

出菌数はおおむね培養法の菌数よりも高い値を示していた（培養がPCRより菌数が高かったのは2試料のみ）。しかし、今年度は検査機関によってリアルタイムPCR法の測定結果が培養法に比較して低い値を示す場

合があった（図7の破線より下に存在するデータ）。その原因として、先に述べたPCR阻害物質吸着樹脂の混入による影響調査が強く示唆された。

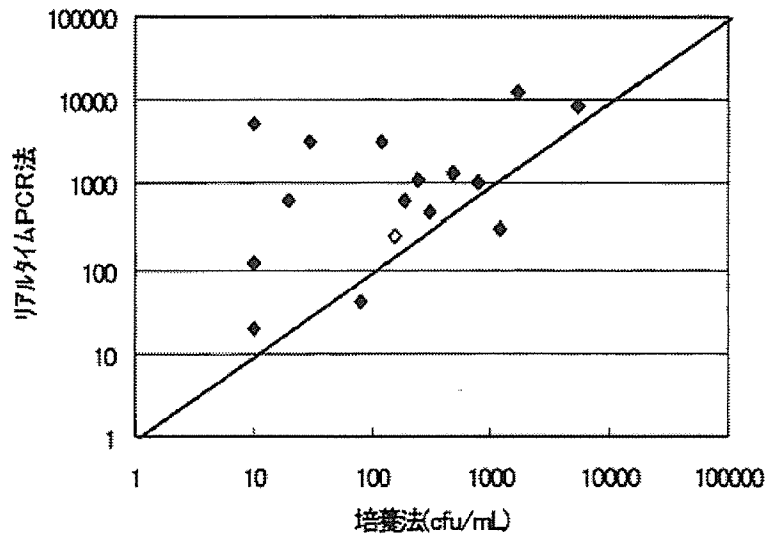


図8 昨年度の横浜市の検出データ

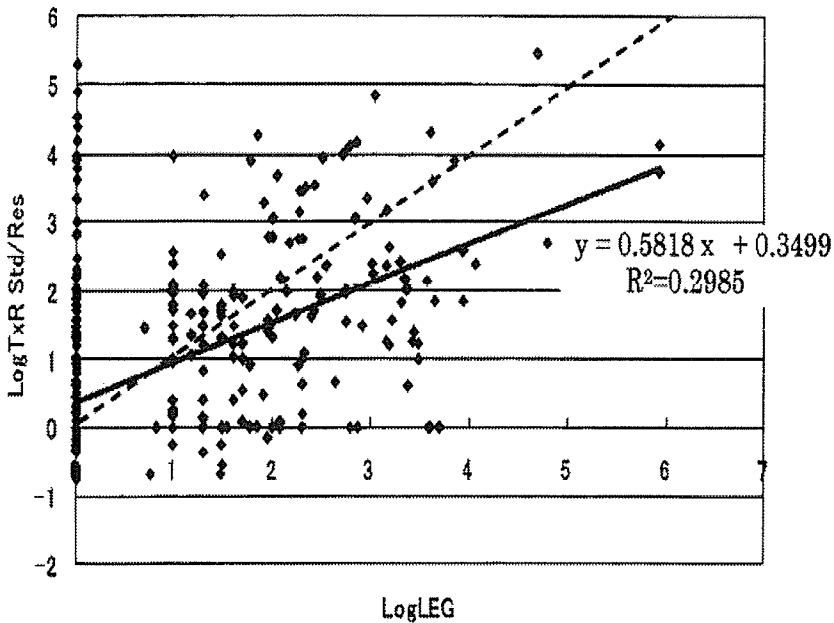


図7 リアルタイムPCR法と培養法の検出結果

D 考察

わが国で入手可能なレジオネラ DNA 検出キットの検出範囲を検討したところ、日本で検出される *Legionella* 属菌（種・株・血清群等）をほぼ検出できることが示されたことから、培養法で *Legionella* sp. が検出されるものの遺伝子検出ができない試料には DNA 増幅の阻害物質、あるいは遺伝子の抽出作業に支障をきたす妨害因子が含まれているものと推測される。当該試験では遺伝子抽出時に PCR 阻害物質吸着樹脂を用いて阻害物質の除去につとめたが、阻害物質吸着用の樹脂そのものが増幅反応にとって著しく阻害的に作用することが実験的に示された。今回の遺伝子検査で培養法よりも低い感度となった理由はこの吸着剤の混入が原因した可能性が強く示唆された。昨年度の横浜市のデータでは、試料総数に対する温泉や薬湯の占める割合が低く、また、阻害物質吸着樹脂の取り扱いに習熟していたため、遺伝子検査法の本来の感度が保障されていたものと判断される。いずれにせよ、リアルタイム PCR 法と培養法による検出菌数には高い相関が認められており、遺伝子抽出方法に改良の余地が残されてはいるが現場適応が可能と判断された。

E 結論

1. LAMP 法は前処理方法をアルカリ熱抽出からリアルタイム PCR 法の前処理方法に変更したところ、検出感度が上がり、
- 2 箇所の協力研究施設で LAMP 法及び

リアルタイム PCR 法の検出感度が同程度になった。

2. 培養法で菌が検出されていながら、LAMP 法及びリアルタイム PCR 法で陰性となる試料は、温泉水試料に多い傾向があった。
3. 遺伝子の抽出操作過程で、阻害物質が除去しきれしていないなどの操作上の不備が指摘され、協力研究機関の間で遺伝子抽出方法に関して更なる改善が必要と思われた。
4. リアルタイム PCR 法と培養法による検出菌数には、相関が認められた。遺伝子検査法が培養法と併用して利用できる可能性が考えられた。
5. 遺伝子検査法では、採水直前に投入される高濃度塩素による一時的な菌数減少の操作が無効になるため、適正管理の指標に利用できる可能性が考えられた。

F 研究発表

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

ワーキンググループ報告

(A)

温泉および銭湯等から浴用水52検体を採取、レジオネラ属菌の汚染状況について培養法および遺伝子増幅法を用いて調査した。検水の採取は県内の保健所の職員に業務を依頼した。検査方法は本研究班のプロトコールに従った。ただし、ろ過濃縮フィルターは0.22 μ m ミリポア ISOPORE および DURAPORE を、また、培養にはGVPC（ピオメリュー）、WYO（栄研化学）、BCYE（ピオメリュー）を使用した。

検水52件の試料のうちレジオネラ属菌が陽性となったのは、培養法で27件(51.9%)、リアルタイム法で38件(73.1%)、LAMP法では31件(59.6%)となり、遺伝子増幅法での検出が培養法よりも勝っていた。培養法で陽性となった検水27件のうち、リアルタイム法、LAMP法が陰性となったのはそれぞれ5件、3件で、うち1件はいずれの遺伝子増幅法も陰性であった。これらのレジオネラ属菌数は $10^2\sim 10^3$ cfu/100mlが4件、10cfu/100mlが3件であった。また、培養法で陰性となった検水25件のうちリアルタイム法、LAMP法が陽性となったのは、それぞれ16件、7件であった。培養法と判定結果が同一となった割合は、リアルタイム法、LAMP法それぞれ59.6%、80.8%であった。

