

図1. リアルタイム PCR による検量線

菌抽出 DNA (◆) を用いたリアルタイム PCR 結果に基づく検量線 (近似曲線) とプラスミド DNA (■) を用いて得られた検量線 (近似曲線) はほぼ平行関係にあり、DNA の増幅効率に差がないことが示された。また、y 軸との接点の差が 4 程度 (≒41.2-37.1) であることから、培養 4 日目の菌 1 cfu 相当から得られる 5S DNA 量は抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 17 (≒2⁴) コピーに相当するものと計算される。

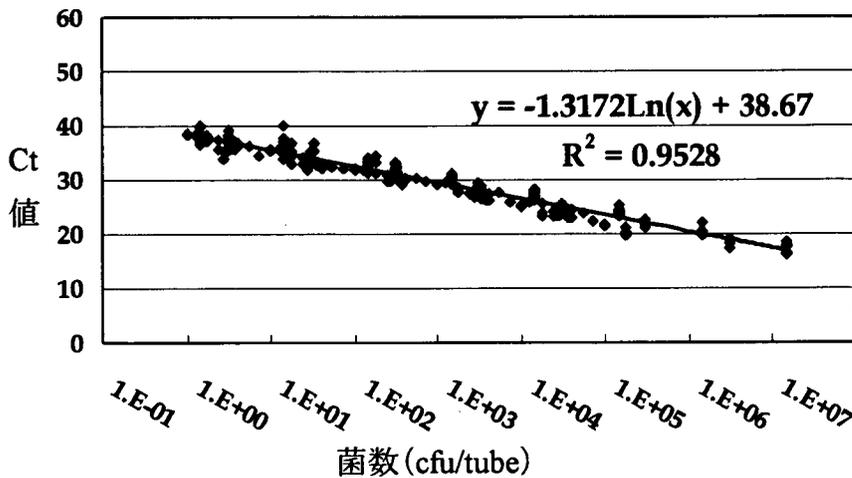


図 2. 3 種のリアルタイム PCR 装置を用いて測定した Ct 値の分布図とその近似曲線

異なった 3 種のリアルタイム PCR 装置 (SmartCyclerII、ABI Prism7000、DICE) を用いて、 $1 \times 10^0 \sim 1.5 \times 10^7$ cfu の範囲にある既知濃度の菌液の Ct 値を測定し、その分布図を作成した。

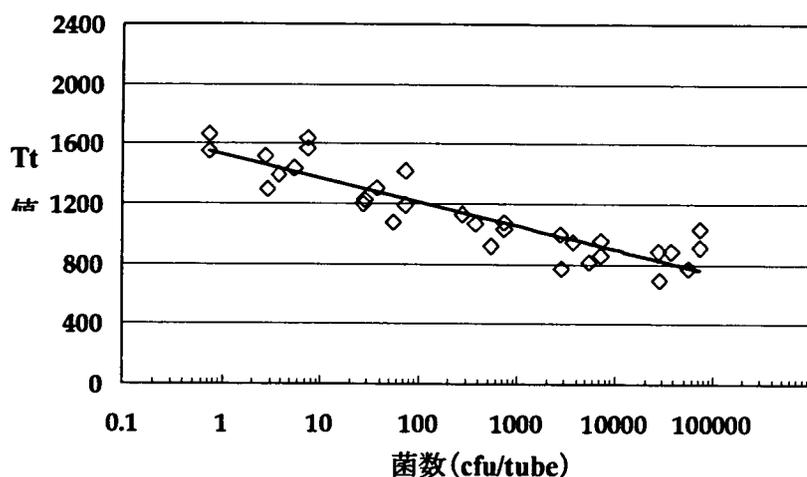


図 3. LAMP 法を用いた定量試験の試み

$1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^5$ cfu/tube の範囲の希釈菌液を用い、LAMP 法により Tt 値測定を行なった。測定ごとのばらつきは大きいものの、Tt 値と菌数には相関が認められ、定量試験への適用の可能性が示された。

表 2. 抽出法の違いによる回収率の比較

試料	DNA 抽出方法	Ct 値	cfu/tube	DNA 回収率 (%)	
				回収率	相対回収率*
無添加対照	アルカリ抽出	18.9	2.9×10^6	96	38
遠心濃縮物 (200mL)	アルカリ抽出	20.6	8.8×10^6	29	11
フィルター濃縮物 (100mL)	アルカリ抽出	21.7	4.1×10^5	14	5
無添加対照	酵素抽出	17.4	7.7×10^6	256	100
遠心濃縮物 (200mL)	酵素抽出	17.8	6.0×10^6	200	78
フィルター濃縮物 (100mL)	酵素抽出	18.0	5.4×10^6	179	70

*: フミン非添加、酵素抽出法に対する相対回収率

表 3 培養法と迅速法の定性結果

LAMP 法					
		陽性	陰性	測定不能	計
培養法	陽性	57	1	0	58
	陰性	94	211	3	308
	計	151	212	3	366
定量リアルタイム PCR 法					
		陽性	陰性	測定不能	計
培養法	陽性	58	0	0	58
	陰性	103	202	3	308
	計	161	202	3	366

