

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

総合研究報告書
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 富山県で多く発生するレジオネラ感染症の感染源として、浴用水に加えて、それ以外の感染源を探求するため、環境中の *Legionella* 属菌の生息状況を調査した。3 年間で調査対象としたのは、浴用施設関連では浴用水 168 検体、シャワー水 89 検体、カラン水 30 検体、計 287 検体である。河川水は、富山市内の市街地を流れる市中河川から採水した 40 検体である。*Legionella* 属菌の通常の培養法による検出率は、浴槽水では 20.3%、シャワー水では 24.7%、カラン水では 30.0%で、陽性検体の約 6 割が 10~99 CFU/100 ml であった。河川水においては、アメーバ培養法により 30.0% (12/40 検体) から *Legionella* 属菌が検出された。道路沿いのエアロゾル調査では、調査した 12 地点のいずれからも *Legionella* 属菌は検出されなかった。しかしながら、遺伝子検査法では、12 地点すべてから気候に関係なく *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、エアロゾル中に広く *Legionella* 属菌が浮遊していることが示唆された。また、浴室内と同等の遺伝子量が得られたことから、感染経路となりうることを示すものと思われる。

L. pneumophila 血清群 1 を目的とする免疫磁気ビーズ (*Lp1*-IMB) 法について、接種菌の回収率は *Lp1* では 25.0~50.0%であったのに対し、*Lp6*、*Lp5* では 7.1%、9.6%、*L. bozemanii* や *L. cherii*、*L. anisa* については、0.0~0.01%と低かった。また、*Lp1* とそれ以外の *Legionella* 属菌懸濁液を混合した場合の *Lp1* の回収率は、等量混合した場合で、12/16 試験 (75.0%) で 40.0%以上を示し、他の菌の回収率より高かった。*Lp1*-IMB 法は、*Lp1* を目的とする感染源特定のための検査法として有用であると思われた。一方、*Lp1* を特異的に検出する遺伝子検査法 (プローブ法) は、*Lp1*-IMB 法、通常培養法いずれよりも感度が高かったことから、感染源を特定するための詳細な培養検査の前にスクリーニング法として使用することが効率的であると思われた。

これまでの環境調査から、富山県におけるレジオネラ症発生が多い理由を明らかにすることはできなかったが、新たな感染源の探求と共に、患者への感染様式の解明と、患者から分離される *Lp1* に注目した検査法の検討を継続することが重要であると思われる。また、この *Lp1* については、感染源調査の中で、選択的に分離する必要があるため、*Lp1*-IMB 法が遺伝子検査と共に使用することが有用であると思われることから、今後はこの方法について検討し、効率を上げる必要があるであろう。

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、2018年の全国での届出数が2,130件と多く、統計を取り始めた2000年から増加傾向が続いている¹⁾。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であるだけでなく、その罹患率(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。しかしながら、レジオネラ症の多くを占める散発事例での感染源は特定されることは極めて少ない。

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、富山県の浴用施設の浴槽水、シャワー水およびカラン水の*Legionella*属菌の棲息状況を調査した。また、これまでの調査で*Legionella*属菌が検出された環境検体について、ヒトへの感染様式を明らかにするため、検体採取近辺で空気中に浮遊する*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、浴用施設の浴槽水、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28~30年度に34施設で採取された128,89および30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、平成28~29年度にかけて、3~11月に計40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²⁾に準じて行なった。

濃縮方法：浴用水、シャワー水、カラン水および河川水(各500~1,500 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)で吸引ろ過し、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 μl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 μl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 μl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 μ 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 μ 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水については、古畑らの報告を参考に、アメーバ共培養法を実施した³⁾。平成 28 年度は、濃縮液 1 ml に PYGC 培地で 30 1 週間培養したアメーバ増菌液を添加し、35 で 1 か月培養した。平成 29 年度は、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を添加し、35 で 1 か月培養した。河川水については、上記の培養法の残りの濃縮液にアメーバ増菌液を添加し、35 で 1 か月培養した。各培養液を酸処理液 (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 μ 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。

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⁴⁾した斜光法で特異的な形態を観察し、血液寒天培地と BCYE- α 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- α 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

