

レジオネラ属菌迅速検査法の検討と汚染実態調査

伊藤翔也 遠藤俊彦 吉田加寿子 大越憲幸
理化学課

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。

LAMP 法では培養法との検出率の乖離が著しく、その原因が死菌の DNA によるものであると考えた。そこで死菌の DNA の増幅を抑制する働きのあるエチジウムモノアジドブロマイド (EMA) を用いて旅館、公衆浴場等の浴槽水を対象とし、LAMP 法を行った。その結果、若干の効果が見られたが、実用性の点では更に改善が必要と考えられた。

キーワード：レジオネラ属菌，人工環境水，LAMP 法，エチジウムモノアジド

はじめに

福島県では、毎年約 100 件程、旅館や公衆浴場における浴槽水中のレジオネラ属菌検査を行い、衛生管理指導に役立てている。レジオネラ属菌は浴槽水以外の人工環境水中にも生息することが知られているが、その生息状況に関する知見はほとんど無い。そこで、浴槽水以外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。

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。

その中で、培養法では陰性であったが LAMP 法では陽性となった検体が多く、結果の乖離が大きかった。その原因について、死菌の DNA を増幅していることが原因であると考え、それを抑制する方法としてエチジウムモノアジドブロマイド (EMA) を用いた EMA-LAMP 法について浴槽水を対象に実施した。EMA は DNA にインターカレートし、その状態で光を照射すると DNA と不可逆的に結合する性質がある。EMA が結合した状態では遺伝子増幅は起きない。これを利用し、LAMP 法において生菌の DNA のみを増幅さ

せる方法について検討した。

材 料

1 人工環境水中の生息状況調査

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。

2 EMA-LAMP法の検討

平成 23 年度レジオネラ属菌検査事業対象の浴槽水を試料とした。

また、死菌量による EMA-LAMP 法への影響試験ではレジオネラ BCYE α 液体培地に、レジオネラ属菌 (*Legionella pneumophila*) のコロニーを 1 白金耳浮遊させ、24 時間培養したものを使用した。

方 法

濃縮と培養法については、当所の SOP に基づき実施した。LAMP 法については、レジオネラ検出キット E (栄研化学株式会社) を用いた。

1 人工環境水中の生息状況調査

1) 濃縮

試料水 100mL、500mL をそれぞれ孔径

0.4 μ m のメンブレ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 分間ミキシングし濃縮試料とした。

2) 培養法

原液、濃縮試料それぞれに 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 $^{\circ}$ 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、システイン要求性の確認を行った。さらに遺伝子を抽出し、PCR 法を用いてレジオネラ属菌及び *Legionella pneumophila* を確定した。なお、*Legionella pneumophila* については、血清群の確認を行った。

3) LAMP 法

500mL 濃縮試料 2mL を滅菌チューブに入れ、4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 20 μ L に試料 5 μ L 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。

2 EMA-LAMP法の検討

濃縮、培養法については 1 の 1) および 2) に同じ。

1) EMA-LAMP 法による迅速測定

EMA は 5mg を 1mL の滅菌水に溶解して用いた。EMA 処理を行う検体については、500mL 濃縮試料 1.5mL を滅菌チューブに入れた後、EMA 溶液 3 μ L を加え、暗所で 5 分間静置した後、チューブを氷冷しながら、距離 20cm で光を照射した。その後 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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、4 $^{\circ}$ 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 20 μ L に試料 5 μ L 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。

なお、対照として EMA 処理を行わない検体も同時に測定を行った。試料 1.5mL を滅菌チューブに入れた後に EMA を加えずに 4 $^{\circ}$ C、12,000rpm で 10 分間遠心を行った。その後上澄みを除去して 40 μ L にした。その後は上記と同様に操作した。

2) 死菌量による EMA-LAMP 法への影響試験

一昼夜培養した培養液を 10 倍ずつ段階希釈して希釈系列を作成し、菌数を測定した。同時にそれらを 100 $^{\circ}$ C、5 分で熱処理し死菌液を作成した。その死菌液及び EMA 処理したのものについて LAMP 法試験を行った。

結 果

1 人工環境水中の生息状況調査

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、修景水が 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。

一方、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。

2 EMA-LAMP法の検討

表 2 に培養法陰性検体のうち LAMP 法陽性を示した検体について EMA-LAMP 法を行った結果を、表 3 には培養法で陽性であった検体の EMA 処理及び EMA 未処理の LAMP 法の結果を示す。表 2、3 とともに (+) は LAMP 法で陽性、(-) は LAMP 法で陰性を示す。

表 2 に示すように、培養法陰性及び EMA 未処理 LAMP 法陽性の 10 検体の内 4 検体において EMA-LAMP 法で陰性となった。

また、表 3 に示すように、培養法陽性の 8 検体では、菌数 20 ~ 4.4 $\times 10^3$ CFU/100mL の 7 検体において EMA 未処理、EMA 処理の両者の LAMP 法で陽性を示し、菌数が

