

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

*Legionella pneumophila* の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析  
-浴槽、冷却塔水および土壌分離株と臨床分離株との比較-

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	前川純子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	常 彬	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	遠藤卓郎	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	鈴木敦子	東京都予防医学協会
研究協力者	市瀬正之	東京都予防医学協会
研究協力者	菊川紀代己	埼玉県立大学 健康開発学科
研究協力者	古畑勝則	麻布大学 生命・環境科学部

研究要旨: *Legionella pneumophila* の遺伝子型別法である SBT (sequence-based typing) 法を用いて、浴槽水分離株 40 株、冷却塔水分離株 48 株、土壌分離株 35 株について型別を行ったところ、各々 28 種類、6 種類、12 種類の ST (sequence type) に分かれ、他の環境分離株より浴槽水分離株の多様性がまさっていた。共通の ST は各々の間で 1 種類ずつしかなく、生息域により ST の分布が異なることが示された。さらに、本邦初発例 (1980 年) から 2008 年までに分離された 149 株の臨床分離株の型別を行ったところ、96 種類の遺伝子型 (ST) に分けられ、本法の有用性が確認できた。臨床分離株と共通の ST は浴槽水分離株で 6 種類だったが、冷却塔水分離株で 1 種類、土壌分離株では 2 種類だった。欧米では給湯水や、冷却塔水からのレジオネラ感染が多いが、日本では入浴施設が主要な感染源となっている。日本では欧米に比べて臨床分離株の ST の多様性が高いことがわかったが、それは、欧米とは異なる感染源である浴槽水からの分離株の多様性を反映している可能性がある。

## A. 研究目的

わが国においてレジオネラ症の主要な感染源は温泉などの入浴施設であると推測されている。レジオネラ症の起因菌として最も頻度の高い *L. pneumophila* 血清群 1 について、浴槽水分離株の遺伝子型別を行ない、特徴づけを行った。冷却塔水分離株、土壌分離株についても型別を行い、浴槽水分離株と比較した。また、レジオネラレファレンスセンターにおいて臨床分離株の収集を行っており、収集された *L. pneumophila* の型別結果から、環境分離株との比較検討を行った。血清群 1 の株についてはモノクローナル抗体 (MAb) 型別も行った。本研究の目的は、各分離株の遺伝子型の特徴を明らかにすること、および本法の疫学的有用性を確認することにある。さらに、臨床分離株と環境分離株を比較することにより、病原性の高い遺伝子型を明らかにし、浴場等の衛生管理につなげる可能性についても言及する。

## B. 研究方法

わが国における *L. pneumophila* 臨床分離株 149 株、および日本各地から分離された臨床分離株とは無関係な *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 123 株 (冷却塔水分離株 48 株、土壌分離株 35 株、浴槽水分離株 40 株、うち温泉由来の株が 13 株、家庭用循環風呂が 8 株、公衆浴場等の温泉ではない浴槽水由来株が 19 株) を EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) の方法

(<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した<sup>1,2)</sup>。*flaA* は鞭毛(flagellin)タンパク質、*pilE* は IV 型線毛(type IV pilin)タンパク質、*asd* はスレオニン生合成系酵素であるアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aspartate-b-semialdehyde dehydrogenase)、*mip* は宿主マクロファージへの感染に寄与する(macrophage infectivity potentiator)タンパク質、*mompS* は主要外膜タンパク質(major outer membrane protein)、*proA* は亜鉛メタロプロテアーゼ(zinc metalloprotease)、*neuA* は N-アシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼ (N-acylneuraminate cytidylyltransferase) をそれぞれコードする遺伝子である。7 遺伝子の遺伝子型が決まった分離株を EWGLI のデータベース<sup>3)</sup>に登録すると、新しい遺伝子型の組み合わせについては ST (sequence type) ナンバーが付与される。

血清群はデンカ生研のレジオネラ免疫血清 (1~15) により決定した。環境分離株については、血清群 1 の株について解析をおこない、臨床分離株は入手したものを血清群によらず、すべて解析した。臨床分離株は複数の患者が発生した事例については 1 株のみ検査したが、逆に 2 種類の株が得られた患者 2 名、3 種類の株が得られた患者 1 名の株はすべて検査したため、患者数は 145 名である。

血清群 1 の株については 6 種の MAb による型別<sup>4)</sup>をドレスデン工科大学のユー

ゲン・ヘルビツヒ博士との共同研究として行った。本型別により血清群1の菌は9種類のサブグループに分けられる(図1)。

### C. 研究結果

SBTにより遺伝子型別を行った(表1)。浴槽水分離株40株は29種類に型別され、多様であった。最も多かったのはST1が6株で、次いでST599が3株だったが、温泉由来株はその中になかった。浴槽水分離株全体で、他に2株存在したSTが4種類あった。冷却塔水分離株48株は6種類に型別され、多様性に乏しく、37株(77.1%)がST1であった。土壌由来株35株は12種類に型別された。最も多かったSTはST48で9株、続いてST739が6株、ST22が5株であった。各由来間で共通のSTは1種類ずつだった(浴槽水と冷却塔水分離株では、ST1、浴槽水と土壌由来株ではST129、冷却塔水と土壌由来株では、ST48)。臨床分離株149株は96種類に型別され、浴槽水分離株同様多様であった。ST138が8株と最も多く、次いでST1およびST120が7株、ST306が6株で、2~4株存在したSTが20種類あった。残りの72種類のSTは1株のみであった。

