

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「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」

令和元年度分担研究報告書

大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT 法の評価、
比色系パルサー法の検討

研究分担者 佐々木 麻里 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 神田 由子、溝腰 朗人、成松 浩志
大分県衛生環境研究センター
研究協力者 江川 英明 大分県南部保健所
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

研究要旨：浴場水のレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として厚生労働省から示された方法について、多様な泉質を有する大分県の実検体を用いて評価した。当所で従来から実施している方法と比較して、培地枚数が少ないにも関わらず同等の結果が得られた。特定酵素基質培地と専用トレイを組み合わせたレジオラート/QT 法は、公衆衛生上重要な菌種である *Legionella pneumophila* を簡便に検査でき、検出された菌量は平板培養法とおおむね同等で強い相関が見られた。比色系パルサー法は、特殊な機器を必要としないため保健所等監視指導機関等での活用が期待できる。溶菌液調製に用いるセルロース製フィルターの孔径を $0.45\mu\text{m}$ に大きくすることでろ過の時間が短縮され、なおかつ孔径 $0.22\mu\text{m}$ と同等の結果が得られた。保健所にて孔径 $0.45\mu\text{m}$ のセルロース製フィルターを用いたパルサー法によるレジオネラ属菌検査を行なったところ、平板培養法でレジオネラ属菌が検出された 2 検体中 1 検体が、パルサー法で陽性となった。

A. 研究目的

公衆浴場において問題となるレジオネラ属菌への対応として、厚生労働省の指針¹⁾により定期的に水質検査を行うこととされており、そのレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として検査法²⁾（ここでは、標準法と称する。）が通知された。この標準法について、多様な泉質を有する大分県の実検体を用いて評価した。併せて、*Legionella pneumophila* を特異的に検出する特定酵素基質培地と最確数（MPN）法で定量する専用トレイを組み合わせたレジオラート/QT 法についても実検体を用いた評価を行った。培養法に加えて、迅速検査法として比色系パルサー法について検討を行った。比色系パルサー法は、レジオネラ属菌特異的 16S rRNA に自己集合体を結合させることで、標的遺伝子を増

幅させずに目視で検知する検査法である。測定に特殊な機器を必要としないことから、試験検査機関のみならず監視指導機関等での活用が期待される。前年度、保健所においてパルサー法によるレジオネラ属菌検査を実施したところ、平板培養法ではレジオネラ属菌が検出されたが、パルサー法では陰性の結果となった³⁾。今年度は濃縮工程を見直し、フィルター孔径を大きくすることで検体濃縮時間の短縮を図った。

B. 研究方法

1. 試料および調製法

令和元年 5 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水 24 施設分 45 検体を対象とした。

濃縮と前処理の方法は標準法に準じて実

施した。すなわち、検体 1200mL をメンブ
ランフィルター（直径 47mm、孔径 0.2 μ m、
ADVANTEC 社、POLYCARBONATE）で吸引
ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水
12mL 入りの滅菌コニカルビーカー（100mL
容量）に移し、ボルテックスミキサーにて 1
分間洗い出しをした。ろ過濃縮後の濃縮試
料（100 倍濃縮）について、50 $^{\circ}$ C で 20 分加
熱後急冷したもの（以下、熱処理試料）、濃
縮試料に等量の 0.2M HCl・KCl 液 pH2.2 \pm
0.2（武藤化学）を加え混和し室温で 5 分間
静置したもの（以下、酸処理試料）、熱や酸
による前処理を行わないもの（以下、未処理
試料）を調製した。

2. 平板培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYO
 α 寒天培地（栄研化学）、GVPC 寒天培地（日
研生物）および MWY 寒天培地（自家製；
Oxoid）を用い、従来から当所で実施して
いた方法（以下、大分法）と標準法とで実施
した。大分法として、熱処理試料および未加熱
試料について、それぞれ 10 倍階段希釈を 2
段（10 倍、100 倍）まで行い、各希釈段階
（1 倍～100 倍）の試料 200 μ L を各分離平板
1 枚にコンラージ棒で塗布した。標準法とし
て、酸処理試料については 200 μ L、熱処理試
料については 100 μ L、濃縮処理を行わない
検体（以下、非濃縮検体）については 200 μ L
を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布し
た。なお、標準法として通知に記載されてい
る非濃縮検体の塗抹量は 100 μ L であるので、
本研究方法ではその 2 倍量を塗抹している
ことになる。これらの培地を乾燥しないよう
にビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、
36 $^{\circ}$ C で培養した。検出限界は大分法では
5cfu/100mL、標準法では 10cfu/100mL（非濃
縮検体では 500cfu/100mL）である（表 1）。