2016 年 6 月～2018 年 2 月にかけて、主に雨天の日の道路沿い 151 検体、浴用施設の浴室内 21 検体 (17 施設) および屋内 30

検体 (2 施設および民家 2 軒) について、液体サイクロン式エアースンプラー (コロリス μ) を用いてエアロゾルを捕集した。なお、浴室内 16 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、Ethidium monoazide (EMA) 処理用の道路沿い 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、10 分毎に 15 ml にメスアップした。

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 μ l の 5% 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。qPCR 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 EMA 処理を実施した。DNA 抽出は、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) を用いた。

直接培養法

捕集液 100 μ 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、次世代シーケンシングを実施した。イリミナ社のプロトコルに従い16S rRNA遺伝子のV3-V4領域をTks Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ)を用いてPCR増幅した後、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。

BIOSAMP を用いたエアロゾル調査

2018年5~8月に道路沿いの6地点で、慣性衝突法によるエアサンプラー (BIOSAMP, ミドリ安全株式会社) を用いて、エアロゾルを計46サンプル捕集した。エアサンプラーにGVPC培地 (日水製薬) を設置し、100 l/min の条件で5および15分間 (各23検体) 捕集した。捕集後、GVPC培地を35℃で7日間培養し、レジオネラ属菌を探索した。

3. 免疫磁気ビーズによる *Lp1* の選択的濃縮法の検討

免疫磁気ビーズ作製方法

Lp1-IMB はデンカ生研で作製した。*Lp1* 以外の血清群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 (*Lp1*-IMB) とした。

使用菌株と菌懸濁液作製法

菌株は表1に示した。これらの菌を滅菌生理食塩水にてマックファーランド2.0に調整し、その 10^{-5} もしくは 10^{-6} まで10倍段階希釈し、検体とした。菌懸濁液100 μ l をBCYE- α 培地 (ピオメリュー) にコンラージ棒で拡げ、35℃で7日間培養し、菌数を測定した。

IMB による *Lp1* 濃縮法

浴槽水検体もしくは菌懸濁液1 ml に*Lp1*-IMB 1滴 (およそ25 μ l) を滴下し、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 μ l もしくは200 μ 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 μ l をBCYE- α 培地、GVPC培地のどちらか1枚もしくは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、 10^{-5} の菌懸濁液200 μ l, 100 μ l, 50 μ l を、それぞれ100倍濃縮液800 μ l, 900 μ l, 950 μ l に接種、ビーズ処理に供する検水量を1,000 μ 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)。

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、 10^{-6} 菌懸濁液100 μ l をBCYE- α 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-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128検体、シャワー水60検体、カラン水30検体、計218検体であ

る。

Lp1-IMB 濃縮法：検体（100 倍濃縮液）を，希釈しない濃縮検体 1 ml と，平成 30 年度分の 92 検体については，滅菌生理食塩水で 5 倍希釈した希釈検体 1 ml についても検査を行った。これらの検体に *Lp1*-IMB 25 μ 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 200 μ l あるいは 100 μ 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 μ l を GVPC 培地にコンラージ棒で拡げるだけとし，表面に接種した検体が確認できなくなってから 35 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

平成 29 年度に採取された浴用水 39 検体，シャワー水 32 検体およびカラン水 15 検体については，培養前に熱または酸にて処理し，未処理検体と併せて BCYE- α 培地，GVPC 培地の両方にコンラージ棒で拡げ，35 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

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 *Lp1* を検出する M \acute{e} rault らの報告⁵⁾ に従い，コンベンショナル PCR 法あるいは qPCR 法にて検出した。PCR は $\times 2$ GoTaq Hot Start DNA Polymerase（プロメガ）12.5 μ l にプライマー（2 μ g/ μ l）各 1.25 μ l，滅菌蒸留水 8 μ l を混合し，これに検体濃縮液から抽出した DNA 2 μ l を接種し，94 $^{\circ}$ C 1 分加熱後，94 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 30 秒の反応を 35 サイクル行い，72 $^{\circ}$ C 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。qPCR 法は，反応試薬として Premix Ex Taq（Probe qPCR）（タカラバイオ）を用いて実施した。

Lp1 特異的遺伝子の検出（sg1-qPCR 法）

DNA 抽出は，Loopamp レジオネラ検出試薬キット E（栄研化学）に添付の抽出試薬を用い，取扱説明書に従い実施した。sg1-qPCR は M \acute{e} rault らの報告⁵⁾ に従い，プライマーおよびプローブを作製し，反応試薬として Premix Ex Taq（Probe qPCR）（タカラバイオ）を用いて実施した。

