

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）

令和2年度研究報告書

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	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	井原基	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。本検討では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 171 検体を対象として検討したところ、平板培養法と比較したレジオラート/QT法の感度は 61.7%、特異度 95.5%であり、結果一致率は 83.6%であった。35 検体中 33 検体でレジオラート陽性のウェルから平板培養法と同一の血清型の *L. pneumophila* が検出され、*L. pneumophila* 選択的に検出できたが、1 検体で *L. dumoffii* が検出された。レジオラート/QT法及び平板培養法ともに陽性であった 37 検体について検出菌量を比較したところ、回帰直線の R^2 は 0.397 となり、弱い相関が認められた。レジオラート/QT法で偽陽性を示す検体から原因となる菌種を同定することができた。偽陽性を示した *Aeromonas hydrophila* は液体培地の変色が比較的早期に認められることから、偽陽性を見分けることができる可能性が示された。レジオラート/QT法は *L. pneumophila* を選択的に検出できる検査法であり、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。

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、欧米等の諸外国で水質管理に使用されているレジオラート/QT法は、専用の粉末培地である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。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。平成 31 年度からレジオラート/QT 法の感度・特異度及び定量性を確認するため、従来法である平板培養法と比較検討してきた。本研究では、引続き実検体を使用した平板培養法との比較検討を実施するとともに、レジオラート/QT 法における偽陽性を引き起こす菌種の特定を行った。

B. 研究方法

(1) 対象

4 カ所の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、冷却塔水等計 171 検体を対象とした。

(2) 方法

今回検討したレジオラート/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。

レジオラート/QT 法で陽性と判定されたものの、ウェルの液体培地からレジオネラ属菌が検出できなかった検体について、GVPC α 寒天培地で発育したコロニーから遺伝子を抽出し、16S rDNA により菌種を同定した。また、同定した菌についてレジオラート/QT 法で陽性を示すか確認するため、単離菌を滅菌水 100 mL に加え、レジオラートを混和した後、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、茶色または濁りが生じるか確認した。

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「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法（薬生衛発 0919 第 1 号）」に準じた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。レジオネラ属菌が 10 CFU/100 mL 以上検出されたものを陽性とした。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。

レジオラート/QT 法及び平板培養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。

偽陽性菌株におけるレジオラート/QT 法の反応性について、本検討で検出された *Aeromonas hydrophila* 菌株 A 及び環境から分離された *A. hydrophila* 菌株 B の 2 種を用いてレジオラート/QT 法が陽性になる菌

量を検討した。各菌株を $10^5 \sim 10^1$ CFU/ml に希釈し、各 10 ml ずつレジオラートに添加し、39°C で 7 日間培養した後、陽性となったセル数をカウントした。

C. 結果

温泉水、浴槽水、プール採暖槽水、冷却塔水等計 171 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、両方法で陽性となったものが 37 検体、両方法で陰性となったものは 106 検体であった (表 1)。平板培養法と比較したレジオラート/QT 法の感度は 61.7 %、特異度 95.5 % であり、結果一致率は 83.6 % であった。検出菌量はレジオラート/QT 法で 0-5223 MPN/100mL、培養法では 0-1100 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 法陽性で平板培養法陰性が 5 検体、レジオラート/QT 法陰性で平板培養法陽性が 23 検体であった。レジオラート/QT 法のみ陽性であった検体の検出菌量は 11-94 MPN/100mL、平板培養法のみ陽性であった検体の検出菌量は 10-280 CFU/100mL であった。

レジオラート/QT 法と平板培養法ともに陽性であった 37 検体のうち 35 検体について、ウェルの液体培地からレジオネラ属菌の検出を試みたところ、34 検体で平板培養法と同じ血清型のレジオネラ属菌が分離された。33 検体は *L. pneumophila* であったが、1 検体は *L. dumoffii* であった。1 検体については交雑菌が多くレジオネラ属菌が分離できなかったため、平板培地上で発育が見られたコロニーから遺伝子抽出し、16S rDNA の塩基配列により菌種を同定したところ、*Ochrobactrum* sp. であった。単離した

菌株を滅菌水に懸濁し、レジオラート/QT 法を実施したところ、濁りを生じ、陽性反応が見られた。

平板培養法で *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が検出された検体は 13 検体あり、このうち、12 検体が *L. pneumophila* も同時に検出された (表 2)。この 12 検体についてレジオラート/QT 法は全て陽性であり、平板培養法で検出された *L. pneumophila* が検出された。1 検体は平板培養法で *L. nautarum* が検出され、レジオラート/QT 法は陰性であった。

レジオラート/QT 法のみ陽性であった 5 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、1 検体で *L. pneumophila* SG3 が検出されたが、4 検体はレジオネラ属菌が検出されなかった (表 3)。培地上で発育が見られたコロニーから遺伝子抽出し、16S rDNA の塩基配列により同定したところ、それぞれ *Brevundimonas naejangsanensis*、*Pseudomonas otitidis*、*Pseudomonas* sp.、*Aeromonas hydrophila* であった。これら単離した菌株をそれぞれ滅菌水に懸濁し、レジオラート/QT 法を実施したところ、茶色の発色を示し、陽性反応が見られた。

