

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）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所

分担研究報告書

レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

研究分担者

○金谷 潤一 富山県衛生研究所

研究協力者

井上 浩章	アクアス株式会社	枝川 亜希子	大阪健康安全基盤研究所
小池 真生子	大阪健康安全基盤研究所	西澤 尚文	株式会社ゴーフォトン
三谷 康正	株式会社ゴーフォトン	花輪 由記	さいたま市健康科学研究センター
大島 萌愛	富山県衛生研究所		

研究要旨

富山県の入浴施設におけるレジオネラ汚染の実態把握と、採水現場で測定可能なモバイル qPCR 法の検討を行った。モバイル qPCR 法は、これまで構築してきたプロトコルをさらに改良した、微細流路チップを用いたろ過濃縮・簡易 DNA 抽出法を用いた。検水の約 3 割からレジオネラ属菌が陽性となり、レジオネラ症の主な原因菌である *Legionella pneumophila* 血清群 1 が含まれていたことから、入浴施設における衛生管理の一層の徹底が必要と考えられた。ここから 44 検体をモバイル qPCR 法の検討に用いたが、4 検体は詰まって全量 40mL の半量程度しかろ過濃縮できなかった。濃縮できた 40 検体の平板培養法の成績（浴槽水、シャワー水・カラン水：陽性 13、陰性 27）を基準として、モバイル qPCR 法の感度は 84.6%、特異度は 92.6%、陽性的中率は 84.6%、陰性的中率は 92.6%、一致率は 90.0% であった。濃縮できなかった 4 検体を除外した比較にはなるが、モバイル qPCR 法の感度は LAMP 法と同等、特異度と一致率は LAMP 法や qPCR 法より高く、比較した中でモバイル qPCR 法が培養法の結果に最も近かった。参考としてモバイル qPCR 法の再現性は、例数は少なく 16 倍に希釈した試料を用いたものの、5 機関の実験室で冷凍 6 検体（4 陽性、2 陰性）の輸送試料を用いた結果がおよそ一致した。モバイル qPCR の反応にはインターナルコントロールの反応も含まれており、その 5 機関におけるネガティブコントロールの（インターナルコントロールの）Ct 値は、 31.8 ± 1.0 と安定であった。モバイル qPCR 法は、レジオネラ属菌の検査経験があれば問題なく実施可能かつ、現場測定により他の検査法よりも迅速に平板培養法に近い結果が得られる有用な検査法と考えられた。

A 研究目的

2024（R6）年の国内におけるレジオネラ症患者報告数は、2,419件（暫定値）であり、前年比106.5%であった^{1,2)}。レジオネラ症対策として、感染源のおよそ4割を占める入浴施設の衛生管理の向上は重要である³⁾。したがって、入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握するため、公衆浴場におけるレジオネラ属菌の検出状況を調査した。

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。そのため、培養法と相関する遺伝子検査法は、入浴水の衛生状態を的確に、かつ早期に把握する点から重要な方法である。近年、モバイル型のリアルタイムPCR装置が普及し始めており、採水現場で直接レジオネラ属菌の遺伝子検出による、迅速な結果の還元も可能な状況となりつつある。本研究では、採水現場で測定可能なモバイル型装置を使用したqPCR法（モバイルqPCR法）について、平板培養法や他の遺伝子検査法（qPCR法およびLAMP法）との相関を検討した。モバイルqPCR法をより簡便に行えるよう、これまで構築してきたプロトコルの改良も目指した。

B 材料と方法

1 検査材料

2024（R6）年に富山県内の公衆浴場から採水した浴槽水30検体、シャワー水8検体、カラン水8検体を用いた。浴槽水は、浴槽の中央付近上部から採水した。シャワー水・カラン水は、温度を約35～40°Cに設定し、たまり水も含めて採水したが、温度調節が出来ない設備の場合は、そのまま採水した。すべての検体について、チオ硫酸ナトリウム入り滅菌採水瓶に500mL×2本採水した。46検体について培養試験を実施した。このうち2検体についてはモバイルqPCR法を実施できなかったため、遺伝子検査法の比較対象とするLAMP法、qPCR法についても実施しなかった。モバイルqPCR法には濃縮前の検水を用いた。フィルター吸引ろ過に

