

供試菌株において、実験初日（BCYE α 、MWY 培地は保存 0 日目、GVPC 培地は保存 10 日目）と保存 90 日目の結果、保存 0、10、20、30 日での結果平均値（GVPC は後者 3 回分）、保存 40、50、60 日での結果平均値、保存 70、80、90 日での結果平均値、さらには保存 90 日間全体での結果平均値を比較した結果、有意な差は認められなかった。これらのことから、今回使用した培地においては、適切な保存を行えば、一般的に製品保証されている 3 ヶ月間は、レジオネラ属菌の発育性能が保持されていると思われる。生培地の保存では、特に結露と乾燥が問題となる場合が多いことから、メーカーによって梱包形態が異なること、開封後の保存のしかた、自施設冷蔵庫の性能と庫内状況などを十分に考慮したうえで保存し、実験前に使用に適当な状況であるかどうか判断する必要があると思われる。今回、数百枚の培地を 3 ヶ月間確実に結露と乾燥なく保存しなければならなかったため、十分な予備実験を行った。その結果、自家調製した培地をビニール袋に入れて口を縛り、ポリプロピレン製の大型クーラーボックスに入れて 4℃で保存をすると非常に良い結果が得られたことを報告する。

一方で、非選択培地である BCYE α 培地と選択培地である MWY 培地、GVPC 培地の出現菌数を比較すると、今回供試した *L. pneumophila* GTC296、*L. pneumophila* 血清群 1、*L. micdadei* は、選択培地ではそれぞれ 60%前後、80%前半、70~80%の出現率にとどまった。このことから、前述 4) に記載したが、状況に応じ BCYE α 培地と選択分離培地を併用することが、効果的な検査結果につながると思われた。

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。より正確な菌数測定も可能となった。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こと、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こともあるが、今回の実験において 13 種類の *L. pneumophila* 血清群およびその他 17 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た。特に、定性までの時間短縮、より正確な定量結果を報告できることは、大きな成果と考える。今後は、斜光法を広く普及するための研修システム等の構築が望まれる。

なお、北海道内では、北海道立衛生研究所をはじめ、レジオネラ属菌検査機能を有する道立 10 カ所のセンター保健所、ならびに函館市衛生試験所、旭川市保健所等の行政機関において、すでに斜光法を正式に導入し、環境、臨床試料を問わず、効果を上げていることを申し添える。

今回の実験では、試料の非濃縮、濃縮、濃縮方法、前処理、使用分離培地、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、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。

謝辞

今回研究協力者招集にあたり、多大なるご協力を頂いた、地方衛生研究所全国協議会 北海道・東北・新潟支部レジオネラレファレンスセンターである山形県衛生研究所の金子紀子先生に深謝いたします。

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) レジオネラ症防止指針第3版, 財団法人ビル管理教育センター, 東京, 2009, pp. 28-36

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

1) 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. 日本環境感染学会誌 2010; 25 (1): 8-14.

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

2) 森本 洋, 清水俊一, 池田徹也, 山口敬治: レジオネラ属菌培養法の検討－分離培地と集落について－, 第77回日本細菌学会北海道支部学術総会, 札幌, 2009年9月

3) 森本 洋, 清水俊一, 池田徹也, 山口敬治: レジオネラ属菌検査法の検討－非選択分離培地の活用法と濃縮法の違いによる検査結果への影響－, 第61回北海道公衆衛生学会, 札幌, 2009年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

