



ONE POINT MEMO No.208

臨床検査ひとくちメモ

Q

温泉でのレジオネラ属菌の消毒と検査は
現在どうなっているのでしょうか？

A

東邦大学医学部化学研究室
加藤尚之

I. レジオネラ属菌とは

レジオネラ属菌とは、レジオネラ科、レジオネラ属に属する55菌種の総称であり¹⁾、自然水系や20℃以上の水が停滞しやすい人工環境水中に広く分布している。レジオネラ属菌はグラム陰性の桿菌で、極に1本か2本の鞭毛を有し運動性を示す。レジオネラ属菌の検出には特殊な培地が用いられている。その発育にはアミノ酸のシステインおよび鉄が必須成分であり、増殖できるpHは6.9±0.1と極端に狭い範囲である。また寒天培地で培養するためには、寒天中の発育阻害因子を吸着するため活性炭の添加を必要とする。コロニーの形成には35℃で5～7日以上を要し、コロニーは、円形で、乳白色、大小不同であり、特有の酸臭がするのが特徴である。

温泉立国であるわが国の温泉施設の約70%が循環濾過方式を導入している。湯量が多いにもかかわらず施設の大型化に対応するためであり、また湯量が少ないことによる温泉資源保護のためである。循環濾過装置では、濾過器のろ材がアメーバなどの原生

動物の繁殖の場となり、そのようなところにレジオネラ属菌が入り込むとその宿主であるアメーバ内でレジオネラ属菌が増殖し、循環湯と共に浴槽内に侵入する。しかし、温泉へのレジオネラ属菌の汚染経路については、十分に明らかになっていない²⁾。厚生労働省は、入浴施設でのレジオネラ症のアウトブレイクを受けて、レジオネラ症防止指針¹⁾を出し、各自治体、入浴施設管理者に対し残留性のある次亜塩素酸系消毒剤の使用を推奨している。しかし、温泉施設でのレジオネラ属菌の調査結果によると、さまざまな泉質やpHを有する温泉水では、必ずしもすべてにこの消毒方法が適応できるわけではないことから、他の消毒方法として次亜塩素酸系消毒剤以外の塩素系薬剤、銀イオン、銅イオン、オゾン、紫外線、光触媒、高温水なども用いられている。

II. 温泉でのレジオネラ属菌の消毒

1. 次亜塩素酸系消毒剤

温泉でのレジオネラ属菌の消毒方法として厚生労

働省は残留性のある塩素消毒を推奨し、遊離残留塩素濃度を0.2～0.4ppmに終日保ち、尚かつ1.0ppm以上にならないように指示している³⁾。一般に次亜塩素酸系消毒剤の消毒効果はアルカリ性溶液では低下することが指摘されている。それは溶液中に存在する消毒力の強い次亜塩素酸(HClO)がアルカリ性溶液中では消毒力がその1/100程度に過ぎない次亜塩素酸イオン(ClO⁻)に変化するためである^{4,5)}。実際に温泉を用いたpHと消毒効果の関係について検討した報告はほとんど無いことから、われわれは源泉のpHを5.0, 7.5, 8.0に調整し、残留塩素濃度0.4ppmで*Legionella pneumophila*を加え、異なるpHでの時間の経過に伴う*L. pneumophila*の消毒効果について検討を行った(図1)。pH5.0では添加した*L. pneumophila*は直ちに死滅したが、pH7.5では1分以上、pH8.0では5分以上の生息が認められた。さらにpH7.5および9.1を示した2つの源泉を用い、残留塩素濃度を0.4および1.0ppmにそれぞれ調整した後、*L. pneumophila*を加え、異なるpHでの時間の経過に伴う*L. pneumophila*の消毒効果について検討を行った(図2)。pH7.5、残留塩素濃度0.4ppmでは、*L. pneumophila*添加後1分以上生息していた。また1.0ppmでは、*L. pneumophila*添加後直ちに死滅した。一方、pH9.1、残留塩素濃度0.4ppmでは*L. pneumophila*添加後1時間以上生息していた。しかし、その生存率は30分で0.1%、1時間では0.001%であった。また1.0ppmでは、*L. pneumophila*添加後15分以内に死滅した。これらのことから温泉のpHによっても*L. pneumophila*に対する塩素消毒効果に時間的な差が生じるようである。

