

察されるレジオネラ分離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。また、分離培地の違い(種類, メーカー), 菌株の違いにより, 見え方が異なる場合があった。集落出現後, 3日日以降は, 培養時間の経過とともに, この形態的特徴が確認しづらくなる場合があった(図3)。

2. 環境試料に対する検討

斜光法を利用したレジオネラ属菌検査結果と鈎菌した集落の最終同定結果を表1, 2に示した。環境試料では, 特に, 培養3日日以降に発育が認められた集落において, 基準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783試料中, 718試料(浴槽水701試料, 冷却塔水15試料, 腐葉土2試料)で特徴的な形態

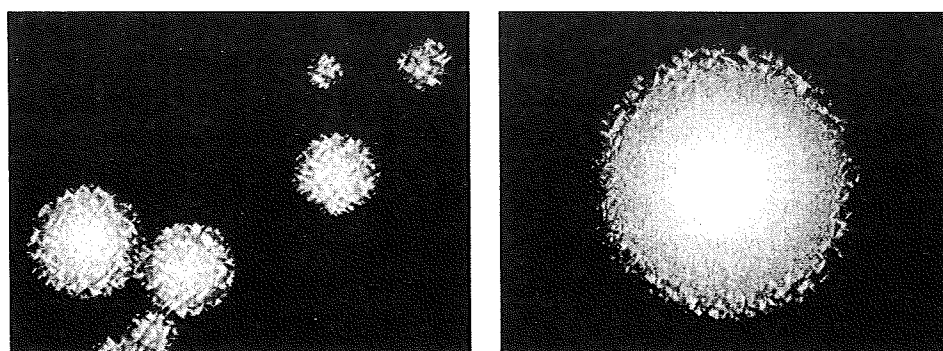


図2 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落1
(左)*L. pneumophila* GTC 296 (ATCC 33152), 発育初日(撮影倍率×120)
(右)*L. pneumophila* GTC 296 (ATCC 33152), 発育2日目(撮影倍率×124)
(BCYE α 生培地: OXOID)

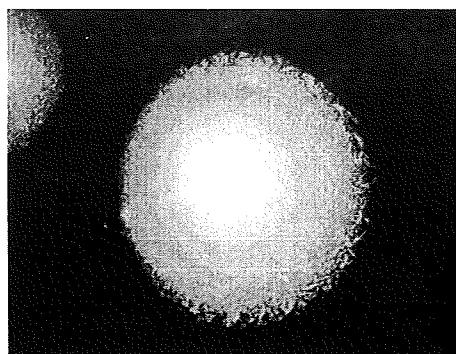


図3 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落2
L. pneumophila GTC 296 (ATCC 33152) の発育3日日以降, 成長とともに模様は淡くなった集落
(BCYE α 生培地: OXOID, 撮影倍率×124)

表1 環境試料のレジオネラ属菌斜光法検査結果

	検査試料数	レジオネラ検出数 (複数種類検出数)
斜光法 +	718	703(611)
斜光法 -	65	0(0)
計	783	703(611)

表2 灰白色湿潤集落の同定結果

	確認集落数	レジオネラ 集落数	非レジオネラ 集落数
斜光法 +	10,620	10,199	421
斜光法 -	5,747	0	5,747
計	16,367	10,199	6,168

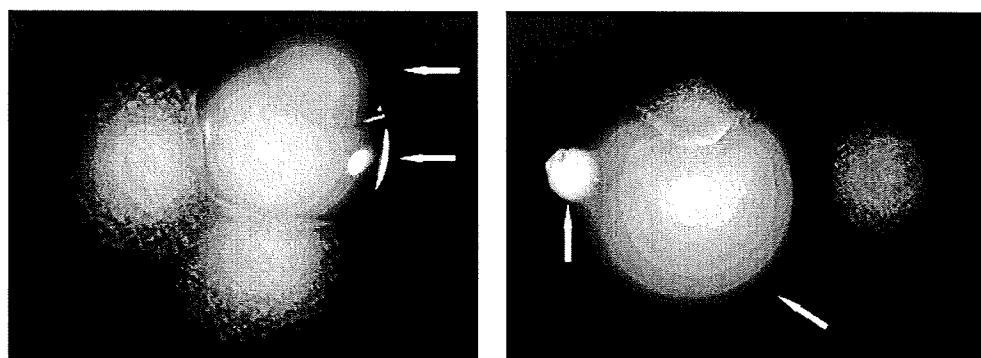


図4 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落と非レジオネラ属菌集落(矢印)
(右)レジオネラ属菌の3/4以上が非レジオネラ属菌に覆われている(温泉水培養4日目, 自家調製 MWY 培地: OXOID, 撮影倍率×80)

