

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2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、
レジオラートを用いた定性試験法の検討

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 高野 真実 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 溝腰 朗人 大分県衛生環境研究センター

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かなり相関が見られた。一方で、専用トレイとシーラーを使用せずに特定酵素基質培地のみを用いた定性的な試験法については、結果が陰性であっても、平板培養法やレジオラート/QT法では陽性となる検体が存在し、今後解決すべき課題が多い。

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、昨年度に引き続き、多様な泉質を有する大分県の実検体を用いて評価した。また、*Legionella pneumophila*（以下、*Lp*）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（以下、QT法）についても実検体を用いた評価を行った。併せて専用トレイとシーラーを必要としない定性的な試験法について検討した。

B. 研究方法

1. 試料および調製法

令和2年8月から11月に搬入された浴槽水および湯口水21施設分41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℃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（武藤化学又は関東化学）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³⁾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 41 検体について、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。QT 法は、大小 2 種類のウエルについて、茶色・濁りのいずれか又は両方を生じた陽性ウエル数の組み合わせから、Lp 菌数を最確数法で定量する方法である。測定に使用した検体量は 10mL で、滅菌蒸留水 90mL を加えて 100mL とし、39 $^{\circ}$ C で培養した。本法の検出限界は 10MPN/100mL である。ま

た、陽性ウエルから採取した培養液を GVPC 寒天培地に画線塗抹し、レジオネラ属菌の分離同定を行った。

4. レジオラート定性試験法（保存菌株による検討）

浴槽水から分離された Lp 菌株 2 種類（血清群 1 と血清群 2）を用いてそれぞれ希釈系列を調製し、QT 法及び下記 5. のフラスコを用いた定性試験法を実施し、比較した。具体的には、Lp 菌株を BCYE α 寒天培地で 2 日間培養し、発育した菌を PBS(-) に懸濁、10 倍階段希釈し、各希釈段階の菌液 0.1mL を、予めレジオラートを溶解させた 100mL の滅菌蒸留水に混和した後、上記 3. 及び下記 5. の方法で培養した（培養温度は 36 $^{\circ}$ C）。平行して、各希釈段階の菌液 0.1mL を BCYE α 寒天培地に塗布し、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養して菌数を測定した。

5. レジオラート定性試験法（実検体による検討）

上記 3. で 10MPN/100mL 以上検出された 12 検体について、それぞれ 10mL を、予めレジオラートを溶解させた 90mL の滅菌蒸留水に加え、ペントフィルター付きのフラスコ（CELLSTAR フラスコ SC、白 FT キャップ 650mL 滅菌：Greiner Bio-One）に入れて 39 $^{\circ}$ C で 7 日間培養し、茶色・濁りのいずれか又は両方が見られたものを陽性とした。

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、QT 法で陽性と判定したウエルがあったこと、レジオラート定性試験法（以下、定性法）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、QT 法で陽性と判定したウエルがなかったこと、定性法で陰性であったことを「(-)」と表記する。

1. 平板培養法

41 検体中、大分法では 19 検体、標準法では 18 検体からレジオネラ属菌が検出された（表 2）。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 5～1000cfu/100ml、10～2000cfu/100mL（濃縮試料のみでは 10～430CFU/100mL）であつ

た。大分法でのみ検出された2検体の菌数はともに5cfu/100mLで、*Lp*が検出された。標準法でのみ検出された1検体の菌数は10cfu/100mLで、*Lp*が検出された。大分法と標準法の菌数の相関は $R^2=0.7521$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8893$ であった(図1)。

2. レジオラート/QT法

41検体中12検体から11~1342MPN/100mLの*Lp*が検出された。平板培養法(+)QT法(-)の結果となったのは、大分法で7検体(10CFU/100mL以上検出された検体に限ると4検体(菌数は100mLあたり10、20、50、500CFUが1検体ずつ))、標準法で6検体(菌数は100mLあたり10CFUが4検体、20CFUと80CFUが各1検体)、平板培養法(-)QT法(+)の結果となった検体はなかった(表3a、3b)。平板培養法の結果と比較したところ、検出/不検出の一致率は大分法で82.9%(10CFU/100mL以上検出された検体に限ると90.2%)、標準法で85.4%、菌数の相関は大分法で $R^2=0.6682$ 、標準法で $R^2=0.6978$ (濃縮試料のみで $R^2=0.7134$) であった(図2)。12検体中11検体の培養液からは*Lp*が検出されたが、1検体(1342MPN/100mL)からはレジオネラ属菌は検出されなかった。当該1検体の培養液を塗抹したGVPC寒天培地上で優勢であったコロニー1種(16S rDNAを用いた遺伝子解析で *Ochrobactrum* sp.と確認)をQT法に供したところ、ウェルに濁りが生じた。茶色は検体を供試した場合よりかなり薄かった。なお、平板培養法ではこの検体から多数の夾雑菌と共に*Lp*が検出された(100mLあたり大分法1000CFU、標準法170CFU)。

