

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」

### 総合研究報告書

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、比色系パルサー法の改良

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、溝腰 朗人、神田 由子、成松 浩志  
大分県衛生環境研究センター  
研究協力者 江川 英明 大分県南部保健所  
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  
(所属は研究協力当時)

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。比色系パルサー法は、特殊な機器を必要としないため保健所等監視指導機関等での活用が期待できる。溶菌液調製に用いるセルロース製フィルターの孔径を 0.45 $\mu\text{m}$  に大きくすることでろ過の時間が短縮され、なおかつ孔径 0.22 $\mu\text{m}$  と同等の結果が得られた。

#### 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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>(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。時間を要する培養法等に加えて、

迅速検査法として比色系パルサー法について検討を行った。比色系パルサー法は、レジオネラ属菌特異的 16S rRNA に自己集合体を結合させることで、標的遺伝子を増幅させずに目視で検知する検査法である。測定に特殊な機器を必要としないことから、試験検査機関のみならず監視指導機関等での活用が期待される。平成 30 年度に、保健所においてパルサー法によるレジオネラ属菌検査を実施したところ、平板培養法ではレジオネラ属菌が検出されたが、パルサー法では陰性の結果となった<sup>3)</sup>。そこで濃縮工程を見直し、フィルター孔径を大きくすることで検体濃縮時間の短縮を図った。

#### B. 研究方法

## 1. 試料および調製法

令和元年5月から令和3年11月に搬入された浴槽水および湯口水75施設分144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 $\mu$ 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 $\alpha$ 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倍階段希釈を2段（10倍、100倍）まで行い、各希釈段階（1倍～100倍）の試料200 $\mu$ 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 $\mu$ L、熱処理試料については100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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<sup>4)</sup>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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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144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（令和元年に採水された検体を除く）。

## 4. レジオラート定性試験法

### 4-1. 保存菌株による検討

浴槽水から分離された *Lp* 菌株2種類（血清群1と血清群2）を用いてそれぞれ希釈系列を調製し、QT法及び下記のフラスコを用いた定性試験法を実施し、比較した。具体的には、*Lp* 菌株を BCYE $\alpha$ 寒天培地で2日間培養し、発育した菌を PBS(-)に懸濁、10倍階段希釈し、各希釈段階の菌液0.1mLを、予めレジオラートを溶解させた100mLの滅菌蒸留水に混和した後、上記3.及び下記4-2.の方法で培養した（培養温度は36 $^{\circ}$ C）。平行して、各希釈段階の菌液0.1mLを BCYE $\alpha$ 寒天培地に塗布し、36 $^{\circ}$ Cで7日間培養して菌数を測定した。

### 4-2. 実検体による検討

令和2年に採水された41検体のうち上記3.で10MPN/100mL以上検出された12検体について、それぞれ10mLを、予めレジオラートを溶解させた90mLの滅菌蒸留水に加え、ベントフィルター付きのフラスコ（CELLSTAR フラスコ SC、白 FT キャップ 650mL 滅菌：Greiner Bio-One）に入れて39°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。

4-3. 実検体による熱処理後36°C培養の検討  
非濃縮の58検体（令和3年採水分）について、50°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°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。

#### 5. 比色系パルサー法

非濃縮検体17検体（令和元年8月採水分）について、レジオネラ属菌迅速検査キット（ファスマック）を用いた。検体をろ過したフィルターに直接変性液を加える溶菌法（下記記載の方法①または方法②）で、1検体につき孔径の異なる2種類のフィルター（0.22 $\mu$ m、0.45 $\mu$ m）でそれぞれろ過後に溶菌液を調製し、添付の取扱説明書に従って測定した。即日測定できなかった溶菌液については、測定するまで1~4日間、-30°Cで冷凍保存した。

上記1に示した検体とは別に採水した浴槽水および湯口水4検体について、保健所で環境衛生監視員が測定した。保健所では孔径0.45 $\mu$ mのフィルターを用いた方法①で溶菌液を調製後すぐに-30°Cで冷凍保存し、測定は5日後に実施した。平板培養法によるレジオネラ属菌数の測定は、当所で大分法にて実施した。

