といえる。

アンモニアは温泉成分の分析項目ではないので，施設ではその含有の有無を把握していないことが多いが，アンモニアを含む温泉水はかなりの頻度でみられると報告[7]されている。

アンモニア成分以外に，遊離塩素消毒が有効でない温泉の泉質として，鉄・マンガン，硫化水素，フミン酸質などの有機物や，酸性では塩素ガスが発生する恐れがあるpH4以下の酸性泉などがあげられる[8]。

前述の浴槽水の遊離塩素消毒による塩素臭に加えて，有害なトリハロメタン等の消毒副生成物の生成も問題となりえる。

3. 代替消毒法としてのモノクロラミン消毒

米国の水道で採用されていたモノクロラミン消毒は，国内では水道法施行規則第17条（水道の結合残留塩素による消毒は0.4mg/L以上，著しく汚染される恐れがある場合1.5mg/L以上と規定）に記載されている結合塩素に相当し，国内でも飲用に適用可能と考えられる。

3.1 モノクロラミンの殺菌効果と安全性

図2に示すように，3mg/Lのモノクロラミンは，高pH域（pH8.8），40℃の環境下で10^6CFU/mLのレジオネラ属菌を10分間で殺菌できた[9]。アルカリ泉での殺菌効果が期待できる成績である。また，同じ3mg/Lの濃度のモノクロラミンによってレジオネラ属菌の増殖宿主であるアメーバの栄養体やシストの不活化が確認できた[10]。なお，モノクロラミンを浴用に使用した場合に皮膚への刺激性が心配されるが，実験動物を用いた皮膚刺激試験では56mg/Lの濃度のモノクロラミンも無刺激物と判定され，入浴に差し支えないと推測された[11]。

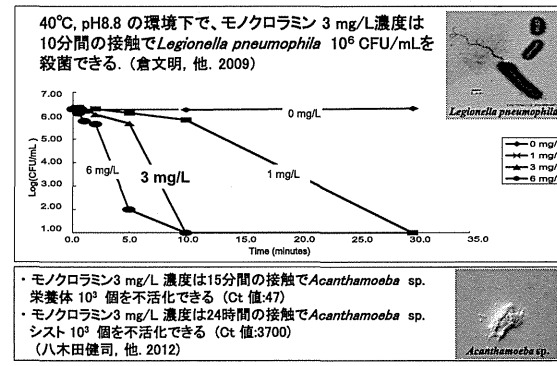


図2 モノクロラミンのレジオネラ，アメーバに対する殺菌・不活化効果

3.2 モノクロラミン消毒の事前適合性試験

温泉水におけるモノクロラミンの安定性を知るために，少量の温泉源泉水にモノクロラミンを3mg/Lの濃度になるよう添加し，ウォーターバスで40℃に保温し，一定時間ごとに，モノクロラミン濃度を測定した。

図3に，アンモニア態窒素を0.4mg/L含む温泉施設の源泉水を使ってモノクロラミン等の安定性試験を行なった結果を示した。本温泉水中ではモノクロラミン濃度は6時間以上安定して維持された。一方，遊離塩素濃度は速やかに低下し30分後には30％に減少した。このように温泉源泉水におけるモノクロラミンの濃度安定性を事前に知ることで，その温泉水におけるモノクロラミン消毒の有効性を事前に予測できた。モノクロラミン消毒の現場への適用判断が容易になると思われる。

なお，遊離塩素消毒が効きにくい温泉成分と言われ

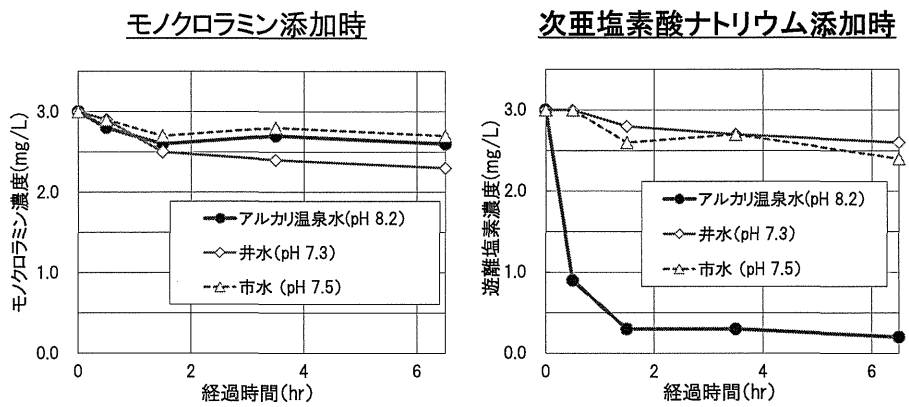


図3 アンモニア態窒素を含む温泉源泉水におけるモノクロラミン等の安定性試験

るアンモニア態窒素，フミン酸，鉄イオン，ヨウ化物イオン，臭化物イオン，硫黄のモノクロラミンに与える影響を調べたところ，モノクロラミンへの影響がほとんどなかったのは，アンモニア態窒素とフミン酸であった。鉄イオンは，モノクロラミンへの影響が見られたものの，濃度低下は遊離塩素よりも小さかった。ヨウ化物イオンは，濃度依存的にモノクロラミン濃度を速やかに低下させた。臭化物イオンは反応速度が遅かったが，ヨウ化物イオンと同様な傾向にあった。硫黄は，モノクロラミンと遊離塩素のいずれでも，添加直後に急速な濃度低下が確認され，系内の硫黄の消費後に塩素濃度が安定した[12]。以上の結果から，モノクロラミンに対しても影響を与える成分が存在することが確認できたが，遊離塩素よりは濃度維持が可能な結果が得られており，遊離塩素処理に替えて温泉施設への適用が期待できる。

4．入浴施設へのモノクロラミン消毒の導入事例

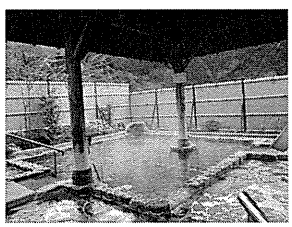
4.1　循環式浴槽施設への導入

泉質の異なった営業中の温泉施設3ヶ所の循環式浴槽（**図4**）で，モノクロラミン消毒の検証試験を行った。対象施設は，1日平均利用者数300～600人規模の露天風呂浴槽（総容量6.5～28㎥）で，泉質は塩化物泉，炭酸水素塩泉で，pHは7.8，8.2，9.0の弱アルカリからアルカリ性であり，アンモニア態窒素を0.4，1.9，4.3mg/L含んでいた。

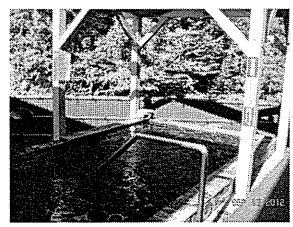
事前に源泉水を使ってモノクロラミン消毒の適合性試験を行ない，各泉質におけるモノクロラミン濃度の安定性を確認した上で，営業施設での実証試験を行った。

4.2　モノクロラミンの生成・注入・測定方法

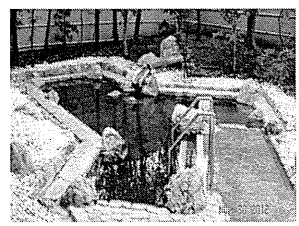
モノクロラミンは，水道水または井戸水に，12％次亜塩素酸ナトリウム溶液と20％塩化アンモニウム溶液を順次添加して生成した。この時の両剤のモル比



・泉質：ナトリウム－炭酸水素塩泉、pH9.0、アンモニア態窒素 1.9 mg/L含む
・公衆浴場の露天風呂
・浴槽容量：20m³
・利用者数：平均319人/日



・泉質：ナトリウム－塩化物泉、pH7.8、アンモニア態窒素 4.3 mg/L含む
・公衆浴場の露天風呂
・浴槽容量：6.5m³
・利用者数：平均587人/日



・泉質：ナトリウム－カルシウム塩化物泉、pH8.2、アンモニア態窒素 0.4 mg/L含む
・ホテルの露天風呂
・浴槽容量：28m³
・利用者数：平均480人/日

図4　モノクロラミン消毒を実施した営業中の温泉施設の概要

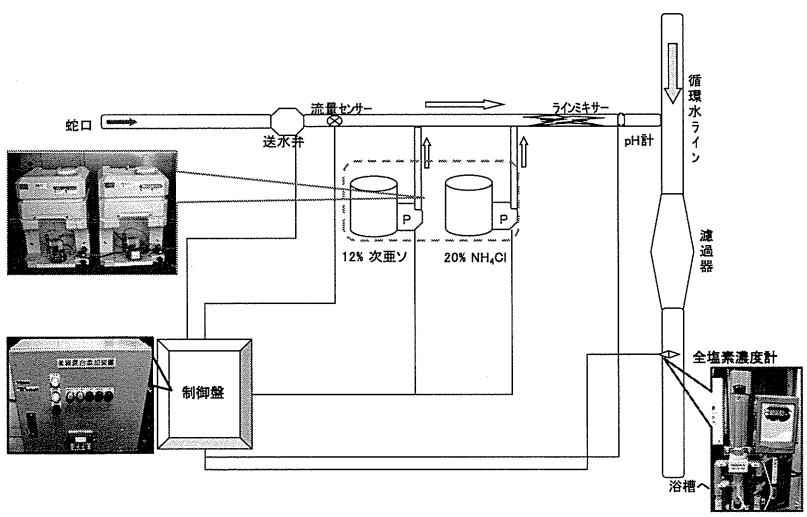


図5　モノクロラミンの自動生成・注入・測定方法

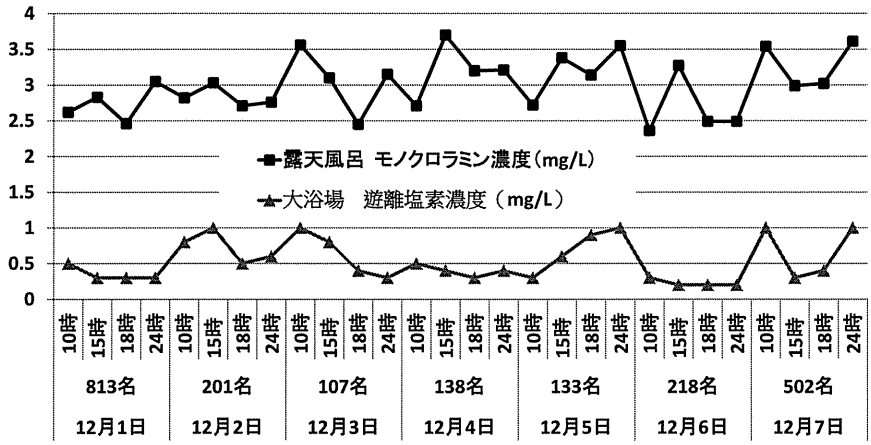


図６　モノクロラミン消毒浴槽と遊離塩素消毒浴槽の各塩素濃度と入浴者数

は遊離塩素に対してアンモニアを過剰（1 ： 2.5）とし，ジクロラミンおよびトリクロラミン生成の抑制に努めた。

モノクロラミンの注入方法は，ヒトの手による投入も可能[13]であるが，機械による注入が便利で確実である。機械による注入はモノクロラミン生成装置と全塩素濃度測定計器を組み合わせて濃度を自動制御する方法（**図 5**）[14]と，新湯の追加量に応じ一定量のモノクロラミンを注入し，濃度を一定に保つタイマー注入方式[15]のいずれかを採用した。モノクロラミンは循環系統のろ過器前に注入した。

図 6 に，一施設のモノクロラミン消毒浴槽と対照浴槽である遊離塩素消毒浴槽で測定した各塩素濃度と入浴者数を示した。モノクロラミン消毒の露天風呂浴槽水の濃度は入浴者数にかかわらず一定の濃度範囲（2.5 ～ 3.5mg/L）を安定して維持することができた。モノクロラミン濃度が，入浴者数にかかわらず安定して保たれることは，新湯の補給に合わせてタイマー注入する方式の施設でも同様であった。