ST1は臨床分離株、冷却塔水分離株、浴槽水分離株から検出され、ST352およびST593は臨床分離株と土壌分離株とから共通に検出された。ST92、ST122、ST131、ST138、ST141、ST278は、臨床分離株と浴槽水分離株から共通に検出された。ST138(3株)、ST141(1株)、ST278(1

株)の臨床分離株の感染源が患者の入浴した温泉であることが、地衛研で行われたパルスフィールドゲル電気泳動解析<sup>6)</sup>により、確定している。

型別の分解能を示すIOD(index of discrimination)<sup>5)</sup>を計算すると、臨床分離株については0.989、浴槽水分離株は、0.972となり、型別法として有用であることが示された。土壌分離株についてもIOD=0.886となり、ある程度の分解能を示したが、冷却塔水分離株については0.401となり、冷却塔水分離株の型別を行うには不十分だと考えられた。

今回調べられた臨床分離株の血清群の内訳は、血清群1が123株、血清群2が4株、3が7株、4が3株、5が7株、6が3株、9が2株であった。

血清群1の臨床分離株123株、および環境分離株123株についてMAb型別を行った。それぞれの由来によりMAb型の頻度に偏りがあった(表2)。浴槽水分離株は9種類すべてのMAb型に分かれ、最も多かったのはBellingham(42%)だった。土壌由来株は6種類のMAb型に分かれ、最も多かったのはOLDA(51%)だった。冷却塔分離株は4つの型のみでOxfordが73%を占めた。臨床分離株は7つのMAb型に分かれ、最も多かったのはBenidorm(48%)だった。

病原性に関連すると考えられているMAb 3/1<sup>7)</sup>に着目すると、臨床分離株は85%が陽性であったのに対し、浴槽水分離株の陽性率は23%で、土壌由来株は14%、冷却塔水由来株の陽性株は1株のみ

(2.1%) であった。

#### D. 考察

水道水等を用いていることが多い公衆浴場の浴槽水分離株では、冷却塔水に多い ST1 株が多く検出されたが、温泉が感染源であった患者由来株と共通の遺伝子型、ST138、ST141、ST278 の株も見いだされた。温泉ではない浴槽水についても、水温、あるいは人が入浴することによる有機物等の持ち込みなど、温泉と似た要素が多く、冷却塔水分離株と一部共通遺伝子型の株がみられるものの全体的には温泉同様の遺伝的多様性が存在すると考えられた。

冷却塔水分離株 48 株について ST1 以外の株は 11 株 (22.9%) だった。さらに、1 株を除いてそれらの株の遺伝型は互いに似通っていて 1 つの complex を形成しており、冷却塔の環境に適応的な遺伝子型のものが広く分布しているのであろうと考えられた。

冷却塔や浴槽へ土埃とともにレジオネラが混入すると考えられており、土壌由来株はほかの株と共通の遺伝子型が多く見られることが期待されたが、実際はほとんどが土壌特有の遺伝子型で、しかも浴槽水由来株や臨床分離株ほどの遺伝的多様性は見られなかった。株数の多かった ST48、ST739、ST22 は遺伝的に互いに離れていたが、それ以外の遺伝子型 9 種類のうち 8 種類は前出の 3 つの ST のいずれかと遺伝的に近縁であった。土壌株が大きく 3 種類の遺伝子型に分かれた理由

は不明であるが、それぞれ異なる環境に適応しているのかもしれない。

臨床分離株と共通の遺伝子型の種類が、浴槽水分離株で 7 種類、土壌分離株で 2 種類、冷却塔分離株で 1 種類だったこととわが国のレジオネラ症の感染源の多くが入浴施設であると考えられていることは矛盾しない。調査する環境分離株の株数を増やすことにより、よりはっきりとした傾向が確認できるであろう。

臨床分離株については、ST1 および ST120 の株の感染源はすべて不明であったが、ST138 の 8 例のうち 7 例、ST306 の 6 例のうち 5 例について、感染源が浴槽水と確定あるいは推定されていて、患者分離株の ST と感染源には関連があると考えられ、逆に感染源不明の患者の感染源の推測も可能であることが示唆された。

臨床分離株の IOD は 0.989 となり、SBT は高い分別能を有する方法であることが示された。環境分離株については、由来により IOD=0.401~0.972 と幅が見られた。諸外国の臨床分離株の SBT の IOD は、英国で 0.901、アメリカで 0.946、カナダでは 0.964 で、本研究と比較して同等かやや低い値となっている。冷却塔水や給水・給湯設備などのレジオネラ症の感染源となりうる人工水から分離された株についての諸国の結果は、英国で IOD=0.933、アメリカで 0.822、カナダで 0.866 (同時に自然水分離株についても行われていて、その値は 0.974) であった<sup>8-10)</sup>。日本では欧米に比べて臨床分離株の ST の多様性

