

原 著

マイクロコロニー蛍光抗体法の温泉施設管理への応用

馬場貴志¹⁾, 山口進康¹⁾, 那須正夫^{1)*}

(平成 23 年 10 月 7 日受付, 平成 23 年 12 月 14 日受理)

Application of Microcolony Method Combined with Direct Fluorescent Antibody Staining for Bathing Facilities

Takashi BABA¹⁾, Nobuyasu YAMAGUCHI¹⁾ and Masao NASU^{1)*}

Abstract

Legionellosis have been steadily increasing and the main source of contamination is considered to be water from bathing facilities and spas in Japan. To prevent of the outbreaks of Legionnaires' disease, rapid detection of active *Legionella pneumophila* followed by the appropriate disinfection were essential. Therefore, we applied the microcolony-fluorescent antibody (MC-FA) method for rapid detection of active *L. pneumophila* for water hygiene management in bathing facilities. Two bathing facilities, MC-FA method allowed rapid detection of active *L. pneumophila* (within 48 hours). Furthermore, active *L. pneumophila* was detected by MC-FA method even in the point where no active cells were detected by the culture method after cleaning. These findings suggest that this MC-FA method could be useful as a rapid monitoring technique of *L. pneumophila* for the prevention of Legionnaires' disease outbreaks.

Key words : Hot spring water, *Legionella pneumophila*, Proliferation activity, Rapid method, Cleaning, Water hygiene management

要 旨

温泉や入浴施設で問題となっているレジオネラ属菌の検査には培養法が広く用いられているが、結果を得るまでに1週間以上を要する。レジオネラ感染症のアウトブレイクを防止するためには、レジオネラ属菌、特に「生きている」*Legionella pneumophila*を迅速に定量し、清掃等の適切な対策を講ずることがもっとも効果的である。そこで本研究では、レジオネラ生菌数を3日間以内に測定可能であるマイクロコロニー蛍光抗体法を用い、温泉施設管理へ応用した。源泉かけ流し方式および加温循環方式の施設を対象として、源泉から浴槽までの各箇所での試料採取および清掃前後での試料採取を行った。その結果、マイクロコロニー蛍光抗体法に

¹⁾ 大阪大学大学院薬学研究科衛生・微生物学分野 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6. ¹⁾ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

*Corresponding author.

より、従来の培養法とほぼ同等の結果を約 48 時間で得ることができた。さらに、従来の培養法では検出できなかった試料においてもレジオネラ生菌を検出可能であった。また、レジオネラ属菌の低減には、清掃が非常に効果的であること、そしてマイクロコロニー蛍光抗体法を用いることで、レジオネラ生菌が残存しやすい個所など、施設管理を行う上で重要な情報を迅速に得られることがわかった。本手法は温泉施設の衛生微生物学的な現状の詳細な把握と、迅速な対応を可能とするものであり、レジオネラ症のアウトブレイクの防止、さらにはより安心・安全な温泉の確保に大きく貢献できると考えられる。

キーワード：温泉水, レジオネラニューモフィラ, 増殖活性, 迅速測定法, 清掃, 衛生管理

1. はじめに

Legionella pneumophila は、レジオネラ症の原因細菌として知られており (Fields *et al.*, 2002), 1976 年にアメリカ・フィラデルフィアで最初のレジオネラ症の集団感染が確認されたクーリングタワーを始めとして (Brenner *et al.*, 1979; Fraser *et al.*, 1977), 噴水やシャワーなど水を循環使用する施設においてしばしば爆発的に増殖し、レジオネラ症のアウトブレイクを引き起こしている (Steinert *et al.*, 2002; Borella *et al.*, 2005; Leoni *et al.*, 2005; Wery *et al.*, 2008). その発生件数は年々増加しており (感染症情報センター), レジオネラ感染症への関心が高まっている。日本においては、大型スパや温泉など入浴施設を中心に報告事例が多い (数内ら, 1995; 鈴木ら, 2002; 古畑ら, 2004; 岡山, 2005; 笹原ら, 2004; 中館ら, 1999). このような施設では、不特定多数の人が入浴するために集団感染がおこりやすく、重篤な事故も報告されている (吉國ら, 2003; 岡田ら, 2005; Kura *et al.*, 2006).

