

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 29 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 神田 由子、後藤 高志、成松 浩志
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 49 検体について検討を行った。昨年度までと同様、培養検査に斜光法を取り入れることによって、より短い期間で正確な培養結果が得られた。併せて、非選択培地の有用性についての検討を行ったが、浴場水からのレジオネラ属菌の分離には、非選択培地は適さなかった。

また、比色系パルサー法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。過去の検討では、検水をろ過してフィルターごと溶菌処理する方法で良好な結果が得られたものの、ろ過に長時間かかる検体があった。その解消法として、目詰まりする検水にはフィルター面積を大きくすることが有効であった。

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 7～10 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。レジオネラ属菌は、培養 3 日後に分離培地上に出現する小コロニーへ 2 方向から斜に光を照射し、実体顕微鏡下で観察をすると特徴的なモザイク様模様を示すことが報告されている¹⁾。そこで、この特徴をレジオネラ属菌の迅速スクリーニングに利用した方法（以下、斜光法¹⁾）をレジオネラ属菌検査のいわゆる『標準的検査法』に導入することを目的に、大分県内の浴場水の調査の中で、斜光法を取り入れた検査法を併行・継続し、様々な泉質に対する有用性と実効性についての検討を平成 21

年度から重ねている。

一方、ISO11731：2017 に示されたレジオネラ属菌分離手順の選択肢には非選択培地が含まれている。そこで、標準的検査法を提示する際の選択肢の一つとして、非選択培地を浴場水のレジオネラ属菌分離に用いることが妥当かどうか併せて検討した。

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）は、レジオネラ属菌特異的 16SrRNA に自己集合体を結合させることで、標的遺伝子を増幅させずに目視で検知する検査法である。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。昨年度、感度向上を目指して、検水ろ過後のフィルターを直接溶菌する方法を検討し、良好な結果を得た²⁾が、フィルターの目詰まりで、ろ過に多大な手間と時間を要する検体が存在したため、今年度はろ過の労力軽減を図った。

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 29 年 6 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水、25 施設 49 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 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 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 α 寒天培地（栄研化学）GVPC 寒天培地（日研生物）MWY 寒天培地（自家製；Oxoid）及び非選択培地 BCYE 寒天培地（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 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 で培養した。本法における検出感度は 5cfu/100mL である。

培養 3 日後に、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 α 寒天培地及び血液寒天培地（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³⁾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、LAMP 反応阻害を確認するため、当該抽出液に 1/10 量の陽性コントロールを添加したものと、陰性対照として用いるキット添付の抽出用試薬に 1/10 量の陽性コントロールを添加したものについて、再度測定をし、Tt 値を比較した。

4. 比色系パルサー法

非濃縮検水 49 検体について、レジオネラ属菌迅速検査キット（ファスマック）を用い、以下の 3 つの方法（～）で溶菌液を調製し、添付の取扱説明書に従って測定を実施した。なお、即日測定できなかった溶菌液については、測定するまで 1 日～4 日間、-30 で冷凍保存した。

方法：検水各 50mL を注射筒に入れてメンブランフィルター（直径 13mm、孔径 0.22 μ m、Merck 社、セルロース混合エステル；以下「13mm フィルター」）に押し出してろ過し、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 μ 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 μ L の中和液を加えて溶菌液を調製した（13mm-50mL 溶菌液と表記）。測定にはこの溶菌液の全量 110 μ L を用いた。

方法：検水各 100mL を注射筒に入れてメンブランフィルター（直径 25mm、孔径 0.22 μ m、Merck 社、セルロース混合エステル；以下「25mm フィルター」）に押し出してろ過し、ろ

過後のフィルターを滅菌したピンセットで折り畳んで2mLチューブに移し、100/30倍に希釈した変性液をろ紙が漬かる量の200 μ L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20 μ Lの中和液を加えて溶菌液を調製した(25mm-50mL溶菌液と表記)。測定には、検水50mL分に相当する半量110 μ Lの溶菌液を用いた。

方法：検水各200mLを注射筒に入れ、方法と同様に調製した(25mm-100mL溶菌液と表記)。測定には、検水100mL分に相当する半量110 μ Lの溶菌液を用いた。

C. 研究結果

1. 培養法

選択培地での培養結果の概要をTable 1に示した。49検体中20検体(41%)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16検体中8検体(50%)、湯口水16検体中7検体(44%)で、「循環式施設」では浴槽水9検体中3検体(33%)、湯口水8施設中2検体(25%)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7施設であった。浴槽水(+)湯口水(-)となった施設は3施設、浴槽水(-)湯口水(+)となった施設は1施設であった(Table 2)。

検出された菌数をTable 3に示す。検水100mLあたり1000cfu以上検出された検体が10検体あり、高菌数の検体が多かった。菌数は最も多い検体で23500cfu/100mLであった。

斜光法は培養3日後を判定日とし、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20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7施設の10検体から検出され、平成24年度以降で最多であったが、検

