

レジオネラ属菌集落の形態観察法について

柳沼幸 山田光一 平澤恭子 斎藤和男
理化学課

要 旨

レジオネラ属菌検査は、検査法が明確に示されていないため、各検査機関で検査方法が異なり、検査結果に影響がでていると推測された。そこで、培養により出現したレジオネラ属菌の集落形態観察に斜光法を用いることにより、検査技術の均一化を図ることを目的とした。斜光法では培養日数によって集落の見え方が変わってくる。そのため、当所で使用している分離培地で、観察に最適な培養日数を探るため検討を行った。また、斜光法により複数の血清群の集落を選択することが可能かについても、併せて検討を行った。

その結果、斜光法でレジオネラ属菌と推定された菌は、PCR法で *Legionella pneumophila* と確認され、斜光法はレジオネラ属菌とそれ以外の菌を区別するのに有用であった。観察に適した培養日数は菌及び培地の性状によって異なり、集落が出現した時点から観察することが重要であった。また、斜光法による観察では、各集落は血清群により特有の傾向は示さなかったが、集落選択の補助として利用すれば、複数の血清群の *Legionella pneumophila* を検出できる可能性は高くなると考えられた。

キーワード：レジオネラ属菌，斜光法，血清群別判定

はじめに

レジオネラ属菌は「公衆浴場における衛生管理要領等の改正について」（平成15年2月14日付健発第0214004号厚生労働省健康局長通知）の中で基準値が明記されている。しかし、検査法については「新版レジオネラ症防止指針」の「〈付録〉1 環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること¹⁾²⁾と記されているのみで、明確には示されていない。そのため、検査機関ごとに検査方法が異なり、検査結果に影響していると思われる。また、菌数算定や確認試験を行う際は、経験をもとに検査を進めており、個人の裁量に大きく左右されている可能性がある。森本ら³⁾⁴⁾は「簡便な培養法、特に集落形態観察による効率的な培養法の実験・検討」でレジオネラ用選択分離培地に発育した集落に光をあて実態顕微鏡で観察する方法（以下“斜光法”とする）の有用性を報告している。そこで、検査技術の均一化を図ることを目的に、斜光法の検討を行った。しかし、斜光法は培養日数によって集落の見え方が変化し、判定が困難になるこ

とがある。そのため、斜光法で観察を行う最良の培養日数を探る検討を行った。

また、*Legionella pneumophila*（以下“*L.pneumophila*”とする）を斜光法で観察すると、血清群によって色やモザイク様構造に違いが見られる。浴槽水には、複数の血清群の *L.pneumophila* が含まれていることがあり、その際、集落選択の補助として斜光法が利用可能なのかを知るため、血清群ごとに同じ傾向を示すのか、併せて検討を行った。

材 料

- 1) 2008年度に搬入された浴槽水の中から、陽性になった3検体を使用した。
- 2) 当所で保管している2001～2008年度分の凍結保存菌株を、血清群別に1～3株ずつ、総数35株を使用した。

方 法

1 培養日数と外観的特徴の関係についての検討

- 1) 試料前処理

浴槽水をメンブランフィルター法により濃縮。さらに、酸処理液(0.2M HCl・KCl buffer (pH2.2))を加え、濃縮倍率の異なる検液を作成した。それらを WYO α 培地(栄研化学)に 100 μ L 塗布し、36 $^{\circ}$ Cで培養した。保存菌株については、血清群を混合した菌液、ならびに 35 株それぞれを WYO α 培地に塗布し、36 $^{\circ}$ Cで培養した。

2) 斜光法による推定試験

培地上に 3 日目以降に発育した集落を、図 1 に示した実態顕微鏡(Nikon)及び光源(OLYMPUS TGHM)を用いて斜光法で、7 日目まで観察した。

3) 確定試験

斜光法による推定試験により特徴的外観構造(集落の辺縁部のモザイク様・中心部の綿様(図 2))が見られた集落に、レジオネラ血清群別試験(デンカ生研)を行った。また、血清群が判定された集落及び分離培地上の疑わしい集落について「病原体検出マニュアル」(国立感染症研究所)に記載されているプライマー(表 1)を使用し、PCR 試験にて確定試験を行った。



図 1 斜光法のための装置



図 2 *L. pneumophila*

2 *L. pneumophila*の血清群の違いによる見え方の違いについての検討

L.pneumophila の血清群 1 ~ 10, 12, 15 群, 群不明株をそれぞれ 1 ~ 3 株ずつ, 総数 35 株からそれぞれ菌液を作成した。それらを WYO α 培地に塗布後 36 $^{\circ}$ Cで培養した。