ATP の測定

検水 100 倍濃縮液にルシパック Pen（キッコーマン）の専用綿棒を浸して約 100 μ 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。

4. 非濃縮検体を用いた培養法による *L. pneumophila* 最確数の検討

検水を付属の滅菌容器入れ，そこに Legiolert（アイデックスラボラトリーズ）培地を入れ，試薬が完全に溶解するまで混和した。検水 100 ml で検査する場合は，硬度試験紙にて硬度を測定し，度合いに応じてサプリメントを添加した。10 ml で検査する場合は，滅菌水 90 ml を付属の容器に入れ，そこに検水 10 ml を添加しよく混和し，10 倍希釈検体とした。それを定量用のトレイ（Quanti-Tray/Legiolert：QT-L）に入れ，専用のゴムシートに装着したのち，専用シーラーで密封した。それを湿潤箱に入れ，乾燥しないように水を含ませたペーパータオル等と共に密閉し，39 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

（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 2 に示した。*Legionella* 属菌が検出されたのは，浴槽水で 26/128 検体（20.3%），シャワー水で 22/89 検体（24.7%），カラン水で 9/30 検体（30.0%）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*，シャワー水では菌種不明の *Legionella* 属菌（UT），カラン水では *Lp5* であった。

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 3 に示した。*Legionella* 属菌の検出率は，平板培養法で 38/155 検体（24.5%），アメーバ共培養法で 24/155 検体（15.5%）と平板培養法で高かった。平板培養法で陽性となった 38 検体からは，*Lp1* と UT がそれぞれ 10 検体から分離され，最も多かった。アメーバ共培養法で陽性となった 24 検体からは，*Lp6* と UT がそれぞれ 7 検体から分離され，最も多かった。4 検体はアメーバ共培養法でのみ陽性となったが，18 検体は平板培養法でのみ陽性となった。

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 4 に示した。12 検体から *Legionella* 属菌が検出された（検出率 30.0%）。*Lp2* と *Lp6* がそれぞれ 2 検体から分離され，最も多かった。

2. バイオエアロゾルにおける *Legionella* 属菌検出状況

道路沿い 151 検体，浴室内 21 検体および屋内 30 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 5）。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 36.7%（11/30 検体）から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。16S rRNA 遺伝子の幾何平均コピー数（copies/m³）は，道路沿い検体で 62.7，浴室内検体で 66.0，屋内で 23.2 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（表 6）。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 遺伝子の幾何平均コピー数（copies/m³）は 16.2 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 遺伝子の幾何平均コピー数（copies/m³）は 9.4 であった。

2016～2017 年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 遺伝子の幾何平均コピー数（copies/m³）は 35.5～106.4 であった。

サンプリングの 7 日前の気候と遺伝子量との関連を調査した結果，降水量と 16S rRNA 遺伝子のコピー数との間に，正の相

関が認められた(図2)。サンプリング当日および3日前の気候についても同様に調査したが、遺伝子量との有意な相関は認められなかった(データ未掲載)。

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7-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7-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た。当該リードが検出された各検体に占める *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7-c)。

BIOSAMP を用いたエアロゾル調査では、46 検体について検査した結果、いずれの検体からもレジオネラ属菌は分離されなかった。

3. *Lp1*-IMB による実検体からの *Lp1* 濃縮分離法

結果を表8に示した。*Lp1*-IMB および通常培養法の両法で *Lp1* が分離されたのは8検体、いずれからも分離されなかったのは196検体であった。*Lp1* が直接培養法で分離され、*Lp1*-IMB 法で分離されなかった検体の *Lp1* の菌数は 10 CFU/100 ml と少なかった。*Lp1* を含む供試菌(表1)の *Lp1*-IMB による回収率結果を表9に示した。全体としてみると、*Lp1* の回収率が 25.0 ~ 50.0%であったのに対し、*Lp6*、*Lp5* では 7.1%、9.6%、*L. bozemanii* や *L. cherii*、

