

レジオネラ症患者発生時の感染源調査ならびに公衆浴場等の施設管理におけるレジオネラ属菌検査の遺伝子抽出法の評価

武藤 千恵子^a, 辻 麻美^a, 田部井 由紀子^a, 市川 めぐみ^a,
石上 武^a, 鈴木 俊也^a, 保坂 三継^b

東京都ではレジオネラ症患者発生時に感染源調査のために、患者利用施設等のレジオネラ属菌検査に培養検査と遺伝子検査を同時に行い、遺伝子検査が陽性の場合には、施設の改善措置後の再検査で陰性の確認が取れるまで施設の使用中止を指示している。また、公衆浴場等の施設管理については、レジオネラが 10 CFU/100 mL 以上検出された施設の改善措置後の再検査として遺伝子検査を導入し、陰性の場合には速やかな設備の使用再開を行っている。現在、遺伝子検査法はキット付属の簡易抽出法による LAMP 法を用いているが、その結果と培養検査の結果が一致しない場合が認められる。そこで、DNA 抽出方法に着目し、簡易抽出法とカラム抽出法の培養法に対する感度および特異度について評価した。その結果、感染源調査では感度の高い簡易抽出法で LAMP 法を行うことで、感染者が施設を利用した際のレジオネラの存在の有無を迅速に示すことができると考えられた。一方、施設の改善措置後の再検査においては、特異度の高いカラム抽出法で LAMP 法を行うことで培養法との結果の不一致は改善され、今まで以上に速やかに設備の使用再開を判断することができると考えられた。

キーワード: レジオネラ属菌, LAMP法, 浴槽水, プール水,

はじめに

東京都におけるレジオネラ症患者の報告数は、LAMP法による喀痰検査が保険適用となった平成23年以降増加し続けている(図1)。レジオネラ属菌検査法は厚生労働省健康局生活衛生課長通知として平成27年3月末に発出された「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止マニュアル」¹⁾において、レジオネラ属菌の遺伝子を用いた迅速検査の活用について記載されており、その利用目的として、患者発生時の感染源調査(原因究明)、改善措置後の陰性確認検査(営業再開の目安)および洗浄効果の判定(陰性証明)等が挙げられている。東京都でも「レジオネラ症患者発生時における施設調査マニュアル」²⁾を作成し、レジオネラ症患者発生時に感染源調査のためには、患者利用施設等のレジオネラ属菌検査に培養検査と遺伝子検査を同時に行い、遺伝子検査が陽性になった場合には、施設の改善措置後の再検査で陰性確認が取れるまで施設の使用中止を指示している。また、公衆浴場等の施設管理については、「公衆浴場の設置場所の配置及び衛生措置等の基準に関する条例」³⁾、「旅館業法施行条例」⁴⁾および「プール等取締条例施行規則」⁵⁾において、レジオネラ属菌の水質基準は「検出されないこと」とされている。「検出されないこと」とはレジオネラ属菌が「10 CFU/100 mL未満」として運用されており、この基準を超えた場合には施設に対して改善指導が

行われている。改善指導後の行政による再検査については、東京都福祉保健局健康安全部長通知によって指導等の要綱が制定されており⁶⁾、遺伝子検査が導入され陰性の場合には速やかな設備の使用再開が行われている。

現在、遺伝子検査法にはレジオネラ検出キットに付属のDNA簡易抽出法によりDNAを抽出し、その後LAMP法を実施しているが、遺伝子検査結果と培養検査結果が一致しない場合があることを我々は報告している⁷⁾。そこで、今回はDNAの抽出法に着目し、キット付属の簡易抽出法とカラム抽出法によりDNAを抽出後、LAMP法により遺伝子検査を行った。この結果を培養法と比較し簡易抽出法とカラム抽出法の感度および特異度について評価したので、その結果について報告する。

