

令和元年度～令和3年度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」
分担研究報告書

「入浴施設・医療機関のレジオネラ汚染実態調査
および
次世代シーケンサーを用いたレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討」

研究代表者	前川純子	国立感染症研究所
○ 研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学
研究分担者	泉山信司	国立感染症研究所
研究協力者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
研究協力者	陳内理生	神奈川県衛生研究所
研究協力者	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所
研究協力者	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所
研究協力者	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
研究協力者	島崎信夫	国際親善総合病院
研究協力者	中村麻子	国際親善総合病院

入浴施設はしばしばレジオネラ属菌により汚染され、集団事例の原因となることがある。また医療機関においてはレジオネラ属菌による汚染が明らかとなっており、重要な課題となっている。そこで、本研究では入浴施設および医療機関においてレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施してきた。

2015年からレジオネラ属菌の汚染実態調査を継続している神奈川県内の1入浴施設において、2015～2018年度には調査対象である8カ所中5カ所から最大3,000 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されていた。この間に、不要配管の切除や次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置などの対策を実施した結果、2019年度の調査では、10～200 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出された。さらに、2020年度の新型コロナウイルス感染症に伴う緊急事態宣言に基づく休業期間における衛生管理を経て、2021年度には1カ所から20 CFU/100 mLの *Legionella pneumophila* SG 6 が検出されるのみとなった。この入浴施設において、レジオネラ属菌は減少したと考えられるものの、完全な排除には至っておらず、配管の洗浄法の変更などさらなる対策が必要と考えられた。

医療機関における汚染実態調査では1医療機関を継続して調査しており、これまで塩素添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシングなどの対策を実施してきた。一部蛇口において、フラッシングを定期的に行う自動排水装置が導入されたもの

の、レジオネラ属菌が検出された。しかし、20 CFU/100 mL と少ない菌数であり、複数回の調査において断続的に検出されたことから、レジオネラ属菌の増殖は抑制されているものの、完全に排除されきれず深部配管のバイオフィームから供給されているものと考えられた。

次世代シーケンサーによる分子疫学的解析法の検討として、入浴施設において分離されたレジオネラ属菌の SNPs 解析および神奈川県において 2015 年に発生したレジオネラ属菌の集団事例の SNPs 解析を実施した。近年、次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されている。しかし、行政検査での利用はあまり進んでおらず、レジオネラ属菌の集団発生事例や入浴施設の管理への応用など、その利用法には検討の余地がある。そこで我々は、これまで 2015 年から調査を継続してきた神奈川県内の入浴施設で検出されたレジオネラ属菌を用いて、サンガー法による Sequence-Based Typing (SBT) 解析、および次世代シーケンサーによる Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施した。SBT 解析では同じ Sequence Type (ST) とされた複数の菌株において、SNPs 解析でも同一もしくは数 SNPs の違いであったことから同一のクローンを起源とする菌株が継続して検出されている可能性が示唆された。これらの菌株には、この施設において、一年以上にわたり検出されているものや、異なる浴室から検出されたものが含まれていた。このため、この入浴施設内にレジオネラ属菌の供給源があるものと推察された。集団事例の株を用いた SNPs 解析では、この集団事例は遺伝的関連のある 2 タイプの *L. pneumophila* SG1 と 1 タイプの *L. pneumophila* SG13 によって引き起こされた可能性が明らかとなった。さらに SNPs 解析では *L. pneumophila* ST2114 の 7 株をそれぞれが遺伝的に関連のある 2 種類のクラスターに区別することができた。ST2114 をより細かく型別でき、高い解析精度を示したことから、本事例において SNPs 解析を利用することは有用と考えられた。本事例を引き起こしたと推察されるこれら 3 タイプの *L. pneumophila* は、いずれも株間の SNPs の差は 21 SNPs 以内であった。このデータは集団事例の SNPs 解析を行政検査として実施する上で、遺伝的関連性を判断する SNPs の値として一つの目安になるものと考えられた。

A. 研究目的

1) 入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査

日本ではレジオネラ属菌の感染源の一つとして入浴施設が知られており、しばしば集団発生を引き起こす^{1, 2, 3)}。ヒト-ヒト感染はおこらないことから⁴⁾、感染源とな

る環境におけるレジオネラ属菌の制御が重要となる。本研究では、入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染予防対策のための基礎的情報を得ることを目的として、汚染実態調査を実施した。

調査対象とした入浴施設では、2015 年度から継続して、カランやシャワー等 8 ヶ所

の採取を実施してきた。2017 年度までに、毎日のフラッシングの導入、カランとシャワーの交換、配管の高濃度塩素消毒を実施した。高濃度塩素消毒を実施した直後の調査では、レジオネラ属菌の DNA は検出されたものの、全ての検体においてレジオネラ属菌の培養は不検出となった。しかし、その後の調査において、最大 3,000 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出された。このため、次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置した。しかし、その後の 2018 年度の 2 回の調査において、計 5 か所から 10~400 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出された。また、これらの対策に加えて、実施時期は不明ではあるものの、不要な配管の切除もおこなっていた。

この入浴施設では、2018 年度以降にも新たに対策を追加したことに加えて、2020 年度には 4 月~5 月にかけて、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言（以下、緊急事態宣言）により休業し、その期間に配管内の遊離残留塩素濃度を高く維持していた。これらの対策の評価を目的として、2019~2021 年度においても調査を継続した。