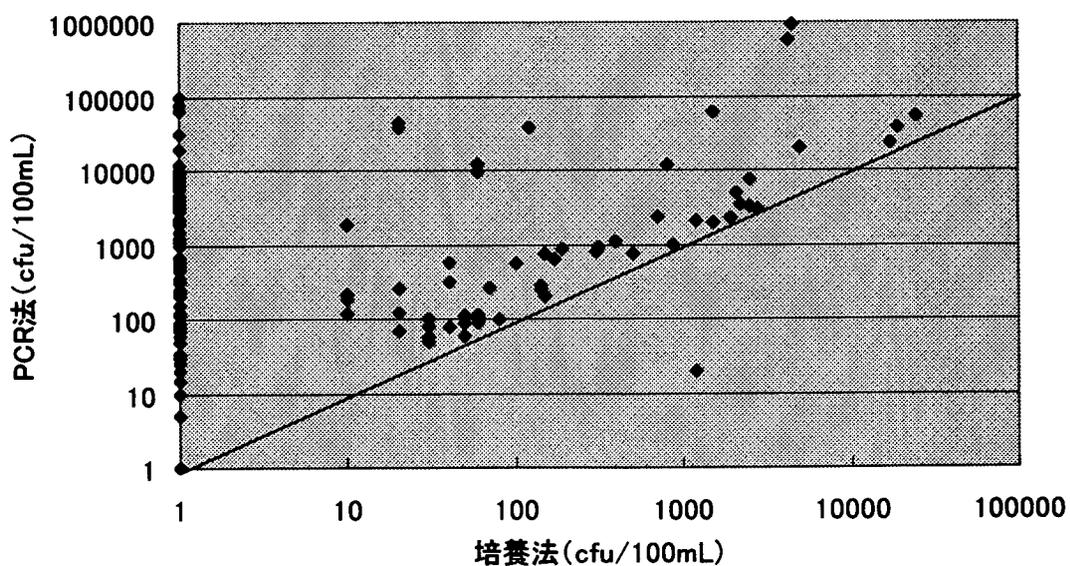


図 4 PCR法と培養法の関連

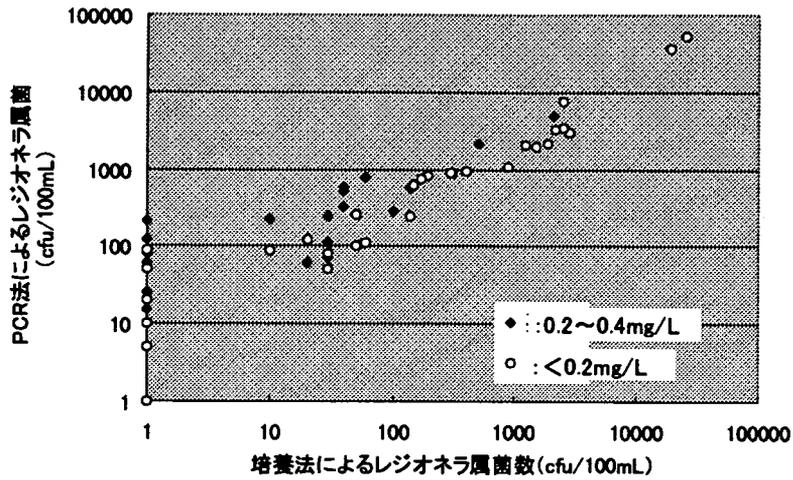


図5 遊離残留塩素0.4mg/L以下の試料中のレジオネラ属菌数

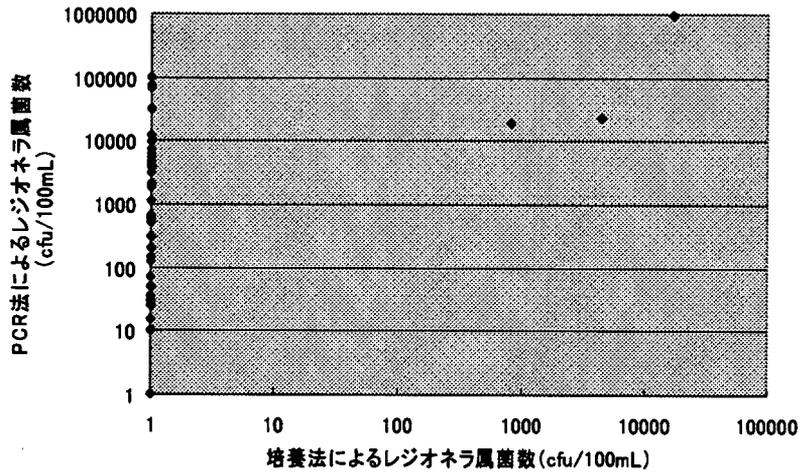


図6 遊離残留塩素1.0mg/Lを超過する試料中のレジオネラ属菌数

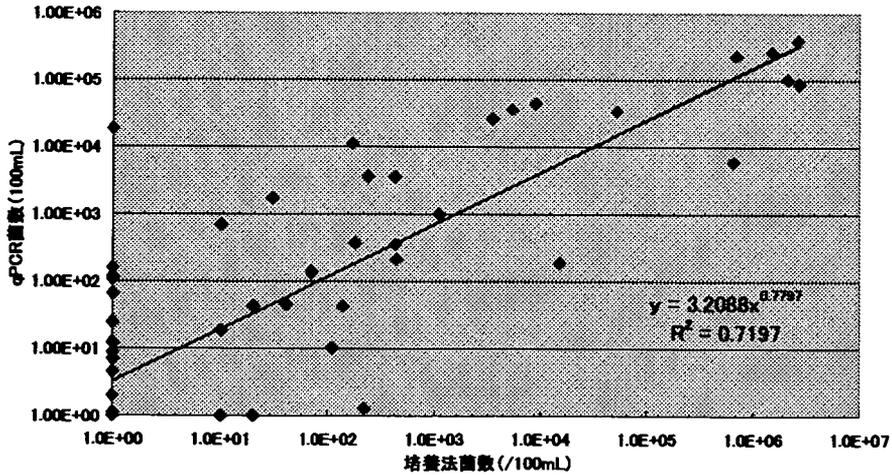


図7 qPCR菌数と培養法菌数の相関

