

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）  
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」

平成 28 年度分担研究報告書

斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査と比色系パルサー法感度向上のための検討

研究分担者 佐々木 麻里 大分県衛生環境研究センター  
研究協力者 一ノ瀬 和也、神田 由子 大分県衛生環境研究センター  
研究協力者 緒方 喜久代 公益社団法人大分県薬剤師会検査センター

研究要旨： 標準的な検査法を提示する一助として、迅速培養法（斜光法を取り入れた培養法）について平成 21 年度から検討を行っている。今年度は大分県内施設の浴場水 39 検体を用いて実施したところ、培養検査に斜光法を取り入れることにより、より短い期間で正確な培養結果が得られた。浴場水由来の *Legionella pneumophila* SG1 株について、調査を始めた平成 24 年度以降初めて *lag-1* 遺伝子保有株が検出された。県内の臨床検体由来株の多くが保有している因子であるので、今後動向に留意したい。

また、比色系パルサー法については、特殊な機器を必要としないことから、保健所等監視指導機関等での活用が期待される。検水をフィルターでろ過後、そのフィルターごと溶菌処理する方法について検討し、良好な結果を得たが、ろ過に長時間かかる検体があり、その解消に向けてさらに検討を進める。

#### A. 研究目的

浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として広く用いられている培養法は結果を得るまでに 7 日から 10 日の長い時間を要する。患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時やレジオネラ属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中のレジオネラ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は、監視現場からより迅速で、かつ正確な検査が求められている。そこで、様々な泉質を有する温泉水等を対象に、正確・簡便・迅速な培養結果を得る方法としての斜光法（分離培地上の出現コロニーに 2 方向から斜光をあて、実体顕微鏡下で観察をするとレジオネラ属菌は特徴的なモザイク様の形態を示すことを利用した方法<sup>1)</sup>）をレジオネラ属菌検査の標準法に導入することを目的に従来の培養法との比較検討を行った。

また、LAMP 法については、迅速に結果

が得られるため当県で多用しているが、様々な泉質を有する温泉水等を利用した公衆浴場等においては、培養(+)LAMP(-)の不一致の結果が得られることがあり、その原因の解決が課題となっている。培養法と LAMP 法の不一致検体について、検討を行った。

比色系パルサー法（Fig. 1）については、測定に特殊な機器を必要としないことから、試験検査機関のみならず監視指導機関等での活用が期待される。100 倍濃縮検体 1mL を用いて実施された過去の結果では、培養法に対して感度が低かった<sup>2)</sup>ので、感度向上のための検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料および検査法

平成 28 年 8 月から 11 月に搬入された浴槽水および湯口水、20 施設 39 検体を対象とした。

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 1200mL をメンブランフィルター（直径 47mm、孔径 0.2 $\mu$ 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 12mL 入りの滅菌コニカルピーカー（100mL 容量）に移し、ボルテックスミキサーにて 1 分間洗い出しをした。ろ過濃縮後の濃縮検体（未加熱と表記）と 50 で 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

レジオネラ属菌の分離培地として WYO $\alpha$  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；Oxoid）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 $\mu$ 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 で培養した。本法における検出感度は 5cfu/100mL である。

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。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYE $\alpha$  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 で 7 日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ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 あたりのレジオネラ属菌数に換算した。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。

また、*L. pneumophila* SG1 と確認された分離株については *lag-1* 遺伝子の保有の有無について、Kozak ら<sup>3)</sup>のプライマー *lag-F* と *lag-R* を用い、PCR 法にて確認した。

## 3. LAMP 法

濃縮検体について、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 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行った。

培養陽性かつ LAMP 陰性であった検体については、当該抽出液に 1/10 量の陽性コントロールを添加し、蒸留水に同様にコントロールを添加したものと併せて再度測定を実施し、Tt 値を比較した。

## 4. 比色系パルサー法

次の 3 法で調製した溶菌液を用いて、添付の取扱説明書に従い、測定を実施した。方法 及び の溶菌液については即日測定、方法 の溶菌液については、測定するまで 1 日～7 日間、-30 で冷凍保存した。

（方法 ）濃縮検体（未加熱）39 検体について、1mL を 12,000rpm（13,000 $\times$ g）で 10 分遠心後、70 $\mu$ L を残して上清を除去し、変性液を 30 $\mu$ L 加えてボルテックスミキサーにて 1 分間混和後、37 15 分間静置し、その後 10 $\mu$ L の中和液を加えて溶菌液を調製した（濃縮 1mL 溶菌液と表記）。