L. anisa については、0.0 ~ 0.01%と低かった。 10^{-5} より 10^{-6} 希釈液での回収率が高かった。*Lp1* とそれ以外の *Legionella* 属菌懸濁液を混合した場合の結果は図3,4に示した。等量混合した場合(図3)では、*Lp1* の回収率は 16 回中 11 回(68.8%)で 40.0%以上を示し、他の菌の回収率より高かった。一方、*Lp1* と他の *Legionella* 属菌懸濁液を 1:9 で混合した場合、6、9 回目を除く 1 ~ 11 回目(9/17, 52.9%)で *Lp1* の回収率は 40.0%以上であったが、14 回目を除き、12 ~ 17 回目の試験では回収率は 10%以下と低かった。回収率が低かった理由は不明であった。

次に、実検体における *Lp1* 添加回収試験の結果を表10に示した。添加した *Lp1* の回収率は、BCYE- α 培地、GVPC 培地にそれぞれに発育した *Legionella* 属菌数を、BCYE- α 培地で求めた推定接種菌数と比較した(表10-a)。処理法別による回収率を見ると、BCYE 培地では酸処理による回収率(35.9%)がわずかに高かった。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、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。これらの方法別、培地別の回収率の統計解析による比較には、BCYE- α 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検体で行った。

未処理の BCYE- α 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5-a)。加熱処理、酸処理の場合も同様に、BCYE- α 培地と比

較するとGVPCでは回収率が有意に低かった ($P < 0.01$)。一方、処理方法について比較すると、BCYE- α 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 5-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 5-c)。

Lp1 特異遺伝子の検出結果を表 11 に示した。遺伝子が検出されたのは平成 29 年度では 4 検体、平成 30 年度では 19 検体であった。これをそれぞれ、*Lp1*-IMB 法と通常培養法の 2 法と比較した (表 11-a, b)。

対象遺伝子を *wzm* としたコンベンショナル PCR 法では通常培養法との相関が良く、特異度感度ともに高かった。これに対し、*Lp1*-IMB 法は感度が低かった。また、平成 30 年度に実施した *sg1*-qPCR 法との比較では、*Lp1*-IMB 法も通常培養法も、遺伝子検査法に対し、特異度は高かったが、感度が低かった。

非濃縮検体を用いた培養法 (Legiolert) による *L. pneumophila* 最確数の検討については、*Lp* 陽性となったのは 100 ml 検体で 3/29 (10.3%) 検体、10 ml 検体で 8/63 (12.7%) 検体であった。100ml, 10ml 検体を用いた結果の特異度はそれぞれ 95.8%, 96.0%, 感度は 40.0%, 43% であった。感度は高くなかったが、特異度は高く、陰性をよく予想できる結果であった。(表 12-a, b)。

D. 考察

富山県におけるレジオネラ症の報告数は

2000 年以降、年間 20~30 名で推移していたが、2015 年、2018 年は 40 名を超える届出であった。本疾患については、患者のおよそ 4 割では浴用水との関連性が強く疑われたが、多くの事例で感染源が特定されないのが現状である。これまでの研究から、感染源が不明とされた患者喀痰から分離された *Lp1* の ST120 について、水たまりから同 ST の菌が分離されるなど、これまで報告されていない環境にも感染源の可能性があることを示してきた⁶⁾。これらの事実から、この 3 年間では新たな感染経路を探求するとともに、実際に患者への感染経路を明らかにするため、これまでと異なる手法、すなわち直接吸入するリスクの高いと思われるエアロゾルについてレジオネラ属菌の汚染状況を調査した。

浴用水関連の浴槽水、シャワー水、カラン水では、検出率はカラン水がわずかに高かったが、それらの菌数は少なく、菌数が多かったのは浴用水であった。また、ヒトからもっとも多く分離される *Lp1* は、浴用水で多く検出され、感染源と疑われる背景を示した。アメーバ共培養法と平板培養法を比較すると、浴用施設関連の検体では、アメーバ共培養法の感度は低かったが、河川水の調査ではアメーバ共培養法での *Legionella* 属菌の検出率が高かった。アメーバ共培養について、浴用水の調査で検出率が低くなった理由は明らかではないが、アメーバ株の選定、共培養条件の変更などにより、改善する可能性もあると考えられる。

3 年間で新しく検討したエアロゾルにおける *Legionella* 属菌の汚染状況については、培養により検出することはできなかった。

しかしながら、遺伝子検査法においては、エアロゾル中に広く *Legionella* 属菌が浮遊していることが示唆された。レジオネラ属菌の増殖にはある程度日数が必要なため、7 日前の降水量とレジオネラ属菌の遺伝子量との間に、正の相関が認められたと考えられた。雨天によって土壌などに含まれるレジオネラ属菌が道路沿いに流れ出し、アメーバなどに寄生して増殖しているのかもしれない。海外では、降水量とレジオネラ症の発生率に、正の相関があることが報告されている⁷⁾。また、道路沿いから浴室内と同等のコピー数が得られたことも、感染経路となりうることを示すものと思われる。

