

資料 1

核酸検出法の手順 (Chelex100 法)

1. 検水 500mL をメンブランフィルター (直径 47mm、0.2 μ m、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE) で吸引ろ過する。
2. 滅菌蒸留水 50mL でメンブランフィルター及びカップを洗浄し、吸引ろ過する。
このとき、カップ壁面を洗うように滅菌水をピペットで流しかける。
3. 吸引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50mL 滅菌コンカルチューブに入れる。
4. チューブに 5.0mL の滅菌蒸留水を加え、5 分間ボルテックスする。このとき、まんべんなく滅菌水がフィルターに接触するようにチューブの角度を調節する。
5. この試料を濃縮試料とする。
6. 濃縮試料 5.0mL のうち、1.0mL を微量高速遠心機 15,000rpm 5 分間遠心し、上清を除去する。
7. この沈さに 5%ChelexTE (pH8.8) 50 μ l を加え、ボルテックスする。このとき、均一に添加するため、Chelex はスターで攪拌しながら採取する。
8. 7 の試料を 100°C で 10 分加熱し、15,000rpm 5 分遠心し、この上清を精製 DNA を除去する。
9. 精製 DNA を 95°C、5 分間加熱後、冷却試料の 5 μ l を qPCR 装置 (ABI PRISM 7000)、および LAMP 装置で核酸増幅。
10. 標準菌株の希釈系列から検量線 (LAMP 法の検量線は希釈系列で菌数の少ないものを採用すると直線性が悪くなるので、菌数の高いほうで得られた直線を採用) を作成し、試料の Ct 値、または Tt 値をもとに試料の菌数とした。
11. 得られた菌数は試料 10mL 中の菌数に相当するので、培養法の 100mL と比較するために、核酸法の菌数を 10 倍にする。

[C] 浴槽水のレジオネラ属菌検出状況と検査法の比較(平成21年度)

研究要旨

平成21年度は浴槽水57検体を採取して、遺伝子検査法(リアルタイム PCR 法、逆転写反応後のリアルタイム PCR 法)と培養法により、レジオネラ属菌の検査を行い、一般細菌数および従属栄養細菌数の測定を並行して実施した。その結果、培養法で浴槽水57検体中3検体(5.3%)からレジオネラ属菌が検出され、それらの菌種および血清群は *L.pneumophila* 3群、5群、6群、8群、9群、10群で、3検体とも複数の血清群の菌が検出された。検査法ごとに検出率を比較すると、逆転写反応後のリアルタイムPCR法(73.7%)、リアルタイムPCR法(56.1%)の順に高く、いずれも培養法より検出率が高かった。これらの遺伝子検査法は高感度で定量性が高く、衛生管理指標として有用と思われる。

A.研究目的

入浴施設で近年特に問題となっているレジオネラ属菌の汚染調査により汚染実態を明らかにし、同時に入浴施設における衛生管理のより良い指標とするため、従来の培養法と遺伝子検査法を比較して、その有用性を検討している。本年度はリボソーム RNA の逆転写反応後にリアルタイム PCR を実施して、その有用性を検討した。

B.研究方法

(1)材料

浴槽水 57 検体を採水し、レジオネラ属菌の検査を実施した。

(2)方法

検査法は、培養法と遺伝子検査法のリアルタイムPCR(qPCR)法および逆転写反応後のリアルタイム PCR(qRT-PCR)法を併用して実施した。即ち、検体 500ml をフィルター(ポリカーボネート製: 0.45 μ l)でろ過し、フィルターを滅菌水 5ml で1分間ボ

ルテックスして菌を十分洗い出した。培養法はこの溶液 1ml を 50°C、20 分間加熱処理後、10 倍段階希釈し、その 0.1ml を GVPC 培地(日本ビオメュー製)にコンラージで塗抹して 37°C、10 日間培養後、コロニーの同定と菌数測定を行った。遺伝子検査は、残りの溶液 2ml を 13,000rpm、5 分間遠心後、上清を除去して沈渣 100 μ l を得た。この濃縮液を昨年度の研究班の DNA 抽出法のうち、リゾチーム処理を省略し、カラムからの最終溶出は AE バッファー 25 μ l で 2 回抽出して、50 μ l の DNA 溶液とし、その 5 μ l を qPCR 法に使用した。qRT-PCR 法は上記遠心濃縮液 100 μ l に RNA 抽出液 400 μ l を添加して、昨年度の研究班の方法に準じて RNA 抽出後、RT 反応を行って調製した溶液の 5 μ l を使用して qPCR 法を行った。qPCR 法は、タカラバイオ: Thermal Cycler Dice Real Time System, Cycleve Legionella (5S) kit 使用)を使用し、RT 反応はタカラバイオ: PrimeScript RT reagent Kit によりタカラバイオから送付された reverse Primer を使用して逆転写反応を行い、その後 qPCR 法を実施した。遺伝子検査法

による定量は、*L.pneumophila* 80-045 株を用いて培養法により菌数を測定し、菌量既知の各希釈液に対する Ct 値(qPCR 法)を測定して検量線を作成した。菌数は実際の検体の測定値(Ct 値)からこの検量線により算出した。また、同時に一般細菌数(以下 SPC)と従属栄養細菌数(以下 HPC)も測定した。

C. 研究結果

菌量既知の菌液を用いて得た検量線を、図 1-1 と 1-2 に示した。どちらも $R^2=0.990$ と $R^2=0.987$ で強い相関が示された。

実検体では、温泉水に含まれるフミン質等による PCR 反応の阻害作用を抑制するために、酵素反応後に反応液を希釈して PCR を実施した。今年度の検体中に含まれる夾雑物の状況を、 $100\mu\text{l}$ の濃縮液中と RNA 抽出後の反応液について、遠心後の沈渣を 図 2-1 と 2-2 に示した。

No19、25、26、35、49 の検体は沈渣に夾雑物が認められ、RNA 抽出後にもこれらの検体では同様に夾雑物が残っていたが、No19 は qRT-PCR 法のみが、No25、26、49 は 3 法の何れも陽性で、No35 は 3 法が陰性であった。

浴槽水 57 検体について、各検査法によるレジオネラ属菌検査結果を、表 1 に示した。培養法では、3 検体(5.3%)が陽性となり、遺伝子検査法では qPCR 法が 32 検体(56.1%)、qRT-PCR 法は 42 検体(73.7%)が陽性となった。また、培養法の基準値($10\text{cfu}/100\text{ml}$)を超過して検出された検体は、qPCR 法が 5 検

体(8.8%)、qRT-PCR 法は 7 検体(12.3%)で、いずれも検出率は qRT-PCR 法 > qPCR 法 > 培養法の順に高かった。培養法で検出されたレジオネラは、*L.pneumophila* 血清群 3 群、5 群、6 群、8 群、9 群、10 群であった。

