

水試料からのレジオネラ属菌検出方法の改良 - 濃縮試料の酸処理条件の検討 -

矢野 一好*, 榎田 隆一*, 保坂 三継*, 真木 俊夫*

Improvement of Method for Isolation of *Legionella* Species in Water - Examination of Acid Treatment for Concentrated Sample -

KAZUYOSHI YANO*, TAKAICHI ENOKIDA*,
MITSUGU HOSAKA* and TOSHIO MAKI*

Keywords : 生活用水 domestic water, レジオネラ属菌 *Legionella* species, 培養方法 cultivation method, 酸処理液 acid buffer

緒 言

環境水を対象にしたレジオネラ属菌の検査は、レジオネラ症がいわゆる感染症新法¹⁾の4類に指定されて以来、本菌の感染源調査という新たな意義をもって実施されるようになってきた。また、建築物に関連した給湯、給水、冷却塔、浴槽及び修景設備等における本菌汚染の防止を目的とした厚生省監修の指針が改訂され、各設備における管理目標が本菌の菌数で提案されている²⁾。提案された指針では、10 CFU/100ml未満を検出限界としており、これに伴って試験精度も向上させる必要がでてきた。

このような背景にあって、環境水からのレジオネラ属菌の検出状況にも変化がみられるようになってきた。1980年代後半から1990年代前半にかけての調査結果³⁾をみると、試料水から検出された菌数は試料水100mlあたり $10^2 \sim 10^5$ レベルであったが、最近では、施設の維持管理レベルの向上や管理指針が示されたこともあってか、検出される菌数は試料水100mlあたり10 CFU以下の場合も多い。

現在我が国で標準的に使用されているいくつかの試験方法は、その検査工程はほとんど同じであるが、試料水を濃縮した後、レジオネラ属菌以外の微生物を死滅させるための「酸処理」条件が試験方法によって異なっている。

本研究は、既存の試験方法における大きな相違点である酸処理溶液のモル濃度について、稼働中の循環式浴槽水を用いて検討したものである。

材料と方法

1. 試料水

実験には、供試菌の添加などの操作を加えない浴槽水を使用した。試料水の選定は、未濃縮の試料水でも菌数が多いこと、選択培地である WYO 寒天培地上でレジオネラ属菌のコロニーと明らかに形状が異なるコロニーを形成するレジオネラ属菌以外の細菌（以下、雑菌と表記）が混入していることを条件として行った。

実験用に選定した試料水は、2000年1月に採水した循環式浴槽水（以下、実験用試料水と表記）である。実験用試料水の採水時点での菌数は、上水試験方法⁴⁾によって試験した結果、*L. pneumophila* 血清群3群が360,000 CFU/100ml、雑菌160,000 CFU/100mlであった。実験用試料水は、実験に供するまで冷暗所に保存した。

2. 酸処理液の調製

実験に使用した酸処理液は、以下の手順に従って調製した。あらかじめ精製水700ml程度を入れた1 Lメスフラスコに KCl 14.9gを溶解し、0.2 mol/L HClでpH 2.2に調整した。pH 調整後、精製水で1 Lまでメスアップし、実験用酸処理液の原液（以下、0.2 M 酸処理液と表記）とした。

3. 酸処理条件の検討

調製した0.2 M 酸処理液を精製水で倍々希釈し4段階濃度の酸処理液を調製した。各々の酸処理液は濃度調整後 pH 2.2が保持されていることを確認した。

実験用試料水 1 mlに濃度調製した4種類の酸処理液

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

を1mlずつ添加した。この実験系列を2系統調製しておき、一つは室温で20分間、他の一つは50℃で20分間処理した。所定の処理が終了した試料は、直ちに1試料につきWYO 寒天培地2枚(1枚につき0.25mlずつ)に塗抹し、37℃で5日間培養してコロニー計数を行った。

この実験結果を基に、一定濃度の酸処理液を用いて酸処理時間のみを変化させた実験も行った。

結 果

1. 酸処理液の濃度と細菌の生残状況

酸処理液の濃度を变化させた条件で行った実験結果を表1と表2に示した。実験は日を改めて2回行った。実験対照は、pH値の変化による菌の凝集等を考慮して、実験結果に影響しないと考えられる酸性液(0.01M, pH2.2)に実験用試料水を添加したものとした。

1) 室温処理

繰り返し2回行った実験の結果、形成されたコロニー数はかなり変動したが、酸処理液の濃度が上昇するに従って雑菌数は明らかに減少し、レジオネラも雑菌ほどではないが減少する傾向を示した。2回の実験結果を同じ尺度で評価するために、対照液中の菌数を100として各