より100倍濃縮液を用意して、培養試験、LAMP法、qPCR法に使用した。

2 平板培養法

平板培養法は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法（薬生衛発0919第1号）」に準じて実施し、10CFU/100mL以上を陽性とした。分離菌の血清型別は、病原体検出マニュアル（国立感染症研究所）に従い加熱抗原を作製後、レジオネラ免疫血清（カネカ）および*Legionella Latex Test*（Thermo Fisher Scientific）を用いて実施した。

3 モバイルqPCR法

微細流路チップ（ビリューチップ、ゴーフォトン）を固定治具（ゴーフォトン）にセットし、検水40mLをシリソードでフィルターろ過した⁴⁾。滅菌水で洗浄後、カネカ簡易DNA抽出キットversion2（カネカ）を用いてDNAを抽出した。A液20μLをフィルターに添加後、固定治具ごと60°Cのヒートブロックで2分間加熱した。ここから回収した試料（約15～20μL）に、B液2μLと混合して、1反応あたり5μLを錆型DNAとしてPCRに用いた。なお、44検体を対象に実施したが、4検体はフィルターが詰まってろ過できなかつたので、40検体の平板培養法の成績（浴槽水、シャワー水・カラン水：陽性13、陰性27）と比較した。

qPCR反応は、PicoGene® Legionella spp. Kit（ゴーフォトン）およびPicoGene® PCR1100（ゴーフォトン）を用いて実施し、レジオネラ遺伝子およびインターナルコンストロールを検出した。なお、このモバイルqPCR法の成績は、他の検査と同様に試験室で行い、現場では行ったものではない。標的遺伝子が検出された場合（Ct値42未満）を陽性と判定した。

4 LAMP法

検水の100倍濃縮液2mLを用いて、Loopampレジオネラ検出試薬キットE（栄研化学）を使用して取扱説明書に従い実施した。標的遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。

5 qPCR 法

使用する各種試薬の取扱説明書に従い実施した。100倍濃縮検体 1 mL から Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) を用いて DNA を抽出後、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を用いて qPCR 反応を実施した。標的遺伝子が検出された場合 (Ct 値 45 未満) を陽性と判定した。

6 複数機関でのモバイル qPCR 法の評価

同一検体を 5 機関で評価した。3 mL の冷凍した検水 12 本 (6 検体×2 回分) を各機関に送付した。各機関では、解凍後に滅菌水 45 mL を添加して 16 倍希釈後、通常の検水とみなしてモバイル qPCR 法を実施した。

C 結果

1 平板培養法による結果

浴槽水の 30% (9/30 検体)、シャワー・カラン水の 31% (5/16 検体) 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、浴槽水では 10~99 CFU/100 mL が 6 検体、100~999 CFU/100 mL が 2 検体、1,000 CFU/100 mL 以上が 1 検体であった。一方、シャワー・カラン水では 10~99 CFU/100 mL が 4 検体、100~999 CFU/100 mL が 1 検体であった。分離菌の血清群別の結果、*L. pneumophila* 血清群 1 が浴槽水の 6 検体、シャワー・カラン水の 3 検体から分離され、最も多かった (表 2)。

2 モバイル qPCR 法による結果

44 検体について実施したが、4 検体はフィルターが詰まり、半量程度しかろ過できなかった。40 検体中、13 検体 (32.5%) が陽性となった (表 3A)。濃縮できなかった 4 検体を除外した比較にはなるが、40 検体の平板培養法を基準として、モバイル qPCR 法の感度は 84.6%、特異度は 92.6%、陽性的中率は 84.6%、陰性的中率は 92.6%、一致率は 90.0% であった。