検査法別に検出結果を比較して、表 2-1 と 2-2 に示した。

培養法で陽性となった検体は遺伝子検査法でも陽性であり、qRT-PCR 法が陽性の検体はほとんどが qPCR 法でも陽性であったが、1 検体は qRT-PCR 法で陰性、qPCR 法は陽性であった。また、遺伝子検査法で検出された菌数が培養法の基準値($10\text{cfu}/100\text{ml}$)を超過して検出された検体では、培養陽性検体は qRT-PCR 法および qPCR 法とも陽性で、また qPCR 法陽性検体は qRT-PCR 法でも陽性であった。

qPCR 法と qRT-PCR 法で陽性となった検体について、両法の菌数分布を、図 3 に示した。

$R^2=0.6248$ で、両方の菌数分布は比較的強い相関が認められた。

D. 考察

今年度実施した浴槽水のレジオネラ属菌検査結果は、培養法で 3 検体(5.3%)のみ陽性で、検出率は低率であった。これらの検体では残留塩素濃度が $0\text{mg}/\text{L}$ であったことから、衛生管理が不十分であったためと思われる。また、これ以外の 9 検体が残留塩素濃度 $0\sim 0.2\text{mg}/\text{L}$ 未満で、培養法ではレジオネラは検出されなかったが、qRT-PCR 法により 9 検体すべてが、qPCR 法では 6 検体が陽性となったことから、これらの浴槽水では

潜在的なレジオネラ汚染が示され、衛生管理の徹底が必要であると思われた。

今年度実施した qRT-PCR 法は、今まで検討してきた qPCR 法に比べさらに検出率が高く、qPCR 法陽性の検体における両法の菌数分布も比較的強い相関が見られたことから、qPCR 法よりもさらに高感度で定量性のある検査法であると考えられる。一方、遺伝子検査法は高感度であるが故に、実験操作中のコンタミネーションなどにより偽陽性を示す可能性があり、また温泉中に含まれるフミン質などの PCR 反応阻害物質により偽陰性を示すこともあるなど、遺伝子検査法を行う際には慎重な操作と対照による反応の確認が求められる。今回 qRT-PCR 法を実施するに当たって、フミン質などを除去する検体処理法として、従来から使用しているカラムに代えて、濃縮液を高希釈して使用する方法を行った。この結果、5 検体の RNA 抽出液において遠心後の管底に夾雑物の沈渣が残っていたが、3 検体は qRT-PCR 法および qPCR 法とも陽性、1 検体は qRT-PCR 法のみ陽性、1 検体は 3 法の検査が全て陰性であったことから、この処理法で RT 反応や qPCR 反応の阻害は回避できるものと思われた。

入浴施設の浴槽水のレジオネラ汚染は、環境中に広く存在していると思われるレジオネラや人による本菌の持ち込みにより容易に起こると思われる。したがって、入浴施設でのレジオネラ感染を防止するためには、環境中に分布するレジオネラの汚染実態の把握と浴槽水等の衛生管理が最も重要であり、迅速・高感度で定量性のある検査法が必要とされている。これまで検討してきた遺伝子検査法は、いずれも迅速・高感度なレジオネラ検出法であり、同時に浴槽水等の衛生管理指標として良好な定量性を示し、有用な検査法であることが示された。また、レジオネラ感染事例発生時の原因究明などにおいても、迅速に結果を得ることのできる非常に有効な検査法であると思われる。ただ、一般的な検査法として普及するには、試薬や検査機器が高価なこと、検体を遺伝子検査に供するまでに比較的煩雑な前処理が必要で、安定した結果を得るにはそれなりのトレーニングを要することなど、多少の問題も残っている。しかし、レジオネラ陽性となった入浴施設の営業再開の判断に、遺伝子検査法による判定を既に導入している自治体もあり、今後はレジオネラ検査において遺伝子検査法の普及が加速されるものと思われる。

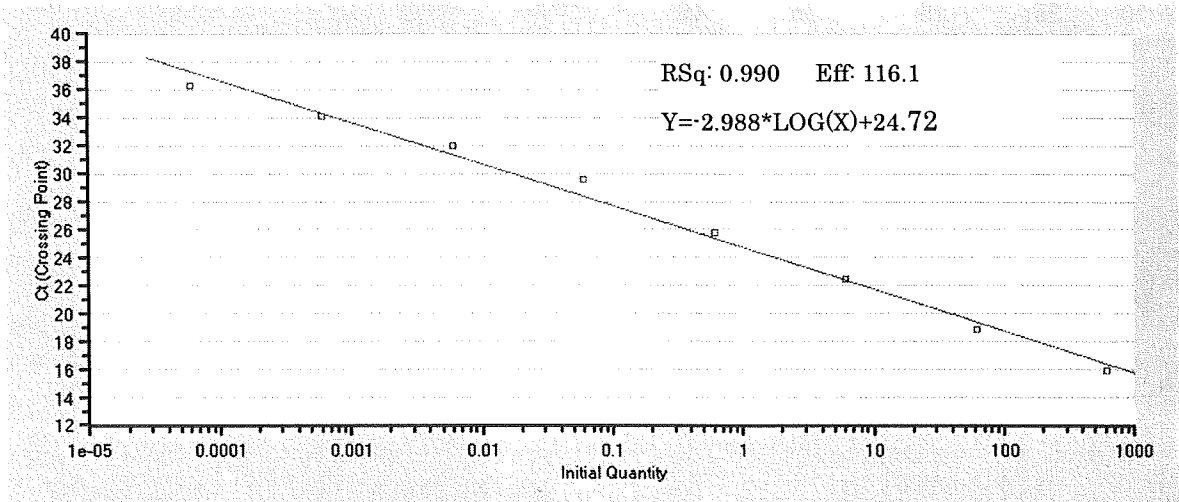


図1-1 検量線(qRT-PCR 法)

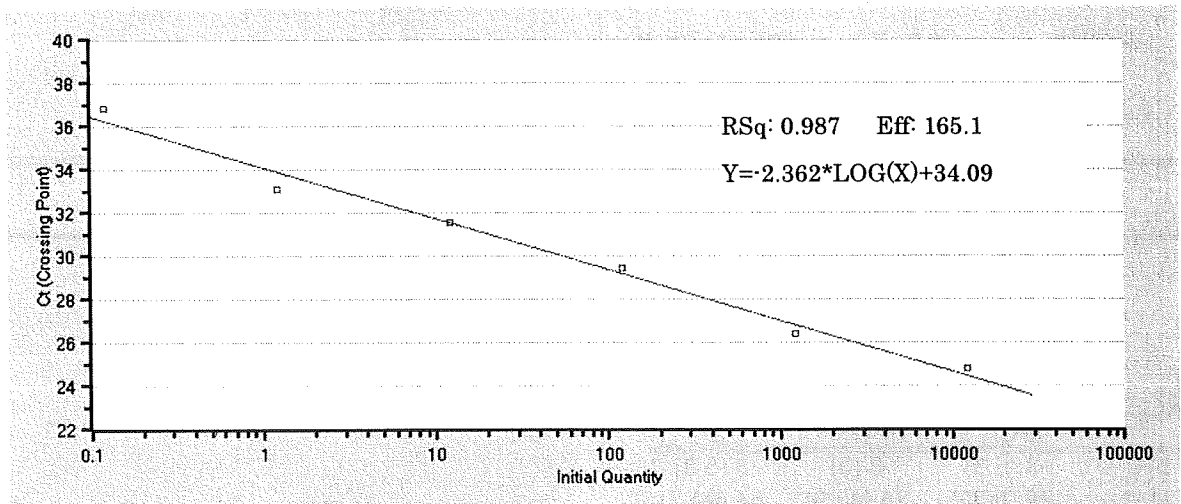


図1-2 検量線(qPCR 法)

