

大分県における浴用水中のレジオネラ属菌の検出状況 (2013 - 2021)

佐々木 麻里、神田 由子、溝腰 朗人^{*1}、高野 真実^{*2}、後藤 高志^{*3}、一ノ瀬 和也^{*2}、百武 兼道^{*4}、成松 浩志^{*5}Isolation of *Legionella* species from public bath water in Oita prefecture, 2013 - 2021Mari Sasaki, Yoshiko Kanda, Akito Mizokoshi^{*1}, Mami Takano^{*2}, Takashi Goto^{*3},
Kazuya Ichinose^{*2}, Kanemichi Hyakutake^{*4}, Hiroshi Narimatsu^{*5}Key words：レジオネラ属菌 *Legionella* sp.、浴用水 public bath water

要 旨

2013年度から2021年度の9年間、大分県内（大分市保健所管内を除く）の公衆浴場や旅館の浴用水440検体を対象に、レジオネラ属菌の検出状況について調査した。調査した440検体のうち198検体（45%）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（SG）は *Legionella pneumophila* SG6、SG3、SG1、SG5、型別不能などであり、臨床検体からは多く分離される *L. pneumophila* SG1 に特異的な遺伝子で、病原性関連遺伝子マーカーとして有用とされる *lag-1* 遺伝子は2施設4検体からのみ検出された。

はじめに

大分県は、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、2004年から公衆浴場等のレジオネラ属菌行政検査を実施し、入浴施設の安全確保に努めてきた。今回2013年から2021年までの検出状況についてまとめたので報告する。

また、浴場水のレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として、2019年に厚生労働省から検査法が示された¹⁾。当該方法を行政検査に導入する目的で、当所で従来から実施している方法と比較した。

さらに、LAMP法については、様々な泉質を有する温泉水等を利用した公衆浴場水等で、培養法でレジオネラ属菌が検出されるにもかかわらずLAMP法で陰性となる不一致の結果が得られることが多々あり、その解決が課題となっていた。そこで、培養法とLAMP法の結果不一致検体について、抽出法を検討したので、併せて報告する。

以下、平板培養法でレジオネラ属菌が検出されたこと、LAMP法で陽性と判定されたこと、*lag-1* 遺伝子が検出されたことを「（+）」と表記し、培養法でレジオネラ属菌が検出されなかったこと、LAMP法で陰性であったこと、*lag-1* 遺伝子が検出されなかったことを「（-）」と表記する。

材料および方法

1 材料

原則、公衆浴場又は旅館業の営業許可を受けている施設内にある入浴施設とし、2013年8月から2021年10月の間、県保健所環境衛生監視員が採水し、搬入した浴槽水および湯口水440検体を調査対象とした（表1）。採水には、高圧蒸気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2,000 mL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センターへ搬入され、検査に供するまでは冷蔵保存した。なお、浴槽水からレジオネラ属菌が検出された場合の汚染源の推定に役立てるため、湯口水を浴槽水と同時に採水し、検査に供した。

2 試料調製法

検査法は、新版レジオネラ症防止指針²⁾に準じて実施した。2019年度からは厚生労働省通知による方法（以下、標準法）¹⁾も追加した。すなわち、検体1,200 mLをメンブランフィルター（直径47mm、孔径0.2 μm、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入りの滅菌コニカルビーカー（100mL容量）に移し、ボルテックスミキサーにて1分間洗い出しをした。ろ過濃縮後の濃縮試料（100倍濃縮）について、50°Cで20分加熱後急冷したもの（以下、熱処理試料）、濃縮試料に等量の0.2M HCl-KCl液pH2.2±0.2（武