10CFU/100mL の 1 検体において EMA 未処理の LAMP 法で陽性，EMA-LAMP 法で陰性を示した。

次に液体培地を段階希釈し，それを熱処理した死菌液による試験の結果を表 4 に示す。EMA 未処理の LAMP 法では 10^2 CFU/100mL 未満の濃度では陰性であったが， 3.0×10^3 CFU/100mL 以上の濃度では陽性となった。EMA-LAMP 法では 3.1×10^4 CFU/100mL 以上の濃度では陽性となった。 3.1×10^3 CFU/100mL では陰性であった。

考 察

1 人工環境水中の生息状況について

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。さらに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。この結果から浴槽水と同様，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。検出率では，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

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/L.dumoffii 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	

表2 培養法陰性検体のLAMP法結果

検体 番号	培養法 CFU/100	EMA 未処理 LAMP法	EMA処理 LAMP法	EMAの 効果(*)
1	<10	(+)	(+)	×
2	<10	(+)	(-)	○
3	<10	(+)	(-)	○
4	<10	(+)	(-)	○
5	<10	(+)	(+)	×
6	<10	(+)	(-)	○
7	<10	(+)	(+)	×
8	<10	(+)	(+)	×
9	<10	(+)	(+)	×
10	<10	(+)	(+)	×

○…対照が培養法陰性、LAMP法陽性だった検体が
EMA-LAMP法で陰性に転じた場合

×…対照が培養法陰性、LAMP法陽性だった検体で
EMA-LAMP法でも陽性だった場合

表3 培養法陽性検体のLAMP法結果

検体 番号	培養法 (CFU/100mL)	LAMP法 (EMA無)	LAMP法 (EMA有)
1	5.2×10^2	(+)	(+)
2	1.2×10^2	(+)	(+)
3	5.1×10^2	(+)	(+)
4	1.2×10^3	(+)	(+)
5	5.9×10^2	(+)	(+)
6	10	(+)	(-)
7	4.4×10^3	(+)	(+)
8	20	(+)	(+)

表4 熱処理前の菌量測定済み液体培地の段階希釈によるEMA有効濃度限界検討結果

菌数(熱処理前) (CFU/100mL)	LAMP法 (EMA無)	LAMP法 (EMA有)
($\sim 10^6$)	(+)	(+)
3.2×10^5	(+)	(+)
3.1×10^4	(+)	(+)
3.0×10^3	(+)	(-)
($\sim 10^2$)	(-)	(-)

属菌の増殖が抑えられていたためと考えられた。

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・条例はないが、足湯の清掃従事者が発症した事例もあるなど、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。このため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。

2 LAMP法について

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 法で検出された可能性が考えられた。

今回の調査の結果、培養法の結果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、さらに検討の必要があると思われた。

しかしそれ以外の用途、例えばレジオネラ属菌が検出された浴槽での清掃後に浴槽使用を再開する際の可否の判断としては培養法よりも迅速に結果が出る LAMP 法は適していると判断された。

3 EMA-LAMP法について

培養法、EMA 処理しない LAMP 法ともに陽性の検体 8 件中、7 件については EMA 処理しても生菌には影響を大きく及ぼさないことが確認できた。しかし 1 件（表 3 検体番号 6）については EMA-LAMP 法が陰性に転じた。これは元々の菌濃度が薄かったことから、陰性に転じたものと考えられた。

培養法陰性、EMA 未処理 LAMP 法陽性だった 10 検体において、EMA 処理 LAMP 法で陰性になったのは 4 検体であった。

10 検体中 4 検体のみで陰性となった原因として、検体中の死菌量が多すぎて EMA で処理しきれなくなったことが考えられた。そこで、表 4 の菌量を含む液体培地について熱処理をほどこし、段階希釈して EMA 処理の効果調べたところ、一定以上 (3.1×10^4 cfu/100mL) の死菌量では EMA を加えても

陽性になってしまうことが確認できた。

以上のことから、EMA-LAMP 法陰性の場合には培養法を省略できるスクリーニング法としての用途が考えられる。また死菌の量が少ないと思われる比較的清浄な検体については LAMP 法単体で行うよりも EMA-LAMP 法を使用する方がより優れた結果が得られると考えられ、さらに保健所、浴場営業者等に速やかに情報を提供できることから今後も実用化に向かってさらに改良を加えていきたい。

まとめ

今回の調査では、浴槽水以外の人工環境水にもレジオネラ属菌が生息していることが分かった。レジオネラ菌の感染経路は主にエアロゾルの吸入であるため、浴槽水に比べれば足湯、修景水による感染の確率は低いものの、一定の管理が必要であると判断された。

LAMP 法の実用化については、今後も改良を加えていきたい。

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.
- 3) Takashi Soejima, Ken-ichiro Iida, Tian Quin, et al. Method To Detect Only Live Bacteria during PCR Amplification, Journal of Clinical Microbiology 2008;46 (7) :2305-2313