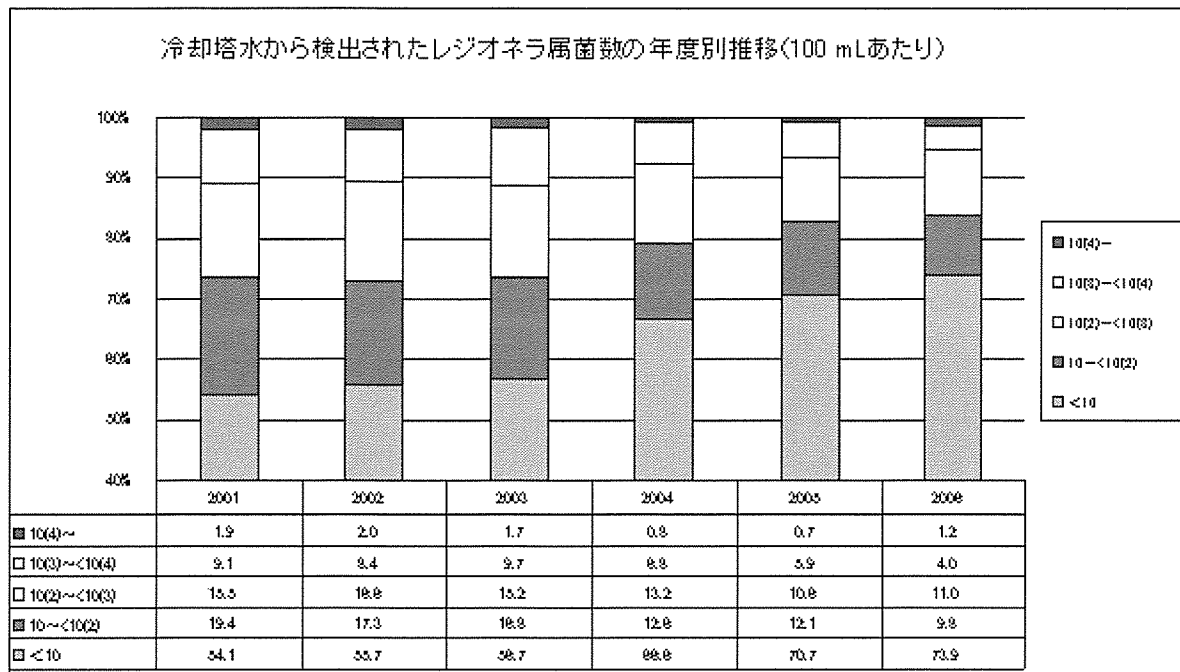


図 7



循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

浴槽水からの抗酸菌の検出状況と検出株の同定

主任研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部
分担研究者 山崎 利雄 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター病原微生物部
杉山 寛治 静岡県環境衛生科学研究所
研究協力者 大畑 克彦 静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨：

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化を検討する上に、浴槽水中から分離される抗酸菌の調査を行った。その結果、浴槽水 55 検体中、2 検体から抗酸菌 5 株が分離された。分離菌は *Mycobacterium avium* 4 株、*M. fortuitum* 1 株と同定された。いずれも、ヒトでの感染が知られているものであった。また、ろ過槽等のバイオフィルム中からは *M. gordonae* 1 株、*M. avium* 4 株、*M. goodii* 9 株が分離された。なお、結核菌 (*M. tuberculosis*) は検出されなかった。

A. 研究目的

抗酸菌 (*Mycobacterium*) は結核菌を除き自然界に広く分布している。抗酸菌の中には細胞性免疫機能の低下している者に感染して発病させるいわゆる日和見感染の原因菌が知られている。本菌は健常人への感染・発症は稀と考えられており、その意味では抗酸菌が分離されたからといって即臨床的な問題に発展するとは限らない。ただ、これまでには家庭用の 24 時間風呂から分離された抗酸菌が原因とされた例も存在することから、循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化を検討する上において浴槽水中にいかなる抗酸菌が存在するかを明らかにすることは重要と考える。そこで、循環式浴槽水より抗酸菌の分離を行い、分離された抗酸菌の同定を行い、抗酸菌の汚染状況を調査し、適切な衛生管理手法確立のための一助とすることを目的とし

た。

B. 研究材料と研究方法

1. 菌の分離と増菌培養

平成 18 年 5 月～7 月において、関東地方のホテル、旅館、又は公衆浴場等営業施設の浴槽水 45 検体および社会福祉施設の浴槽水 10 検体 計 55 検体について、抗酸菌およびレジオネラ属菌の汚染状況を調査し、浴槽の形態 (①連日使用循環式浴槽 ②毎日完全換水循環式浴槽 ③毎日完全換水式浴槽 ④利用者毎完全換水式浴槽) または浴槽水中の残留塩素濃度との関連を調べた。なお、今回の調査では④の利用者毎完全換水式浴槽に該当する検体は含まれていなかった。

抗酸菌の分離培養は、採取された浴槽水 200ml を 9,000rpm、30 分間遠心し、得られた沈渣を 2ml の滅菌精製水に再懸濁した。この懸濁液

1ml に等量の 4%NaOH を加えて室温で 20 分間処理し (アルカリ処理)、このアルカリ処理液 0.1ml ずつを 2-3 本の 2%小川培地に接種し 36±1°C で培養し、コロニーの出現状況を毎週観察した。コロニー陰性の場合には 8 週間まで培養した。検出された菌を、チール・ネルゼン染色法で抗酸菌である事を確認後、滅菌精製水で微濁浮遊液を 10 倍希釈系列で希釈し、それぞれの 0.1ml ずつを Middlebrook 7H10 寒天培地に接種し、5%CO₂ フランキ内で 36±1°C で 2-3 週間培養後、単コロニーを釣菌し、1%小川培地にて増菌した。

レジオネラ属菌の分離培養は、検体 400ml を 9,000rpm、30 分間遠心後、上清を捨て、沈渣を滅菌 PBS により懸濁して 100 倍濃縮液を作製した (冷却遠心濃縮法)。そして、濃縮液を 50°C、20 分間加熱処理後、その 100 μl を GVPC 寒天培地 (ビオメリュー) に塗布し、37°C 7 日間、培養した。本菌を疑う集落について、BCYE α 培地 (日水) および SCD 寒天培地 (栄研) による鑑別培養後、ラテックスキット (オキソイド) を用いてスクリーニングテストを行い、レジオネラ免疫血清 (デンカ生研) を用いたスライド凝集反応により、血清群を決定した。

2. 抗酸菌の同定試験

生化学的検査法による同定試験は、極東抗酸菌鑑別セット (極東製薬工業) を用いた。試験操作法、観察判定日、観察判定法は、使用説明書にしたがった。抗酸菌鑑別セット使用による同定試験は、発育速度、集落性状、着色、光発色性試験、p-ニトロ安息香酸 (PNB) 500 μg/ml 含有培地上の発育、エタンブトール (EB) 5 μg/ml 含有培地上の発育、ピクリン酸 (PA) 0.2%含有培地上の発育、p-アミノサリチル酸 (PAS) 2mg/ml 含有培地の黒変、塩酸ヒド

ロキシルアミン (HA) 500 μg/ml 含有培地上の発育、硝酸塩還元試験、Tween80 水解試験である。さらに、アリルスルファターゼ試験を追加した。これらの生化学的検査法その他、主な抗酸菌 18 菌種の同定が可能な DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) 試験キット (極東製薬工業) を用いた。DDH 試験法の操作は、使用説明書に従った。

