

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）

公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

研究代表者 前川 純子 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

#### 感染源解明のための環境調査

研究分担者 磯部 順子 富山県衛生研究所

研究協力者 金谷 潤一 富山県衛生研究所

研究要旨 本研究では、浴槽水、シャワー水、カラン水および市中河川水における *Legionella* 属菌の汚染状況調査と、感染源となり得る環境検体周辺の空気中の *Legionella* 属菌の棲息状況について、直接平板培養法だけでなく、アメーバ共培養法も併用して調査した。また、患者検体から最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群 1（以下 Lp1）を環境検体から効率よく検出するため、Lp1 で感作した免疫磁気ビーズ（LP1-IMB）を用いて Lp1 を選択的に濃縮する方法について検討した。

*Legionella* 属菌の平板培養法による検出率は、浴槽水で 8/39 検体（20.5%）、シャワー水で 8/32 検体（25.0%）、カラン水で 4/15 検体（26.7%）であった。アメーバ共培養法による検出率は 14/86 検体（16.3%）であり、平板培養法の検出率（20/86 検体、23.3%）の方が高かった。河川水からはアメーバ共培養法により 9 月、11 月の 6 検体から *Legionella* 属菌が検出され（検出率 30.0%）、すべて *L. pneumophila* であった。エアロゾルの調査については、道路沿い 52 検体、浴室 5 検体および屋内 20 検体について調査し、平板培養法およびアメーバ共培養法において *Legionella* 属菌は分離されなかった。しかしながら、道路沿い検体で 75.5%（114/151 検体）、浴室 検体で 71.4%（15/21 検体）および屋内検体で 45.0%（9/20 検体）から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。16S rRNA 遺伝子のコピー数（copies/m<sup>3</sup>）は、道路沿い検体で 81.0、浴室 検体で 72.0、屋内で 19.5 であった。湿度、気温および降水量と 16S rRNA 遺伝子のコピー数との相関は見られなかった。Lp1-IMB 濃縮法による Lp1 の分離では、Lp1 が浴槽水 35 検体中 5 検体から分離された。Lp1 の添加回収実験では、BCYE- $\alpha$  培地での接種菌量を基に算出した回収率についてみると、GVPC 培地を用いた回収率は  $28.4 \pm 13.1\%$  と有意に低かった（ $P < 0.01$ ）。また、処理方法について比較すると、BCYE- $\alpha$  培地を用いた場合、未処理と加熱処理および酸処理との間に差は認められなかった。

以上の結果から、感染源となり得る環境（エアロゾル）検体から *Legionella* 属菌の遺伝子を検出し、ヒトへの感染経路の一端を証明することができたが、継続した調査が必要である。一方、Lp1-IMB 法については、Lp1 の選択的濃縮に有用であることが示された。検出感度をあげることができれば、感染源の特定に有用な方法となることが期待される。

## A. 研究目的

レジオネラ症は、感染症発生動向調査によると、2016年の全国での届出数が1,602件と、統計を取り始めた2000年からの17年間でもっとも多かった<sup>1)</sup>。本疾患は2003年の尿中抗原検査の保険適用に続き、2005年には日本呼吸器学会において診断フローチャートに尿中抗原検査法が示されたことにより、全国的にその届出数が増加傾向を示したと推測されている。しかしながら、それから既に15年が経過した現在でも本疾患の増加傾向は続き、尿中抗原検査の普及だけで説明が難しい状況となっている。一方、富山県においてもレジオネラ症の届出は全国と同様な状況となっているが、加えて、レジオネラ症罹患率(対人口10万人)は全国の中でもっとも高い状況が続いている<sup>1)</sup>。そして、本疾患の感染源は、集団感染事例などでは特定されるが、散发事例において特定されることは極めて少ないという状況も続いている。

そこで、レジオネラ症の発生予防を目的とし、感染源を明らかにするため、富山県の公衆浴場の浴槽水、シャワー水およびカラン水に加えて、市中河川水中の*Legionella* 属菌の棲息状況を調査した。昨年度に引き続き、通常的人工培地での培養に加え、アメーバ共培養法についても検討した。また、これまでの調査で*Legionella* 属菌が検出された環境検体から、ヒトへの感染様式を明らかにするため、検体採取近辺で空气中に浮遊する*Legionella* 属菌を調査した。一方、感染源特定のために必要となる感染源疑いの環境検体から、患者検体で最も多く分離されている*Legionella pneumophila* 血清群1(以下Lp1)を効率

よく検出するため、Lp1で感作した免疫磁気ビーズ(Lp1-IMB)を用いて選択的濃縮法によるLp1の分離について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 感染源調査(浴槽水・シャワー水・カラン水および河川水)

#### 検体

調査対象は、公衆浴場の浴槽水、シャワー水、カラン水および河川水とした。浴槽水、シャワーおよびカラン水については、対象施設の選定と採水を厚生センター職員に依頼した。河川水については、富山市の街の中心部を流れる4河川5地点を対象とした。

#### 調査期間と試料

浴槽水、シャワー水およびカラン水の試料は、それぞれ平成29年度に14施設で採取された39、32および15検体である。シャワー水およびカラン水については、温度を40℃に設定後約10秒間流出させた後、容器に採取した。河川水は、3、9、10、11月に計20検体を採取した。

#### *Legionella* 属菌の分離

*Legionella* 属菌の分離は、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)「公衆浴場等における*Legionella* 属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」の精度管理ワーキンググループが推奨する浴用水の方法<sup>2)</sup>に準じて行なった。

濃縮方法：浴用水(1,500 ml)、シャワー水(1,500 ml)、カラン水(1,500 ml)および河川水(1,000 ml)は、メンブランフィルター(直径47 mm, 0.2 μm, ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE)で吸引る過

し、そのフィルターを 100 倍濃縮液となるように滅菌蒸留水で 1 分間ボルテックスしたものを試料とした。

培養法：浴槽水、シャワー水およびカラン水は 100 倍濃縮液について未処理、酸処理 (0.2M KCl-HCl, pH2.2 で等量混合後 5 分間静置)、加熱処理 (50 20 分アルミバスで加熱)を行い、その 100  $\mu$ l を GVPC 培地 (日水製薬) にコンラージ棒で広げて 35 で培養した。ただし、酸処理検体は、200  $\mu$ l について同様に培養した。非濃縮検体については、未処理の 100  $\mu$ l を GVPC 培地にコンラージ棒で広げて、35 で 7 日間培養した。河川水は、濃縮検体 5 ml のうち 100  $\mu$ l を酸処理液と等量混合後、室温で 15 分静置した。混合液 200  $\mu$ l を GVPC 培地にコンラージ棒で広げて、35 で 7 日間培養した。