レジオネラ患者を減少させるためには、まずは、およそ 4 割の感染源と推定されている浴用水の衛生管理を徹底的に行うことが、最も確実な方法であると思われる。レジオネラ症が発生したときに、行動調査に基づき、感染源と疑われる環境検体から *Legionella* 属菌を検出することは重要である。免疫磁気ビーズを用いて、目的とする菌を選択的に濃縮する方法について検討した結果、本法を使用することは有用であることが明らかとなった。とりわけ、濃縮検体を希釈する、すなわち、濃縮率を変更することでより検出率が高くなる傾向が認められた。これらの事実から、感染源を特定することが求められる行政検査などでは、検体の濃縮率などを変えながら、免疫磁気ビーズを使用することは有用であると思われる。加えて、*Lp1* に特異的な配列を検出する遺伝子検査法が有用であったことから、患者の起因菌が *Lp1* の場合には、PCR 法（プローブ法）によりスクリーニングすることで、陽性検体について丁寧な培養を行

うことも可能であると思われる。

結語

これまでの環境調査から、富山県におけるレジオネラ症発生が多い理由を明らかにするためには、新たな感染源の探求と共に、患者から分離されている *Lp1* に注目した調査が必要であると思われる。

また、この *Lp1* については、感染源調査の中で、選択的に分離する必要があり、遺伝子検査と共に使用することが有用であると思われることから、今後はこの方法について検討し、効率を上げる事が必要であろう。

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-sokuhou-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) Mérault N, 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) Kanatani J, et al. 2013. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 3959–66.
- 7) Hicks LA, et al. 2007. Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis. *Epidemiol. Infect.* 135:811–817.

F . 研究発表 報告

- 1) 磯部順子 , 金谷潤一 , 他 : 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2015 年) 富山県衛生研究所年報 .39,61-67 , 2016.
- 2) 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 .
- 2) 磯部順子 , 金谷純一 , 他 . 2018 . 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2017 年) . 富山県衛生研究所年報 . 41:32-37 .
- 論文発表
- 1) Kanatani J, et al. 2017. Prevalence of

Legionella Species Isolated from Shower Water in Public Bath Facilities in Toyama Prefecture, Japan. *J Infect Chemother.* 23:265-270. 2017.

学会発表

- 1) Junko Isobe, Jun-ichi Kanatani, Keiko Kimata, Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Masanori Watahiki. Distribution of *Legionella* spp. in windshield washer fluid of motor vehicles in Toyama, Japan. ESGLI 2017. London. September. 2017.
- 2) Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Shiho Norimoto, Keiko Kimata, Kaoru Uchida, Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, Masanori Watahiki. Detection and identification of *Legionella* species in aerosols from the area nearby asphalt roads and from bath water in public bath facilities in Toyama Prefecture, Japan. ESGLI 2017. London. September. 2017.
- 3) Junko Isobe, Jun-ichi Kanatani, Keiko Kimata, Kaoru Uchida, Masanori Watahiki, Fumiaki Kura, Kensuke Ozawa, Fumio Gondaira, Junko Amemura-Maekawa. Evaluation of an immunomagnetic separation method to detect *Legionella pneumophila* serogroup 1 from environmental specimens. ESGLI 2018. Lyon. August 2018.
- 4) 磯部順子 , 金谷潤一 , 木全恵子 , 内田 薫 , 綿引正則 , 倉 文明 , 小澤賢介 , 権平文夫 , 前川純子 . 浴用水から *Legionella pneumophila* 血清群 1 を検出するための免疫磁気ビーズによる濃縮分離法の検討 第

45 回日本防菌防黴学会 2018 年 11 月 東京 .

5) 金谷潤一，綿引正則，木全恵子，加藤智子，内田 薫，倉 文明，前川純子，磯部順子 . 大気エアロゾル中のレジオネラ属菌検出状況 第 45 回日本防菌防黴学会 2018 年 11 月 東京 .