2) 医療機関におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査

医療機関でのレジオネラ属菌の汚染は、レジオネラ感染症の院内感染の原因となりうることから、病院内の環境管理の重要な課題となっている⁵⁾。このため、レジオネラ属菌汚染の対策の一環として、医療機関におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査を継続してきた。

調査対象である 1 医療機関ではこれまで

塩素添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシングなどの対策を実施してきた。この医療機関では、本研究の途中過程において、一部蛇口に設定時間ごとに自動でフラッシングを行う自動排水装置を導入しており、その評価も含めて汚染実態調査を行った。

3) 次世代シーケンサーによるレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

近年になって急速に次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されている。しかし、レジオネラ属菌において利用されている例は少なく、集団発生事例や入浴施設の管理への応用など、その利用方法は検討の余地がある。

そこで本研究では入浴施設でのレジオネラ属菌の動態解析および集団発生事例におけるレジオネラ属菌における全ゲノム解析の有用性の検討を目的として、上記の入浴施設の汚染実態調査において分離された株および神奈川県において 2015 年に発生したレジオネラ症集団事例^{2, 3)}において分離された菌株を用いて、サンガー法による Sequence-Based Typing (SBT) 解析および次世代シーケンサーによる Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施し、比較した。

B. 研究方法

1) 入浴施設および医療機関におけるレジオネラ属菌汚染実態調査

1-1) 調査対象および測定項目

(1) 入浴施設

神奈川県内の 1 入浴施設において、2019 年度は 9 月に 1 回、2020 年度は緊急事態宣

言による休業からの営業再開前日（5月）、再開後約1ヶ月後の7月、約3ヶ月後の9月、約5ヶ月後として10月、11月の計5回採取した。2021年度は10月に1回採取した。これらの調査において、2つの浴室のそれぞれの浴槽水、湯口水、カラン並びにシャワー水、地下タンクおよび高置タンクの温水の計14試料を採取した。ただし、2020年度の10月の採取については、上記の採取箇所のうち2つの浴室のカラン計4ヵ所において給水系のみを採取した。

シャワーやカランからの水は放水直後に採取するとともに一部のカランについては放水3分後にも採取した。

採取した試料を用いて、レジオネラ属菌の分離培養・遺伝子検査、温度測定、pH測定および遊離残留塩素濃度の測定を実施した。試料は採取当日に検査を開始した。

(2) 医療機関

医療機関の給水・給湯系を対象とした調査は、「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究（研究代表者：松井佳彦）」と共同で実施した。神奈川県内の1医療機関を対象とし、洗面台等の蛇口水は、放水直後及び3L流水後について、さらには給水系および給湯系を分けられる場合には分けて採取した。6ヵ所（地下控室1か所、倉庫内1ヵ所、病室洗面台4ヵ所）から、計12試料を、2019年9月、2020年10月、および2021年7月に採取した。さらに、採取した6ヵ所のうち自動排水装置を設置した病室洗面台4ヵ所について2021年8月および同9月にも採取した。

採取した試料を用いて、レジオネラ属菌の分離培養・遺伝子検査、従属栄養細菌数の

測定、温度測定、pH測定及び遊離残留塩素濃度の測定を実施した。試料は採取当日に検査を開始した。

1-2) 試料の採取、温度測定、pH測定および遊離残留塩素濃度の測定

水試料は25%チオ硫酸ナトリウム1.0mLを添加した500mLの滅菌容器に採取した。温度は、試料採取時にデジタル温度計を用いて測定した。pHおよび遊離残留塩素濃度測定用試料は50mL遠沈管に採取した。実験室搬入時に、pHはガラス電極法を用いて、遊離残留塩素濃度はDPD法による吸光度法として、ハンディ水質計“アクアブ”AQ-101型（柴田科学）を用いて測定した。

1-3) レジオネラ属菌の分離

試料500mLを、直径47mm、孔径0.2 μ mのポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、5mLの50倍希釈PBSで再浮遊した（以下、濃縮試料とする）。濃縮試料0.5mLについて、50 $^{\circ}$ C、20分の加熱処理を行った。別の0.5mLに同量のpH2.2緩衝液を加え、4分間酸処理した。未処理及び処理後の濃縮試料を50倍希釈PBSで10倍希釈し、原液と10倍及び100倍希釈液の各100 μ LをMWY寒天平板培地（Oxoid）及びGVPC寒天平板培地（日水製薬）に塗抹し、36 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。レジオネラ属菌を疑う集落をBCYE α 寒天平板培地（日研生物）に転培し、性状により鑑別を行った。

1-4) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法によるレジオネラ属菌遺伝子の検出

LAMP 法によるレジオネラ属菌遺伝子の検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) により行った。1-3) の濃縮試料 1.5 mL を用いて、キット添付の説明書に従って実施した。

1-5) レジオネラ属菌の同定

試料から分離されたレジオネラ属菌は、LEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene) 及び Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) のプライマーを用いた PCR^{6,7)} によりレジオネラ属菌と *L. pneumophila* であることを決定した。さらに、型別用血清 (デンカ生研) 及び自発蛍光の有無により種の鑑別を行った。

1-6) 従属栄養細菌数

試料を PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の 1 mL を R2A 寒天培地 (BD) に接種し、混釈培養法により 20 °C で 7 日間培養した。培養後、集落数を計数した。