3. 分離抗酸菌の 16S-rDNA のシーケンス

生化学的検査法や DDH 試験法において同定不能と判定された菌株および同定結果を再確認するために、分離菌 1 白金耳量を TE-緩衝液 100 μl に懸濁し、100°C30 分間加熱して DNA を抽出し、16S-rRNA を標的としたプライマー 16Ss (5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') と 16Sas (5' TGCACACAGGCCACAAGGGA 3') を用いて 94°C1 分間のプレヒーティングの後、94°C30 秒、60°C30 秒、72°C1 分の条件で 30 サイクルの PCR を行い、PCR プロダクトを High pure PCR product Purification kit (ベーリンガーマンハイム社) を用いて精製後、Dye terminator cycle sequencing 法にて DNA を標識し、スピнкаラム法により未反応の蛍光色素を取り除いた後、ABI310 シークエンサーにてシーケンスをおこなった。得られた結果を Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDM) あるいは、NCBI の nucleotide-nucleotide BLAST のデータベースと比較して、菌種の決定を行った。

当該研究の検査材料にはヒトや実験動物由来の試料は含まれていない。また、分離施設は特定できないようデーターを整理したので、倫理面の配慮はなされている。

C. 研究結果

1. 抗酸菌の汚染状況

浴槽水 55 検体中 2 検体 (3.6%) から抗酸菌が分離され、その内訳を表 1 に示した。営業施設における浴槽水 1 検体、社会福祉施設の浴槽水 1 検体であった。浴槽形態別の抗酸菌検出状況は、連日使用循環式浴槽において 39 検体中 2 検体 (5.1%) が検出されたが、毎日完全換水循環式浴槽 12 検体と、毎日完全換水式浴槽 4 検体から抗酸菌は検出されなかった (表 1)。なお、この 2 検体からレジオネラ属菌は検出されなかった (表 2)。

2. レジオネラ属菌の検出状況

浴槽水 55 検体中 4 検体 (7.3%) からレジオネラ属菌が分離され、その内訳は営業施設における浴槽水 3 検体、社会福祉施設の浴槽水 1 検体であった (表 1)。また各々の汚染菌量は $10 \sim < 10^3$ オーダー CFU/100ml であり (表 3)、分離菌株の血清型は *Legionella pneumophila* SG1、SG3、SG5、SG6、SG9、UT および *L. spp* であった。そして、その内訳は *L. p* SG1 が 2 株、*L. p* SG3、SG5、SG6、UT および *L. spp* が各々 1 株であった (表 3)。

3. 浴槽形態別レジオネラ属菌の検出状況

浴槽水 55 検体における浴槽形態別のレジオネラ属菌検出状況は、連日使用循環式浴槽において 39 検体中 3 検体 (7.7%) および毎日完全換水循環式浴槽において 12 検体中 1 検体 (8.3%) が各々陽性であった。しかし、毎日完全換水式浴槽 4 検体から本菌は検出されなかった (表 1)。

4. 浴槽水の残留塩素濃度別の抗酸菌検出状況

抗酸菌が検出された浴槽水 2 検体における残留塩素濃度は、1 検体が残塩 0.2ppm 未満の浴槽水で、1 検体が残塩 0.4ppm 未満の浴槽水で

あった (表 4)。

5. 浴槽水の残留塩素濃度別のレジオネラ属菌検出状況

レジオネラ属菌が検出された浴槽水 4 検体における残留塩素濃度は、4 検体とも残塩 0.2ppm 未満の浴槽水であった (表 4)。

6. 抗酸菌の同定

浴槽水 55 検体中 2 検体 (3.6%) から抗酸菌 5 株が分離され、それぞれ増菌培養後同定試験を行った。抗酸菌 5 株全てが光発色性を持たず、PNB 培地に増殖したため、結核菌群 (*M. tuberculosis* complex) を否定した。この抗酸菌 5 株の生化学的検査法と DDH 法による同定結果を表 5 に示した。生化学的検査法では、*Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex (MAC) と判定された 4 菌株は、DDH 法では全て *M. avium* と判定された。迅速発育菌 1 株は、生化学的検査法と DDH 法の両方で、*M. fortuitum* と同定された。これらの同定結果を 16S-rRNA を標的とした PCR 産物の DNA シークエンスによって確認した。浴槽水由来抗酸菌 5 株の同定菌種内訳を表 6 に示した。*M. avium* 4 株、*M. fortuitum* 1 株であった。更に、浴場より採取された濾材についても調査したところ、濾材 22 検体中 6 検体から抗酸菌 14 株が検出され、これらについても同定を行った。濾材由来の抗酸菌 14 株も全てが光発色性を持たず、PNB 培地に増殖したため、結核菌群 (*M. tuberculosis* complex) を否定した。この抗酸菌 14 株の同定結果を表 7 に示した。生化学的検査法では、*M. gordonae* 1 株が同定され、この株は、DDH 法とシークエンス法で *M. gordonae* と確認された。生化学的検査法では、MAC と判定された 4 菌株は、DDH 法では全て *M. avium* と判定された。迅速発育菌 9 株は、生化学的検査法と DDH 法の両方で、同定不能であ

ったが、16S-rRNA を標的とした PCR 産物の DNA シークエンスによって、人には病原性の無いと言われている、*M. goodii* と同定された。濾材由来抗酸菌 5 株の同定菌種内訳を表 8 に示した。*M. gordonae* 1 株、*M. avium* 4 株、*M. goodii* 9 株であった。

D. 考察

当該年度における抗酸菌およびレジオネラ属菌の検出率は抗酸菌が 55 試料中 2 件 (3.6%)、レジオネラ属菌が 4 件 (7.3%) であった。過去 2 年間の検査結果と比較すると、両者ともかなり低いものとなった (抗酸菌検出率：平成 16 年度 23.3%、平成 17 年度 13.2%；レジオネラ属菌検出率：平成 16 年度 16.7%、平成 17 年度 19.1%)。また抗酸菌とレジオネラ属菌が同時に検出された浴槽水はなく、さらに掛け流し式である毎日完全換水式浴槽からの抗酸菌検出は、過去 2 年と同様に認められなかった。これは、本形態の浴槽は病原微生物増殖の温床となりうるろ過装置やバイオフィームが形成されやすい循環式の配管構造を持たず、さらに毎日の換水により有機物の蓄積を阻止しているためと考えられた。

ちなみに、*M. tuberculosis* の感染による結核患者の新規登録数は平成 17 年度が 28,319 人で、人口 10 万人当たりの罹患率が 22.2 であった。結核による死亡者数は 2,295 人で人口 10 万人当たりの死亡率は 1.8 で、わが国では死亡原因の 25 位とされる。今回の浴槽水調査でも昨年同様に、結核菌 (*M. tuberculosis*) は検出されなかった。また、ろ材から結核菌が検出された例もなく、浴槽水を介した結核感染の可能性はほとんどないものと考えられる。

しかし、今年度の調査では浴槽水から *M. avium* 4 株、*M. fortuitum* 1 株が分離され、ろ材からは、*M. gordonae* 1 株、*M. avium* 4 株、*M. goodii* 9 株が分離された。非結核性抗酸菌は自然界に広く分布しているが、ほとんどが日和見感染菌である。したがって、菌が分離されたからといって、即病気を起こす原因とは言いきれない。しかし、かつて、家庭用の 24 時間風呂の浴槽水から感染したと考えられる *M. avium* による皮膚感染症例が報告されているため、浴槽内や配管の清掃や消毒、或は、フィルターや濾材のこまめな取り換えなどにより、抗酸菌症の原因となりうる菌を排除することは重要であろう。

E. 結論

健康人にとっては、ほとんどが日和見感染菌である抗酸菌は、自然界に広く分布している。今回の循環式浴槽の浴用水 55 検体から抗酸菌 5 株が分離された。ヒトに病原性のある *M. avium* 4 株、*M. fortuitum* 1 株が同定された。また、ろ過材からは、ヒトに病原性のある *M. avium* 4 株、*M. gordonae* 1 株が同定され、非結核性抗酸菌症の感染源となり得るので、循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化を検討することが必須である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 山崎利雄、入浴施設の浴槽水における抗酸菌の検出、第 81 回日本結核病学会総会、2006、4 月、仙台
2. 山崎利雄、東日本地区の温泉浴槽水からの抗酸菌の分離状況、第 35 回 結核・非定

