

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調査により、検水の約1割からレジオネラ症の主な原因菌である *Legionella pneumophila* 血清群1が検出されたことから、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。

採水現場で測定可能なモバイル qPCR 法を 44 検体について実施したが、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 法が平板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。

ST23 や ST120 の全ゲノム配列による系統解析の結果から、患者由来株は、入浴施設由来株だけでなく、水たまり由来株や土壤由来株など自然環境から分離された株とも近縁な系統関係を示した。また、ST502、ST505 を含めた 4 STs において、患者由来株のみで偏ったクラスターなどを形成することはなかった。10 事例の患者検体から 8 株ずつ分離して、同一検体内における SNPs 解析を実施した結果、9 検体では 8 株内で SNPs は検出されなかった。一方、浴槽水 10 検体からも同様に 8 株ずつ分離し、SNPs 解析を実施した結果、8 株内で SNPs が検出されなかったのは 2 検体のみであった。全ゲノム配列を用いた系統解析による感染源調査の際は、環境検体からは複数の株を解析するのが望ましいと考えられた。複数株の解析が難しい場合は、環境中のレジオネラ属菌の多様性を考慮した上で、同一由来株であるかどうかを判断する必要があると考えられた。

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⁾。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、平板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。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、平板培養法および遺伝子検査法の一つである LAMP 法を用いて、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。本研究では、2012 年以降の 12 年間の調査結果も合わせてまとめ、陽性となった検体の特徴などについて報告する。また、遺伝子検査は、平板培養法と結果が一致しなかった場合を含め、その結果の解釈を監視員や施設管理者にわかりやすく説明することが必要となるため、説明文を作成し、検査成績書と合わせて送付した。

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。

レジオネラ属菌は、土壤、浴槽水など環境中に広く生息しているが、レジオネラ症患者から検出される遺伝子型（ST、Sequence-Based Typing による型別）には偏りがある³⁾。富山県でレジオネラ症患者から高頻度で検出される ST の菌株は、複数の環境検体から検出されるため、遺伝子型別結果による感染源特定の判断に迷う場合がある。そこで、これらの遺伝子型の菌株について全ゲノム配列を用いた系統解析を実施し、患者

および患者が利用した入浴施設から分離された菌株について系統的な近縁度を明らかにする。また、同一検体から複数の菌株を分離し、同一検体内における SNPs の蓄積頻度を明らかにする。得られた結果は、感染源調査の際に患者由来株と環境由来株の SNPs 解析を実施した場合に、その結果の解釈において参考となる知見となる。また、新規検査法開発の基盤となる知見にもなり得る。本研究により、公衆浴場の衛生管理およびレジオネラ症対策の向上が期待される。

B 材料と方法

1 検査材料

2022 (R4) 年から 2024 (R6) 年に公衆浴場などから採水した浴槽水、シャワー水およびカラン水を用いた。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。2012 年から 2021 年に実施した検査結果も合わせて結果を解析した。

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、10 CFU/100 mL 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（デンカ）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 40 mL をシリング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 20 μL 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 15~20 μL）に、B 液 2 μL と混合して、1 反応あたり 5 μL 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ったので、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。

4 LAMP 法

検水の 100 倍濃縮液 2 mL 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。

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、Cyclease PCR *Legionella*(16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を用いて qPCR 反応を実施した。

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。

7 SNPs 解析

2005 年以降に県内でレジオネラ症患者から高頻度に検出された 4 STs (ST23 : 14 株、ST120 : 23 株、ST502 : 33 株、ST505 : 31 株) の菌株を用いて、SNPs 解析を実施した。菌株の由来は、患者および浴槽水の他に、シャワー水、カラン水、水たまり、土壌である。また、同一検体から分離された菌株の SNPs を比較するため、10 事例（散発）のレジオネラ症患者から 8 株ずつ分離し、同一 ST であることを確認後、SNPs 解析に用いた。同様に、浴槽水 10 検体からも 8 株ずつ分離し、同一 ST

であることを確認後、SNPs 解析に用いた。

菌株の DNA は、QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン）を用いて抽出した。イルミナ社のプロトコルに従い、Nextera XT DNA Library Preparation Kit、Nextera XT Index Kit および MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) を用いてライブラリーを作製後、RUN を実施した。遺伝子型ごとに BactSNP で pseudogenome を作成後、Gubbins を用いて組換え領域を除去し、SNPs を比較した⁵。箱ひげ図の作成は、David らの文献を参考にした⁶。レファレンスには、*L. pneumophila* str. Pari 株（Accession no. NC_006368.1）のゲノム配列を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は、患者情報の使用にあたっては、倫理委員会で承諾のもと実施した。

C 結果

1 検水の平板培養法および LAMP 法によるレジオネラ属菌検査結果

2012 年以降に搬入された検体についてレジオネラ属菌の検査を実施した結果を、表 1 から 7 に示した。また、遺伝子検査法による結果の解釈を監視員や施設管理者にわかりやすく説明するための文書を作成し（別紙）、2022 年以降の検査成績書と合わせて送付した。

