

平成 25 年度～27 年度 分担総合研究報告書

冷却水系の消毒維持管理と菌の多様性

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	○縣 邦雄	アクアス株式会社 つくば総合研究所
研究協力者	井上浩章	アクアス株式会社 つくば総合研究所
	神澤 啓	アクアス株式会社 つくば総合研究所

(研究要旨)

冷却水はレジオネラ属菌の増殖環境であり、諸外国では多くの集団発生が報告<sup>1)</sup>されている。我が国でも建築物の空調用冷却塔が夏季に多く稼働しており、冷却水を原因とするレジオネラ症の感染リスクがある。冷却水起因のレジオネラ症防止に役立てるために、冷却水のレジオネラ汚染の実態把握、市街地空気中のレジオネラ存在調査の検討、冷却水のレジオネラを抑制するための消毒・維持管理方法の確立を目的として調査研究を行った。

①実冷却水のレジオネラ属菌の存在実態

実際に運転している冷却水中のレジオネラ属菌検出率(10CFU/100mL 以上)は 25%程度である。殺菌剤の種類別では、CMI 等の有機系殺菌剤は無処理よりも検出率を低下させている。塩素系殺菌剤使用の冷却水におけるレジオネラ属菌数分布は無処理と同様であり抑制効果は無かった。

冷却水のクローンライブラリー解析の結果、培養法で検出されず既存種に属さないレジオネラ属菌クローンが存在しており、多様なレジオネラ菌種が確認された。冷却水中の難培養性レジオネラ属菌の存在をアメーバ共培養と定量 PCR の組み合わせにより調査した結果、*Legionella drozanskii* 等の難培養性レジオネラ属菌の生菌の存在を確認した。冷却水では培養法で検出されないレジオネラ属菌の生菌が存在しており、それらは PCR 検査により検出できることがわかった。

②市街地の空気中のレジオネラ存在調査の検討

サイクロン式エアサンプラーによる、空気中のレジオネラ属菌の定量的測定法を確立した。実際の冷却塔内部や近傍では空気中にレジオネラ属菌が存在し、検出量は冷却水のレジオネラ属菌数と相関があった。市街地の空気を採集して調査した結果、レジオネラ属菌の遺伝子が検出され、ビルが多い繁華街や土埃が多い地域で遺伝子量が多く検出される傾向であった。

③モデル冷却塔による、各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果を評価

無処理と、結合塩素及び結合臭素(各 3mg/L asCl<sub>2</sub>)処理では 10<sup>2</sup>~10<sup>4</sup>CFU/100mL のレジオネラ属菌が連続的に検出された。結合塩素及び結合臭素はレジオネラ属菌の抑制効果は無かった。

CMI + カチオン処理は常時レジオネラ属菌不検出を維持し、効果の持続性が確認された。

遊離塩素は、循環運転停止による残留塩素の消失、pH が 8.7 に上昇したことによるアメーバが増殖等の要因により、レジオネラ属菌が検出された。遊離臭素もレジオネラが検出され、遊離塩素と遊離臭素処理では、pH 条件、運転休止の影響など維持管理上の注意点が明確になった。

以上の結果、冷却水及び空気中のレジオネラ属菌汚染の実態と PCR 検査法の有用性、及び冷却水中のレジオネラ属菌の効果的な抑制方法が明確になった。

## A. 研究目的

レジオネラ症の発生件数は夏期に多い傾向にあり、その理由として空調用冷却水からの感染が推定される。わが国で報告されるレジオネラ症の感染源は入浴施設が多いが、海外のレジオネラ症集団発生は、冷却塔を感染源とするものが主である。諸外国に学び、冷却水を原因とするレジオネラ症の発生を抑制するため、冷却水のレジオネラ属菌の実態把握と消毒対策を講じる必要がある。

本研究では、①実冷却水のレジオネラ属菌の存在実態明確化の目的で、殺菌剤の種類別レジオネラ属菌数分布調査及び、PCR 検出遺伝子のクローンライブラリー解析により、冷却水のレジオネラ属菌の多様性と難培養菌の存在を調査する。

②市街地におけるレジオネラ症感染リスクを評価するために、空気中のレジオネラ属菌の調査方法を確立し、汚染実態の調査を行った。

③冷却水のレジオネラ属菌を抑制するための消毒維持管理方法の確立を目的として、モデル冷却塔を用いて各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果を評価した。

## B. 研究方法

### 1. 実冷却水のレジオネラ属菌の存在実態

#### (1) 冷却水におけるレジオネラ属菌検出率及び殺菌剤の種類別菌数分布

2001年1月から2012年12月にかけて日本全国の建築物（ビル）や工場、医療施設、商業施設等の冷却水を採水し、アクアス（株）つくば総合研究所で検査した結果を解析した。採水には25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を1 mL 添加して高圧蒸気滅菌した500 mL 容のポリプロピレン製容器を用いた。冷却水で使用している殺菌剤の種類を、採水者が検査依頼ラベルに記載した。試料水は冷蔵状態（4~6℃）で保存し、速やかに検査した。

レジオネラ属菌検査方法はISO 11731 に準じた。試料水400 mL を冷却遠心（6400×g, 30 min）で100倍濃縮し、等量の0.2 M 酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）を加え10 min 室温に放置後、200 μL をGVPC 培地に接種した。37℃のインキュベータで培養し、6日後に培地を観察してレジオネラ属菌と判断さ

れる集落数を計数した。これらの集落を血液寒天培地とBCYE α培地に接種して、37℃で培養した。2日後、血液寒天培地に発育せずBCYE α培地に発育した集落をレジオネラ属菌とした。この試験の検出下限は10CFU/100mL である。

但し、上記手法でレジオネラ属菌の検査をした時、GVPC 培地全体に他の細菌や真菌が発育し、レジオネラ属菌の検出ができない場合がある。その場合は、保存しておいた100倍濃縮菌液を使用し、前処理として加温処理（50℃×30min）に続き酸処理（前述）を行い、レジオネラ属菌用選択培地としてCATα培地<sup>2)</sup>を使用して再検査して得た結果も集計に加えた。

#### (2) 冷却水のレジオネラの多様性調査

実際に運転されている冷却水11検体を採取して、培養法によるレジオネラ属菌検出を行い、菌種を同定した。同じ試料水を用いて、レジオネラ属菌の16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーを作製して解析した<sup>3)</sup>。各検体の濃縮試料をエチジウムモノアジド処理（Viable Legionella Selection Kit for PCR Ver.2.0 および LED CrossLinker 12, タカラバイオ）した後、DNA を抽出・精製（NucleoSpin gDNA Clean-up kit, タカラバイオ）し、レジオネラ属に特異的なプライマーペア（LEG 225F および LEG 858R）<sup>4)</sup>でPCR 増幅（TaKaRa Ex Taq Hot Start Version, タカラバイオ）し、そのPCR 増幅産物を用いて定法に従いクローニングした。得られたクローンの塩基配列は解析ソフト（Mothur platform）で解析し、塩基配列が99%以上一致するものを同一のOTU として分類して多様性指数を算出した。

実際の冷却水において、培養法でレジオネラ属菌の生菌不検出であり、遺伝子検査法で陽性となった冷却水13試料についてアメーバ共培養によるレジオネラ属菌の増殖性を調査した。25 cm<sup>2</sup> の培養フラスコに *Acanthamoeba* sp. AC3722-12（環境分離株）をPYGC 培地で培養（30℃, 4日間）し、培養フラスコの底一面にアメーバを増殖させ、培養上清を10 mL のPage's saline に置換した後、冷却水の100倍濃縮液を0.1 mL 添加して30℃で15日間培養した<sup>5)</sup>。

アメーバ共培養 6 日目と 15 日目にサンプリングして培養法 (試料液 0.1mL, GVPC 培地, 37°C, 8 日間) および定量 PCR 法 (試料液 50  $\mu$ L, Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit, タカラバイオ) でレジオネラ属菌を検出した。また, PCR 増幅産物をクローニングして 16S rRNA 遺伝子の一部の塩基配列 (616 bp) を決定<sup>6)</sup>することで, PCR で検出したレジオネラ属菌を同定した。

## 2. 市街地の空気中のレジオネラ属菌存在調査

サイクロン式エアサンプラー (コリオリス  $\mu$ , 図 1.) を使用して空気中のレジオネラ属菌を調査した。コリオリス  $\mu$  は専用の捕集容器に入れた 15 mL の捕集液 (滅菌脱イオン水) 中に空気中の粒子を捕集する。空気の吸引量は 300 L/min であり, 10 分間ないし 20 分間吸引して, 捕集液中のレジオネラ属菌を培養法と定量 PCR 法で検査した。

培養法による検査は, 捕集液を酸による前処理後 0.1mL ずつ 5 枚の選択培地に接種して培養しレジオネラ属菌を検出した。定量 PCR 法は, 捕集液 2 mL をマイクロチューブに移し, 15000 rpm で 10 分間遠心して上清を除き, アルカリ熱抽出法<sup>7)</sup>により DNA を抽出した。抽出した DNA は NucleoSpin gDNA Clean-up Kit (タカラバイオ) で精製した。定量 PCR は Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ), および Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ) を用い, 使用方法は各取扱説明書に従った。

空気の捕集は, 実際に運転している冷却塔 4 基について, 冷却塔の内部 (点検口から 0.5m) 及び冷却塔の側面約 1m 付近でのサンプリングとした。市街地の空気中のレジオネラの存在調査は, 市街地の一定範囲を乗用車で移動しながら, 右後部座席窓から空気を採集した。採集日は 2015 年 9 月 21 日, 天候は晴れ, 最高気温 27.5°C, 湿度 45%, 東の風 3 m/s だった。採集箇所は国道 294 号 (茨城県常総市), 東京都の渋谷駅周辺, 新宿駅周辺, 銀座周辺, 国道 254 号 (春日町交差点から東池袋 2 丁目交差点), 池袋駅周辺, 首都高速道路 (東池袋から扇大橋), およびつくば駅周辺とした。陰性対照は弊社研究所の実験室内で採集した。

