

## 浴槽水等からのレジオネラ属菌検出状況 (平成 27～29 年度)

栗林 智早 青田 達明 千神 彩香\* 山本 美和子  
松室 信宏 坂本 綾

### はじめに

レジオネラ (*Legionella*) 属菌は、自然界や循環式浴槽等人工的な水環境にも生息する。本菌に汚染されたエアロゾルや塵埃を吸入することで感染し、特に細胞性免疫機能が低下した場合には肺炎を発症しやすくレジオネラ症を引き起こすことがある<sup>1)</sup>。昨年は県内の入浴施設で大規模なレジオネラ症集団感染が発生した。

本市では、広島市公衆浴場法施行条例で規定する基準の遵守状況の確認のため、公衆浴場の浴槽水等のレジオネラ属菌検査等を実施し、施設の衛生管理向上を図っている。

今回、平成 27～29 年度の市内の公衆入浴施設等からのレジオネラ属菌検出検査結果についてまとめたので報告する。

### 方 法

#### 1 材料

平成 27 年 4 月から平成 30 年 3 月までに保健部環境衛生課により搬入された、市内の公衆浴場等 38 施設の浴槽水等 74 検体を試料とした。

#### 2 培養法

培養は、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ推奨法を参考にして実施した<sup>2)</sup>。試料 500mL を 100 倍ろ過濃縮し、未処理、酸処理 (0.2M HCl-KCl buffer pH2.2・4 分)、熱処理 (50℃・20 分) したものを、BCYE α 寒天培地 (OXOID) と GVPC α 寒天生培地 (日研生物) に塗抹後 37℃ で 7 日間培養した。斜光法によりレジオネラ属菌様集落を羊血寒/BCYE α 寒天培地 (日研生物) に接種し、L-システイン要求性を確認した。

#### 3 血清型別及び菌種同定

分離菌はレジオネララテックスキット (OXOID) とレジオネラ免疫血清「生研」(デンカ生研) を用いて菌種同定及び血清群別を実施した。同定できなかった菌株については、Ratcliff<sup>3)</sup>らの報告を基に *mip* 遺伝子を確認するため、Forward プライマー: Legmip\_f (5' -GGG RAT TVT TTA TGA AGA TGA

RAY TGG), Reverse プライマー: rm13 (5' -CAG GAA ACA GCT ATG ACT CRT TNG GDC CDA TNG GNC CDC C) を使用し、熱変性 94℃・1 分、アニーリング 58℃・2 分、伸長 72℃・2 分、35 サイクルで増幅した。シーケンス用のプライマーとして、Forward プライマー: Legmip\_fs (5' -TTT ATG AAG ATG ARA YTG GTC RCT GC), Reverse プライマー: M13-R (5' -CAG GAA ACA GCT ATG AC) を使用し塩基配列を決定後、解析サイト Legionella species identification by mip similarity により菌種を同定した。

#### 4 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析

分離同定された *L. pneumophila* SG1 5 株を国立感染症研究所病原体検出マニュアルに記された方法に準じて実施した。

BCYE α 寒天培地に得られた新鮮な単離菌を用い、制限酵素 *Sfi* I (Roche) を 50U/1sample で 50℃ 一晚処理をし、パルスタイム 5-50 秒、電圧 6.0V/cm、角度 120°、温度 14℃ で 21 時間泳動を行った。

泳動像は BioNumerics Ver. 7.5 (Applied Maths) で解析し系統樹を作成した。

### 結果と考察

#### 1 検出状況

レジオネラ属菌の検出状況を表 1 に示す。12 施設 14 検体 (18.9%) からレジオネラ属菌が検出された。

検出菌数は、10～10<sup>2</sup>CFU/100mL 未満が 13 検体、10<sup>2</sup>～10<sup>3</sup>CFU/100mL 未満が 1 検体であった。10<sup>3</sup>CFU/mL 以上検出された検体はみられなかった。過去の報告<sup>4), 5)</sup>に比べ検出菌数は少ない傾向がみられた。

