

# レジオネラ対策における浴槽水の簡易迅速な検査法（ATP測定法）の有用性に関する検討

富田隆弘、岸田一則

## Simple and Rapid Analysis of *Legionella* Species in Water Bath Using an ATP Assay

Takahiro TOMITA and Kazunori KISHIDA

### 要旨

サンプリングにマイクロピペットを必要とせず、浴槽水に浸すだけで一定量サンプリングできる水用サンプラーを用いて浴槽水のATP値を測定したところ、検査法に関わらずATP値が高くなるに従ってレジオネラ属菌検出率が高くなる傾向が見受けられた。このATP測定法は、環境衛生監視員が現場検査の中で浴槽水の衛生管理状態を把握する目的で有効に活用できるものと思われた。

また、試料水中のレジオネラ属菌を殺菌した場合、加熱殺菌ではATP値が殺菌前の3分の1以下まで減少したのに対して、塩素殺菌では殺菌前とほとんど変わらないことが判明した。

キーワード：レジオネラ、ATP、浴槽水、培養法、LAMP法

Keywords: *Legionella*, ATP, bath water, cultivation method, LAMP method

### はじめに

レジオネラ属菌によって引き起こされるレジオネラ症は、劇症型の肺炎、あるいは熱性疾患の病型を示すが、重篤な場合は死に至ることから、感染症法<sup>1)</sup>に基づく四類感染症として位置づけられており、また、入浴施設における集団感染事例がたびたび報告され、死亡者が発生するなどの社会的な問題になっている<sup>2), 3)</sup>。

本県では、平成15年に条例<sup>4), 5)</sup>の一部を改正し、公衆浴場等入浴施設におけるレジオネラ症防止対策を図っているが、平成19年度から4年間行った浴槽水中のレジオネラ属菌検査では、その検出率は毎年20%前後で推移しており大幅な変動は見られなかった<sup>6), 7)</sup>。

浴槽水中のレジオネラ属菌の検査法として、規則<sup>8), 9)</sup>の中で培養法が規定されているが、検査には専用設備が必要であり、検査終了までに1週間以上の時間を要する。環境衛生監視員は試料を採取してから培養法の検査結果が出るまでの間、衛生管理手法が適切であるか判断することが困難である。そのため現場において施設の清浄度が確認できる迅速検査法の開発が望まれている。

ATP測定法は、生物が持つエネルギー物質であるATP (Adenosine Triphosphate: アデノシン三リン酸) の量を光に変えて発光量を迅速に検査する方法<sup>10)</sup>

で、食品製造ラインの食品残渣や細菌の持つATPを短時間に数値化できることから、食品衛生分野では、食品衛生検査指針<sup>11)</sup>にも掲載され、現場で実施できる清浄度判定などに活用されている<sup>12)</sup>。

また、ATP測定法は、測定器があれば特段の技術を要しない簡単な操作性に加えて、結果判定までに必要な時間は十数秒で、かつ測定結果が数値で示されることから、環境衛生分野においても現場検査としての活用が期待されており、上木らの報告<sup>13)</sup>では、レジオネラ属菌そのものの検査を行うことはできないものの、浴槽水中のATP値がレジオネラ属菌の指標になりうるとの報告がなされた。

しかしながら、この報告ではふき取り検査用サンプラー（キッカーマンバイオケミファ、ルシパックPen）を使用しているために、浴槽水中のATP測定の手順は、①サンプラーを一旦分解し測定チューブを取り外す、②マイクロピペットで試料を一定量採取し、直接測定チューブに試料を注入する、③そのチューブをサンプラーに戻し、試薬と反応させ、ATP値を測定するという手順で行われていた。

マイクロピペットの使用は現場で採水検査する環境衛生監視員にとって煩雑であることに加え、コンタミネーションが懸念される。

今回我々は、サンプリングにマイクロピペットを

必要とせず、浴槽水に浸すだけで一定量サンプリングできる水用サンプラー（Hygiena社、AQUASnap）を用いて、浴槽水のATP値を測定し、レジオネラ属菌検査結果（培養法及びLAMP法）と比較して、レジオネラ対策における有用性を検討した。