アメーバ共培養法：浴槽水、シャワー水およびカラン水については、濃縮液 1 ml を 10  $\times$  AS Buffer (10 mg/ml ヘパリン添加) に置換後、PYGC 培地で 30 1 週間培養したアメーバ増菌液 (古畑らの報告<sup>3)</sup>) を添加し、35 で 1 か月培養した (アメーバ共培養法)。培養液を酸処理液 (0.2M KCl-HCl, pH2.2) と等量混合後、室温で 15 分静置した。混合液 200  $\mu$ l を GVPC 培地にコンラージ棒で広げて、35 で 7 日間培養した。河川水については、上記培養法の残りの濃縮液にアメーバ増菌液を添加して実施した。

#### 分離された *Legionella* 属菌の同定

同定は、平板に発育した *Legionella* 属菌様のコロニーについて、森本の報告<sup>4)</sup>した斜光法で特異的な形態を観察し、血液寒天培地と BCYE- $\alpha$  培地 (ピオメリュー) に塗抹し、システインの要求性を確認した。次に、BCYE- $\alpha$  培地にのみ発育したコロニー

について、レジオネララテックステスト (OXOID) とレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) により血清群を決定した。

## 2. エアロゾル調査

### サンプリング

主に雨天の日の道路沿い 82 検体、浴用施設の浴室内 5 検体 (5 施設) および屋内 20 検体 (1 施設および民家 2 軒) について、エアサンプラー (コリオリス  $\mu$ ) を用いてエアロゾルを捕集した。なお、浴室内 4 検体は施設のミスト発生装置 (稼働中) 周辺の浴槽水付近で捕集した。15 ml の捕集液 (0.005% Tween 80 液) 中に 300 l/min の条件で 10 分間捕集した。ただし、道路沿い 30 検体については、15 ml の捕集液 (滅菌水) 中に 300 l/min の条件で 30 分間捕集した。

### 遺伝子検査法

捕集液 2 ml を用いて行った。15,000 rpm で 5 分間遠心後の沈殿に 100  $\mu$ l のキレックス (Bio-Rad) 溶液を添加し、100 で 10 分加熱後、遠心上清を DNA 溶液とした。定量 PCR は、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を用いた。ただし、滅菌水で捕集した道路沿い 30 検体については、死菌 DNA の PCR 増幅を阻害するため、上記の DNA 抽出とは別に、DNA 抽出前に Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 (タカラバイオ) を用いて Ethidium monoazide (EMA) 処理を実施した。

### 直接培養法

捕集液 100  $\mu$ l を GVPC 培地 (日水製薬) にコンラージ棒で広げて、35 で 7 日間培養した。

### アメーバ共培養法

残った捕集液にアメーバ増菌液を添加して、浴用水などと同様にアメーバ共培養法を実施した。

#### 16S メタゲノム解析

道路沿い23 検体および浴室9 検体について、次世代シーケンスを実施した。イルミナ社のプロトコルに従い 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR で増幅後、Nextera XT Index Kit および MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いてランを実施し、MiSeq Reporter で解析した。

### 3 .IMB による Lp1 の選択的濃縮法の検討

#### Lp1-IMB 作製方法

Lp1-IMB はデンカ生研で作製した。Lp1 以外の血清型に対する交差反応を吸収後、硫酸分画にて粗精製し、至適感作濃度（ビーズに結合しやすい抗体の濃度）とした抗体を磁気ビーズに感作し、Lp1 免疫磁気ビーズとした。

#### Lp1-IMB による実検体からの Lp1 濃縮分離法

供試検体は、前述の感染源調査で 100 倍濃縮された浴槽水 35 検体、シャワー水 12 検体、カラン水 6 検体、計 53 検体とした。Lp1-IMB 濃縮法：検体(100 倍濃縮液)1 ml に IMB 25  $\mu$ l を接種し、10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸着させた。ビーズを磁石で集め、滅菌生理食塩水で洗浄した。この操作（洗浄）を 2 回実施した後、最終的に生食 100  $\mu$ l もしくは 200  $\mu$ l に懸濁、ボルテックスでよく混和し、IMB 検体とした。この IMB 検体 100  $\mu$ l を 1 - で記載した方法と同様に、培養前に熱または酸にて処理し、未処理検体と併せて BCYE- $\alpha$  培地、GVPC 培地の両方にコンラージ棒で拡げ、35 で 7 日間培養した。

#### 実検体への Lp1 添加回収試験

接種菌は当所で分離、保管している Lp1 (LG626, LG643) と Lp9 (LG494) を用いた。これらの菌を 30 3 日間培養後、滅菌生理食塩水にてマックファーランド 2.0 に調整し、10 倍段階希釈した。添加菌量による回収率の差をみるため、 $\times 10^{-5}$  の菌懸濁液 200  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 50  $\mu$ l を、それぞれ 100 倍濃縮液 800  $\mu$ l, 900  $\mu$ l, 950  $\mu$ l に接種、ビーズ処理に供する検水量を 1,000  $\mu$ l とした。検体数は上述した浴槽水、シャワー水、カラン水のうち 40 検体を用い、平板培養実施日～1 週間のうちに実施した（計 6 回）。ただし、5 回目のみ、3 週間後に添加実験を行った。Lp9 については Lp1-IMB の特異性を確認するため、初回のみ添加回収実験を行った。*Legionella* 属菌を接種した 100 倍濃縮検体について、と同様、IMB 濃縮法にて Lp1 を選択的に濃縮培養し、その菌数から回収率を求めた。接種した *Legionella* 属菌数は、 $\times 10^{-6}$  菌懸濁液 100  $\mu$ l を BCYE- $\alpha$  培地、GVPC 培地にコンラージ棒で拡げ、35 で 7 日間培養後、それぞれ菌数を測定した（推定菌数）。