なし

表1 検体別抗酸菌およびレジオネラ属菌検出状況 (%)

	施設	連日使用 循環式浴槽	毎日 完全換水 循環式浴槽	毎日 完全換水式 浴槽	利用者毎 完全換水式 浴槽	吐出湯	貯湯槽	計
抗酸菌 (+)	営業	1/31 (3.2)	0/11 (0)	0/3 (0)	0/0 (0)	—	—	1/45 (2.2)
	社会福祉	1/8 (12.5)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/0 (0)	—	—	1/10 (10)
	計	2/39 (5.1)	0/12 (0)	0/4 (0)	0/0 (0)	—	—	2/55 (3.6)
レジオネ ラ (+)	営業	2/31 (6.5)	1/11 (9.1)	0/3 (0)	0/0 (0)	—	—	3/45 (6.7)
	社会福祉	1/8 (12.5)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/0 (0)	—	—	1/10 (10)
	計	3/39 (7.7)	1/12 (8.3)	0/4 (0)	0/0 (0)	—	—	4/55 (7.3)

表2 (1) 営業施設における浴槽水の抗酸菌および
レジオネラ属菌検出状況 (%)

	レジオネラ (+)	レジオネラ (-)	計
抗酸菌 (+)	0 (0)	1 (2.2)	1
抗酸菌 (-)	3 (6.7)	41 (91.1)	44
計	3	42	45

表2 (2) 社会福祉施設の浴槽水の抗酸菌および
レジオネラ属菌検出状況 (%)

	レジオネラ (+)	レジオネラ (-)	計
抗酸菌 (+)	0 (0)	1 (10)	1
抗酸菌 (-)	1 (10)	8 (80)	9
計	1	9	10

表3 菌数別レジオネラ属菌検出状況 (%)

		10 ⁻ < 10 ² CFU/100ml	10 ² ~ < 10 ³ CFU/100ml	10 ³ ≤ CFU/100ml	計
レジオネラ (+)	(1)	0	3*	0	3
	(2)	1**	0	0	1
	計	1	3	0	4

*①100 CFU、L. spp, *②710 CFU、L. p SG1, 3, 6, UT, *③940 CFU、L. p SG1

**①30 CFU、L. p SG5

表4 残留塩素濃度別抗酸菌およびレジオネラ属菌検出状況 (%)

		<0.2ppm	0.2~0.4ppm	0.4ppm<	未検査 又は不明	計
抗酸菌 (+)	(1)	1	0	0	0	1
	(2)	0	0	1*	0	1
	計	1	0	1	0	2
レジオネラ (+)	(1)	3	0	0	0	3
	(2)	1	0	0	0	1
	計	4	0	0	0	4

*1.0ppm (30 CFU、*L.p* SG5)

表5 浴槽水由来抗酸菌の同定試験結果

菌株 No.	発育 速度	集落性状		生化学的検査法	同定結果	
		型	色		DDH*法	シーケンス法
K-64	Rapid	Rough	クリーム色	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
K-65	Slow	Smooth	灰白色	MAC**	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
K-66	Slow	Smooth	灰白色	MAC**	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
K-67	Slow	Smooth	灰白色	MAC**	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
K-68	Slow	Smooth	灰白色	MAC**	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>

*DDH: DNA-DNA Hybridization法キット (極東製薬工業) による同定結果

MAC**: *M. avium*-*M. intracellulare* complex

表6 浴槽水由来抗酸菌5株の菌種の内訳

菌種名	株数
<i>M. avium</i>	4
<i>M. fortuitum</i>	1

表7 濾材由来抗酸菌の同定試験結果

菌株 No.	発育 速度	集落性状		同定結果		
		型	色	生化学的検査法	DDH*法	シーケンス法
K-50	Rapid	Smooth	クリーム色	Group IV	判定不能(⑦⑩)	<i>M. goodii</i>
K-51	Rapid	Smooth	クリーム色	Group IV	判定不能(⑰⑩)	<i>M. goodii</i>
K-52	Rapid	Smooth	クリーム色	Group IV	判定不能(⑮⑱)	<i>M. goodii</i>
K-53	Rapid	Smooth	クリーム色	Group IV	判定不能(④⑧)	<i>M. goodii</i>
K-54	Rapid	Smooth	クリーム色	Group IV	判定不能(⑩⑨)	<i>M. goodii</i>
K-55	Rapid	Smooth	クリーム色	Group IV	判定不能(⑲②)	<i>M. goodii</i>
K-56	Rapid	Smooth	クリーム色	Group IV	判定不能(⑮⑥)	<i>M. goodii</i>
K-57	Slow	Smooth	クリーム色	MAC**	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
K-58	Rapid	Smooth	クリーム色	Group IV	判定不能(⑨⑩)	<i>M. goodii</i>
K-59	Slow	Smooth	黄オレンジ色	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
K-60	Rapid	Smooth	クリーム色	Group IV	判定不能(⑬⑥)	<i>M. goodii</i>
K-61	Slow	Smooth	クリーム色	MAC**	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
K-62	Slow	Smooth	黄オレンジ色	MAC**	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
K-63	Slow	Smooth	黄オレンジ色	MAC**	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>

*DDH: DNA-DNA Hybridization法キット (極東製薬工業) による同定結果

MAC**: *M. avium*-*M. intracellulare* complex

②:TB complex, ④:*M. marinum*, ⑥:*M. scrofulaceum*, ⑦:*M. gordonae*, ⑧:*M. szulgai*,

⑨: *M. avium*, ⑩: *M. intracellulare*, ⑬:*M. nonchromogenicum*, ⑮:*M. triviale*,

⑰:*M. chelonae*, ⑱:*M. perigrinum*

表8 濾材由来の抗酸菌14株の菌種の内訳

菌種名	株数
<i>M. gordonae</i>	1
<i>M. avium</i>	4
<i>M. goodii</i>	9

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）
分担研究報告書

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

レジオネラ属菌迅速測定法の有用性の検討（Ⅱ）

分担研究者 荒井 桂子 横浜市衛生研究所

研究協力者

吉川循江	横浜市衛生研究所	田中礼子	横浜市衛生研究所
林 宏子	横浜市衛生研究所	山口 正	横浜市衛生研究所
磯部順子	富山県衛生研究所	佐々木美江	宮城県保健環境センター
杉山寛治	静岡県環境衛生科学研究所	田栗利紹	長崎県衛生公害研究所
中嶋 洋	岡山県環境保健センター	高田千恵子	東京都健康安全センター
橋本-鈴木敦子	東京都予防医学協会		

研究要旨： 研究要旨:循環水を用いた浴場施設が原因と推定されるレジオネラ肺炎が現在も全国で散発し、死亡例も出ている。レジオネラ肺炎はレジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸入して感染するもので、主な汚染源として浴槽水が指摘されている。浴場施設では、レジオネラ症防止に向けて自主検査等で浴槽水中の菌数把握、菌の増殖抑制・制御に取り組んでいる。浴槽水からレジオネラ属菌が検出された場合、入浴施設では営業の停止と浴槽システムの洗浄・消毒が求められ、レジオネラ属菌が不検出となったことが確認されるまで営業停止等の措置が取られる。しかしながら、レジオネラの培養試験は結果判明までに7～10日を要し、代替試験法開発への期待が多方面から寄せられている。そこで、国内で供給可能な状況にある遺伝子増幅を利用した迅速測定法2法（LAMP法及びリアルタイムPCR法）の有用性を検討した。

