

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）

平成 29 年度（総括・分担）研究報告書

研究代表者： 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部

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

レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発
携帯型フローサイトメーター用蛍光試薬の特異性の検討

研究分担者： 田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター

研究協力者： 倉 文明 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室

研究協力者： 蔡 国喜 長崎県環境保健研究センター

研究協力者： 小嶋 裕子 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

現場検査への実用化を目指し、迅速検出法の検査に携帯型フローサイトメーターを適用してレジオネラ属菌用特異染色試薬による検出限界と特異性を調査した。本研究で使用した装置は、532 nm 半導体レーザーを備えた 6.5 kg の検出装置である。本迅速検出法は約 $10^2 \sim 10^5$ CFU/mL の範囲で培養法と高い相関 ($y = 409.26x^{0.8689}$, $R^2 = 0.95113$) を示し、レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1、血清群 3、血清群 4、血清群 5、血清群 6、血清群 9、血清群 10 および型別不能株ならびにレジオネラ・デュモフィを検出することができた。本検査法の検出限界と定量限界はそれぞれ約 1,300 counts/100 mL および約 4.00×10^4 counts/mL と決定され、生菌数として 32 CFU/100 mL および 235 CFU/mL に相当していた。この迅速検出法は遊離塩素処理条件下で、レジオネラ属菌で汚染された浴槽水と清浄な浴槽水とを区別することができることから、入浴施設等の現場において、特にレジオネラ・ニューモフィラのリスクを監視するために利用可能であると結論づけた。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は、バイオフィームやアメーバにより塩素の殺傷力をも回避できることが知られており、循環ろ過式入浴施設の浴槽水において繰り返し検出されることがある。このような施設において塩素消毒を行う場合、温泉の成分、入浴者の皮垢やバイオフィームは塩素の阻害物質として働くために、遊離塩素により浴槽水を安定的かつ効果的に消毒するためには高度な技術が必要である。この入浴施設における塩素消毒の問題を軽減するために考案されたフローサイトメトリーによる迅速検出法 (Rapid Detection Method, RDM)¹⁾ は、細菌汚染とレジオネラ汚染との強い関連性から、細菌計数によりレジオネラリスクを判定しており、僅かな試料から極短時間でスクリ

ーニングすることを可能とした技術である。この RDM 法では、完全に消毒された水の状態を清浄化ステージと定めて閾値を決定しており、この閾値により得られるレジオネラリスクの存否結果はレジオネラ属菌培養法と約 90%一致していた¹⁾。しかしながら、測定装置は重たく、携帯困難なことや、この検出方法がレジオネラ属菌に特異的でないことが課題としてあげられていた。

今回、この迅速検出法にレジオネラ属菌用特異染色試薬および携帯型フローサイトメーターを適用する機会を得たので報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌液の調製

1) 特異性実験に供した 23 株の概要を表 1 に示

した。即ち、*Legionella pneumophila* 血清群 1 を 3 株 (以上 A グループ)、*L. pneumophila* の血清群 3、血清群 4、血清群 5、血清群 6、血清群 9、および血清群 10 を各 1 株、並びに型別不能であった 2 株を用い (以上 B グループ)、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌 11 株 (C グループ)、レジオネラ属菌以外の細菌として *Escherichia coli* 1 株 (D グループ) を使用した。FCM の検出限界決定のための実験には、*L. pneumophila* 血清群 1 (表 1 No.1) を使用し、定量限界決定のための実験には上記特異性実験で反応性が認められた A グループ 3 株、B グループ 8 株および *Legionella dumoffii* を用いた。

2) *L. pneumophila* の各血清群および他のレジオネラ属菌は、 -80°C 保存株を BCYE α 培地に復元後、 30°C で 3 日間培養したものを供試した。*E. coli* は TSA 培地に復元後、 30°C で 24 時間培養したものを供試した。

3) 復元した各細菌は孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のステリカアップフィルターユニット (ミリポア) でろ過滅菌した PBS を用いて、マックファーランド濁度 $0.2\sim 0.5$ となるように懸濁した。懸濁液 $0.1\ \text{mL}$ をレジオネラ属菌は MWY 増菌培地 (*Legionella* LC Medium Base, タカラバイオ)、大腸菌は TSB 培地の各 $1.0\ \text{mL}$ に移植して 37°C 、18 時間培養したものを初期調製菌液とした。

