

2009 42010A

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

迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る
公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 倉 文 明

平成22（2010）年3月

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

迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る
公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 倉 文 明

平成22（2010）年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究-----1
倉 文明

II. 分担研究報告

1. 液体培養(Liquid Culture)定量 RT-PCR を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討-----23
遠藤卓郎、烏谷竜哉、泉山信司
2. リアルタイム PCR によるレジオネラ生菌のみを迅速検出する方法における
ethidium monoazide (EMA) と propidium monoazide (PMA) の効果の比較研究-----33
常 彬、前川純子、田栗利紹、杉山寛治
3. EMA-PCR による浴槽水中のレジオネラ生菌の検出の検討-----39
杉山寛治、神田 隆
4. 浴槽水を対象にした各種遺伝子検査法成績の比較-----49
田栗利紹、遠藤卓郎、泉山信司
5. リアルタイム RT-PCR 法を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討-----57
荒井桂子
6. LAMP 法を用いたレジオネラ属菌検出における前処理の検討-----63
荒井桂子
7. EMA 処理とリアルタイム PCR のコンビネーションによる環境中のレジオネラ
生菌のみを定量検出する方法に関する研究-----69
荒井桂子
8. 迅速検査用阻害回避試薬の変更対応-----77
泉山信司、遠藤卓郎、猪又明子
9. qRT-PCR 及び阻害回避試薬を用いた LAMP 法の浴槽水等試料における検討-----87
遠藤卓郎、緒方喜久代、中嶋 洋、泉山信司、磯部順子、矢崎知子
10. ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究-----115
黒木俊郎、中嶋 洋、藤田雅弘
11. *Legionella pneumophila* の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析
—土壌分離株および臨床分離株と浴槽、冷却塔水分離株との比較—-----125
前川純子
12. 検査法の検討 4 効率のよい集落観察法の普及と検討,

分離培地の保存に関する検討-----	137
森本 洋、緒方喜久代、磯部順子、矢崎知子	
13. ゼラチン・ディスク配付による菌数測定的外部精度管理-----	159
渡辺祐子	
14. 日本の環境水から分離される既存の DNA-DNA ハイブリダイゼーションキット にないレジオネラ属菌種の同定-----	185
山崎利雄、前川純子	
15. <i>Legionella pneumophila</i> の自由生活性アメーバ感染性における宿主特異性の問題—	193
八木田健司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	203
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	205

I . 総括研究報告書

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）

総括研究報告書

迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の
衛生管理手法に関する研究

研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨： わが国におけるレジオネラ症の集団発生は主として入浴施設を介して起きており、浴槽水中でのレジオネラ増殖が大きな問題となっている。現行では浴槽水中のレジオネラ属菌検査は培養を基本としており、結果判定までに 1 週間程度を要している。このため、関係者からは迅速な汚染度評価方法に関する要望が強い。そこで、以下の検討を行い、成果を得た。

- 1) 標的にリボソーム RNA 遺伝子の転写産物であるリボソーム RNA (rRNA) そのものを利用する高感度定量 RT-PCR 法 (qRT-PCR) を昨年度確立した。これに、濃縮試料の 18 時間液体培養とを組み合わせることで、選択的な生菌の検出が可能となった (Liquid Culture qRT-PCR)。浴槽水等 83 検体で培養法との相関を確認できた。
- 2) Ethidium monoazide (EMA) と propidium monoazide (PMA) は特異的に死菌の細胞膜を透過し、その染色体 DNA を切断することにより、PCR の増幅を抑制できる。EMA または PMA 処理およびリアルタイム PCR のコンビネーションによりレジオネラ生菌のみ検出できることを証明した。EMA は少量で PMA と同様の効果を示した。塩素濃度により EMA 使用量の調整が必要であった。すなわち死菌が多く存在する場合 (例えば、塩素濃度が高いとき) は、高濃度の EMA が必要であった。
- 3) アルカリ熱抽出による DNA 抽出はその後の核酸増幅反応においてフミン等の阻害作用を受けやすい。そこで阻害回避試薬を用い実際の浴槽水等の試料への LAMP 法の適用を検討した。試料水の濃縮倍率を 200 倍にすることにより、10 CFU/100mL 未満の低レベルのレジオネラ属菌汚染を迅速検査法により検出できることがわかった。
- 4) 開発者のみならず他の研究者によっても実施可能な検査法であることを確認するために、本研究班で条件設定した qRT-PCR、EMA-qPCR、阻害回避試薬を利用した LAMP 法を複数の地衛研で取り組み、その有用性を確認できた。なお、EMA-qPCR については、地衛研の研究分担者、研究協力者を対象に 1 日間の研修を 5 月に実施した。
- 5) 現場で ATP 量を測定して迅速に浴槽水を衛生管理する指標値 (昨年度提案) をもとにして、3 施設の複数の浴槽をモニタリングした。浴槽の清掃と関連して ATP の数値の低下が認められ、ATP の量とレジオネラ汚染がよく関連していた。その場で結果が判明するので衛生管理がやりやすくなったと管理者からの評価を得た。
- 6) *L. pneumophila* の遺伝子型別法とモノクローナル (MAb) 抗体型別を実施した。浴槽、冷却塔、土壌という生息環境による環境分離株の違いが認められ、土壌と冷却塔由来の株は多様性が少なく、それぞれ 3 つ、1 つの complex を形成した。MAb3/1 陽性株の % は臨床分離株、浴槽水分離株、土壌分離株、冷却塔水分離株でそれぞれ 85%、23%、14%、2% であった。環境の株は一様に人に感染するわけではなく、そのごく一部分が人に感染していた。
- 7) 一定の菌数の *L. pneumophila* を含んだゼラチンディスクを配布して、7 つの民間検査

機関を含む 30 の機関について外部精度管理を実施した。

- 8) 冷却塔及び浴槽水由来の *L. pneumophila* の遺伝子型は異なり、冷却塔型は比較的均一である。この違いが宿主アメーバの違いによるものか検討した。アメーバ増殖によるプラーク領域の大きさの比較によりレジオネラのアメーバへの感染性を評価した。どちらの生息環境由来の菌株も両環境由来のアメーバに同程度の感染性を示し、この仮説は実証されなかった。
- 9) 効率の良い集落観察法（斜光法）の研修を昨年度に続き行い、レジオネラ属菌の定性までの時間短縮、より正確な定量結果を報告することが可能となった。分離培地の保存に関する検討を行い、適切な保存を行えば製造後 3 ヶ月間はレジオネラ属菌の発育性能が保持されていることを確認した。
- 10) 市販 DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) キットで同定できないが、日本で分離されている *L. busanensis*, *L. gresilensis*, *L. londiniensis*, *L. nautarum*, *L. quinlivanii*, *L. geestiana* の 6 つのレジオネラ属菌を、DDH 法により同定可能にした。