（方法 ）濃縮検体（未加熱）39 検体について、2mL を 12,000rpm（13,000 $\times$ g）で 10 分遠心後上清を除去し、さらに濃縮検体 2mL を加えて同条件で遠心後、70 $\mu$ L を残して上清を除去し、変性液 30 $\mu$ L を加えた後、方法 と同様に調製した（濃縮 4mL 溶菌液と表記）。

（方法 ）濃縮検体に対応する非濃縮検水 39 検体について、各 100mL を注射筒を用いてメンブランフィルター（直径 13mm、孔径 0.22 $\mu$ m、Merck 社、混合セルロースアセテート）でろ過し、ろ過後のフィルターを 2mL チューブに移し、100/30 倍に希釈した変性液 100 $\mu$ L を加えてボルテックスミキサーで 1 分間混合後、フィルターを下にした状態で 37 15 分間静置し、その後 10 $\mu$ L の中和液を加えて溶菌液を調製した（フィルター溶菌液と表記）。

## C. 研究結果

### 1. 培養法

培養結果の概要を Table 1 に示した。39 検体中 15 検体（38%）からレジオネラ属菌が検出された。内訳は「掛け流し・非循環式施設」では浴槽水 12 施設 12 検体中 6 施

設 6 検体 (50%)、湯口水 11 施設 11 検体中 4 施設 4 検体 (36%) で、「循環式施設」では浴槽水 8 施設 12 検体中 2 施設 3 検体 (25%)、湯口水 4 施設 4 検体中 2 施設 2 検体 (38%) であった。

浴槽水と湯口水ともにレジオネラ属菌が検出された施設は 5 施設であった。浴槽水 (+) 湯口水 (-) となった施設、浴槽水 (-) 湯口水 (+) となった施設は各 1 施設であった (Table 2)。

検出された菌数を Table 3 に示す。菌数は最も多い検体で 500cfu/100mL であり、例年に比べて検出菌数は少なかった。

斜光法は培養 3 日目を判定日とし、特徴あるモザイク様のコロニーについて確認検査を行った。その結果、レジオネラ属菌が検出された 15 検体は、継続培養後に菌数が増加することはあったが、全て斜光法で陽性を確認することができた。一方、斜光法における検出菌と異なる種類・血清群の菌が継続培養後に検出された検体もあった。検出菌の血清群別の結果を Table 4 に示した。SG1 株が 1 施設の 2 検体から検出され、検査した 18 株全てが *lag-1* 遺伝子を保有していた。これは、平成 24 年から大分県の浴場水由来株の *lag-1* 保有調査を開始して以来、初めてのことである (Table 5)。

## 2. LAMP 法

濃縮検体 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行い、1 回でも陽性となった場合は、その結果を採用した (Table 6)。2 検体が培養 (+) LAMP (-) の不一致の結果となった。2 検体のレジオネラ属菌数は 5cfu/100mL、500cfu/100mL であり、共に *L. pneumophilla* が検出された。これら 2 検体について、陽性コントロールを添加した抽出液と蒸留水とで Tt 値に差はなかった。

## 3. 比色系パルサー法

濃縮 1mL 溶菌液 (方法 ) について実施した結果、39 検体中、培養法とパルサー法とともに陽性となったのは 12 検体、培養 (-) パルサー (+) となったのは 9 検体、培養 (+) でパルサー (-) の不一致の結果となったのは 3 検体であった (Table 7-1)。不一致の結果となった 3 検体は、フィルタ

ー溶菌液 (方法 ) で測定したところ、すべてパルサー法陽性となった。

濃縮 4mL 溶菌液 (方法 ) については、39 検体中、培養法とパルサー法とともに陽性となったのは 14 検体、培養 (-) パルサー (+) となったのは 10 検体、培養 (+) パルサー (-) の不一致の結果となったのは 1 検体であった (Table 7-2)。不一致の結果となった 1 検体は濃縮 1mL 溶菌液 (方法 ) においても陰性であった。この検体からは 500cfu/100mL のレジオネラ属菌が検出され、血清群は *L. pneumophilla* SG2 及び SG3 であった。

フィルター溶菌液 (方法 ) については、培養法陽性の検体は全てパルサー法陽性で不一致の検体はなく (Table 7-3)、濃縮検体 1mL に相当する非濃縮検水 100mL の使用で、非常に感度良く検出できた。しかし、ろ過に際して目詰まりが起こりやすく、多大な労力を要する検体が存在した。