標準法に採用され、大分法においても従
前より実施していた斜光法⁴⁾にて、培養 3
日後に各分離培地を観察した。レジオネラ
属菌が疑われたコロニーは、BCYE α 寒天培
地（自家製；Oxoid）および血液寒天培地（ウ
マ血、自家製）に接種し、血液寒天培地での
発育の有無を確認した。BCYE α 寒天で発育
し、血液寒天では発育しなかったコロニー

について、PCR 法での同定検査を行った。
斜光法観察後の分離培地は 36 $^{\circ}$ C で 7 日間培
養を継続し、分離平板上に出現した灰白色
のレジオネラ様コロニーについて、同様の
同定検査を行った。最終的に同定されたコ
ロニー数をもって検体 100mL あたりのレジ
オネラ属菌数に換算した。

3. レジオラート/QT 法

非濃縮検体 45 検体について、
L.pneumophila を特異的に検出する特定酵素
基質培地レジオラートと専用トレイの
Quanti-Tray/Legiolert（いずれも IDEXX）を
用い、添付の取扱説明書に示された飲料水
用 10mL プロトコールに従って測定した。
測定に使用した検体量は 10mL で、90mL の
滅菌蒸留水を加えて 100mL とした。本法の
検出限界は 10MPN/100mL である。

4. 比色系パルサー法

非濃縮検体 17 検体（令和元年 8 月に搬入さ
れた検体）について、レジオネラ属菌迅速検査
キット（ファスマック）を用いた。検体をろ過
したフィルターに直接変性液を加える溶菌法
（下記記載の方法①または方法②）で、1 検体
につき孔径の異なる 2 種類のフィルター
（0.22 μ m、0.45 μ m）でそれぞれろ過後に溶菌液
を調製し、添付の取扱説明書に従って測定した。
即日測定できなかった溶菌液については、測定
するまで 1 日～4 日間、-30 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。

上記 1 に示した検体とは別に採水した浴槽
水および湯口水 4 検体について、保健所で環境
衛生監視員が測定した。保健所では孔径
0.45 μ m のフィルターを用いた方法①で溶菌液
を調製後すぐに -30 $^{\circ}$ C で冷凍保存し、測定は 5
日後に実施した。平板培養法によるレジオネラ
属菌数の測定は、当所で大分法にて実施した。
方法①：検水 100mL を注射筒に入れて直径
13mm のメンブランフィルター（孔径 0.22 μ m
または 0.45 μ m、Merck 社、セルロース混合エス
テル）に押出または吸引してろ過し、ろ過後の
フィルターを 2mL チューブに移し、100/30 倍
に希釈した変性液 100 μ L を加えてボルテック
スミキサーで 1 分間混合後、フィルターを下に
した状態で 37 $^{\circ}$ C 15 分間静置し、その後 10 μ L の
中和液を加えて溶菌液を調製した。測定にはこ
の溶菌液の全量 110 μ L を用いた。

方法②：検水 200mL を注射筒に入れて直径

25mm のメンブランフィルター（孔径 0.22 μ m または 0.45 μ m、Merck 社、セルロース混合エステル）に押し出または吸引してろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌したピンセットで折り畳んで 2mL チューブに移し、100/30 倍に希釈した変性液をろ紙が漬かる量の 200 μ L 加えてボルテックスミキサーで 1 分間混合後、フィルターを下にした状態で 37 $^{\circ}$ C 15 分間静置し、その後 20 μ L の中和液を加えて溶菌液を調製した。測定には、検水 100mL 分に相当する半量 110 μ L の溶菌液を用いた。

C. 研究結果

以下、平板培養法でレジオネラ属菌が検出されたこと、レジオラート/QT 法で陽性と判定したウェルがあったこと、パルサー法で陽性であったことを「(+）」と表記し、培養法でレジオネラ属菌が検出されなかったこと、レジオラートで陽性と判定したウェルがなかったこと、パルサー法で陰性であったことを「(-）」と表記する。

