

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	森本 洋	北海道立衛生研究所
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
佐々木 麻里	大分県衛生環境研究センター		

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 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
塩崎 晋啓	日本板硝子株式会社	水谷 幸仁	日本板硝子株式会社
村尾 拓哉	日本板硝子株式会社	森中 りえか	株式会社ファスマック

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。

LCEMA-qPCR法、PALSAR法、モバイル qPCR法（Picogene PCR1100 使用）では、これまでのプロトコルを改良した結果、より平板培養法と相関する方法となった。

平板培養法に加えて免疫磁気ビーズ（Lp-IMB）法を併用することによって、特定の血清群の菌検出率が向上したため、感染源調査などの際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%、*lag-1*遺伝子陽性率は0.3～4.4%、分離されたLp1菌株に占める*lag-1*遺伝子の陽性率（*lag-1*/Lp1）は7.7～50.0%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^{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。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。現在、死菌由来DNAのPCR増幅を阻害するEthidium monoazide (EMA)と液体培地による前培養を組み合わせた「生菌迅速検査法 (LC EMA-qPCR法)」が開発され³⁾、試薬が市販されているが、本研究ではカラムを使用した簡易抽出法によるLC EMA-qPCR法について検討した。また、レジオネラ属菌特異的16S rRNAを標的とし、プレート上のDNAプローブに結合させて検出するPALSAR法については、シャワー・カラン水を対象とした検査において感度を上げるため、プロトコルを改良し、検討した。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、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プロトコルを構築し、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⁴⁾、感染源特定のために必要となる感染源疑いの環境検体が

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、レジオネラ・ニューモフィラで感作した免疫磁気ビーズ (Lp-IMB) を用いた選択的濃縮法について検討し、その有用性を評価した。また、レジオネラ・ニューモフィラ血清群1 (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^{5,6)}、複数の検査機関において浴槽水由来株の *lag-1* 遺伝子保有率を調査した。

近年、公衆浴場のシャワー水を原因としたレジオネラ症感染事例が報告されている⁷⁾。そこで、浴槽水だけでなくシャワー・カラン水も対象とし、培養検査のみならず、16S アンプリコン解析による結果も踏まえて公衆浴場の水系の総合的な汚染実態を明らかにし、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、主に浴槽水、シャワー水、カラン水、採暖槽水であったが、一部プール水なども用いた。遺伝子検査には機関A・B・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、10 CFU/100 ml 以上を検出とした。

3 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。

4 LC EMA-qPCR 法

LC EMA-qPCR 法は、使用する各種試薬の取扱説明書に従い実施した。1 検体につき、3 種類の方法で DNA を抽出した。Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ)、NucleoSpin Tissue (タカラバイオ)、Lysis Buffer for *Legionella* Type2 (カラム抽出、タカラバイオ) を用いてそれぞれ 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。反応後、添付の取扱説明書に記載された方法で、16S rRNA 遺伝子のコピー数を CFU 相当値に換算し、定量値 1 CFU 相当/100 ml 以上を陽性と判定した。また、平板培養法の菌数との散布図を作成した。ただし、平板培養法における 10 CFU/100 ml 未満、qPCR における CFU 相当値 1 未満はそれぞれ log 値 0 にプロットした。

5 PALSAR 法

シャワー・カラン水についてのみ検討した。PALSAR 法は、100 倍濃縮検体 4 ml を遠心後、上清を除去し、活性炭を除いた MWY 液体培地 1 ml に懸濁した。36°C で 18 時間培養後、添付の取扱説明書に従い実施した。なお、溶菌条件は 70°C 5 分とした。目視の発色確認により 16S rRNA が検出された場合を陽性と判定した。当日中に測定しない場合は、増菌液を 4°C で保存した。

6 モバイル qPCR 法

1) qPCR 反応系の確認

1 検体につき、2 種類の方法で DNA を抽出した。検水の 100 倍濃縮液 1 ml および 2 ml について、それぞれ Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) および Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) に付属のアルカリ熱抽出試薬を用いて、取扱説明書に従い DNA を抽出した。同時に、検水の 100 倍濃縮液 1 ml を 15,000 rpm で 5 分間遠心