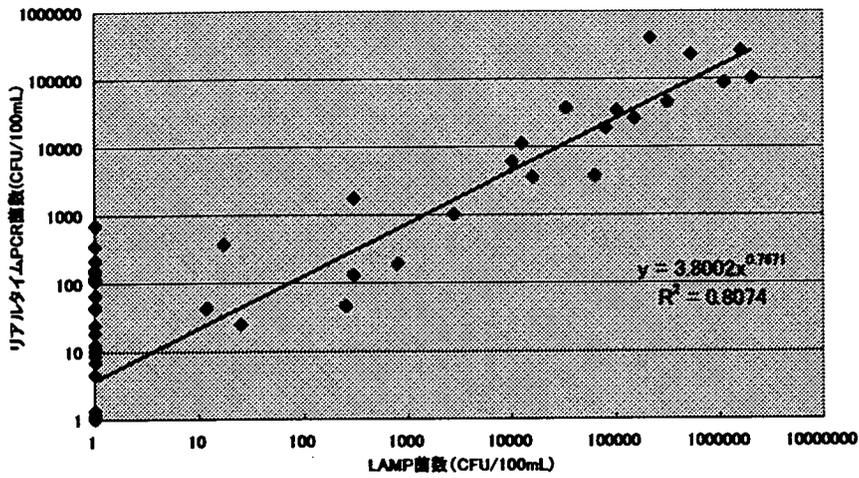


図 8 リアルタイムPCR菌数とLAMP菌数の相関

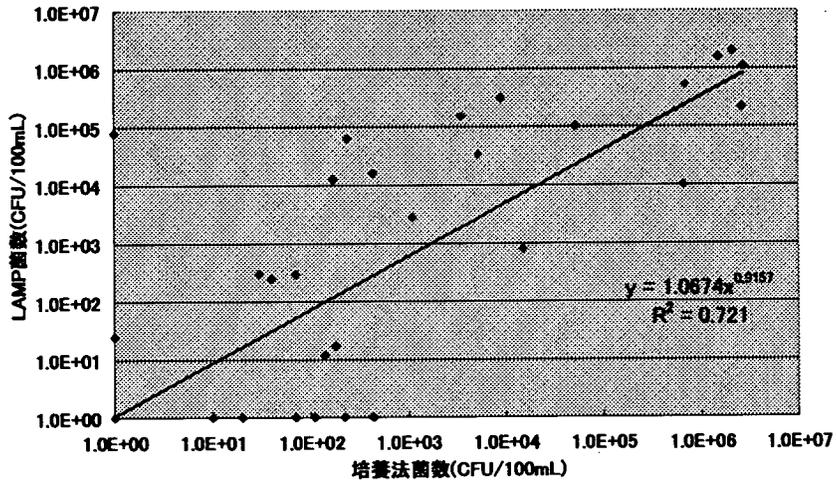


図 9 LAMP菌数と培養法菌数の相関

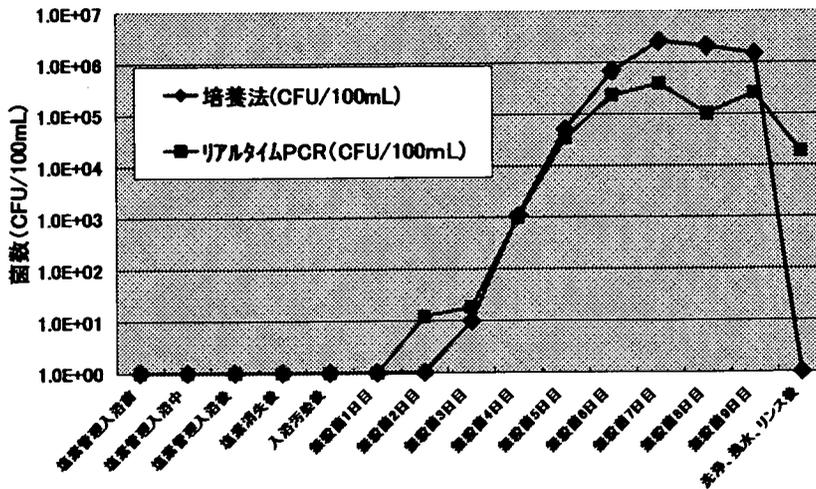


図 10 モデル浴槽でのレジオネラ属菌数の推移

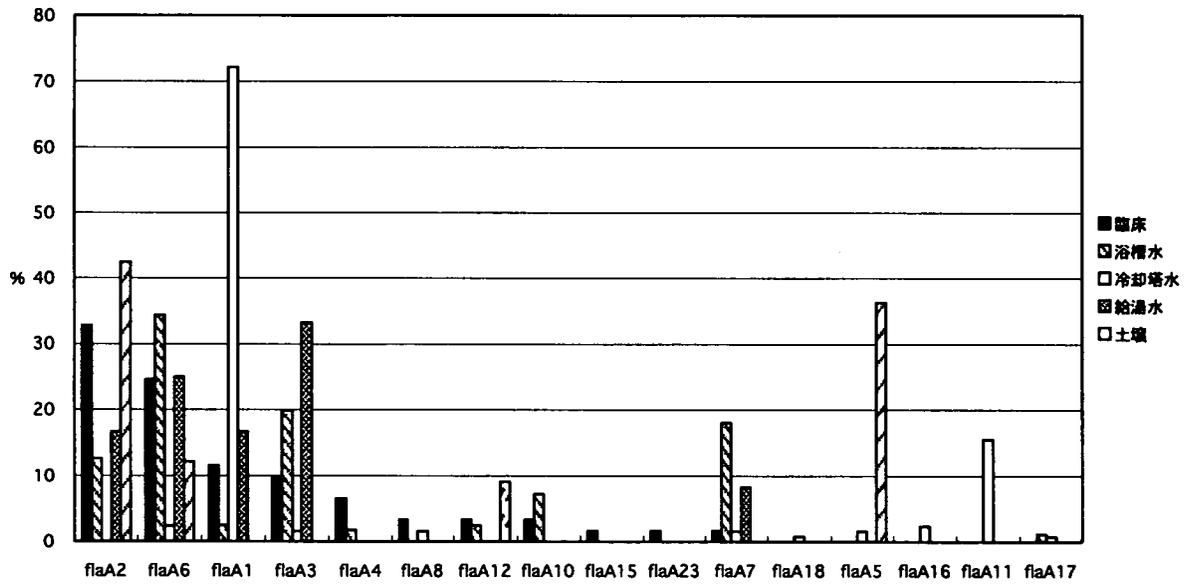
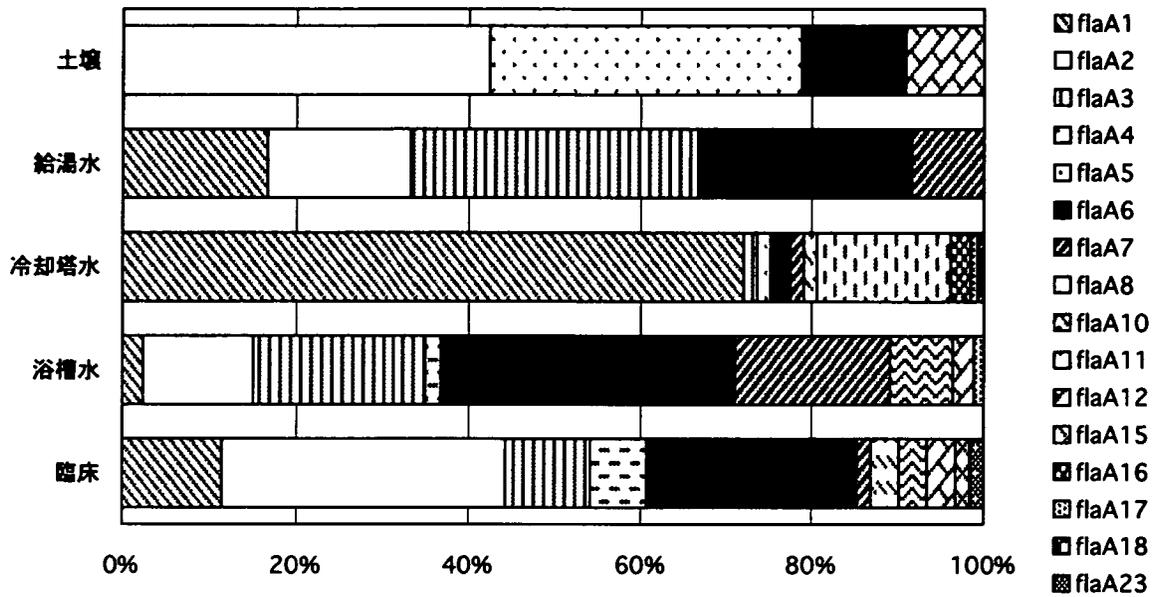