4.3　モノクロラミンの消毒効果

モノクロラミン濃度を自動制御する方法と，タイマー注入方式のいずれを用いた施設でも，レジオネラ属菌は一切検出されず，レジオネラ属菌の増殖の場となる自由生活性アメーバも不検出であった。代表して一施設の微生物検査と各種塩素濃度の結果を**表 1** に示した。他の一施設では事前に実施した遊離塩素管理時の検査で，温泉水に含まれるアンモニアの影響で浴槽水からは遊離塩素は検出されず（不連続点塩素処理が出来ていないため），レジオネラ属菌が検出された。一方，モノクロラミン消毒時にはレジオネラ属菌，アメーバともに不検出であり，モノクロラミン消毒の優位性が確認された。

本稿では詳しく述べないが，鉄イオンを含む鉄泉の温泉施設や井戸水の沸かし湯[15]でもモノクロラミン消毒の有効性が確認できた。

また，浴槽水の消毒だけでなく，モノクロラミン消毒によるバイオフィルム除去や形成抑制効果も明らかになった。各施設のヘアキャッチャー接続配管内面を手で拭き取ったところ，モノクロラミン消毒実施時に

表１　アンモニア態窒素 0.4mg/L を含む温泉営業施設のモノクロラミン消毒の各種塩素濃度と微生物検査結果

		対照浴槽	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目	5 週目	6 週目
微生物検査	レジオネラ属菌数(CFU/100mL)	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10	＜10
	アメーバ数(個/50mL)	＜1	＜1	＜1	＜1	＜1	＜1	＜1
	従属栄養細菌数(CFU/mL)	＜1	1.1×10^2	5.2×10^2	1.0×10^3	1.7×10^3	1.6×10^4	7.2×10^2
塩素濃度	モノクロラミン(mg/L)	0.1	2.6	3	3.4			2.2
	ジクロラミン(mg/L)	0.1	＜0.1	＜0.1	＜0.1			0.1
	トリクロラミン(mg/L)	＜0.015	＜0.015	＜0.015	＜0.015			＜0.015
	遊離塩素(mg/L)	1.2	＜0.1	＜0.1	＜0.1			＜0.1
現場簡易検査	モノクロラミン(mg/L)	0.35	3.6	3.2	3.5	4.0	3.3	3.7
	全塩素(mg/L)	1.5	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	遊離塩素(mg/L)	1	0.1	0.1	＜0.1	＜0.1	＜0.1	＜0.1
	遊離アンモニア(mg/L)	ND	0.32	0.55	0.4	0.25	0.35	0.3

は汚れが全くつかず，遊離塩素消毒時の拭き取りの汚れの著しさと大きく異なることが目視で確認できた（図7）。

モノクロラミンは遊離塩素よりもバイオフィルムへの浸透性が高く，バイオフィルム内の細菌を効果的に殺菌できることは実験的にも確認されている[16]。このようなモノクロラミンによるバイオフィルムの制御効果は，欧米の病院の循環給湯系でも実証され，配管内の給湯水のモノクロラミン濃度を1.5～3mg/Lに保持することで，配管内のレジオネラ属菌の増殖・定着を抑制し，レジオネラ症の院内感染を予防できたと報告されている[17, 18]。

4.4 塩素臭と消毒副生成物の低減効果

表1の中欄に，一施設の浴槽水の各種塩素濃度を示した。塩素臭の原因物質の一つであるトリクロラミンは，3施設ともモノクロラミン消毒期間中は全く検出されず，入浴者へのアンケートでも塩素臭の苦情はなかった。過去にレジオネラ症の集団発生があった施設では，入浴者からの塩素臭の苦情で遊離塩素濃度を低く抑えていたとの話も聞く。モノクロラミン消毒時に塩素臭がないことは，入浴者のみならず，確実な殺菌が求められる施設の衛生管理担当者にとっても好ましいことと思われる。

図8に，一施設の浴槽水中の総トリハロメタンの濃度を示した。遊離塩素消毒時は153 μg/Lと高い値であったが，モノクロラミン消毒導入後（12月6日以降）は1/50程度（3 μg/L）以下まで低減できた[19]。モノクロラミン消毒は消毒副生成物の低減化に概ね有効であると思われた。

なお，ヨウ素イオンを含む施設の浴槽水では，モノクロラミン処理により，ヨウ素化トリハロメタンの生成量が増加した[20]。ヨウ素イオンはモノクロラミン濃度を低下させることが分かっており[12]，ヨウ素イオン

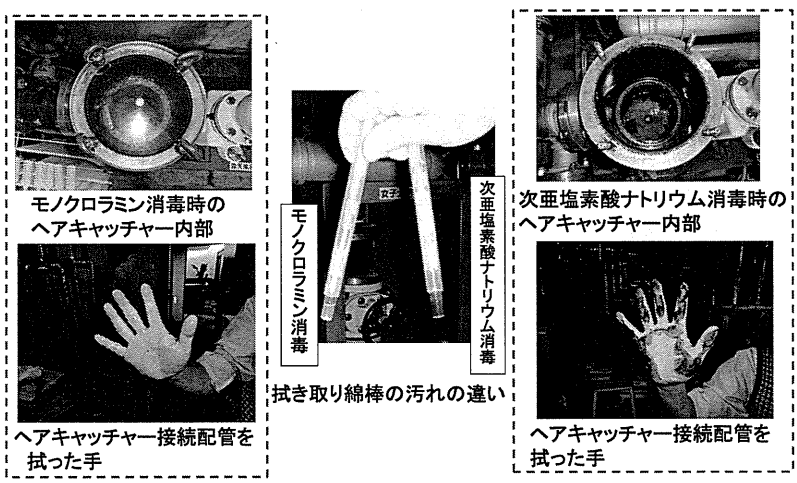


図7　モノクロラミン消毒（3mg/L）時と遊離塩素消毒（0.5～1mg/L）時のヘアキャッチャー配管内の拭き取りの比較

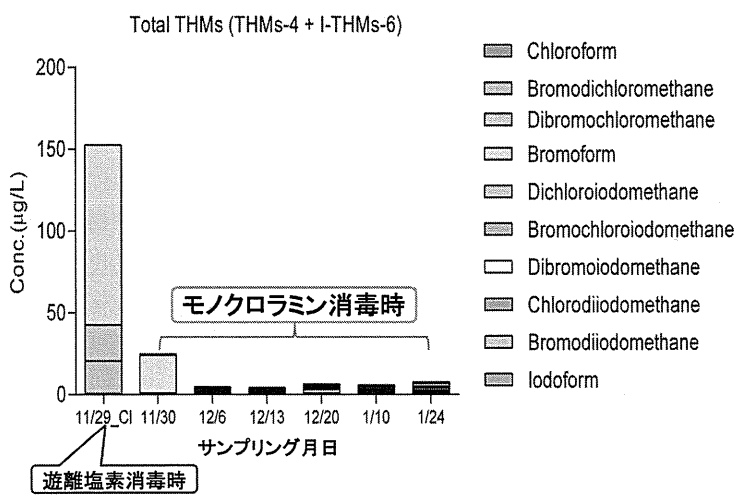


図8　浴槽水中のトリハロメタンの濃度（神野透人，他，2013）

を含有する温泉水へのモノクロラミンの適用の可否については更に検討していきたい。

4.5 掛け流し式浴槽への導入

全国の循環系を持たない掛け流し式温泉の29.5%(119/403)の試料からレジオネラ属菌が検出されている[21]。静岡県内のアルカリ泉質(pH9.0)の掛け流し式温泉施設でも源泉水のレジオネラ属菌汚染に苦慮していた。そこで,5年前から源泉水のモノクロラミン消毒を導入した。消毒前の源泉水からは現在もレジオネラ属菌が検出されるが,モノクロラミン濃度が3mg/Lになるよう源泉タンク内に連続注入され配湯された浴槽水からは,レジオネラ属菌,自由生活性アメーバともに検出されず,十分な消毒効果が得られている[22]。入浴者から塩素臭の苦情はなく,現在も安定したモノクロラミン消毒を実施中である。

源泉温度が55℃以下の掛け流し式温泉施設では,源泉タンク内でレジオネラ属菌の増殖がみられることがある。その時は先ず源泉タンク内の洗浄消毒が行われるが,消毒後もレジオネラ属菌が検出される場合は,源泉水そのものの汚染が疑われ,源泉水を消毒する必要が出てくる。その場合も,源泉タンクから浴槽に至るまでの配管も含め,長時間安定して薬剤濃度が保持される,またヒトの入浴に伴う有機物による失活もない,モノクロラミン消毒が有効であろう。

4.6 モノクロラミン消毒の注意点

モノクロラミン溶液は,水道水や井戸水に,次亜塩素酸ナトリウムとアンモニウム源である塩化アンモニウム溶液などを混合させて作成する($HClO + NH_3 \rightarrow NH_2Cl + H_2O$)。この高濃度溶液は保存がきかず[23],オンサイトでの用時調製が必要となる。

また,モノクロラミン溶液作成時にアンモニウム源が不足したり,pHが酸性側に傾くと,モノクロラミンから悪臭の原因となるジクロラミン($NH_2Cl + HOCl \rightarrow NHCl_2 + H_2O$)や,トリクロラミン($NHCl_2 + HOCl \rightarrow NCl_3 + H_2O$)が生成される可能性があり[6]注意しなければならない。

さらに,モノクロラミンを注入した浴槽水に高濃度の次亜塩素酸ナトリウムを加えることは,モノクロラミン濃度の低下や上記のトリクロラミンの生成による悪臭発生を招く恐れがある。同様に,モノクロラミン処理浴槽の配管洗浄時に次亜塩素酸ナトリウムを使用することは避けたほうが良い。モノクロラミン管理時の配管洗浄には高濃度モノクロラミン(終濃度20mg/L程度)の使用が安全で効果的である[15]ことを確認している。

モノクロラミンは遊離塩素と同様に魚類に毒性があり,その排水時には中和が必要となる場合がある。排水を下水に接続している施設では必要ないが,河川に放流するような施設ではモノクロラミンを薬剤で中和しなければならない。中和剤としてチオ硫酸ナトリウムや亜硫酸ナトリウムが使用できる[15]。

5. モノクロラミン消毒の条例への記載

静岡市では,本研究成果等を根拠として,静岡市公衆浴場法施行条例及び静岡市公衆浴場法等の施行に関する規則並びに静岡市旅館業法等施行条例及び静岡市旅館業法等の施行に関する規則において,平成25年4月1日から,浴槽水の消毒方法として遊離残留塩素による方法とモノクロラミンによる方法を併記し,どちらかを選択できることとした(**表2**)。具体的にモノクロラミン消毒を条例に盛り込むのは全国で初めてである。静岡市内には高pHのアルカリ泉やアンモニア態窒素を含む温泉が多い。温泉水質等から判断して,より効果的で合理的な消毒方法を選択出来るこの条例は営業者にも望ましいものと思われる。この条例の趣旨が全国的に理解され普及していくことを期待している。

表2 静岡市公衆浴場法施行条例どのように規定したか

(1)浴槽水に塩素系薬剤を投入する方法。この場合において,浴槽水の遊離残留塩素濃度は,1リットル中0.2ミリグラム(気泡発生装置,ジェット噴射装置その他の微小な水粒を発生させる設備(以下「気泡発生装置等」という。)を使用する浴槽の浴槽水にあっては,1リットル中0.3ミリグラム以上に保つものとする。
(2)浴槽水にモノクロラミンを投入する方法。この場合において,浴槽水のモノクロラミン濃度は,1リットル中3ミリグラム以上に保つものとする。

どちらかを営業者が選択できる

厚生労働省の通知によると,現時点でもモノクロラミン消毒の採用は問題無いと解釈されているが,普及には通知等に具体的なモノクロラミンの語句を入れることや,各地方自治体の条例にモノクロラミン消毒が採用されることが効果的であろう。