後、上清を除去し、滅菌水 50 µl に懸濁したものを鋳型とした。レジオネラ属菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子配列を標的として、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 qPCR 反応を実施した。qPCR 反応には、モバイル qPCR 装置 Picogene PCR1100 (日本板硝子) を用いた。

比較として、Lysis Buffer for *Legionella* で抽出した DNA については qPCR 装置 (TP900)、アルカリ熱抽出試薬で抽出した DNA については LAMP 装置 (LA-320C) を用いて、それぞれ反応を実施した。

また、TP900 を用いた qPCR 法および Picogene PCR1100 を用いたモバイル qPCR 法における 16S rRNA 遺伝子のコピー数から散布図を作成した。ただし、コピー数 1 未満は log 値 0 にプロットした。

2) 実検体での検討

検水 500 ml をフィルターろ過後 (ポリカーボネート、0.2 µm、47 mm)、核酸抽出試薬 500 µl 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 5 µl を鋳型として、マスターミックス 17 µl と混ぜ、qPCR 反応を実施した。

7 Lp-IMB 法

1) Lp-IMB 作製方法

対象を Lp1、2、3 の 3 血清群とし、IMB は自家調製 IMB と D 社調製 IMB の 2 種類を用いた。自家調製 IMB は、市販されているビーズ粒子 (DynabeadsTM M-280 Sheep anti-Rabbit IgG) をレジオネラ免疫血清で感作した。方法は国立感染症研究所の病原体検出マニュアルの中の「腸管出血性大腸菌検査検出診断マニュアル」に準拠した⁸⁾。D 社調製 IMB は、目的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) Lp-IMB による回収率の比較

添加回収には当所で凍結保管している Lp1、Lp2、Lp3 を BCYE 寒天培地 (ビオメリュー) に画線塗抹し、30°C で 3 日間培養した。その培養菌を McFarland 2.0 となるよう PBS に懸濁し、10 倍段階希釈して最終的に菌濃度 1×10^{14} CFU/ml の菌液を作製した。この菌懸濁液 1 ml に Lp-IMB を 25 μ l 接種し、10 分毎に転倒混和しながら 30 分間ビーズに吸着させた。PBS で 2 回洗浄したのち、PBS にて 100 または 200 μ l に懸濁してビーズ濃縮液とした。これら 100 μ l を BCYE 寒天培地にコンラージ棒で塗布し、湿潤箱に入れて、35°C で 7 日間培養し、3 日目以降は斜光法で観察した。レジオネラを疑うコロニーは血液寒天と BCYE 寒天培地に再分離し、BCYE 寒天培地のみに発育した菌をレジオネラ属菌とし、その数を測定した。

3) 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⁹⁾。

4) 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 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、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 μ 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。

8 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⁵⁾に従って PCR により lag-1 遺伝子を検出した。

9 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 μ 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 平板培養法による結果

318 検体中、78 検体 (24.5%) 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、10～99 CFU/100 ml が 52 検体 (16.4%)、100～999 CFU/100 ml が 19 検体 (6.0%)、1,000 CFU/100 ml 以上が 7 検体 (2.2%) であった。分離菌の血清群別の結果、Lp6 が 38 検体から分離され、最も多かった (表 2)。次に多かったのは、Lp1 (28 検体) であった。また、Lp 以外の菌種が 12 検体から分離された。

2 LC EMA-qPCR 法による結果

各抽出法における、平板培養法に対する相関は表 3 に示した。Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を用いた場合、平板培養法に対する感度 (91.2%)・特異度 (78.3%)・陽性的中率 (55.4%)・陰性的中率 (96.8%)・一致率 (81.2%) 全てにおいて、他の 2 つの方法と比較し最も高かった。とりわけ、感度および陰性的中率は、NucleoSpin Tissue を用いた場合よりも有意に高かった ($P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるカイ二乗検定)。Lysis Buffer for *Legionella* と Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を用いた場合では、感度などに有意な差はなかった。