濃度における菌数を生残率に換算し、その変動を図1に示した。酸処理の目的は、レジオネラ属菌には極力ダメージを与えず、雑菌を効率よく抑制することである。この目的から推測すると、室温で20分間処理することを前提にした場合は、0.1~0.2Mの酸処理液が必要である。

2) 加熱処理の併用効果

表1及び表2の実験結果をみると、加熱併用処理の場合もレジオネラの菌数は減少傾向を示した。その減少傾向は室温処理に比較して大きいものであった。特に、雑菌の減少傾向が著しく、いずれの濃度でもコロニー数は0を示した。両者の変動は、図2に示したとおりであり、今回の実験に使用した雑菌を抑制する効果は十分認められたが、レジオネラの受ける損傷も大きいものと推測された。

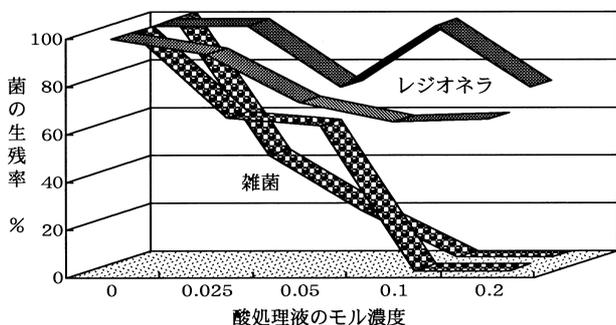
2. 酸処理の時間と細菌の生残状況

酸処理液の濃度を变化させた条件で行った実験結果から、所期の目的を満たす濃度条件は、0.1~0.2Mの酸処理液であることが判明したので、濃度条件を2段階に固定し、処理時間を変化させた条件で繰り返し実験を行い、その結果を表3及び表4に示した。

表1. 酸処理液の濃度と細菌の生残状況(実験: 1回目)

温度	細菌種別	対照	0.025M	0.05M	0.1M	0.2M
室温	レジオネラ	150	140	110	98	99
		100	93.3	73.3	65.3	66.0
	雑菌	100	64	61	0	0
		100	64.0	61.0	0	0
50	レジオネラ	130	110	100	71	0
		100	84.6	76.9	54.6	0
	雑菌	74	0	0	0	0
		100	0	0	0	0

対照: 0.01M (pH 2.2) 溶液で調整した直後の菌液
 上段数値: CFU/0.5mL 下段数値: 生残率 (%)
 処理時間: 20分間 (一定)



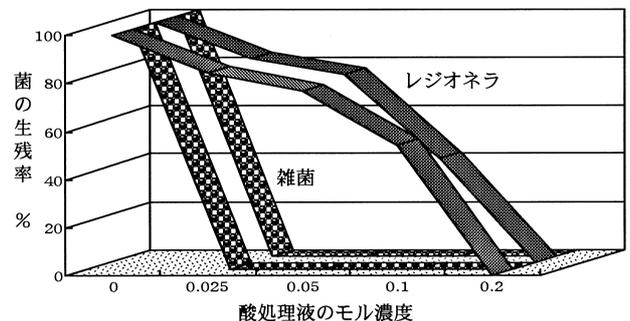
処理時間は室温20分間とし2回の繰り返し実験結果を示した。

図1. 酸処理液の濃度と細菌の生残状況

表2. 酸処理液の濃度と細菌の生残状況(実験: 2回目)

温度	細菌種別	対照	0.025M	0.05M	0.1M	0.2M
室温	レジオネラ	31	37	23	37	23
		100	100	74.2	100	74.2
	雑菌	77	33	15	0	0
		100	42.9	19.5	0	0
50	レジオネラ	46	39	36	20	0
		100	84.8	78.3	43.5	0
	雑菌	110	0	0	0	0
		100	0	0	0	0

対照: 0.01M (pH 2.2) 溶液で調整した直後の菌液
 上段数値: CFU/0.5mL 下段数値: 生残率 (%)
 処理時間: 20分間 (一定)



処理時間は50度20分間とし2回の繰り返し実験結果を示した。

図2. 酸処理液の濃度と細菌の生残状況

表 3 . 酸処理液の濃度及び処理時間別細菌の生残状況 (実験 : 1 回目)

濃度	細菌種別	対照	2分	3分	4分	5分	7分	10分	15分	20分	25分	30分
0.2M	レジオネラ	58	60	79	45	70	54	41	54	55	46	42
		100	100	100	77.6	100	93.1	70.7	93.1	94.8	79.3	72.4
	雑菌	58	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1M	レジオネラ	31	31	33	30	25	32	23	26	27	ND	ND
		100	100	100	96.8	80.6	100	74.2	83.9	87.1		
	雑菌	58	56	50	45	29	10	5	0	0	ND	ND
		100	96.6	86.2	77.6	50.0	17.2	8.6	0	0		

