

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 (長崎県の調査)

川野 みどり、田栗 利紹

Sanitary Control against Legionnaires' disease on Recreational Water Facilities in Nagasaki

Midori URAYAMA-KAWANO, Toshitsugu TAGURI

Key words: *Legionella* spp., EMA-qPCR, PALSAR

キーワード: レジオネラ属菌, EMA-qPCR 法, PALSAR 法

はじめに

レジオネラ属菌の検査は一般的に平板培養法が用いられているが、結果が判明するまでに 7~10 日を要するため、レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法の開発が進められている。

今回、厚生労働科学研究「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」への協力の中でレジオネラ属菌の迅速検査法を検討するにあたり、長崎県内の調査事例をまとめたので報告する。

調査方法

1 調査対象

2016 年度に 5 つの入浴施設から 45 検体の試料を採取し、検査法の検討に用いた。検体の泉質は、酸性泉 22 検体、塩化物泉 11 検体、井水 4 検体、および水道水 8 検体であった。そのうち 28 検体は浴槽水、16 検体は湯口水、および 1 検体はシャワー水であった。浴槽水のうち 14 検体は循環濾過式、14 検体はいわゆる掛流し式を標榜する浴槽からの採水であった。

2 検査・解析方法

遊離残留塩素濃度は、現地での採水時に残留塩素測定器を用いて *N,N*-ジエチル-*p*-フェニレンジアミン (DPD) 吸光度法で測定した。検体は採水後 24 時間以内に検査に供した。500 mL 検水を、直径 47 mm、孔径 0.4 μm のポリカーボネートタイプメンブレンフィルター (ミリポア) で吸引ろ過した後、フィルターを滅菌蒸留水 5 mL で洗い出し、1 分間攪拌した懸濁液を検水原液 (100 倍濃縮液) とした。

平板培養法の前処理は、熱処理 (50°C、20 分間) をした後、酸処理 (0.2M HCL・KCL buffer, pH2.2 を等量添加、室温 5 分間) を実施した。平板培養法は研究班の精度管理ワーキンググループ推奨法¹⁾ に準じて行った。培地はシステイン添加 GVP α 培地 (シスメックスバイオメリュー) および BCYE α 培地 (シスメックスバイオメリュー) を使用し、1 検体あたり 0.1 mL 検水原液を各培地 2 枚に塗抹後 37°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。

浴槽水のバイオマスの指標として ATP を測定した。ルシパックワイド (キッコーマン) の専用綿棒を検水原液に浸して携帯用簡易測定器 PD-10 により測定したものを検水 10 mL あたりの RLU (Relative lights unit) 値とした。

EMA qPCR 法は、DNA 抽出の前に、Viable Legionella Selection Kit for PCR Ver.2.0 (タカラバイオ) を用いて EMA 処理を実施した。続いて、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) と Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。リアルタイム PCR の結果は、添付の取扱説明書に記載された方法で、コピー数から CFU (colony forming units) に換算した。

PALSAR 法は、100 倍濃縮検体 4 mL を遠心後、上清を除去し、添付の取扱説明書に従い実施した。当日測定しない場合は、RNA 抽出後の検体を -20°C で保存した。

結果

1 検体の塩素濃度

各検体の塩素濃度は、酸性泉が 0.09 ± 0.08 mg/L、塩化物泉が 0.40 ± 0.69 mg/L、井水が 1.45 ± 0.71 mg/L、水道水が 1.08 ± 0.99 mg/L であった。

2 平板培養法による結果

45 検体について検査した結果、4 検体からレジオネラ属菌が検出され、菌数は $10 \sim 40$ CFU/100 mL であった。検出されたレジオネラ属菌は全て *Legionella pneumophila* であり、血清型別に見ると、血清群 (SG) 6 が 1 検体、SG1 と SG6 の混合汚染が 1 検体、SG4 と SG8 の混合汚染が 1 検体であり、型別不能が 1 検体であった (表 1)。これらの検体は全て浴槽水であり、泉質ごとに見ると、酸性泉 1 検体、塩化物泉 2 検体、および井水 1 検体であった (表 1)。

3 ATP 量と泉質の関係

表 2 に濃縮検体の ATP 量と泉質の関係を示した。平板培養法でレジオネラ属菌が検出された検体のうち、酸性泉と塩化物泉の 3 検体は 10 mL あたり 1000 RLU を超えていたが井水は 10 RLU 未満に過ぎなかった。

4 EMA-qPCR 法と平板培養法との比較

平板培養法による 10 CFU/100 mL 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 mL 相当を用いて解析を行った²⁾。EMA-qPCR 法を使用した 45 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 3)。平板培養法では 4 検体が陽性であったのに対し EMA-qPCR 法では 28 検体からレジオネラ属菌遺伝子が検出された。EMA-qPCR 法の平板培養法に対する感度は 75% (3/4 検体)、特異度は 39% (16/41 検体) であった。平板培養法で陽性を示した 4 検体は、EMA-qPCR 法では 1~9 CFU/100 mL 相当が 2 検体、10~99 CFU/100 mL 相当が 1 検体であり、1 検体は検出限界以下であった (表 4)。EMA-qPCR 法と平板培養法との菌数 (定量値) の相関は見られなかった ($R^2 = 0.0142$)。