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 . Lp1-IMB 法の検討に供試した *Legionella* 属菌

	<i>Legionella</i> spp. (serogroup)	<i>lagI</i> 遺伝子	SBT
1	<i>L. pneumophila</i> (1)	+	ST 505
2	<i>L. pneumophila</i> (1)	+	ST 644
3	<i>L. pneumophila</i> (1)	+	ST UT
4	<i>L. pneumophila</i> (1)	-	ST 644
5	<i>L. pneumophila</i> (1)	-	ST 1094
6	<i>L. pneumophila</i> (1)	-	ST UT
7	<i>L. pneumophila</i> (6)	NT	
8	<i>L. pneumophila</i> (5)	NT	
9	<i>L. bozemanii</i>	NT	
10	<i>L. cherii</i>	NT	
11	<i>L. anisa</i>	NT	

表 2 . 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	33	128	26	20.3%	102	16	7	3
シャワー水	34	89	22	24.7%	67	10	11	1
カラン水	21	30	9	30.0%	21	9	0	0

b . 血清型別

	血清型別										
	Lp1	Lp3	Lp4	Lp5	Lp6	Lp8	Lp9	Lp15	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. micdadei</i>	UT
浴槽水	12	2	1	1	6	2	4			1	1
シャワー水	2	2	1	6	5			4			7
カラン水	1	1	1	4	1				1		3

表 3 . 浴用施設における平板培養法およびアメーバ共培養法との比較

a . 陽性数

	検体数	陽性数	検出率 (%)
平板培養法	155	38	24.5%
アメーバ共培養法	155	24	15.5%

b . 血清型別

	血清群								
	Lp1	Lp3	Lp5	Lp6	Lp9	Lp15	<i>L. micdadei</i>	<i>L. cherii</i>	UT
平板培養法	10	4	8	8	1	4	1		10
アメーバ共培養法	2	3	4	7			1	1	7

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	20	18	38
	陰性	4	113	117
	計	24	131	155

表 4 . 市中河川水における *Legionella* 属菌検出結果

		陽性数／検体数		血清型
		平板培養	アメーバ共培養	
2016年	5月	Not tested	3/5検体	<i>Lp1</i> 、 <i>Lp6</i> 、 <i>Lp15</i>
	6月	Not tested	0/5検体	
	9月	Not tested	2/5検体	<i>Lp2</i> 、 <i>L. waltersii</i>
	10月	Not tested	1/5検体	<i>Lp2</i> 、 <i>L. longbeache</i>
2017年	3月	0/5検体	0/5検体	
	9月	0/5検体	3/5検体	<i>Lp3</i> 、 <i>Lp6</i> 、 <i>Lp7</i> 、UT
	10月	0/5検体	0/5検体	
	11月	0/5検体	3/5検体	<i>Lp4</i> 、UT

表 5 . エアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果（捕集液；0.005% Tween 80）

採取場所	検体数	陽性数			16S rRNAコピー数の幾何平均 (copies/m ³)
		平板培養	アメーバ共培養	qPCR (%)	
道路沿い	151	0	0	114 (75.5)	62.7
浴室内	21	0	0	15 (71.4)	66.0
屋内	30	0	0	11 (36.7)	23.2

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

表 6 . エアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果（捕集液；滅菌水）

	検体数	陽性数 (%)	16S rRNAコピー数の幾何平均 (copies/m ³)
平板培養	30	0	
アメーバ共培養	30	0	
qPCR	30	26 (86.7)	16.2
EMA qPCR	30	20 (66.7)	9.4