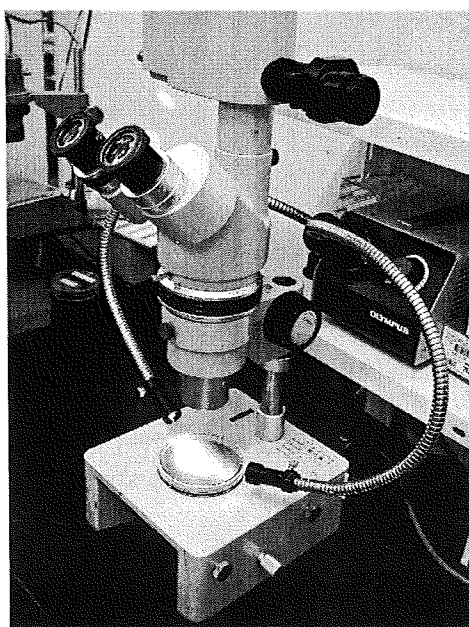


図1
分離培地からの集落観察（暗所で行う）

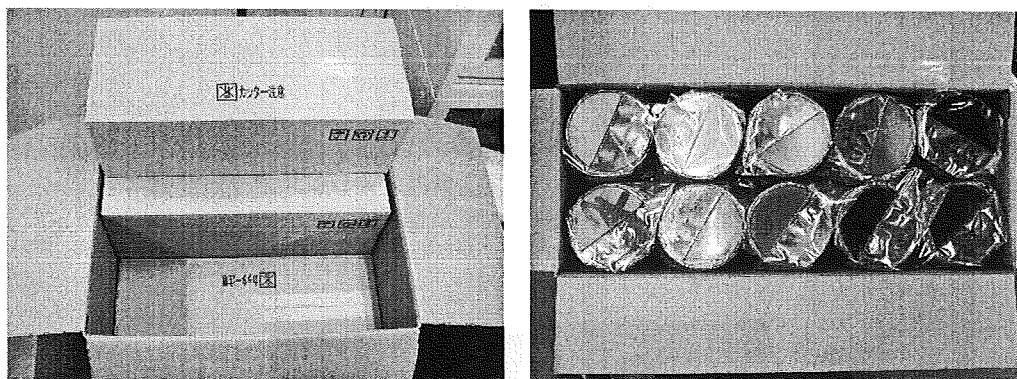


図2 GVPC 培地保存形態

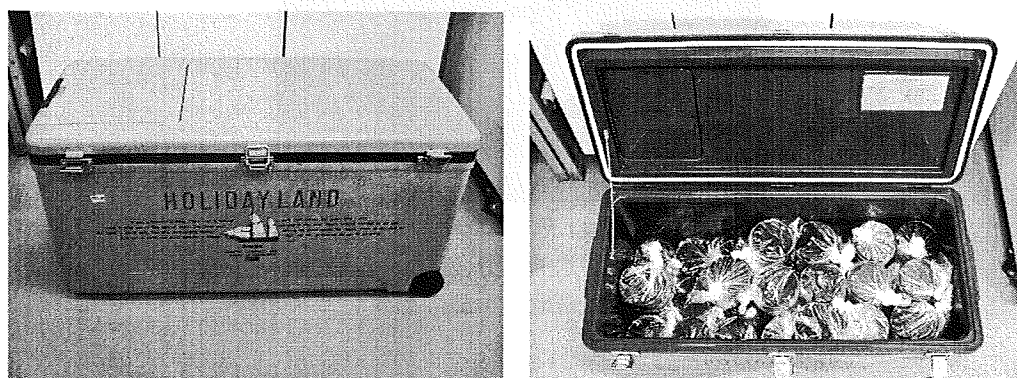


図3 BCYE α およびMWY 培地保存形態

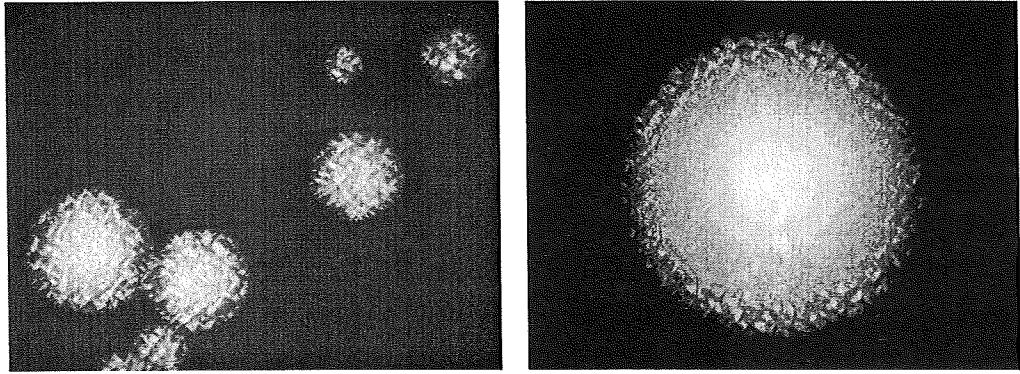


図4 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落1 (BCYE α 生培地: Oxoid)
 (左) *L.pneumophila* GTC296 出現初日 集落の成長とともに模様も変化する (撮影倍率 $\times 120$)
 (右) *L.pneumophila* GTC296 出現2日目 (撮影倍率 $\times 124$)

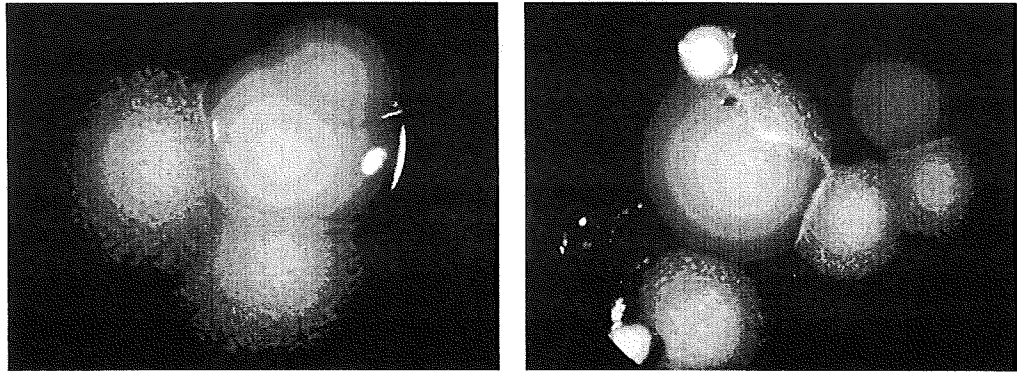


図5 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落と非レジオネラ属菌集落
 (浴槽水培養4日目、自家調製MWY培地: Oxoid、撮影倍率 $\times 80$)