本研究で検討した遺伝子検査法の成果の一部は、レジオネラ症防止指針第三版（(財) ビル管理教育センター）に記載された。また各種研修会で講義された。

研究分担者・所属機関及び職名

遠藤卓郎・国立感染症研究所客員研究員
常 彬・国立感染症研究所主任研究官
前川純子・国立感染症研究所主任研究官
八木田健司・国立感染症研究所主任研究官
山崎利雄・国立感染症研究所主任研究官
荒井桂子・横浜市衛生研究所医務職員
緒方喜久代・大分県衛生環境研究センター
主幹研究員
黒木俊郎・神奈川県衛生研究所専門研究員
杉山寛治・静岡県環境衛生科学研究所
微生物部長
田栗利紹・長崎県環境保健研究センター
主任研究員
中嶋 洋・岡山県環境保健センター
特別研究員
森本 洋・北海道立衛生研究所研究職員
渡辺祐子・神奈川県衛生研究所主任研究員

A. 研究目的

わが国におけるレジオネラ症の集団発生は入浴施設を介して起きており、浴槽水中でのレジオネラ増殖が大きな問題となっている。

現行では浴槽水中のレジオネラ属菌検査は培養を基本としており、結果判定までに 1 週間程度を要している。このため、関係者からは迅速な汚染度評価方法に関する要望が強い。近年、迅速検査法として多方面で遺伝子検査が導入されており、レジオネラ検出用の試薬も市販されている。これまでに、遺伝子検査を用いて定性検査がなされており、迅速性に優れるものの、培養法との検査結果の不一致が指摘されたり（培養法に比べ陽性率が高い）、あるいは温泉水中の増幅阻害物質が問題とされてきた。

そこで、基準となる菌種を選択し、厳密な培養条件のもとで得られた菌を用いて遺伝子検査と培養法による菌量計算を行い、両者の関係付けを行なった。また、迅速でかつ現行の培養法の結果とよく対応できるようにするために生菌を検出する PCR 法を 2 種類開発し浴槽水に応用した。

さらに、わが国においてレジオネラ症の主要な感染源は温泉などの入浴施設であると推測されているが感染源の不明な例も多い。そこで、レジオネラ症の起因菌株について、レジオネラレファレンスセンターにおいて収集し、遺伝子型別 (SBT) を行った。

B. 研究方法および材料

1. 標準菌

1980年にレジオネラ肺炎患者より分離され、わが国における *L. pneumophila* serogroup 1 の基準株として広く用いられている長崎 80-045 株 (斉藤ら、1981) を暫定的な基準株とした。この保存株を BCYE α 培地 (DIFCO) に植え、30°C、4 日間培養した。35°C で培養しないのは、細長い形態の菌となるのを防ぎ正しい DNA-cfu 関係を求めるためである。得られた菌を生理食塩水に McFarland No. 2 程度の濃度に懸濁し、数段階の 10 倍希釈系列を作製し、希釈液ごとに DNA 抽出を行い、あわせて培養による菌数測定を行なった。

2. 浴槽水の検査

200mL あるいは 500mL の浴槽水をろ過濃縮 (ミリポア ISOPORE GTTP02500 あるいは HHTP04700、ポリカーボネート 0.2 μ m, 0.4 μ m) した。ろ過のできなかつた薬湯等の一部は遠心濃縮した。培養法は GVPC 培地で 37°C、5~7 日間培養した。一部には WYO α 培地や MWY 培地も用いて比較した。DNA の抽出は通常は酵素溶菌法により行った。同時に遊離残留塩素濃度 (現場測定、DPD 法) を測定した。

3. 核酸抽出と DNA 増幅

DNA 抽出はアルカリ抽出法と酵素溶菌法の 2 方法を用いた。酵素溶菌法では、DNA 抽出工程を中性域 (pH 7.6 の TE 緩衝液使用) で行い、Proteinase K により溶菌する。さらに DNA 回収用シリカ・カラムを使用した。一部にはキレックス樹脂の添加と加熱の手順で DNA を抽出した。

DNA 増幅法としては、リアルタイム PCR (ここではサイクリングプローブ法と通常のプローブ法) や LAMP 法を用いた。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組合せにより蛍光を検出し、高感度で非常に配列特異性が高い。

LAMP 法は、被検試料を恒温で培養し、濁度測定によってレジオネラを検出する迅速簡便な方法である。これら 2 つの方法は、それぞれ 5S rRNA 遺伝子、16S rRNA 遺伝子という異なる遺伝子を標的にしている。EMA-PCR 法では 16S rRNA 遺伝子を標的に molecular beacon probe を設定した。

RNA の抽出は、qRT-PCR の酵素溶菌希釈法に準じた。RT 反応には PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) を使用した。RNA 抽出液 5 μ l に RT 反応バッファー 2 μ l、RT 酵素 0.5 μ l 及び reverse primer 0.5 μ l を加え、RNase free dH₂O で全量を 10 μ l とし、42°C、15 分間逆転写反応を行った。反応後、85°C 5 秒で酵素失活を行った。この RT 反応液に、15 μ l の TE 緩衝液を加えて全量を 25 μ l とし、そのうちの 5 μ l を定量 PCR (qPCR) の鋳型とした。

LC qRT-PCR 法によるレジオネラ陽性の判定は、加熱殺菌試料の Ct 値 (Ct (H)) と未加熱試料の Ct 値 (Ct (N)) を比較し、未加熱試料において Ct 値の減少 (Δ Ct) が有意にみられた場合にレジオネラ生菌が存在すると判断した。

4. Ethidium monoazide (EMA) と PCR のコンピネーションによるレジオネラの生菌と死菌の区別

Legionella pneumophila 80-045 株を生理食塩水に懸濁し、約 10⁷ CFU/100 ml の懸濁液を作製した。これらの菌液を遊離塩素 1 ppm で室温 30 分処理し、死菌の調製を行った。レジオネラの生菌および塩素処理した死菌を含む懸濁液それぞれを 500 mL の水道水に添加し、モックサンプルを作製した。一方、公衆浴場およびモデル浴槽から水サンプルを採集し、解析を行った。これらのサンプルは遠心により濃縮し、酸処理したサンプル 0.1 mL を BCYE または GVPG 寒天培地に塗布し、37 °C で培養した。濃縮サンプルに EMA を添加し、遮光下 4°C で 5 分間放置した後、可視光を 5 分間照射した。常法により染色体 DNA

を精製し、レジオネラの 16S rDNA を標的とする qPCR による定量解析を行った。

5. ATP 量の測定

ATP 量の測定は入浴施設の管理担当者に依頼し、簡易測定キット (ルシパックワイド (キッコーマン)) により行った。キットの説明書に従って専用の測定器 (ルミテスター PD-10N) にキット本体をセットし、測定器に表示された数値を読み、ATP 量を測定した。

6. *Legionella pneumophila* の遺伝子型の解析

EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した。さらに、遺伝子型別による菌株間の類縁関係を示すため、BioNumerics (Applied Maths) を用いて、1 遺伝子のみが異なる ST 間をまず最小の長さの枝でつなぎ、それ以上の差異をもつ ST 間を差異数に比例した長さの枝でつなぎ、枝の合計の長さが最小になるように minimum spanning tree を作成した。