6. おわりに

浴槽水のモノクロラミン消毒は,遊離塩素消毒に比

べ，濃度が安定して維持され，消毒効果が長期間持続し，消毒副生成物の生成が少なく，配管等に付着するバイオフィルムの殺菌と形成抑制ができること，不快な塩素臭や人体に有害な消毒副生成物が低減できることなどの利点が多いことがわかった。

モノクロラミン消毒は，すでに欧米の水道[4, 5]や給湯系[17, 18]で実施され，配管等に付着するバイオフィルムの殺菌と形成抑制が可能で，レジオネラ症発生の予防に効果的であると報告されている[24]。日本でも，温泉水等にモノクロラミン消毒を採用することで，年に1,000名以上の患者届出がされているレジオネラ症の発生防止に効果があると期待される。モノクロラミン消毒が浴槽水のレジオネラ対策に苦慮する施設，指導する行政，利用者にとっての安全性向上と，いずれの立場にとっても有用な消毒方法になることを期待したい。

7. 謝辞

本研究は，厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業の「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」〔研究代表者：倉文明．H25 - 健危 - 一般 - 009〕及び「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」〔研究代表者：倉文明．H22 - 健危 - 一般 - 014〕と健康安全・危機管理対策総合研究事業の「公衆浴場における レジオネラの消毒方法の研究」〔研究代表者：遠藤卓郎．H19 - 健危 - 一般 - 015〕）で，以下の方々と共同で実施した。

長岡宏美，佐原啓二，神田隆（静岡県環境衛生科学研究所），縣邦雄（アクアス（株）つくば総合研究所），市村祐二，江口大介，青木信和（ケイアイ化成（株）），久保田明（中伊豆温泉病院），田中慶郎，横山博（（株）マルマ），富田敦子，和田裕久（静岡市環境保健研究所），片山富士男（静岡市保健所），神野透人，岡元陽子，田原麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所），小坂浩司（国立保健医療科学院），泉山信司，八木田健司，遠藤卓郎，倉文明（国立感染症研究所）

【参考文献】

1) 岡田美香，河野喜美子，倉文明，前川純子，渡辺治雄，八木田健司，他：循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例Ⅰ．発生状況と環境調査．感染症学雑誌 79 巻 p.365-74 2005.
2) Kuroki T, Ishihara T, Ito K. Kura F.： Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan, with a special focus on Legionella concentrations in water. Jpn J Infect Dis. 62（3）p.201-5 2009.
3) Taguri T, Oda Y, Sugiyama K, Nishikawa T, Endo T, Izumiyama S, Yamazaki M, Kura F.： A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of *Legionella* in bath water. J Microbiol Methods. 86（1）p.25-32 2011.
4) Seidel CJ, McGuire MJ, Summers RS, Via S.： Have utilities switched to chloramines? J Am Water Works Assoc. 97 p.87-97 2005.
5) Flannery B, Gelling LB, Vugia DJ, Weintraub JM, et al.： Reducing *Legionella* colonization of water systems with monochloramine. Emerg Infect Dis. 12（4）p.588-96 2006.
6) 環境・衛生部会試験法委員会：衛生試験法・注解 2010 p.748 日本薬学会編
7) 小高陽子，成冨武治，中川和好，日向瞳，福島得忍：源泉における温泉水の水質変化について．千葉県衛研年報 第 54 号 p.84-90 2005.
8) 甘露寺泰雄：適正利用としての浴槽衛生管理と資源の集中管理．NPO 法人健康と温泉フォーラム資料
9) 倉文明，泉山信司：モノクロラミンのレジオネラに対する殺菌作用．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業．公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究（研究代表者 遠藤卓郎）．平成 20 年度分担研究報告書．p.15-24 平成 21 年.
10) 八木田健司，泉山信司：レジオネラ属菌対策における宿主アメーバの管理 - モノクロラミンの *Acanthamoeba* に対する不活化効果 - ．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業．公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究（研究代表者 倉文明）．平成 23 年度総括・分担研究報告書．p.179-182 平成 24 年.
11) 神野透人，泉山信司，香川（田中）聡子，高橋淳子，畔上二郎：モノクロラミンの皮膚一次刺激性に関する研究．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業．公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究（研究代表

者　遠藤卓郎）平成 20 年度分担研究報告書. p.30-47 平成 21 年.

12) 青木信和，市村祐二，江口大介，杉山寛治，泉山信司，小坂浩司，片山富士男，和田裕久，富田敦子：アンモニウムイオン，ヨウ化物イオン等が塩素剤の安定性に与える影響．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業．レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究（研究代表者　倉文明）平成 25 年度総括・分担研究報告書. p.51-58 平成 26 年.

13) 杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，縣邦雄，遠藤卓郎：モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策．保健医療科学 59（2）p.109-115 2010.

14) 佐原啓二，縣邦雄，神野透人，八木田健司，杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，片山富士男，他：モノクロラミンによる循環式浴槽の消毒効果について - 営業施設における検証試験 - ．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究（研究代表者倉文明）平成 24 年度総括・分担研究報告書. p.27-38 平成 25 年.

15) 縣邦雄，神野透人，八木田健司，杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，長岡宏美，片山富士男，他：種々の温泉水におけるモノクロラミン消毒効果と高濃度洗浄の検証．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究（研究代表者　倉文明）平成 25 年度総括・分担研究報告書. p.35-50 平成 26 年.

16) Lee WH, Wahman DG, Bishop PL, Pressman JG：Free chlorine and monochloramine application to nitrifying biofilm: comparison of biofilm penetration, activity, and viability. Environ Sci Technol. 45（4）p.1412-9 2011.

17) Kool JL, Carpenter JC, Fields BS. Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. Lancet. 353（9149）p.272-7 1999

18) Casini B., Totaro M., Valentini P., Baggiani A., Privitera G.：Long-term effects of monochloramine disinfection for *Legionella* and other waterborne bacteria control in a hospital water network. The 8th international conference on *Legionella*. Book of abstracts. p.82 2013.

19) 神野透人，佐原啓二，縣邦雄，香川（田中）聡子，岡元陽子，真弓加織，杉山寛治，小坂浩司：消毒副生成物の暴露評価．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究（研究代表者　倉文明）平成 24 年度総括・分担研究報告書．p.49-58 平成 25 年.

20) 神野透人，縣邦雄，八木田健司，香川（田中）聡子，田原麻衣子，岡元陽子，河原陽子，真弓加織，他：消毒副生成物の暴露評価．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究（研究代表者　倉文明）平成 25 年度総括・分担研究報告書. p.59-68 平成 26 年.

21) 烏谷竜哉，黒木俊郎，大谷勝実，山口誠一，佐々木美江，齊藤志保子，藤田雅弘，杉山寛治，中嶋洋，村上光一，田栗利紹，藏元強，倉文明，八木田健司，泉山信司，前川純子，山崎利雄，縣邦雄，井上博雄：掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子．感染症学雑誌 83 巻 1 号 p.36-44 2009.

22) 杉山寛治，縣邦雄，神田隆，泉山信司，小坂浩司：掛け流し式浴槽水に対するモノクロラミン消毒方法の導入．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究（研究代表者　倉文明）平成 22 年度総括・分担研究報告書．p.33-40 平成 23 年.

23) 縣邦雄，泉山信司，神澤啓：結合型塩素による浴槽水の消毒効果の評価．厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業．公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究（研究代表者　遠藤卓郎）平成 21 年度分担研究報告書．p.33-46 平成 22 年.

24) Kool, J. L., Carpenter, J. C., Fields, B. S.: Monochloramine and Legionnaires' disease. Journal AWWA. 92（9）p.88-96 2000.

レジオネラ症
Legionellosis

倉　文明* *KURA Fumiaki*

1 基本病因，発症機序

1976年，米国フィラデルフィアのホテルで開催された在郷軍人の大会で，221例が肺炎を発症し，34例が死亡した。その原因となった細菌は*Legionella pneumophila*（レジオネラ・ニューモフィラ）と命名された（レジオネラ肺炎）[1]。一方，1968年，米国ポンティアックではインフルエンザ様疾患の集団発生を認めた。その原因細菌がレジオネラであることが，1979年に判明した（ポンティアック熱）[1]。

レジオネラ症は4類感染症（全数把握）であり，診断した場合には直ちに保健所に届ける義務がある。

1. 起因菌

レジオネラ症の原因菌であるレジオネラ属菌は，水中や湿った土壌などの自然環境に存在している細菌で，20～45℃で繁殖し，循環式浴槽水，空調施設の冷却塔水，給湯水などの人工的な温水中に生息するアメーバなどの細胞内でも増殖している。レジオネラ属（genus *Legionella*）は，57種，70以上のserogroupが存在する[2]。ヒトからもっとも多く分離されるのは*L. pneumophila*で，とくに血清群1（83%）が多く，続いて血清群2，3，6が多い[3]。

レジオネラ属菌は好気性グラム陰性桿菌であるが，通常の培地では増殖しない。システインを含む培地（BCYE-α），さらに抗菌薬を含有した培地（WYO，MWY，BMPA）が用いられる。また，培養に3～5日を要する。熱に比較的強いが，60℃では*L. pneumophila*の1/10減少時間は2分である。食細胞内に貪食されても殺菌されず増殖する細胞内寄生体である。

2. 疫学

小児の報告例は少ない。2008年1月から2012年12月までに，国内で31例の無症状病原体保有者を含む4,081例が報告された[3]。平均年齢は67.0歳（0～103歳）で男性が多い（81%）。15歳未満の報告は17例（うち5歳未満が14例，肺炎型が14例）のみであった。

レジオネラ肺炎は，市中肺炎の2～9%を占める。レジオネラ肺炎の危険因子として，喫煙や慢性の肺疾患，移植患者などが知られている[4]。成人の感染は市中あるいは院内感染であるのに対し，小児の場合は，免疫不全や術後・新生児感染の場合である[4]。

Levyらは，1989年以降の新生児レジオネラ感染症（主に肺炎）の9症例を1998年にまとめた[5]。それによると，正常新生児は2例と少なく，早期産児や基礎疾患（心疾患，免疫不全など）をもつ新生児は7例と多かった。起因菌は*L. pneumophila*血清群1が多かった。加湿器による新生児の院内集団感染が，日本（1996年）やキプロス（2008年）[6]で発生した。24時間風呂で出生した新生児の感染も報告された[7]。いずれも死亡例が含まれている。

2 基本病態（図）

1. 潜伏期

レジオネラ肺炎の潜伏期は2～10日間，ポンティアック熱の潜伏期は平均36時間と短い。

2. 感染様式，感染経路

汚染された水や温水自体を吸引したり，そのエアロゾルを吸入することによって感染が成立す

* 国立感染症研究所細菌第一部
〔〒162-8640　東京都新宿区戸山1-23-1〕
TEL 03-4582-2687　FAX 03-5285-1163
E-mail：fkura@nih.go.jp

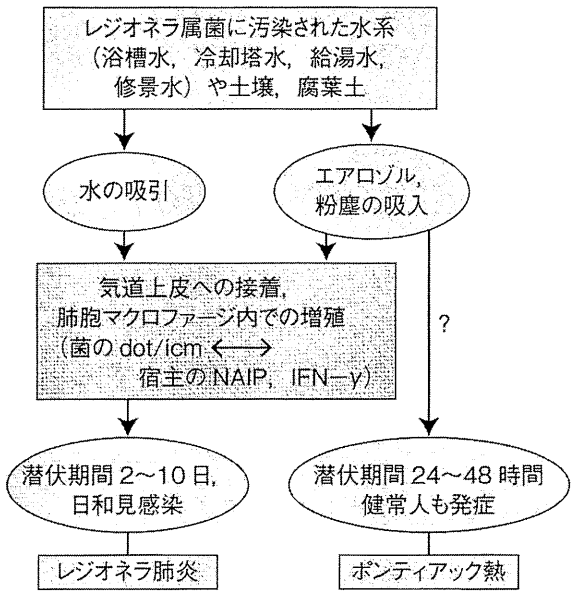


図　レジオネラ症の2つの型とその発症の病態生理

る。ヒト→ヒト感染は報告されていない。感染源は病院，高齢者施設，ホテルや大型船などの水系，温泉，24時間風呂，渦流浴，噴水，加湿器，家庭の飲用水などである。レジオネラ属菌の増殖は，至適水温（25〜42℃），水の停滞で加速される。また藻類やアメーバなどの微生物の存在によって促進する[4]。