レジオネラ症発症のリスクの低減には、施設の適切な維持管理が最も基本であり、そのための方法として、レジオネラ属菌のモニタリングを行うことにより、増殖の兆候をいち早く捉え、清掃・消毒などの対策を講じることができれば、レジオネラ症のアウトブレイクを未然に防止できると考えられる。

L. pneumophila の検出は培養法を中心に行われているが、結果を得るまでに 7~10 日間を要する。これでは *L. pneumophila* の増加が確認された段階で対策を講じたとしても、手遅れになる可能性がある。そこで、迅速な測定法が必要とされており、レジオネラ防止指針第 3 版 (財団法人ビル管理教育センター, 2009) にもリアルタイム PCR 法が記載されるなど遺伝子を標的とした方法も用いられつつある (Wellinghausen *et al.*, 2001; Solhang and Bergh 2006). また、従来のリアルタイム PCR 法では困難であった *L. pneumophila* の生死を判別するために、膜の健全性を指標とした手法が報告される (Delgado-Viscogliosi *et al.*, 2009) など、「生きている」*L. pneumophila* を捉える重要性が増してきている。そこで本研究では、増殖活性を指標とした細菌の迅速検出法であるマイクロコロニー法を応用した。マイクロコロニーとは短時間培養することにより形成される数回分裂した数十 μm 程度の微細なコロニーのことであり、このマイクロコロニーを検出対象とすることで通常の培養法に比べて培養時間が短縮でき、迅速検出が可能となる (Rodrigues *et al.*, 1988). また、環境中には肉眼で観察できる大きさのコロニーは形成しないが、マイクロコロニーまでは形成できる細菌が多く存在することが明らかになっている (Kawai *et al.*, 1999; 馬場ら, 2007) ことから、より高精度な検出も可能となる。さらに本研究では *L. pneumophila* に特異的な蛍光抗体を組み合わせたマイクロコロニー蛍光抗体法を用いて、温泉施設の維持管理への応用を行った。

2. 方 法

2.1 試料採取

浴槽水試料は 2004 年 11 月～2005 年 12 月に、源泉かけ流し方式（施設 A）および加温循環方式（施設 B）の 2 施設において、清掃前後の浴槽水を滅菌したプラスチックボトルに採取した。各地点 1L を採取し、平板培養法およびマイクロコロニー蛍光抗体法により *L. pneumophila* 数を測定した。

2.2 培養法による *L. pneumophila* 数の測定

培養法による *L. pneumophila* 数の測定はレジオネラ症防止指針に準じておこなった。各 500 mL を孔径 0.2 μm のポリカーボネートフィルターでろ過した。フィルターを 5 mL のろ過滅菌水に懸濁したのち、50°C、30 分の熱処理を行い、試料とした。それらをろ過滅菌水によって段階希釈し、WYO α 寒天培地に 100 μl ずつ塗抹し、37°C で 7 日間培養した。形成したコロニーを観察し、灰白色を示すコロニーを釣菌し、羊血液/BCYE α 寒天培地上で、37°C で 2 日間培養した。BCYE α 寒天培地上で増殖し、羊血液培地で増殖しなかったコロニーについて、レジオネラ免疫血清（デンカ生研）を用いて凝集反応を観察し、レジオネラ血清群を同定した。