図 11 それぞれの由来からの分離株における各 *flaA* 遺伝子型の占める割合。(上) 分離株の由来別に各 *flaA* 遺伝子型の占める割合を示した。(下) 各 *flaA* 型についてそれぞれの由来株における頻度を示した。

II. 分担研究報告書

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

迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の
衛生管理手法に関する研究

遺伝子検査法を用いたレジオネラの定量方法

主任研究者	倉 文明	国立感染症研究所 細菌第一部
分担研究者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
	前川 純子	国立感染症研究所細菌第一部
	荒井 桂子	横浜市衛生研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
	田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	研究協力者	泉山 信司
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
山本 純子		タカラバイオ株式会社
安中 敏光		栄研化学株式会社

研究概要： 浴槽水等におけるレジオネラ検査において、培養法に替わる迅速検査法が求められている。近年、迅速検査法として多方面で遺伝子検査が導入されており、レジオネラ検出用の試薬も市販されていることから、それらの検出特性を検討すると共に定量試験への利用を検討した。該研究で検討した市販レジオネラ遺伝子検査キット(CycleavePCR Legionella Detection Kit および姉妹品(CycleavePCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit)、および Loopamp レジオネラ検出試薬キット E)は、臨床分離株やわが国の環境分離株をほとんど洩れなく検出した。なお、*L. londiniensis* はいずれの検査キットでも検出できなかった。本菌種は培養によって環境中からしばしば分離されることから、遺伝子検査法を選択する場合にはこの点に留意する必要がある。

CycleavePCR Legionella Detection Kit とその姉妹品はリアルタイム PCRとして開発されたものであるが、基準菌株として暫定採用した *L. pneumophila* 長崎 80-045 株(30℃、4日間培養)を用いた検討において定量 PCRとしての利用が可能であった。また、プラスミド DNA との対比によると、上記の培養条件で得られた菌 1 cfu 当りのゲノムはおよそプラスミド DNA の 16 コピーに相当していた。ゲノムあたりの 5S rDNA は 3 コピーとされていることから、培養 4 日目の菌体内には 5~6 倍のコピー数の 5S rDNA が含まれていると計算された。また、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E は迅速定性試験用に開発されたものであるが、条件設定を厳密に行えば定量試験法としての利用も可能と考えられた。いずれの試験方法においても、定量試験に際しては検査毎に検量線を作成することが基本である。

1. 研究目的

わが国におけるレジオネラ症の集団発生は入浴施設を介して起きており、浴槽水中でのレジオネラ増殖が大きな問題となっている。現行では浴槽水中のレジオネラ属菌検査は培養を基本としており、結果判定までに1週間程度を要している。このため、関係者からは迅速な汚染度評価方法に関する要望が強い。近年、迅速検査法として多方面で遺伝子検査が導入されており、レジオネラ検出用の試薬も市販されている。これまでに、遺伝子検査を用いて定性検査がなされており、迅速性に優れるものの、培養法との検査結果の不一致が指摘されたり(培養法に比べ陽性率が高い)、あるいは温泉水中の増幅阻害物質が問題とされてきた。また、50種以上存在するレジオネラ属菌に対する反応性については情報が得られていない。

指摘するまでもなく、遺伝子検査法では生菌、死菌を問わず、DNAが存在すれば陽性と判定される。したがって、死菌のみを含む浴槽水であれば培養法で陰性、遺伝子検査で陽性となる。このことが遺伝子検査法で陽性率が高くなる原因と考えられる(平成18年度、厚生労働科学研究報告書)。ところで、通常の浴槽水検査において死菌だけが多量に検出されるような現象は想定し難い(H18年度報告書)。したがって、浴槽水のレジオネラ検査においては死菌を検出ことに問題はなく、むしろ積極的に検出することが汚染実態の解明に繋がるものと考え。一方、温泉試料水にはしばしばフミン物質やその他の阻害物質が含まれており、これらの持込みがDNAの増幅反応に障害的に作用している。

当該研究においては、2種類の市販のレジオネラ遺伝子検査キット(CycleavePCR Legionella Detection Kit およびその姉妹品の CycleavePCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit、および Loopamp レジオネラ検出試薬キット E)を用い、それらの検出特性を検討すると共に定量試験への利用を検討した。培

養法では汚染指標として培養菌数(cfu: colony forming unit)が用いられているが、遺伝子検査法ではこれに相当する単位はなく、リアルタイムPCRでは増幅DNAが一定量に達するまでの反応サイクル数(Ct値)から反応に供された鋳型DNA量(ゲノム数やプラスミドのコピー数)が算定される。同様にLAMP法ではDNA増幅が一定量に達するまでの反応時間(Tt値)から鋳型DNA量を算定する試みがなされている。しかしながら、菌種が異なる場合、あるいは同一菌種であっても培養日数や培養条件が異なる場合には菌体内のゲノム数(鋳型DNA量)は容易に変動する(平成14年、吉田ら)。そのため、単純に《鋳型DNA量》を《cfu》に読み替えることは出来ない。そこで、基準となる菌種を選択し、厳密な培養条件のもとで得られた菌を用いて遺伝子検査と培養法による菌量計算を行い、両者の関係付けを行なった。

2. 研究方法および材料

2.1. 使用菌種

2.1.1. 検出特性試験に供した菌種

・ *Legionella pneumophila* の1~15血清群参照株16株、および untypable の3株、7菌種の14 biotypeを含む、50菌種、75株を使用した(表1:報告書末尾に添付)。基本的にレジオネラはBCYE α 培地で35 $^{\circ}$ C、4~7日間培養し、菌体よりDNAを精製した。ただし、*L. pneumophila* sub sp. *fraseri*、*L. beliardensis*、*L. cherrii*、*L. drozanskii*、*L. fallonii*、*L. gresilensis*、*L. maceachernii*、*L. nautarum*、*L. quateirensis*、*L. rowbothamii*、*L. santicrucis*、*L. steigerwaltii*、*Legionella* sp. LLAP-14株は30 $^{\circ}$ Cに培養温度を調整した。また、*L. donaldsonii*、*L. drozanskii*、*L. fallonii*、*L. feeleeii* biotype2、*L. gratiana*、*L. hackeliae* biotype2、*L. nautarum*、*L. rowbothamii*、*L. santicrucis*、*L. spiritensis* biotype2株は5%炭酸ガス存在下で培養した。

・レジオネラ属菌以外との交差反応性を検討するため、全国 5 箇所の浴槽水 24 検体から R2A 寒天平板培地を用いて 37℃、48 時間の培養で分離された菌のコロニー ($10^2 \sim 10^6$ コロニー) をすべて回収し、混合菌液を作製した。これより DNA を抽出し、 10^6 cfu/tube 相当の DNA を鋳型として、リアルタイム PCR および LAMP 反応に供した。