レジオネラ属菌は原生動物のアメーバの食胞内に

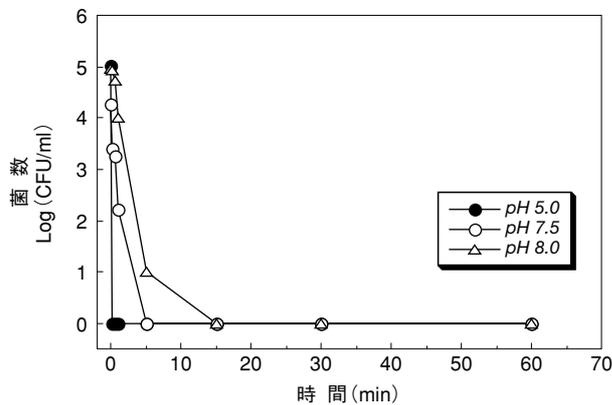


図1 残留塩素濃度0.4ppmでの*L. pneumophila*への塩素消毒に対するpHの影響

取り込まれるが、殺菌されずにその中で増殖し、やがて細胞を破壊してアメーバから放出し、他のアメーバに貪食され増殖を繰り返す。またアメーバの食胞内に取り込まれたレジオネラ属菌は消毒剤等から保護されている。したがって、レジオネラ属菌の増殖を抑制するためには、アメーバを完全に殺細胞することが重要である。そこでアメーバに貪食された*L. pneumophila*に対する塩素消毒効果について検討を行った(図3)。アメーバに貪食された*L. pneumophila*は、残留塩素濃度0.4ppmでは消毒効果が認められなかった。また残留塩素濃度が10ppmでは消毒効果は約12%であったが、30ppmでは、99.999%以上の*L. pneumophila*が消毒された。このようにアメーバに貪食された*L. pneumophila*は、残留塩素濃度が0.2～0.4ppmでは消毒されないようである。またシスト化⁶⁾(環境の悪化によってそれに耐えられ

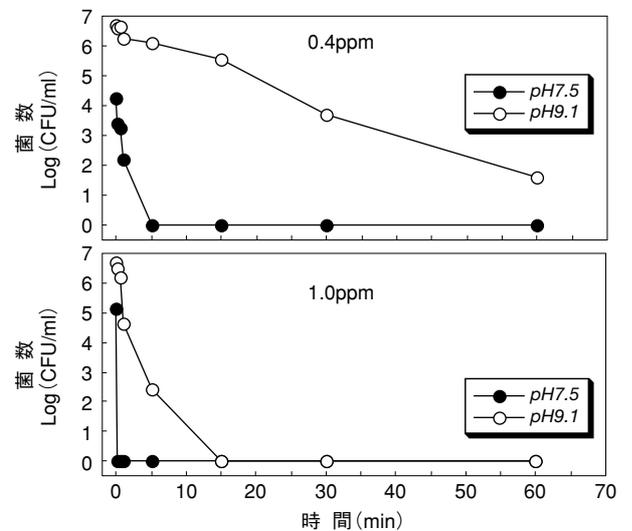


図2 温泉源泉での*L. pneumophila*への塩素消毒に対するpHの影響

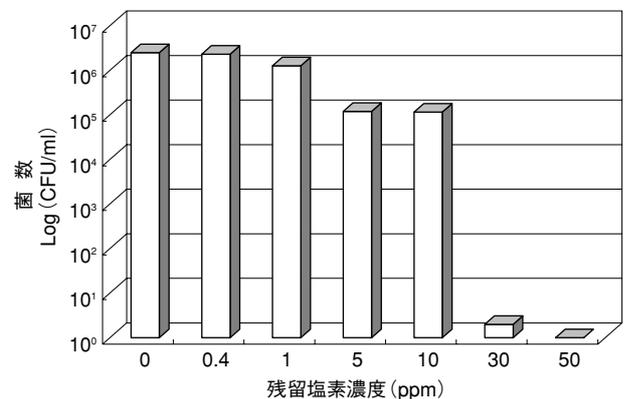


図3 *A. castellanii*に貪食された*L. pneumophila*に対する塩素消毒効果

る体に変化した状態、ただし増殖できない)したアメーバに貧食された *L. pneumophila* は、残留塩素濃度が 50ppm では 50%が生存していたことから、*L. pneumophila* もアメーバ内で Viable but non-culturable (VNC) 状態で存在している可能性がある^{7,8)}。