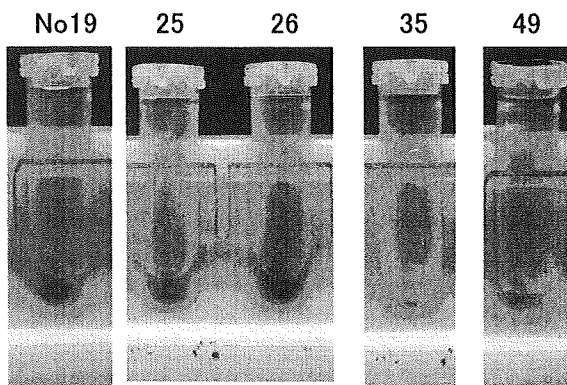


図2-1 RNA 抽出前の沈渣

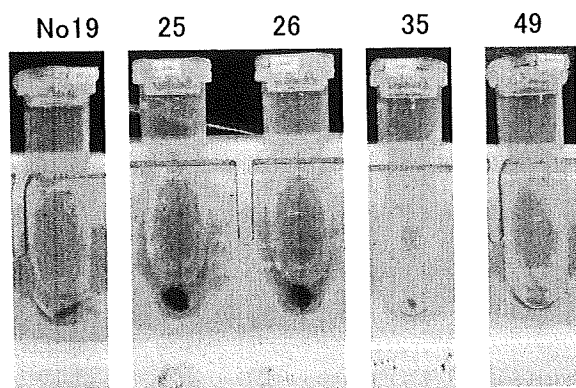


図2-2 RNA抽出後の沈渣

表1 浴槽水の検査法別レジオネラ検出結果

検査法	陽性検体数	検出率(%)	検出菌名(血清群)
培養法	(3)	(5.3)	<i>L. pneumophila</i> (3群、5群、6群、8群、9群、10群)
qPCR法	32 (5)	56.1 (8.8)	
qRT-PCR法	42 (7)	73.7 (12.3)	
計	43		

* (): 10cfu/100ml以上検出

表2-1 検査法別検出結果の比較

①	qPCR+	qPCR-	計
培養+	3 (5.3)	0 (0)	3 (5.3)
培養-	29 (50.9)	25 (43.9)	54 (94.7)
計	32 (56.1)	25 (43.9)	

②	qPCR+	qPCR-	計
qRT-PCR+	31 (54.4)	11 (19.3)	42 (73.7)
qRT-PCR-	1 (1.8)	14 (24.6)	15 (26.3)
計	32 (56.1)	25 (43.9)	

③	qRT-PCR+	qRT-PCR-	計
培養+	3 (5.3)	0 (0)	3 (5.3)
培養-	39 (68.4)	15 (26.3)	54 (94.7)
計	42 (73.7)	15 (26.3)	

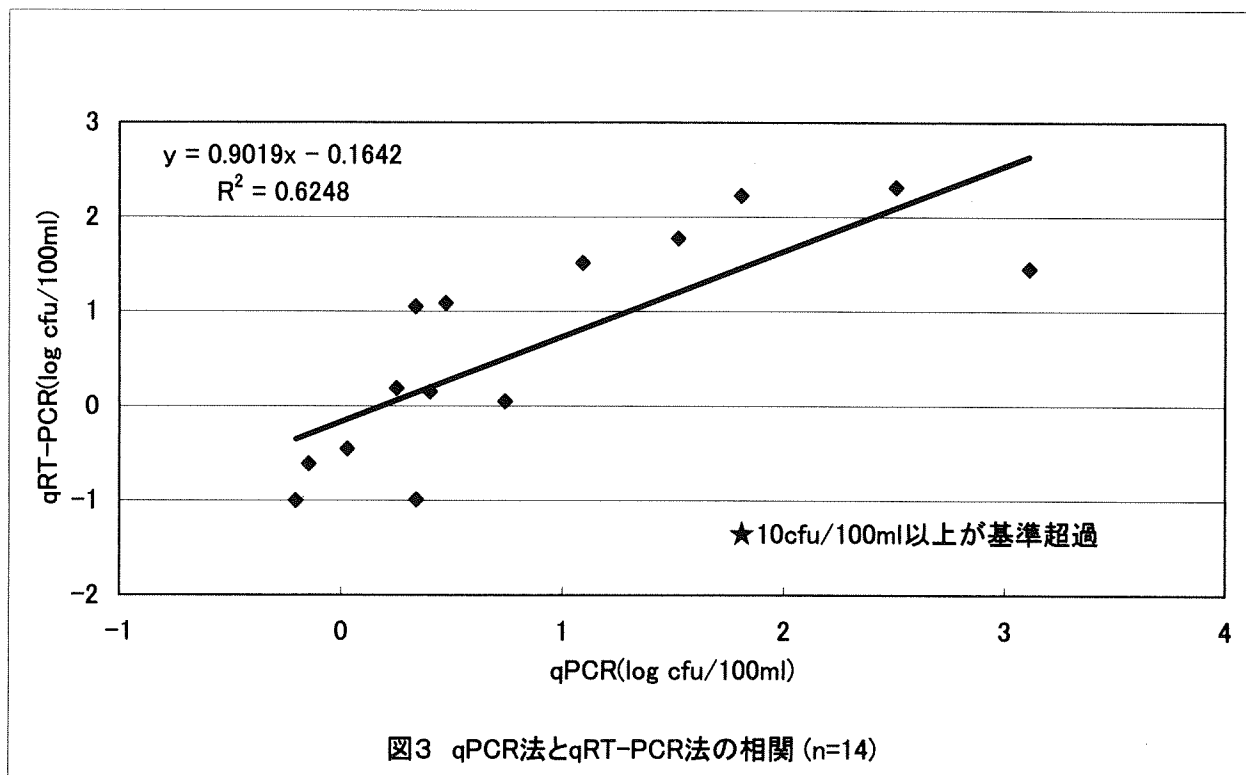
表2-2 検査法別検出結果の比較

①	qPCR+	qPCR-	計
培養+	3 (5.3)	0 (0)	3 (5.3)
培養-	2 (3.5)	52 (91.2)	54 (94.7)
計	5 (8.8)	52 (91.2)	

②	qPCR+	qPCR-	計
qRT-PCR+	5 (8.8)	2 (3.5)	7 (12.3)
qRT-PCR-	0 (0)	50 (87.7)	50 (87.7)
計	5 (8.8)	52 (91.2)	

③	qRT-PCR+	qRT-PCR-	計
培養+	3 (5.3)	0 (0)	3 (5.3)
培養-	4 (7.0)	50 (87.7)	54 (94.7)
計	7 (12.3)	50 (87.7)	

(10cfu/100ml以上検出)



[D] 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」

平成 21 年度分担研究報告書

浴槽水等を用いた核酸抽出法と培養法の比較検討

研究要旨:5%キレックス溶液を用いて、浴槽水等から *Legionella* 属菌の定量的な核酸抽出が可能か検討した。標準菌株(Nagasaki 80-045)の希釈系列を用い、5%キレックス溶液で DNA を抽出し、*Legionella* 属菌の 5SrRNA を標的としたリアルタイム定量 PCR(qPCR)を行ったところ、高い直線性を有する検量線が得られ、その検出感度は 3cfu/tube であった。同抽出方法については昨年度も検討したが、キレックス溶液による抽出量を 200 μ l から 40 μ l に変更することにより、検出感度が高くなり、安定した成績が得られた。

次に、入浴施設の浴槽水等のろ過濃縮試料に応用し、抽出 DNA の 5 μ l を用い qPCR で *Legionella* 属菌の定量を試みた。1 検体で qPCR の増幅阻害がみられたが、簡便で、安価な DNA 抽出方法としての汎用が期待される。