併せて、実験室内で *L. pneumophila* SG1 を添加した試料水を調整し、加熱・塩素殺菌が ATP 値に与える影響について検討した。

## 材料と方法

### 1. 浴槽水中のレジオネラ属菌等の検査

#### 1) 浴槽水

平成23年9月から11月に当研究室にレジオネラ属菌検査依頼のあった県内の公衆浴場等10施設で採水された浴槽水20検体を試料とした。

#### 2) 方法

##### (1) 浴槽水のレジオネラ属菌検査方法

レジオネラ属菌の検査は、第3版レジオネラ症防止指針<sup>14)</sup>に準じて実施した。浴槽水1000mLをろ過濃縮法で5mLに濃縮した。この濃縮液に0.2M HCl-KCl溶液(pH2.2)を等量添加し60秒間攪拌し、室温で5分間作用させて酸処理をした。この処理液をレジオネラ属菌の選択培地であるGVPC $\alpha$ 寒天培地（極東製薬工業）に原液処理液は2枚、希釈液（10倍、100倍、1000倍）は各1枚にそれぞれ0.1mLずつ塗抹し、37°Cで7日間培養した。

青みを帯びた灰白色の湿潤集落をレジオネラ属菌様集落として計数し、このうち代表的な集落を羊血液寒天培地（日研生物）及びBCYE $\alpha$ 寒天培地（日研生物）に移植して37°Cで2日間、5%CO<sub>2</sub>恒温器で培養後観察した。BCYE $\alpha$ 寒天培地に発育し、羊血液寒天培地に発育しない集落がかつグラム陰性の小桿菌をレジオネラ属菌とした。

レジオネラ属菌と判定されたコロニーは、デュオパスレジオネラ（メルク）及びLegionella Latex Test Kit（OXOID）で同定した。

##### (2) LAMP（Loop-mediated isothermal amplification）法

濃縮試料について、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E（栄研化学）を用い、添付文書に従い測定を行った。増幅反応及び判定にはLoopampリアルタイム濁度測定装置（栄研化学、RT-160C）を用いた。

##### (3) ATP測定法

ATP測定器（Hygiena社、EnSURE）を用い、添付文書に従い測定を行った。ATP値はRLU（Relative Light Unit）で示した。なお、水用サンプラーには、AQUASnap（Hygiena社）を使用した。

##### (4) 施設の管理状況調査

試料採水時に、保健所環境衛生監視員が原水の種別について聞き取り調査を行うとともに、DPD（ジエチル-p-フェニレンジアミン）法により浴槽水の遊

離残留塩素濃度を測定した。

### 2. *L. pneumophila* SG1 を添加した試料水中のレジオネラ属菌等の検査

#### 1) 使用菌株

当所に冷凍保存していた *L. pneumophila* SG1（菌株番号359）をGVPC $\alpha$ 寒天培地（極東製薬工業）に37°Cで7日間培養して用いた。

#### 2) 方法

##### (1) *L. pneumophila* SG1 を添加した試料水の調整

平板上の *L. pneumophila* SG1 を掻き取って、滅菌精製水に浮遊させ、McFarland 0.5 となるよう菌浮遊原液を調製した。

##### (2) 殺菌前の試料水の測定

菌浮遊原液を等量の滅菌精製水で希釈し、試料を調製した。

この試料のATP測定を行うとともに、培養法及びLAMP法で試料中のレジオネラ属菌検査を行った。

また、滅菌精製水のATP測定を行った。

##### (3) 塩素殺菌後の試料水の測定

塩素殺菌は、遊離残留塩素濃度1.0mg/L溶液に5分間浸す条件<sup>15)</sup>で行った。

次亜塩素酸ナトリウム溶液（和光純薬）を滅菌精製水に溶解し、遊離残留塩素濃度が2.0mg/Lになるよう調整し、DPD法により遊離残留塩素濃度を確認した。

10mLの菌浮遊原液を10mLの遊離残留塩素濃度2.0mg/L溶液で希釈し、攪拌後、5分間静置したのち、ATP測定を行うとともに、培養法及びLAMP法で試料中のレジオネラ属菌検査を行った。また、遊離残留塩素濃度2.0mg/L溶液のATP測定を行った。