が高いことが示されたが、それは、欧米とは異なる感染源である浴槽水からの分離株の多様性を反映している可能性がある。

遺伝子型、MAb型ともに、環境分離株と臨床分離株との間で、その分布や頻度がそれぞれ異なっていた。臨床分離株も本来環境に生息していたはずであることを考えると、環境に生息している *L. pneumophila* の特定の株がレジオネラ症の発生に関与していると考えられる。臨床分離株は MAb3/1 陽性株が 85%を占めていたのに対し、環境分離株の陽性率は 2-23%だった。MAb3/1 陽性か否かを DNA レベル<sup>10)</sup>で判定する系が開発できれば、環境水に MAb3/1 陽性株が存在するか迅速に検査することができ、有用であると考えられる。

#### E. 結論

わが国のレジオネラ症患者からの *L. pneumophila* 臨床分離株と、浴槽水、冷却塔水、土壌由来の *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株について SBT 法および MAb 型別法を用いて型別したところ、その疫学的有用性が確認できた。また、遺伝子型、MAb 型ともに、環境分離株と臨床分離株との間で、その分布や頻度が、それぞれ異なっていた。環境に生息している *L. pneumophila* の特定の株がレジオネラ症の発生に関与していることが示唆され、冷却塔水、土壌由来株より浴槽水由来株が、より関与していると推測された。そのことはわが国のレジオネラ症の感染源

の多くが入浴施設であると考えられていることと矛盾しない。

#### 謝辞

今回解析した菌株を分与くださった青木敏也、安形則雄、伊藤 穰、磯部順子、岩渕香織、上野伸弘、瓜生佳世、江口ヒサ子、大谷勝実、緒方喜久代、小笠原準、奥野ルミ、金澤祐子、金澤裕司、金子紀子、烏谷竜哉、河野喜美子、久保園祥子、小林敬典、小堀すみえ、小山敏枝、斉藤厚、嶋田直美、清水 寧、杉山寛治、舘田一博、辻 英高、土井 均、中嶋 洋、貫名正文、沼田 昇、藤田直久、古田紀子、堀川和美、増子京子、藪内英子、山本一成、渡辺祐子（敬称略）の諸氏に感謝いたします。

#### F. 参考文献

- 1) Gaia, V, Fry, NK, Afshar, B, Lück, PC, Meugnier, H, Etienne, J, Peduzzi, R, and Harrison, TG. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 43:2047-52.
- 2) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1

- strains. J. Clin. Microbiol. 45:1965-8.
- 3) [http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)
  - 4) Helbig JH, Luck PC, Knirel YA, Witzleb W, Zahringer U. 1995. Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. Epidemiol. Infect. 115:71-8.
  - 5) Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26:2465-6.
  - 6) Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. 2009. An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of PFGE agarose plugs for the analysis of *Legionella* isolates. JJID. 62:54-6.
  - 7) Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Luck PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G, Harrison TG. 2002. Related Articles, Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21:710-6.
  - 8) Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. 2009. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 28:781-91.
  - 9) Kozak NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor TH Jr, Shelton BG, Fields BS. 2009. 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. 47:2525-35.
  - 10) Reimer AR, Au S, Schindle S, Bernard KA. 2009. *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Published online: 4 December 2009. DOI 10.1007/s10096-009-0840-3

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Endo T, Watanabe H. *flaA* genotypes of *Legionella pneumophila* isolates from bath water and cooling tower water show distinct distributions. Microbiol Immunol 52:460-464 (2008)

- 2) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Jürgen H. Helbig, Bin Chang, Noriko Kaneko, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Kimiko Kawano, Hiroshi Nakajima, Yuki Tada, Haruo Watanabe, and the Working Group for *Legionella* in Japan. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups, and sequence types. J. Med. Microbiol. (in press).
2. 学会発表
- 1) 鈴木敦子、前川純子、倉 文明、常彬、泉山信司、市瀬正之、渡辺治雄、遠藤卓郎. 冷却塔水からのレジオネラ属菌の検出状況—2001 年度から 2006 年度まで— 第 81 回日本感染症学会総会. 京都、2007 年 4 月.
- 2) 倉 文明、前川純子、鈴木敦子、常彬、泉山信司、市瀬正之、遠藤卓郎、渡辺治雄. 浴槽水からのレジオネラ属菌の検出状況—*Legionella pneumophila* 血清群 1 の増加— 第 81 回日本感染症学会総会. 京都、2007 年 4 月.
- 3) 前川純子. レジオネラの検査法と分子疫学. 衛生微生物技術協議会、第 28 回研究会、岡山、2007 年 7 月.
- 4) Kura F, Amemura-Maekawa J, Suzuki -Hashimoto A, Chang B, Izumiyama S, Ichinose M, Endo T, and Watanabe H. Surveillance of *Legionella* isolates from bathtub water in Japan: A increase of the rate of *Legionella pneumophila* serogroup 1 among *Legionella* isolates. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Uppsala, Sweden. June 2007.
- 5) Suzuki -Hashimoto A, Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Izumiyama S, Ichinose M, Endo T, and Watanabe H. The surveillance of *Legionella* from cooling towers between 2001 and 2006 in Japan. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Uppsala, Sweden. June 2007.
- 6) 前川純子、山崎利雄、渡辺治雄、倉文明、森本 洋、熊田裕子、藤田雅弘、黒木俊郎、杉山寛治、緒方喜久代、縣 邦雄. 掛け流し式温泉の温泉成分検査、微生物実態調査、および施設の衛生管理状況についての調査. 第 81 回日本細菌学会総会、京都、2008 年 3 月.
- 7) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Bin Chang, Haruo Watanabe, and Jürgen H. Helbig. Sequence based typing and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in Japan. 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Madrid, Spain.