2.1.2. 定量試験に向けた暫定 *Legionella* 基準株

L. pneumophila serogroup 1 長崎 80-045 株を暫定的な基準株とした(斉藤ら、1981)。本菌株は 1980 年にレジオネラ肺炎患者より分離され、わが国における *L. pneumophila* serogroup 1 の基準株として広く用いられている。実験に先立ち、保存株を BCYE α 培地 (DIFCO) に植え、30℃、4 日間培養した。得られた菌を生理食塩水に McFarland No. 2 程度の濃度に懸濁した。これを原液とし、数段階の 10 倍希釈系列を作製し、希釈液ごとに DNA 抽出を行い、あわせて培養による菌数測定を行った。

2.2. DNA 抽出方法

DNA 抽出はアルカリ抽出法と中性域での酵素溶菌法(以下、酵素溶菌法)の 2 方法を用いた。

2.2.1. アルカリ抽出法: 市販の DNA 抽出用アルカリ試薬 (GL サイエンス) の仕様書に従い、菌の濃縮試料 100 μ L に 2 倍量の Buffer A を混和、次いで Buffer B および C を各 200 μ L 添加して混和する(この反応で析出物生成)。室温で 15,000rpm、5 分間の遠心により上清を得る。上清をシリカ・カラムに充填し、遠心により液相を除去する。カラムに Buffer D を 300 μ L 充填し、遠心洗浄する。次いで、カラムに Buffer E (DNA 溶出液) を 20 μ L 加え、液相を遠心回収する。

2.2.2. 酵素溶菌法: 菌の濃縮試料 100 μ L

に TE 緩衝液 50 μ L、1M NaCl 20 μ L、10% TritonX-100 液 10 μ L、20mg/mL Lysozyme (Sigma) 10 μ L を添加して 40℃、15 分間の処理を行なう。次いで、20mg/mL Proteinase K (Roche) 10 μ L 添加し、60℃、30 分間溶解反応を行う。75℃、5 分間加温後に激しく攪拌する。室温で 15,000rpm、3 分間の遠心分離を行い、上清を回収する。上清に Buffer AL (Qiagen QIAamp DNA mini kit) 200 μ L を添加・混合し、エタノール 200 μ L を加えた後にシリカ・カラム (GL サイエンス) に DNA を吸着させる。5,000 rpm、1 分間の遠心により除液し、Buffer AW1、300 μ L および Buffer AW2、300 μ L を用いて各 1 回の遠心洗浄 (10,000 rpm、1 分間) を行う。カラムに Buffer AE (DNA 溶出液) 20 μ L を添加して静置後、遠心 (10,000 rpm 1 分間) により DNA 溶出液を回収する。溶出 DNA は使用まで -20℃ で凍結保存する。ちなみに、DNA 回収用シリカ・カラムは少量の溶出液 (20 μ L) による回収用としてシリカ量が調整されているものを使用した。

2.2.3. プラスミド DNA: 5S rDNA の部分配列 (122bp; 一部の配列を置換) を pMD18-T Simple ベクターの T-Cloning サイトに導入したプラスミド DNA を用い、プラスミドのコピー数 (吸光度による定量とプラスミドの分子量からの計算値) と定量 PCR 反応による Ct 値から検量線を作成した。

2.3. 検査キットおよび試薬

2.3.1. リアルタイム PCR: Cycleave PCR Legionella Detection Kit および Cycleave PCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit を用い、SmartCycler 2 (Sepheid) を測定装置とした場合には前者のキットを、Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ; 以下、DICE RealtimePCR)、および ABI-7000 定量 PCR 装置 (Applied Biosystems) では後者のキット

を使用した。

2.3.2. **LAMP 法:** Loopamp レジオネラ検出試薬キット E(栄研化学)を用い、測定装置には LA-320C を使用した。

2.3.3. フミン酸保存液: 30mg/mL のフミン酸(和光純薬)溶液を用意し、直前によく攪拌して使用した。

3. 研究結果

3.1. 温泉水試料を考慮した DNA 抽出方法の検討:

温泉水等の地下水にはしばしばフミン質が含まれており、PCR 反応等の遺伝子増幅反応

に阻害的に作用することが指摘されている。そこで、予備実験としてフミン酸の混入による PCR 反応の阻害について確認した(表 2)。既知濃度の菌懸濁液 (1.2×10^7 cfu/tube) にフミン酸を 0.06mg/mL、または 0.6mg/mL となるように添加し、これを試料として通常のアルカリ抽出法により DNA を回収し(最終液量: 20 μ L)、そのうちの 5 μ L を PCR 反応に供した。その結果、フミン酸非添加対照ではほぼ期待通りの DNA 量が回収されたが、0.6mg/mL のフミン酸添加試料では著しい PCR 反応の阻害が見られ、非添加対照に対する相対回収率は 7% 程度にまで低下した。

表 2. フミン酸混入によるリアルタイム PCR 反応への影響

フミン酸添加量	Ct 値*	反応効率(%)		
		cfu/tube	反応効率	相対効率*
0 μ g/mL	18.4	3.9×10^6	132	100
60 μ g/mL	19.2	2.3×10^6	76	58
600 μ g/mL	22.2	2.9×10^5	10	7

* 増幅 DNA が一定量に達するまでの反応サイクル数

** フミン非添加対照に対する相対効率

そこで、DNA 抽出工程を中性域(pH 7.6 の TE 緩衝液使用)で行い、リゾチームおよび Proteinase K による溶菌、ついでシリカ・カラム(GL サイエンス)への吸着による DNA 回収

を行った。この回収操作により、フミン酸添加試料から得た鋳型 DNA による反応効率は非添加群と遜色ない程度に向上した(表 3)。

表 3. 酵素溶菌法によるフミン質添加試料からの DNA 回収効率

菌濃度		フミン酸非添加群		フミン酸添加群			希釈段階ごとの
cfu/tube	Ct 値	cfu/tube	反応効率(%)	Ct 値	cfu/tube	反応効率(%)	反応効率(%)*
3×10 ⁵	21.1	6.0×10 ⁵	192	21.2	5.7×10 ⁵	185	97
3×10 ⁴	25.6	2.6×10 ⁴	85	25.6	2.6×10 ⁴	84	99
3×10 ³	28.9	2.7×10 ³	88	29.4	1.9×10 ³	62	71
3×10 ²	31.9	3.2×10 ²	104	31.7	3.8×10 ²	123	118
3×10 ¹	34.8	4.5×10 ¹	146	34.8	4.2×10 ¹	135	93
3×10 ⁰	38.4	3.7×10 ⁰	121	37.5	6.7×10 ⁰	217	179