## 3. モデル冷却塔を用いた各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果の評価

アクアス (株) つくば総合研究所 (茨城県つくば市) に循環式モデル冷却塔を設置して, 各種殺菌剤を添加してレジオネラ属菌, アメーバ等の抑制効果の評価した。モデル冷却塔は保有水量 60L, 循環水量 180L/hr, 電気ヒーターにより常時水温を 30°C に維持し, つくば市水を 7L/day 補給した。以下の条件を設定し各種殺菌剤の試験を行った。

- ①無処理: 殺菌剤を添加しない条件
- ②遊離塩素: 次亜塩素酸ナトリウム溶液を残留塩素濃度測定計器で制御しつつ添加して, 循環水中の遊離塩素濃度を 0.2~1.0mg/L の範囲に維持。
- ③結合塩素: 結合塩素剤 (塩素化スルファミン酸) を連続的に添加して, 循環水中の全残留塩素濃度を 3 mg/L に維持。
- ④CMI+カチオン製剤品: CMI (5-クロロ-2-メチル-4-イソアゾリノ-3-オン) とカチオンポリマー (WSCP) を含有する処理剤を循環水中に 200mg/L 維持。
- ⑤遊離臭素: 次亜臭素酸塩を残留塩素濃度測定計器で制御しつつ添加して, 循環水中の遊離臭素濃度を 0.4 mg/L (asCl<sub>2</sub>) に維持。
- ⑥結合臭素: 結合臭素剤 (臭素化スルファミン酸) を連続的に添加して, 循環水中の全残留濃度を 3 mg/L (asCl<sub>2</sub>) に維持。

モデル冷却塔は, 夜間と休日 (土日, 長期休日) は循環を停止及び, 無処理期間の設定, 残留塩素濃度, pH 調整などの条件変更を行っている。

原則として 1 週間に一度, レジオネラ属菌数, アメーバ数, ATP 濃度, 一般細菌数, 従属栄養細菌数及び理化学的水質項目を測定した。

レジオネラ属菌の検査法は前述の通りである。

アメーバ数の測定は, 試料水 50mL を遠心濃縮し, 濃縮菌液の全量が大腸菌塗布寒天培地に接種, 25°C で 2 週間培養した後, プラーク数を計数した。ATP 濃度は東亜 DKK 社製 ATP TESTER AF-70 を使用して測定した。一般細菌数は, 標準寒天培地 (日水製薬) を使用し 37°C で 24 $\pm$ 2 時間培養後の集落数を測定した。従属栄養細菌数は, R2A 寒天培地 (日水製薬) を使用し 20°C で 7 日間培養後の集落数を測定した。

## C. 結果と考察

### 1. 実冷却水のレジオネラ属菌の存在実態

#### (1) 冷却水におけるレジオネラ属菌検出率及び殺菌剤の種類別菌数分布

2001年1月から2012年12月の冷却水の検査検体数は合計77842検体。2001年が3121検体、以後増加し2012年は年間8503検体である。これら冷却水のレジオネラ属菌検査結果を集計した<sup>8)</sup>。

各年毎の冷却水のレジオネラ属菌の検出率を10CFU/100mL以上、及び100CFU/100mL以上に分類した結果を図2.に示す。10CFU/100mL以上検出される割合は、2001年及び続く数年は30%程度であり、その後漸減し2008年以降は25%以下となっている。また、100CFU/100mL以上検出されるものは、10CFU/100mL以上検出される割合よりも約10%低い。これら冷却水のうち、冷却水処理剤を添加しているものは約90%であるが、薬剤による冷却水処理を行なってもレジオネラ属菌が検出される実態が明らかとなった。

冷却水のレジオネラ属菌数分布を殺菌剤の種類別に集計した結果を図3.に示す。殺菌剤の種類は、5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリノン-3-オンに代表されるイソチアゾリン系、4級アンモニウム塩化合物等のカチオン系、1-5-ペンタンジアル（グルタルアルデヒド）、及び塩素系（遊離塩素及び結合塩素）に分類した。レジオネラ属菌検出率は殺菌剤無処理が53.1%、イソチアゾリン系が19.2%、カチオン系が21.9%、グルタルアルデヒドが9.7%、塩素系が55.0%であった。

有機系殺菌剤では、無処理の冷却水と比較するとレジオネラ属菌の検出率は明らかに減少しており、一定の効果が認められる。但し、有機系殺菌剤で処理していてもレジオネラ属菌が検出されている。その要因は殺菌剤の注入量不足や殺菌剤の消費、分解等によって殺菌剤が有効濃度以上に保たれていないことが考えられる<sup>9)</sup>。

一方、塩素系では無処理と同等以上（55.0%）のレジオネラ属菌が検出されている。また、無処理と比較して10<sup>4</sup>CFU/100mL以上の高菌数のレジオネラ属菌が検出される検体の割合が2.9%から

13%に上昇している。塩素系処理は、冷却水のレジオネラ属菌抑制効果が認められていない。

#### (2) 冷却水のレジオネラの多様性調査

##### ① クローンライブラリー解析による冷却水のレジオネラ属菌の多様性調査

クローンライブラリー解析した11検体の冷却水の処理状況、採水日、培養法によるレジオネラ属菌の検出菌数と菌種を表1.に示す。これら冷却水11検体と、浴槽水3検体のクローンライブラリーを構成するクローンの相対量を図4.に示す。全ての冷却水で赤く示した既存種に属さない未知のレジオネラ属菌クローンの塩基配列が大部分を占めた。冷却水から培養法で検出されたレジオネラは、表1.に示す通りほとんどが*Legionella pneumophila*であったが、冷却水B, G, H, J, K (CMI連続注入)及び冷却水L (遊離塩素処理)から*L. pneumophila*のクローンは回収されなかった。

一方、浴槽水は*L. pneumophila*のクローン比率が冷却水と比較して高く、既存種に属さない未知のレジオネラ属菌クローンの割合が低い。

表2.にクローンライブラリーの多様性指数を示す。冷却水I, O (結合塩素処理)はOTU数、Chao1の値が高く、多様性が高いことを示している。冷却水L (遊離塩素処理)の多様性は低かった。浴槽水D, Eの多様性は低く、既存種に属さない未培養のレジオネラ属菌クローンの塩基配列は検出されなかった。浴槽水Fからは未培養のレジオネラ属菌クローンの塩基配列が検出されたが、クローンの半数は*L. pneumophila*であった。

クローンライブラリー解析の結果、冷却水中のレジオネラ属菌の80%以上は既存種に該当しない未知のレジオネラ属菌と考えられる。これは、培養法では冷却水中のレジオネラ属菌の一部しか検出できないことを示す。冷却水B, G, H, J, K (CMI連続注入)および冷却水L (遊離塩素処理)の培養法による*L. pneumophila*の菌数は<10から2.9×10<sup>2</sup>CFU/100mlと比較的少なかったが、これらの冷却水中では全レジオネラに対する*L. pneumophila*の存在比率が低かったため、*L. pneumophila*のクローンは回収できなかったと推察する。

一方、浴槽水の多様性は冷却水と比較して明らか

に低く、*L. pneumophila* のクローンが多く検出される結果である。

浴槽水や冷却水のレジオネラ属菌検査では、培養法検査「陰性」、遺伝子検査「陽性」の不一致が発生する。これは、死菌由来と考えられ、ENA-qPCR法により解消する可能性が考えられた。ところが調査<sup>10)</sup>の結果、冷却水では82検体中、培養陰性q-PCR陽性となる53検体の不一致はEMA処理によっても53検体のままであった。冷却水でEMAの効果を得られない原因は、冷却水中に多く存在する培養不能の未記載のレジオネラ属菌であることが考えられた。

## ②冷却水の難培養性レジオネラの検出

培養法でレジオネラ属菌の生菌不検出、遺伝子検査法で陽性の冷却水13試料(表3.)をアメーバ共培養し、増殖程度を調査した。培養法では13試料全てが不検出となりレジオネラ属菌の増殖はみとめられなかった。q-PCR法では5試料においてレジオネラ属菌の16S rRNA遺伝子のコピー数の増加が認められた。(図5.)