査した全33株中*lag-1*遺伝子を保有する株はなかった(Table 5)。

選択培地と非選択培地の培養結果を比較したところ、非選択培地のみでレジオネラ属菌が検出された検体は無かった(Table 6)。両培地で検出された9検体のレジオネラ属菌数は、1検体を除いて選択培地の方が多かった。非選択培地上には非常に多くの雑菌が発育し、培養7日後には倒置培養したシャーレの蓋まで菌が流れだし、蓋を開けることが困難な検体が複数あった。

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 7)。7検体が培養(+)LAMP(-)の不一致の結果となった。7検体中6検体(グループA)のレジオネラ属菌数は5~50cfu/100mLで、*L. pneumophila*が分離された。残り1検体(グループB)は、レジオネラ属菌数が1500cfu/100mLで、*L. pneumophila*とLAMP法適用外の菌種である*L. londiniensis*が分離され、その泉質はマグネシウム・ナトリウム-炭酸水素塩・硫酸塩泉であった。

これら7検体について、陽性コントロールを添加した抽出液と陽性コントロールを添加した陰性対照とでTt値を比較したところ、グループAの6検体では差が見られなかったが、グループBの1検体では3回測定中3回とも抽出液のTt値の方が1~2分遅い値となった。(陰性対照平均Tt値27.7分、抽出液平均Tt値29.1分)。

3. 比色系パルサー法

各方法で実施した結果をTable 8-1、8-2、8-3に示した。検水50mL相当を測定した方法と方法では発色の薄い検体が多く、陰性が陽性が判定に迷う検体があった(表では「±」と記載)。

49検体中、培養法陽性でパルサー法陰性の不一致の結果となったのは、13mm-50mL溶菌液(方法)については6検体(Table 8-1)、25mm-50mL溶菌液(方法)についても6検体(Table 8-2)であった。この2種類の方法で両方とも不一致の結果となったのは5検体で、そのうちの3検体及び片

方が不一致の結果になった2検体から検出されたレジオネラ属菌数は5~50cfu/100mLと低菌数であったが、残り2検体から検出された菌数は、それぞれ1500cfu/100mL、6000cfu/100mLであった。なお、この高菌数の2検体のLAMP法の結果は、3回測定中それぞれ3回陰性、2回陰性で、泉質はともにマグネシウム・ナトリウム-炭酸水素塩・硫酸塩泉であった。

25mm-100mL溶菌液(方法)について(Table 8-3)培養(+)かつパルサー(-)の2検体から検出されたレジオネラ属菌数はともに5cfu/100mLであった。

13mmフィルターで50mL、25mmフィルターで200mLの検水をろ過した場合には、目詰まりする検体もあったが、昨年度13mmフィルターで100mLろ過した場合と比較して押出す力は少なく済み、短時間でろ過できた。

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日後での陰性の判定はできないが、3日後の時点で観察・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。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に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。

非選択培地については、選択培地と比較して、検出できた検体数も菌数も少なかった。これは非選択培地上に非常に多くの雑菌が発育し、レジオネラ属菌を覆い隠してしまったためと考えられる。浴場水はレジオネラ属菌以外の菌が含まれていることが多く、ISO11731:2017の想定する雑菌の少ない水を対象とした検査とは異なり、非選択培地の使用は適していないことが示された。

比色系パルサー法について、13mmフィルターと25mmフィルターを比較したところ、ろ過した検水量が同じであれば同等の結果であった。25mmフィルターの結果では、検水量を増やした方が検出率は高かった。発色の程度も考慮すると、測定量は検水100mL相当がよいと言える。フィルター面積が大きい方がろ過にかかる労力はかなり軽減されたが、フィルターを折り畳む手間と溶菌液を半量にする手間を要した。これらのことから、目詰まりしにくい検体については13mmフィルターで100mLをろ過し、13mmフィルターではろ過困難な場合については25mmフィルターを用いて同等の測定量にすることを推奨したい。

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。

同一の検体で培養法では高菌数なのにLAMP法とパルサー法ではともに陰性となったものがあり、温泉成分(マグネシウム等)の影響が疑われたが、原因の解明は今後の検討課題としたい。

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。浴場水のレジオネラ属菌分離に非選択培地は適さない。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。パルサー法において、検水に適したフィルターを用いて溶菌処理をすることで、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と考えられる。

参考文献

- 1 森本洋：分離集落の特徴を利用したレ

- 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 佐々木麻里 他：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．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）「公衆衛生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 年度総括・分担研究報告書：62-67
 - 3 Kozak et al. : 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.* 2009. 47(8) : 2525-2535
- F. 研究発表等
1. 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 29 年度環境監視員担当者会議、2017 年 4 月、大分.
 2. 佐々木麻里：大分県のレジオネラ症とレジオネラ検査について、レジオネラ症防止対策講習会、2017 年 11 月、大分.
 3. 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 29 年度第 2 回保健所等検査技師研修会、2018 年 2 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)

