

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 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

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	佐々木 麻里	大分県衛生環境研究センター
淀谷 雄亮	川崎市健康安全研究所	中西 典子	神戸市健康科学研究所

#### 研究協力者

山口 友美	宮城県保健環境センター	武藤 千恵子	東京都健康安全研究センター
磯部 順子	富山県衛生研究所	枝川 亜希子	地方独立行政法人
森本 洋	北海道立衛生研究所		大阪健康安全基盤研究所
中筋 愛	タカラバイオ株式会社	吉崎 美和	タカラバイオ株式会社
小澤 賢介	デンカ株式会社	稲窪 大治	日本板硝子株式会社

#### 研究要旨

本研究では、入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握し、新たな検査法を確立・普及することを目的とし、1. 迅速な検査法の開発、2. 感染源特定のための検査法の確立、3. 公衆浴場における水系の総合的な汚染実態の解明を行った。

モバイル型 qPCR 装置（Picogene PCR1100、日本板硝子）を使用した迅速検査法では、これまでのプロトコルを改良した結果、平板培養法に対する感度は LAMP 法と同等（75%、3/4 検体）となった。

平板培養法に加えて、レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1 (Lp1) で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) 法を併用することによって、Lp1 の検出率が 7.8% (18/230 検体) から 11.3% (26/230 検体) となったため、感染源調査など Lp1 の検出が求められる際には有用な方法であると考えられた。

8 か所の地方衛生研究所において、2016～2020 年に浴槽水から分離されたレジオネラ属菌の検出状況を調査した結果、レジオネラ属菌の陽性率は 11.5～75.0%と機関によって差が認められた。同様に、Lp1 陽性率は 0～12.6%、Lp1 の病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子陽性率は 0.3～4.4%と、これらの値も機関によって差が認められた。加えて、分離された Lp1 菌株に占める *lag-1* 遺伝子の陽性率 (*lag-1*/Lp1) も、最も低い機関は 7.7%であったのに対し、最も高い機関は 50.0%であった。

16S アンプリコン解析の結果、各検体に占める菌種別リード割合の平均値は、浴槽水検体では *Pseudomonas* (14.5%)、シャワー水検体では *Phreatobacter* (15.1%) が最も高かった。レジオネラ属菌のリードの割合は、浴槽水検体では 0.8%、シャワー水検体では 0.1%であった。シャワー水については、菌叢の多様性が高い検体の多くから平板培養法でレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい豊富な栄養条件でレジオネラ属菌も増殖した可能性が考えられた。

## A 研究目的

2021年の国内におけるレジオネラ症患者報告数は、2,112件（暫定値）であり、前年比103%であった<sup>1,2)</sup>。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。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し、新たな検査法を確立・普及することを目的とし、1. 迅速な検査法の開発、2. 感染源特定のための検査法の確立、3. 公衆浴場における水系の総合的な汚染実態の解明を行う。

現在、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。このような培養法に替わる迅速検査法に対して、監視指導のためにリアルタイムに結果を提供すること、営業再開の時期を早めることなどの理由により、行政・業者双方からの要望があり、必要性は高い。近年、モバイル型qPCR装置が市販されており、採水現場で遺伝子検査が実施できる状況となっている。したがって本研究では、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、平板培養法や他の迅速検査であるLAMP法と相関が取れるよう、これまで構築してきたプロトコルを改良し、比較検討した。

国内における患者由来株の87%は*Legionella pneumophila* 血清群1 (Lp1) であるため<sup>3)</sup>、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、患者由来株と同一の菌種・血清群の菌株を効率よく検出することが求められる。したがって、これまで検討してきたLp1で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) を用いた選択的濃縮法について、複数の機関で実施し、その有用性を評価した。また、Lp1の中でもリポ多糖修飾のためのO-アセチルトランスフェラーゼをコードしている*lag-1* 遺伝子は、患者由来株の75%から検出され、病原性との関連も示唆されているため<sup>4,5)</sup>。そこで、本年

度は浴槽水由来株の*lag-1* 遺伝子保有率を調査した。

公衆浴場の水系の総合的な汚染実態を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いた16Sアンプリコン解析を行った。対象は、浴槽水に加え、近年、レジオネラ症の感染源として報告された公衆浴場のシャワー水とし<sup>6)</sup>、入浴施設の衛生管理に資する基盤となる知見とする。