この結果から、難培養性レジオネラ属菌のアメーバ内増殖が示唆された。各PCR増幅産物をクローニングした結果を図6.に示す。CTW-Aから得られた全てのクローンは*Legionella drozanskii*、CTW-Iから得られた全てのクローンは*Legionella lytica*、CTW-LおよびCTW-Mから得られた一部のクローンは*Legionella massiliensis*の16S rRNA遺伝子部分配列とほぼ一致した(図6.の黄色部分)。一方、CTW-Jから得られた全てのクローンとCTW-LおよびCTW-Mから得られたほとんどのクローンは*L. drozanskii*と同じクラスターに分類されたため、これらのクローンは*L. drozanskii*の近縁種と推測する(図6.の水色部分)。

*L. drozanskii*や*L. lytica*は通常の培養法では検出できないレジオネラ属菌として知られる。今回の調査の結果、冷却水中に生息する多様な培養法では検出できないレジオネラ属菌の生菌の存在を確認した。PCR法では、これら難培養性のレジオネラ属菌も検出されるため、冷却水系のレジオネラ感染源としてのリスク評価にPCR法を活用することは有用と考える。

## 2. 市街地の空気中のレジオネラ属菌存在調査

### (1) 冷却塔の周辺での調査結果

調査した4基の冷却塔循環水のレジオネラ属菌数を表4.に示す。CT-A, B, Cからはレジオネラ属菌の生菌、遺伝子ともに検出したが、CT-Dからはレジオネラ属菌の生菌は検出しなかった。

捕集液からの定量PCRによるレジオネラ属菌は吸引した空気1m<sup>3</sup>中のレジオネラ属菌遺伝子のコピー数に換算して示す。各冷却塔の内部と外部から採集した空気中のレジオネラ属菌の遺伝子検出結果を図7.に示す。各冷却塔ともに冷却塔内部の方が外部よりもレジオネラ属菌の遺伝子量が多かった。冷却水中のレジオネラ属菌の遺伝子量と比較すると、上部のファンが稼働中のCT-AとCT-Cでは、水中の遺伝子量が多いCT-Cの方が空気中の遺伝子量が多かった。上部ファンが停止中のCT-Bは、冷却水中のレジオネラ属菌の遺伝子量が最も高かったが、空気中のレジオネラ属菌の遺伝子量は比較的lowかった。冷却水から生菌が検出されず遺伝子量も少なかったCT-Dの空気からは、極少量の遺伝子が検出された。

また、各捕集液から培養法によりレジオネラ属菌を検出した結果、CT-A内部から25CFU/m<sup>3</sup>、CT-C内部から5CFU/m<sup>3</sup>検出しており、冷却水中のレジオネラ属菌数が多いCT-Aの方が空気中のレジオネラ属菌数が多かった。一方、CT-B内部から生菌は検出しなかった。これは、CT-Bは上部のファンが停止しておりエアロゾルの発生が少なく、レジオネラ属菌の飛散が少なかったと推察する。この結果、稼働中の冷却塔は冷却水のレジオネラ属菌汚染量と空中に飛散するレジオネラ属菌の量に関連があることを示唆した。

### (2) 市街地での調査結果

各採集エリアおよび移動時に採集した空気中のレジオネラ属菌遺伝子検出結果を図8.に示す。渋谷駅周辺、新宿駅周辺、銀座周辺、および池袋駅周辺で採集した空気中からは10から100copies/m<sup>3</sup>のレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。国道294号(常総市)では都内の繁華街と同レベルのレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。これは、空気採集の11日前に発生した常総市を流れる鬼

怒川の氾濫による水害により、辺りが土埃にまみれていた影響と推察する。また、首都高速道路でも僅かながらレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。一方、国道 254 号、つくば駅周辺ではレジオネラ属菌の遺伝子は検出しなかった。

各採集場所の捕集液から培養法によりレジオネラ属菌の生菌の検出を試みたが、何れの捕集液からもレジオネラ属菌の生菌は検出しなかった。この結果より、ビルの密度の高い繁華街や土埃の多い地区では空气中にレジオネラ属菌の遺伝子が存在することが確認された。

### 3. モデル冷却塔を用いた各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果の評価

2014 年 2 月から 2015 年 2 月までの、無処理、遊離塩素、結合塩素、CMI+カチオンの処理条件のレジオネラ属菌、アメーバの検査結果を時系列的にグラフ化したものを、図 9. と図 10. に示す。夜間と休日は運転停止しており、長期運転停止と殺菌剤なし循環運転はグラフ中に示した。8 月 21 日から 4 条件とも循環水に炭酸水ナトリウムを 200mg/L 添加して pH を 8.7 に上昇させた。それ以前の pH は平均 8.1 であった。遊離塩素は、循環運転中は遊離塩素濃度 0.2mg/L。結合塩素は、循環運転中は全塩素濃度 3mg/L、CMI+カチオン剤の処理剤濃度は循環水中 200mg/L である。

レジオネラ属菌は、無処理及び結合塩素処理では  $10^2 \sim 10^4$  CFU/100mL の高菌数で連続的に検出された。CMI+カチオン処理では、循環運転の停止の有無にかかわらず、試験期間中連続して不検出 (10CFU/100mL 未満) を維持した。遊離塩素処理系は、2 月 26 日の運転停止後、検出され始め殺菌剤無しの運転で  $10^4$  CFU/100mL 近くまで増加した。遊離塩素 0.2mg/L により  $10^1 \sim 10^2$  CFU/100mL 程度に低下、6 月 4 日から不検出となったが、8 月中旬の運転停止により  $10^4$  CFU/100mL に増加した。8 月 21 日から循環水の pH を 8.7 にしたところ、日中の循環水中の遊離塩素 0.2mg/L 維持によっても  $10^1 \sim 10^2$  CFU/100mL 程度のレジオネラ属菌が継続的に検出された。

アメーバも、レジオネラ属菌と同様の傾向である。無処理と結合塩素処理では、ほぼ常時アメーバが

検出されている。CMI+カチオン処理ではアメーバは、ほぼ不検出 (2PFU/100mL 未満) を維持した。遊離塩素処理は、運転停止時に増加する傾向がみられ、特に 8 月の運転停止と pH 調整後は常時  $10^2 \sim 10^3$  PFU/100mL のアメーバが検出されるようになった。この結果、pH 8.7 程度の条件では遊離残留塩素濃度 0.2mg/L ではアメーバを抑制できないことを示している。

2015 年 3 月から 2016 年 2 月までの、遊離塩素、遊離臭素、結合臭素の処理条件のレジオネラ属菌、アメーバの検査結果を時系列的にグラフ化したものを図 11. と図 12. に示す。各図中の薄青の帯は、長期休暇の運転停止である。

遊離塩素は 3 月 5 日から 5 月 11 日は 0.4mg/L 維持、以降は 1.0mg/L 維持した。遊離臭素は、8 月 24 日に処理を開始しており、0.4mg/L ( $\text{asCl}_2$ ) の濃度を維持した。8 月 24 日以前は無処理状態とした。結合臭素 (臭素化スルファミン酸) は、8 月 24 日に処理を開始、全残留濃度 3mg/L ( $\text{asCl}_2$ ) を維持した。8 月 24 日以前は無処理状態である。結合臭素処理は、その水系に 2016 年 1 月 18 日から、CMI 製剤の殺菌剤を 20mg/L、週 2 回添加した。

レジオネラ属菌は、結合臭素処理は全残留濃度 3mg/L ( $\text{asCl}_2$ ) で  $10^3 \sim 10^4$  CFU/100mL の高菌数を連続的に検出した。1 月 18 日に CMI 製剤を添加した結果、直ちに不検出となった。遊離塩素処理は、0.4mg/L で  $10^2$  CFU/100mL が連続的に検出され、その後 1.0mg/L に濃度を上げた結果やや菌数レベルが低くなったが、継続的に数 10CFU/100mL が検出されている。遊離臭素処理は、0.4mg/L ( $\text{asCl}_2$ ) でそれまでの無処理時の  $10^3$  CFU/100mL レベルを数 10CFU/100mL に低下させた。但し散発的に数 10CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出された。

アメーバも、レジオネラ属菌と同様の傾向である。無処理時と結合臭素処理では、ほぼ常時アメーバが検出されている。遊離塩素処理は、5 月 11 日に残留濃度を 0.4 から 1.0mg/L に高めた結果アメーバ数が減少したが、8 月以降再度定着を始め  $10^2$  PFU/100mL 程度となった。遊離臭素処理では 0.4mg/L ( $\text{asCl}_2$ ) でアメーバ類を抑制している。結合臭素処理で  $10^2$  PFU/100mL 存在したアメーバ類

は、CMI 製剤の添加により不検出となった。

今回の試験結果より、無処理冷却水では、一旦レジオネラ属菌が定着するとその後連続して検出されることが確認された。処理方式別では、結合塩素と結合臭素は、循環水中の残留濃度を 3mg/L(asCl<sub>2</sub>)維持してもレジオネラ属菌を抑制できず、無処理よりも高菌数となることもあった。結合塩素と結合臭素処理では、常時アメーバが多く検出されており、レジオネラの増殖環境が形成されていることが考えられた。CMI+カチオン処理は、運転停止などの影響を受けず、安定してレジオネラ、アメーバを不検出に維持した。これは、殺菌効果に加え、分解しにくい持続性が寄与していると考えられる。遊離塩素は、運転停止期間に残留塩素が消失、pH8.7で残留濃度 0.4mg/Lでは常時アメーバ、レジオネラ属菌を抑制できず、1.0mg/Lでもアメーバは抑制できずレジオネラが低菌数はあるが継続的に検出した。遊離臭素処理は遊離塩素に比較してアメーバ、レジオネラとも抑制的であるが、常時不検出にはならなかった。CMI 製剤処理は、週 2 回 20mg/L の添加により水系に定着したレジオネラ、アメーバ類を不検出にしておき、殺菌対策としての有用性が確認された。

#### D. 結論

(1) 実際に運転している冷却水のレジオネラ属菌検出率は、無処理条件では 53.1%である。殺菌剤種類別の検出率は、CMI 系が 19.2%、カチオン系が 21.9%、グルタルアルデヒドが 9.7%、塩素系が 55.0%であった。殺菌剤処理により検出率は低下するが、すべて不検出にはなっておらず維持管理面の注意が必要である、特に塩素系では無処理と同様の検出率、及び高い菌数が検出されており、殺菌剤の種類を選定に注意する必要がある。

(2) 冷却水のレジオネラ属菌の多様性調査を、クローンライブラリー解析により行った。冷却水では、培養法で検出されない既存種に属さないレジオネラ属菌クローンの塩基配列が大部分を占め、多様なレジオネラ菌種の存在が確認された。一方浴槽水では、*L. pneumophila* のクローンが多く検出されており、多様性は低かった。冷却水の