2. RDM 用抗レジオネラ染色試薬の作製

1) 特異性が異なる 3 種類のレジオネラ属菌用ポリクローナル抗体を、Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を使って、取扱説明書のとおり処理した。ここで、バイロスタット社の抗レジオネラ・ニューモフィラ抗体 (V6051) を使用した蛍光色素は FL Ip SG1、アークリソース社の抗レジオネラ・ニューモフィラ抗体を使用した試薬は FL ARK_{Ip}、アークリソース社の抗レジオネラ属菌抗体を使用した試薬は FL ARK_{spp} と標記した (表 2)。これらの試薬は抗レジオネラ抗体として約 $2\ \text{mg/mL}$ の濃度となるように調製した。

3. 携帯型フローサイトメーターの RDM への適用

1) 使用したフローサイトメーター、miniPOC (シスメックスパルテック社) はもともと HIV/AIDS 患者の血液細胞モニタリング用に市販されているものである。その光学的特長は表 3 のとおりで励起/蛍光波長が $532\ \text{nm}/570\ \text{nm}$, $610\ \text{nm}$ の半導体レーザーを搭載し、標的細胞へのレーザー照射で得られる側方散乱光と蛍光強度をフォトマルチプライヤー (光電子増幅管) により探知して、内臓の解析装置で細胞数として数値化される。本装置で自動的に表記される細胞数 (cells/ μL) は人白血球用キットに最適化されているために、ここでは細菌用に換算した数値を粒子数として記載する。装置重量は $6.5\ \text{kg}$ で測定時間は約 5 分間である。

4. 特異性の証明

1) 初期調製菌液の 1000 倍希釈液を約 10^5 CFU/mL として RDM と平板培養法に供した。RDM 用菌液は終濃度 0.05% となるようにグルタルアルデヒド溶液を加えて菌を固定して測定まで冷蔵保存した。

2) 平板培養法で、培地はシステイン添加 BCYE 培地 (ピオメリュー) を使用し、塗抹後 35°C で $3\sim 7$ 日間培養し、システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。

3) RDM 計測に際しては各試料 $1\ \text{mL}$ を $5\ \text{mL}$ チューブ (イナオプティカ) に分取し、等量の $0.1\% \text{BSA}$ (MACS BSA Stock Solution を希釈して使用, ミルテニーバイオテク社) および $1.5\ \mu\text{L}$ の抗レジオネラ属菌用染色試薬を加えて常温で 30 分間、振とうしたものを miniPOC にセットして特定エリア内の粒子数を算出した。あらかじめ染色試薬用の測定最適条件と試薬由来ノイズを検出しないスキッタグラムの範囲を設定して、染色試薬用特定エリアとした (図 1)。

5. RDM の検出限界の決定

1) 非濃縮検体と濃縮検体を用いた添加回収実験を行った。最初に、市販の PBS 粉末 ($\text{pH}7.2$,

和光純薬工業)を用いて作製したPBSをステリカップフィルターユニットにてろ過滅菌した後、メスシリンダーを用いて正確に500 mLを滅菌済みポリ容器に分注した。最終濃度が0 CFU/mL(ブランク、菌液の代わりに生理食塩水を添加)、1 CFU/mL、10 CFU/mL、および100 CFU/mLとなるように*L. pneumophila* 血清群 1の初期調製菌液を分注した模擬サンプルを各6本作製した。非濃縮サンプル0.1 mLを2枚のBCYE培地に塗沫してレジオネラの菌数を測定した。菌数を正確に掌握するために低濃度サンプル(1 CFU/mLと10 CFU/mL)については、追加で0.5 mLを2枚のBCYE培地に塗沫した。濃度ごとに6回実験を行った結果を解析した。

2) 濃縮検体については、孔径0.2 μmポリカーボネートメンブレンフィルターを用いて100倍に濃縮したものの0.1 mLをBCYE培地2枚に塗沫して、35°Cで3~7日間培養した。高濃度サンプル(100 CFU/mLの100倍濃縮液)については適切に希釈してレジオネラ菌数を計測した。濃度ごとに6回実験を行った結果を解析した。

3) RDM計測に際しては各サンプルをグルタルアルデヒドで固定した上で、上記4.3)と同様に処理した。RDM値と培養法の値を比較して検出限界値を決定した。

6. RDMの定量限界の決定

1) 特異性を示した12株の初期調製菌液を使用した。それぞれ、約 10^5 CFU/mLとなるよう希釈したものを原液として、5段階の10倍希釈列を作製して、平板法とRDM法で比較した上で定量限界値を決定した。

