

表1 検査に用いられた土壌および給湯水分離株の血清群の内訳

SG	1	3	5	6	7	8	9	UT	計
給湯水	3	1	3	3	1	0	0	1	12
土壌	20	3	0	1	0	8	1	0	33
計	23	4	3	4	1	8	1	1	45

表2. 土壌及び給湯水分離株の *flaA* 型

NIIB No.	SG	由来	<i>flaA</i>	分離年	NIIB No.	SG	由来	<i>flaA</i>	分離年
2388	1	土壌	2	2001	2382	8	土壌	5	2001
2395	1	土壌	2	2001	2384	8	土壌	5	2001
2404	1	土壌	2	2001	2401	8	土壌	5	2001
2338	1	土壌	2	2001	2370	1	土壌	6	2001
2366	1	土壌	2	2001	2371	1	土壌	6	2001
2375	1	土壌	2	2001	2411	1	土壌	6	2001
2380	1	土壌	2	2001	2400	9	土壌	6	2001
2403	1	土壌	2	2001	2327	1	土壌	12	2001
2409	1	土壌	2	2001	2390	1	土壌	12	2001
2348	3	土壌	2	2001	2336	6	土壌	12	2001
2365	3	土壌	2	2001					
2372	3	土壌	2	2001	1790	1	給湯水	1	2006
2341	8	土壌	2	2001	1002	7	給湯水	1	2005
2393	8	土壌	2	2001	2238	1	給湯水	2	2007
2398	1	土壌	5	2001	2413	6	給湯水	2	2007
2335	1	土壌	5	2001	1238	1	給湯水	3	2006
2383	1	土壌	5	2001	2422	3	給湯水	3	2007
2399	1	土壌	5	2001	1891	6	給湯水	3	2006
2406	1	土壌	5	2001	2421	6	給湯水	3	2007
2408	1	土壌	5	2001	1890	5	給湯水	6	2006
2333	8	土壌	5	2001	832	5	給湯水	6	2005
2334	8	土壌	5	2001	2241	UT	給湯水	6	2007
2379	8	土壌	5	2001	2239	5	給湯水	7	2007

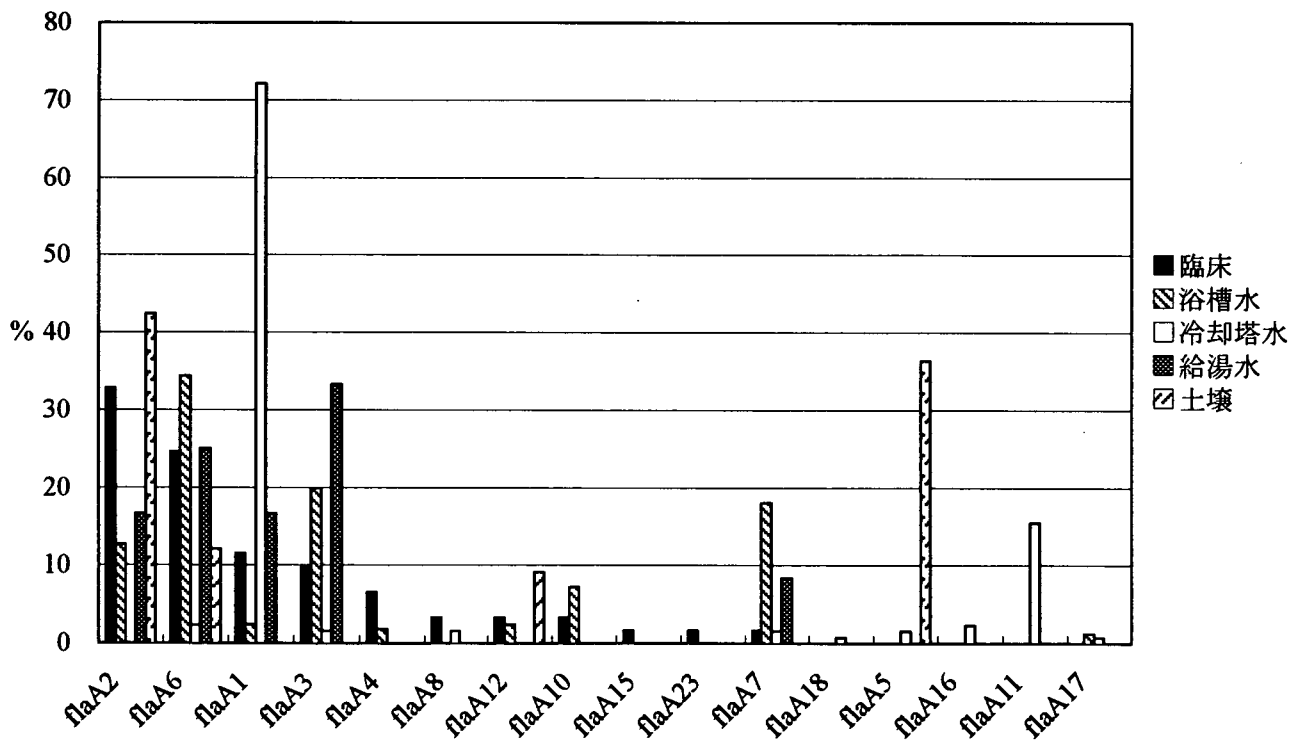
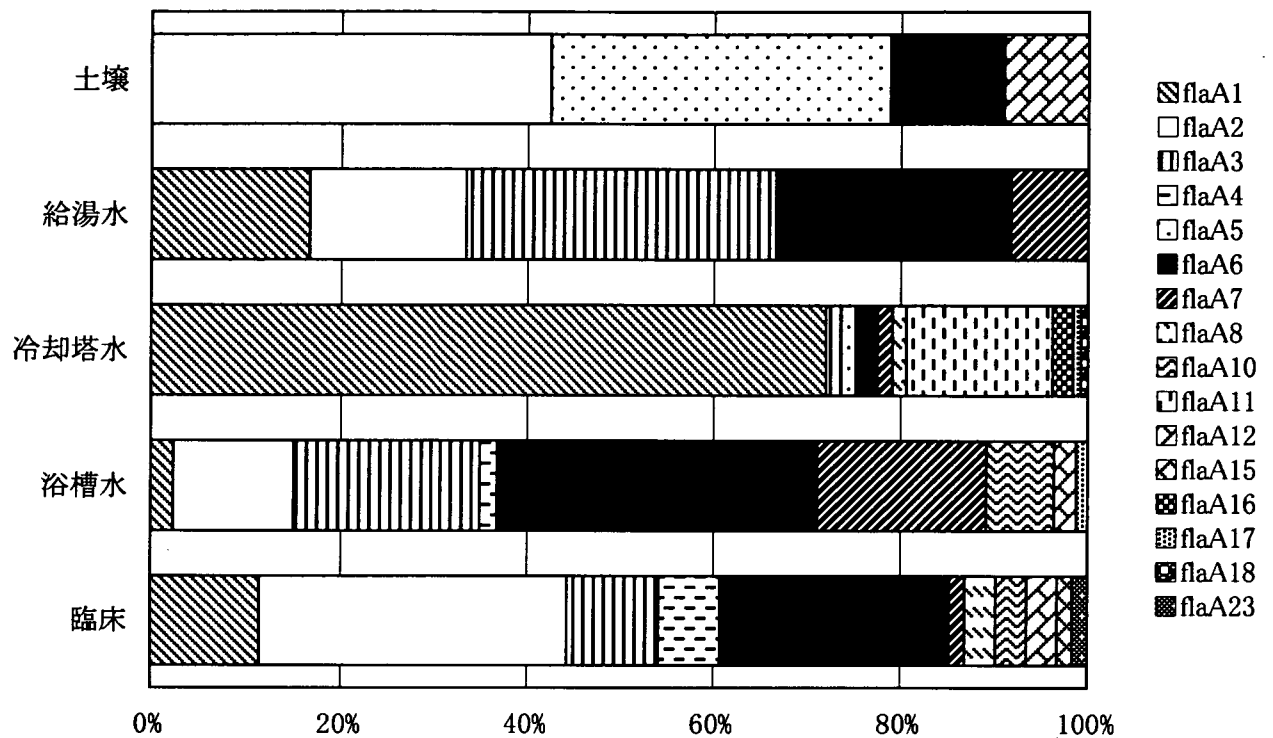