既存のDNA検出キットはわが国の環境株、臨床株に概ね対応しており、利用に供し得ると判断された。これまで、DNA検査は培養法との間で検出結果に不一致が認められることから使用が差し控えられてきたが、不一致の主な原因が不自然な多量の死菌の存在によるものと判断された。DNA検査は迅速性のみならず試料水の採水直前の消毒剤投入などといった不正行為の発見につながる利点があり、洗浄後の確認試験や営業再開に向けた検査などに活用が期待される。その一方で、温泉成分中にはDNA増幅に対して阻害的に働く成分が含まれる可能性があること、菌の濃縮ならびにDNA抽出等に技術的な習熟が必要であることも明らかになった。

A 研究目的

浴場施設の多くは循環式浴槽を用いており、浴槽システム中に増殖するレジオネラ属菌の管理が重要になっている。現行では汚染の監視体制として菌の培養試験が行われているが、結果判明までに7~10日を要することから現状把握が難しい状況にある。また、浴場施設の営業再開に際しても検査結果を得るまでに同じく7~10日間を要することとなり、改善措置の確認などの衛生管理への利用手段としては必ずしも最善であるとは限らない。そこで、国内で供給可能な状況にある遺伝子増幅を利用した迅速測定法2法(LAMP法及びリアルタイムPCR法)の有用性を検討した。

B 迅速法

当該研究事業においては国内で供給可能な状況にある検査方法であることを前提とし、培養法に比較して短時間で結果が判明すること、比較的安価な装置を使用すること、検出限界値が培養法と同等以上であること等を考慮し、以下の2方法を検討した。

1. LAMP法(栄研化学社)

LAMPとはLoop-Mediated Isothermal Amplificationの略であり、わが国の企業が独自に開発した遺伝子増幅法である。標的遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させることを特徴としている。複数のプライマーの組み合わせにより標的遺伝子配列の増幅がなされることから、高い特異性が得られる。サンプルとなる遺伝子、プライマー、鎖置換型DNA polymerase、基質等を混合し、一定温度(65℃付近)で保温することによって反応が進み、検出までの工程を1ステップで行うことができる。

標的DNAを15分~1時間で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅することができ、反応の副生成物であるピロリン酸マグネシウムの白濁を検出する。

レジオネラ属菌の検出には、レジオネラ属菌の保持する16S rRNAをコードする遺伝子領域内にLAMP法用のプライマーを設計し、開発した専用の試薬キットを使用する必要がある。

使用試薬: Loopamp レジオネラ検出試薬キットE

使用機器: Loopamp リアルタイム濁度測定装置

2. リアルタイムPCR法(タカラバイオ社)

リアルタイムPCR法はサーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した装置を用いるもので、試料中に含まれる特異遺伝子量と増幅産物の検出に至る時間との間に負の相関が見られることを利用してリアルタイムで定量的な検出を可能としている。

使用試薬: CycleavePCR® *Legionella* Detection Kit

使用機器: リアルタイムPCR装置(Smart Cycler®)

試薬キットはレジオネラ属菌を網羅的に検出する5S rRNA遺伝子および*Legionella pneumophila mip* (macrophage infectivity potentiator protein) 遺伝子の特定配列を検出する。リアルタイムPCR用キットで、検出には特異性の高いサイクリングプローブ法を採用している。リアルタイムPCR装置では三波長同時にモニタリングしており、*mip* 遺伝子と5S rRNA遺伝子ならびにインターナルコントロールの同時検出が可能である。

C 研究結果

1. 検量線の作成

リアルタイム PCR 法は定性の他、レジオネラ属菌及び *L. pneumophila* の定量測定が可能である。この方法は直接菌数が算出されないため、既知の濃度の菌液を用いて検量線を作成する必要がある。そこで、*L. pneumophila* を用い、死菌を含まぬように純培養 3 日後に培地上に出現した菌を用い、菌の段階希釈液を作製し、培養による菌数の確認の上、DNA を抽出して検量線用に供した。複数回の測定結果から平均値を求め、検量線を作成した。

1.1. 試料の調製および操作手順

L. pneumophila SG1 80-045 株 (国立感染症研究所提供) を BCYE 培地に塗布し、37°C で 3 日間培養したプレート 1 枚分の菌をかきとり、 6.6×10^9 cfu/mL の菌液 10mL から DNA の抽出を行った。リゾチーム処理後、SDS で溶菌し、フェーノール、クロロホルム処理し、エタノール沈殿を行ない、最終的に、5mL の TE buffer に溶解したものを試料とした。

6.6×10^9 cfu/mL \times 10ml/5ml = 1.3×10^{10} cfu/mL

1.1.2. 操作手順

1. DNA 溶液 (原液濃度は 1.3×10^7 cfu/ μ L) を 26 倍希釈する (希釈液濃度は 0.5×10^6 cfu/ μ L)
2. 10 倍希釈を 6 回繰り返す、 0.5×10^0 cfu/ μ L までの各段階溶液を作成する
3. 各段階 2 μ L を鋳型とする。
4. 滅菌注射用水を BLANK にする
5. MIP のポジコン、5 S のポジコンを 1 本ずつ用意する
6. 1 回 10 本の反応を SmartCycler で測定し、検量線を作成する
7. これを、環境試料測定前に行い、検量線が直線であることを確認する。

1.2. 結果

1.2.1. 直線性の確認

$1 \sim 10^6$ cfu まで mip (図 1)、5S (図 2) の各遺伝子について検量線を作成したところ、ともに直線性を有することが確認され、検量線による定量が可能であった。この検量線を用いてリアルタイム PCR によって検出された遺伝子量を培養法による菌数に変換し、両者の比較を行った。

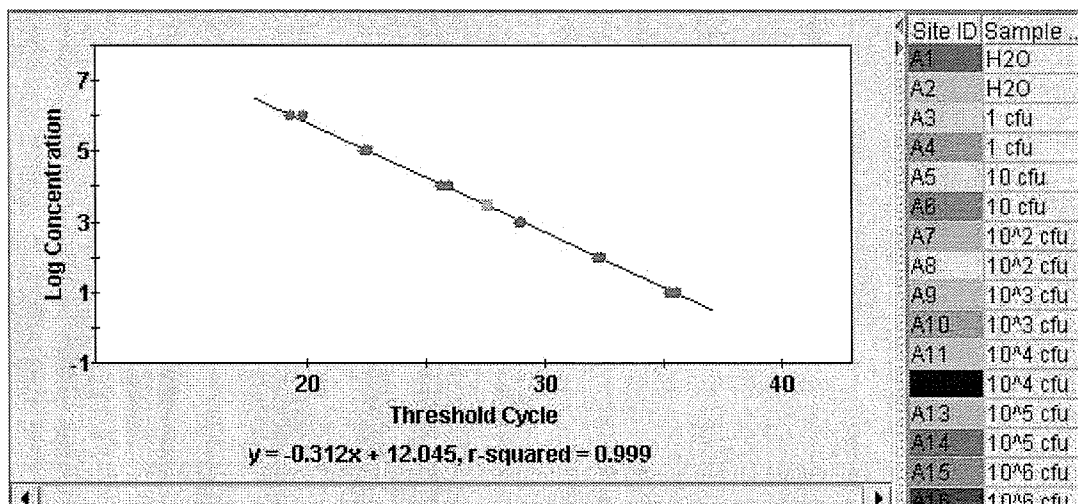


図1 mip 遺伝子による検量線 (*L. pneumophila*)