C. 結果及び考察

1. 抗レジオネラ染色試薬の特異性

1) 約 10^5 CFU/mLに調製した23株の細菌からなる試験液を培養法とRDMで計測して染色試薬ごとの成績を比較したところ、Aグループの3株について、FL Ip SG1は培養法の菌数と同等の値を示したが、FL ARK_Ipの反応性は低かった(図

2)。一方で、Bグループの8株において、FL Ip SG1の反応性は低かったが、FL ARK_Ipの反応性は培養法とほぼ同等の値を示した。FL Ip SG1は、Aグループの*L. pneumophila* 血清型 1に高い反応性を示し、FL ARK_IpはBグループの*L. pneumophila* 血清群 3、血清群 4、血清群 5、血清群 6、血清群 9、血清群 10、及び2株の型別不能株に特異的であると考えられた(図2)。メーカーによると、FL Ip SG1に用いた抗体は血清群 1以外の*L. pneumophila*にも反応性があるとされているがRDMではほとんど反応が認められなかった。一方で、FL ARK_Ipは*L. pneumophila* 血清群 1への反応性は低かったものの、供試した血清群 1以外の*L. pneumophila*には全ての株で培養法を上回る値を示しており高い反応性を持つと考えられた。レジオネラ属菌に反応性を持つとされるFL ARK_sppはFL ARK_Ipと類似しており、Aグループとは反応せず、Bグループに対する値はやや低めであったが一定の回収が認められた。FL Ip SG1とFL ARK_IpのグループC及びDに対する反応は認められなかった。FL ARK_sppのCグループ及びDに対する反応性も低かったが、*L. dumoffii*に対しては一定の反応が認められた。今回の大腸菌に対する反応性のみで供試した抗レジオネラ染色試薬の特異性を証明できたわけではないが、Cグループとの反応挙動を見る限りではFL Ip SG1とFL ARK_Ipの一般細菌に対する選択性の強さを期待できる結果であった。

2. 本RDMの検出限界値と定量限界値

1) 標的とする*L. pneumophila* 血清群 1の濃度(設定値)が0 CFU/mL(ブランク)、1 CFU/mL、10 CFU/mL、および100 CFU/mLとなるように調製した模擬サンプルの培養法の成績(実測値)はそれぞれ 0 ± 0 CFU/mL、 0 ± 0 CFU/mL、 12 ± 4 CFU/mL、及び 25 ± 19 CFU/mLであった。RDMにより計測したところ、 421 ± 63 counts/mL、 556 ± 153 counts/mL、 667 ± 215 counts/mL、及び $1,556 \pm 509$ counts/mLを示した。これらを100

倍に濃縮した結果は、培養法が 0 ± 0 CFU/100mL、 32 ± 29 CFU/100mL、 562 ± 200 CFU/100mL、及び $3,470 \pm 1,248$ CFU/100mL であり、RDM は、 516 ± 70 counts/100mL、 $1,357 \pm 379$ counts/100mL、 $5,230 \pm 220$ counts/100mL、及び $36,698 \pm 2,089$ counts/100mL であった (図 3)。1 CFU/mL を 100 倍濃縮したサンプルの RDM の結果がブランクと比較した最小値であったことから、今回用いた蛍光試薬を RDM で測定した時の検出限界を約 1,300 counts/100 mL と決定した。この値の生菌数は 32 CFU/100 mL に相当していた。我が国の塩素消毒条件でのレジオネラ属菌検査の検出限界は 10 CFU/100 mL であるので、浴槽水の検査に適用するためには追加の濃縮が必要であることが示唆された。ここで、RDM 法は遊離塩素処理条件下で非濃縮の浴槽水中の細菌数を計測することによって、レジオネラ属菌に汚染された浴槽水から清浄な水を区別することができることを考慮すると^{1, 2)}、非濃縮水のスクリーニングとの組み合わせにより有効性を高めることができると考えられた。

2) 特異性実験で FL Ip SG1 又は FLARK_Ip に反応性のあった 11 株の *L. pneumophila*、及び FLARK_spp に反応した *L. dumoffii* のそれぞれ約 10^5 CFU/mL の模擬サンプルを 5 段階 10 倍希釈した試験液を作製して、平板法と RDM で測定した。全ての成績をまとめると、RDM は培養法との間に回帰式 $y = 409.26x^{0.8689}$ ($R^2 = 0.95113$) からなる相関関係を示した (図 4)。供試 11 菌株の定量性を示す最小値を平均した値は 37,562 counts/mL を示したことから、RDM の定量下限を約 4.00×10^4 counts/mL と決定した。この値は生菌数として 235 CFU/mL に相当していた。

