

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3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
研究分担者	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
研究分担者	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
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	花田祐一	アイデックスラボラトリーズ株式会社

研究要旨

本研究では、レジオラート/QT法の有用性を確認するため、検査室間における検査精度の比較検討を実施するとともに、実検体を使用した平板培養法及び遺伝子検査法と比較検討した。3施設において検査室間における検査精度の比較検討を実施したところ、各施設でlotの許容範囲内の値を得ることができ、レジオラート/QT法の試験法の安定性が確認できた。実検体におけるレジオラート/QT法と平板培養法の結果一致率は85.5%と高い一致率を示し、検出菌量は強い相関が認められた。また、レジオラート/QT法の培養3日目以前にウェルの変色が確認される検体は偽陽性であることが示唆された。不一致であった42検体中31検体で検出菌量が30MPN又はCFU/100mL未満であった。このうち6検体が遺伝子検査法陰性であり、レジオラート/QT法及び平板培養法いずれの方法においても不一致が生じた。

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 *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。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、レジオラート/QT法の有用性を確認するため、検査室間における検査精度の比較検討を実施するとともに、引続き実検体を使用した平板培養法及び遺伝子検査法と比較検討した。

B. 研究方法

1. 検査室間の比較

3 施設においてそれぞれ同一ロットの IDEXX-QC LEGIONELLA PNEUMOPHILA を用いてレジオラート/QT法及び平板培養法を実施し、得られた検出菌数を製品情報と比較するとともに検査室間の検出菌数を比較した。

同一ロットの IDEXX-QC LEGIONELLA PNEUMOPHILA 3本を滅菌水 40 mL に溶解させ、対象検体とした。検体を 10 mL 及び 2 mL 分取し滅菌水で 100 mL にメスアップしたものをそれぞれ 2 つ調製し、レジオラート/QT法に従って 7 日間培養した後、菌数を測定した。また、検体を BCYE α 寒天培地 5 枚に 200 μ L ずつ塗布し 7 日間培養し、菌数を測定し平均値を算出した。さらに、検体 15 mL に滅菌水 485 mL を加え 500 mL とし、全量をろ過濃縮法にて濃縮した後、5 mL の滅菌水で溶解した。BCYE α 寒天培地 5 枚に 200 μ L ずつ塗布し 7 日間培養し、菌数を測定し平均値を算出した。使用した lot について製品情報から菌量及び Acceptable Range を使用した濃度に換算して算出し、結果を比較した。

2. 実検体を使用したレジオラート/QT法と平板培養法の比較検討

5 カ所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 290 検体を対象とした。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、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。また、培地の観察を頻回に実施し、ウェルの液体培地の変色を確認した培養経過日数を測定した。

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。

同時に平板培養法にてレジオネラ属菌の分離を、遺伝子検出法にてレジオネラ属菌の検出を実施した。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。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。遺伝子検出法は LAMP 法又はリアルタイム 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/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。

C. 結果

1. 検査室間の比較

3 施設で実施した結果 3 施設ともに使用 lot の Acceptable Range の範囲内となった(表 1)。特に 2 mL で実施したレジオラート/QT 法については 23140-34450 MPN/100mL の範囲となった。同時に実施した平板培養法では非濃縮で 23800-36800 CFU/100mL であり、濃縮法では 2333-5470 CFU/100mL であった。

2. 実検体を使用したレジオラート/QT 法と平板培養法の比較検討

5 施設で計 290 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 65 検体、両方法で陰性となったものは 183 検体であった(表 2)。平板培養法と比較したレジオラート/QT 法の感度は 70.7%、特異度は 92.4% であり、結果一致率は 85.5% であった。

レジオラート/QT 法で陽性であった 80 検体におけるウェルの変色を確認した培養経過日数を確認したところ、培養 3 日目から 20 検体で変色を確認され、培養 5 日目で 70 検体の変色を確認された(図 1)。2 日目で変色が見られた 2 検体のレジオラート培養液からはレジオネラ属菌が検出されず、平板培養法不検出かつ LAMP 法陰性の検体であった。

レジオラート/QT 法及び平板培養法ともに陽性であった検体の検出菌量について相関を検討したところ、回帰直線の R^2 は 0.748 となり、強い相関が認められた(図 2)。

レジオラート/QT 法と平板培養法が不一致であった検体の検出菌量は 42 検体中 31 検体で 10-29 CFU 若しくは MPN/100mL であった(図 3)。レジオラート/QT 法のみ陽