図1 それぞれの由来からの分離株における各 *flaA* 遺伝子型の占める割合。

(上) 分離株の由来別に各 *flaA* 遺伝子型の占める割合を示した。

(下) 各 *flaA* 型についてそれぞれの由来株における頻度を示した。

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)  
迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究

平成19年度分担研究報告

検査法の検討1 効率のよいコロニー観察法、生培地の比較検討

分担研究者 森本 洋 (北海道立衛生研究所感染症センター微生物部)  
研究協力者 宮坂次郎 (熊本県保健環境科学研究所微生物科学部)  
中村昭子 (函館市衛生試験所微生物担当)

研究要旨

環境水中のレジオネラ属菌の基準は、公衆浴場(10CFU/100mL 未満)、冷却塔(100CFU/100mL 未満)で示されているものの、公定法が示されていないため各検査機関で検査法に違いが認められる。そこで検査法の効率化を図るために、今年度は効率の良い集落観察法の検討を行った。出現集落に斜光をあて、実態顕微鏡で観察すると、レジオネラ属菌は特徴的な形態(外観構造)を示す。これにより他の細菌との見極めが簡易になり、培地上の正確なレジオネラ集落のカウント、場合によっては、複数種類のレジオネラの釣菌を効率的に行える可能性が示唆された。また、現在広く利用されているいくつかの検査マニュアル<sup>1~5)</sup>を参考に選択分離培地の検討も行った。選択分離培地は、WYO $\alpha$ (1社)、MWY(1社)、GVPC(5社)寒天生培地を使用した。これらを用いて実際の温泉水を検査したところ、培地の種類により検出数、検出種類、集落形態・大きさ、出現時期等に違いが認められた。また同じGVPC寒天生培地でも各社で違いが認められた。これらのことが、検査結果に影響を与えている可能性が示唆された。

A. 研究目的

公衆浴場及び旅館業におけるレジオネラ症発生防止対策については、「公衆浴場における衛生等管理要領等について」(平成12年12月15日付生衛発第1811号厚生省生活衛生局長通知)の中に盛り込まれ、初めてレジオネラ属菌の基準(10CFU/100mL 未満)及び検査法(冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること)が示された。この後、「公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について」(平成15年2月14日付

建発第0214004号厚生労働省健康局長通知)で新たに“また、その具体的手順は「新版レジオネラ症防止指針」の「<付録>1 環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること”という一文が加えられた。しかしながら、大腸菌群の基準及び検査法では「原水、原湯、上がり用湯及び上がり用水の水質基準及び検査方法」(水質基準に関する省令平成4年厚生省令第69号)、「浴槽水の水質基準及び検査方法」(下水の水質の検定方法等に関する省令昭和37年厚生省令・建

設省令第1号別表第1(第6条))と明確に示されているのに対し、レジオネラ属菌では明確に示されていない。このため、各検査機関で検査方法が異なり、検査結果に影響している可能性があると思われる。そこで検査法の効率化を図るため、今年度は効率の良い集落観察法の検討を行った。分離培地上のレジオネラ属菌集落に関しては、マニュアル上では“大小不同、灰白色湿潤集落で特有の淡い酸臭がある”と記載されている場合が多い。しかしながら、実際の検査においては、他の細菌との見極めが困難な場合が少なくない。1981年に竹田らが、当時確認されていたレジオネラ症菌血清型1~3は、当時使用されていた3種類の分離培地(1%ヘモグロビンおよび1%イソピターレX加ミューラーヒントン寒天培地、Feeley-Gorman寒天培地、チャコール・イーストエキストラクト寒天培地)上で、その集落の外観がカットグラス様の構造を呈すると紹介している<sup>6)</sup>ことから、現在一般的に行われているレジオネラ属菌検査法の中に、この形態的特徴を利用する方法を取り入れ、効率的にレジオネラ属菌の確認および菌数の測定ができないか検討する事を目的とした。また、現在広く利用されているいくつかの検査マニュアルを参考に培地を検索し、実際の温泉水を試料に選択分離培地の検討も行った。

## B. 研究方法

### 1) 効率の良い集落観察法の検討

#### 1. 使用分離培地

現在繁用されていると思われる分離培地、6社(栄研化学、極東製薬工業、日研生物医学研究所、Oxoid、BD、Biomerieux)のBCYE $\alpha$ 寒天生培地、5社(極東製薬工業、

日研生物医学研究所、Oxoid、Biomerieux、Merck)のGVPC寒天生培地、栄研化学のWYO $\alpha$ 寒天生培地、Oxoid社のMWY寒天生培地を使用した。またOxoid社の製品については他に、レジオネラCYE寒天基礎培地にサプリメントを指示通り溶解、添加し調製したもの(BCYE $\alpha$ 、BMPA $\alpha$ 、MWY寒天培地)も使用した。

#### 2. 供試標準菌株

5種類のGIFU strain (*Legionella pneumophila* GTC296(SG1)、297(SG5)、*Legionella micdadei* GTC299、*Legionella oakrigensis* GTC319、*Legionella spiritensis* GTC401)を使用し、上記分離培地で分離培養を行った。

#### 3. 分離集落の形態観察

分離集落の形態観察は、暗室中に実体顕微鏡(Nikon SMZ-10)を設置し、分離平板培地を顕微鏡の台の上に載せ、光源(FIBER OPTIC LIGHT)を設置し、分離平板培地に斜光(以下斜光法)を当てることよって行った(写真1)。

#### 4. 環境試料に対する検討

浴槽水744試料、冷却塔水17試料、腐葉土2試料の計763試料に対し、レジオネラ属菌検査を行い、MWY寒天培地(Oxoid:レジオネラCYE寒天基礎培地にサプリメントを指示通り溶解、添加し調製したもの)に発育した集落を斜光法によって観察し、他の細菌との見分けが可能か、菌数測定の効率化が図れるか等の検討を行った。

#### 2) 選択分離培地の検討

##### 1. 使用選択分離培地

先に示した、現在繁用されていると思われる市販生培地(5社のGVPC寒天生培地、1社のWYO $\alpha$ 寒天生培地、1社のMWY寒天

生培地)のみを使用した。

## 2. 供試試料

9箇所の温泉水、各 500mLを供試した。

## 3. 検査法

試料を非濃縮試料と濃縮試料(ろ過濃縮法による)に分け、それぞれを前処理(未処理、熱処理:50°C20分、酸処理:0.2M HCl・KCl buffer pH2.2を加え室温で4分間放置)し、各前処理試料 100  $\mu$ L(酸処理試料は 200  $\mu$ L)を各選択分離培地2枚に塗布した。それらを 37°Cで培養し、培養 10日目までの各選択分離培地に対し、暗室で斜光をあて実体顕微鏡で分離された集落の形態を毎日観察した。環境試料では通常培養 3日目以降にレジオネラ属菌が培地上に発育してくると言われていることから、特に培養 3日目以降に発育してきた集落に注意しながら観察を行った。各選択分離培地上で標準菌株同様の形態的特徴が観察された集落をレジオネラ様集落として釣菌し、区画した BCYE  $\alpha$  寒天平板培地と血液寒天平板培地に画線培養した。培養後、BCYE  $\alpha$  寒天平板培地にのみ発育したものをレジオネラ属菌と推定した。レジオネラ属菌の同定は、PCR法<sup>7,8)</sup>、レジオネラ免疫血清「生研」、レジオネララテックテスト(Oxoid)、DDHレジオネラ(極東)による DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより行った。