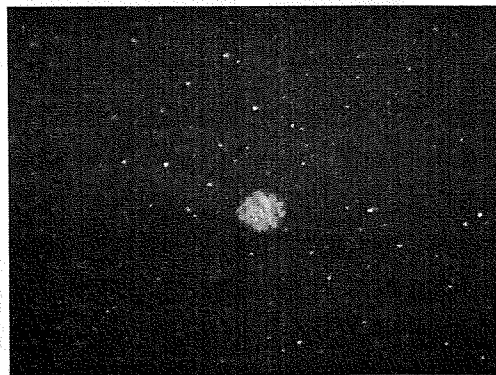


図6 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落2
 培養30~35時間目の浴槽水で確認された *L.pneumophila* SG6
 (自家調製MWY培地: Oxoid、撮影倍率 $\times 204$)

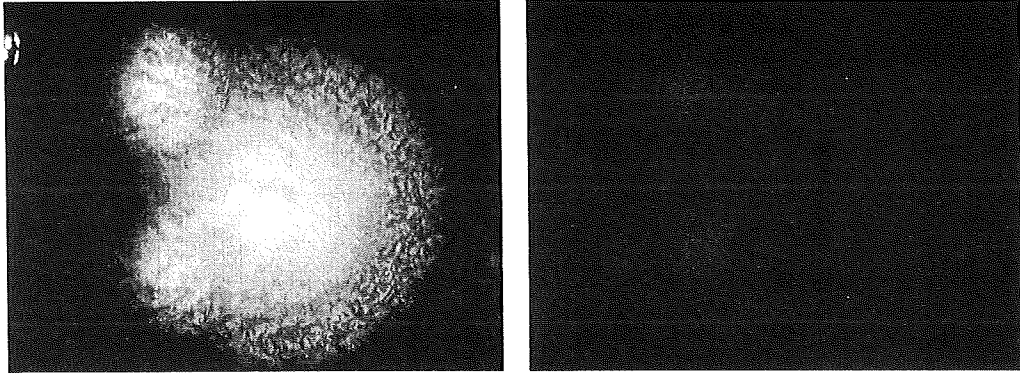


図7 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落3

(左) *L.cherrii* (辺縁部オレンジ) と *L.pneumophila* SG1 (辺縁部ピンク)
 (右) 同上集落に長波長 UV 照射 自発蛍光を発する *L.cherrii*
 (浴槽水培養4日目、自家調製MWY培地: Oxoid、撮影倍率×120)

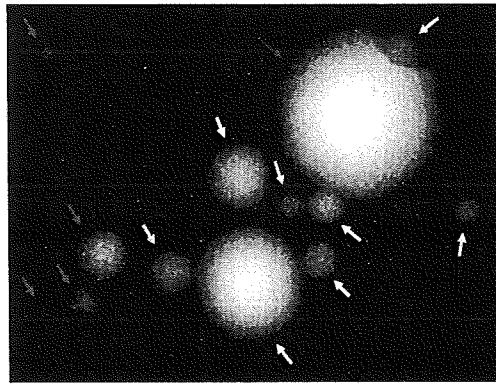
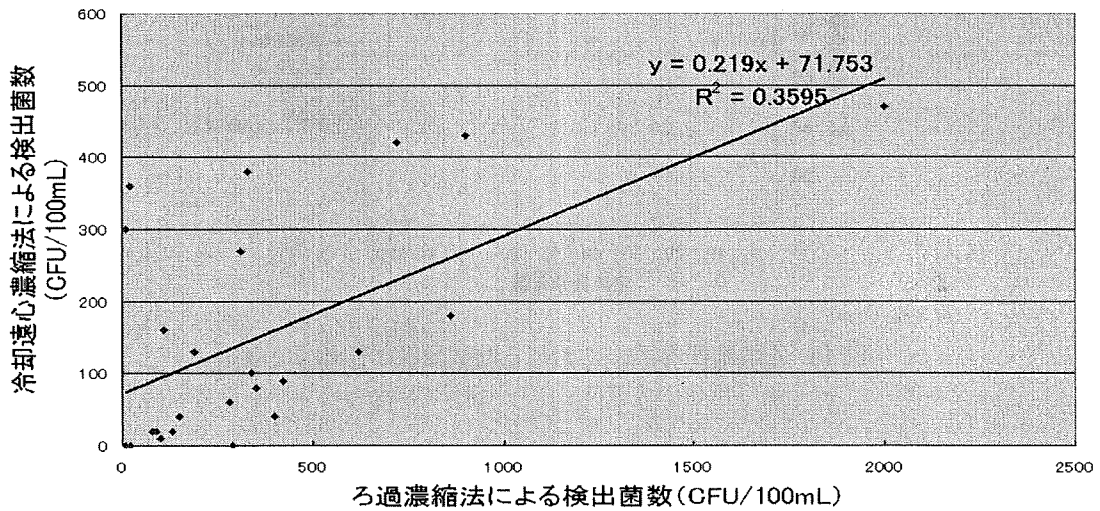
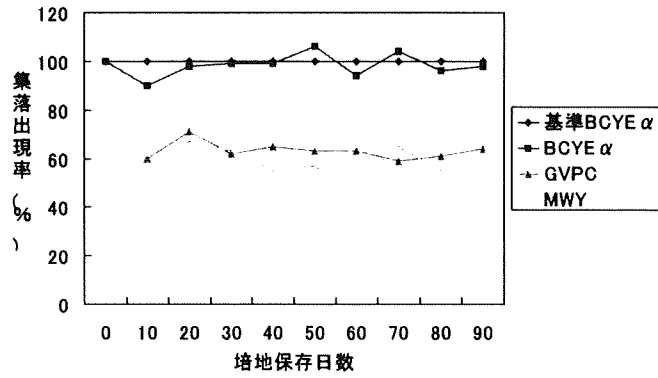