2.3 マイクロコロニー蛍光抗体法による *L. pneumophila* 数の測定

マイクロコロニー蛍光抗体法による *L. pneumophila* 数の測定にあたっては、熱処理までは培養法と同様に行った。熱処理済み試料各 1 mL を孔径 0.2 μm の酸化アルミニウム製メンブレンフィルター（ANODISC 25, Whatman）でろ過し、細菌をフィルター上に捕集した。フィルターをろ過面を上にして WYO α 寒天培地上に静置し、37°C で 48 時間培養した。その後 4% ホルムアルデヒドを染み込ませたろ紙上にフィルターを 30 分間静置し、細菌を固定した。滅菌水を染み込ませたろ紙上にフィルターを 10 分間静置して洗浄し、風乾した後、蛍光抗体を用いて染色した。

蛍光抗体は FITC-labeled anti-*Legionella pneumophila* sg1-14 antibody（Monoclonal technologies Inc., GA, USA）を用いた。10 μL の蛍光抗体を 3% 牛アルブミン血清（BSA）を含有したリン酸緩衝液（pH7.2）で 600 μL に希釈した。スライドガラス上に染色液を滴下し、その上にフィルターを静置し、ハイブリチャンバー内で 30°C、30 分間染色した。フィルターをリン酸緩衝液を染み込ませたろ紙上に移し、暗所で 15 分間静置し、洗浄した。ろ紙で余分な水分を除去した後、蛍光顕微鏡（E400, Nikon）を用いて、青色励起光下で計数した。計数にあたっては、20 視野を計数した（岡本ら, 2009）。また、計数時に 1 視野あたりのマイクロコロニー数の平均値が 2 以下となった場合は、フィルター全面を計数した。

3. 結 果

マイクロコロニー蛍光抗体法を用いて、浴槽水中の *L. pneumophila* を検出した蛍光顕微鏡画像を Fig. 1 に示した。44～48 時間培養を行うことにより、直径 20～50 μm 程度のマイクロコロニーが形成された（Fig. 1a）。計数不能（too numerous to count : TNTC）となった場合は、マイクロコロニー同士が結合し、視野一面に *L. pneumophila* が広がっており、明らかに異常と判断することができた（Fig. 1b）。

2 施設において、培養法およびマイクロコロニー法を用いて、*L. pneumophila* 数を測定した結果を Table 1 および Table 2 に示した。施設 A では、どちらの手法でも源泉および加水用の地下水

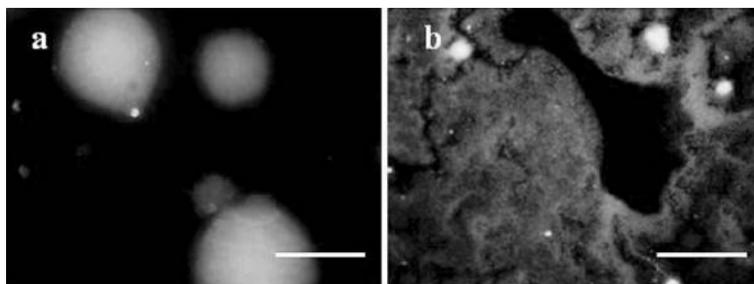


Fig. 1 Fluorescent microscopic images of microcolonies of *Legionella pneumophila*. a : microcolonies of *L. pneumophila* in bath water samples. b : TNTC (too numerous to count). Scale bars : 50 micrometer.

Table 1 Quantification of *L. pneumophila* in hot spring water samples (Bathing facility A).