## B 材料と方法

### 1 検査材料

8か所の地方衛生研究所(機関A~H)において、2016年以降に公衆浴場などから採水した試料を用いた。試料は、浴槽水、シャワー水、カラン水、採暖槽水であった。遺伝子検査には機関D・F、Lp1-IMB検査には機関A・E・F、16Sアンプリコン解析には機関Fの試料を用いた。

### 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）」に準じて各機関の方法で実施し、10CFU/100mL以上を検出とした。

### 3 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。

### 4 モバイルqPCR法

検水500mLをフィルターろ過後(ポリカーボネート、0.2μm、47mm)、核酸抽出試薬500μLを添加した手もみ式簡易破碎容器に入れ、室温で1分間手もみした。核酸抽出液5μLを鋳型として、マスターミックス17μLと混ぜ、qPCR反応を実施した。マスターミックスには、レジオネラ属菌に特異的な16S rRNA 遺伝子配列を標的としたプライマー、プローブおよび内部コントロール用プラス

ミドを作製し、Taq と共に添加した。qPCR 反応には、Picogene PCR1100（日本板硝子）を用いた。

## 5 Lp1-IMB 法

### 1) Lp1-IMB 作製方法

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、免疫磁気ビーズとした。

### 2) qPCR 法による Lp1 スクリーニング (Lp1-qPCR)

LAMP 法の際に抽出した DNA を鋳型として用いた。既報に従い、Lp1 特異的な qPCR 反応を実施した<sup>7)</sup>。

### 3) Lp1 の選択的濃縮分離

IMB による選択的濃縮法には、検水の 100 倍濃縮液または 5 倍希釈液を供試した。試料 1 mL に Lp1-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、ビーズを磁石で集め、PBS で洗浄した。この洗浄操作を 2 回実施した後、最終的に PBS 100  $\mu$ L に懸濁、ボルテックスでよく混和後、GVPC 寒天培地（日水製薬）1 枚にコンラージ棒で塗布し、35°C で 7 日間培養した。

## 6 *lag-1* 遺伝子の検出

浴槽水から分離された Lp1 菌株から DNA を抽出し、Kozak らの方法<sup>4)</sup>に従って PCR により *lag-1* 遺伝子を検出した。

## 7 16S アンプリコン解析

令和元年～2 年度に採水した浴槽水 59 検体およびシャワー水 34 検体について、検水 1,200 mL をフィルターろ過し（ポリカーボネート、0.22  $\mu$ m、47 mm）、ビーズでフィルターを破碎後、Dneasy PowerBiofilm Kit（キアゲン）を用いて DNA を抽出した。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 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 RUN を実施し、QIIME2 で解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は、研究機関内外の倫理委員会等における承認手続きが必要となる研究には該当しない。

## C 結果

### 1 LAMP 法およびモバイル qPCR 法の結果

LAMP 法と平板培養法の相関は表 1A に示した。LAMP 法の平板培養法に対する感度は 75.0%（3/4 検体）であった。モバイル qPCR 法については、Ct 値のカットオフ値を 40、45、50 に設定し、平板培養法との相関を示した（表 1B～D）。モバイル qPCR 法の平板培養法に対する感度は、いずれのカットオフ値においても 75.0%（3/4 検体）であった。また、カットオフ値を 40 に設定した場合、偽陽性検体（平板培養は陰性であるが迅速検査法が陽性となった検体）を 33 から 8 まで減らすことができ、LAMP 法の 16 よりも低かった。

### 2 Lp1-IMB 法の結果

Lp1-qPCR 法を実施した結果、23.1%（40/352 検体）が陽性となり、平板培養法（14.7%、20/352 検体）および Lp1-IMB 法（6.2%、14/230 検体）の陽性率よりも高かった（表 2A）。しかしながら、平板培養法および Lp1-IMB 法で陽性となった検体のうち、7 および 6 検体は Lp1-qPCR 法が陰性であった。平板培養法と Lp1-IMB 法の相関を見ると、6 検体はどちらの方法でも陽性となったが、20 検体はいずれかの方法でのみ陽性となった（表 2B）。平板培養法に加えて Lp1-IMB 法を併用することによって、Lp1 の検出率が 7.8%（18/230 検体）から 11.3%（26/230 検体）となった。

### 3 浴槽水におけるレジオネラ属菌の *lag-1* 遺伝子の検出

8 か所の地方衛生研究所において、2016～2020

年に浴槽水から分離されたレジオネラ属菌の検出結果を示した(表3)。レジオネラ属菌の陽性率は、11.5~75.0%と機関によって差が認められた。同様に、Lp1 陽性率は0~12.6%、*lag-1* 遺伝子陽性率は0.3~4.4%と、これらの値も機関によって差が認められた。加えて、分離されたLp1 菌株に占める *lag-1* 遺伝子陽性率 (*lag-1*/Lp1) も、最も低い機関は7.7%であったのに対し、最も高い機関は50.0%であった。