図8 *L. pneumophila*血清群4 (矢印ピンク), *L. rubrilucens* (黄緑),
*L. pneumophila*型別不能 (白), *L. pneumophila*血清群1 (赤),
*L. pneumophila*血清群5 (水色), *L. feeleii* (黄色)
 (浴槽水培養4日目、自家調製MWY培地: Oxoid、撮影倍率×80)

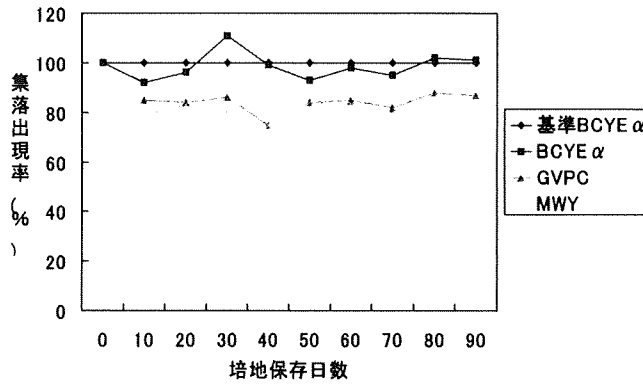
図9 濃縮法別レジオネラ検出菌数



Legionella GTC296 出現率の変化



Legionella pneumophila SG1(野生株) 出現率の変化



Legionella micdadei (野生株) 出現率の変化

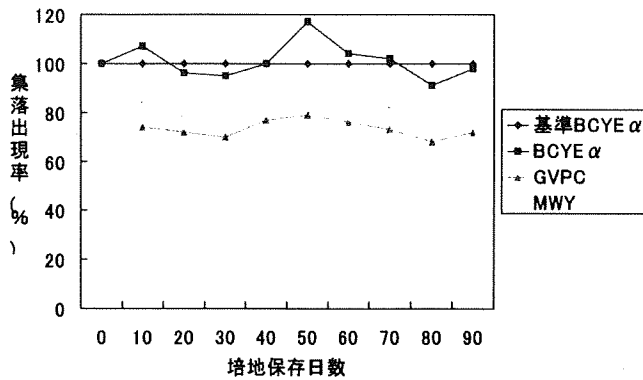


図10 各培地保存段階における供試菌株の出現率の変化

表1 絮用されているレジオネラ属菌用選択分離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 (極東)
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 ¹⁾	30 ²⁾	10 ³⁾	10 ¹⁾	30 ¹⁾ 10 ¹⁾		
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	30 40 20
F	<i>L.p.</i> SG6 <i>L.oakridgensis</i>	無 熱 酸	30 ⁴⁾	20 ⁵⁾			10 ⁵⁾	10 ³⁾ 10 ³⁾	
G	<i>L.p.</i> SG1,10	無 熱 酸	40 ³⁾ 40 ³⁾		10 ¹⁾	40 ¹⁾	40 ³⁾		
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
I**									

