

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  
研究代表者： 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

### 総合研究報告書

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： 小嶋 裕子 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

現場検査への実用化を目指して、迅速検出法(RDM)に携帯型フローサイトメーターとレジオネラ属菌用特異染色試薬を適用して改良型(I-RDM)とし、そのレジオネラリスク評価方法としての有効性を調査した。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。I-RDM はレジオネラ・ニューモフィラ(LP) SG1 を用いた添加回収実験において、約  $10^2 \sim 10^5$  CFU/mL の範囲で培養法と高い相関 ( $y = 8.1799x^{0.8732}$ ,  $R^2 = 0.9544$ ) を示し、LP SG1 のほかに SG3、SG4、SG5、SG6、SG9、SG10 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 1,300 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。現地調査において浴槽水 76 試料を I-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、その感度は 93.3%、特異度は 95.1% を示した。浴槽水を用いた LP の定量性については、I-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い値を示したものの定性的には妥当な成績を示した。I-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

*Legionella pneumophila* (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) <sup>1)</sup> 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<sup>1)</sup>。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、ヒト HIV 診断用の携帯型フローサイトメーター (6.5 kg) を細菌測定による消毒効果判定に応用するとともに、濃縮水を用いて LP を特異的に定量する改良型 RDM 法 (improved-RDM, I-RDM) を作成し、その有効性を証明したので報告する。

## 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、LP SG1 を 3 株 (以上 A グループ)、LP の SG3、SG4、SG5、SG6、SG9、および SG10 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)、LP 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、LP SG1 (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) LP 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 $\alpha$  培地に接種後、30°C で 3 日間培養したものを供試した。*E. coli* は TSA 培地に接種後、30°C で 24 時間培養したものを供試した。

3) 培養した各細菌は孔径 0.2  $\mu$ m のステリカカ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 ~ 0.5 となるように懸濁した。懸濁液 0.1 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 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. 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 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 I-RDM 法への適用

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 nm/570 nm, 610 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、内蔵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/ $\mu$ L) 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 kg で測定時間は約 5 分間である。

### 4. レジオネラ染色試薬の特異性の証明

1) 初期調製菌液の 1000 倍希釈液を約  $10^5$  CFU/mL として I-RDM と平板培養法に供した。I-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 (ピオメリユー) を使用し、塗抹後 35°C で 3~7 日間培養し、計数した。

3) I-RDM 計測に際しては各試料 1 mL を 5 mL

チューブ（イナオプティカ）に分取し、等量の 0.1%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  $\mu$ 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ャ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。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せて細菌数（Total Bacterial Counts）とした。

#### 5. I-RDM の LP 染色における検出限界の決定

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（pH7.2, 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）、最終濃度 1 CFU/mL、10 CFU/mL、および 100 CFU/mL となるように LP SG1 の初期調製菌液を添加した模擬サンプルを各 6 本作製した。同サンプル 0.1 mL を 2 枚の BCYE 培地に塗抹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 培地に塗抹した。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  $\mu$ m ポリカーボネートメンブレンフィルターを用いて模擬サンプルを 100 倍に濃縮したものの 0.1 mL を BCYE 培地 2 枚に塗抹して、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) I-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。I-RDM 値と培養法の値を比較して検出限界値を決定した。

6. I-RDM のレジオネラ染色における定量限界の決定

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 I-RDM 法で比較した上で定量限界値を決定した。

#### 7. 現地調査

##### 1) 高濃度塩素処理前後浴槽水の調査（第 1 回）

I-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）程度の浴槽水を検出する必要がある。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  $\times$  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。

#### 8. I-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4のとおり処理した。最初にminiPOCを用いて浴槽水中の塩素消毒効果を判定した。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  $\mu$ L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