2) 次世代シーケンサーによるレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

2-1) 使用菌株

(1) 入浴施設

本研究においてレジオネラ属菌汚染実態調査を実施している入浴施設において、2018 年 1 月から 2020 年 10 月までに検出された *Legionella pneumophila* (SG1: 8 株, SG6: 5 株, SG9: 5 株) について供試した (表 1(1))。

(2) 集団事例

2015 年に神奈川県 の 1 入浴施設で発生したレジオネラ症集団事例 (患者 7 名) において、4 名の患者 (1~4) および 2 つの浴槽水 (1,

2) から分離された *Legionella pneumophila* (SG1: 8 株, SG13: 3 株) を供試した (表 1(2))。

2-2) SBT 解析

菌株からの DNA 抽出はアルカリ熱抽出により実施した。抽出した DNA を用いて、<http://www.ewgli.org/> の方法に従い、7 つの遺伝子 (*flaA*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) を PCR により増幅し、サンガー法により、その塩基配列を決定した。決定した塩基配列をデータベースと比較し、各遺伝子のアレル番号と ST 型を決定した。

2-3) SNPs 解析

菌株からの DNA 抽出は QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出した DNA を用いて Collibri™ PCR-free ES DNA Library Prep Kit (Thermo Fisher Scientific) または QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) によりライブラリを調整し、iSeq100 System (illumina) により、リードデータを得た。

本研究における汚染実態調査の対象である入浴施設から分離された菌株のリードデータのマッピングに用いるリファレンス配列は、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia (アクセッション番号: AE017354) とした。集団発生事例の分離株のリードデータのマッピングに用いるリファレンス配列は、Genbank に complete genome が公開されている代表的な 6 株の *L. pneumophila* SG1、すなわち Alcoy、Corby、Lens、Paris、Philadelphia および 130b (各アクセッション番号: CP001828, CP000675, NC006369, NC006368, AE017354, FR687201) のうち、供試菌株と kmer に基づくゲノムの

類似性が最も高い株の配列とした。kmer は供試菌株のリードデータを KmerID (<https://github.com/phe-bioinformatics/kmerid>) により比較することにより得た。

マッピングは Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) を用い、SNPs の抽出は Genome Analysis Toolkit (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) を用いた。抽出した SNPs を CLC Genomics Workbench (QIAGEN) を用いてアライメントし、比較した。

C. 結果及び考察

1) 入浴施設におけるレジオネラ汚染実態調査

調査対象とした 1 入浴施設では、地下タンクに原湯を引き込み、汲み上げポンプにより高置タンクへと送ったのち、高置タンクからカラン、シャワー及び浴槽水など施設全体に原湯を供給する構造となっている。また、次亜塩素酸ナトリウム添加装置は地下タンクと高置タンクの間設置されている。

2019 年 9 月の調査ではレジオネラ属菌は浴室 A の 2 つのカラン並びに浴室 B のカランから検出された。浴室 A の 1 つのカランから *L. pneumophila* SG9 が 10 CFU/100 mL 検出された(表 2)。もう一方のカランでは、*L. pneumophila* SG1、6 及び *Legionella* sp. が 200 CFU/100 mL 検出された。pH は 8.0~8.4 であり、地下タンクの遊離残留塩素濃度は 0.01 mg/L であった。それ以外の遊離残留塩素濃度は、浴室 A の浴槽水で 3.45 mg/L、浴室 B の浴槽水で 3.35 mg/L と高いものの、その他は 0.15~0.37 mg/L と全体的に低く、レジオネラ属菌の増殖が充分抑えられてい

ないものと考えられた。また、温度は地下タンクおよび高置タンクでそれぞれ 56.9°C および 55.3°C と 55°C 以上を示しており、その他は、33.0~41.5°C であった。

2020 年度において聞き取りをした結果、緊急事態宣言に基づく休業期間中は、以下の 4 点の対策を実施していた。1) 3 日に一回程度、汲み上げポンプを稼働させたうえで、次亜塩素酸ナトリウム添加装置を稼働し、カランのフラッシングを 30 分程度実施した。2) 4~5 日に 1 回カラン、シャワー及び浴槽水の遊離残留塩素濃度を比色法 (DPD 法) により測定し、0.8~2.0 mg/mL に維持されていることを確認した。3) 加えて、浴槽水に別途次亜塩素酸ナトリウムを追加するとともに、地下タンクにも添加した。4) ろ過装置の逆洗浄を週 1~2 回実施した。

緊急事態宣言による休業からの再開前は、重点的に実施する衛生管理として以下の 7 点を行っていた。1) 営業日に比色法 (DPD 法) により遊離残留塩素濃度を測定し、カラン、シャワーおよび浴槽水で、0.8~2.0 mg/L を維持した。浴槽については、測定時に濃度不足の場合、次亜塩素酸ナトリウムを直接添加した。2) 営業終了時に浴槽の湯を抜き、清掃、その日のうちに湯を満たした。3) ろ過器の逆流洗浄を週 1~2 回実施した。4) 営業日の朝、営業開始前にカランとシャワーのフラッシングを実施した。5) 定休日前日の営業終了後は、次亜塩素酸ナトリウムを浴槽に追加(濃度測定無)し、ろ過器を浴槽の間に 30 分間循環したのち、停止した。6) 定休日には清掃業者による清掃を実施した。7) 年 1~2 回の高濃度塩素洗浄を実施した。

