

4 保健所担当者ともモザイク様模様を明瞭に確認し、研修後直ちに環境水のレジオネラ検査において補助的に利用していきたいとのことであった。また、4 保健所とも実体顕微鏡、コールドライトを所持しているため機器を購入するなどの初期投資が不要であり、暗室に変わるスペースを工夫して整備すれば斜光法による鏡検は可能であるとのことであった。研修後、各保健所から斜光法に関するレポートの提出を受けたが、4 保健所とも斜光法が実施可能であり、今後環境水の検査あるいはレジオネラに関する行政検査に補助的に利用していきたい旨の内容であった。

4 さいごに

簡便にレジオネラ属菌のコロニーを判別できるため、環境水の検査にしても臨床検体の検査にしても補助的に用いるには非常に有用であると考えられた。ただし、特に斜光法を利用し始めた最初の頃は、あまり同法に頼りすぎてしまうと誤った判断につながる恐れがあることを、念頭におく必要があると思われた。また、平板の蓋を開けて鏡検しコンタミネーションを起こしたことがあったため、コンタミネーション防止対策を考慮する必要があると思われた。

表1 菌種によるモザイク様模様の違い

菌種	色味	モザイク模様の密度
<i>L. pneumophila</i> SG1	辺縁が紫	緻密
<i>L. pneumophila</i> SG3	全体的にオレンジ	粗
<i>L. dumoffii</i>	辺縁がピンク	緻密
<i>L. micdadei</i>	白色	非常に緻密
<i>L. londiniensis</i>	白色	緻密

はじめに

平成 20 年度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) 「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」—簡便な培養法, 特に集落形態観察による効率的な培養法の実験・検討—に参加し、集落形態からのレジオネラ判別手法をご教授いただいたので、当所でも検討を行った。

検討方法

- 1) 試料前処理: 浴場水 A、B をメンブレンフィルター法により濃縮。さらに、酸処理液 (0.2M HCl・KC1 buffer (pH 2.2)) を加え、濃縮倍率の異なる検液を作成した。それらを WYO α 培地 (栄研化学) に 100 μ L 塗布し、36°C で培養した。
- 2) 斜光法による推定試験: 培地上に 3 日目以降に発育した集落を、実態顕微鏡 (Nikon) 及び光源 (ORYMPUS TGHM) で集落に光を照射 (以下斜光法) しながら 7 日目まで観察した。
- 3) 確定試験: 浴槽水 A 関連から 11 集落 (No.1~11)、浴槽水 B 関連からは 6 集落 (No.12~17) を釣菌した。斜光法による推定試験により特徴的外観構造 (集落の辺縁部のモザイク様・中心部の綿様) が見られた集落は、レジオネラ血清群別試験を行った。また、血清群が同定された集落については「病原体検出マニュアル」(国立感染症研究所) に記載されているプライマー (表 1) を使用し、PCR 試験にて確認試験を行った。

表 1 プライマー¹⁾

5SrRNA (レジオネラ属菌特異的)
Forward(5-29)
5'-GGCGACTATAGCGRTTTGGAA-3'
Reverse(91-112)
5'-GCGATGACCTACTTTCRCATGA-3'
Mip (<i>Legionella pneumophila</i> 特異的)
Forward(948-965)
5'-GCATTGGTGCCGATTTGG-3'
Reverse(1092-1115)
5'-GYTTTGCCATCAAATCTTTYTGAA-3'

注 1) 「病原体検出マニュアル」(国立感染症研究所)。なお Mixed base の表記は国際表記に準じて R (A, g) 及び Y (C, T) とする。

検討結果及び考察

斜光法による推定試験は、当所の装置でも特徴的外観構造を十分確認することができた。そこで、3 日目以降に発育した集落を経時的に観察したところ、集落 No.10 以外はレジオネラ属菌の特徴的外観を示していた。集落が重なっている場所において斜光法を行うと、レジオネラ属菌の特徴的外観を示し、なおかつ色や形状の異なる集落を見ることができた。これは、数種類のレジオネラ属菌が存在していると考えられたため、それぞれ特徴の異なる集落について釣菌し、確認試験を行った (集落 No.4~7)。その結果、血清群別試験で 3 種類の血清群が確認 (*Legionella pneumophila* SG2、5、6) でき、これらは PCR 試験でも *Legionella pneumophila* と確認された。その他の釣菌

した集落についても、斜光法で見え方の違うものは、*Legionella pneumophila* の血清群が異なるものが多く、各浴槽水から複数の *Legionella pneumophila* 血清群が確認された (表 2)。今回の検討には、1 種類の選択培地しか使用しておらず、他の培地を使用すれば今回とは異なった色や形状を示すものと考えられた。そのため、今後さまざまな選択培地で検討する必要があると考えられる。

斜光法を実施してみると、多くの集落は 3 日目から 4 日目に特徴的外観構造が最も顕著にみられた。また、集落に色がついて見えるものもあり、それらの集落はモザイク様構造がわかりやすかった。色は日数の経過とともに失われてしまう場合が多く、それと共に外観的特徴もわかりづらくなっていった。日数が経過するほど特徴はわかりづらくなる傾向があり、集落が出現した時点から観察する必要があると思われた。

まとめ

現在当所でのレジオネラ検査は、培養 3 日目もしくは 4 日目に WYO α 培地上に発育している疑わしい集落を釣菌し、確認試験を行っている。これは、経験をもとに釣菌しているものであり、個人の裁量に大きくかかわっている。3 日目以降集落の形状が変わってくることもあり、釣菌後さらに操作が増えることも多くあった。その点斜光法を行うことにより、培地上では同じように見える集落も、色合いの違いなどから数種類混ざっていることが確認でき、集落選択の補助として利用可能と思われた。

斜光法は、熟練をさほど要さないため、レジオネラ検査の経験が浅い検査員でも、レジオネラ属菌を容易に見つけ出すことができ、確認試験まで確実に実施することが可能になると思われる。斜光法は、簡便なことから、選択培地に発育した集落についてスクリーニング的に使用することもでき、有効に活用できる検査法であると思われる。