7. ゼラチン・ディスク配布による外部精度管理

各ディスク 2 枚をセラムチューブに入れ、試料 1、2 として国立感染症研究所の菌株輸送法に基づいて病原体運搬用容器 (カテゴリー A) に入れた上で、「ゆうパックチルド」にて各機関あてに発送した。なお、地研に対しては希釈用 PBS buffer も同封した。また、当所に対してもディスク菌数確認のため、同様に各ディスク 5 枚を発送し、2 日後に到着するよう到着日を指定した。

各機関ではディスク 1 枚を 1/50PBS (民間検査機関では滅菌蒸留水) 10ml に加え 36°C で完全に溶解して原液とし、「検水作製方法」に従って、菌数測定を行い (民間検査機関では、可能であれば測定とした) 次に、原液 1ml を 1/50PBS 500ml に加えた検水を作製し、各機関

の検査方法で菌数の測定を行うよう求めた。回答期間は 1 ヶ月とし、さらに原液菌数と作製検水菌数から回収率を求め回答様式に記載し、具体的な検査方法の内容についても詳細に記載することを依頼した。

8. アメーバへの *Legionella pneumophila* の感染性

3 日間培養した *L. pneumophila* 株をアメーバ用バッファー (NaCl 12.0g、MgSO₄ · 7H₂O 0.4g、CaCl₂ · 2H₂O 0.4g、Na₂PO₄ 14.2g、KH₂PO₄ 13.6g/1000ml を 100 倍希釈して調製) で濃度約 1.0 O.D. に調整した。加熱処理した大腸菌 (DH1) も同様に調製し、両菌浮遊液を等量で混合した。この菌液を 90mm 径の寒天プレート (1.5%) に約 0.5ml を全面に塗布し表面を乾燥させた。これをレジオネラ菌株 (培養温度の条件も含めて) ごとに作製し試験用培地とした。

アメーバは増殖中の栄養体をプレート上でアメーバ用バッファーで浮遊、回収し、500xg、5 分間の遠心で濃縮後、レジオネラ属菌を塗布したプレートに 3 μl を滴下し乾燥させた。また同じアメーバ濃縮液は大腸菌のみを塗布した寒天プレート (菌量として 1.0 O.D. を 0.5ml 塗布) に同様に 3 μl 滴下し、アメーバの正常な増殖を観察した (対照実験)。

感染時の温度条件は菌株およびアメーバ株の事前の培養温度に合わせた。即ち、30°C で培養した菌株およびアメーバ株の感染は 30°C で行うという条件とした。

感染性の有無は感染 2 日後において試験用培地上で顕微鏡的に観察されるアメーバの変化 (細胞の崩壊、細胞内で運動する菌の確認)、また対照となる大腸菌塗布寒天培地上で観察される正常なアメーバ増殖との比較 (アメーバ増殖によるプラーク領域の大きさの比較) で評価した。なおアメーバ増殖性の差を表すために、本実験ではプラーク領域の大きさから以下のようなスコアを設定した。増殖性の高い順から、対象実験と同程度の増殖を示

す場合を++、対象の約 50%の増殖を示す場合を+、増殖せずに滴下した領域に止まる場合を±、滴下領域内で死滅した場合を-とした。

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがい、周辺の環境の汚染を引き起こさず、個人情報保護に十分に配慮して行われた。

C. 研究結果および考察

1) 液体培養 (Liquid Culture) 定量逆転写 (RT)-PCR を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討

昨年度、rRNA を鋳型とする qRT-PCR 法を開発し感度を 1,000 倍以上高めることができ、高感度化することで抽出過程で特段の処理を施さなくても阻害反応を回避できることが確認された。今年度は簡便、迅速で定量性に優れたレジオネラ属菌の生菌検出法を開発する目的で、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC qRT-PCR) を検討した。昨年度開発したレジオネラのリボソーム RNA を鋳型として検出する定量 RT-PCR 法 (qRT-PCR) の核酸抽出に先立ち、濃縮試料を液体培地で 18 時間培養し生菌の rRNA を増幅させ、生菌の rRNA を優先的に検出する方法を試みた (図 1)。通常の培養法に用いる酸処理検体をレジオネラ液体培地に加えて1夜培養すると、rRNA は 100 倍に増加した。培養液の一部を酵素溶解して精製操作なしに希釈するだけの簡便な操作で、鋳型調製を行うことが可能であった。以上より、温泉試料から生菌数の測定が可能な LC qRT-PCR を確立した。ROC 曲線の解析により求めたカットオフ値 $\Delta Ct \geq 1.5$ により、培養法との相関を求め、培養法と LC qRT-PCR との間には有意な相関が認められた (図 2 (a)、 $R^2=0.487$, $p<0.01$)。なお、培養法、LC qRT-PCR 法ともに 50 CFU/100ml 以上の定量値を示した検体に限定すると、両検査法の間さらに高い相関が認められた (図 2 (c)、 $R^2=0.866$, $p<0.01$)。培養法に代わる生菌迅速検査法とし

て活用が期待される。

2) Ethidium monoazide (EMA) または propidium monoazide(PMA)と PCR のコンビネーションによるレジオネラの生菌と死菌の区別

Ethidium monoazide (EMA) と propidium monoazide (PMA) は特異的に死菌のみの細胞膜を透過し、その染色体 DNA を切断することにより、PCR の増幅を抑制できる。我々はこの特性を利用し、EMA 処理およびリアルタイム PCR のコンビネーション使用による人工的水利用設備のレジオネラ生菌のみの定量検出することを昨年度に報告した (Appl Environ Microbiol 75:147-153, 2009)。本年度は、PMA 処理およびリアルタイム PCR のコンビネーションによるレジオネラ生菌のみの定量解析を試し、環境中のレジオネラ生菌のみを迅速検出における EMA と PMA の効果を比較した(文献 5)。その結果、PMA 処理とリアルタイム PCR のコンビネーション使用も EMA と同様に、人工的水利用設備のレジオネラ生菌のみの定量検出ができることを示した (図 3)。しかし、レジオネラの死菌由来 DNA の PCR 増幅を抑制に必要とする PMA の量は EMA の約 4 倍であった。また、PMA は高価であるため、人工的水利用設備のレジオネラのサーベイランス調査には EMA がもっとも実用的であることが示唆された。また、浴槽水試料の中に存在しているレジオネラは、EMA 等に感受性が高いので、死菌量に関係する塩素濃度により、EMA や PMA の使用量の調整が必要であった (表 1)。EMA-PCR を開発者以外の地衛研で実施しても、同様に培養法とよい相関が得られた (図 4、浴槽水の塩素濃度により EMA 処理濃度を 2 段階 $1 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$ に変えた)。

3) 温泉水試料ではフミン質等による遺伝子増幅反応の阻害が懸念されることから、核酸抽出酵素処理・カラム精製工程を中性-弱酸性下で行なうことによる核酸抽出法を提案して