性であった 15 検体中 4 検体でレジオラート培養液からレジオネラ属菌が検出された。検出菌量が 10-29 CFU 若しくは MPN/100mL であった 31 検体のうち、遺伝子検査法を実施した 22 検体中 6 検体で遺伝子検査が陰性であった。

D. 考察

同一 lot 試薬を用いて検査室間での検出状況の比較を行ったところ、各施設で lot の許容範囲内の値を得ることができ、レジオラート/QT 法の試験法の安定性が確認できた。同時に実施した平板培養法での検出菌量はレジオラート/QT 法の検出菌量と比較し高い値となった。この原因として、レジオラート/QT 法の液体培養液には抗生物質が含まれているため、培養が抑制されたことが考えられる。濃縮工程を実施した結果、非濃縮の検体と比較し 85.1% から 90.7% 減少し、検査室間のばらつきが大きくなった。この原因として、菌体がろ過工程により喪失または損傷を受けたことが考えられる。本検討は 3 施設のみでの検討であり実施数が不十分ではあるが、レジオラート/QT 法は平板培養法と比較し操作工程が少ないことから操作者の手技による結果の差が出にくく、検査精度の担保がしやすい検査であると考えられる。

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 85.5% と過去の検討と同等程度の高い一致率を示した。特異度は 92.4% と過去の検討と同等の高い値であり、感度は過去の検討と比較するとばらつきが確認された。本検討は実検体を用いた検討であること、実施施設が異なることが影響したもの

と考えられる。レジオラート/QT 法におけるウェルの変色が認められる培養経過日数は培養 2 日目から確認され、培養 5 日目までで 90% の検体で変色が認められた。このうち培養 2 日目で変色が認められた 2 検体は平板培養法で不検出であり、また、遺伝子検査法である LAMP 法においても陰性であったことから偽陽性であると考えられた。本検討ではレジオラート/QT 法ではレジオネラ陽性の検体は培養 3 日目以降にウェルの変色が確認された。従って、培養 3 日目以前にウェルの変色が確認される検体は偽陽性であることが示唆され、レジオラート/QT 法における一部の偽陽性検体を除外することが可能になると考えられる。

本検討においてはレジオラート/QT 法及び平板培養法の検出菌量に強い相関が確認された。過去の検討においても一定程度の相関は確認されており同様の結果となった。一方で検出菌量が 30 MPN 又は CFU/100mL 未満の菌数の検体においてはレジオラート/QT 法及び平板培養法の不一致が確認された。検出菌量が 30 CFU/100mL 未満の不一致検体 31 検体中 6 検体が遺伝子検査法陰性であり、菌量の少ない検体におけるレジオネラ属菌の検出はレジオラート/QT 法及び平板培養法いずれの方法においても不一致が生じた。レジオネラ属菌の分離培養には通常 3-6 日必要であること、夾雑菌に影響されレジオネラ属菌の発育が阻害され分離が困難となることが多いため不一致になったと示唆される。より高い精度が求められる場合には複数の検査法を組み合わせる必要があることが示唆された。

本検討において実検体におけるレジオラート/QT 法の有用性が確認でき、検出菌数

も平板培養法に強い相関があることが示された。また、偽陽性である一部検体についてはウェルが変色するまでに日数を記録することで除外できると考えられた。一部検体で偽陽性を示すことが判明していることから、偽陽性を示す検体の性質の把握や偽陽性を低減させる手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

淀谷雄亮、佐々木麻里、増輪文治、井原基、田栗利紹、緒方喜久代、武藤千恵子、田中奈緒美、湯澤栄子、小嶋由香、前川純子、岡部信彦：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。日本防菌防黴学会第 48 回年次大会。2021 年 9 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 検査室間での検出状況の比較

実施機関	レジオラート/QT法 (10 mL) MPN/100mL	レジオラート/QT法 (2mL) MPN/100mL	平板培養法 (非濃縮) CFU/100mL	平板培養法 (濃縮) CFU/100mL
A	22726	27615	36800	5470
	>22726	30405		
B	22726	23140	23800	3067
	19226	24580		
C	>22726	27745	25200	2333
	>22726	34450		

使用 lot の換算値は 15900 MPN/100mL であり、Acceptable Range は 1590-40312 MPN/100mL であった。

表 2 実検体におけるレジオラート/QT 法と平板培養法の比較

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート/QT法	陽性	65	15	80
	陰性	27	183	210
	計	92	198	290

