

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

研究代表者 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

分担研究報告書

入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン作成

研究分担者

○金谷 潤一	富山県衛生研究所	森本 洋	北海道立衛生研究所
中西 典子	神戸市環境保健研究所	佐々木 麻里	大分県衛生環境研究センター
田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター		

研究協力者

大森 恵梨子	仙台市衛生研究所	大屋 日登美	神奈川県衛生研究所
磯部 順子	富山県衛生研究所	枝川 亜希子	大阪健康安全基盤研究所
平塚 貴大	広島県衛生研究所	緒方 喜久代	大分県薬剤師会検査センター
吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所	倉 文明	国立感染症研究所

研究要旨

現在、浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。一方、濃縮検体から直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法は、検査開始から1～2日で結果を得られるため、その必要性は高い。また、令和元年には、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）が通知され、迅速検査に関する記述が盛り込まれた。そこで本研究では、「入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン」を作成するため、研究班の分担研究者及び研究協力者で構成するワーキンググループを形成した。

迅速検査ガイドライン案を示した。まず、迅速検査を実施するにあたり、留意点すべき点を述べた。また、現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利であるという点から、各市販キットの特性などを一覧に示した。その上で、キットごとに、方法の概要、判定方法、平板培養法との結果の相関を示した。

最後に、実検体を用いて迅速検査を使用する際の具体例を挙げた。前提として、迅速検査法は様々な用途で利用できると考えられるが、各施設において迅速検査法を導入する際は、それぞれの方法の特性を理解した上で自施設の平板培養法の結果と比較し、どのように利用するかを検討することが望ましい。

A 研究目的

現在、浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに7～10日を要する。一方、濃縮検体から直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法は、検査開始から1～2日で結果を得られるため、その必要性は高い。また、令和元年には、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）が通知され、迅速検査に関する記述が盛り込まれた。

迅速検査は、入浴施設における浴槽水などの水検体から、PCR法、リアルタイムPCR法（qPCR法）、LAMP法、PALSAR法などで直接、菌の核酸（DNA、RNA）を定性的あるいは定量的に検出する方法である。現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利である。ただし、反応阻害や死菌の存在など結果の解釈に留意すべき点がある。

そこで、これまで得られた知見から、入浴施設の水におけるレジオネラ属菌迅速検査のガイドラインを作成することとした。本ガイドラインを参照することにより、迅速検査の適切な利用が可能になると考えられる。

B 方法

本研究では、「入浴施設の水におけるレジオネラ属菌迅速検査ガイドライン」を作成するため、研究班の分担研究者及び研究協力者で構成するワーキンググループを形成した。「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）に基づき、ガイドラインの内容を検討した。

C 結果および考察

迅速検査ガイドライン案を別添に示した。まず、迅速検査を実施するにあたり、留意点すべき点を述べた。コンタミネーションを防止するため、フィルター付き製品を使用すること、遺伝子増幅前後の作業エリアを区別することが重要である。また、インターナルコントロールの使用により、反応阻害を確認することが望ましい点も述べた。

現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利であるという点から、各市販キットの特性などを一覧に示した。その上で、キットごとに、方法の概要、判定方法、平板培養法との結果の相関を示した。LAMP法は、試薬キットにはインターナルコントロールが追加されていないが、追加する方法が文献で報告されていることを紹介した。PALSAR法は、シャワー・カラん水を対象とする場合、検水の濃縮液を一晩培養した後に測定する必要があることを述べた。

最後に、実検体を用いて迅速検査を使用する際の具体例を挙げた。前提として、迅速検査法は様々な用途で利用できると考えられるが、各施設において迅速検査法を導入する際は、それぞれの方法の特性を理解した上で自施設の平板培養法の結果と比較し、どのように利用するかを検討することが望ましい。また、公衆浴場の水質基準に係る検査として、平板培養法に置き換えて実施する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法（LC EMA-qPCR法）を用いることが望ましいことを留意する点として述べた。ただし、検査法は、各自治体の条例等で規定されている場合があるため、事前に確認する必要がある。LC EMA-qPCR法を用いる際は、過去の検討結果から、平板培養法と相関の高い1 CFU/100 ml相当をカットオフ値とし、判定する。

D まとめ

令和2年度の研究活動として、入浴施設の水

水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン案を作成した。現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利である。しかしながら、各検査法における特性などをまとめたものはないため、ガイドライン案を作成して、利用する際の具体的な留意点などを示した。

