

公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究

新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT法の有効性の検討

研究代表者	前川純子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所
研究分担者	佐々木麻里	大分県衛生環境研究センター
研究分担者	田栗利紹	長崎県環境保健研究センター
研究協力者	緒方喜久代	公益社団法人大分県薬剤師会 検査センター
研究協力者	湯澤栄子	川崎市健康安全研究所
研究協力者	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
研究協力者	田中奈緒美	アイデックスラボラトリーズ株式会社

研究要旨:レジオネラ属菌の検査においては平板培養法が広く利用されているが、手技が煩雑であり、検査室における手技の安定性が問われる試験である。今回、手技が非常に簡易な特定酵素基質培地キットであるレジオラート/QT法の感度、特異度及び定量性を検討するため、平板培養法と比較した。温泉水、浴槽水等計138検体について実施したところ、平板培養法と比較したレジオラート/QT法の感度は75.6%、特異度81.7%であり、結果一致率は79.7%であった。結果が不一致であったものは28検体あり、比較的検出菌量の少ない検体が多かった。レジオラート/QT法のみ検出であった17検体について、陽性となったウェルの液体培地からレジオネラ属菌の分離を試みたところ、14検体で*L. pneumophila*が検出されたが、3検体についてはレジオネラ属菌が分離できなかった。レジオラート/QT法及び平板培養法ともに検出となった34検体について検出菌量の比較を行ったところ、レジオラート/QT法の方が検出菌量の多い傾向があるものの回帰直線の R^2 は0.778であり、強い相関が認められた。本検討の結果からレジオラート/QT法は平板培養法と同等の検査法であるとともに、手技も平板培養法と比較し非常に簡易であり有用な検査法であると考えられる。

A. 研究目的

レジオネラ属菌の検査においては平板培養法が広く用いられているが、検体の濃縮、分離培地の選択、加えてコロニーの鑑別などに熟練を要する等、検査機関内外での検査手技の安定性が課題となっている。近年、*Legionella pneumophila* 検出用の特定酵素基質培地であるレジオラートと培養兼計数用の専用トレイ Quanti-Tray/legiolert が販売されており、欧米等の諸外国で使用されている。レジオラートには *L. pneumophila* が特異的にもつ酵素によっ

て分解できる基質が含まれており、これが分解されることにより茶色の発色が起こり、選択的に菌を検出することができる。レジオラート/QT法はレジオラートを溶かした検体を専用トレイ Quanti-Tray/legiolert で培養することにより *L. pneumophila* を選択的に検出・定量できる検査法であり、濃縮手順がなく、確定試験が不要である等、操作が非常に簡易なキットである。今回、国内における浴槽水及び温泉水等についてレジオラート/QT法の感度・特異度及び定量性を確認するため、従来の平板培養法と

比較検討した。

B. 研究方法

1. 基礎的検討

基礎的検討として、循環ろ過式入浴施設から入手したろ材より分離された *L. pneumophila* SGUT の菌株を BCYE α 寒天培地に塗布し増菌した後、希釈系列を作成し、平板培養法及びレジオラート/QT 法を行い、各々の検出菌数を比較した。

方法としては、*L. pneumophila* の菌株を BCYE α 寒天培地で 2~4 日間培養し、発育したコロニーを滅菌水に懸濁し、希釈系列を 10 倍ごと 4 段階作成したものをを用いて比較実験を実施した。BCYE α 寒天培地に各希釈段階の菌懸濁液 0.1 mL を添加し湿潤環境で 36 °C で 7 日間培養した。並行して、レジオラートを溶解した滅菌水 100 mL に各希釈段階の菌懸濁液 0.1 mL を添加し混和した後、Quanti-Tray/legiolert にシーラーPLUS を用いて封入し、湿潤環境で 36 °C で 7 日間培養した。本培養温度はレジオネラ症防止指針第 4 版に準拠している。培養後、茶色または濁りの生じたウェル数を陽性とし、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。上記の実験を 3 回繰り返した。

2. 実検体の検討

(1) 対象

各施設に搬入された公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 138 検体を対象とした。

(2) 方法

レジオラート/QT 法は添付された説明書の飲料水用 10 mL プロトコールに従い実施した。滅菌水 90 mL にレジオラートを加えよく溶かした後、浴槽水等の検体 10 mL を加えた。よく混

和した後、専用の Quanti-Tray/legiolert にシーラーPLUS を用いて封入し、湿潤環境で 39 °C で 7 日間培養した。培養後、茶色または濁りの生じたウェル数を陽性とし、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。陽性となったウェルの液体培地を GVPC α 寒天培地等レジオネラ属菌選択分離培地に塗抹し、レジオネラ属菌の分離を行い、システイン要求性又は免疫血清により検出菌の同定を行った。

同時に平板培養法にてレジオネラ属菌の分離を実施した。平板培養法は各検査機関の方法で実施し、ろ過濃縮法にてレジオネラ属菌の分離を行い、システイン要求性又は免疫血清により検出菌の同定及び検出菌量を算出した。なお、大分県衛生環境研究センターの検出菌量は、標準法（非濃縮検体を除く）で実施したものである。

