

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究(長崎県の調査)

浦山 みどり、田栗 利紹

Standardization of Environmental Monitoring Techniques for *Legionella* spp. and Sanitation Management in Bath Water

Midori URAYAMA, Toshitsugu TAGURI

Key words: *Legionella* spp., LC EMA-qPCR¹⁾, PALSAR

キーワード: レジオネラ属菌, LC EMA-qPCR 法, PALSAR 法

はじめに

レジオネラ属菌の検査は一般的に平板培養法が用いられているが、結果が判明するまでに7~10日を要するため、レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法の開発が進められている。

今回、厚生労働科学研究のレジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究(H25-健危-一般-009)の研究協力として、2015年度は平板培養法、LC EMA-qPCR(Liquid culture ethidium monoazide quantitative polymerase chain reaction)法およびPALSAR法について、浴槽水等の実試料を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行ったので報告する。

調査方法

1 調査対象

2015年度に浴用施設から59検体の試料を採取し、検査法の検討に用いた(表1)。検体の内訳は、浴槽水が48検体、シャワー水が2検体、その他が9検体であった。浴槽水の泉質は、温泉が21検体、白湯が27検体であった。

2 検査・解析方法

ATP値について、検水をろ過濃縮法で100倍に濃縮した濃縮液に、ルシパックワイドの専用綿棒を浸して約100 μ Lを吸い取り、携帯用簡易測定器を用いて検水10mLあたりのRLU値を測定した。

平板培養法の前処理は、熱処理(50、20分間)をした後、酸処理(0.2M HCL・KCL buffer, pH2.2を等量添加、室温5分間)をしたものが25検体、

その他は酸処理のみ実施した。

LC EMA-qPCR法は、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR(7730、タカラバイオ)、*Legionella* LC Medium base(9016、タカラバイオ)、Lysis Buffer for *Legionella*(9181、タカラバイオ)、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(CY240、タカラバイオ)を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。ATP値が5,000 RLU/10 mL以上の検体は、1,000倍濃縮液及び100倍濃縮液の両方について検査を実施し、定量値の高い値を採用した。リアルタイムPCRの結果は、添付の取扱説明書に記載された方法で、コピー数からCFUに換算した。

PALSAR法は、100倍濃縮液1mLを遠心後、上清を除き、添付の取扱説明書に従い実施した。

結果及び考察

1 平板培養法による結果

59検体について検査した結果、27検体から10 CFU/100 mL以上のレジオネラ属菌が検出された(表2)。菌数別に見ると、10~99 CFU/100 mLが17検体、100~999 CFU/100 mLは0検体、1,000 CFU/100 mL以上が10検体であった。最も多かった検体では22,800 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出された。血清型別に見ると、*L. pneumophila* 血清群(SG)5が4検体、*L. pneumophila* SG1が3検体、*L. pneumophila* SG6が1検体であり、その他の検体は型別不能であった(表3)。

2 LC EMA-qPCR法による結果

(1) 平板培養法との比較

平板培養法による 10 CFU/100 mL 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 mL 相当を用いて解析を行った²⁾。LC EMA-qPCR 法を使用した 59 検体について、平板培養法の結果と比較した(表 4)。平板培養法では 27/59 検体の検体から 10 CFU/100 mL 以上のレジオネラ属菌が検出された。LC EMA-qPCR 法では 43/59 検体の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。LC EMA-qPCR 法の平板培養法に対する感度は 100% (27/27 検体)、特異度は 50% (16/32 検体)であった。LC EMA-qPCR 法と平板培養法との菌数(定量値)の相関は、 $R^2 = 0.7788$ であった(図 1)

(2) LC EMA-qPCR 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となり、LC EMA-qPCR 法で陰性となった検体は 0 検体であった。

(3) LC EMA-qPCR 法における偽陽性検体

平板培養法で陰性となり、LC EMA-qPCR 法で陽性となった検体は 16/32 検体であった。これらの LC EMA-qPCR 法の定量値は、1~9 CFU/100 mL 相当が 4 検体、10~99 CFU/100 mL 相当が 7 検体、100 CFU/100 mL 相当以上は 1 検体であった。検出限界以下(5 CFU/100 mL)ではあるが、レジオネラ属菌を検出した検体は 5 検体であった。

3 PALSAR 法による結果

(1) 平板培養法との比較

PALSAR 法を実施した 30/59 検体について、平板培養法の結果と比較した(表 5)。平板培養法では 9/30 検体の検体から 10 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出された。PALSAR 法では 12/30 検体の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 33.3% (3/9 検体)、特異度は 57.1% (12/21 検体)であった。

(2) PALSAR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性となったが、PALSAR 法で陰性となった 6 検体すべてが平板培養法での菌数が 10~99 CFU/100 mL であった。

考 察

平板培養法と 2 種類の迅速検査キット(LC EMA-qPCR 法、PALSAR 法)をについて、比較および評価を行った。

LC EMA-qPCR 法について、平板培養法による 10 CFU/100 mL 以上の検体を検出するカットオフ値を 1

CFU/100 mL 相当として解析を行った結果、平板培養法に対する感度は 100%、特異度は 50%、菌数(定量値)の比較は $R^2 = 0.7788$ と、特異度は低かったが高い相関を示し、全体として平板培養法の菌数を反映していた。