2020 年度の調査における 5 月の営業再開

前日には、1カ所から 80 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 及び *Legionella* sp.が、約1カ月後の7月には同じ採取箇所から 10 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 が検出されるのみとなった。しかし、営業再開後から約3か月後の9月の調査では3カ所から 10~20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6、9 及び *Legionella* sp.が検出され、約5か月後の11月の調査では2カ所から、それぞれ 60 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 及び 9 が検出された(表2)。本調査により採取したカラン、シャワー及び湯口からの採取試料は、pH 8.0~8.2 であった。遊離残留塩素濃度は、営業再開前日の調査では 1.3~1.9 mg/L で、7月は 0.1~0.9 mg/L、9月は 0.5~1.7 mg/L、11月は 0.4~0.7 mg/L であった。5月の営業再開前日の調査では地下タンクが 50.0°C、高置タンクが 45.4°Cで、その他は 29.2~42.2°Cであった。これは、地下タンクおよび高置タンクともに休業期間中の原湯の引き込み量の低下に伴い、温度が低下したものと考えられた。7月、9月、11月の調査では、地下タンクは 54.9°C以上、高置タンクは 55.3°C以上で、その他は 30.9~50.2°Cであった。

2020年度の調査結果を踏まえて、上記1)~7)の対策に加えて、以下の対策を追加した。8) 定休日中の遊離残留塩素濃度を高く維持することを目的として、定休日前日の営業終了後、地下タンクに次亜塩素酸ナトリウムを添加した。9) 配管内の温泉水の停滞を防止することを目的として、温泉水の汲み上げポンプを夜間も継続して、稼働させ、浴室の各系統につき一つの蛇口を開けた。8)、9)の対策を実施して以降、施設管理者の点検において、定休日明けであって

もカラン等の末端で遊離残留塩素濃度 1.0~2.0 mg/L を維持していた。

2021年度調査において分離試験では、浴室Aのカラン2から *L. pneumophila* SG 6 が 20 CFU/100 mL 検出されたのみであった(表2)。また、pH は 8.0~8.3 であった。遊離残留塩素濃度については、地下タンクで 0.01 mg/L、浴室A浴槽水で 0.1 mg/L、浴室Aの湯口で 0.4 mg/L であったのを除き、0.6~1.3 mg/L であった。水温は地下タンクが 57.3°C、高置タンクが 55.3°C、その他は 32.7~47.2°C であった。

年度を経るに従い、レジオネラ属菌が検出されたカランの数および菌数が減少したことから、この施設においてレジオネラ属菌が減少した可能性があると考えられた。これは、2020年の休業期間中の衛生管理により、大幅にレジオネラ属菌が減少し、その後、配管内の温泉水の停滞防止といった遊離残留塩素を保つために実施した対策が効果を示したことによるものと考えられた。

各浴室の浴槽水および高置タンクについては2015年の調査開始以来、レジオネラ属菌の分離培養、LAMPともに陰性であり、今回のいずれの調査でも同様であった。地下タンクについては2019年度までは分離培養及びLAMPのいずれでも陰性であった。しかし、2020年度の調査に引き続き、2021年度も分離培養は陰性であるもの、LAMPは陽性であった。これは、2020年度の休業期間中に地下タンクに侵入・定着したレジオネラ属菌が排除されていないものと考えられた。しかし、地下タンクと高置タンクの間塩素添加装置が設置されていること、2020年度の営業再開後の調査で、地下及び高置タンクの温度が 54.9°C以上となってお

り、2021年度の調査でも55.7℃以上と高温が保たれていること、および高置タンクからはレジオネラ属菌が検出されていないことから、地下タンクに定着したレジオネラ属菌が高置タンク以降の配管内で定着している可能性は低いものと考えられた。

この入浴施設ではレジオネラ属菌の完全な排除には至っておらず、衛生管理方法によっては、再び増加する可能性がある。今後は配管の個別洗浄や消毒方法の変更などさらなる対策を追加するとともに、汚染実態調査によるモニタリングを継続することが重要と考えられた。

2) 医療機関でのレジオネラ属菌の汚染実態調査

調査対象の1医療機関における2019年の調査時には、病室の2カ所から採取した4試料から、*L. pneumophila* SG1が検出され、菌数は10~20 CFU/100mLであった(表3)。*L. pneumophila* SG1が検出された試料の遊離残留塩素濃度は0.8~1.2 mg/Lであった。一方で、従属栄養細菌数の高かった、倉庫給水系初流水および3L流水後ならびにA病棟病室2初流水は、遊離残留塩素濃度が検出限界付近であり、ほとんど塩素が消失していたが、レジオネラ属菌は分離されなかった。

2020年の調査では、1カ所から採取した2試料から*L. pneumophila* SG1が検出された。2021年7月の試験では、調査した12試料全てにおいてLAMPおよび分離培養のいずれにおいてもレジオネラ属菌は陰性であった。このうち、倉庫については、2019年11月に、残り3カ所については2021年3月に自動排水装置が設置されていた。1ヶ月後

の8月の試験では、自動排水装置が設置された4カ所中、1病室1試料から20 CFU/100 mLの*L. pneumophila* SG1 (LAMP陰性)が検出された。この結果を受けて、自動排水装置をそれまでは3時間に1分間稼働し、フラッシングしていたのを1時間に1分間稼働するように変更した。この変更後12日目に3回目となる9月の試験を実施した。その結果、2病室2試料から20 CFU/100 mLの*L. pneumophila* SG1(ともにLAMP陽性)が検出された。