| Sampling point | | Temperature (°C) | pH | Colony-forming <i>L. pneumophila</i> (CFU/100 mL) | Microcolony-forming <i>L. pneumophila</i> ^{*1} (mCFU ^{*2} /100 mL) |
|------------------|----------------------------|------------------|-----|---|--|
| Source | Source | 60 | 7.3 | ND ^{*1} | 0 |
| | Ground water ^{*3} | 17 | 7.7 | ND | 0 |
| Before cleanning | | | | | |
| Indoor | Bath a | 42 | 7.4 | 10 | 22 |
| | Bath b | 42 | 7.3 | ND | 0 |
| | Bath c | 41 | 7.4 | 70 | 9 |
| | Bath d | 42 | 7.2 | ND | 8 |
| Open air | Bath e | 42 | 7.5 | ND | 9 |
| | Bath f | 40 | 7.6 | 10 | 7 |
| | Wooden bath | 41 | 7.4 | 40 | 7 |
| | Ceramic bath | 41 | 7.3 | 40 | 2 |
| After cleanning | | | | | |
| Indoor | Bath a | 42 | 7.5 | ND | 0 |
| | Bath b | 42 | 7.4 | ND | 3 |
| | Bath c | 41 | 7.5 | ND | 0 |
| | Bath d | 41 | 7.4 | ND | 0 |
| Open air | Bath e | 41 | 7.6 | ND | 5 |
| | Bath f | 42 | 7.4 | 10 | 6 |
| | Wooden bath | 41 | 7.3 | ND | 3 |
| | Ceramic bath | 41 | 7.2 | ND | 0 |

^{*1} : Means of two replicates.

^{*2} : Microcolony-forming units.

^{*3} : Used for temperature control of hot spring water.

^{*1} : Under detection limit (10 CFU/100 mL).

中から *L. pneumophila* は検出されなかった (Table 1). しかし, 清掃前の浴槽水からは培養法およびマイクロコロニー法により *L. pneumophila* が検出された. 一方, 清掃を行うことにより, *L. pneumophila* は減少し, 培養法においては外湯を除き, 検出されなかった. しかしながら清掃後に

Table 2 Quantification of *L. pneumophila* in hot spring water samples (Bathing facility B).

| Sampling point | | Temperature (°C) | pH | Colony-forming <i>L. pneumophila</i> (CFU/100mL) | Microcolony-forming <i>L. pneumophila</i> ^{*1} (mCFU ^{*2} /100mL) |
|-----------------|-----------------------------|------------------|-----|--|---|
| Source | | | | | |
| | Tank | 60 | 7.3 | 0 | 0 |
| Before cleaning | | | | | |
| | Filtration system | — | — | 1.6 × 10 ⁴ | TNTC ^{*3} |
| | Maifan stones ^{*4} | — | — | 25 ^{*5} | 13 ^{*5} |
| | Inlet to bath a | 42 | 8.7 | 1.4 × 10 ³ | TNTC |
| | Inlet to bath b | 41 | 8.6 | 9.6 × 10 ³ | TNTC |
| ----- | | | | | |
| Indoor | Bath a | 39 | 8.8 | 8.8 × 10 ³ | TNTC |
| | Bath b | 40 | 8.9 | 7.9 × 10 ³ | TNTC |
| After cleaning | | | | | |
| | Filtration system | — | — | NT ^{*6} | NT |
| | Maifan stones ^{*4} | — | — | ND ^{*7} | 3 ^{*5} |
| | Inlet to bath a | 41 | 8.7 | ND | 3 |
| | Inlet to bath b | 41 | 8.8 | ND | 0 |
| ----- | | | | | |
| Indoor | Bath a | 40 | 8.8 | ND | 1 |
| | Bath b | 40 | 8.8 | ND | 1 |

^{*1}: Means of two replicates.

^{*2}: Microcolony-forming units.

^{*3}: Too numerous to count or over growth.

^{*4}: Filtering materials of filtration system.

^{*5}: Bacterial number on maifan stones (CFU or mCFU/g maifan stones).

^{*6}: Not tested.

^{*7}: Under detection limit (10 CFU/100 mL).