#### Lp1 特異的遺伝子の検出（PCR 法）

濃縮検体からの DNA 抽出は Lysis Buffer for *Legionella*（タカラバイオ）、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。対象遺伝子は *wzm* を M $\acute{e}$ rault らが報告<sup>5)</sup>した SG1-P1 (5'-TTACCGCTTGCTTTTATGGA-3') と SG1-P2(5'-CCTATCAACGCTCTTGAAA-3')をプライマーとして、PCR 法にて検出した。PCR は  $\times 2$  GoTaq Hot Start DNA

Polymerase (プロメガ) 12.5 µl にプライマー (2 µg/µl) 各 1.25 µl, 滅菌蒸留水 8 µl を混合し, これに検体濃縮液から抽出した DNA 2 µl を接種し, 94 1 分加熱後, 94 30 秒, 55 30 秒, 72 30 秒の反応を 35 サイクル行い, 72 4 分保温した. 得られた増幅産物は 2% アガロース (和光純薬) ゲル電気泳動 (100V, 30 分) により確認した.

#### Lp1-IMB 濃縮法の洗浄方法の検討

に述べた添加菌数の測定において, 滅菌生理食塩水の他に, 緩衝液 ACES (同仁化学研究所) を用いて洗浄し, 生理食塩水による洗浄との比較を行った.

#### 処理法および培地間の回収率の比較

統計解析は統計解析ソフト IBM SPSS 24 を用いた. 2 群間の比較は対応のある t 検定を行い, 多重比較は Bonferroni 法で調整した. 統計的有意水準は  $P < 0.05$  とし,  $P < 0.10$  を傾向有りとした.

#### (倫理面への配慮)

本研究は, 研究機関内外の倫理審査委員会等において承認手続きが必要となる研究には該当しない.

### C. 研究結果

#### 1. 浴槽水・シャワー水, カラン水および河川水における *Legionella* 属菌検出状況

浴槽水・シャワー水およびカラン水から検出された *Legionella* 属菌の菌数および菌種 (血清群) を表 1-a b に示した. *Legionella* 属菌が検出されたのは, 浴槽水で 8/39 検体 (20.5%), シャワー水で 8/32 検体 (25.0%), カラン水で 4/15 検体 (26.7%) であった. 浴槽水から分離された *Legionella* 属菌で最

も多かったのは Lp1, シャワー水およびカラン水では LpUT であった.

今年度実施したアメーバ共培養法による *Legionella* 属菌の分離結果について, 通常の平板培養法と比較した結果を表 2 に示した. *Legionella* 属菌の検出率は, 平板培養法で 20/86 検体 (23.3%), アメーバ共培養法で 14/86 検体 (16.3%) と平板培養法で高かった (表 2-a). 平板培養法でのみ *Legionella* 属菌が分離された 8 検体 (浴槽水 4 検体, シャワー水 1 検体およびカラン水 2 検体) からは, Lp1, Lp5 および LpUT が検出された (表 2-b, c). アメーバ共培養法のみ陽性となった 2 検体 (浴槽水 1 検体およびカラン水 1 検体) からは, Lp3 と *L. cherrii* が検出された.

河川水における *Legionella* 属菌の月別の検出率と分離された菌を表 3 に示した. 9 月および 11 月の 6 検体から *Legionella* 属菌が検出された (検出率 30.0%). 分離されたのはすべて *L. pneumophila* であった.

#### 2. バイオエアロゾルにおける *Legionella* 属菌検出状況

道路沿い 52 検体, 浴室内 5 検体および屋内 20 検体について調査した結果, 直接培養法およびアメーバ共培養法において *Legionella* 属菌は分離されなかった (表 4, 平成 28 年度のデータも含む). しかしながら遺伝子検査法においては, 道路沿い検体で 75.5% (114/151 検体), 浴室内検体で 71.4% (15/21 検体) および屋内検体で 45.0% (9/20 検体) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された. 16S rRNA 遺伝子の平均コピー数 (copies/m<sup>3</sup>) は, 道路沿い検体で 81.0, 浴室内検体で 72.0, 屋内で 19.5 であった.

滅菌水で捕集した道路沿い 30 検体についても、平板培養法およびアメーバ共培養法において *Legionella* 属菌は分離されなかった。しかしながら、遺伝子検査法 (qPCR 法) においては 86.7% (26/30 検体) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、16S rRNA 遺伝子のコピー数 (copies/m<sup>3</sup>) は 31.9 であった。また、生菌を検出する EMA-qPCR 法においても、66.7% (20/30 検体) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、16S rRNA 遺伝子のコピー数 (copies/m<sup>3</sup>) は 20.0 であった (表 5)。

平成 28~29 年度に捕集した道路沿い 151 検体について、地点別の検出率を比較した (図 1)。すべての地点から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、検出率は 60.0~93.3%、16S rRNA 遺伝子のコピー数 (copies/m<sup>3</sup>) は 54.0~124.1 であった。また、気候とコピー数の相関も比較したが、本調査では、湿度、気温および降水量と 16S rRNA 遺伝子のコピー数との相関は見られなかった (図 2)。

16S メタゲノム解析で取得したリード数は、道路沿い検体で中央値 121,351 (66,803~975,202)、浴室内で中央値 115,879 (68,986~1,110,988) であった (表 6-a)。道路沿い 22/23 検体および浴室内 9/9 検体から *Legionella* 属菌のリードが検出され、各検体に占める *Legionella* 属菌のリードの割合の平均値は、道路沿い検体で 0.23%、浴室内検体で 0.10% であった (表 6-b)。また、道路沿い 4/23 検体および浴室内 2/9 検体から *L. pneumophila* のリードが検出され、各検体に占める *L. pneumophila* のリードの割合の平均値は、道路沿い検体で 0.0033%、浴室内検体で 0.0337% であった