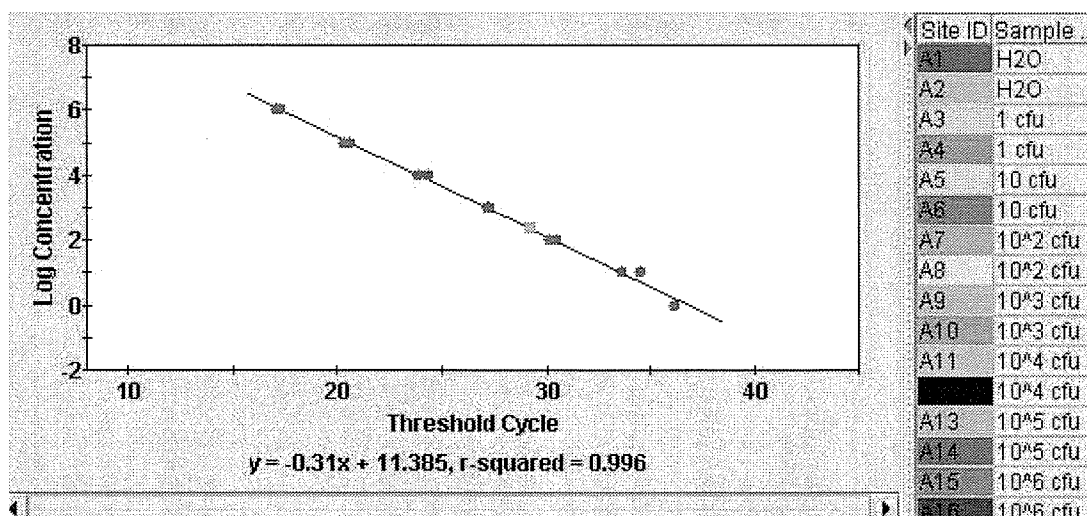


図2 5S 遺伝子による検量線 (レジオネラ属菌)

1.2.2. 同一検査機関及び同一検査者によって測定された検量線の再現性の確認

検量線の再現性について2研究機関(岡山県環境保健センター、横浜市衛生研究所)で検討を行った。試料は共通の検量線用の遺伝子抽出試料を使用し、岡山県は同一日に2回測定、横浜市は2日間で2回および3回の計5回測定を行った。結果を表1および表2に示した。岡山県の結果では、III坤遺伝子による測定値の分散は0.000025~0.0576、標準偏差は0.005~0.24、5S遺伝子による測定値の分散は0.000625~0.005625、

標準偏差は0.025~0.145であった。横浜市の結果では、mip遺伝子による測定値の分散は0.0000699~0.00123、標準偏差は0.008367~0.035071、5S遺伝子による測定値の分散は0.00012~0.00223、標準偏差は0.010954~0.047223であった。両研究機関の結果から、レジオネラ属菌検出用試薬 CycleavePCR Legionella Detection kit 及びリアルタイムPCR装置(SmartCycler)を用いた検量線は、良好な再現性が確認された。

表1 岡山県環境保健センターによる検量線の再現性試験結果

Protocol	Sample ID	FAM Ct	TET Ct	TxR Ct	平均からの差		その2乗		分散		標準偏差	
					FAM	TxR	FAM	TxR	FAM	TxR	FAM	TxR
Legionella	1	0	34.39	38.18	0	-0.08	0	0.0036	0	0.0036	0	0.08
Legionella	1	0	34.41	38.28	0	0.08	0	0.0036				
		0		36.22								
Legionella	10	38.39	33.75	33.12	0.24	-0.025	0.0578	0.000625	0.0576	0.000625	0.24	0.025
Legionella	10	35.91	33.75	33.17	-0.24	0.025	0.0578	0.000625				
		36.15		33.145								
Legionella	100	33.2	32.91	29.7	0.205	-0.075	0.042025	0.005625	0.042025	0.005625	0.205	0.075
Legionella	100	32.78	32.63	29.85	-0.205	0.075	0.042025	0.005625				
		32.995		29.776								
Legionella	1000	29.27	0	25.57	0.035	0.065	0.001225	0.004225	0.001225	0.004225	0.035	0.065
Legionella	1000	29.2	0	26.44	-0.035	-0.065	0.001225	0.004225				
		29.235		26.505								
Legionella	10000	25.8	0	23.15	0.145	0.05	0.021025	0.0025	0.021025	0.0025	0.145	0.05
Legionella	10000	25.51	0	23.05	-0.145	-0.05	0.021025	0.0025				
		25.855		23.1								
Legionella	100000	21.74	0	19.61	0.03	-0.145	0.0009	0.021025	0.0009	0.021025	0.03	0.145
Legionella	100000	21.69	0	19.9	-0.03	0.145	0.0009	0.021025				
		21.71		19.755								
Legionella	1000000	19.34	0	18.08	-0.005	-0.09	0.000025	0.0081	0.000025	0.0081	0.005	0.09
Legionella	1000000	19.33	0	18.26	0.005	0.09	0.000025	0.0081				
		19.335		18.17								

2007.2.9実施の2回分のみ

表2 横浜市衛生研究所による検量線の再現性試験結果

濃度	FAM Ct	TxR Ct	平均		分散		標準偏差	
			FAM	TxR	FAM	TxR	FAM	TxR
0	0.00	0.00						
0	0.00	0.00						
0	0.00	0.00	0	0	0	0	0	0
0	0.00	0.00						
0	0.00	0.00						
1	0.00	36.15						
1	0.00	36.14						
1	0.00	36.18	0	36.152	0	0.00027	0	0.016432
1	0.00	36.15						
1	0.00	36.14						
10	35.90	33.20						
10	35.92	33.21						
10	35.91	33.30	35.912	33.244	0.00017	0.00223	0.013038	0.047223
10	35.93	33.29						
10	35.90	33.22						
100	32.75	30.01						
100	32.72	30.10						
100	32.77	30.08	32.74	30.07	0.00057	0.00133	0.023875	0.036469
100	32.71	30.09						
100	32.74	30.09						
1000	29.00	27.00						
1000	28.95	27.01						
1000	28.99	26.98	28.99	27.00	0.00043	0.00013	0.020736	0.011402
1000	29.00	26.99						
1000	28.99	27.00						
10000	25.40	23.50						
10000	25.45	23.52						
10000	25.45	23.53	25.45	23.52	0.00123	0.00013	0.035071	0.011402
10000	25.48	23.52						
10000	25.49	23.51						
100000	22.00	20.10						
100000	22.01	20.11						
100000	22.02	20.11	22.01	20.11	7E-05	0.00012	0.008367	0.010954
100000	22.01	20.13						
100000	22.00	20.11						
1000000	19.30	16.78						
1000000	19.29	16.77						
1000000	19.31	16.78	19.30	16.77	7E-05	0.00017	0.008367	0.013038
1000000	19.30	16.78						
1000000	19.29	16.75						

1.2.3. 異なる検査機関による検量線の相関性

同一検査機関及び同一検査者によって測定された検量線の再現性が良好である結果を踏まえ、異なる検査機器、検査者によって提出された複数の検査機関による検量線について、検定を行った。2) で検量線を作成した 2 研究機関の使用したリアルタイム PCR 装置は異なり、検査者も異なるため、岡山県と横浜市の結果、ならびにメーカーによる結果とを比較した。表 3 及び図 3 に

表 3 mip 遺伝子による検量線
(*L. pneumophila*)

logLeg	yokohama	okayama	Maker
1	35.912	36.15	35.445
2	32.738	32.995	32.33
3	28.986	29.235	28.925
4	25.454	25.655	25.755
5	22.008	21.71	22.47
6	19.298	19.335	19.565
相関係数	-0.99908	-0.99835	-0.99981