いた。一方、簡易な調製方法も求められており、アルカリ熱抽出法と反応回避試薬の組み合わせにより阻害の回避や軽減効果が得られた。検出感度 1CFU/100mL の培養法を比較対照として行い、迅速検査法が 1CFU/100mL レベルのレジオネラ属菌を検出できることを確認できた。

4) ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリング

入浴施設への HACCP システムの導入に向けて、浴槽水の ATP 測定をモニタリング項目として入浴施設の衛生管理に応用することを目的に本調査を実施した。3 か所の温泉入浴施設において、実際に衛生管理担当者が ATP 簡易測定装置を用いて浴槽水の ATP 測定を行った。入浴施設での ATP 測定実施期間中に一般細菌数、従属栄養細菌数およびレジオネラ属菌数を測定し、ATP 測定値との関係を解析した。毎日洗浄している浴槽では ATP 値は低く保たれており、洗浄の効果が明らかであった。複数日をあけて洗浄を行う浴槽では、洗浄後の ATP 値は低いものの、短時間で従属栄養細菌が増殖し、これに伴い ATP 値が上昇した。ATP 値の測定は、浴槽水の汚染状況の指標として使用することが可能であり、入浴施設での衛生管理に有効であると考えられた (図 5-1, 5-2)。

ATP 量測定を行っていただいた管理者からの感想を以下に挙げる。

1. 数字で結果がすぐに表れるため、浴槽の汚れを知るかなり良い指標になった。
2. 入浴客が多くて清掃が行き届かなかった日は数字が高く出たことがあり、意識的に衛生管理を行うきっかけになった。
3. 測定しながらの衛生管理に、かなり興味を持つことができた。
4. 汚れの状態を数字で知ることができ、清掃を行う動機付けとなった。
5. 清掃実施の指示を出すのは難しい場合

があるが、数値で示すことで説得力が増した。

6. 清掃の効果を知るのは難しかったが、効果を数値で知ることができ、やる気が出た。

ATP 測定による浴槽水の衛生管理の要点をまとめた (図 6)。

5) Legionella pneumophila の遺伝子型別法とモノクローナル抗体型別

Legionella pneumophila の遺伝子型別法である SBT (sequence-based typing) 法を用いて、土壌分離株 35 株について型別を行ったところ、12 種類の ST (sequence type) に分かれた。昨年度行った浴槽水分離株 40 株、冷却塔水分離株 48 株については、各々 28 種類、6 種類に分かれたので、浴槽水、土壌、冷却塔水分離株の順に多様性が高いことが分かった。共通の ST は各々の間で 1 種類ずつしかなく、生息域により ST の分布が異なることが示された。最も多かった ST は ST48 で 9 株、続いて ST739 が 6 株、ST22 が 5 株であった。Minimum spanning tree 法で解析を行ったところ、土壌由来株は ST48 complex、ST739 complex、ST22・ST448 complex の大きく 3 つのグループに分けられた (図 8A)。

昨年度までに、本邦初発例 (1980 年) から 2008 年までに分離された 86 株の臨床分離株の SBT を行ったが (文献 4)、今年度はレジオネラ・レファレンスセンターで新たに収集した 63 株 (分離年は 2004 年から 2009 年) について型別を行った。合わせて臨床分離株 149 株は 96 種類の遺伝子型 (ST) に分けられ、本法の有用性が確認できた (図 8b)。臨床分離株と共通の ST は土壌分離株との間で 2 種類だった (表 2)。参考までに、昨年度までの調査データを含めると、臨床分離株と共通の ST は浴槽水分離株で 7 種類、冷却塔水分離株で 1 種類であった。臨床分離株 63 株は 51 種類に型別され、多様であった。ST505 が 4 株と最も多く、次いで ST138 と ST384 が 3 株で、2 株存在した ST が 5 種類あった。残りの 43

種類の ST は 1 株のみであった。臨床分離株の血清群の内訳は、血清群 1 が 54 株、血清群 2、3、4、6 が各 2 株、9 が 1 株であった。臨床分離株と共通の遺伝子型の種類が、浴槽水分離株で 7 種類、土壌分離株で 2 種類、冷却塔分離株で 1 種類だったこととわが国のレジオネラ症の感染源の多くが入浴施設であると考えられていることは矛盾しない。

血清群 1 の臨床分離株および土壌分離株について MAb 型別を行った。臨床分離株 54 株は 7 つの MAb 型に分かれ、最も多かったのは Benidorm 28 株 (51%) で、次いで Allentown/France 12 株 (22%) だった。土壌分離株 35 株は 6 種類の MAb 型に型別された。このうち OLDA が 18 株(51.4%)で、Bellingham が 11 株(31.4%)を占めた。由来により MAb 型の頻度が異なっていた (表 3)。図 9 にはこれまでの臨床分離株 123 株のデータをまとめた。

病原性に関連すると考えられている MAb 3/1 に着目すると、臨床分離株は陽性が 85% (123 株中 105 株) だったのに対し、土壌分離株は陽性が 14% (5 株)、浴槽水分離株 (23%)、冷却塔分離株 (2%) と少なかった。

欧米では給湯水や、冷却塔水からのレジオネラ感染が多いが、日本では入浴施設が主要な感染源となっている。日本では欧米に比べて臨床分離株の ST の多様性が高いことがわかったが、それは、欧米とは異なる感染源である浴槽水からの分離株の多様性を反映している可能性がある (文献 4)。

6) レジオネラ属菌の培養検査に必要な外部精度管理

一定の菌数の *L. pneumophila* を含んだゼラチンディスクを配布して、外部精度管理を実施した。19 年度から 20 年度に、試料の配付方法として採用したゼラチン・ディスク法を評価するとともに、試料の処理法間の回収率の相違を検討した。その結果、ゼラチン・ディスク法の実用性については回収率に有意の差がなく、ディスクの使用についても問題は認

められなかった。次いで、神奈川衛研を含む 8 機関で濃縮法と酸・加熱処理法の各検査工程を検討したところ、ろ過法と酸処理法が高い回収率を示した。

今年度は、30 機関 (7 民間検査期間を含む) に配布した。民間検査機関、初回参加の地研、3 回目の参加地研の間で回収率を比較したところ、同程度の回収率のバラツキが認められた。測定結果の集計に当たっては、Health Protection Agency (HPA) に準じて中央値と 6% ~94% 範囲を良好範囲として評価したところ、試料 1 では 15 (11 機関) (図 10)、試料 2 では 8 (5 機関) が範囲外となった。また、ろ過法と冷却遠心法の比較では回収率に大きな差は認められなかったが、加熱処理法に比べ酸処理法は高い回収率を示した(ディスクから由来した直後の菌は加熱処理に弱いので、浴槽水試料の加熱処理結果とは異なる)。回収率にかなりの違いがあり各機関における検査方法に対する精度管理が必要であると考えられた。

