

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4年度 分担研究報告書

「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」

レジオネラ属菌の新規検査法の検討

研究分担者	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所
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	山口友美	宮城県保健環境センター
研究協力者	梅津萌子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	高久靖弘	東京都健康安全研究センター
研究協力者	西里恵美莉	川崎市健康安全研究所
研究協力者	吉田裕一	川崎市健康安全研究所

研究要旨

操作が容易で利便性が高いと期待されるレジオラート/QT法は、浴槽水等の実検体で偽陽性が経験されており、対策として前処理の酸処理の有効性について検討した。浴槽水等 90 検体から、前処理なし、酸処理 5 分、酸処理 10 分の 3 通りでレジオラート/QT 法の測定を行い、平板培養法と比較した。レジオラート/QT 法の感度及び検出菌量は酸処理の反応時間に従って低下する傾向にあったが、従来の平板培養法であってもそうしたものであり、特に問題とはならなかった。未処理で 50 MPN/100mL 以上に着目すると、13 検体中の 12 検体は酸処理 5 分と 10 分であっても陽性と判定された。残り 13 検体中の 1 検体は酸処理により、レジオネラではない偽陽性を抑制できていた。例数が少ないかもしれないが、レジオラート/QT 法の前処理として、酸処理 5 分が有効であった。

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 *Legionella 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。本研究班では平成 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が、非常に稀ではあるものの一部検体において交雑菌による偽陽性が確認されていた。そこで、本研究では検体の培養前に酸処理を加えた改良したプロトコールにおける有効性を確認するため、実検体を使用した前処理の実施条

件を比較検討した。

B. 研究方法

各地方衛生研究所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 90 検体を対象とした。レジオラート/QT 法（未処理）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、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。

上記プロトコールに追加する酸処理の工程として、検体 10 mL に対し、あらかじめ滅菌水 10 mL で溶解した×20 前処理剤 (IDEXX Pre-treatment reagent) を 0.5 mL 加え前処理を 5 分又は 10 分実施した後、15% KOH を 0.3 mL 加え、中和処理した。レジオラートの粉末を 90 mL の滅菌水で溶解し、検体全量を加えよく攪拌した後、Quantitray/legiolert に封入し 37°C で 7 日間培養した。

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）」に準じた各検査施設の方法で実施し、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、10 CFU/100mL 以上を陽性とした。

各処理を行ったレジオラート/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。

遺伝子検出法は LAMP 法によりレジオネラ属菌の遺伝子検出を行った。

C. 結果

3 施設に搬入された計 90 検体について各法で比較検討した。まず、レジオラート/QT 法（未処理）と平板培養法を比較したところ、ともに陽性であったものが 25 検体、ともに陰性であったものが 59 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 86.2%、特異度は 96.7% であり、結果一致率は 93.3% であった。酸処理 5 分及び 10 分ではともに 21 検体が陽性となり、平板培養法と比較した特異度はともに 98.4% と変わらなかったものの、感度は 69.0%、66.7% と低下する傾向が確認された（表 2 及び表 3）。

1 検体において、レジオラート/QT 法（未処理）でレジオネラ属菌が 4096 MPN/100mL 検出されたが、酸処理 5 分、10 分ともに陰性となった。平板培養法では 190 CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出されており、検出菌種は *L. thermalis* 及び *L. nagasakiensis* であった（表 4）。

レジオラート/QT 法（未処理）で検出されたもののレジオラート/QT 法（酸処理 5 分）で検出されなかった検体は 8 検体であり、上記 1 検体を除いて 11 から 39 MPN/100mL であった（表 4）。レジオラート/QT 法（未処理）で検出されたもののレジオラート/QT 法（酸処理 10 分）で検出されなかった検体は 8 検体であり、このうち、3 検体は酸処理 5 分では検出されたものの酸処理 10 分では検出されなかった。レジオラート/QT 法（未処理）において 50 MPN/100mL 以上の検出菌量であった 13 検体中上記の *L. thermalis* 及び *L. nagasakiensis* が検出された 1 検体を除く 12 検体においては、酸処理 5 分及び酸

処理 10 分ともに全ての検体で陽性と判定された。

平板培養法でレジオネラ属菌が検出された 29 検体のうち、LAMP 法を実施した 24 検体中 22 検体で陽性となった。陰性であった 2 検体の平板培養法の検出菌量はともに 10 CFU/100mL であった。レジオラート/QT 法では 1 検体は未処理、酸処理 5 分で陽性で、酸処理 10 分で陰性となり、もう 1 検体は未処理、酸処理 5 分で陰性、酸処理 10 分で陽性となった。

レジオラート/QT 法の 3 法すべてで陽性であった 16 検体について酸処理による検出菌量の変化を検討した。16 検体中 9 検体において酸処理 5 分で検出菌量が低下し、酸処理 10 分では 13 検体で検出菌量が低下した。酸処理 5 分と 10 分を比較すると 12 検体で検出菌量が減少していた (図 1)。