- May 2008.
- 8) 前川純子、倉 文明、常 彬、市瀬正之、渡辺治雄：*Legionella pneumophila* 血清群 1 分離株の遺伝子型別およびモノクローナル抗体型別. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月, 名古屋.
  - 9) 前川純子：レジオネラの検査法の進歩. ワークショップ「レジオネラの細菌学」. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月, 名古屋.
  - 10) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Jürgen H. Helbig, Bin Chang, Noriko Kaneko, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Kimiko Kawano, Hiroshi Nakajima, Yuki Tada, and Haruo Watanabe. Distribution of serogroups, sequence types, and monoclonal antibody subgroups among *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan. LEGIONELLA 2009. Paris, France. October 2009.
  - 11) 前川純子、倉 文明、常 彬、多田有希、金子紀子、渡辺祐子、磯部順子、貫名正文、中嶋 洋、河野喜美子、渡辺治雄、レジオネラ・ワーキンググループ：わが国のレジオネラ症患者由来株の血清群、遺伝子型、モノクローナル抗体型の分布. 第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京、2009 年 10 月.
  - 12) 前川純子、倉 文明、常 彬、菊川紀世己、渡辺祐子、磯部順子、貫名正文、中嶋 洋、河野喜美子、村井美代、渡辺治雄：*Legionella pneumophila* の遺伝子型別による菌株の解析. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月, 横浜 (予定).

H. 知的所有権の取得状況

なし



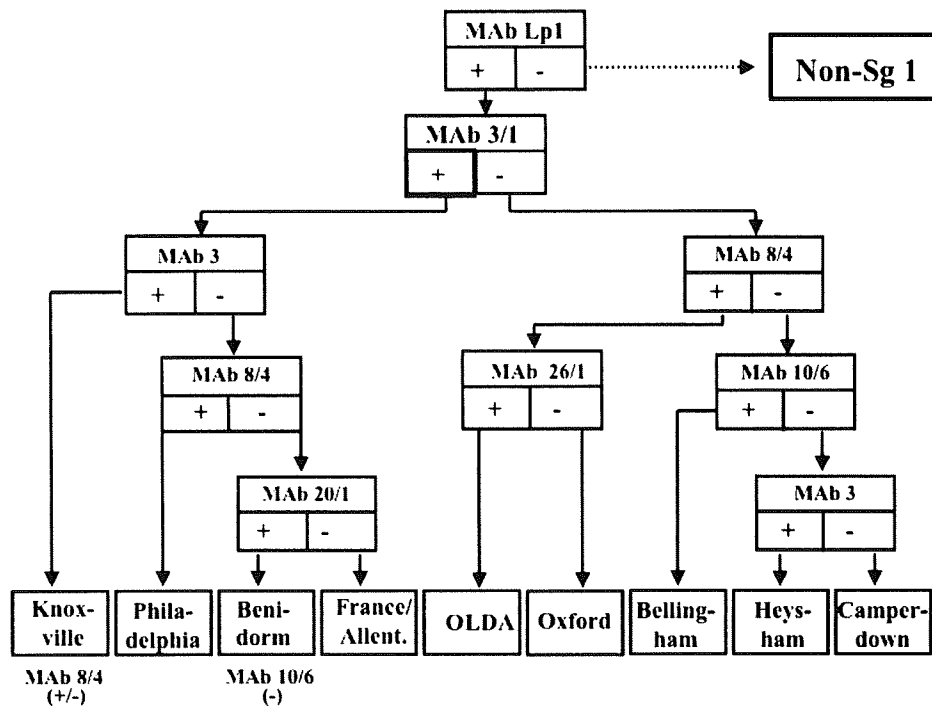


図1. 6種のモノクローナル抗体を用いた *L. pneumophila* 血清群1の型別のチャート図 (文献5の図を改変)。

表1. 臨床分離株と環境分離株のSTの分布  
血清群1

ST	臨床分離株	浴槽分離株	冷却塔水分離株	土壌分離株	計
1	7	6	37	0	50
48	0	0	1	9	10
138	8	1	0	0	9
120	7	0	0	0	7
306	6	0	0	0	6
739	0	0	0	6	6
22	0	0	0	5	5
23	4	0	0	0	4
384	4	0	0	0	4
505	4	0	0	0	4
352	2	0	0	2	4
129	0	2	0	2	4