各検査方法における検出率を比較するとともに、レジオラート/QT 法で求められた MPN 値と平板培養法で求められた CFU 値を比較した。

C. 結果

1. 基礎的検討

レジオラート/QT 法における検出菌量は希釈系列ごとに概ね 10 倍ごと段階的に減少していき、希釈ごとに表のとおり検出菌量を示した（表 1）。また、同時に実施した平板培養法においてもレジオラート/QT 法とある程度同等の検出菌量を示した。

2. 実検体の検討

温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 138 検体についてレジオラート/QT 法及び平板培養法を実施したところ、両方法で検出となったものが 34 検体、両方法で不検出となったものは 76 検体であった（表 2）。平板培養法と比較したレ

レジオラート/QT法の感度は75.6%、特異度81.7%であり、結果一致率は79.7%であった。検出菌量はレジオラート/QT法で0-22726 MPN/100mL、培養法では0-16640 CFU/100mLであった。結果が不一致であった検体は28検体あり、レジオラート/QT法検出で平板培養法不検出が17検体、レジオラート/QT法不検出で平板培養法検出が11検体であった(表3)。レジオラート/QT法のみ検出であった検体の検出菌量は10-534 MPN/100mL、平板培養法のみ検出であった検体の検出菌量は10-80 CFU/100mLであった。レジオラート/QT法のみ検出であった検体について、陽性となったウェルの液体培地からレジオネラ属菌の分離を行ったところ、14検体で*L. pneumophila*が検出されたが、3検体についてはレジオネラ属菌が分離できなかった。一方で平板培養法のみ検出であった11検体の菌量は10-80 CFU/100mLであり、このうち、*L. pneumophila*が検出された6検体は10-40 CFU/100mLであった。5検体についてはレジオネラ属菌であることをシステム要求性により確認したが、菌種同定は未実施であった。

レジオラート/QT法及び平板培養法ともにレジオネラ属菌を検出した34検体について検出菌量の比較を行った(図1)。レジオラート/QT法の方が検出菌量の多い傾向があるものの、回帰直線の R^2 は0.778となり、強い相関が認められた。

D. 考察

レジオラート/QT法の有効性を確認するため、既存菌株を用いた希釈系列を作成し検討したところ、希釈系列ごとに検出菌量が減少した。また、平板培養法と比較してもほぼ同等の検出菌量であったことから、既存菌株を用いた検討においてレジオラート/QT法は平板培養法と同等の性能であることが示された。

続いて、実検体におけるレジオラート/QT法の有効性を検討したところ、平板培養法との一致率が79.7%と高い一致率を示した。また、検出菌量についても平板培養法との強い相関が確認され、実検体においても有用な検査であることが示された。28検体についてはそれぞれ一方のみ検出の検体が確認されたが、検出菌量の比較的少ない検体に結果の不一致が起こった。この28検体中レジオラート/QT法検出で平板培養法不検出が17検体、レジオラート/QT法不検出で平板培養法検出が11検体であり、レジオラート/QT法及び平板培養法の検出感度は同程度であることが示唆された。レジオラート/QT法のみ検出であった検体について、陽性反応を示したウェルの液体培地からレジオネラ属菌の分離を試みたが、3検体についてはウェルの液体培地からレジオネラ属菌を分離することはできなかった。この原因として、検体に含まれる他の細菌がレジオラートに含まれる基質に反応した偽陽性の可能性、あるいは分離培養の困難な菌種であった可能性が考えられる。一方で、平板培養法のみ検出された検体のうち、5検体についてはレジオネラ属菌の菌種を同定しておらず、レジオラート/QT法で検出できない菌種、つまり*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌であったため、レジオラート/QT法では検出できなかった可能性が考えられる。

本検討の実検体における検討は各施設で行っており、対象検体がそれぞれ異なることに加え、温泉水が多く含まれ、含有成分やpH等検体の性質が異なること、また、平板培養法を各施設の方法で実施したことによる差を留意する必要がある。また、レジオラート/QT法は*L. pneumophila*を特異的に検出するキットであるが、本検討においてレジオラート/QT法で検出され、かつ*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌のみが検出される検体はなかった。*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌が含まれ

る検体においてレジオラート/QT法がどのような結果を示すか確認する必要があると考えられる。また、本検討においてレジオラート/QT法検出、平板培養法不検出であり、レジオラート/QT法からレジオネラ属菌が分離できなかった偽陽性の可能性がある検体が3検体確認された。頻度は少ないものの、どのような菌種がキットに影響を与えているか、より詳細な検討が必要である。しかしながら、レジオラート/QT法の手技は非常に簡易であり、平板培養法における過、前処理等の複雑な手技がなく多検体の処理が短時間で可能であること、コロニーの鑑別が不要であることから結果判定も容易であり、検査経験が浅い検査員でも検査が可能である利点があると考えられる。このことから、レジオラート/QT法は平板培養法と比較し検査者間、検査室間の差が出にくく使用しやすい有用なキ

