

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 30 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

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： 下田 貴宗 シモダアメニティ株式会社

研究協力者： 新道 欣也 株式会社 お風呂のシンダー

#### 研究要旨

レジオネラ症対策として開発してきたレジオネラリスクの現地迅速評価法（RDM）とレジオネラニューモフィラ（LP）の特異検出法とを組み合わせると当該菌の生死スクリーニングを伴うオンサイト定量解析法として改良し、その有効性を評価した。現地調査において浴槽水 76 試料を RDM 法と培養法で処理し、本方法の培養法に対するスクリーニングとしての有効性を検証したところ、RDM 法の培養法に対する感度は 93.3%、特異度は 95.1%を示した。供試試料の LP 数の定量性については、RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し（ $R^2 = 0.65$ ）、培養法の検出限界値（10 CFU/100mL）付近においてはやや高め値を示したものの定性的には妥当な成績を示した。RDM 法は、5 分間の消毒効果判定と約 1 時間の LP 定量評価により、遊離塩素消毒下の入浴施設において現場でのレジオネラリスク監視の有用なツールとして利用可能であるといえる。

#### A. 研究目的

レジオネラニューモフィラ（LP）はレジオネラ症の主要な起因菌種であり、我国では特に入浴施設において大きな社会的影響を及ぼしている。LP を含むレジオネラ属菌によるアウトブレイクが全国各地で発生して以降、浴槽水では塩素消毒による水質管理が普及してきたが、循環ろ過器式入浴施設に代表されるとおり、衛生管理に関わる諸問題のためにレジオネラ属菌汚染が再発を繰返して深刻な事態を引起している事例が少なくない。

我々は、これまでに浴槽水中レジオネラリスクの迅速評価法（RDM）を独自に開発してきた。最初に、ヒト HIV 診断用の携帯型フローサイトメーター（6.5 kg）を細菌測定に応用し、レジオネラ汚染が生じる浴槽水と清浄な浴槽水の細菌

数を比較解析して両者を区別する一定の閾値を見出すことにより、非濃縮水を用いたレジオネラリスクの現地評価方法を開発した<sup>1,2)</sup>。さらに濃縮水を用いて LP を特異染色することに成功し、現地における LP の定量法を作成した<sup>3)</sup>。

今回、作成した LP 定量法により現地調査を実施した結果を報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 現地調査

##### 1) 高濃度塩素処理前後浴槽水の調査（第 1 回）

RDM 法は、レジオネラ属菌検査法のスクリーニング法として位置づけられ、その有効性検証にあたり、培養検査の検出限界（10 CFU/100mL）程度の浴槽水を検査する必要がある。その成績を満たす浴槽水を予測して採水することは困難な

ので、比較的厳格な塩素消毒を行っている入浴施設において、塩化物泉および井水を利用している3種の循環ろ過式浴槽を繰り返し調査した。当該施設の1日あたり利用者数は700人～1000人で毎日営業しており、一週間毎に高濃度塩素洗浄処理(20 mg/L×1時間)を行っている。この処理前後の浴槽から5週にわたって合計30検体のサンプルを採水した。

## 2) オゾン処理前後の浴槽水の調査(第2回)

異なる3施設5循環ろ過式浴槽から採水した浴槽水に発泡式オゾン処理(ナノバブル発生装置およびオゾン発生装置はシモダアメニティ株式会社製)を施し、処理前後および1回濯ぎ後(1浴槽のみ濯ぎ2回実施)の合計16検体の浴槽水を供試した。これらの施設は社会福祉施設であり、1日あたり50～100名の利用者を有し、原水として水道水を利用して塩素消毒を行い、7日に1回換水している。

## 3) その他の入浴施設の調査(第3回)

研究協力者が検査を委託された入浴施設において30種類の循環ろ過式浴槽水を冷蔵郵送により長崎県環境保健研究センターに搬入し調査した。採水後の検体は冷蔵保存して遅くとも1週間以内に試験に供した。本調査における浴槽水は循環ろ過式で塩素消毒を行っていることを除いて施設ごとの衛生管理状況のデータはない。