対照 : 0.01M (pH2.2) 溶液で調整した直後の菌液
 ND : 試験せず 上段数値 : CFU/0.5mL 下段数値 : 生残率 (%)

表 4 . 酸処理液の濃度及び処理時間別細菌の生残状況 (実験 : 2 回目)

濃度	細菌種別	対照	3分	5分	10分	15分	20分
0.2M	レジオネラ	24	35	31	14	20	14
		100	100	100	58.3	83.3	58.3
	雑菌	84	0	0	0	0	0
0.1M	レジオネラ	46	50	46	49	24	24
		100	100	100	100	52.2	52.2
	雑菌	84	63	24	5	4	0
		100	75.0	28.6	6.0	4.8	0

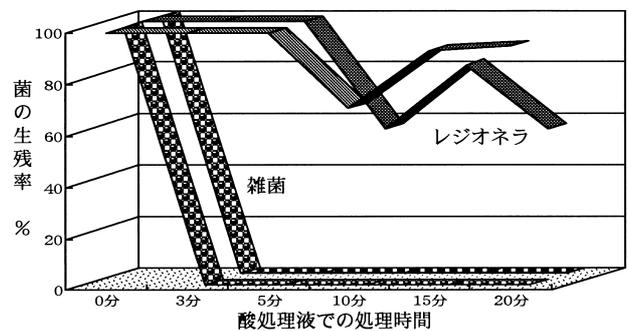
対照 : 0.01M (pH2.2) 溶液で調整した直後の菌液
 上段数値 : CFU/0.5mL 下段数値 : 生残率 (%)

濃度別の実験結果と同様、同一条件でも繰り返し実験によってコロニー数の変動がみられたので菌数を生残率に換算して図 3 及び図 4 に示した。図 3 のグラフからみると、0.2M の酸処理液で短時間処理する組み合わせが所期の目的を満足すると判断した。すなわち、0.2 M で 3 ~ 5 分間処理した場合、レジオネラの生残率は 100% であり、雑菌は検出限界以下に抑えることができた。

考 察

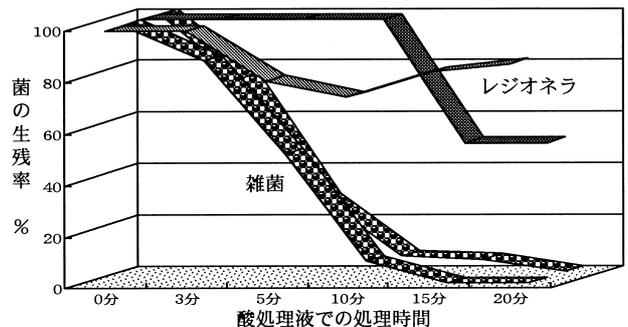
環境水からレジオネラを検出する目的は、大きく分けて二つある。一つは、建築物等における水関連設備の維持管理指標であり、もう一つは、「感染症新法」第 15 条に記載されている積極的疫学調査の一環として行われる感染源調査である。いずれの目的でも、試験法に求められる検査精度や検出限界値は、厳しくなる一方である。特に、建築物等における指針値に対応した検査に求められる精度は、試料水 100ml あたり 10 CFU 未満の検出限界値を満たす必要がある。

我が国で汎用されている水試料を対象としたレジオネラ属菌の検出方法はいくつかある (表 5)。いずれの試験方法も、試料水の濃縮方法や使用する選択培地などは



0.2 M (pH2.2) 溶液で処理した 2 回の繰り返し実験結果を示した。

図 3 . 酸処理時間と細菌の生残状況



0.1 M (pH2.2) 溶液で処理した 2 回の繰り返し実験結果を示した。

図 4 . 酸処理時間と細菌の生残状況

ほとんど同様であるが、濃縮試料を選択培地に塗抹する前に行う「酸処理液の濃度」と処理時間が一定していない^{2,4-6)}。具体的には、4 種の試験方法について酸処理過程のみを抜粋して表 5 に示した。この酸処理過程が検出菌数のばらつきに及ぼす影響が大きいと考えられる。検査室においてしばしば経験することであるが、本菌の選択培地シャーレ全面にレジオネラ属菌以外のコロニーが発育してしまって判定ができない場合や、シャーレ上にまったくコロニーの形成が確認できない場合がある。この原因の一つに酸処理過程があると考えられる。すなわち、