レジオネラ属菌は吸引や吸入によって，鞭毛や線毛を介して呼吸器上皮細胞や肺胞マクロファージに接着する。菌はMip（macrophage infectivity potentiator）により効率よく貪食されるが，その殺菌機構（phagosome-lysosome fusion）を逃れて細胞内で増殖できる。この機構を逃れるのに関与する遺伝子はdot（defective organele trafficking）geneあるいはicm（intracellular multiplication）geneとよばれている。また，細胞内増殖に関与する宿主側の遺伝子はマウスのレジオネラ感受性の系統差から*Lgn-1*として報告され，現在はNAIP（neuronal apoptosis inhibitory protein）とよばれている。上記のように菌は食細胞内で増殖できるため，細胞性免疫が宿主の感染防御の主体となる。液性免疫として抗体は産生されるが，感染防御には有効でない。

3 病態生理からみた臨床症状

レジオネラ症は，重症化しやすい肺炎と，自然軽快するポンティアック熱とに分けられる。成人も含めた発生動向調査によると，レジオネラ症全体では，発熱（92%），肺炎（90%），咳嗽（48%），呼吸困難（44%），意識障害（17%），下痢（9.8%），多臓器不全（8.5%），腹痛（2.5%）が認められた[3]。

1. レジオネラ肺炎

上記の症状以外にレジオネラ肺炎では，悪寒（42〜77%），頭痛（40〜48%），筋肉痛（20〜40%），嘔気や嘔吐（8〜49%），意識障害，傾眠，幻覚，歩行障害などの神経症状（4〜53%），胸痛（13〜35%）などがある[1]。また，高齢者では比較的徐脈がみられることもある。病初期の咳は乾性であまり目立たない。播種性血管内凝固症候群や糸球体炎，横紋筋融解症などをひき起こすこともある。

1）小児のレジオネラ肺炎

症状の記載された日本の15歳未満，10例では，発熱（7/10），咳嗽（7/10），呼吸困難（3/10），下痢（3/10），腹痛（1/10），多臓器不全（1/10）であった（文献3の元となった感染症発生動向調査より）。

2）新生児のレジオネラ肺炎

症状は，主に呼吸障害と発熱である[5]。嘔吐もみられた[7]。

2. ポンティアック熱

主症状は発熱で，そのほかに悪寒，筋肉痛，倦怠感，頭痛などの感冒様症状を伴う。予後は良好で通常7日以内に自然治癒する。小児での報告は少ないが，1988年に英国で渦流浴を介した31例の小児（成人も含めると187例）の*L. micdadei*による集団感染があった[8]。成人に比べ小児のほうが症状が短期間で消え，関節痛や息切れを示す割合も低かった。

4 病態生理からみた診断のための臨床検査

診断には，潜伏期間中の行動を問診し，病歴，

症状からレジオネラ症を疑うことが大切である。グラム染色で喀痰中の細菌がほとんど染まらず，ヒメネス染色やアクリジンオレンジ染色で染まることが診断の助けとなる。白血球増加，血小板減少，低リン酸血症，肝機能障害，腎機能障害，血尿がみられることがある[1]。ほかの肺炎に比し，低ナトリウム血症(≦130 mEq/L)の頻度が高い。βラクタム薬やアミノグリコシド系薬剤が無効の肺炎は，マイコプラズマやクラミジア肺炎のほか，レジオネラ肺炎の可能性を示唆する。新生児においても，白血球が著明に増加（～80,000/μL）することもある[5]。

特徴的なX線所見はないとされながらも，成人では葉性の斑状浸潤影（patchy infiltrate）が特徴的で，硬結（consolidation）に進展する[1]。胸水がみられることもある。結節性陰影や空洞化は，免疫抑制薬を投与している患者にみられる。小児では，Campinsらが経験した5例の院内感染例において，硬結，浸潤影のほか，肺膿瘍も合併した症例があった。新生児では，浸潤影，空洞像，肺炎像，気管支肺炎像，肺胸膜炎像などがみられる(両側＞片側)[5]。

培養，尿中抗原検査，核酸同定検査は，保険適用である。尿中抗原検査や核酸同定検査は迅速ですぐれた検査である。感染源の解明のためには培養法により菌を分離することが重要である。

1. 培養

喀痰を採取し，選択培地で培養を実施する。WYOα培地ではレジオネラ属菌でない菌がコロニーを形成することもあるので，そのコロニー由来の菌がBCYE-α培地（L-システイン不含）で増殖しないことを確認する。ビー・エム・エル(BML)，LSIメディエンスなどの検査会社が受けつけている。菌株の分離は，感染源の特定のために行う遺伝子型検査（PFGE法やSBT法）に必要である。菌株識別のためのこれらの検査については，地方衛生研究所や国立感染症研究所に相談されたい。臨床分離株については，菌株が送付されれば，ST（sequence type）を同定して情報をフィードバックしている。

2. 尿中抗原検査

①BinaxNOWレジオネラ，②Qライン極東レジオネラ，③チェックレジオネラ，などがある。測定原理はイムノクロマト法で，特別な装置を必要とせず，ベッドサイドで簡単に尿中抗原を検出できる。注意点は，*L. pneumophila* 血清群1のみを対象とすること，治療に伴い陰性となること，軽症例では抗原量が少ないためか陽性率が低くなることなどである。現在，発生動向調査の届出の96%は，この検査で確定診断されている[3]。

3. そのほかの抗原検査，レジオネラ免疫血清“生研”

分離された菌が，レジオネラ属菌と同定された場合，その菌株を用いて血清群（*L. pneumophila* 血清群1～15，*L. bozemanii*，*L. dumoffii*，*L. gormanii*，*L. micdadei*）を特定する。検体中の抗原と試薬中の血清が抗原抗体反応を起こし，生じた凝集塊を目視するものである。試験管，マイクロピペット，オートクレーブ，スライドグラスなどの器具や装置が必要である。

4. 血清抗体

以下の①②のいずれかを満たすとき，レジオネラ症と診断できる(国内症例全数届出の基準)。①単一血清で256倍以上，あるいは，②ペア血清による抗体陽転または抗体有意上昇で少なくとも1回は128倍以上。尿中抗原陰性，培養陰性の場合の確定診断に，また集団感染の疫学調査などに有効である。

1）レジオネラ凝集反応用抗原“生研”

マイクロプレート凝集法である。湿潤箱，96ウェルマイクロプレート，マイクロピペットなどを必要とし操作から判定まで1日弱かかる。*L. pneumophila* 血清群1A，1B，2～6，*L. bozemanii*，*L. dumoffii*，*L. gormanii*，*L. micdadei* の各々に対する血清抗体価を検出できる。本法では，IgMによる凝集反応をみるので，急性期および発症後2～3週後のペア血清を試験するのがよい。陰性の場合は5～6週後の血清も試験する。

2）IFA（蛍光抗体法）

L. pneumophila 血清群1～6を混合した抗原に対するIFAが利用できる。検査会社などに相談されたい。

5. 核酸同定検査

LAMP（loop-mediated isothermal amplification）

法あるいはPCR法による核酸同定検査がある。LAMP法は喀痰を試料として保険適用となっていて，検査会社で実施できる。血清や尿からも核酸は検出される。尿中抗原が*L. pneumophia*血清群1の検出に限られるのに対して広くレジオネラ属菌を検出できるので，感度の高い有望な新しい検査方法といえる。

5 治療目標とその手順，および症状・検査所見からみた効果判定指標

小児レジオネラ肺炎に対する確立した治療法はない。

成人の肺炎治療として，マクロライド（アジスロマイシン）やキノロン系（レボフロキサシン）の効果が優れているとして評価されている[9]。これらは，従来のマクロライドであるエリスロマイシンよりも，細胞内活性が高いこと，肺組織・肺胞マクロファージ・白血球への移行が優れていること，投与回数が少なくてすむこと，消化器系の副作用が少ないことから推奨されている。キノロン系（パズフロキサシン，シプロフロキサシン，レボフロキサシン）の薬剤は注射薬でも販売されており，消化管吸収障害などの可能性の観点から，初期治療には注射薬が勧められ，軽症以外の第一選択薬である。治療量・治療期間はアジスロマイシンでは500 mg/日・分1・3日間，レボフロキサシンでは500 mg/日・分1・10～14日間とされる[9,10]。注射剤にはエリスロマイシン（適応外使用）やアジスロマイシンもある。

抗菌薬投与中においてもしばらくの間，胸部X線所見が悪化する。所見が正常化するまでには数か月かかることもある。

小児の肺炎治療として，マクロライド系薬剤が第一選択となる。キノロン系は禁忌である。アジスロマイシン経口10 mg/kg/日・分1・3日間，エリスロマイシン経口25～50 mg/kg/日・分4，クラリスロマイシン経口15 mg/kg/日・分2～3が投与される[11]。やむをえずキノロン系薬剤を使う際には，十分な説明が必要である。

なお，一般に，ポンティアック熱には抗菌薬は必要ない。

環境検査と消毒

「レジオネラ症防止指針，第3版[12]」には，病院を含む建築物におけるレジオネラ症防止対策について記載されている。①エアロゾル化，②環境，③宿主側の3要因について感染危険度を点数化し，その合計点数に応じた対応（定期的な水培養検査の頻度など）が決められている。菌が実際に検出された場合には，以下の①，②のように対応する。

① 人がエアロゾルを直接吸引する可能性が低い人工環境水であっても，100 CFU/100 mL以上の菌が検出された場合には，直ちに菌数を減少させるために清掃・消毒などの対策を講じる。また，対策実施後は菌数が検出限界以下であることを確認する。

② 浴槽水，シャワー水など，人が直接エアロゾルを吸引するおそれのあるものは，菌数の目標値を10 CFU/100 mL未満とし，検出された場合には直ちに清掃・消毒などの対策を講じる。また，対策実施後は菌数が検出限界以下であることを確認する。

給湯システムの除染には，水温を70℃以上に上昇させフラッシュなどが必要である[9,12]。給水系を塩素からモノクロラミンに変えてレジオネラ感染リスクが減少したという報告もある[12]。

6 よくある合併症の病態生理とその診断・治療・予防[1,9]

肺外合併症はまれである。菌血症を起こし，心合併症（心筋炎，心膜炎，さらには人工弁心内膜炎）を併発することが知られている。また，免疫不全者では蜂窩織炎，副鼻腔炎，敗血症性関節炎，直腸周囲の膿瘍，膵炎，腹膜炎，腎盂腎炎などが起こることが報告されている。汚染された水により，手術部位感染を起こすこともある。心内膜炎の成人ではキノロン系にアジスロマイシンを加え，3～6か月間治療を続ける。そのほかの肺外合併症においても，アジスロマイシンかキノロン系による治療を14～21日間続ける。

7 症状経過，検査所見からみた予後判定

初期治療（抗菌薬）の遅延，宿主の免疫状態，治療開始時の重症度が，予後を左右する[9]。致命率は高く，有効な抗菌薬による治療を受けた健康成人で5%，免疫抑制患者で20%であり，無治療の健康人で15～20%，免疫抑制患者で80%と報告されている[13]。

培養陽性の小児レジオネラ肺炎のうち，正常小児が肺炎になったのは15例未満だが，免疫抑制状態の小児は70例未満と多く報告されている[13]。66例の19歳未満のレジオネラ肺炎を集計したCDCの報告では，30%の症例に1つ以上のリスク因子があり，22%が死亡している。Levyらがまとめた新生児レジオネラ感染症（主に肺炎）の9例中6例が死亡しており，うち5例がエリスリマイシンを投与されていなかった[5]。