従属栄養細菌は7月の試験では6カ所12試料すべてで、 $1.0\sim 6.8\times 10^3$ CFU/mLの発育を認めた。8月、9月の試験においても調査した4カ所8試料すべてにおいて、 $2.0\sim 8.9\times 10$ CFU/mLの発育を認めた。遊離残留塩素濃度は今年度の調査に使用したすべての試料で、0.67 mg/L以上を示し、pHは7.3~7.8、水温は20.6~24.8℃であった。

従属栄養細菌は控室の試料において、最大を示し、 6.8×10^3 CFU/mLまで発育しているものの、この場所からはレジオネラ属菌は検出されなかった。倉庫においては、自動排水装置設置前の2019年度の調査では、 1.8×10^4 および 1.5×10^3 CFU/mLであったのが、設置後は $2.0\sim 6.9\times 10$ CFU/mLと減少した。しかし、その他の自動排水装置を設置した場所では、設置前から従属栄養細菌数が $0\sim 6.7\times 10$ CFU/mLと低く抑えられており、変化は認められなかった。

2021年度の調査でも遊離残留塩素濃度が0.67 mg/L以上と高く維持されており、毎日実施していたフラッシングの効果と考えられた。加えて、レジオネラ属菌は、自動排水装置設置後、一度不検出となり、その後、20 CFU/100 mLと少ない菌数が断続的に異な

る蛇口から検出されていることから、蛇口付近で定着しているのではなく、配管の深部に存在するレジオネラ属菌のバイオフィルムの一部が剥がれ落ちるなどしたものが検出されたと考えられた。

3) 次世代シーケンサーによるレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

3-1) 入浴施設における次世代シーケンサーを用いたレジオネラ属菌の動態解析

本研究において、レジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した入浴施設から分離された菌株の SBT 解析において、SG 1 は KL2064 のみが Sequence Type (ST) 1 であり、その他はすべて ST552 であった。SG6 は 5 株すべてが ST191 であった。SG9 はすべて ST2693 であった。(表 4)。

SNPs 解析は *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia をリファレンス配列として、血清型ごとに実施した。SG1 では 11,489 の SNPs が得られた。全 8 株中、KL2064 を除く 7 株の SNPs は全て一致した。KL2064 の SNPs は、7,176 の SNPs が他の株と異なっていた(表 5 (1))。SG6 では 36,119 の SNPs を得られた。SG6 であった株は SBT 解析ではすべて同じ ST であったものの、SNPs 解析では 1~4 つの SNPs が異なる 3 つの遺伝子型に分けられた(表 5 (2))。SG9 では 87,741 の SNPs を得た。SG9 であった株は SBT 解析ではすべて同じ ST であったものの、SNPs 解析では 1~2 つの SNPs が異なる 3 つの遺伝子型に分けられた(表 5 (3))。

SBT 解析において同じ S であった菌株は、SG1 では SNPs 解析でも全て一致しており、SG6 および SG9 では数塩基異なるのみであ

った(表 5 (1)、(2)、(3))。SNPs 解析は SBT 解析よりも分解能が高いとされていることに加え⁸⁾、Raphael らはニューヨーク州におけるアウトブレイクを起こした SG 1 の解析において、特定のアウトブレイクに関連した分離株は、コア SNPs の違いが 5 つ以下であったことを報告している⁹⁾。これらのことから、本研究において SBT 解析により ST が一致した菌株については同じクローンを起源としている可能性が高いと考えられた。2018 年 1 月に検出された SG1 である KL1997 と同じ遺伝子型であった菌株は、2018 年 10 月および 2019 年 9 月においても検出された(表 1、5 (1))。加えて、この遺伝子型の SG1 は、浴室 A のカランから KL1997 を含む 6 株が、浴室 B から KL2104 が検出されていることから(表 1、5 (1))、この遺伝子型の SG1 は配管の末端で維持されているものではなく、これら浴室の共通部分に供給源があると考えられた。2020 年 5 月以降、SG1 は検出されていないため(表 2)、この遺伝子型の排除に成功した可能性があるが、引き続き注視する必要があると考えられた。

2020 年度に実施した 5 回の汚染実態調査のうち、4 回目までに検出された SG6 及び 9 のすべてを次世代シーケンス解析に供試した。その結果、2020 年度に検出された菌株は 2019 年度以前から検出されていた菌株と同じ遺伝子型もしくは近縁株であり、休業期間中に新たに SG6 および 9 が侵入した可能性は低いと考えられた。このことからこの入浴施設内のどこかにこれらレジオネラ属菌の供給源があり、排除できていないものと考えられた。

本研究においては SBT よりも高い分解能

を持つとされる SNPs 解析により、同一のクローン由来と考えられるレジオネラ属菌が継続してこの入浴施設から検出されていることが明らかとなった。今回解析した菌株はこれまでこの入浴施設から検出された菌株のごく一部であり、今後さらに供試菌株を増やすことで、これまでに実施したレジオネラ属菌の対策の前後でどのように菌叢が変化するかを解析することが可能と考えられた。