E 研究発表

なし

F 知的財産権の出願・登録状況

なし

入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン

迅速検査は、入浴施設における浴槽水などの水検体から、PCR法、リアルタイムPCR法、LAMP法、PALSAR法などで直接、菌の核酸（DNA、RNA）を定性的あるいは定量的に検出する方法である。現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利である（別表）。迅速検査を実施する場合は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）にも記載されているとおり、以下の点に十分留意する必要がある。以下に、市販の検出試薬キットを用いた環境水における各種迅速検査法の概要と、浴槽水、湯口水、採暖槽水、シャワー水、カラン水、プール水を対象とした実検体における平板培養法との相関を示した。また、迅速検査法の活用例も記載した。

1 留意する点

- (1) 迅速検査法は反応系によりそれぞれ特性があるので、検出試薬キットの説明書をよく読み理解して用いる。各種迅速検査法における結果の判定は、添付の取扱説明書に従う。
- (2) 迅速検査法によっては、生菌のみならず死菌 DNA や VNC (viable but non culturable)状態の菌も検出する。
- (3) 器具類はすべてディスポーザブル又は滅菌済みのものを使用する。コンタミネーション防止のために、ピペットチップはフィルター付きの製品を使用する。
- (4) コンタミネーション防止のために、1. 反応試薬の調製、分注を行うエリア（検水及び核酸を持ち込まない）、2. 検水の濃縮、核酸調製を行うエリア（検水を扱うため安全キャビネットが設置されていなければならない）、3. 陽性対照の調製、添加を行うエリア、の3つに作業環境を分けることが望ましい。ピペット等もエリアごとに別のものを使う。
- (5) 温泉水などに含まれるフミン質などの遺伝子増幅反応の阻害物質が含まれている場合、迅速検査法によっては結果が偽陰性となることがある。したがって、インターナルコントロールを用いるなど、偽陰性確認が可能な検出試薬キットの使用が望ましい。
- (6) 常に陽性対照と陰性対照を用意し、反応が正常に進行していることを確認する。
- (7) 試料中の核酸が分解酵素により分解されることを防ぐため、使用する試薬は、市販の調整済み試薬や、DNA分解酵素、RNA分解酵素を含まない分子生物学グレ

ードのものとする。なお、試薬の保存は取扱説明書の条件に従う。

- (8) 核酸抽出した後、直ちに反応を行わない場合は、試料を凍結保存（-20℃以下）する。

2 各種迅速検査法の概要

(1) qPCR 法および EMA-qPCR 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、タカラバイオ株式会社から市販されている。Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 の取扱説明書に従い、検水の 2,000 倍濃縮液 40 μL を作製し、使用する。DNA 抽出は Lysis Buffer for *Legionella*、qPCR 反応は Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いる。反応液にインターナルコントロールが添加されており、反応阻害確認が 1 本のチューブで可能である。また、EMA-qPCR 法は、DNA 抽出前に Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 および LED Crosslinker 12 を用いて、EMA 処理を 1 回実施する。

② 平板培養法との相関¹⁾

a. qPCR法

		平板培養法 (CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
qPCR	陽性	120	257	377
	陰性	3	224	227
計		123	481	604

感度 97.6%、特異度 46.6%、陽性的中率 31.8%、陰性的中率 98.7%、一致率 57.0%

b. EMA-qPCR法(EMA処理 1 回)

		平板培養法 (CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
EMA-qPCR	陽性	113	190	303
	陰性	11	299	310
計		124	489	613

感度 91.1%、特異度 61.1%、陽性的中率 37.3%、陰性的中率 96.5%、一致率 67.2%

(2) LC EMA-qPCR 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、タカラバイオ株式会社から市販されており、各種試薬の取扱説明書に従い実施する。作製した検水の 1,000 倍濃縮液 0.1 mL を 5 分間酸処理し、*Legionella* LC Medium base、レジオネラ BCYE α 発育サプリメント（関東化学）およびレジオネラ MWY 選択サプリメント（関東化学）を用いて作製した MWY 液体培

地を添加後、36°Cで 18 時間培養する。増菌液 0.1 mL を分取し、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR および LED Crosslinker 12 を用いて EMA 処理を実施する。その後、qPCR 法と同様に DNA を抽出後、qPCR 反応を実施する。

② 平板培養法との相関¹⁾

LC EMA-qPCR法のカットオフ値を 1 CFU/100 mL相当とした場合

		平板培養法(CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
LC EMA-qPCR	≥1	125	82	207
	<1	15	296	311
計		140	378	518

