

教育環境の細菌学的調査への迅速自動細菌検査装置の応用

古田 裕子*・小早川ゆり**・大本 洋嗣**・浜田元輔**・清原伸彦**
青木茂治***・江原友子****・長 船 哲 齊* *****・大 和 眞*****

(平成 8 年 10 月 18 日受付, 平成 9 年 1 月 31 日受理)

Evaluation of the AutoMicrobic System for Identification of Bacteria in the Water of Swimming Pools

Hiroko FURUTA, Yuri KOBAYAKAWA, Youji OHOMOTO, Motosuke HAMADA,
Nobuhiko KIYOHARA, Shigeji AOKI, Tomoko EHARA,
Tetsuaki OSAFUNE and Makoto YAMATO

Little attention has been paid to the sanitary and hygienic regime of the swimming pool. Furthermore, little is known concerning the actual circumstances of bacteria contamination in the water of swimming pools. We investigated the rapid system of identification of isolated bacteria from the water of indoor and outdoor swimming pools in Nippon Sport Science University on April 6th and 18th, 1996. Fifteen strains of typical bacteria isolated from the water of indoor and outdoor swimming pools were rapidly identified with a Gram-Positive and Negative Identification card used in conjunction with the AutoMicrobic system. We found that these bacteria were non-pathogenic bacteria which are often found in water. However, *Pseudomonas* and *Serratia* strains have recently been noticed as the bacteria of opportunistic infection in the clinical medicine. It is considered that the water of indoor and outdoor swimming pools in our University is well maintained. It is necessary to continue watching the bacterial flora in the water of swimming pool throughout four seasons.

はじめに

体育系大学の学生を取り巻く教育環境条件には、公衆衛生学的にさまざまなものが挙げられる。それらのうち、教育環境や施設の細菌などの微生物による汚染を知っておくことは教育上また防疫上、重要なことと考えられる。そのため、学内のいろいろな施設から分離された細菌を同定し、その結果から必要がある場合には適切な防疫対策を立てることが大切である。

この度、本学に自動細菌検査システム、Vitek Auto Microbic System (AMS) および Automatic Tests in Bacteriology (ATB) (日本ビオメリュー・バイテック(株))が導入されることとなった。本システムは、分離された細菌の生理生化学的性状を調べ、コンピュータを利用して迅速に被検細菌の同定を行う装置である。そこで手始めとして、本研究ではこの自動細菌検査装置を学内プールの細菌検査に応用することを試みた。

消化器感染症の感染源は、飲料水や食物が主なものとされている。最近、ウイルス、細菌、真菌や寄生虫卵に汚染されたプールの水を遊泳中に無意識に飲み込むことによって、感染症を引き起こした例が数多く報告されている¹⁻⁶⁾。例えば、Keeら(1994)は夏期の屋外プールにおいて、一日の利用者185名中、46名が吐き気、下痢、頭痛を起こした Echovirus S30 の感染例を報告している¹⁾。また Brewsterら(1994)は、スコットランドで発生したペロ毒素を産生する病原性大腸菌 O-157 株の感染源として、子供用プールに着目している⁴⁾。

近年、プールの利用は単に健常者の競技や遊泳に限られたものではなく、何らかの疾患をもつ患者のリハビリテーションや体力増進などにも利用されてきている。このような社会的趨勢を考えると、日頃からプールの細菌による汚染状況を的確に把握しておくことは非常に大切なことである。本稿は、今後の継続的かつ組織的検査