* 1 大分県南部保健所、* 2 大分県立病院、* 3 大分県東部保健所 * 4 大分県北部保健所豊後高田保健部 * 5 退職

藤化学又は関東化学)を加え混和し室温で5分間静置したもの(以下、酸処理試料)、熱や酸による前処理を行わないもの(以下、未処理試料)を調製した。

3 平板培養法

レジオネラ属菌の分離培地としてWYO α 寒天培地(栄研化学)、GVPC寒天培地(日研生物)、MWY寒天培地(関東化学又は自家製;Oxoid)の3種類を用い、2018年度までは、従来から当所で実施していた方法(以下、大分法)のみ、2019年度から2021年度までの3年間は大分法と標準法とで実施した。大分法として、熱処理試料および未加熱試料について、それぞれ10倍階段希釈を2段(10倍、100倍)まで行い、各希釈段階(1倍~100倍)の試料200 μ Lを各分離平板1枚にコンラージ棒で塗布した。標準法として、酸処理試料については200 μ L、熱処理試料については100 μ L、濃縮処理を行わない検体(以下、非濃縮検体)については200 μ Lを各分離平板1枚にコンラージ棒で塗布した。なお、標準法として通知に記載されている非濃縮検体の塗抹量は100 μ Lであるので、本研究方法ではその2倍量を塗抹していることになる。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°Cで培養した。検出限界は大分法では5CFU/100mL、標準法では10CFU/100mL(非濃縮検体では500CFU/100mL)である(表2)。

培養3日後と7日後に各分離培地を観察し、レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYE α 寒天培地(自家製;Oxoid)および血液寒天培地(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、EnviroAmp Legionella Kitのプライマー配列³⁾を用いたPCR法で同定検査を行った。分離した菌株は、Legionella Latex Test Kit(Oxoid)およ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。(2013年度は11月採水の17検体についてのみ型別まで実施した。)

4 lag-1遺伝子の検出

血清群型別により*L. pneumophila* SG1と判定された菌株については、Kozakら⁴⁾によるプライマー(lag-F: 5'-CTCACAACAAGTC AAGCAAC-3', lag-R: 5'-AAACCATACCAAA GCAACAT-3')を用いて、病原性との関連が指摘されているlag-1遺伝子の有無

を調査した。PCRの反応条件は、最初の熱変性95°C 2分後、熱変性94°C30秒、アニーリング55°C30秒、伸長72°C60秒を30サイクル繰り返した。

5 LAMP法

濃縮検体440検体について、Legionella Detection Kit E(栄研化学)を用い、リアルタイム濁度測定装置(LA320-C又はLoopampEXIA)(栄研化学)で1検体につき3回繰り返し測定を行った。

2016-2018年度の136検体中、培養(+)でLAMP(-)となった11検体については、LAMP反応阻害を確認するため、当該抽出液に1/10量の陽性コントロールを添加したものについて、再度測定し、Tt(Threshold time)値*を比較した。

さらに、2018年度の検体で、培養(+) LAMP(-)となった2検体、菌数が多い(100CFU以上/100mL)にも関わらずLAMP3回中2回(-)であった4検体を含めた20検体について、以下の抽出法(Chelex抽出法)で再度濃縮検体から抽出、測定し、キットの説明書どおりの抽出法(常法)とTt値を比較した。抽出は同じ濃縮検体からで、測定は3回繰り返しした。また、2017年度に、レジオネラ属菌数が1,500CFU/100mLでLAMP(-)であった1検体と、6,000CFU/100mLでLAMP3回中2回(-)であった1検体についても、Chelex抽出法を適用した。

Chelex抽出法: 予めChelex 100 Chelating Resin(BioRad)を10%w/vになるよう滅菌蒸留水(遺伝子工学用)に懸濁させ、Chelex液を調製した。濃縮検体2mLをチューブに採取し13,000gで10分間遠心した後、50 μ Lを残して上清を除去、10%Chelex液を50 μ L添加し、十分に混和した。沸騰水中で10分間加熱後、13,000gで5分間遠心した上清をサンプルとした。

* Tt値: LAMP法で一定の濁度に達するまでの時間(分)。菌数が多いほど値が小さい傾向にある。

結果

1 レジオネラ属菌の検出状況

培養結果の概要を表3に示した。440検体中198検体(45%)からレジオネラ属菌が検出された。このうち、基準値違反は165検体(38%)であった。内訳は「循環式施設」では浴槽水82検体中23検体(28%)、湯口水67検体中30検体(45%)で、掛け流し式を含む「非循環式施設」では浴槽水148検体中88検体(59%)、湯口水143検体中57検体(40%)