において、培養法で検出されないにも関わらず、マイクロコロニー法で検出された試料があり、特に屋外に設置された浴槽においてその傾向が顕著であった。

施設 B では、顕著な *L. pneumophila* の増加が認められ、浴槽だけでなく、ろ過システムおよびろ過資材である麦飯石からも培養法で 100 mL あたり、10³~10⁴ CFU が検出された (Table 2)。一方、マイクロコロニー法では、*L. pneumophila* 数が多すぎるため計数不能 (too numerous to count : TNTC) となった。ただちに配管洗浄、塩素消毒などの清掃を行うことにより培養法では検出されなくなったが、マイクロコロニー法では、麦飯石や浴槽への流入口、および浴槽において数は少ないが、*L. pneumophila* が検出された。

4. 考 察

施設 A は源泉かけ流しであり、源泉の温度も 60°C と高いことから、源泉では *L. pneumophila* は検出されず、さらに加水用の地下水からも検出されていないにも関わらず、浴槽から検出された (Table 1)。つまり、かけ流し方式であっても、不特定多数の人が入浴することにより、外部からレジオネラが持ち込まれる可能性があり、その後の施設の維持管理が重要であることがわかる。実際に、周辺の登山やハイキング後の利用者も多く、土壌などを介して持ち込まれている可能性が考

えられる。本施設においては、毎日完全に浴槽水を抜き、洗剤などをもちいた清掃を徹底しており、清掃後には培養法では *L. pneumophila* は検出されなかった。しかしながら、細菌数は少ないもののマイクロコロニー蛍光抗体法では検出された試料があったことから、増殖活性をもつ *L. pneumophila* が生残していることがわかった。さらに、露天風呂や檜風呂など清掃しにくい場所でその傾向が顕著であることがわかった。

施設 B は源泉を加温・循環しており、さらに適切な維持管理を怠ったために *L. pneumophila* の顕著な増加を引き起こした。配管洗浄など清掃を行うことにより *L. pneumophila* は検出されなくなったが、施設 A と同様にマイクロコロニー法では検出された (Table 2)。特に浴槽への流入口から検出されていることから、循環設備内部のろ過資材などに生残している可能性があり、実際にろ過資材の一つである麦飯石にも *L. pneumophila* が生残していた。

このようにレジオネラ症発症のリスクとなる *L. pneumophila* を減少させるためには、やはり清掃が最も重要かつ効果的であることがわかった。それに加えて、マイクロコロニー蛍光抗体法など新手法を用いることにより、清掃の効果や施設の衛生微生物学的な現状を迅速に知ることができる。また、本法は試料をフィルター上に濃縮することにより検出限界を向上できるため、培養法で検出限界 (10 CFU/100 mL) 以下となる試料においても検出可能である。本研究においては、マイクロコロニー蛍光抗体法で検出されなければ、培養法でも検出されないことから、本法を自主管理のためのモニタリング法として用いることにより、レジオネラ症の発症のリスクを低減できると考えられる。

5. ま と め

マイクロコロニー蛍光抗体法は温泉施設における増殖可能な *L. pneumophila* の迅速モニタリング法として有用であり、培養法と同等以上の感度があることから、施設の衛生微生物学的現状を詳細に把握することができる。レジオネラ症発症のリスクを下げるためには、清掃などの維持管理が必須であり、その際には管理者の認識が重要である。施設内のどのような場所に *L. pneumophila* が生存するのか、あるいは生残しやすいのかを把握しておくことは、施設管理を行う上で重要であることから、本手法を自主検査等へ応用することにより、温泉施設の安全性の確保に貢献できるものと考えられる。

引用文献

- 馬場貴志, 山口進康, 青木一洋, 那須正夫 (2007) : マイクロコロニー自動計数システムによる水環境中の生菌数の迅速計測. 防菌防黴, 35 : 719-724.
- Borella, P., Montagna, T., Stampi, S., Stancanelli, G., Romano-Spica, V., Triassi, M., Marchesi, I., Bargellini, A., Tatò, D., Napoli, C., Zanetti, F., Leoni, E., Moro, M., Scaltriti, S., D'Alcalà, G.R., Santarpia, R. and Boccia, S. (2005) : *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. Appl. Environ. Microbiol., 71, 5805-5813.
- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G. and McDade, J.E. (1979) : Classification of the Legionnaires' disease bacterium : *Legionella pneumophila* genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. Ann. Intern. Med., 90, 656-658.
- 財団法人ビル管理教育センター (2009) : レジオネラ症防止指針 第3版. pp. 109-115. 財団法人ビル管理教育センター, 東京.
- Delgado-Viscogliosi, P., Solignac, L. and Delattre, J.M. (2009) : Viability PCR, a culture-independent