一方、レジオネラ属菌数について、培養法とリアルタイム法における陽性22検体の菌数の平均をlog対数で比較したところ、それぞれ1.797と1.428で、培養法で高かった。

遺伝子増幅法のレジオネラ属菌の検出率は培養法に比べ高いことが判明した。しかし、培養法でレジオネラ属菌が分離されたにもかかわらず、リアルタイム法およびLAMP法で陰性となった検体がおよそ13%に及んだ。また、菌数測定においては培養法による測定値が遺伝子検査法よりも高い結果であった。この培養法と遺伝子増幅法の結果の相違は、現時点で遺伝子増幅法のみでレジオネラ属菌による汚染状況を判断するのはリスクが大きいことを示すものである。ただし、迅速法に対する要望が強いことも踏まえ、検査方法等の更なる検討を続ける必要があると思われる。

(D)

試験には、いわゆる掛け流し式と称する6施設21浴槽水と循環式の20施設81浴槽水を用いた(表1)。平成17年度の試料は培養法で濃縮操作をしたものを2.0mLマイクロチューブ(アシスト)に移し-30°Cで約半年間保管しておいたものを使用した。浴槽水からのレジオネラ属菌検査法(培養法)、浴槽水からのDNA抽出法、並びにリアルタイムPCR法およびLAMP法の操作は、分担研究者により提供された方法に統一して実施した。また、これらに必要な試薬類、器具、機器も全て分担研究者の指示に従った。リアルタイムPCR法の検量線についても分担研究者から送付された抽出試料を用いて作成した。なお、リアルタイムPCRについては、*L. pneumophila* に特異的な mip 遺伝子と *Legionella* 属菌に特異的な 5S リボゾーム DNA を標的とする試験系を設定したが、前者については分担研究者の報告に譲り、ここでは後者においてのみ記述する。

表1 調査施設数と検体数

	掛流式		循環式	
	施設数	検体数	施設数	検体数
H17	6	21	1	3
H18	0	0	19	78
計	6	21	20	81

培養法と迅速測定法の定性結果の比較：表2に、培養法、LAMP法およびリアルタイムPCR法の定性結果を示した。LAMP法を実施した99試料のうち、培養陽性でLAMP陽性の試料は25試料、培養陽性でLAMP陰性の試料は12試料、培養陰性でLAMP陽性の試料は4試料、培養陰性でLAMP陰性の試料は58試料であった。リア

ルタイムPCR法を実施した102試料のうち、培養陽性でリアルタイムPCR陽性の試料は31試料、培養陽性でリアルタイムPCR陰性の試料は8試料、培養陰性でリアルタイムPCR陽性の試料は16試料、培養陰性でリアルタイムPCR陰性の試料は47試料であった。

表2 培養法と迅速測定法の定性結果の比較

		LAMP法			リアルタイムPCR法		
		陽性	陰性	計	陽性	陰性	計
培養法	陽性	25	12	37	31	8	39
	陰性	4	58	62	16	47	63
	計	29	70	99	47	55	102

培養法とリアルタイムPCR法の定量性の比較：表3と図1に、培養陽性でかつリアルタイムPCR陽性を示した31試料の定量測定値と相関図を示した。培養法とリアルタイムPCRの間には $r^2=0.7893$ と高い相関が認められたが（図1）、全体的に培養法

の値よりもリアルタイムPCRの値の方が低い傾向にあり、培養法成績を基準としたリアルタイムPCR法成績の回収率は、全体の約6割（31試料のうち19試料）が5%未満の値に過ぎなかった（表3）。

表3 リアルタイムPCR法(+PCR)陽性-培養法陽性試料における測定値の比較

サンプル	rPCR測定値:a (Value/100mL)	培養法測定値:b (CFU/100mL)	培養法を基準とした回収率(a/b)
1	5755.73	865000	0.7%
2	2889.60	190	1520.8%
3	1537.53	1470	104.6%
4	1422.46	190	748.7%
5	228.34	1470	15.5%
6	172.04	3750	4.6%
7	102.70	2340	4.4%
8	69.82	8650	0.8%
9	36.69	1660	2.2%
10	17.26	1450	1.2%
11	10.08	3080	0.3%
12	1.40	20	7.0%
13	1.18	120	1.0%
14	0.41	20	2.1%
15	0.21	30	0.7%
16	14186.06	865000	1.6%
17	485.03	64000	0.8%
18	389.00	8650	4.5%
19	252.52	2000	12.6%
20	51.36	270	19.0%
21	47.93	20	239.6%
22	46.70	30	155.7%
23	42.69	170	25.1%
24	16.67	3080	0.5%
25	9.97	30	33.2%
26	9.67	10	96.7%
27	4.26	200	2.1%
28	2.92	80	3.6%
29	0.72	90	0.8%
30	0.56	30	1.9%
31	0.29	31	0.9%

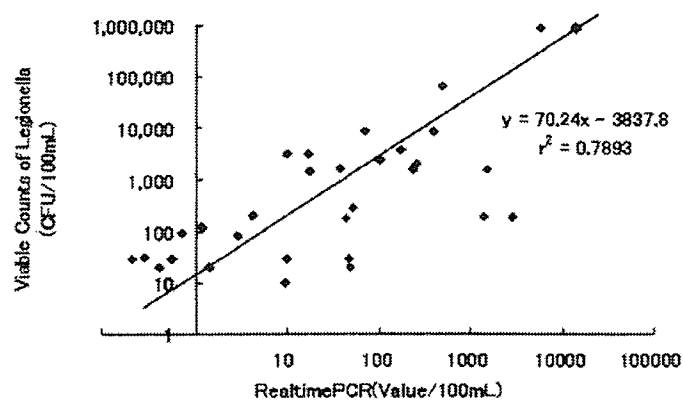


図1. リアルタイムPCR法と培養法による菌数測定

迅速測定法の定性結果： 培養陽性、迅速検査法陰性の試料（以下偽陰性試料と略す）は、平成 17 年度に荒井ら¹⁾が実施した時には 100 試料のうち LAMP 法で 2 試料、リアルタイム PCR 法で 0 試料であったことと比べて、当研究所の成績では、LAMP 法で 99 試料中 12 試料、リアルタイム PCR 法で 102 試料中 8 試料と多く出現した。逆に、培養陰性、迅速検査法陽性の試料（以下、偽陽性試料と略す）は、荒井らの報告では LAMP 法で 26 試料、リアルタイム PCR 法で 48 試料であったことと比べて、当研究所の成績では、LAMP 法で 4 試料、リアルタイム PCR 法で 16 試料と少なくなっていた。

