

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5年度研究報告書

「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	山口 友美	宮城県保健環境センター
研究協力者	中川 佳子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	近 真理奈	埼玉県衛生研究所
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	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	本宮 恵子	千葉市環境保健研究所
研究協力者	小野田 早恵	静岡市環境保健研究所
研究協力者	鈴木 史恵	静岡市環境保健研究所
研究協力者	高橋 美穂	静岡市環境保健研究所
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	小嶋 由香	川崎市健康安全研究所

研究要旨

本研究では、浴槽水等の実検体におけるレジオラート/QT法の前処理の有用性を確認するため、酸処理の実施有無における検出率について平板培養法と比較検討した。浴槽水等204検体についてレジオラート/QT法の前処理なし及び酸処理5分を行い、平板培養法と比較したところ、感度及び検出菌量は酸処理によって低下する傾向が確認された。一方で、レジオラート/QT法の酸処理において、平板培養法と比較した特異度は98.6%と未処理の93.9%から向上し、一致しなかった2検体からはレジオラート培養液から*L. pneumophila*が検出された。レジオラート/QT法の未処理検体で陽性で、酸処理検体では陰性となった27検体中5検体については、平板培養法不検出かつ遺伝子検査法も陰性であったことから、酸処理により偽陽性を防ぐことができたと考えられた。本検討からレジオラート/QT法における酸処理の有効性を示すことができた。

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。昨年度に先行研究として検体の前処理として酸処理 5 分と酸処理 10 分を比較したところ、酸処理 5 分で前処理が十分である可能性が示された。そこで、本研究では検体の培養前に酸処理 5 分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、実検体を使用し比較検討した。

B. 研究方法

6 つの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 204 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 プロトコールに従った。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 5 分静置した後、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、検体とした。それぞれ Quanti-Tray/legiolert に封入し 37 °C で 7 日間培養し、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。

同時に平板培養法にてレジオネラ属菌の分離培養を実施した。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た。ろ過濃縮法にて濃縮した検体を用い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レジオネラ属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。遺伝子検出法は LAMP 法、リアルタイム PCR 法及び PCR 法によりレジオネラ属菌の遺伝子検出を行った。

レジオラートが陽性となったウェルの培養液を GVPC α 寒天培地等に接種し、レジオネラ属菌の分離を行い、分離されたレジオネラ属菌を同定した。GVPC α 寒天培地等にレジオネラ属菌のコロニーが確認できなかった場合、優勢のコロニーを採取し、16S rDNA 遺伝子等により菌種を同定し、分離された菌種を懸濁したものを検体としてレジオラート/QT 法を実施し、偽陽性を引き起こすか確認した。

C. 結果

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 50 検体、ともに陰性であったものが 139 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 (未処理) の感度は 84.7 %、特異度は 93.9 % であり、結果一致率は 92.6 % であった。レジオラート/QT 法 (酸処理) と平板培養法を比較すると、31 検体がともに陽性となり、平板培養法と比較した特異度は 98.6 % であったが、感度は 55.4 % と低下した (表 2)。レジオラート/QT 法 (酸処理) とレジオラート/QT 法 (未処理)

を比較すると、未処理と比較した感度は54.2% 特異度は99.3%であった(表3)。レジオラート/QT法(未処理)で陰性であったが、レジオラート/QT法(酸処理)で陽性となった1検体についてはレジオラート培養液から*L. pneumophila* SG6が検出された。当該検体は平板培養法においても不検出で、遺伝子検査法は陽性であった。

レジオラート/QT法の未処理、酸処理とともに検出された検体32検体のうち、>22726 MPN/100mLとなりMPN値が確定しなかった1検体を除いた31検体について検出菌量を比較したところ、酸処理により23検体で検出菌量が減少し、平均で79.1%中央値61.5%の検出菌量となった(表4)。

レジオラート/QT法の未処理が陽性で酸処理が陰性であった27検体のうち、レジオラート培養液からレジオネラ属菌が分離できたものは12検体であった(表5)。レジオネラ属菌が分離されなかった14検体中8検体は平板培養法においてもレジオネラ属菌が検出されず、8検体中5検体で遺伝子検査法は陰性であった。