謝辞　この総説は，第4版の新庄正宜博士の総説をもとにしている。

文献

1) Pedlo-Botet ML, Stout JE, Yu VL：Clinical manifestations and diagnosis of Legionella infection. UpToDate Topic 7035, Ver 8.0, Dec 2013
2) 中臣昌広：レジオネラ症対策のてびき，倉　文明（監），日本環境衛生センター，2013
3) 国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課：レジオネラ症2008.1～2012.12．病原微生物検出情報 **34**：155-157，2013　http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/ra/legionella/687-idsc/iasr-topic/3611-tpc400-j.htmlIdisease/legionellosis/sokuho0718.html（2014年8月23日アクセス）
4) Pedro-Botet ML, Stout JE, Yu VL：Epidemiology and pathogenesis of Legionella infection. UpToDate Topic 7029, Ver 8.0, Dec 2013
5) Levy I, Rubin LG：*Legionella* pneumonia in neonates：a literature review. J Perinatol **18**：287-290, 1998
6) Yiallouros PK, Papadouri T, Karaoli C, et al：First outbreak of nosocomial *Legionella* infection in term neonates caused by a cold mist ultrasonic humidifier. Clin Infect Dis **57**：48-56, 2013
7) Nagai T, Sobajima H, Iwasa M, st al：Neonatal sudden death due to *Legionella pneumonia* associated with water birth in a domestic spa bath. J Clin Microbiol **41**：2227-2229, 2003
8) Goldberg DJ, Emslie JA, Fallon RJ, et al：Pontiac fever in children. Pediatr Infect Dis J **11**：240-241, 1992
9) Pedro-Botet ML, Yu VL：Treatment and prevention of Legionella infection. UpToDate Topic 7025, Ver 9.0, Dec 2013
10) 浦部昌夫，島田和幸，川合眞一（編）：今日の治療薬2014，南江堂，東京，2014
11) 小児呼吸器感染症診療ガイドライン作成委員会：小児呼吸器感染症診療ガイドライン2011，協和企画，東京，2011
12) レジオネラ症防止指針作成委員会：レジオネラ症防止指針，第3版，財団法人ビル管理教育センター，2009
13) Edelstein PH, Mason WH：Legionnaire's disease, Pontiac fever, and related illnesses. In Feigin RD, Cherry JD, et al（eds）：Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 7th ed, Saunders, Philadelphia, pp1705-1714, 2013

〈関連ウェブサイト〉

・国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課：レジオネラ症2008.1～2012.12．病原微生物検出情報34：155-157，2013
http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/ra/legionella/687-idsc/iasr-topic/3611-tpc400-j.htmlIdisease/legionellosis/sokuho0718.html
・国立感染症研究所：病原体検出マニュアル，レジオネラ症，平成23年10月7日改訂
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/legionella_2012.pdf
・LPSN bacterio.net：Genus *Legionella*
http://www.bacterio.net/legionella.html

＊　＊　＊

AEM
Journals.ASM.org

Close Genetic Relationship between *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from Sputum Specimens and Puddles on Roads, as Determined by Sequence-Based Typing

Jun-ichi Kanatani,[a] Junko Isobe,[a] Keiko Kimata,[a] Tomoko Shima,[a] Miwako Shimizu,[a] Fumiaki Kura,[b] Tetsutaro Sata,[a] Masanori Watahiki[a]

Department of Bacteriology, Toyama Institute of Health, Nakataikoyama, Imizu-shi, Toyama, Japan[a]; Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan[b]

We investigated the prevalence of *Legionella* species isolated from puddles on asphalt roads. In addition, we carried out sequence-based typing (SBT) analysis on the genetic relationship between *L. pneumophila* serogroup 1 (SG 1) isolates from puddles and from stock strains previously obtained from sputum specimens and public baths. Sixty-nine water samples were collected from puddles on roads at 6 fixed locations. *Legionella* species were detected in 33 samples (47.8%) regardless of season. Among the 325 isolates from puddles, strains of *L. pneumophila* SG 1, a major causative agent of Legionnaires' disease, were the most frequently isolated ($n = 62$, 19.1%). Sixty-two isolates of *L. pneumophila* SG 1 from puddles were classified into 36 sequence types (STs) by SBT. ST120 and ST48 were identified as major STs. Environmental ST120 strains from puddles were found for the first time in this study. Among the 14 STs of the clinical isolates ($n = 19$), 4 STs ($n = 6$, 31.6%), including ST120, were also detected in isolates from puddles on roads, and the sources of infection in these cases remained unclear. The *lag-1* gene, a tentative marker for clinical isolates, was prevalent in puddle isolates (61.3%). Our findings suggest that puddles on asphalt roads serve as potential reservoirs for *L. pneumophila* in the environment.

Legionella pneumophila is a major agent causing Legionnaires' disease, which is a severe form of legionellosis and a potentially fatal pneumonia (1). *L. pneumophila* is a Gram-negative bacterium that is ubiquitous in natural environments. In addition, it has been found in anthropogenic environments, such as cooling towers, baths, showers, and decorative fountains (2–5). Legionellosis may be acquired through inhalation of aerosolized water contaminated with *Legionella* species (6). Therefore, aquatic facilities are potential sources of sporadic cases or outbreaks of infection. Although 58 species and more than 70 serogroups (SG) of *Legionella* species have been identified (7), more than 90% of legionellosis cases are caused by *L. pneumophila* (8). Among 15 serogroups of *L. pneumophila*, most clinical strains (80%) in Japan belonged to SG 1 (9). Recently, in the United States, Kozak et al. revealed that 75% of the *L. pneumophila* SG 1 clinical isolates but only 8% of environmental isolates harbored the *lag-1* gene, which is required for the expression of the virulence-associated epitope recognized by monoclonal antibody 2 of the international standard panel (10).

To identify the infection sources of legionellosis cases, sequence-based typing (SBT) was proposed by the European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI); SBT is a sequence-based scheme comprising defined regions of 7 genes (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, and *neuA*) for *L. pneumophila* (11–13). SBT has been used as a molecular typing method to characterize *L. pneumophila* SG 1 strains (14–16).

In Japan, public baths are a major source of infection, according to the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases (17). Fatal cases of legionellosis from homes and spa pools have been reported (18, 19). Recently, several reports revealed that legionellosis could be acquired from puddles of rainwater on roads (20) and from air-conditioning systems of motor vehicles (21). These environments have thus been considered potential new sources of infection. However, the genetic relationships between strains from clinical specimens and from these environmental sources have not been clearly analyzed by molecular typing techniques. Furthermore, our previous study reported that the comparative analysis of *L. pneumophila* SG 1 isolates from sputum specimens and public baths found a clonal group formed only by clinical isolates that were not associated with bath water (22). The short genetic distance between strains of the clonal group suggested that they were derived from a common and unrecognized type of source.

We hypothesize that clinical isolates that are not associated with bath water may be genetically close to isolates from puddles on asphalt roads. The main objective of this study was to characterize the genetic relationship between *L. pneumophila* SG 1 isolates from puddles and stock strains previously isolated from sputum specimens, public baths, and some other environmental sources.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. A total of 140 *L. pneumophila* SG 1 isolates were analyzed, including isolates from puddles on roads ($n = 62$), public baths ($n = 51$), cooling towers ($n = 5$), showers ($n = 3$), and sputum specimens ($n = 19$). Among these, 62 isolates from puddles and 5 isolates from other sources (1 isolate from a cooling tower, 2 isolates from 2 showers, and 2 isolates from 2 patients) obtained in this study were collected from 2010 to

Received 27 February 2013 Accepted 15 April 2013
Published ahead of print 19 April 2013
Address correspondence to Masanori Watahiki, masanori.watahiki@pref.toyama.lg.jp.
Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AEM.00637-13

Downloaded from http://aem.asm.org/ on June 8, 2013 by NATL INST OF INFECTIOUS DISEAS

2011 and from 2010 to 2012, respectively, in Toyama Prefecture, Japan (Table 1); the remaining 73 isolates (51 isolates from 24 public baths, 4 isolates from 2 cooling towers, 1 isolate from a shower, and 17 isolates from 16 patients), obtained in a previous study, were collected from 2005 to 2012 in Toyama Prefecture, Japan (22).

Identification of *Legionella* species from puddles on a road. After rainfall, water samples were collected at 6 fixed locations along 3 main national roads once per month from November 2010 to October 2011 in Toyama Prefecture (Fig. 1). The eastern and southern parts of the prefecture were not selected for sampling because they are mountainous and sparsely populated. Samples from locations A to E were collected from November 2010 to October 2011; samples from location F were collected from February to October 2011.

Water samples (150 ml) from puddles on asphalt roads were filtered with a 0.22-μm-pore-size polycarbonate membrane (catalog no. GTTP04700; Millipore, Billerica, MA, USA) and resuspended in 3 ml of distilled water. After the concentrated samples were mixed with equal volumes of 0.2 mol/liter KCl-HCl buffer (pH 2.2) for 5 min at room temperature, they were spread onto glycine-vancomycin-polymyxin B-cycloheximide agar plates (bioMérieux, Lyon, France) and modified Wadowsky Yee agar plates (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom). The agar plates were incubated at 35°C for 7 days in a moist chamber. Smooth gray colonies were subcultured onto buffered charcoal-yeast extract agar plates (bioMérieux) and blood agar plates (Eiken Chemical, Tokyo, Japan). The colonies growing only on buffered charcoal-yeast extract agar plates were presumed to belong to the genus *Legionella* by observation of the characteristic outward structures (cut-glass-like or mosaiclike appearance) under a stereo microscope with oblique illumination (23). The detection limit of the procedure was 10 CFU/100 ml. These colonies were tested using a latex agglutination test kit (catalog no. DR0800M; Oxoid, Hampshire, United Kingdom) and slide agglutination with commercial antisera (Denka Seiken, Tokyo, Japan) to determine the *Legionella* species and serogroups. The remaining colonies not identified by serological methods were examined by PCR with primers for *Legionella* genus-specific 16S rRNA genes and *L. pneumophila* species-specific *mip* genes (24, 25). The species of some isolates were determined by sequencing of 16S rRNA genes as described previously, with a slight modification (26). Sequencing was performed with an ABI Prism 3130*xl* genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and primers 27f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and r1L (GTATTACCGCGGCTGCTGG).

SBT. SBT was performed according to the protocol of the EWGLI (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php), as described previously (11, 12). Novel alleles and sequence types (STs) were submitted to the EWGLI SBT database for assignment. Clonal analyses were performed by using eBURST V3 (http://eburst.mlst.net). Groups that were generated with single-, double-, and triple-locus variants were defined as clonal groups (CGs).

PCR amplification of the *lag-1* gene. Genomic DNA was extracted by emulsifying several colonies of *L. pneumophila* in 100 μl of 5% (wt/vol) Chelex-100 solution (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan). The suspension was boiled at 100°C for 10 min and then centrifuged at 20,000 × *g* for 5 min at room temperature. The supernatant was used as a DNA template. The primers lag-F and lag-R were used for amplification of the *lag-1* gene (10). The PCR was performed using GoTaq green master mix (Promega, Madison, WI, USA) under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 2 min and 30 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 1 min.

Statistical analysis. The χ^2 test was performed to compare the proportions of *Legionella*-positive and -negative puddles, as well as *lag-1*-positive and -negative isolates, using Microsoft Excel (Microsoft, Tokyo, Japan). To test for significant differences in the cell concentrations of *Legionella* species, the Mann-Whitney U test was performed using R statistical software (version 2.15.1). A P value of <0.05 was considered statistically significant.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequence data from this study have been submitted to DNA Data Bank of Japan (http://www.ddbj.nig.ac.jp/) under accession numbers AB811041, AB811042, AB811044, AB811045, AB811047 to AB811052, AB811054, AB811055, AB811057 to AB811064, AB811066 to AB811075, and AB811077.