3-2) レジオネラ属菌の集団事例における全ゲノム解析の検討

SBT 解析の結果、*L. pneumophila* SG 1 は 7 株が ST2114、1 株が ST2121 だった(表 6)。ST2114 と ST2121 は *neuA* 遺伝子の Allele のみが異なり、その塩基配列の差は 1 塩基のみだった。*L. pneumophila* SG13 は 3 株すべてが ST2113 だった。これらの結果は Kuroki らの解析結果と一致していた^{2, 3)}。

SNPs 解析において、供試した 11 株と kmer に基づくゲノムの類似性が最も高かった株はすべて Corby 株(kmer similarity 89.9%~91.2%)であり、これをレファレンス配列としてマッピングした。

SNPs 解析により、*L. pneumophila* SG1 の 8 株はクラスター A (KLH24, KLH31, KLH33, KL1528) とクラスター B (KLH22, KLH32, KL1523, KL1524) に分けられた(表 7(1))。クラスター A における株間の SNPs の差は 8~21 SNPs であり、ST2114 の 4 株で構成された。クラスター B における株間の SNPs の差は 3~6 SNPs であり、ST2114 の 3 株および ST2121 の 1 株で構成された。クラスター A および B の株間の SNPs の差は最大で 744 SNPs だった。*L. pneumophila* SG13 の 3 株に

ついては、株間の SNPs の差は 16~21 SNPs だった(表 7(2))。

Reuter ら¹⁰⁾ は、レジオネラ症集団事例の分離株の SNPs 解析において、5 株(患者由来 2 株および環境由来 3 株)が遺伝的に関連のあるクラスターを形成し、その SNPs の差は 15 SNPs 以内だったと報告している。また、Graham ら¹¹⁾ は、レジオネラ症患者由来 3 株と感染源と疑う病院の給湯由来 1 株の SNPs 解析において、遺伝的関連のあるクラスターを形成し、最大 20 SNPs の差を認めたと報告している。本研究においても、*L. pneumophila* SG1 のクラスター A は株間の差が 8~21 SNPs、クラスター B は株間の差が 3~6 SNPs であり、前述の報告の SNPs とほぼ同じであることから、クラスター内の株は遺伝的に関連していると考えられた。*L. pneumophila* SG13 においても同様に、株間の差が 16~21 SNPs であり、遺伝的に関連が示唆された。なお、*L. pneumophila* SG1 と *L. pneumophila* SG13 の株間は 1833~2562 SNPs の差を認めた(表 7 に記載なし)。

本研究で解析した集団事例において、レジオネラ属菌が分離された浴槽水は、浴槽水 1, 2 のみであった。クラスター A に属する浴槽水 2 由来株(KL1528)およびクラスター B に属する浴槽水 1 由来株(KL1523, KL1524)は、それぞれ分離された浴槽水のみから分離された。解析した株数が少ないため断定はできないが、クラスター A に属する株は浴槽水 2 を感染源とする株であり、クラスター B に属する株は浴槽水 1 を感染源とする株であると推察された。*L. pneumophila* SG13 についても同様に、浴槽水 1 および浴槽水 2 が感染源と推察された。

L. pneumophila の分子疫学解析における

分解能は SNPs 解析、cgMLST 解析、SBT 解析の順に高いとされている⁸⁾。Kuroki らが実施した cgMLST 解析では、ST2114 を 2 つの cgMLST プロファイルに分けることができたが、その差はわずか 1 塩基であった³⁾。一方、本研究の SNPs 解析では同じ ST2114 の 7 株をそれぞれが遺伝的に関連のある 2 種類のクラスター A, B に区別することができた。ST2114 をより細かく型別でき、高い解析精度を示したことから、本事例において SNPs 解析を利用することは有用と考えられた。

本事例で分離された *L. pneumophila* SG1 は、各遺伝子(Allele)の塩基配列が非常に近い 2 種類の ST (ST2114 と ST2121 は 1 塩基の差)だったため、合わせて SNPs 解析を実施したところ、2 種類の ST が同じクラスター B を形成した。このことから、SNPs 解析を実施するにあたり、SBT 解析において ST が同じである株に加え、塩基配列の近い株についても合わせて SNPs 解析を実施する必要があることが示された。

本研究の SNPs 解析により、本事例は 3 タイプ(2 タイプの *L. pneumophila* SG1 および 1 タイプの *L. pneumophila* SG13 のレジオネラ属菌によって引き起こしたと推察され、いずれも株間の SNPs の差は 21 SNPs 以内であった。このデータはレジオネラ症集団事例の SNPs 解析を行政検査として実施する上で、遺伝的関連性を判断する SNPs の値として一つの目安になると考えられた。行政検査としてレジオネラ症集団事例への全ゲノム解析の利用を検討するためには、本研究のような集団事例株の全ゲノム解析を実施し、データを蓄積していくことが必要であると考えられた。