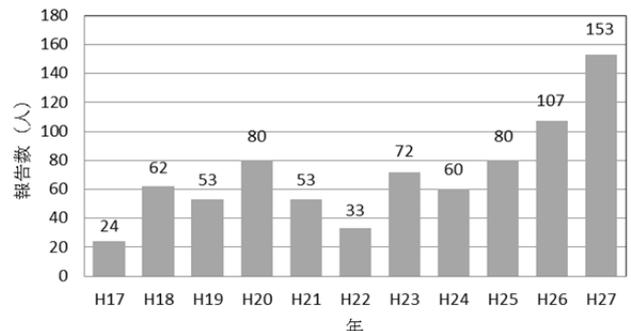


図1. 東京都におけるレジオネラ症報告数
(東京都感染症発生動向調査)

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

実験方法

1. 試料水

東京都健康安全研究センターに平成26年度～平成27年度に搬入された浴槽水等計185検体を用いた。その内訳は、レジオネラ症の感染源調査として搬入された浴槽水等95検体およびレジオネラ属菌が10 CFU/100 mL以上検出された施設の改善措置後の再検査として搬入された浴槽水等90検体である。

2. 試験方法

1) 培養法

培養法は、前報に従った⁷⁾。すなわち、試料水1 Lをろ過濃縮後、酸処理を行った100倍濃縮液をGVPCα寒天培地（日研生研）2枚とWYOα寒天培地（栄研化学）2枚に各0.25 mLずつ計1 mL 塗布し、37°C7～10日間培養した。各集落について確認検査後、同定を行った。本法における検出限界は1 CFU/100 mLである（図2）。

2) 遺伝子抽出法

遺伝子の抽出には、レジオネラ検出キットE（栄研化学）に付属の簡易抽出キットとQIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を用いたカラム抽出を行った。上記濃縮液を1 mLずつ用い、各キットのマニュアルに従って遺伝子を抽出した。

3) LAMP法

レジオネラ検出試薬キットEに追加プライマーとして *Legionella londiniensis* 用LAMP法キット（ニッポンジーン）を添加した後、リアルタイム濁度測定装置（LA-320C）を用いて65°C60分間測定した（図2）。

結果

1. 培養法検査結果

培養法では185検体中27検体（14.6%）からレジオネラ属菌が検出され、8検体から10 CFU/100 mLを超過する菌数が検出された。菌数別にみると、19検体が1～9 CFU/100 mL（10.3%）、10～99 CFU/100 mLが7検体（3.8%）、1,000 CFU/100 mL以上が1検体（0.5%）であり、最高検出菌数は2,300 CFU/100 mLであった（表1）。

2. LAMP法検査結果

簡易抽出法によるLAMP法では、185検体中48検体（25.9%）でレジオネラ属菌の遺伝子が陽性となった。また、カラム抽出法によるLAMP法では、33検体（17.8%）でレジオネラ属菌の遺伝子が陽性となった（表2）。

3. 培養法結果と各抽出法におけるLAMP法結果の比較

1) 感染源調査における比較

感染源調査を考慮し、培養法で1 CFU/100 mL以上を「陽性」とした場合の培養法結果との比較を行った（表3）。

簡易抽出法では培養法陽性となった27検体中17検体がLAMP法でも陽性となったが、10検体は陰性となった。また、培養法陰性となった158検体中127検体はLAMP法でも陰性であったが、31検体は陽性となった。

