

浴槽水のレジオネラ属菌検査における迅速検査法導入の結果

保健科学課 細菌担当

1 はじめに

福岡市では、公衆浴場法に基づく衛生管理として、公衆浴場や社会福祉施設の浴槽水等（以下、「浴槽水」とする。）についてレジオネラ属菌検査を実施しており、年間約400検体の検査を行っている。平成29年度まで第3版 レジオネラ症防止指針¹⁾（以下、「防止指針」とする。）を参考に、培養法で検査を行っていたが、培養期間は7日間と定められており、検査結果が出るまでに時間を要していた。そこで迅速な陰性確認を目的として、リアルタイムPCR（以下、「qPCR」とする。）を用いた迅速検査法を開発し²⁾、平成30年度から運用を開始した。迅速検査法導入前後3年間のレジオネラ属菌検査結果及びレジオネラ属菌陽性施設の過去5年間の検査結果の解析結果を報告する。

2 検査方法

平成29～令和元年度に採水された浴槽水1,185検体について、平成29年度は培養法、平成30～令和元年度は迅速検査法及び培養法によりレジオネラ属菌検査を実施した。検査のフロー図を図1に示す。

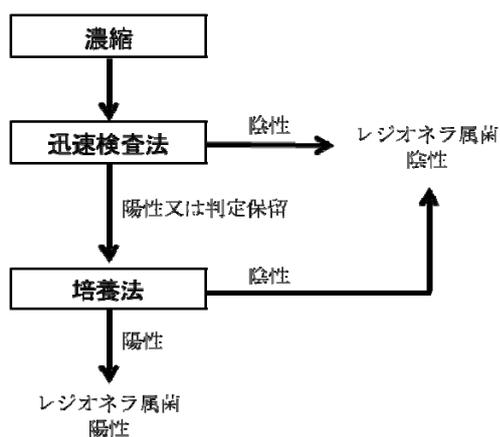


図1 検査方法フロー図

2.1 濃縮

防止指針のろ過濃縮法に準じ、検水500 mLを、直径47 mm、孔径0.2 µmのポリカーボネート製メンブランフィルター(ADVANTEC)で吸引ろ過後、メンブランフィルター

を滅菌水2.5 mLで洗浄し200倍（一部の検体は100倍）濃縮液（以下、「濃縮液」とする。）とした。

2.2 迅速検査法

微量高速冷却遠心機 MX-205 (TOMY) を用い濃縮液 500 µL を 800×g, 1 分間低速遠心後上清を採取した。この上清を 12,800×g, 5 分間遠心した。上清を除去し、沈渣に滅菌水 500 µL を加えた。12,800×g, 5 分間遠心後上清を除去し、沈渣から熱抽出法で遺伝子を抽出した。得られた遺伝子を鋳型 DNA として qPCR を行い、Ct 値が得られたものを陽性とした。qPCR 条件等は既報²⁾ のとおり。

qPCRで陰性となった検体については、レジオネラ属菌陰性と判定し、検査終了とした。qPCRで陽性又はPCR反応阻害の確認のためのインターナルコントロールが検出されず判定保留となった検体については、培養法を実施し、7日間の培養後に結果判定を行った。

2.3 培養法

濃縮液を等量のレジオネラ酸処理液（0.2 mol/L HCl・KCl buffer pH2.2, 関東化学）で混和し 5 分間反応したものを試料液とし、試料液 0.1 mL を滅菌生理食塩水 2.4 mL と混合し希釈液を作製した。試料液及び希釈液各 100 µL を MWY 寒天培地（関東化学）に 1 枚ずつ塗抹し、36°C で 7 日間培養後レジオネラ属菌数を調べた。

3 検査結果及び考察

3.1 過去3年間の検査結果

平成 29～令和元年度における浴槽水のレジオネラ属菌検査結果を表 1 に示す。培養法陽性のものを「陽性」、qPCR 陰性のものを「遺伝子 (-)」、qPCR 陽性又は判定保留かつ培養法陰性のものを「遺伝子(±)・培養(-)」として集計した。