## 2. RDM法による浴槽水の処理方法

### 1) 非濃縮浴槽水を用いた塩素消毒効果の判定

供試した浴槽水は表1のとおり処理した。フローサイトメーターはminiPOC(シスメックスパルテック社)を使用し、最初に供試浴槽水における塩素消毒の効果を判定した。即ち、検体1 mLを5 mLチューブ(イナオプティカ)に分取し、0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)を含む希釈液1 mLと混合し、0.1%の蛍光色素 propidium iodide (Wako chemicals) 10 μLを加えた後、miniPOCにセットして試験に供した。予め測定ノイズを除いた特定エリアを設定し、細菌細胞から得られる側方散乱光強度(SSC)と

蛍光強度(FL)を2つの指標としてエリア内の細胞を計数し、装置独自の補正値を掛け合わせて細菌数(Total Bacterial Counts)とした。この時、試料中の細菌数が後述の基準値1000 counts/mLを越した場合は「消毒効果なし」と判定して続くLP特異検査でLPが検出された場合は生菌と判断した。一方で、同値に満たない試料は「消毒効果有り」と判定し、LPが検出された場合でも死菌と判断した。

### 2) LPの特異的定量

昨年度の方法<sup>3)</sup>に準拠して、LP血清群1用染色試薬(FL lp SG1)とLP非血清群1染色試薬(FL non\_lp SG1)を作製した。これらの試薬は抗LP抗体として約2 mg/mLを含む。検水1 Lを携帯用ろ過器でろ過した後、フィルターを剪刀にて細かく破断しながら50 mLプラスチック遠心管に入れた。これに1 mL PBSを加え、1分間ホモジナイズして濃縮懸濁液とした。RDM計測に際して、各懸濁液を2本の5 mLサンプル管(イナオプティカ)に0.5 mLずつ分注し、等量の0.1% BSA(ミルテニーバイオテク社)入りPBSおよび0.75 μLのFL lp SG1 又はFL non-lp SG1を加えて常温で30分間染色したものをminiPOCにセットして計測した。特定エリア内の粒子数に装置独自の補正値を掛け合わせてRDM値を算出し、その測定値を作成した検量線<sup>3)</sup>により濃度換算してLP数とした。

### 3) 平板培養法によるレジオネラ属菌数の測定

レジオネラ属菌検査は当研究班の標準試験法に準拠した。即ち、培地はGVPC培地(ピオメリュー)を使用し、100倍ろ過濃縮した検水を塗沫後35°Cで3～7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。検出したレジオネラ属菌は定法により血清型別試験を行った。

## C. 結果及び考察

### 1. 現地調査の結果

1) 表2に施設調査結果の概要を示した。RDM

法は前述のとおり最初に非濃縮検体を用いて消毒効果を判定し、検体を濃縮した後に LP 数を判定する 2 段階判定を行い、消毒効果を基に LP の生死を判別する。第 1 回目の調査で得られた培養陽性サンプルの最低 TBC 値 (1260 counts/mL) に基づき、1000 counts/mL を消毒効果の暫定的な判定閾値として設定した (図 1)。この調査で RDM 法により LP SG1 が 21 回検出され (カットオフ: < 10 cells/100 mL)、その平均値は 10 ~ 146 cells/100 mL であった。このうち 5 回の細菌数は基準値以上を示したが、16 回は消毒効果が認められたために死菌と判定され、培養法も全て不検出であった (図 1)。LP 生菌と判定された 5 回のうち 3 回は、培養検査で 10 CFU/100 mL の LP SG1 が検出され、残る 2 回の細菌数は全て基準値以上を示したために、生菌と判定されたが、培養検査では不検出であった (表 2)。