3. レジオラート定性試験法(保存菌株による検討)

QT法及びBCYE α 寒天培地で測定した菌量は希釈系列ごとに段階的に減少していき、検出限界未満になった希釈段階において、レジオラート定性試験法でも陰性となった(表4)。

4. レジオラート定性試験法(実検体による検討)

結果を表5に示す。12検体中6検体が定性法陽性と判定された。平板培養法及びQT法でレジオネラ属菌数の多い検体が陽性となる傾向が見られたが、上記2.でQT法培養液からレジオネラ属菌が検出されなかった1検体(検体No.10)については、菌数が多いにも関わらず定性法は陰性であった。

D. 考察

平板培養法について、昨年度⁴⁾と同様、使用培地枚数の少ない標準法で大分法と同等の結果が得られた。大分法または標準法の一法のみでレジオネラ属菌が検出された検体もあったが、菌数の少ない検体(5または10cfu/100mL)であったため、ばらつきが生じたと考える。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の水質検査には適した方法だと言える。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。

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。41検体を検査したところ、平板培養法で検出された菌量とおおむね同等であり、昨年度⁴⁾の結果ほどではないがかなり相関が見られた。一方、今回レジオネラ属菌以外の菌でもQT法で陽性ウェルを生じることが確認され、そこから*Lp*が分離されなくても陽性と判定される(偽陽性)の可能性が示された。当該菌が検出された検体は、平板培養法で*Lp*が検出されており、QT法でウェルの茶色が当該菌のみを供試した場合より濃かったことから、この検体自体については偽陽性ではないと考えられた。平板培養法でも夾雑菌が非常に多く、レジオネラ属菌の分離に困難を来した検体であったので、QT法の培養液(前処理なし)から*Lp*が分離されなかったと推察する。QT法は、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。偽陽性の可能性はあるものの、平板培養法との結果一致率は高いことから、ヒトから検出されるレジオネラ属菌のほとんどを占め公衆衛生上重要な菌種である *Lp*⁵⁾ の検査が簡便に行える QT 法は、日常の衛生管理には非常に有用な検査法と考える。

QT 法は簡便で有用な検査法であるが、専用トレイとシーラーを必要とする。そこで、それら高価な機器を使用しない定性法について検討した。予試験において、空気の量が少ないと検出できないことが示唆された（データ未掲載）ため、培養容器としてベントフィルターが付いた大きめのフラスコを用いた。保存菌株による検討ではフラスコ内に入った *Lp* 菌数が数個であっても検出可能という結果が得られた一方、実検体を用いた場合には一桁多い菌数が必要であった。保存菌株を用いた場合、実検体と同じ 39℃ 培養では QT 法で発育抑制が見られたため 36℃ 培養としたが、その温度差が検出可能菌量の差となった可能性も考えられる。実検体には様々な夾雑菌が含まれており、36℃ 培養ではその抑制も弱くなるため、*Lp* の発育と夾雑菌抑制とが釣り合うよう、定性法の培養温度については今後の検討課題としたい。表 5 の検体 No.10 は平板培養法及び QT 法で検出された *Lp* 菌数は多かったにも関わらず定性法は陰性であった。この検体は夾雑菌が非常に多かったのも、それが関与しているのかもしれないが、原因は定かでない。その夾雑菌の 1 つ (*Ochrobactrum* sp.) は QT 法で培養液に濁りを生じることが確認されたが、定性法は透明のままであった。レジオネラ属菌も *Ochrobactrum* sp. も好気性菌であることから、ベントフィルターだけでは酸素の量が

足りないことが考えられる。培養容器についても再検討が必要で、定性法について手法を確立するには多くの課題が残る。

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) 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
- 4) 佐々木麻里 他：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. 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」令和元年度総括・分担研究報告書 : 27-324)
- 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)

F. 研究発表

研修会

- 1) 佐々木麻里 他：レジオネラ症総論と培養法の注意点、レジオネラ web 研修会、2021 年 1 月、大分 (web 開催) .

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
		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
		酸処理	1 倍	200 μ L	10cfu/100mL
	非濃縮検体	1 倍	200 μ L*	500cfu/100mL	3 枚

*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=41)

	標準法		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
大分法	+	17	2	19
≥5cfu/100mL	-	1	21	22
計		18	23	41

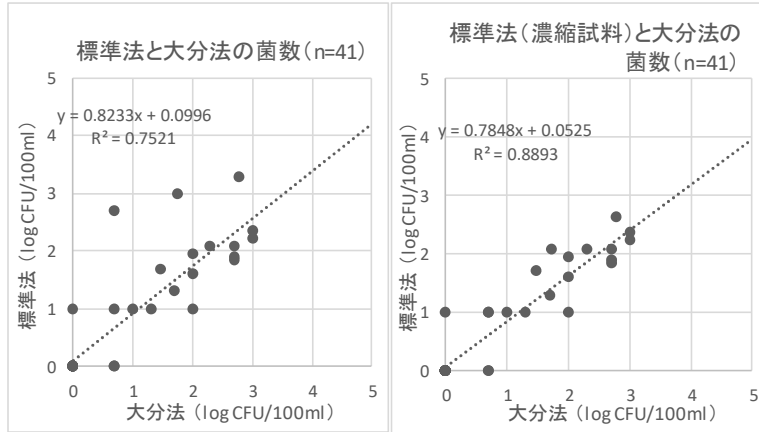


図 1. 標準法と大分法との相関

表 3a. レジオラート/QT 法と大分法の比較 (n=41)