1. 平板培養法

45 検体中、大分法では 25 検体、標準法では 22 検体からレジオネラ属菌が検出された（表 2）。標準法のうち 1 検体については、濃縮試料を塗抹した培地は夾雑菌が多く発育したためにレジオネラ属菌検出不能であったが、非濃縮検体からはレジオネラ属菌が検出された。この 1 検体を含む 2 検体は非濃縮検体のみからレジオネラ属菌が検出され、標準法の濃縮試料からは検出されなかった。検出されたレジオネラ属菌数は大分法と標準法でそれぞれ 5~44500cfu/100ml、10~31500cfu/100mL であった。大分法でのみ検出された 4 検体の菌数は 100mL あたり 5cfu が 2 検体、20cfu と 50cfu が各 1 検体で、*L. pneumophila* が検出された。標準法でのみ検出された 1 検体からは *L. pneumophila* が検出され、その菌数は 10cfu/100mL であった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.8553$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8607$ （標準法で検出不能となった 1 検体のデータを除く）であった（図 1）。

2. レジオラート/QT 法

45 検体中 17 検体から 10 ~ 22726

MPN/100mL の *L. pneumophila* が検出された。平板培養法 (+) レジオラート (-) の結果となったのは、大分法で 8 検体 (10cfu/100mL 以上検出された検体に限ると 3 検体 (菌数は 50cfu/100mL))、標準法で 6 検体 (菌数は 10~40cfu/100mL が 5 検体、500cfu/100mL (非濃縮検体のみで検出) が 1 検体)、平板培養法 (-) レジオラート (+) の結果となったのは標準法のみ 1 検体 (菌数はレジオラートで 10MPN/100mL、大分法で 20cfu/100mL) であった（表 3a、3b）。平板培養法との菌数の相関は大分法で $R^2=0.8712$ 、標準法で $R^2=0.7844$ であった（図 2）。

3. 比色系パルサー法

17 検体の結果を表 4a、4b、4c に示す。ろ過フィルターの孔径を 0.45 μ m にしても 0.22 μ m と同等以上の結果となった。平板培養法 (+) パルサー法 (-) の不一致の結果となったのは 2 検体で、*L. pneumophila* が分離され、菌数は 5cfu/100mL と 50cfu/100mL であった。なお、この 2 検体は標準法ではレジオネラ属菌が検出されなかった。

保健所で実施した 4 検体のうち、平板培養法 (+) パルサー法 (+) となった 1 検体の菌数は 45cfu/100mL、平板培養法 (+) でパルサー法 (-) となった 1 検体の菌数は 25cfu/100mL で、ともに *L. pneumophila* が検出された（表 5）。なお、これら 2 検体は、前年度の検討で共に 85cfu/100mL のレジオネラ属菌が検出されたがパルサー法 (-) であった 2 検体³⁾と同一施設の検体であった。

D. 考察

平板培養法について、使用する培地枚数は 1 種類につき標準法で 3 枚、大分法で 6 枚である。単純に培地枚数の多い方が検出確率は上がるが、枚数の少ない標準法で大分法と同等の結果が得られた。大分法のみでレジオネラ属菌が検出された検体もあったが、5cfu/100mL の検体を含むいずれも菌数の少ない検体であったため、ばらつきが生じたと考えられる。指針による基準ではレジオネラ属菌は 10cfu/100mL 未満とされており、標準法は指針による定期的水質検査には適した方法だと言える。ただし、標準

法において濃縮試料では検出できない検体があったことから、濃縮試料のみでなく非濃縮検体についても併せて検査を実施することが重要と考える。また、今回非濃縮検体の塗抹量を 100 μ L でなく 200 μ L としたが、夾雑菌の増加による平板観察の困難さは感じなかった。より検出率を上げるために、非濃縮検体の塗抹量は 100 μ L よりも 200 μ L の方が望ましいと考える。

レジオラート/QT 法については、検体の濃縮工程や菌の確定試験が不要であるため、検体の処理や結果の判定が容易で、検査者の手技による差異が生じにくい。45 検体を検査したところ、レジオラート/QT 法と平板培養法で検出される菌量はおおむね同等であり、強い相関が見られた。レジオラート/QT 法は *L.pneumophila* のみを特異的に検出する方法であり、それ以外のレジオネラ属菌は検出できない。しかし、患者から検出されるレジオネラ属菌の多くは *L.pneumophila* である⁵⁾ ことから、公衆衛生上重要な菌種である *L.pneumophila* の検査が簡便に行えることは日常の衛生管理には非常に有用な検査法と言える。