RESULTS

Isolation of *Legionella* species from water samples of puddles on roads. *Legionella* species were detected in 33 samples (47.8%) from locations A ($n = 4$), B ($n = 5$), C ($n = 7$), D ($n = 7$), E ($n = 7$), and F ($n = 3$) (Fig. 1). *Legionella* species were isolated frequently, except in September and October 2011 (Table 2). Among the 33 positive samples, the concentrations of *Legionella* species ranged from 10 to 99 CFU/100 ml in 18 (54.5%) samples, 14 (42.4%) samples contained 100 to 999 CFU/100 ml, and 1 (3.0%) sample contained 7,520 CFU/100 ml. Even when the mean temperature was <0°C in January, *Legionella* species were isolated from 4 of 5 samples, and 3 samples contained 100 to 999 CFU/100 ml. Furthermore, the isolation rates of *Legionella* species at mean temperatures of ≥20°C (50.0%, 12/24) and <20°C (46.7%, 21/45) were almost the same ($P > 0.05$; the χ^2 test), indicating that *Legionella* species were detected regardless of temperature. However, the concentrations of *Legionella* species ranged from 20 to 7,520 CFU/100 ml at mean temperatures of ≥20°C and from 10 to 240 CFU/100 ml at mean temperatures of <20°C. The Mann-Whitney U test revealed that the concentrations of *Legionella* species at mean temperatures of ≥20°C and <20°C were significantly different ($P < 0.05$): the geometric means ± standard deviations ($\log_{10}$ CFU/100 ml) in *Legionella*-positive puddles were 2.30 ± 0.68 and 1.63 ± 0.47, respectively.

Among the 33 positive samples in which *Legionella* species were detected, *L. pneumophila* was detected in 26 samples (78.8%), including 4 samples at mean temperatures of <0°C in January. Thus, *L. pneumophila* was also frequently detected in samples from puddles regardless of temperature.

Serological distribution of *Legionella* species. We isolated 325 colonies from puddles from the 6 sampling locations. According to the serogroup typing, 234 isolates were identified as *L. pneumophila* strains. The remaining 91 isolates were examined by PCR, resulting in 11 additional *L. pneumophila* strains. Overall, the most-prevalent species was *L. pneumophila* ($n = 245$, 75.4%), whereas other *Legionella* species accounted for the remaining 24.6% ($n = 80$). Among the 245 *L. pneumophila* isolates, SG 1 accounted for 25.3% ($n = 62$), followed by SG 5 ($n = 56$, 22.9%), SG 8 ($n = 50$, 20.4%), and others (SG 2, SG 6, SG 9, SG 3, SG 11, SG 14, and untypeable; $n = 77$, 31.4%) (Fig. 2A). Among the 80 non-*L. pneumophila* isolates, 31 were randomly selected, and the species of these isolates were determined by 16S rRNA gene sequencing. *L. gresilensis* accounted for 71.0% ($n = 22$), followed by *L. longbeachae* ($n = 6$, 19.4%), *L. oakridgensis* ($n = 1$, 3.2%), *L. sainthelensi* ($n = 1$, 3.2%), and *L. waltersii* ($n = 1$, 3.2%) (Fig. 2B).

Distribution of STs and *lag-1* genes. We analyzed 62 *L. pneumophila* SG 1 isolates obtained from puddles on asphalt roads in comparison with 73 *L. pneumophila* SG 1 stock strains from a previous study (22) and 5 isolates obtained from sources other than puddles in this study (Table 1). The 19 (total) clinical isolates from sputum specimens were collected from 4 hospitals in Toyama Prefecture. Among these, 17 isolates were obtained from 17 patients; the remaining 2 isolates were obtained from the same patient but classified into different STs.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on June 8, 2013 by NATL INST OF INFECTIOUS DISEAS

TABLE 1 Sequence types and *lag-1* gene results of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates obtained in this study[a]

Strain	Origin	Date of isolation		Allele no.							ST	Presence of *lag-1*
		Yr	Mo	*flaA*	*pilE*	*asd*	*mip*	*mompS*	*proA*	*neuA*		
LG1554	PU	2010	Nov	2	3	6	10	2	1	6	22	Negative
LG1555	PU	2010	Nov	2	3	9	10	2	1	6	23	Negative
LG1732	PU	2011	May	2	3	9	10	2	1	6	23	Negative
LG1743	PU	2011	May	2	3	9	10	2	1	6	23	Positive
LG1551	PU	2010	Nov	5	2	22	27	6	10	12	48	Negative
LG1552	PU	2010	Nov	5	2	22	27	6	10	12	48	Negative
LG1553	PU	2010	Nov	5	2	22	27	6	10	12	48	Negative
LG1625	PU	2011	Jan	5	2	22	27	6	10	12	48	Negative
LG1719	PU	2011	May	5	2	22	27	6	10	12	48	Negative
LG1723	PU	2011	May	5	2	22	27	6	10	12	48	Negative
LG1742	PU	2011	May	5	2	22	27	6	10	12	48	Negative
LG1737	PU	2011	May	2	3	18	13	25	5	6	75	Positive
LG1680	PU	2011	Mar	4	10	11	15	29	1	6	89	Positive
LG1729	PU	2011	May	12	8	11	20	5	12	6	118	Positive
LG1550	PU	2010	Nov	2	3	5	11	2	1	6	120	Positive
LG1674	PU	2011	Mar	2	3	5	11	2	1	6	120	Positive
LG1736	PU	2011	May	2	3	5	11	2	1	6	120	Positive
LG1746	PU	2011	May	2	3	5	11	2	1	6	120	Positive
LG1747	PU	2011	May	2	3	5	11	2	1	6	120	Positive
LG1771	PU	2011	Jun	2	3	5	11	2	1	6	120	Positive
LG1772	PU	2011	Jun	2	3	5	11	2	1	6	120	Positive
LG1805	PU	2011	Aug	3	13	1	10	14	9	11	127	Negative
LG1604	PU	2010	Dec	2	1	6	15	2	1	6	132	Positive
LG1749	PU	2011	May	2	1	6	15	2	1	6	132	Positive
LG1673	PU	2011	Mar	2	3	9	10	2	1	10	384	Positive
LG1766	PU	2011	Jun	2	3	9	10	2	1	10	384	Positive
LG1698	PU	2011	Mar	2	3	5	10	2	1	6	507	Negative
LG1740	PU	2011	May	2	3	5	10	2	1	6	507	Positive
LG1748	PU	2011	May	2	3	5	10	2	1	6	507	Positive
LG1546	PU	2010	Nov	8	10	3	10	2	1	6	610	Positive
LG1814	PU	2011	Aug	12	9	2	5	27	20	6	615	Positive
LG1679	PU	2011	Mar	12	8	11	10	5	12	6	624	Positive
LG1622	PU	2011	Jan	21	40	43	20	15	26	2	808	Negative
LG1632	PU	2011	Jan	21	40	43	20	15	26	2	808	Negative
LG1768	PU	2011	Jun	2	3	6	15	51	1	6	876	Positive
LG1733	PU	2011	May	2	3	5	3	2	1	9	1186	Positive
LG1735	PU	2011	May	2	3	5	3	2	1	9	1186	Positive
LG1631	PU	2011	Jan	2	3	5	13	2	1	6	1187	Positive
LG1767	PU	2011	Jun	2	3	5	13	2	1	6	1187	Positive
LG1638	PU	2011	Jan	2	3	5	28	2	1	6	1188	Positive
LG1799	PU	2011	Aug	2	3	5	58	2	1	6	1189	Positive
LG1683	PU	2011	Mar	2	3	18	12	35	1	6	1190	Positive
LG1797	PU	2011	Aug	2	3	58	10	2	1	6	1191	Positive
LG1753	PU	2011	May	2	10	5	10	2	1	6	1192	Negative
LG1739	PU	2011	May	2	10	5	10	2	1	9	1193	Negative
LG1741	PU	2011	May	2	10	5	10	2	1	9	1193	Negative
LG1678	PU	2011	Mar	2	10	5	47	18	5	9	1194	Negative
LG1681	PU	2011	Mar	2	10	9	12	2	5	6	1195	Positive
LG1540	PU	2010	Nov	2	10	14	3	18	4	11	1196	Negative
LG1730	PU	2011	May	2	10	57	10	18	5	9	1197	Negative
LG1630	PU	2011	Jan	2	23	13	25	18	22	9	1198	Positive
LG1697	PU	2011	Mar	2	23	13	25	18	22	9	1198	Positive
LG1813	PU	2011	Aug	2	31	5	21	18	12	6	1199	Positive
LG1811	PU	2011	Aug	4	8	11	10	11	12	10	1200	Positive
LG1745	PU	2011	May	12	8	11	56	2	12	34	1201	Positive
LG1686	PU	2011	Mar	12	15	11	56	11	12	34	1202	Positive
LG1541	PU	2010	Nov	21	14	29	1	15	29	6	1203	Positive
LG1543	PU	2010	Nov	34	27	56	57	72	29	44	1204	Negative
LG1544	PU	2010	Nov	34	27	56	57	72	29	44	1204	Negative

(Continued on following page)

Downloaded from http://aem.asm.org/ on June 8, 2013 by NATL INST OF INFECTIOUS DISEAS

TABLE 1 (Continued)

Strain	Origin	Date of isolation		Allele no.							ST	Presence of *lag-1*
		Yr	Mo	*flaA*	*pilE*	*asd*	*mip*	*mompS*	*proA*	*neuA*		
LG1691	PU	2011	Mar	34	27	56	57	72	29	44	1204	Negative
LG1804	PU	2011	Aug	34	27	56	57	72	29	44	1204	Negative
LG1689	PU	2011	Mar	34	27	55	54	71	44	44	1225	Negative
LG1975	CT	2011	Jun	1	4	3	1	1	1	1	1	Negative
LG2051	SH	2012	Nov	7	6	17	3	13	11	11	59	Negative
LG2055	SH	2012	Nov	5	2	22	27	6	10	12	48	Negative
LG1535	PA	2010	Nov	2	3	5	15	2	1	6	973	Positive
LG1757	PA	2011	May	10	12	7	3	16	18	6	138	Positive

[a] PU, puddle; CT, cooling tower; SH, shower; PA, patient; ST, sequence type.

Sixty-two *L. pneumophila* SG 1 isolates from puddles were classified into 36 STs (Tables 1 and 3). Twenty of the 36 STs were identified for the first time in this study. The major STs were ST120 (n = 7, 11.3%) and ST48 (n = 7, 11.3%), followed by ST1204 (n = 4, 6.5%), ST23 (n = 3, 4.8%), and ST507 (n = 3, 4.8%). Twenty-four STs were represented by only a single isolate.

Puddle isolates of ST120 were detected in samples from locations B (n = 2), C (n = 1), and E (n = 4), and puddle isolates of ST48 in samples from locations A (n = 1), B (n = 1), C (n = 3), and D (n = 2) (Fig. 1). Furthermore, ST120 and ST48 strains were isolated during 4 (November 2010 and February, May, and June 2011) and 3 (November 2010 and January and May 2011) different months, respectively.

PCR amplification showed that 59.7% (37/62) of *L. pneumophila* SG 1 isolates from puddles harbored the *lag-1* gene (Table 3). Among the isolates belonging to ST120 and ST48, which were the major STs of puddle isolates, the *lag-1* gene was present in all ST120 isolates (7/7) and was missing in all ST48 isolates (0/7).

Clonal analysis. Clonal analyses were performed using *L. pneumophila* isolates obtained from puddles on roads (n = 62), public baths (n = 51), cooling towers (n = 5), showers (n = 3), and patients with legionellosis (n = 19) (Table 4). The puddle isolates formed 2 major CGs, CG1 and CG4, which included 58.1% and 8.1% of puddle isolates, respectively (Table 4). On the other hand, bath isolates formed other CGs, CG2 and CG3, which included 49.0% and 25.5% of bath isolates, respectively.

Among the 14 STs of clinical isolates (n = 19), 4 STs (ST120, ST132, ST384, and ST507; n = 6) and 3 STs (ST138, ST505, and ST644; n = 6) were also detected in isolates from puddles and public baths, respectively. The remaining 7 STs (n = 7) were detected in CGs that included environmental isolates, although the same ST was not observed in the environmental isolates. CG1, CG2, CG3, CG4, and CG5 included 7 STs (ST120, ST132, ST353, ST384, ST506, ST507, and ST973), 3 STs (ST2, ST502, and ST644), 2 STs (ST505 and ST682), ST42, and ST138, respectively.

