

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3年度分担研究報告書

大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT法の評価、
レジオラートを用いた定性試験法の検討

研究分担者 佐々木 麻里 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 高野 真実 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 溝腰 朗人 大分県衛生環境研究センター

研究要旨：浴場水のレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として厚生労働省から示された方法について、多様な泉質を有する大分県の実検体を用いて評価した。当所で従来から実施している方法と比較して、培地枚数が少ないにも関わらず同等の結果が得られた。特定酵素基質培地と専用トレイを組み合わせたレジオラート/QT法は、公衆衛生上重要な菌種である *Legionella pneumophila* を簡便に検査でき、検出された菌量は平板培養法とおおむね同等で相関が見られた。また、専用トレイとシーラーを使用せずに特定酵素基質培地のみを用いた定性的な試験法については、加熱処理した検体をQT法より低い温度で培養することにより、可能となった。

A. 研究目的

公衆浴場において問題となるレジオネラ属菌への対応として、厚生労働省の指針¹⁾により定期的に水質検査を行うこととされており、そのレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として検査法²⁾（ここでは、標準法と称する。）が通知された。この標準法について、多様な泉質を有する大分県の実検体を用いて評価した。また、*Legionella pneumophila*（以下、*Lp*）を特異的に検出する特定酵素基質培地と最確数（MPN）法で定量する専用トレイを組み合わせたレジオラート/QT法（以下、QT法）についても実検体を用いた評価を行った。併せて専用トレイとシーラーを必要としない定性的な試験法について検討した。

B. 研究方法

1. 試料および調製法

令和3年6月から11月に搬入された浴槽水および湯口水30施設分58検体を対象とした。

濃縮と前処理の方法は標準法に準じて実施した。すなわち、検体1200mLをメンブランフィルター（直径47mm、孔径0.2 μ m、ADVANTEC社、POLYCARBONATE）で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水12mL入りの滅菌コニカルビーカー（100mL容量）に移し、ボルテックスミキサーにて1分間洗い出しをした。ろ過濃縮後の濃縮試料（100倍濃縮）について、50 $^{\circ}$ Cで20分加熱後急冷したもの（以下、熱処理試料）、濃縮試料に等量の0.2M HCl・KCl液pH2.2 \pm 0.2（武藤化学又は関東化学）を加え混和し室温で5分間静置したもの（以下、酸処理試料）、熱や酸による前処理を行わないもの（以下、未処理試料）を調製した。

2. 平板培養法

レジオネラ属菌の分離培地としてWYO α 寒天培地（栄研化学）、GVPC寒天培地（日研生物）およびMWY寒天培地（関東化学又は自家製；Oxoid）を用い、従来から当所で実施していた方法（以下、大分法）と標準法とで実施した。大分法として、熱処理試料

および未加熱試料について、それぞれ 10 倍段階希釈を 2 段 (10 倍、100 倍) まで行い、各希釈段階 (1 倍～100 倍) の試料 200 μ L を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布した。標準法として、酸処理試料については 200 μ L、熱処理試料については 100 μ L、濃縮処理を行わない検体 (以下、非濃縮検体) については 200 μ L を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布した。なお、標準法として通知に記載されている非濃縮検体の塗抹量は 100 μ L であるので、本研究方法ではその 2 倍量を塗抹していることになる。これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36 $^{\circ}$ C で培養した。検出限界は大分法では 5cfu/100mL、標準法では 10cfu/100mL (非濃縮検体では 500cfu/100mL) である (表 1)。

標準法に採用され、大分法においても従前より実施していた斜光法³⁾にて、培養 3 日後に各分離培地を観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYE α 寒天培地 (自家製; Oxoid) および血液寒天培地 (ウマ血、自家製) に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認した。BCYE α 寒天で発育し、血液寒天では発育しなかったコロニーについて、PCR 法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は 36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、同様の同定検査を行った。最終的に同定されたコロニー数をもって検体 100mL あたりのレジオネラ属菌数に換算した。

