

埼玉県の公衆浴場等におけるレジオネラ属菌の検出状況 及び培養法と LAMP 法の比較検討

近 真理奈 福島浩一 嶋田直美 山本徳栄 青木敦子

Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Saitama Prefecture,
and Comparison of culture method and LAMP method.

Marina Kon, Hirokazu Fukushima, Naomi Shimada, Norishige Yamamoto and Atsuko Aoki

はじめに

レジオネラ属菌は、自然界の土壌や淡水などの環境中に生息するグラム陰性桿菌であるが、近年は、冷却塔、循環式浴槽、加湿器、噴水などの水景用水など、人工的な水環境にも生息域を広げている。これらの環境から発生したエアロゾルや粉塵と一緒にレジオネラ属菌が吸入されると、体内のマクロファージの中で増殖し、ヒトに経気道感染(レジオネラ症)を起こす。レジオネラ症は、四類感染症に指定されており、免疫力の低下している高齢者や、基礎疾患のある人などでは、重篤な場合には死亡することもあるため、注意を要する感染症の一つである。

日本では、平成14年7月に、宮崎県の浴用施設で7名が死亡する集団感染事例¹⁾をはじめ、温泉や循環式浴用施設を感染源とする多くの事例が報告されており、レジオネラ症の患者発生と浴用施設との関連が明らかになってきている。

そこで埼玉県では、県内の公衆浴場及び旅館業の入浴設備について、レジオネラ属菌に係る浴槽水の水質基準適合状況を確認し、衛生管理の徹底を指導するため、「埼玉県レジオネラ属菌行政検査実施要領」を定め、平成20年度から24年度にかけてレジオネラ属菌の行政検査(レジオネラ属菌調査事業)を実施したので、この調査の結果について報告する。また、平成21年度以降の検査において、培養法と迅速検査Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)法によるレジオネラ属菌の検出結果を比較検討したので、併せて報告する。

材料および方法

1 調査対象および期間

平成20年度から24年度にかけて、循環式濾過器を設置している県内の公衆浴場328施設の浴槽水563検体を対象に、レジオネラ属菌の検査を行った。

また、平成21年度から24年度までの424検体については、培養法と併せて迅速検査(LAMP)法を行った。

浴槽水は、500mLのチオ硫酸ナトリウム入り滅菌採水ビンで採取し、採水当日に当所に搬入された。

2 検査方法

(1)培養法

検査は、国立感染症研究所病原体検出マニュアル²⁾に準じて実施した。すなわち濃縮を行わない非濃縮検体と濃縮検体を併行して行い、非濃縮検体については、未処理と酸処理、濃縮検体については酸処理検体のみを供試した。なお、浴槽水の濃縮は、ビル管理教育センターの「第3版レジオネラ症防止指針」³⁾の冷却遠心濃縮法に準じて実施した。

非濃縮未処理検体100 μ L、非濃縮酸処理検体200 μ L、および濃縮酸処理検体100 μ LをMWY寒天培地(関東化学)にコンラージ棒で塗布した。これらの培地を乾燥しないように湿潤箱に入れ、36~37 $^{\circ}$ Cで7日~10日間培養した。

3日目以降に発育した灰白色・湿潤性のレジオネラ属菌様コロニーを鈎菌し、BCYE α 寒天培地(関東化学)と5%ヒツジ血液寒天培地(日本BD)に再分離した。BCYE α 寒天培地のみに発育したコロニーについて、レジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いて菌種と血清群を同定した。市販血清で型別できない場合は、必要に応じてPCR法により菌種の同定を行った²⁾。同定されたコロニー数をもって浴槽水100mLあたりの菌数に換算し、レジオネラ属菌の菌数を算定した。

(2)LAMP法

LAMP法は、Loopampレジオネラ検出試薬キット(栄研化学)を用い、説明書に従って実施し、濁度測定装置LA320Cで判定を行った。

調査結果

1 レジオネラ属菌の検出状況

対象とした328施設のうち79施設(24.1%)、浴槽水563検体のうち101検体(17.9%)からレジオネラ属菌が検出された。検出菌数は表1のとおりであった。<10²CFU/100mLが72検体と全体の71.3%を占め、10²CFU/100mLが14検体(13.9%)、10³CFU/100mLが5検体(4.9%)、10⁴CFU/100mLが8検体(7.9%)、10⁵CFU/100mLが2検体(2.0%)であった。