表 2 釣菌集落の確認試験結果

集落 No.	斜光法 3 日目	血清群	PCR
1	(+)	2	(+)
2	(+)	5	(+)
3	(+)	5	/
4	(+)	6	(+)
5	(+)	6	/
6	(+)	2	(+)
7	(+)	5	(+)
8	(+)	2	(+)
9	(+)	6	(+)
10	(-)	/	(-)
11	(+)	2	(+)
12	(+)	5	(+)
13	(+)	不明	(+)
14	(+)	5	/
15	(+)	不明	(+)
16	(+)	6	(+)
17	(+)	6	(+)

*集落No.1～11：浴槽水 A

集落No.12～17：浴槽水 B

斜線部は実施しなかった検査

平成 20 年度分担研究報告

検査法の検討 3 濃縮についての検討、分離培地としてのBCYE α 培地活用に関する検討

研究分担者 森本 洋 北海道立衛生研究所

研究要旨

公衆浴場における水質基準等に関する指針には、レジオネラ属菌の検査において、冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによることと記載されており、濃縮検体からの検査が推奨されている。このことは、検体中にレジオネラ属菌数が少ない場合を想定していると思われる。しかしながら、本格的な清掃消毒直後の浴槽水や温泉源泉等は別として、実際にはレジオネラ属菌数を予測することは難しい場合が多い。そこで、実際の浴槽水等を利用して、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査し、非濃縮検体からレジオネラ属菌が検出された場合、濃縮検体検査結果との比較を行った。その結果、非濃縮検体の結果が最終結果に反映された場合がその大半を占め、非濃縮検体検査の必要性が示唆された。また、濃縮法の違い(冷却遠心濃縮法とろ過濃縮法)による検査結果の比較も行った。その結果、ろ過濃縮による検出率の方が高い傾向にあった。

レジオネラ属菌の検査対象となる環境水中には、多種多様の微生物が存在しており、選択分離培地の使用が不可欠であるが、選択分離培地自体がレジオネラ属菌の発育に影響を与える場合があると思われる¹⁾。そこで非選択培地であるBCYE α 培地を分離培地として検査に活用できないか、実際の浴槽水等を利用して検討した。その結果、BCYE α 培地から効果的にレジオネラ属菌を検出できた例があった。特に、施設再開に向けた清掃消毒直後の浴槽水や温泉源泉等雑菌が少ないと考えられる検体に対し、その効果が期待できると思われた。

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)及び検査法について示された。そこには、検査法として、冷却遠心濃縮法又はろ

過濃縮法のいずれかによることと記載されており、濃縮検体からの検査が推奨されている。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(以下防止指針)」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。つまり、これらの通知文には、濃縮法とその具体的手順についての記載がなされている。このことは、検体中にレジオネラ属菌数が少ない場合を想定していると思われる。防止指針には、レジオネラ属菌数が 10^2 CFU/100mL 未満と推定される時は検水を濃縮する²⁾、と記載されている。しかしながら、本格的な清掃消毒直後の浴槽水や温泉源泉等は別として、実際にはレジオネラ属菌数を予測することは難しい場合が多い。このことは、防止指針でも触れられており、菌数を予測できないので、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査すると記載されている³⁾。このような状況の中、特に行政的な検査においては、上記通知文が検査法の根拠となる場合があり、非濃縮検体について検査を行わない場合があると思われる。

そこで今回、実際の浴槽水等を利用して、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査し、非濃縮検体からレジオネラ属菌が検出された場合、濃縮検体検査結果との比較を行い、非濃縮検体の検査結果が最終検査結果にどのように反映されるかを検討した。

レジオネラ属菌の検査対象となる環境水中には、多種多様の微生物が存在しており、選択分離培地の使用が不可欠である。このことは防止指針にも記載されている⁴⁾。しかしながら、現在、市販され普及している3種類の選択分離培地(MWY、GVPC、WYO α)自体がレジオネラ属菌の発育に影響を与える場合があると思われる。

そこで今回、非選択培地であるBCYE α 培地を分離培地として検査に活用できないか、実際の浴槽水等を利用して検討した。

濃縮方法の違いが検査結果に影響を与えているかを確認するために、同一検体に

対し、冷却遠心濃縮法とろ過濃縮法による検査を同時に行い、その結果を比較検討した。

B. 研究方法

1) 非濃縮検体と濃縮検体との比較検討

1. 対象検体

実際の浴槽水等の検査で、非濃縮検体からレジオネラ属菌が検出された265検体について比較検討した。

2. 濃縮

ろ過濃縮法で行った。直径 47mm、孔径 0.2 μ m のポリカーボネート製メンブランフィルター(ADVANTEC)で検水 500ml をポリサルフォン製(Nalgene)のろ過器(ろ液受フラスコ付)で吸引ろ過した。吸引終了後のフィルターを剥がして5mlのろ液にひたし、10分間、手で強く振り洗浄した。この洗浄液(100倍濃縮液)を接種検体とした。

3. 前処理

酸処理:0.2M HCl・KCl buffer(武藤化学) 1ml と非濃縮検体 1ml とを混合し、室温に 4分置き酸処理液とした。濃縮検体も同様に処理を行った。

熱処理:非濃縮および濃縮検体各 1ml を、50°Cで 20 分間加熱し、熱処理検体とした。

未処理:酸、熱処理をせず、非濃縮、濃縮検体そのものを未処理検体とした。

4. 使用分離培地

MWY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)を使用した。

5. 接種

非濃縮および濃縮検体を同時に検査した。酸、熱処理による前処理検体に加え、未処理検体も接種した。未、熱処理検体につい

ては 100 μ l、酸処理検体については 200 μ l を MWY 培地に接種、塗布した。

6. 培養

接種後のシャーレは、36°C で 10 日間培養した。

7. 判定

10 日間の培養中、毎日観察し、仮判定後、釣菌し、L-システインの要求性、PCR 法^{5,6)}、レジオネラ免疫血清「生研」、レジオネララテックステスト(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、レジオネラ属菌の同定を行った。

8. 比較検討

非濃縮検体と濃縮検体との結果を比較し、非濃縮検体の検査結果が最終検査結果にどのように反映されるかを検討した。なお、非濃縮検体と濃縮検体から共にレジオネラ属菌が検出された場合は、菌数が多く算定された検体の結果を最終結果とした。

2) 分離培地としての BCYE α 培地活用に関する検討

1. 供試検体

浴槽水等 144 検体を供試した。

2. 検査法

分離培地として、自家調製した BCYE α 培地と MWY 培地(共に 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)、および生培地の BCYE α 培地と GVPC 培地(共に Biomérieux)を使用した。