キット化が進み操作の簡便性や信頼性が向上しているとはいえ、遺伝子増幅法において DNA 抽出技術はその熟練性の巧拙が成績に大きく影響することは周知の事実である。偽陰性については、荒井らの報告や両迅速検査法を用いた他の報告を勘酌すると、検査法自体の検出感度が低いと考えるよりも、DNA 抽出時の回収率の低さを疑う方が妥当と考えられた。本研究では使用したことのない検査キットや機器が多く指定されていた反面、高価な試薬や検査日程の

制限などにより、検査実施者が自らの技量を検証する時間と術を持てなかったように思えた。

リアルタイム PCR 法の定量性： リアルタイム PCR 法の定量性に関しては非常に高い相関 ($r^2=0.7893$) を認めたが (図 1)、培養法成績を基準とした場合のリアルタイム PCR 法の回収率は、両者が陽性を示した 31 試料のうち 19 試料が 5%未満ときわめて低い値であった (表 3)。

今回、両試験法の高相関を認めた背景には、供試した試料の塩素管理状況が一因として考えられる。荒井らも述べているように、遊離塩素濃度が高い浴槽水ではその殺菌力のために培養法成績は陰性であるか過小な値を示すことは当然と思われる。しかしながら、今回定量性の比較に使用した 31 試料は、表 3 のとおり、塩素管理されていない掛け流し式施設、循環式でも管理が不備であった施設、および塩素管理がなされていても、高 pH、高アンモニアを検出して (データ未掲載) 塩素の活性阻害が疑われる施設と、大半が塩素の影響を考えなくてもよい試料であった。

表 4 陽性検体の塩素管理状況

	掛流式	循環式	
<0.2	10	9	
0.2<		12(8 [※])	
	10	21	31

※:高pH、高NH₄-Nであった試料

全体的な回収率の低さの原因について、一つは前述した DNA 抽出技術の巧拙があり、他には試薬等の不備が考えられた。確たる証拠とは言えないがこれらに関連づけ

るための根拠として独自の解析を試みたので以下に記述する。

抽出段階における技術検証の必要性： 当所において、循環式浴槽水の 24 試料は、試

験系の繰り返し再現性を評価するために同じ試料の抽出を異なる二人の検査員 AB により異なる時期 (A が B よりも一ヶ月程度早く処理した) に実施し、リアルタイム PCR 測定に供していた。この時、抽出後の試薬調整等は全て第三の検査員が実施した。比較にはリアルタイム PCR のうち 5S リボソ

ーム DNA を標的とするプライマーを標識した ToxR の Ct 値 (PCR 増幅が閾値を超えるサイクル数) を用い、平均値の差の検定には Student の t 検定を用いた。図 2 のとおり、二人の検査員による 24 浴槽水の抽出試料を用いたリアルタイム PCR 測定値の間には明らかな違いが認められた ($P < 0.001$)。

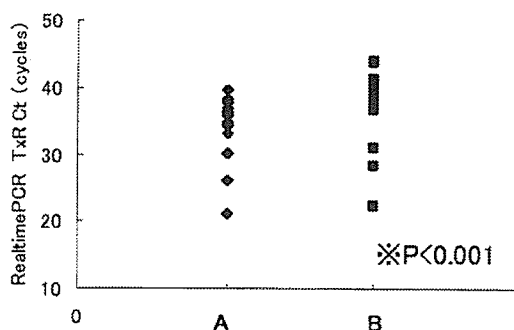
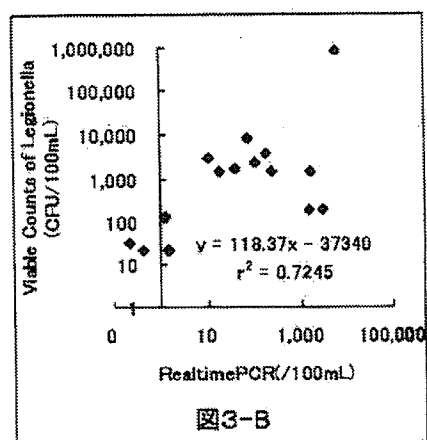
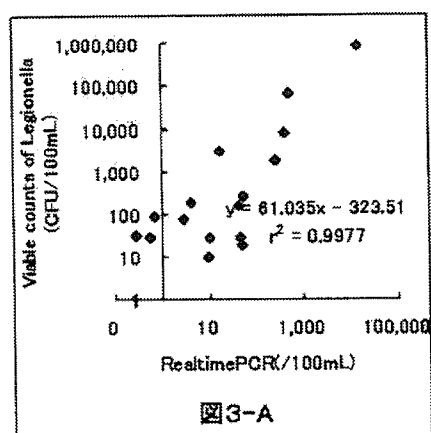


図2 検査員別のリアルタイムPCR法計測値の比較

次に、図 1 に示した成績をこれらの検査員ごとに分けたものを図3-A、Bに示した。なお、検査員ごとの実測値は表 3 に示しており、サンプル番号 1~15 が検査員 A、サンプル番号 16~31 が検査員 B によるものである。検査員ごとの両試験法成績の相関係数は、A が $r^2=0.9977$ 、B が $r^2=0.7245$ と若干後者の値が劣ったとはいえ共に高い相関を認めた。一方、培養法成績に対する rPCR 法成績の回収率は、バラツキがあるものの共に大半が 5% 未満の値と、きわめて低

い値を示した。

これらのことから、両検査員による試験成績の差が明らかであり、理由として熟練性の違いが最も疑われた。しかしながら、両者の高い相関性、実施時期のタイムラグおよび全体的な低い回収率を考慮すると試薬ロットの差、試薬の劣化あるいは試薬類の使用方法の不備なども考えられた。特に低回収率については、荒井らの成績と明らかに異なっていることから、今後改善方法を検討する必要があると考えられた。



LAMP 法、リアルタイム PCR 法ともに偽陰性が増加したことやリアルタイム PCR 法成績の低回収率などにより、DNA 抽出技術や試薬類の使用方法等について今後さらに検討する余地を認めたものの、塩素の影響が低い試料を用いたリアルタイム PCR 法成績と培養法成績の高い相関性により、今回検討したリアルタイム PCR 法の定量性には一定の信頼性を認めることができた。

参考文献

1. 厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)「循環式浴槽における浴水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」平成 17 年度報告書(主任研究者遠藤卓郎) ,65-76.