- method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cell in environmental water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3502-3512.
- Fields, B.S., Benson, R.F. and Besser, R.E. (2002) : *Legionella* and Legionnaires' disease : 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 506-526.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C. and Brachman, P.S. (1977) : Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, **297**, 1189-1197.
- 古畑勝則, 原 元宣, 吉田真一, 福山正文 (2004) : 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況. *感染症誌*, **78**, 710-716.
- Kawai, M., Yamaguchi, N. and Nasu, M. (1999) : Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 496-504.
- Kura, F., Amemura-Maegawa, J., Yagita, K., Endo, T., Ikeno, M., Tsuji, H., Taguchi, M., Kobayashi, K., Ishii, E. and Watanabe, H. (2006) : Outbreak of Legionnaires' disease on cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. *Epidemiol. Infect.*, **134**, 385-391.
- Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P.P., Sacchetti, R., Stampi, S. and Zanetti, F. (2005) : *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 373-379.
- 中館俊英, 山内広平, 井上洋西 (1999) : 温泉を感染源としたレジオネラ肺炎の集団発生例. *日呼吸会誌*, **37**, 601-607.
- 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 前川純子, 渡辺治雄, 八木田健司, 遠藤卓郎, 鈴木 泉 (2005) : 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例. *感染症誌*, **79**, 365-374.
- 岡本晃典, 山口進康, 馬場貴志, 高木達也, 那須正夫 (2009) : 細菌数測定法における誤差分布の推定. *医薬品研究*, **40**, 1-8.
- 岡山昭彦 (2005) : レジオネラ症 : 国内におけるアウトブレイク. *臨床と微生物*, **32**, 360-364.
- Rodrigues, U.M. and Kroll, R.G. (1988) : Rapid selective enumeration of bacteria in foods using a microcolony epifluorescence microscopy technique. *J. Appl. Bacteriol.*, **64**, 65-78.
- 笹原武志, 菊野理津子, 奥田舜治, 関口朋子, 佐藤義則, 高山陽子, 青木正人, 井上松久 (2004) : 温泉水における *Legionella* 属菌汚染と泉質に関する調査・研究. *感染症誌*, **78**, 545-553.
- Solhang, A. and Bergh, K. (2006) : Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by *mip* sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 6394-6398.
- Steinert, M., Hentschel, U. and Hacker, J. (2002) : *Legionella pneumophila* : an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**, 149-162.
- 鈴木敦子, 市瀬正之, 松江隆之, 天野祐次, 寺山 武, 泉山信司, 遠藤卓郎 (2002) : 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況. *感染症誌*, **76**, 703-710.
- Wellinghausen, N., Frost, C. and Marre, R. (2001) : Detection of Legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3985-3993.
- Wery, N., Bru-Adan, V., Minervini, C., Delgènes, J.P., Garrelly, L. and Godon, J.J. (2008) : Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a

cooling tower facility. Appl. Environ. Microbiol., **74**, 3030-3037.

数内栄子, 森正道, 斎藤厚 (1995) : *Legionella pneumophila* serogroup 7 による pontiac fever の
集団発生例Ⅱ. 疫学調査結果. 感染症誌, **69**, 654-665.

吉國謙一郎, 中山浩一郎, 本田俊郎, 新川奈緒美, 有馬忠行, 湯又義勝, 伊藤祐治 (2003) : 循環
濾過式浴槽水が原因と推定されたレジオネラ症集団発生事例—鹿児島. 病原微生物検出情,
24, 31-32.

本論文の一部は, 2006年9月6日 日本温泉科学会第59回大会で発表した.