方法①：検水100mLを注射筒に入れて直径13mmのメンブランフィルター（孔径0.22 $\mu$ mまたは0.45 $\mu$ m、Merck社、セルロース混合エステル）に押し出または吸引してろ過し、ろ過後のフィルターを2mLチューブに移し、100/30倍に希釈した変性液100 $\mu$ Lを加えてボルテックスミキサーで1分間混合後、フィルターを下にした状態で37°C15分間静置し、その後10 $\mu$ Lの中和液を加えて溶菌液を調製した。測定にはこの溶菌液の全量110 $\mu$ Lを用いた。

方法②：検水200mLを注射筒に入れて直径25mmのメンブランフィルター（孔径0.22 $\mu$ mまたは0.45 $\mu$ m、Merck社、セルロース混合エステル）に押し出または吸引してろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌したピンセットで折り畳んで2mLチューブに移し、100/30倍に希釈した変性液をろ紙が漬かる量の200 $\mu$ L加えてボルテックスミキサーで1分間混合後、フィルターを下にした状態で37°C15分間静置し、その後20 $\mu$ Lの中和液を加えて溶菌液を調製した。測定には、検水100mL分に相当する半量110 $\mu$ Lの溶菌液を用いた。

#### 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

144検体中、大分法では62検体、標準法では56検体からレジオネラ属菌が検出された（表2）。標準法のうち1検体については、濃縮試料を塗抹した培地は夾雑菌が多く発育したためにレジオネラ属菌検出不能であったが、非濃縮検体からはレジオネラ属菌が検出された。この1検体を含む3検体は非濃縮検体のみからレジオネラ属菌が検出され、標準法の濃縮試料からは検出されなかった。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 5~44500、10~31500 (濃縮試料のみでは 10~16640) であった。大分法でのみ検出された 8 検体の菌数は 5 が 6 検体、20 と 50 が各 1 検体で、*Lp* が検出された。標準法でのみ検出された検体は 2 検体で、その菌数はともに 10 であった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R2=0.8541$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は  $R2=0.8579$  であった (図 1)。

## 2. レジオラート/QT 法

144 検体中 44 検体から *Lp* が検出され、そのうち 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 22 検体 (菌数が 10 以上検出された検体に限ると 11 検体)、標準法で 17 検体、平板培養法 (-) QT 法 (+) の結果となった検体は、大分法では 4 検体 (MPN/100mL は 11,23,58,>22726)、標準法では 5 検体 (4 検体は大分法と同一検体、もう 1 検体の MPN/100mL は 10) 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 81.9%、標準法で 84.7%、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  $R2=0.7577$ 、標準法で  $R2=0.7425$  (濃縮試料のみ (検出不能 1 検体除く) で  $R2=0.7626$ ) であった (図 2)。QT 法陽性 44 検体のうち 27 検体の陽性ウエルから採取した培養液からレジオネラ属菌の分離同定を行ったところ、21 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、1342MPN/100mL の 2 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なかった。

## 3. レジオラート定性試験法

### 3-1. 保存菌株による検討

QT 法及び BCYE  $\alpha$  寒天培地で測定した菌量は希釈系列ごとに段階的に減少していき、検出限界未満になった希釈段階において、レジオラート定性試験法でも陰性となった (表 4)。

### 3-2. 実検体による検討

結果を表 5 に示す。12 検体中 6 検体が定性法陽性と判定された。平板培養法及び QT 法でレジオネラ属菌数の多い検体が陽性となる傾向が見られたが、上記 2. で QT 法培養液からレジオネラ属菌が検出されなかった 1 検体 (検体 No.10: 1342MPN/100mL) については、菌数が多いにも関わらず定性法は陰性であった。

### 3-3. 実検体による熱処理後 36°C 培養の検討

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、令和 3 年採水 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 6a、6b 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。