各抽出法を用いた LC EMA-qPCR 法の定量値

(CFU 相当値) と平板培養法の菌数との相関は、それぞれ $r = 0.4172$ (Lysis Buffer for *Legionella*)、 $r = 0.522$ (Lysis Buffer for *Legionella* Type2)、 $r = 0.1931$ (NucleoSpin Tissue) であった (図 1)。

3 PALSAR 法による結果

35 検体のシャワー・カラン水について検討した結果、平板培養法に対する感度は 100%、特異度は 60.7%、陽性的中率は 38.9%、陰性的中率は 100%、一致率は 68.6% であった (表 4)。

4 モバイル qPCR 法における qPCR 反応系の確認

24 検体について検討した (表 5)。Lysis Buffer for *Legionella* およびアルカリ熱抽出液を用いて DNA を抽出した場合、モバイル qPCR 法における平板培養法に対する感度などは、既存の機器を使用した LAMP 法 (LA-320C) および qPCR 法 (TP900) と同等であった。一方で、入浴水の濃縮液を鋳型としてそのまま qPCR 反応を実施した場合は、平板培養法に対する感度は 33.3% と、Lysis Buffer for *Legionella* およびアルカリ熱抽出液を用いた場合よりも有意に低かった ($P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるフィッシャーの正確確率検定)。モバイル qPCR 法における各抽出法のコピー数を qPCR 法 (TP900) のコピー数と比較した結果においても、濃縮液を鋳型として用いた場合は、全体的に定量値が低かった (図 2)。

1 検体については、アルカリ熱抽出した DNA を用いたモバイル qPCR 法で反応阻害が確認され、陰性となった。この DNA を用いた LAMP 法では陽性であった。また、同一検体から Lysis Buffer for *Legionella* で抽出した DNA を用いた qPCR 法およびモバイル qPCR 法も陽性であった。

5 実検体を用いたモバイル qPCR 法の結果

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 (表 6A)。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 6B~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。

6 Lp-IMB の回収率の比較

Lp1 の回収率の結果を表 7 に示した。自家調製 IMB による Lp1 の回収率は 0.0~1.5%、平均 0.33% であった。これに対し、D 社調製 IMB を用いた場合の回収率は 50.6~113.3%、平均 80.6% と、自家調製 IMB に比べ高かった。ただし、D 社調製 IMB による添加回収実験では、 10^3 CFU/mL 以上を添加した場合、回収された菌が多く、計測不能として平均値には加えなかった。

Lp2、3 の 2 血清群を対象とした添加回収の結果を表 8 に示した。Lp1 と同様に発育菌が多く、菌数測定ができなかった場合、その回収率は解析から外した。自家調製 IMB による回収率は 0.0~0.4%、平均 0.1% であった。これに対し、D 社調製 IMB による回収率は 8.3~100.0%、平均 48.2% と、Lp1 の場合と同様、D 社調製 IMB で高かった。

7 実検体を用いた Lp1-qPCR 法および 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 9A)。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 9B)。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。

8 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 10)。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。

9 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 菌種を見ると、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 11)。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 α 多様性 (Faith の系統的多様性) において差が認められなかったが、種の相違度を示す β 多様性 (Weighted Unifrac 距離) は異なる傾向であった(図 3)。シャワー水の水源別に見ると、井戸水の方が水道水より α 多様性が高く、 β 多様性も異なる傾向であった。

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 4)。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