レジオラートが陽性となったウエルの培養液を培養したところ、25検体から*L. pneumophila*が検出され、1検体から*L. dumoffii*が検出された(表4及び表5)。19検体から平板培養法と同一の血清群が検出されたが、6検体で平板培養法では検出されなかった菌種または血清群が検出された。

レジオラート培養液からレジオネラ属菌が検出されなかった9検体について、優勢のコロニーについて同定したところ、*Stenotrophomonas* sp.、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Aeromonas* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Serratia marcescens*、*Klebsiella aerogenes*が検

出された(表5)。単離した菌種のうち*Aeromonas* sp.の1菌種、*Pseudomonas* sp.の2菌種及び*Klebsiella aerogenes*の1菌種について単離した菌を用いてレジオラート/QT法を実施したところ、陽性を示した。

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、平板培養法の結果一致率は92.6%と高い一致率を示した。これまで実施した本研究班での検討と同程度であり、改めてレジオラート/QT法の有用性が示された。レジオラート/QT法は酸処理により、未処理と比較して感度の低下が確認され、検出菌量の比較においても、検出菌量の低下が確認された。一方で、レジオラート/QT法の未処理で陽性で、酸処理では陰性となった27検体中5検体については、平板培養法不検出かつ遺伝子検査法も陰性であったことから、酸処理により偽陽性を防ぐことができたと考えられた。レジオラート培養液から分離されたレジオネラ属菌以外の菌種のうち、*Aeromonas* sp.の1菌種、*Pseudomonas* sp.の2菌種、*Klebsiella aerogenes*の1菌種についてはレジオラート/QT法で偽陽性を示すことが確認された。これらの検体については酸処理によりレジオラート/QT法で陰性が確認されたことから、酸処理を実施することにより該当の夾雑菌の影響は除外できるものと考えられる。

レジオラート培養液からレジオネラ属菌の分離を実施したところ、おおむね平板培養法と同一の血清群の*L. pneumophila*が検出された。一部検体から平板培養法では検出されなかった血清群が確認され、特に3検体でSG1が検出された。レジオラート/QT

法は液体培養であるため、平板培養法と併用することにより、目的の血清群を分離することに役立つものと考えられる。

本検討結果から酸処理を実施することにより偽陽性を起こす可能性を低減することができることが示唆された。しかしながら、酸処理により感度が大きく低下したことから、酸処理を実施する検体の選択は慎重にする必要があると考えられる。一方で、平板培養法が不検出でレジオラート/QT法のみでレジオネラが検出され、培養液から菌が分離された検体も確認されたことから、必ずしも平板培養法に劣る検査法ではない。より正確な検査を実施するためには遺伝子

検査法を併用するなど複数の検査法を組み合わせることを重要であると考えられる。

E. 総括

レジオラート/QT法における浴槽水に対する前処理法と酸処理は有用である。

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 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		計
		検出	不検出	
レジオラート/QT法（未処理）	陽性	50	9	59
	陰性	6	139	145
計		56	148	204

表2 レジオラート/QT法（酸処理）と平板培養法のレジオネラ属菌検出検体数

		平板培養法		計
		検出	不検出	
レジオラート/QT法（酸処理）	陽性	31	2	33
	陰性	25	146	171
計		56	148	204

表3 レジオラート/QT法（未処理）と酸処理のレジオネラ属菌検出検体数

		レジオラート/QT法（未処理）		計
		検出	不検出	
レジオラート/QT法（酸処理）	陽性	32	1	33
	陰性	27	144	171
計		59	145	204

表 4 レジオラート/QT 法未処理及び酸処理でともに陽性であった検体の結果一覧
(n=32)