2 モバイル qPCR 法、LAMP 法および qPCR 法による結果と比較

2024 年に搬入された 44 検体についてモバイル qPCR 法、LAMP 法および qPCR 法を実施し、各検査法を比較した。モバイル qPCR 法では、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 8A）。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。LAMP 法では、22 検体（50.0%）が陽性となった（表 8B）。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。qPCR 法では、30 検体 (68.2%) が陽性となった (表 8C)。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。

3 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)。

4 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)。

5 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 9)。レジオネラ遺伝子についても同様の傾向であった。

6 4 STs の菌株における全ゲノム配列の系統解析

解析の結果は図 3～6 に示した。ST23 や ST120 の結果から、患者由来株は、入浴施設由来株だけでなく、水たまり由来株や土壤由来株など自然環境から分離された株とも近縁な系統関係を示した。また、ST502、ST505 を含めた 4 STs において、患者由来株のみで偏ったクラスターなどを形成することはなかった。今回解析に用いた菌株には、7 事例 (散発) のレジオネラ症患者及び当該患者が利用した入浴施設の浴槽水から分離した菌株が含まれており、このうち 6 事例については、患者由来分離株と浴槽水由来分離株が同一 ST の菌株内の比較において近縁な系統であった。事例 4 については、患者由来株と浴槽水由来株との間で 31 SNPs 検出された。その他の事例では、それぞれ 0～15 SNPs であった。

7 同一検体由来株における SNPs 解析

10 事例の患者検体から 8 株ずつ分離して、同一検体内における SNPs 解析を実施した結果、9 検体では 8 株内で SNPs は検出されなかった (表 10)。1 検体 (Patient 08) については、1 株のみ他の 7 株と比較し、1 SNP 検出された。一方、浴槽水 10 検体からも同様に 8 株ずつ分離し、SNPs 解析を実施した (表 11、Facility 06 は 7 株のみ解析)。その結果、8 株内で SNPs が検出されなかったのは 2 検体のみであった (Facility 02, Facility 09)。4 検体においては、SNPs 解析によって 7 種類の variants が検出された (Facility 01, Facility 05, Facility 06, Facility 10)。また、Facility 08 の検体においては、最大で 98 SNPs 検出された。得られた結果から、解析した菌株数と SNPs 解析によって検出可能な variants について箱ひげ

図を作成した（図7）。患者由来株においては、1または2株をSNPs解析することすべてのvariantsが検出できる結果であったのに対し、浴槽水由来株については、すべてのvariantsを得るために少なくとも7株解析する必要がある結果であった。

D 考察

1 入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査

13年間にわたり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1割からレジオネラ症の主な原因菌である *L. pneumophila* 血清群1が検出されたことから^{7,8)}、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。

最終換水日から7日以上経過した検体では、レジオネラ属菌の陽性率が高い傾向であった（表3）。「公衆浴場における衛生等管理要領等について」では、浴槽水の換水頻度は「1週間に1回以上完全に換水して浴槽を清掃すること」となっている。そのため、浴槽水の換水、洗浄、塩素系薬剤による消毒を適切に実施し、バイオフィルムの形成やレジオネラ属菌の増殖を抑制することが重要である。一方で、換水日に採水した検体の約2割からもレジオネラ属菌が検出されているため、配管洗浄・消毒等により、配管内に付着したバイオフィルムを除去することも重要であると考えられた。

「公衆浴場における衛生等管理要領等について」では、浴槽水の消毒に当たっては、塩素系薬剤を使用し、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を0.4mg/L程度を保つことが求められている。本調査においても、採水時の遊離残留塩素濃度が0.4mg/L以上であった検体の陽性率は15.1%であったのに対し、0.4mg/L未満の検体では38.1%と高かったことから、遊離残留塩素濃度の維持がレジオネラ属菌の抑制には重要であることが示された（表4）。シャワー・カラン水についても、「入浴施設の衛生管理の手引き（令和4年5月13日）」によると、貯湯槽水の温度を60°C以上に保つことができない場合や、調節箱を設置する場合は、遊離残留塩素濃度を0.4mg/L以上に保つ必要があることが記載されている。本調査では、採水時の遊離残留塩素濃度が0.4mg/L以上

であった検体の陽性率は13.3%であったのに対し、0.4mg/L未満の検体では29.4%と高かったが（表4）、調節箱の設置の有無や貯湯槽水の温度については調査していない。また、シャワー・カラン水におけるレジオネラ属菌の増殖を抑制するためには、シャワー・ヘッドやホースの洗浄・消毒も重要となってくるため、これらの箇所を総合的に衛生管理する必要がある。