*: 各希釈段階での非添加群に対するフミン酸添加群の反応効率

次いで、フミン質を含み、PCRの反応阻害が確認されている温泉試料水に既知の菌数(1.2×10⁸ cfu/mL)のレジオネラを添加した菌液を用意し、酵素溶菌法による改善が見られるかを改めて検討した。アルカリ抽出法と酵素抽出法により上述のサンプル 100μLから鋳型 DNA を抽出し(20μL)、その内の 5μL を用いてリアルタイム PCR の反応を行った。表 4. には非添加対照試料を酵素抽出法で抽出した結果を基準として、各条件での相対回収率を示した。抽出

法の違いにより無添加対照試料の結果を比較すると、酵素溶解法はアルカリ抽出法に比べ小さな Ct 値となっており、鋳型 DNA 回収率が良い傾向がみられた。また、酵素溶解法は温泉試料水からの DNA 回収にも優れており、アルカリ法に比べはるかに高い回収率が得られた。これに反して、アルカリ抽出法で求めた Ct 値は明らかに大きな値となっており、反応阻害が確認された(表 4)。

表 4. 抽出法の違いによる回収率の比較

試料	DNA 抽出方法	Ct 値	cfu/tube	DNA 回収率(%)	
				回収率	相対回収率*
無添加対照	アルカリ抽出	18.9	2.9×10 ⁶	96	38
遠心濃縮物(200mL)	アルカリ抽出	20.6	8.8×10 ⁶	29	11
フィルター濃縮物(100mL)	アルカリ抽出	21.7	4.1×10 ⁶	14	5
無添加対照	酵素抽出	17.4	7.7×10 ⁶	256	100
遠心濃縮物(200mL)	酵素抽出	17.8	6.0×10 ⁶	200	78
フィルター濃縮物(100mL)	酵素抽出	18.0	5.4×10 ⁶	179	70

*: フミン非添加、酵素抽出法に対する相対回収率

得られた結果から、該研究では以下の方法で鋳型 DNA の抽出・精製を行なうこととした

(詳細は別添資料参照)。その要約を以下に示す。

1. 500mL の試料水をメンブランフィルター(孔径 ≤ 0.45μm)でろ過
2. 適量の滅菌水で洗浄
3. ろ過回収物を 5mL の滅菌水に懸濁
4. 2ml を取り、遠心濃縮
5. 沈渣を適量 (0.2mL) の TE 緩衝液 (pH7.6) に懸濁し
6. Lysozyme を加え 15 分間反応
7. Proteinase K を添加して 30 分間の溶菌処理
8. 精製試薬 (QIAamp mini kit) とシリカ・カラム (GL カラム) の組み合わせによる DNA 精製
9. 溶出液 20μl により DNA を回収

3.2. 検出特性試験

Legionella 属に属する 51 菌種、75 株(含む、*L. pneumophila* SG 1~15、untypable 3 株、7 菌種の 14 biotype) を用いてリアルタイム PCR 試薬キット、および LAMP 試薬キットの検出特性を検討した(表 1)。このうち、臨床分離株は 13 種 26 株で、他は環境分離株である。リアルタイム PCR 法では 10 cfu/tube 相当の DNA 量を用いて 40 サイクル以内の増幅反応が閾値を超えた場合に「検出可能な菌種・菌株」とし、 10^4 cfu/tube 相当以上の鋳型 DNA を用いても増幅反応が閾値に達しない場合を「検出不可能な菌種・菌株」とした。また、LAMP 法では 60 cfu/tube 相当の鋳型 DNA 以下で増幅反応が閾値を越えた場合に「検出可能な菌種・菌株」とし、 10^4 cfu/tube 相当以上の鋳型 DNA 量を用いても増幅反応が閾値に達しなかった場合を「検出不可能な菌種・菌株」とした。

リアルタイム PCR では 39 菌種 62 株の検出が可能であった。LAMP 法では 37 菌種 61 株が検出可能と判断された。この中には LAMP 法で *L. birninghamensis* が不検出となったのを除き、*L. pneumophila* 血清群 1~15、および臨床分離株が含まれていた。

一方、リアルタイム PCR では 11 菌種 13 株 (*L. geestiana* は 10 cfu/tube 相当の鋳型 DNA では不検出、100 cfu/tube 相当以上で陽性)、また、LAMP 法では 13 菌種 14 株が不検出となったが、それらの多くはわが国での分離例がないか、あるいは稀にしか分離されない菌種に限られた。なお、環境からはしばしば *L. londiniensis* が培養分離されているが、いずれの方法によっても不検出であった。

一方、非特異反応の検証として、全国 5 地域で採取し採取した浴槽水試料 24 検体から従属栄養細菌を分離し、その DNA を鋳型として両方法により DNA 増幅を試みた。すなわち、24 件の試料水から R2A 培地で分離されたコロニーを全て回収し、混合菌液を作製した。これより、 10^6 cfu/tube 程度の希釈菌液を調製し、鋳型 DNA を抽出した。これを用い両検査方法により DNA 増幅を試みた。その結果、いずれの反応においても陽性反応は認められなかった。

3.3. 定量 PCR

L. pneumophila SG1 80-045 株を用いて、定量 PCR による Ct 値と培養による菌数測定と比較から両者の相関関係(検量線の作成)を検討した。BCYE α 培地上で 4 日間培養の菌を用い、McFarland No. 2 程度の濃度の菌液を作成した。これを原液として菌の段階希釈液を用意し、それぞれにつき上述の酵素溶菌法により鋳型 DNA を調整した。得られた鋳型 DNA を用いて定量 PCR を行い、Ct 値を求めた。同時に、各希釈濃度の菌液を適宜希釈し、BCYE α 培地を用いて 37℃、7 日間の培養を行い、形成されたコロニー数から各希釈菌液の菌数を測定した。定量 PCR により得られた Ct 値を縦軸、培養法によって得られた菌数 (cfu/ml) を横軸として作成した分布図(図1)から両者間には[式1]で近似される強い相関関係が確認された。