(表 6-b)。

### 3. 免疫磁気ビーズによる Lp1 の選択的濃縮法の検討結果

#### 実検体からの Lp1 の分離

Lp1-IMB 濃縮法による Lp1 の分離結果を表 7 に示した。Lp1 は浴槽水 35 検体中 5 検体から分離された。この 5 検体の他に浴槽水 1 検体から *L. micdadei* が、1 検体からは Lp5 が分離された。また、Lp1-IMB 濃縮法と平板培養法の両方、あるいはどちらか一方の方法で *Legionella* 属菌が陽性となった 10 検体について、分離結果を比較した (表 8)。この表に、Lp1 特異的遺伝子の PCR による検出結果も示した。Lp1-IMB 濃縮法において Lp1 が分離されたのは 5 検体、平板培養法では 6 検体であった。これらのうち、両法で Lp1 が分離されたのは 3 検体 (No. 1, 2, 5) で、それらの菌数は平板培養法で 100~890 CFU/100 ml であった。これに対し、Lp1-IMB 濃縮法でのみ分離された Lp1 の菌数は 100 ml 中 13 CFU, 2 CFU、平板培養法のみで分離された 3 検体の Lp1 の菌数はいずれも 10 CFU/100ml と少なかった。*Legionella* 属菌が分離できた処理法と培地の種類を見ると、Lp1-IMB 濃縮法ではどちらも差は認められなかった。この 10 検体において、アメーバ共培養法で *Legionella* 属菌が分離されたのは 2 検体 (No. 2, 3) と、他の培養法より少なかった。一方、Lp1 特異遺伝子が検出されたのは 4 検体 (No. 1, 2, 5, 8) で、No. 10 を除く 3 検体で Lp1-IMB 濃縮法、平板培養法で Lp1 が分離された。逆に、どちらかの培養法で Lp1 が分離されたにも関わらず、4 検体 (No. 3, 4, 7, 9) 本遺伝子は陰性であった。

#### 実検体での Lp1 添加回収試験結果

推定菌数を求めるため、 $\times 10^6$  菌懸濁液の菌数を表 9 に示した。2 回目の実験では GVPC 培地による添加菌の測定を行わなかった。菌数の平均値は BCYE- $\alpha$  培地で 81.9 CFU/100 $\mu$ l であったのに対し、GVPC 培地では 46.6CFU/100  $\mu$ l で、BCYE- $\alpha$  培地での発育菌数のおよそ 56.9%であった。菌株 LG494 (Lp9) も Lp1 同様で、GVPC 培地上の菌数は (46.0/100  $\mu$ l) で、BCYE- $\alpha$  培地 (85.0/100  $\mu$ l) の 54.1%であった。

添加した Lp1 の回収率は、BCYE- $\alpha$  培地、GVPC 培地にそれぞれに発育した *Legionella* 属菌数を、BCYE- $\alpha$  培地で求めた推定接種菌数と比較した (表 10-a)。一方、GVPC 培地については、GVPC 培地で測定した推定接種菌数と回収率も示した (表 10-b)。はじめに BCYE- $\alpha$  培地での接種菌量を基に算出した回収率についてみると、BCYE- $\alpha$  培地での回収率は 10.7 ~ 75.0% (平均 33.2%) と大きなばらつきがみられた。接種菌別に見ると、回収率はいずれの実験回でも LG626 に比べ、LG643 で高かった。処理法別では酸処理による回収率 (35.9%) でわずかに高かった。GVPC 培地での回収率は 6.1 ~ 44.5% (平均 25.9%) で、BCYE- $\alpha$  培地 (平均 33.2%) よりバラツキは小さかったが、回収率は全体に低かった。GVPC 培地においても、わずかではあるが、LG643 の回収率が高かった。処理法別では、加熱処理による回収率が高かった (26.8%)。一方、GVPC 培地で測定した接種菌量を基に算出した回収率 (表 10-b) については、13.7 ~ 80.2% とばらつきが大きかったが、未、加熱、酸いずれの処理法でも 40% 以上と高く、中でも未

処理による回収率 (42.3%) が高かった。

回収率の統計解析による比較には、BCYE- $\alpha$  培地、GVPC 培地の両方で 3 種類の処理法のすべての培養結果が得られている 39 検体の回収率を用いた。

未処理の BCYE- $\alpha$  培地を用いた Lp1 回収率は  $37.8 \pm 18.5\%$  であったのに対し、GVPC 培地を用いた回収率は  $28.4 \pm 13.1\%$  と有意に低かった ( $P < 0.01$ ) (図 3-a)。加熱処理、酸処理の場合も同様に、BCYE- $\alpha$  培地と比較すると GVPC では回収率が有意に低かった ( $P < 0.01$ )。これらは、BCYE- $\alpha$  培地から算出した推定接種菌量に対する回収率であるが、GVPC 培地における回収率を GVPC 培地から算出した接種菌量について求めると、その回収率は大きく上昇し、処理の場合で  $52.0 \pm 26.9\%$  となった。加熱処理、酸処理も同様で、GVPC 培地で回収率は上昇した。一方、処理方法について比較すると、BCYE- $\alpha$  培地を用いた場合、未処理と加熱処理および酸処理との間に差は認められなかった。加熱処理と酸処理を比較すると、酸処理をしたものは加熱処理したものより回収率が高い傾向が認められた ( $P < 0.10$ ) (図 3-b)。GVPC を用いた場合、各処理方法の間に回収率の差は認められなかった (図 3-c)。

#### 洗浄液の検討

IMB 濃縮法の中のビーズ洗浄液の検討結果を表 11 に示した。計 6 回の検討を行ったが、回収率の平均に大きな差は認められなかった。

#### D. 考察

日本では、公衆浴場等を利用したレジオネラ症患者の場合、感染拡大防止のため、

生活衛生担当部局が浴槽水等を検査し、衛生管理の指導を行なうシステムがほぼできている。しかしながら、2015年の臨床分離株 Lp1 の SBT の遺伝子型を Minimum Spanning Tree で解析した結果では、土壌・水溜り分離株グループが 165/410 株 (40.2%) と浴槽水グループ 129/410 株 (31.5%) より多かったことが報告されている<sup>6)</sup>。これらのデータから、環境由来検体の絞り込みが困難で、感染源が特定できない事例が多いものと思われる。

このような背景を踏まえ、本研究では、これまで報告されていない感染源を探求している。そして、それらの環境検体から発生するエアロゾルまたはミスト中の *Legionella* 属菌を証明し、とりわけ、水溜りなど、これまで直接的な感染源とは証明されていない環境のリスクを明らかにしようとして試みた。