このように本調査における 30 検体中 2 検体は偽陽性であったが、他の培養陽性検体のコロニー数が検出限界ぎりぎりの検体であったことから確率的な問題と思われる。少なくとも RDM 法において、培養検査で 10 CFU/100 mL を示した 3 浴槽水は全て生 LP 菌として定量できたために、感度のよい検査といえる。

2) 第 2 回目の調査においては、培養検査でレジオネラ属菌を認めたのは 1 検体のみで、その菌数は 10 CFU/100 mL で LP SG5 と同定された。この時の RDM 値は非 SG1 の生 LP 菌として 112 細胞/100 mL を示した。他に RDM により 7 回 LP 非 SG1 が検出されたが、これらの塩素消毒は有効であったために全て死菌と判定され、培養法においても LP は不検出であった (表 2, 図 1)。

3) 第 3 回目の調査においては、培養検査では 30 検体中 11 検体がレジオネラ属菌陽性を示し、その菌数は 10 ~ 23,000 CFU/100 mL であった。菌種は全て LP で、血清群は SG3、SG5、SG6、および SG untypable であった。このときの RDM 値は生きた非 SG1 の LP として 15 ~ 34,310 cells/100 mL と計測された。また、同時に RDM

により LP SG1 が 2 回検出されたが (図 1: 65 回と 66 回)、そのときの培養検査では SG1 は検出されず、SG5 が多数検出されていた (ともに 10,000 CFU/100 mL 以上) ために FL Ip SG1 の交差反応とも考えられるが、培養検査で分離できなかった可能性も否定できない。RDM により LP 非 SG1 が検出された 51 回、59 回、73 回および 74 回の 4 検体 (図 1) は消毒効果が認められ全て死菌と判定されたが、培養検査でも LP は検出されておらず判定を支持する結果であった (表 2, 図 1)。RDM により死菌と判定されたが培養法でレジオネラが検出された 69 回 (図 1) については次項で考察する。第 3 回目の調査施設における衛生管理状態が不明なために比較することは困難であるが、今回の LP 死菌の検出率が他 2 回と比べて明らかに少なかったことは興味深い (表 2)。

## 2. RDM 法のスクリーニング法としての妥当性

今回供試した 76 検体について、レジオネラ属菌の平板培養法に対する RDM 法のスクリーニングとしての妥当性を評価したところ (表 3)、その感度は 93.3%、特異度は 95.1% であった。培養法で陽性であった 15 例のうち 14 例は陽性と正しく判定され、1 例 (図 1, 69 回) は偽陰性を示した。これは細菌数が 127 counts/mL と基準値より明らかに低くて消毒効果ありと判定されたにもかかわらずレジオネラが検出された例である。この時の RDM 法は非 SG1 の LP として 79 細胞/100 mL を示していたが、培養法が 10 CFU/100 mL で検出限界ぎりぎりであったことから確率的な問題と思われる。平板培養法で陰性であった 61 例のうち 58 例は陰性と正しく判定された。偽陽性であった 3 例の RDM による LP 数は非 SG1 として 54 ~ 246 cells/100mL であり死菌を検出した可能性もあるが、TBC が  $10^3 \sim 10^4$  counts/mL と高値を示したことを考慮すると培養法に原因があった可能性が示唆された。なお、これらの他に TBC が基準値を超えた 2 例が認められていたが、培養法でレジオネラが不検出であ

り、RDM による LP 数は SG1 も非 SG1 も不検出 (< 10 cells /100 mL) であったため陰性と評価した。

### 3. RDM 法測定値の定量性

図 2 に培養法で検出されたレジオネラ属菌数と RDM 法による LP 数の相関を示した。全体的に RDM 法が培養法よりも高い値を示す傾向にあったものの、RDM 法は培養法と菌数において比較的高い相関を示した ( $R^2 = 0.65$ )。RDM 値による LP 数がレジオネラ属菌数よりも高い値を示す傾向が認められたが、その理由のひとつに、RDM 法が死菌を含む菌数であったことが考えられた。