	レジオラート		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
大分法	+	12	7	19
≥5cfu/100mL	-	0	22	22
計		12	29	41

表 3b. レジオラート/QT と標準法の比較 (n=41)

	レジオラート		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
標準法	+	12	6	18
≥10cfu/100mL	-	0	23	23
計		12	29	41

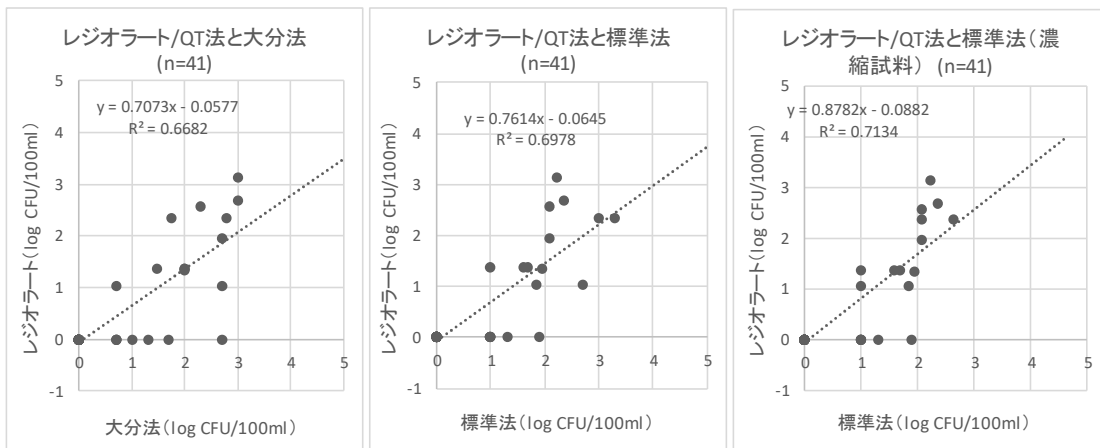


図 2. レジオラート/QT法と平板培養法との相関

表 4. 保存菌株を用いたレジオラート定性試験法の結果

菌株	希釈系列	レジオラート 定性試験法	レジオラート/QT 法 MPN/菌液 0.1mL	菌数 (BCYE α) CFU/菌液 0.1mL
菌株 1 <i>Lp</i> 血清群 1	3	+ (茶色&濁り)	>2272.6	試験せず
	4	+ (茶色&濁り)	>2272.6	>300
	5	+ (茶色&濁り)	230.7	290
	6	+ (茶色&濁り)	22.3	30
	7	+ (茶色&濁り)	2.3	2
	8	-	<1.0	0
	9	-	<1.0	試験せず
菌株 2 <i>Lp</i> 血清群 2	3	+ (濁りのみ)	>2272.6	試験せず
	4	+ (濁りのみ)	2272.6	>300
	5	+ (濁りのみ)	134.2	225
	6	+ (濁りのみ)	10.6	28
	7	+ (濁りのみ)	1.1	4
	8	-	<1.0	0
	9	-	1.1	試験せず

注) + : 陽性 - : 陰性 *Lp* : *L.pneumophila*

表 5. 実検体を用いたレジオラート定性試験法の結果

検体	レジオラート定性試験法	レジオラート/QT 法	平板培養法 (標準法濃縮試料)	
	(検水量 10mL)	MPN/100mL	CFU/100mL	検出菌種
1	+ (濁りのみ)	223	430	<i>Lp</i> 及びそれ以外
2	+ (濁りのみ)	474	230	<i>Lp</i> 及びそれ以外
3	-	23	40	<i>Lp</i> 及びそれ以外
4	-	90	120	<i>Lp</i>
5	-	23	50	<i>Lp</i> 及びそれ以外
6	+ (茶色のみ)	11	10	<i>Lp</i>
7	+ (濁りのみ)	223	120	<i>Lp</i> 及びそれ以外
8	+ (濁りのみ)	361	120	<i>Lp</i> 及びそれ以外
9	-	11	70	<i>Lp</i> 及びそれ以外
10	-	1342	170	<i>Lp</i>
11	-	23	10	<i>Lp</i> 及びそれ以外
12	+ (濁りのみ)	22	90	<i>Lp</i>
陰性対照	-	<10		試験せず

注) + : 陽性 - : 陰性 *Lp* : *L.pneumophila*