3. レジオラート/QT 法

非濃縮検体 58 検体について、特定酵素基質培地レジオラートと専用トレイの Quanti-Tray/Legiolert (いずれも IDEXX) を用い、添付の取扱説明書に示された飲料水用 10mL プロトコールに従って測定した。QT 法は、大小 2 種類のウエルについて、茶色化または濁りの一方か両方が生じたら陽性とし、陽性ウエル数の組み合わせから、*Lp* 菌数を最確数法で定量する方法である。測定に使用した検体量は 10mL で、滅菌蒸留水 90mL を加えて 100mL とし、39 $^{\circ}$ C で培養した。本法の検出限界は 10MPN/100mL であ

る。また、陽性ウエルから採取した培養液を GVPC 寒天培地に画線塗抹し、レジオネラ属菌の分離同定を行った。

4. レジオラート定性試験法

非濃縮の 58 検体について、50 $^{\circ}$ C 水浴中 20 分間加熱して試料 (加熱) とした。なお、58 検体中 19 検体については、その一部を加熱しないまま試料 (未加熱) として比較検討した。各試料 10mL を、ベントフィルター付きのフラスコ (CELLSTAR フラスコ Advanced TC、青 FT キャップ 250mL 滅菌: Greiner Bio-One) に入れたレジオラート液 (レジオラート 1 包 (100mL 用) を 80mL の滅菌蒸留水に溶かした溶液) 40mL に加え、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養し、茶色化または濁りの一方か両方が見られたものを陽性とした。陽性のフラスコから採取した培養液を GVPC 寒天培地に画線塗抹し、レジオネラ属菌の分離同定を行った。

C. 研究結果

以下、平板培養法でレジオネラ属菌が検出されたこと、QT 法で陽性と判定したウエルがあったこと、レジオラート定性試験法 (以下、定性法) で陽性であったことを「(+)」と表記し、培養法でレジオネラ属菌が検出されなかったこと、QT 法で陽性と判定したウエルがなかったこと、定性法で陰性であったことを「(-)」と表記する。

1. 平板培養法

58 検体中、大分法では 18 検体、標準法では 16 検体からレジオネラ属菌が検出された (表 2)。標準法 16 検体のうち 1 検体は、濃縮試料ではレジオネラ属菌が検出されず、非濃縮検体のみで検出された。レジオネラ属菌数 (以下「菌数」という、単位は CFU/100mL) は、大分法と標準法でそれぞれ 5～2000、10～1500 (濃縮試料のみでは 10～890) であった。大分法でのみ検出された 2 検体の菌数はともに 5 で、*Lp* が検出された。標準法でのみ検出された検体はなかった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.9184$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8185$ であった (図 1)。

2. レジオラート/QT 法

58 検体中 14 検体から 11～361MPN/100mL

の、1 検体から測定上限値 22726MPN/100mL を超える *Lp* が検出された。平板培養法 (+) QT 法 (-) の結果となったのは、大分法で 7 検体 (菌数は、10 以上検出された検体に限ると 4 検体で、10、15、50 及び 100 各 1 検体)、標準法で 5 検体 (菌数は 10 が 3 検体、20 と 40 が各 1 検体)、平板培養法 (-) QT 法 (+) の結果となった検体は、大分法と標準法のどちらも同じ検体で 4 検体 (MPN/100mL は 11,23,58,>22726) であった (表 3a、3b)。平板培養法の結果と比較したところ、検出/不検出の一致率は大分法で 81.0%、標準法で 84.5%、菌数の相関は、QT 法で測定上限を超えた 1 検体を除くと、大分法で $R2=0.6443$ 、標準法で $R2=0.6717$ (濃縮試料のみで $R2=0.5891$) であった (図 2)。15 検体中 10 検体の培養液からは *Lp* が分離されたが、平板培養法 (-) QT 法 (+) の 4 検体と 39MPN/100mL の 1 検体からはレジオネラ属菌は分離されなかった。測定上限を超えた 1 検体については、GVPC 寒天培地上に発育した菌は無かった。