#### 4 16S アンプリコン解析

16S アンプリコン解析で取得したリード数は、浴槽水検体で中央値85,333(14,125~201,261)、シャワー水で中央値87,243(20,774~187,709)であった。

各検体に占める菌種別リード割合の平均値は、上位10菌種のうち、浴槽水検体では *Pseudomonas* (14.5%)、シャワー水検体では *Phreatobacter* (15.1%) が最も高かった(表4)。3菌種 (*Methylobacterium-Methylorubrum*、*Obscuribacteraceae*、*Mycobacterium*) は、両方の検体から検出された。*Legionella* は、浴槽水検体の0.8%、シャワー水検体の0.1%であった。

浴槽水検体とシャワー水検体では、種の多様性を示す $\alpha$ 多様性(Faithの系統的多様性)は差が認められなかったが、種の相違度を示す $\beta$ 多様性(Weighted Unifrac距離)は異なる傾向であった(図1A, 1B)。シャワー水の水源別に見ると、井戸水の方が水道水より $\alpha$ 多様性が高く、 $\beta$ 多様性も異なる傾向であった(図1C, 1D)。

各検体の菌叢を見ると、水道水を使用しているシャワー水検体では Alphaproteobacteria の割合が高かった(図2)。一方、井戸水を使用している検体においては菌叢が多様であり、それらの検体の多くからレジオネラ属菌が分離された。

#### D 考察

モバイル型 qPCR 装置を使用した迅速検査法の

検討では、これまでのプロトコルを改良した結果、LAMP 法と同等の感度となった。更に、カットオフ値を40に設定することで、平板培養陰・迅速検査法陽性の検体をLAMP法より少なくでき、平板培養法と関連する方法であった。ただし、今年度の検体では平板培養陽性が4検体と少なかったため、モバイルqPCR法の感度を確認するためには、より多くの平板培養陽性検体を用いた検討が必要である。また、本プロトコルでは、ポアサイズ0.2 $\mu$ mのポリカーボネートフィルターで検水を500mL濃縮する必要がある。採水現場での濃縮・測定を実施する場合、より簡便な濃縮方法などについて検討し、プロトコルを更に改良することが望ましい。

感染源を特定するためには、環境検体から患者由来株の大半を占めるLp1を分離することが重要となるが、主な感染源である浴槽水からは、複数の血清群のレジオネラ属菌が分離される場合がある<sup>8)</sup>。現在、レジオネラ属菌を血清群、あるいは菌種により鑑別する培地などはないため、IMBによりLp1を選択的に濃縮分離する方法を検討している。Lp1-qPCR法は、平板培養法やLp1-IMB法と比較し陽性率が高いため、Lp1のスクリーニング法として有用である。ただし、検出下限値付近の検体などにおいては、平板培養法やLp1-IMB法でLp1が分離されても、Lp1-qPCR法が陰性となる場合があることに留意する必要がある。平板培養法とLp1-IMB法を比較すると、平板培養法でLp1を分離できない検体の一部からLp1-IMB法でLp1を分離できた一方、Lp1-IMB法でLp1を分離できなかった検体の一部から平板培養法でLp1を分離できた。夾雑菌やLp1以外のレジオネラ属菌が多い検体などにおいては、IMBの効果が低下すると考えられるため、平板培養法とLp1-IMB法を併用することでLp1の検出率を最も高くできる。感染源調査などLp1の検出が求められる際には有用な方法であると考えられた。

浴槽水におけるレジオネラ属菌の検出率は、地

域によって差が認められた。とりわけ病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子の検出率は、最も高い検査機関では半数の Lp1 から検出された。国内におけるレジオネラ症患者の罹患率は都道府県によって異なるため<sup>9)</sup>、地域における浴槽水のレジオネラ属菌汚染実態の差異がその要因となっている可能性について、今後検証する必要がある。

16S アンプリコン解析では、検体種（浴槽水とシャワー水）やシャワー水の水源（井戸水と水道水）によって菌叢が異なっていた。検体ごとに見ると、シャワー水については、菌叢の多様性が高い検体の多くから平板培養法でレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい豊富な栄養条件でレジオネラ属菌も増殖した可能性がある。また、アメーバなどの存在によって共培養された可能性も考えられたため、18S アンプリコン解析なども用いて検水の菌叢とレジオネラ属菌の検出状況についてより詳細に解析する必要がある。