(E)

循環式浴槽水 61 検体について、同一検体を培養法(ろ過法、一部遠心法を含む)と遺伝子診断法(LAMP 法、リアルタイム PCR 法)でレジオネラを検査して、検査法毎の検出率および定量値と残留塩素濃度の影響等を比較した。リアルタイム PCR 法による定量では、既知濃度の菌液を用いて得られた Ct 値で検量線を引き、各検体の菌数を求めた。

検査法別のレジオネラ検出状況を、表 1 に示した。

表 1. 検査法別のレジオネラ検出率

検査法	結果		
	陽性	陰性	陽性率(%)
培養法	7	54	11.5
LAMP 法	18	43	29.5
リアルタイム PCR 法	32	29	52.5

培養法は7検体 (11.5%)、LAMP法は18検体 (29.5%)、リアルタイムPCR法は32検体 (52.5%) からレジオネラが検出された。陽性検体の検出菌量は、培養法に比べリアルタイムPCR法が高い値を示した。なお、検量線を2回作成して各濃度の菌液から得られたCt値の標準偏差は mip が 0~0.24、5S rRNA は 0.025~0.145 であった。レジオネラが陽性になった検体の検査法間での一致状況を、

表2および図1に示した。陽性になった32検体中三法すべて陽性になったものが7検体 (21.9%)、LAMP法とリアルタイムPCRの二法が陽性のものは18検体 (56.3%) で、リアルタイムPCRのみ陽性が14検体 (43.8%) であった。培養法で陽性になった検体はLAMP法でも陽性で、さらにLAMP法陽性の検体はすべてリアルタイムPCR法でも陽性であった。

表2. 陽性検体におけるリアルタイムPCR法との一致率

検査法	一致率(%)
培養法+LAMP法 7/32	21.9
LAMP法 18/32	56.3

塩素等による消毒の状況と検査法毎のレジオネラ検出状況を、表3に示した。各検査法とも残留塩素濃度が0.4ppmより低い検体から多く検出されたが、リアルタイム

PCR法は0.4ppm以上の検体からも8検体検出された。オゾン消毒された1検体は何れの検査法でも検出された。

図1. 陽性検体と検査法との関係

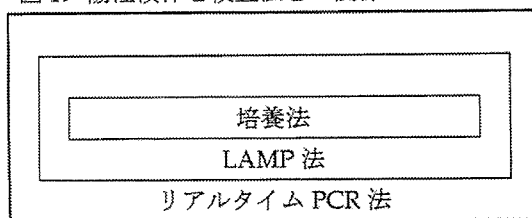


表3. 消毒の状況と検査法別レジオネラ検出数

検査法\消毒法	残留塩素濃度		その他 オゾン	不明
	<0.4ppm	□0.4ppm		
培養法	6	0	1	0
LAMP法	15	0	2	1
リアルタイムPCR法	20	8	2	2

今回の調査では遺伝子診断法は培養法に比べ検出率が高く、しかも培養法陽性検体

は本方法でも全て検出された。これは遺伝子診断法が塩素消毒等による死菌も検出す

るため、生菌のみを検出の対象とする培養法に比べ高い検出率を示したものと思われる。残留塩素濃度と検査法毎の検出数は、残留塩素濃度が低い検体がどの検査法でも検出率が高かったが、オゾン消毒の1検体は培養法でも陽性になったことから、装置の殺菌能力を十分発揮するために日常点検を厳重に行う必要がある。遺伝子診断法は迅速性や簡便性から培養法に比べてメリットが多い検査法であり、これにより菌の存在の有無を確認することは、循環式浴槽の洗浄・消毒の指標として有効な手段になると思われるが、一方で再現性のある安定した結果を出すためには、検査手技の習熟やDNA等の混入防止など注意すべき点が多いことも事実であり、現状では培養法の補助手段としての利用が適当と考える。今後は循環式浴槽における衛生管理の指標として遺伝子診断法を適用するために、遺伝子診断に使用する機種による差や施設間の精度管理等、更なる検討が必要であると思われる。

(B)

公衆浴場および温泉施設の浴槽水68件を対象として培養法およびリアルタイムPCR法、LAMP法を実施した。培養法は公定法に準拠し、検水200mLを6,000rpm、10分遠心して2mLに濃縮した後に、加湿処理した試料100 μ LをGVPC培地に塗抹培養し、

(3) LAMP法と培養法の比較

両方法で陽性となったのは16浴槽、陰性となったのは38浴槽と54浴槽(79%)で結果が一致した。

両方法で結果が異なった浴槽は14浴槽(20%)、このうち培養陰性・LAMP陽性または培養陽性・LAMP陰性はいずれも7浴

分離菌について同定した。リアルタイムPCR法、LAMP法は検水200mLをメンブレンフィルターで濃縮後、DNA抽出しTEバッファ10 μ Lに溶解したものを鋳型として用いた。

リアルタイムPCR法はSmartCycler、LAMP法はLoopampRT-160Cで遺伝子検出を行った。

(1) 菌陽性率の比較

レジオネラ属菌は、培養法では68浴槽中23浴槽(34%)、リアルタイムPCR法では26浴槽(38%)、LAMP法では23浴槽(34%)で陽性となり、リアルタイムPCR法およびLAMP法は培養法と同等かまたは高い陽性率を示した。

(2) リアルタイムPCR法と培養法の比較

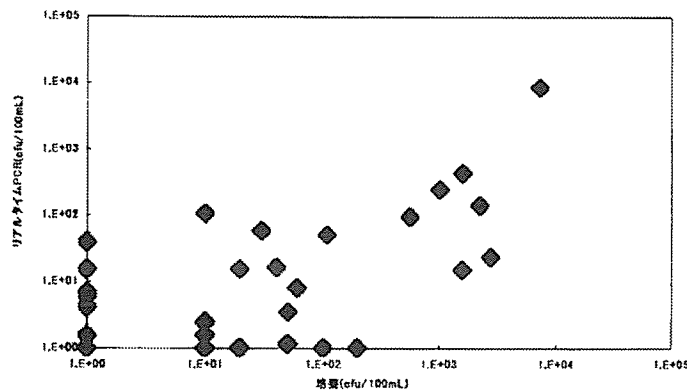
両方法で菌が陽性となったのは17浴槽、陰性は36浴槽と53浴槽(78%)で結果が一致した。

結果が異なった浴槽は15浴槽(22%)、このうち培養陰性・リアルタイムPCR陽性は6浴槽(9%)、培養陽性・リアルタイムPCR陰性は5浴槽(7%)、測定不能は4浴槽(6%)であった。

培養陰性・リアルタイムPCR陽性の浴槽のうち、2浴槽からは残留塩素が検出され、他5浴槽は換水から採水までの日数が0または1日であった。

槽であった。培養陰性・LAMP陽性の7浴槽は、リアルタイムPCRと同様に残留塩素濃度が高いかもしくは換水からの日数が短かった。

図1 検出菌数の比較



(4) 検出菌数の比較

菌が検出された浴槽について培養法とリアルタイムPCR法で換算した菌数を比較すると、両者間に強い相関 ($r=0.79$) が認められ、菌数は培養法の方が高い傾向を示した(図1)。今回の検討で、リアルタイムPCR法やLAMP法は培養法より陽性率が高いことが確認された。PCR法は死菌でも生菌と同じ挙動を示すことが知られており、死菌を同時に検出している可能性があるため、レジオネラ属菌の検査として単独に用いる場合この点を考慮する必要があると思われる。

