

大分県における浴用水中のレジオネラ属菌の検出状況 (2010-2012)

緒方 喜久代、佐々木 麻里、成松 浩志

Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Oita Prefecture, 2010-2012

Ogata Kikuyo, Sasaki Mari, Narimatsu Hiroshi

Key words : レジオネラ属菌 *Legionella* sp. 浴用水 Public Bath Water, LAMP 法

要 旨

2010年度～2012年度の3年間、県下（大分市保健所管内を除く）の公衆浴場浴用水等161検体を対象に、レジオネラ属菌による生息状況等について調査した。調査した161検体のうち87検体（54%）からレジオネラ属菌が検出され、浴槽の種類別では、掛け流し浴槽水68検体のうち44検体（65%）から、循環式浴槽水19検体のうち11検体（58%）からレジオネラ属菌が検出された。分離されたレジオネラ属菌の血清群は、*L.pneumophila* SG1、SG3、SG5、SG6、SG型別不能などであった。

はじめに

宮崎県の集団感染事例^{1,2)}を契機に、2003年4月1日、大分県公衆浴場法施行条例及旅館業法施行条例を改正し、レジオネラ属菌の自費による検査（以下、自主検査）を含む、入浴施設管理者の自主衛生管理の強化を図ってきた。県は、入浴施設管理者の自主管理体制の効果を高め、衛生管理のより一層の徹底を図るため、行政検査（県保健所が採水し、搬入）を実施し、入浴施設の安全確保に努めてきた。

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、行政検査として搬入された様々な泉質を有する温泉水等の検体を対象に、正確・簡便・迅速な培養結果を得る方法としての斜光法³⁾を導入し、培養法の迅速かつ効率化を図った。また、搬入から短時間で結果が得られる手法として汎用されている遺伝子増幅を利用したLAMP法についても検討した。加えて、公衆浴場等において簡便な施設管理

を行う手段⁴⁾としてのATP測定の有用性についても検討したので、併せて報告する。

材料及び方法

1. 材料

原則、公衆浴場業又は旅館業の許可を受けている営業施設内にある入浴施設とし、平成2010年5月から2012年11月の間、県保健所環境監視員が採水し、搬入した浴槽水および湯口水161検体を調査対象とした。内訳は、2010年度が58検体、2011年度が56検体、2012年度が47検体であった。採水には高圧滅菌処理をしたポリプロピレン製ボトル（2L容器）を用い、約2000mlを採取した。また、採取時に残留塩素が認められた検体についてはチオ硫酸ナトリウムによる処理を直ちに施し、採水当日あるいは翌日に当所へ搬入され、検査に供するまでは冷蔵保存とした。なお、レジオネラ属菌が基準値以上検出された場合、レジオネラ属菌汚染源の推定に役立つため湯口水を浴槽水と同時に採水し、検査に供した。

2. レジオネラ属菌の検出

検査法は新版レジオネラ症防止指針⁵⁾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、φ0.2μm、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入りの滅菌コンカルビーカー (100ml容量)に移し、ボルテックスミキサーにて5分間攪拌してフィルター捕捉物を再懸濁させた。ろ過濃縮後、濃縮検体 (未加熱と表記)と50℃ 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 (図1)。一部浴槽水については、雑菌処理として酸処理を行った。

一部浴槽水について、従属栄養細菌数とATP測定を実施した。

3. 分離培養法

レジオネラ属菌の分離培地としてWYO *a* 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 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。

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 *a* 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10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。分離培地上にレジオネラ属菌の発育を認めない場合、レジオネラ属菌数は10cfu/100ml未満とし、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。

L-システインの要求性からレジオネラ属菌が疑われたにもかかわらず、*mip* および5S rRNAを標的としたPCR法で既知の生成物が得られなかった分離株あるいはスライド凝集に反応しなかった分離株については、

F: 5'-GTAAAGCACTTTCAGTGGGGAG-3', R: 5'-GGTCAACTTATCGCGTTTGCT-3'あるいは、ユニバーサルプライマー

(MicroSeq-F:5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', MicroSeq-500R: 5'-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3')を用いた16Sシーケンス解析により詳細な同定を行った。