LAMP法による遺伝子検査の結果は、概ね平板培養法と相關していた（表6、7）。培養陰性・LAMP陽性検体の多くは、死菌DNAを検出したことによるものであると考えられた。一方、培養陽性・LAMP陰性検体の多くは、検体中に含まれるレジオネラ菌量が少なかつたため、検出感度によるものであると考えられた。本調査では、LAMP法の平板培養法に対する陰性的中率は94.4%であった。平板培養法では、検査結果が判定するまでに約1週間を要するため、LAMP法は検体中のレジオネラ属菌陰性を迅速（当日中）に判定する方法として有用であることが明らかとなった。とりわけ、検水の洗浄・消毒効果の判定や、それに伴う施設の営業再開の判断など、早期の結果判定が望まれる際にLAMP法の活用が有用であると考えられた。

レジオネラ属菌の検査成績書を返した際、遺伝子検査と培養検査との結果の不一致の解釈について、監視員や施設管理者からしばしば質問を受ける。遺伝子陽性・培養陰性の結果は、死菌のDNAを検出している可能性が考えられる。また、平板培養法の検出下限値である10CFU/100mL未満のレジオネラ属菌が存在した可能性や、生きているが培養できない（viable but non-culturable）状態のレジオネラ属菌を検出している可能性も考えられる。一方、遺伝子陰性・培養陽性の結果は、以下の可能性が挙げられる。1. 検水に含まれる成分により、遺伝子增幅反応が阻害され、陰性となった。2. 検査では、検水を培養検査、遺伝子検査のためにそれぞれ取り分けるが、その際、遺伝子検査のために取り分けた検水に、レジオネラ属菌が含まれなかつた。3. 遺伝子検査法の感度が低く、陰性となつた。4. 用いた遺伝子検査法では検出できない種類のレジオネラ属菌が存在した。

上記の結果の解釈を監視員や施設管理者にわかりやすく説明することが必要となるため、「レジオネラ属菌の培養検査・遺伝子検査(LAMP 法)の結果について」と題した説明文(別紙)を作成し、検査成績書と合わせて送付し、遺伝子検査結果の解釈の普及に努めた。

2 モバイル qPCR 法の検討

モバイル qPCR 法の検討では、令和 6 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つた。したがつて、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 にとっては 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ルの誤差程度(±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つても、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、濃縮できなかつた 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つた 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つた。

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つても 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、丁度良く感度が低いことについては、検査にとって都合が良いと言えた。一方、qPCR 法でのみ陽性となつた 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 法を行つ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增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增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つたため、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、遺伝子增幅を阻害する影響があつ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、希釈をしていない、濃縮できた 40 検体では、この悪影響を受けていない。仮に現場試験で增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、あるいは鉄型量を減らして再

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。

3 全ゲノム配列を用いた系統解析および SNPs 解析

4 STs の菌株における全ゲノム配列の系統解析の結果、分離株の由来による系統の偏りは認められなかつたため、レジオネラ症は入浴施設だけでなく、水たまりや土壤も感染源となる可能性があると考えられた。また、6/7 事例では、それぞれの事例で分離された患者および浴槽水由来株は遺伝的に近縁であった。したがって、疫学調査の結果と合わせて、これらの入浴施設が感染源ではないかと疑われた。しかしながら、事例 4 は患者および浴槽水由来株との間に 31 SNPs 検出され、他の事例と比較し、やや遠縁であった。浴槽水は、温度やアメーバなどの原生動物の存在によりレジオネラ属菌が増殖しやすい環境であるため、レジオネラ属菌の多様性が高いと考えられる。そのため、SNPs の蓄積した菌株を検査に供した可能性が考えられる。あるいは、当該患者はもう 1 か所公衆浴場を利用していたため、別の感染源が存在した可能性も考えられる。ただし、その施設の検水からは、レジオネラ属菌は検出されなかつた。

同一検体内での SNPs の蓄積頻度を調査した結果、患者から分離した株においては、SNPs はほとんど検出されなかつた。一方、浴槽水から分離した株においては、多数の SNPs が検出された。上述の通り、浴槽水中では SNPs が蓄積しやすいためではないかと考えられる。SNPs が完全一致した株を取得するのは容易ではなく、何株を釣菌すれば一致するかは、その環境におけるレジオネラの多様性や割合に左右されそうである。したがって感染源調査の際は、環境検体からは複数の株を解析するのが望ましいと考えられた。複数株の解析が難しい場合は、環境中のレジオネラ属菌の多様性を考慮した上で、同一由来株であるかどうかを判断する必要があると考えられた。

E 結 論

富山県の入浴施設におけるレジオネラ汚染の実態把握調査により、検水の約 1 割からレジオネラ症の主な原因菌である *Legionella pneumophila* 血清群 1 が検出されたことから、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。モバイル qPCR 法の検討では、採水現場での測定を想定し、微細流路チップを用いた過濃縮・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。全ゲノム配列を用いた系統解析による感染源調査の際は、環境検体からは複数の株を解析するのが望ましいと考えられた。複数株の解析が難しい場合は、環境中のレジオネラ属菌の多様性を考慮した上で、同一由来株であるかどうかを判断する必要があると考えられた。