施設調査におけるLP定量は、前述の方法(B.2.1)に準拠して、LP SG1用染色試薬(FL Ip SG1)とLP非SG1染色試薬(FL ARK<sub>Ip</sub>)を調製して実施した。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  $\mu$ LのFL Ip SG1又はFL ARK<sub>Ip</sub>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、その測定値を前述のB.6で作成した検量線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(ビオメリュー)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. 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I-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<sub>Ip</sub>の反応性は低かった(図1)。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<sub>Ip</sub>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LP SG1に高い反応性を示し、FL ARK<sub>Ip</sub>はBグループのLP SG3、SG4、SG5、SG6、SG9、SG10、及び2株の型別不能株に特異的であると考えられた(図1)。メーカーによると、FL Ip SG1に用いた抗体はSG1以外のLPにも反応性があるとされているがI-RDMではほとんど反応が認められなかった。一方で、FL ARK<sub>Ip</sub>はLP SG1への反応性は低かったものの、供試した非SG1のLP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<sub>spp</sub>はFL ARK<sub>Ip</sub>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<sub>Ip</sub>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<sub>spp</sub>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. I-RDM のレジオネラ染色における検出限界値と定量限界値

1) 標的とする LP SG1 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  $0 \pm 0$  CFU/mL、 $0 \pm 0$  CFU/mL、 $12 \pm 4$  CFU/mL、及び  $25 \pm 19$  CFU/mL であった。I-RDM により計測したところ、 $421 \pm 63$  counts/mL、 $556 \pm 153$  counts/mL、 $667 \pm 215$  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  $0 \pm 0$  CFU/100mL、 $32 \pm 29$  CFU/100mL、 $562 \pm 200$  CFU/100mL、及び  $3,470 \pm 1,248$  CFU/100mL であり、I-RDM は、 $516 \pm 70$  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 2)。1 CFU/mL を 100 倍濃縮したサンプルの I-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 I-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。

2) 特異性実験で FL Ip SG1 又は FL ARK Ip に反応性があった 11 株の *L. pneumophila*、及び FL ARK 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 I-RDM で測定した。全ての成績をまとめると、I-RDM は培養法

との間に回帰式  $y = 8.1799x^{0.8732}$  ( $R^2 = 0.9544$ ) からなる相関関係を示した (図 3)。供試 11 菌株の定量性を示す最小値を平均した値は 1,261 counts/mL を示したことから、I-RDM の定量下限を約 1,300 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。

### 3. 現地調査の結果

1) 表 5 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 4)。この調査で I-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し、培養法も全て不検出であった (図 4)。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 (表 5)。この時、本方法の性質から全ての値が生 LP 数を示すのではなく、死菌を含む菌数を示すと考えられた。

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 5、図 4）。

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 I-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。I-RDM により 2 回 LP SG1 が検出されたが（図 4: 65 回と 66 回）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。I-RDM により LP 非 SG1 が検出された 51 回、59 回、73 回および 74 回の検体（図 4）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。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 4）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 5）。

## 2. I-RDM の培養法スクリーニングとしての妥当性

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 I-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 1 例（図 4、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 I-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 5 例のうち 3 例の I-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. 施設調査における I-RDM 法測定値の定量性

図 5 に培養法で検出されたレジオネラ属菌数と I-RDM 法による LP 数の相関を示した。全体的に I-RDM 法が培養法よりも高い値を示す傾向にあったものの、I-RDM 法は培養法と菌数において比較的高い相関を示した（ $R^2 = 0.65$ ）。I-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、I-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

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、主に *L. pneumophila* を特異的に検出することが可能となった。浴槽水からの LP 定量については、I-RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し（ $R^2 = 0.65$ ）その検出限界値（10 CFU/100mL）を含めてレジオネラスクリーニング法としての高い感度（93.3%）と特異度（95.1%）を示した。即ち、遊離塩素消毒下の現場において、浴槽水の消毒効果判定と SG1 型別判定を含めた LP 定量が可能であるために、I-RDM 法は入浴施設におけるレジオネラリスクの監視ツールとして有用であるといえる。

## 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

- 1) 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 9<sup>th</sup> International Conference on *Legionella*. Rome, 26<sup>th</sup> – 30<sup>th</sup> September, 2017.
- 2) Taguri, T, Cai, G, Ebisu-Ojima, H, Kura, F and Amemura-Maekawa, J, On-site inspection method for *Legionella pneumophila* in bath water, The 5<sup>th</sup> meeting for ESGLI, Lyon, France, August 30<sup>th</sup>, 2018.