154	0	0	4	0	4
132	3	0	0	0	3
353	3	0	0	0	3
122	2	1	0	0	3
593	1	0	0	2	3
599	0	3	0	0	3
448	0	0	0	3	3
598	0	0	3	0	3
2	2	0	0	0	2
42	2	0	0	0	2
118	2	0	0	0	2
123	2	0	0	0	2
139	2	0	0	0	2
142	2	0	0	0	2
507	2	0	0	0	2
609	2	0	0	0	2
92	1	1	0	0	2
131	1	1	0	0	2
141	1	1	0	0	2
278	1	1	0	0	2
52	0	2	0	0	2
86	0	2	0	0	2
136	0	2	0	0	2
150	0	0	2	0	2
445	0	0	0	2	2
Others	52	17	1	4	74
Totals	123	40	48	35	246

血清群 1 以外

ST*	臨床分離株	血清群
93	3	3
430	3	3
J2	3	5
354	2	2

J5	2	2
Others	13	2,3,4,5,6,9
Totals	28	0

\*J2、J5 は *neuA* が増幅されず、便宜的に本研究で付けた番号。

表 2. 各分離株におけるモノクローナル抗体型の分布

MAb 型	臨床分離株	浴槽水分離株	冷却塔水分離株	土壌	小計
Allent./France	24	1	0	3	28
Bellingham	2	17	1	11	31
Benidorm	59	4	0	1	64
Camperdown	0	1	0	0	1
Heysham	0	1	0	0	1
Knoxville	11	1	0	0	12
OLDA	11	6	11	18	46
Oxford	5	6	35	1	47
Philadelphia	11	3	1	1	16
小計	123	40	48	35	246

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ネオ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

検査法の検討

研究分担者 森本 洋 北海道立衛生研究所

－効率の良い集落観察法の検討－

研究協力者	磯部 順子	富山県衛生研究所
	岩渕 香織	岩手県環境保健センター
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	佐々木美江	宮城県仙南・仙塩広域水道事務所
	瀬戸 順次	山形県衛生研究所
	中村 昭子	元函館市衛生試験所
	星 俊信	仙台市衛生研究所
	宮坂 次郎	熊本県食肉衛生検査所
	柳沼 幸	福島県衛生研究所
	矢崎 知子	宮城県保健環境センター
	山本 一成	新潟市衛生環境研究所
	和栗 敦	青森県環境保健センター

研究要旨

環境水中のレジネオラ属菌の基準は、公衆浴場(10CFU/100mL未滿)、冷却塔(100CFU/100mL未滿)で示されているものの、検査における公定法が示されていないため各検査機関で方法に違いが認められる。そこで効果的な検査法を提言するため、以下の検討を行い、成果を得た。

1) 効率の良い集落観察法の検討：分離培地上の出現集落に斜光を当て、実体顕微鏡で観察する(斜光法)と、レジネオラ属菌は特徴的な形態(外観構造)を示す。この方法を培養法に組み込むことで、レジネオラ属菌と他の細菌との見極めが簡易になり、レジネオラ集落の確認、カウント、釣菌などが効率良く行えるようになった。その結果、定性までの時間短縮、より正確な定量結果を報告することが可能となった。また、斜光法にコロニーPCRを併用することで、さらに正確で迅速な結果判定が可能となる場合があった。

2) 選択分離培地の検討および前処理条件の検討：市販生培地の種類により検出数、検出種類、集落形態・大きさ、出現時期などに違いが認められた。また同じ名前の生培地でも

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を示唆し、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報告した。

前処理条件（未、熱、酸処理）の違いにより、検査結果に違いが認められた。これらのことが、検査結果に影響を与えている可能性を示唆し、すべての前処理を行うことが精度の高い結果につながると報告した。

3) 濃縮についての検討：濃縮法（冷却遠心濃縮、ろ過濃縮法）の違いが検査結果に影響を与えている可能性（ろ過濃縮による検出率の方が高い傾向にあった）を示唆し、それぞれの効果的な手技の検討の必要性を報告した。また、非濃縮検体と濃縮検体を同時に検査する並行培養の有用性を報告した。

4) 分離培地としての BCYE  $\alpha$  培地活用に関する検討：非選択培地である BCYE  $\alpha$  を利用することで、効果的にレジオネラ属菌が検出された事例を示し、特に、清掃消毒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報告した。また、選択分離培地同様、BCYE  $\alpha$  もメーカーごとで検出結果に違いが出る可能性を示唆した。

5) 分離培地の保存に関する検討：確認した培地においては、適切な保存を行えば、製造後3ヶ月間はレジオネラ属菌の発育性能が保持されると報告した。一方で、選択分離培地では、非選択分離培地に比べ、一定の割合で発育が抑制される結果が得られたと報告した。

以上のことから、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、効果的かつ統一した検査法を十分に検討し、大腸菌群同様、「公衆浴場における衛生等管理要領」に明確に示し、検査上の注意点とともに記載することが望ましいと思われた。

#### 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（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、その検査法については、「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（「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））のように省令で明確に示されていないため、各検査機関で異なった検査マニュアル<sup>1-6)</sup>が利用されるなど検査方法が多様化し、検査結果に影響している可能性があると思われる。そこで効果的な検査法を提言するために、培養法の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 効率の良い集落観察法の検討