レジオネラ属菌検査における培養法「陰性」、遺伝子「陽性」の不一致の要因として、培養不可能、未記載のレジオネラ属菌の存在が考えられた。

(3) 培養法でレジオネラ不検出、遺伝子が検出された冷却水について、アメーバ共培養でレジオネラの増殖を調査した。13 検体中 5 検体で培養不能レジオネラ属菌の生菌の存在が確認された。実冷却水における、培養不能レジオネラ属菌生菌の存在が示され、冷却水系のレジオネラ感染源としてのリスク評価に PCR 法によるレジオネラ属菌遺伝子検出の有用性が示された。

(4) 空気中のレジオネラ属菌の存在を、サイクロン式エアサンプラーにより調査した結果、冷却塔の内部や側面の空気中に冷却水中の菌数に相応するレジオネラ属菌が存在した。空気中の菌数は冷却塔のファンが稼働している場合に高くなる傾向である。

市街地や土埃の多い地域の空気からレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。市街地ではビルの屋上の空調用冷却塔からのレジオネラ汚染が考えられ、今後のレジオネラ症抑制対策において汚染実態調査の必要性が示された。

(5) 各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果。結合塩素(塩素化スルファミン酸)、結合臭素(塩素化スルファミン酸)処理では 3mg/L(asCl<sub>2</sub>)維持しても 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>CFU/100mL のレジオネラ属菌が継続的に検出され、レジオネラ属菌の抑制効果は無かった。遊離塩素(1.0mg/L)処理は、無処理に比較してレジオネラを低菌数に抑制するが、アメーバを抑制できず、レジオネラ属菌が 10CFU/100mL レベルで継続的に検出された。遊離臭素処理では 0.4mg/L(asCl<sub>2</sub>)維持により塩素処理よりもアメーバ、レジオネラを抑制したが継続的に不検出とはならなかった。CMI 製剤品は、規定濃度添加により安定的にレジオネラ、アメーバを不検出にした。酸化性殺菌剤の使用にあたっては水系の pH、運転停止条件の把握、遊離残留濃度を適正に維持する等の維持管理上の注意が必要である。

—以上—

## E. 参考文献

- 1) 倉文明：レジオネラ症の国内外の動向，ビルと環境. No.149, pp36-44 (2015)
- 2) Inoue, H., Noda, A., Takama, T., Ishima, T., and Agata, K. :Enhanced antifungal effect of the selective medium for the detection of *Legionella* species by a combination of cycloheximide, amphotericin B and thiabendazole. *Biocontrol Sci.*, **11**, pp69-74(2006)
- 3) Inoue, H., R. Fujimura, K. Agata, and H. Ohta ) Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. *Microbes and Environments*, **30**.pp108-112(2015)
- 4) Miyamoto, H., H. Yamamoto, K. Arima, J. Fujii, K. Murata, K. Izu, T. Shiomori, and S. Yoshida PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of Legionellae in hospital cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, pp2489-2494 (1997)
- 5) Inoue, H., Agata, K., and Ohta, H., Detection of uncultured *Legionella* spp. in cooling tower water samples by amoebic coculturing and quantitative PCR. 30th JSME annual meeting & 7th international symposium on Microbial Ecology in Tsuchiura, PN-221. (2015)
- 6) Inoue, H., Fujimura, R., Agata, K., and Ohta, H. Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. *Microbes and Environments*, **30**. pp108-112(2015)
- 7) Baige, J., Lokies, J., Schaberg, T., Finckh, U., Fischer, M., Mauch, H., Lode, H., Kohler, B., and Rolfs, A. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 90-95. (1995)
- 8) 井上浩章, 高間朋子, 石間智生, 縣邦雄：各種水利用設備のレジオネラ属菌検出実態, 防菌防黴誌. Vol.41, NO.12, pp659-661 (2013)
- 9) 財団法人ビル管理教育センター：第3版レジオネラ症防止指針, p87(2009)
- 10) Inoue, H., Takama, T., Yoshizaki, M., and Agata, K. Detection of *Legionella* species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment. *Biocontrol Science*, **20**. pp71-74(2015)

## F. 研究発表

### (1) 学会発表

- 1) 井上浩章, 藤村玲子, 縣邦雄, 太田寛行：エチジウムモノアジド処理 PCR 法による環境水中のレジオネラ属菌の検出, 第29回日本微生物生態学会, 鹿児島 (2013)
- 2) 井上浩章, 小野寺順子, 石間智生, 縣邦雄：冷却水のレジオネラ属菌に対する NaClO の殺菌効果調査, 日本防菌防黴学会第40回年次大会, 大阪 (2013)
- 3) 井上浩章, 藤村玲子, 縣邦雄, 太田寛行：EMA-qPCR 法とクローンライブラリーによる環境水中のレジオネラ属菌の多様性解析. 日本防菌防黴学会第41回年次大会, 東京 (2014)
- 4) 井上浩章, 太田寛行, 縣邦雄, : 培養法と遺伝子検出法によるレジオネラ属菌検査結果の相違に関する検討. 日本防菌防黴学会第42回年次大会, 東京 (2015)
- 5) Inoue, H., Agata, K., and Ohta, H., Detection of uncultured *Legionella* spp. in cooling tower water samples by amoebic coculturing and quantitative PCR. 30th JSME annual meeting & 7th international symposium on Microbial Ecology in Tsuchiura, PN-221. (2015)

### (2) 論文発表

- 1) 井上浩章, 高間朋子, 石間智生, 縣邦雄：各種水利用設備のレジオネラ属菌検出実態, 防菌



防黴誌. Vol. 41, NO. 12, pp659-661(2013)

- 2) Inoue, H., Takama, T., Yoshizaki, M., and Agata, K. Detection of *Legionella* species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment. *Biocontrol Science*, 20. pp71-74(2015)
- 3) Inoue, H., Fujimura, R., Agata, K., and Ohta, H. Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. *Microbes and Environments*, 30. pp108-112(2015)
- 4) 井上浩章, 伊藤雅代, 縣邦雄, :サイクロン式エアサンプラーと定量PCRによる空気中のレジオネラ属菌の検出. 日本防菌防黴学会誌, (投稿中)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
なし

表 1. クローンライブラリー解析した冷却水および浴槽水

試料	処理状況	採水日	レジオネラ属菌数 (CFU/100 ml)	菌種
冷却水 A	無処理	2012/11/6	$1.2 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 N	無処理	2014/ 6/27	$6.8 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 C	CMI 間欠	2013/ 2/14	$7.6 \times 10^4$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 B	CMI 連続	2013 /2/ 7	$2.9 \times 10^2$	<i>L. pneumophila</i> , <i>Legionella</i> sp. L-29
冷却水 G	CMI 連続	2013/12/ 3	$4 \times 10$	<i>Legionella</i> sp. LC2720
冷却水 H	CMI 連続	2014/ 1/17	< 10	—
冷却水 J	CMI 連続	2013/12/ 3	$2 \times 10$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 K	CMI 連続	2013/12/ 5	< 10	—
冷却水 L	遊離塩素	2014/ 7/15	$5 \times 10$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 I	結合塩素	2013/11/29	$2.7 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 O	結合塩素	2014 /9/ 9	$9.8 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>
浴槽水 D	遊離塩素	2013/ 3/21	$3.2 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. dumoffii</i>
浴槽水 E	遊離塩素	2013/ 4/23	$4.0 \times 10^4$	<i>L. pneumophila</i>
浴槽水 F	遊離塩素	2013/ 5/15	$6.1 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>

表 2. 各試料から得られたクローンライブラリーの多様性指数

試料	解析した クローン数	得られた OTU 数	Chao1	Simpson ( $1/\lambda$ )	Shannon-Wiener ( $H'$ )	Good' s coverage (%)
冷却水 A	51	11	15	7.87	2.16	92.2
冷却水 N	64	6	7	3.25	1.29	96.9
冷却水 C	62	16	28	13.32	2.63	87.1
冷却水 B	58	17	23	10.60	2.53	87.9
冷却水 G	75	8	10	2.08	1.14	96.0
冷却水 H	66	19	30	9.71	2.45	84.8
冷却水 J	82	10	14	2.70	1.37	93.9
冷却水 K	58	6	7	2.44	1.15	96.6
冷却水 L	87	2	2	1.02	0.06	98.9
冷却水 I	105	29	67	9.91	2.67	82.9
冷却水 O	86	22	52	7.41	2.35	83.7
浴槽水 D	65	3	3	1.90	0.71	98.5
浴槽水 E	70	2	2	1.03	0.07	98.6
浴槽水 F	65	7	7	2.58	1.16	96.9

OTU (Operational taxonomic units) : クローンを分類する際に、その塩基配列の一致率から分類されるグループの単位で、試料から得られたクローンが多くの OTU に分類されれば多様な塩基配列が含まれることを示す。

Chao1 : 試料に含まれていると推測される OTU 数の予測値。

Simpson ( $1/\lambda$ ) 及び Shannon-Wiener ( $H'$ ) : どちらも多様性指数で数値が大きいほど多様性が高いことを示す。

Good' s coverage : クローンライブラリーのカバー率で、解析クローン数が不足していると値が低くなる。

表 3. 冷却水の難培養性レジオネラの検出試験に用いた冷却水

	レジオネラ属菌数	レジオネラ属菌 DNA 量	アメーバ数 <sup>a</sup>	細菌数 <sup>b</sup>	pH
	(CFU/100 mL)	(copies/100 mL)	(PFU/100 mL)	(CFU/mL)	
CTW-A	<10	$2.2 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$ (AC, VK, HT)	$2.6 \times 10^6$	7.8
CTW-B	<10	$1.1 \times 10^5$	<2	$1.0 \times 10$	8.1
CTW-C	<10	$9.9 \times 10^5$	<2	$3.9 \times 10^5$	8.1
CTW-D	<10	$1.0 \times 10^3$	<2	$1.2 \times 10^3$	8.4
CTW-E	<10	$1.6 \times 10^4$	2 (AC)	<10	7.9
CTW-F	<10	$4.5 \times 10^2$	<2	<10	8.8
CTW-G	<10	$6.5 \times 10^4$	<2	$1.6 \times 10^4$	8.6
CTW-H	<10	$1.3 \times 10^3$	<2	$1.1 \times 10^5$	7.6
CTW-I	<10	$4.8 \times 10^4$	$8.0 \times 10^3$ (VN, VK)	$1.1 \times 10^6$	8.3
CTW-J	<10	$1.3 \times 10^3$	<2	$3.7 \times 10^6$	8.5
CTW-K	<10	$1.2 \times 10^4$	12 (AC)	$2.6 \times 10^6$	8.0
CTW-L	<10	$3.0 \times 10^6$	<2	$1.8 \times 10^6$	8.2
CTW-M	<10	$1.5 \times 10^5$	6 (HT)	$1.3 \times 10^7$	8.0

<sup>a</sup> 数値の下の括弧はアメーバの種類を示す

(AC: *Acanthamoeba* sp., VK: *Vahlkampfiidae*, HT: *Hartmannella* sp., VN: *Vannella* sp.)