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) Nakanishi N, et al. Investigation of a *Legionella pneumophila* outbreak at a bath facility in Japan using whole-genome sequencing of isolates from clinical and environmental samples. *Microorganisms*. 2022 Dec 22;11(1):28.
- 6) David S, et al. Low genomic diversity of *Legionella pneumophila* within clinical specimens. *Clin Microbiol Infect*. 2018, 24(9):1020.e1-1020.e4.
- 7) 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.
- 8) 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. Characterization of bacterial microbiome in water from public bath, especially focused on *Legionella*. The 10th International Conference on *Legionella*. Yokohama, Japan. September 2022.
- 2) Kanatani J et al. Correlation between bacterial microbiome and *Legionella* species in water from public bath facilities by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Microbiol Spectr*. 2024 Feb 16:e0345923.
- 3) 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. 培養検査におけるレジオネラ属菌の陽性率

	検体数	陽性数(%)
浴槽水	510	106 (20.8)
シャワー・カラント水	390	104 (26.7)

表3. 最終換水日からの経過日数と陽性率

経過日数	検体数	陽性数(%)
0	133	28 (21.1)
1	154	36 (23.4)
2-6	164	24 (14.6)
≥ 7	41	13 (31.7)
計	492	101 (20.5)

表2. 検出されたレジオネラ属菌の菌数の分布

CFU/100 mL	検体数(%)	浴槽水	シャワー・カラント水
< 10	404 (79.2)	286 (73.3)	
10-99	72 (14.1)	60 (15.0)	
100-999	25 (4.9)	34 (8.7)	
1000-9,999	7 (1.4)	9 (2.3)	
≥ 10,000	2 (0.4)	1 (0.3)	
計	510 (100)	390 (100)	

表4. 採水日の遊離残留塩素濃度

		検体数	陽性数(%)
浴槽水	< 0.4 mg/L	118	45 (38.1)
	≥ 0.4 mg/L	378	57 (15.1)
シャワー・カラント水	< 0.4 mg/L	320	94 (29.4)
	≥ 0.4 mg/L	45	6 (13.3)

表5. 分離菌の菌種・血清群

菌種・血清群	陽性数(%)	
	浴槽水 (N = 106)	シャワー・カラント水 (N = 104)
<i>L. pneumophila</i> 血清群1	51 (48.1)	18 (17.3)
<i>L. pneumophila</i> 血清群3	8 (7.5)	11 (10.6)
<i>L. pneumophila</i> 血清群5	16 (15.1)	29 (27.9)
<i>L. pneumophila</i> 血清群6	26 (24.5)	33 (31.7)
<i>L. pneumophila</i> 血清群9	16 (15.1)	5 (4.8)
その他の <i>L. pneumophila</i>	30 (28.3)	32 (30.8)
<i>L. pneumophila</i> 以外の菌種	11 (10.4)	21 (20.2)

表6. 培養法と遺伝子検査法(LAMP法)との相関

培養法に対する(%) :	浴槽水 (N = 277)	シャワー・カラント水 (N = 231)	全検体 (N = 508)
感度	85.4	81.8	83.5
特異度	62.4	80.7	70.4
陽性的中率	32.3	57.0	41.7
陰性的中率	95.3	93.4	94.4
一致率	66.4	81.0	73.0

表7. 培養法と遺伝子検査法(LAMP法)との相関(2×2表)

A) 浴槽水

	培養(+)	培養(-)	計
LAMP (+)	41	86	127
LAMP (-)	7	143	150
計	48	229	277

B) シャワー・カラント水

	培養(+)	培養(-)	計
LAMP (+)	45	34	79
LAMP (-)	10	142	152
計	55	176	231

C) 全検体

	培養(+)	培養(-)	計
LAMP (+)	86	120	206
LAMP (-)	17	285	302
計	103	405	508

表8. 平板培養法と各種遺伝子検査法との相関

A) モバイルqPCR法*

		平板培養		計
		+	-	
モバイルqPCR	+	11	2	13
	-	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つた

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
	-	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%