### 4. 比色系パルサー法

17 検体の結果を表 7a、7b、7c に示す。ろ過フィルター孔径を 0.45 $\mu$ m にしても 0.22 $\mu$ m と同等以上の結果となった。平板培養法 (+) パルサー法 (-) の不一致の結果となったのは 2 検体で、*Lp* が分離され、菌

数は5と50であった。なお、この2検体は標準法ではレジオネラ属菌が検出されなかった。

保健所で実施した4検体のうち、平板培養法(+)パルサー法(+)となった1検体の菌数は45、平板培養法(+)でパルサー法(-)となった1検体の菌数は25で、ともに*Lp*が検出された(表8)。なお、これら2検体は、過去の検討で共に菌数85のレジオネラ属菌が検出されたがパルサー法(-)であった2検体<sup>3)</sup>と同一施設の検体であった。

#### D. 考察

平板培養法について、使用する培地枚数は1種類につき標準法で3枚、大分法で6枚である。単純に培地枚数の多い方が検出確率は上がるが、枚数の少ない標準法で大分法と同等の結果が得られた。大分法または標準法の一法のみでレジオネラ属菌が検出された検体もあったが、5cfu/100mLの検体を含むいずれも菌数の少ない検体であったため、ばらつきが生じたと考えられる。指針<sup>1)</sup>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。ただし、標準法において濃縮試料では検出できない検体があったことから、濃縮試料のみでなく非濃縮検体についても併せて検査を実施することが重要と考える。また、今回非濃縮検体の塗抹量を100 $\mu$ Lでなく200 $\mu$ 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3検体から分離されたレジオネラ属菌は、いずれも平板上に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 $\mu$ Lよりも200 $\mu$ Lの方が望ましいと考える。

QT法について144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、強い相関が見られた。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、ヒトから検出されるレジオネラ属菌のほとんどを占め公衆衛生上重要な菌種である*Lp*<sup>5)</sup>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。予試験において、空気の量が少ないと検出できないことが示唆された(データ非掲載)ため、培養容器としてベントフィルターが付いた大きめのフラスコ(容量650mL)を用いたところ、保存菌株による検討ではフラスコ内に入った*Lp*菌数が数個であっても検出可能という結果が得られた一方、実検体を用いた場合には一桁多い菌数が必要であった。保存菌株を用いた場合、実検体と同じ39 $^{\circ}$ C培養ではQT法で発育抑制が見られたため36 $^{\circ}$ C培養としたが、その温度差が検出可能菌量の差となった可能性が考えられた。また、大きめのフラスコは孵卵器内で幅をとり、扱いづらかった。そこで、検体量は減らさずにレジオラートを含む全体の液量を半分にし、ベントフィルター付きフラスコ容量を小さく(容量250mL)した上で、実検体においても36 $^{\circ}$ C培養としたが、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 $^{\circ}$ C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。培養温度を下げても、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。一方で 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ったと考えられる。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。

比色系パルサー法については、過去に保健所で実施した結果<sup>3)</sup>から、改善のために濃縮工程の時間短縮を図った。フィルターの孔径を 0.45 $\mu\text{m}$  に大きくしたところ、ろ過の時間が 1 検体当たり約 20 分から約 5 分に短縮され、なおかつ孔径 0.22 $\mu\text{m}$  フィルターと同等の結果が得られた。第 4 版レジオネラ症防止指針 (公益財団法人日本建築衛生管理教育センター発行) によるとレジオネラ属菌の菌体サイズは 0.3～0.9 $\times$ 2～20 $\mu\text{m}$  である。培養法のろ過濃縮工程においては、洗い出し操作で菌がフィルターから剥がれやすいように均一な表示径の円筒状孔を持つポリカーボネート製メンブランフィルターを用いるので、レジオネラ属菌が 0.45 $\mu\text{m}$  の孔を通過してしまう可能性がある。しかし、パルサー法に用いたセルロース製フィルターは網目構造のため、膜の内部に菌が入り込んで残りやすく、フィルターごと溶菌処理することでロスが少なかったと考えられる。保健所で実施したパルサー法について、過去に孔径 0.22 $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて (-) であった施設の検体が、今回孔径 0.45 $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて (+) となった。今回はレジオネラ菌数が少ないにも関わらず (+) となったことからパルサー法に使用するフィルターの孔径は 0.45 $\mu\text{m}$  がよいと言える。