## C. 研究結果及び考察

### 1) 効率の良い集落観察法の検討

今回使用した全てのレジオネラ用分離培地上で、確認された5種類のレジオネラ供試菌株の集落は、そのすべてでカットグラス様(モザイク様)、または集落の辺縁部がカットグラス様で中心部が綿様等の特徴的な外観

構造を観察することができた(写真 2, 3)。このことは、斜光法によって観察されるレジオネラ属菌集落の形態的特徴が、通常の検査において有効利用できる可能性を示唆するものであった。しかしながら、分離培地の違いにより見え方に違いが認められる場合、また集落出現後 3日目以降は、培養時間の経過とともに特徴が見づらくなる場合があることから、各検査機関で使用する分離培地での確認、練習は必要であると思われる。なお、最も本形態的特徴を確認しやすかった分離培地は MWY (Oxoid)であった。これは、MWY に添加されている 2種類の色素が影響していると思われた。

実際の環境試料を用いた結果では、培養 3日目以降に発育が認められた集落において特に、標準菌株と同様の特徴的な形態を示したものが多数認められた。全 763 試料中 698 試料で特徴的な形態を示した集落が認められた。それら特徴的な形態を示した 9620 集落について釣菌し同定検査を行った結果、9239 集落がレジオネラ属菌と同定された(96%)。その結果、698 試料中 682 試料(浴槽水 671、冷却塔水 15、腐葉土 2 試料)(98%)がレジオネラ属菌陽性であった。なお、一般的にレジオネラ属菌の集落は灰白色湿潤集落と言われていることから、全 763 試料でカットグラス様等の形態的特徴のない灰白色湿潤集落 5347 集落についても確認検査を行った結果、それらはすべて非レジオネラ属菌であった。このことから、カットグラス様等の形態的特徴のある集落を数える事により、より正確に菌数を算出する事が可能であると思われた(写真 4, 5)。また、一環境試料中から複数種類のレジオネラ属菌が検出された事例が、陽性検体 682 検体中

596 検体(浴槽水 579、冷却塔水 15、腐葉土 2 検体:87%)あった。集落の形態的特徴には色、大きさ、外観構造の見え方に違いがある場合が有り(写真 6, 7, 8)、さらに培地上に出現するまでの日数等を考慮する事により、同一分離培地上に存在している複数種類のレジオネラ属菌の釣菌を極めて効率的に行える可能性が示唆された。さらに、今回の斜光法を利用した集落観察法では、実態顕微鏡を使用するため、培養 30~35 時間目で培地上に発育してきた極めて初期段階でのレジオネラ属菌集落(写真 9)を確認できたケースもあった。この方法を利用する事により、分離平板上に発育してくるレジオネラ属菌を早い段階から確認する事ができると思われた。なお、今回の試験において、斜光法を利用した集落観察法により検出されたレジオネラ属菌の種類は、*L.pneumophila* 血清群 1~8、10、12、13、15 および血清群不明(市販抗血清に非凝集)、*L.anisa*、*L.birminghamensis*、*L.bozemanii*、*L.cherrii*、*L.dumoffii*、*L.erythra*、*L.feeleii*、*L.gormanii*、*L.jamestowniensis*、*L.maceachernii*、*L.micdadei*、*L.oakridgensis*、*L.rubrilucens*、*L.sainthelensi*、*L.spiritensis*、*L.spp.* であった。

## 2) 選択分離培地の検討

レジオネラ属菌検査結果を表 1(ろ過濃縮)、表 2(非濃縮)に示した。9 試料すべてでレジオネラ属菌は確認されたが、9 試料すべてからレジオネラ属菌を検出できた培地はなかった。今回最もレジオネラ属菌の検出頻度が高かった培地は WYO $\alpha$ (栄研)で 9 試料中 8 試料、次いで GVPC(Biomerieux、Oxoid)が 7 試料、MWY(Oxoid)、GVPC(Merk、日研)が 6 試料、GVPC(極東)が 4

試料であった。今回の供試試料では、WYO $\alpha$ (栄研)に GVPC(Biomerieux)を組み合わせることにより、全試料からレジオネラ属菌を検出することができた。しかしながら、この組み合わせでも今回確認された全菌種を検出することができなかった。また、最もレジオネラ属菌数が多い条件をすべて満たすこともできなかった。以上のことから、複数の選択分離培地を使用することが精度の高い結果につながると思われるが、その組み合わせにおいては、どれが最適というわけではなく、各検査者が使用しやすい培地を選ぶことも重要な要素であると思われる。

今回 3 試料(試料 E:無処理、H:熱処理、I:熱と酸処理)で、すべての培地からレジオネラ属菌が検出された。試料 H と I においては、熱や酸処理により他の細菌が抑制されたこと、またレジオネラ属菌の数や種類が多かったためバランス良く検出されたと思われる。しかしながら、試料 E は他の細菌が混在した(表 3)無処理からのみ、すべての選択分離培地から検出されている。また *L.pneumophila* 血清群 6 のみが検出され、その菌数は 20~40CFU/100mL と少なかったがバランス良く検出された。このことは、熱や酸処理を行わなくても十分にレジオネラ属菌を検出できる場合があり、また熱や酸処理をすることで検出しづらくなる可能性も否定できないと思われた。特に試料 A、B、C、F においては、無処理の重要性を認識する結果であったと思われる。熱や酸処理は、試料中に混在する他の細菌を抑制するために必要な処理であるが、例えば、湯口より上流部の温泉水や清掃消毒後の浴槽水等、比較的細菌の混在が少ないと思われる試料に対しては、無処理を併用することが望ましいと思

われる。試料中にレジオネラ属菌が存在していても、すべての前処理(無・熱・酸)条件から同等にレジオネラ属菌が検出されるわけではない。このことは、どの選択分離培地に対しても言えることである。精度の高い検査を行うためには、無、熱、酸すべての前処理を行うことが望ましいと思われる。

試料 I の結果(表 2)を見ると、すべての選択分離培地からレジオネラ属菌は検出されているが、検出菌種に大きな違いが認められた。本試料からは5種類のレジオネラ属菌が検出されているが、それらすべてを検出できた培地は GVPC(日研)だけであった。次いで4種類検出されたのが MWY(Oxoid)と GVPC(Biomerieux, Oxoid)であった。WYO $\alpha$ (栄研)と GVPC(Merck)は2種類、GVPC(極東)では1種類しか検出することができなかった。検出菌種から見ると、*L.pneumophila* 血清群 UT はすべての培地から検出され、*L.sp.*も GVPC(極東)を除く6種類の培地で検出された。しかしながら、*L.maceachernii* と *L.micdadei* は4種類(MWY:Oxoid、GVPC:Biomerieux、Oxoid、日研)、*L.rubrilucens* については1種類(GVPC:日研)でしか検出されなかった。これらのことから、菌種によっては使用選択分離培地さらには各前処理との組み合わせによる条件の違いが、その検出に大きな影響を与えている可能性が示唆された。また、これら条件の違いによって、培地上に発育する他の細菌の数、種類の違いもレジオネラ属菌の検出に影響を与えているものと思われる。

試料 H の非濃縮試料の結果(表 2)を見ると、1000~2000CFU/100mL のレジオネラ属菌が存在していると思われた。しかしながら、濃縮試料の結果(表 1)を見ると