<sup>b</sup> R2A 培地で 25°C, 7 日間培養したときの細菌数

表 4. エアサンプラー調査した冷却塔の冷却水中のレジオネラ属菌数

冷却塔	冷却塔の運転状態		保有水量 (m <sup>3</sup> )	レジオネラ属菌	
	ファン	水の循環		培養法 (CFU/100 mL)	定量 PCR (copies/100 mL)
CT-A	運転	運転	20	$1.2 \times 10^5$	$6.2 \times 10^4$
CT-B	停止	運転	20	$1.0 \times 10^4$	$2.7 \times 10^6$
CT-C	運転	運転	8	$4.6 \times 10^3$	$1.6 \times 10^5$
CT-D	停止	運転	18	<10	5.7



図1. サイクロン式エアサンプラー外観

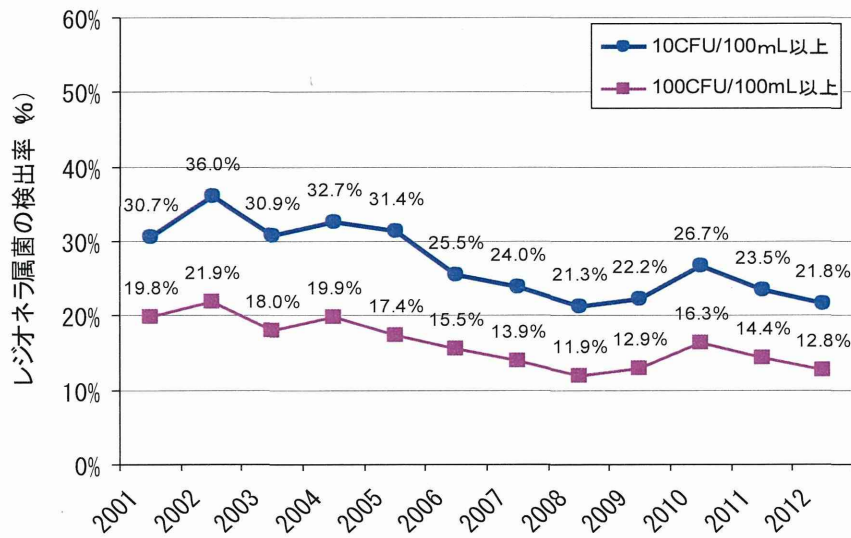


図2. 冷却水のレジオネラ属菌検出率の年別推移

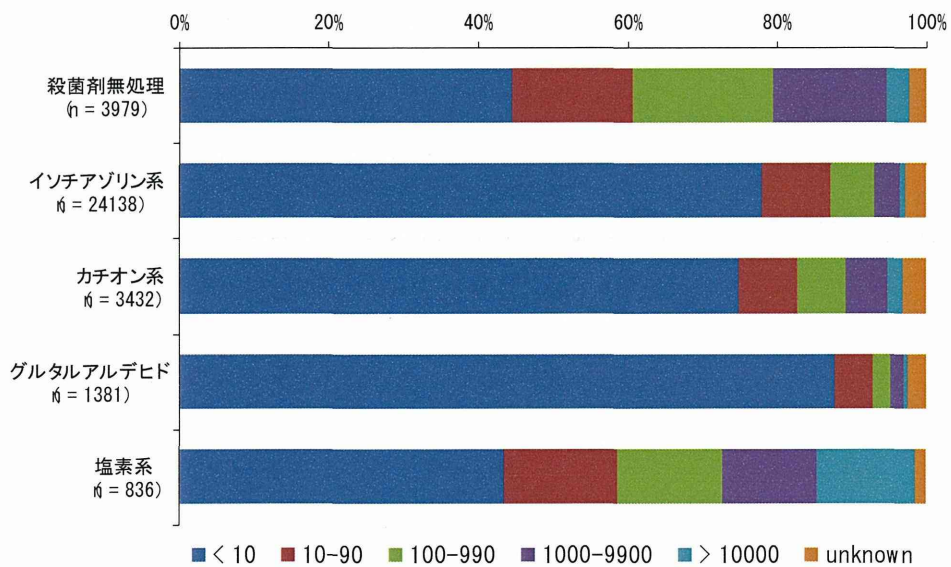


図3. 殺菌剤の種類別レジオネラ属菌の菌数分布

(凡例は、レジオネラ属菌数の範囲を示す 単位：CFU/100mL)