##### (4) 加熱殺菌後の試料水の測定

加熱殺菌は、95°Cで5分間加熱する条件<sup>16)</sup>で行った。

10mLの菌浮遊原液を10mLの滅菌精製水で希釈し、95°Cで5分間加熱したのち、ATP測定を行うとともに、培養法及びLAMP法で試料中のレジオネラ属菌検査を行った。また、滅菌精製水を95°Cで5分間加熱したのちのATP測定を行った。

##### (5) 塩素殺菌、加熱殺菌後の試料水の測定

菌浮遊原液を等量の遊離残留塩素濃度2.0mg/L溶液で希釈し、攪拌後、5分間静置したのち、95°Cで5分間加熱した。その試料のATP測定を行うとともに、培養法及びLAMP法で試料中のレジオネラ属菌検査を行った。

## 結果及び考察

## 1. 浴槽水の検査結果

浴槽水の検査結果は表1のとおりであった。

浴槽水20検体のうち、培養法では検体番号1、3、4、16の4検体(20.0%)からレジオネラ属菌が検出された。LAMP法では検体番号1、3、4、6、10、15、18の7検体(35.0%)からレジオネラ属菌DNAが検出された。

## 2. 培養法とLAMP法のレジオネラ属菌検査結果の比較

培養法とLAMP法のレジオネラ属菌検査結果を比較したところ、表2のとおりであった。

培養法とLAMP法の検査結果が一致したのは、培養法とLAMP法が共に検出された3検体、共に不検出であった12検体の合計15検体(75.0%)であった。

培養法とLAMP法の検査結果が異なる検体は5検体(25.0%)あった。

そのうち、培養法では不検出、LAMP法では検出となった4検体(20.0%)については、LAMP法が死菌でも検出することから、浴槽水中のレジオネラ属菌は死菌として存在していたものと思われた。

表2 培養法とLAMP法の検査結果の比較

		LAMP法		計
		検出	不検出	
培養法	検出	3	1	4
	不検出	4	12	16
計		7	13	20

LAMP法で検出できるレジオネラ属菌は *L. pneumophila* を含む11菌種21株であるが、*L. pneumophila* であっても *L. pneumophila* SG5 及び *L. pneumophila* SG7 は検出することができないと報告されている<sup>17)</sup>。

培養法では検出、LAMP法では不検出となった検体が1検体(5.0%)あったが、LAMP法の検出対象外又はLAMP法の検出下限値以下のいずれかであると考えられた。

## 3. ATP値別レジオネラ属菌検出状況

ATP値別レジオネラ属菌検出状況をまとめたところ、表3のとおりであった。

表1 浴槽水の検査結果一覧表

番号	施設	種類	原水種別	レジオネラ属菌			ATP (RLU)	遊離残留塩素濃度 (mg/L)
				培養法		LAMP法		
				菌数 (CFU/100mL)	菌種及び血清群			
1	A	公衆浴場	上水	5	<i>L. pneumophila</i> SG2-14	+	225	1.5
2	A	公衆浴場	上水	不検出		-	32	2.0
3	B	公衆浴場	上水	15	<i>L. pneumophila</i> SG1	+	77	0.5
4	C	公衆浴場	上水	10	<i>L. pneumophila</i> SG2-14	+	98	0.2
5	C	公衆浴場	上水	不検出		-	3	0.6
6	D	公衆浴場	上水	不検出		+	7	0.8
7	D	公衆浴場	上水	不検出		-	3	0.6
8	D	公衆浴場	上水	不検出		-	3	0.5
9	D	公衆浴場	上水	不検出		-	2	0.4
10	E	公衆浴場	上水	不検出		+	3	>2.0
11	E	公衆浴場	上水	不検出		-	0	>2.0
12	F	公衆浴場	上水	不検出		-	399	0.4
13	F	公衆浴場	上水	不検出		-	17	1.5
14	F	公衆浴場	温泉水	不検出		-	1	2.0
15	F	公衆浴場	温泉水	不検出		+	14	2.0
16	G	公衆浴場	井水	5	<i>L. pneumophila</i> SG2-14	-	28	0.5
17	G	公衆浴場	井水	不検出		-	23	1.5
18	H	事業所内浴槽	上水	不検出		+	36	0
19	J	一般家庭浴槽	上水	不検出		-	0	0
20	K	一般家庭浴槽	上水	不検出		-	1	0.3