ットであると考えられる。

E. 総括

レジオラート/QT法は平板培養法と同等の検査法であるとともに、手技も平板培養法と比較し非常に簡易であり有用な検査法である。

F. 健康危険情報

なし

G. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 レジオラート/QT法の基礎的検討結果

検体	希釈系列	レジオラート/QT法 (MPN/mL)	平板培養法 (CFU/mL)
1	10 ⁻³	>22726	>300
	10 ⁻⁴	>22726	>300
	10 ⁻⁵	17178	>300
	10 ⁻⁶	1644	1540
2	10 ⁻³	>22726	>300
	10 ⁻⁴	>22726	>300
	10 ⁻⁵	>22726	>300
	10 ⁻⁶	2580	2460
3	10 ⁻³	5067	>300
	10 ⁻⁴	788	640
	10 ⁻⁵	39	20
	10 ⁻⁶	<1	0

表 2 実検体におけるレジオラート/QT法と平板培養法の結果

レジオラート/QT法	平板培養法		
	検出	不検出	計
検出	34	17	51
不検出	11	76	87
計	45	93	138

表 3 不一致検体の一覧

表 3-1 レジオラート/QT 法のみ検出であった検体一覧(n=17)

検体No.	検体種別	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)	平板培養法 (CFU/100mL)	検出菌種
1	温泉水	10	<10	<i>L. pneumophila</i>
2	採暖槽水	11	<10	<i>L. pneumophila</i> SG5
3	浴槽水 (水道)	11	<10	<i>L. pneumophila</i> SG5
4	浴槽水 (水道)	10	<10	<i>L. pneumophila</i> SG6
5	採暖槽水	11	<10	<i>L. pneumophila</i> SG6
6	温泉水	534	<10	<i>Legionella</i> sp.
7	温泉水	35	<10	※検出できず
8	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
9	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
10	温泉水	223	<10	<i>Legionella</i> sp.
11	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
12	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
13	温泉水	11	<10	※検出できず
14	温泉水	20	<10	<i>Legionella</i> sp.
15	温泉水	23	<10	※検出できず
16	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
17	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.

表 3-2 平板培養法のみ検出であった検体一覧(n=11)

検体No.	検体種別	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)	平板培養法 (CFU/100mL)	検出菌種
1	温泉水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SG6, UT
2	温泉水	0	40	<i>L. pneumophila</i> SG5, 7, UT
3	温泉水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SG3
4	温泉水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SGUT
5	温泉水	0	10	<i>Legionella</i> sp.
6	再暖槽水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SG1
7	浴槽水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SG6
8	温泉水	0	10	<i>Legionella</i> sp.
9	温泉水	0	80	<i>Legionella</i> sp.
10	温泉水	0	20	<i>Legionella</i> sp.
11	温泉水	0	10	<i>Legionella</i> sp.

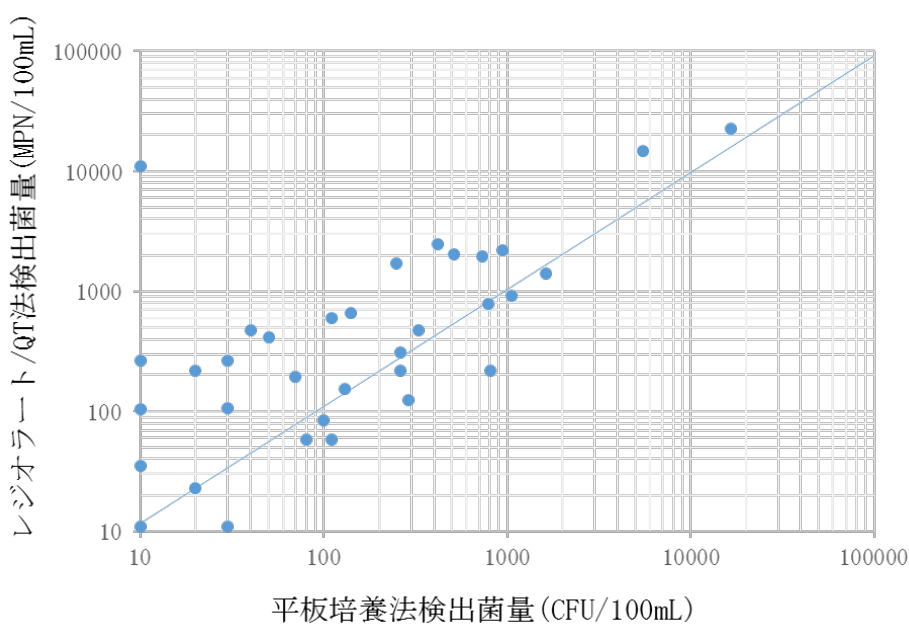


図 1 レジオラート/QT 法と平板培養法の検出菌量の比較(n=34)