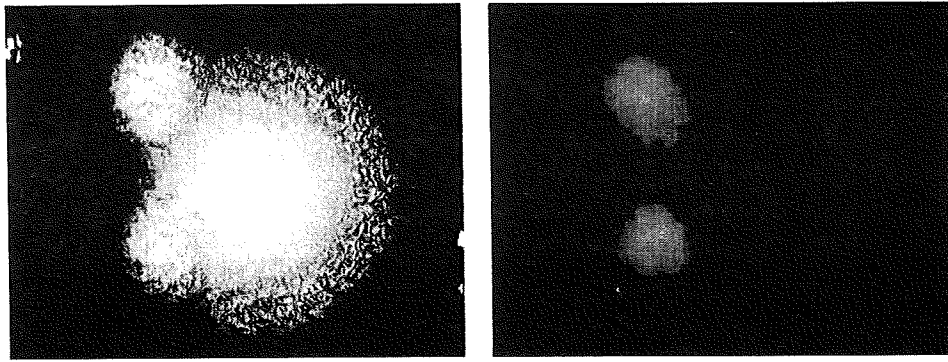


図5 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落 3

(左)*L. cherrii* (辺縁オレンジ)と*L. pneumophila* 血清群 1 (辺縁ピンク)
 (右)同上集落に 360 nm の長波長紫外線を当て、自発蛍光を示す *L. cherrii* (温泉水培養 4 日目, 自家調製 MWY 培地 : OXOID, 撮影倍率×120)

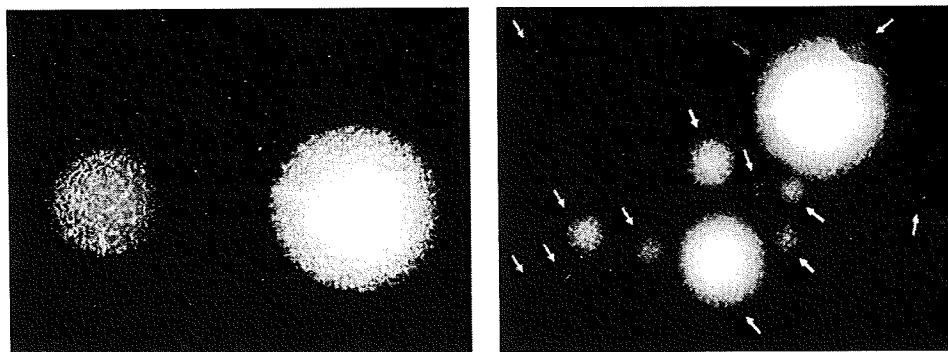


図6 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落 4

(左)*L. geestiana* : 左と *L. pneumophila* 血清群 6 : 右 (撮影倍率×120)
 (右)*L. pneumophila* 血清群 4 : 矢印ピンク, *L. rubrilucens* : 黄緑, *L. pneumophila* 血清群不明 : 白, *L. pneumophila* 血清群 1 : 赤, *L. pneumophila* 血清群 5 : 水色, *L. feeleii* : 黄色 (撮影倍率×80)(温泉水培養 4 日目, 自家調製 MWY 培地 : OXOID)

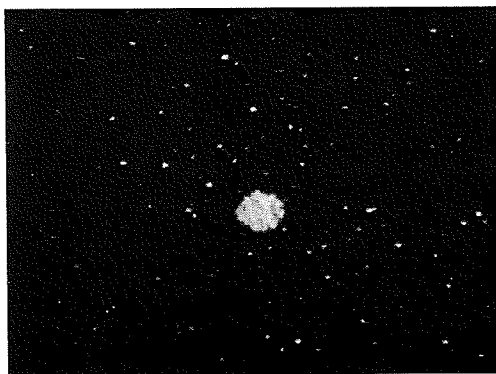


図7 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落 5
 温泉水培養 30~35 時間で発育した *L. pneumophila* 血清群 6
 (自家調製 MWY 培地 : OXOID, 撮影倍率×204)