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67施設であった。浴槽水(+)湯口水(-)となった施設は37施設、浴槽水(-)湯口水(+)となった施設は20施設であった(表4)。

検出されたレジオネラ属菌数を表5に示す。検水100mLあたり1,000CFU以上検出された検体が40検体あり、最も菌数が多い検体は44,500CFU/100mLであった。

検出された*L. pneumophila*の血清群別の結果を表6に示した。型別不能を除き、SG6、SG3、SG1、SG5の順に多く型別された。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。

2 lag-1 遺伝子の検出状況

L. pneumophila SG1株が31施設の42検体から検出され、そのうち2施設4検体からlag-1遺伝子を保有する株が検出された(表7)。

3 平板培養法の比較

2019-2021年度の144検体中、大分法では62検体、標準法では58検体からレジオネラ属菌が検出された(表8)。標準法のうち1検体については、濃縮試料を塗抹した培地は夾雑菌が多く発育したためにレジオネラ属菌検出不能であったが、非濃縮検体からはレジオネラ属菌が検出された。この1検体を含む3検体は非濃縮検体のみからレジオネラ属菌が検出され、標準法の濃縮試料からは検出されなかった。レジオネラ属菌数(以下「菌数」という、単位はCFU/100mL)は、大分法と標準法でそれぞれ5~44,500、10~31,500(濃縮試料のみでは10~16,640)であった。大分法でのみ検出された8検体の菌数は5が6検体、20と50が各1検体で、*L. pneumophila*が検出された。標準法でのみ検出された検体は2検体で、その菌数はともに10であった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.8541$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8579$ であった(図1)。

4 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。常法による結果は表9のとおりで、35検体が培養(+)LAMP法(-)の不一致の結果となった。このうち、2016-2018年度に不一致の結果となった11

検体について、11検体中10検体(グループA)の菌数は5~500(うち9検体は60未満)で、*L. pneumophila*が分離された。残り1検体(グループB)は、菌数が1,500で、*L. pneumophila*とLAMP法適用外の菌種である*L. londiniensis*が分離され、その泉質はマグネシウム・ナトリウム-炭酸水素塩・硫酸塩泉であった。

これら11検体中、グループAの2検体(それぞれ菌数は5、55)を除く8検体とグループBの1検体について、陽性コントロールを添加した抽出液と陽性コントロールを添加した陰性対照とでTt値を比較したところ、グループAの8検体では差が見られなかったが、グループBの1検体では3回測定中3回とも抽出液のTt値の方が1~2分遅い値となった。(陰性対照平均Tt値27.7分、抽出液平均Tt値29.1分)。

Chelex抽出法による20検体の結果については表10のとおりであった。常法とChelex抽出法について、陰性のTt値を60分としてt検定を実施したところ、全検体間では有意差が見られなかった。しかし、培養で検出された菌数が50以上の9検体間では、Tt値の平均値と標準偏差は、常法で 45.8 ± 9.9 分、Chelex抽出法で 36.0 ± 10.7 分であり、Chelex抽出法のTt値が有意に低下した($p=0.012<0.05$)。t検定は対応のある2標本間の片側検定で実施した。

また、グループBの1検体と、菌数6,000でLAMP3回中2回陰性であった1検体については、Chelex抽出法でLAMP3回中3回とも(+)であった。

考察

本調査の結果、レジオネラ属菌の検出率(10CFU/100mL以上)は38%で、他の調査結果⁵⁻⁷⁾と比較すると高めの検出率となった。循環式と掛け流し式を含む非循環式の検出状況を比較すると、湯口水は同程度の検出率であるのに対して、浴槽水では非循環式の検出率が循環式の検出率の倍以上高かった。掛け流し式浴槽では消毒剤を入れてもお湯とともに流れ出してしまう等、塩素消毒による管理の難しさが表れた結果だと考えられる。「おんせん県」である大分県は掛け流し式施設が多く、小まめな清掃など塩素消毒だけに頼らない衛生管理が重要である。

lag-1遺伝子は、*L. pneumophila* SG1に特異的な遺伝子である。*L. pneumophila* SG1臨床分離株の90%がlag-1遺伝子を保有している⁸⁾とされるのに対し、環境分離株における保有率は6~59.7%⁹⁾と高くない。本調査でのlag-1保有率は9.5%(4/42)であり、