表3 ATP 値別レジオネラ属菌検出状況

ATP(RLU)	n	培養法		LAMP法	
		検出数	検出率(%)	検出数	検出率(%)
0-24	13	0	0%	3	23.1%
25-49	3	1	33.3%	1	33.3%
50-	4	3	75.0%	3	75.0%
計	20	4		7	

培養法では、ATP 値が 0-24RLU のときは、レジオネラ属菌が検出された検体はなく、ATP 値が 25-49RLU のときは 33.3%の検体から、50RLU 以上では 75.0%の検体からそれぞれレジオネラ属菌が検出された。

上木らの報告<sup>13)</sup>では、ふき取り検査用サンプラー(キッカーマンバイオケミファ、ルシバック Pen)にマイクロピペットで一定量の浴槽水を採水して調査を行っており、ATP 値が 25RLU 未満の検体からのレジオネラ属菌の検出はほとんどなく(307 検体のうち 1 検体から検出)、ATP 値がこの範囲内であれば施設の管理が良好と判断することを可能としている。

上記の測定法では ATP だけでなく AMP も検出することから高感度という特性があり、我々が検討した ATP のみを検出する水用サンプラーとは異なるが、上木らと同様の結果が得られた。

LAMP 法では、ATP 値が 0-24RLU のときは、23.1%の検体から、25-49RLU のときは 33.3%の検体から、50RLU 以上では 75.0%の検体からそれぞれレジオネラ属菌が検出された。

培養法、LAMP 法といった検査法に関わらず ATP 値が高くなるに従ってレジオネラ属菌検出率が高くなる傾向が認められ、水用サンプラーによって得られた ATP 値は、浴槽水の衛生管理状態を把握する上で有効に活用できることが示された。

4. 培養法、LAMP 法の検査結果と ATP 値

培養法と LAMP 法の検査結果の違いを 4つのパターンに分類し、各々の ATP 値の平均値を表 4 に示した。

なお、Grubbs の棄却検定(5%)を行い、パターン A の中の 1 検体を棄却し、パターン A については 11 検体で統計処理を行った。

表4 培養法、LAMP 法の検査結果と ATP 値

パターン	培養法	LAMP法	n	ATP値の平均値(RLU)
A	-	-	11	7.7
B	-	+	4	15.0
C	+	-	1	28.0
D	+	+	3	133.3

棄却した 1 検体は、表 1 の検体番号 12 であるが、同日に同一施設から採水した他の 3 検体(検体番号 13、14、15)と比較して、ATP 値が高く、残留塩素濃度が低い値を示していた。採水時の調査記録を確認したところ、採水方法の不備等によるものか確認できなかったが、今回の検討からは異常値として除外した。

培養法が検出、LAMP 法も検出で生菌が多いと考えられるパターン D は、培養法が不検出、LAMP 法が検出で死菌のみ存在すると考えられるパターン B に比べて、ATP 値が高い傾向が見られた。

5. レジオネラ属菌の加熱及び塩素殺菌前後の ATP 値

*L. pneumophila* SG1 の菌株を滅菌精製水に浮遊させた試料を調整し、加熱及び塩素殺菌が ATP 値に与える影響について検討した。

加熱殺菌又は塩素殺菌について、それぞれ条件を設定して実験を行ったところ、表 5 のとおりであった。

殺菌前の試料は、添加した *L. pneumophila* SG1 のコロニーが  $4.1 \times 10^5$  CFU/100mL 検出され、ATP 値は 216.9RLU であった。