1000CFU/100mL 以上のレジオネラ属菌が確認されたのは、GVPC(Biomerieux、極東)の熱処理条件だけであった。

特に濃縮試料における酸処理条件だけで見ると、どの培地においても他の前処理条件より菌数が少なく、180~390CFU/100mL であった。しかしながら、非濃縮試料では酸処理条件でレジオネラ属菌が最も多く確認されている(WYO $\alpha$ :栄研、MWY:Oxoid、GVPC:Merck、日研)。これらのことから、試料を濃縮することが、レジオネラ属菌の検出に対し、何らかの弊害を与えている可能性が示唆された。今回の実験では、試料 A~G のように、レジオネラ属菌数が  $10^1$  CFU/100mL レベルであれば、試料を濃縮することが効果的に結果に表れたと考えることができる。しかしながら、試料 H のように濃縮をすることによって結果に大きな違いが出る場合もあった。試料中の菌数を予測することは困難な場合が多いことから、精度の高い検査を行うためには、非濃縮試料の検査も行うことが望ましいと思われる。

また、今回5社の GVPC 寒天生培地を使用した。各社でレジオネラ属菌の陽性数、検出菌数、検出菌種に違いが認められる場合があった。利用者側では同じ培地として通常考えるが、各社で特徴があるように思われた。今後検討が必要であると思われる。

#### D. 結論

今回、分離集落の形態的特徴を利用して検査を行うことにより、他の雑菌等が多数認められた分離平板上からでも、レジオネラ属菌の存否を高い確率で確認することができ、また効率良く釣菌することができた。現在報告されているすべてのレジオネラ属菌に対して確認を行っているわけではない事、また、

環境試料中には様々な細菌が存在しており、本特徴に類似の疑わしい集落が発育する事もあるが、今回の実験において 12 種類の *L.pneumophila* 血清群およびその他 15 種類以上のレジオネラ属菌が効率良く検出されたこと、またレジオネラ肺炎の患者から最も高率に検出されている *L.pneumophila* 血清群 1 において、この形態的特徴が観察されたことから、十分に通常の検査業務に対応できる方法であるとともに、感染源や汚染源を調査するにあたり有効な検査法の一つであると思われる。

今回の実験では、試料の濃縮、非濃縮、前処理、使用選択分離培地、またそれらの組み合わせによる条件の違いにより、レジオネラ属菌の検出数、種類に違いが認められる場合があり、検査結果に大きな影響を与えていることが示唆された。これらのことから、浴槽水の衛生管理上、レジオネラ属菌の基準を定める上では、大腸菌群同様、可能な限り統一した検査方法を示すことが望ましいと思われる。

#### E. 参考文献

- 1) 改訂・レジオネラ属菌防除指針—温泉利用入浴施設用—,(財)全国環境衛生営業指導センター 全国旅館環境衛生同業組合連合会,東京, 1999, pp.15-27
- 2) 厚生省生活衛生局企画課監修:新版レジオネラ症防止指針,財団法人ビル管理教育センター,東京, 1999, pp.85-94
- 3) 社団法人日本水道協会編:上水試験方法 2001 年版,社団法人日本水道協会, 東京, 2001, pp.654-658
- 4) 社団法人日本水道協会編:上水試験方

法解説編 2001 年版,社団法人日本水道協会, 東京, 2001, pp.886-888

5) 日本薬学会編:衛生試験法・注解 2005, 金原出版, 東京, 2005, pp.103-105

6) 竹田美文他訳:レジオネラ症,近代出版, 東京, 1981, p.67

7) 山本啓之:遺伝子による検出方法,臨床と微生物, 近代出版, 東京, 1998, 25, pp.35-39

8) 舘田一博:*Legionella pneumophila*, 臨床と微生物, 近代出版, 東京, 1999, 26, p.603-606

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



表1 絮用されているレジオネラ属菌用選択分離生培地を利用した温泉水からのレジオネラ属菌検査結果  
 ーろ過濃縮試料からの出現菌種と前処理法ごとの出現菌数(CFU/100mL)ー

検体No.	出現菌種	前処理	WYO (栄研)	MWY (Oxoid)	GVPC (Merk)	GVPC (Biomérieux)	GVPC (Oxoid)	GVPC (日研)	GVPC (福東)
A	<i>L.p.</i> .SG1	無 熱 酸	10 10						
B	<i>L.feeleii</i>	無 熱 酸			30				
C	<i>L.p.</i> .SG1,10 <i>L.birminghamensis</i>	無 熱 酸	10 <sup>1)</sup>	30 <sup>2)</sup>	10 <sup>3)</sup>	10 <sup>1)</sup>	10 <sup>1)</sup>	30 <sup>1)</sup> 10 <sup>1)</sup>	
D	<i>L.p.</i> .SG6	無 熱 酸	20 30	40	50 10	50 30	30	10	20
E	<i>L.p.</i> .SG6	無 熱 酸	40	20 40 20	40 40 20	30 40 10	30 30 20	30 20 20	30 40 20
F	<i>L.p.</i> .SG6 <i>L.oakridgensis</i>	無 熱 酸	30 <sup>4)</sup>	20 <sup>5)</sup>			10 <sup>5)</sup>	10 <sup>5)</sup> 10 <sup>5)</sup>	
G	<i>L.p.</i> .SG1,10	無 熱 酸	40 <sup>3)</sup> 40 <sup>3)</sup>		10 <sup>1)</sup>	40 <sup>1)</sup>	40 <sup>3)</sup>		
H*	<i>L.p.</i> .SG1,2,5,13,UT <i>L.rubrilucens</i> <i>L.sp.</i>	無 熱 酸	200 330 190	750 420 200	290 740 260	1130 390	520 520 180	820 750 340	1100
***									

菌数表示の無いものは10CFU/100mL>

無：処理無し

熱：50℃, 20分

酸：0.2M HCl・KCl buffer pH2.2を等量加え、室温で4分

\* 各条件ごとの詳細な検出・同定データなし

\*\* 絮用した細菌数が多すぎてカウントできず

*L.p.* : *L.pneumophila*

1) *L.p.*.SG10

2) *L.p.*.SG10:10,*L.birminghamensis* :20

3) *L.p.*.SG1

4) *L.p.*.SG6:10,*L.oakridgensis* :20

5) *L.p.*.SG6

太数字：最大菌数

表2 測定されているレジオネラ属菌用選択分離培養地を利用した温泉水からのレジオネラ属菌検査結果  
 -非濃縮試料からの出現菌種と前処理法ごとの出現菌数(CFU/100mL) -

検体No.	出現菌種	前処理	WYO (米研)	MWY (Oxoid)	GVPC (Merk)	GVPC (Biomérieux)	GVPC (Oxoid)	GVPC (日研)	GVPC (経東)
A									
B									
C									
D									
E									
F									
G									
H	L.p.SG1,2,13,UT L.rubrilucens L.sp.	無 熱 酸	1000 <sup>1)</sup>	2000 <sup>2)</sup>	1000 <sup>3)</sup> 1000 <sup>4)</sup>	2000 <sup>1)</sup>	2000 <sup>1)</sup>	1000 <sup>5)</sup>	2000 <sup>6)</sup>
I	L.p.UT, L.sp. L.maceachemii L.micdadei,rubrilucens	無 熱 酸	1000 <sup>7)</sup> 14000 <sup>8)</sup> 13000 <sup>9)</sup>	28000 <sup>10)</sup> 24000 <sup>11)</sup>	3000 <sup>7)</sup> 30000 <sup>12)</sup> 43000 <sup>13)</sup>	1000 <sup>7)</sup> 27000 <sup>14)</sup> 16000 <sup>15)</sup>	1000 <sup>7)</sup> 20000 <sup>16)</sup> 60000 <sup>17)</sup>	1000 <sup>4)</sup> 24000 <sup>18)</sup> 21000 <sup>19)</sup>	1000 <sup>7)</sup> 25000 <sup>7)</sup> 18000 <sup>7)</sup>

菌数表示の無いものは1000CFU/100mL>

無：処理無し

熱：50℃, 20分

酸：0.2M HCl・KCl buffer pH2.2を等量加え, 室温で4分

太数字：最大菌数

L.p.: L.pneumophila

1) L.p.SG2

2) L.p.SG2,UT

3) L.p.SG1

4) L.rubrilucens

5) L.sp.