臨床分離株の保有状況と比較して非常に低かった。大分県内では、2018年に加湿器が原因と考えられた集団感染事例が発生している¹⁰⁾が、このときに加湿器の水から分離された*L. pneumophila* SG1は*lag-1*遺伝子を保有していた。*lag-1*遺伝子の有無はレジオネラ症発生リスクの目安になるものと考ええる。

平板培養法について、使用する培地枚数は1種類につき標準法で3枚、大分法で6枚である。単純に培地枚数の多い方が検出確率は上がるが、枚数の少ない標準法で大分法と同等の結果が得られた。大分法又は標準法の一法のみでレジオネラ属菌が検出された検体もあったが、5CFU/100mLの検体を含むいずれも菌数の少ない検体であったため、ばらつきが生じたと考えられる。指針¹¹⁾による基準ではレジオネラ属菌は10CFU/100mL未満とされており、標準法は指針に基づく定期的な水質検査には適した方法だと言える。ただし、標準法において濃縮試料では検出できない検体があったことから、濃縮試料のみでなく非濃縮検体についても併せて検査を実施することが重要と考える。また、今回非濃縮検体の塗抹量を100μLでなく200μLとしたが、夾雑菌の増加による平板観察の困難さは感じなかった。さらに、非濃縮検体のみ(+)となった3検体から分離されたレジオネラ属菌は、いずれも平板上に1コロニー(500 CFU/100mLに相当)であったことから、検出率を上げるためには、非濃縮検体の塗抹量は100μLよりも200μLの方が望ましいと考える。

LAMP法については、レジオネラ属菌数が少ない検体の場合は、検査結果にばらつきが生じやすく、50CFU/100mL以上のレジオネラ属菌数が検出された検体については、Chelex抽出法を用いることでT_t値が有意に低下した。これは、LAMP(+)となる回数が増えたことを反映している。常法とChelex抽出法による抽出物について、レジオネラ16S rRNA遺伝子コピー数を測定したところ、Chelex抽出物のコピー数の方が少なかった(データ未掲載)。このことから、Chelex抽出法により抽出された遺伝子コピー数が増えたからではなく、何らかの反応阻害を低減できたためにLAMP(+)の回数が増え、T_t値が低下したと考えられる。レジオネラ属菌数が5 CFU/100mLの3検体については全く改善されなかったが、LAMPキット添付の説明書では60CFU/testが検出限界とされており、また、菌数が非常に多いにもかかわらずLAMP(-)であった検体についてもChelex抽出法では(+)となったことから、Che-

lex抽出法は偽陰性を減らすのに有効な抽出法であると考ええる。

おわりに

培地枚数の少ない標準法で大分法と同等の結果が得られたことから、2022年度以降のレジオネラ属菌行政検査方法を標準法に変更した。

LAMP法については、抽出法を変更することにより、多様な泉質を有する大分県の浴場水検査において培養(+)でLAMP(-)の不一致が解消されることが示唆されたため、こちらも2022年度からは、Chelex抽出法を導入した。

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並びに県庁本課の関係各位に深謝します。

本調査の一部は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(課題番号:H25-健危-一般-009、H28-健危-一般-006、19LA1006)の補助を受けて実施されました。

参考文献

- 1) 「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」(令和元年9月19日付け薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)
- 2) 厚生省生活衛生局企画課監修: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(1999)
- 3) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル(レジオネラ症)平成23年10月7日改訂, http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/legionella_2012.pdf
- 4) Kozak N.A., Benson R.F., Brown E., Alexander N.T., Taylor T.H.Jr, Shelton B.G., and Fields B.S.: Distribution of *lag-1* alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. J. Clin. Microbiol. 47, 2525-35 (2009)
- 5) 高橋志保今野貴之伊藤佑歩鈴木忠之:公衆浴場等におけるレジオネラ属菌の検出状況(2017~2021年度),秋田県健康環境センター年報, 18, 59-60 (2022)
- 6) 枝川亜希子, 安達史恵, 小池真生子, 肥塚利江,