また、検出したレジオネラ属菌の菌種及び検体数は表2のとおりであり、複数の菌種、血清群が分離された検体が35検体あった。

表1 レジオネラ属菌検出検体の菌数

検出菌数(CFU/100mL)	検体数(割合%)
10~<10 ²	72 (71.3)
10 ² ~<10 ³	14 (13.9)
10 ³ ~<10 ⁴	5 (4.9)
10 ⁴ ~<10 ⁵	8 (7.9)
10 ⁵ ~<10 ⁶	2 (2.0)
計	101 (100.0)

表2 検出菌種および検体数内訳

菌種	検出検体数 [※]
<i>Legionella pneumophila</i>	107
SG1	29
SG2	2
SG3	5
SG4	4
SG5	26
血清群 SG6	22
SG8	1
SG9	11
SG10	3
SG13	1
SGUT	3
<i>Legionella micdadei</i>	19
<i>Legionella bozemanii</i>	1
<i>Legionella sp.</i>	9

※ 1検体で複数菌種・血清群の分離：35検体

検出された菌種は、*Legionella pneumophila*(以下、*L. pneumophila*)が107検体と最も多く、その血清群(SG)は、1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13及びUTで、その他の菌種は、*Legionella micdadei*(以下、*L. micdadei*)が19検体、*Legionella bozemanii*が1検体であった。また、市販血清による型別が不能で、PCR法によりレジオネラ属菌の同定をした*Legionella sp.*が9検体から検出された。

2 培養法とLAMP法の比較検討

LAMP法を実施した424検体の判定結果と、培養法での検出結果の関係を表3に示した。

表3. 培養法とLAMP法の検出検体数

	LAMP法		計
	陽性	陰性	
検出	63	10	73
培養法 不検出 [※]	84	267	351
計	147	277	424

※不検出：検出限界値(10CFU/100mL)未満

培養法でレジオネラ属菌が検出されたのは73検体(17.2%)で、LAMP法では147検体(34.7%)が陽性であっ

た。培養法で検出された73検体のうち、LAMP法で陽性が63検体(86.3%)、陰性が10検体(13.7%)あった。培養法で検出された73検体のうち、LAMP法で陰性となった10検体の検出菌数と菌種を表4に示した。一方、培養法で不検出であった351検体のうち、LAMP法で陽性が84検体(23.9%)、陰性が267検体(76.1%)であった。

表4 培養法検出・LAMP法陰性検体の検出菌数と菌種

No.	菌数CFU/100ml	検出菌種
1	10	<i>L. pneumophila</i> . SG1
2	10	<i>L. pneumophila</i> . SG1
3	10	<i>L. pneumophila</i> . SG1
4	10	<i>L. pneumophila</i> . SG5
5	10	<i>L. pneumophila</i> . SG6
6	10	<i>L. pneumophila</i> . SG6
7	10	<i>L. pneumophila</i> . SG9
8	90	<i>L. micdadei</i>
9	220	<i>L. micdadei</i>
10	10	<i>L. sp.</i>

考 察

県内の入浴施設におけるレジオネラ属菌の検出率は、施設で24.1%、浴槽水では17.9%であった。また、検出された検体の7割以上が<10² CFU/100mLであったが、10⁴ CFU/100mL以上検出された検体も約1割存在した。

*L. pneumophila*の血清群別の浴用水からの検出頻度は、SG1, SG5, SG6が高いと言われ、他県の報告においてもその傾向が認められている^{3,4)}。今回の調査でも検出率の高い順に、SG1が29検体、SG5が26検体、SG6が22検体と、SG1が最も多く検出され、同様の傾向であった。SG1は患者から検出されることが多いことから、注意が必要である。

また、今回市販血清による型別が不能で、PCR法によってレジオネラ属菌と同定された9株については、今後ユニバーサルプライマーを用いて保存菌株の16Sシーケンス解析により、菌種の詳細な同定を進める必要があると考えている。