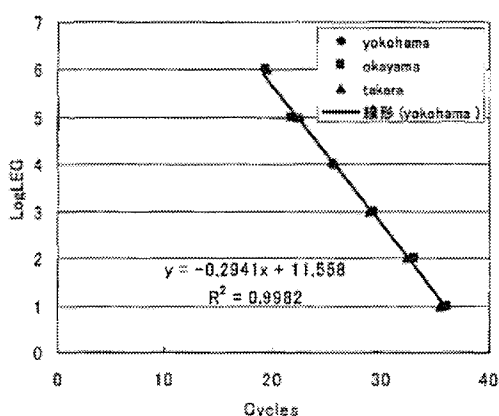


図 3 mip 遺伝子による検量線
(*L. pneumophila*)

mip 遺伝子による検量線 (*L. pneumophila*)、表 4 及び図 4 に 5S 遺伝子による検量線 (レジオネラ属菌) を示した。3 研究機関の測定値は試料の *L. pneumophila* SGI の Log 濃度に対して相関係数を調べたところ、いずれも -0.999 付近であり、高い相関を示した。同一の DNA 抽出液から作製した検量線試料で検量線を作成すると、異なる検査機器、異なる検査者による検量線であっても高い相関性を示すことが判明した。

表 4 5 S 遺伝子による検量線
(レジオネラ属菌)

logLeg	yokohama	okayama	Maker
0	36.152	36.22	36.145
1	33.244	33.145	34.085
2	30.074	29.775	30.295
3	26.996	26.505	27.16
4	23.516	23.1	24.12
5	20.112	19.755	20.51
6	16.772	16.17	17.225
相関係数	-0.99979	-0.99992	-0.99958

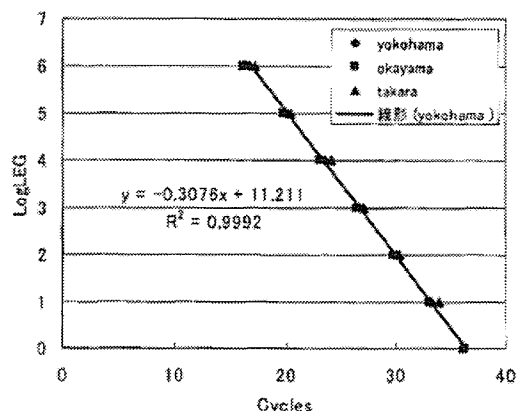


図 4 5 S 遺伝子による検量線
(レジオネラ属菌)

1.2.4. 死菌の検出

LAMP 法及びリアルタイム PCR 法は抽出した遺伝子を鋳型として検出を行うため、生菌・死菌の区別なく検出されると予想される。そこで、死菌のみ、および死菌＋生菌の試料に対する定量性の確認を行った。

1.2.5 試料の調製と操作手順

滅菌注射用水に *L. pneumophila* SG1 (白湯浴槽水由来) を BCYE α 培地に塗抹し、37°C 3 日間培養した菌を、10、50、100 (cfu/100mL) の各濃度になるように添加し、試料 A 群を作成した。同様の試料を 100°C、10 分加熱し、死菌試料とし、これを試料 B 群とした。また、試料 A と同様の試料の半量を 100°C、10 分加熱し、死菌＋生菌の試料とし、これを試料 C 群とした。

1.2.6 操作手順

(1) 濃縮操作

試料 100mL を 0.22 μ m のメンブランフィルターでろ過し、TaKaRa DEXPAT[®] 中で攪拌し混濁させた。

(2) DNA 抽出

100°C、10 分加熱し、25°C、12,000rpm 10 分遠心する。抽出上清をイソプロパノールとグリコーゲンに分注したチューブへ採り、再び 25°C、14,000rpm 10 分遠心し、上清を

捨ててエタノールを入れた後、25°C、14,000rpm 10 分遠心した。その後上清を捨てて風乾し、これをサンプルとした。

(3) LAMP 法

サンプル溶液、陽性コントロール、陰性コントロール各 5 μ L に試薬を 20 μ L 添加し、Loopamp リアルタイム濁度測定装置で測定を行った。

(4) リアルタイム PCR 法

サンプル溶液、陽性コントロール、陰性コントロール各 5 μ L に試薬を 20 μ L 添加し、Smart Cycler[®] で測定を行った。

1.2.7. 結果

(1) LAMP 法

まず、生菌のみの試料 A 群 10、50、100 (cfu/100mL) の各濃度を測定したところ、全て陽性であった。次に、死菌のみの試料 B 群及び死菌＋生菌の試料 C 群の 10、50、100 (cfu/100mL) の各濃度を測定したところ、全て陽性であった。

(2) リアルタイム PCR 法

LAMP 法同様に、試料 A 群、B 群、C 群の順に各濃度を測定したところ、全て陽性で、各濃度もほぼ一致していた (図 5)。

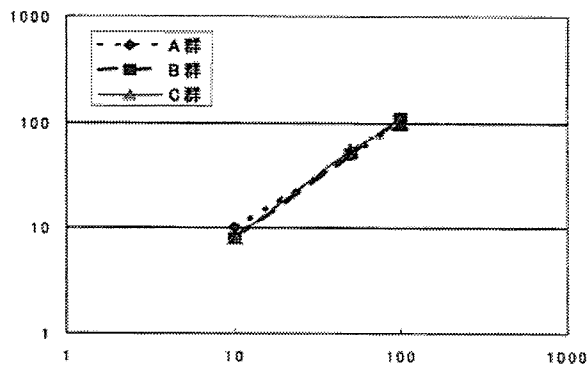


図5 *L. pneumophila* SG1の生菌と死菌によるリアルタイムPCR法検出状況

4 考察

LAMP法及びリアルタイムPCR法は生菌、死菌の区別なく、*L. pneumophila* SG1を検出した。また、リアルタイムPCR法は生菌、死菌の区別なく *L. pneumophila* SG1の定量が可能であった。

2. LAMP法およびリアルタイムPCR法の *Legionella* 属菌の種(株)との反応性

市販のレジオネラ検出キットの検出精度の確認を目的として *L. pneumophila* の15血清群参照株と Untypable 3株、8菌種の16 Biotypeを含む51菌種、76株を用いて

反応性を検討し、以下の結果を得た(表1)。

- ・ A社の製品は41菌種、64株を認識
- ・ B社の製品では38菌種、63株を認識
- ・ 両製品とも *L. pneumophila* の15血清群参照株、および Untypable 3株全てを認識

以上の結果から、市販検出キットは浴槽水におけるレジオネラ汚染の検出方法として利用可能であるものと判断した(表1)。ちなみに、ヒト臨床分離株の9割は *L. pneumophila* の血清群1とされる(倉文明：当該研究分担報告)。