### E. 結論

LP 特異試薬を用いた RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し ( $R^2 = 0.65$ )、培養法の検出限界値 (10 CFU/100mL) 付近においても定性的に妥当な成績を示すことが施設調査において確認された。即ち、RDM 法は、遊離塩素消毒下において、レジオネラ属菌の生死スクリーニングに応用することができるとともに、SG1 型別判定を含めた LP の現場での定量ができるために、入浴施設現場におけるレジオネラリスク監視の有用なツールとして利用可能であるといえる。

### 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.

- 3) 田栗 利紹ら, 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, 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, 研究代表者: 前川純子, 87-93, 2018.

### G. 学会発表

Taguri, T, Cai, G, Ebisu-Ojima, H, Kura, F and Amemura-Maekawa, J, On-site inspection method for *Legionella pneumophila* in bath water, The 5th meeting for ESGLI, Lyon, France, August 30th, 2018.

### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1 RDM法の作業工程

工程	ステップ	対象物	操作方法	目的	操作時間(分)
1	細菌計数	非濃縮水試料	等量の希釈液とサンプルとを混合して核酸染色液を加えてシリンジに吸引後、装置にセットして計測	消毒効果判定	5
2	濃縮	非濃縮水試料	携帯型ろ過器を用いて1000 mLを1 mLに濃縮	水試料の1000倍濃縮	~30
3	菌の懸濁	濃縮試料	フィルターを剪刀で破砕して混釈	フィルターからの菌分離と混釈	2
4	染色	濃縮試料	懸濁液を2本の5mLサンプル管に0.5 mLずつ分注して、等量のBSA入りPBSを加えて、FL lp SG1 又はFL non-lp SG1により染色	特異染色	30
5	レジオネラ計数	濃縮試料	シリンジに吸引後、装置にセットして計測	レジオネラ菌計数	5