併せて、斜光法を取り入れた培養法の迅速化についても検討を行った。その結果、より短い期間で正確な培養結果が得られ、特殊な分析機器も必要としないことから、浴槽水等の *Legionella* 属菌培養検査に大いに役立つことが示された。

A. 研究目的

浴槽水の *Legionella* 属菌の検査法としては培養法が広く用いられているが、結果を得るまでに 7 日から 10 日を要する。一方、患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時や *Legionella* 属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中の *Legionella* 属菌の存在あるいは菌数を速やかに把握する必要がある場合が多々あり、監視現場からはより迅速で、かつ正確な検査法が求められている。そこで、昨年度と同様、様々な泉質を有する温泉水等を対象に、培養法と核酸検出法(qPCR 法、LAMP 法)を行い *Legionella* 属菌の検出感度、定量性などについて比較検討した。

併せて、正確・簡便・迅速な培養結果を得る方法として、分離培地上の出現コロニーに 2 方向から斜光をあて、実体顕微鏡で観察をすると、*Legionella* 属菌は特徴的なモ

ザイク状の形態を示すことを利用した「斜光法」を日常の *Legionella* 属菌検査に導入する目的で従来の培養法と比較検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 21 年 6 月、7 月、10 月、12 月に搬入された浴槽水等 68 検体を対象に検査を実施した。

検査法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した。すなわち、検水 1500ml をメンブランフィルター(直径 47mm、0.2 μ m、ADVANTEC 社 POLYCARBONATE)で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 15ml 入りの滅菌コニカルビーカー(100ml 容量)に移し、ボルテックスミキサーにて 5 分間激しく振とうした。ろ過濃縮後、濃縮検体(未加熱と表記)と 50 $^{\circ}$ C 20 分加熱後、急冷

した濃縮検体(加熱処理と表記)をそれぞれ濃縮試料(100倍濃縮)とした。

2. 培養法

Legionella 属菌の分離培地として WYO α 寒天平板(栄研化学)、GVPC 寒天平板(日研生物)、MWY 寒天平板(自家製)を用い、非濃縮処理の検水および各濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、その 200 μ L を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布し、これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36 $^{\circ}$ C で培養した。

培養 3 日目に、2 方向から光を照射し、実体顕微鏡下で各分離培地を観察した。*Legionella* 属菌が疑われたコロニーは、BCYE α 寒天培地(自家製)及び血液寒天培地(ウマ血、自家製)に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、PCR 法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は 36 $^{\circ}$ C で 10 日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色の *Legionella* 様コロニーについて、同様の同定検査を行った。最終的に同定されたコロニー数をもって検水 100ml あたりの *Legionella* 属菌数に換算した。分離した菌株は、*Legionella* Latex Test Kit(OXOID)及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

3. 検量線の作成

Legionella pneumophila SG1, Nagasaki 80-045 を指標菌株とし、30 $^{\circ}$ C 3 日間培養後、滅菌生理食塩水で McF2 程度の菌液を調整し、10 倍希釈系列を作成した。希釈した菌液(10² から 10⁸)について DNA 抽出を行い、検量線を作成した。

4. DNA 抽出

濃縮試料 2000 μ L を分取し 12000rpm で 5 分間遠心後、上清を除去して沈渣に 5% キレックス溶液 40 μ L を添加、99 $^{\circ}$ C 5 分加熱処理後、12000rpm で 5 分間遠心した。得られた上清を約 30 μ l ~ 25 μ l 程度、キレ

ックス粒子が入らないように注意深く分取し、DNA 抽出液として、測定までの間、冷凍保存(-30 $^{\circ}$ C)した。

また、LAMP 法については、検査キットに添付されている抽出方法で検討を行った。

5. 核酸検出法

qPCR 法については、CyclevePCR *Legionella*(5SrRNA)Detection Kit (タカラバイオ)を用い、Thermal Cycler Dice Real Time System(以下、DICE)で測定した。

LAMP 法については、*Legionella* Detection Kit *E*(栄研化学)を用い、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で測定した。

C. 研究結果および考察

1. 培養法

培養結果の概要を表 1 に示した。68 検体中 36 検体(53%)から *Legionella* 属菌が検出された。内訳は浴槽水 34 検体中 19 検体(56%)、湯口水 34 検体中 17 検体(50%)であった。

Legionella 属菌が検出された 36 検体について分離培地の検出感度を比較した結果を表 2 に示した。濃縮未加熱検体では、使用した 3 種類の分離培地全てから分離されたものが 22 検体、WYO α +MWY から分離されたものが 1 検体、WYO α のみから 2 検体、MWY のみから分離されたものが 2 検体であった。濃縮加熱検体では、3 種類の分離培地全てから分離されたものが 20 検体、WYO α +MWY から分離されたものが 1 検体、GVPC+MWY から分離されたものが 2 検体、WYO α のみから 4 検体、GVPC のみから 2 検体、MWY のみから分離されたものが 4 検体であった。未加熱・加熱によらず濃縮検体としてみると、使用した 3 種類の分離培地全てから分離されたものが 24 検体、GVPC+MWY から分離されたものが 1 検体、WYO α のみから 6 検体、MWY のみから分離されたものが 5 検体であった。

MWY のみに発育してきた菌株について、16S シークエンス解析により種の同定を試み

たところ、*L. maceachernii* と同定された。当該菌の MWY 以外の WYO α 、GVPC での培地発育試験試みたが WYO α 、GVPC では、ともに発育が認められなかったため、MWY のみでしか分離できない *Legionella* 属菌の存在が示されたのとも考える。

斜光法は培養 3 日目を判定日とし、特徴あるモザイク状のコロニーに加えて、モザイク状疑いのコロニーについても確認検査を行った。その結果、釣菌した 474 コロニー中 *Legionella* 属菌と確認されたものは 389 コロニーで 82% のヒット率であった。さらに、斜光法で紛らわしいコロニーを釣菌し、精査した結果、すべて *Legionella* 属菌は否定された。ヒット率が 82% にとどまったのは、経験不足から紛らわしいコロニーも釣菌したためであり、経験を積むことによりヒット率は上昇するものと考えられる。

分離された *L. pneumophila* の主な血清群は SG1、SG2、SG3、SG4、SG5、SG6、SG9 などであった。

一方、培養 3 日目では発育コロニーが観察されず、培養 10 日目で *Legionella* 属菌の発育が確認された検体が 2 検体あった。

2. 検量線の作成

10^2 から 10^8 CFU までの希釈系列から、5%キレックス溶液で抽出した DNA の qPCR による検量線を作成した。得られた検量線は直線性も高く、 $R^2=0.997$ で高い負の相関を示した(図 1)。検出感度は 3cfu/tube であった。図 2 に指標菌の各希釈系列の培養法で求めた菌数とキレックス抽出 DNA による qPCR 測定菌数を示した。

3. 核酸検出法と培養法の相関

(1) 基準値(10cfu/100ml)に合わせた定量の結果(表 3)

68 検体について、qPCR 法と培養法の 10cfu/100ml 以上、未満での比較を行った。培養法(+)qPCR(-)の不一致が 4 検体であった。培養(+)qPCR(-)となった 4 検体のうち 1 検体はインターナルコントロールの増幅が確認されず、PCR 増幅阻害が認められた。

(2) 基準値(10cfu/100ml)によらない定性の結果(表 4、表 5、表 6、表 7)