* 自然科学, ** 運動方法 (水泳), *** 日本歯科大学 (総合研究センター), **** 東京医科大学 (微生物学), ***** 体育研究所

の基礎とするため、新しく導入された自動細菌検査装置を学内プールの細菌検査に試験的に応用した例について報告する。

I. 材料と方法

1. 被検菌採取と培養法

被検プール水は1996年4月18日、日本体育大学屋内プール（深沢キャンパス：水温26°C，0.4~1.0 ppmの次亜塩素酸ナトリウムを含む）および1996年4月6日、日本体育大学屋外プール（健志台キャンパス：水温28°C，0.4~1.0 ppmの次亜塩素酸ナトリウムを含む）から採取したもので、消毒に用いられている次亜塩素酸ナトリウムの濃度は水質基準条件を満たしている。これらの水は、あらかじめ滅菌した試験管に採取し、できるだけ速やかに細菌増殖用ハートインフュージョン寒天培地（栄研化学）、真菌用サブロー寒天培地（栄研化学）、低温細菌用CVT寒天培地（栄研化学）を使用し細菌および真菌の検出を試みた。すなわち被検水0.1 mlを各々の寒天平板培地に滅菌ピペットで滴下し、コンラージ棒により寒天平板上に塗布した。寒天培地は恒温器（アドバンテックCI-610）で35°Cまたは20°C，1~7日間培養した後、平板上に生じた集落数を計数しプール中の菌濃度を推定した。

2. 使用機器

各々の寒天培地から得られた各菌集落について純培養し、特に出現頻度の高いと思われる細菌について、グラム染色を行った後、VITEK AMS および ATB (Auto-

matic Tests in Bacteriology) 自動細菌検査装置（日本ビオメリュー・バイテック(株)）によって4~24時間以内で同定した⁷⁾。

3. API 細菌同定キット:

VITEK AMS および ATB のデータベースに入力されていない菌種の同定にはAPI手法（日本ビオメリュー・バイテック(株)）で判定した。

4. 次亜塩素酸ナトリウム・ディスク法による感受性試験:

自動細菌検査装置によって迅速同定された *Pseudomonas* と *Serratia* とは日和見感染の起因菌である。これらの菌について、次亜塩素酸ナトリウム（和光純薬(株)製）による各濃度の抵抗性を調査した。

成 績

1996年4月6日に日本体育大学、屋外プールから採取した細菌および真菌の集落（コロニー）数は 4.5×10^2 個/mlで、4月18日の屋内プールでは20個/mlであった。次に、分離頻度の高いと思われる細菌のコロニーについてグラム染色を行った。その結果、90%以上はグラム陽性桿菌であった。表1は、これらの細菌の一部を自動細菌検査装置により、菌種を同定したもので菌種同定の確度は90~99.8%であった。屋内・屋外プールともに好気性・通性嫌気性芽胞形成グラム陽性桿菌 *Bacillus* 属が最も多く分離され、菌株は *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *B. megaterium* であった。次いでグラム陽性球菌 *Staphylococcus saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. siuri* が検

表 1

屋内プール 1996年 4月18日 水温 26°C	屋外プール 1996年 4月6日 水温 28°C
<i>Bacillus subtilis</i> G+ 桿菌	<i>Bacillus subtilis</i> G+ 桿菌
<i>Bacillus sphaericus</i> G+ 桿菌	<i>Bacillus megaterium</i> G+ 桿菌
<i>Bacillus megaterium</i> G+ 桿菌	<i>Flavobacterium indologenes</i> G- 桿菌
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> G+ 球菌	<i>Staphylococcus siuri</i> G+ 球菌
<i>Staphylococcus xylosus</i> G+ 球菌	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> G- 桿菌
<i>Pasteurella pneumotropica</i> G- 桿菌	<i>Micrococcus nishinomiyamrnsis</i> G+ 球菌
<i>Aeromonas salmonicida</i> G- 桿菌	<i>Pseudomonas cepacia</i> G- 桿菌
	<i>Serratia marcescens</i> G- 桿菌