## D. 考察

斜光法は高価かつ特殊な機器を必要とせず、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。培養 7 日以降で発育を認めるレジオネラ集落もあるため、培養 3 日目での陰性の判定はできないが、3 日目の時点で観察・同定し、速報することで、速やかな行政対応につなげることが可能となる。県保健所の適切な指導により、浴場水のレジオネラ属菌検出率、検出菌数は減ってきているものと思われる。少ない菌数のレジオネラ属菌が他の多数の菌に紛れているような状況でも、斜光法における特徴的なモザイク様の形態は、平板上に発育したコロニーを見分ける際の分かりやすい手がかりとなり、検査の迅速化だけでなく精度向上にもつながると考える。

浴場水由来の *L. pneumophila* SG1 株について、調査を始めた平成 24 年度以降初めて *lag-1* 遺伝子保有株が検出された。*lag-1* は県内のレジオネラ症患者由来株の多くが保有している因子である (データ非公表)。当該施設周辺に患者が増えているという状況はないが、今後動向に留意したい。

LAMP 法については、培養結果との不一致の原因について、陽性コントロールを添加した抽出液と蒸留水とで  $T_t$  値に差はなく、今回の不一致の要因は検水による反応阻害ではないと考えられた。

比色系パルサー法については、濃縮水 1mL を測定した場合と比較して、使用する検水の量を増やした濃縮水 4mL 測定の場合は感度が良かった。フィルター溶菌液で実施した場合には、濃縮水 1mL に相当する非濃縮検水 100mL の測定で、濃縮 4mL 溶菌よりもさらに感度が良かった。濃縮溶菌液は調製の際に上清を除去するという工程が入るのに対し、フィルター溶菌液はフィルターに補足された菌をそのまま溶菌に供することができるため、ロスが生じにくかったと推察される。

比色系パルサー法の感度向上に、フィルター溶菌は有効と思われた。注射筒を用いて検水を圧縮ろ過する方法は大量多検体を同時に処理するには不向きである。しかし、特殊な機器を必要としないというパルサー法の利点を活かすには、ろ過においても高価な機器を使用しない方法が望まれる。注射筒を用いたろ過であれば、検査機器の揃っていない施設においても利用でき、保健所の監視担当課や浴用施設等での検査も可能になることから、少数の検体の繰り返し検査による衛生担保や迅速な衛生管理につながると考える。一方で、今回ろ過自体に非常に時間がかかる検体が存在したため、労力を軽減する方法の検討を要する。

LAMP 法と比較して、比色系パルサー法は培養法陰性の検体が陽性となる擬陽性が多かった。その理由としては、検出ターゲットが DNA と RNA で異なること、菌量が少ない場合のバラツキ（1 回の測定に供試する溶菌液の量が異なる）が考えられた。

#### E. 結論

培養法の迅速化、精度向上を図るにあたって、斜光法は有用である。斜光法を含めた標準的検査法を提示し、精度の高いレジオネラ属菌検査を普及するための研修システム確立に向け、今後の検討を図っていきたい。

また、機器の揃った検査機関以外にもレジオネラ属菌の検査が可能になることは、公衆浴場等の衛生管理の一助となる。注射筒とフィルターを用いた溶菌法により、監視指導機関等でも感度良くレジオネラの検査を行うことが可能となることが考えられ、比色系パルサー法の検討をさらに進めていく。

#### 参考文献

- 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 磯部 順子 他：レジオネラ属菌迅速検査法の評価．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）「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 27 年度総括・分担研究報告書：61-69
- 3 Kozak et al. : Distribution of lag-1 alleles and equence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. J Clin Microbiol. 2009. 47(8) : 2525-2535

#### F. 研究発表等

1. 佐々木麻里：レジオネラ症に係る最近の知見と検査の取り組み、平成 28 年度環境監視員担当者会議、2016 年 4 月、大分。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Fig. 1 比色系パルサー法 (出典: 検査キット取扱説明書)