LC EMA-qPCR 法における DNA 抽出では、Lysis Buffer for *Legionella* を使用しているが、本試薬は、界面活性剤と PCR 阻害物質を吸着する樹脂からなり、遠心操作後に吸着樹脂の上にゲル層が形成され、上清を回収するプロトコルとなっている。しかしながら、容量が 50 μ l と少なく、ピペット操作のミスによりゲルや樹脂を回収してしまうと、その後の qPCR 反応に反応阻害などの影響を与える可能性がある。本研究では、この可能性を防ぐため、ゲルを含まずカラムで樹脂を除去する抽出法による新たな試薬 (Lysis Buffer for *Legionella* Type2) を検討した。平板培養法との比較では、従来の Lysis Buffer for *Legionella* を使用した場合と同等の結果であり、問題なく使用できることを確認できた。一方で、NucleoSpin Tissue を使用した場合は、平板培養法に対する感度 (61.8%) および陰性的中率 (87.1%) は、Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を使用した場合よりも有意に低かった。NucleoSpin Tissue はカラムを使用した DNA 抽出法であるため、純度の高い DNA を得ることができる。したがって、反応阻害物質の存在が予想される検体においては有用となる場合もある。しかしながら、抽出工程が多いため、DNA の収量が低下し、感度や陰性的中率が低下すると考えられた。LC EMA-qPCR 法における DNA 抽出には、既にプロトコルに記載されている Lysis Buffer for *Legionella*、または新たな試薬である Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を使用するのが望ましい。

PALSAR 法におけるこれまでの検討では、シャワー・カラン水を対象とした場合、浴槽水などを対象とした場合と比較し、感度が低かった¹⁰⁾。しかしながら、MWY 液体培地で一晚増菌する方法では、平板培養法に対する感度は 100%であったため、これらの検体では増菌培養を実施することが

望ましい。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、Lysis Buffer for *Legionella* またはアルカリ抽出液で抽出した DNA を用いた場合、平板培養法との相関は既存の機器を使用した LAMP 法 (LA-320C) および qPCR 法 (TP900) と同等の結果であった。qPCR 法との定量値の比較においても、概ね相関していた。ただし、1 検体については、アルカリ熱抽出した DNA を用いたモバイル qPCR 法でのみ反応阻害が確認され、陰性となった。遺伝子検査法においては、反応阻害などにより偽陰性となることを防ぐため、内部コントロールにより反応阻害を確認することは重要である。DNA を抽出せず、濃縮液をそのまま qPCR 反応に使用した検討では、平板培養法に対する感度 (33.3%) は、Lysis Buffer for *Legionella* またはアルカリ抽出液で抽出した DNA を用いた場合よりも、有意に低かった。採水現場で測定することを想定した場合、検査機器、工程はできる限り簡略化することが求められるため、濃縮液を直接鋳型とすることを検討したが、感度は低かった。

そこで、新たな核酸抽出試薬を検討した結果、実検体を用いた検討において 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、平板培養法と相関する方法であった。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 μm のポリカーボネートフィルターで検水を 500 ml 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¹¹⁾。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¹²⁾、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

LCEMA-qPCR 法、PALSAR 法、モバイル qPCR 法 (Picogene PCR1100 使用) では、これまでのプロトコルを改良した結果、より平板培養法と関連する方法となった。平板培養法に加えて免疫磁気ビーズ (Lp-IMB) 法を併用することによって、特定の血清群の菌検出率が向上したため、感染源調査などの際は有用な方法であると考えられた。レジオネラ属菌の陽性率、Lp1 陽性率、*lag-1* 遺伝子陽性率、分離された Lp1 菌株に占める *lag-1* 遺伝子の陽性率 (*lag-1*/Lp1) は、地域によって差が認められた。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-sokuho-data-j-2152.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) 烏谷 竜哉 他、液体培養 (Liquid Culture) EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討、公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究、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 平成 24 年度分担研究報告書, 71-84.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 腸管出血性大腸菌感染症 2019 年 9 月版. 病原体検出マニュアル.
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20190920.pdf>
- 9) 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.
- 10) 磯部順子 他. レジオネラ属菌迅速検査法の評価. 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」平成 28~30 年度総合研究報告書, 19-33, 2019.
- 11) 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.
- 12) 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) 金谷潤一 他. 環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価. 日本防菌防黴学会誌. 2020, 48, 515-522.
- 2) 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. 平板培養法の結果

菌数(CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	240	(75.5)
10-99	52	(16.4)
100-999	19	(6.0)
1,000以上	7	(2.2)
計	318	(100)

表 2. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 1	28
SG 2	1
SG 3	10
SG 4	5
SG 5	15
SG 6	38
SG 8	7
SG 9	5
SG 12	1
SG 13	1
SG 14	1
UT	9
<i>Legionella</i> spp.	12