ID-No	Species	Serogroup or Biotype	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	A††	B††
1	NIIB0145 <i>L. adelaidensis</i>		E	1762-AUS-E	49625	-	-
2	NIIB0040 <i>L. anisa</i>		E	WA-316-C3	35292	+	+
3	NIIB0405 <i>L. bairdii</i>		E	Montbeillard A1	700512	-	+
4	NIIB0057 <i>L. birminghamsensis</i>		C	1407-AL-H	43702	+	-
5	NIIB0009 <i>L. bozemanii</i>	1	C	WIGA	33217	+	+
6	NIIB0687 <i>L. bozemanii</i>	2	C	Tronto-3	35545	+	+
7	NIIB0114 <i>L. brunensis</i>		E	441-1	43878	+	-
8	NIIB1254 <i>L. busanensis</i>		E	KCTC 12084, K9951	700510	-	+
9	NIIB0047 <i>L. cherrii</i>		E	ORW	35252	+	+
10	NIIB0113 <i>L. cincinnatiensis</i>		C	72-OH-H	43753	+	+
11	NIIB0417 <i>L. donaldsonii</i>		C	MDA 2706	BAA-693	+	+
12	NIIB0406 <i>L. drozanski</i>		E	LLAP-1	700990	-	+
13	NIIB0078 <i>L. dumoffii</i>	BT-1	E	NY 23	33279	+	+
14	NIIB0234 <i>L. gormanii</i>		E	LS-13	33297	+	+
15	NIIB0049 <i>L. erythrae</i>	1	E	SE-32 A-C8	35303	+	+
16	NIIB0146 <i>L. fairfieldensis</i>		E	1725-AUS-E	49588	-	+
17	NIIB0408 <i>L. fallonii</i>		E	LLAP-10	700992	+	+
18	NIIB0688 <i>L. fedaii</i>	1	E	WVO-44C	35072	+	+
19	NIIB0689 <i>L. fedaii</i>	2	C	691-WI-H	35849	+	+
20	NIIB0193 <i>L. gentiana</i>		E	1308	49504	+	-
21	NIIB0147 <i>L. gratiana</i>		E	Lyon 8420412	49413	+	+
22	NIIB0404 <i>L. gressiae</i>		E	Gne'oux 11D13	700509	-	+
23	NIIB0690 <i>L. hackettiae</i>	1	C	Lansing 2	35250	+	+
24	NIIB0691 <i>L. hackettiae</i>	2	C	798-P A-H	35999	+	+
25	NIIB0053 <i>L. isantensis</i>		E	Bercovier 4	43119	-	-
26	NIIB0046 <i>L. jamaicatowniensis</i>		E	JA-26-G1-E2	35298	+	+
27	NIIB0014 <i>L. jordanis</i>		E	BL-540	35623	+	+
28	NIIB0148 <i>L. lansingensis</i>		C	1677-ML-H	49751	+	+
29	NIIB0194 <i>L. londiniensis</i>	1	E	1477	49505	-	+
30	NIIB1255 <i>L. londiniensis</i>	2	E	Mullhouse B26	BAA-518	-	-
31	NIIB0692 <i>L. longbeachae</i>	1	C	Long Beach 4	33462	+	+
32	NIIB0693 <i>L. longbeachae</i>	2	C	Tucker 1	33484	+	+
33	NIIB0045 <i>L. macascherinii</i>		E	PX-1-G2-E2	35300	+	+
34	NIIB0008 <i>L. micdadei</i>		C	TATLOCK	33218	+	+
35	NIIB0116 <i>L. montana</i>		E	316-36	43877	+	-
36	NIIB0195 <i>L. nautarum</i>		E	1224	49506	+	+
37	NIIB0036 <i>L. oakridgeensis</i>		E	OR-10	33761	-	+
38	NIIB0042 <i>L. parisensis</i>		E	PF-209C-C2	35299	+	+
39	NIIB0001 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1	C	Philadelphia-1	33152	+	+
40	NIIB0002 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	2	C	Togus-1	33154	+	+
41	NIIB0003 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	3	E	Bloomington-2	33155	+	+
42	NIIB0004 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	4	C	Los Angeles-1	33156	+	+
43	NIIB0005 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	5	E	Dallas 1E	33216	+	+
44	NIIB0150 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>vasculi</i>	5	E	U8W	33737	+	+
45	NIIB0006 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	6	C	Chicago 2	33215	+	+
46	NIIB0033 <i>L. pneumophila</i>	7	E	Chicago 8	33823	+	+
47	NIIB0034 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	8	C	Concord 3	35096	+	+
48	NIIB0304 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	9	E	IN-23-G1-C2	35289	+	+
49	NIIB0050 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	10	C	Leiden 1	43283	+	+
50	NIIB0051 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	11	C	797-PA-H	43130	+	+
51	NIIB0060 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	12	C	570-CO-H	43290	+	+
52	NIIB0061 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	13	C	82A3105	43736	+	+
53	NIIB0062 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	14	C	1169-MN-H	43703	+	+
54	NIIB0063 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	15	C	Lansing 3	35251	+	+
55	NIIB0451 <i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-192		+	+
56	NIIB0453 <i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-206		+	+
57	NIIB0462 <i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-239		+	+
58	NIIB0196 <i>L. quaternensis</i>		E	1335	49507	+	-
59	NIIB0115 <i>L. quinlanii</i>	1	E	1442-AUS-E	43830	+	+
60	NIIB0260 <i>L. quinlanii</i>	2	E	LC870	BAA-538	+	-
61	NIIB0407 <i>L. roobotkhamii</i>		E	LLAP-6	700991	+	+
62	NIIB0048 <i>L. rubrilucens</i>		E	WA-270 A-C2	35304	+	+
63	NIIB0039 <i>L. sainthelensii</i>	1	E	Mt St Helens 4	35248	+	+
64	NIIB0207 <i>L. sainthelensii</i>	2	C	Ly176.97	700517	+	+
65	NIIB0409 <i>L. santitruis</i>		E	SC-63-C7	35301	+	+
66	NIIB0149 <i>L. shakaparræ</i>		E	214	49655	+	-
67	NIIB0043 <i>L. spiritensis</i>	1	E	Mt St Helens 9	35249	-	+
68	NIIB0261 <i>L. spiritensis</i>	2	E	ML76	BAA-537	-	+
69	NIIB0041 <i>L. steigerwaltii</i>		E	SC-18-C9	35302	+	+
70	NIIB0262 <i>L. taurinensis</i>		E	Turin I no 1	700508	+	+
71	NIIB0117 <i>L. tucsonensis</i>		C	1087-AZ-H	49180	+	+
72	NIIB0032 <i>L. wadsworthii</i>		C	81-716 A	33877	+	+
73	NIIB0206 <i>L. waltersii</i>		E	2074-AUS-E	51914	+	+
74	NIIB0197 <i>L. worsleiensis</i>		E	1347	49508	+	-
75	NIIB0305 <i>Legionella genomospecies 1</i>		E	2055-AUS-E	51913	+	-
76	NIIB0306 <i>Legionella</i> sp.		E	LLAP-14	700313	+	-

3. 夾雑菌との交差反応性

3.1. 目的

核酸試験法を環境試料に適用する場合、環境中に多様な DNA が存在することから非特異反応が生じる恐れがある。非特異反応を否定するために反応物の配列決定がしばしば行われるが、DNA 増幅物の取り出しによる実験環境の汚染が心配されることから必ずしも推奨されない。一方、陰性対象として多種の鋳型 DNA を用意し、反応陰性の確認が当該製品を含め一般的に行われているが、環境中には未知の配列が多数存在し、その環境に対応するあらゆる菌種を用意し試験することは現実には不可能であり、この方法は代表的な種の確認に留まる。当該研究では環境中の細菌叢をあらゆる程度網羅した陰性対象として、R2A 培養の菌叢に着目し、R2A 培地で 24 時間培養のコロニーより DNA を抽出し、陰性対象の鋳型とした。

3.2. 方法

陰性対象としての従属栄養細菌抽出 DNA

地理的に離れている 5 つの地域より 24 試料を得た。各浴槽水試料より R2A 培地を用いて 37°C で 24 時間培養し、生育したコロニーをかきとり懸濁液を作製した。懸濁液の McFarland 濃度を確認し、 $10^8 \sim 10^{10}$ の細菌が含まれる菌液より定法に従い DNA 抽出を行った。溶出液 100 μ L より 5 μ L をリアルタイム PCR 並びに Lamp の反応に使用した。

試料に含まれる細菌の多様性は最大の見積もりで培養時のコロニー数であるが、実際は同じ菌種のコロニーが複数存在するこ

とから少なくなる。掛け流し式浴槽水から分離した 100 コロニーの従属栄養細菌からの解析から 20 種程度の異なった遺伝子配列を取得した経験から、試験に供した DNA の多様性は 1 桁低い $10^1 \sim 10^5$ の範囲にあるとするのが妥当ではないかと考える。ところで、従属栄養細菌を分離した 24 浴槽水試料の中にはレジオネラ属菌培養陽性の試料も含まれていた。しかしながら、レジオネラ属菌は R2A 培地での培養では増殖せず、仮に試料原液に含まれていたとしても、増殖した従属栄養細菌によって高度に希釈される。従って、上述の方法で回収した DNA 試料ではレジオネラ属菌の存在は無視できる。