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、平板培養法の結果一致率は 93.3 % と高い一致率を示した。過去の検討と同等程度であり、改めてレジオラート/QT 法の有用性が示された。酸処理を追加することにより、未処理と比較して感度の低下が確認された。検出菌量の比較においても、酸処理により検出菌量の低下が確認されており、酸処理 10 分においては酸処理 5 分よりもさらに検出菌量の低下が確認された。また、1 検体においては未処理では検出されたものの酸処理 5 分及び 10 分では陰性であったことから、未処理の陽性反応は偽陽性であったことが推察され、酸処理の前処理法が有効であった事例となった。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ため、当該検体において平板培養法で検出された *L. thermalis* 及び *L. nagasakiensis* といった菌種には反応しないと考えられた。酸処理の反応時間については、1 検体ではあるが偽陽性を検知できたこと、酸処理 5 分に比べ酸処理 10 分の方がレジオネラの検出菌量が低下傾向にあったことから、本検討においては 5 分が適切であると考えられた。一方で、50 MPN/100mL 以上の比較的多いレジオネラ属菌が含まれると考えられる検体においては、酸処理 10 分でも全ての検体で陽性と判定できたことから、酸処理 10 分も有用であると考えられ、検体の特性をあらかじめ考慮し交雑菌の菌量を推定した上で、酸処理時間を設定する必要があると思われる。本検討で実施した検体数は 90 検体であり、陽性検体数は平板培養法及びレジオラート/QT 法ともに陽性であった検体は 25 検体のみであること、平板培養法で陽性であった 29 検体中 10 検体が検出限界値の 10 CFU/100mL であり、遺伝子検査法においても結果が不一致であるなど、非常に低い菌量の検体を対象としていることを留意する必要がある。酸処理の有用性を明らかにするにはさらなる検討数の積み重ねが必要であると考えられた。

E. 総括

レジオラート/QT 法における前処理法として本検討においては酸処理 5 分が適切であると考えられた。

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（未処理）と平板培養法のレジオネラ属菌検出検体数

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート/QT法 (未処理)	陽性	25	2	27
	陰性	4	59	63
計		29	61	90

表2 レジオラート/QT法（酸処理5分）と平板培養法のレジオネラ属菌検出検体数

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート/QT法 (酸5分)	陽性	20	1	21
	陰性	9	60	69
計		29	61	90

表3 レジオラート/QT法（酸処理10分）と平板培養法のレジオネラ属菌検出検体数

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート/QT法 (酸10分)	陽性	18	3	21
	陰性	11	58	69
計		29	61	90

表4 レジオラート/QT法（未処理）で陽性であった検体の結果一覧（n=27）

No.	レジオラート/QT法			平板培養法	検出菌種	LAMP法
	未処理	酸処理5分	酸処理10分			
1	10	0	0	30	Lp SG5, 6	+
2	10	11	11	10	Lp SG6	+
3	11	0	11	<10	-	+
4	11	0	23	10	Lp SG6	+
5	11	0	0	10	Lp SGUT	+
6	22	22	11	20	Lp SG6	+
7	22	32	0	10	Lp SG5	-
8	22	0	11	50	Lp SG1, 6	+
9	23	23	11	40	Lp SGUT	+
10	23	10	0	70	Lp SG1	+
11	39	0	0	10	Lp SG1	+
12	39	0	0	10	Lp SG5	+
13	39	11	52	10	Lp SG5, 10	+
14	43	11	0	10	Lp SG5, 6	NT
15	52	58	47	<10	-	+
16	65	84	39	210	Lp SG1, 5, 6, 9	NT
17	124	22	22	50	Lp SG3	+
18	146	74	79	180	Lp SG1	+
19	223	146	124	100	Lp SG2, Lsp	+
20	246	155	123	160	Lp SG5	+
21	264	84	39	180	Lp SG6	+
22	361	74	52	330	Lp SG3, 4	+
23	416	474	361	400	Lp SG6, 7	+
24	474	223	146	580	Lp SG1, 3, 5, 9	NT
25	642	854	659	2600	Lp SG4	+
26	921	361	219	700	Lp SG6, SGUT	+
27	4096	0	0	190	<i>L. thermalis</i> , <i>L. Nagasakiensis</i>	NT

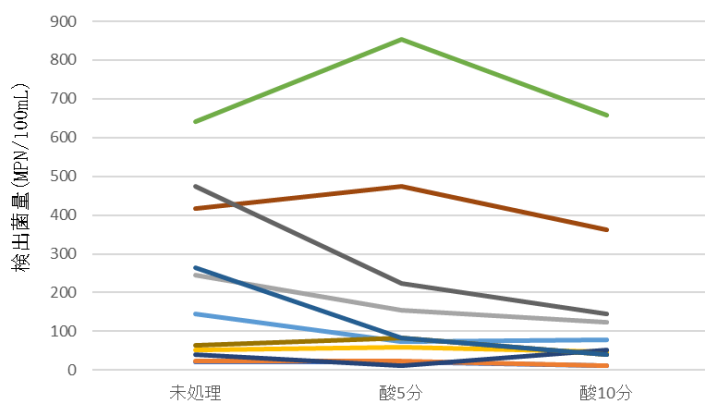


図1 同一検体ごとのレジオラート/QT法における各処理の検出菌量（n=16）