

レジオネラ属菌汚染実態調査と迅速検査法の検討

伊藤翔也 山田光一¹⁾ 吉田加寿子 大野金男
理化学課 ¹⁾前衛生研究所

要 旨

福島県内の浴槽水以外の人工環境水中のレジオネラ属菌の汚染状況について調査を実施した。足湯、修景水など 20 検体を採取し、培養法による検査の結果、6 検体から *Legionella pneumophila* を検出した。うち 1 検体からは *Legionella dumoffii* も同時に検出した。

並行して、検査に 7 日間を要する培養法に代わる迅速検査法の検討のため、LAMP 法による検査も行った。LAMP 法では、19 検体で陽性を示し、培養法より検出率が高かった。

キーワード：レジオネラ属菌、人工環境水、LAMP 法

はじめに

福島県においては、年間 120 件程度浴槽水のレジオネラ属菌検査を実施して公衆浴場等の衛生管理状況を把握している。しかし、それ以外での人工環境水中のレジオネラ属菌の生息調査については、ほとんど知見がない。今回、入浴施設以外での人工環境水中のレジオネラ属菌汚染実態調査を行ったので報告する。

同時に、現在 7 日間を要する培養法に代わる迅速検査法として、栄研化学株式会社で開発された遺伝子増幅法である LAMP 法による検査法について検討を行った。

材 料

2010 年 10 月から 12 月にかけて福島県内の屋外修景水施設、足湯施設などから採取した人工環境水 20 検体を試料とした。

採取と同時に、残留塩素濃度、水温についても測定を行った。

方 法

濃縮と培養法については、当所 SOP に基づき実施した。LAMP 法については、レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学株式会社) を用い、その説明書に基づき実施した。

1 濃縮

試料水 100mL、500mL をそれぞれ孔径 0.4 μ m のメンブランフィルターでろ過濃縮し

た。そのフィルターを 5mL の滅菌水が入った遠沈管に入れ、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌し濃縮試料とした。

2 培養法

原液、濃縮試料それぞれ HCL・KCL 緩衝液 (pH2.2) を等量加え酸処理した。処理液を WYO α 寒天培地 (栄研化学) に 0.1mL 塗布し、36 °C で 7 日間培養を行った。培養 4 日目からコロニーの計測を行い、培養 7 日目に菌数を確定した。また、培養中に現れたレジオネラ属菌と思われるコロニーについて、グラム染色、血清群の確認、BCYE α 寒天培地および血液寒天培地上における発育の確認によるシステイン要求性の確認を行った。また遺伝子抽出を行い、PCR 法を用いてレジオネラ属菌および *Legionella pneumophila* を確定した。レジオネラ属菌の菌種同定には、DDH レジオネラ'極東' (極東製薬工業株式会社) を用いた。

3 LAMP法

500mL 濃縮試料 2mL を滅菌チューブに入れ、4 °C、12,000rpm で 10 分間遠心した後、上澄みを除去して 40 μ L にした。Extract Solution for *Legionella* 50 μ L を添加して混合した後、95 °C で 18 分間加熱処理をした。氷上で冷却後、1M Tris-HCL (pH7.0) 8 μ L を加え混合した。4 °C、12,000rpm で 10 分間遠心したものを試料とした。あらかじめ調製した反

応液 20μL に試料 5μL を添加し、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C で測定を行った。

結果

結果を表 1 に示した。培養法では 20 検体中 6 検体で *Legionella pneumophila* が検出された（陽性率 30 %）。内訳は足湯が 4 件、修景水は 2 件だった。うち 1 検体では *Legionella dumoffii* も同時に検出された。なお、レジオネラ属菌が検出された試料では、いずれでも残留塩素は検出されなかった。

LAMP 法では、19 検体で陽性を示した（陽性率 95 %）。陽性の 19 検体中 13 検体は、培養法では陰性であった。

考察

培養法の結果から、浴槽水以外の人工環境水中にもレジオネラ属菌が生息していることが明らかになった。足湯よりも清掃の機会が少ないと考えられる修景水での検出率が、足湯での検出率の半分になっている。この原因は採水を 10 月からと比較的寒い時期に行っており、レジオネラ属菌の増殖が抑えられていたためと考えられる。

今回調査を行った施設では、公衆浴場と異なり管理方法などを規定した法律・条例はない。しかしヒトがエアロゾルを吸引する可能性があるという点では変わりはない。足湯に関しては、エアロゾルを吸い込む危険性が少ないため問題になることはあまりないが、足

表 1 レジオネラ属菌測定結果

試料No	試料の種類	残留塩素	培養法	L.pneumophila 血清群	LAMP法	備考
1	足湯	N.D	<10		陽性	硫黄泉
2	足湯	N.D	<10		陽性	硫黄泉
3	足湯	N.D	<10		陽性	硫黄泉
4	足湯	N.D	<10		陽性	硫黄泉
5	足湯	N.D	30	1群 6群	陽性	硫黄泉
6	足湯	N.D	10	3群	陽性	硫黄泉
7	足湯	N.D	10	3群	陽性	硫黄泉
8	足湯	N.D	<10		陽性	単純泉
9	足湯	N.D	1.0×10 ²	6群	陽性	単純泉/ <i>L.dumoffii</i> 検出
10	温泉水	N.D	<10		陽性	単純泉
11	給湯水	N.D	<10		陽性	
12	修景水	N.D	<10		陽性	
13	修景水	N.D	<10		陽性	
14	修景水	0.24	<10		陽性	
15	修景水	0.42	<10		陽性	
16	修景水	N.D	<10		陰性	
17	修景水	N.D	1.8×10 ²	5群 6群	陽性	
18	修景水	N.D	<10		陽性	
19	修景水	N.D	<10		陽性	
20	修景水	N.D	3.0×10 ²	5群	陽性	

湯の清掃をした人物が発症した事例もある。施設管理者等に対して適正な管理方法の周知が必要であると考えられる。

今回レジオネラ属菌が検出された施設は、いずれも残留塩素が含まれていなかった。浴槽水と同様、残留塩素の管理がレジオネラ属菌対策に重要であることが示唆された。

今回 LAMP 法では 19 検体で陽性となり、培養法よりも検出率が高い結果となった。この原因として培養法では検出できない死菌又は VBNC 菌（生きてはいるが培養はできない状態の菌）が LAMP 法で検出できた可能性が考えられる。

培養法との検出率の乖離が著しいため、LAMP 法を培養法の代替としての検査法として用いるには検討の必要があると思われた。ただし、施設の清掃を行った後に、レジオネラ属菌の汚染がないことを確認するためには LAMP 法は適した方法であると考えられる。

今後は、季節性を考慮し夏期の修景水施設や冷却塔水の汚染状況についても調査を続けると共に、迅速検査法についても検討を続けたい。

参考文献

- 1) レジオネラ症防止指針第 3 版。目黒克之，編。東京:財団法人ビル管理教育センター，2010
- 2) Akira Ohno, Naoyuki Kato, Koji Yamada, 他. Factors Influencing Survival of Legionella pneumophila Serotype 1 in Hot Spring Water and Tap Water. Appl Environ Microbiol. 2003 ; 69 : 2540-2547.