菌数表示の無いものは10CFU/100mL>

L.p.: *L.pneumophila*

太数字: 最大菌数

無: 処理無し

1) *L.p.*SG10

熱: 50°C, 20分

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

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

3) *L.p.*SG1

* 各条件ごとの詳細な検出・同定データなし

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

** 発育した細菌数が多すぎてカウントできず

5) *L.p.*SG6

表2 絮用されているレジオネラ属菌用選択分離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)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 (極東)
A									
B									
C									
D									
E									
F									
G									
H	<i>L.p.</i> SG1,2,13,UT <i>L.rubrilucens</i> <i>L.sp.</i>	無 熱 酸	1000 ¹⁾	2000 ²⁾	1000 ³⁾ 1000 ⁴⁾		2000 ¹⁾	1000 ⁵⁾	2000 ⁶⁾
I	<i>L.p.</i> UT, <i>L.sp.</i> <i>L.maceachernii</i> <i>L.micdadei, rubrilucens</i>	無 熱 酸	1000 ⁷⁾ 14000 ⁸⁾ 13000 ⁹⁾	28000 ¹⁰⁾ 24000 ¹¹⁾	3000 ⁷⁾ 30000 ¹²⁾ 43000 ¹³⁾	27000 ¹⁴⁾ 16000 ¹⁵⁾	1000 ⁷⁾ 20000 ¹⁶⁾ 60000 ¹⁷⁾	1000 ⁴⁾ 24000 ¹⁸⁾ 21000 ¹⁹⁾	1000 ²⁾ 25000 ⁷⁾ 18000 ²⁾

菌数表示の無いものは1000CFU/100mL>

7) *L.p.*SGUT

無: 処理無し

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

熱: 50°C, 20分

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

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

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

太数字: 最大菌数

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

L.p.: *L.pneumophila*

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

1) *L.p.*SG2

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

2) *L.p.*SG2,UT

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

3) *L.p.*SG1

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

4) *L.rubrilucens*

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

5) *L.sp.*

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

6) *L.p.*SG13

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

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

表3 選択分離生培地上に発育したレジオネラ属菌以外の細菌

—ろ過濃縮試料からの前処理法ごとの出現菌数(CFU/100mL)—

検体No.	前処理	WYO (栄研)	MWY (Oxoid)	GVPC (Merk)	GVPC Biomérieux	GVPC (Oxoid)	GVPC (日研)	GVPC (極東)
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°C, 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

表4 レジオネラ属菌検出25検体における濃縮法別の確認菌数 (CFU/100ml)

検体番号	ろ過濃縮法	冷却遠心濃縮法
1	80	20
2	90	20
3	340	100
4	620	130
5	280	60
6	420	90
7	900	430
8	720	420
9	20	360
10	10	300
11	130	20
12	310	270
13	2000	470
14	20	<10
15	290	<10
16	110	160
17	190	130
18	100	10
19	150	40
20	10	<10
21	20	<10
22	400	40
23	350	80
24	860	180
25	330	380

<10 : 非検出 (検出限界未満)

表5 レジオネラ属菌検出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)

ろ過 : ろ過濃縮法

遠心 : 冷却遠心濃縮法

不等号は確認菌数の状況を示す

表6 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7 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8 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9 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10 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11 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 12 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 13 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 14 各培地保存段階における
供試菌株の出現率の変化(%)

Legionella GTC296 出現率の変化(%)

	実験初日 ¹⁾	90日目 ²⁾	序盤	中盤	終盤	全体
BCYE α	100	98	97	100	99	98
MWY	59	58	62	54	59	59
GVPC	60	64	64	64	61	63

1) BCYE α、MWYは保存0日目の値
GVPCは保存10日目の値
2) 保存90日目の値
序盤:序盤1ヶ月間の平均値
中盤:中盤1ヶ月間の平均値
終盤:終盤1ヶ月間の平均値
全体:90日間の平均値

Legionella pneumophila SG1(野生株)
出現率の変化(%)

	実験初日 ¹⁾	90日目 ²⁾	序盤	中盤	終盤	全体
BCYE α	100	101	100	97	100	99
MWY	84	82	82	81	83	82
GVPC	85	87	85	81	86	84

1) BCYE α、MWYは保存0日目の値
GVPCは保存10日目の値
2) 保存90日目の値
序盤:序盤1ヶ月間の平均値
中盤:中盤1ヶ月間の平均値
終盤:終盤1ヶ月間の平均値
全体:90日間の平均値

Legionella micdadei(野生株)
出現率の変化(%)

	実験初日 ¹⁾	90日目 ²⁾	序盤	中盤	終盤	全体
BCYE α	100	98	100	107	97	101
MWY	82	84	81	83	80	81
GVPC	74	72	72	77	71	73

1) BCYE α、MWYは保存0日目の値
GVPCは保存10日目の値
2) 保存90日目の値
序盤:序盤1ヶ月間の平均値
中盤:中盤1ヶ月間の平均値
終盤:終盤1ヶ月間の平均値
全体:90日間の平均値

【資料1】

岩手県環境保健研究センター 岩渕香織

はじめに

研修課題の「効率のよいコロニー観察法」は、発育した集落に暗室で直接斜光をあて実体顕微鏡で観察する検査法で「斜光法」という。レジオネラ属菌は特徴的なモザイク模様を示すので斜光法を用いることにより他の細菌と判別が容易であり、合理的な方法と考える。