その他の検査法は、前述 1) に準じた。

3) 濃縮方法の違いによる検査結果の比較検討

1. 供試検体

掛け流し温泉の浴槽水 16 検体及びその湯口水 16 検体を供試した。

2. 検査法

同一検体に対し、冷却遠心濃縮法とろ過濃縮法による検査を同時に行い、その結果を比較検討した。冷却遠心濃縮法は、滅菌遠心管に検体 400ml を入れ、6000rpm、15°C、30 分間遠心した。この後、通常、上清をすべて捨てる⁷⁾が、今回、沈渣の損失をできるだけ防ぐために、滅菌遠心管には、4ml の水が入っている遠心管を斜め 60 度程度に傾けた時の液面の位置を、あらかじめ正確にマーキングしておき、遠心後の上清を、ピペットで慎重にマーキングラインまで捨て、100 倍濃縮液とした。ろ過濃縮法は、ろ過量を冷却遠心濃縮法と同じく 400ml とした以外は、前述 1) の 2. 濃縮と同じ方法で行った。使用培地は、前述 2) の使用培地に、その他の検査法は、前述 1) に準じた。

なお、今回行った全ての検査において、分離培地中に発育しているレジオネラ属菌を、効率良く選定、釣菌、菌数測定するために、昨年度、本研究事業報告書において提案したレジオネラ属菌コロニー観察法⁸⁾(以下斜光法)を取り入れ検査した。

C. 研究結果及び考察

1) 非濃縮検体と濃縮検体との比較検討

非濃縮検体からレジオネラ属菌が検出された 265 検体中、濃縮 144 検体(約 54%)で、分離培地上にレジオネラ属菌が旺盛に発育、もしくは他の細菌やカビが旺盛に発育し、レジオネラ属菌のカウントが不能となった。その結果、この 144 検体は非濃縮検体の結果を最終報告とした。残る 121 検体についての結果を表 1 に示した。非濃縮検体での算定菌数が濃縮検体の結果を上回った

検体が 109、その逆の結果が 11、同じ結果が 1 検体あった。これらの結果、非濃縮検体の検査結果から最終的に菌数を確定させたものは、144 に 109 を加えた 253 検体となり、全 265 検体の約 95% を占めた。これら 253 検体中、131 検体(約 52%) が、非濃縮検体を接種した分離培地中のレジオネラ属菌コロニー数が 10 個未満(1000~9000CFU/100ml)であった。この 131 検体について、濃縮検体を接種したレジオネラ属菌数を見ると(表 2)、43 検体(約 33%) が 1000CFU/100ml 未満であった。そのうち、検出されなかった 3 検体を含め、100CFU/100ml 未満が 14 検体(約 11%) あった。カウント不能も 54 検体(約 41%) あった。

非濃縮検体での算定菌数が濃縮検体の結果を上回った 109 検体について、この時の非濃縮検体から確認されたレジオネラ属菌数に対する濃縮検体菌数の割合を表 3 に示した。濃縮検体での確認菌数が非濃縮検体菌数の 80% 以上を占める割合は約 2.8% しかなく、50% 未満だった割合が約 78% あった。つまり、濃縮することにより、確認可能なレジオネラ属菌数が大きく減少する場合があった。

以上をまとめると、

非濃縮検体からレジオネラ属菌が検出された 265 検体について、非濃縮検体の検査結果から最終的な菌数を確定させたものは、253 検体となり、約 95% を占めた。

検体を濃縮することは検出率を上げる一手法であるが、実際には、レジオネラ属菌以外の微生物や浮遊物も濃縮され、分離培地上にレジオネラ属菌が発育しにくい状況を作り出したり、実験ロスにより菌数が減少する

可能性も懸念された。

これらのことから、環境水を検査するにあたり、非濃縮検体を検査することは実状を適切に把握するためにも大変重要であり、濃縮検体と同時に検査することが必要であると思われる。

2) 分離培地としての BCYE α 培地活用に関する検討

浴槽水 144 検体中 116 検体からレジオネラ属菌が検出された。この 116 検体中、BCYE α 培地でしか検出されなかった検体が 15(約 13%) あった(表 4)。BCYE α 培地と選択分離培地共に検出された検体が 50(約 43%) あった。この 50 検体中、BCYE α 培地の方が、確認されたレジオネラ属菌数が多かった検体が 26(52%) あり、選択培地のそれを(19 検体:38%) を上回った(表 5)。これらの結果、BCYE α 培地の検査結果から最終的な菌数を確定させたものは、15 に 26 を加えた 41 検体となり、レジオネラ属菌が検出された 116 検体の約 35% を占めた(表 6)。選択分離培地から有意にレジオネラ属菌が検出されたものは 70 検体(約 60%) だった。

これらの結果を、浴槽水と湯口を含む上流域(湯口、打たせ湯、貯湯タンク、源泉井戸、飲用泉口等)別に分けて比較した。BCYE α 培地の検査結果から最終的な菌数を確定させた 41 検体中 33 検体が、上流域から検出されたものであった(表 7)。浴槽水でも 8 検体から検出されたが、そのうち 5 検体は非濃縮検体だった。選択分離培地の検査結果から最終的な菌数を確定させた 70 検体中、55 検体は浴槽水だった(表 8)。

これらのことから、BCYE α 培地は入浴の影響を受けていない湯や浴槽水であっても

非濃縮の状態、つまり総じて培地接種時に比較的雑菌が少ないと推察される状況下では、検査に有効活用できると思われた。選択分離培地は、総じて培地接種時に雑菌が多いと推察される状況下で、特にその効果が再認識された。

本格的な清掃消毒直後の浴槽水や温泉源泉等は別として、実際には環境水中に存在する微生物量を予測することは難しい場合が多いことから、選択分離培地を使用することは必須である。たとえ上流域であっても、貯湯タンク等の滞留した温泉水中で微生物が相当数増殖している場合があることから、やはり選択分離培地の使用は必要である。しかしながら、今回、BCYE α 培地でしか検出されなかった場合が約13%あったこと。さらに、最終的にBCYE α 培地の検査結果から菌数を確定させたものが約35%あったことから、BCYE α 培地と選択分離培地を併用することは、検査精度を上げる一手法だと思われる。特に、事件発生後の施設再開に向けた清掃消毒直後の浴槽水や湯口より上流域の温泉水、さらには非濃縮検体等、総じて培地接種時に比較的雑菌が少ないと推察される状況下では、BCYE α 培地と選択分離培地を併用することで、その効果が期待できると思われた。

