

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

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	緒方喜久代	公益社団法人大分県薬剤師会 検査センター
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	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
研究協力者	井原基	長崎県環境保健研究センター
研究協力者	湯澤栄子	川崎市健康安全研究所
研究協力者	田中奈緒美	アイデックスラボラトリーズ株式会社
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、実検体を使用して平板培養法と比較検討した。既存菌株を用いた検討においてレジオラート/QT法は平板培養法と同等の性能であることが示された。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83.6%と高い一致率を示し、検出菌量を比較した結果、回帰直線のR2は0.748となり、強い相関が認められた。不一致であった検体の74.5%が30 MPN又はCFU/100mL未満の検出限界に近い菌量での不一致であった。ウェルの液体培地を培養したところ、レジオラート/QT法で偽陽性を示す菌種が確認された。

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。本研究ではレジオラート/QT 法の有用性を確認するため、基礎的な検討とともに実検体を用いて従来法である平板培養法と比較検討した。

B. 研究方法

1. 基礎的検討

基礎的検討として、循環ろ過式入浴施設から入手したろ材より分離された *L. pneumophila* 血清群別不能の菌株を BCYE α 寒天培地に塗布し増菌した後、希釈系列を作成し、平板培養法及びレジオラート/QT 法を行い、各々の検出菌数を比較した。

方法としては、*L. pneumophila* の菌株を BCYE α 寒天培地で 2~4 日間培養し、発育したコロニーを滅菌水に懸濁し、希釈系列を 10 倍ごと 4 段階作成したものをを用いて比較実験を実施した。BCYE α 寒天培地に各希釈段階の菌懸濁液 0.1 mL を添加し湿潤環境で 36°C で 7 日間培養した。並行して、レジオラートを溶解した滅菌水 100 mL に各希釈段階の菌懸濁液 0.1 mL を添加し混和した後、Quanti-Tray/legiolert にシーラー PLUS を用いて封入し、湿潤環境で 36°C で 7 日間培養した。本培養温度はレジオネラ症防止指針第 4 版に準拠している。培養後、茶色ま

たは濁りの生じたウェル数を陽性とし、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。上記の実験を 3 回繰り返した。

2. 検査室間の比較

3 機関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、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。また、検体をろ過濃縮法にて濃縮した後、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。

3. 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

各施設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 599 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。

レジオラート/QT 法で陽性と判定されたものの、ウェルの液体培地からレジオネラ属菌が検出できなかった一部検体について、GVPC α 寒天培地で発育したコロニーから遺伝子を抽出し、16S rDNA により菌種を同定した。また、同定した菌についてレジオラート/QT 法で陽性を示すか確認するため、単離菌を滅菌水 100 mL に加え、レジオラートを混和した後、専用の Quanti-Tray/legiolert にシーラーPLUS を用いて封入し、湿潤環境で 39°C で 7 日間培養し、茶色または濁りが生じるか確認した。

同時に平板培養法にてレジオネラ属菌の分離と遺伝子検出法にてレジオネラ属菌の遺伝子検出を実施した。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）」に準じた各検査機関の方法で実施し、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。

4. 偽陽性菌株におけるレジオラート/QT 法の反応性

本検討で検出された *Aeromonas hydrophila* 菌株 A 及び環境から分離された *A. hydrophila* 菌株 B の 2 菌株を用いてレジオラート/QT 法が陽性になる菌量を検討した。各菌株を $10^5 \sim 10^1$ CFU/mL に希釈し、各 10 mL ずつレジオラートに添加し、39°C で 7 日間培養した後、陽性となったセル数をカウントした。

C. 結果

1. 基礎的検討

レジオラート/QT 法における検出菌量は希釈系列ごとに概ね 10 倍ごと段階的に減少していき、希釈ごとに表のとりの検出菌量を示した（表 1）。また、同時に実施した平板培養法においてもレジオラート/QT 法とある程度同等の検出菌量を示した。

2. 検査室間の比較

3 機関で実施した結果、3 機関ともに使用 lot の Acceptable Range の範囲内となった（表 2）。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。

3. 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

各検査機関で計 599 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 136 検

体、両方法で陰性となったものは 365 検体であった (表 3)。平板培養法と比較したレジオラート/QT 法の感度は 69.0 %、特異度は 90.8 %であり、結果一致率は 83.6 %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 136 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 R² 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 98 検体中 73 検体で 10-29 CFU 若しくは MPN/100mL であった (図 3)。検出菌量が 10-29 CFU 若しくは MPN/100mL で遺伝子検査法を実施した 35 検体中 7 検体で遺伝子検査が陰性であった。