その中で、0.2 μm フィルターを使用し酸処理を行った場合回収率の比較では、試料 1 についてはポリカーボネート製が 38.6% (n=5)、ニトロセルロース製が 8.9% (n=8)、また試料 2 についてはポリカーボネート製が 39.3% (n=5)、ニトロセルロース製が 14.0% (n=8) と、ポリカーボネート製が良好という結果が認められた。

7) *Legionella pneumophila* の自由生活性アメーバ感染性における宿主特異性

冷却塔分離株は遺伝的多様性に乏しく浴槽水分離株とは異なっているので (前川報告, Microbiol Immunol, 52:460-464,2008)、この原因が宿主アメーバの違いにある可能性について、冷却塔および温泉の生息環境に由来する *L. pneumophila* (SG1) 株とアメーバ株の適合性を検索した。しかし、どちらの生息環境由来 *L. pneumophila* (SG1) 株も 2 つの生息環境由来アメーバに感染した。冷却塔および浴槽水より分離された *L. pneumophila* SG1 株なら

びにアメーバ株を用いて、菌のアメーバ感染性あるいは細胞内増殖性と分離された環境条件（温度条件）との関係を検討した。環境中に生息するレジオネラ属菌の分布特性を規定する要因としては、菌の宿主アメーバ特異性がその主因となることを示す結果は得られず、菌の温度耐性能力も考慮する必要があるものと思われた。なお、アメーバ属によっては *Acanthamoeba* 属などは *L. pneumophila* SG1 に対する高い感受性を示し、*L. pneumophila* SG1 による環境汚染あるいは感染源成立を規定する生物学的要因となりうることが示唆された。なお、*Vexillifera* 属のアメーバは 1 株飲み検査したが、レジオネラの増殖が認められなかった。

8) 培養法の検討

効率の良い集落観察法の普及と検討：一昨年度報告書において提案した「効率の良い集落観察法(斜光法)」(文献6)について、昨年度に引き続き、他県地方衛生研究所等の協力のもと、研修会及び各地研で実際の検体について本観察法を組み込んだ検査の結果をもとに、その長所、短所、改良点、活用方法の検討を行った。本年度は、「特に発育早期のレジオネラ属菌集落の確認に重点を置いた観察を行う。さらに”斜光法”単独の結果およびコロニーPCRと併せた結果から、定性的な培養法の短縮が可能か検討する。」というテーマに主眼を置いた。その結果、定性までの時間短縮、より正確な定量結果を報告することが可能となった。また、コロニーPCRを併用することで、さらに正確で迅速な結果判定が可能となり、浴槽水の検査が3~5日で結果が得られるようになった(4~7日間短縮できた)。培養2~3日後でコロニーの直径が0.5mmなら、コロニーPCRでレジオネラ属菌の同定が可能であった(表4)。研修後の各地衛研の検討において、臨床検体(喀痰)から培養2日目で *L. pneumophila* のコロニーを特定できた事例もあった。

分離培地の保存に関する検討：市販分離生

培地の有効消費期限が製造後ほぼ3ヶ月間であることから、分離培地製造後3ヶ月間保存中に培地性能が変化するかどうかを検討した。今回確認した培地(Oxoidの非選択培地及びMWY培地〔ともに自家調製〕、MerckのGVPC生培地)については、適切な保存を行えば、製造後3ヶ月間はレジオネラ属菌の発育性能が保持されていた。選択分離培地では、非選択分離培地に比べ、一定の割合で発育が抑制されたが十分な集落出現率であった。

9) DNA-DNA ハイブリダイゼーション(DDH)法によるレジオネラ属菌の同定

市販のDNA-DNAハイブリダイゼーション(DDH)キットにて同定できないレジオネラ属菌種を、DDH法により同定可能にすることを最終目標に、今年度は、塩基配列決定法にて同定された環境水から分離されたレジオネラ属菌の株数を増やし、DDH法での同定結果と比較し検査精度の向上をはかった。昨年報告した *L. busanensis*、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii* の5菌種と新たに *L. geestiana* を追加した。この方法を用いて、日本の環境水から分離されたが16S rRNA遺伝子塩基配列決定法で同定不能であった、レジオネラ属菌株11株の菌種同定を行い、6株の *L. busanensis*、*L. gresilensis* 1株、*L. quinlivanii* 1株を同定できた。

D. 結論

わが国におけるレジオネラ症の集団発生は主として入浴施設を介して起きており、浴槽水中でのレジオネラ増殖が大きな問題となっている。現行の培養法では、結果判定までに1週間程度を要しているため、関係者からは迅速な汚染度評価方法に関する要望が強い。そこで、本研究では、迅速・簡便な検査について以下のように改善した。

リボソームRNAを鋳型として検出するRT-qPCR(逆転写産物を鋳型とした定量PCR)を行い、生菌を検出するDNA迅速検査、液体培

養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC qRT-PCR) を開発した。もう一つの生菌を検出する DNA 迅速検査 EMA(ethidium monoazide)-PCR についても複数の地衛研で実施して培養法とのよい相関がみられた。

バイオマスの指標としての ATP について、現場で浴槽水の ATP を測定して、迅速に浴槽を衛生管理する指標値を設定した。毎日清掃を行っている浴槽では ATP 値は低い値を継続的に示し、菌の増殖が少ないことが示された。ATP 量の測定は、浴槽水の細菌等の汚染状況を現場でリアルタイムに知ることができるため、入浴施設の衛生管理上非常に有効であることが示された。

培養法と遺伝子検査法を組み合わせ、早期のコロニーを遺伝子検査法でレジオネラ属菌と同定することにより、3~5 日で結果が得られるようになった (4~7 日間短縮した)。今年度も効率のよいコロニー観察法 (斜光法) の研修を行い普及させた。

核酸を検出する迅速検査は、死菌を検出する場合でもレジオネラの増殖があったことを示し日常の衛生管理に役立てることができる。また、集団感染事例の感染源のスクリーニングや閉鎖施設の再開にも利用できる。

本研究で検討した遺伝子検査法の成果の一部は、レジオネラ症防止指針第三版 ((財) ビル管理教育センター) に記載された。

E. 健康危険情報
なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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(3):201- 5.
- 2) Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura

K, Iwanaga S, Koyama Y, Kura F, Noami M, Kusaka K, Funato T, Takeda M, Okumiya K, Kato N, Yamaguchi K. 2009. Is driving a car a risk for Legionnaires disease? Epidemiol. Infect. 137(11):1615-22.

- 3) 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(8):1295 -7.
- 4) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Jürgen H. Helbig, Bin Chang, Noriko Kaneko, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Kimiko Kawano, Hiroshi Nakajima, Yuki Tada, Haruo Watanabe, and the Working Group for *Legionella* in Japan. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups, and sequence types. J. Med. Microbiol. (in press).
- 5) Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, and Watanabe H: Comparison of the ability of ethidium monoazide and propidium monoazide for selective detection of viable *Legionella* cells, Jpn. J. Infect. Dis. (in press).
- 6) 森本 洋 : 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 日本環境感染学会誌 2010 ; 25 (1):8-14.