3)濃縮方法の違いによる検査結果の比較検討

掛け流し温泉の浴槽水およびその湯口水各16検体、計32検体のうち、浴槽水13検体、湯口水12検体の計25検体からレジオネラ属菌が検出された。そのうち、ろ過濃縮検体の方が、確認されたレジオネラ属菌数が多かった検体が21(84%)あり、冷却遠心

濃縮の結果(4検体:16%)を大きく上回った(表9)。また、レジオネラ属菌が検出された25検体中、4検体(16%)では、冷却遠心濃縮法でレジオネラ属菌が検出されなかった。ろ過濃縮法で検出されなかった事例は無かった。

これらのことから、濃縮方法の違いが検査結果に影響を与えている可能性が示唆された。ろ過濃縮法の大きな欠点は、検体によりろ過時間が予測しづらいことである。中には、ろ過に長時間を要することもあり、検体数が多い場合には、その労力が相当大きなものとなる。一方、冷却遠心濃縮法では、遠心時間が一定であり、多数の検体処理に適している。冷却遠心濃縮法の大きな欠点は、遠心終了時および終了後の遠心管移動における振動により、沈渣が再浮遊する可能性があること、環境水中の浮遊物質によっては、沈渣とならず浮遊し続けている物質もあり、レジオネラ属菌がその浮遊物に付着している可能性があること、また、上清除去においては、デカンテーション、アスピレーターやピペットによる除去が考えられるが、いずれの方法でも沈渣の損失を防ぐことが難しいこと、さらには、上清除去操作は検査者による個人差が影響する可能性が懸念されること等が挙げられる。一方、ろ過濃縮法では、一旦フィルターに捕集された捕集物は剥がれにくいいため、ここまでの濃縮操作上の損失はかなり抑えることができていると思われる。しかしながら、捕集物を効率良く剥がす工夫が必要であり、この操作の違いが検査結果に影響することが懸念される。

今回、冷却遠心濃縮法における沈渣の損失をできるだけ防ぐための工夫をしたが、今後は、濃縮方法の違いにより検査結果に影響

響が出ぬよう、それぞれの効果的な手技の検討が必要であると思われる。

D. 結論

1) 非濃縮検体と濃縮検体との比較検討

非濃縮検体については、防止指針にも、菌数を予測できないので濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査することと記載されている。今回の調査においても、非濃縮検体の検査結果から最終的な菌数を確定させたものが約 95%を占めた。濃縮検体で測定不能となった場合、冷蔵または冷凍保存していた濃縮液を希釈し再分離培養を行ったり、測定不能となる可能性を考慮し、当初から濃縮液を希釈し分離培養を行う検査機関もあると聞く。しかしながら、保存期間中や凍結融解時にレジオネラ属菌がダメージを受ける可能性、さらには濃縮液の希釈工程による実験ロスが懸念され、検査結果に影響を与える場合があると思われる。環境水を検査するにあたり、非濃縮検体を検査することは、実状を適切に把握するためにも大変重要であり、濃縮検体と同時に検査することが必要であると思われる。また、非濃縮検体を接種した分離培地中のレジオネラ属菌コロニー数が 10 個未満であったとしても、濃縮検体ではカウント不能であったり、濃縮工程の実験ロス等により菌数の減少が示唆される事例があったことから、ここで確定された菌数も重要な意味を持つと思われる。

2) 分離培地としてのBCYE α 培地活用に関する検討

湯口より上流域の温泉水や浴槽水であっても非濃縮検体等、総じて培地接種時に比較的雑菌が少ないと推察される状況下では、BCYE α 培地と選択分離培地を併用するこ

とで、その効果が期待できると思われた。特に、行政検査対応として、事件発生後の施設再開に向けた清掃消毒直後の浴槽水の検査は、最善をつくす必要があることから、BCYE α 培地の併用が望まれる。

3) 濃縮方法の違いによる検査結果の比較

今回の調査では、ろ過濃縮による検査精度の方が高い結果となった。しかしながら、どちらの濃縮法を選ぶかは、検査機関の実験器材、処理検査件数等の要因により変わってくるものと思われる。今回特に注目すべき点は、ろ過濃縮法で検出され、冷却遠心濃縮法で検出されなかったものが 16%あったことだった。今後は、濃縮方法の違いにより検査結果に大きな影響が出ぬよう、それぞれの効果的な手技を検討し、両濃縮法に対する統一した操作法を示す必要があると思われる。

今回の調査では、昨年度、本研究事業報告書において提案した斜光法を取り入れ検査を行った。非選択培地であるBCYE α 培地を使用するということは、そこに様々な細菌が旺盛に発育することが想定され、そのような状況の分離平板中に発育しているレジオネラ属菌を、効率よく選定、釣菌、菌数測定する必要がある。また、ろ過濃縮の方がレジオネラ属菌を効率良く検出できた反面、雑菌の濃縮効率も良く、分離培地上ではレジオネラ属菌の確認作業に手間取る場合が往々にしてある。そこでの確認作業において、斜光法は検査効率と精度を上げる有効な方法であった。

E. 参考文献

- 1) 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,p.87
 - 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,p.88
 - 3) 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,p.91
 - 4) 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,p.86
 - 5) 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
 - 6) 舘田一博:*Legionella pneumophila*,臨床と微生物,近代出版,東京,1999,26,pp.603-606
 - 7) 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.88-89
 - 8) 森本 洋,宮坂次郎,中村昭子:検査法の検討1 効率の良いコロニー観察法,生培地の比較検討: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年度総括・分担研究報告書 pp.123-137
- F. 研究発表
1. 論文発表
なし
 2. 学会発表
 - 1) 森本 洋,清水俊一,池田徹也,山口敬治:レジオネラ選択分離生培地の違いが検査結果に影響を与えるか?,第60回北海道公衆衛生学会,札幌,2008年11月
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 非濃縮及び濃縮検体からレ菌
が検出された121検体における
確認菌数の状況