レジオラート/QT 法のみ陽性であった 37 検体中 17 検体でレジオラート培養液から *L. pneumophila* が検出された。*L. pneumophila* が検出されなかった 4 検体において、レジオラート培養液を培養した培地上で発育が見られたコロニーから遺伝子抽出し、16S rDNA の塩基配列により同定したところ、それぞれ *Brevundimonas naejangsanensis*、*Pseudomonas otitidis*、*Pseudomonas* sp.、*Aeromonas hydrophila* であった。これら単離した菌株をそれぞれ滅菌水に懸濁し、レジ

オラート/QT 法を実施したところ、茶色の発色を示し、陽性反応が見られた。

4. 偽陽性菌株におけるレジオラート/QT 法の反応性

レジオラート/QT 法で陽性反応を示した菌株のうち *A. hydrophila* について、偽陽性となる菌量を検討するため、希釈系列を用いた検討を行った。浴槽水由来株 A は 10¹ から陽性となったが、環境由来株 B は 10³ から陽性と菌株によって大きい差がみられたが、少量の菌量でも陽性反応を示した (表 4)。また、レジオネラ属菌が陽性となる検体ではおおよそ 5 日目ごろから陽性となるのに対し、本菌株による陽性反応は 2 日目から 3 日目と比較的早期に見られた。

D. 考察

レジオラート/QT 法の有効性を確認するため、既存菌株を用いた希釈系列を作成し検討したところ、希釈系列ごとに検出菌量が減少した。また、平板培養法と比較してもほぼ同等の検出菌量であったことから、既存菌株を用いた検討においてレジオラート/QT 法は平板培養法と同等の性能であることが示された。

同一 lot 試薬を用いて検査室間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 83.6 %と高い一致率を示した。特に特異度は 90.8 %と高い値であった。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 日目に変色が認められた 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。本検討からレジオラート/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ることが示唆された。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可能性が示唆され、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、レジオネラ属菌を定量的に検出することが確認された。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ものの、不一致であった検体の 74.5 %が 30 MPN 又は CFU/100mL 未満の検出限界に近い菌

量での不一致であった。また、レジオラート/QT 法の陽性であった 17 検体についてはレジオラート培養液からレジオネラ属菌が検出されたことから同検体は平板培養法より感度よくレジオネラ属菌が検出できた。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。より高い精度での検出を実施する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。

本検討においてレジオラート/QT 法で偽陽性を示す菌種が複数確認された。今回確認された菌種は水環境や土壌などの環境中で分離が報告されている菌種である。また、これら偽陽性を示す菌種が確認された 4 検体は残留塩素がそれぞれ 0, 0, 0.1, 0.4 mg/L と「公衆浴場における衛生等管理要領等について（生衛発第 1811 号）」に規定される浴槽水中の遊離残留塩素濃度を通常 0.4 mg/L と比較し、4 検体中 3 検体が残留塩素の低い検体であった。残留塩素により多くの細菌は消毒されるが残留塩素が含まれない場合に多数の菌種が生存できることになり、このうち本検討で明らかとなったレジオラートに反応する一部菌種によりレジオラート/QT 法で偽陽性を示すことがあるものと考えられる。

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、平板培養法と同等の検査法である。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 レジオラート/QT法の基礎的検討結果

検体	希釈系列	レジオラート/QT法 (MPN/mL)	平板培養法 (CFU/mL)
1	10 ⁻³	>22726	>300
	10 ⁻⁴	>22726	>300
	10 ⁻⁵	17178	>300
	10 ⁻⁶	1644	1540
2	10 ⁻³	>22726	>300
	10 ⁻⁴	>22726	>300
	10 ⁻⁵	>22726	>300
	10 ⁻⁶	2580	2460
3	10 ⁻³	5067	>300
	10 ⁻⁴	788	640
	10 ⁻⁵	39	20
	10 ⁻⁶	<1	0

表2 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3 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	136	37	173
	陰性	61	365	426
	計	197	402	599