2. 学会発表

- 1) Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, and Watanabe H. 2009. Detection and quantification of viable *Legionella* cells from environmental water samples by combined use of ethidium monoazide and real-time PCR. The 7th International Conference, *Legionella* 2009, Paris.

- 2) Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko N, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, and Watanabe H: DistribuMon of serogroups, sequence types, and monoclonal antibody subgroups among *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan. LEGIONELLA 2009. Paris. October 2009.
- 3) Kura F, Amemura-Maekawa J, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Endo T, Watanabe H: Two groups of *Legionella anisa* isolates of environmental origin in Japan. LEGIONELLA 2009. Paris. October 2009.
- 4) Taguri T, Oda Y, Sugiyama K, Izumiyama S, Kura F: Using flow cytometry to monitor the risk of legionellosis in bath water. LEGIONELLA 2009. Paris. October 2009.
- 5) 泉山信司、倉 文明、遠藤卓郎：遺伝子検査による *Legionella* 属菌の定量. 第 60 回全国水道研究発表会、2009 年 5 月、大宮市.
- 6) 神田隆、高橋奈緒美、杉山寛治、泉山信司、倉文明、遠藤卓郎：市販 DNA 抽出キットを用いたレジオネラ核酸検出法の検討、日本防菌防黴学会第 36 回年次大会 2009 年 9 月、豊中市.
- 7) 荒井桂子、堀切佳代、田中礼子、吉川循江、北爪稔、山口正：免疫磁気ビーズ法を用いたレジオネラ属菌の分離法. 日本防菌防黴学会第 36 回年次大会、2009 年 9 月、大阪.
- 8) 森本 洋、清水俊一、池田徹也、山口敬治：レジオネラ属菌培養法の検討—分離培地と集落について—, 第 77 回日本細菌学会北海道支部学術総会, 札幌, 2009 年 9 月
- 9) 前川純子、倉 文明、常 彬、多田有希、金子紀子、渡辺祐子、磯部順子、貫名正文、中嶋 洋、河野喜美子、渡辺治雄、レジオネラ・ワーキンググループ: わが国のレジオネラ症患者由来株の血清群、遺伝子型、モノクローナル抗体型の分布. 第 58 回日本感染症学会東日本地方学術集会、2009 年 10 月、東京.
- 10) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉 文明: DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌の同定. 第 58 回日本感染症学会東日本地方学術集会、2009 年 10 月、東京.
- 11) 荒井桂子、吉川循江、田中礼子、堀切佳代、北爪稔、山口正: レジオネラ症患者発生時の緊急を要する浴場施設における試料採取等の研究. 第 55 回神奈川県公衆衛生学会、2009 年 10 月、横浜.
- 12) 森本 洋、清水俊一、池田徹也、山口敬治: レジオネラ属菌検査法の検討—非選択分離培地の活用法と濃縮法の違いによる検査結果への影響—, 第 61 回北海道公衆衛生学会, 札幌, 2009 年 11 月
- 13) 渡辺祐子、佐々木美江、磯部順子、田栗利紹、緒方喜久代、倉文明: レジオネラの外周精度管理に関する基礎的検討. 第 22 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会、2010 年 2 月、前橋.
- 14) 磯部 順子、中嶋 洋、渡辺 祐子、森本 洋、緒方 喜久代、常 彬、前川 純子、渡邊 治雄、倉 文明: 浴槽水からのレジオネラの単離および定量化における免疫磁気分離法の評価、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月、横浜.
- 15) 前川純子、倉 文明、常 彬、菊川紀世己、渡辺祐子、磯部順子、貫名正文、中嶋 洋、河野喜美子、村井美代、渡辺治雄: *Legionella pneumophila* の遺伝子型別による菌株の解析. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月、横浜.
- 16) Bin Chang, Toshitsugu Taguri, Kanji Sugiyama, Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, and Haruo Watanabe: Specific detection of viable *Legionella* cells from environmental samples by real-time PCR. 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月、横浜.

17) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉文明、市販 DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) 法キットで同定できないレジオネラ属菌の同定、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3

月、横浜.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

なし

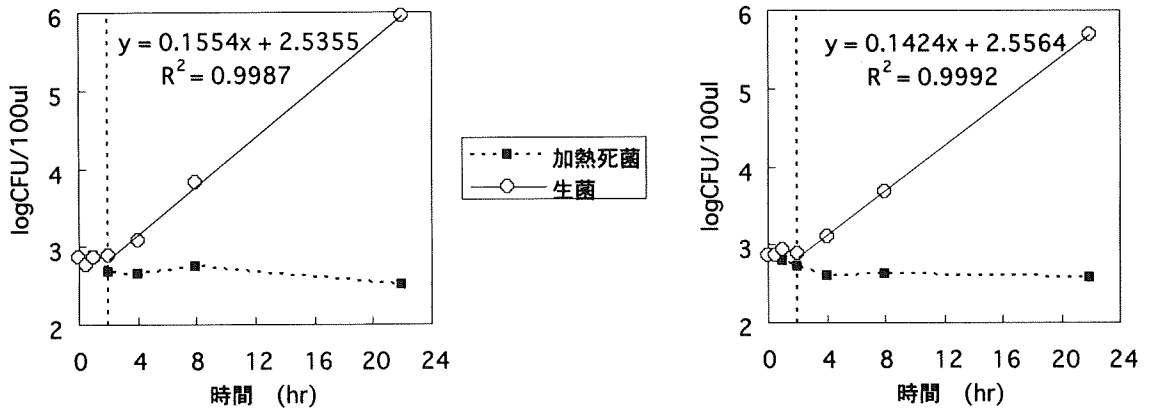


図1 LC qRT-PCR 法における rRNA の増幅 (BCYE α 液体培地)