$$y = -1.42 \ln(x) + 37.1, (r^2=0.9964) \dots [式1]$$

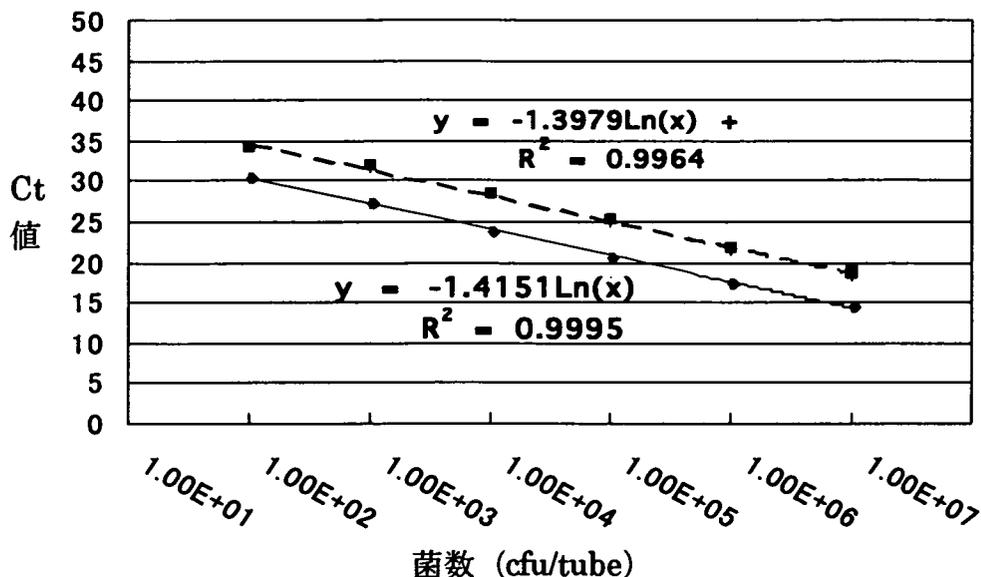


図 1. リアルタイム PCR による検量線

菌抽出 DNA (◆) を用いたリアルタイム PCR 結果に基づく検量線 (近似曲線) とプラスミド DNA (■) を用いて得られた検量線 (近似曲線) はほぼ平行関係にあり、DNA の増幅効率に差がないことが示された。また、y 軸との接点の差が 4 程度 (≒ 41.2-37.1) であることから、培養 4 日目の菌 1 cfu 相当から得られる 5S DNA 量は抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 17 (≒2⁴) コピーに相当するものと計算される。

3.4. プラスミド DNA を鋳型とした定量 PCR による検量線

また、5S rDNA の部分配列 (122bp; 一部の配列を置換) を導入したプラスミド DNA を用い、

プラスミドのコピー数と定量 PCR 反応による Ct 値から検量線を作成した。得られた検量線は [式2] で近似された。

$$y = -1.40 \ln(x) + 41.2, (r^2=0.9995) \dots [式 2]$$

菌抽出 DNA を用いたリアルタイム PCR 結果に基づく検量線 (近似曲線) とプラスミド DNA を用いて得られた検量線 (近似曲線) はほぼ平行関係にあり、両者において DNA の増幅効率に差がないことが示された。また、両曲線の接点の差が 4 程度 (≒41.2-37.1) であることから、計算上では培養 4 日目の菌 1 cfu 相当から得られる 5S DNA 量は抽出効率や反応効率等の

諸条件を含めてプラスミド 16 (≒2⁴) コピーに相当していた。

また、3 種類の PCR 装置を使用し、2×10¹ ~ 1.5×10⁷ cfu の範囲にある既知濃度の菌液の Ct 値を少なくとも 3 回以上測定し、その分布図 (図 2) と近似曲線 [式 3] を計算した。SmartCyclerII (CycleavePCR Legionella Detection Kit 使用)、DICE および ABI

Prism7000 (CycleavePCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit 使用)により得られた近 似曲線は

$$y = -1.39 \ln(x) + 39.22 \quad (r^2=0.975) \quad \dots [式3]$$

$$y = -1.37 \ln(x) + 37.82 \quad (r^2=0.975) \quad \dots [式4]$$

$$y = -1.26 \ln(x) + 38.63 \quad (r^2=0.950) \quad \dots [式5]$$

と計算され、3 装置間の測定誤差は僅かであった。

また、これらのデータを 1 つにまとめたものが図 3 で、下述の近似式[式6]が得られた。

$$y = -1.32 \ln(x) + 38.7, \quad (r^2=0.9528) \quad \dots [式6]$$

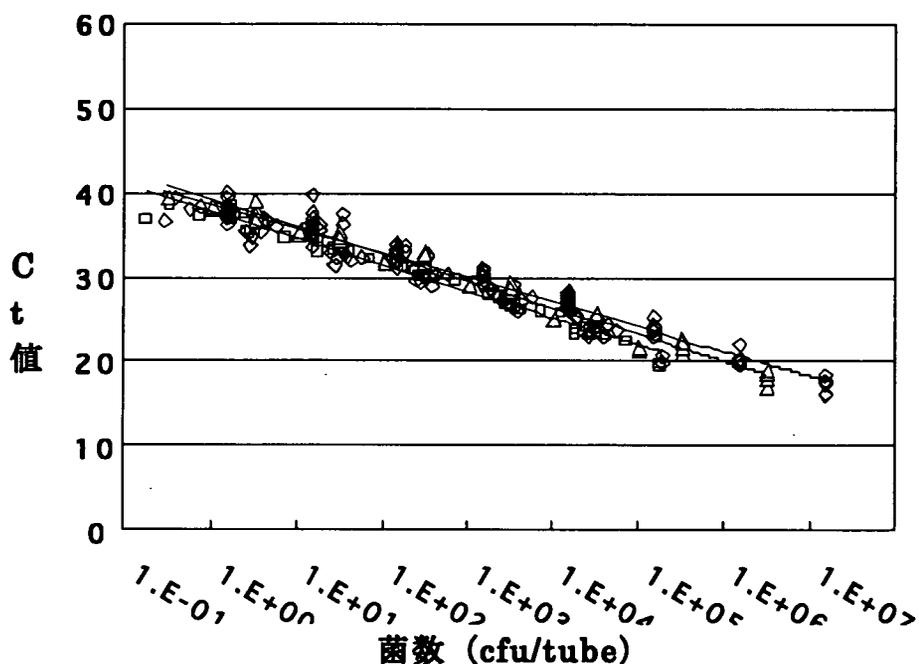


図 2. 3 種類のリアルタイム PCR 装置を用いた Ct 値測定結果

SmartCyclerII (Δ)、DICE (\square) および ABI Prism7000 (\diamond) による Ct 値の分布図とその近似曲線を示す。それぞれの近似式は $y = -1.39 \ln(x) + 39.22$ ($r^2=0.975$)、 $y = -1.37 \ln(x) + 37.82$ ($r^2=0.975$)、および $y = -1.26 \ln(x) + 38.63$ ($r^2=0.9502$) であった。その結果、異なった PCR 装置を用いても得られる Ct 値に大きな誤差は生じな

図3で明らかなように、同一の菌数での Ct 値の誤差は菌数が少ない試料において大きくなる傾向が見られた。例を示すと、ABI7000 を用いた場合の 1.5×10^1 cfu/tube の Ct 値 ($n=17$) の平均値 (\pm SD) は $35.9 (\pm 1.4)$ で、菌数 (cfu) に換算して最大7倍程度 ($\approx 2^{2.8}$) の誤差と計算された(表 5)。また、SmartCyclerII を用いた