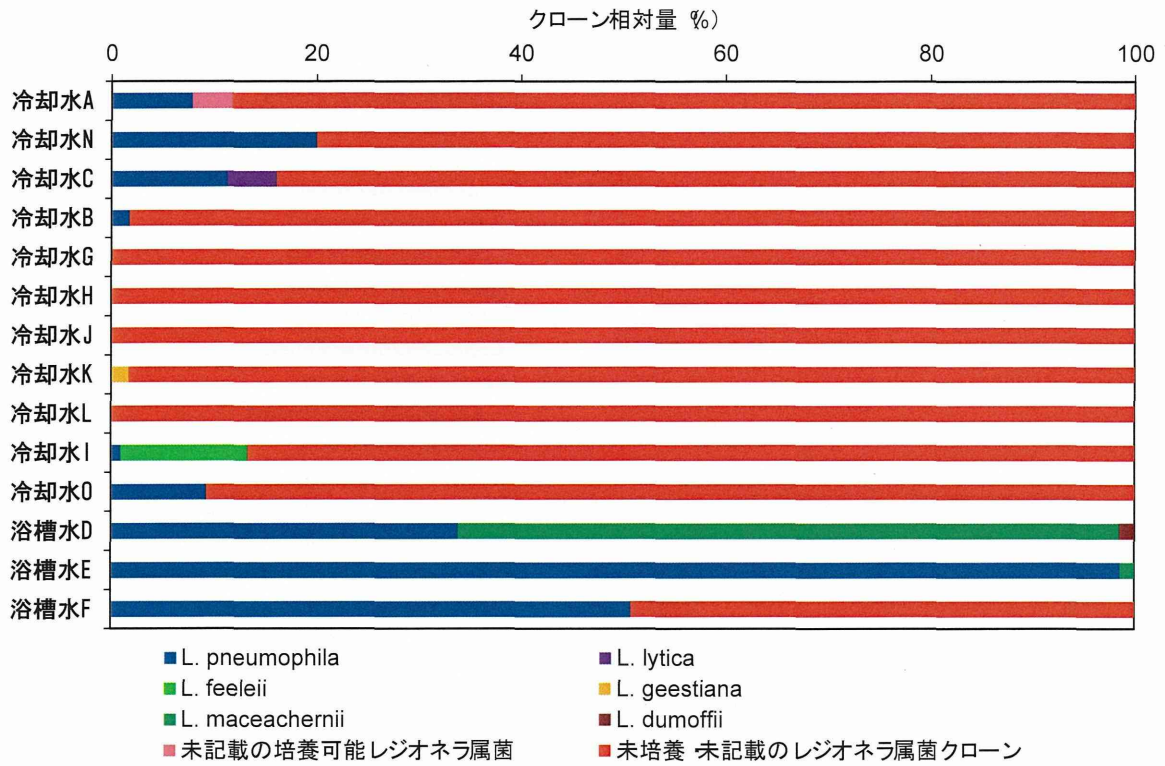


図4. 各クローンライブラリーを構成するクローンの相対量

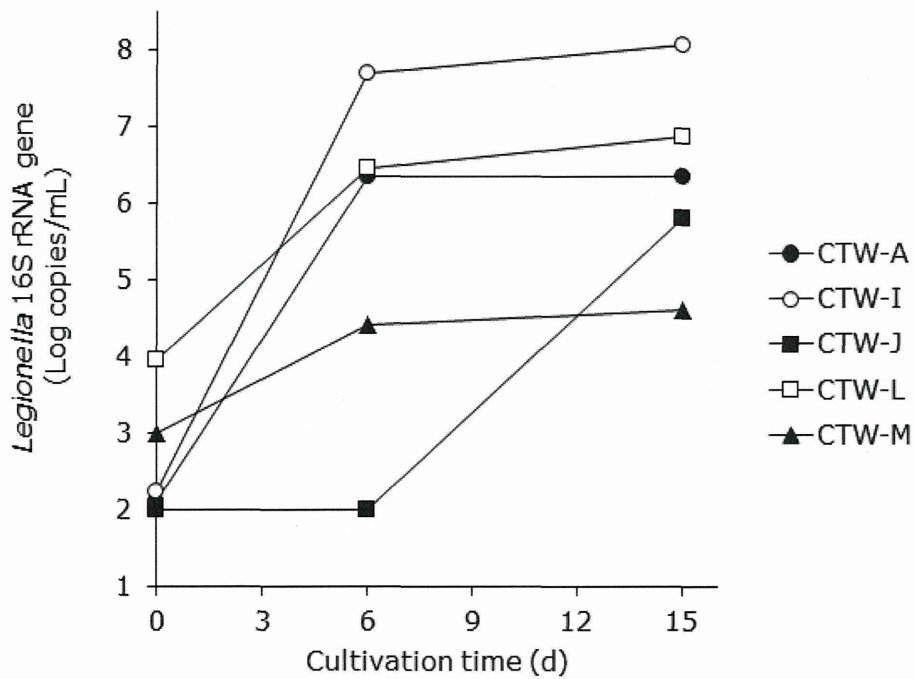


図5. アメーバ共培養によるレジオネラ属菌遺伝子量の経時変化

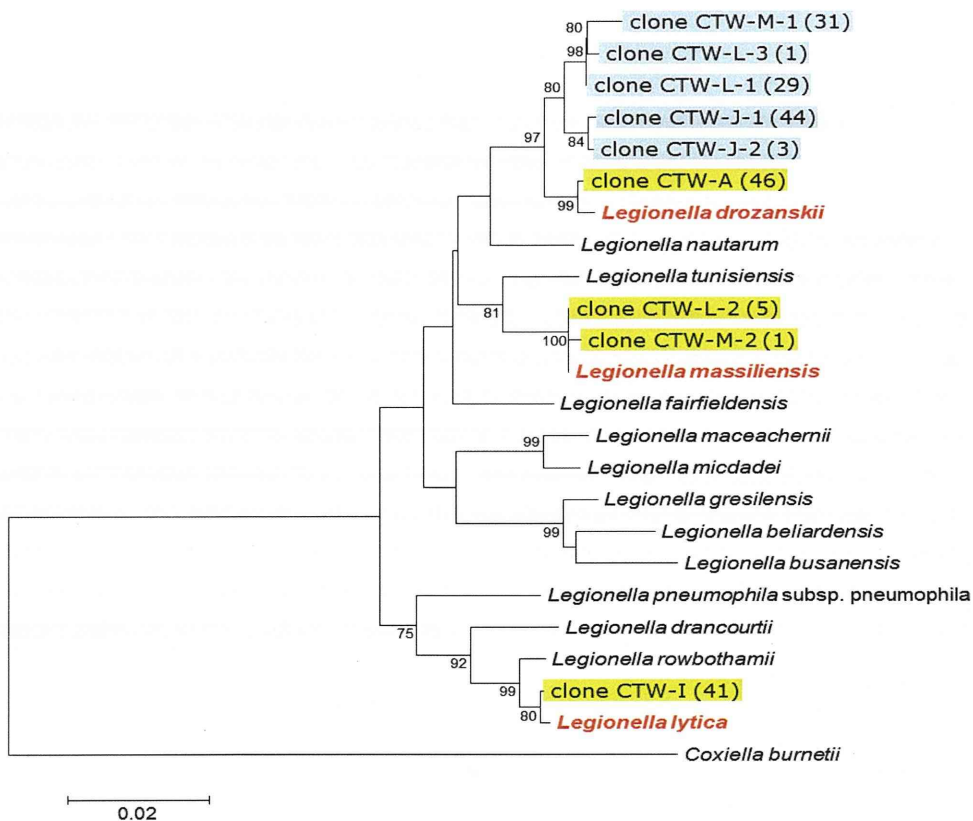


図 6. 検出した代表クローンと関連するレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子部分配列 (616 bp) の分子系統樹 (NJ 法)  
節部分の数値はブートストラップ値で 70%以上のものを記載した。  
括弧内の数値は得られたクローン数を示す。

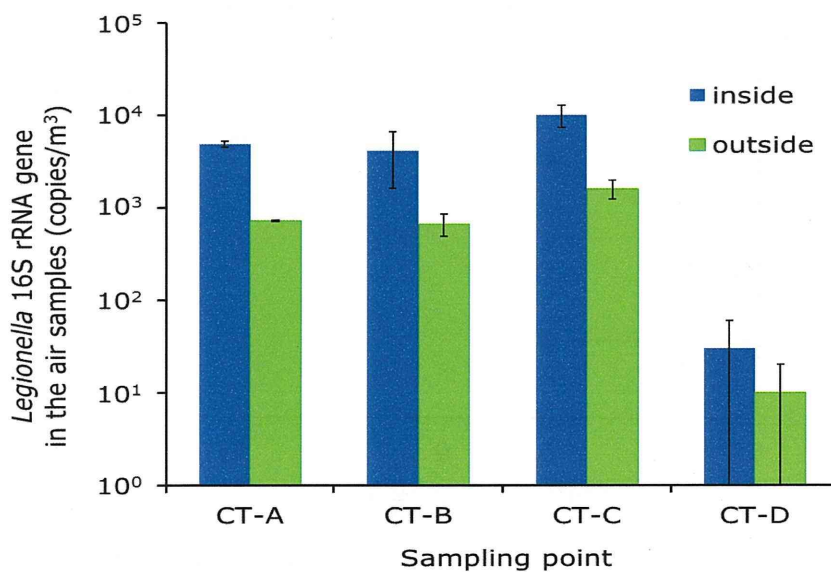


図 7. 冷却塔の内部と外部の空气中レジオネラ属菌遺伝子

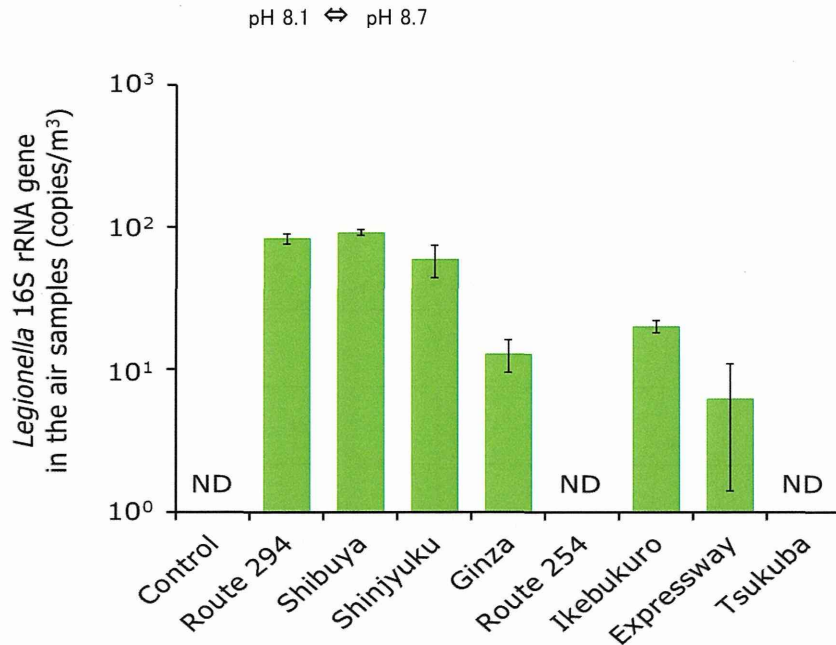


図 8. 市街地の空气中的レジオネラ属菌遺伝子 (NDは不検出)

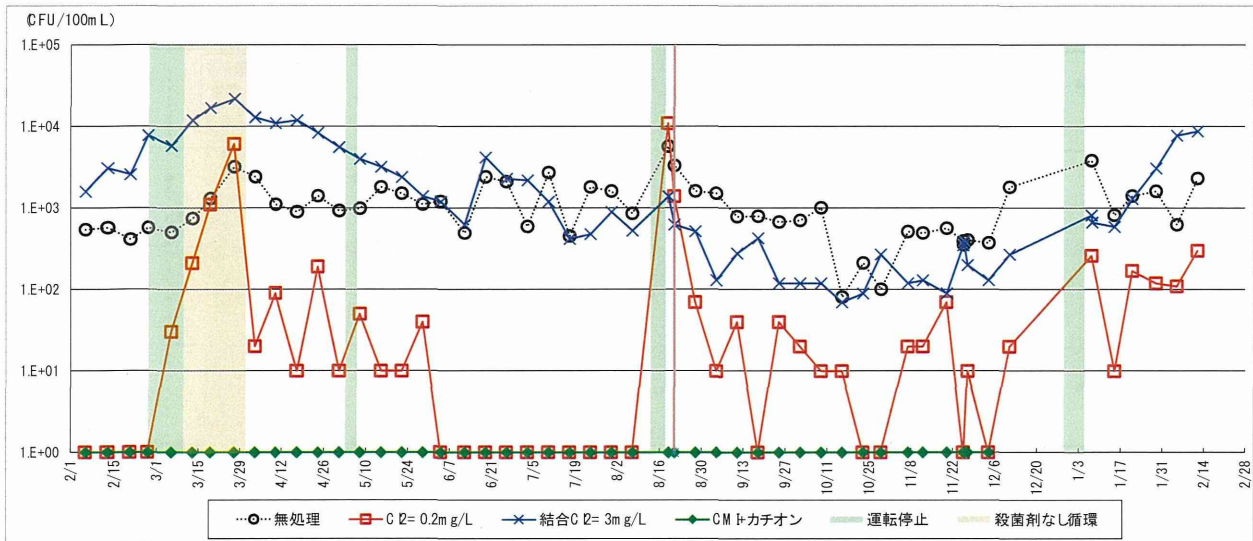


図 9. モデル冷却水のレジオネラ属菌の推移 (2014年2月から2015年2月)