カラム抽出法では培養法陽性となった27検体中14検体が

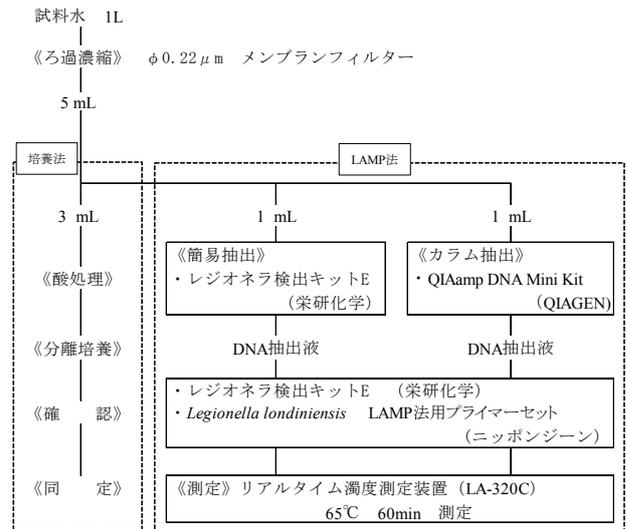


図2. レジオネラ属菌検査の流れ

表1. 培養法におけるレジオネラ属菌検出状況

検体数	菌数 (CFU/100mL)				
	<1	1 ≤ ~ <10	10 ≤ ~ <100	100 ≤ ~ <1,000	1,000 <
185	158 (85.4%)	19 (10.3%)	7 (3.8%)	0 (0.0%)	1 (0.5%)

表2. 各抽出法におけるLAMP法のレジオネラ属菌検出状況

抽出法	陽性検体数	
簡易抽出法	48	(25.9%)
カラム抽出法	33	(17.8%)

n=185

表3. 感染源調査対応を前提とした培養法とLAMP法の比較

抽出法	LAMP法	培養法	
		陽性 (1CFU/100 mL以上)	陰性 (1CFU/100 mL未満)
簡易抽出法	陽性	17	31
	陰性	10	127
カラム抽出法	陽性	14	19
	陰性	13	139

表4. 施設改善措置後の再検査対応を前提とした培養法とLAMP法の比較

抽出法	LAMP法	培養法	
		陽性 (10CFU/100mL以上)	陰性 (10CFU/100mL未満)
簡易抽出法	陽性	8	40
	陰性	0	137
カラム抽出法	陽性	8	25
	陰性	0	152

LAMP法でも陽性となったが、13検体は陰性となった。培養法陰性となった158検体中139検体ではLAMP法でも陰性であったが、19検体は陽性となった。

2) 施設の改善措置後の再検査における比較

施設の改善措置後の再検査を考慮し、培養法で10 CFU/100 mL以上を「陽性」とした場合の培養法結果との比較を行った(表4)。

簡易抽出法では培養法陽性となった8検体中8検体がLAMP法陽性となり、培養法とLAMP法の結果は一致した。しかし、培養法陰性となった177検体中137検体はLAMP法陰性であったが、40検体は陽性となった。

カラム抽出法では培養法陽性となった8検体中8検体がLAMP法陽性となり、培養法とLAMP法の結果は一致した。しかし、培養法陰性となった177検体中152検体はLAMP法陰性であったが、25検体は陽性となった。

3) 培養法陽性でLAMP法でいずれかもしくは両抽出法で検出できなかった検体

培養法においてレジオネラ属菌が1 CFU/100 mL以上検出されたが、LAMP法でいずれかもしくは両抽出法で陰性となった検体が16検体あった(表5)。レジオネラ属菌数はいずれも10 CFU/100 mL未満であった。16検体中7検体は両抽出法において陰性で検出菌数は1~7 CFU/100 mL、3検体は簡易抽出法のみで陰性で検出菌数はいずれも1 CFU/100mL、6検体はカラム抽出法のみで陰性であり、検出菌数は3~9 CFU/100 mLと簡易抽出のみで陰性および両抽出法で陰性となった検体の検出菌数より多かった。いずれの抽出法でもLAMP法陰性となった7検体は、水道水、温泉水、井戸水等を原水として使用していたが、簡易抽出法もしくはカラム抽出法のみで陰性だった9検体は、