LC EMA-qPCR 法で偽陽性となった 16/32 検体について、5 検体は検出限界以下(5 CFU/100 mL)ではあるが、レジオネラ属菌が検出された。このことから、その他の検体についても、検出限界以下の低濃度のレジオネラ属菌が存在していた可能性や、viable but non-culturable 状態のレジオネラ属菌が存在していた可能性が考えられる。

PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 33.3%、特異度は 57.1% であり、LC EMA-qPCR 法と比較し、特異度は同等であったが、感度が低かった。PALSAR 法で偽陰性となった 6 検体は、平板培養法での菌数はすべて 50 CFU/100 mL 未満であった。PALSAR 法は RNA を標的とする迅速検査法であり、RNA は DNA と比較し分解されやすい性質であるため、濃縮検体の保存状況が影響していた可能性が考えられる。また、PALSAR 法の検水量は 100 mL/reaction であるため、平板培養法の 500 mL/reaction に比べ、感度が低くなっている可能性も考えられる。

今回の結果から、LC EMA-qPCR 法(カットオフ値 1 CFU/100 mL 相当)は、平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。一方で PALSAR 法は平板培養法に対する感度が低かった。濃縮検体の保存が RNA の検出に影響するかどうか、また、1 反応あたりの検水量を多くするかによって、感度が向上するか検討する必要があると考えられた。

謝 辞

本調査を遂行するにあたり、情報を提供いただいた研究代表者である倉文明先生(国立感染症研究所 ウイルス第二部/細菌第一部 主任研究員)をはじめ、富山県衛生研究所、研究分担者、研究協力者の関係各位に感謝する。

参 考 文 献

1) 金谷潤一 他、Liquid Culture EMA qPCR におけるレジオネラ生菌迅速検査法の改良と評価、レジオネラ検査の標準化及び消毒等にかかる公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究、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 平成

26年度 総括・分担研究報告書、63-76

2) 金谷潤一 他、レジオネラ属菌迅速検査法の評価、
レジオネラ検査の標準化及び消毒等にかかる公衆浴

場等における衛生管理手法に関する研究、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 平成27年度 総括・分担研究報告書、61-69

表1. 検体内訳

		検体数
浴槽水	温泉	21
	白湯	27
シャワー水		2
その他		9
計		59

表2. 平板培養法による検出率

菌数 (CFU/100 mL)	検出検体数	(%)
10未満	32	54.2
10-99	17	28.8
100-999	0	0.0
1000以上	10	17.0
計	59	100

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L.pneumophila</i>	
SG5	4
SG1	2
SG6	1
UT	20

表4. 平板培養法とLC EMA-qPCR法との比較

	平板培養法		計
	10	< 10	
LC EMA-qPCR	27	16	43
(カットオフ値1 CFU/100 mL相当)	0	16	16
計	27	32	59

感度 100%、特異度 50%

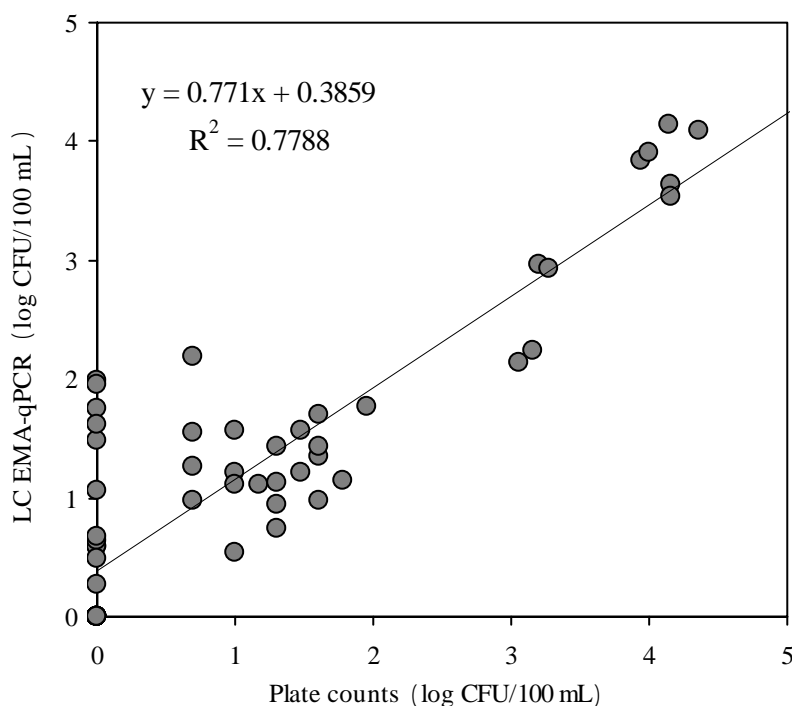


図1 平板培養法とLC EMA-qPCR法との相関

表5. 平板培養法とPALSAR法との比較

		平板培養法		計
		10	< 10	
PALSAR法	陽性	3	9	12
	陰性	6	12	18
計		9	21	30

感度 33.3%、特異度 57.1%