## E. 結論

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標準法は、定期的な水質検査に適した方法である。検査においては、濃縮試料だけでなく、非濃縮検体の検査実施も望まれる。

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、簡便な手技で *L.pneumophila* の検査ができ、平板培養法と同等の結果を得られた。日常の衛生管理に有用な検査法である。

一方、機器の揃った検査機関以外でもレジオネラ属菌の検査が可能になることは公衆浴場等の衛生管理の一助となる。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。また、迅速検査法として、検体をろ過した孔径 0.45 $\mu\text{m}$  のセルロース製フィルターに直接変性液を加える溶菌法を用いたパルサー法が活用できる可能性がある。

## 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) 佐々木麻里 他: 斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査および実検体を用いた LAMP 法と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)「公衆衛生等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 30 年度総括・分担研究報告書: 23-30
- 4) 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
- 5) Junko Amemura-Maekawa et al.: *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan

between 2008 and 2016. Appl Environ Microbiol 84:e00721-18 (2018)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

F. 研究発表  
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 200 $\mu$ L	5cfu/100mL	6枚
		未処理	1倍、10倍、100倍	各 200 $\mu$ L	5cfu/100mL	
標準法	濃縮試料	熱処理	1倍	100 $\mu$ L	10cfu/100mL	3枚
		酸処理	1倍	200 $\mu$ L	10cfu/100mL	
	非濃縮検体	1倍	200 $\mu$ L*	500cfu/100mL		

表 2. 標準法と大分法の比較 (n=144)

\*通知に記載されている塗抹量は「100 $\mu$ L」

	標準法		計	
	$\geq 10$ cfu/100mL			
	+	-		
大分法	+	54	8	62
$\geq 5$ cfu/100mL	-	4	78	82
計		58	86	144

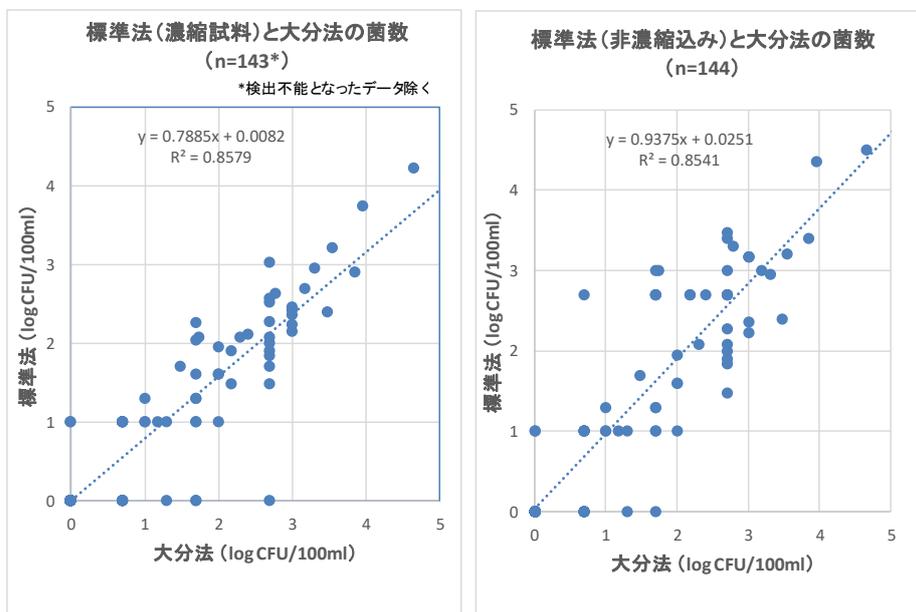


図1. 標準法と大分法の相関

表 3a. レジオラート/QT 法と大分法の比較 (n=144) 表 3b. レジオラート/QT と標準法の比較 (n=144)