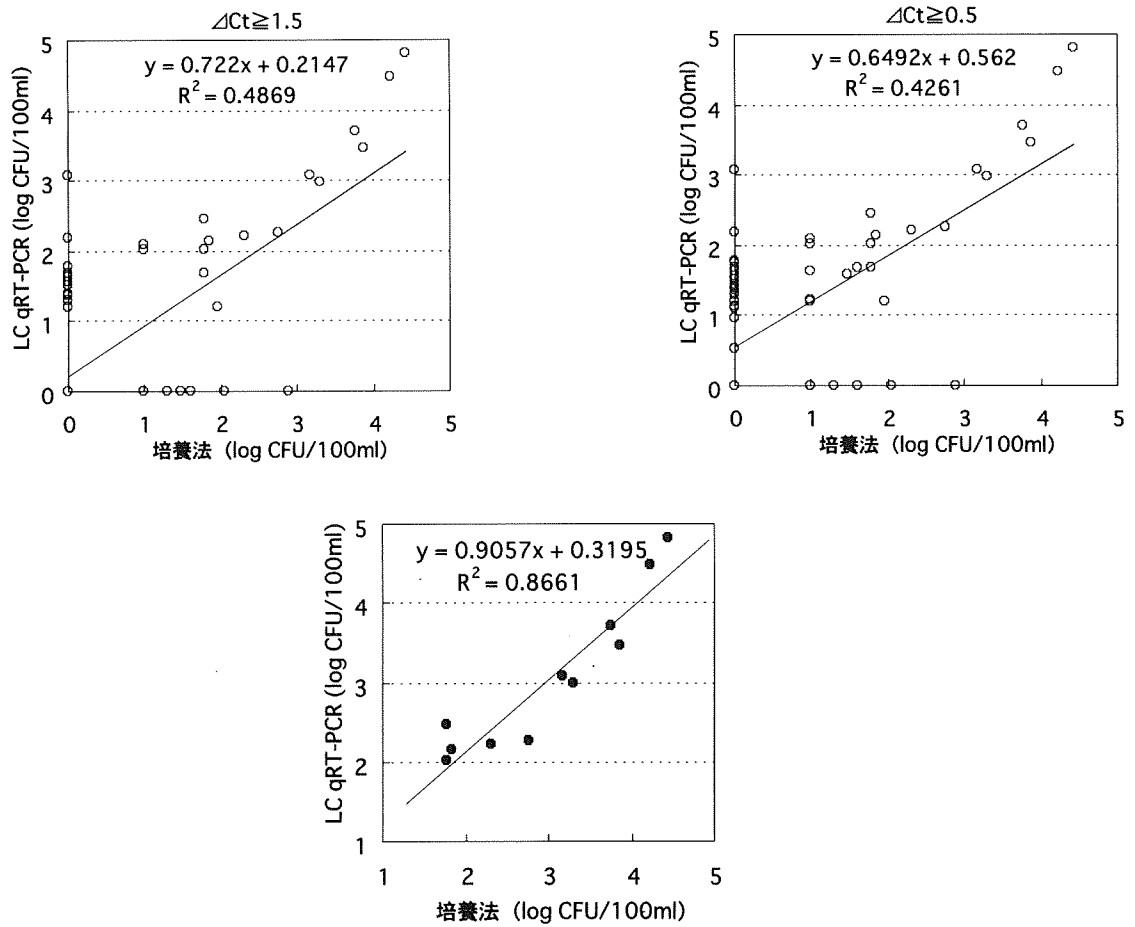


図2 培養法と LC qRT-PCR 法の相関

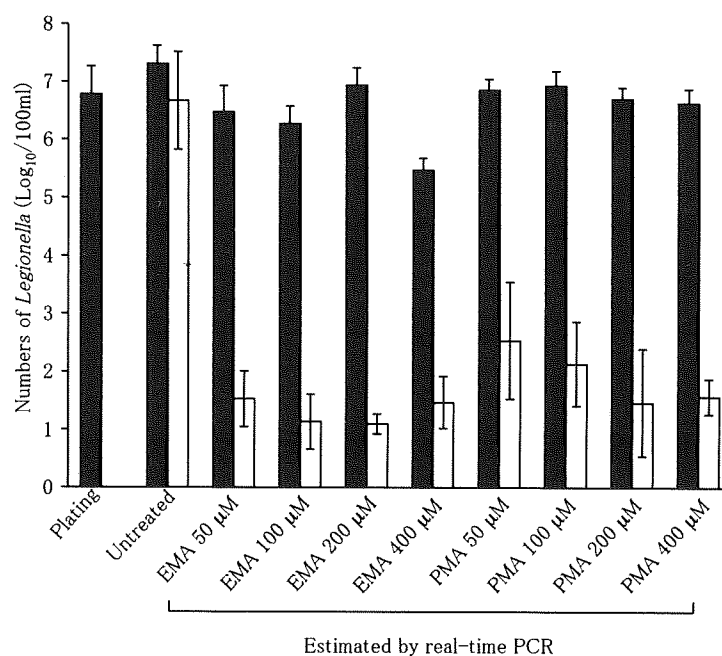


図3. *L. pneumoniae* のモックサンプルにおける生菌のみの定量検出
 ■: 生菌 □: 塩素処理した死菌

表 1. モデル浴槽サンプルにおけるレジオネラ生菌のみの定量検出

Sample No. ^{a)}	The number of <i>Legionella</i> by plating (log ₁₀ CFU/100ml) ^{b)}	The number of <i>Legionella</i> estimated by real-time PCR target 16S rRNA gene (log ₁₀ CFU/100ml) ^{c)}						
		Without treatment	Treatment with EMA at			Treatment with PMA at		
			12.5 μM	25 μM	50 μM	50 μM	100 μM	200 μM
1	3.6	3.3	3.3	2.6	2.2	3.5	3.5	3.3
2	3.3	3.1	3.0	2.8	2.6	2.8	3.0	3.1
3	4.7	4.5	3.8	3.2	2.8	4.3	3.8	2.9
4	4.6	4.4	4.3	3.7	2.9	4.3	3.9	3.2
5	2.4	4.4	2.4	2.5	2.1	2.7	2.5	2.6
6	1.3	4.1	3.7	2.5	1.6	3.2	2.5	2.9
7	<1	3.7	2.6	—	—	2.6	2.3	1.3
8	<1	3.2	2.0	2.1	1.1	2.8	1.7	1.4
9	<1	2.1	—	—	—	—	—	—
10	<1	1.9	—	—	—	—	—	—

^{a)}: Samples of No.1, 3, 5, 7, and 9 were obtained from the bathtub, No. 2, 4, 6, 8, and 10 were from the filter tank of a model spa.

^{b)}: The number of bacteria were determined by plating cells on the GVPC plates.

^{c)}: (—), Not detected.

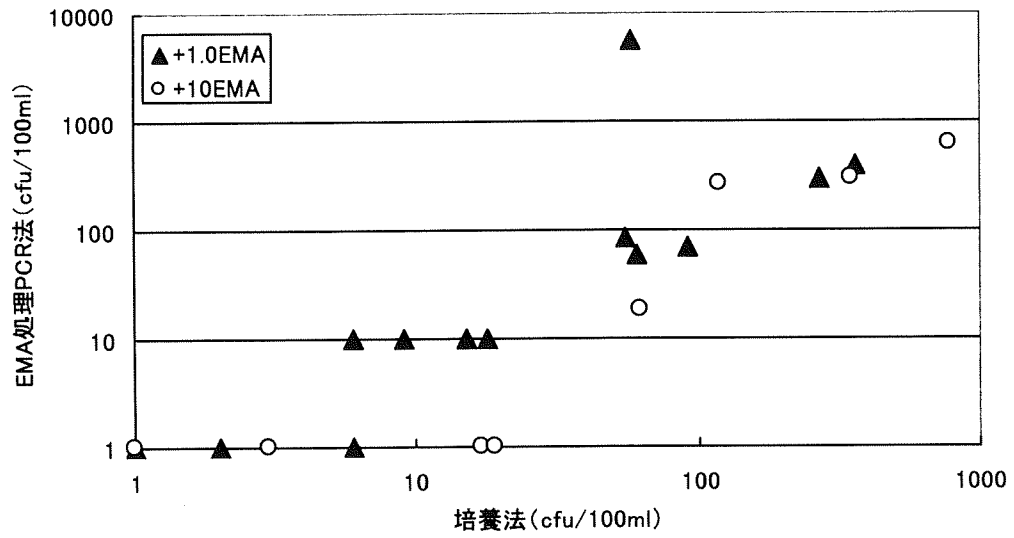


図4 残留塩素値によるレジオネラ属菌検出値

残留塩素が 0.4 mg/L 未満の試料は+1.0 EMA 処理、0.4 mg/L 以上の試料は+10 EMA 処理の値を採用し、培養法と比較した。R = 0.8853 と高い相関を示した。