今年度の検討においても昨年度と同様に、直接平板培養、アメーバ共培養法、どちらの培養法でも *Legionella* 属菌を分離することはできなかった。しかしながら遺伝子検査法では採取地点に関わらず 6 割以上の検体が陽性となり、遺伝子量と気候には相関が見られなかった。EMA-qPCR 法において *Legionella* 属菌の遺伝子が検出されたことから、エアロゾル中における生菌の存在が示唆された。16S メタゲノム解析では、ほとんどの検体から *Legionella* 属菌のリードが検出され、*L. pneumophila* のリードも一部の検体から検出された。これらの結果から、エアロゾル中に広く *Legionella* 属菌が浮遊している可能性が示唆された。また、道路沿い検体における *Legionella* 属菌遺伝子の検出率および遺伝子量は、浴室内検体

と同等かつ屋内検体より高かったことから、道路沿いのエアロゾルは浴室内のそれと同様のリスクがある可能性が考えられた。

アメーバ共培養については、既知の報告<sup>7)</sup>を基に *Legionella* 属菌の感染を促進するヘパリンを添加して検討したが、これまでの報告<sup>8,9)</sup>と同様に、直接培養法と比べ検出率が低かった。この原因は不明であるが、一部の検体では、夾雑菌の発育により斜光法による *Legionella* 属菌様コロニーの観察が困難であったため、夾雑菌抑制のための検討が必要であると考えられた。

2007年から2016年にわが国におけるレジオネラ症患者から分離（臨床分離株）され、レファレンスセンターで解析されたレジオネラ属菌は 86.7%が Lp1 であった<sup>10)</sup>。従って、分子疫学的解析を実施し、感染源を特定するには、Lp1 を標的とした環境由来検体の検査が重要となる。しかしながら、感染源となるような、すなわち衛生管理の不十分な浴用水は Lp1 だけでなく、他の血清群の *L. pneumophila* をはじめ、夾雑菌も多く検出される場合が多い。培地上の *Legionella* 属菌を形状だけで Lp1 と特定できないため、時間と労力をかけ多くのコロニー調べることとなり、結果として Lp1 を見落とすことが懸念される。また、夾雑菌による Lp1 の発育阻害（マスキング）も見落としの要因となっている。本年度、実検体について Lp1-IMB により Lp1 を選択的に濃縮分離したところ、平板培養法では分離されなかった検体から Lp1 を分離することができた。また、他の血清群の *Legionella* 属菌を選択する確率が低く、Lp1 に特異的であることも明らかになった。しかし、検体によっては平板培養法で Lp1

を分離したにも関わらず、IMB 法で Lp1 を分離できなかった。これら平板培養法と IMB 法で結果が異なった検体では、Lp1 の菌数が 2~13 CFU/100 ml と検出限界に近いものであったことから、供試した検体に Lp1 が含まれる確率によることが考えられる。このことは、Lp1 の菌数が少ない検体で、PCR による Lp1 特異的遺伝子が不検出となっていることについても同様のことが推定される。IMB 法はこれまでも様々な菌種での検査法<sup>11)</sup>に採用されている事からも、その有用性が高いという結果は信頼できるものとする。逆に、感染源を特定する検査において、この Lp1 特異遺伝子を検出する PCR 法をスクリーニング法として利用するのはリスクが高いと思われる。Mérault らのプローブを用いて qPCR 法として感度を上げることができれば、スクリーニング法として使用できるかも知れない。一方で、本年は加熱処理や酸処理により、夾雑菌によるマスキング回避を検討したが、実際の検体からの分離でも添加回収実験においても、これらの処理は有用ではなかった。この理由は、ビーズにより既に夾雑菌が除去されていることが考えられる。加熱や酸による処理は、Lp1 にもストレスとなる可能性が考えられることから、Lp1-IMB 法ではこれらの処理を必ず実施する必要性はないように思われる。*Legionella* 属菌の受けるストレスについては、GVPC 培地に含まれる抗生剤も同様である。本研究で添加菌を測定するために使用した GVPC 培地での発育菌数は BCYE- $\alpha$  培地の 54~56% と低かった。添加回収実験においても、GVPC 培地での回収率は、基本となる菌数を BCYE- $\alpha$  とするか、GVPC 培地とするか

で異なった。この抑制力は、検体に含まれる夾雑菌の量によっては有用であり、考慮の上利用しなければならない。Lp1-IMB 法は Lp1 だけを捕集するのが目的であるが、実際には本年の結果のように他の血清群や菌種、夾雑菌も捕集された。処理法や抗生剤を使用しない Lp1-IMB 濃縮法となるような手技の確立が必要である。例えば、夾雑菌などが多い場合には検体を希釈し、夾雑菌を減らしてから IMB を使用する等の検討も必要である。Lp1-IMB 濃縮法は少ない菌数の Lp1 を検出するのが特徴のひとつであるから、濃縮検体の希釈、すなわち濃縮率での対応について、ATP と関連付けて確認することが必要と思われる。

#### 結語

感染源となり得る環境（エアロゾル）検体から *Legionella* 属菌の遺伝子を検出し、ヒトへの感染経路の一端を証明することができた。しかしながら、直接、菌を分離することはできなかったため、継続した調査が必要である。一方、IMB については、感染源調査に有用と思われるため、検出感度の向上を目指し、実用化に向けて具体的な使用手順などの検討が必要である。

#### 謝辞

本実態調査を実施するにあたり、富山県生活衛生課、各厚生センター、富山市保健所の担当者および採水にご協力いただいた浴用施設の皆様に深謝いたします。

#### E. 参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報。

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/239-idwr/data/6998-idwr-sokuh-o-data-j-1652.html> .

2) 森本 洋, 他 . *Legionella* 属菌検査法の安定化に向けた取り組み . 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 *Legionella* 属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 24 年度分担研究報告書 93-131 .

3) 古畑 勝則, 他 . 2002 . 土壌からの *Legionella* 属菌の分離状況 . 日本防菌防黴学会誌 . 30:555-561 .

4) 森本 洋 . 2010 . 分離集落の特徴を利用した *Legionella* 属菌分別法の有用性 . 日本環境感染誌 . 25:8-14 .

5) M rault N, Rusniok C, et al. 2011. Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. *Appl Environ Microbiol.* 77:1708-1717.

6) レジオネラレファレンスセンター会議報告 . 2015 年 . 衛生微生物技術協議会第 36 回研究会 .