レジオラート/QT 法で陽性反応を示した菌株のうち *A. hydrophila* について、偽陽性となる菌量を検討するため、希釈系列を用いた検討を行った。浴槽水由来株 A は 10^1 から陽性となったが、環境由来株 B は 10^3 から陽性と菌株によって大きい差がみられたが、少量の菌量でも陽性反応を示した (表 4)。また、レジオネラ属菌が陽性となる検体ではおおよそ 5 日目ごろから陽性となるのに対し、本菌株による陽性反応は 2 日目

から3日目と比較的早期に見られた。

レジオラート/QT法及び平板培養法ともに陽性であった37検体について検出菌量の比較を行った(図1)。回帰直線の R^2 は0.397となり、弱い相関が認められた。

D. 考察

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、平板培養法との結果一致率は83.6%と高い一致率を示した。特に、平板培養法と比較した特異度は95.5%と非常に高い値であった。一方で、本検討では感度は61.7%と昨年度の75.6%から大幅に低下した結果となった。レジオラート/QT法と平板培養法で結果の不一致が見られた28検体のうち、23検体がレジオラート/QT法陰性、平板培養法陽性であり、その菌数は10-280 CFU/100 mLであった。このうち、18件は50 CFU/100 mL以下であり、比較的少ない菌数の検体での不一致が多かった。一方で、レジオラート/QT法陽性、平板培養法陰性の検体が5検体あった。そのうち1検体はレジオラート培養液から*L. pneumophila*が検出され、平板培養法でも10 CFU/100 mL未満であるものの、同一の血清型が検出されており、真の陽性であったことが確認できた。レジオネラ属菌の培養法は手技が複雑であり、培養日数も7日から10日と非常に時間がかかるため、検査者の技能や菌の発育状況、交雑菌の影響により、含まれるレジオネラ属菌が少ない場合は何れか一方のみが検出される不一致が生じやすいと考えられる。また、本検討においては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。今後検体数の蓄積及び検体種類別の検

討を加えて、感度特異度についてより詳細に解析する必要があると考える。

浴槽水等の環境検体では複数のレジオネラ属菌の菌種が検出される事例が多く見られるが、本検討においても37検体中13検体(35.1%)で確認された。このうち、12検体では*L. pneumophila*と他のレジオネラ属菌が検出された検体であり、この12検体はレジオラート/QT法で陽性となった。レジオラートの培養液からは1検体を除き、*L. pneumophila*のみが検出された。また、平板培養法で*L. nautarum*のみが検出されたプール水の1検体においてはレジオラート/QT法では陰性となった。レジオラート/QT法は*L. pneumophila*を特異的に検出できるよう設計された方法であるが、本検討の結果からはレジオネラ属菌が複数混在する検体においても*L. pneumophila*を選択的に検出できることが実証されたものと考えられる。また、今回の検討においてはレジオネラ属菌検出であった37検体中36検体で*L. pneumophila*が検出される結果となった。このことから、レジオネラ属菌陽性の検体のほとんどを*L. pneumophila*を選択的に検出するレジオラート/QT法で陽性と判定できると考えられる。

一方で、今回、1検体のみではあるが、*L. dumoffii*によりレジオラート/QT法で陽性を示した検体があった。平板培養法においては*L. pneumophila* SG5も検出されていたことから、レジオラート培養液内に*L. pneumophila*が存在したものの、平板培地上でうまく分離できなかった可能性もあるため、*L. dumoffii*に対するレジオラート/QT法の反応性はより詳細に検討する必要がある。レジオネラ属菌は非常に多くの菌

種があることから、浴槽水で頻繁に検出される菌種についてはレジオラート/QT 法の反応性を確認する必要があると思われる。

検出菌量の検討では回帰直線の R^2 は 0.397 となり、弱い相関が認められる結果となった。昨年度の検討においては 32 検体において回帰直線の R^2 は 0.778 となり、強い相関が認められており、本検討と乖離する結果となった。この原因として、本検討では 37 検体中検出菌量が 100 CFU/100mL であった検体が 23 検体、100 MPN/100 mL であった検体が 24 検体と比較的検出菌量の少ない検体が多かったため、相関が弱くなったことが考えられた。検出菌量の検討においては検体数を増やし検討を重ねる必要があると考えられた。

本検討においてレジオラート/QT 法で偽陽性を示す菌種が複数確認された。今回確認された菌種は水環境や土壌などの環境中で分離が報告されている菌種である。また、これら偽陽性を示した 4 検体は残留塩素がそれぞれ 0, 0, 0.1, 0.4 mg/L と「公衆浴場における衛生等管理要領等について（生衛発第 1811 号）」に規定される浴槽水中の遊離残留塩素濃度を通常 0.4 mg/L と比較し、4 検体中 3 検体が残留塩素の低い検体であった。残留塩素により多くの細菌は消毒されるが残留塩素が含まれない場合に多数の菌種が生存できることになり、このうち本検討で明らかとなったレジオラートに反応する一部菌種によりレジオラート/QT 法で偽陽性を示すことがあるものと考えられる。