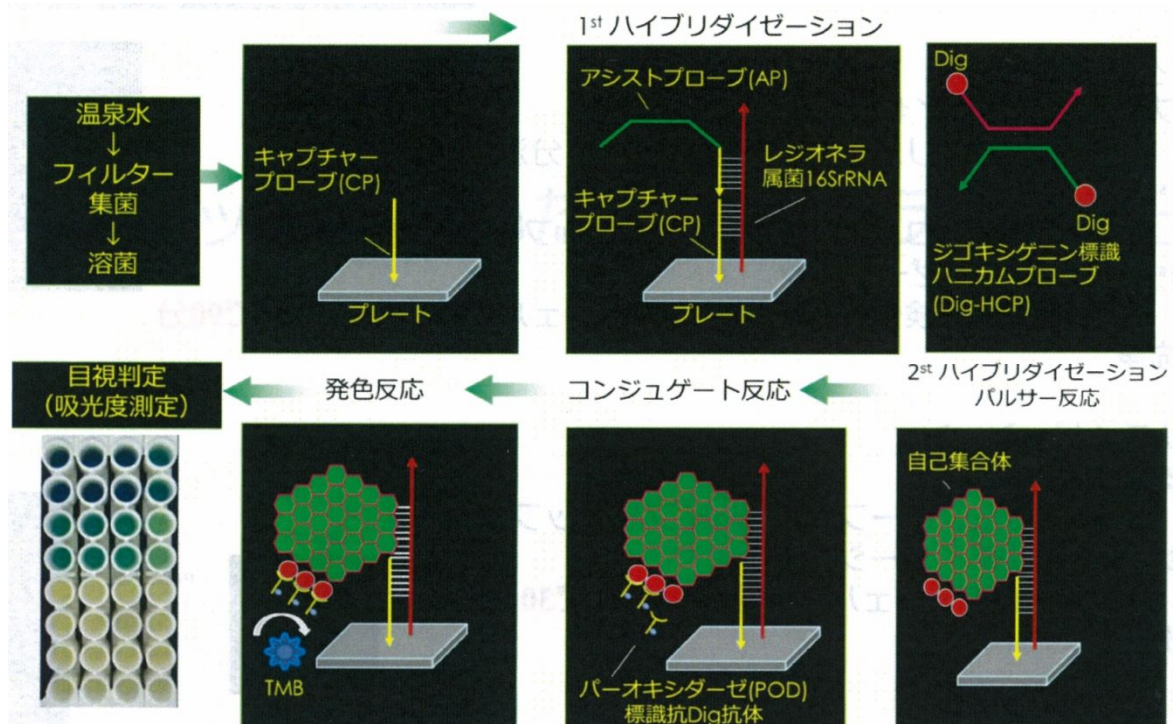


Table 1 培養法の結果

		採水箇所	検体数	検出数 <sup>a</sup>	検出率
掛け流し式 非循環式	浴槽水		12	6	50%
	湯口水		11	4	36%
循環式	浴槽水		12	3	25%
	湯口水		4	2	50%
計			39	15	38%

<sup>a</sup>10cfu/100mL によらない(定性)

Table 2 浴槽水と湯口水の検出状況 (n=15)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	5	1	6
	-	1	8	9
計		6	9	15

10cfu/100mL によらない(定性)

Table 3 培養法の検出菌数別検体数 (n=39)

菌数	検体数
5 未満	24
5 - 9	2
10 - 99	5
100 - 999	8
1000 以上	0
合計	39

Table 4 血清群別の陽性検体数 (n=15)

血清群	検体数
SG1	2 (2)
SG2	4 (4)
SG3	4 (4)
SG4	1 (0)
SG5	1 (1)
SG6	2 (2)
SG7	1 (0)
SG8	2 (0)
SG9	1 (0)
SG12	1 (1)
SG15	5 (4)
SGUT	12 (12)

重複有り

( )内は斜光法で確認された検体数再掲

Table 5 浴場水における5年間の *lag-1* 検出状況

	<i>lag-1</i> 検出		SGI 検出		培養法検出		検査数	
	施設数	検体数	施設数	検体数	施設数	検体数	施設数	検体数
H24年	0	0	6	8	23	29	29	47
H25年*	0	0	0	0	7	10	9	17
H26年	0	0	4	4	15	22	28	56
H27年	0	0	5	6	15	25	25	50
H28年	1	2	1	2	8	15	20	39

\*血清群データのある検体のみ計上  
 培養法は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 6 LAMP 法と培養法の比較 (n=39)

	LAMP		計
	+	-	
培養法	+	13	15
	-	3	24
計	16	23	39

培養法は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 7-1 パルサー法(濃縮 1mL 溶菌液)と培養法の比較 (n=39) (方法 )

	パルサー		計
	+	-	
培養法	+	12	15
	-	9	24
計	21	18	39

培養法は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 7-2 パルサー法(濃縮 4mL 溶菌液)と培養法の比較 (n=39) (方法 )

	パルサー		計
	+	-	
培養法	+	14	15
	-	10	24
計	24	15	39

培養法は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 7-3 パルサー法(フィルター溶菌液)と培養法の比較 (n=39) (方法 )

	パルサー		計
	+	-	
培養法	+	15	15
	-	13	24
計	28	11	39

培養法は 10cfu/100mL によらない(定性)