確認レ菌数状況	検体数
非濃縮 > 濃縮	109
非濃縮 < 濃縮	11
非濃縮 = 濃縮	1
計	121

レ菌:レジオネラ属菌

等号、不等号は確認菌数の状況を示す

表2 非濃縮検体接種培地上の
コロニー数が10個未満だった131
検体における濃縮検体中のレ菌数

菌数(CFU/100mL)	検体数
0	3
10~100 >	11
100~1000 >	29
1000 ≤	34
確認不能	54
計	131

レ菌:レジオネラ属菌

等号、不等号は確認菌数の状況を示す

表3 非濃縮 > 濃縮 109 検体の非濃縮検
体レ菌数に対する濃縮検体レ菌数の割合

占有率	検体数(%)
50% >	85 (78)
50~60% >	7 (6.4)
60~70% >	6 (5.5)
70~80% >	8 (7.3)
80% ≤	3 (2.8)
計	109 (100)

レ菌:レジオネラ属菌

等号、不等号は確認菌数の状況を示す

表4 レ菌検出116検体における
分離培地別検出結果

分離培地	検体数(%)
BCYE α	15 (13)
BC & 選択培地*	50 (43)
選択培地	51 (44)
計	116 (100)

レ菌:レジオネラ属菌

* BCYE αと選択培地共に検出

表5 BC&選択培地50検体における
確認レ菌数の状況

確認レ菌数状況	検体数(%)
BC > 選択	26 (52)
BC = 選択	5 (43)
BC < 選択	19 (44)
計	50 (100)

レ菌:レジオネラ属菌

等号、不等号は確認菌数の状況を示す

表6 レ菌検出116検体における
確認レ菌数の状況

確認レ菌数状況	検体数(%)
BC & BC > 選択	41 (35.3)
BC = 選択	5 (4.3)
選択 & 選択 > BC	70 (60.3)
計	116 (100)

レ菌:レジオネラ属菌

等号、不等号は確認菌数の状況を示す

表7 BC & BC>選択 41 検体における
採取エリア別のレ菌検出結果

採取エリア	検体数(内非濃縮検体数)
浴槽水	8(5)
上流域*	33(7)
計	41(12)

レ菌:レジオネラ属菌

* 湯口、源泉井戸、貯湯タンク、飲用泉口等

表8 選択 & 選択>BC 70 検体における
採取エリア別のレ菌検出状況

採取エリア	検体数(内非濃縮検体数)
浴槽水	55(7)
上流域*	15(0)
計	70(7)

レ菌:レジオネラ属菌

* 湯口、源泉井戸、貯湯タンク、飲用泉口等

表9 レ菌検出 25 検体における
濃縮法別の確認菌数の状況

確認菌数の状況	検体数(%)
ろ過 > 遠心	21 (84)
ろ過 < 遠心	4 (16)
計	25 (100)

レ菌:レジオネラ属菌

不等号は確認菌数の状況を示す

分担研究報告書

免疫磁気分離法による浴槽水からのレジオネラの濃縮法

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	荒井 桂子	横浜市衛生研究所
	緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	森本 洋	北海道立衛生研究所
	渡辺 祐子	神奈川県衛生研究所
研究協力者	磯部 順子	富山県衛生研究所
	佐々木 美江	宮城県保健環境センター

研究要旨 種々の泉質の温泉由来の浴槽水等 191 検体について、従来法（ろ過法）と、新規の免疫磁気分離法（immunomagnetic separation : IMS）の菌濃縮方法について比較検討した。IMS 法はろ過法に比べ、感度は 78.3%、特異性は 94.7%となった。7 検体が免疫磁気分離法で検出、ろ過法非検出となったが、逆に 13 検体がろ過法で検出されたものの免疫磁気分離法では検出されなかった。IMS 法による雑菌除去の程度をみるために、一定量の従属栄養細菌の共存下で添加した *L. pneumophila* SG1 を回収した所、洗浄無しで 92 cfu/plate、洗浄 3 回で 0 cfu /plate と雑菌が効率よく減少した。

A. 研究目的

環境水に存在するレジオネラの検出では、試料を 100~200 倍濃縮して集菌する必要がある。現在は、メンブランフィルターを用いたろ過法と遠心法によって行われている。両方法では大量の試料を必要とするうえ、ろ過法では夾雑物の多い試料の場合、メンブランフィルターが目詰まりして濃縮時間がかかること、遠心法ではろ過法と比べて夾雑物の影響は受けないものの、回収に個人差が生じることなどの問題がある。そこで、新たな方法として腸管出血性大腸菌や腸炎ビブリオなどで汎用されている免疫磁気分離法（immunomagnetic separation : IMS）の有用性を初めて検討した。

B. 研究方法及び材料

1. 浴槽水

7 地方衛生研究所管内で採水された 191 検体の浴槽水（湯口水 5 検体を含む）を使用した。内訳

は、アルカリ性単純泉 42、ナトリウム・カルシウム塩化物泉 16、単純弱放射能泉 11、ナトリウム-塩化物泉 10、含硫黄弱放射能泉 3、酸性-含硫黄・鉄・アルミニウム・カルシウム・硫酸塩泉 2、単純酸性硫黄泉 2、ナトリウム・塩化物・炭酸水素塩泉 2、ナトリウム炭酸水素塩泉 2；白湯 64、薬湯 12、その他温泉水 22、ミネラル泉 2、不明 1 であった。

2. 添加回収試験

2.1 添加する指標菌として、浴槽水から検出された *L. pneumophila* SG4 を用いた。9900cfu/tube および 10cfu/tube に調整し、それぞれ添加回収試験を行った。

2.2 公衆浴場から分離した *L. pneumophila* SG1 に従属栄養細菌（20000cfu/mL）を追加して添加する実験も行った。使用した従属栄養細菌は、循環式入浴施設や温泉施設の浴槽水より R2A 培地に接種して 20°C 7 日間培養した菌群のうち 37°C で培養