68 検体について、LAMP 法と培養法および qPCR 法・LAMP 法と培養法の定性結果の比較を行った。培養法(+)LAMP 法(-)の不一致が 3 検体あった。今回、LAMP 法については、阻害回避処理試薬を用いた検討を併せて行ったが、回避処理前と処理後で測定結果に不一致が生じたため、5 回繰り返し測定を行い、精度について検討した結果を表 5 に示した。5 回とも同じ結果が得られたのは 16 サンプル中 5 サンプルで、昨年度まで多くみられた培養法(+)LAMP 法(-)の不一致の原因は、LAMP 法の不安定さにも一因があるのではないかと考えられた。

培養法(+)で qPCR 法と LAMP 法が(-)のものがそれぞれ 5 検体、3 検体あった。

qPCR 法と LAMP 法の比較では、qPCR (+)LAMP (-)の不一致が 9 検体であった。この 9 検体のうち、培養法でも(+)となったものは 2 検体であった。qPCR (-)LAMP (+)の不一致は 5 検体で、阻害回避処理をすることで LAMP 法(-)から(+)の結果に転じたものが 2 検体あった。この 5 検体のうち、培養法でも(+)となったものは 4 検体であった。

(3)核酸抽出法と培養法の相関(図 3)

68 検体について、各検査法の定性値をもとに散布図を作製した。

D. 結論

培養法について検討した結果、*Legionella* 菌が検出された 36 検体(53%)のうち、使用した WYO α 、GVPC、MWY の分離培地全てから *Legionella* 属菌が分離されたものは 24 検体(35%)に過ぎず、*Legionella* 属菌を感度よく分離するには、*Legionella* 属菌の発育特性に配慮し、選択性の異なる培地を併用することが望ましい。今回、濃縮加熱処理した検体からのみ *Legionella* 属菌が検出された場合もあり、未加熱・加熱処理の併用や各種分離培地の併用など培養チャンスを多くすることが検出率アップにつながり、レジオネラ感染症の

危険性を回避することに貢献できると考えられる。

また、斜光法は検査検体数が多いと観察に長時間を要し、10日間培養を続ける間に何回も観察しなければならないとなると、心が折れそうになることもあるが、簡便で迅速な結果が得られる培養法として、非常に有用な方法であることには変わりない。今後、核酸検出法(主にLAMP法)の結果と培養3日目で見観察・同定する斜光法の結果を合わせて迅速結果として行政対応し、培養1週間で降しか発育してこない検体もあったため、10日間引き続き培養を継続し、最終結果として対応することで行政側との調整を図っている。3日目観察・同定後、最終判定日の10日目まで作業を中断することができることから、負担軽減にも功を奏し、また、検査を集中することにより検出確率が上昇する利点も考えられた。

qPCR法では、5%キレックス溶液の液量を200 μ lから40 μ lに変更したことにより、昨年度に比べ、抽出効率が上がり安定した測定結果が得られた。核酸抽出法としてのキレックス法は安価で、操作が簡便で、迅速にDNA抽出をすることができる有用な方法として汎用が期待される。

一方、*Legionella* 属菌数が少ない検体の場合等は、検査結果にバラツキが生じやすく、培養法(+)LAMP法(-)の不一致の一因として、LAMP法の不安定さが考えられた。繰り返し(同一DNA抽出液を複数回)の測定やピペット操作の熟練など細心の注意を払う必要性を痛感した。

入浴施設における浴槽等の清掃・消毒効果を確認するための衛生管理手法として、迅速で高感度の核酸検査法を導入することは効果的ではあるが、少菌数の場合は見逃しの危険性もあることから、培養法の併用は必須であろう。そこで、培養法における迅速化を図るため、斜光法を取り入れた培養法を併用することにより、さらに正確な結果が期待でき、迅速な行政対応が可能になるものと考えられる。

参考文献

1 「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」厚生労働科学研究費補助金 地域健康危機管理研究事業、主任研究者 倉文明、H19年度総括・分担研究報告書

2 「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」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、研究代表者 倉文明、H20年度総括研究報告

3 森本 洋:分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 環境感染誌, 2010. 25(1):8-14

F. 研究発表等

1. 環境衛生監視員等事例発表会にて発表
2. 大分県レジオネラ監視マニュアル作成

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

FAMY = -3.114 * LOG(X) + 40.03 RSq : 0.997 Eff = 109.5 %

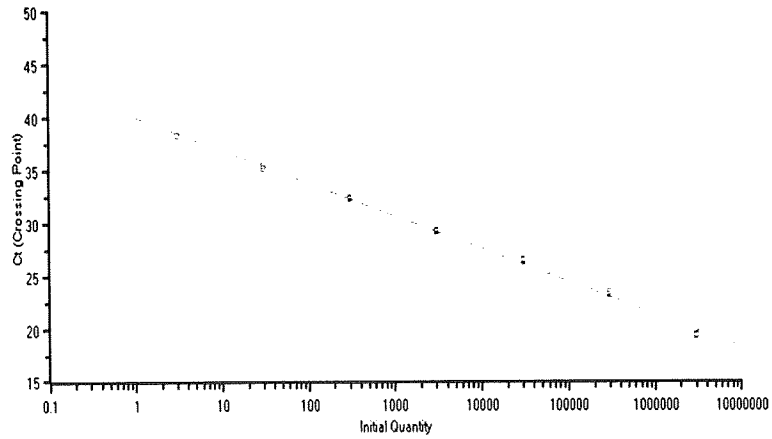


図1 キレックス抽出による検量線

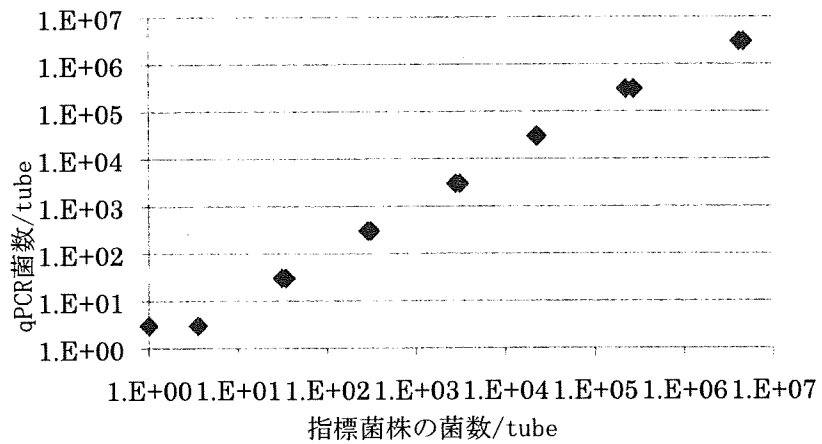


図2 キレックス抽出の qPCR 定量値の比較

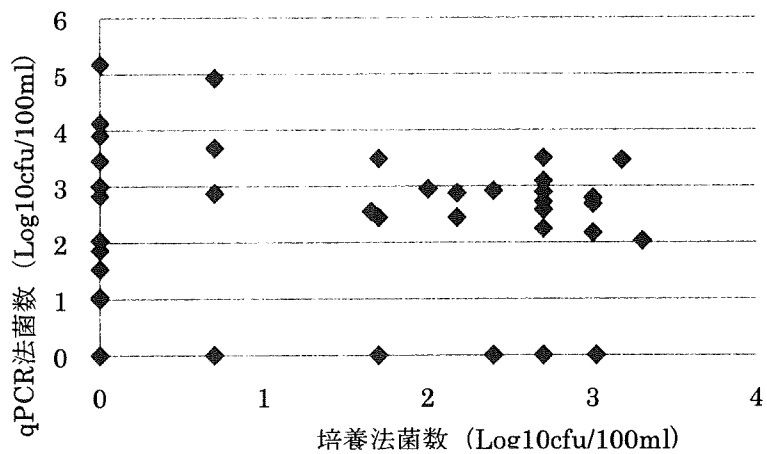


図3 浴槽水等の qPCR 法と培養法の定性値による散布図

表 1 培養法の結果

	採水箇所	検体数	検出数	WYO	GVPC	MWY
掛け流し式	浴槽水	29	17	14	15	17
	湯口水	29	13	11	8	10
循環式	浴槽水	5	2	1	1	2
	湯口水	5	4	4	1	1
計		68	36	30	25	30