実験の基準株として5種類の GIFU strain を供試し、現在広く普及している市販分離培地である BCYE  $\alpha$ 、GVPC、WYO  $\alpha$ 、MWY 寒天培地で分離培養後、それら培地を暗室中に設置した実体顕微鏡のステージに載せ、コールドライトで斜光を当てる(以下斜光法)ことによって分離集落の観察を行った(図1)。観察は10日間毎日行った。

浴槽水 764 試料、冷却塔水 17 試料、腐葉土 2 試料の計 783 試料に対し、斜光法を取り入れたレジオネラ属菌検査を行った。

それぞれの結果から、斜光法の有用性を検討した。また、斜光法にコロニー PCR を併用し、その有用性を検討した。

10カ所の地方衛生研究所等に斜光法の研修を行い、その有用性を検討した。

### 2) 選択分離培地および前処理の検討

選択分離培地として、5社(極東、日研生物医学研究所、Oxoid、Biomérieux、Merck)のGVPC寒天培地、栄研化学のWYO  $\alpha$ 寒天培地、Oxoid社のMWY寒天培地を使用した。試料として、9カ所の浴槽水(温泉水)各500mLを供試した。試料を非濃縮と濃縮試料(ろ過濃縮法)に分け、それぞれを前処理(未処理、熱処理、酸処理)し、各前処理試料100  $\mu$ L(酸処理試料は200  $\mu$ L)を各選択分離培地に塗布した。それらを37°Cで10日間培養し、レジオネラ様集落を釣菌(斜光法利用)し、区画したBCYE  $\alpha$ 寒天培地と血液寒天培地に画線培養した。培養後、BCYE  $\alpha$ 寒天培地にのみ発育したものをレジオネラ属菌と推定した。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)、及びDDHレジオネラ

(極東)により行った。

これにより、選択分離培地の種類や前処理条件が、検査結果にどのような影響を与えているかを検討した。

### 3) 濃縮についての検討

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16検体及びその湯口水16検体を供試した。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。分離培地として、自家調製した非選択分離培地(BCYE  $\alpha$ 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  $\alpha$ 培地とGVPC培地(共にBiomérieux)を使用した。両濃縮試料を、それぞれ前処理(未処理、熱処理、酸処理)し、それら100  $\mu$ L(酸処理試料は200  $\mu$ L)を各分離培地に塗布した。以後の検査は、前述2)選択分離培地および前処理の検討に準じた。

非濃縮検体と濃縮検体との比較検討: 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。分離培地として、自家調製したMWY培地(共にOxoid)を使用した。その他の検査は前述2)選択分離培地および前処理の検討に準じた。ここでは、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。

これらの実験から、濃縮方法の違いや非濃縮検体と濃縮検体の違いが検査結果にど

のような影響を与えているかを検討した。

#### 4) 分離培地としての BCYE $\alpha$ 培地活用に関する検討

浴槽水等 144 検体を供試した。同一検体に対し、非選択分離培地と選択分離培地による検査を同時に行い、その結果を比較検討した。分離培地として、自家調製した非選択分離培地 (BCYE  $\alpha$  培地) と MWY 培地 (共に Oxoid)、および生培地の BCYE  $\alpha$  培地と GVPC 培地 (共に Biomérieux) を使用した。その他の検査は前述 2) 選択分離培地および前処理の検討に準じた。

これにより、非選択分離培地の積極的な分離培地としての活用方法を検討した。

#### 5) 分離培地の保存に関する検討

市販分離生培地の有効消費期限が製造後ほぼ 3 ヶ月間であることから、分離培地製造後 3 ヶ月間保存中に培地性能が変化するかどうかを検討した。実験の基準株として、GIFU strain である *Legionella pneumophila* GTC296 (血清群 1)、温泉水由来 *L. pneumophila* 血清群 1 および *L. micdadei* の 3 種類を供試した。分離培地として、自家調製した非選択分離培地 (BCYE  $\alpha$  培地) と MWY 培地 (共に Oxoid)、および GVPC 生培地 (Merck) を使用した。製造直後の GVPC 生培地を 400 枚購入し、その搬入日 (製造 10 日目) に合わせて BCYE  $\alpha$  培地と MWY 培地を各 250 枚調製した。培養 2 日目の供試菌株を滅菌精製水中でマクファーランド 1.0 に調整し、その後、滅菌精製水で 10 倍段階希釈した。 $10^4 \sim 10^6$  倍希釈液をそれぞれ  $100 \mu\text{L}$  ずつ 3 種類の培地 2 枚ずつに接種し、10 日間培養し、菌数測定をした。この実験を培地保存期間 (3 ヶ月間) 中、GVPC 生培地搬入日を実験初日とし、その後、10