3.3. 結果

従属栄養細菌より抽出した DNA を陰性対照として用い、市販のレジオネラ DNA 検出キットの反応特異性を確認した。その結果、全国 5 地域 24 環境試料から分離した細菌類に対して交差反応を示さなかった。

4. PCR 阻害物質吸着樹脂の混入による影響調査

実試料には金属等のさまざまな PCR 阻害物質が共存している可能性があり、前処理で阻害物質吸着樹脂 (TaKaRa DEXPAT 等) を使用して阻害物質を吸着除去を行った。吸着樹脂は無色透明のビーズ状で、目視で確認することが困難であるため、DNA 抽出液中に混入する危険が考えられた。そこで、吸着樹脂が DNA 抽出液中に混入した場合を考慮し、その影響を調査した。

4.1. 試料の調製および操作手順

検量線作成用に配布した *L. pneumophila* SG1 の DNA 抽出液を希釈し、 10^4 cfu/ 5μ L に調整した。PCR 反応系に阻害物質吸着樹脂、あるいは阻害物質を吸着させた樹脂を混入させて増幅反応を行い、阻害の程度を定量した。具体的には以下の試料を用いて DNA 増幅反応を行い、阻害の程度を定量した。

- DNA 抽出液 (*L. pneumophila* SG1、 10^4 cfu/ 5μ L)
- DNA 抽出液に無処理の DEXPAT の吸着樹脂約 5 粒を投入 (DEXPAT"A")
- DNA 抽出液に阻害物質を吸着させた DEXPAT の吸着樹脂約 5 粒を投入 (DEXPAT"B")

4.2. 結果

PCR 阻害物質吸着樹脂の混入による測定値の変化を図 6 に示した。DEXPAT FREE 試料を用いた結果は検量線から、 1.02×10^4 、 1.03×10^4 、 1.02×10^4 (cfu/ 5μ L) と算定された。DEXPAT"A"を投入した実験群の結果は 8.52×10^3 、 2.31×10^3 、 10^3 、 3.39×10^3 と検出菌数は 3Log 程度低下し、DEXPAT"B"混入試料では PCR 反応は検出限界値以下となり、DNA 抽出作業においては阻害物質吸着樹脂の混入はその後の反応に致命的な障害を与えることが示された。

4.3. 考察

TaKaRaDEXPAT を利用した前処理は、PCR 阻害物質吸着樹脂に阻害物質を吸着させるため、阻害物質除去には優れた方法であると思われるが、阻害物質の吸着の有無に係らず、吸着樹脂が DNA 抽出後に混入すると測定結果に大きく影響を及ぼすこと

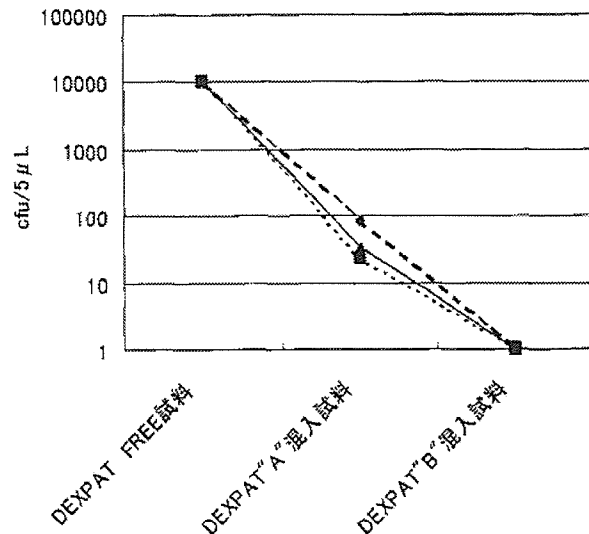


図 6 PCR 阻害物質吸着樹脂の混入による測定値の変化

が判明した。このことから、前処理段階で吸着樹脂の混入には注意を払う必要がある。

5. 浴槽水を用いたレジオネラ遺伝子検査法の評価

全国の 7 衛生研究所および検査機関の研究協力を得て浴槽水を用いて、レジオネラの迅速遺伝子測定法の有用性を検討した。

5.1. 試料の調製および手順

5.1.1. 試料

当該研究に参加した衛生研究所ごとに各種の浴槽水を採取した。収集した浴槽水の総計は 615 試料となった。

5.1.2. 測定方法

培養法、LAMP 法、定量リアルタイム PCR 法を用いて *Legionella* sp. を測定した。

5.1.3. 培養法

試料を 0.45μ m のメンブレンフィルターでろ過し、滅菌水中でフィルターを攪拌し混濁させ、濃縮菌液を作製した。この菌液

を加熱処理 (50°C、20 分間) した後、MWY、GVPC の平板に塗抹し、37°C で 10 日間培養した。出現したコロニーを BCYE α で純培養し、L-システイン欠乏培地で生育の確認、グラム染色を行った後菌種血清型の同定を行った。

5.1.4. Lmap 法

試料を 0.22 μ m のメンブランフィルターでろ過し、TaKaRaDEXPAT 中で攪拌し混濁させた。100°C、10 分加熱し、25°C、12,000rpm 10 分間遠心する。抽出上清をあらかじめイソプロパノールとグリコーゲンを分注したチューブへ採り、再び 25°C、14,000rpm 10 分遠心し、上清を捨て、沈さにエタノールを加え、25°C、14,000rpm 10 分間遠心した。その後上清を捨て、風乾し、これをサンプルとした。サンプル溶液、陽性対照、陰性対照を各 5 μ L に対し。試薬を 20 μ L 添加し、Loopamp リアルタイム濁度測定装置で測定を行った。

5.1.5. リアルタイム PCR 法

Lamp 法と同様に前処理したサンプル溶液、陽性コントロール、陰性コントロールに試薬を添加し、SmartCycler で測定を行っ

た。

5.2. 結果

所定の方法を用い各事業所が行ったレジオネラ検出結果を総括的に解析した。

5.2.1. 定性結果

浴槽水全 615 試料のレジオネラ属菌定性測定結果を表 5 に示した。陽性率は培養法で得られた 26.6% (164 試料) に比較し、LAMP 法では 36.9%、リアルタイム PCR では 49.0% となり、迅速遺伝子検出法によって高いレジオネラ陽性率が示された。これは培養可能な生菌の他、培養不可能菌種や死菌等の遺伝子を増幅している可能性が考えられた。また、非特異交差反応の可能性も考えられた。一方、培養陽性試料のうち、迅速遺伝子検出法で陰性となった試料が Lamp 法で 28.0% (49/175)、リアルタイム PCR 法で 14.0% (23/164) 存在した。

表 5 LAMP 法とリアルタイム PCR 法の培養法との比較

欠測 8	LAMP法			
		陽性	陰性	計
培養	陽性	126	49	175
	陰性	98	334	432
	計	224	383	607

欠測 27	リアルタイムPCR法			
		陽性	陰性	計
培養	陽性	141	23	164
	陰性	147	277	424
	計	288	300	588

5.2.2. 定量結果

リアルタイム PCR 法と培養法の検出結果を図 7 に示した。リアルタイム PCR 法と培養法による検出菌数には相関が認められない。その理由として、培養法では生菌のう

ち培養できる程度に活性の高い菌数のみを算定するのに対し、DNA 検出法は死菌あるいは培養では増殖できない菌をも測定することが挙げられる。昨年度の横浜市のデータ (図 8) では、リアルタイム PCR 法の検