10cfu/100m によらない(定性)

表 2 分離培地の検出感度

			検出数	未加熱	加熱
WYO	GVPC	MWY	24	22	20
WYO	GVPC				
WYO		MWY		1	1
	GVPC	MWY	1		2
WYO			6	2	4
	GVPC				2
		MWY	5	2	4
計			36	27	33

濃縮検体において、
未加熱・加熱に分けず、
総合的な検出数

表 3 qPCR 法と培養法の比較

		qPCR		計
		+	-	
培養法	+	26	4	30
	-	20	18	38
計		46	22	68

10cfu/100m による(定量)

○6 月採水No.23(湯口水)：濃縮試料の 10 倍希釈段階で WYO α に 1 コロニー発育。L.p
○10 月採水No.1(浴槽水)：菌数 10cfu、LAMP の立ち上がりも遅い。L.p
○10 月採水No.9(浴槽水)：菌数は 1050cfu。MWY のみに遅く発育。LAMP は阻害回避処理後に陽転。分離菌株はコンベンショナル PCR(-)
○10 月採水No.10(No.1 の湯口水)：菌数は 1050cfu。インターナルコントロール (-) で qPCR 反応阻害が確認された。L.p

表 4 LAMP 法と培養法の比較

		LAMP		計
		+	-	
培養法	+	33	3	36
	-	13	19	32
計		46	22	68

10cfu/100m によらない(定性)

○6 月採水No.8(浴槽水)：菌数 50cfu
○6 月採水No.24(湯口水)：菌数 5cfu
○10 月採水No.16(湯口水)：菌数 5cfu

表 5 LAMP 法培養法との比較 (2)

検体No	培養法	LAMP 法(従来法)					LAMP 法(阻害回避処理)				
		初回	2	3	4	5	初回	2	3	4	5
1	10cfu	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
5	50cfu	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
7	検出せず	-	+	・	-	-	+	-	・	+	-
9	1050cfu	-	-	・	+	+	+	-	・	-	-
10	1000cfu	+	・	・	-	+	+	・	・	+	+
11	50cfu	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
16	5cfu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	40cfu	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

同一検体について 5 回繰り返し測定をした。・は NT

表 6 核酸検査法と培養法の比較

		qPCR		計	LAMP		計
		+	-		+	-	
培養法	+	31	5	36	33	3	36
	-	19	13	32	13	19	32
	計	50	18	68	46	22	68

10cfu/100m によらない(定性)

表 7 qPCR 法と LAMP 法の比較

		qPCR		計
		+	-	
LAMP	+	41	5	46
	-	9	13	22
	計	50	18	68

○LAMP 法で阻害回避処理試薬を用いることにより 3 検体が陽転したが、そのうち、2 検体が含まれている。
 ○qPCR 法でインターナルコントロール (-) の PCR 反応阻害が確認されたものが 1 検体あった。
 ○培養法で 4 検体 (+)

○培養法で 2 検体 (+)

平成 21 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
分担研究報告書

「ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究」

研究代表者	国立感染症研究所細菌第一部	倉 文明
研究分担者	神奈川県衛生研究所	黒木俊郎
研究分担者	岡山県環境保健センター	中嶋 洋
研究協力者	群馬県衛生環境研究所	藤田雅弘

入浴施設への HACCP システムの導入に向けて、浴槽水の ATP 測定をモニタリング項目として入浴施設の衛生管理に応用することを目的に本調査を実施した。3 か所の温泉入浴施設において、実際に衛生管理担当者が ATP 簡易測定装置を用いて浴槽水の ATP 測定を行った。入浴施設での ATP 測定実施期間中に一般細菌数、従属栄養細菌数およびレジオネラ属菌数を測定し、ATP 測定値との関係を解析した。毎日洗浄している浴槽では ATP 値は低く保たれており、洗浄の効果が明らかであった。複数日をあけて洗浄を行う浴槽では、洗浄後の ATP 値は低いものの、短時間で従属栄養細菌が増殖し、これに伴い ATP 値が上昇した。ATP 値の測定は、浴槽水の汚染状況の指標として使用することが可能であり、入浴施設での衛生管理に有効であると考えられた。

1. はじめに

本調査は、入浴施設への HACCP システムの導入を前提に、モニタリング項目としての ATP 測定の有用性を検討することを目的に実施してきた。

昨年度の調査では、8 地域で採取された浴槽水 356 検体を対象に、ATP 値を測定し、レジオネラ属菌の検出、従属栄養細菌数および一般細菌数との関連性を調査した。その結果に基づいて ATP 値が 50RLU を超えない管理が必要であることを提案した。こ

の提案の内容は、実験浴槽で解析した結果とも整合するものであった。

今年度は、入浴施設で実際に浴槽水の ATP 量を施設の管理担当者に測定していただき、ATP の測定の有用性を検討した。

2. 材料と方法

1) レジオネラ属菌の測定

レジオネラ属菌の培養は、各衛生研究所において通常用いている方法により行った。試料水（浴槽水）200ml または 500ml を滅

菌メンブタンフィルターでろ過した。フィルターを10mlの滅菌水が入った50ml遠沈管に入れ、激しく振り、フィルターから菌をはがした。菌浮遊液を熱または酸処理した後、滅菌水で10倍段階希釈し、原液と各段階の0.1mlをレジオネラ属菌用の選択分離寒天培地に塗抹し、36°Cで5日間以上培養した。レジオネラ属菌と推定される平板上の集落を計数し、試料中の100mlあたりのレジオネラ属菌数を算定した。

レジオネラ属菌が疑われる集落は、レジオネラ属の確認には16S rRNAをターゲットとしたPCR法、*L. pneumophila*の確認には *mip* 遺伝子をターゲットとしたPCR法を用いて鑑別を行った。レジオネラ属菌あるいは *L. pneumophila* であることが確認された菌株は市販血清により菌種あるいは血清型を決定した。

2) 従属栄養細菌数と一般細菌数の測定

浴槽水の試料を滅菌水で10倍段階希釈し、原液と各段階の0.1mlを従属栄養細菌数の測定にはR2A寒天平板培地へ、一般細菌数の測定には標準寒天培地へそれぞれ接種した。R2A寒天平板は42°Cで7日間、標準寒天平板は36°Cで3日間培養した。培養後、集落数を計数し、試料1ml中の従属栄養細菌数と一般細菌数を決定した。

3) ATP量の測定

ATP量の測定は入浴施設の管理担当者に依頼し、簡易測定キット(ルシバックワイド(キッコーマン))により行った。キットの説明書に従って専用の測定器(ルミテスターPD-10N)にキット本体をセットし、測定器に表示された数値を読み、ATP量を測