[http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H28\\_Legionnaires\\_2.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H28_Legionnaires_2.pdf) .6)

7) 八木田 健司, 他 . レジオネラ感染とアメーバ レジオネラ属菌感染促進物質の探索 . 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 ) 「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28 年度分担研究報告書 79-84.

8) Edagawa A, et al. 2015. Investigation of *Legionella* Contamination in Bath Water Samples by Culture, Amoebic Co-Culture, and Real-Time Quantitative PCR Methods. *Int J Environ Res Public Health.* 12:13118-13130.

9) 磯部 順子, 他 . レジオネラ属菌迅速検査法の評価 . 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 ) 「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28 年度分担研究報告書 39-50 .

10) レジオネラレファレンスセンター会議報告 . 2017 . 衛生微生物技術協議会第 38 回研究会 .

[http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H29\\_Legionnaires.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H29_Legionnaires.pdf) .

11) 工藤由起子, 他 . 2015 . 腸管出血性大腸菌 O26 , O103 , O111 , O121 , O145 および O157 の食品からの検出における選択増菌培地および酵素基質培地の検討 . 日本食品微生物学会誌 . 32:60-66 .

F . 研究発表  
報告

磯部順子, 金谷潤一, 他 . 2017 . 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 ( 2016 年 ) . 富山県衛生研究所年報 . 40:61-66 .

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表 1 . 浴用施設における *Legionella* 属菌検出結果

a . 陽性数および菌数

	施設数	検体数	陽性数	検出率 (%)	菌数			
					10 未満	10 - 99	100 - 999	>1000
浴槽水	14	39	8	20.5%	31	4	3	1
シャワー水	14	32	8	25.0%	24	3	4	1
カラン水	14	15	4	26.7%	11	4	0	0

b . 血清型別

	血清型別					
	Lp1	Lp3	Lp5	Lp6	Lp UT	ミクダディ
浴槽水	6		1		1	1
シャワー水		2	1	1	5	
カラン水			2		3	

表 2 . 浴用施設における平板培養法およびアメーバ共培養法

a . 陽性数

	検体数	陽性数	検出率 (%)
平板培養法	86	20	23.3%
アメーバ共培養法	86	14	16.3%

b . 血清型別

	血清群						
	Lp1	Lp3	Lp5	Lp6	Lp UT	ミクダディ	<i>L.cherrii</i>
平板培養法	6	2	4	1	9	1	
アメーバ共培養法	1	3	3	2	4	1	1

c . 両法の相関

		アメーバ共培養法		
		陽性	陰性	計
平板培養法	陽性	12	8	20
	陰性	2	64	66
	計	14	72	86

表 3 . 市中河川水における *Legionella* 属菌検出結果

	陽性数 / 検体数		血清群
	平板培養	アメーバ共培養	
3 月	0/5 検体	0/5 検体	
9 月	0/5 検体	3/5 検体	Lp 3, Lp 6, Lp 7, Lp UT
10 月	0/5 検体	0/5 検体	
11 月	0/5 検体	3/5 検体	Lp 4, Lp UT

表 4 . エアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果 1

採取場所	検体数	陽性数			16S rRNAコピー数の平均 (copies/m3)	備考
		平板培養	アメーバ共培養	qPCR (%)		
道路沿い	151	0	0	114 (75.5)	81.0	99検体はH28のデータ
浴室内	21	0	0	15 (71.4)	72.0	16検体はH28のデータ
屋内	20	0	0	9 (45.0)	19.5	

吸引量 3000 L (300 L/min, 10 min)  
15 ml 0.005% Tween 80

表 5 . エアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果 2

	検体数	陽性数 (%)	16S rRNAコピー数の平均 (copies/m3)
平板培養	30	0	
アメーバ共培養	30	0	
qPCR	30	26 (86.7)	31.9
EMA qPCR	30	20 (66.7)	20.0