E. 結論

抗レジオネラ染色試薬と携帯型フローサイトメーターを RDM に適用することにより、*L. pneumophila* と *L. dumoffii* を特異的に検出する

ことが可能となった。その検出限界は現行の基準値を満たさないので、更なる濃縮方法の検討と非濃縮水のスクリーニングとの組み合わせが必要である。しかし、これらの改善により、入浴施設等の現場において、特にレジオネラ・ニューモフィラのリスクを監視するために利用可能となりうる。

F. 参考文献

- 1) Taguri, T, Oda, Y, Sugiyama, K, Nishikawa, T, Endo, T, Izumiyama, S, Yamazaki, M, and Kura, F. A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of Legionella in bath water. *Journal of Microbiological Methods*, **86**, 25–32, 2011.
- 2) 田栗 利紹ら, フローサイトメトリー法における不連続点を越えた塩素消毒の清浄化判定, 厚生労働科学研究補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 23 年度分担研究報告書, 研究代表者: 倉文明, 53-58, 2011.

G. 学会発表

Taguri, T, Cai, G, Ebisu-Ojima, H, Amemura-Maekawa, J, and Kura F. Breakpoint Chlorination as Control of Legionella in Bath Water using flow cytometry, The 9th International Conference on Legionella. Rome, 26th – 30th September, 2017.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 供試菌株の概要

	菌種	菌株 ^a	血清群	由来等
1	<i>Legionella pneumophila</i>	NIIB0058	SG 1	臨床分離株
2	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki290402	SG 1	環境分離株
3	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki474	SG 1	環境分離株
4	<i>Legionella pneumophila</i>	NIIB0138	SG 3	臨床分離株
5	<i>Legionella pneumophila</i>	NIIB0233	SG 4	環境分離株
6	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki487	SG 5	環境分離株
7	<i>Legionella pneumophila</i>	unknown	SG 6	-
8	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki435	SG 9	環境分離株
9	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki452	SG 10	環境分離株
10	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki448	SG UT	環境分離株
11	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki478	SG UT	環境分離株
12	<i>Legionella santicrocuis</i>	JCM7557		標準株
13	<i>Legionella israelensis</i>	JCM7560		標準株
14	<i>Legionella parisiensis</i>	JCM7561		標準株
15	<i>Legionella spiritensis</i>	JCM7562		標準株
16	<i>Legionella hackeliae</i>	JCM7563		標準株
17	<i>Legionella erythra</i>	JCM7564		標準株
18	<i>Legionella rubrilucens</i>	JCM7565		標準株
19	<i>Legionella anisa</i>	JCM7573		標準株
20	<i>Legionella jamestowniensis</i>	JCM7590		標準株
21	<i>Legionella dumoffii</i>	NIIB0091		臨床分離株
22	<i>Legionella micdadei</i>	NIIB0095		臨床分離株
23	<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3972		標準株

^a NIIB, National Institute of Infectious Diseases, Department of Bacteriology I.; NBRC, NITE Biological Resource Center; JCM, Japan Collection of Microorganism

表 2. フローサイトメトリーによる坑レジオネラ属菌用染色試薬の特性

	略名	抗体の名称	蛍光色素	特異性
1	FL Ip SG1	Rabbit anti- <i>Legionella pneumophila</i> antibody ^a	Alexa fluor 532 ^c	<i>Legionella pneumophila</i>
2	FL ARK_Ip	Rabbit anti- <i>Legionella pneumophila</i> antibody ^b	Alexa fluor 532 ^c	<i>L. pneumophila</i>
3	FL ARK_spp	Rabbit anti- <i>Legionella</i> antibody ^b	Alexa fluor 532 ^c	<i>Legionella</i> species

供給元 a: バイロスタット社, b: アークリソース社, c: サーマサイエンティフィック日本支社

表 3. フローサイトメーターの光学的特長

名称	光源	波長 励起/蛍光	パラメータ	検出方式	測定時間	装置重量
miniPOC ^a	半導体レーザー	532 nm/570 nm, 610nm	側方散乱光 蛍光強度 ^b	PMT ^c PMT ^c	5 min.	6kg

^a供給元 シスメックス社. ^b蛍光強度検出器はハイパスフィルターを使用, ^cPMT: 光電子増倍管(フォトマル)