日本体育大学に Vitek AutoMicrobic System (AMS) および Automatic Tests in Bacteriology (ATB) が導入された。本システムは、分離された細菌の生理生化学的性状を調べ、コンピュータを利用して迅速に被検細菌の同定を行う装置である。そこで手始めとして、本研究ではこの自動細菌検査装置を学内プールの細菌検査に応用することを試みた。表は屋内・屋外プール水から、高頻度に分離された菌種について同定したものである。G: グラム染色による陰性 (-), 陽性 (+) を示す。

出された(表1)。屋外プールにおいては、グラム陰性桿菌 *Pseudomonas cepacia*, *Serratia marcescens* が分離された。これらの菌種は水中、土壌、動物、植物に常在することが知られている腐敗菌である^{8,9)}。

当プールでは常に法定による0.4~1.0 ppmの次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)が添加され、適切な管理がなされている。最近、*Pseudomonas* や *Serratia* の菌種一部は日和見感染の起因菌として注目されている¹⁰⁾。今回、このような環境条件下で検出された *P. cepacia*, *S. marcescens* について、ディスク法による次亜塩素酸ナトリウム感受性試験を段階的に行った。その結果、阻止円は両菌とも次亜塩素酸ナトリウム・ディスク上の濃度50 ppmで形成された。したがって、プールから検出される *Pseudomonas* や *Serratia* の菌種の中には、消毒剤として使用される次亜塩素酸ナトリウムに耐性を示すことが明らかになった。

考 察

医学臨床検査分野においては、病気の原因となっている細菌など微生物の同定は必須である。しかし、従来から用いられている定法による同定作業は、各種の試薬調製や培地の作成が繁雑であり、菌種決定までに長時間を要するのが実状である。そのため、細菌検査の分野では、近年自動化機器が使用されるようになってきた^{12~14)}。

現在、微生物同定の自動化装置は数種市販されているが、本研究で使用した Vitek AMS システムは、マクダネル・ダグラス社(米国)により開発された装置である¹⁰⁾。本装置は、臨床材料や環境中から分離されたグラム陽性菌¹³⁾、グラム陰性桿菌¹²⁾、真菌¹⁴⁾の生理生化学的性状を、それぞれの微生物群に専用のテストカード(培地)で調べ、その結果を自動的にコンピュータに読みとりコード化する。そして得られたコードを装置に内蔵されているデータベースと照合させて、被検株の菌種を同定する。また、本装置は分離された細菌の薬剤感受性試験にも利用できる機能も備えている¹¹⁾。

今回は、日本体育大学に新しく導入されることになった本装置を用いて、当大学の屋内および屋外プールから検出される細菌を調べたもので、その結果を報告した。

両プールで検出されたグラム陽性桿菌は *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. sphaericus* などの *Bacillus* 属の菌種であった。これらの菌種のうち、*B. subtilis* は日和見感染を起こし、菌血症、眼感染症、心内膜炎、呼吸器疾患などの原因となる可能性が指摘されている。*Bacillus* 属は耐久孢子を形成し、過酷な環境下でも耐えることができるため、自然界には広く生息している。し

たがって、両プールで検出されたことは、この属の菌種が持っている特性を反映したものであろう。

グラム陽性菌として *Staphylococcus* 属の *S. saprophyticus*, *S. xylosus* および *S. siuri* が検出された。これらの菌を光学顕微鏡で観察すると、菌体は球状でブドウの房状の特徴的な配列をしていた。*Staphylococcus* 属の菌種のなかでは黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) が最も病原性が強く、食中毒や化膿性感染症の原因菌としてよく知られている。特に近年は、各種の抗生物質に耐性のメチシリン耐性ブドウ球菌(MRSA)による院内感染が問題となっている¹⁵⁾。屋内プールから検出された *S. saprophyticus* は、コアグラーゼ陰性で病原性はないとされているが、表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*) と同じように院内感染や日和見感染の原因となり得るとの報告もあり、臨床には無視できない菌種である¹⁵⁾。