また、死菌を同時に検出すると一般的に菌数は、リアルタイムPCR法の方が高くなると考えられた。しかし、今回の調査では菌数の相関性はあるものの、培養法の方が高い値を示したため、今後、更に検討する必要があると思われた。

しかし、消毒剤を検査直前に投入した浴槽からも遺伝子検出が可能なこと、また衛生指導後の迅速な陰性確認が可能ことから、衛生指導においては有用な検査であると思われた。

(5) SmartCycler と ABIPrism7900HT の比

較

SmartCycle は TAKARACycleavePCR Legionella Detection kit を用いるときに、使用する機器である。しかし、検査施設において使用可能な機器は限られているため、SmartCycle を使用できないこともある。そこで、SmartCycle と ABIPrism7900HT を使用し、TAKARA CycleavePCR Legionella Detection Kit を用いて 5S rRNA 遺伝子および Mip 遺伝子の検出を試み、ABIPrism7900HT が導入可能であるか検討した。

浴槽水 59 件を対象とした。DNA 濃縮・抽出方法は、班マニュアルに従い、検水 200ml を濃縮・抽出し、TE バッファー 10 μ L で溶解した試液を鋳型とした。SmartCycler は鋳型 5 μ L を用いて、添付書とおりの反応条件で遺伝子を増幅した。ABIPrism7900HT は 2 μ L を用いて、反応条件 95°C、10 秒、熱変性 95°C、5 秒、アニーリング 55°C、10 秒、伸長 72°C、6 秒、40 サイクルで実施した。

1) 5S rRNA 遺伝子

59 件中 4 件が TET 陰性で測定不能となっ

た。これらを除いた 55 件について、培養法と両機器による 5S rRNA 遺伝子の検出数を比較した（表 1）。遺伝子陽性は SmartCycler20 件、ABIPrism7900HT23 件で、後者の方が若干、検出数が多くなった。一方、両機器ともに培養陰性、遺伝子陽性の浴槽水は残留塩素濃度が高いか、または換水日数が 0~1 日であったため、死菌を検出した可能性が考えられた。培養陽性で遺伝子が陰性となった要因は、不明であり、DNA 回収率等を今後検討したいと考えている。

検出菌数の換算値は、両機器で強い相関を示し、ABIPrism7900HT を利用しての検査も可能であることが確認された（図 1、図 2）。しかし、全体的に遺伝子の換算値の方が培養法より低値となったため、レジオネラ属菌の検査として単独に用いる場合は、十分な検討が必要となると考えられた。

2) Mip 遺伝子

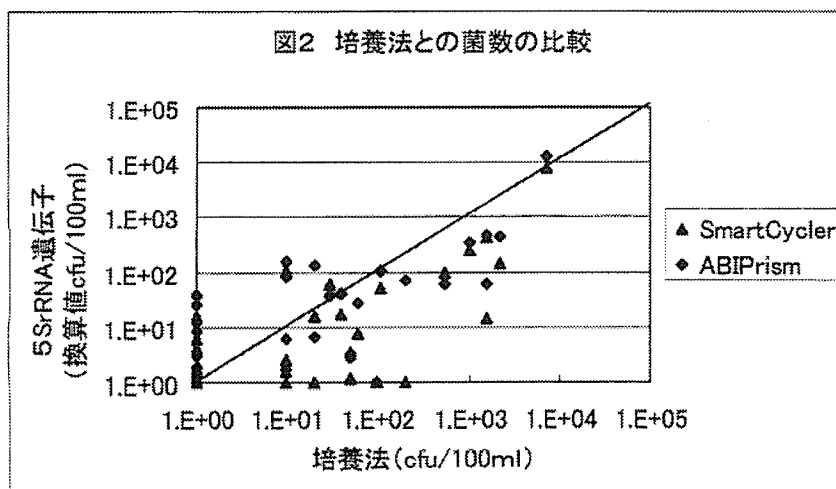
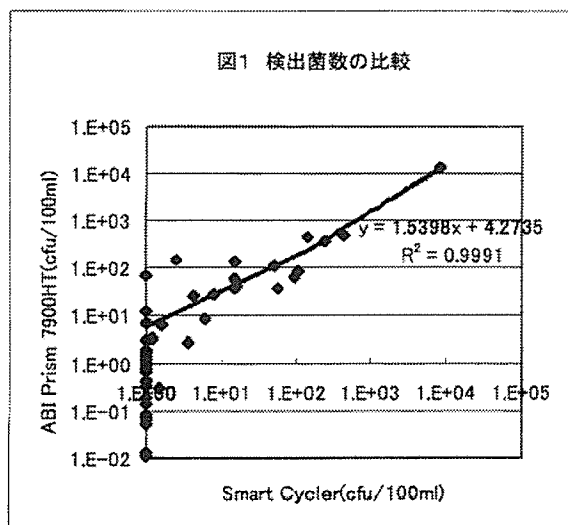
培養法で検出された 20 件のうち *L. pneumophilap*19 件、*L. micdaddi* のみ 1 件であった。Mip 遺伝子は ABIPrism7900HT で 14 件(*L. micdaddi* のみ 1 件)検出された。検出されなかった 6 件のうち、2 件は 5SrRNA 遺伝子も検出されず、4 件は 5S rRNA 遺伝子が 2~6cfu/100ml と低値であった。更に、タカラバイオによると Mip 遺伝子の検出感度は、5SrRNA 遺伝子の 10 分の 1 程度であり、今回の検出限界は 1cfu/100ml であるため、4 件は Mip 遺伝子が検出されなかったと考えられた。

一方、SmartCycler で検出された 1 件は、培養法で最も高値 7200cfu/100ml となった検体からであった。

定量 PCR を使用しての調査は、検査直前に消毒剤を投入された浴槽からの遺伝子検出が可能なこと、また衛生指導後の陰性確認に用いられることから衛生指導においては有用な検査であると思われた。

表1 培養法と Smart Cycler および ABI Prism 7900HT の 5SrRNA 検出数の比較

培養	Smart Cycler		培養	ABI Prism 7900HT	
	陽性	陰性		陽性	陰性
陽性	16	4	陽性	18	2
陰性	4	31	陰性	5	30



(C) 浴槽水 42 検体、温泉源泉水 3 検体、貯湯槽水 2 検体の計 47 検体について、レジオネラ属菌の培養検査、リアルタイムPCR定量法、および LAMP 法 (検体 10ml と 1ml からの定性法) を実施した。