	レジオラート			計
	≥10cfu/100mL		+	
	+	-		
大分法	+	40	22	62
≥5cfu/100mL	-	4	78	82
計		44	100	144

	レジオラート			計
	≥10cfu/100mL		+	
	+	-		
標準法	+	39	17	56
≥10cfu/100mL	-	5	83	88
計		44	100	144

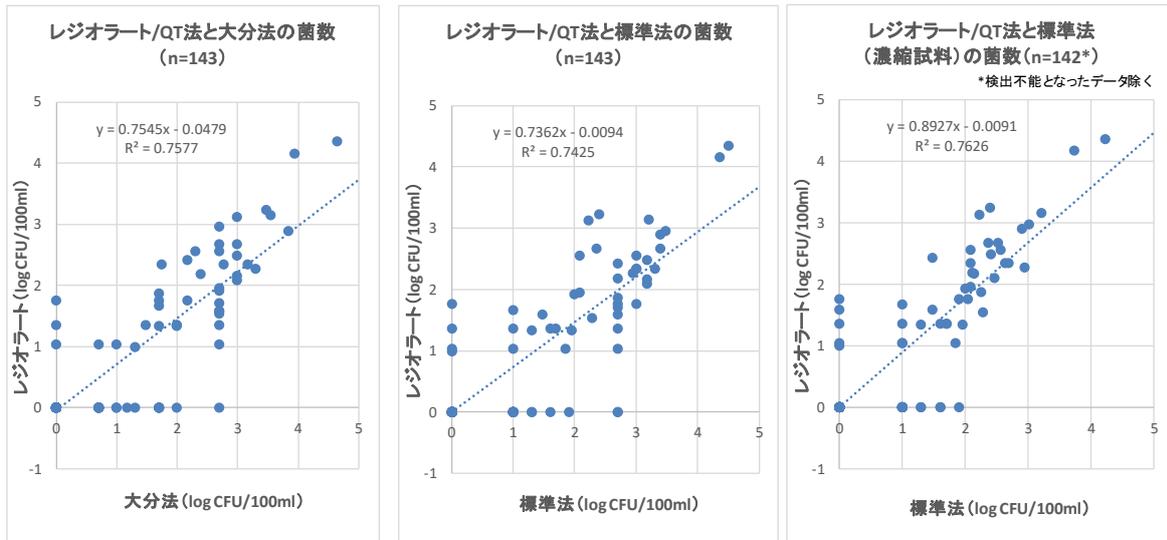


図2. レジオラート/QT法と平板培養法の相関(測定上限を超えた1検体除く)

表 4. 保存菌株を用いたレジオラート定性試験法の結果

菌株	希釈系列	レジオラート 定性試験法	レジオラート/QT 法 MPN/菌液 0.1mL	菌数 (BCYE α) CFU/菌液 0.1mL
菌株 1 <i>Lp</i> 血清群 1	3	+ (茶色&濁り)	>2272.6	試験せず
	4	+ (茶色&濁り)	>2272.6	>300
	5	+ (茶色&濁り)	230.7	290
	6	+ (茶色&濁り)	22.3	30
	7	+ (茶色&濁り)	2.3	2
	8	-	<1.0	0
菌株 2 <i>Lp</i> 血清群 2	3	+ (濁りのみ)	>2272.6	試験せず
	4	+ (濁りのみ)	2272.6	>300
	5	+ (濁りのみ)	134.2	225
	6	+ (濁りのみ)	10.6	28
	7	+ (濁りのみ)	1.1	4
	8	-	<1.0	0
	9	-	1.1	試験せず