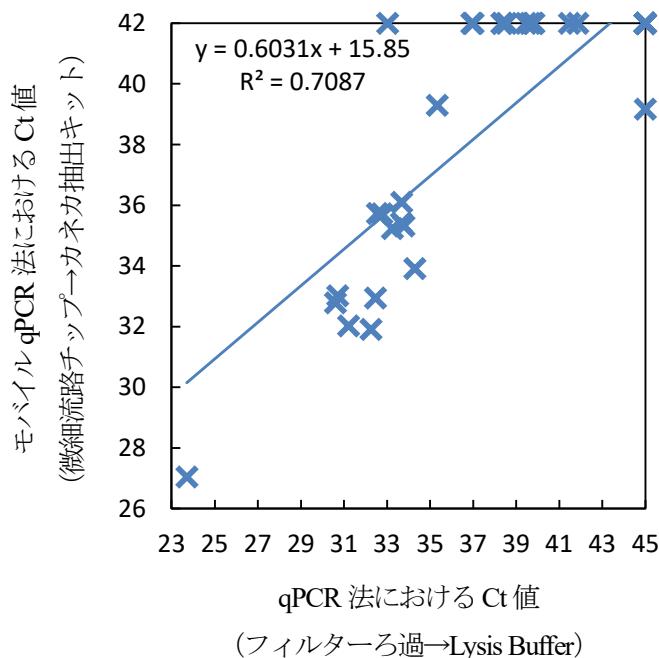


図1. モバイルqPCR法およびqPCR法で抽出したDNAの遺伝子量(Ct値)の比較

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。

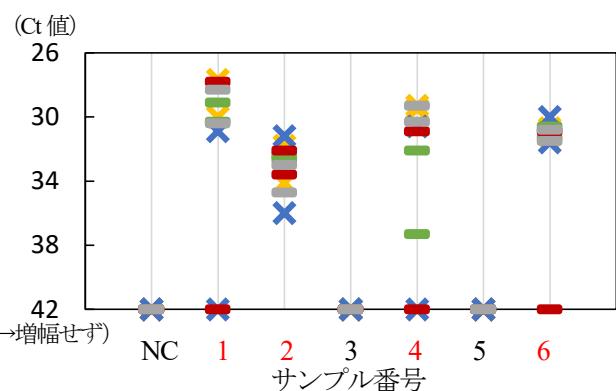
A) 判定結果まとめ (N=2)

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 (レジオネラ特異的遺伝子)



C) Ct 値まとめ (インターナルコントロール)

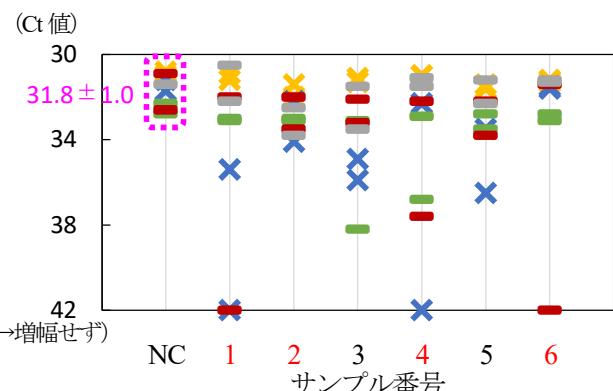


図2. 冷凍保存同一検体を用いた5機関でのモバイルqPCR法の評価結果

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9. 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

図3. Lp1 ST23 の全ゲノム配列による系統解析 (14 株)

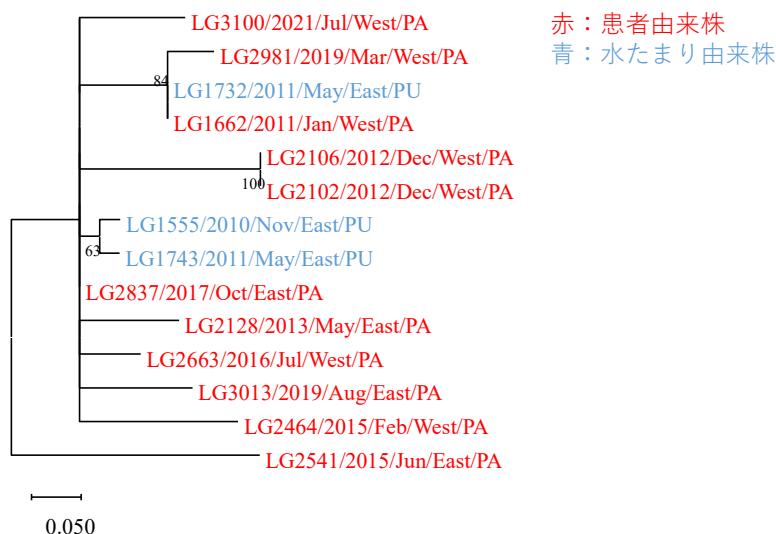


図4. Lp1 ST120 の全ゲノム配列による系統解析 (23 株)