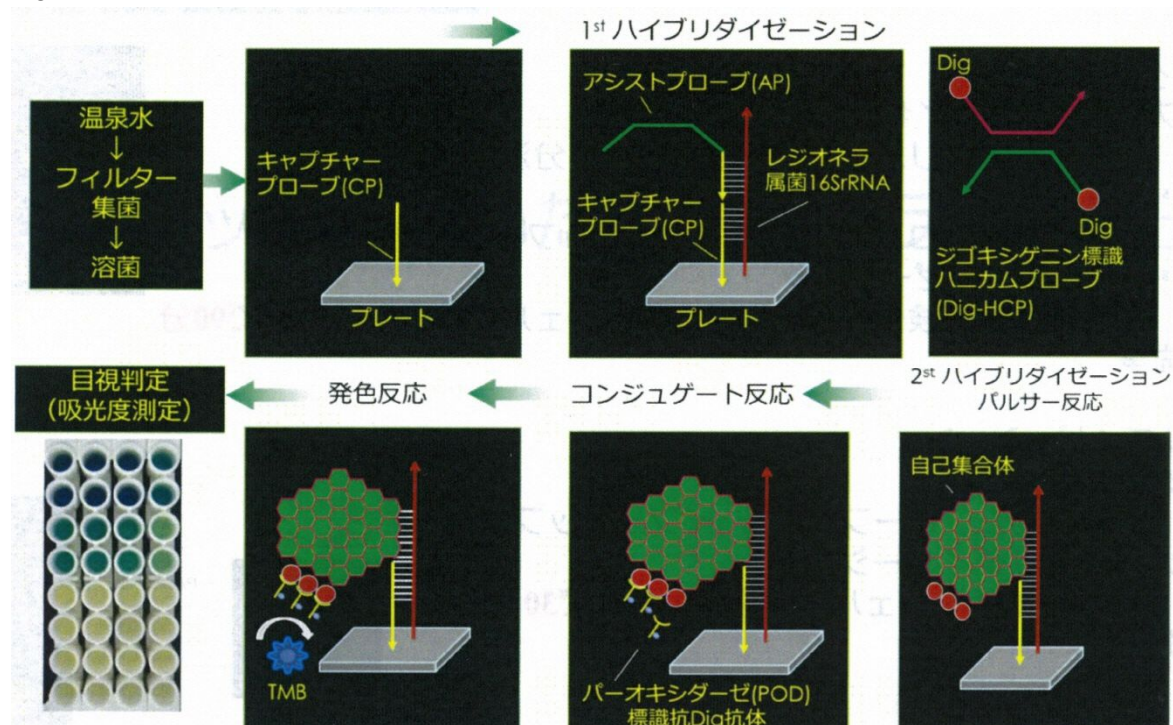


Table 1 培養法の結果

		採水箇所	検体数	検出数 ^a	検出率
掛け流し式 非循環式	浴槽水		16	8	50%
	湯口水		16	7	44%
循環式	浴槽水		9	3	33%
	湯口水		8	2	25%
計			49	20	41%

^a 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	+	7	1	8
	-	3	13	16
計		10	14	24

+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 3 培養法の検出菌数別検体数 (n=49)

菌数	検体数
5 未満	29
5 - 9	3
10 - 99	3
100 - 999	4
1000 以上	10
合計	49

Table 4 血清群別の陽性検体数 (n=20)

血清群	検体数
SG1	10(10)
SG2	1 (0)
SG3	8 (8)
SG4	6 (6)
SG5	6 (4)
SG6	9 (8)
SG8	1 (1)
SG9	2 (2)
SG12	1 (1)
SG13	3 (3)
SG15	2 (2)
SGUT	14 (14)

複数の血清群が同時に検出された検体あり

()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6年間の lag-1 検出状況

	lag-1 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
H29年	0	0	7	10	12	20	25	49

*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 選択培地と非選択培地の比較 (n=49)

	非選択培地			計
		+	-	
選択培地	+	9	11	20
	-	0	29	29
計		9	40	49

+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 7 LAMP法と培養法の比較 (n=49)

	LAMP			計
		+	-	
培養法	+	13	7	20
	-	10	19	29
計		23	26	49

培養法+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 8-1 パルサー法 (13mm-50mL 溶菌液) と培養法の比較 (n=49)(方法)

	パルサー			計	
		+	±		-
培養法	+	13	1	6	20
	-	12	0	17	29
計		25	1	23	49

培養法+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 8-2 パルサー法 (25mm-50mL 溶菌液) と培養法の比較 (n=49)(方法)

	パルサー			計	
		+	±		-
培養法	+	12	2	6	20
	-	15	2	12	29
計		27	4	18	49

培養法+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 8-3 パルサー法 (25mm-100mL 溶菌液) と培養法の比較 (n=49)(方法)

	パルサー			計
		+	-	
培養法	+	18	2	20
	-	24	5	29
計		42	7	49

培養法+ は 10cfu/100mL によらない(定性)