遊離残留塩素濃度 1.0mg/L で 5 分間処理した試料は、ATP 値が 214.8RLU であり、殺菌前後の ATP 値について平均値の差の検定(危険率 5%)を行ったところ、有意な変化は認められなかった。

95℃で 5 分間加熱処理した試料は、ATP 値が 68.7RLU であり、殺菌前後の ATP 値について平均値の差の検定(危険率 5%)を行ったところ、有意な減少が認められた。

遊離残留塩素濃度 1.0mg/L で 5 分間処理後、95℃で 5 分間加熱処理した試料は、ATP 値が 53.7RLU であり、殺菌前後の ATP 値について平均値の差の検定(危険率 5%)を行ったところ、有意な減少が認められた。

それぞれ殺菌後の試料は培養法で陰性であることを確認した。

また、レジオネラ属菌を浮遊させるのに用いた滅菌精製水、それを 95℃で 5 分間加熱した水、遊離残留塩素濃度 2.0mg/L の溶液の ATP 値を測定したところ、いずれも 0RLU であり、バックグラウンドとして影響を与えていなかった。

ATP は細菌が生命活動を行っているときに産生される物質であること<sup>18)</sup>、表 4 から培養法で検出された検体の方が LAMP 法のみで検出された検体に比べて ATP 値が高い値を示したことから、試料水中のレジオネラ属菌を殺菌した場合、ATP 値は減少するものと考えられた。

しかし、今回の実験では、加熱殺菌では ATP 値が殺菌前の 3分の1以下まで減少していたのに対して、塩素殺菌直後では殺菌前とほとんど変わらない結果であった。

表5 殺菌方法の違いによる試料水のATP値の比較

	殺菌前	殺菌後		
		遊離残留塩素濃度 1.0mg/L 5分間	95℃ 5分間	遊離残留塩素濃度 1.0mg/L 5分間 + 95℃ 5分間
培養法 (CFU/100mL)	4.1×10 <sup>5</sup>	不検出	不検出	不検出
LAMP法	+	+	+	+
ATP値※ (RLU)	216.9	214.8	68.7	53.7

※ n=10の平均値

ATP測定の実理は、試薬の作用で細胞膜と細胞壁に穴をあけて、ATPを細胞外に抽出し、ルシフェラーゼとルシフェリンを含んだ発光試薬を作用させ、光強度からATP値を算出している<sup>19)</sup>。このことから、塩素殺菌により細菌の細胞壁に損傷を与え<sup>20)</sup>、細菌中のATPが細胞外に遊離され、ATP値として算出された可能性が考えられる。

そのため、塩素滅菌直後であれば、ATP値によって浴槽水の汚染の程度を把握することが可能である。

### まとめ

浴槽水に浸すだけで一定量サンプリングできる水用サンプラー（Hygiena社、AQUASnap）を用いて浴槽水のATP値を測定したところ、培養法、LAMP法ともにATP値が高くなるに従ってレジオネラ属菌検出率が高くなる傾向が確認された。

上木らは、ATP値の管理指標として25RLU未満を管理目標値、25-80RLUを要注意、80RLU以上を要改善と区分した<sup>13)</sup>。我々の検討はATP単独で測定する方法であるが、上木らと同様に25RLU未満が管理目標値として適切であることが判明した。他の管理指標についても同様の設定が可能か、今後検体数を増やし検討する必要がある。

加熱及び塩素殺菌がATP値に与える影響について検討したところ、加熱殺菌ではATP値が殺菌前の3分の1以下まで減少したのに対して、塩素殺菌では殺菌前とほとんど変わらないことが判明した。