6) L.p.SG13

7) L.p.SGUT

8) L.p.SGUT:11000,L.sp.:3000

9) L.p.SGUT:12000,L.sp.:1000

10) L.p.SGUT:22000,L.sp.:3000,L.maceachemii:2000,L.micdadei:1000

11) L.p.SGUT:23000,L.micdadei:1000

12) L.p.SGUT:25000,L.sp.:5000

13) L.p.SGUT:30000,L.sp.:13000

14) L.p.SGUT:18000,L.sp.:7000,L.maceachemii:1000,L.micdadei:1000

15) L.p.SGUT:13000,L.sp.:2000,L.maceachemii:1000

16) L.p.SGUT:13000,L.sp.:6000,L.maceachemii:1000

17) L.p.SGUT:55000,L.sp.:3000,L.maceachemii:1000,L.micdadei:1000

18) L.p.SGUT:17000,L.sp.:5000,L.maceachemii:1000,L.micdadei:1000

19) L.p.SGUT:18000,L.sp.:3000

表3 選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌以外の細菌  
 ーろ過濃縮試料からの前処理法ごとの出現菌数(CFU/100mL)ー

検体No.	前処理	WYO (栄研)	MWY (Oxoid)	GVPC (Merk)	GVPC Biomérieux	GVPC (Oxoid)	GVPC (日研)	GVPC (煙東)
A	無	+	+++	++	+++	+++	++	+++
	熱	50	++	250	620	+	820	+
	酸	40		300	550	10	20	+++
B	無				30			40
	熱			20			10	20
C	無	1630	4	+	++	2910	+	+++
	熱		140	1710	1350	80	220	+++
	酸		70	+	2490	40	620	++
D	無	1580	++	+	2160	+++	2330	+++
	熱	50	310	1980	450	770	2400	1140
	酸	60	20	210	90	20	230	2470
E	無	310	710	120	350	530	210	800
	熱	10	10					60
	酸	10	70	30		100	20	20
F	無	10	20	60	140	30	50	50
	熱			10				20
	酸	10	20	30	10		70	
G	無	2250	+++	+++	+++	+++	++	+++
	熱	670	1580	1620	+++	910	1070	+++
	酸	120	410	530	1090	250	290	+++
H	無	+	500	+	++	560	720	+++
	熱	10	10	110	330		10	1020
	酸	670		+	2070	40	50	+

菌数表示の無いものは10CFU/100mL>

無：処理無し

熱：50℃，20分

酸：0.2M HCl・KCl buffer pH2.2を等量加え，室温で4分

＋：カウント不能で培地の3/4程度に発育

++：カウント不能で培地の5/6程度に発育

+++：カウント不能で僅かな隙間のみ，ほぼ培地全面に発育



写真 1

分離培地からの集落観察（暗所で行う）

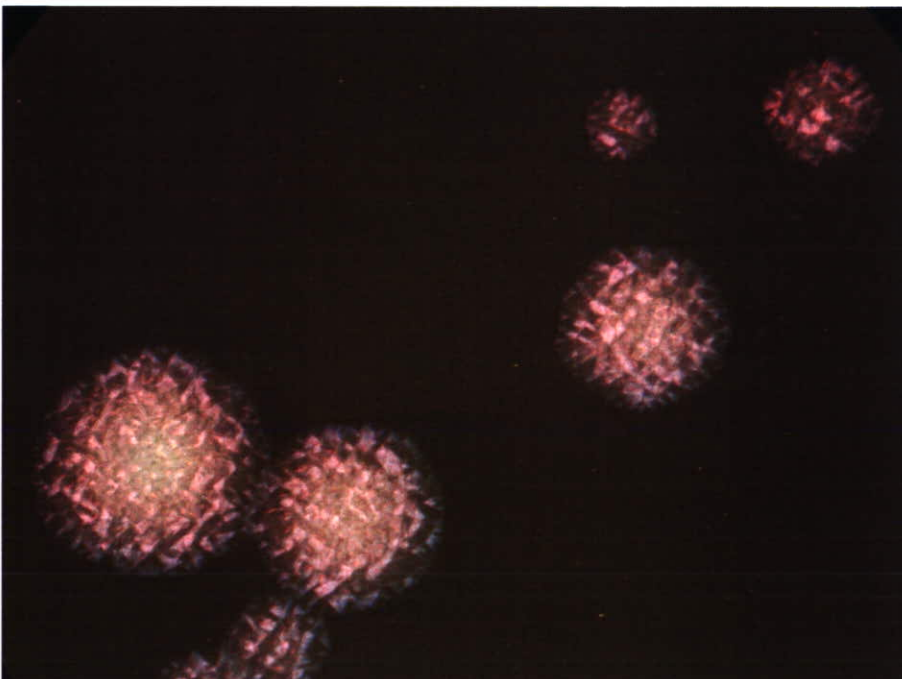


写真 2

*L. pneumophila* GTC296（撮影倍率×120）

BCYE  $\alpha$  生培地（Oxoid）出現初日 集落の成長とともに模様も変化する。

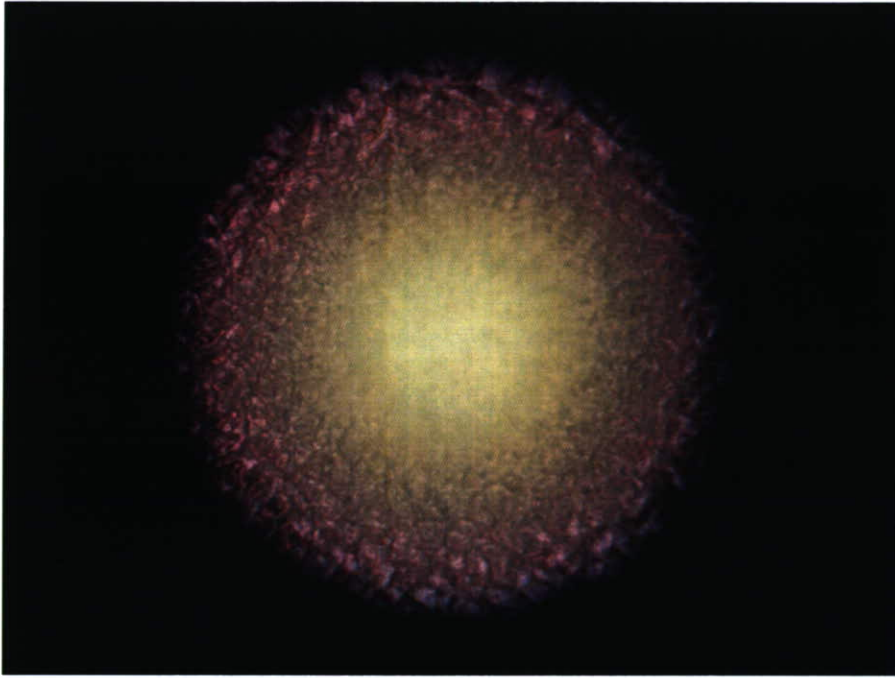


写真 3

*L. pneumophila* GTC296 (撮影倍率×124)