3 LAMP 法による結果

44 検体について実施した結果、22 検体 (50.0%) が陽性となった (表 3B)。平板培養法に対する感度は 85.7%、特異度は 66.7%、陽性的中率は 54.5%、陰性的中率は 90.9%、一致率は 72.7% であった。

4 qPCR 法による結果

44 検体について実施した結果、30 検体 (68.2%) が陽性となった (表 3C)。平板培養法に対する感度は 92.9%、特異度は 43.3%、陽性的中率は 43.3%、陰性的中率は 92.9%、一致率は 59.1% であった。

5 モバイル qPCR 法および qPCR 法における、ろ過から DNA 抽出までの抽出効率の比較

同一検体からモバイル qPCR 法および qPCR 法を目的に抽出した 2 つの DNA を、2 つとも Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いて qPCR 反応を行い、DNA 抽出方法の違いを Ct 値で比較した。40 検体について検討した結果、モバイル qPCR 法と qPCR 法の相関係数は 0.84 であった。両方の方法で陽性となったのが 14 検体、両方陰性が 13 検体、モバイル qPCR 法のみ陽性が 1 検体、qPCR 法のみ陽性が 12 検体であった。qPCR 法のみ陽性の 12 検体中の 11 検体は、Ct 値が 36 より高く、培養陰性であった (図 1)。

6 モバイル qPCR 法の 5 機関での再現性評価

冷凍送付した 6 検体 (6 検体×2 回分) を 5 機関で評価した結果を図 2 に示した。すべての機関で 4 検体陽性、2 検体陰性、ネガティブコントロール (NC) 陰性となり、判定結果はおよそ一致した (図 2A)。ただし、陽性と判定した 4 検体のうち、機関 B、D については 2 検体が、2 回のうち 1 回の実施でレジオネラ遺伝子およびインターナルコントロールが検出されず、希釈試料を用いたにも関わらず、增幅阻害と判定された (図 2B、C)。また、陽性と判定した機関 D の 1 検体については、2 回のうち 1 回の実施でレジオネラが検出されず、偽陰性と判定された。この検体のインターナルコントロールの Ct 値は 37.6 であった。5 機関における NC のインターナルコントロールの Ct 値は、 31.8 ± 1.0

の範囲内であった（図2C）。

7 冷蔵検体と冷凍検体を用いたモバイルqPCR法の比較

上述の結果から一部の冷凍保存検体で反応阻害が確認されたため、検水を冷凍保存することによる影響を検討した。この検討には、16倍希釈ではなく、検水原液の4検体を用いた。冷蔵および冷凍保存後の試料から、核酸抽出～モバイルqPCR法を行い比較した。その結果、4検体すべてで、冷凍後はインターナルコントロールのCt値が高くなる、もしくは不検出となった（表4）。レジオネラ遺伝子についても同様の傾向であった。

D 考察

富山県内における入浴施設のレジオネラ属菌の汚染実態を調査した結果、検水の約3割からレジオネラ属菌が検出され、入浴施設の水系にはレジオネラ属菌がある一定の割合で生息していた。レジオネラ症は、レジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸い込むことが原因で発症することから、特にエアロゾルが多く発生するシャワー水の管理は重要である。衛生管理状況を見直し、適切な消毒等により対策をとる必要がある。検出されたレジオネラ属菌を菌種・血清群別に見ると、浴槽水およびシャワー・カラン水からは*L. pneumophila* 血清群1が最も多く検出された。*L. pneumophila* 血清群1はレジオネラ肺炎の原因菌の80%以上を占めるため、軽視できない状況であった^{5, 6)}。