グラム陰性桿菌 *Pseudomonas* 属は水中や土壌中に、また動物や植物に付着して生息している。一般に *Pseudomonas* 属は消毒剤 chlorhexidine digluconate の保存液中でも増殖し、それが原因となって尿路感染症、創傷感染症、敗血症などの院内感染を起こした例が報告されている⁸⁾。この属の代表的な菌種である緑膿菌 (*P. aeruginosa*) は、本来は病原性は強くはないが、広域抗生物質を投与した患者に菌交代症を起こして、緑膿菌感染症を誘発することが知られている。今回、屋外プールで検出された *P. cepacia* は1950年にタマネギの病原菌として分離されたもので、その後植物や動物に広く分布していることが明らかになった。ヒトに対しても稀には感染症を起こすことがあるとの報告もある⁸⁾。

屋外プールから検出されたグラム陰性桿菌 *Sphingomonas paucimobilis* は、水道の蛇口、流し台などに生息しており、菌血症や脳外科手術後の髄膜炎などを起こす。この菌は紫外線に対して抵抗性が強いことが特徴とされている^{8,9)}。

屋内プールで検出されたグラム陰性桿菌 *Aeromonas salmonicida* は Vitek 装置では84%の確率で *Vibrio alginolyticus* と判定されたが、25°Cの低温下、0.1% NaCl 普通寒天培地で増殖することから、同菌と確定された。*A. salmonicida* は河川水に広く分布し、サケやマスに対しては病原性がある⁸⁾。*Aeromonas* 属の菌のなかにはヒトに対して、水による創傷感染症、急性下痢症、敗血症などを起こすものもあるが、*A. salmonicida* の病原性についてはまだ明らかになっていない⁸⁾。