注) + : 陽性 - : 陰性 *Lp* : *L.pneumophila*

表 5. 実検体を用いたレジオラート定性試験法の結果

検体	レジオラート定性試験法	レジオラート/QT 法	平板培養法 (標準法濃縮試料)	
	(検水量 10mL)	MPN/100mL	CFU/100mL	検出菌種
1	+ (濁りのみ)	223	430	<i>Lp</i> 及びそれ以外
2	+ (濁りのみ)	474	230	<i>Lp</i> 及びそれ以外
3	-	23	40	<i>Lp</i> 及びそれ以外
4	-	90	120	<i>Lp</i>
5	-	23	50	<i>Lp</i> 及びそれ以外
6	+ (茶色のみ)	11	10	<i>Lp</i>
7	+ (濁りのみ)	223	120	<i>Lp</i> 及びそれ以外
8	+ (濁りのみ)	361	120	<i>Lp</i> 及びそれ以外
9	-	11	70	<i>Lp</i> 及びそれ以外
10	-	1342	170	<i>Lp</i>
11	-	23	10	<i>Lp</i> 及びそれ以外
12	+ (濁りのみ)	22	90	<i>Lp</i>
陰性対照	-	<10		試験せず

注) + : 陽性 - : 陰性 *Lp* : *L.pneumophila*

表 6a. 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
	$\geq 10\text{cfu}/100\text{mL}$		計	
	+	-		
大分法	+	12	6	18
$\geq 5\text{cfu}/100\text{mL}$	-	1	39	40
計		13	45	58

表 6b. 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
	$\geq 10\text{cfu}/100\text{mL}$		計	
	+	-		
標準法	+	12	4	16
$\geq 10\text{cfu}/100\text{mL}$	-	1	41	42
計		13	45	58

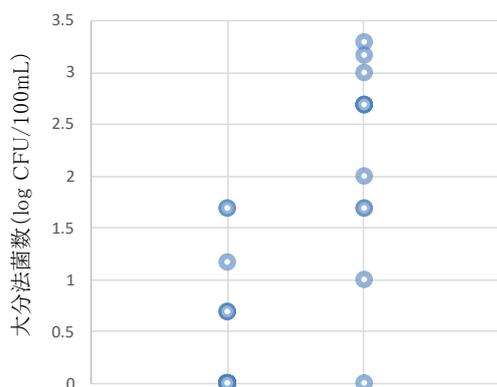


図3a. レジオラート定性試験法 (加熱) と大分法菌数

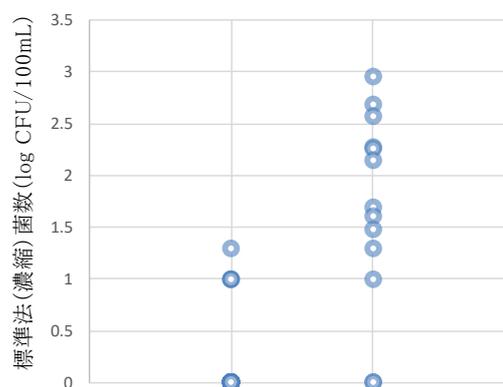


図3b. レジオラート定性試験法 (加熱) と標準法 (濃縮試料) 菌数

表 7a. パルサー法（孔径 0.22 $\mu\text{m}$ ）と  
平板培養法の比較（n=17）

	パルサー			計
	0.22 $\mu\text{m}$			
	+	-		
平板培養	+	10	2	12
法*	-	2	3	5
計		12	5	17

\*平板培養法は大分法

表 7b. パルサー法（孔径 0.45 $\mu\text{m}$ ）と  
平板培養法の比較（n=17）

	パルサー			計
	0.45 $\mu\text{m}$			
	+	-		
平板培養	+	10	2	12
法*	-	4	1	5
計		14	3	17

\*平板培養法は大分法

表 7c. パルサー法フィルター孔径の比較（n=17）

	0.45 $\mu\text{m}$		計	
	+	-		
	0.22 $\mu\text{m}$	+		12
	-	2	3	5
計		14	3	17

表 8. 保健所実施パルサー法結果

No.	採水年月	種類	泉質	培養結果 菌数(/100mL)	パルサー法 結果	
1	2020年2月	循環式	浴槽水	井水	5cfu 未満	(-)
2	2020年2月	循環式	湯口水	井水	5cfu 未満	(+)
3	2020年2月	循環式	浴槽水	水道水	25cfu	(-)
4	2020年2月	循環式	湯口水	水道水	45cfu	(+)