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

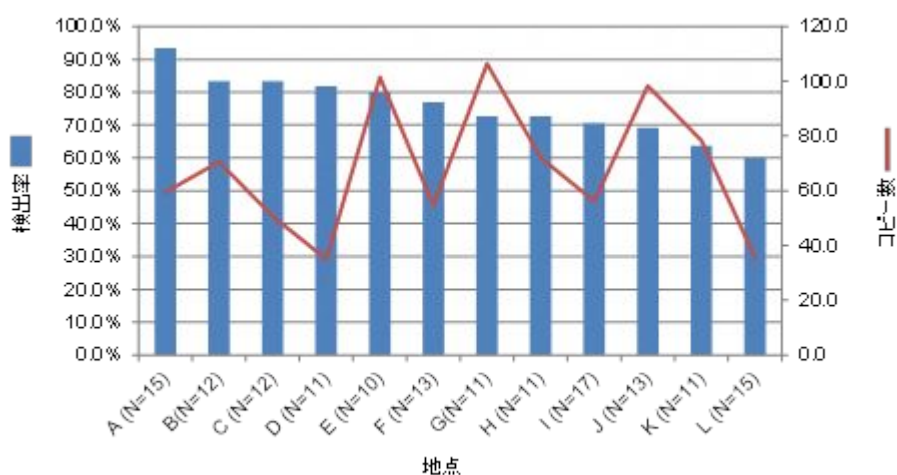


図 1 . 地点別のエアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果

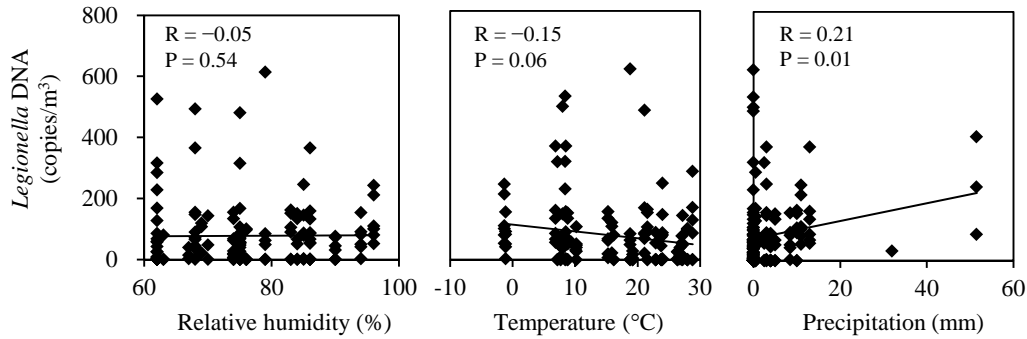


図 2 .サンプリングの 7 日前の気候とエアロゾル中における *Legionella* 属菌の遺伝子量

表 7 . 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 8 . IMB による *Legionella* 属菌 (単一血清群) の回収率

		Lp1-IMB法	
		+	
通常培養法	+	8	8
		6	196

表 9 . IMB による *Legionella* 属菌 (単一血清群) の回収率

	全体			-5希釈液			-6希釈液		
	測定回数	回収率平均	実測値平均	測定回数	回収率平均	実測値平均	測定回数	回収率平均	実測値平均
<i>L. p.</i> SG1 ST505 (+)	5	37.6%	506	2	38.2%	1032	3	37.2%	155
<i>L. p.</i> SG1 ST644 (+)	4	30.4%	304	2	15.3%	401	2	45.6%	21
<i>L. p.</i> SG1 ST:UT(+)	3	49.8%	248	1	34.7%	327	2	57.4%	208
<i>L. p.</i> SG1 ST644 (-)	2	50.2%	863	1	46.3%	1158	1	54.1%	569
<i>L. p.</i> SG1 ST1094 (-)	3	46.0%	593	1	34.6%	1348	2	51.7%	216
<i>L. p.</i> SG1 ST:UT(-)	3	25.0%	110	1	6.8%	125	2	34.1%	103
<i>L. p.</i> SG6	6	7.1%	58	1	3.8%	194	5	10.1%	31
<i>L. p.</i> SG5	3	9.6%	61				3	9.6%	61
<i>L. bozemanii</i>	1	0.0%	9						
<i>L. cherii</i>	1	0.0%	0						
<i>L. anisa</i>	4	0.1%	26	3	1.3%	35	1	0.0%	0