L. pneumophila を貧食していないアメーバを用いて、各残留塩素濃度でのアメーバの生存率について検討を行った(図4)。残留塩素濃度 0.4ppm ではアメーバは約 82%生存していた。また 30ppm では 26%が、50ppm では 20%が生存していた。したがって、次亜塩素酸ナトリウムでアメーバを殺細胞するためには 70ppm 以上の残留塩素濃度が必要であると同時に、本実験の暴露時間が 10 分間であることを考慮すると、接触時間を長くすることが重要である。またシスト化したアメーバを完全に殺細胞するためには、さらに高濃度の次亜塩素酸ナトリウムが必要である。

温泉での塩素消毒の問題点として、さまざまな泉質を有する温泉の中で、特に硫化水素や鉄が多く含まれる温泉では、塩素が還元され消毒効果が減少するために、塩素消毒をしているにもかかわらずレジオネラ属菌が検出される。また薬湯と称している温泉では、加えた塩素と薬湯が反応しその効果が激減したためにろ材からレジオネラが浴槽内に侵入し感染した事例もある。さらに過剰の塩素薬剤の投入により発生する塩素臭は温泉本来の癒しの効果を著しく減少させることから温泉施設によっては使用を敬遠しているところもある。

2. 二酸化塩素

二酸化塩素 (ClO_2) は、次亜塩素酸のような臭いが発生しない、トリハロメタン類を生成しない、アンモニウムイオンと結合型塩素を形成しない、比較

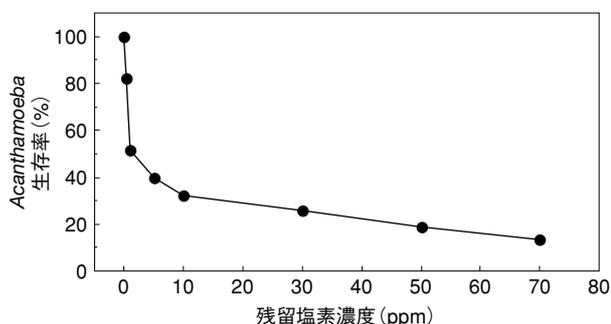


図4 *A. castellanii*に対する塩素消毒効果の検討

的高い pH でも有効に作用するなどの特徴があることから、温泉の消毒剤として用いられている。一方で、二酸化塩素は不安定なことから、温泉施設で亜塩素酸ナトリウムと塩酸や次亜塩素酸を反応させて製造しなければならないことや、また反応生成物として亜塩素酸イオンを生成するので、その濃度管理に注意を払う必要がある。

3. モノクロラミン

モノクロラミンは、アルカリ性条件下で次亜塩素酸ナトリウムとアンモニアの反応によって生成される。杉山ら⁹⁾は、モノクロラミンを温泉でのレジオネラ属菌の消毒に用いるために検討を行っている。それによると井戸水を用いたモデル循環式浴槽で、入浴しながら2週間にわたり浴槽水を使用し続け、常時モノクロラミン濃度を 3mg/L に保つことでレジオネラ属菌が検出されないことを確認している。浴槽のモノクロラミン濃度の測定方法が問題とされていたが、*N,N*-ジエチル-*p*-フェニレンジアミン (DPD) 吸光度法で測定できることを明らかにした。しかし、本法はアンモニアの不足や pH をアルカリ性に保たないと臭いの原因となるジクロラミンやトリクロラミンを生成することから、酸性の温泉に用いる場合には pH および泉質に十分注意を払う必要がある。また有機物との反応でも有機クロラミンを生成する。

4. 銀イオン

銀イオンには古くから消毒作用があることが知られていた¹⁰⁾。これまで温泉施設での応用はそれほど多くはないが、残留性があり揮発することがないことや臭いがなく、また pH にほとんど影響されないことなど¹¹⁾、塩素薬剤の欠点を補う性質を有している。図5に示したように pH9.1 の B 源泉に、*L. pneumophila* を添加した実験では、銀イオン濃度 0.05mg/L で消毒効果を示していた。また塩化物イオン、硫酸イオン濃度が高い A 源泉で消毒効果がやや低下する傾向がみられた。一般に多量の塩化物イオン、硫化水素、硫酸イオンなどが存在すると銀イオンの濃度が低下する。例えば Na-Cl 泉 (pH8.0、塩化物イオン濃度 2,579mg/L)、Na·Ca-Cl 泉 (pH8.2、塩化物イオン濃度 4,160mg/L)、Na-Cl·SO₄ 泉 (pH8.2、塩化物イオン濃度 1,060mg/L) では、いずれも高濃度の塩化物イオンのため、銀イオン濃度 0.05 ~