吸引量 9000 L (300 L/min, 30 min)  
15 ml 滅菌水

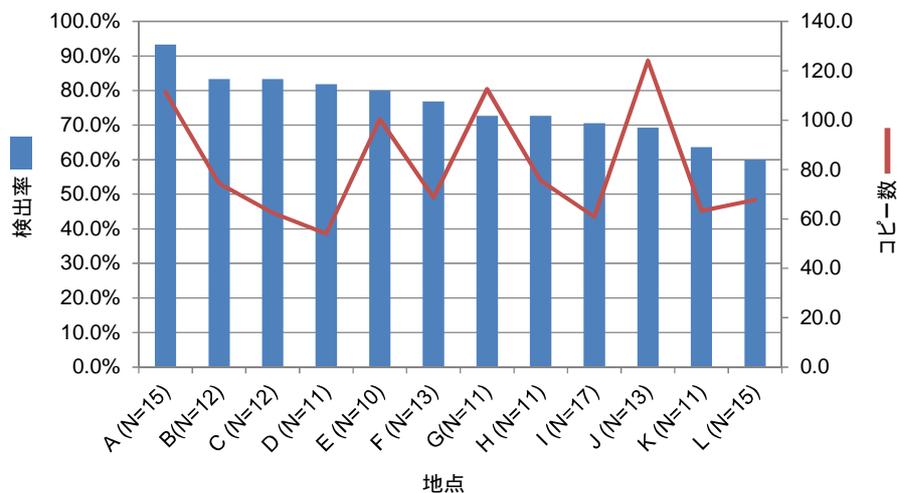


図 1 . 地点別のエアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果

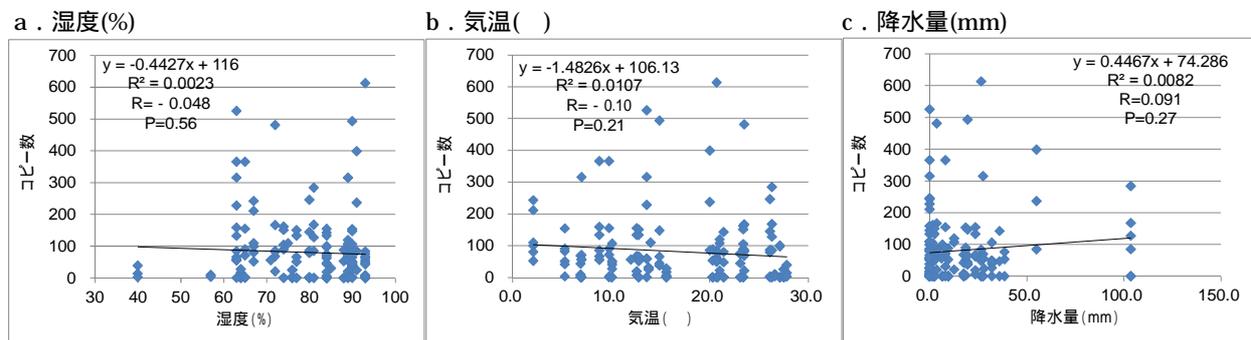


図 2 . エアロゾル中の *Legionella* 属菌遺伝子量と気候との相関

表 6 . 16S メタゲノム解析結果

a . 取得リード数

検体	検体数	No. of reads per sample	
		Median	(Range)
道路沿い	23	121,351	(66,803 975,202)
浴室	9	115,879	(68,986 1,110,988)

b . Genus

Road (N = 23)			Bath (N = 9)		
	N	%		N	%
<i>Sphingomonas</i>	23	15.67	<i>Sphingomonas</i>	9	22.51
<i>Streptococcus</i>	23	14.39	<i>Mycobacterium</i>	9	7.54
<i>Roseomonas</i>	23	2.81	<i>Pseudomonas</i>	9	5.28
<i>Methylobacterium</i>	23	2.48	<i>Methylocaldum</i>	9	5.27
<i>Bacillus</i>	23	1.99	<i>Acinetobacter</i>	9	1.87
<i>Calothrix</i>	23	1.85	<i>Pelomonas</i>	9	1.57
<i>Arthrobacter</i>	23	1.63	<i>Arthrobacter</i>	9	1.56
<i>Achromobacter</i>	23	1.62	<i>Vibrio</i>	9	1.53
<i>Pseudomonas</i>	23	1.6	<i>Methylobacterium</i>	9	1.52
<i>Vibrio</i>	23	1.17	<i>Ochrobactrum</i>	9	1.51
<i>Legionella</i>	22	0.23	<i>Legionella</i>	9	0.1
Others		38	Others		35.15
Unclassified		11.78	Unclassified		9.1
Total		100	Total		100

c . Species

Road (N = 23)			Bath (N = 9)		
	N	%		N	%
<i>L. shakespearei</i>	15	0.1158	<i>L. shakespearei</i>	5	0.0025
<i>L. cherrii</i>	14	0.0492	<i>L. taurinensis</i>	5	0.0013
<i>L. taurinensis</i>	12	0.0707	<i>L. cherrii</i>	5	0.0006
<i>L. sainthelensi</i>	11	0.0379	<i>L. rowbothamii</i>	4	0.0108
<i>L. waltersii</i>	10	0.0126	<i>L. sainthelensi</i>	4	0.0013
<i>L. rowbothamii</i>	9	0.0054	<i>L. waltersii</i>	3	0.0024
<i>L. worsleiensis</i>	8	0.0042	<i>L. tucsonensis</i>	3	0.0011
<i>L. fallonii</i>	6	0.0031	<i>L. pneumophila</i>	2	0.0337
<i>L. pneumophila</i>	4	0.0033	<i>L. fallonii</i>	2	0.0154
<i>L. moravica</i>	2	0.0013	<i>L. worsleiensis</i>	2	0.0013
<i>L. tucsonensis</i>	2	0.0003	<i>L. moravica</i>	1	0.0002
<i>L. cincinnatiensis</i>	2	0.0003	<i>L. anisa</i>	1	0.0001
<i>L. longbeachae</i>	2	0.0002	<i>L. cincinnatiensis</i>	1	0.0001
<i>L. steigerwaltii</i>	1	0.0002			
<i>L. anisa</i>	1	0.0001			

表 7 . Lp1-IMB による濃縮法による *Legionella* 属菌の分離結果

	IMB濃縮培養 検討数	<i>Legionella</i> 属菌 陽性検体数	IMBによる Lp1分離検体数
浴用水	35	7*	5
シャワー	12	0	
カラん水	6	0	

\* : 1 検体から *L. micdadeii* , 1 検体から Lp5 分離された

表 8 . Lp1 が分離された検体の Lp1-IMB 法と平板培養法の *Legionella* 属菌の分離結果

	Lp1-IMB濃縮培養法		平板培養法		アメーバ 培養法	Lp1特異遺伝子 (PCR)
	(血清型/種別 菌数 CFU/100ml)	Legionella属菌が分離された 処理法	培地	(血清型/種別 菌数 CFU/100ml)		
1陽性(Lp1;2, UT;2)	未処理 加熱	GVPC, BCYE	陽性(Lp1; 890)	未 加熱 酸	陰性	陽性
2陽性(Lp1 ; 3, UT ; 1)	未処理	GVPC	陽性(Lp1; 100)	未 加熱 酸	陽性 (Lp1)	陽性
3陽性 ( <i>L. micdadeii</i> ; 2570)	未処理 加熱 酸	GVPC BCYE,GVPC BCYE,GVPC BCYE,GVPC	陽性(Lp1; 10) ( <i>L. micdadeii</i> ; 7510)	未 加熱 酸 非濃縮	陽性 ( <i>L. micdadeii</i> )	陰性
4陽性(Lp1;13)	未処理	BCYE	陰性		陰性	陰性
5陽性(Lp1;11)	未処理 加熱 酸	BCYE,GVPC BCYE,GVPC GVPC	陽性(Lp1; 820)	未 加熱 酸	陰性	陽性
6陽性(Lp5;3)	加熱 酸	BCYE BCYE	陽性(Lp5; 10)	加熱	陰性	陰性
7陽性(Lp1;2)	酸	GVPC	陰性		陰性	陰性
8陰性			陽性(Lp1; 10)	未	陰性	陽性
9陰性			陽性(Lp1; 10)	未 加熱	陰性	陰性
10陰性			陽性(Lp2-4; 10)	加熱	陰性	陰性

表 9. 添加菌 (菌懸濁液) の菌数

実験	1		3		4		5		6									
	A	C	A	B	A	A	B	A	B									
使用菌株名*																		
GVPC	58	57	39	53	39	52	80	129	46	43	21	20	13	21	34	45	43	44
BCYE- $\alpha$	86	87	85	85	69	87	129	173	68	83	47	40	82	41	69	80	67	103