3. レジオラート定性試験法

未加熱の非濃縮検体 19 検体中 7 検体が陽性と判定された。その 7 検体中 1 検体の培養液からは *Lp* が分離されたが、6 検体の培養液からはレジオネラ属菌は分離されず、それ以外の菌のみが GVPC 寒天培地上に発育した。一方、同 19 検体を加熱したものについては、8 検体が陽性と判定され、そのうち 7 検体の培養液から *Lp* が分離された。以上の成績から加熱処理が有効と判断し、2.1 の 58 検体全て (上記 19 検体含む) について、加熱処理後にレジオネラ定性試験法 (以下、定性法) を試み、13 検体が陽性と判定された。陽性検体中 2 検体の培養液からレジオネラ属菌は分離されなかったが、11 検体の培養液から *Lp* が分離された。平板培養法との関係を表 4a、4b 及び図 3a、3b にまとめた。平板培養法 (+) 定性法 (-) の結果となったのは、大分法で 6 検体 (菌数は、10 以上検出された検体に限ると 3 検体で、15 及び 50 が 2 検体)、標準法で 4 検体 (菌数は 3 検体が 10、1 検体が 20)、平板培養法 (-) 定性法 (+) の結果となった検

体は、大分法と標準法のどちらも同じ検体で 1 検体 (培養液からレジオネラ属菌は分離されず) であった。この 1 検体は QT 法でも陽性 (23MPN/100mL) であったが、定性法でも培養液からレジオネラ属菌は分離されなかった。

D. 考察

平板培養法について、過去 2 年間^{4,5)}と同様、使用培地枚数の少ない標準法で大分法と同等の結果が得られた。大分法のみでレジオネラ属菌が検出された検体は、標準法の検出下限値未満 (菌数 5) の検体であった。指針による基準ではレジオネラ属菌は 10CFU/100mL 未満とされており、標準法は指針に基づく定期的な水質検査には適した方法だと言える。また、今回非濃縮検体の塗抹量を 100 μ L でなく 200 μ L としたが、夾雑菌の増加による平板観察の困難さは感じなかった。さらに、非濃縮検体のみ (+) となった検体から分離されたレジオネラ属菌は、平板上に 1 コロニー (500CFU/100mL に相当) であったことから、検出率を上げるためには、非濃縮検体の塗抹量は 100 μ L よりも 200 μ L の方が望ましいと考える。

QT 法について 58 検体を検査したところ、平板培養法で検出された菌量とおおむね同等であり、過去 2 年間 3、4) の結果ほどではないが相関が見られた。一方で、平板培養法 (-) でも QT 法 (+) と判定された 4 検体は、QT 法培養液からも *Lp* が分離されず、検水濃縮試料の遺伝子検査法 (LAMP 法) も (-) であった (データ非掲載) ことから、偽陽性と考えられた。これはレジオネラ属菌以外の夾雑菌によるものと考えられる。QT 法培養液を塗抹した GVPC 寒天培地に菌が発育しなかった検体についても、同一施設の別検体では発色しなかったため、温泉成分等水質による影響ではないと推察される。QT 法は、検体の濃縮工程や菌の確定試験が不要であるため、検体の処理や結果の判定が容易で、検査者の手技による差異が生じにくい。偽陽性はあるものの、平板培養法との結果一致率は高いことから、*Lp* の検査が簡便に行える QT 法は、日常の衛生管理には非常に有用な検査法と考える。また、メー