モバイルqPCR法の検討では、今年度は採水現場での測定を想定し、微細流路チップを用いたろ過濃縮法と市販試薬の簡易DNA抽出法を組み合わせた新たな方法を検討した。ほとんど（40/44検体）の検体については問題なく実施できた一方で、目視で茶褐色の沈殿が認められた4検体（1施設）については、フィルターが詰まって半量程度しかろ過できなかった。したがって、このような検体についてモバイルqPCR法を実施する場合には、ろ過できた範囲で試験することが考えられる。ろ過水量の倍半分は、qPCRにとってCt値が1の違いでしかなく、NCのインターナルコントローラーの誤差程度（±1）の違いでしかない。レジオネラ検査は多い水量を濃縮してから一部だけを検査しているが、その理由は想像するに、バイオフィルムなどの分散していない試料であっても、精度良く定量できるようにするためであり、濃縮できない試料の検査を排除することが目的ではない。もし半量が気になるのであれば、2枚のフィルターで半量ずつ濃縮を実施し、同じ抽出液を用いて順番にDNAを抽出して濃縮率を合わせる方法もありえる。

平板培養法を基準にしたモバイルqPCR法の相関は、濃縮できなかった4検体を除いた40検体の場合、感度はLAMP法と同等、特異度と一致率はLAMP法やqPCR法より高く、検討した範囲で最も平板培養法に近いものであった。仮に濃縮のできなかった4試料を不検出相当とみなしたとしても（感度78.6%、特異度93.3%、陽性的中率84.6%、陰性的中率90.3%、一致率88.6%）、平板培養法に近い結果であった。試験した範囲では、モバイルqPCR法が、現場で最も早く、平板培養法に近い結果が得られることとなった。

モバイルqPCR法が平板培養法に近い結果が得られた理由として、ろ過からDNA抽出までの抽出効率がqPCR法と比較して低いため、平板培養法陰性であってもqPCR法では少ない遺伝子量（高いCt値）が検出された検体については、モバイルqPCR法では検出されなかつた可能性が考えられた。しかし、同一検体からモバイルqPCR法およびqPCR法で抽出したDNAの遺伝子量をqPCR法のCt値で比較した結果は両者の相関を示しており、全体的にqPCR法で抽出したDNAの方が遺伝子量が多かつたとしても、モバイルqPCR法を目的としたDNAのろ過抽出方法には問題がないと考えられた。モバイルqPCR法が、丁度良く感度が高いことについては、検査にとって都合が良いと言えた。一方、qPCR法でのみ陽性となった12検体中11検体は、平板培養法で陰性であったことから、死菌を感度良く検出した可能性が考えられた。

冷凍保存した6検体（16倍希釈）を用いてモバイルqPCR法を行って施設間の再現性を見たが、5機関の判定結果は一致した。NCのインターナルコントロールの

Ct 値も安定しており、モバイル qPCR 法は通常レジオネラ属菌の検査を実施している機関・実施者であれば、問題なく実施可能な方法と考えられた。一部の検体については、希釈したにも関わらず遺伝子の増幅阻害が認められたが（インターナルコントロールの Ct 値が 37.6 と高い）、事後の検討により、冷凍保存した検体は増幅阻害が生じることが判明した。冷凍保存した検体ではフィルターろ過の際に詰まりやすい傾向にあったため、冷凍することにより目視では確認できない結晶などが生じた、凍結融解で DNA の分解が促進したなどにより、遺伝子増幅を阻害する影響があった可能性が考えられた。本研究では同一検体を複数機関で検討するため検水を冷凍輸送したが、実際の検査では検水を冷凍することなくモバイル qPCR 法を実施するため、この悪影響は問題にならない。現に冷凍前の、希釀をしていない、濃縮できた 40 検体では、この悪影響を受けていない。仮に現場試験で増幅阻害がかかれれば、インターナルコントロールの反応から問題が把握でき、一旦は判定不能とする、あるいは鋳型量を減らして再試験する、試験室に持ち帰って通常の検査に切り替える、といった次善策での対応が考えられる。