4. 従属栄養細菌数とATP測定

従属栄養細菌数は、R2A寒天培地 (関東化学)を用い、混釈寒天培養法にて、42℃、7日間培養し、菌数測定を行った。

ATPは、ルシパックワイド (キッコーマンバイオケミファ)を用いて測定した。測定対象は、濃縮検体とした。

5. 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。

加えて、培養 (+) LAMP (-)の濃縮検体について、阻害回避試薬を用いた検討およびDNA抽出法の検討を行った。

結 果

1. レジオネラ属菌の検出状況

培養結果の概要を表1に示した。161検体中87検体 (54%)からレジオネラ属菌が検出された。うち、基準値違反は78検体 (48%)であった。内訳は「掛け流し施設」では浴槽水68検体中44検体 (65%)、湯口水56検体中24検体 (43%)で、「循環式施設」では浴槽水19検体中11検体 (58%)、湯口水18検体中8検体 (44%)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23施設であった。浴槽水 (+) 湯口水 (-) となった施設は22施設、浴槽水 (-) 湯口水 (+) となった施設は9施設であった (表2)。同一施設の浴槽水と湯口水から検出されたレジオネラ属菌の血清群は、おおむね一致していた。

レジオネラ属菌が検出された87検体について分離培地の検出感度を比較した結果を表3に示した。濃縮未加熱検体では、使用した3種類の分離培地全てから分離されたものが44検体、WYO *a* + GVPCからの分離が4検体、WYO *a* + MWYからの分離が3検体、GVPC + MWYからの分離が4検体、WYO *a*のみからの分離が10検体、GVPCのみからの分離が4検体、MWYのみから分離が5

検体であった。濃縮加熱検体では、3種類の分離培地全てから分離されたものが48検体、WYO *a* + GVPC からの分離が6検体、WYO *a* + MWY からの分離が6検体、GVPC + MWY からの分離が2検体、WYO *a* のみからの分離が4検体、GVPC のみからの分離が4検体、MWY のみから分離が9検体であった。

斜光法は培養3日目を判定日とし、特徴あるモザイク状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87検体のうち82検体は斜光法で確認することができたが、5検体は継続培養後にレジオネラ属菌が確認された(表4)。継続培養で陽性となった5検体から分離されたレジオネラ属菌は、4検体は *L. pneumophila*、1検体は *L. anisa* であった。

分離菌株の血清群の結果を図2に示した。SG3、SG6、SG1、SG5の順に多く型別された。分離菌株の5分の4は型別されたが、5分の1(22%)は型別不能であった。

L-システインの要求性からレジオネラ属菌が疑われたにもかかわらず、同定ができなかった分離株について16S rRNAあるいはユニバーサルプライマーを用い、シーケンスによる同定を試みた。その結果、5S rRNAプライマーに反応し、スライド凝集に反応しなかった分離株は *L. anisa* と同定された。5S rRNAプライマーに反応せず、16S rRNAプライマーに反応した分離株は *L. taurinensis*、*L. longbeachae*、*L. oakridgenensis* と同定され、16S rRNAプライマーに反応しなかった分離株はユニバーサルプライマーを用いたPCRで *Mycobacterium sp.*、*Roseomonas*、*Pedobacter saltans*、*Soil bacterium* と同定された。

2. 従属栄養細菌数とATP測定

従属栄養細菌数とATP測定値をlog対数で比較した(図3)。併せて、レジオネラ属菌数とATP測定値もlog対数で比較した(図4)。従属栄養細菌数とATP値においては相関が認められたが、レジオネラ属菌数とATP値には相関は認められなかった。また、100倍濃縮液のATP値が50RLU未満では、レジオネラの検出率は20%(1/5)であったが、ATP値がそれ以上では77%(23/30)に上昇した。

3. LAMP法と培養法の比較

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(表5)。培養(+)LAMP法(-)の濃縮検体について、阻害回避処理試薬を用い、再度測定を行ったが、得られた結果は同じであった。

2011年に、レジオネラ属菌数が2000cfu/100ml検出されたにもかかわらず、LAMP法(-)となったサンプルBについて、DNA抽出法の検討を行った。カラム抽出法では、3回繰り返し測定の結果、一回もLAMP法陽性の結果は得られなかった。また、3回連続測定で陽性結果が得られたものの安定した結果とはならなかった添付試薬による抽出とキレックス抽出については、さらに3回繰り返し測定を行った。しかし、添付試薬による抽出は、3回とも陰性結果となり、比較的安定した結果が得られたのは、キレックス抽出法であった(表6)。なお、レジオネラ属菌16S rRNAを用いたPCR法により、いずれの抽出方法においても、DNAが抽出されていることを確認した。