A. *hydrophila* においては陽性反応がレジ

オネラ属菌ものより早期にみられることから、培地の観察を頻繁に実施することで、偽陽性を見つけることが可能であると考えられる。

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ろ過、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。しかしながら、本検討で見られたように、一定の確率で偽陽性が起こることを理解した上で使用する必要がある。レジオラート/QT 法をより有用に使用するため、偽陽性の発生頻度の把握や確認できる手法、偽陽性を低減する方法を検討する必要があると考える。

E. 総括

レジオラート/QT 法は *L. pneumophila* を選択的に検出できる検査法であり、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 実検体におけるレジオラート/QT法と平板培養法の比較結果

レジオラート /QT法	平板培養法		
	陽性	陰性	計
陽性	37	5	42
陰性	23	106	129
計	60	111	171

表2 平板培養法で *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が検出された検体の結果一覧

検体 No.	検体種別	レジオラート /QT法 (MPN/100 mL)	レジオラート /QT法 検出菌種	平板培養法 (CFU/100 mL)	平板培養法 検出菌種
1	プール水	0	-	51	<i>L. nautarum</i>
2	浴槽水	47	Lp SG5	12	Lp SG5, 14 <i>L. quinlivanii</i>
3	浴槽水	58	<i>L. dumoffii</i>	85	Lp SG5 <i>L. dumoffii</i>
4	冷却塔水	659	Lp SG8	30	Lp SG8 <i>L. rubrilusens</i> , <i>L. sainthelensi</i>
5	浴槽水	223	Lp SG2	430	Lp SG1,2,3,5,6,UT <i>L. londiniensis</i> <i>Legionella</i> sp.
6	浴槽水	474	Lp SG3	230	Lp SG3,UT <i>Legionella</i> sp.
7	浴槽水	23	Lp SGUT	40	Lp SG13,UT <i>Legionella</i> sp.
8	湯口水	23	Lp SGUT	50	Lp SG1,13,UT <i>Legionella</i> sp.
9	浴槽水	223	Lp SG6	120	Lp SG1,3,6 <i>Legionella</i> sp.
10	湯口水	361	Lp SG1,6	120	Lp SG1,3,6 <i>Legionella</i> sp.
11	湯口水	11	Lp SG1	70	Lp SG1,UT <i>Legionella</i> sp.
12	浴槽水	23	Lp SG2	10	Lp SG2 <i>Legionella</i> sp.
13	浴槽水	106	Lp SG1	120	Lp SG1 <i>L. anisa</i>

表3 レジオラート/QT法の陽性ウェルからレジオネラ属菌が検出できなかった検体一覧

検体 No.	検体種別	残留塩素 (mg/L)	レジオラート /QT法 (MPN/100 mL)	レジオラート /QT法 検出菌種	平板培養法 (CFU/100 mL)	平板培養法 検出菌種
1	浴槽水	0.4	94	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	<10	-
2	浴槽水	0.1	11	<i>Pseudomonas otitidis</i>	<10	-
3	浴槽水	0	90	<i>Pseudomonas sp.</i>	<10	-
4	浴槽水	0	23	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	<10	-

表 4 *A. hydrophila* におけるレジオラート/QT 法の結果

表 4-1 浴槽水から分離された *A. hydrophila* の結果

菌量 (CFU/100 mL)	大ウェル 陽性数	小ウェル 陽性数	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)
10 ¹	6	65	6469
10 ²	6	90	>22726
10 ³	6	90	>22726
10 ⁴	6	90	>22726
10 ⁵	6	90	>22726

表 4-2 環境から分離された *A. hydrophila* の結果

菌量 (CFU/100 mL)	大ウェル 陽性数	小ウェル 陽性数	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)
10 ¹	0	0	-
10 ²	0	0	-
10 ³	2	4	72
10 ⁴	6	6	361
10 ⁵	6	50	4096

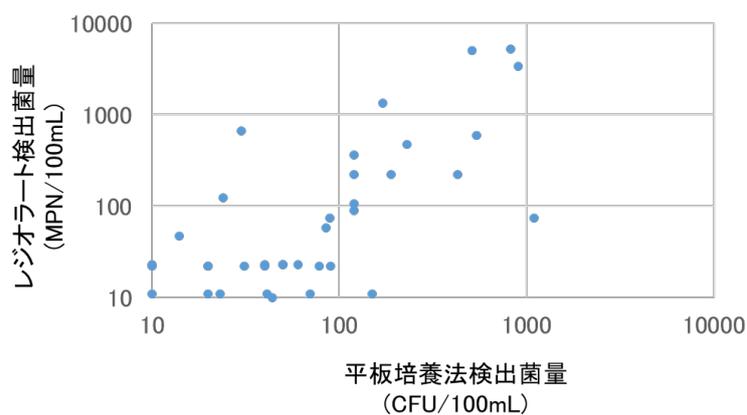


図 1 レジオラート/QT 法と平板培養法の検出菌量の比較