

広島市内における公衆浴場浴槽水からのレジオネラ属菌 検出状況（平成13年度）

山本美和子 石村 勝之 毛利 好江 萱島 隆之
笠間 良雄* 平崎 和孝

はじめに

レジオネラ症は、レジオネラ属菌を含んだエアロゾル化した水を吸入することにより感染する。近年、レジオネラ属菌が、老人ホームの浴槽水や24時間風呂、銭湯などから検出され、それらの利用者がレジオネラ肺炎で死亡する事例が相次いでいる。静岡県では、平成12年に温泉レジャー施設の循環式濾過式浴槽水を感染源とするレジオネラ症が集団発生しており¹⁾、その他全国各地でもレジオネラ症の報告がある。平成12年12月には、「公衆浴場における水質基準等に関する基準」において、基準値が10CFU/100mlと定められた。本市では、平成13年度より経常的にレジオネラ属菌の検査を開始したのでその検査結果を報告する。

方法

1 材料

平成13年7月から12月までの間に本市社会局保健部環境衛生課により採水された広島市内の公衆浴場34施設の浴槽水を試料とした。

2 レジオネラ属菌検出法

「レジオネラ症防止指針」²⁾に記載されている冷却遠心濃縮法で行った。試料200mlを6,000rpm、30min冷却遠心分離し、沈渣を滅菌蒸留水1mlに懸濁し、200倍濃縮液とした。濃縮液を等量の0.2M HCl・KCl buffer (pH2.2)で酸処理した後、WY0 寒天培地、BCYE 寒天培地に0.1mlずつ塗末した。

37℃、5日間培養し、疑わしい集落をBCYE 寒天培地および血液寒天培地に画線し、BCYE 寒天培地のみに生えたものについて同定試験を行った。

3 レジオネラ属菌の同定

分離菌株の同定は、後述するPCR法およびレジオネラ免疫血清（デンカ生研）を用いスライドガラス凝集反応で行った。

4 PCR法によるレジオネラ属菌の検出・同定法

濃縮した浴槽水800μlを、10分間煮沸後、鋳型DNAとした。分離菌株については、BCYE 寒天培地上のコロニーを、蒸留水にMcFarland No.1程度に懸濁し、10分間煮沸後、鋳型DNAとした。プライマーはレジオネラ属の16S rRNAに特異的な配列であるLEG854B (5' -CGGTCAACTTATCGCGTTT -GCT-3')、LEG448A (5' -GAGGGTTGATAGGTTAAGAGC -3')および*Legionella pneumophila*の*mip*遺伝子上の特異的な配列であるLmipL920 (5' -GCTA -CAGACAAGGATAAGTTG-3')、LmipR1548 (5' -GTTTTGTA TGACTTTAATTCA-3')を用いた^{3),4)}。Reaction mixtureはPROMEGA社の試薬を用い調製した。反応条件はLEGプライマーでは熱変性95℃、30sec、アニーリング50℃、60sec、伸長反応72℃、60secで40サイクル増幅を行った。Lmipプライマーでは熱変性94℃、60sec、アニーリング50℃、60sec、伸長反応72℃、120secで40サイクル増幅を行った⁵⁾。増幅産物は、0.5×TBE bufferにエチジウムブロマイドを加えた泳動槽で、2%アガロースゲ

表1 レジオネラ属菌検出状況

菌数 (CFU/100ml)	検出件数 (検出率%)	遊離残留塩素濃度 (ppm) *				測定不可
		0.2未満	0.2~0.5未満	0.5~1.0未満	1.0以上	
10未満(不検出)	26(76)	4	2		18	2
10~10 ² 未満	3(8.8)	1	2			
10 ² ~10 ³ 未満	5(15)	3		1		1
計	34	8	4	1	18	3