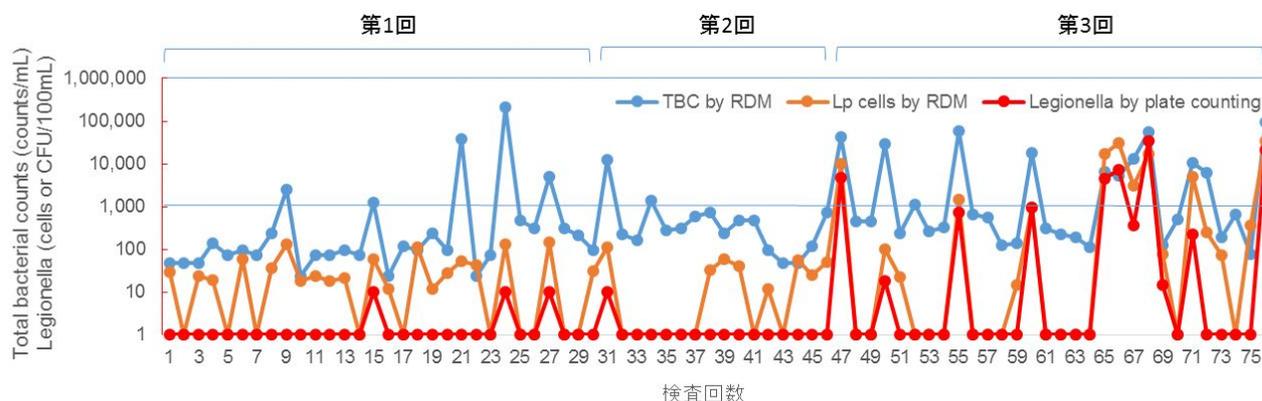


図1. 施設調査におけるRDM法閾値と測定値ならびにレジオネラ生菌数の比較

※青線はRDM法における閾値(TBCとして1000 counts/mL)を表す。LP cellsのカットオフ値は10 cells/100mL。

表2 施設調査結果の概要

調査	検体数/ 浴槽数	培養法				RDM法				
		SG1陽性 検体数	非SG1陽 性検体数	陰性検体数 ( $<10$ CFU/100mL)	定量値の範囲 (CFU/100mL) (検出された血清群)	SG1陽性 検体数 (生菌)	非SG1陽 性検体数 (生菌)	陰性検体数 ( $<10$ cells/100mL)	定量値の範囲 (cells/100mL)	
									FL lp SG1	FL non-lp SG1
第1回	30/3	3	0	27	10 (SG1)	21 (5)	0	9	10 ~ 146	-
第2回	16/5	0	1	15	10 (SG5)	0	8 (1)	8	-	10 ~ 112
第3回	30/30	0	11	19	10 ~ 23,000 (SG3, SG5, SG6, SGUT)	2	16 (12)	14	380 ~ 570	15 ~ 34,310

表3 レジオネラ属菌培養法とRDM法との定性結果の比較 (n =76)

		平板培養法(CFU/100ml)		
		10	< 10	
Rapid Detection Method (cells/100mL)	10	14	3	17
	< 10	1	58	59
		15	61	76
感度	93.3%	特異度	95.1%	

うち3検体はSG1,   うち27検体はLP死菌と判定

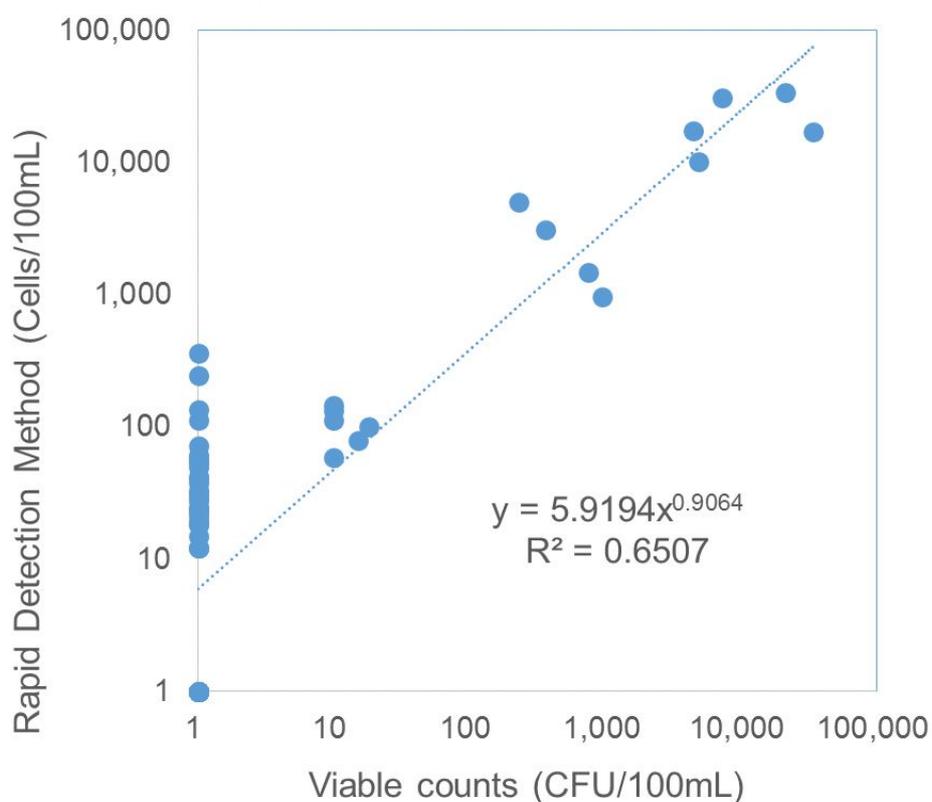


図2. 培養法とRDM法のレジオネラ菌数の相関

※RDMは10 cells/100mL未満を不検出. 両方法ともに不検出は1 cells or CFU/100 mLで表示した.