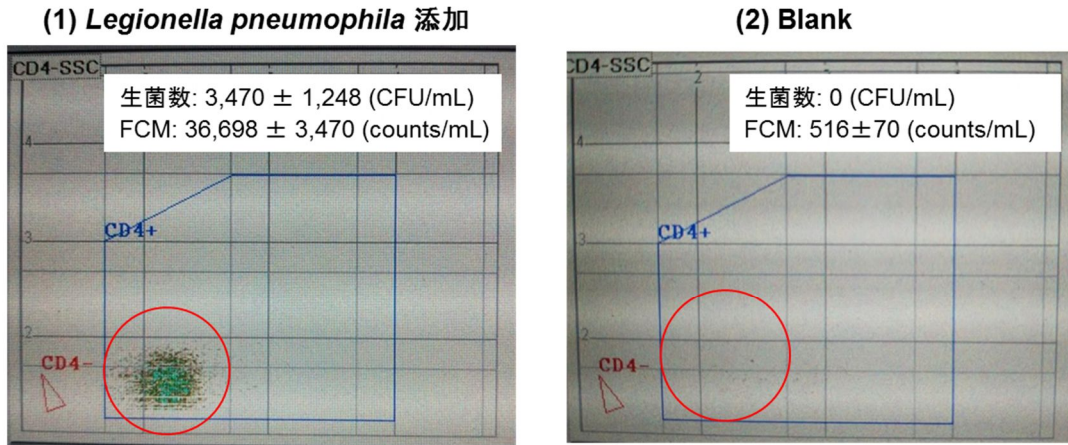


図 1. レジオネラ菌含有水 (1) と清浄水 (2) の比較

蛍光色素: FL Ip SG1, 菌株: *Legionella pneumophila* NIID0058
画面はフローサイトメーターの解析画面、青枠は計測エリア、(1)赤丸内はレジオネラ

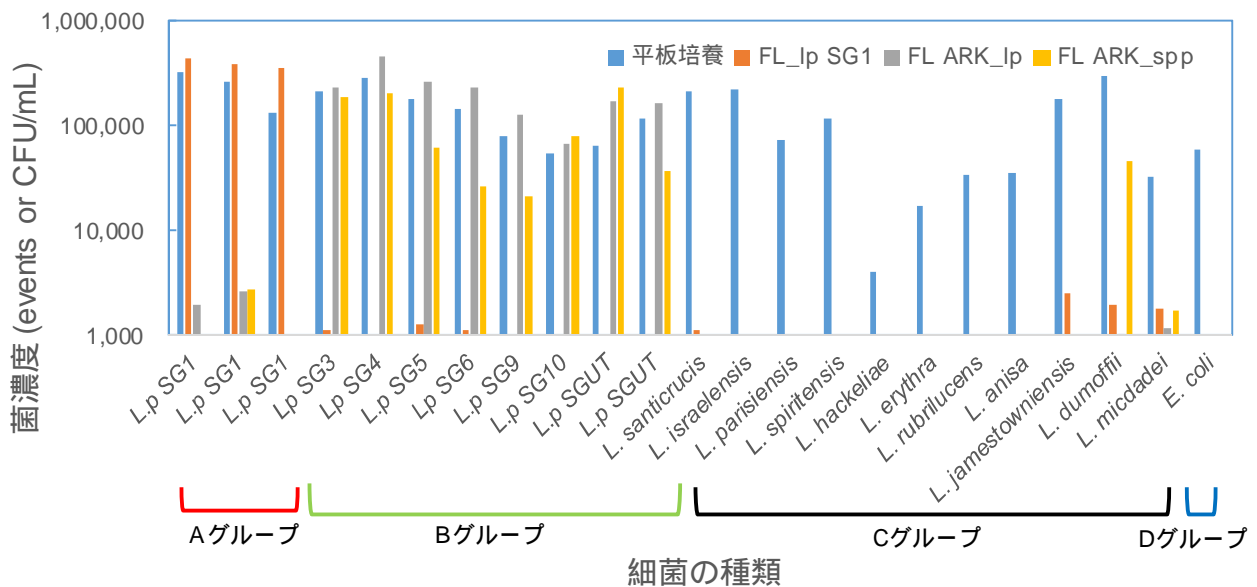


図 2. 培養法とフローサイトメトリー(蛍光試薬ごと)の供試細菌株
に対する定量性の比較

Aグループ: *Legionella pneumophila* 血清型1, Bグループ: *L. pneumophila* 血清型1以外, Cグループ: *Legionella* spp., Dグループ: レジオネラ以外の菌種.