以上の通り、本研究で検討したモバイル qPCR 法は、平板培養法と相關した遺伝子検査法として有用であると考えられた。

E 結 論

富山県内における入浴施設のレジオネラ属菌の汚染実態を調査した結果、検水の約 3 割からレジオネラ属菌が検出され、入浴施設の水系にはレジオネラ属菌がある一定の割合で生息していた。レジオネラ症の主な原因菌である *L. pneumophila* 血清群 1 が検出されたため、レジオネラ症発生防止のためには、施設の衛生管理が重要であると考えられた。モバイル qPCR 法の検討では、今年度は採水現場での測定を想定し、微細流路チップを用いたろ過濃縮・簡易 DNA 抽出法を組み合わせた新たな方法を検討した。平板培養法を基準として、モバイル qPCR 法の感度は LAMP 法と同等、特異度と一致率は LAMP 法や qPCR 法より高く、モバイル

qPCR 法は平板培養法に近い結果が得られる遺伝子検査法として有用と考えられた。5 機関でモバイル qPCR 法を実施した結果、判定結果は概ね一致した。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ 2024 年第 52 週.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/13081-idwr-sokuho-data-j-2452.html>
- 2) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ 2023 年第 52 週.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/12442-idwr-sokuho-data-j-2352.html>
- 3) Amemura-Maekawa J, et al. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84(18), pii: e00721-18.
- 4) 井上浩章、他：微細流路チップとモバイルリアルタイム PCR 装置を用いたオンラインでのレジオネラ属菌迅速検査に関する検討. 日本防菌防黴学会第 50 回年次大会. 2023.8.29-30.
- 5) Yu VL,,et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis*, 2002, 186(1), 127-128.
- 6) Amemura-Maekawa J, et al. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *J Med Microbiol*, 2010, 59 (Pt 6), 653-659.

F 研究発表

- 1) Kanatani J, et al. Prevalence and molecular epidemiology of Legionnaires' disease in Toyama Prefecture, Japan. The 8th ESGLI Meeting. Dresden, Germany. October 2024.

G 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1. 検出されたレジオネラ属菌の菌数

CFU/100 mL	検体数(%)	
	浴槽水	シャワー・カラント水
< 10	21 (70.0)	11 (68.8)
10–99	6 (20.0)	4 (25.0)
100–999	2 (6.7)	1 (6.3)
> 1,000	1 (3.3)	0 (0)
計	30 (100)	16 (100)

表2. 分離菌の菌種・血清群

菌種・血清群	検体数	
	浴槽水	シャワー・カラント水
<i>L. pneumophila</i> 血清群1	6	3
<i>L. pneumophila</i> 血清群3		1
<i>L. pneumophila</i> 血清群4	4	
<i>L. pneumophila</i> 血清群5		2
<i>L. pneumophila</i> 血清群6		2
<i>L. pneumophila</i> 血清群8	2	1
<i>L. pneumophila</i> 血清群9	1	
<i>L. pneumophila</i> 血清群10	1	
<i>L. micdadei</i>	1	