浴槽の日常管理として、浴槽水の遊離残留塩素濃度の確保の他に、週1回以上の換水、ろ過器の逆洗、配管洗浄等により付着した有機物等の除去が求められている<sup>21)</sup>が、管理不十分であっても浴槽水の外観等では汚染の確認が困難な例が多い。ATP値を測定することにより、配管内等確認しにくい部位の有機物等の汚染であっても迅速に判定することが可能である。

本法は環境衛生監視員が立入検査の際にその場で入浴施設の管理者に対し、適切な指導、助言等を

行うことができ、迅速で効果的なレジオネラ防止対策を可能とする。

### 文献

- 1) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律，平成10年法律第114号，平成20年6月18日改正
- 2) David W. Fraser, Theodore R. Tsai, Walter Orenstein, William E. Parkin, H. James Beecham, Robert G. Sharrar, et al: Legionnaires' Disease — Description of an Epidemic of Pneumonia, The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE, 297, 1189-1197(1977)
- 3) 斉藤厚：レジオネラ感染症ハンドブック，日本医事新報社，231-241（2007）
- 4) 公衆浴場法施行条例，平成5年千葉県条例第32号，平成15年7月11日改正
- 5) 旅館業法施行条例，昭和33年千葉県条例第7号，平成15年7月1日改正
- 6) 富田隆弘，石井俊靖：千葉県内の浴槽水等におけるレジオネラ属菌検出状況（平成19年度～平成21年度），千葉県衛生研究所年報，58，74-78（2009）
- 7) 平成22年度 浴槽水等のレジオネラ属菌検査結果，千葉県健康福祉部衛生指導課（URL：<http://www.pref.chiba.lg.jp/eishi/toukeidata/koyou/h22-rejionera.html>）
- 8) 公衆浴場法施行条例に基づく浴槽水等の水質基準及び水質検査に関する規則，平成15年千葉県規則第113号，平成15年8月1日制定
- 9) 旅館業法施行条例に基づく浴槽水等の水質基準及び水質検査に関する規則，平成15年千葉県規則第112号，平成15年8月1日制定
- 10) 伊藤武：新しい衛生管理法 ATPふき取り検査改訂増補版，株式会社鶏卵肉情報センター，3-14（2009）

- 11) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 微生物編 2004, 社団法人日本食品衛生協会,71-74 (2004)
- 12) 草野篤：衛生検査・指導への ATP 法の活用 2 日本マクドナルドにおける店舗衛生管理と ATP ふき取り検査の活用, 食品と開発, 47(5), 26-29 (2012)
- 13) 上木隆人, 土居浩, 赤穂保, 浦山京子, 中村清純, 矢野公一, 他：平成 22 年度地域保健総合推進事業「保健所のレジオネラ対策における簡易迅速な検査法の実用化と自主管理の推進に関する研究」報告書, 15-22 (2011)
- 14) 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, 28-36(2009)
- 15) 縣邦雄, 石間智生, 三山義輝, 青木哲也, 田中俊光, 藤垣妙子, 他：レジオネラ属菌に対する有機系殺菌剤の殺菌性能, ビルと環境, 92, 84-88
- 16) 古畑勝則, 高柳保, 團野直子, 岡田誠之, 紀谷文樹：給湯水におけるレジオネラ汚染とその対策, 日本公衆衛生雑誌, 41(11), 1073-1083 (1994)
- 17) 安中敏光：LAMP 法による *Legionella* 属菌の検出, *Journal of the Association for Rapid Method and Automation in Microbiology*, 45(1), 25-30 (2003)
- 18) 吉田眞一, 柳雄介, 吉開泰信：改訂 33 版戸田新細菌学, 70-103 (2007)
- 19) 羽毛田靖：ATP 法による細菌数測定装置の基礎と応用, 防菌防黴, 25(8), 457-466 (1997)
- 20) 福崎智司：次亜塩素酸ナトリウムを用いた洗浄・殺菌操作の理論と実際, 調理食品と技術, 16(1), 1-13 (2010)
- 21) レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針, 厚生労働省告示第 264 号, 平成 15 年 7 月 25 日