## E 結論

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、これまでのプロトコルを改良した結果、LAMP 法と同等の感度となった。平板培養法と Lp1-IMB 法を併用することで Lp1 の検出率を最も高くでき、感染源調査など Lp1 の検出が求められる際には有用な方法であると考えられた。病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子の検出率は、最も高い検査機関では半数の Lp1 から検出された。16S アンプリコン解析の結果、シャワー水については、菌叢の多様性が高い検体の多くから平板培養法でレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい豊富な栄養条件でレジオネラ属菌も増殖した可能性がある。

## 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 2021 年第 52 週。  
[https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/10886-idwr-](https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/10886-idwr-sokuho-data-j-2152.html)

[sokuho-data-j-2152.html](https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10411-report-ja2020-20.html)

- 2) 国立感染症研究所発生動向調査年別報告数一覧（全数把握）  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10411-report-ja2020-20.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) Kozak NA et al. Distribution of *lag-1* alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J Clin Microbiol.* 2009, 47(8), 2525-2535.
- 5) Wee BA, et al. Population analysis of *Legionella pneumophila* reveals a basis for resistance to complement-mediated killing. *Nat Commun.* 2021. 12(1), doi: 10.1038/s41467-021-27478-z.
- 6) 石山 康史 他. シャワー水を感染源としたレジオネラ症例について. 病原微生物検出情報 (IASR). 2010, 31, 331-332.
- 7) Mérault N et al. Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. *Appl Environ Microbiol.* 2011, 77(5), 1708-1717.
- 8) 平塚貴大. 2017 年に広島県で発生したレジオネラ症集団感染事例案について. 平成 29 年度生活衛生関係技術担当者研修会資料, 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課.
- 9) レジオネラ症 2008.1~2012.12. 病原微生物検出情報 (IASR). 2013, 34, 155-156.

## F 研究発表

- 1) Kanatani J et al. Detection of *Legionella* species, the influence of precipitation on the amount of *Legionella* DNA, and bacterial microbiome in aerosols from outdoor sites near asphalt roads in Toyama Prefecture, Japan. *BMC Microbiol.* 2021, 21(1):215. doi: 10.1186/s12866-021-02275-2.

G 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表 1. 迅速検査法の結果

A)					B)				
		培養					培養		
		+	-	計			+	-	計
LAMP	+	3	16	19	モバイルqPCR	+	3	33	36
	-	1	60	61	Ct 値 ≤ 50	-	1	32	33
		4	76	80			4	65	69

C)					D)				
		培養					培養		
		+	-	計			+	-	計
モバイルqPCR	+	3	33	36	モバイルqPCR	+	3	8	11
Ct 値 ≤ 45	-	1	32	33	Ct 値 ≤ 40	-	1	57	58
		4	65	69			4	65	69

表 2. 2018～2021 年に採水された検水における Lp1 の検出結果

A)				
Lp1陽性率	検体数	陽性数	%	備考
Lp1-qPCR	352	40	23.1	
平板培養	352	20	14.7	7検体はLp1-qPCR陰性
Lp1-IMB	230	14	6.2	6検体はLp1-qPCR陰性

B)				
		Lp1-IMB		
		+	-	計
平板培養	+	6	12	18
	-	8	204	212
計		14	216	230

表 3. 2016～2020 年に採水された浴槽水のレジオネラ属菌検出結果

機関	検体数 (延べ)				
	N	L. spp 陽性 N (%)	Lp1 陽性 N (%)	lag-1 陽性 N (%)	lag-1/Lp1 (%)
A	623	159 (25.5)	26 (4.2)	2 (0.3)	7.7
B	604	88 (14.6)	35 (5.8)	5 (0.8)	14.3
C	590	185 (31.4)	67 (11.4)	26 (4.4)	38.8
D	287	33 (11.5)	7 (2.4)	NT	NT
E	222	103 (46.4)	28 (12.6)	4 (1.8)	14.3
F	205	38 (18.5)	18 (8.8)	9 (4.4)	50.0
G	78	19 (24.4)	7 (9.0)	NT	NT
H	4	3 (75.0)	0 (0)	NT	NT

表 4. 16S アンプリコン解析で検出された主な菌種 (Genus level)