感度 89.3%、特異度 78.3%、陽性的中率 60.4%、陰性的中率 95.2%、一致率 81.3%

(3) LAMP 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、栄研化学株式会社から市販されている。検水の 100 倍濃縮液 2 mL を使用する。Loopamp レジオネラ検出試薬キット E を用いて、取扱説明書に従い、添付の試薬を用いて DNA を抽出後、LAMP 反応を実施する。本試薬には、インターナルコントロールは添付されていない。ただし、以下の方法で、試料中の反応阻害物質の有無を確認することが可能である²⁾。1 検体につき 2 本チューブを用意し、1 本目のチューブには試料水の DNA 抽出液 5 μL と LAMP 法試薬 20 μL を加えて反応液とし、2 本目のチューブには 1 本目のチューブと同様の反応液に陽性コントロール 2 μL をインターナルコントロールとして添加する。冷凍保存した DNA 抽出液を用いて LAMP 反応を実施する場合、95°C で 5 分間加熱し、氷上で急冷後(加熱変性)、LAMP 反応に用いる。

② 平板培養法との相関¹⁾

	平板培養法(CFU/100 mL)		計
	≥10	<10	
陽性	192	141	333
陰性	39	483	522
計	231	624	855

感度 83.1%、特異度 77.4%、陽性的中率 57.7%、陰性的中率 92.5%、一致率 78.9%

(引用文献 6 および 7 を改変)

(4) PALSAR 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、株式会社ファスマックから市販されている。本試薬には、インターナルコントロールは添付されていない。浴槽水、湯口水および採暖槽水を対象とする場合は、検水の 100 倍濃縮液 4 mL を遠心後、上清を除去し、レジオネラ属

菌迅速検出キットを用いて取扱説明書に従い実施する。ただし、溶菌条件は70℃で5分間とする。

シャワー水およびカラン水を対象とする場合は、上述の条件では平板培養法に対する感度が37.5%と低く、一晚培養液で測定することで改善した¹⁾。具体的には、検水の100倍濃縮液4 mLを遠心後、上清を除去し、MWY培地の組成から活性炭を抜いた培地1 mLに懸濁する。36℃で18時間培養後、遠心して上清を除去し、レジオネラ属菌迅速検出キットを用いて取扱説明書に従い実施する。ただし、溶菌条件は70℃で5分間とする。

② 平板培養法との相関^{1,3)}

a. 浴槽水、湯口水および採暖槽水

		平板培養法(CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
PALSAR	陽性	41	40	81
	陰性	8	85	93
計		49	125	174

感度 83.7%、特異度 68.0%、陽性的中率 50.6%、陰性的中率 91.4%、一致率 72.4%

b. シャワー水およびカラン水(一晚培養)

		平板培養法(CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
PALSAR (一晚培養)	陽性	7	11	18
	陰性	0	17	17
計		7	28	35

感度 100%、特異度 60.7%、陽性的中率 38.9%、陰性的中率 100%、一致率 68.6%

3 迅速検査の活用例

迅速検査法は、上記のとおり、様々な用途で利用できると考えられる。ただし、各施設において迅速検査法を導入する際は、それぞれの方法の特性を理解した上で自施設の平板培養法の結果と比較し、どのように利用するかを検討することが望ましい。

(1) 清掃・消毒管理された検水におけるレジオネラ属菌の陰性を確認する場合

日常的に清掃・消毒管理している入浴施設等において、定期的な平板培養検査の結果、レジオネラ属菌が陰性であることを確認している検水において、迅速検査法を用いて、レジオネラ属菌の有無を判定する。この場合の迅速検査は、自治体の条例で定められた水質基準に係る検査ではなく、自主的な検査として実施し、衛生管理状態の確認のための参考値として活用する。qPCR法、EMA-qPCR法、LC EMA-qPCR法、LAMP法、PALSAR法（浴槽水、湯口水および採暖槽水についての

み) が市販されている。

(2) 平板培養法と併用したスクリーニング検査として利用する場合

レジオネラ属菌が検出され、営業を停止している施設・浴槽において、浴槽・配管等の洗浄実施後、迅速な営業再開のために、洗浄効果の確認に利用する⁴⁾。平板培養法と同時に迅速検査法を実施し、迅速検査が陰性であることをもって、一旦営業を再開する。ただし、最終的な陰性の判断は、平板培養法の結果により判定する。平板培養法からレジオネラ属菌が検出された場合は、直ちに営業を停止し、必要な措置を講じる。この場合、患者発生リスクが高まる気泡発生装置の使用は控えるのが望ましい。qPCR法、EMA-qPCR法、LC EMA-qPCR法、LAMP法、PALSAR法(浴槽水・湯口水、採暖槽水についてのみ) が市販されている。