比色系パルサー法については、前年度保健所で実施した結果³⁾ から、改善のために濃縮工程の時間短縮を図った。フィルターの孔径を 0.45 μ m に大きくしたところ、ろ過の時間が 1 検体当たり約 20 分から約 5 分に短縮され、なおかつ孔径 0.22 μ m フィルターと同等の結果が得られた。第 4 版レジオネラ症防止指針（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター発行）によるとレジオネラ属菌の菌体サイズは 0.3~0.9 \times 2~20 μ m である。培養法のろ過濃縮工程においては、洗い出し操作で菌がフィルターから剥がれやすいように均一な表示径の円筒状孔を持つポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いるので、レジオネラ属菌が 0.45 μ m の孔を通過してしまう可能性がある。しかし、パルサー法に用いたセルロース製フィルターは網目構造のため、膜の内部に菌が入り込んで残りやすく、フィルターごと溶菌処理することでロスが少なかったと考えられる。保健所で実施したパルサー法につ

いて、前年度孔径 0.22 μ m のフィルターを用いて (-) であった施設の検体が、今回孔径 0.45 μ m のフィルターを用いて (+) となった。前年度よりレジオネラ菌数が少ないにも関わらず (+) となったことからパルサー法に使用するフィルターの孔径は 0.45 μ m がよいと言える。

E. 結論

浴場水のレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として厚生労働省から示された標準法は、定期的な水質検査に適した方法である。検査においては、濃縮試料だけでなく、非濃縮検体の検査実施も望まれる。

特定酵素基質培地と専用トレイを組み合わせたレジオラート/QT 法は、簡便な手技で *L.pneumophila* の検査ができ、平板培養法と同等の結果を得られた。日常の衛生管理に有用な検査法である。

一方、機器の揃った検査機関以外でもレジオネラ属菌の検査が可能になることは公衆浴場等の衛生管理の一助となる。検体をろ過した孔径 0.45 μ m のセルロース製フィルターに直接変性液を加える溶菌法を用いたパルサー法が活用できる可能性がある。

参考文献・通知

- 1) 「公衆浴場における水質基準等に関する指針」(平成 12 年 12 月 15 日生衛第 1811 号厚生省生活衛生局長通知 令和元年 9 月 19 日一部改正)
- 2) 「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」(令和元年 9 月 19 日付け薬生衛発 0919 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)
- 3) 佐々木麻里 他：斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査および実検体を用いた LAMP 法と比色系パルサー法の検討. 厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「公衆衛生等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 30 年度総括・分担研究報告書：23-30
- 4) 森本 洋：分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 日本環境

感染学会誌, 2010. 25 (1) : 8-14

5) Junko Amemura-Maekawa et al. : Legionella pneumophila and Other Legionella Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. Appl Environ Microbiol 84:e00721-18 (2018)

- 1) 佐々木麻里 他：環境水等からのレジオネラ属菌の検査法について、レジオネラ実技研修会、2019年4月、福岡。
- 2) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、令和元年度環境監視員担当者会議、2019年6月、大分。

F. 研究発表
研修会

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 平板培養法

前処理		希釈段階	平板塗抹量	検出限界	使用培地枚数	
大分法	濃縮試料	熱処理	1倍、10倍、100倍	各 200 μ L	5cfu/100mL	6枚
		未処理	1倍、10倍、100倍	各 200 μ L	5cfu/100mL	
標準法	濃縮試料	熱処理	1倍	100 μ L	10cfu/100mL	3枚
		酸処理	1倍	200 μ L	10cfu/100mL	
	非濃縮検体	1倍	200 μ L*	500cfu/100mL		

*通知に記載されている塗抹量は「100 μ L」

表 2. 標準法と大分法の比較 (n=45)

	標準法			計
	≥ 10 cfu/100mL		計	
	+	-		
大分法	+	21	4	25
≥ 5 cfu/100mL	-	1	19	20
計		22	23	45

表 4a. パルサー法 (孔径 0.22 μ m) と
平板培養法の比較 (n=17)

	パルサー 0.22 μ m			計
			計	
	+	-		
平板培養 法*	+	10	2	12
	-	2	3	5
計		12	5	17

*平板培養法は大分法

表 3a. レジオラートと大分法の比較 (n=45)

	レジオラート			計
	≥ 10 MPN/100mL		計	
	+	-		
大分法	+	17	8	25
≥ 5 cfu/100mL	-	0	20	20
計		17	28	45