松島加代, 土屋誠:大阪府内中核市における公衆浴場等浴槽水のレジオネラ属菌および水質状況調査, 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所研究年報, 7, 94-101 (2023)

- 7) 武藤千恵子, 梅津萌子, 猪又明子:東京都における浴槽水のレジオネラ属菌試験とその検出状況, 日本水処理生物学会誌, 59 (2), 17-25 (2023)
- 8) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Kyoko Chida, Hitomi Ohya, Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima, Takahiro Hiratsuka, Shuji Yoshino, Miho Sakata, Miyo Murai, Makoto Ohnishi, Working Group for Legionella in Japan : *Legionella pneumophila*

and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016 : Appl Environ Microbiol, 84 : 721-18, 2018.

- 9) レジオネラ研究者の会編:「レジオネラ属菌を知る」, p.24-25 (2021), 株式会社M'sクリエイト
- 10) 佐々木麻里, 神田由子, 後藤高志, 成松浩志:加湿器が原因とされたレジオネラ症集団発生事例について, 大分県衛生環境研究センター年報, 45, 47-51 (2017)
- 11) 「公衆浴場における水質基準等に関する指針」(平成12年12月15日生衛第1811号厚生省生活衛生局長通知 令和元年9月19日一部改正)

表1 調査対象検体数

採取年度	検体数		
	浴槽水	湯口水	計
2013	29	25	54
2014	28	28	56
2015	25	25	50
2016	24	15	39
2017	25	24	49
2018	25	23	48
2019	24	21	45
2020	21	20	41
2021	29	29	58
計	230	210	440

表2 平板培養法

前処理		希釈段階	平板塗抹量	検出限界	使用培地枚数
大分法	濃縮試料	熱処理	1倍、10倍、100倍	各200μL	5CFU/100mL
		未処理	1倍、10倍、100倍	各200μL	5CFU/100mL
標準法	濃縮試料	熱処理	1倍	100μL	10CFU/100mL
		酸処理	1倍	200μL	10CFU/100mL
	非濃縮検体	1倍	200μL*	500CFU/100mL	

*通知に記載されている塗抹量は「100μL」

表3 レジオネラ属菌の検出状況 (n=440)

	採水箇所	検体数	検出数*	検出率
循環式	浴槽水	82	23	28%
	湯口水	67	30	45%
掛け流し式	浴槽水	148	88	59%
非循環式	湯口水	143	57	40%
計		440	198	45%

*10CFU/100mLによらない(定性)

表4 浴槽水と湯口水の検出*状況 (n=208)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	67	20	87
	-	37	84	121
計		104	104	208

*10CFU/100mLによらない(定性)

表5 培養法の検出菌数別検体数 (n=440)

菌数	検体数
5未満	242
5-9	33
10-99	58
100-999	67
1000以上	40
合計	440

表6 血清群別の陽性検体数

血清群	検体数		計
	浴槽水	湯口水	
SG1	24	18	42
SG2	11	9	20
SG3	38	33	71
SG4	10	6	16
SG5	17	18	35
SG6	42	31	73
SG7	6	2	8
SG8	1	2	3
SG9	4	6	10
SG10	3	0	3
SG11	0	0	0
SG12	1	4	5
SG13	3	4	7
SG14	1	0	1
SG15	7	6	13
型別不能	64	48	112
Lp [*] 以外	35	25	60