考 察

本調査の結果、レジオネラ属菌の検出率(基準値違反)は48.4%で他の調査結果^{6,9)}と同様の結果となった。

レジオネラ属菌が検出された87検体について、使用した分離培地のWYO *a*、GVPC、MWY各培地別に分離状況をみると、各分離培地でのレジオネラ属菌の分離は56検体から65検体となり、いずれの分離培地においても、単独使用では87検体陽性という結果は得られない。レジオネラ属菌を感度よく分離するためには、レジオネラ属菌の発育特性に配慮し、選択性の異なる培地を併用することが望ましい。また、未加熱の濃縮検体では74検体から、加熱処理では79検体からレジオネラ属菌が分離されたが、この場合においても、単独処理で87検体陽性という結果は得られないことから、未処理、熱処理、酸処理などの処理工程を併用することにより、効率よくレジオネラ属菌が検出されたと考えられる。さらに、レジオネラ属菌の検査をするうえで、菌数を予測できないため、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査することが望ましいとの報告¹⁾があることから、濃縮検体と非濃縮検体から同時にレジオネラ属菌の検出を試みた結果、濃縮検体からレジオネラ属菌が検出されず、非濃縮検体からのみレジオネラ属菌が検出された検体があり、濃縮法のみでは

レジオネラ属菌を見逃す危険性がある。各種分離培地の併用や処理工程の併用など培養の機会を多くすることが検出率向上につながり、レジオネラ感染症の危険性を回避することに貢献できると考える。

培養7日以降で発育を認める検体もあったため、培養3日目で培養検査を打ち切ることはいけないものの、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。今後は、LAMP法で得られた結果と斜光法での培養結果を合わせて迅速な行政対応を行い、10日間引き続き培養を継続し、最終結果として判断することが可能と考える。培養3日目の観察・同定後、最終判定日の10日目まで作業を中断することができることから、負担軽減にも功を奏し、また、検査を集中することにより検出確率が上昇する利点も考えられた。

従前より、環境水から検出される *L.pneumophila* の血清群には特徴があり、冷却塔からはSG1、浴槽水からはSG4～SG6が主に分離される⁶⁾とされてきたが、本調査の結果、SG1、SG3、SG5、SG6が約50%を占めており、その傾向は遠藤ら¹⁰⁾の報告と一致している。今回、結果としては示さなかったが、分離された *L.pneumophila* SG1の代表株についてPFGE法で遺伝子解析を行った結果、同時期の同一施設由来でも異なるPFGEパターンを示したことから、同一施設の同じ血清群であっても複数の遺伝子型が存在することが示唆された¹¹⁾。2003年4月、レジオネラ症の診断に尿中抗原検出キットが保険適用になったことで検査件数そのものが増加し、以前は、原因不明の市中肺炎とされていた一部の肺炎患者がレジオネラ症と診断されるようになり、結果として、レジオネラ症は増加傾向に繋がっていると考えられる。しかし、感染源を特定し、感染防止対策を講じるうえでは、臨床検体からのレジオネラ属菌の分離・同定は不可欠で、医療機関との連携を図り、菌株確保に向けたより一層の努力が必要と考える¹²⁻¹³⁾。

LAMP法において、レジオネラ属菌数が少ない検体の場合等は、検査結果にバラツキが生じやすく、培養法(+)LAMP法(-)の不一致の一因として考えられた。さらに、温泉検体では、「菌数」だけではなく、検出される「菌種」や泉質などの様々な要因により、LAMP法で安定した結果が得られない場合が考えられ、測定時には注意を要する。

浴槽水(+)湯口水(-)となった施設は、浴槽

や床の清掃不足や入浴客の不適切な利用方法などが原因と考えられ、衛生管理指導の強化が望まれる。現在までの厚生労働省からの通知では、塩素消毒などの薬剤を用いた管理手法が中心となっているが、塩素管理下では *L.pneumophila* SG1が浴槽水中で優性化しているとの報告⁷⁾もあることから、塩素消毒に頼らない管理手法の早期確立が望まれる。衛生管理状態の簡便な把握手段として、ATP測定法が注目されており、今回の結果からも、従属栄養細菌数とATP値においては良い相関が認められ、ATP値を清掃の日安として、現場検査に用いることは有用な手段と考えられた。上木ら¹⁴⁾の報告によると、ATP値が25RLU未満である場合、レジオネラ属菌検出率は0.3%と非常に低く、ATP値を25RLU未満に維持管理することが推奨されている。しかし、今回の結果においては、従属栄養細菌数とATP値においては良い相関が認められたものの、レジオネラ属菌数とATP値には相関が認められず、ATPの数値が低いことが、即、レジオネラ属菌陰性とはならないので、注意を要する。