No.	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)				平板培養法 (CFU/100mL)		遺伝子 検査法
	未処理	分離菌種	酸 処 理	分離菌種	検出 菌量	検出菌種	
1	141	Lp SG1	146	Lp SG1	240	LpSG1, 6	陽性
2	223		223		140	LpSG3, 7	陽性
3	23		11		10	LpSG3	陽性
4	94	Lp SG1	35	Lp SG1	20	LpSG5	陽性
5	169	Lp SG1	104	Lp SG1	150	LpSG8	陽性
6	74	Lp SG8	58	Lp SG1	90	LpSG1, 8	陽性
7	219	Lp SG9	124	Lp SG9	80	LpSG1, 5, 9	陽性
8	23	Lp SG3	52	Lp SG3	120	LpSG3	陽性
9	194	Lp SG8	194	Lp SG8	200	LpSG8	陽性
10	854		474		730	LpSG5	陰性
11	7855		3071		2300	LpSG1, 8	陽性
12	223		146		150	LpSG3	陽性
13	534		474		460	LpSG3, 5	陽性
14	>22726		187		1200	Lp SG5	陽性
15	223		58		70	LpSG1, 9	陽性
16	94		47		110	LpSG5, 6	陽性
17	104	<i>Stenotropho monas</i> sp.	11	Lp SG1	<10		陽性
18	194		74		700	LpSG9, UT	陽性
19	596		223		200	LpSG6	陽性
20	52		11		20	LpSG9	陽性
21	90		187		50	LpSG6	陽性
22	11	Lp SG3	23	Lp SG5	45	LpSG1, 3, 5 <i>L. londiniensis</i>	NT
23	23	Lp SG10	58	Lp SG6	27	LpSG1, 6, 14 , SGg4/10	NT
24	3071	Lp SG1	4489	Lp SG1	8000	LpSG1, 3	NT
25	1964	Lp SG12	1269	Lp SG12	1600	LpSG1, 5, 6, 12 , SGg5	NT
26	52		39		20	LpSG6L. sp	陽性
27	2674		1057		1440	LpSG5, 9	陽性
28	4096		126		20	LpSG6	陽性
29	7855		5549		3140	LpSG1, 3, 5	陽性
30	3730		1490		460	LpSG6	陽性
31	66		52		75	LpSG7	陽性
32	8417	Lp SG4, 6	1882	Lp SG5, 6	500	LpSG5, 6	陽性

表 5 レジオラート/QT 法未処理が陽性かつ酸処理が陰性であった検体の結果一覧 (n=27)

*分離した菌種によりレジオラート/QT 法が偽陽性を示したことを確認したことを示す。

No.	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)			平板培養法 (CFU/100mL)		遺伝子 検査法
	未処理	分離菌種	酸処理	検出 菌量	検出菌種	
1	23	Lp SG6	0	10	Lp SG8	陽性
2	155		0	<10		陽性
3	11	<i>L. dumoffii</i>	0	20	Lp SG1	陽性
4	11	Lp SG6	0	10	Lp SG6	陰性
5	23	Lp SG15, UT	0	10	Lp SG15	陽性
6	11	Lp SG1	0	20	Lp SG3, UT	陽性
7	11	Lp SGUT	0	370	Lp SGUT、 L. sp	陽性
8	104	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	0	<10		陰性
9	52		0	1000	Lp SGg4/10	陽性
10	74		0	50	Lp SG6, SGg4/10	陽性
11	39		0	<10		陰性
12	264	Lp SG5	0	130	Lp SG1, 5	NT
13	58	Lp SG3	0	74	Lp SG3	NT
14	169	Lp SG3	0	220	Lp SG3	NT
15	58	Lp SG1	0	52	Lp SG1, 3	NT
16	11	Lp SG5	0	17	Lp SG5, 6	NT
17	58	発育せず	0	18	<i>L. nagasakiensis</i> <i>L. thermalis</i>	NT
18	310	雑菌	0	120	Lp SG3 SGg4/10	NT
19	90	<i>Aeromonas</i> sp.*	0	30	Lp SG1 <i>L. micdadei</i>	陽性
20	22	<i>Pseudomonas</i> sp.*	0	20	Lp SG1 <i>L. micdadei</i>	陰性
21	11	<i>Pseudomonas</i> sp.*	0	<10		陰性
22	106	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	0	<10		陽性
23	124	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> , <i>Serratia marcescens</i>	0	<10		陽性
24	22	<i>Serratia</i> <i>marcescens</i>	0	10	Lp SG9	陽性
25	22	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	0	<10		陰性
26	11	Lp SG5	0	10	Lp SG5	陽性
27	35	<i>Klebsiella</i> <i>aerogenes</i> *	0	<10		陰性