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 <sup>a</sup>	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 santicrucis</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

<sup>a</sup> 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 <sup>a</sup>	Alexa fluor 532 <sup>c</sup>	<i>Legionella pneumophila</i>
2 FL ARK_Ip	Rabbit anti- <i>Legionella pneumophila</i> antibody <sup>b</sup>	Alexa fluor 532 <sup>c</sup>	<i>L. pneumophila</i>
3 FL ARK_spp	Rabbit anti- <i>Legionella</i> antibody <sup>b</sup>	Alexa fluor 532 <sup>c</sup>	<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 <sup>a</sup>	半導体レーザー	532 nm/570 nm, 610nm	側方散乱光 蛍光強度 <sup>b</sup>	PMT <sup>c</sup> PMT <sup>c</sup>	5 min.	6kg

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



表4. I-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 ARK_lp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

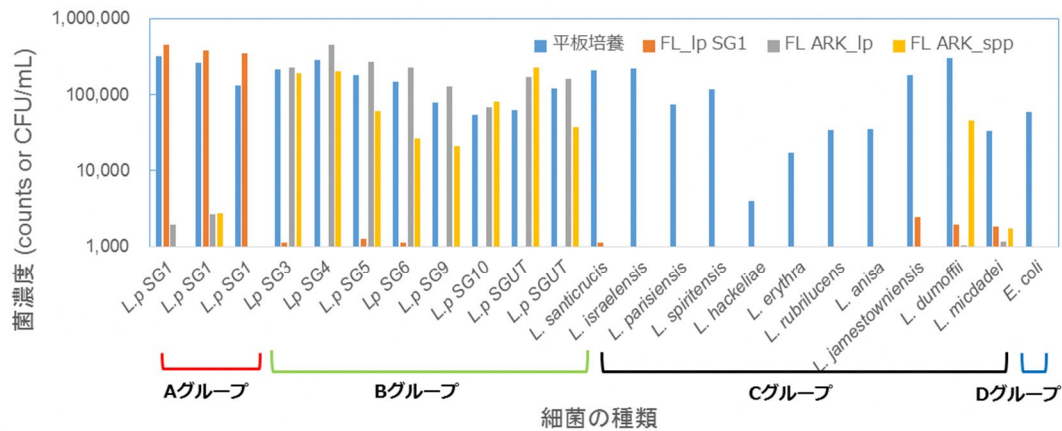


図1. 培養法とフローサイトメトリーの供試細菌株に対する定量性の比較

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.

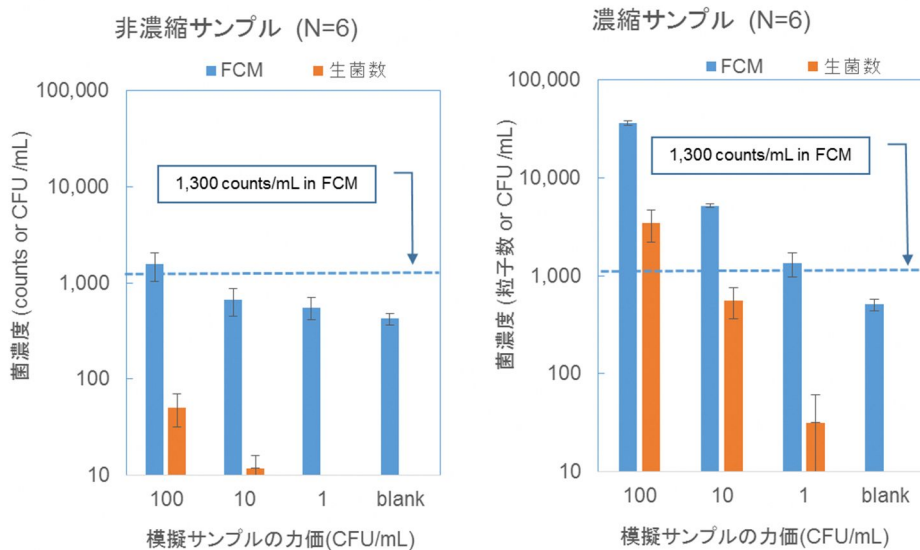


図2. 濃縮処理試料によるFCMの検出限界 (生菌数相当値) の決定

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.