特別な装置を使わず、発育集落を観察してレジオネラ属菌の確認をする方法であることから、北海道立衛生研究所の資料に基づく「斜光法」で検査を行った事例を報告する。

斜光法を用いて検査を行った事例について
事例1

尿中抗原検査 (Binax 社) では陰性であったが、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 を分離した事例である。患者喀痰はスプタザイム処理後、熱・酸処理した試料 (以下処理試料) と未処理試料を、BCYE- α 、GVPC、MWY 寒天培地の計 6 枚に各 100 μ l を塗抹し 37°C で培養した。培養 2 日目に処理試料及び未処理試料を塗抹した MWY 寒天培地上に実体顕微鏡の強拡大による斜光法で微小なモザイク模様のコロニーを確認した。2 日目のコロニーはあまりに微小であるため、釣菌は行わず、培養 3 日目にやや発育したそれらのコロニーを BCYE- α 培地と血液寒天培地に画線培養し同定検査を行った。その結果、未処理試料塗抹の MWY 寒天培地上のコロニーが *L.pneumophila* SG2 と同定された。

その後も 10 日目まで斜光法による観察を

続けたが、検出されたのは未処理試料塗抹の MWY 寒天培地のみで、BCYE- α 、GVPC、及び処理試料を塗抹した MWY 寒天培地上に *L.pneumophila* SG2 は発育しなかった。また、*L.pneumophila* SG2 と同定したコロニーは培養 4 日目以降も目に見えるコロニーに発育しなかった。抗生物質 (エリスロマイシン) 治療中の喀痰採取だったので、*L.pneumophila* SG2 は損傷を受けていたのではないかと思われる。

目視では超微小なコロニーであったので「斜光法」で観察していなければ、レジオネラ属菌を検出できなかったのではないかと思われる。検出率の低い臨床検体からの分離にも「斜光法」は有用であると推察された。

事例2

さらにこの患者と関連する公衆浴場の調査では、18ヶ所中 7ヶ所からレジオネラ属菌が検出された。1 検体に 9 枚の分離培地を使用し計 162 枚についてレジオネラ属菌の確認を「斜光法」で行った。レジオネラ属菌の同定のため、コロニーの観察を通常の見視で行った場合、分離培地上からの灰白色湿潤集落の釣菌数はかなりの数となる。「斜光法」で観察して釣菌したコロニーは 48 菌株で、同定されたレジオネラ属菌は 31 菌株であった。

同一培地上に *L.pneumophila* の血清群の異なる 2 種類が発育したが、モザイク模様の色や特徴が異なっていたかの確認をしていなかった。今回の研修では、モザイク模様の色などの特徴により種類の異なるレジオネラ属菌の判別が可能であった。モザイク模様だけを確認するのではなく、今後モザイク模様の特徴についても確認が必要と思われる。

事例3

喀痰から *L.pneumophila* SG1 が検出された事例である。1 晩で喀痰を 4 件採取したもので、事例 1 と同様の分離操作を行い、斜光法で確認を行った。4 件全ての喀痰から *L.pneumophila* SG1 が検出されたが、菌数は喀痰によってばらついていた。培地上で多いものでは 157CFU、少ないもので 1CFU 発育した。発育数の多い分離培地ではレジオネラ属菌に特徴的なモザイク模様を示したコロニーを計測した。菌種が複数ということも考えられるので、その後目視でコロニーの性状を見ながら釣菌し同定を行った。

BCYE- α 寒天培地には発育が認められなかったが、GVPC 及び MWY 寒天培地上では未処理、処理によってコロニー数に大きなばらつきは見られなかった。しかし、事例 1 では *L.pneumophila* SG2 は未処理試料を塗抹した MWY 寒天培地からのみ検出され、他の処理方法や分離培地には発育しないことから、菌種や培養条件により発育状況に差が出ると推察される。

「斜光法」は菌数が多く発育した分離培地を観察する場合においても効率よくレジオネラ属菌を計測できる方法である。

斜光法のまとめ

「斜光法」は下記の事項により有効な検査法と思われた。

1. レジオネラ属菌の発育コロニーは特

徴的なモザイク模様により他の菌と判別が容易であり、釣菌の対象とするコロニーを限定し効率よくレジオネラ属菌を確認する。

ただし、不確かなコロニーもあるので、正確な菌数を測定し偽陰性を防ぐためには、①陽性対照で確認する②写真等の画像をみて確認する③型別不能なコロニーについては釣菌して同定することが必要である。

2. 発育早期から観察が可能である。
3. 弱っているレジオネラ属菌でも観察可能である。
4. 発育菌数が多くても効率よく同定作業ができる。
5. ひとつの分離培地に数種類のレジオネラ属菌が発育した場合、菌の種類を特定はできないがコロニーのモザイク模様の特徴や色、紫外線照射などにより、そのレジオネラ属菌の特徴を示す。

終わりに

レジオネラ属菌の確認は分離培地上に多数のコロニーが発育すれば同定が煩雑となる。「斜光法」により効果的に他の菌との判別の作業を行なうことができることから、レジオネラ属菌検査を行う検査施設への普及が望まれる。