表 3. LC EMA-qPCR 法における平板培養法との相関 (149 検体、平板培養陽性 34 検体)

DNA抽出法	培養法に対する(%) :				
	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率	一致率
Lysis Buffer for <i>Legionella</i>	85.3%	73.9%	49.2%	94.4%	76.5%
Lysis Buffer for <i>Legionella</i> Type2	91.2%*	78.3%	55.4%	96.8%*	81.2%
NucleoSpin Tissue	61.8%*	76.5%	43.8%	87.1%*	73.2%

* $P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるカイ二乗検定

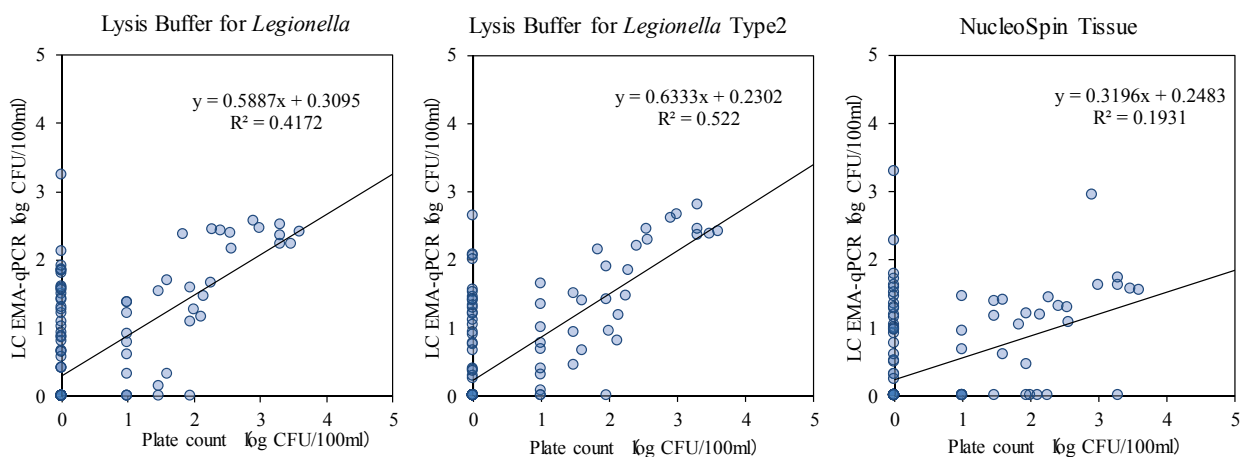


図 1 LC EMA-qPCR 法と平板培養法との定量値の相関

表 4. シャワー・カラン水における PALSAR 法の結果

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
PALSAR 法	陽性	7	11	18
	陰性	0	17	17
計		7	28	35

感度100%、特異度60.7%、陽性的中率38.9%、
陰性的中率100%、一致率68.6%

表 5. 迅速検査法と平板培養法との相関 (24 検体、平板培養陽性 15 検体)

迅速検査法(DNA抽出法)	培養法に対する(%) :				
	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率	一致率
モバイルqPCR (Lysis Buffer for <i>Legionella</i>)	93.3%A	66.7%	82.4%	85.7%	83.3%
モバイルqPCR (アルカリ熱抽出)	86.7%A	66.7%	81.3%	75.0%	79.2%
モバイルqPCR (未抽出、濃縮液を鋳型)	33.3%B	77.8%	71.4%	41.2%	50.0%
qPCR (Lysis Buffer for <i>Legionella</i>)	93.3%	66.7%	82.4%	85.7%	83.3%
LAMP (アルカリ熱抽出)	100.0%	66.7%	83.3%	100.0%	87.5%