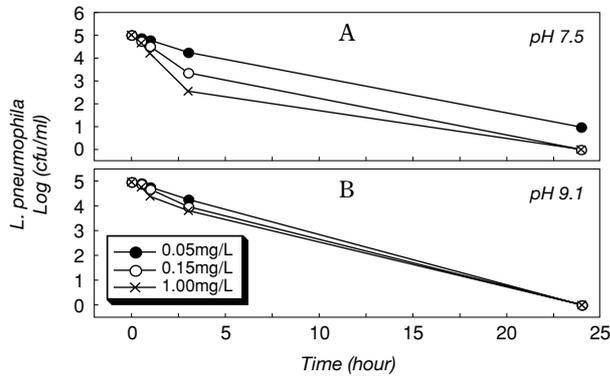


図5 泉質の異なる温泉水を用いた*L. pneumophila*に対する銀イオン殺菌効果

A: pH 7.5, Cl^- 120mg/L, SO_4^{2-} 842mg/L

B: pH 9.1, Cl^- 11.3mg/L, SO_4^{2-} 30.9mg/L

0.15mg/Lの範囲で消毒効果を示さなかった。

銀イオン消毒は即効性に欠けることから、ろ材等濾過槽や配管を十分に洗浄しておかないと銀イオンが十分に存在しているにもかかわらず、レジオネラ属菌が検出される。したがって、適当な薬剤を用いてろ材等濾過槽や配管を洗浄する必要がある。銀イオン消毒では、浴槽での銀イオン濃度管理が重要であることから、簡易的な銀イオン測定装置の開発が望まれる。

アメーバによる *L. pneumophila* の貪食実験では、銀イオン濃度 5mg/L で 3 時間作用してもアメーバに貪食された *L. pneumophila* は完全には消毒されない。またシスト化したアメーバの殺細胞効果は、銀イオン濃度 5mg/L では全く効果が認められない。

5. 銅イオン

銅イオン消毒では pH の影響を強く受ける。例えば pH7 では効果が認められているが、pH9 では効果を示さないことが実験的に研究されている¹¹⁾。一般に抗菌薬殺菌力を測定する指標の一つとして最小殺菌濃度を測定する。実際に温泉を用いた検討では、pH が 9 以上でも 0.5mg/L で消毒効果が認められた温泉があった。逆に pH が 7 であっても消毒効果が認められない温泉もあり、この違いは、温泉の泉質による。

アメーバによる *L. pneumophila* の貪食実験では、銅イオン濃度 10mg/L で 3 時間作用してもアメーバに貪食された *L. pneumophila* は完全には消毒されない。またシスト化したアメーバの殺細胞効果は、銅イオン濃度 10mg/L では全く効果が認められない。

6. 有機系消毒剤

第四級アンモニウム塩（塩化ベンザルコニウム）と 2-フェノキシエタノールの混合液を含むテレミスト[®] によるレジオネラ属菌の消毒では、0.03% で消毒効果が認められた。またアメーバに対する細胞致死率は、10 分で 90%、60 分で 100% であった。0.03% テレミスト[®] で濾過槽およびろ材の洗浄を行った結果、濾過槽からアメーバは検出されなかった。同様に浴槽内の清掃を行ったところ、レジオネラ属菌は検出されなかった。テレミスト[®] は過酸化水素水や高濃度塩素に比べ扱いやすい利点があるが、消毒後は十分に洗浄し、薬剤が残らないように注意する必要がある。バイオフィルムの除去に関してのデータはほとんど無いようなので今後の検討に期待する。

7. 加温

高温消毒はろ材を消毒する上では最も効果的であると考えられる。70～80℃の熱湯をろ材に通せば、レジオネラ属菌は消毒され、アメーバは殺細胞される。問題点として火傷の危険性や、消費エネルギーが大きいためコストが掛かること、ろ材全体に熱湯が行き渡らない可能性があることなどから、温泉施設での普及は進んでいない。