レジオネラ属菌の検査を実施している民間検査機関は、従来、環境検査を主とした中に、レジオネラ属菌の検査を取り入れたところも多く、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは取り組む経緯や成り立ちが異なる場合も多い。そのような場合、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは異なり、微生物検査の技術を習得し、熟練した検査員が在籍しない場合も多々ある。民間検査機関を含めたレジオネラ属菌検査にかかわる全ての検査機関の質の良い検査精度を確保するため、研修及び精度管理は今後の重要な課題と考える。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、検体採取にご協力いただきました浴用施設および各保健所ならびに食品安全・衛生課の関係各位に深謝します。

参 考 文 献

- 1) 宮崎県福祉保健部：日向サンパーク温泉「お船出の湯」におけるレジオネラ症集団発生事例報告書，2003。
- 2) 岡田美香，河野喜美子，倉文明，前川純子，渡辺治雄，八木田健司，遠藤卓郎，鈴木泉：循環

- 式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発症状況と環境調査, 感染症学雑誌, 79, 365-374
- 3) 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. 環境感染誌, 2010. 25 (1): 8-14
 - 4) 「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」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、研究代表者 倉 文明、H21 年度総括研究報告
 - 5) 新版 レジオネラ症防止指針, 財団法人ビル管理教育センター
 - 6) 楠木くみ子、岩谷美枝、花岡 暉、石上 武、矢野一好: 多摩地域における入浴施設水のレジオネラ属菌汚染緊急調査とその対策事例 (平成13年度), 東京衛研年報, 53, 14-19
 - 7) 鈴木敦子、市瀬正之、松江隆之、天野祐次、寺山 武、泉山信司、遠藤卓郎: 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況 - 1996年4月から2000年11月まで -, 感染症学雑誌, 76, 703-710
 - 8) 笹原武志、菊野理津子、奥田舜治、関口朋子、佐藤義則、高山陽子、青木正人、井上松久: 温泉水における Legionella 属菌汚染と泉質に関する調査・研究, 感染症学雑誌, 78, 545-55
 - 9) 磯部順子、綿引正則、清水美和子、嶋 智子、木全恵子、倉田 毅: 富山県における浴用水中の Legionella 属菌の分離状況, 富山衛研年報, 30, 110-114
 - 10) 遠藤卓郎: 厚生労働省科学研究費補助金 (健康科学総合研究事業) 循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究 平成17年度 総括・分担研究報告書, 2006.
 - 11) 寺嶋 淳: 厚生労働省科学研究費補助金 (新興・再興感染症事業) 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 平成18年度 総括・分担研究報告書, 2007.
 - 12) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報; 28: 144-145
 - 13) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報; 29: 193-194
 - 14) 「ATP測定法を用いた公衆浴場等における管理マニュアル」平成22年度 地域保健総合推進事業、分担事業者 東京都多摩立川保健所 上木隆人