培養法とリアルタイム PCR 法の定性結果

を比較し、表 1 に示した。培養法に対するリアルタイム PCR 法の陽性一致率は 94.7% (18/19)、陰性一致率は 92.9% (26/28) であった。培養法と LAMP 法の定性結果を比較し、表 2 に示した。培養法に対する LAMP 法の陽性一致率は 89.5% (17/19)、陰性一致率は 96.4% (27/28) であった。

残留塩素が確認された浴槽水の一部（リアルタイム PCR 法：2 検体、LAMP 法：1 検体）で、培養陰性、遺伝子（核酸）検出陽性の検体がみられた。また、塩化物泉の貯湯槽水（リアルタイム PCR 法：1 検体、LAMP 法：2 検体）で、培養陽性、遺伝子（核酸）検出陰性の検体がみられた。検査

結果には含めなかったが、一部の温泉浴槽水でリアルタイム PCR 法のインターナルコントロールが陰性となった検体があり、温泉水中に PCR 反応阻害物質が含まれていて、DNA 精製処理でも除けなかった可能性が示唆された。

表 1 培養法とリアルタイム PCR 法の定性結果の比較

		リアルタイム PCR		
		陽性	陰性	計
培養法	陽性	18	1	19
	陰性	2	26	28
計		20	27	47

表 2 培養法と LAMP 法の定性結果の比較

		LAMP		
		陽性	陰性	計
培養法	陽性	17	2	19
	陰性	1	27	28
計		18	29	47

(F)

1. 定性試験

公衆浴場等の循環式浴槽水 100 試料につき培養法、LAMP 法、定量リアルタイム PCR 法を用いレジオネラの検出・測定を行った。対象とした浴用水原水は水道水 65 試料、簡易給水水道（井水）12 試料、井水 14 試料、海水 1 試料、温泉 8 試料であった。

培養法で *Legionella* sp. が検出されたのは 1 試料で、菌数は 500cfu/100ml、*L. pneumophila* SGI であった。この試料は薬湯（実母散）で残留塩素は不検出であった。生薬の実母散をガーゼに入れて浴槽に直接投入するタイプの薬湯であったため、未使

用の実母散を収去し、レジオネラ属菌の測定を試みたが、検出されなかった。

LAMP 法及びリアルタイム PCR 法の定性結果を次に示した。LAMP 法で *Legionella* sp. 陽性を示した試料は 51 試料、陰性を示した試料は 49 試料であった。培養法で陽性であった試料は LAMP 法でも陽性を示した。一方、リアルタイム PCR 法で陽性を示した試料は 54 試料、陰性を示した試料は 46 試料であった。培養法で陽性であった試料はリアルタイム PCR 法でも陽性を示した。LAMP 法で陽性であった試料は、全てリアルタイム PCR 法でも陽性を示した。LAMP 法及びリアルタイム PCR 法の定性結果はほぼ同程度の結果を示した。

		LAMP 法			
		+	-	計	
培養法	+	1	0	1	
		-	50	49	99
		計	51	49	100

		リアルタイム PCR 法			
		+	-	計	
培養法	+	1	0	1	
		-	53	46	99
		計	54	46	100

リアルタイム PCR 法が陽性で LAMP 法が陰性を示した 3 試料は温泉 2 試料、薬湯 1 試料であった。阻害物質の可能性を考え、DNA 溶液を 10 倍及び 100 倍希釈して再度 LAMP 法で測定したところ、1 試料は 10 倍、100 倍希釈で、1 試料は 100 倍希釈で陽性を示した。しかし、1 試料は 10 倍、100 倍希釈でも陰性であった。

前年度はリアルタイム PCR 法の方が LAMP 法よりも高い感度を示していた。そこで、今年度は LAMP 法の DNA 抽出処理をアルカリ熱抽出からリアルタイム PCR 法の抽出方法に変更して行った。今回、LAMP 法の結果がリアルタイム PCR 法の定性結果と同程度であった一因が抽出方法の変更にあるかどうかを確認するため、前年度リアルタイム PCR 法が陽性で LAMP 法が陰性を示した 22 試料のうち、10 試料について、抽出方法をアルカリ熱抽出法とリアルタイム PCR 法の 2 種類行って、LAMP 法の測定を行った。その結果、アルカリ熱抽出では 10 試料のうち 1 試料が、リアルタイム PCR 法の抽出方法では 6 試料が陽性になった。アルカリ熱抽出で陽性を示した 1 試料は、リアルタイム PCR 法で定量された菌数が低く、検出限界値付近であるため、今回は陽

性になったと思われた。また、リアルタイム PCR 法の抽出方法でも陰性を示した 3 試料は温泉及び薬湯であった。この試料を 10 倍及び 100 倍希釈して再度 LAMP 法で測定したところ、2 試料が 100 倍希釈で陽性を示した。

前回は感度において LAMP 法に比べてリアルタイム PCR 法の方が優れていたが、今回は LAMP 法及びリアルタイム PCR 法の定性結果はほぼ同程度の結果を示した。これは LAMP 法の DNA 抽出処理をアルカリ熱抽出からリアルタイム PCR 法の抽出方法に変更したためと思われた。また、夾雑物による阻害に対して、リアルタイム PCR 法の方が阻害を受けにくいと思われた。

2. 定量試験

試料及び測定方法は定性試験に準じた。培養法で *Legionella* sp. が検出されたのは 1 試料で、500cfu/100ml、*L. pneumophila* SG1 であった。一方、リアルタイム PCR 法では 54 試料が陽性反応を示し、その菌数は検量線から 20~6,700,000cfu/100ml と計算された。

3. 附帯情報からの検討

今回の調査結果を残留塩素等の施設管理に係る附帯情報から検討を行った。全 100 試料のうち、残留塩素濃度が 0.2~1.0mg/L の範囲であったのは 41 試料で、1.0 mg/L を超過していたのは 34 試料であった。残り 25 試料は 0.2 mg/L 未満で、そのうちの 1 試料（薬湯）は残留塩素が不検出で、培養法により *L. pneumophila* が検出された。過酸化水素・高濃度塩素等による配管洗浄は 47 施設で行われており、そのうちの 42 施設はレジオネラが不検出であった。残りの 5 施設からはレジオネラが検出されたが、菌数は $10^1 \sim 10^2/100\text{ml}$ と低い値であった。したがって、配管系の定期洗浄はレジオネラ汚染防止には有効な措置と考えられる。