Source	Bath water		Shower water	
No. of samples	59		34	
Amplicon Sequence Variants	1568		1043	
Top10		%		%
1	<i>Pseudomonas</i>	14.5	<i>Phreatobacter</i>	15.1
2	Unknown	7.6	<i>Sphingomonas</i>	9.4
3	<i>Staphylococcus</i>	7.2	DSSF69	8.3
4	<i>Candidatus_Obscuribacter</i>	6.1	<i>Novosphingobium</i>	6.8
5	Uncultured	4.6	<i>Mycobacterium</i>	3.4
6	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	2.5	<i>Obscuribacteraceae</i>	3.4
7	<i>Obscuribacteraceae</i>	2.4	<i>Blastomonas</i>	3.1
8	Unknown	2.3	SM2D12	3
9	<i>Cutibacterium</i>	2.3	<i>Bradyrhizobium</i>	2.9
10	<i>Mycobacterium</i>	2.2	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	2.9
	<i>Legionella</i>	0.8	<i>Legionella</i>	0.1

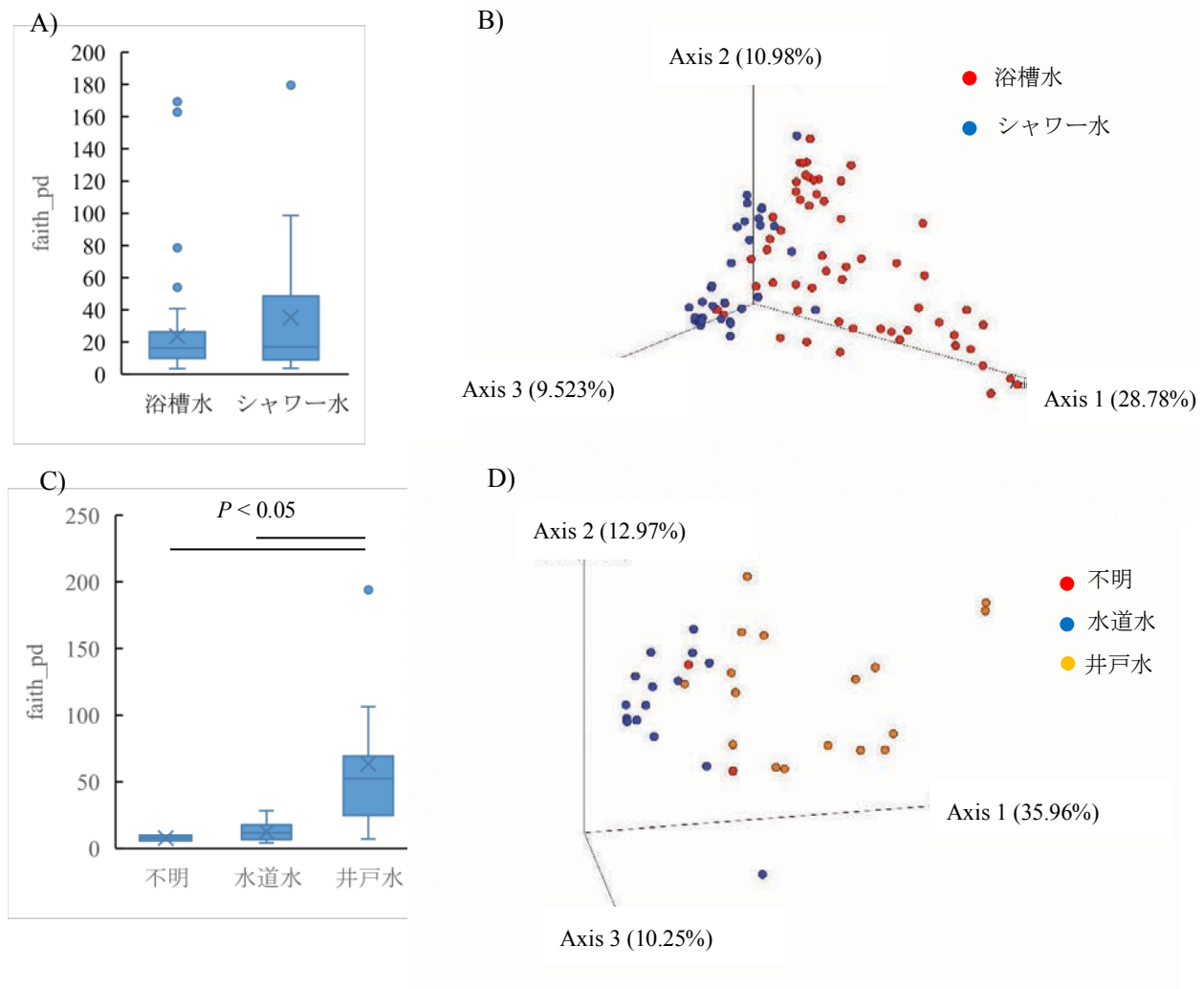


図 1. 16S アンプリコン解析による  $\alpha$  および  $\beta$  多様性

A) 検体種別の  $\alpha$  多様性    B) 検体種別の  $\beta$  多様性

C) シャワー水の水源別  $\alpha$  多様性    D) シャワー水の水源別  $\alpha$  多様性



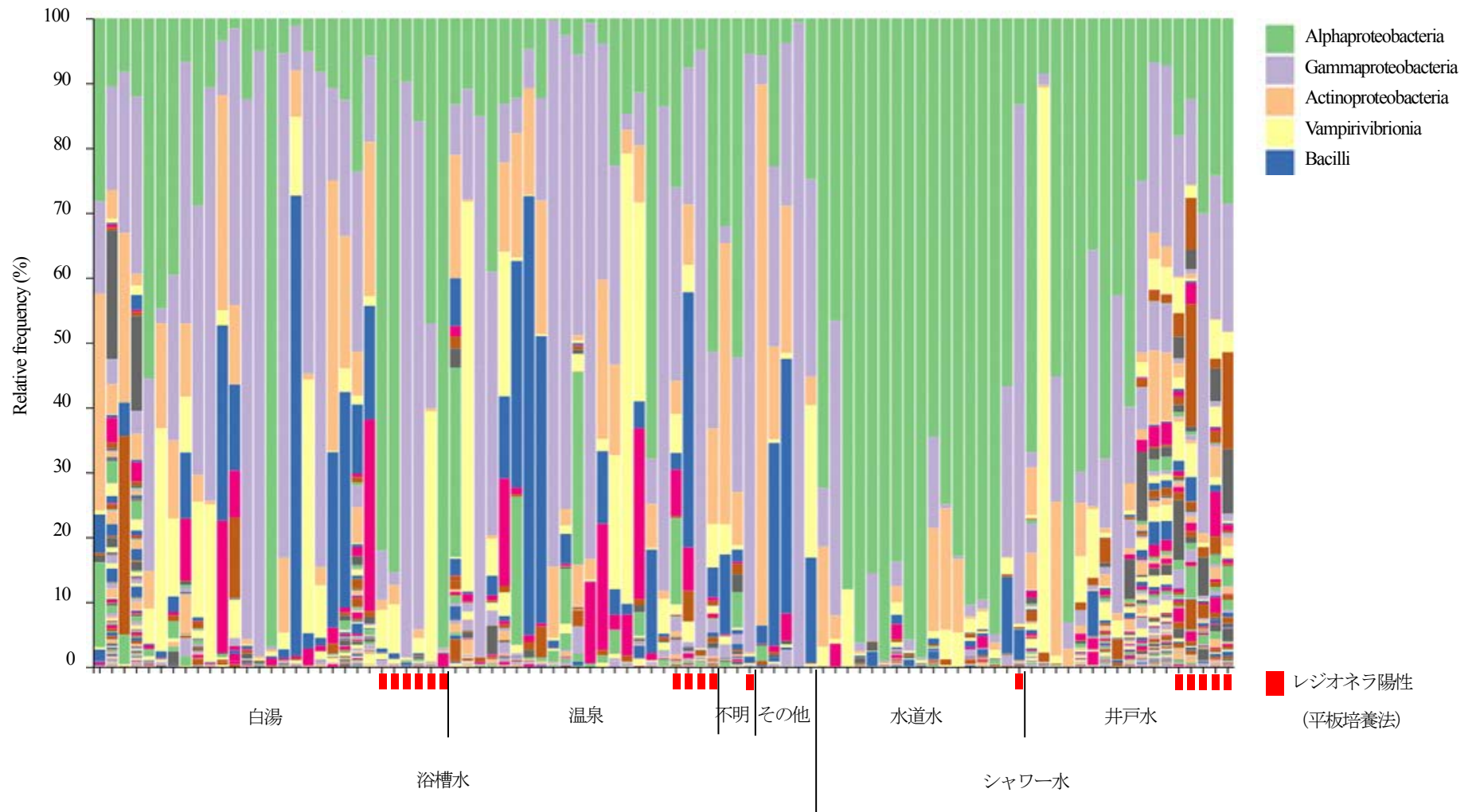


図2. 16S アンプリコン解析による各検水の菌叢 (Class level)