*Lp: *Legionella pneumophila*

表7 浴用水におけるlag-1検出状況

採取年度	レジオネラ属菌検査数		レジオネラ属菌(+) ^{*1}		<i>L. pneumophila</i> SG1(+)		<i>lag-1</i> 遺伝子(+)	
	施設数	検体数	施設数	検体数	施設数	検体数	施設数	検体数
2013 ^{*2}	9	17	7	10	0	0	0	0
2014	28	56	15	22	4	4	0	0
2015	25	50	15	25	5	6	0	0
2016	20	39	8	15	1	2	1	2
2017	25	49	12	20	7	10	0	0
2018	25	48	15	24	2	3	0	0
2019	24	45	16	25	3	6	1	2
2020	21	41	14	19	6	7	0	0
2021	30	58	14	18	3	4	0	0
計	207	403	116	178	31	42	2	4

^{*1}10CFU/100mLによらない(定性)^{*2}2013年度は一部検体のみ血清群型別を実施したため表1の検体数と一致しない

表8 標準法と大分法の比較 (n=144)

		標準法		計
		≥10CFU/100mL		
		+	－	
大分法	+	54	8	62
≥5CFU/100mL	－	4	78	82
計		58	86	144

図1 標準法と大分法の相関

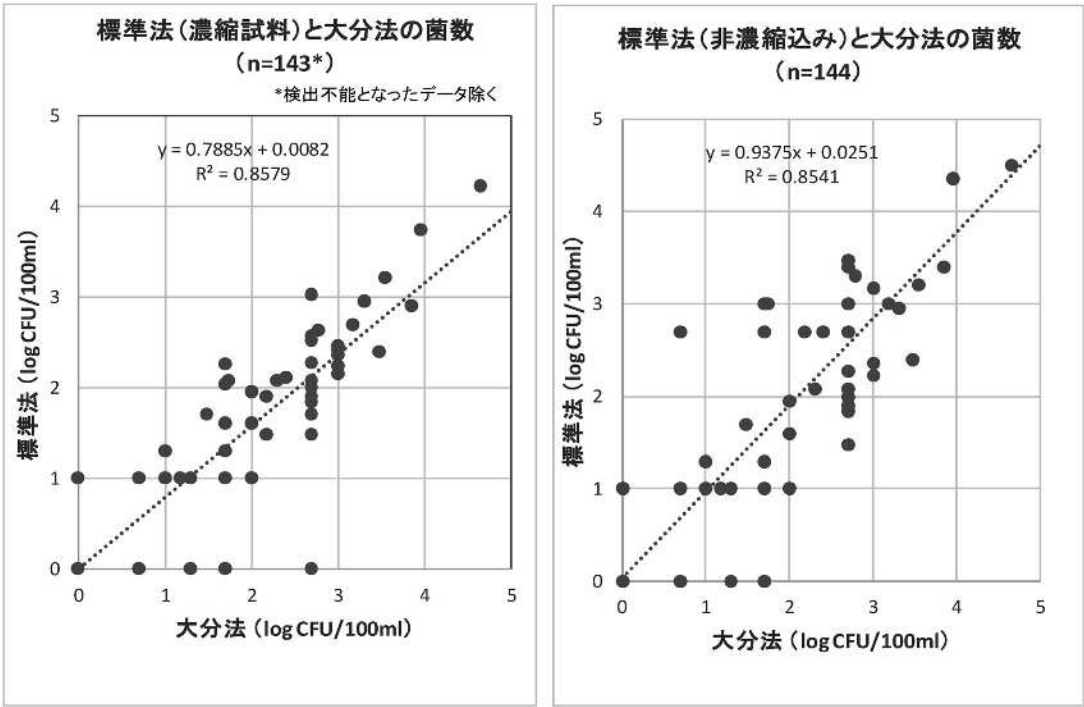


表9 LAMP法と培養法の比較 (n=440)

	LAMP		計
	+	-	
培養法			
+	163	35	198
-	65	177	242
計	228	212	440

*培養法は10CFU/100mLによらない(定性)

表10 Chelex抽出法と常法によるLAMP法結果 (20検体60テスト)

培養結果 菌数(/100mL)	Chelex抽出法 LAMP		常法LAMP
	検体数 テスト数	陽性検体数 陽性テスト数	陽性検体数 陽性テスト数
5CFU未満	8	2	3
	24	6	5
5CFU	3	1	2
	9	1	4
50CFU以上	9	8	8
	27	22	13
合計	20	11	13
	60	29	22