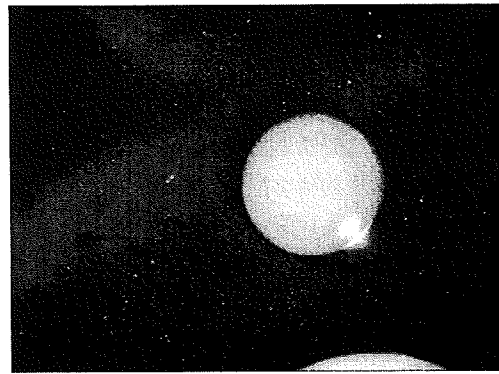


図8 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落 6
 発育当初から不明瞭な模様を呈した *L. micdadei*(温泉水培養 4 日目, 自家調製 MWY 培地 : OXOID, 撮影倍率×120)

を示した集落が認められた。これら集落のうち、釣菌した 10,620 集落について確認検査を行った結果, 10,199 集落がレジオネラ属菌と同定された(96%)。これにより, 718 試料中 703 試料(浴槽水 686 試料, 冷却塔水 15 試料, 腐葉土 2 試料)で, レジオネラ属菌が確認された。なお, 全 783 試料において, 斜光法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 5,747 集落に

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(図4)。このことは, 培養期間中, 斜光法により本特徴を有する集落が認められなかった試料(65 試料)からは, レジオネラ属菌が確認されなかったことも意味する。また, 一つの環境試料から, 菌種の異なる複数のレジオネラ属菌が検出された事例が, 陽性

703 試料中 611 試料(浴槽水 594 試料, 冷却塔水 15 試料, 腐葉土 2 試料: 87%)あった。これらの試料では, 分離培地上に発育した集落を斜光法で観察すると, 色, 大きさ, 外観構造などで見え方に違いがある場合が多数認められた。この形態的特徴の異なる集落を釣菌して確認検査を行うと, 種類の異なるレジオネラ属菌であることが多かった(図 5, 6)。さらに, 斜光法では, 実体顕微鏡を使用するため, 培養 2 日目(30~35 時間程度)で培地上に発育してきた極めて微小なレジオネラ属菌集落を確認できる場合もあった(図 7)。また, 真菌類や雑菌が多数発育した分離培地上で, わずかな隙間に発育したレジオネラ属菌も確認することができた。

なお, 今回の試験において, 斜光法により確認されたレジオネラ属菌の種類は, *L. pneumophila* (血清群 1~10, 12, 13, 15, 不明), *L. anisa*, *L. birminghamensis*, *L. bozemani*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. erythra*, *L. feeleii*, *L. geestiana*, *L. gormanii*, *L. jamestowniensis*, *L. londinienensis*, *L. maceachernii*, *L. micdadei*, *L. oakridgensis*, *L. rubrilucens*, *L. sainthelensii*, *L. spiritensis* であった。

考 察

本研究で, 斜光法を利用したレジオネラ属菌検査を行った結果, 5 種類の基準株, 環境試料から分離された *L. pneumophila* の 13 血清群およびその他 17 種類のレジオネラ属菌が, カットグラス様などの特徴的な外観構造を有していた。今回, 環境試料を検査した結果, 本特徴を有していた灰白色湿潤集落の 96% がレジオネラ属菌であったこと, 本特徴を有していない灰白色湿潤集落は, 全て非レジオネラ属菌であったことから, 本観察法は, 分離培地上で, レジオネラ属菌の分別を行う上で極めて有用な方法であると思われた。従来法では, 肉眼で観察し, 灰白色を呈する湿潤集落をレジオネラ属菌様集落と推定し, 菌数測定や釣菌を行ってきた。しかしながら, この方法では, 他の発育菌との分別が困難であり, 不確かな菌数測定や非効率な釣菌作業を行わなければならない場合が多い。今回, 斜光法の導入により, レジオネラ属菌集落の有する形態的特徴を利用することで, 多数の灰白色湿潤集落を含む集落が分離培地上に発育していたとしても, 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ることが判明した。それにより, 他の菌の発育の多少にかかわらず, 釣菌対象となる集落が限定され, その後のレジオネラ属菌の確認検査を効率良く行うことができ, 菌数測定も極めて正確に行うことができると思われた。