D. 参考文献

1. 日帰り温泉施設におけるレジオネラ症集団発生事例—埼玉県 (IASR Vol. 34 p. 157-158: 2013 年 6 月号)
2. 日帰り入浴施設におけるレジオネラ症集団発生事例と衛生管理上の対策—神奈川県(IASR Vol. 37 p. 140-141: 2016 年 7 月号)
3. Kuroki T, et al.: Outbreak of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella pneumophila* Serogroups 1 and 13. *Emerg. Infect. Dis.*, 2017, 23, 349–351.
4. レジオネラ症 2008.1~2012.12 (IASR Vol. 34 p. 155-157: 2013 年 6 月号)
5. 黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、陳内理生、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、「入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査」、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「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」(研究代表者、前川純子)、令和元年度分担研究報告書より
6. 山本啓之: PCR 法による *Legionella* 属細菌の検出・同定. *日本臨床*, 50 特別号: 394-399,1992.
7. Mahbubani MH, et al.: Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Molecular and Cellular Probes*, 4: 175-187, 1990.
8. David, S. et al.: Evaluation of an Optimal Epidemiological Typing Scheme for *Legionella pneumophila* with Whole-Genome Sequence Data Using Validation Guidelines. *J Clin Microbiol*, 2016, Vol 54,

- p. 2135-2148.
9. Raphael, B.H. et al.: Genomic resolution of outbreak-associated *Legionella pneumophila* sero-group 1 isolates from New York State. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, 82, 3582–3590.
10. Reuter S, et al.: A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ Open*, 2014, 33(1), e002175.
11. Graham RMA,: Real-time investigation of a *Legionella pneumophila* outbreak using whole genome sequencing. *Epidemiol Infect*, 2014, 142, 2347–2351.
- E. 健康危険情報
なし
- F. 研究発表
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 全ゲノム解析に供試した菌株

(1) 入浴施設

採水場所	菌種	血清型	採水年月	菌株番号
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2064
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2018年10月	KL2065
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2019年9月	KL2106
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2020年9月	KL2162
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2020年10月	KL2170
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年1月	KL1997
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年1月	KL2000
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2066
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2069
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2108
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2112
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2018年10月	KL2071
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2019年9月	KL2110
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年5月	KL2155
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年7月	KL2160
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年9月	KL2166
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	9	2018年10月	KL2068
浴室Bカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2104

(2) 集団感染事例

菌株番号	菌種	血清型	分離由来
KLH22	<i>L. pneumophila</i>	1	患者1
KLH24	<i>L. pneumophila</i>	1	患者2
KLH25	<i>L. pneumophila</i>	13	患者2
KLH31	<i>L. pneumophila</i>	1	患者3
KLH32	<i>L. pneumophila</i>	1	患者4
KLH33	<i>L. pneumophila</i>	1	患者4
KL1519	<i>L. pneumophila</i>	13	浴槽水1
KL1523	<i>L. pneumophila</i>	1	浴槽水1
KL1524	<i>L. pneumophila</i>	1	浴槽水1
KL1528	<i>L. pneumophila</i>	1	浴槽水2
KL1532	<i>L. pneumophila</i>	13	浴槽水2

表2 入浴施設におけるレジオネラ属菌の検出結果

	2019年				2020年				2021年						
	9月		5月(営業再開前日)		7月		9月		10月		11月		10月		
	LAMP	培養	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	
浴室A	湯口	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-	
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-	
	カラン1	-	L. p. SG9 10	-	-	-	-	-	L. p. SG9 10	-	L. p. SG9 10	-	L. p. SG9 60	-	-
	カラン2	+	L. p. SG1 L. p. SG6 L. sp. 200	+	L. p. SG6 L. sp. 80	+	L. p. SG6 10	+	L. p. SG6 L. sp. 20	-	L. sp. 20	+	L. p. SG6 L. sp. 60	+	L. p. SG6 20
浴室B	湯口	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-	
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-	
	カラン1	-	-	-	-	-	-	-	L. sp. 10	-	-	+	-	-	-
	カラン2	-	L. p. SG1 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
地下タンク	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	

L. p. : *L. pneumophila*、L. sp. : *Legionella* sp.、+ : 陽性、- : 陰性、N. T. : not tested

※2020年10月は給水系の試料水を採取した。

表3 医療機関におけるレジオネラ属菌の検出状況

			2019年			2020年			2021年								
			9月			10月			7月		8月			9月			
			LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL
控室	給水	初流水	-	-	1.7×10 ²	-	-	1.0×10 ³	-	-	6.8×10 ³	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
	給水	3L流水後	-	-	1.5×10	-	-	5.4×10	-	-	3.9×10	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
倉庫 (自動排水装置： 2019年11月設置)	給水	初流水	+	-	1.8×10 ⁴	-	-	5.6×10	-	-	9.0	-	-	3.1×10	-	-	6.9×10 ¹
	給水	3L流水後	-	-	1.5×10 ³	-	-	2.0	-	-	1.7×10	-	-	3.3×10	-	-	2.5×10 ¹
A病棟病室1 (自動排水装置： 2021年3月設置)	給水	初流水	+	<i>L. p</i> SG1 20	1.0	-	-	0	-	-	4.0	-	-	2.0×10	-	-	1.1×10 ¹
	給水	3L流水後	+	<i>L. p</i> SG1 20	0	+	-	0	-	-	1.0	-	-	5.2×10	+	<i>L. p</i> SG1 20	9.5
A病棟病室2	加温装置	初流水	-	-	2.6×10 ³	-	-	2.9×10	-	-	5.3×10 ³	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
	加温装置	3L流水後	-	-	9.0	-	-	0	-	-	1.2×10 ²	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
B病棟病室1 (自動排水装置： 2021年3月設置)	給水	初流水	-	-	4.0	-	<i>L. p</i> SG1 10	5.0	-	-	3.6×10	-	-	1.1×10 ²	+	<i>L. p</i> SG1 20	8.9×10 ¹
	給水	3L流水後	-	-	3.0	-	<i>L. p</i> SG1 20	0	-	-	1.2×10	-	-	3.8×10	-	-	1.1×10 ¹
B病棟病室2 (自動排水装置： 2021年3月設置)	給水	初流水	-	<i>L. p</i> SG1 10	6.7×10	-	<i>L. p</i> SG1 20	2.0	-	-	4.1×10	-	<i>L. p</i> SG1 20	4.9×10	-	-	5.0
	給水	3L流水後	-	<i>L. p</i> SG1 20	7.0	+	-	0	-	-	2.1×10	-	-	1.8×10	-	-	2.0