日ごとに行った。結果判定は、実験当日に調製した BCYE  $\alpha$  培地に同じく検体を接種し、菌数測定した結果を比較対照とし、この結果を 100 とした場合における、各培地の実験結果の割合を求めることで判定した。3 ヶ月間の培地保存方法は、市販培地は搬入包装のまま (10 枚ずつビニールで密封されたもの 10 組が 1 つの段ボール箱に入れられ、さらに段ボールの大箱に入れられた状態)  $4^\circ\text{C}$  で保存した (図 2)。自家調製培地は、6 枚ずつを 1 枚のビニール袋に入れ、口を縛り、ポリプロピレン製の大型クーラーボックスに入れ、 $4^\circ\text{C}$  で保存した (図 3)。なお、いずれの培地においても、一度ビニール袋から開封された培地については、開封当日以外での使用はしなかった。

### C. 研究結果及び考察

#### 1) 効率の良い集落観察法の検討

斜光法で分離集落を観察すると、レジオネラ属菌は、特徴的な外観構造 (カットグラス様、モザイク様、辺縁部カットグラス様で中心部が綿様) を呈した (図 4)。この観察法を用いると、レジオネラ属菌と雑菌を効率良く区別、釣菌することができた (図 5)。また、菌数測定も簡便で、極めて正確に行うことができた。本研究では、環境試料から *L. pneumophila* の 13 血清群およびその他 17 種類以上のレジオネラ属菌が、この観察法で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 においても、この特徴が観察されたことから、本観察法は、レジオネラ属菌検査をするにあたり有効な検査法であると思われた。

10 カ所の地方衛生研究所と斜光法を検討

した結果を以下に示す。

1. レジオネラ属菌の発育コロニーは特徴的な形態(外観構造:モザイク様)を有し、他の発育菌との判別が容易であった。他の菌の発育の多少にかかわらず、釣菌対象となるコロニー(微少なレジオネラ属菌様コロニーであっても)が限定され、効率良くレジオネラ属菌を確認することができると思われた。
2. 菌数測定が正確に行うことができると思われた。
3. 発育早期から確認が可能となる(培養2日目からの確認が可能であった報告が複数有り(図6))。これにより、定性的な判定日数を短縮できる可能性が示唆された。尿中抗原検査(Binax社)陰性であったが、強くレジオネラ症を疑う重症肺炎患者の喀痰から *L. pneumophila* SG2 を分離した事例で、その存在が培養2日目から確認されたとの報告があった。また、分離培地にカビが発育した場合には、培養日数の経過とともにカビが旺盛に発育し、検査に大きく影響を与えることがあるが、発育早期に確認可能な本法は、カビの影響を回避できる場合があり、この点からも、有用な方法であると報告された。
4. 培養日数の経過により、コロニーの特徴が判別しづらくなる場合があることから、早い時期からの観察が良いと思われる。
5. 培養日数が経過しても、コロニーが大きくなりづらい場合に対応可能であった。
6. 一つの分離培地上に数種類のレジオネラ属菌が発育した場合、種類を特定することは難しいが、コロニーの発育時期、模様、色等、特徴の違いから、異なる種類を効率的に釣菌できる場合があった(図7、8)。
8. 従来法では、経験や個人の熟練度による差が大きかったが、斜光法ではこの点はかなり解消され、レジオネラ検査経験の浅い検査員でも、判定がしやすくなると思われる。
10. 臨床検査でも効率的なレジオネラ分離培養検査が期待できる。
11. 一方で、斜光法においても、コロニーの特徴が不確かで、判定に苦慮する場合もあり、疑わしい場合は釣菌して確認する必要がある。
12. スクリーニング的に斜光法を取り入れるのであれば、集落発生から決まった日数で観察することが重要であると考えられた。
13. 培養早期には目視で確認できないほどの微細な雑菌のコロニーが存在する可能性があり、コンタミネーションを考慮する必要がある。
14. 鏡検と判定に慣れる必要がある。
15. 特に分離培地(メーカー、種類)の違いにより、特徴が異なる場合がみられたことから、自施設で使用する分離培地を用いて、十分に検討する必要がある。
16. たくさんの検体を処理する場合は、分離培地の観察枚数が多くなることから、適切に検査を行うための工夫が必要である。
17. 鏡検時に観察しやすいことからシャーレの蓋を開けるが、この時にコンタミネーションを起こすことがあるので、工夫が必要である。
18. 簡便な観察法ではあるが、単独での判断は、誤判定につながる可能性がある。そこでコロニーPCR法を併用することにより、さらに正確で迅速な結果判定が可能となった(釣菌時には、コロニーの大きさを



考慮し、確実に菌体を採取しているか、培地成分を採取していないかなどに十分注意すること。)

19. 斜光法とコロニー PCR 法の併用は、ルーチンで行っている環境水検査等の急を要しない検査に用いた場合、経費的な面を考慮し合わせても非効率な側面が考えられるが、レジオネラ症集団発生時の原因施設調査等迅速性を求められる場面において、定性的な検査という位置付けで行うには非常に有用な方法であると考えられた。

以上のことから、特に定性検査においては、これまでの培養法に斜光法を組み込むことで迅速化が可能となり、患者由来検体にも効果的に利用できると考える。また、環境水等の検査では、定性的な考えと定量的な菌数測定結果の位置付けを明確にすることにより、迅速、正確な行政対応へ結びつけることができると考えられた。