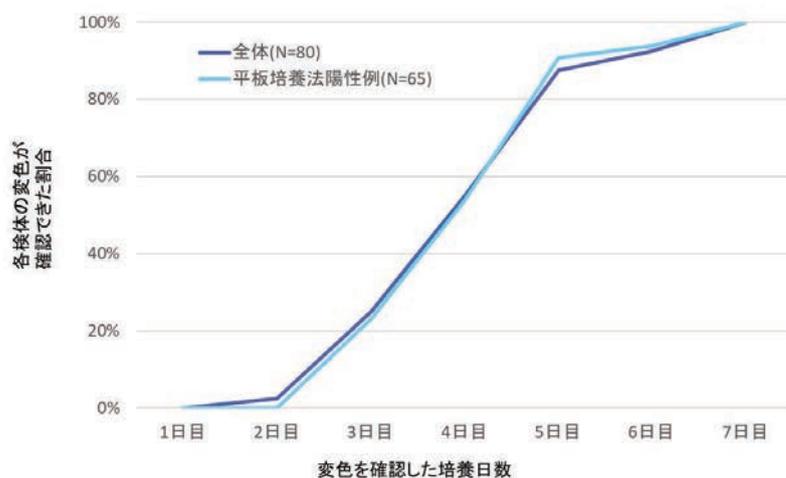


図 1 レジオラート/QT 法における変色を確認した培養経過日数

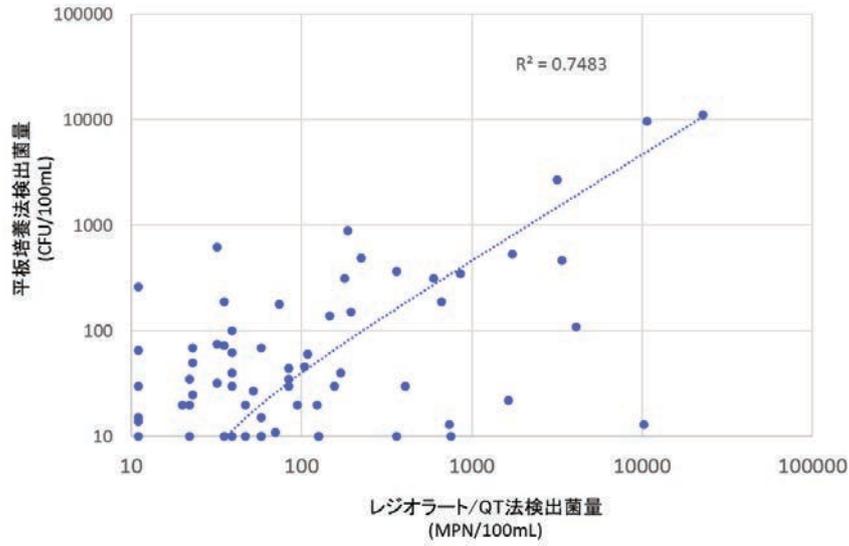


図2 平板培養法とレジオラート/QT法の検出菌量の比較(n=65)

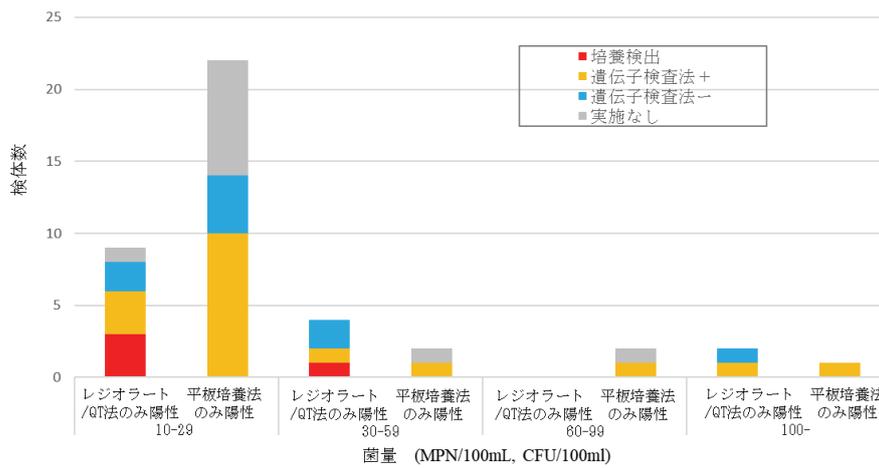


図3 不一致であった検体の検出菌量と遺伝子検査との関連