1. はじめに

レジオネラの検査は、WYO α 培地等の選択培地上で灰白色の集落をレジオネラ疑いとして同定するようレジオネラ症防止指針に記載されている。しかし、これらの選択培地に発育する雑菌は灰白色のものが多く、またレジオネラは菌種、選択培地の種類によって培地上の集落の色調が異なる。そのため、同定には多数の集落を釣菌して菌種を同定しなければならない。

レジオネラを効率的に分離できる手法の開発が望まれるなか、今回、北海道衛生研究所で斜光法の研修を受ける機会を得たので従来法と比較検討した。

2. 方法

平成 20 年 10 月に搬入された浴槽水 42 件を対象に検査を実施した。

搬入された検体は、冷却遠心法で濃縮後、酸処理した濃縮検体 100 μ l を WYO α 培地(栄研)、MWY 培地(自家製:OXOID)、GVPC 培地(日研)にそれぞれ塗抹し、10 日間培養した。各培地に発育した集落を、従来法では目視で、斜光法では透過光を 2 方向から照射し顕微鏡で観察した。レジオネラが疑われた集落は、釣菌し、血液寒天培地で発育の有無を確認後、PCR またはレジオネララテックス(OXOID)で菌種を同定し、市販免疫血清で血清型を決定した。

3. 結果

従来法、斜光法のどちらの方法においても浴槽水 42 件のうち 13 件(31.0%)からレジオネラが検出され、*L.pneumophila* SG1,5,6,7,12,

Legionella sp.が分離された。

集落の算定も同様の結果であった。

3.2 斜光法の利点

3.2.1 検査時間の短縮

培養 2 日目に WYO α 培地で微小な集落が発育した。従来法では集落の形状を確認できなかったため、培養 3 日以降に検査を開始した。斜光法では、レジオネラ特有のモザイク状構造の集落が観察されたため、培養 2 日目から検査を進めることができた。斜光法は、従来法と比較して結果を早く得ることが可能であった。

3.2.2 効率的な分離

培養 2 日目から WYO α 培地、MWY 培地、GVPC 培地上で多くの雑菌が発育し、従来法ではこの平板からレジオネラを分離できなかった。斜光法では、この平板から培養 5 日目にモザイク状の集落を釣菌し、分離した菌は *L.pneumophila* SG6 であった。斜光法は雑菌の多い培地上でもレジオネラの集落を効率的に分離することが可能であった。

一方、培養 7 日以降に発育したレジオネラ疑いの集落を、斜光法で観察し形状からレジオネラが否定された。生化学的性状を確認したところ、血液寒天培地に発育しレジオネラ以外の菌であった。

4. 考察

浴槽水などの環境水には様々な菌が存在している。レジオネラの検査では、これらの菌の発育を抑制するために酸処理や加熱処理などの検体処理を行い、抗生剤を数種類含有した選択培地を使用しているが、選択培地上に多数の雑菌が発育することは少なくない。従来法では、培養 2 日目まで発育した菌を雑菌として印をつけ、この雑菌以外の集

落をレジオネラ疑いとして培養 3 日目から釣菌し、同定している。しかし、培養 3 日目以降でもレジオネラと類似した雑菌が発育することもあり、レジオネラの集落のみを効率的に釣菌することは検査に熟練した者でも難しいと思われる。

今回検討した斜光法では、培養 2 日目からの釣菌可能であること、雑菌が多数発育した培地からでも高い確率でレジオネラが釣菌可能であること、レジオネラ疑いの集落を即判定できることが確認された。

このことからレジオネラを効率的に分離できる方法であると思われた。

また、培地上の集落に斜めに照射し目視で観察してもレジオネラは白く発光しているように見えるため、ある程度発育した集落であればこの方法でも確認できるのではないかと思われた。

研修中には、様々な菌種を効率的に分離できることも示唆されたので、今度、検査標準作業書(SOP)への導入も視野にいれ、さらに効率的にレジオネラを分離できるように検討したいと思う。

1 はじめに

レジオネラ検査に係る斜光法によるコロニー観察については、これまで当所で行ってなかった方法であったため、当所既存の実体顕微鏡およびコールドライトを暗室に配備する等の環境整備を行った。当所では環境水のレジオネラ検査を行っていないため、レジオネラ属菌保存菌株、温泉水模擬検体、ヒト臨床検体について、斜光法による鏡検を行った。また、環境水のレジオネラ検査を担当している山形県内4保健所検査課を対象とした当所主催の研修会において、斜光法の利用に関する研修を行った。

2 材料と方法

レジオネラ属菌保存菌株は、*Legionella pneumophila* 血清群 (SG) 1 および 3、*L. dumoffii*、*L. micdadei*、*L. londiniensis* の 5 株を BCYE α および WYO α に塗抹した。温泉水模擬検体は、県内某温泉貯湯槽から汲んだ温泉水を「新版レジオネラ症防止指針」における冷却遠心濃縮法による濃縮後、酸処理を施した検体に、*L. pneumophila* 血清群 1 及び *L. dumoffii* をそれぞれ適量混ぜ、WYO α に塗布した。ヒト臨床検体については、レジオネラ肺炎疑いで当所に搬入される検体を、スプタザイム処理後直接あるいは熱処理、熱・酸処理を施し WYO α に塗布した。以上の平板について、経時的に斜光法による鏡検を行った。