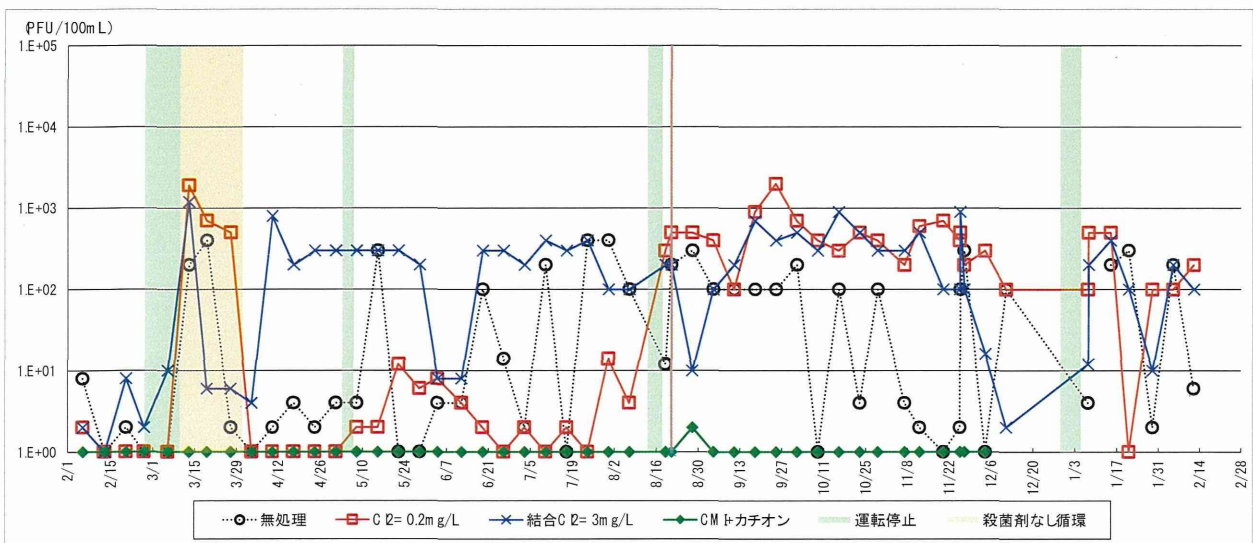


図 10. モデル冷却水のアメーバ数の推移 (2014年2月から2015年2月)

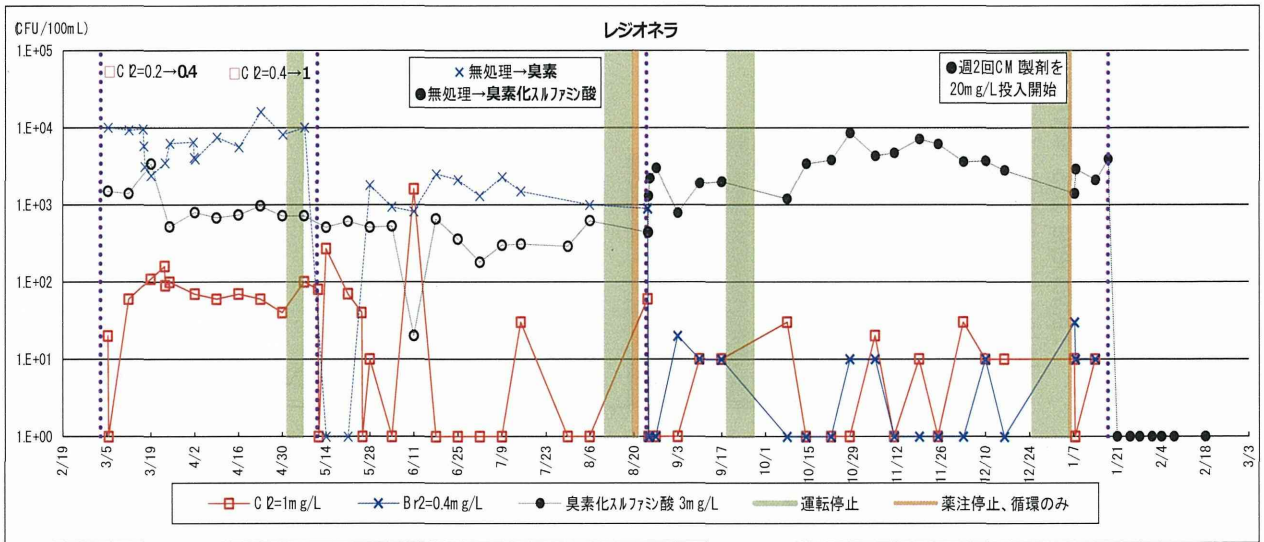


図 11. モデル冷却水のレジオネラ属菌の推移(2015年3月から2016年2月)

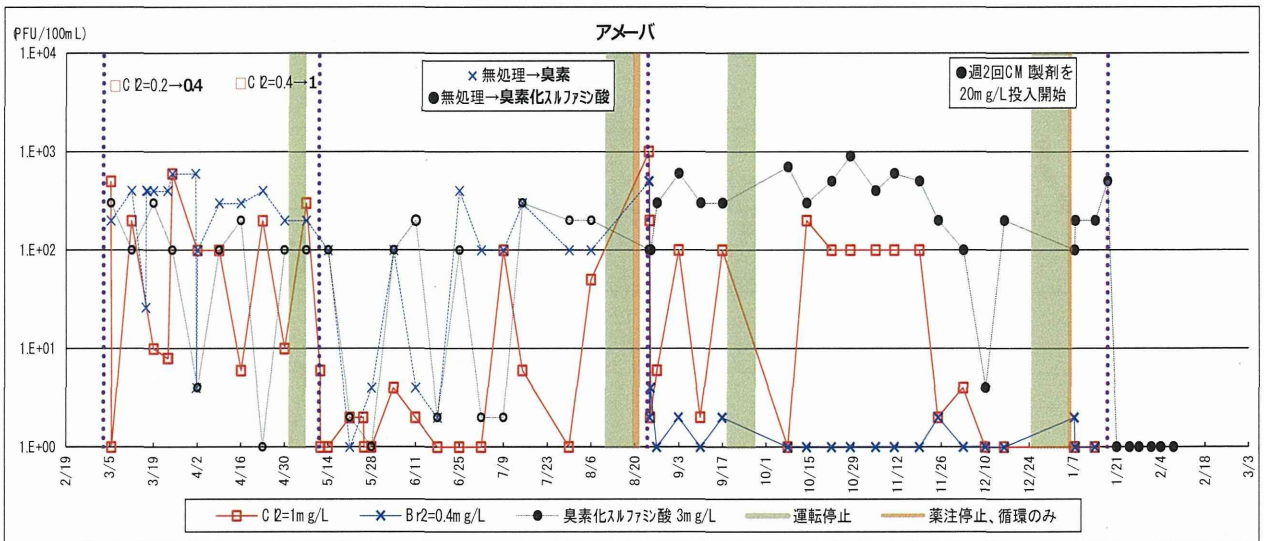


図 12. モデル冷却水のアメーバ数の推移(2015年3月から2016年2月)



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）

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 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

### 分担研究報告書

#### レジオネラ属菌迅速検査法の評価

研究分担者	磯部 順子	富山県衛生研究所
	烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	佐々木 麻里	大分県衛生環境研究センター
	八木田 健司	国立感染症研究所
研究協力者	山口 友美	宮城県保健環境センター
	武藤 千恵子	東京都健康安全研究センター
	飯高 順子	川崎市健康安全研究所
	淀谷 雄亮	川崎市健康安全研究所
	金谷 潤一	富山県衛生研究所
	浦山 みどり	長崎県環境保健研究センター
	田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター
	緒方 喜久代	公益社団法人 大分県薬剤師会検査センター
	原口 浩幸	株式会社ファスマック
	森中 りえか	株式会社ファスマック
	泉山 信司	国立感染症研究所

#### 研究要旨

本研究では、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、LC EMA qPCR 法、LAMP 法、PALSAR 法について、浴槽水などの実試料を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

LC EMA qPCR 法について、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当および 5 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った平板培養法に対する感度は 89.3% および 80.7%、特異度は 78.3% および 86.5% であった。LC EMA qPCR 法において低濃度平板培養陽性検体を見逃すリスクを避けるため、LC EMA qPCR 法のカットオフ値は 1 CFU/100 ml 相当が良いと考えられた。菌数（定量値）の相関は  $R^2 = 0.6874$  であり、平板培養法と高い相関を示した。

286 検体について LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 84.0%（68/81 検体）、特異度は 76.6%（157/205 検体）であり、LC EMA qPCR 法の感度（89.2%）、特異度（80.3%）よりもやや低かったものの、全体として平板培養法と関連している方法であると考えられた。

268 検体について PALSAR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 47.0%（39/83 検体）、特異度は 76.8%（142/185 検体）であり、LC EMA qPCR 法、LAMP 法と比較し、特異度は同等であったが、感度は低かった。異なる菌種や血清群 8 株を用いた感度実験に顕著

な差はなかったため、実検体で検出された菌種に対する特異性が低かったわけではないと考えられる。一部の濃縮検体については、測定まで冷蔵または $-20^{\circ}\text{C}$ で保存していた。保存状態が RNA の検出に影響するかどうか確認する必要があるが、PALSAR 法の平板培養法に対する感度が不足している可能性は考えられる。検体の濃縮率を上げて 1 反応あたり用いる検水量を多くすることで感度が向上するかについても、検討する必要がある。

本研究から、LC EMA qPCR 法（カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当）および LAMP 法は、平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。

## A 研究目的

現在、浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに 7~10 日を要する。一方、濃縮検体から直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法（リアルタイム PCR 法および LAMP 法）は、検査開始から数時間で結果を得られるため、配管洗浄などの効果確認に活用されている<sup>1)</sup>。しかし、通常の遺伝子検査では、生菌のみならず死菌由来する遺伝子も増幅対象とするため、結果の解釈に注意を要する。