表5. 培養法でレジオネラ属菌が検出され、LAMP法でいずれかもしくは両抽出法で陰性となった検体

施設名称	原水の種類	培養法		LAMP法	
		菌数(CFU/100mL)	菌種及び血清群	簡易抽出法	カラム抽出法
A	井戸水	1	<i>L. pneumophila</i> SG4	—	—
B	水道水	1	<i>L. pneumophila</i> SG1	—	—
C	水道水	1	<i>L. pneumophila</i> SG3	—	—
D	不明	1	<i>L. pneumophila</i> SG4	—	—
E	水道水	3	<i>L. pneumophila</i> SG5	—	—
F	温泉水	5	<i>L. londiniensis</i>	—	—
G	温泉水	7	<i>L. pneumophila</i> SG3,4 <i>L. londiniensis</i> SG1	—	—
H	温泉水	1	<i>L. pneumophila</i> SG1	—	+
I	温泉水	1	<i>L. pneumophila</i> SG6	—	+
J	井戸水	1	<i>L. pneumophila</i> SG6	—	+
K	井戸水	3	<i>L. pneumophila</i> SG4	+	—
L	温泉水	3	<i>L. pneumophila</i> SG6	+	—
M	温泉水	4	<i>L. pneumophila</i> SG1,6	+	—
N	温泉水	4	<i>L. pneumophila</i> SG6	+	—
O	温泉水	8	<i>L. pneumophila</i> SG1	+	—
P	温泉水	9	<i>L. pneumophila</i> SG1,5,14,2-14	+	—

表6. 各抽出法における培養法に対するLAMP法の感度および特異度

評価指標	感染源調査		施設改善措置後の再検査	
	簡易抽出法	カラム抽出法	簡易抽出法	カラム抽出法
感度 (%)	63.0	51.9	100.0	100.0
特異度 (%)	80.4	88.0	77.4	85.9

温泉水を原水として使用していたものが7検体と多く、井戸水が2検体であった。また、検出された菌種および血清群は *L. pneumophila* および *L. londiniensis* であった。*L. londiniensis* は以前はLAMP法での検出が困難な菌種であったが、近年販売されている追加のプライマーを添加することで、LAMP法で検出が可能となった菌種であるため、本調査で検出された菌種はすべてLAMP法で検出可能な菌種であった。

考 察

1. 積極的疫学調査の感染源調査対応を前提とした評価

積極的疫学調査における感染源調査を考慮し、培養法で1 CFU/100mL以上を「陽性」とした場合、簡易抽出法での培養法に対する感度は63.0%、特異度は80.4%となった。また、カラム抽出法での培養法に対する感度は51.9%、特異度は88.0%となった(表6)。培養法においてレジオネラ属菌が1CFU/100mL以上検出され、LAMP法でいずれかの抽出法で陰性となった検体が16検体あったが、菌数はいずれも10 CFU/100 mL未満であり、検出された菌種はすべてLAMP法で検出可能な菌種であった。また、培養法陽性でLAMP法が陰性の検体が16検体あったが、簡易抽出法で陰性は10検体、カラム抽出法で陰性は13検体であり、簡易抽出法で陰性であった検体の菌数は1 CFU/100 mLが多かった。

これらの結果から、両抽出法による特異度は高いものの、感度が若干高いことから、簡易抽出法が優れていると考えられた。

積極的疫学調査における感染源調査においては、感度の高い簡易抽出法でLAMP法を行うことで、感染者が施設を利用した際のレジオネラ属菌の存在の有無を迅速に示すことができると考えられる。

2. レジオネラ属菌が10 CFU/100 mL以上検出された施設における設備の改善措置後の再検査の対応を前提とした評価

レジオネラ属菌が10 CFU/100 mL以上検出された施設の改善措置後の再検査を考慮し、10 CFU/100 mL以上を「陽性」とした場合、簡易抽出法での培養法に対する感度は100%、特異度は77.4%となった(表6)。

また、カラム抽出法での培養法に対する感度は100%、特異度は85.9%となった。

このことから、両抽出法による感度は十分に高く、偽陰性は少ないと考えられたが、カラム抽出法の方が特異度が

高く、カラム抽出法を用いることで培養法との結果の不一致が若干改善される傾向が見られた。

施設改善措置後の再検査においては、特異度の高いカラム抽出法でLAMP法を行うことで、培養法との結果の不一致は若干改善され、施設に対して今まで以上に速やかに設備の使用再開が行えると考えられた。