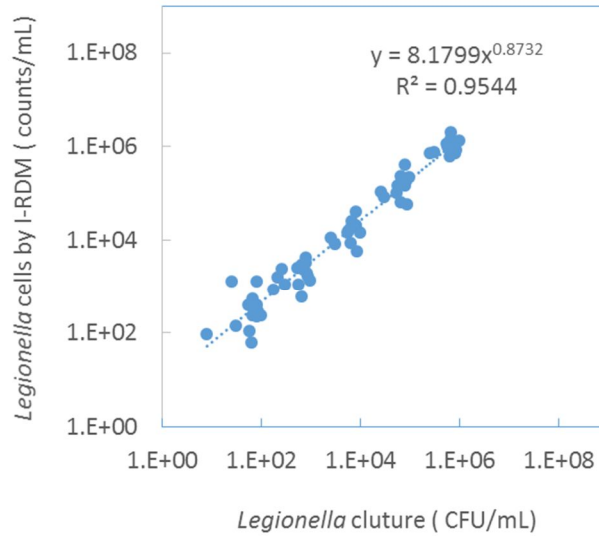


図3. 培養法と迅速検出法の相関

表5 施設調査結果の概要

調査	検体数/ 浴槽数	培養法				I-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 ARK_lp
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

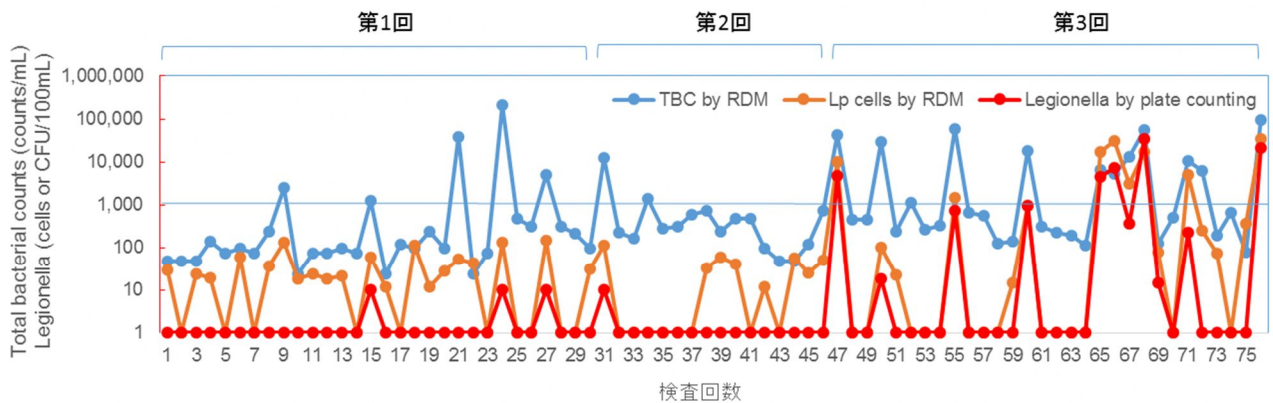


図4. 施設調査におけるI-RDM法閾値と測定値ならびにレジオネラ生菌数の比較

※ 青線はI-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6 レジオネラ属菌培養法とI-RDM法との定性結果の比較 (n =76)

	平板培養法(CFU/100ml)			
		10	< 10	
Improved 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				

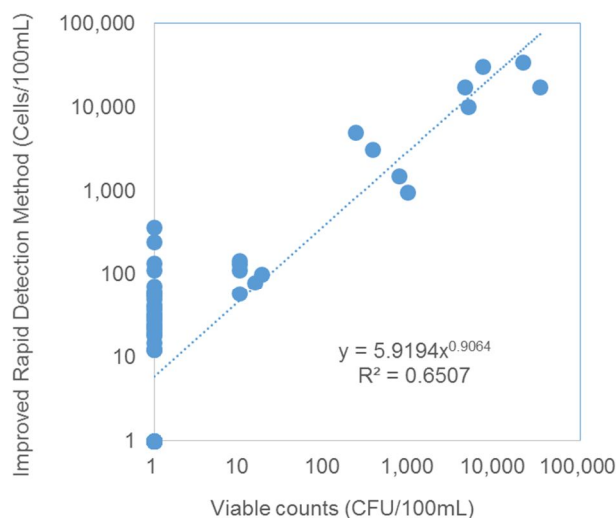


図5. 培養法とI-RDM法のレジオネラ菌数の相関

※ I-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。