BCYE  $\alpha$  生培地 (Oxoid) 出現 2 日目

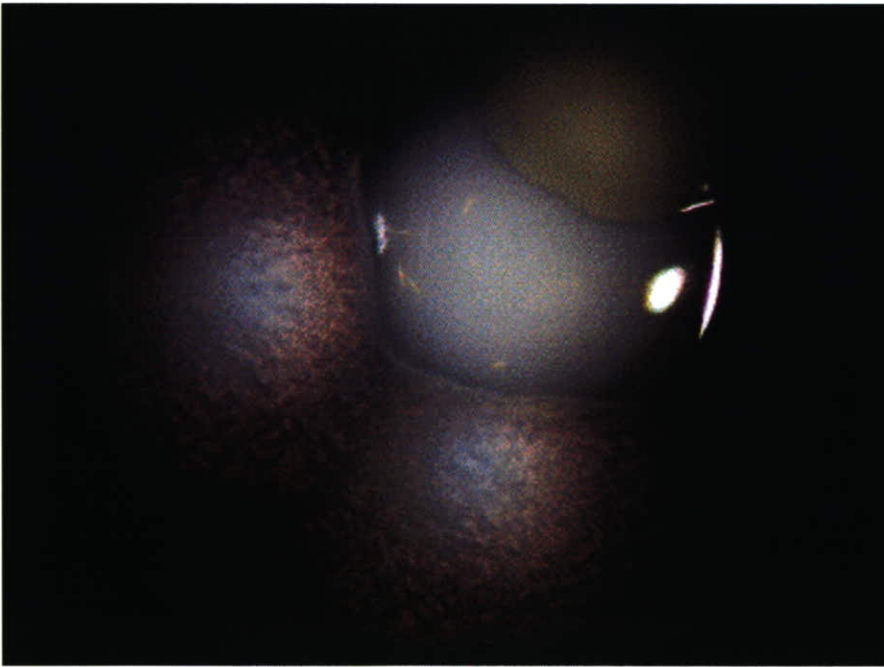


写真 4

レジオネラ属菌と他の細菌-1 (撮影倍率×80)

浴槽水培養 4 日目

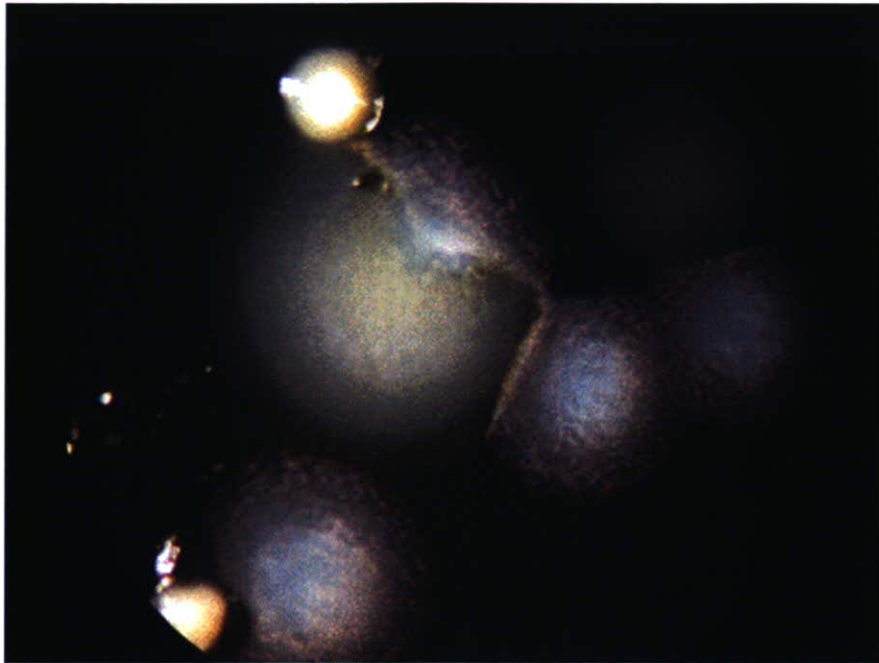


写真 5

レジオネラ属菌と他の細菌-2 (撮影倍率×80)

浴槽水培養 4 日目

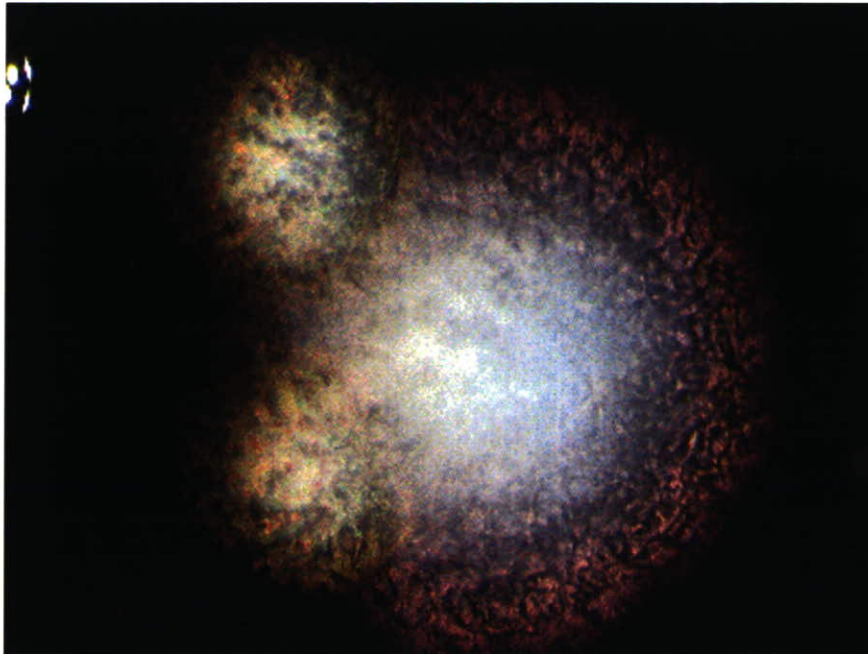


写真 6

辺縁部オレンジ色 : *L. cherrii* 辺縁部ピンク : *L. pneumophila* SG1  
(撮影倍率×120)

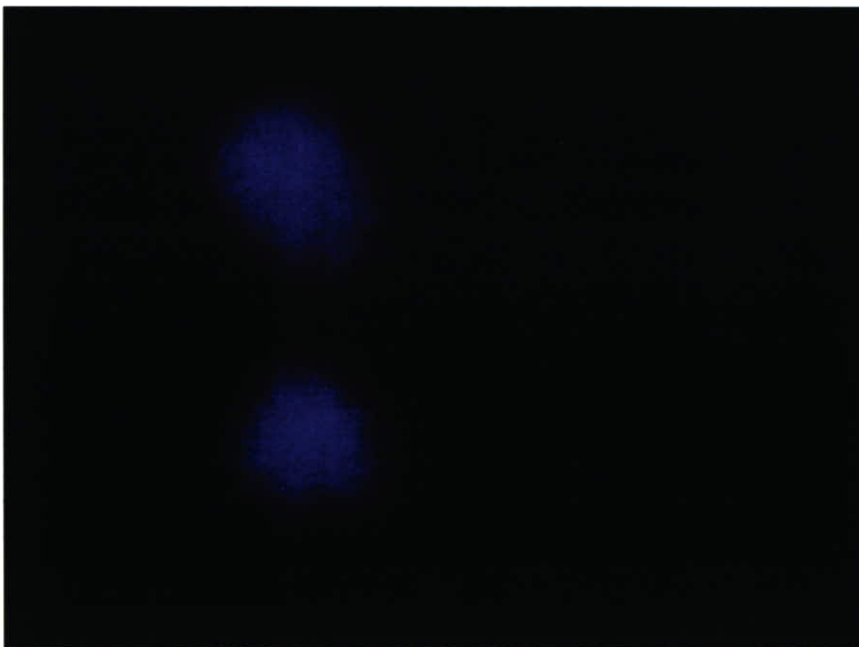


写真 7

写真 6 に長波長 UV 照射 自発蛍光を発する *L. cherrii*  
(撮影倍率×120)