平板培養法で陽性となり、EMA-qPCR 法で陰性となった検体は 1 検体あり、泉質は井水であった (表 3、4)。

EMA-qPCR 法の結果が平板培養法に対して偽陽性となった検体は 25 検体あった (表 3)。それらの泉質は酸性泉 20 検体、塩化物泉 4 検体、井水 1 検体であり、EMA-qPCR 法の 100 mL あたりの定量値は、1~9 CFU 相当が 6 検体、10~99 CFU 相当が 6 検体、100~999 CFU 相当は 12 検体で、1000 CFU 相当以上は

1 検体であった (表 4)。

5 PALSAR 法と平板培養法との比較

PALSAR 法を実施した 45 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 5)。平板培養法陽性の 4 検体に対して PALSAR 法では 3 検体が陽性を示した。PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 75% (3/4 検体)、特異度は 34% (14/41 検体) であった。

考 察

今回、平板培養法と 2 種類の迅速検査法を用いて比較検討したが、PALSAR 法の平板培養法に対する定性検査結果は EMA-qPCR 法とほぼ同等であったため、定量的解析の観点から、ここでは平板培養法と EMA-qPCR 法との比較および評価を中心に考察する。

EMA-qPCR 法と平板培養法の比較では菌数 (定量値) の相関は認められず、EMA-qPCR 法の偽陽性検体は、ほとんど酸性泉で認められた (20/25)。井上ら³⁾によれば、pH3.8 未満の酸性泉からはレジオネラ属菌はほとんど検出されないが、有機炭素量やバイオマス量 (全細菌数、ATP) が有意に高く酸性を好む細菌が増殖しやすい環境にあるとされる。今回、酸性泉における各種測定値の相関を調べたところ、全体的に EMA-qPCR は ATP との相関が認められ、湯口水に ATP と pH 間の相関が認められた (図 1)。今回調査した酸性泉利用施設は同じ自噴泉を利用しているが、泉源の位置は施設で異なりいくつかの場所に分かれている。当該泉には酸性泉に適応した *Acidiphilium* 属菌等温泉固有の細菌の存在が知られており^{4,5)}、ATP はこれら細菌由来の可能性が高い。これらのことから、今回の ATP と pH の関係は湯口水に特有のものと考えられたが、希釈等の影響も否定できない。加えて、EMA-qPCR の定量値と ATP 量との相関が温泉固有の細菌によるものか、非培養性のレジオネラ属菌によるものかは不明で、今後の調査が待たれる。なお、レジオネラ属菌が検出された酸性泉の pH は 3.3 であったが、ATP が 1000 RLU/10mL を超えており、バイオフィルムの関与が示唆された (表 2、図 1)。

平板培養法により、井水から検出された 1 検体の ATP 量は非常に低く、残留塩素は 1.3 mg/L 検出されており、平板培養法や分離菌株の型別試験で得られた結果も複数培地による結果であり、定量値としては 10 CFU/100 mL を下回っていた (データ未掲載)。EMAqPCR と PALSAR 法の値も共に検出限界以下で

あったことから本事例は非常にまれなケースであると
考えられた。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金「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」(H28-健危-一般-006)により実施された。

参 考 文 献

- 1) 森本 洋 他、レジオネラ属菌検査法の安定化に
向けた取り組み-: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 24 年度総括・分
担研究報告書 93-130、2012.
- 2) 磯部順子 他、レジオネラ生菌迅速検査法の評価

-: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)「レジオネラ検査の標準化
及び消毒等にかかる公衆浴場等における衛生管
理手法に関する研究」、平成 28 年度 総括・分担
研究報告書、51-61、2016.

- 3) 井上博雄 他、温泉における微生物汚染ポテンシ
ヤルの評価-:厚生労働科学研究費補助金地域健
康・危機管理研究事業 「掛流し温泉における適切
な衛生管理方法の開発等に関する研究」、平成 18
年度 総括・分担研究報告書、31-43、2006.
- 4) 谷本保栄ら、好熱性好酸性細菌の検索、単離及び
諸性質の検討、岡山大学農学部学術報告、85、
15-21、1996.
- 5) 長島秀行、温泉微生物と社会、温泉科学、60、
278-286、2010.