レジオネラ属菌は, 他の細菌に比べ増殖速度が遅く, 7 もしくは 10 日目まで培養するとされている¹⁻⁶⁾。我々も, これまでに分離培地上で発育が確認されてから数日間にわたり, レジオネラ属菌集落の増加が認められる

事例をしばしば経験している。また, 種類によっては発育が確認されるまでに, 7 日間以上の培養日数を要し, その後最終確認に至るまでに, さらに数日間の培養が必要だった事例も何度か経験している。文献によっては, 培養 24~48 時間後に出現した集落はレジオネラ属菌ではなく, 独立集落は 4~5 日目から出現しはじめ, 6~7 日前後で集落性状が判定できるまでに生育すると記載されている^{1,2)}。しかしながら, 斜光法では, 実体顕微鏡を利用することから, 培養 2 日目(30~35 時間程度)から特徴的な微小集落を確認できる場合があった。発育早期から高い確率でレジオネラ属菌の存在が確認できることは, 定性的な判定日数を短縮できる可能性がある。また, 環境試料では, 分離培地に真菌類が発育する場合があります。一般的に数日間の培養日数が必要ということは, 培養早期に発育しているそれら真菌類や雑菌の集落の成長に伴い, レジオネラ属菌の発育可能エリアが極めて限定されていく。状況によっては, わずかな隙間に発育したレジオネラの微小集落が, 検査者がそれと気づく前に, 真菌類や雑菌の集落で覆われる可能性があり, 検査に大きく影響を与えていることも考えられる。しかしながら, 本法では, より培養日数を要するレジオネラ属菌に対しても, そのような影響を最小限に抑えることができる可能性があり, この点からも有用な方法であると思われた。

今回, 一つの環境試料から, 菌種の異なる複数のレジオネラ属菌が検出された事例が, 陽性 703 試料中 611 試料(87%)あった。これらの事例では, 一つの分離培地上から複数種類のレジオネラ属菌が発育した場合がほとんどであった。従来法では, これらを分別することが非常に困難であるが, 斜光法により, 色, 大きさ, 外観構造などの見え方の違う集落を釣菌すること, さらに集落の発育時期等を考慮することにより, 異なる種類を効率的に釣菌する事が可能な場合があると思われた。このことから, 環境水の詳細な実態調査や患者発生時の詳細な感染源調査などを行う時にも, 有効な検査法の一つであると思われた。ただし, 特徴の違いで種類を特定することは難しく, 菌種を特定する検査は必須である。

現在レジオネラ属菌は 50 を超える菌種が報告されており, 中にはいくつかの血清群に分けられる種類もある。よって, それらすべてにおいてこのような形態的特徴が認められるのかは, 今後確認してみなければわからないが, 本研究において 5 種類の基準株, 環境試料から分離された *L. pneumophila* の 13 血清群およびその他 17 種類のレジオネラ属菌で, カットグラス様等の特徴的な外観構造を有していることが確認され, 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, 本法は, 定期

的な環境水の自主検査および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。

一方で、斜光法においても、本形態の特徴が不明瞭なレジオネラ属菌集落も経験した(図8)。分離培地の違い(種類、メーカー)、菌株の違いなどにより、このような見え方をする場合があると思われる。十分な観察により、判定することは可能であるが、鏡検と判定に慣れること、疑わしい場合は必ず釣菌し確認する事が必要である。また、斜光法単独での確定は誤判定につながる可能性もあるので、注意が必要である。さらに、レジオネラ属菌集落が分離培地に発育してから3日目以降は、培養時間の経過とともに、この形態の特徴が確認しづらくなる場合があるので、注意が必要である。

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導入することで、正確性の向上と迅速化が可能となり、患者由来試料にも応用できると考える。また、環境水などの検査では、定性的な考えと、十分な培養日数を考慮した定量的な菌数測定の結果の位置付けを明確にすることにより、正確で迅速な対応へ結びつけることができると思われた。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、安価で比較的スポットライト様に使用できるペン型の高光度LEDライト(口径7~10 mm)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。