使用菌株名 : A ( LG626.Lp1 ) , B(LG643.Lp1) , C(LG494.Lp9)

表 10-a . Lp1 添加回収実験結果(BCYE- $\alpha$  による添加菌数測定)

実験	検体数	添加菌	添加菌数 (BCYE- $\alpha$ ) (CFU/100ml)	BCYE $\alpha$ による回収率(%)				GVPCによる回収率(%)			
				未処理	加熱処理	酸処理	平均	未処理	加熱処理	酸処理	平均
①	4	LG626	346	35.5	37.6	14.4	29.2	25.9	30.8	12.8	23.2
②	4	LG626	347	21.1	20.1	18.9	20.0	12.6	16.3	15.7	14.9
③	5	LG626	312	18.3	27.4	17.6	21.1	16.3	23.0	21.5	20.3
	4	LG643	604	23.6	25.0	23.9	24.1	19.6	22.6	20.6	20.9
④	10	LG626	75.5	35.2	29.9	34.2	33.1	27.0	24.9	24.2	25.4
⑤	3	LG626	21.8	10.7	13.8	13.8	12.8%	6.1	9.2	13.8	9.7
	2	LG643	25.4	43.4	37.5	75.0	51.9%	43.4	43.4	43.4	43.4
⑥	7	LG626	74.5	49.9	43.3	62.7	52.0%	33.9	35.2	35.0	34.7
	8	LG643	84.5	55.6	45.1	62.8	54.5%	41.0	36.2	44.5	40.6
		平均	210.1	32.6	31.1	35.9	33.2%	25.1	26.8	25.7	25.9

表 10-b . Lp1 添加回収実験結果(GVPC による添加菌数測定)

実験	検体数	添加菌数 (GVPC) (CFU/100ml)	GVPCによる回収率(%)		
			未処理	加熱処理	酸処理
①	2	230	39.0	46.3	19.2
③	5	182	28.3	32.7	29.8
	4	418	45.8	42.2	41.1
④	10	44.5	13.7	19.5	29.3
⑤	3	10.25	54.3	28.5	53.2
	2	9.55	72.6	74.2	77.8
⑥	7	39.5	64.0	78.1	77.0
	8	43.5	80.2	70.7	78.4
	41		42.3	40.6	41.7

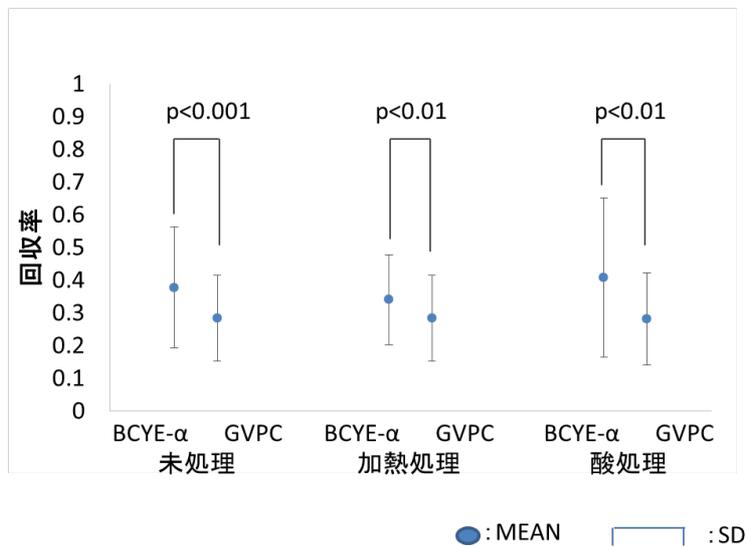


図 3-a . 添加回収実験における回収率の比較  
(BCYE-α 培地と GVPC 培地の比較)  
N=39 で実施した対応のある t 検定

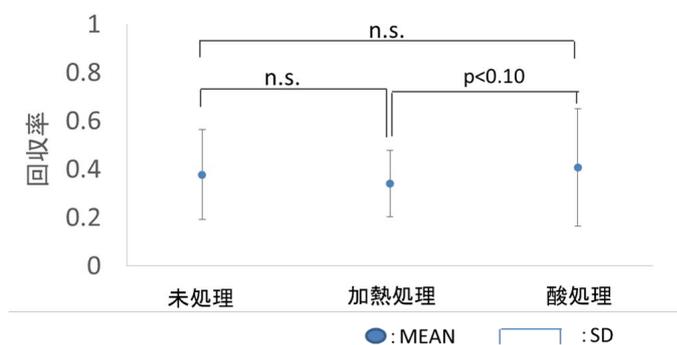


図 3-b . 添加回収実験における回収率の比較  
(BCYE-α 培地での処理法の比較) n=39

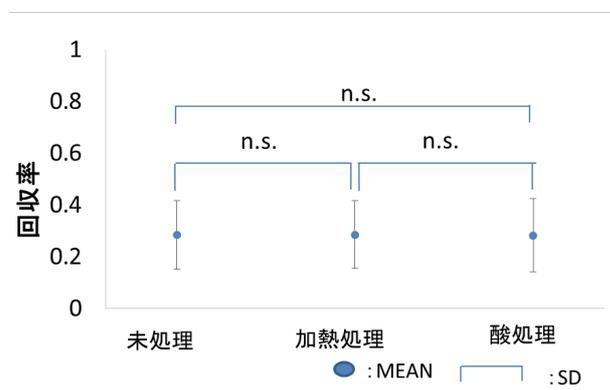


図 3-c . 添加回収実験における回収率の比較  
(GVPC 培地での処理法の比較) n=39

表 11 . LP1-IMB 法における洗浄方法別回収率

実験回	添加菌数 (BCYE- $\alpha$ で測定)	生食	回収率 (%)	Buffer (ACES)	回収率 (%)
1	880	340	38.6	300	34.1
2	860	230	26.1	358	41.6
3	880	270	30.7	281	31.9
4	780	356	45.6	159	20.4
5	1510	618	40.9	634	46.0
6	750	88	11.7	75	10.0
7	750	128	17.1	110	14.7
平均	915.7	290	30.1	273	28.4