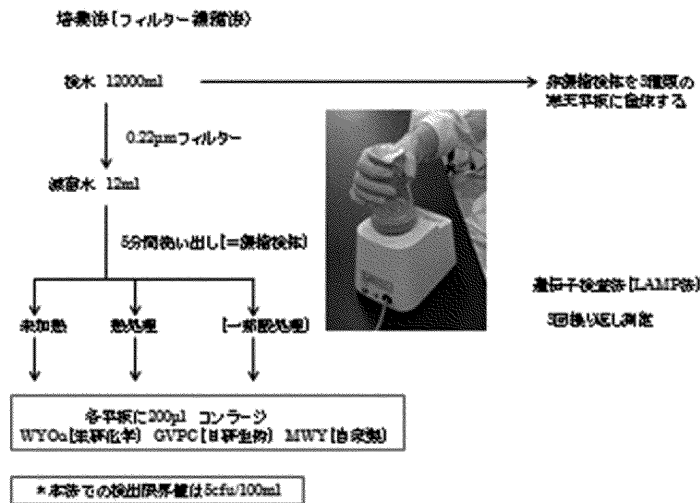


図1 検査法プロトコール

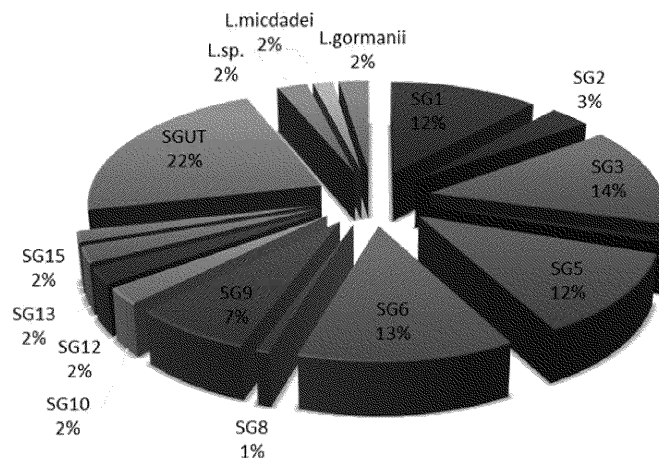


図2 分離菌株の血清群別

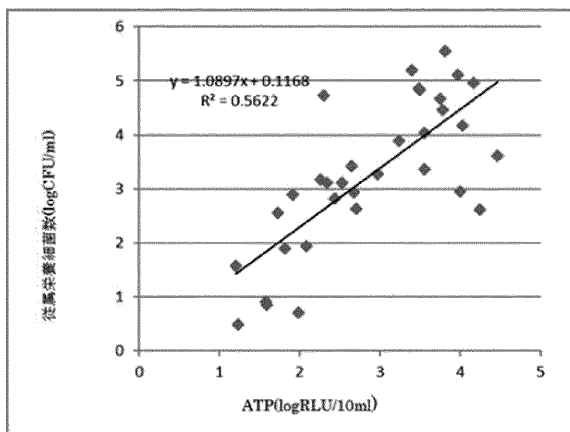


図3 従属栄養細菌数と ATP 値

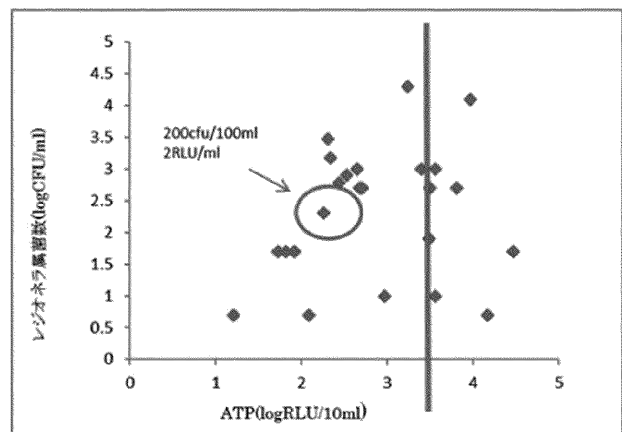


図4 レジオネラ属菌数と ATP 値

(ATP値 log RLU/10ml の数値3.4 (縦線) が 25RLU に換算される)

表1 培養法の結果 (n=161)

	採水箇所	検体数	検出数			
			基準値 ^a	不適率	基準値によらない ^b	検出率
非循環式	浴槽水	68	43	63%	44	65%
	湯口水	56	19	34%	24	43%
循環式	浴槽水	19	9	47%	11	58%
	湯口水	18	7	39%	8	44%
計		161	78	48%	87	54%

a : 10cfu/100ml以上

b : 10cfu/100mlによらない (定性)

表2 浴槽水と湯口水の検出状況 (n=74)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	23	9	32
	-	22	20	42
計		45	29	74

10cfu/100mlのよらない (定性)

表3-1 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=161)

	未加熱	加熱
WYO ^a (市販品)	61	64
GVPC (市販品)	56	60
MWY (自家製)	56	65

10cfu/100mlのよらない (定性)

表3 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=161)

			未加熱	加熱
WYO	GVPC	MWY	44	48
WYO	GVPC		4	6
WYO		MWY	3	6
	GVPC	MWY	4	2
WYO			10	4
	GVPC		4	4
		MWY	5	9
計			74	79

10cfu/100mlのよらない (定性)

表4 斜光法と従来法の比較^a

斜光法で検出	従来法のみで検出	合計
82	5	89

a : 基準値 10cfu/100mlのよらない

表5 LAMP法と培養法の比較

		LAMP法		計
		+	-	
培養法	+	66	21	87
	-	26	48	74

10cfu/100mlのよらない (定性)

表6 DNA抽出法の検討

		測定回数	LAMP法測定結果 ^a
LAMP法添付試薬による抽出		1回目	2/3
		2回目	0/3
キレックスによる抽出		1回目	1/3
		2回目	2/3
タカラ	カラム抽出 ^b	1回目	0/3
キアゲン	カラム抽出 ^c	1回目	0/3

^a 陽性回数 / 測定回数

^b TaKaRa NucleoSpin Tissue

^c QIAamp DNA Mini Kit