以降の操作は、上記“1 培養日数と外観的特徴の関係についての検討 2), 3)”と同様に行った。ただし、PCR 試験は血清群別判定で判定不能であった菌株に対してのみ行った。

結果及び考察

1 培養日数と外観的特徴の関係についての検討

3 日目以降 WYO α 培地に発育した集落の中から、表 2 のように観察領域を決め、経時的に観察した後、確定試験を行った。結果を表 3 に示す。

多くの集落は、3 日目から 4 日目に特徴的

外観構造が最も顕著にみられた。また、集落に色がついて見えるものもあり、それらの集落はモザイク様構造が確認しやすかった。色は日数の経過と共になくなってしまう場合が多く、それと共に外観的特徴も確認しにくくなった。しかし、典型的な特徴を残したまま発育する集落もあった。どのような集落でも日数が経過するほど特徴は確認しにくくなる傾向があり、集落が出現した時点から観察する必要があると思われた。

2 *L. pneumophila*の血清群の違いによる見え方の違いについての検討

領域 2 (図 3) のように集落が重なっている場所において斜光法を行うと、色やモザイク様構造の異なる集落を見分けることができた。これは数種類のレジオネラ属菌が存在していると考えられたため、それぞれ

表1 プライマーの塩基配列

* Mixed base の表記は国際表記に準じて R (A, g) 及び Y (C, T) とする.

5SrRNA (レジオネラ属菌特異的)	
Forward (5-29)	5'-GGCGACTATAGCGRITTTGGAA-3'
Reverse (91-112)	5'-GCGATGACCTACTTTCRCATGA-3'
mip (<i>Legionella pneumophila</i> 特異的)	
Forward (948-965)	5'-GCATTGGTGCCGATTTGG-3'
Reverse (1092-1115)	5'-GYTTTGCCATCAAATCTTTYTGAA-3'

特徴の異なる集落について釣菌し，確定試験を行った．その結果，*L.pneumophila* の血清型 2 群，5 群，6 群の 3 種類の群を検出することができた．領域 2 以外の観察領域でも，外観的特徴に違いの見られるものは，血清群が異なるものが多かった．そこで，*L.pneumophila* の血清群の違いによる見え方の違いについて検討した．

結果を図 4 に示す．

保存菌株を斜光法で観察すると，色やモザイク様構造の違いは，それぞれの群によって特有の傾向を示すものではなかった．

表2 観察領域と釣菌した集落No.

検体 No.	領域 No.	釣菌集落 No.
検体 1	領域 1	1, 2, 3
	領域 2	4, 5, 6, 7
	領域 3	8, 9
	領域 4	10
	領域 5	11
検体 2	領域 6	12, 13
	領域 7	14, 15, 16
検体 3	領域 8	17

表3 培養日数と外観的特徴の関係結果

集落 No.	斜光法 ^{注)}					血清群	PCR
	3 日目	4 日目	5 日目	6 日目	7 日目		
1	(3 +)	(2 +)	(2 +)	(2 +)	(2 +)	2	(+)
2	(2 +)	(2 +)	(2 +)	(2 +)	(+)	5	(+)
3	(2 +)	(2 +)	(2 +)	(2 +)	(+)	5	/
4	(3 +)	(3 +)	(2 +)	(2 +)	(2 +)	6	(+)
5	(3 +)	(3 +)	(2 +)	(2 +)	(2 +)	6	/
6	(3 +)	(3 +)	(2 +)	(2 +)	(2 +)	2	(+)
7	(2 +)	(2 +)	(2 +)	(2 +)	(+)	5	(+)
8	(2 +)	(3 +)	(2 +)	(2 +)	(+)	2	(+)
9	(2 +)	(3 +)	(+)	(+)	(+)	6	(+)
10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	/	(-)
11	(2 +)	(3 +)	(3 +)	(2 +)	(+)	2	(+)
12	(3 +)	(2 +)	(+)	(+)	(+)	5	(+)
13	(3 +)	(3 +)	(3 +)	(3 +)	(3 +)	不明	(+)
14	(3 +)	(2 +)	(2 +)	(+)	(+)	5	/
15	(3 +)	(3 +)	(3 +)	(3 +)	(3 +)	不明	(+)
16	(3 +)	(3 +)	(3 +)	(2 +)	(2 +)	6	(+)
17	(3 +)	(2 +)	(2 +)	(+)	(+)	6	(+)