表3. 平板培養法と各種遺伝子検査法との関連

A) モバイルqPCR法*

	平板培養		
	+	-	計
モバイルqPCR +	11	2	13
モバイルqPCR -	2	25	27
	13	27	40

*4検体は、フィルターが詰まりろ過できなかった

感度	84.6%
特異度	92.6%
陽性的中率	84.6%
陰性的中率	92.6%
一致率	90.0%

B) LAMP法

	平板培養		
	+	-	計
LAMP +	12	10	22
LAMP -	2	20	22
	14	30	44

感度	85.7%
特異度	66.7%
陽性的中率	54.5%
陰性的中率	90.9%
一致率	72.7%

C) qPCR法

		平板培養		計
		+	-	
タカラqPCR	+	13	17	30
	-	1	13	14
		14	30	44

感度 92.9%
 特異度 43.3%
 陽性的中率 43.3%
 陰性的中率 92.9%
 一致率 59.1%

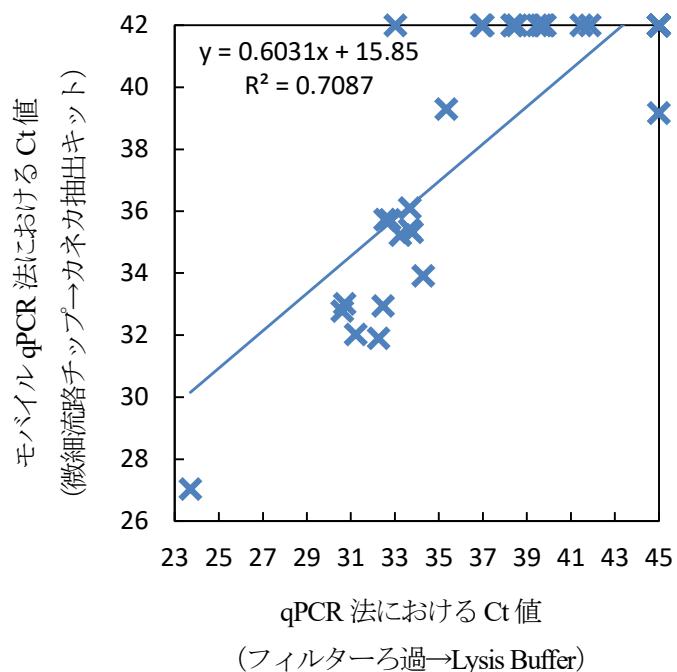


図 1. モバイル qPCR 法および qPCR 法で抽出した DNA の遺伝子量 (Ct 値) の比較
 モバイル qPCR 法における Ct 値 42、qPCR 法における Ct 値 45 は不検出を意味する。

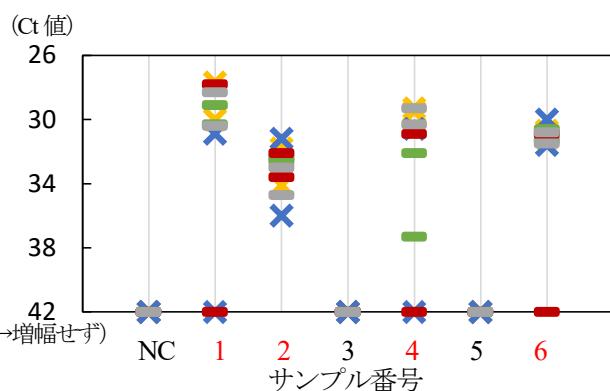
A) 判定結果まとめ ($N=2$)

サンプル番号	機関A	機関B	機関C	機関D	機関E
NC	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
1	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
2	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
3	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
4	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
5	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
6	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性

*青下線は、2回のうち1回の測定において増幅阻害が確認された検体

*青点線は、2回のうち1回の測定において偽陰性となった検体

B) Ct 値まとめ (レジオネラ遺伝子)



C) Ct 値まとめ (インターナルコントロール)

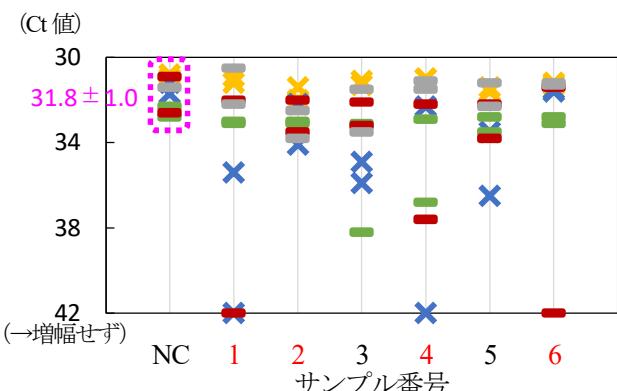


図2. 冷凍保存同一検体を用いた5機関でのモバイルqPCR法の評価結果

Ct値42は不検出を意味する。

黄色×印；機関A、青色×印；機関B、緑色一印；機関C、赤色一印；機関D、灰色一印；機関E。

表4. 冷蔵検体と冷凍検体を用いたモバイルqPCR法の比較

検体	標的遺伝子	Ct値	
		冷蔵	冷蔵検体を4日間冷凍
検体A	Leg	不検出	不検出
	IC	31.2	不検出
検体B	Leg	34.8	不検出
	IC	32.1	不検出
検体C	Leg	25.3	30.7
	IC	30.7	31.5
検体D	Leg	26.6	32.0
	IC	30.8	31.2