AとBは有意差あり ($P < 0.05$)、ボンフェローニ補正によるフィッシャーの正確確率検定

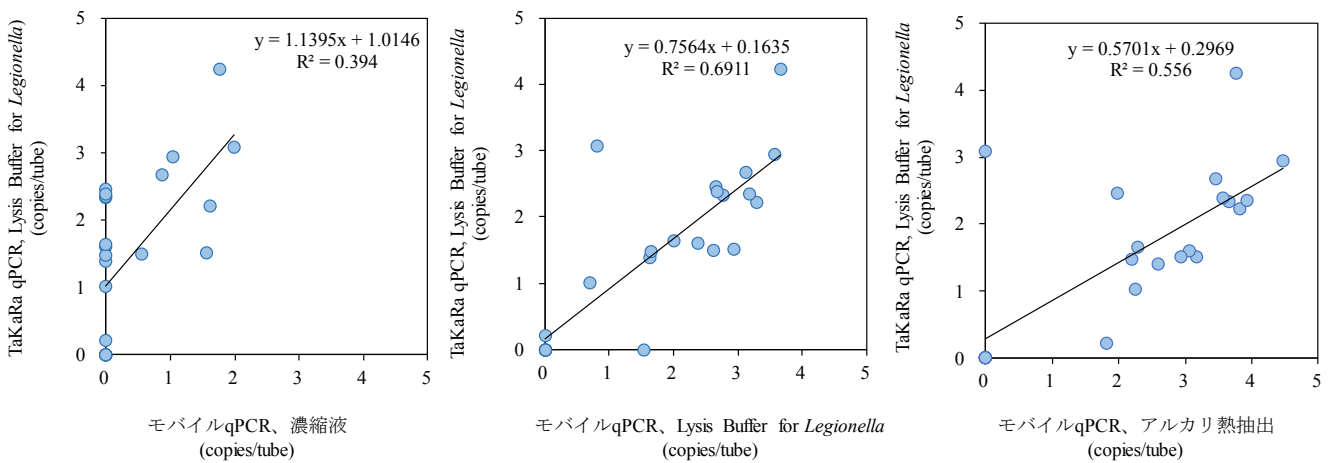


図 2 qPCR 法とモバイル qPCR 法との定量値の相関

表 6. 実検体を用いたモバイル qPCR 法の結果

A)

		培養		計
		+	-	
LAMP	+	3	16	19
	-	1	60	61
		4	76	80

B)

		培養		計
		+	-	
モバイルqPCR	+	3	33	36
Ct 値 ≤ 50	-	1	32	33
		4	65	69

C)

		培養		計
		+	-	
モバイルqPCR	+	3	33	36
Ct 値 ≤ 45	-	1	32	33
		4	65	69

D)

		培養		計
		+	-	
モバイルqPCR	+	3	8	11
Ct 値 ≤ 40	-	1	57	58
		4	65	69

表 7. Lp1-IMB による添加回収の結果

	理論値 CFU/1,000 ml	自家調製IMB		D社調製IMB	
		測定値	回収率 (%)	測定値	回収率 (%)
1	30,000	119	0.40	>1,000	計測不能
	3,000	5	0.17	>1,000	計測不能
	300	0	0.00	237	79.0
	30	0	0.00	34	113.3
2	53,000	146	0.28	>1,000	計測不能
	5,300	12	0.23	>1,000	計測不能
	530	0	0.00	374	70.6
	53	0	0.00	42	79.2
3	67,000	282	0.42	>1,000	計測不能
	6,700	33	0.49	>1,000	計測不能
	670	3	0.45	339	50.6
	67	1	1.5	61	91.0
平均			0.33		80.6

表 8. Lp2、Lp3-IMB による添加回収の結果

	理論値 CFU/1,000 ml	自家調製MB		D社調製IMB	
		測定値	回収率 (%)	測定値	回収率 (%)
Lp2	14000	2	0.0	>1,000	計測不能
	1400	1	0.1	>1,000	計測不能
	140	0	0.0	126	90.0
	14	0	0.0	14	100.0
	27000	44	0.2	>1,000	計測不能
	2700	12	0.4	>1,000	計測不能
	270	1	0.4	162	60.0
	27	0	0.0	13	48.1
Lp3	24000	11	0.05	>1,000	計測不能
	2400	1	0.04	497	20.7
	240	0	0.0	24	10.0
	24	0	0.0	2	8.3
平均			0.1		48.2