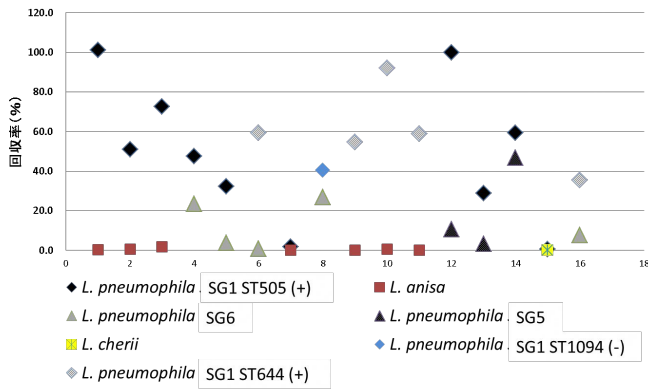


図 3 . 混合する菌を等量とした場合の回収率の比較

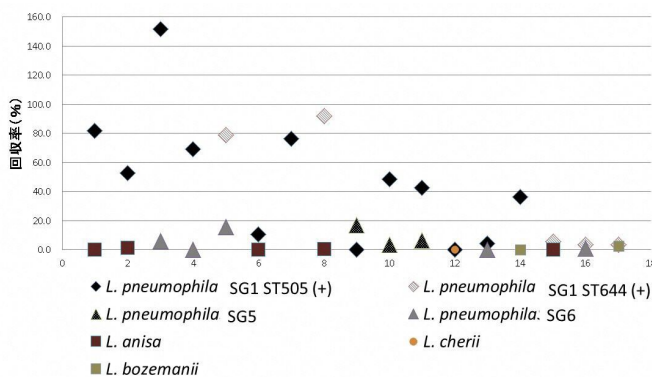


図 4 . Lp1 菌の混合比を 1/10 にした場合の回収率の比較

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

実験 検体数	添加菌	添加菌数 (BCYE-α) (CFU/100ml)	BCYE α 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

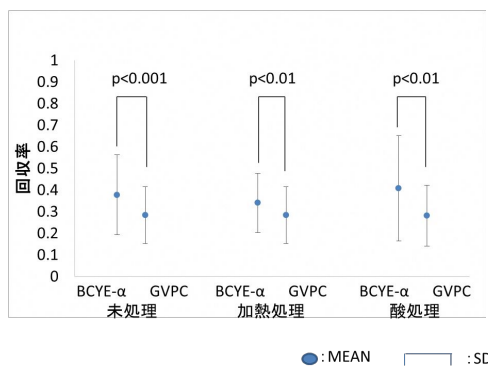


図 5-a . 添加回収実験における回収率の比較
(BCYE-α 培地と GVPC 培地の比較)
N=39 で実施した対応のある t 検定

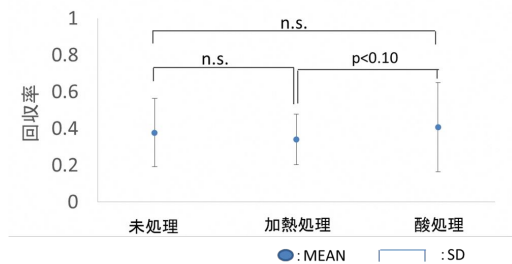


図 5b . 添加回収実験における回収率の比較
(BCYE-α 培地での処理法の比較)
N=39

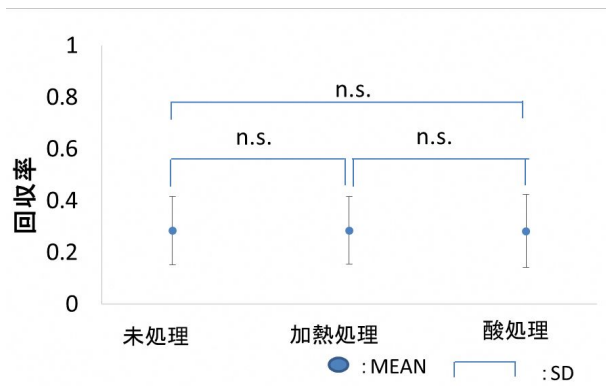


図 5-c . 添加回収実験における回収率の比較
(GVPC 培地での処理法の比較)
N=39

表 11 . *Lp1* 特異遺伝子と *Lp1*-IMB 法・通常培養法における *Lp1* の検出結果の比較

a.平成 29 年度実施

	qPCR (<i>wzm</i>)		計
	+	-	
<i>Lp1</i> -IMB	+	2	2
	-	47	49
	4	47	51
通常培養法	+	1	5
	-	79	79
	4	80	84

b.平成 30 年度実施 (プローブ法)

	sg1-qPCR		計
	+	-	
<i>Lp1</i> -IMB	+	4	5
	-	72	87
	19	73	92
通常培養法	+	1	5
	-	72	87
	19	73	92

表 12 . Legiolert と通常培養法における *Lp* の検出結果の比較

a . 検水 100ml の場合

	通常培養法		
	+	-	計
Legiolert (100ml)	+	1	3
	-	23	26
	5	24	29

b . 検水 10 ml の場合

	通常培養法		
	+	-	計
Legiolert (10ml)	+	2	8
	-	47	55
	14	49	63