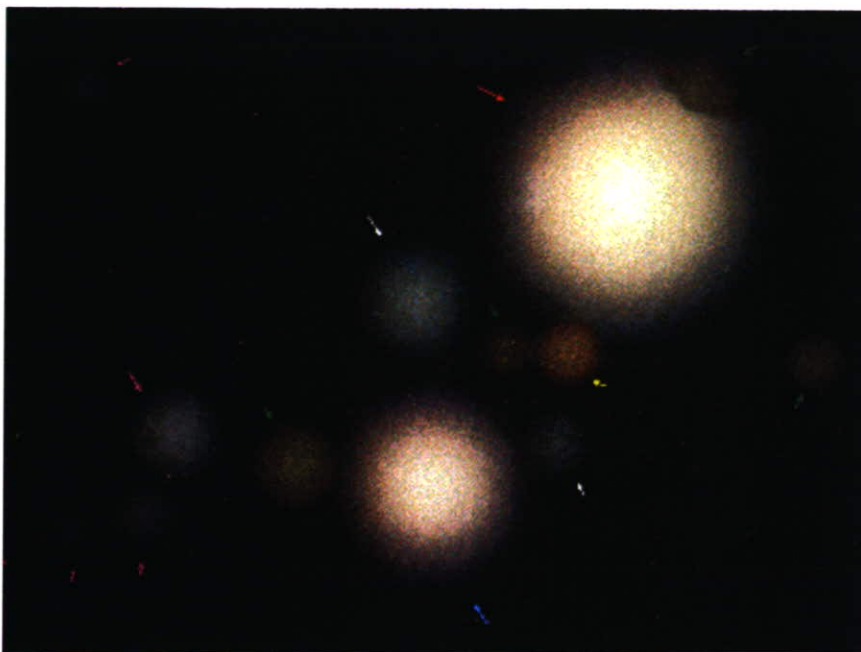


写真 8

複数種類のレジオネラ属菌が混在していた培養 4 日目の浴槽水

矢印ピンク：*L. pneumophila* SG4, 赤：*L. pneumophila* SG1, 水色：*L. pneumophila* SG5,  
白：*L. pneumophila* SG 不明, 黄緑：*L. rubrilucens*, 黄色：*Legionella* sp.

(撮影倍率×80)

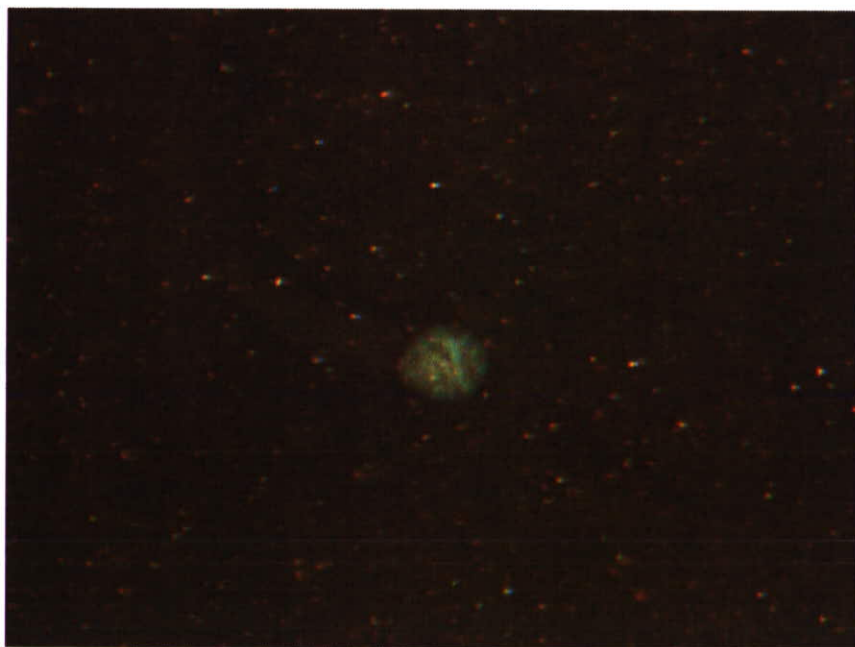


写真 9

培養 30~35 時間目の浴槽水で確認された *L.pneumophila* SG6

(撮影倍率×204)



厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)

迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の  
衛生管理手法に関する研究

標準試料を使用した外部精度管理の試行

主任研究者 倉 文明 国立感染症研究所  
研究協力者 渡辺祐子 神奈川県衛生研究所

A. 研究目的

レジオネラ属菌の環境水からの検査方法は、新版レジオネラ症防止指針等で示されている。しかし、その詳細な方法は検査担当者により選択できる部分があるため、検査結果に差が生じる場合があることが考えられる。一方、レジオネラ属菌の培養検査結果は、検査機関により検出される菌数が著しく異なる場合があるとの報告がある。

そこで、*L.pneumophila* の分離株を用い標準試料を作製し、各機関にゆうパックチルド(4℃)で送付後、今回の調査に協力していただいた協力機関(以下、「各機関」)で実施している方法に従ってレジオネラ属菌の検出を行うという試行を通じて、精度管理の実情や課題点を明らかにするとともに、的確な精度管理手法の確立を図る。

B. 研究方法

菌株保存法であるゼラチン・ディスク法(以下、「ディスク」)を利用して精度管理用標準試料(以下、「試料」)を作製し、その生残性を確認した後、「ゆうパック」にて送付し、各機関において標準試料の菌数を「ディスクを用いたレジオネラの精度管理の実施方法及び回答方法」に従って測定する。あわせて、同じ溶液を用いて検水を作製後、各機関で実施しているレ

ジオネラ属菌検出方法で検査を行うことにより、外部精度管理の試行を行った。

1. 精度管理用の標準試料

精度管理用の標準試料は菌数が異なる2種類とし、菌数1枚のディスクに含まれる菌数が *L.pneumophila* 1群が  $10^3$ CFU/ml(試料1)のものと、*L.pneumophila* 5群が  $10^5$ CFU/ml(試料2)の菌量になるよう、病原体検出マニュアルのゼラチン・ディスク作製法に従い、ディスクを作製した。なお、それぞれのディスクについては、国立感染症研究所と当所で各試料計6枚のディスクについて菌数を確認した。さらに、送付10日前にも当所にて菌数を確認した。また、ディスクの生残性調査や「ゆうパック」送付の影響調査のため、試料3から6のディスクを作製し、様々な条件において菌数測定を実施した。

2. ディスクの生残性調査

試料3のディスクを使用し、このディスクを次のa~eの条件で保存後に菌数測定を行い、これを各条件ごとに3回くり返し集計し、aの結果と比較した。

- 50倍希釈のPBS(以下PBS) 1mlを加え37℃5分溶解
- PBS 1mlを加え室温5分溶解
- ディスクを4℃で1日保存

- d. ディスクを-80℃に7日保存
- e. ディスクを4℃に7日保存

### 3. 「ゆうパック」送付の影響調査

ディスクの送付条件による影響を調べるため、できるだけ実際に近い送付方法となるよう、試料4～6のディスク各3枚を菌株輸送容器に入れ、「ゆうパックチルド」で当所から当所あてに送付し、翌日の夕方到着するよう時間を指定し、到着後は冷蔵保存し、翌日測定を行い、送付前後の菌数を比較した。

### 4. 精度管理の試行調査

#### (1) 精度管理の協力機関

今回の精度管理の協力機関としては、大分県衛生環境保健センター、岡山県環境保健センター、静岡県環境衛生科学研究所、富山県衛生研究所、長崎県環境保健研究センター、北海道立衛生研究所及び宮城県保健環境センターの7機関とした。

#### (2) 実施に当たっての事前連絡

各機関に対しては、事前にメールにて、精度管理用試料の送付日、「ディスクを用いたレジオネラの精度管理の実施方法及び回答方法」(添付1)、回答様式(添付2)、検査方法、送付予定日を通知し、あらかじめ培地等の準備を依頼した。