して生育した菌群を使用した。*Methylobacterium*、*Pseudomonas*、*Flavobacterium* 等であった。

2.3 浴槽水から 45mL を分取し、緩衝液 5mL とビーズ液 150 μ L を加え Dynal sample Mixer 等のミキサーで 1 時間反応させた。反応後、DynaMag-50 にセットして 5 分間静かに混和し上清を除去した。沈査に緩衝液 50mL を加え、ミキサーで 5 分間洗浄した。再度、DynaMag-50 にセットして 5 分間静かに混和し上清を除去後、緩衝液 1mL で再懸濁し試料とした。試料 100 μ L を GVPC 培地(日研、ピオメリュー)に塗布して培養し、菌数を測定した。添加回収後の菌数は、培地上に生育した集落の平均値で求めた。

3. ろ過法(従来法)

定法に準じて浴槽水 500mL あるいは 1000mL をフィルター (ISOPORE: ミリポアポリカーボネート 0.2 μ m) でろ過し、滅菌蒸留水 5 mL で再懸濁させたものを濃縮試料とした。アドバンテック社のポリカーボネートあるいはミリポアの PVDF フィルターを使用した施設もあった。

4. 菌数測定

濃縮試料を 50 $^{\circ}$ C、20 分間(ろ過法、IMS 法では 3 施設でマニュアル通りの 30 分間)加熱処理した。1 施設ではろ過法の後、酸処理を 4 分間行った。ろ過法は 100 μ L、IMS 法は 250 μ L あるいは 400 μ L を GVPC 培地に塗布して 7~10 日間培養し、菌数を測定した。IMS 法では培地の枚数と接種量により、検出感度は 5~9cfu/100mL となった。

C. 結果

1. 予備実験

指標菌(浴槽水から検出された *L. pneumophila* SG4) を添加してその回収率を求めた。9900cfu/tube および 10cfu/tube に調整し、回収試験を行ったところ、回収率はそれぞれ 51.2%、55.6% であった。また、一定量の従属栄養細菌の共存下で添加した *L. pneumophila* SG1 を回収した所、洗浄無しで 92 cfu/plate、洗浄 1 回(通常の IMS 法のプロトコル)で、16 cfu/plate、洗浄 2 回で 1.3 cfu/plate、洗浄 3 回で 0 cfu/plate と雑菌が効率よく減

少した。指標菌の希釈系列に従属栄養細菌を共存させた試料では、IMS 法は 23 cfu/100mL まで検出が可能で、検出限界値はほぼ通常法と同様であった。その下の希釈である 2.3 cfu/100mL は検出されなかった。

2. 定性的解析(感度および特異性)

浴槽水 191 検体について、ろ過法と比較すると、感度は 78.3%、特異性は 94.7% となった。7 検体が免疫磁気分離法で検出、ろ過法非検出となったが、逆に 13 検体がろ過法で検出されたものの免疫磁気分離法では検出されなかった(表)。

3. 定量的解析(散布図)

浴槽水 191 検体の内、レジオネラ菌数が過剰で計数不能であった 2 検体を除いた 189 検体について、両方法の両対数グラフを作製した。 $R^2=0.79$ とよく相関したが、直線の傾き 0.79 から、ろ過法よりも IMS 法は感度がやや低いことが示された。ろ過法で菌が検出された 58 検体(コロニーが多くて計数しなかった 2 検体を除く)を、30cfu/100mL 未満(9 検体)、30~999 cfu/100mL (35 検体)、1000 cfu/100mL (9 検体)に分けると、IMS 法の検出平均 cfu はろ過法の、それぞれ 21%、84%、80% であった。

D. 考察

免疫磁気分離法は磁気ビーズとレジオネラ属菌をいかに効率良く、確実に反応させるかによって、レジオネラ属菌の集菌能力に差が生じる。そこで、磁気ビーズを試料に加えた後、ミキサーで 1 時間混合する過程が問題になる。貸与されたミキサーは 50mL チューブが傾斜したまま回転するため、転倒混和が可能である。試料にビーズを入れて回転させるとき、ビーズが均一に混和されるスピードに調節することが大事である。また、ミキサーにセットする前とミキサーから外した後に各 1 分程度転倒混和を行ったことで、十分な混和が行われたと考えられた。

雑菌が多い等の事前の情報がある場合にはそれらを排除する方法としてこの方法は有用であると考えられる。雑菌が多い試料では、通常法の加熱

処理ではGVPC培地上にレジオネラ属菌と共に雑菌のコロニーが出現し、その選別に熟練が必要であるが、IMS法では磁気ビーズにレジオネラ属菌だけを捕らえ、雑菌は洗浄の過程で取り除かれていくため、GVPC培地上出現する雑菌のコロニーが非常に少なくなった(100の雑菌コロニーが5程度に減少)。これは、レジオネラ属菌のコロニーが雑菌のコロニーに埋没して検出が不可能になることを避けることができ、純培養の時間短縮にも繋がると思われる。また、初心者でも、比較的容易にレジオネラ属菌のコロニーを判別できるようになり、利点の多い手法と考えられた。

IMS法で集菌して洗浄後にDNA抽出を行うと、温泉の泉質により含まれているフミン質などの不純物の除去・精製が可能と思われ、LAMP法等の反応阻害物質の除去による定量性の向上が期待できる。

種々の泉質の温泉水に適用してIMS法はレジオネラ属菌を検出可能であった。しかし、4施設で指摘されたように、試験に供する浴槽水の量が10分の1程度であるため、試料の分取時に検体中の菌が採取できず感度が低下したことが考えられた。IMS法は、喀痰や配管の拭き取り、ヘアーキャッチャーなどの少量のサンプルで雑菌が多い場合の集菌・分離方法として期待される。

IMS法は、使用するミキサーが8本、DynaMag-50が2本までの反応しかできないことから、数多くの検体を処理するには適していない。集菌作業に時間や手間がかかり、かえって作業が煩雑になり、検体数が多い場合にはこの方法で実施するのは現実的では無いとの指摘もあった(3施設)。一方、遠心機や吸引ポンプなど機器を必要としないこと、手技が容易なことを考慮した実用性は高いという指摘もあった。

浴用水によってはBufferと反応し析出する成分がみられたことから、Buffer成分を検討する必要があると思われた(2施設で指摘有り)。図2に、緩衝液を添加した直後生じた沈殿物を示した(図2)。磁気ビーズを添加すると、ビーズと沈殿物が