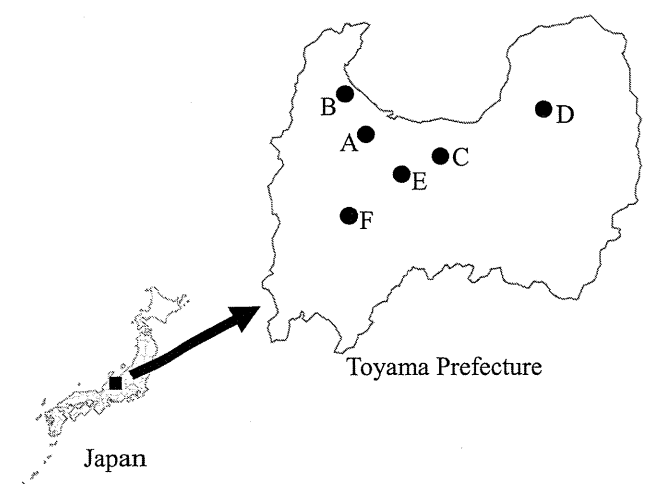


FIG 1 Locations of the 6 fixed points for sampling from puddles on roads. Sixty-nine samples were collected from the 6 locations as follows: A (n = 12), B (n = 12), C (n = 12), D (n = 12), E (n = 12), and F (n = 9).

DISCUSSION

We investigated the prevalence of *Legionella* species isolated from puddles on asphalt roads and the genetic relationships between isolates from sputum specimens and environmental sources. Sixty-two isolates of *L. pneumophila* SG 1 from puddles were classified into 36 STs by SBT, with ST120 and ST48 being the major STs; strains of these 2 STs were widely distributed in Toyama Prefecture regardless of the season. Although ST48 environmental strains were primarily isolated from soil and partially from cooling towers, as reported previously (27), ST120 environmental strains were not mentioned either in the previous report or in the EWGLI SBT database as of 27 February 2013. On the other hand, ST120 clinical strains were detected in 5.8% of isolates from patients with legionellosis in Japan, although the sources of infection remain unclear as determined by epidemiological investigation (9). It was not described whether isolation of *L. pneumophila* strains from environmental sources, including water from puddles on roads, was carried out or not in these cases. Our results showed that 1 clinical strain also belonged to ST120. This strain was not associated with bathwater as determined by epidemiological investigation. Furthermore, isolation of *L. pneumophila* strains from other environmental sources was not carried out. Thus, the source of infection in this case was not clarified. Hicks et al. reported that a 1-cm increase in rainfall was associated with a 2.6% increased risk of legionellosis (28). Furthermore, Fisman et al. identified an association between legionellosis and increased humidity (odds ratio per 1% increase in relative humidity of 1.08, and 95% confidence interval of 1.05 to 1.11) 6 to 10 days before the occurrence of legionellosis cases (29). Therefore, our findings suggest the possibility that patients with legionellosis caused by ST120 strains may have inhaled splashed aerosols from puddles contaminated with

Downloaded from http://aem.asm.org/ on June 8, 2013 by NATL INST OF INFECTIOUS DISEAS

TABLE 2 Distribution of *Legionella* species from puddles on roads in Toyama Prefecture, Japan

Yr	Mo	Mean temp (°C)	No. of samples (no. with *L. pneumophila*): Analyzed	*Legionella* positive	With CFU/100 ml of: 10–99	100–999	>1,000	Geometric mean ± SD (log_{10} CFU/100 ml) in *Legionella*-positive puddles
2010	Nov	11.4	5	4 (4)	4 (4)	0	0	1.3 ± 0.3
	Dec	10.4	5	3 (2)	3 (2)	0	0	1.4 ± 0.3
2011	Jan	−0.6	5	4 (4)	1 (1)	3 (3)	0	2.0 ± 0.1
	Feb	9.0	6	5 (5)	4 (4)	1 (1)	0	1.6 ± 0.5
	Mar	11.5	6	4 (1)	3 (1)	1 (0)	0	1.7 ± 0.5
	Apr	15.0	6	1 (0)	0	1 (0)	0	2.4
	May	21.2	6	4 (4)	1 (1)	3 (3)	0	1.9 ± 0.4
	Jun	32.2	6	2 (2)	1 (1)	1 (1)	0	1.8 ± 0.2
	Jul	31.0	6	3 (1)	0	2 (1)	1 (0)	3.2 ± 0.5
	Aug	26.2	6	3 (3)	1 (1)	2 (2)	0	2.2 ± 0.5
	Sep	18.0	6	0	0	0	0	Not measured
	Oct	16.4	6	0	0	0	0	Not measured
Total			69	33 (26)	18 (15)	14 (11)	1 (0)	

this strain. The fact that all ST120 isolates in this study harbored the *lag-1* gene, a tentative marker for clinical isolates, supports this hypothesis. Alternatively, patients with legionellosis may be infected indirectly through a puddle route. In this regard, driving an automobile using windshield wiper fluid without added windshield washes that usually contain biocidal agents like propranolol has been reported as a newly identified risk factor for the disease (30), and *L. pneumophila* strains were actually found in windshield wiper fluid without added windshield washes (31). So, automobiles may be contaminated with *L. pneumophila* strains originating from puddles due to splashing. To date, Palmer et al. have not reported the STs of the isolates from windshield wiper fluid.

The *lag-1* gene was prevalent in puddle isolates (59.7%). Among the *L. pneumophila* SG 1 isolates in Toyama Prefecture, 100% (17/17) of clinical isolates and 43.1% (22/51) of bath isolates harbored the *lag-1* gene (J. Kanatani, J. Isobe, K. Kimata, T. Shima, M. Shimizu, F. Kura, T. Sata, and M. Watahiki, unpublished data). The frequencies of the isolates harboring the *lag-1* gene were not significantly different between isolates from puddles and public baths ($P > 0.05$, χ^2 test). In Japan, the number of legionellosis cases peaked in July, the second half of the rainy season (32, 33). To elucidate the possibility that splashed aerosols from puddles on a road, as well as public bath water, are a probable source of legionellosis, we need further investigation of the virulence of these strains by a combination of molecular typing profiles such as SBT, *lag-1* allele typing, and monoclonal antibody subgrouping (9).

Among the 14 STs of clinical isolates ($n = 19$), 4 STs (ST120, ST132, ST384, and ST507; $n = 6$) were also detected in isolates from puddles on roads, suggesting that 33.3% (6/18) of patients (6/19 of clinical isolates) may be infected directly or indirectly through a puddle route rather than a bath route. As with the case of the ST120 clinical isolate, the infection source of the remaining

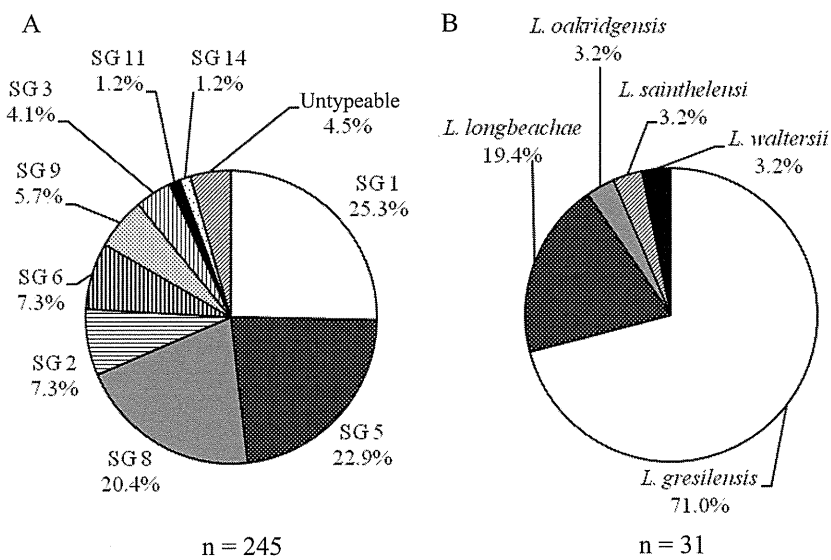


FIG 2 Distribution of *Legionella* species from puddles. (A) Frequencies of serogroups among *L. pneumophila* isolates. (B) Frequencies of *Legionella* species among non-*L. pneumophila* isolates identified by 16S rRNA gene sequencing.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on June 8, 2013 by NATL INST OF INFECTIOUS DISEAS

TABLE 3 Sequence types of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates obtained from puddles on roads in Toyama Prefecture, Japan

ST[a]	No. (%) of isolates	No. with indicated result for *lag-1*	
		Positive	Negative
120	7 (11.3)	7	0
48	7 (11.3)	0	7
1204[b]	4 (6.5)	0	4
23	3 (4.8)	3	0
507	3 (4.8)	2	1
132	2 (3.2)	1	1
384	2 (3.2)	2	0
808	2 (3.2)	0	2
1186[b]	2 (3.2)	2	0
1187[b]	2 (3.2)	2	0
1193[b]	2 (3.2)	0	2
1198[b]	2 (3.2)	2	0
Others[c]	24 (38.7)	16	8
Total	62 (100)	37	25

[a] ST, sequence type.
[b] The ST was identified for the first time in this study.
[c] Fifteen of 24 STs were identified for the first time in this study, and each was presented by only a single isolate.

5 clinical isolates also remained unclear. For the identification of unrecognized sources of legionellosis, in our opinion, *L. pneumophila* strains should be isolated from clinical specimens and various environmental sources, including water from puddles on roads, and analyzed by molecular typing methods such as SBT and monoclonal antibody subgrouping (9).

In samples from puddles, *L. pneumophila* SG 1, SG 5, and SG 8 were frequently detected. In those from soil, among 87 *L. pneumophila* isolates, SG 1 accounted for 42.5% ($n = 37$), followed by SG 8 (18.4%, $n = 16$) and SG 3 (16.1%, $n = 14$), although SG 5 was not detected (J. Amemura-Maekawa, K. Kikukawa, J. H. Helbig, S. Kaneko, A. Suzuki-Hashimoto, K. Furuhata, B. Chang, M. Murai, M. Ichinose, M. Ohnishi, F. Kura, and the Working Group for *Legionella* in Japan, unpublished data). Furthermore, 31 of the 36 puddle isolates belonging to CG1 revealed the same or single-, double-, and triple-locus variants of STs derived from soil (group S1 [27]) and 3 of the 5 puddle isolates belonging to CG4 revealed triple-locus variants of STs derived from soil (group S3 [27]). These results showed that the isolates from puddles and soil were genetically and serologically close to each other. However, the only common STs detected in samples from both puddles and soil were ST22 and ST48. To elucidate the habitat segregation of *L. pneumophila* strains in these environments, further investigation of isolates from puddles and soil is required.

In this study, *Legionella* species were isolated even at low temperatures. In this regard, Söderberg et al. reported that *L. pneumophila* strains could survive in tap water at 4°C for about a year, while a gradual decline in the number of CFU was seen (34). Although *Legionella* species were not detected in puddles during the last 2 months of collection for this study (September and October 2011), 4 of 6 puddles regained positivity for *L. pneumophila* and/or other *Legionella* species 2 months later (data not shown). Thus, *Legionella* species, including *L. pneumophila*, were distributed in puddles regardless of the season. A previous study in metropolitan Tokyo reported that the isolation rates of *L. pneumophila* strains from puddles increased with increasing mean temperatures and that *L. pneumophila* SG 1 strains were the most frequently isolated (20). Because *L. pneumophila* was frequently detected in samples from puddles, the possibility of contracting legionellosis in daily life should be considered. It may be important to recommend that individuals who are immunocompromised or elderly wear masks to avoid acquiring the disease, especially during the warm rainy season. Among the 5 other *Legionella* species detected in samples from puddles in this study, to the best of our knowledge, *L. longbeachae*, *L. oakridgensis*, and *L. sainthelensi* have been isolated from patients with pneumonia (35–37) and *L. waltersii* DNA was identified in a patient with pneumonia (38). Thus, these species may also be important in the etiology of community-acquired pneumonia.