表 9. 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 10. 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 11. 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

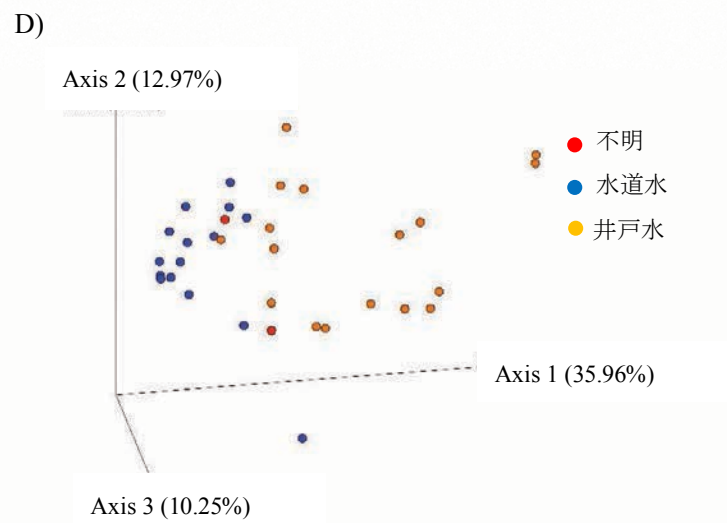
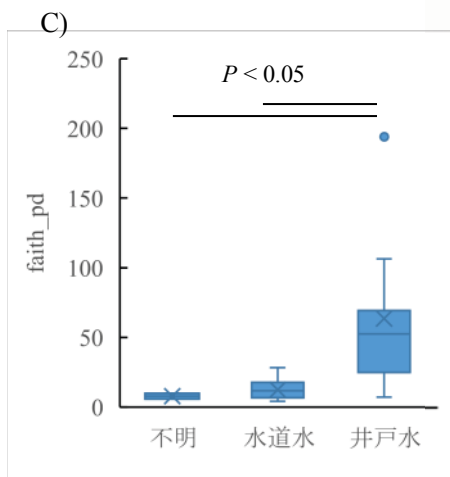
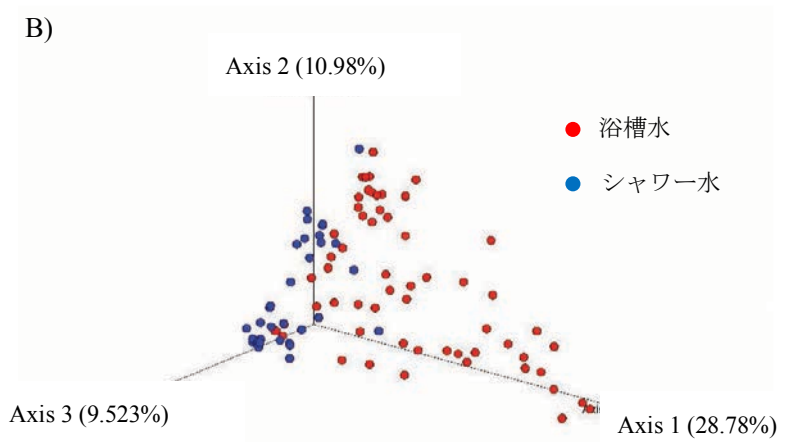
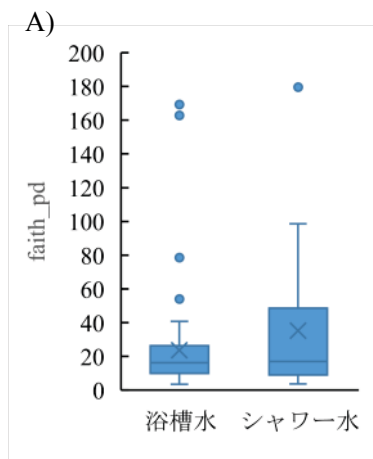