なお、貯湯槽の湯温を 60℃ 以上に保つことが原則となっているが、70℃ 以上に保つことを推奨する。

8. その他

紫外線、オゾン、光触媒による消毒に共通していることは、残留性がないことである。したがって、循環式浴槽に使用する場合には残留性のある消毒剤、例えば塩素系薬剤との併用が必要である。

以上、温泉水中のレジオネラ属菌の消毒方法について紹介した。わが国の温泉資源は 27,800 カ所に及び、源泉の約 40% は単純温泉である。このような温泉では循環ろ過を導入しているところが多いが、単純温泉は比較的消毒剤が泉質の影響を受けないことから、レジオネラ属菌を消毒しやすい温泉でもある。一方で温泉はさまざまな泉質と pH を有することから、どのような消毒剤を選ぶかは、泉質と pH を十分に考慮して、その温泉と相性の良い消毒剤を選択することを勧める。そのためにも現地にて採取した源泉にレジオネラ属菌を添加し、有効な消毒剤を

決定するなどの検討は必要である。また業者はその後のレジオネラ属菌の検査を定期的実施することをお願いする。最後に循環式浴槽のレジオネラ属菌の消毒方法について紹介したが、温泉の掛け流し浴槽でも清掃を十分に行なわなければレジオネラ属菌が検出されることを付け加えておく。

Ⅲ. 温泉水中レジオネラ属菌の検出法

1. 培養法

一般的に行われている検出法である。方法の詳細はレジオネラ症防止指針¹⁾に述べられているので割愛するが、簡潔に述べると、滅菌した容器にて採水した後、塩素消毒がなされている検水に対しては残留塩素をチオ硫酸ナトリウムにて中和する。その後検水を遠心法か、あるいは濾過法により濃縮し、等量の0.2MHCl/KCl (pH2.2) bufferを添加、室温で4分間置く酸処理あるいは50℃、20分間の熱処理を加え、WYO α 培地などのレジオネラ属菌用選択培地に塗布する。湿潤下5～7日間培養し、特有の酸臭を有する灰白色湿潤集落をレジオネラ属菌として推定する。その後L-システイン要求性を確認後、特異抗血清により血清群を確定する。集落1個は検水100mLあたり10 CFU (Colony Forming Unit) に相当し、これが検出限界となる。

培養法の長所は、生きてレジオネラ属菌を検出できることであり、温泉浴槽水中での危険性を直接知ることができることにある。ただし検出限界については注意する必要がある。すなわち酸処理あるいは熱処理による負荷、さらにはWYO α 培地等の選択培地に含まれる選択成分などがレジオネラ属菌にも影響し、検出感度は低下する。われわれの検討では回収率が10～30%程度となる。たとえば検水100mL中10 CFUの検査結果でも実際はその10倍存在すると思われるべきである(未発表データ)。

一方培養法の欠点は、採水してから検査会社に送付し、採水から前処理を含め結果が得られるまでに1週間以上要すること、また検査費用が1サンプルにつき数千円かかり、サンプル数によっては検査費用が高額となることがあげられる。現行のレジオネラ症防止指針では年一回以上の検査を求めているが、以上の欠点は各施設の検査頻度に影響を及ぼす