以上、当学の屋外、屋内プールから検出された細菌群について、その性状を概観した。今回は1回のみを試料採取であったが、分離、同定された細菌は水中などの自

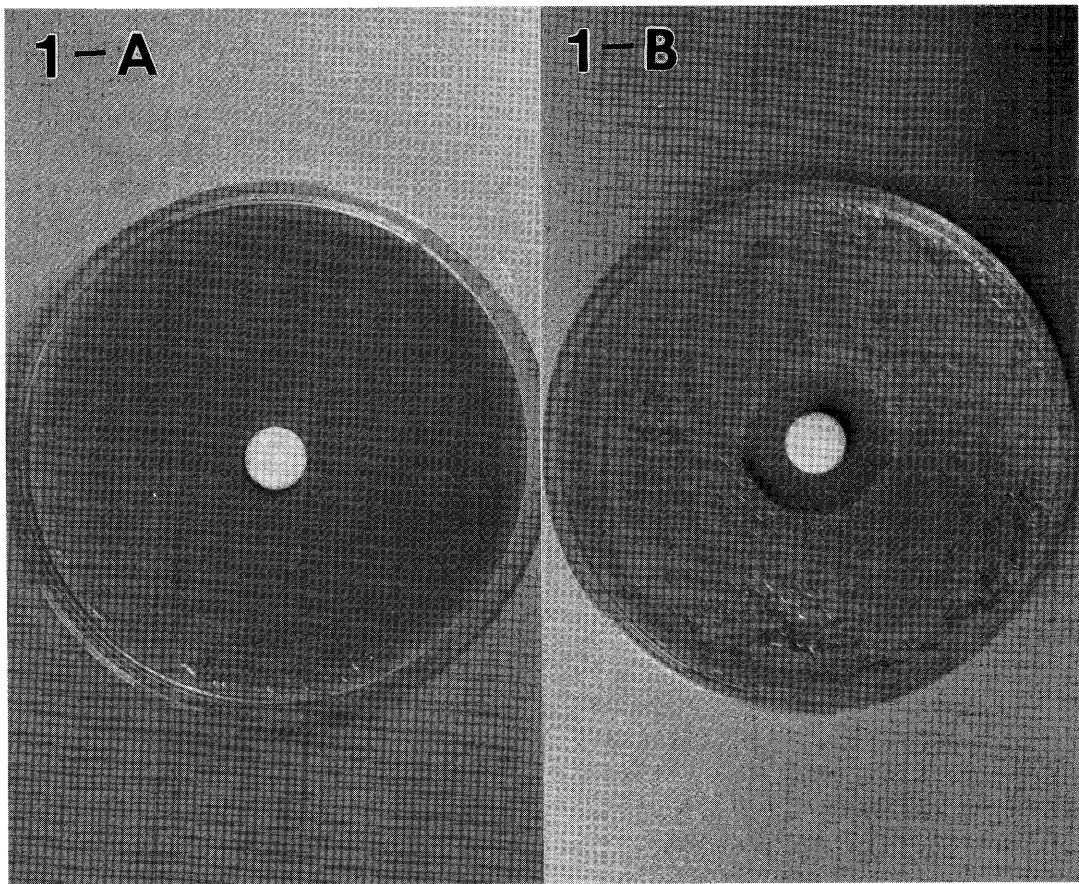


写真1

プール水から分離された *Pseudomonas*, *Serratia* について、プールの消毒剤として使用されている次亜塩素酸ナトリウムの濃度感受性検査を実施した。次亜塩素酸ナトリウムは 1, 5, 10, 50 および 100 ppm 濃度で行った。写真 A はプール水から分離された *Serratia marcescens* 株の感受性試験の結果を示す。次亜塩素酸ナトリウム濃度 10 ppm では阻止円は得られなかった。写真 B は濃度 50 ppm で直径 2.5 cm の阻止円が観察された。*Pseudomonas cepacia* 株についても同様の結果が得られた（本稿にはデータは示していない）。これらの結果から、*Pseudomonas* や *Serratia* では次亜塩素酸ナトリウムに耐性になっていることが明らかになった。しかし、*Pseudomonas* や *Serratia* はヒトに対して常在菌叢を構成する非病原菌であり、また測定の結果、水中に存在する総菌数は極めて少ないため、健康な遊泳者に直接感染症を引き起こす可能性はないと推測される。

然環境中に常在する菌種で、本来ヒトに対しては常在菌叢を構成する非病原性のものであった⁹⁾。また、プール水中に含まれる総菌数は少なく、遊泳者に対して直接感染症を引き起こす可能性はきわめて低いと考えられる。しかし、プール利用者の年齢層の幅が、わが国に比べてはるかに広い欧米諸国では、プールが水経由の感染源となりうる可能性が高いことが早くから指摘されている^{4~6)}。したがって、当大学のプールについても細菌汚染の状況を日頃から把握しておくことは、異常時における適切な対応のためにも必要なことである。なお、プール水採取時の次亜塩素酸ナトリウム濃度は基準条件を満たしてお

り、プールは適切な水質管理がされていることが示唆された。

今回のプールからの試料採取は 4 月に 1 回行ったのみであり、得られた結果から性急に結論を導くことは危険である。プールの細菌叢は、試料採取時の水温、利用者数、消毒剤濃度などによって変化が生じる可能性がある。したがって、今後はこれらの変動要因を的確に把握しながら、年間を通して定期的に試料を採取し、細菌汚染の状況を継続的に観察していく予定である。その過程で、もしも病原性の強い細菌が検出されたり、あるいは細菌感染によるプール事故が発生した場合には、利用者

に対する細菌の影響についても適時検討するつもりである。本学におけるこのようなプールの継続的調査により、それらの細菌汚染の実態が詳細に掌握されれば、プール利用者の健康管理やプールの衛生管理などのための有益な基礎データとなるとが期待される。そして、それらの基礎データは、病気からの回復のために水泳を取り入れている患者に対する適切な遊泳指導や、日和見感染の防止対策策定にも役立つものとなるであろう。さらに写真1に示したように、プールの主な消毒剤として使用されている次亜塩素酸ナトリウムに強い耐性を示す菌も検出された。今後は、次亜塩素酸ナトリウム耐性菌の予防策の検討も重要な研究課題となるであろう。