平成 25 年には、EMA 処理により死菌由来遺伝子の検出を阻害した「生菌迅速検査法（LC EMA qPCR 法）」が開発され<sup>2)</sup>、市販されている。また近年、レジオネラ属菌特異的 16S rRNA を標的とし、プレート上の DNA プローブに結合させて検出する PALSAR 法が開発された。他の迅速検査法と同様に濃縮検体を用いる本検査は、特殊な機器が不要で肉眼による判定が可能であり、当日中に結果が判明する方法である。

本研究では、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、LC EMA qPCR 法、LAMP 法、PALSAR 法について、浴槽水などの実試料を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

## B 材料と方法

### 1 検査材料

全国 6 か所の地方衛生研究所において、平成 26~27 年度に実試料 617 検体（平成 26 年度 176

検体、平成 27 年度 441 検体）を採取し、検査法の検討に用いた。実試料として主に浴槽水を採取したが、その他に原水、湯口水、シャワー水、採暖槽水、プール水、足湯を採取した。

### 2 検査方法

ATP 値は、検水 100 倍濃縮液にルシパックワイドまたはルシパック Pen（キッコーマン）の専用綿棒を浸して約 100  $\mu\text{l}$  を吸い取り、携帯用簡易測定器を用いて検水 10 ml 当たりの RLU 値を測定した。

平板培養法は新版レジオネラ症防止指針に準じ、各機関の方法で実施した。

LAMP 法は、Loopamp レジオネラ検査キット E（LMP661、栄研化学）を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。一部の検体は、5%（w/v）キレックス溶液（バイオラッド）を用い、 $100^{\circ}\text{C}$  10 分間加熱後、遠心上清を鋳型 DNA として用いた。

LC EMA qPCR 法は、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR（7730、タカラバイオ）、*Legionella* LC Medium base（9016、タカラバイオ）、Lysis Buffer for *Legionella*（9181、タカラバイオ）、Cyclecleave PCR *Legionella*（16S rRNA）Detection Kit（CY240、タカラバイオ）を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。ただし、平成 26 年度は酸処理時間を 4 分間で実施した。また、一部の検体はリアルタイム PCR を N=2 で実施した。ATP 値が 5,000 RLU/10 ml 以上の検体は、1,000 倍濃縮液及び 100 倍濃縮液の両方について検査を実施し、定量値の高い値を採用した。リアルタイム PCR

実施後、添付の取扱説明書に記載された方法でコピー数から CFU に換算した。

PALSAR 法は、100 倍濃縮検体 1 ml を遠心後、上清を除去し、添付の取扱説明書に従い実施した。

*L. gormanii*、*L. bozemanii*、*L. micdadei*、*L. dumoffii*、*L. pneumophila* SG 3、*L. pneumophila* SG 8、*L. pneumophila* SG 10、*L. pneumophila* SG 1 Philadelphia の 8 株について、PALSAR 法における菌種、血清群ごとの感度を調べた。BCYE 寒天培地で 35°C、3 日間培養後、生理食塩水で McFarland No. 1 濁度の菌液（約  $10^8$  CFU/ml）を調製した。その菌液を 10 倍段階希釈し、-1~-6 段階の希釈液 0.1 ml をそれぞれ測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、研究機関内外の倫理委員会等における承認手続きが必要となる研究には該当しない。

## C 結果

### 1 平板培養法による結果

617 検体について検査した結果、165 検体（26.7%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された（表 1）。菌数別に見ると、107 検体（17.6%）が 10~99 CFU/100 ml、100~999 CFU/100 ml が 27 検体（4.4%）、1,000 CFU/100 ml 以上が 31 検体（5.0%）であった。最も多かった検体では、46,000 CFU/100 ml のレジオネラ属菌が検出された。血清群別の結果を表 2 に示した。*L. pneumophila* 血清群（SG）1 が 48 検体から分離され、最も多かった。次に多かったのは、*L. pneumophila* SG 6（47 検体）、*L. pneumophila* SG 5（40 検体）、*L. pneumophila* SG 3（33 検体）であった。また、*L. pneumophila* 以外の菌種が 30 検体から分離された。

### 2 LC EMA qPCR 法による結果

#### （1）平板培養法との比較

LC EMA qPCR 法について、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当および 5 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った。LC EMA qPCR 法を

使用した 518 検体について、平板培養法の結果と比較した（表 3）。平板培養法では 140/518 検体（27.0%）の検体から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、LC EMA qPCR 法では、カットオフ値を 1 CFU/100 ml 相当とした場合は 207/518 検体（40.0%）の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出され、平板培養法に対する感度は 89.3%（125/140 検体）、特異度は 78.3%（296/378 検体）であった。カットオフ値を 5 CFU/100 ml 相当とした場合では、164/518 検体（31.7%）の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出され、平板培養法に対する感度は 80.7%（113/140 検体）、特異度は 86.5%（327/378 検体）であった。LC EMA qPCR 法と平板培養法との菌数（定量値）の相関は、 $R^2 = 0.6672$  であった（図 1）。

#### （2）LC EMA qPCR 法（カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当）における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性（10 CFU/100 ml 以上）となったが LC EMA qPCR 法で陰性（1 CFU/100 ml 相当未満）となった 15 検体のうち、13 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml であり、残りの 2 検体 30 CFU/100 ml であった。この 2 検体は源泉が温泉であり、検体の ATP 値は 76,093 RLU/10 ml および 40,590 RLU/10 ml と高く、採水時の遊離残留塩素濃度（mg/L）はどちらも 0.05 未満であった。

#### （3）LC EMA qPCR 法（カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当）における偽陽性検体

平板培養法の結果が陰性（10 CFU/100 ml 未満）となったが LC EMA qPCR 法で陽性（1 CFU/100 ml 相当以上）となったのは、82/518 検体（15.8%）であった。これら 82 検体における LC EMA qPCR 法の定量値を見ると、45 検体（54.9%）は 1~9 CFU/100 ml 相当、30 検体（36.6%）は 10~99 CFU/100 ml 相当、7 検体（8.5%）は 100 CFU/100 ml 相当以上であった。ただし、14 検体（17.1%）は、平板培養法の菌数が 1~9 CFU/100 ml であった。

### 3 LAMP 法による結果

#### (1) 平板培養法との比較

LAMP 法を使用した 384 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 4)。平板培養法では 121/384 検体 (31.5%) の検体から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、LAMP 法では 165/384/検体 (43.0%) の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。LAMP 法の平板培養法に対する感度は 81.8% (99/121 検体)、特異度は 74.9% (197/263 検体) であった。

#### (2) LAMP 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性 (10 CFU/100 ml 以上) となったが LAMP 法で陰性となった 22 検体のうち、13 検体 (59.1%) は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml、残りの 9 検体 (40.9%) は 20~60 CFU/100 ml であった。

### 4 PALSAR 法による結果

#### (1) 平板培養法との比較

PALSAR 法を使用した 268 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 9)。平板培養法では 83/268 検体 (31.0%) の検体から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、PALSAR 法では 82/268/検体 (30.6%) の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 47.0% (39/83 検体)、特異度は 76.8% (142/185 検体) であった。

#### (2) PALSAR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性 (10 CFU/100 ml 以上) となったが PALSAR 法で陰性となった 44 検体のうち、35 検体 (79.5%) は平板培養法での菌数が 10~99 CFU/100 ml であった。残りの 9 検体は、平板培養法での菌数が 100 CFU/100 ml 以上 (最大 1,500 CFU/100 ml) であり、分離菌の血清群別の結果、すべての検体から *L. pneumophila* が分離された。この 9 検体については、100 倍濃縮検体 1 ml を遠心して上清を除去した後、測定するまで、3 検体は冷蔵で 2 日間、3 検体は -20°C で約 1 か月保存した (残り 3 検体は保存状態不明)。

#### (3) PALSAR 法における菌種ごとの感度

8 株の 10 倍段階希釈液について PALSAR 法を実施した結果、すべての株について検出限界が  $10^3 \sim 10^4$  CFU/reaction (0.1 ml) であった (図 2)。

### D 考察

3 種類の迅速検査キット (LC EMA qPCR 法、LAMP 法、PALSAR 法) について、平板培養法の結果と比較し、評価した。

LC EMA qPCR 法について、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当および 5 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った結果、平板培養法に対する感度は 89.3% および 80.7%、特異度は 78.3% および 86.5% であった。LC EMA qPCR 法において低濃度平板培養陽性検体を見逃すリスクを避けるため、LC EMA qPCR 法のカットオフ値は 1 CFU/100 ml 相当が良いと考えられた。菌数 (定量値) の比較は  $R^2 = 0.6672$  と高い相関を示し、LC EMA qPCR 法は全体として平板培養法の菌数を反映していた。

LC EMA qPCR 法で偽陰性 (カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当) となった 13/15 検体は、平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml と低濃度ではあったが、13 検体から検出された菌種がすべて *L. pneumophila* であり、LC EMA qPCR 法で検出可能な菌種であった。低濃度培養陽性検体 (10 CFU/100 ml) における LC EMA qPCR 法の感度は 59.4% (19/32 検体) であったことから、平板培養法の菌数が低い場合には、LC EMA qPCR 法で陰性になる場合があると考えられる。LC EMA qPCR 法で偽陰性となった残りの 2 検体 (いずれも 30 CFU/100 ml) は ATP 値が高く夾雑菌汚染が考えられ、1 検体は検水が白濁していたため、PCR の反応阻害の可能性が考えられた。

LC EMA qPCR 法で偽陽性 (カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当) となった検体は全体の 15.8% (82/518 検体) であった。本研究では平板培養法のカットオフ値を 10 CFU/100 ml としているが、各機関の平板培養法が異なるため、検出下限値も