一方、リアルタイム PCR 法で *Legionella sp.* が検出された 54 試料について、菌数が $10^1 \sim 10^3$ 個/100ml 相当（低濃度汚染群）と $10^4 \sim 10^6$ 個/100ml 相当（高濃度汚染群）の 2 群に分けた場合、低濃度汚染群では残留塩素が 0.2~1.0mg/L、換水後 0~2 日目の試料であった。すなわち、低濃度群は残留塩素の濃度が規定内に保たれ、換水後の経過日数も少なく日常管理が適正に行われているものと判断された。換言すれば、残留塩素・換水等の日常の維持管理は重要であるが、レジオネラ対策には一相の努力が必要と考えられる。これに対し、高濃度汚染群では残留塩素が 0.2 mg/L 未満か 1.0 mg/L

超過であった。また、配管洗浄をしていない、あるいは換水後の日数が 5 以上を経過したものであった。すなわち、高濃度汚染群は通常の維持管理に問題があり、*Legionella sp.* が高濃度に検出されたと考えられた。中でも残留塩素が 1.0mg/L を超過した試料から高濃度のレジオネラが検出されることは、通常はあり得ないことで、試料採取直前に高濃度の塩素投入が疑われた。

(G)

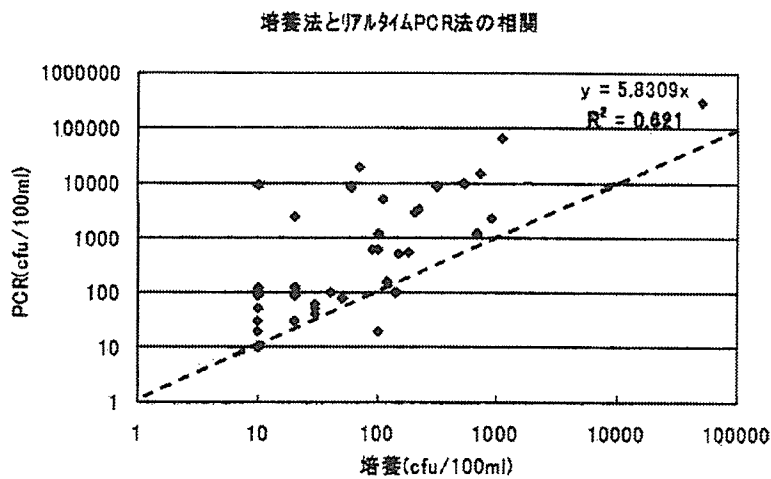
定性試験：公衆浴場等の循環式浴槽水 138 検体を対象に、培養法、LAMP 法、定量リアルタイム PCR 法によりレジオネラ検出を行った。培養法でレジオネラが検出されたのは 43 試料（31.2%）で、菌数は $10 \sim 50,000\text{cfu}/100\text{ml}$ の範囲にあった。分離された菌株は *L. pneumophila* SG1、SG3、SG4、SG5、SG6、*Legionella sp.* であった。

LAMP 法でレジオネラ陽性と判定された試料は 44 試料、陰性と判定された試料は 94 試料であった。一方、リアルタイム PCR 法で陽性となった試料は 70 試料、陰性は 68 試料であった。培養法で陽性となった試料は 43 検体で、そのうち LAMP 法で陰性を示した試料は 16 検体（37.2%）、リアルタイム PCR 法で陰性を示した試料は 1 検体であった。

	Lamp 法			リアルタイム PCR 法			
	+	-	計	+	-	計	
培養法	+	27	16	43	42	1	43
	-	17	78	95	28	67	95
	計	44	94	138	70	68	138

LAMP 法及びリアルタイム PCR 法ともに培養法よりも高い陽性率を示したが、LAMP 法に比べてリアルタイム PCR 法の方が高い感度を示した。しかし、培養法陽性試料の陽性率は、LAMP 法 62.8%、リアルタイム PCR 法 97.7%と大きく異なった。これは夾雑物による阻害に対して、リアルタイム PCR 法の方が阻害を受けにくいこと等が原因と思われた。

定量試験： 試料及び測定方法は定性試験に準じて行った。培養法でレジオネラが検出されたのは 43 試料 (31.2%) で、菌数は 10~50,000cfu/100ml、リアルタイム PCR 法では 10~290,000cfu/100ml が検出された。培養法とリアルタイム PCR 法の間を下記に示した。相関係数は 0.80、危険率 0.001 で相関が認められた。



また、培養法よりもリアルタイム PCR 法で検出された菌数の方が高い傾向が認められた。リアルタイム PCR 法陽性で LAMP 法陰性であった試料のリアルタイム PCR 法による菌数と試料数は、 1×10^1 cfu/100ml が 18 試料、 1×10^2 cfu/100ml が 5 試料、 1×10^3 cfu/100ml が 2 試料であった。

培養法とリアルタイム PCR 法に相関が認められた。リアルタイム PCR 法陽性で LAMP 法陰性であった試料は、リアルタイム PCR 法による検出菌数が 1×10^1 cfu/100ml と低い菌数であったことから、リアルタイム PCR 法の方が LAMP 法より感度が高いことが確認された。

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

浴槽水中に浮遊状態で存在するレジオネラ属菌の宿主アメーバへの感染性について

分担研究者	八木田健司	国立感染症研究所	寄生動物部
分担研究者	倉 文明	国立感染症研究所	細菌第一部
分担研究者	泉山 信司	国立感染症研究所	寄生動物部
研究協力者	下河原理江子	国立感染症研究所	寄生動物部

研究要旨： 浴槽水等感染源となりうる環境におけるレジオネラ属菌に関しては、菌数とともにその感染性に関するデータが重要と考えられる。しかしながら、環境中において宿主アメーバ等に対する感染性を評価する方法は知られていない。そこで、本研究ではマイクロプレートを用いた宿主アメーバ-レジオネラ感染系を用いて ID₅₀ (50% infectious dose) を求める方法を考案した。96 穴マイクロプレートの各ウェルに宿主アメーバのシートを作成し、これに段階希釈したレジオネラを接種して一定時間培養（4 日間）、その上清を BCYE α 培地に植えて各段階希釈におけるアメーバでのレジオネラの増殖の有無を確認した。その結果、BCYE α 培地で培養（30℃、3 日間培養）した菌の ID₅₀ は 2-3 cfu と算出された。ところが、レジオネラをモデル浴槽水（脱塩素処理水道水、42℃）中に浮遊状態で放置すると、継時的にアメーバへの感染力が低下し、1 週間後には ID₅₀=35、2 週間後には ID₅₀=128 という結果を得た。すなわち、浴槽水等の環境ではレジオネラ属菌はアメーバなどの宿主に対する感染性は比較的速やかに消失することが示唆された。

A. 研究目的

ヒトのレジオネラ属菌感染は、浴槽水等の環境中に存在する菌が経気的に取り込まれることで引き起こされる。その時の感染リスクを決定付ける主たる要因は、菌量と菌の感

染性であり、どの程度の感染性を有する菌の集団がどの程度の量取り込まれるかにより感染の成否が決まると考えられる。菌量に関しては、定量的な菌数測定法により汚染の程度、また暴露量が算出可能であり、感染事例における感染源の汚染を菌数で知ることが