カーからは新たに夾雑菌低減用に前処理剤の販売が開始されており、その有効性を期待したい。

QT法は簡便で有用な検査法であるが、専用トレイとシーラーを必要とする。そこで、それら高価な機器を使用しない定性的な試験法について検討した。昨年度⁵⁾の検討において、QT法と同じ39℃培養では*Lp*の発育が抑制されたため36℃培養としたところ、夾雑菌の発育が抑制できず、陽性培養液の多くからレジオネラ属菌が分離されなかった。平板培養法の前処理の1つである熱処理(50℃で20分間加熱)を実施した検水を使用したところ、陽性培養液の多くからレジオネラ属菌が純培養状に分離された。培養温度を下げて、夾雑菌を抑制するための前処理を加えることで*Lp*を検出することが可能となった。定性法を平板培養法と比較すると、大分法の菌数で10~50、標準法の菌数で10~20の検体で結果にバラツキが生じた。標準法で菌数30以上の検体では定性法は全て陽性となった。QT法と同様、偽陽性と考えられる検体もあった。平板培養法でも発育した夾雑菌が多かったため、熱処理で十分に抑制できなかつたと考えられる。定性法は、平板培養法と比べて検出可能下限の菌数が若干劣るものの、検出/不検出の一致率は大分法で87.9%(10以上検出された検体に限ると93.1%)、標準法で91.4%と高く、簡便な検査法の1つとして使用できると考える。

参考文献・通知

- 1) 「公衆浴場における水質基準等に関する

指針」(平成12年12月15日生衛第1811号厚生省生活衛生局長通知 令和元年9月19日一部改正)

- 2) 「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」(令和元年9月19日付け薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)
- 3) 森本 洋：分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 日本環境感染学会誌, 2010. 25 (1) : 8-14
- 4) 佐々木麻里 他：大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT法の評価、比色系パルサー法の検討. 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」令和元年度総括・分担研究報告書：27-32
- 5) 佐々木麻里 他：大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT法の評価、レジオラートを用いた定性試験法の検討. 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：52-57

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 平板培養法

前処理		希釈段階	平板塗抹量	検出限界	使用培地枚数	
大分法	濃縮試料	熱処理	1倍、10倍、100倍	各200μL	5cfu/100mL	6枚
		未処理	1倍、10倍、100倍	各200μL	5cfu/100mL	
標準法	濃縮試料	熱処理	1倍	100μL	10cfu/100mL	3枚
		酸処理	1倍	200μL	10cfu/100mL	
	非濃縮検体	1倍	200μL*	500cfu/100mL		

*通知に記載されている塗抹量は「100μL」

表 2. 標準法と大分法の比較 (n=58)

	標準法			計
	≥10cfu/100mL		+	
	+	-		
大分法	+	16	2	18
≥5cfu/100mL	-	0	40	40
計		16	42	58

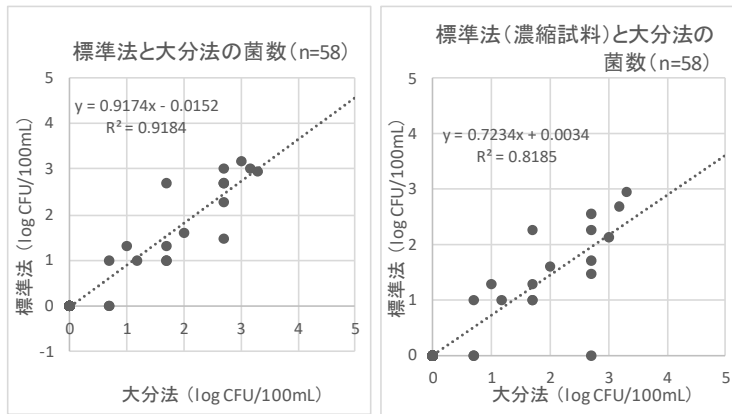


図1. 標準法と大分法の相関

表 3a. レジオラート/QT 法と大分法の比較 (n=58)

	レジオラート		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
大分法	+	11	7	18
≥5cfu/100mL	-	4	36	40
計		15	43	58

表 3b. レジオラート/QT と標準法の比較 (n=58)

	レジオラート		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
標準法	+	11	5	16
≥10cfu/100mL	-	4	38	42
計		15	43	58