(3) 公衆浴場の水質基準に係る検査として、平板培養法に置き換えて実施する場合

平板培養法との整合性の観点から、迅速検査法のみで水質基準に適合しているか否かを判断する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法(LC EMA-qPCR法)を用いることが望ましい。ただし、検査法は、各自治体の条例等で規定されている場合があるため、事前に確認する必要がある。過去の検討結果⁵⁾から、LC EMA-qPCR法はカットオフ値を1 CFU/100 ml相当とした場合に、平板培養法に対する感度を約9割に保ったまま8割以上の一致率を示したため、カットオフ値1 CFU/100 ml相当で判定する。

(4) レジオネラ症患者発生時における感染源追究のための検査の場合

レジオネラ症患者の感染源として疑われる検水の検査においては、患者検体から菌が分離された場合、遺伝子型別(PFGE法、SBT法、MLVA法など)により分子疫学的な調査も必要となることから、平板培養法により菌を分離する必要がある。ただし、同時に迅速検査法を実施することで、汚染されている検水を推定することが可能となり、コロニーの選別の際、有用な情報となる。

4 参考文献

1. 金谷潤一, 磯部順子, 山口友美, 武藤千恵子, 淀谷雄亮, 飯高順子, 佐々木麻里, 田栗利紹, 蔡国喜, 川野みどり, 倉文明, 前川純子: 環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価. 日本防菌防黴学会誌. 48:515-522, 2020.
2. 枝川亜希子, 土井 均, 木村明生, 田中榮次, 肥塚利江, 渡辺 功: LAMP法を用いた浴槽水からのレジオネラ属菌検出時における反応阻害確認の必要性. 日本防菌防黴学会誌, 37:3-8, 2009.
3. 金谷潤一, 磯部順子, 山口友美, 武藤千恵子, 淀谷雄亮, 中筋愛, 吉崎美和, 塩崎晋

啓, 水谷幸仁, 村尾拓哉, 森中りえか, 小澤賢介: レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発. 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年度総括・分担研究報告書, 2021(印刷中).

4. 浅野陽子: 核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について, 生活と環境, 52, 89-91, 2007.
5. 磯部順子, 烏谷竜哉, 佐々木麻里, 八木田健司, 山口友美, 武藤千恵子, 飯高順子, 淀谷雄亮, 金谷潤一, 浦山みどり, 田栗利紹, 緒方喜久代, 原口浩幸, 森中りえか, 泉山信司: レジオネラ属菌迅速検査法の評価. 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)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成25~27年度総合研究報告書, 53-60, 2016.

別表 各種迅速検査法一覧

方法	試薬 メーカー	検出する核酸	検水濃縮後の 所要時間	特徴	反応阻害の確認	検水での活用例
qPCR法	タカラバイオ 株式会社	レジオネラ属菌の 16S rRNA遺伝子	約2.5時間	・死菌DNAも検出	・試薬にインターナルコントロールが添加されている	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及
EMA-qPCR法	タカラバイオ 株式会社	レジオネラ属菌の 16S rRNA遺伝子	約3.5時間	・EMA処理により、死菌DNAのPCR増幅を阻害	・試薬にインターナルコントロールが添加されている	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及
LC EMA-qPCR法	タカラバイオ 株式会社	レジオネラ属菌の 16S rRNA遺伝子	約21時間	・液体培地による前増菌培養とEMA処理を組み合わせ、生菌を選択的に検出	・試薬にインターナルコントロールが添加されている	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及、水質基準適合 判断*
LAMP法	栄研化学 株式会社	レジオネラ属菌の 16S rRNA遺伝子	約2時間	・死菌DNAも検出	・インターナルコントロールは添付されていない ・反応液に陽性コントロールを添加して確認する方法が報告されている	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及
PALSAR法	株式会社 ファスマック	レジオネラ属菌の 16S rRNA	約5時間	・16S rRNAを直接検出 ・特別な反応装置や検出機器が不要 ・遺伝子を増幅しないので増幅産物によるコンタミネーションが無い	・インターナルコントロールは添付されていない ・検討した報告はない	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及

*検査法は、各自治体の条例等で規定されている場合がある。