できる。一方、環境中でのレジオネラの感染性に関しては定量方法の開発が急がれる。

環境中でのレジオネラの感染性に関しては、昨年度の報告において宿主アメーバ由来の菌について浴槽水中での感染性の変化を検討した。その結果、アメーバへの感染性は比較的速やかに消失することが明らかとなった。本年度の研究ではさらに定量的に把握できるよう新たな試験方法を開発した。新たな定量法を用い、宿主アメーバに対する ID₅₀ を求めた。

B. 研究方法

2-1. 宿主アメーバ：

試験には *Acanthamoeba* sp. 76-2253 株を用いた。75cm² 培養フラスコ (SMILON 製) を用いて 10ml の PY 培地で 30°C、3 日間培養し、単層に増殖したものをを用いた。

2-2. レジオネラ属菌：

試験には *Legionella pneumophila* 80-045 株 (SG 1、臨床分離株) を用いた。同菌株は -80°C 凍結保存材料を BCYE α 培地 (DIFCO 製、#218301) に接種後 3 日間、30°C - 35°C にて培養したものをを用いた。試験に際しては、下記アメーバ用生理食塩水を用いて必要濃度に調整した。

2-3. アメーバ用生理食塩水 (Amoeba saline : AS) の調整：

Page の処方 (Page, 1967) に基づき、A 液 (NaCl 12.0g/100ml、MgSO₄ · 7H₂O 0.4g/100ml、CaCl₂ · 2H₂O 0.4g/100ml)、および B 液 (Na₂PO₄ 14.2g/100ml、KH₂PO₄ 13.6g/100ml) を作製した。試験に際して A

および B 両液を混合して 10 倍あるいは 100 倍に蒸留水により希釈して用いた。10xAS (10 倍希釈 AS) は A および B の元液を直接混合すると沈殿が生ずるため、A 液を先に蒸留水で 5 倍程度に希釈した後に B 液を加え、さらに蒸留水を加えて最終的に両液が 10 倍希釈になるように調整した。調整後の 10xAS はフィルターろ過滅菌して保存した。オートクレーブ処理は沈殿を生ずるため滅菌には不適であった。1xAS (100 倍希釈 AS) は 10xAS をさらに蒸留水で 10 倍希釈することで調整し、同様にろ過滅菌して用いた。

2-4. レジオネラ属菌液の調整：

BCYE α 培地で培養した菌はループで回収し 4ml の 1xAS に入れ懸濁液を作製し、その 2.5ml を等量の 10%ホルマリン溶液と混合したのち、吸光度 (660nm フィルターの O.D. 値) から濃度を測定した。得られた O.D. の 2 倍を元液の O.D. とし、これより 1.0 O.D. の菌液を 1xAS で調整した。感染試験には、1.0 O.D. の菌液を 1xAS で適宜希釈して作製した希釈系列 (10 倍、5 倍、2 倍希釈など) の菌液を用いた。

2-5. ボトル浴槽モデル試験：

昨年度、本研究において開発した方法を利用した。なお試験に用いる菌には BCYE α 培地で 30°C、3 日間培養したものをを用いた。試験水は昨年度同様、オートクレーブ処理した塩素除去滅菌水道水とし、菌液は試験水で 1.0 O.D. に調整したものを 10⁻⁵ O.D. の濃度となるようにボトル内の試験水 200ml に添加し、42°C で攪拌した。感染性試験には、継時的にボトルより浮遊液の 200 μ l を採取し、

これを 1xAS で希釈系列を作製して用いた。

2-6. マイクロプレートアッセイ法の手順：

本研究では、レジオネラ属菌のアメーバに対する感染性を定量的に解析するために、50%感染菌量概念を導入し、これを算出するためのマイクロプレートを用いたアメーバ-レジオネラ属菌感染アッセイ系を考案した (図-1 参照)。以下にその手順を示す。

- 1) 菌感染用のアメーバを単層になるまで培養フラスコで培養後、フラスコごと氷水上におき 15 分間ほど冷却した。軽くフラスコ底面を叩くことで培地中にアメーバを剥離、浮遊させた。
- 2) アメーバ浮遊液を 50ml 遠心管に回収し 500xg で 5 分間遠心した。上清を除去後、10xAS でアメーバを再浮遊し、混和後、再び 500xg で 5 分間遠心した。
- 3) 上清を除去後、10xAS でアメーバを再浮遊し、一部をとって血球算定盤を用いてアメーバの濃度を測定し、 1.0×10^6 cells/ml となるように 10xAS でアメーバ数を調整した。
- 4) 48 ウェルマイクロプレート (SMILON 製) を 2 枚用意し、その各ウェルに 1.0×10^6 cells/ml のアメーバ浮遊液を 0.5ml ずつ入れ (ウェルあたりのアメーバ数は 5×10^5 cells)、2-3 時間、25℃で静置しウェル底全面にアメーバを付着、伸展させた。
- 5) アスピレーター等を用いてウェル内の 10xAS を除去したのち、各希釈系列のレジオネラ属菌試験液を 0.1ml ずつ縦列に 10 個のウェルに加えた (5 ウ

ェル/プレート x2 プレート)。横列は希釈系列の濃度変化が生ずるようにした

(例：右に向かって 1/2、1/4、1/8、...、1 プレート最大 8 系列まで可能)。

なお試験に用いた希釈系列の菌液は、菌濃度測定のためにその 0.1ml を BCYE α 培地 3 枚に接種し、35℃で 4-5 日間培養した。

- 6) 乾燥を防ぐためマイクロプレートをビニールテープでシールし、35℃で 1 日間培養後、さらに各ウェルに 0.2ml ずつ 1xAS を加え 3 日間、合計 4 日間培養を継続した。
- 7) ウェル内でアメーバに感染後、菌が細胞内増殖したことを確認するため、ウェル内をピペッティングで穏やかに攪拌し、その 10 μ l を BCYE α に接種し 35℃で 5-6 日間培養した。
- 8) 希釈系列の各菌濃度について培養陽性であったウェル数を合計し、培養陽性率を算出した。

2-7. 50% Infectious dose (ID50) の算出：

本試験ではマイクロプレートアッセイ法により算出された各菌濃度における培養陽性率を、その濃度における菌の感染率と考え、別途測定したウェル内の菌数と感染率との関係から「用量 (菌数) - 作用 (感染率) 曲線」を求め、さらにプロビット法を用いて 50%感染菌量 (10 ウェル中 5 ウェルにおいて培養陽性となる菌数) を算出した。

C. 結果

3-1. ウェル内の菌数と感染率の関係

アメーバ内でのレジオネラの増殖はおよ