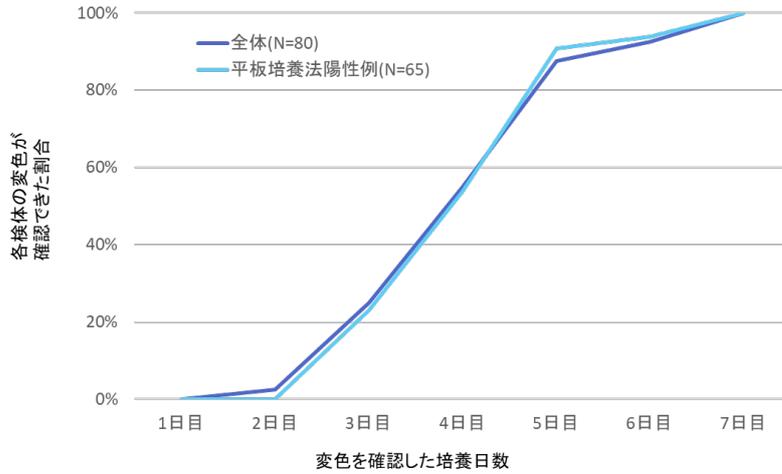


図1 レジオラート/QT法における変色を確認した培養経過日数

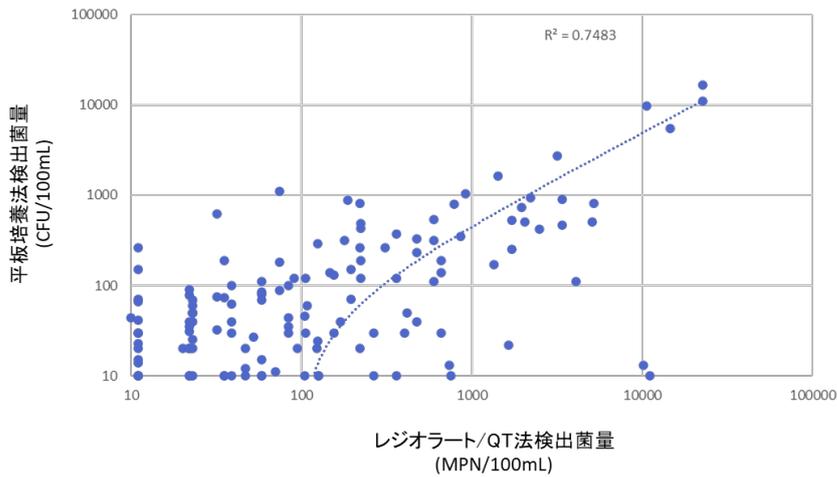


図2 平板培養法とレジオラート/QT法の検出菌量の比較(n=136)

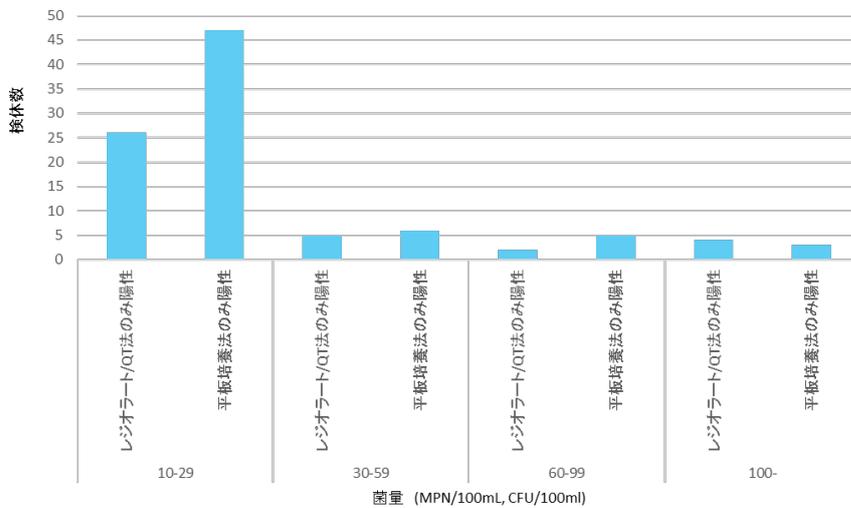


図3 不一致であった検体の検出菌量

表 4 *A. hydrophila* におけるレジオラート/QT 法の結果

表 4-1 浴槽水から分離された *A. hydrophila* の結果

菌量 (CFU/100 mL)	大ウェル 陽性数	小ウェル 陽性数	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)
10 ¹	6	65	6469
10 ²	6	90	>22726
10 ³	6	90	>22726
10 ⁴	6	90	>22726
10 ⁵	6	90	>22726

表 4-2 環境から分離された *A. hydrophila* の結果

菌量 (CFU/100 mL)	大ウェル 陽性数	小ウェル 陽性数	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)
10 ¹	0	0	-
10 ²	0	0	-
10 ³	2	4	72
10 ⁴	6	6	361
10 ⁵	6	50	4096