混合し沈降した。これら混合物は、磁気板側に一度は付着するものの、上清除去と同時に剥がれ落ち、その後の操作および結果に影響を与えたものと思われる。沈殿の原因は不明であるが、検体に豊富に含まれるカルシウム分(4250mg/kg)が影響している可能性も示唆された。日本では温泉水が検体となる場合が往々にしてあるが、様々な温泉成分や浮遊物が磁気ビーズ本体や緩衝液に影響を与えることが懸念された。泉質により緩衝液を選択、もしくは泉質によっては検査に影響を与えることがある等の表示等、さらに検討が必要である。

従来法とIMS法では確認された種類が異なる場合があった。IMS法で集菌できるレジオネラ属菌の特異性と感度を、種類を増やし検証する必要があると思われた。

これらのことから、現時点では、従来法の方がIMS法に比べて検査精度が高いと思われた。一方、雑菌の除去が容易であるため、雑菌による汚染の程度の高い試料にはIMS法は有効である。この方法の普及には、今後緩衝液と混合した時に析出を減らす工夫、特異性の試験を追加する必要がある。

E. 結論

種々の泉質の温泉由来の浴槽水等191検体について、従来法(ろ過法)と、新規の免疫磁気分離法(immunomagnetic separation: IMS)という2つの菌濃縮方法について比較検討した。IMS法はろ過法に比べ、感度は78.3%、特異性は94.7%となった。IMS法では洗浄により試料に共存する雑菌が効率よく減少した。今後緩衝液と混合した時に析出を減らす工夫、特異性の試験を追加する必要がある。

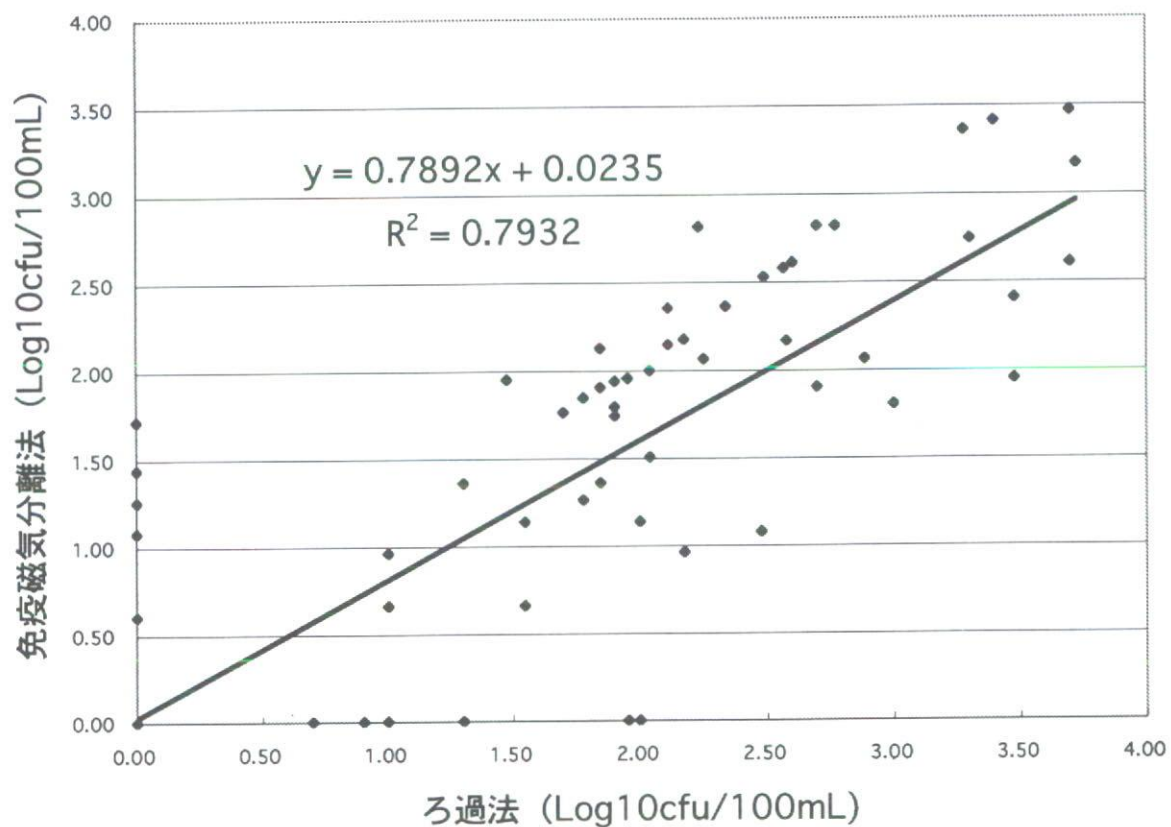
F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 免疫磁気分離法の評価(191検体)