定した。

浴槽水のATP量の測定は、状況に応じて1日1回あるいは午前中と夕方の1日2回行っていただくように依頼した。

4) 浴槽に関するデータの収集

レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、一般細菌数の測定を行った浴槽施設について、水温、pH、残留塩素濃度、入浴者数、泉質、浴槽の材質のデータも可能な範囲で収集した。

3. 結果

3ヶ所の入浴施設において、ATP量の計測は衛生管理担当者に依頼して行った。A県においては1入浴施設の2浴槽(aおよびb)の浴槽水を10月26日から11月11日までの18日間にわたり1日1回ATP量を測定することを衛生管理担当者に依頼するとともに、レジオネラ属菌数、一般細菌数および従属栄養細菌数を計測した(図1)。両浴槽の入浴者数は平均280.3人(235~384人)であった。浴槽aの湯温は40~43°C、浴槽bは41~43°Cであった。浴槽aおよびbにおいて、それぞれレジオネラ属菌数は10~2,600CFU/100ml および10~3,270CFU/100ml、従属栄養細菌数は9,430~3,500,000CFU/ml および17,540~2,640,000CFU/ml、一般細菌数は291~363,000CFU/ml および16~597,000CFU/mlであった。検出されたレジオネラ属菌は *L. pneumophila* SG3 およびSG4で、頻度は低いがSG6も検出された。清掃は浴槽aは11月4日、浴槽bは10月26日に実施した。浴槽aでは清掃後

に従属栄養細菌数、一般細菌数および ATP 値が減少したが、レジオネラ属菌数は減少しなかった。これに対して、浴槽 b では清掃後にレジオネラ属菌数が減少したが、その他の項目は減少しなかった。ATP 値は、浴槽 a では 16 回測定したうち 11 回、浴槽 b では 13 回は 50RLU を越えていた。

B 県においては、1 入浴施設の 2 浴槽（ヒノキおよび陶器）の浴槽水を 9 月 19 日から 10 月 12 日に 1 日 2 回 ATP 量を測定することを衛生管理担当者に依頼した（図 2）。入浴者数は 6～27 人であった。湯温は 40～42℃であった。清掃（簡易な水洗い、ブラッシングあるいは塩素消毒）は毎日実施していた。ATP 量の測定は 13 日で 21 回行い、浴槽「ヒノキ」では 0～1,308RLU で 8 回、「陶器」では 0～141RLU で 2 回、50RLU を越えていた。

C 県においては、1 入浴施設の 2 浴槽（大浴場およびヒノキ）の浴槽水を 15 日間にわたり 1 日 2 回 ATP 量を測定することを衛生管理担当者に依頼するとともに、レジオネラ属菌数、一般細菌数および従属栄養細菌数を 10 月 27 日、30 日、11 月 2 日、6 日、9 日および 10 日に計測した（図 3）。入浴者数の情報は得られなかった。浴槽「大浴場」および「ヒノキ」の湯温は 41～42℃であった。清掃は、「大浴場」は週 1 回の割合で 10 月 28 日、11 月 2 日および 9 日の深夜に、「ヒノキ」は毎日午前中に実施していた。それぞれレジオネラ属菌数は 43～912,000CFU/100ml および <10～550CFU/100ml、従属栄養細菌数は 800～480,000CFU/ml および 51,000～735,000CFU/ml、一般細菌数は 135～15,000CFU/ml および 2,500～

29,350CFU/ml であった。ATP 値は、29 回測定したうち「大浴場」では 26 回、「ヒノキ」では 7 回、50RLU を超えていた。「大浴場」の清掃後は ATP 値は 50RLU を下回ったが、翌日には 50RLU を超えた。

4. 考察

入浴施設の衛生管理の HACCP システムを導入することを前提に、浴槽水の ATP 量測定がモニタリング項目として有用であるかどうかを検討することを目的に本調査を進めてきた。これまでの調査において、実験室レベルでの検討では ATP 値と従属栄養細菌数は相関しており、浴槽水中の菌数の推測が可能であることを示されてきた。さらに、実際の浴槽において ATP 量、従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数を測定したところ、ATP 値が 40～50RLU を超えるとレジオネラ属菌が検出される頻度が有意に高くなることから、50RLU を超えないように管理することが必要であることを提案した。

今年度は、入浴施設の管理で実際に ATP 量の測定を行い、モニタリング項目としての有用性を検討した。その結果、50RLU を超えないように管理されている浴槽ではレジオネラ属菌は検出されないか、菌数が低い状態であった。これに対し、50RLU を高頻度で超えていた浴槽では、レジオネラ属菌が浴槽内で増殖し、高い菌数で検出された。以上の結果から、ATP 量の測定が入浴施設の衛生管理において有用であることが示された。

本調査は、ATP 量の測定が衛生管理の現場での浴槽管理のためのモニタリング項目

としての有用性を実証することを目的として行ったが、さらに、浴槽の管理上の利用効果を検証することも試みた。全般的に、浴槽の管理に ATP 量の測定を活用することに賛同が得られた。ATP 量測定を行っていただいた管理者からの感想を以下に挙げる。

1. 数字で結果がすぐに表れるため、浴槽の汚れを知るかなり良い指標になった。
2. 入浴客が多くて清掃が行き届かなかった日は数字が高く出たことがあり、意識的に衛生管理を行うきっかけになった。
3. 測定しながらの衛生管理に、かなり興味を持つことができた。
4. 汚れの状態を数字で知ることができ、清掃を行う動機付けとなった。
5. 清掃実施の指示を出すのは難しい場合があるが、数値で示すことで説得力が増した。
6. 清掃の効果を知るのは難しかったが、効果を数値で知ることができ、やる気が出た。

A 県の入浴施設では、清掃後でも ATP 値や各菌数が減少しないことが観察された。これは、清掃が不十分であることが示唆されていた。このことから、ATP 値の変動をみることで浴槽の清掃による清浄度、菌数への効果を確認することができることが示された。本施設においては、清掃の方法を検討して変更し、それを実施した上で ATP 値の変化を測定して、清掃の効果を確認することが推奨される。

B 県の入浴施設では、ATP 量の測定を依

頼するとともに、50RLU を超えない浴槽水の管理を勧めた。衛生管理担当者は ATP 量を測定することで浴槽水の細菌等の汚染状況を知ることができ、数値を気にしながら清掃を実施した。その効果は ATP 値に現れており、特に「陶器」浴槽では継続的に低値が保たれていた。

C 県の「ヒノキ」浴槽の ATP 値が低いにもかかわらず、従属栄養細菌数が高い結果となっている理由は、ATP 量測定と菌数測定用試料採取のタイミングのずれと推測された。ATP 量の測定は 1 日 2 回実施するように依頼し、午前中の清掃後と夕方の入浴客のピーク後に測定していただいた。一方、菌数測定用試料は清掃直前に採取した。

調査対象にヒノキの浴槽が 2 ヶ所あったが、管理の難しさを示していた。B 県においては、「ヒノキ」浴槽と「陶器」浴槽を同様の清掃法で管理していたが、ATP 値は「ヒノキ」浴槽が「陶器」浴槽よりも高めであった。C 県では、「ヒノキ」浴槽を毎日清掃していたが、ATP 値は低めを保っていたものの、従属栄養細菌数は測定時には $10^4 \sim 5 \text{CFU/ml}$ であった。「ヒノキ」浴槽は清掃時に全換水されていたが、浴槽表面が荒れないようにするためにブラッシングはされていなかった。さらに、木質の色が白く変わらないようにするために塩素消毒も行われていなかった。そのために従属栄養細菌が残留し、結果的に従属栄養細菌数が常に高くなると推測された。