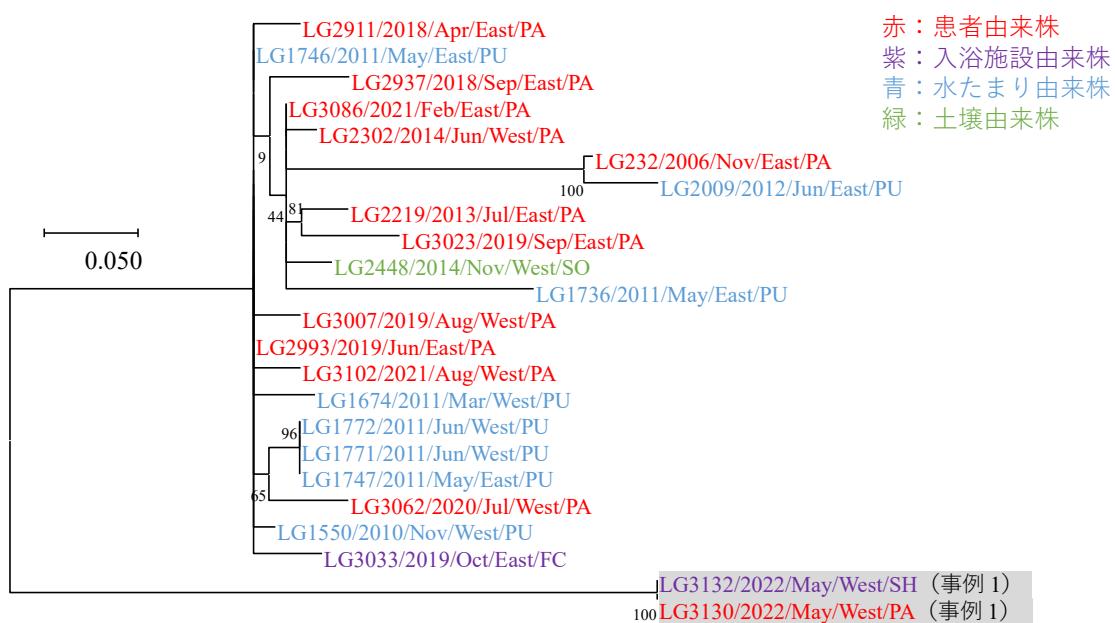


図5. Lp1 ST502 の全ゲノム配列による系統解析 (33 株)

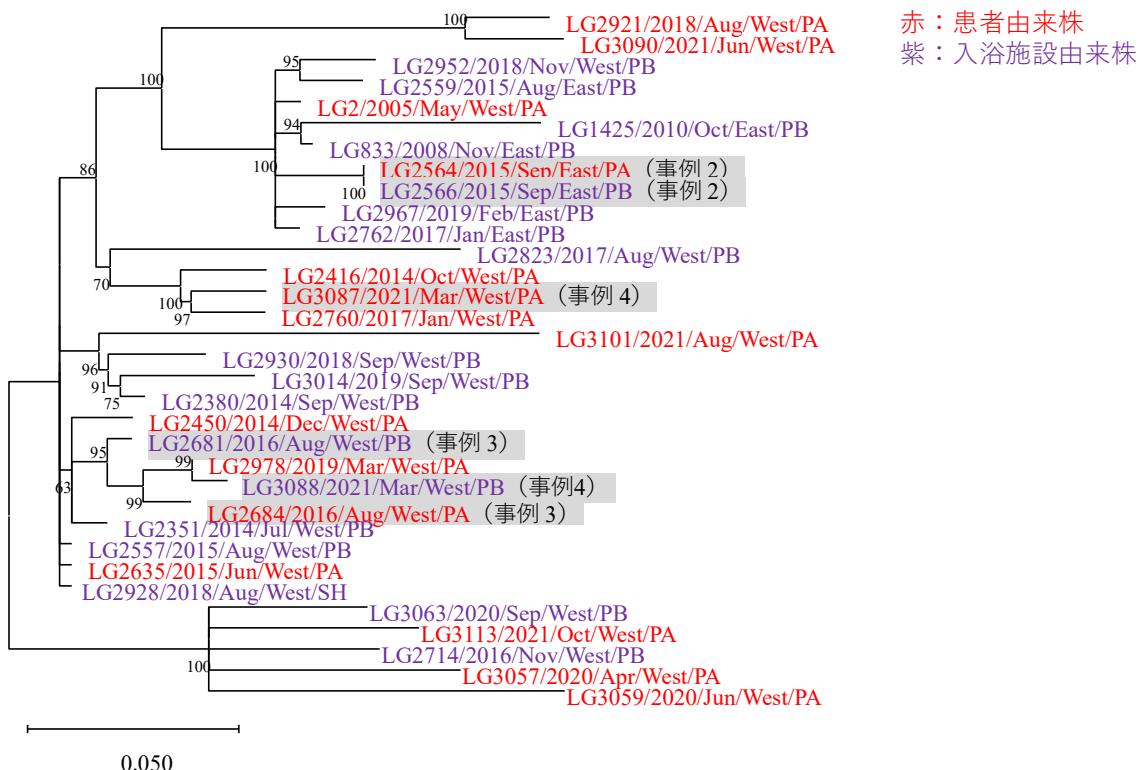


図6. Lp1 ST505 の全ゲノム配列による系統解析 (31 株)