* . 遊離残留塩素濃度は保健部環境衛生課が採水時に測定した値を用いた。

* : 現 社会局保健部食品保健課

表2 検出されたレジオネラ属菌の血清群

菌種	血清群	菌株数
<i>L. pneumophila</i>	SG1	1
	SG4	1
	SG5	3
	SG6	3
計		8

ル電気泳動により同時染色し、バンドを確認した。

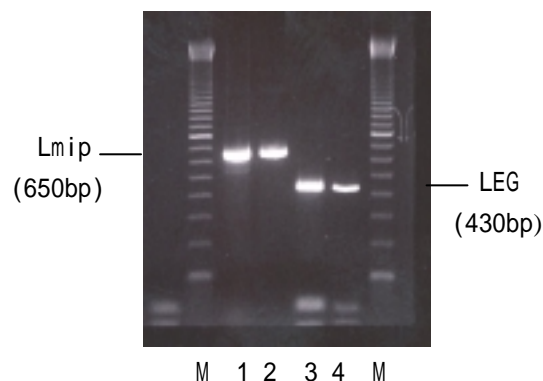
結 果

1 分離培養によるレジオネラ属菌検出状況

34 施設のレジオネラ属菌検出状況を菌数別に表1に示した。このうち、公衆浴場の水質基準である10CFU/100mlを超えたものが8施設(23.5%)あった。8施設のうち、遊離残留塩素濃度が1.0ppm未満であったものは7施設(87.5%)で、1施設は測定不可であり、低濃度の施設から検出される傾向がみられた。一方、水質基準値以内であった26施設のうち、遊離残留塩素濃度が1.0ppm未満の施設は6施設(23%)であった。一方、1.0ppm以上の施設は18施設(69%)で、そのうち2.0ppmを超えた施設が12施設(46%)であった。今回の結果では、公衆浴場における衛生管理要領で保つことが望ましいとされている浴槽水の遊離残留塩素濃度の0.2~0.4ppm以上であるにもかかわらず、レジオネラ属菌が検出される施設がみられた。

2 検出されたレジオネラ属菌の血清群

分離培養でレジオネラ属菌が検出された8施設の分離株について行った血清群別結果を表2に示した。すべてが*L. pneumophila*の抗血清に凝集し、SG5が3検体(37.5%)、SG6が3検体(37.5%)、SG1およびSG4がそれぞれ1検体(12.5%)であった。



レーンM：100bpラダー
 レーン1：SG1
 レーン2：SG5
 レーン3：SG1
 レーン4：SG5

図3 LEGおよびLmipプライマーを用いたPCR増幅産物の泳動像

3 PCR法によるレジオネラ属菌検出状況

LEGおよびLmipプライマーを用いた*L. pneumophila* SG1凝集株およびSG5凝集株のPCR増幅結果を図3に、また、濃縮した浴槽水および分離培養した菌株について行ったPCRの結果を表3に示した。8施設の分離菌株はすべてPCR陽性であった。一方、濃縮した浴槽水は試験した5施設のうち、レジオネラ属菌数が $10^2 \sim 10^3$ CFU/100ml未満の1施設および10CFU/100ml未満の1施設の計2施設が陽性であった。

以上の成績から、今回使用したプライマーは、過去に有用性の報告されているプライマーであるが、今回の結果からも、性状等で菌種を同定しにくいレジオネラ属菌の同定手段として有用と考えられた。一方、浴槽水の濃縮液を用いたPCR法では、生菌が存在しなくても陽性反応が得られる可

表3 PCR法によるレジオネラ属菌検出状況

レジオネラ属菌数 (CFU/100ml)	PCR 検出数(検出数/検査数)		
	分離菌(n=8)		濃縮した浴槽水(n=5)
	LEG プライマー	Lmip プライマー	LEG プライマー
10 未満(未検出)			1/1
10 ~ 10^2 未満	3/3	3/3	0/2
$10^2 \sim 10^3$ 未満	5/5	5/5	1/2
計	8/8	8/8	2/5

能性があるため、分離培養の結果とは必ずしも一致しないことがあるが、今回の結果からみると、さらに検出感度を上げることができれば、レジオネラ属菌が存在している、または存在していた可能性を迅速に推測できるため、スクリーニング検査として有用であると考えられる。

今回の調査で平成 13 年度広島市内における公衆浴場浴槽水のレジオネラ属菌汚染状況を検査した結果、34 施設のうち 8 施設(23.5%)からレジオネラ属菌が検出された。宮崎県での集団感染事例の例などをみても、今後も定期的に検査を実施し、レジオネラ症未然防止のため努力していく必要があると思われる。

文 献

1) 杉山寛治 他：静岡県温泉レジャー施設におけ

るレジオネラ症集団発生 - 検査面から - , 感染症学雑誌, 75, 82, (2001)

- 2) 厚生省生活衛生局監修：新版レジオネラ症防止指針,(財)ビル管理教育研修センター(1999)
- 3) Miyamoto, H et al : Development of a new semi nested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of Legionellae in hospital cooling tower water , Appl Environ Microbiol , 63, 2489 ~ 2494(1997)
- 4) 山本啓之：遺伝子による検出方法,臨床と微生物, 25, 35 ~ 39(1998)
- 5) 力田正二 他：PCR を用いたレジオネラの同定について,福島県衛生公害研究所年報,16,82 ~ 84(1998)