		ろ過法		
		陽性	陰性	合計
免疫磁気分離法	陽性	47	7	54
	陰性	13	124	137
	合計	60	131	191

感度 78.3 %
 特異性 94.7 %

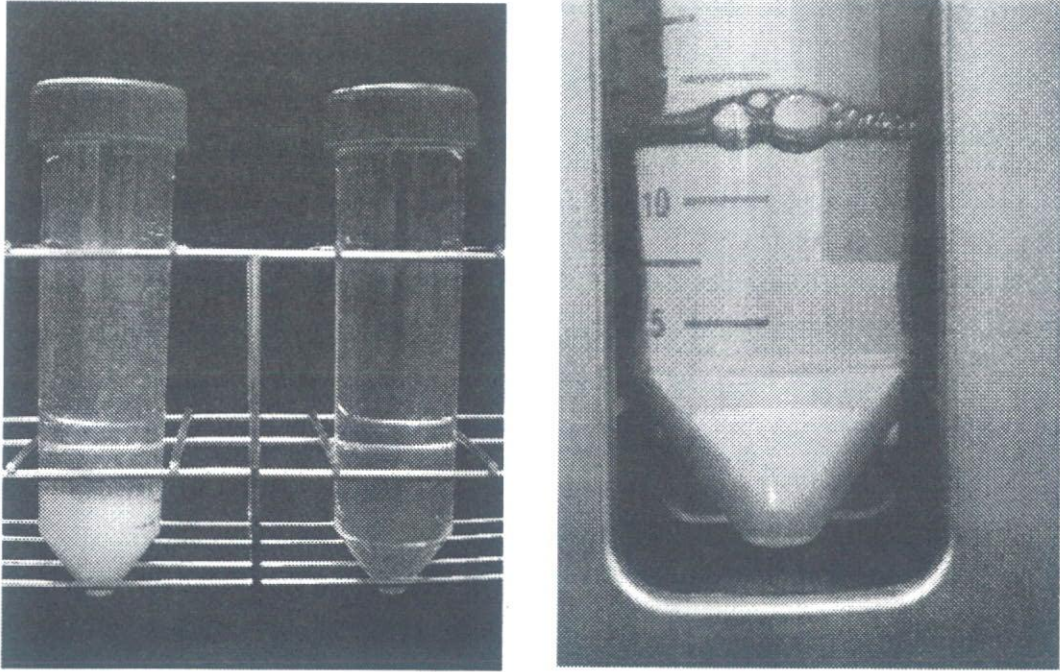


図2 左：緩衝液添加に沈殿が生じた検体（左遠心管、3分後、右は沈殿が生じなかった検体）
右：磁気ビーズを添加後に磁石で回収した。その後上清除去と同時に磁気板に付着した沈殿物とビーズの混合物が剥がれ落ちた。

保存温度：2-8℃（12ヶ月間有効）

キット構成

DynabeadsR MAX anti-Legionella （1.5mL x 10本）

10X Buffer（500mL x 2本）

その他に必要な器具

- 磁石（いずれか）
 - DB12001 Dynal MPC-1
 - DB12302 DynaMag-50（推奨）
- ミキサー
 - DB15908 Dynal MX-2
- 50mLの遠心チューブ
- 選択寒天培地（例GVPCなど）

試験サンプル

水サンプル、菌接種した水サンプル、スワブサンプル、ターゲットもしくは非ターゲットの希釈懸濁液など

特異性と感度

Dynabeads MAX Legionellaは血清型1を含む*Legionella pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. brunensis*, *L. dumoffii*, *L. micdadei*, *L. anisa*に結合します。

Dynabeads MAX Legionellaは1Lの水サンプル中に100CFU以下である*L. pneumophila*を回収可能です。

準備

サンプル：100-1000mLのサンプル（水、接種済み水、環境スワブ、ターゲットもしくは非ターゲットの希釈懸濁液）から分取した45mLを試験に使用します。

冷蔵されていたサンプルを試験に使用する場合は室温に戻してから試験を行ってください。

試薬

Dynabeads MAX anti-Legionellaは1サンプルあたり150μLを使用します。必要量をきれいなチューブに分注し室温に戻します。

1xBufferは1サンプルあたり51mL必要です。5.1mLの10xBufferを45.9mLのイオン交換水で希釈します。

注意事項

- 分離操作は室温（15-25℃）で行います。全ての試薬は使用前に室温に戻します。
- Dynabeads MAX anti-Legionellaは使用前に10秒間ボルテックスし、よく分散させます。
- サンプル容器を開放して作業する際はラミナーフローもしくはバイオリジカル安全キャビネット内で行ってください。
- 多検体を試験する場合は、それぞれのサンプルを別々に取扱い、チューブのキャップを閉めてから次のサンプルチューブを操作するようにします。
- チューブから液を除去する際はマニュアルピペットを使用しビーズを取り除かないように気をつけます。アスピレーターは使用しないようにしてください。

レジオネラ分離操作手順

1. 50mLチューブからキャップをはずし、5mLの10xBufferを加えた後、再度しっかりとキャップする。複数検体を試験する場合は本数分用意する。
2. テストサンプルをよく混ぜる。
3. それぞれのサンプルから45mLを取り、5mLの10xBufferの入ったチューブに加える。キャップはしっかりと締める。それぞれのサンプルについて同様の操作を繰り返す。
4. サンプルとBufferの入ったチューブを10秒間攪拌（ボルテックス）する。
5. Dynabeads Max anti-Legionellaを10秒間ボルテックス（上下さかさまにして5秒ずつ）し、それぞれのチューブに150 μ Lずつ加える。キャップはしっかりと締めます。
6. サンプルチューブをミキサーにセットし、1時間混合する（回転数：18-22RPM）。
7. 1時間後、ミキサーからチューブを外し、磁石（DynaMag-1もしくはDynaMag-50）にセットする。
8. サンプルは磁石にセットした状態で穏やかに混ぜながら5分間インキュベートする。
注：1分間ごとに15秒ほど穏やかに反転させることを繰り返す
9. 5分後、サンプルはマグネットにセットした状態のまま、上清をピペットで取り除く。ビーズを吸わないように気をつける。
10. マグネットからチューブをはずし、1xBufferを50mL加える。ミキサーで5分間混ぜる（18-22RPM）。
11. ミキサーからチューブを取り外し、マグネットにセットする。サンプルは磁石にセットした状態で5分間穏やかに混ぜながらインキュベートする。
注：1分間ごとに30秒ほど穏やかに反転させることを繰り返す
12. サンプルをマグネットにセットした状態で1xBufferをピペットで取り除く。
13. ビーズを1mLの1xBufferで再懸濁する。

サンプルのプレートへの塗抹と解析

1. GVPC寒天培地を2枚用意し、1つは「未処理」もう1つは「熱処理」とラベルする。
2. 1mLのDynabeads MAX懸濁液から0.4mLを「未処理」GVPCプレートに塗抹する。懸濁液がプレート上に均等に分布し、インキュベーション前に乾いていることを確認する。
3. チューブに残った0.6mLのDynabeads MAX懸濁液のうち0.4mLを別のチューブに分注し、この0.4mLを50℃のウォーターバスに30分間つけ熱処理する。
4. チューブをウォーターバスから取り出し、5分間室温に置く。
5. 熱処理したDynabeads MAX懸濁液0.4mLを「熱処理」GVPCプレートに塗抹する。懸濁液がプレート上に均等に分布していることを確認する。
6. 残った0.2mLのDynabeads懸濁液は予備に保存しておく。
7. プレートを37℃でインキュベートし、3-5、7-10、11-14日目に観察する。
8. 確認操作はL-システイン含有およびL-システイン不含BCYE培地で継代培養した後、免疫血清による確認試験を実施する。

それぞれのプレート（未処理もしくは熱処理）で最もコロニー形成数が多かったプレートのコロニー数に5.8をかけることで、CFU/100 μ Lを算出する。