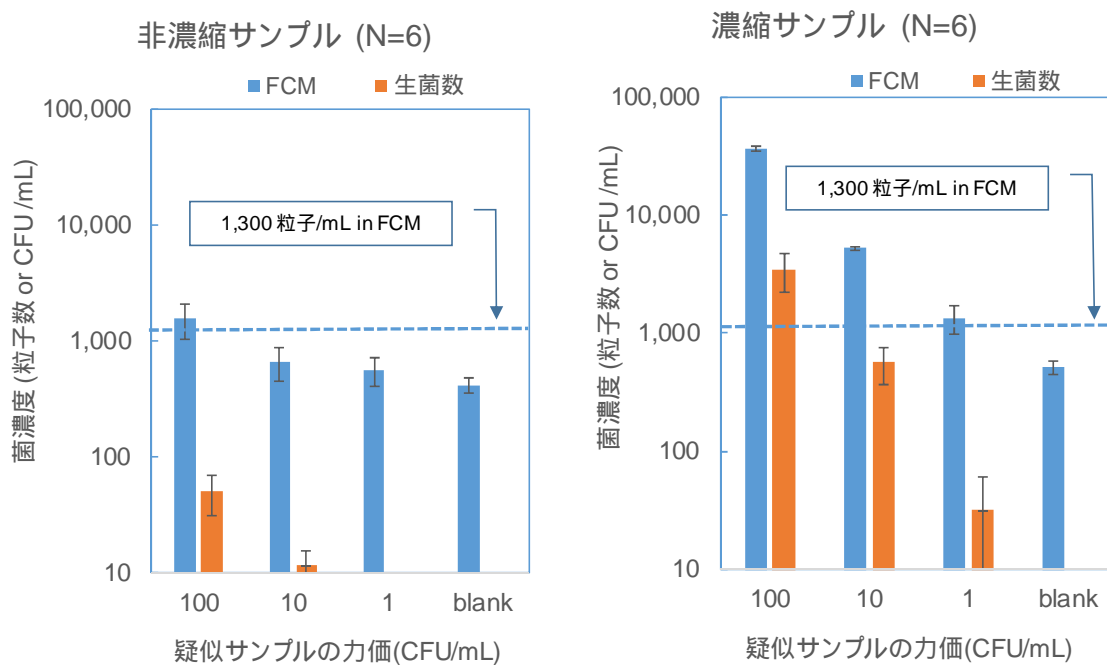


図3 . 濃縮処理試料によるFCMの検出限界（生菌数相当値）の決定

FCM:フローサイトメトリーによる細菌数, CFU:colony forming unit, 青色破線はFCMの検出限界値を示す.

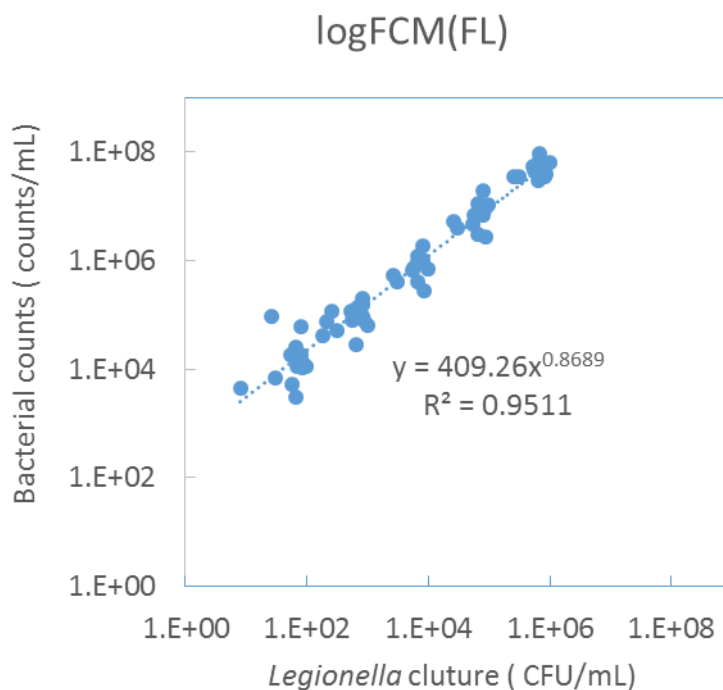


図4. 培養法と迅速検出法の相関