図 3. 16S アンプリコン解析による α および β 多様性

A) 検体種別の α 多様性 B) 検体種別の β 多様性

C) シャワー水の水源別 α 多様性 D) シャワー水の水源別 α 多様性

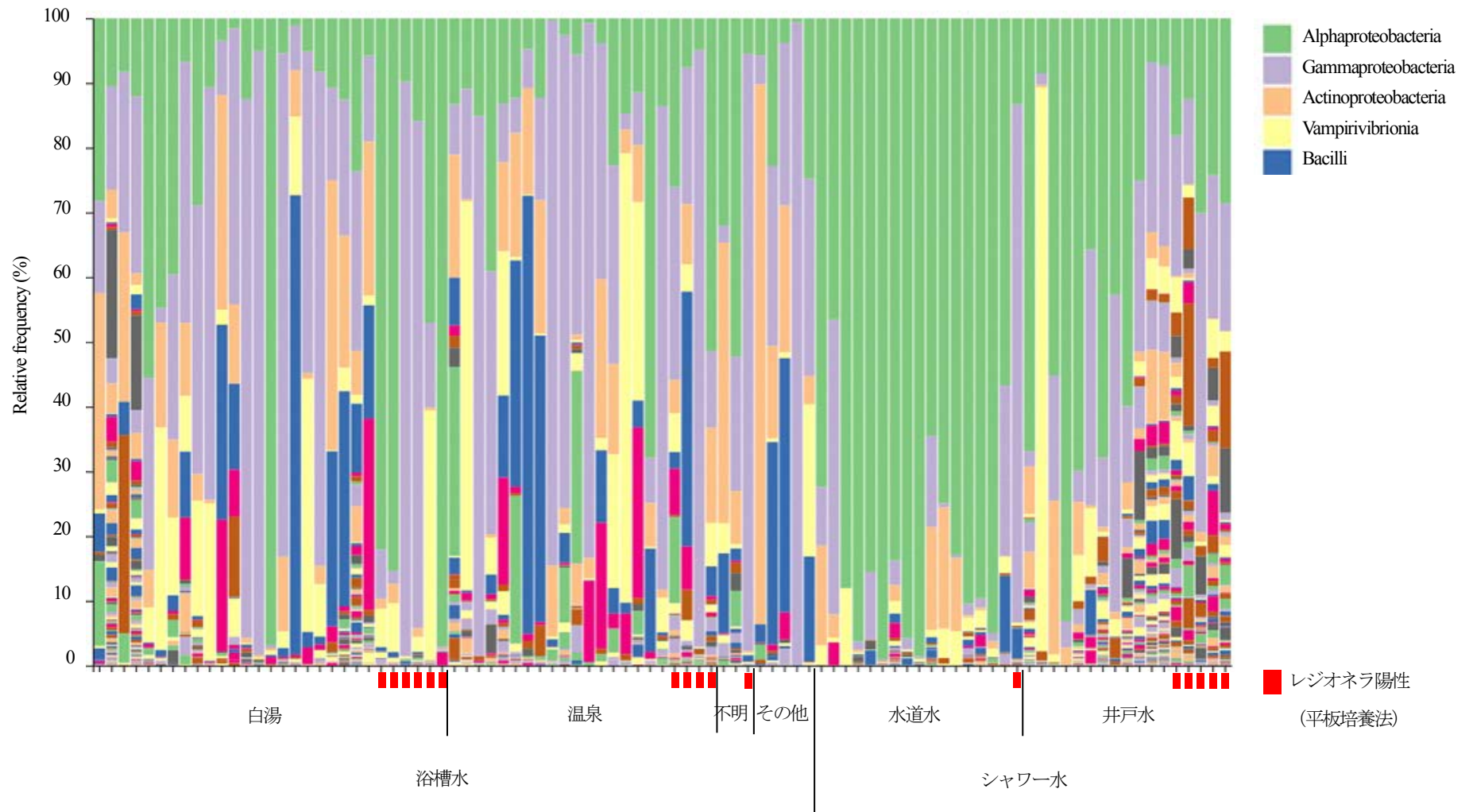


図4. 16S アンプリコン解析による各検水の菌叢 (Class level)