#### 2 分離菌株の菌種及び血清群

分離菌株の菌種及び血清群を表 2 に示す。*L. pneumophila* SG1 と *L. maceachernii* が最も多く各 6 株、次いで *L. pneumophila* SG5 が 4 株検出された。

レジオネラ属菌が検出された 14 検体のうち 7 検体については、1 検体当たり複数の菌種又は複数の血清群が分離された。最も多く検出された検体は、*L. pneumophila* SG1, SG8, SG14 及び *L. macea-*

\*: 現 健康福祉局保健部環境衛生課

表 1 レジオネラ属菌検出状況

| 年度 | 施設数 | 検体数 | 陽性検体数(陽性率)<br>/陽性施設数 | 検出菌数(CFU/100mL) |                          |                                       |
|----|-----|-----|----------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------------------|
|    |     |     |                      | 10 未満           | 10 以上 10 <sup>2</sup> 未満 | 10 <sup>2</sup> 以上 10 <sup>3</sup> 未満 |
| 27 | 17  | 19  | 3(15.8%)/2           | 16              | 3                        |                                       |
| 28 | 9   | 29  | 6(20.7%)/5           | 23              | 5                        | 1                                     |
| 29 | 12  | 26  | 5(19.2%)/5           | 21              | 5                        |                                       |
| 計  | 38  | 74  | 14(18.9%)/12         | 60              | 13                       | 1                                     |

表 2 浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の菌種及び血清群

| 菌種・血清群                    | 菌株数 |
|---------------------------|-----|
| <i>L. pneumophila</i> SG1 | 6   |
| SG2                       | 1   |
| SG3                       | 1   |
| SG5                       | 4   |
| SG6                       | 1   |
| SG8                       | 2   |
| SG14                      | 1   |
| <i>L. maceachernii</i>    | 6   |
| <i>L. sp.</i>             | 1   |
| 計                         | 23  |

*chernii* の 4 種類が分離され、複数のレジオネラ属菌による汚染が認められた。同一検体から複数のレジオネラ属菌が検出されることから、菌同定はより多くの菌株について行うことが必要であると考えられる。

### 3 PFGE 解析

分離した 5 株の *L. pneumophila* SG1 について、制限酵素 *Sfi* I で処理した PFGE 像と解析結果を図に示す。

今回実施した菌株間において類似度の高いものはなかった。16002 と 16003 は、同一施設の検体から分離された菌株であるが、類似度は 75.0% と低く由来が異なる菌による汚染の可能性が高いと考えられた。このことより同一血清群が検出されても異なるレジオネラ属菌による汚染である可能性が示唆された。

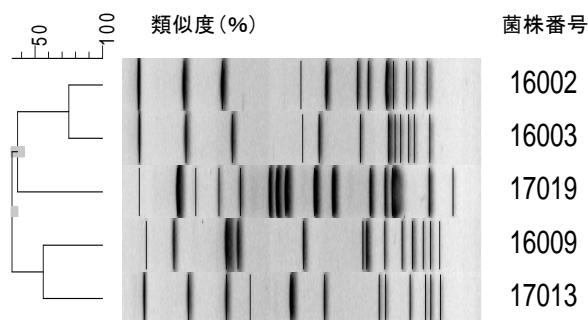


図 *L. pneumophila* SG1 株 PFGE 像

### 文 献

- 1) 倉 文明 他：国立感染症研究所「レジオネラ症とは」, 2014 年 6 月 25 日改訂, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/530-legionella.html>
- 2) 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)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 25 年度分担研究報告書, 97-123
- 3) RODNEY M. RATCLIFF et al. : Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene, J Clin Microbiol, 36(6), 1560~1567(1998)
- 4) 生物科学部：浴槽水からのレジオネラ属菌検出状況(平成 23~25 年度), 広島市衛生研究所年報, 33, 66(2014)
- 5) 生物科学部：公衆浴場等浴用水からのレジオネラ属菌検出状況(平成 26 年度), 広島市衛生研究所年報, 34, 68~69(2015)