ATP 量の測定結果は浴槽水の従属栄養細菌の増殖や汚れの指標となり、数値が高い場合は浴槽水中の菌数が高く、レジオネラ属菌が増殖する危険性が高いことを示すが、レジオネラ属菌の存在そのものを推測する

ものではない。特に配管中などのピンポイントでレジオネラ属菌が増殖している場合は、従属栄養細菌数と ATP 値が低くてもレジオネラ属菌が浴槽水中に存在している場合がある。C 県の「ヒノキ」浴槽からは、ATP 値が低いにもかかわらずレジオネラ属菌が検出されたが、この浴槽および「大浴場」の湯口からも菌数が少ないもののレジオネラ属菌が高い頻度で検出されたことから、当該入浴施設の配管中でレジオネラ属菌が増殖していることが推測された。

今回の調査対象とした入浴施設の浴槽からレジオネラ属菌が検出されたことから、結果を直ちに施設に知らせ、消毒等の処置を施すことを勧めた。

E. 結論

入浴施設の衛生管理担当者に浴槽水の ATP 量を測定することを依頼し、同時にレジオネラ属菌数、従属栄養細菌数および一般細菌数を測定して、ATP 値と各菌数の関係および入浴施設での ATP 量測定に有効性を検討した。

毎日清掃を行っている浴槽では ATP 値は低い値を継続的に示し、菌の増殖が少ないことが示された。複数日おきに清掃を実施している浴槽では清掃後は ATP 値は低いものの、短時間のうちに ATP 値は上昇した。各菌数も高値が観察された。また、ATP 量の測定は、浴槽水の細菌等の汚染状況を現場でリアルタイムに知ることができるため、入浴施設の衛生管理上非常に有効であることが示された。

以上の結果から、入力施設における浴槽水の ATP 量の測定はモニタリング項目として有用であるという結論が得られた。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

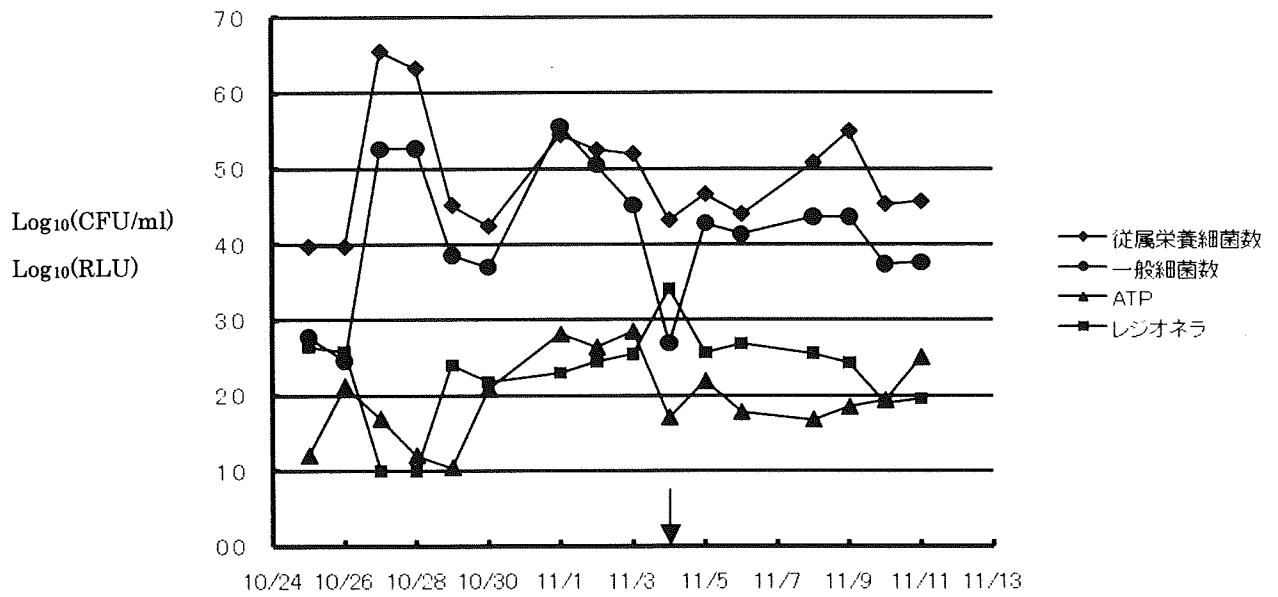


図 1-1 A 県の 1 入浴施設の 1 浴槽 (a) における ATP 量、従属栄養細菌数および
レジオネラ属菌数の推移
↓ : 清掃実施

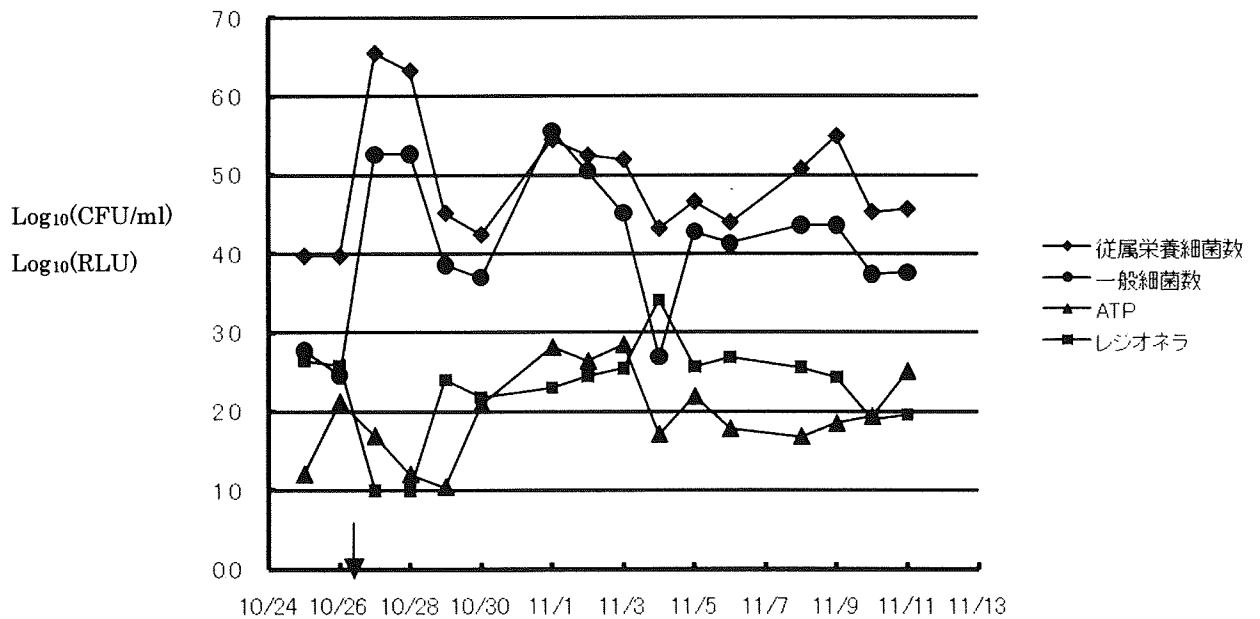


図 1-2 A 県の 1 入浴施設の 1 浴槽 (b) における ATP 量、従属栄養細菌数および
レジオネラ属菌数の推移
↓ : 清掃実施