表 4b. パルサー法 (孔径 0.45 μ m) と
平板培養法の比較 (n=17)

	パルサー 0.45 μ m			計
			計	
	+	-		
平板培養 法*	+	10	2	12
	-	4	1	5
計		14	3	17

*平板培養法は大分法

表 3b. レジオラートと標準法の比較 (n=45)

	レジオラート			計
	≥ 10 MPN/100mL		計	
	+	-		
標準法	+	16	6	22
≥ 10 cfu/100mL	-	1	22	23
計		17	28	45

表 4c. パルサー法フィルター孔径の比較
(n=17)

	0.45 μ m			計
			計	
	+	-		
0.22 μ m	+	12	0	12
	-	2	3	5
計		14	3	17

表 5. 保健所実施パルサー法結果

No.	採水年月	種類	泉質	培養結果		パルサー法 結果
				菌数(100mL)		
1	2020年2月	循環式	浴槽水	井水	5cfu 未満	(-)
2	2020年2月	循環式	湯口水	井水	5cfu 未満	(+)
3	2020年2月	循環式	浴槽水	水道水	25cfu	(-)
4	2020年2月	循環式	湯口水	水道水	45cfu	(+)

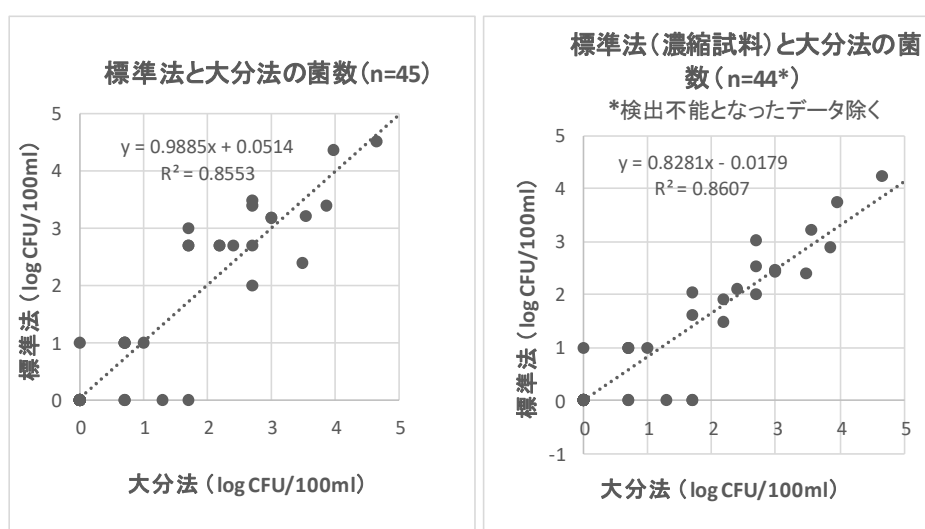


図1. 標準法と大分法との相関

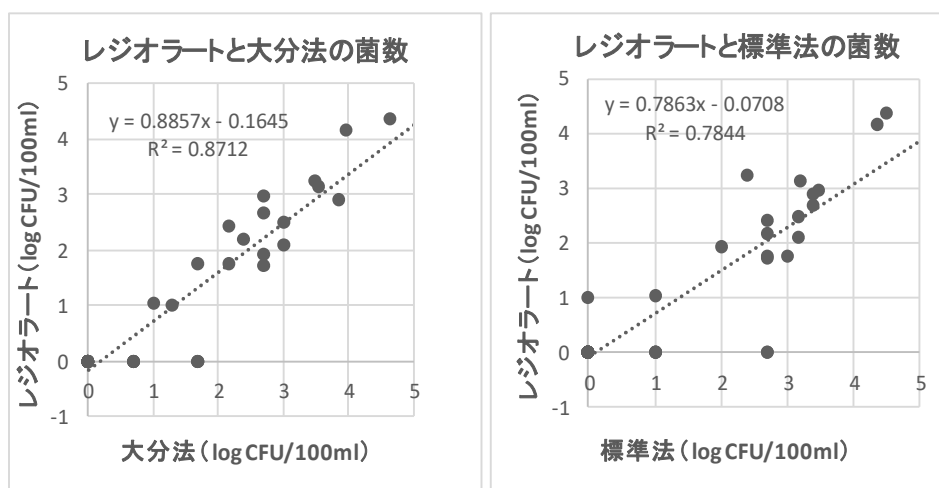


図2. レジオラートと平板培養法との相関