県内 4 保健所検査課を対象とした研修については、保存菌株 5 株、温泉水模擬検体について、実際に斜光法により鏡検してもらい、各課において今後利用が可能か否かに

ついて検討した。

3 結果および考察

(1) レジオネラ属菌保存菌株

5 株すべてにおいて、いわゆる「モザイク様模様」を確認でき、菌種によって色味やモザイク模様の密度が異なることが確認できた。一概に、特定の菌種が特定のモザイク模様を示すとは言えないと思われるが、表 1 に示すような印象を受けた。ただし、*L. micdadei* は非常に緻密な柄であり、ある程度倍率を上げて鏡検しないと判断に迷う場面があり、*L. londiniensis* については全体的にピントが合いづらい像であった。

(2) 温泉水模擬検体

温泉水由来の雑菌に比して添加菌の量が多すぎたため、容易にレジオネラを判別できてしまったが、雑菌とレジオネラのコロニーが被っている場所において、斜光法により立体的にそれぞれの境界を判別できたため、コロニーをカウントする際には非常に有用であると考えられた。

(3) ヒト臨床検体

臨床検体について随時斜光法により鏡検を行ったところ、1 検体についてモザイク様模様を示したコロニーを観察し、最終的にレジオネラと同定された。鏡検は簡便に行えるため頻繁に観察することができ、雑菌の多い臨床検体からレジオネラを見つけ出すのに役立った。鏡検に熟練すれば、培養日数が経過しなくてもレジオネラを見つけ出すことが可能になるとわれ、最終診断までの日数が短縮できる可能性が示唆された。

(4) 県内 4 保健所検査課を対象とした研修

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 (0.2MHC1・KC1 buffer (pH2.2)) 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'-GCGATGACCTACTTTTCRCATGA-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も多く、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

【資料 2】

- 1) 斜光法およびコロニー PCR との組み合わせによる培養法の短縮に向けた検討
- 2) 斜光法を導入した培養法の検査マニュアル作成に向けた検討

研修報告書

富山県衛生研究所細菌部 磯部順子

1. はじめに

レジオネラの検査は、遺伝子検査での定量法が検討されているが、現時点では未だ培養法による定量値が基準となっている。遺伝子検査法においては、死菌の問題が挙げられるが、培養法においては時間がかかることが問題であると思われる。したがって、効率よく、さらに精度の高い方法として、実体顕微鏡を用いた、斜光法による培養法の確立が検討されている。昨年と今年の2年間にわたり、この研修に参加し、従来法との比較を行った。

2. 方法

平成 21 年 9 月～11 月に搬入された浴用水 41 検体について検討した。搬入された検体は 1000ml を吸引ろ過し、濃縮したのち、酸・加熱処理後の検体を 100 μ l, GVPC 培地（日研）および MWY 培地（OXOID）に塗抹し、それぞれ 7 日間培養した。ただし、培養 3 日目にはコールドランプにより 2 方向から平板に光を当て、レジオネラ特有のモザイク模様、カットガラス様に見えるコロニーについて、その時点で血液寒天と BCYE 培地へ接種、もしくは LAMP 法によりレジオネラであることを確認した。斜光法による釣菌は色／形状がことなる代表株を選択した。また、濃縮検体について、

LAMP 法による遺伝子検査も行った。

3. 結果

培養法で 10cfu/100ml 以上のレジオネラ属菌数となった検体は 17/41 件（41.5%）であった。検体搬入当日に遺伝子検査を実施し、結果が出た時点でメールにて結果を連絡した。

3 日目には斜光法でコロニー観察し、生きているレジオネラ属菌が存在する可能性が極めて高いことを連絡した。ただし、菌数は、発育の遅い菌もあることから 7 日後まで保留とした。しかし、5 検体については、業務の関係で 2 日目に判定することがあったが、2 日目でかなり大きく成長しているコロニーはすべてレジオネラではなかった。また、斜光法検査ができなかった 5 検体は結果の報告が 10 日目と、斜光法を用いたときに比べ、遅くなった。

斜光法でレジオネラであると判定したコロニーについて、今年度はそのほとんどがレジオネラ属菌であった。加えて、コロニーを以前より注意深く観察することにより、より多くの血清型を釣菌することが可能であった。

事例 1. カビが発育し、通常の 7 日培養後には釣菌できなかったが、3 日目に斜光法で再分離していたため、レジオネラ属菌を見逃すことなく判定できた。

事例 2. 培養 2 日目に平板に大きく成長したコロニーを斜光法で観察したところ、モザイク様ではなかった。念のため、血液寒天に接種したところ、翌日発育し、レジオネラは否定された。

事例 3. 平板上で観察する限り、レジオネラとは考えられないコロニーの斜光法でのモザイク形態により、同定したところ、