*斜線部分は実施しなかった検査

注) 斜光法は以下のとおり判定した．

- (3 +) : 特徴がわかりやすい (2 +) : 特徴がある (+) : わかりづらいが特徴を確認できる
 (-) : 特徴がない

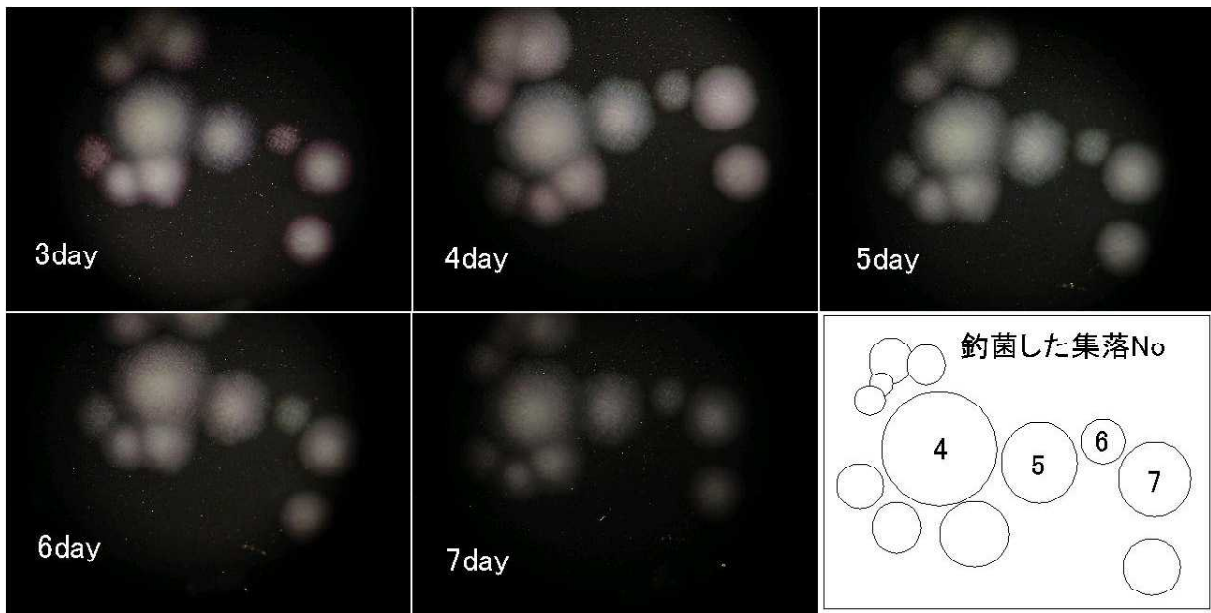


図3 領域2の時系列写真

集落 No. 4 青紫色集落. モザイク様構造が細かい.

集落 No. 5 青紫色集落. 中心部の綿様部分が集落 No, 4 より小さく濃い.

集落 No. 6 桃色集落. 4 日目以降色が消失. 綿様構造があまりはっきりしていない.

集落 No. 7 桃色集落. 集落 No, 6 より色が濃く, 綿様構造がはっきりしている.