L. p. : *L. pneumophila*、*L. sp.* : *Legionella sp.*、+ : 陽性、- : 陰性、N. T. : not tested

表4 入浴施設から分離されたレジオネラ属菌の SBT 解析

血清型	菌株番号	SBT								採水場所	採水年月
		ST	<i>flaA</i>	<i>piE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>		
1	KL2064	1	1	4	3	1	1	1	1	浴室Aカラシ	2018年10月
1	KL1997	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラシ	2018年1月
1	KL2000	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラシ	2018年1月
1	KL2066	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラシ	2018年10月
1	KL2069	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラシ	2018年10月
1	KL2108	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラシ	2019年9月
1	KL2112	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラシ	2019年9月
1	KL2104	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Bカラシ	2019年9月
6	KL2071	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラシ	2018年10月
6	KL2110	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラシ	2019年9月
6	KL2155	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラシ	2020年5月
6	KL2160	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラシ	2020年7月
6	KL2166	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラシ	2020年9月
9	KL2065	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラシ	2018年10月
9	KL2106	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラシ	2019年9月
9	KL2162	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラシ	2020年9月
9	KL2170	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラシ	2020年10月
9	KL2068	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラシ	2018年10月

表 5 入浴施設から分離されたレジオネラ属菌の SNPs 解析

(1) *Legionella pneumophila* SG1

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2064	KL1997	KL2000	KL2066	KL2069	KL2104	KL2108	KL2112
浴室A カラン1	2018年10月	KL2064		7176	7176	7176	7176	7176	7176	7176
浴室A カラン2	2018年1月	KL1997			0	0	0	0	0	0
浴室A カラン2	2018年1月	KL2000				0	0	0	0	0
浴室A カラン2	2018年10月	KL2066					0	0	0	0
浴室A カラン2	2018年10月	KL2069						0	0	0
浴室A カラン2	2019年9月	KL2104							0	0
浴室A カラン2	2019年9月	KL2108								0
浴室B カラン2	2019年9月	KL2112								

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

(2) *Legionella pneumophila* SG6

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2071	KL2110	KL2155	KL2160	KL2166
浴室A カラン2	2018年10月	KL2071		0	4	3	3
浴室A カラン2	2019年9月	KL2110			4	3	3
浴室A カラン2	2020年5月	KL2155				1	1
浴室A カラン2	2020年7月	KL2160					0
浴室A カラン2	2020年9月	KL2166					

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

(3) *Legionella pneumophila* SG9

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2065	KL2106	KL2162	KL2170	KL2068
浴室A カラン1	2018年10月	KL2065		1	1	1	2
浴室A カラン1	2019年9月	KL2106			0	0	1
浴室A カラン1	2020年9月	KL2162				0	1
浴室A カラン1	2020年10月	KL2170					1
浴室A カラン2	2018年10月	KL2068					

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

表6 集団発生事例におけるレジオネラ属菌の SBT 解析

Serogroup	菌株番号	SBT								分離由来
		ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	
1	KLH22	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者1
1	KLH24	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者2
1	KLH31	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者3
1	KLH32	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者4
1	KLH33	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者4
1	KL1524	2114	6	10	21	3	17	14	9	浴槽水1
1	KL1528	2114	6	10	21	3	17	14	9	浴槽水2
1	KL1523	2121	6	10	21	3	17	14	57	浴槽水1
13	KLH25	2113	6	10	21	10	17	14	209	患者2
13	KL1519	2113	6	10	21	10	17	14	209	浴槽水1
13	KL1532	2113	6	10	21	10	17	14	209	浴槽水2

表7 集団発生事例におけるレジオネラ属菌のSNPs解析

(1) *Legionella pneumophila* SG1

クラスター	ST	菌株番号	KLH24	KLH31	KLH33	KL1528	KLH22	KLH32	KL1524	KL1523	分離由来
A	2114	KLH24		5	3	5	740	743	738	742	患者2
	2114	KLH31			4	6	741	744	739	743	患者3
	2114	KLH33				4	739	742	737	741	患者4
	2114	KL1528					741	744	739	743	浴槽水2
B	2114	KLH22						19	14	8	患者1
	2114	KLH32							17	21	患者4
	2114	KL1524								16	浴槽水1
	2121	KL1523									浴槽水1

※表中の数字は株間のSNPsの差(青背景：クラスターA、赤背景：クラスターB)

(2) *Legionella pneumophila* SG13

ST	菌株番号	KLH25	KL1519	KL1532	分離由来
2113	KLH25		16	19	患者2
2113	KL1519			21	浴槽水1
2113	KL1532				浴槽水2

※表中の数字は株間のSNPsの差