#### (3) 試料の送付

試料1、2について各ディスク5枚ずつをセラムチューブに入れ、2次容器にWHO許可容器を使用した上で、「ゆうパックチルド」で送付した(写真1)。同時にGVPC培地20枚、希釈用PBS1袋も送付した。

### 5. 各機関における精度管理のための菌数測定

各機関でディスクに1mlのPBSを加え37℃で溶解後、(図1)各0.1mlをとり培地

2枚に塗布し、菌数を測定する。さらに0.1mlをとり10倍希釈を行い、その菌数を測定する。残りのディスク溶解液を各機関でレジオネラ属菌検査に使用している検水量に希釈し、検査検水とする。これを各機関で行っているレジオネラ属菌の検査方法に従って菌数を測定して、回収率を求め、その結果を回答表に記入するよう依頼した。また、実際に各機関で行っている検査方法についても記載を求めた。

## C. 研究結果

### 1. 精度管理用の標準試料

感染研と当所で測定したそれぞれ7枚のディスクの平均菌数は、試料1が $3.7 \times 10^3$ CFU/ml、試料2が $6.6 \times 10^5$ CFU/mlであり、事前に確認した菌数のCV%は7.1%から25.9%の範囲であった。(表1)

### 2. ディスクの生残性調査

ディスクの溶解時の温度やディスクの保存温度の影響について調査したところ、ディスクの保存は一日4℃で保存した場合60%程度減少していたが、1週間保存ではあまり差がなくなっていた。また、-80℃で保存した場合は、1週間保存でもほとんど変化がなかった。(表2)

### 3. 「ゆうパック」送付の影響調査結果

送付前と到着後の菌数の回収率は56%から210%という範囲であり、CV%については最大のもは送付前の61%であった。(表3)

### 4. 精度管理の試行調査

回答が得られた各機関のうち、全回答があった機関のみの回答を表4にまとめ、また、検査方法は、回答が得られた7機関からの結果を表5にまとめた。

試料1、2の回収率は、ディスク1枚ごと

の回収率を求め算出した。

試料 1 では、各機関ともディスク中に  $10^3$ CFU/ml 前後の菌数があることが確認されているにもかかわらず、各機関で行っているレジオネラ属菌検査法ではほとんど検出することができなかった。

試料 2 でも、各機関ごとのディスク菌数の平均値は、送付時点で確認したものより1オーダー程度大きい、あるいは小さい場合があり、かなりの誤差が生じていた。これは送付したディスクのバラツキの影響が大きいのではないかと考えられた。1機関を除いて回収率は 20%以下と低かったが、各機関の5回の結果の CV%では著しく高値ではなかった。

## D. 考察

### 1. 精度管理用の標準試料

今回作製した試料用ディスクの CV%は 7.1%から 25.9%の範囲で、EWGLI (The European Working Group for Legionella Infection) で使用されている精度管理用 LENTICULE ディスクの精度の良いバッチは CV%が25%以内とされていることから、今回作製した試料については使用可能の範囲内であると考えられた。

### 2. ディスクの生残性

ディスクの保存方法や溶解温度について、いくつかの条件で実施したが、保存条件の影響よりもディスク間のバラツキが大きいのではないかと考えられた。しかし、4℃1日保存では菌数の減少が認められたことから、念のため各機関で試料の受領後は、検査開始まで凍結保存をしてもらうこととした。なお、効果的な保存条件については、今後も検が必要であると考えられた。

### 3. 「ゆうパック」送付の影響

この結果についてもディスクのバラツキが大きかったものの、前後の回収率の状況から、送付条件による影響は大きくはないものと考えられた。

## 4. 精度管理の試行調査

### (1) 標準試料について

ディスク法は、精度管理用標準試料として取り扱いが簡単でコンパクトなこと等から試料には有効と考えられたが、作製ディスクにバラツキが生じたことが最大の問題点であり、ディスクの均一性を高めることが重要な課題であると考えられた。

また、レジオネラの検体濃縮にろ過法を用いている一部の機関からろ過に時間がかかったとの記載があった。原因としては、ディスク作製時に炭末を添加しているため、これがろ過の妨げになっている可能性が推測された。このことから、炭末を加えないディスクの作製方法を検討する必要があると考えられた。また、精度管理用 LENTICULE ディスクの作製方法が報告されていることから、この方法についても検討が必要であると考えられた。

### (2) 検査方法

今回の試行結果からはディスクのバラツキと回収率の低さが大きな課題であることが判明した。新版レジオネラ防止指針等に記載されているレジオネラ属菌の検査方法は、検体の濃縮方法から雑菌を押さえるための前処理法まで詳細な部分で様々な選択肢がある。そのため、今回、それぞれの機関が行っている検査方法は、検水量はじめ濃縮法等が7機関とも少しずつ異なっており、全て同じ方法で行っている機関はなかった。また、濃縮法による回収率の違い<sup>1)</sup>やろ過法におけるろ紙のポアサイズや材質による回収率の違い

2)<sup>3)</sup>をはじめ、培地の種類による発育性の差<sup>4)</sup>の報告があることを考えれば、回収率を改善するためには、検査法の濃縮法や前処理法など個々の行程において回収率を確認し、その中から最も効率的な検査方法を見いだして、統一化を図っていく必要があると考えられた。

一方、今回の精度管理の試行では、ディスクの溶解からレジオネラ検出用検水を調整する過程が複雑でわかりにくかったとの指摘があることから、記述の改善が必要であると考えられた。

レジオネラ属菌の精度管理については、平成14年度厚労省科学特別研究「生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究」の中で全国の機関を対象に実施されている。この時は、試料原液 3mlを冷蔵で配付し、配付された各機関で原液中の菌数と原液から作製した疑似環境水の菌数を測定し、回答するものであったが、一部で試料が凍結するなどのトラブルが発生したため、原液中には5から10×10<sup>3</sup>CFU/mlの菌が含まれていたにもかかわらず一部不検出であったとの報告がされている。このため今回は、ディスク法を利用して試料を配付し、外部精度管理を行うための試行を行った。この試行での結果や課題点を基にさらなる検討を加え、外部精度管理態勢の構築を目指す必要がある。

## E. 結論

外部精度管理の試行を行ったことにより、ディスクの菌数のバラツキと回収率の低さが大きな問題であることが明確になった。そこで、まず精度管理のための配付試料の作製方法の検討を行うとともに、回収率の低さやバラツキの原因として現在

の指針の検査法の行程や選択肢が多いことが考えられたため、現行のレジオネラ属菌検査法の行程や選択肢ごとに回収率の検討を行い、検査法自体の回収率を改善し、統一した検査法として確立していく必要があると考えられた。なお、現在行われているレジオネラ検査の回収率はどのレベルを目指す必要があるか、その目標を定めつつ検討を行っていくことも重要であると考えられた。

- 1) Catherine A. Boulanger, Paul H. Edelstein: Precision and Accuracy of Recovery of *Legionella pneumophila* from Seede Tap Water by Filtration and Centrifugation : Appl. Environ. Microbiol., 61:1805-1809, 1995
- 2) Hsu-Feng Lu, Mei-Fen Tsou, Shau-Yen Huang et al : Factors affecting the recovery of *Legionella pneumophila* serogroup 1 from cooling tower water systems : J. Microbiol. Immunol. Infect, 34: 161-166, 2001
- 3) Lori Smith, Karen Carroll, Susan Mottice : Comparison of Membrane Filters for Recovery of Legionellae from Water Samples : Appl. Environ. Microbiol., Jan.: 344-346, 1993
- 4) 奥田敬一, 池戸正成, 藪内英子: 冷却塔水から *Legionella* 属菌を検出するための新選択培地 : Wadowsky-Yee-Okuda (WYO) 培地. 感染症誌, 58: 1073-1082, 1984