謝辞：本稿を終えるにあたり、検査にご協力頂いた、北海道保健福祉部保健医療局健康安全室 熊田洋行氏、胆振保健福祉事務所保健福祉部試験検査課 内山康裕氏、釧路保健福祉事務所保健福祉部試験検査課 玉手直人氏、北海道立衛生研究所 池田徹也氏、清水俊一氏、山口敬治氏、ご助言を頂いた熊本県食肉衛生検査所 宮坂次郎氏、岩手県環境保健センター 岩渕香織氏、宮城県仙南・仙塩広域水道事務所 佐々木美江氏、山形県衛生研究所 瀬戸順次氏、福島県衛生研究所 柳沼幸氏、仙台市衛生研究所 星俊信氏、新潟市衛生環境研究所 山本一成氏、青森県環境保健センター 和栗敦氏、富山県衛生研究所 磯部順子氏、大分県衛生環境研究センター 緒方喜久代氏に深

謝致します。

利益相反について：本研究は北海道の試験研究費および平成19~21年度厚生労働科学研究補助金(地域健康危機管理研究事業及び健康安全・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(研究代表者 倉文明)」の一環として実施されたことを付記する。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課監修：レジオネラ症防止指針，財団法人ビル管理教育センター，東京，1994. p. 34-5.
- 2) 改訂・レジオネラ属菌防除指針—温泉利用入浴施設用—：財団法人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. p. 18-22.
- 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. 89-92.
- 4) 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. p. 654-7.
- 5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2005，金原出版，東京，2005. p. 103.
- 6) 第3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，東京，2009. p. 31-2.
- 7) Gilda L. Jones, G. Ann Hébert, editors：レジオネラ症. 竹田美文，本田武司，三輪谷俊夫 訳，近代出版，東京，1981. p. 64-8.
- 8) P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Tenover, editors: *Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY*. 7th EDITION. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1999. p. 579-80.
- 9) P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgenson, M. A. Pfaller and R. H. Tenover, editors: *Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY*. 8th EDITION. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 2003. p. 815.
- 10) 山本啓之：遺伝子による検出方法. 臨床と微生物 1998; 25(1): 35-9.
- 11) 館田一博：診断・治療と遺伝子検査 *Legionella pneumophila*. 臨床と微生物 1999; 26 増刊: 603-6.
- 12) 第3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，東京，2009. p. 35.
- 13) 厚生省監修：微生物検査必携 細菌・真菌検査第3版：財団法人日本公衆衛生協会，東京，1987. p. F-47.

〔連絡先〕：〒060-0819 北海道札幌市北区北19条西12丁目
北海道立衛生研究所感染症センター微生物部
食品微生物科 森本 洋
E-mail: morimoto@iph.pref.hokkaido.jp]

Usefulness of Selection of Legionella by Colony Appearance

Yo MORIMOTO

*Food Microbiology Division, Department of Microbiology, Center for Infectious Disease Prevention,
Hokkaido Institute of Public Health*

Abstract

An acid or heat preprocessing step or a selective isolation agar is required for the *Legionella* culture test, since the test sample may contain various other bacteria. However, miscellaneous bacterial growth is sometimes not possible to control even with such precautions. Many *Legionella*-test manuals indicate that isolated *Legionella* colonies are characterized by different-sized grayish-white moist look with the slight acidic odor peculiar to *Legionella*. However, in the actual test, *Legionella* colonies are often difficult to distinguish from other bacteria in presence of many similar-looking colonies. Therefore, we suggest a colony-observation method which is more precise and simple. The characteristic outward structures (cut-glass like or mosaic like appearance) of *Legionella* spp. were observed under a stereo microscope with oblique illumination over the growing culture on the isolation agar. *Legionella* spp. could be distinguished from other bacteria and efficiently obtained using this observational method. In addition, bacteria count was easy and extremely accurate with this method. In this study, 13 serogroups of *L. pneumophila* and 17 types of other *Legionella* spp. were detected efficiently by this method from environmental samples. Since the same features were observed in the *L. pneumophila* serogroup 1, which was detected most frequently in *Legionella pneumonia* patients, this observational method is one of the most effective test methods for regular monitoring of environmental water or investigations of infection or contamination sources.

Key words : *Legionella* colonies, oblique illumination, cut-glass like, mosaic-like