In conclusion, ST120 environmental strains were isolated from puddles on an asphalt road for the first time in this study. Furthermore, 33.3% of patients with legionellosis in Toyama Prefecture, Japan, may be infected directly or indirectly through a puddle route. Our findings by SBT analysis suggest that puddles on as-

TABLE 4 Distributions of clonal groups from 74 sequence-based typing profiles of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates in Toyama Prefecture, Japan[a]

CG (total no. of STs; no. of isolates)	No. (%) of isolates ($n = 140$) from:					ST(s) detected in both clinical and environmental isolate(s)[b] (no. and sources of isolates with ST)
	PU	PB	CT	SH	PA	
CG1 (25; 46)	36 (58.1)	1 (2.0)	0	0	9 (47.4)	120 (7 from PU, 1 from PA), 384 (2 from PU, 3 from PA), 507 (3 from PU, 1 from PA), 132 (2 from PU, 1 from PA)
CG2 (15; 28)	0	25 (49.0)	0	0	3 (15.8)	644 (4 from PB, 1 from PA)
CG3 (7; 19)	0	13 (25.5)	0	1	5 (26.3)	505 (5 from PB, 4 from PA)
CG4 (6; 6)	5 (8.1)	0	0	0	1 (5.3)	
CG5 (3; 5)	0	4 (7.8)	0	0	1 (5.3)	138 (1 from PB, 1 from PA)
CG6 (4; 4)	1 (1.6)	3 (5.9)	0	0	0	
CG7 (2; 2)	1 (1.6)	1 (2.0)	0	0	0	
CG8 (2; 2)	0	2 (3.9)	0	0	0	
Singletons (10; 28)[b]	19 (30.6)	2 (3.9)	5	2	0	
Total	62 (100)	51 (100)	5	3	19 (100)	

[a] CG, clonal group; PU, puddle; PB, public bath; CT, cooling tower; SH, shower; PA, patient; ST, sequence type.
[b] Singletons include 10 STs that are not grouped into any CGs.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on June 8, 2013 by NATL INST OF INFECTIOUS DISEAS

phalt roads serve as potential reservoirs for *L. pneumophila* in the environment, which could increase potential opportunities for exposure. To identify unrecognized sources of infection in legionellosis cases, we need to isolate *L. pneumophila* strains from clinical specimens and various environmental sources, including water from puddles on roads, and to analyze these strains by a combination of molecular typing techniques and epidemiological investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Norman K. Fly (Respiratory and Systemic Infection Laboratory, Health Protection Agency) for assigning the newly identified alleles and STs. We also thank the physicians and laboratory personnel in the following institutions for providing the clinical isolates: Kouseiren Takaoka Hospital, Takaoka City Hospital, Tonami General Hospital, and Toyama University Hospital.

This work was supported by a Health and Labor Sciences Research grant (number H22-kenki-014 to F.K.) from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

REFERENCES

1. **Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS, the Field Investigation Team.** 1977. Legionnaires' disease. Description of an epidemic of pneumonia. N. Engl. J. Med. **297**:1189–1197.
2. **Cordes LG, Wiesenthal AM, Gorman GW, Phair JP, Sommers HM, Brown A, Yu VL, Magnussen MH, Meyer RD, Wolf JS, Shands KN, Fraser DW.** 1981. Isolation of *Legionella pneumophila* from hospital shower heads. Ann. Intern. Med. **94**:195–197.
3. **Hlady WG, Mullen RC, Mintz CS, Shelton BG, Hopkins RS, Daikos GL.** 1993. Outbreak of Legionnaire's disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology. Am. J. Epidemiol. **138**:555–562.
4. **Ito I, Naito J, Kadowaki S, Mishima M, Ishida T, Hongo T, Ma L, Ishii Y, Matsumoto T, Yamaguchi K.** 2002. Hot spring bath and *Legionella* pneumonia: an association confirmed by genomic identification. Intern. Med. **41**:859–863.
5. **Keller DW, Hajjeh R, DeMaria A, Fields BS, Pruckler JM, Benson RS, Kludt PE, Lett Mermel SMLA, Giorgio C, Breiman RF.** 1996. Community outbreak of Legionnaires' disease: an investigation confirming the potential for cooling towers to transmit *Legionella* species. Clin. Infect. Dis. **22**:257–261.
6. **Arnow PM, Chou T, Weil D, Shapiro EN, Kretzschmar C.** 1982. Nosocomial Legionnaires' disease caused by aerosolized tap water from respiratory devices. J. Infect. Dis. **146**:460–467.
7. **Euzeby JP.** 2013. List of prokaryotic names with standing in nomenclature—genus *Legionella*. http://www.bacterio.cict.fr/l/legionella.html. Accessed 27 February 2013.
8. **Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Chereshsky A.** 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. J. Infect. Dis. **186**:127–128.
9. **Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, Watanabe H, the Working Group for *Legionella* in Japan.** 2010. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. J. Med. Microbiol. **59**:653–659.
10. **Kozak NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor TH, Jr, Shelton BG, Fields BS.** 2009. Distribution of *lag-1* alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. J. Clin. Microbiol. **47**:2525–2535.
11. **Gaia V, Fly NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG.** 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. **43**:2047–2052.
12. **Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fly NK, Lück PC.** 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding *N*-acylneuraminate cytidylyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J. Clin. Microbiol. **45**:1965–1968.
13. **Farhat C, Mentasti M, Jacobs E, Fry NK, Lück C.** 2011. The *N*-acylneuraminate cytidyltransferase gene, *neuA*, is heterogenous in *Legionella pneumophila* strains but can be used as a marker for epidemiological typing in the consensus sequence-based typing scheme. J. Clin. Microbiol. **49**:4052–4058.
14. **Coscollá M, Fenollar J, Escribano I, González-Candelas F.** 2010. Legionellosis outbreak associated with asphalt paving machine, Spain, 2009. Emerg. Infect. Dis. **16**:1381–1387.
15. **O'Loughlin RE, Kightlinger L, Werpy MC, Brown E, Stevens V, Hepper C, Keane T, Benson RF, Fields BS, Moore MR.** 2007. Restaurant outbreak of Legionnaires' disease associated with a decorative fountain: an environmental and case-control study. BMC Infect. Dis. **7**:93. doi:10.1186/1471-2334-7-93.
16. **Scaturro M, Losardo M, De Ponte G, Ricci ML.** 2005. Comparison of three molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated during an epidemic of legionellosis in Rome. J. Clin. Microbiol. **43**:5348–5350.
17. **National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare.** 2000. Legionellosis, April 1999-July 2000. Infect. Agents Surveill. Rep. **21**:186–187. http://idsc.nih.go.jp/iasr/21/247/tpc247.html. Accessed 27 February 2013.
18. **Kuroki T, Ishihara T, Ito K, Kura F.** 2009. Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan, with a special focus on *Legionella* concentrations in water. Jpn. J. Infect. Dis. **62**:201–205.
19. **Okada M, Kawano K, Kura F, Amemura-Maekawa J, Watanabe H, Yagita K, Endo T, Suzuki S.** 2005. The largest outbreak of legionellosis in Japan associated with spa baths: epidemic curve and environmental investigation. Kansenshogaku Zasshi **79**:365–374. (In Japanese.)
20. **Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, Kura F, Kato N, Matsubayashi K, Okumiya K, Yamaguchi K.** 2009. *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. Emerg. Infect. Dis. **15**:1295–1297.
21. **Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, Kura F, Noami M, Kusaka K, Funato T, Takeda M, Matsubayashi K, Okumiya K, Kato N, Yamaguchi K.** 2009. Is driving a car a risk for Legionnaires' disease? Epidemiol. Infect. **137**:1615–1622.
22. **Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, Watahiki M.** 27 December 2012. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama prefecture, Japan. J. Infect. Chemother. [Epub ahead of print.] doi:10.1007/s10156-012-0537-x.
23. **Morimoto Y.** 2010. Usefulness of selection of *Legionella* by colony appearance. Japanese J. Environ. Infect. **25**:8–14. (In Japanese.)
24. **Yamamoto H.** 1992. Detection and identification of *Legionella* species by PCR. Nihon Rinsho **50**:394–399. (In Japanese.)
25. **Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, Atlas RM.** 1990. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Mol. Cell. Probes **4**:175–187.
26. **Tanaka D, Isobe J, Watahiki M, Nagai Y, Katsukawa C, Kawahara R, Endoh M, Okuno R, Kumagai N, Matsumoto M, Morioka Y, Ikebe T, Watanabe H, the Working Group for Group A Streptococci in Japan.** 2008. Genetic features of clinical isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. J. Clin. Microbiol. **46**:1526–1529.
27. **Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhata K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F, the Working Group for *Legionella* in Japan.** 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bath water and soil in Japan. Appl. Environ. Microbiol. **78**:4263–4270.
28. **Hicks LA, Rose CE, Jr, Fields BS, Drees ML, Engel JP, Jenkins PR, Rouse BS, Blythe D, Khalifah AP, Feikin DR, Whitney CG.** 2007. Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis. Epidemiol. Infect. **135**:811–817.
29. **Fisman DN, Lim S, Wellenius GA, Johnson C, Britz P, Gaskins M, Maher J, Mittleman MA, Spain CV, Haas CN, Newbern C.** 2005. It's not the heat, it's the humidity: wet weather increases legionellosis risk in the greater Philadelphia metropolitan area. J. Infect. Dis. **192**:2066–2073.
30. **Wallensten A, Oliver I, Ricketts K, Kafatos G, Stuart JM, Joseph C.**

Downloaded from http://aem.asm.org/ on June 8, 2013 by NATL INST OF INFECTIOUS DISEAS

2010. Windscreen wiper fluid without added screenwash in motor vehicles: a newly identified risk factor for Legionnaires' disease. Eur. J. Epidemiol. 25:661–665.
31. **Palmer ME, Longmaid K, Lamph D, Willis C, Heaslip V, Khattab A.** 2012. *Legionella pneumophila* found in windscreen washer fluid without added screenwash. Eur. J. Epidemiol. 27:667.
32. **National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare.** 2008. Legionellosis, January 2003-September 2008, Japan. Infect. Agents Surveill. Rep. 29:327–328. http://idsc.nih.go.jp/iasr/29/346/tpc346.html. Accessed 27 February 2013.
33. **Ozeki Y, Yamada F, Saito A, Kishimoto T, Tanno S, Nakamura Y.** 2012. Seasonal patterns of legionellosis in Saitama, 2005-2009. Jpn. J. Infect. Dis. 65:330–333.
34. **Söderberg MA, Dao J, Starkenburg SR, Cianciotto NP.** 2008. Importance of type II secretion for survival of *Legionella pneumophila* in tap water and in amoebae at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 74:5583–5588.
35. **Benson RF, Thacker WL, Fang FC, Kanter B, Mayberry WR, Brenner DJ.** 1990. *Legionella sainthelensi* serogroup 2 isolated from patients with pneumonia. Res. Microbiol. 141:453–463.
36. **Lo Presti F, Riffard S, Jarraud S, Le Gallou F, Richet H, Vandenesch F, Etienne J.** 2000. Isolation of *Legionella oakridgensis* from two patients with pleural effusion living in the same geographical area. J. Clin. Microbiol. 38:3128–3130.
37. **McKinney RM, Porschen RK, Edelstein PH, Bissett ML, Harris PP, Bondell SP, Steigerwalt AG, Weaver RE, Ein ME, Lindquist DS, Kops RS, Brenner DJ.** 1981. *Legionella longbeachae* species nova, another etiologic agent of human pneumonia. Ann. Intern. Med. 94:739–743.
38. **König C, Hebestreit H, Valenza G, Abele-Horn M, Speer CP.** 2005. *Legionella waltersii*—a novel cause of pneumonia? Acta Paediatr. 94:1505–1507.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on June 8, 2013 by NATL INST OF INFECTIOUS DISEAS