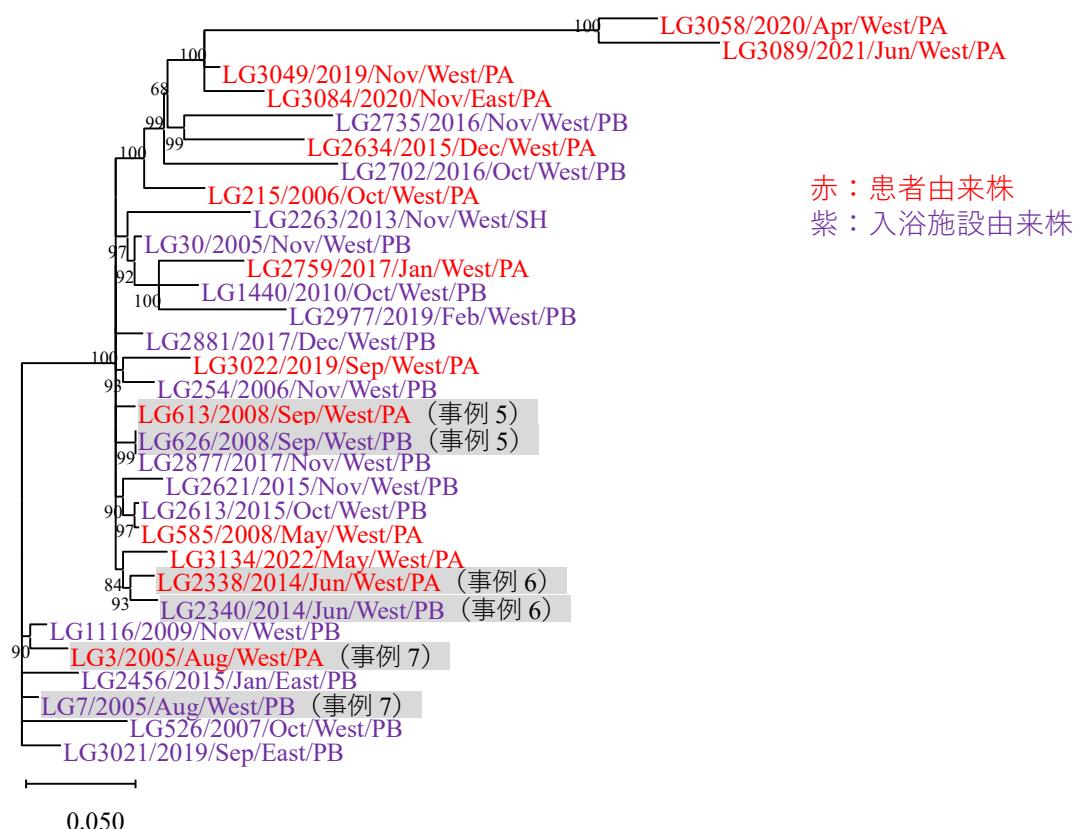


表 10. 同一患者由来の各 8 株における SNPs 解析

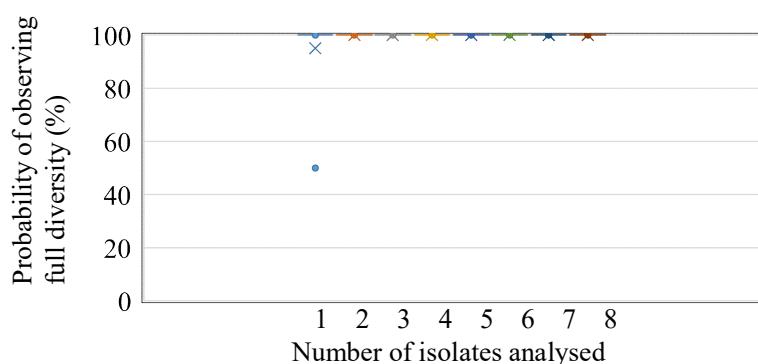
Patient	SBT		SNPs between pairs				No. of SNP variant
	ST	Allele no.	range	mean	median		
Patient 01	ST89	(4, 10, 11, 15, 29, 1, 6)	0 SNPs between all			1	
Patient 02	ST2856	(6, 10, 15, 15, 17, 14, 6)	0 SNPs between all			1	
Patient 03	ST609	(3, 13, 1, 1, 14, 9, 1)	0 SNPs between all			1	
Patient 04	ST2930	(3, 13, 1, 3, 12, 9, 6)	0 SNPs between all			1	
Patient 05	ST502	(6, 10, 19, 3, 19, 4, 6)	0 SNPs between all			1	
Patient 06	ST502	(6, 10, 19, 3, 19, 4, 6)	0 SNPs between all			1	
Patient 07	ST23	(2, 3, 9, 10, 2, 1, 6)	0 SNPs between all			1	
Patient 08	ST1798	(7, 10, 17, 10, 13, 4, 11)	0-1	0.25	0	2	
Patient 09	ST1273	(7, 6, 17, 10, 13, 11, 6)	0 SNPs between all			1	
Patient 10	ST89	(4, 10, 11, 15, 29, 1, 6)	0 SNPs between all			1	