ま と め

簡易抽出法とカラム抽出法を用いてDNAを抽出し、LAMP法を実施した際の培養法に対する感度および特異度について評価した。

積極的疫学調査における感染源調査対応を前提とし、培養法で1 CFU/100mL以上のものを「陽性」とした場合、両抽出法による特異度は高いが、簡易抽出法における感度が若干高いことから、簡易抽出法が優れていると考えられた。

一方、レジオネラ属菌が10 CFU/100 mL以上検出された施設における改善措置後の再検査の対応を前提とし、培養法で10 CFU/100 mL以上を「陽性」とした場合、両抽出法による感度は十分高く、偽陰性は少ないと考えられたが、より特異度の高いカラム抽出法を用いることで、培養法との結果の不一致が若干改善されると期待される。

以上の結果から、感染源調査では感度の高い簡易抽出法でLAMP法を行うことで、感染者が施設を利用した際のレジオネラ属菌の存在の有無を迅速に示すことができると考

えられた。また、施設の改善措置後の再検査においては、特異度の高いカラム抽出法でLAMP法を行うことで培養法との結果の不一致は改善され、今まで以上に速やかに設備の使用再開を判断することができると考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局生活衛生課長：健衛発0331第7号，循環式浴槽におけるレジオネラ症防止マニュアルの改正について（通知），2015.
- 2) 東京都福祉保健局健康安全部長：25福保健環第1683号，25福保健感第1102号，レジオネラ症患者発生時における施設管理マニュアルについて（通知），2014.
- 3) 公衆浴場の設置場所の配置及び衛生措置等の基準に関する条例，昭和39年8月1日東京都条例第184号，平成24年4月1日改正，2012.
- 4) 旅館業法施行条例，昭和32年10月22日東京都条例第64号，平成24年4月1日改正，2012.
- 5) プール等取締条例施行規則，昭和50年3月31日東京都規則第78号，平成19年4月1日改正，2007.
- 6) 東京都福祉保健局健康安全部長：24福保健環第1910号，公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導等に関する要綱の制定について（通知），2013.
- 7) 武藤千恵子，石上 武，楠くみ子，他：東京健安研七年报，65，245-248，2014.

Evaluation of the Genetic Extraction Method for the Examination of *Legionella* Bacteria in Source of Infection Investigations at the Time of the Legionnaires' Disease Outbreaks

Chieko MUTO^a, Asami TSUJI^a, Yukiko Tabei^a, Megumi ICHIKAWA^a,
Takeshi ISHIKAMI^a, Toshinari SUZUKI^a and Mitsugu HOSAKA^a

Whenever there is an outbreak of Legionnaires' disease, the Tokyo Metropolitan Government examines water samples from the facilities that were used by the patients of the disease to test for *Legionella* bacteria using both culture and genetic testing methods. In the case of facilities such as community bathhouses, a genetic test is performed when *Legionella* bacteria are detected in the water samples at more than 10 colony-forming units (CFUs) per 100 mL by a culture test. When the genetic test result is positive, the facilities are forced to suspend business until a negative test result is confirmed following an appropriate remedy. However, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method, which is a genetic test that uses a simple DNA extraction method attached to a LAMP kit, does not give the same results as a culture test. Therefore, a new LAMP method that involved a column DNA extraction method was examined and compared with the simple DNA extraction method. The simple DNA extraction method showed a sensitivity of 63.0% compared with the culture method and was suitable for detecting the presence of *Legionella* bacteria at the facilities used by the legionellosis patients. By contrast, the column DNA extraction method showed a specificity of 85.9% compared with the culture method and was suitable for re-examination once an appropriate remedy had been performed at the facilities. Furthermore, the decision to allow the facilities to reopen for business would become faster by performing both extraction methods in the LAMP test.

Keywords: Legionella, the LAMP method, bath water, pool water

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