斜光法には実体顕微鏡は必須であるが、光源について、固定式のコールドライト以外での検討を行った結果、安価でスポットライトのように使用できるペン型の高光度 LED ライト（口径 7～10mm 白色）でも、簡易的に確認することができた。

本斜光法は、観察場所と明所、暗所等の条件、使用培地、実体顕微鏡、斜光ライトなどについて、自施設の状況を十分に把握し、事前にレジオネラ属菌の集落形態を確認した上で、従来の培養法に組み込むことにより、効率的な検査結果が得られる方法と思われた。特にコロニー PCR 法との併用は、さらに正確で迅速な結果判定ができると考えられた。今後は、各施設の検査体制や状況を考慮し、自施設に合った導入を検討することで、検査効率を上げることができ

られると思われる。

なお、研究協力者からの報告を資料(資料 1:平成 20 年度、資料 2:平成 21 年度)として添付する。

## 2) 選択分離培地および前処理の検討

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 WY0 $\alpha$  (栄研) で 9 試料中 8 試料、次いで GVPC (Biomérieux、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、WY0 $\alpha$  (栄研) に GVPC (Biomérieux) 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。

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。

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る。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。

### 3) 濃縮についての検討

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及びその湯口水各16検体、計32検体のうち25検体からレジオネラ属菌が検出された。その内訳は、浴槽水13検体、湯口水12検体であった。検出結果を表4、5に示した。レジオネラ

属菌が検出された25検体のうち21検体（84%）では、ろ過濃縮法の方が冷却遠心濃縮法よりも検出菌数が多かった。逆に、冷却遠心濃縮法がろ過濃縮法を上回ったのは4検体（16%）であった。また、2つの方法のうち、ろ過濃縮法でのみレジオネラ属菌を検出したものが25検体中4検体あった。

今回の実験結果から、濃縮方法の違いが検出菌数及び陽性検出率に大きな影響を及ぼすことが示唆された。冷却遠心濃縮法の場合、遠心時間が一定であり、多数の検体処理に適している。しかしながら、遠心終了時及び終了後の遠心管移動における振動による沈渣の再浮遊や、沈渣とならなかったレジオネラ属菌の付着した浮遊物の存在、さらには、デカンテーションやピペッティング操作などの上清除時に沈渣を損失する可能性があるなど、一連の濃縮工程で菌体の回収に大きな影響があるものと思われる。一方、ろ過濃縮法では、検体によりろ過時間が予測しづらいことやろ過に長時間を要することがあり、多数の検体を同時に、迅速に処理できない場合がある。また、ろ過フィルターの材質や菌体を回収するためのろ過フィルターの洗浄方法に注意を要する。しかしながら、菌体を吸着捕集することにより効率的な濃縮が可能であると思われる。このように、冷却遠心濃縮法とろ過濃縮法の特徴が、レジオネラ属菌の検出菌数や陽性検出率に影響しているものと思われる。

今回、これらのことをふまえて実験を実施したが、両濃縮法での検出菌数の比較結果、さらには冷却遠心法では陽性検体とならなかった4検体がろ過濃縮法で検出されたこ

とを考慮すると、温泉水からのレジオネラ属菌の検出には、ろ過濃縮法が優れていると考える。

ところで、行政検査においては、前述通知文が検査法の根拠となる場合がある。現在、公衆浴場におけるレジオネラ属菌の基準は、10CFU/100mL未満とされている。このことは、レジオネラ症防止指針に示されている冷却遠心濃縮法またはろ過濃縮法でレジオネラ属菌が検出されないことを意味しており、温泉利用施設などの衛生管理や指導に影響している。つまり、該当施設の自主検査において、実際にはレジオネラ属菌が存在しているにもかかわらず、レジオネラ属菌が検出されなかった場合、その施設の衛生管理が適切である根拠の一つとなり、その後の衛生管理法の改善や指導の遅れがレジオネラ属菌の増殖を促すこととなり、患者発生につながる可能性がある。従って、検体液の濃縮法には高い精度が求められる。検体液の濃縮に冷却遠心濃縮法あるいはろ過濃縮法のどちらを選択するかは、検査機関の機材、検査件数などの要因に影響されると思われる。しかしながら、本試験結果の散布図を図9に示したが、この結果だけで見ると、両濃縮法結果には相関が認められない。このことから、現時点では両濃縮法の精度を並列で考えにくい状況であると思われる。従って、両法のいずれを選択しても濃縮法によるレジオネラ属菌の検出精度に違いが生じないように、手法を改善していく必要があると思われる。

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6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7）、34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8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面があった。

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。

#### 4) 分離培地としての BCYE $\alpha$ 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  $\alpha$  培地でしか検出されなかった検体が 15 (約 13%) あった (表 9)。BCYE  $\alpha$  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  $\alpha$  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 10)。これらの結果、BCYE  $\alpha$  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 11)。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  $\alpha$  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 12)。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 13)。

これらのことから、BCYE  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  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。

#### 5) 分離培地の保存に関する検討

結果を図 10、表 14 に示した。3 種類の