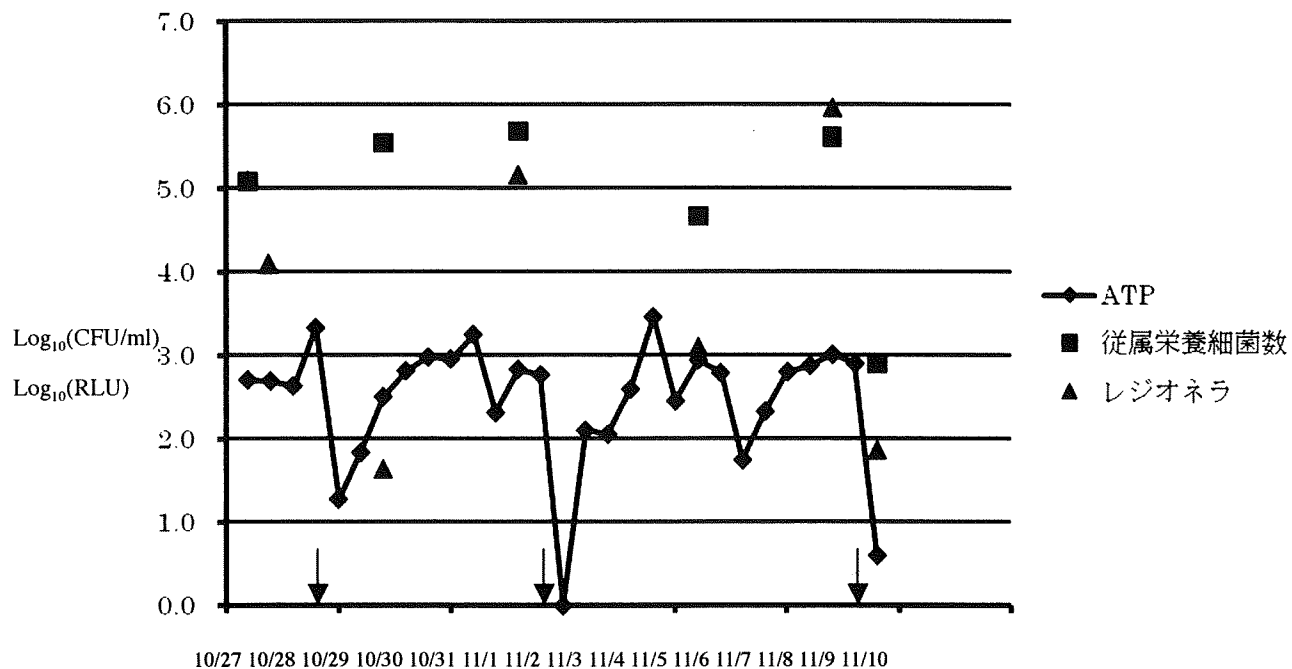


図 5-1 C 県の 1 入浴施設の 1 浴槽（大浴場）における ATP 量、従属栄養細菌数
およびレジオネラ属菌数の推移

↓ : 清掃実施

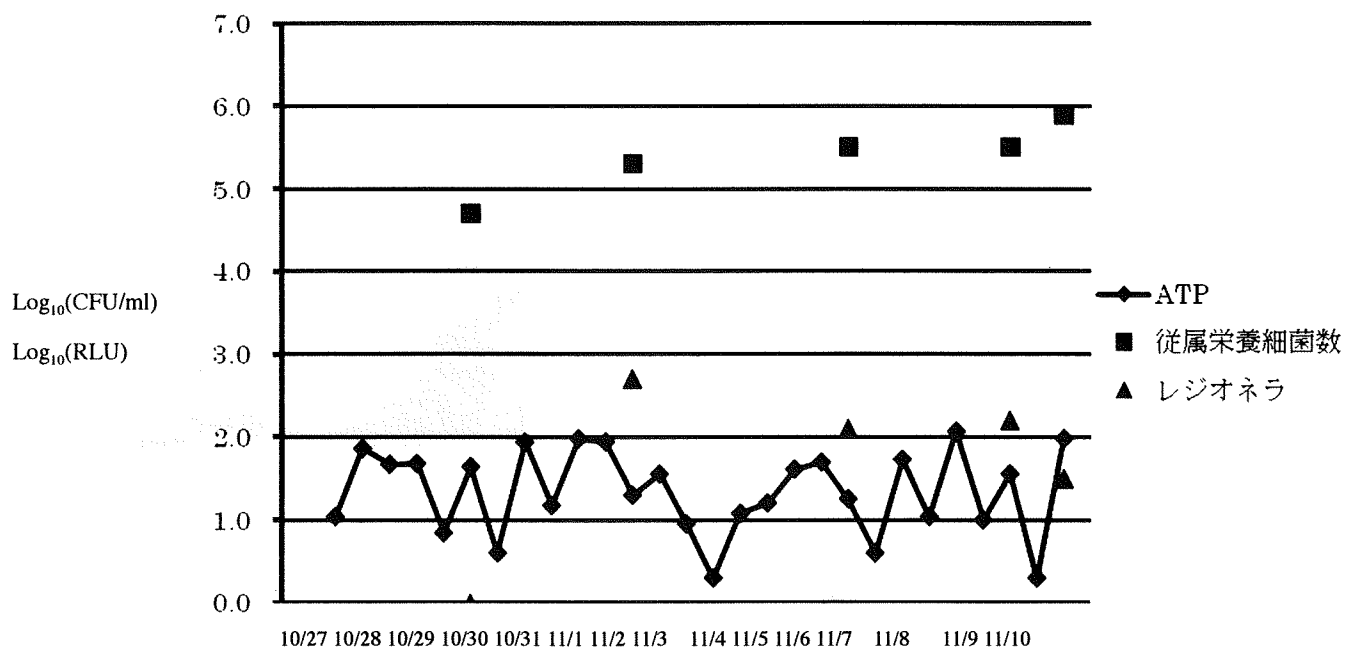


図 5-2 C 県の 1 入浴施設の 1 浴槽（ヒノキ）における ATP 量、従属栄養細菌数
およびレジオネラ属菌数の推移