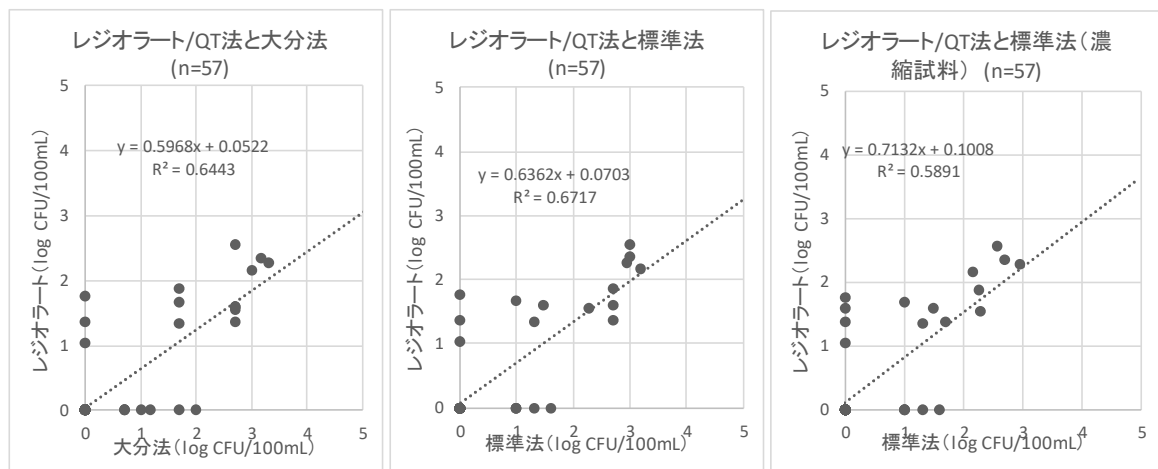


図2. レジオラート/QT法と平板培養法との相関

表 4a. レジオラート定性試験法（加熱）と大分法の比較（n=58）

	定性試験法		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
大分法	+	12	6	18
≥5cfu/100mL	-	1	39	40
計		13	45	58

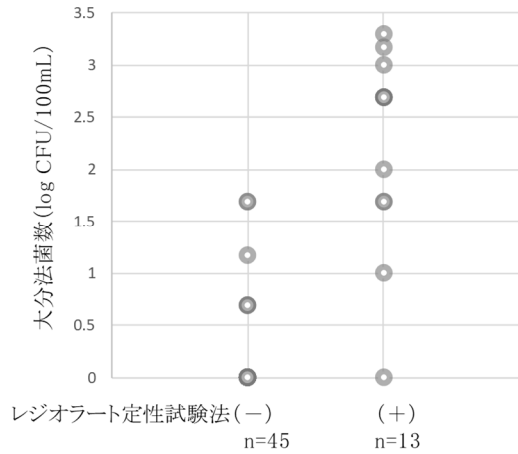


図3a. レジオラート定性試験法(加熱)と大分法菌数

表 4b. レジオラート定性試験法（加熱）と標準法の比較（n=58）

	定性試験法		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
標準法	+	12	4	16
≥10cfu/100mL	-	1	41	42
計		13	45	58

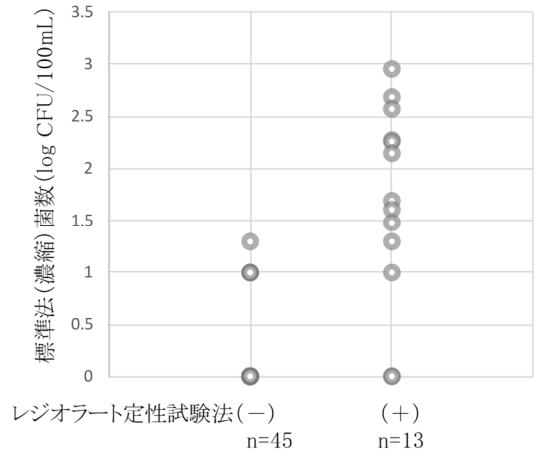


図3b. レジオラート定性試験法(加熱)と標準法(濃縮試料)菌数