表5 . レジオネラ試験方法と酸処理条件

試験方法	溶液の調整方法	濃縮物の処理方法
ISO 11731	0.2 mol/L HCl溶液3.9mLと0.2 mol/L KCl溶液25mLを混和し、pH 2.2 ± 0.2に調整する．調整には、1 mol/L KOHを使用する．	濃縮物と等量混和し、5 ± 0.5分間静置
上水試験方法	0.2 mol/L 塩酸5.3mLと0.2 mol/L塩化カリウム溶液25mLを精製水100mLに加え、pH 値を2.2にしたもの．	濃縮物と等量混和し、室温で15分
衛生試験法	0.2 mol/L HCl 溶液3.9mLと0.2 mol/L KCl 溶液25mLを混和し、高圧蒸気滅菌する．	濃縮物を50℃、5分間加熱後室温まで冷却し、酸処理溶液を等量加えて室温で15～20分間静置する
厚生省監修 レジオネラ症防 止指針	0.2 M HCl・KCl buffer pH2.2 ± 0.2	濃縮検水とを等量混和し、25℃に5～20分間置く．処理時間は共存するレジオネラ属菌以外の微生物の量により異なる．

処理が不完全であると、選択培地上でレジオネラ属菌以外の微生物がレジオネラより先に増殖し、試料水中にレジオネラが存在していたとしても不検出の結果になる可能性がある．また、酸処理が強すぎるとレジオネラも死滅してしまって不検出の結果を招く可能性がある．

このような観点で、既存の試験方法をみると、表5に示したとおり酸処理液の成分とpH値はどの方法も同様であるが、処理液の濃度と処理時間が微妙に異なっている．

本研究は、実際の水試料を用いて、レジオネラ試験方法にある酸処理条件について検討したものである．実験試料水の選定は、前述の条件を加味し試料水の濃縮処理を行わなくても検出できる濃度のレジオネラと酸処理に対してある程度の抵抗性がある雑菌がほどよく混入していることを指標にして行った．その結果として、循環式浴槽水が選定された．この実験用試料水は、上水試験方法の酸処理条件で処理しても死滅していない雑菌がレジオネラと同程度の菌数で混入していることから推測して、本実験の実験試料水としては適切であったと考える．

本実験において重要なもう一つの実験条件は、実験対照（コントロール）の設定方法である．水中に混入している微生物の多くは、単粒子で水中に浮遊していることが少なく、微生物同士、あるいは有機固形物等を核として凝集している場合がほとんどである⁷⁾．特にこのような現象は酸性領域で強く認められる⁷⁾．従って、本実験で採用した対照菌液は、実験条件に影響が少ないと考えられる濃度の酸処理液（0.01 M, pH 2.2）で調製した直後の菌液とした．

実験結果は、試料水が浴槽水であること、供試菌を添加していないこと、実験日が異なることなどが影響してコロニー数そのものには変動が認められるものの、0.2 M pH 2.2 の KCl 溶液を使用して3～5分間処理した場合、レジオネラの生残率は100%であり、雑菌は検出限界以下に抑えられた．この実験結果は、ISO 11731を支持する結果となった．

今後の検討課題としては、多種多様な実試料を用いて同様の検討を行うことと、固形物等の夾雑物が大量に混入している泥水や土を試料とした場合の処理条件の検討も必要であると考えられる．

今回の実験では、加熱処理についての詳細な検討はしなかったが、泥などを試料とした場合は、酸処理と加熱処理を併用することも考慮すべきであると考えられる．

本菌の検出精度と検出限界を更に向上させるための大きな課題としては、選択培地の選択力を強化や菌体が凝集している可能性がある濃縮試料をアルカリ溶液処理などをして単粒子にする方法の開発なども残されている．

結 論

本実験は、レジオネラ属菌試験方法において、試料水中のレジオネラ属菌以外の微生物を死滅させるために行う、酸処理液の濃度と処理時間について検討したものである．処理条件の検討は、レジオネラ属菌とその他の細菌が共に高濃度に生息している稼働中の循環式浴槽水を用いて行った．

その結果、試料水に生息しているレジオネラ属菌に与える損傷を最小限にし、レジオネラ属菌以外の細菌類を最大限死滅させる酸処理条件は、0.2 M KCl 溶液（pH 2.2）で3～5分間処理することであると判明した．

文 献

- 1) 官報：大蔵省印刷局，号外第203号，平成10年10月2日。
- 2) ビル管理教育センター：新版 レジオネラ症防止指針，85-94, 1999, 東京。
- 3) 矢野一好，保坂三継，真木俊夫：東京衛研年報，50, 259-263, 1999.
- 4) 日本水道協会：上水試験方法，520-523, 1993, 日本水道協会，東京。
- 5) International Standard：ISO 11731：1998 (E).
- 6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2000, 97-99, 2000.
- 7) 矢野一好：水質汚濁研究，13, (8) 485-490, 1990.