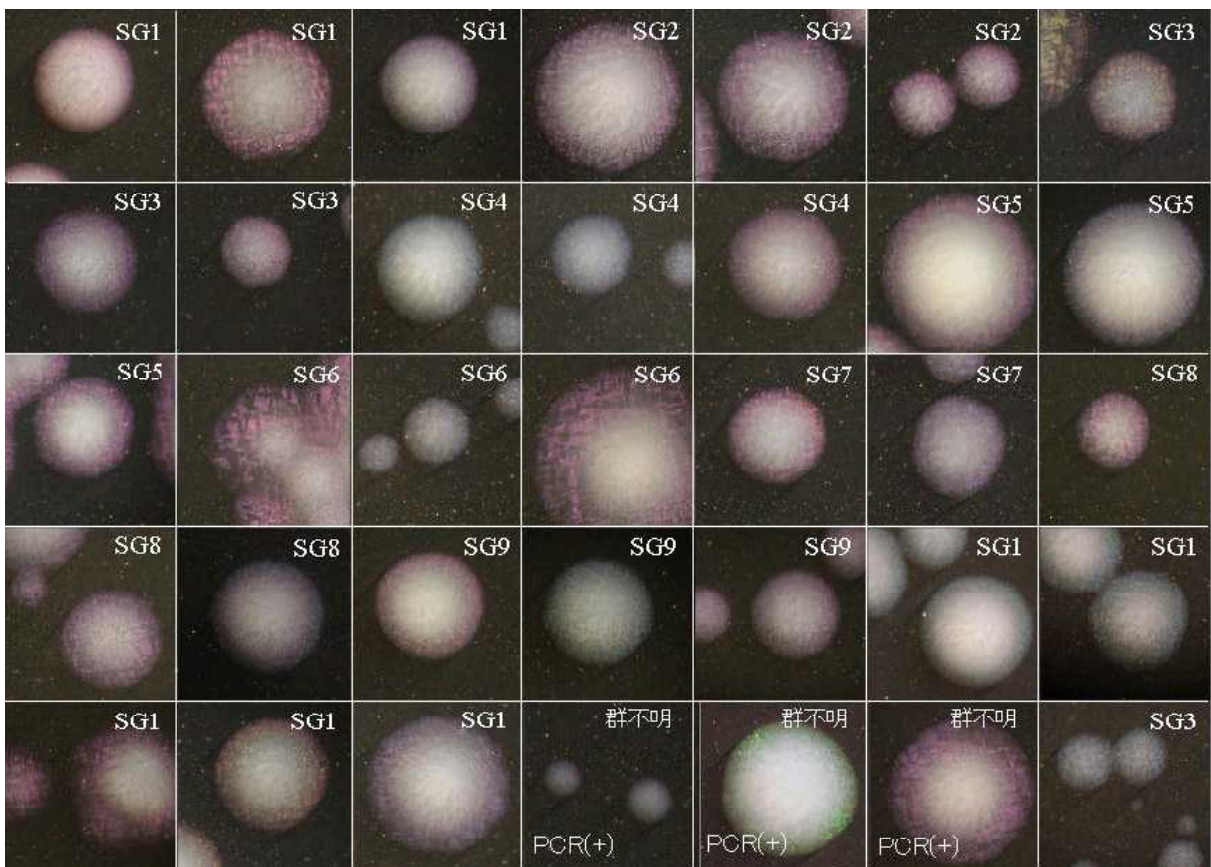


図4 35株の*L. pneumophila*を斜光法で観察した写真 (培養3日目)

また、集落の密集度によっても色合いは大きく異なっていた。これは、培地と菌株の相性や培養条件など様々な理由が考えられる。しかし、緑色がかった集落は4群, 9群, 10群, 群不明に多くみられ、それ以外の群にはない色合いであった。また、培養初期に黄色がかった集落は、3群と10群に多く見られた特徴であった。そのため、特徴の異なる集落を釣菌すれば、*L.pneunophila* を複数群検出できる可能性は高くなり、浴槽水に複数の血清群の *L.pneunophila* が含まれる際に、集落選択の補助として利用可能と思われる。

3 斜光法について

現在、レジオネラ属菌用の選択分離培地は多数市販されており、色素が配合されている培地もある。それらを使用すれば、今回の結果とは違った結果が得られる可能性があるため、さらに検討する必要があると思われる。また、今回の検討では *L.pneunophila* のみの検討であったが、今後レジオネラ属菌の種別の検討も必要と思われる。

斜光法を推定試験として行うことにより、レジオネラ属菌と雑菌を区別できるとともに、通常の観察法で同じように見える集落も、色合いの違いなどから数種類の群が含まれていることが確認でき、斜光法の有用性が明らかになった。

斜光法は、熟練をさほど要さないため、レジオネラ検査の経験が浅い検査員でも、レジオネラ属菌を容易に見つけ出すことができ、検査技術の均一化につながるものと考えられた。

まとめ

1 斜光法での観察は、長期間培養すると判別困難になる場合が多く、培養初期での観察が重要であった。

2 *L.pneunophila* の血清群別に特徴的な見え方の傾向は見られなかった。

謝 辞

今回の検討にあたり、北海道立衛生研究所森本洋先生をはじめ、研究協力者の諸先生方に助言いただきましたことに、深謝いたします。

引用文献

- 1) 厚生労働省健康局長通知. 公衆浴場における衛生管理要領等の改正について. 平成15年2月14日付健発第0214004号
- 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, 東京, 1999
- 3) 森本洋, 宮坂次郎, 中村昭子. 検査法の検討1 効率の良いコロニーの観察法, 生培地の比較検討. 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業) 迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究, 2008
- 4) 森本洋, 宮坂次郎ら. 検査法の検討2 効率の良いコロニーの観察法の普及. 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業) 迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究, 2009