ことも否めない。このような培養法に生じる問題はレジオネラ属菌感染症に対する施設安全管理の運用面で問題が残る。

2. 遺伝子検出法

培養法に対し遺伝子検査法は、検査にかかる時間は非常に短く条件によっては採水日の内に結果が得られる。また検査特異度も高い。しかし、検出感度については培養法に比べ劣るとは言われるが、方法によっては培養法に匹敵するものもありさまざまである。採水の方法は培養法に準じ、濃縮した検水を検査対象とする。現在行われている方法は研究段階のものも含めいくつかある。PCR (Polymerase Chain Reaction) 法が一般的に行われる。すなわちレジオネラ属菌に共通して特有な遺伝子(通常16s RNAをコードする遺伝子領域)¹²⁾あるいは、臨床から分離されるレジオネラ属菌の大部分を占める*L. pneumophila*に特異的な遺伝子(mip gene: macrophage infectivity potentiator geneなど)¹³⁾をターゲットにし、それぞれのプライマーを設計してターゲット遺伝子を例えば95℃ denaturing, 55℃ annealing, 72℃ elongationのそれぞれ一定時間を1サイクルとするサイクルの繰り返しで増幅し、増幅産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイドで染色、UV照射によりサイズマーカーバンドを参照に目的の遺伝子領域が増幅されているか否かを確認する。検出感度は通常培養法に比べやや劣るとされる。また通常のPCR法は半定量的であるがこれに対し、検出特異度を向上させ、さらに定量性を持たせたPCR法としてPCR増幅量をリアルタイムでモニターし解析するreal-timePCR法がある。これは初発のDNA量を縦軸にプロットし、一定の指数関数的増幅量になるPCRサイクル数(threshold cycle; Ct値)を横軸にプロットする。既知量のDNA濃度の希釈段階を用いてスタンダードを作成し、未知濃度サンプルのDNA濃度をスタンダードから求める。real-timePCR法にはいくつかの方法がある。一つはPCR反応によって合成された二本鎖DNA増幅産物に結合する蛍光試薬を用い、結合した蛍光試薬の励起光を検出するインターカレーター法(蛍光試薬としてSYBER GREENを用いる。特異性は遺伝子増幅産物の融解温度を測定することで確保)である。次はTaqMan probe法で、これは5'末端を蛍

光物質 (FAM など) で、3'末端をクエンチャー物質 (TAMRA など) で修飾したオリゴヌクレオチド (TaqMan プローブ) を PCR 反応系に加える方法である。TaqMan probe はターゲット DNA の特異配列にハイブリダイゼーションするが、通常 probe に結合したクエンチャーにより蛍光励起が抑制されている。しかし、同時にスタートする PCR 反応に伴うポリメラーゼの 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により、ハイブリダイズした TaqMan probe が分解されていく。その probe の分解に伴い蛍光色素がプローブから外れる。それにより外れた蛍光色素は probe 末端に結合するクエンチャーからの抑制から解除され、蛍光が励起されて検出される。本方法はターゲット遺伝子特異的な DNA probe を用いるので特異性はインターカレーター法よりも高い。次にサイクリングプローブ法がある。これは PCR 反応 DNA 増幅産物に対し、RNA を probe 配列中央に含むキメラ probe が結合する。結合後 RNaseH によりキメラ probe 中央の RNA が分解される。これによって TaqMan probe 法と同様に probe に結合したクエンチャーによる抑制が外れ、同様に probe に結合した蛍光物質が励起される。サイクリングプローブ法は、RNA 付近にミスマッチが存在すると、RNaseH による切断は起こらないので、一塩基の違いを認識することができるため、非常に特異性の高い検出法となる。

一方、栄研化学 (株) により開発された LAMP 法 (Loop-mediated Isothermal Amplification) は、レジオネラ属菌に共通した 16s RNA をコードした遺伝子の 6 つの領域に対する 4 種類のプライマーを用い、PCR 法とは異なり鎖置換反応を利用して 65℃ の一定温度で反応させることを特徴とする。本方法は定量性に優れるとともに、増幅効率が非常に高く遺伝子産物を目視によっても検出できることが大きな特徴とされる。現在保険適用されている唯一の遺伝子診断法である。われわれもまた LAMP 法を用いてアスファルト道路路上に溜まった雨水からレジオネラ属菌を検出している¹⁴⁾。しかしながら以上の方法は、温泉水中に存在するレジオネラ属菌、あるいは *L. pneumophila* のターゲット DNA を検出するため、生菌とともに死菌をも検出してしまう難点がある。多くの施設では、レジオネラ属菌の検出をレジオネラ感染予防対策として、施設管理の面から行う

ので、日常的には塩素消毒を中心とするレジオネラ消毒が適切に効果をもたらしているかを確認することに大きな関心がある。この観点からすると、迅速性や特異性に優れた遺伝子検出法も、死菌を検出してしまうことで、生菌を検出する培養法に対しては大きなビハインドを抱える。そこで生菌の検出ができる遺伝子検出法が開発されている。その一つがエチジウムモノアザイド (Ethidium monoazide : EMA) を用いる EMA PCR 法¹⁵⁾、あるいは EMA real time PCR 法¹⁶⁾ である。以下、本法について簡単に紹介する。本法の原理は EMA が生菌の膜を通過することができず、死菌のみ細胞内に浸透することを利用する。たとえば *L. pneumophila* を含むと疑われる環境水を常法により濃縮し、一定濃度の EMA を添加する。暗所に一定時間インキュベーションし、その後ハロゲンランプを照射し、レジオネラ細胞外の EMA を分解する。さらに遠心し洗浄してレジオネラ細胞を集める。適当な DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、PCR、あるいは real time PCR を行う。もしレジオネラ属菌が含まれ生菌であれば EMA は細胞内に浸透せず、DNA 二重結合にインターカレートしないので DNA は無傷であり PCR 反応が開始され、DNA 増幅が起こる。もし死菌であれば、細胞内に浸透した EMA が DNA 二重結合にインターカレートするため、DNA ポリメラーゼ反応が阻害される。結果として、PCR 反応は開始されず DNA 増幅は起こらない (図 6)。