表 11. 同一浴槽水由来の各 8 株における SNPs 解析

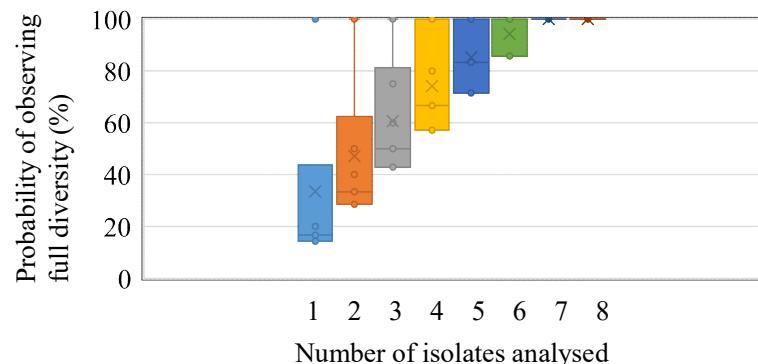
Facility	SBT		SNPs between pairs				No. of SNP variant
	ST	Allele no.	range	mean	median		
Facility 01	ST1151	(7, 43, 31, 3, 48, 15, 40)	0-4	1.929	2	7	
Facility 02	ST1095	(6, 10, 15, 28, 21, 14, 11)	0 SNPs between all	0	0	1	
Facility 03	ST644	(6, 10, 20, 10, 9, 14, 11)	0-4	2.393	2	6	
Facility 04	ST1	(1, 4, 3, 1, 1, 1, 1)	0-4	1.821	2	6	
Facility 05	ST502	(6, 10, 19, 3, 19, 4, 6)	0-7	4.607	5	7	
Facility 06 (N = 7)	ST141	(2, 12, 3, 6, 8, 14, 9)	1-17	6.238	3	7	
Facility 07	ST1101	(6, 6, 15, 3, 9, 14, 11)	0-10	2.75	1	4	
Facility 08	ST763	(6, 10, 19, 28, 19, 4, 11)	0-98	50.89	56	5	
Facility 09	ST1528	(6, 10, 17, 28, 17, 14, 9)	0 SNPs between all	0	0	1	
Facility 10	ST1	(1, 4, 3, 1, 1, 1, 1)	0-8	3.786	3.5	7	

図 7. SNPs 解析による同一検体内における解析株数と検出可能な variants の箱ひげ図

A) 患者由来株



B) 浴槽水由来株



レジオネラ属菌の培養検査・遺伝子検査(LAMP 法)の結果について

培養検査は、生きたレジオネラ属菌そのものを検出する検査法です。一方、遺伝子検査法（LAMP 法）は、レジオネラ属菌の遺伝子を検出する方法です。それぞれの結果についての解釈は、下記のとおりです。

1 結果における解釈

1) 培養検査陰性・遺伝子検査陰性

検査した水に、レジオネラ属菌は存在していないと考えられます。

2) 培養検査陽性・遺伝子検査陽性

検査した水には、生きたレジオネラ属菌が存在しています。

3) 培養検査陽性・遺伝子検査陰性

検査した水には、生きたレジオネラ属菌が存在しています。遺伝子検査で陰性になった理由として、以下の可能性が考えられます。

3-1) 水に含まれる成分により、遺伝子增幅反応が阻害され、陰性となつた。

3-2) 検査では、水を培養検査、遺伝子検査のためにそれぞれ取り分ける。その際、遺伝子検査のために取り分けた水に、レジオネラ属菌が含まれなかつた。

3-3) 遺伝子検査法の感度が低く、陰性となつた。または、用いた遺伝子検査法では検出できない種類のレジオネラ属菌が存在した。

4) 培養検査陰性・遺伝子検査陽性

検査した水には、レジオネラ属菌の遺伝子が含まれています。培養検査で陰性となった理由として、以下の可能性が考えられます。

4-1) 既に死んでいるレジオネラ属菌の遺伝子を検出している。

塩素などの消毒効果により、人に感染し病気を起こす可能性のあるレジオネラ属菌は存在していないと考えられます。消毒剤により遺伝子も消滅あるいは変異するので、遺伝子検査は陰性になります。遺伝子が陽性になるという結果は、その水には検査の少し前まで生きたレジオネラ属菌が存在していたという事実を示しています。

4-2) 培養検査では検出できないが、生きているレジオネラ属菌の遺伝子を検出している。

培養検査は、すべてのレジオネラ属菌を検出できるわけではありません。ただし、このようなレジオネラ属菌でも遺伝子検査は陽性となりますので、遺伝子検査の結果は水の中にレジオネラ属菌が生存しているという事実を示していることが考えられます。

2 衛生管理の必要性

1) 結果1の場合は、これまで通り、衛生管理を継続してください。

2) 結果2、3、4の場合は、衛生管理上の注意が必要です。汚染が疑われる場所の消毒・清掃が必要です。また、レジオネラ属菌が増えないよう、常時、塩素などの消毒により管理する必要があります。