表1 供試検体の泉質と平板培養法のレジオネラ属菌検出状況

	レジオネラ属菌 陰性	レジオネラ属菌陽性 <i>Legionella pneumophila</i> Sero Group			
		<i>Legionella pneumophila</i> Sero Group			
		SG6	SG1, 6	SG4, 8	Untypable
酸性泉 <pH3.8	9	1			
酸性泉 ≥pH3.8	12				
塩化物泉	9		1	1	
井水	3		1		
水道水	8				
Total	41		4		

表2 ATP量と泉質の関係

	レジオネラ属菌 陰性	ATP量(RLU ¹⁾ /10 mL)				Total	
		<1	≥1, <10	≥10, <100	≥100, <1000		≥1000
酸性泉 <pH3.8				5	2	1(1) ²⁾	8
酸性泉 ≥pH3.8			1	4	6	3	14
塩化物泉	1		2	3	1	4(2)	11
井水			3(1)	1			4
水道水			7		1		8

¹⁾Relative Lights Unit、²⁾太字は平板法の陽性検体を含む検体で、カッコ内は陽性検体数

表3 平板培養法とEMA-qPCR法との比較 (n =45)

	EMA-qPCR (CFU-equivalent/100mL)	平板培養法(CFU/100 mL)		
		≥10	<10	Total
≥1	3	25	28	
<1	1	16	17	
	4	41		

感度：75%，特異度：39%

表4 EMA定量PCRによる遺伝子量と泉質の関係

		Gene quantity on EMA-qPCR (CFU-equivalent/100mL)					Total
		<1	≥1, <10	≥10, <100	≥100, <1000	≥1000	
酸性泉	<pH3.8		2	4(1)¹⁾	3	1	10
	≥pH3.8	1		2	9		12
塩化物泉		5	5(2)	1			11
井水		3(1)	1				4
水道水		8					8

¹⁾太字は平板法の陽性検体を含む検体で、カッコ内は陽性検体数

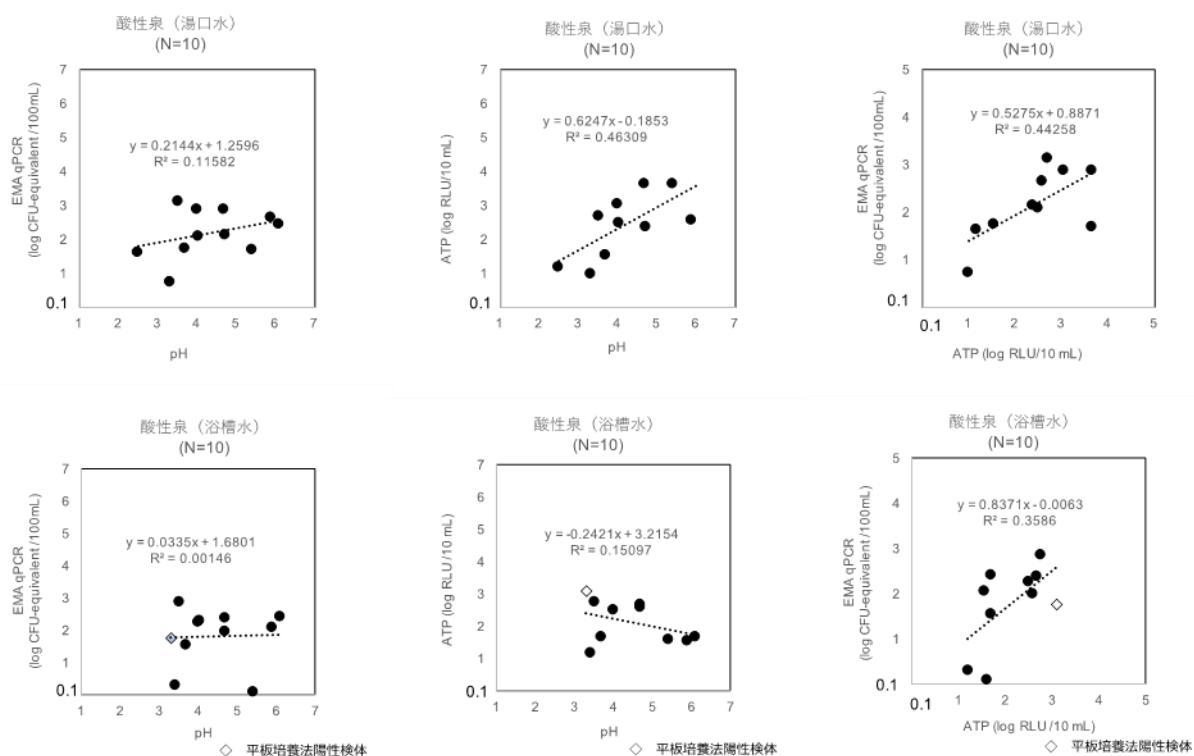


図1 酸性泉における各種測定値の相関

表5 平板培養法とパルサー法との比較 (n =45)

		平板培養法(CFU/100 mL)		
		≥10	<10	
PALSAR	陽性	3	27	30
	陰性	1	14	15
		4	41	

感度：75%，特異度：34%