以上、温泉水中のレジオネラ属菌の主な検出法について紹介した。特に前処理に濾過濃縮法を用いる場合には、温泉水中に含まれる沈殿物が遺伝子検出法では影響することがあるので注意する。

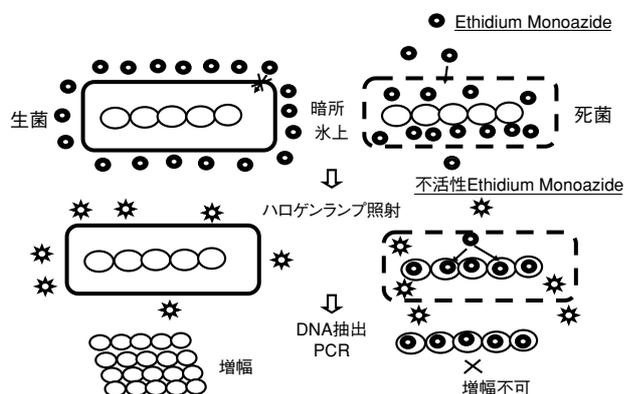


図 6 EMA PCRによる生菌/死菌の区別の原理

文 献

- 1) (財)ビル管理教育センター 厚生省生活衛生局企画課監修：レジオネラ症防止指針(第3版). 2009.
- 2) 加藤尚之, 大野 章, 齋藤宏治, 山口恵三：温泉施設に分布する *Legionella pneumophila* の侵入経路の解明に関する研究, 温泉科学, **60** : 434-444, 2011.
- 3) 吉田眞一：レジオネラの細菌学と感染症, 福岡医誌. **97** : 192-199, 2006.
- 4) White GC. (1998) : Handbook of chlorination and alternative disinfectants. 4th edition. New York : J. Wiley
- 5) (財)中央温泉研究所：平成 14 年度温泉利用施設における衛生管理等検討調査, 環境省業務報告書. 2003.
- 6) 藪内英子：人工環境水中のレジオネラとそれによる感染症, 予防医学. **39** : 22-30, 1997.
- 7) Michael, S. Levente, E. Rudolf, A. and Jorg, H : Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environ. Microbiol. **63** : 2047-2053, 1997.
- 8) Ohno, A. Kato, N., Yamada, K. Yamaguchi, K : Factors influencing of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. Appl Environ Microbiol. **69** : 2540-2547, 2003.
- 9) 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** : 109-115, 2010.
- 10) Lansdown AB : Silver. I : Its antibacterial properties and mechanism of action. J Wound Care. **11** : 125-130, 2002.
- 11) Yu-sen E. Lin, et al.: Negative Effect of High pH on Biocidal Efficacy of Copper Silver Ions in Controlling *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. **68** : 2711-2715, 2002.
- 12) 中室克彦, 土井 均, 肥塚利江, 枝川亜希子 (2012) : *Legionella* の低濃度オゾン水殺菌効果に及ぼす温度及び pH の影響
- 13) Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K : Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. Appl Environ Microbiol. **63** : 2489-2494, 1997.
- 14) Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, Meunier O, Prevost G, Piemont Y, Fleurette J, Monteil H : Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. J Clin Microbiol. **30** : 920-924, 1992.
- 15) Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, Kura F, Kato N, Matsubayashi K, Okumiya K, and Yamaguchi K : Emerg Infect Dis. **15** : 1295-1297, 2009.
- 16) Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, Rudi K : Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. Biotechniques. **34** : 804-810, 812-813, 2003.
- 17) Chen NT, Chang CW : Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. J Appl Microbiol. **109** : 623-634. 2010.