レジオネラ属菌の検査法として、一般的に用いられている培養法は、結果判明までに1週間から10日を要する。しかし、患者発生時の原因究明や、汚染施設の洗浄後の衛生状態の確認などにおいては、レジオネラ属菌の存在を速やかに把握することが望ましいため、迅速かつ精度の高い検査法が求められている。LAMP法は、概ね1日以内に検体中の一定量以上のレジオネラ属菌遺伝子の有無を判定できるため、迅速検査法として有用とされている^{5,6)}。しかし今回、培養法でレジオネラ属菌が検出されたが、LAMP法では陰性となり、両検査法の結果が不一致となった検体が10検体あった。このうち8検体は、検出菌数が検出限界値の10 CFU/100mLであり、その菌種は*L. pneumophila*が7検体と*Legionella sp.*が1検体であった。LAMP法の検出限界値はおおよそ6~60CFU/100mL^{5,6)}とされているが、倉ら⁷⁾により、

菌数の少ない検体においては精度が劣ることが報告されており、検出限界値付近の菌数が少ない検体では、遺伝子が捕捉されず、陰性となった可能性が考えられた。さらに菌種について、1 検体は *Legionella* sp. であったことから *Legionella londiniensis* などと同様に LAMP 法では検出できない菌種であった可能性があり、今後検証していきたい。

10 検体のうち残りの 2 検体は、菌数が 90 CFU/100mL と 220 CFU/100mL で、他の 8 検体と比較すると、検出限界値よりは菌数が多く、菌種はともに *L. micdadei* であった。

L. micdadei は、今回 LAMP 法を実施した 424 検体のうち、7 検体から検出されたが、LAMP 法陰性であったこれら 2 検体以外の 5 検体では、LAMP 法陽性で、その検出菌数は 10 ～300 CFU/100mL であった。

L. micdadei は、Loopamp レジオネラ検出試薬キットで検出可能な菌種であり、今回の調査において、菌数が検出限界値の 10 CFU/100mL であった他の検体でも陽性になったことから、これら 2 検体については、浴槽水の水質等の要因により PCR が阻害された可能性が考えられた。LAMP 法については、検出試薬キットの説明書に記載のとおり、鉄イオン、マンガニオンを含む金属イオンやフミン⁸⁾等 PCR 阻害物質の影響等により、レジオネラ属菌が存在するにもかかわらず、陰性となることも知られており、注意が必要である。

一方で、今回、培養法が不検出で LAMP 法が陽性となった 84 検体については、死菌の遺伝子が検出されたためと考えられた。このように、LAMP 法では、死菌遺伝子を検出できることから、培養法で浴槽水からレジオネラ属菌が検出されない場合でも、施設における過去の汚染を LAMP 法の陽性結果により把握し、衛生管理の指導の一助とすることが可能であると考えられた。

本調査の結果、培養法でレジオネラ属菌が検出されても、LAMP 法では陰性となる検体があったことから、LAMP 法だけで施設の汚染状況を評価することは困難であり、培養法との併用を原則^{7,9)}とし、LAMP 法の特徴や問題点を理解したうえで、検査法を選択的に組み合わせていくことが重要であると考えられた。

文 献

- 1) 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 前川純子 他: 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団事例 I. 発症状況と環境調査, 感染症学誌, 79, 365-374, 2005
- 2) 国立感染症研究所: 全国地方衛生研究所, 病原体検査マニュアル
- 3) 財団法人ビル管理教育センター: レジオネラ症防止指針 第3版, 2009
- 4) 緒方喜久代, 佐々木麻里, 成松浩志: 大分県における浴用水のレジオネラ属菌の検出状況 (2010~2012), 大分県衛生環境研究センター年報, 40, 46-52, 2012
- 5) 安中敏光, 吉野 学, 百田隆祥, 根本二郎 他:

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法によるレジオネラ属菌の検出 日本臨床微生物学雑誌 13, 19-25, 2003

6) 安中敏光: 遺伝子を標的とした感染症の迅速検査法の進歩, LAMP 法による *Legionella* 属菌の検出, JARMAM 14, 25-30, 2003

7) 倉 文明, 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 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. (平成 20 年度), 74-80, 2008

8) 井上浩章, 野田晃子, 縣 邦雄, 安中敏光 他: LAMP 法, PCR 法を用いた浴槽水レジオネラ属菌の迅速検査に関する調査研究 防菌防黴, 32, 10, 481-487, 2004

9) 磯部順子, 金谷潤一, 清水美和子, 増田千恵子 他: 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2012), 富山衛研年報, 36, 58-63, 2012