本研究に使用した自動細菌検査装置は、分離された細菌を短期間に同定するにはきわめて有用であった。また、必要な場合には他の同定試験を併用することにより、その有用性はいっそう増強された。なお、今回は使用しなかったが、本装置が持っている薬剤感受性試験の機能も併せて利用すれば、分離された細菌の、より詳細な性状も解析できると期待される。当大学にはプール以外にも細菌検査の対象となるいろいろな施設がある。また、学生が直接身に付けたり、手にする防具、ユニフォーム、スポーツ用具などの細菌汚染の実体も興味ある問題であり、これらは今後の研究課題としたい。

謝 辞

貴重な御助言を戴いた衛生学・公衆衛生学研究室 伊藤 孝教授に厚く御礼申し上げます。本研究の一部は、日本体育大学・奨励研究費および平成7年度文部省科学研究・基盤研究(A)分担費第07304082号、一般研究(C)第07640886号の援助によっておこなった。

引用文献

- 1) Kee, F., McElroy, G., Stewart, D., Corle, P. and Watson, J.: A community outbreak of echovirus infection associated with an outdoor swimming pool. *J. Public Health Med.*, **16**, 145-148, 1994.
- 2) 村上 司, 春木孝祐, 木村輝男, 箕城昇次, 志辺清子, 鶴保謙四郎: プール水およびスイミングプール遊泳者からのウイルス分離. 大阪市立環境科学研究所報告, **50**, 82-86, 1988.
- 3) 新関寛二: こどもとプール皮膚感染症. 日本小児皮膚科学会雑誌, **8**, 18-26, 1989.
- 4) Brewster, D. H., Brown, M. I., Robertson, D., Houghton, G. L., Bimson, J. and Sharp, J. C.: An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol. Infect.*, **112**, 441-447, 1994.
- 5) Totkova, A., Klobusicky, M., Valent, M. and Tirjakova, E.: Helmintologicke a protozoologicke nalezy vo vode skolskeho bazena. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.*, **43**, 130-136, 1994.
- 6) Keusch, G. T., Hamer, D., Joe, A., Kelley, M., Griffiths, J. and Ward, H.: Cryptosporidia, who is at risk? *Schweiz Med. Wochenschr.*, **125**, 899-908, 1995.
- 7) 長沢光章: 自動機器—バイテック (VITEK). 臨床と微生物, **22**, 669-675, 1995.
- 8) 加藤延夫: 医系微生物学 (2班). 朝倉書店, 1995.
- 9) Stanier, R. Y., Adelberg, E. A. and Ingraham, J. L.: *The Microbial World*. Prentice-Hall INC., 1976.
- 10) Lapage, S. P. *et al.*: Identification of bacteria by computer: General aspects and perspectives. *J. Gen. Microbiol.*, **77**, 273-290, 1973.
- 11) Isenberg, H. S. and Sampson Scherer, J.: Clinical laboratory feasibility study of antibiotic susceptibility determined by the AutoMicrobic System. *Current chemotherapy and infectious disease. Am. Soc. Microbiol.*, 526-528, 1980.
- 12) 山根誠久, 加藤仁美: 自動検査装置 AMS-EBA カードによる腸内細菌同定の検討. 臨床と細菌, **10**, 327-336, 1983.
- 13) Appelbaum, P. C. *et al.*: Comparative evaluation of the API20S system and the AMS Gram-Positive Identification Card for species identification of *Streptococci*. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 164-168, 1984.
- 14) 山根誠久, 斎藤芳彦: 自動検査装置 AMS-YBCA による酵母状真菌同定成績. 臨床と細菌, **9**, 493-501, 1982.
- 15) 那須 勝: MRSA 最近の動向, 総合臨床, **40**, 209-215, 1991.