3 年とも、陽性率は 10%程度で横ばいであった。迅速検査法導入後の平成 30 年度及び令和元年度において、レジオネラ属菌陰性と判定された検体のうち qPCR 陽性又は判定保留のものはそれぞれ 104 検体 (26.7%)、126 検体 (32.2%) と、全体の 30%程度を占めていた。これらの検体についてレジオネラ属菌の生菌は検出されていないが、レジオネラ属菌の遺伝子は存在する可能性がある。

表 1 平成 29～令和元年度における浴槽水のレジオネラ属菌検査結果

検査結果	H29	H30	R 元
陽性	43 (10.6%)	42 (10.8%)	32 (8.2%)
陰性	遺伝子 (-)	244 (62.6%)	233 (59.6%)
	遺伝子 (±)・培養 (-)	104 (26.7%)	126 (32.2%)
計	404	390	391

※平成 29 年度は迅速検査法導入前のためすべて培養法のみ結果を示す

表 2 平成 29～令和元年度のレジオネラ属菌数の分布

菌数 (cfu/100mL)	H29	H30	R 元
10 ¹	28	34	22
10 ²	10	6	8
10 ³	4	1	1
10 ⁴	0	1	1
10 ⁵	1	0	0

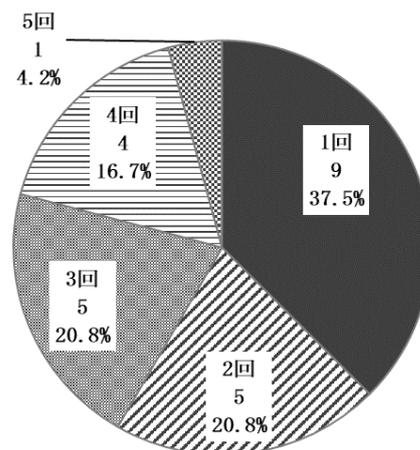


図 2 令和元年度陽性施設の過去 5 年間の陽性回数

ることが示された。迅速検査法の導入によりレジオネラ属菌の痕跡が明らかになったことで、施設の衛生指導に有用な情報を提供することができるようになった。

また、迅速検査法の導入により、平成 30 年度には 244 検体 (62.6%)、令和元年度には 233 検体 (59.6%) について qPCR による陰性判定を行った。これらの陰性検体については検査開始日に結果判定を行うことができたため、検査結果が出るまでの時間が従来の 7 日後から大幅に短縮された。

培養法で陽性になった検体について、菌数の分布を表 2 に示す。検体数としては 2～5 件と少ないものの、どの年度でも 1.0×10^3 cfu/100mL 以上のレジオネラ属菌が検出されている。 5.0×10^3 cfu/100mL を超える濃度ではレジオネラ症集団発生の危険性が高いとの報告³⁾もあることから、菌数が多い施設は特に注視する必要がある。

3.2 培養法陽性施設の陽性回数

令和元年度に培養法陽性（以下、「陽性」とする。）

の 32 検体を採水した 24 施設について、過去 5 年間の検査結果を遡った結果を図 2 に示す。陽性の 24 施設のうち、平成 27～令和元年度に 2 回以上陽性となったのは 15 施設 (62.5%) であった。同じ施設で複数回レジオネラ属菌が検出される傾向があることから、陽性となった施設に対して、継続して衛生指導を行っていく必要があることが示唆された。

文献

- 1) 財団法人 ビル管理教育センター：第 3 版 レジオネラ症防止指針，2009
- 2) 松永典久，他：リアルタイム PCR 法を用いた浴槽水等のレジオネラ属菌迅速検査法の開発，福岡市保健環境研究所報，43，52～58，2018
- 3) 岡田美香，他：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 I.発症状況と感染調査，感染症学雑誌，79，365～374，2005