場合 3.1×10^1 cfu/tube の Ct 値 (\pm SD) は $34.9 (\pm 0.24)$ と誤差はさらに小さく、菌数に換算した誤差は 1.4 倍程度 ($\approx 2^{0.5}$) と計算された(表 5)。なお、該検査方法では 1 cfu/tube に相当する鋳型 DNA 量で確実に陽性反応が得られた(図 3)。

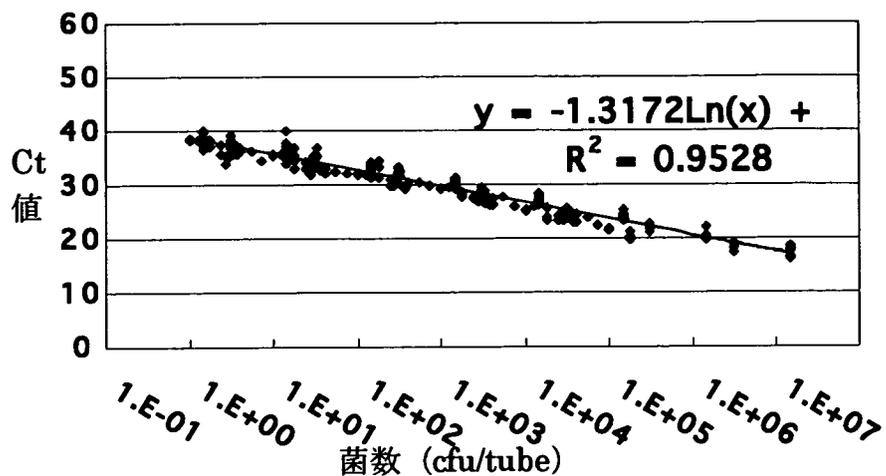


図 3. 3 種のリアルタイム PCR 装置を用いて測定した Ct 値の分布図とその近似曲線
 異なった 3 種のリアルタイム PCR 装置 (SmartCyclerII、ABI Prism7000、DICE) を用いて、
 $1 \times 10^0 \sim 1.5 \times 10^7$ cfu の範囲にある既知濃度の菌液の Ct 値を測定し、その分布図を作成した。

	Ct 値	
	1.5x10 cfu/tube	3.1x10cfu/tube
	33.8	34.8
	34.7	34.9
	35.0	35.0
	35.1	34.7
	35.2	35.4
	35.2	34.9
	35.3	35.0
	35.3	-
	35.5	-
	35.5	-
	35.7	-
	36.0	-
	36.3	-
	36.6	-
	37.1	-
	37.7	-
	39.9	-
平均値	35.9	34.9
SD	1.4	0.24

表 5. Ct 値の測定誤差

ABI7000を用いた場合の 1.5×10^1 cfu/tube の Ct 値 (n=17) の平均値 (\pm SD) は $35.9 (\pm 1.4)$ で、菌数 (cfu) に換算して最大 7 倍程度 ($\approx 2^{2.8}$) の誤差と計算された。また、SmartCyclerII では 3.1×10^1 cfu/tube の Ct 値 (n=7) の平均値 (\pm SD) は $34.9 (\pm 0.24)$ と誤差はさらに小さく、菌数に換算した誤差は 1.4 倍程度 ($\approx 2^{0.5}$) と計算された。

3.5. LAMP 法による菌数定量の試み

本来、LAMP 法は定性試験として開発されているものであるが、DNA 増幅が始まり、反応液の濁度が基準に到達する時間(Tt 値)が鋳型 DNA 量に相関し、DNA 量が増すにつれて短くなる。そこで、菌数とTt値による分布図を作成して、両者の相関性について検討した。

定量 PCR 法と同様に、*L. pneumophila* (SG180-045 株、30℃、4 日間培養)の菌液を用い、概ね $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^5$ cfu/tube とな

るように希釈菌液を作製し、それぞれの希釈菌液につき酵素溶菌法により鋳型 DNA を調製し、同時に培養による菌数測定を行った。得られた鋳型 DNA を用いて LAMP 法 (Loopamp レジオネラ検出試薬キット E; 栄研化学) により各希釈菌液の Tt 値を求めた。菌数と Tt 値により作成された分布図 (図 4) から近似曲線 [式 7] を得た。Tt 値と菌数には相関が認められ、定量試験への適用の可能性が示された。

$$y = -68.8 \ln(x) + 1530 \quad (r^2 = 0.8098) \quad \dots\dots\dots \text{[式 7]}$$

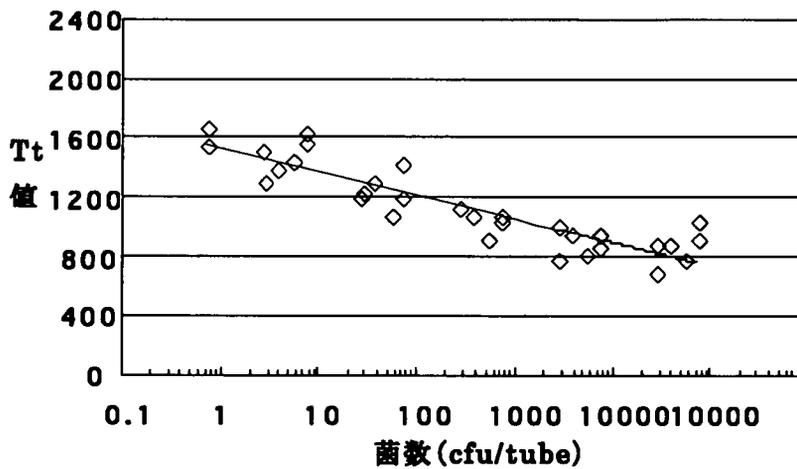


図 4. LAMP 法を用いた定量試験の試み

$1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^5$ cfu/tube の範囲の希釈菌液を用い、LAMP 法により Tt 値測定を行なった。測定ごとのばらつきは大きいものの、Tt 値と菌数には相関が認められ、定量試験への適用の可能性が示された。

4. 考察

レジオネラの迅速検査法としてリアルタイム PCR 試薬が市販されていることから、浴槽水検査への利用が可能か検討した。温泉水等は泉種により多様な塩類やフミン等の有機物が含まれる可能性があり、DNA 増幅反応の阻害が指摘されている。予備実験においてフミン質による PCR 反応阻害が確認されたことから、鋳型 DNA にフミン質の混入(持ち込み)を防ぐ抽出

工程を提案した。すなわち、浴槽水を[レジオネラをフィルターろ過 → 中性域で酵素処理による溶菌 → シリカカラムによる DNA 回収 → 溶出]の順で精製することとした(別添試料)。本方法では DNA 抽出の全工程を中性域で行っており、フミン質の溶出を防ぐことで鋳型 DNA 溶液への持込を減らした。

Legionella 属に属する 50 菌種、75 株を用いて該検査キットの検出特性について検討した

ところ、Cycleave PCR Legionella Detection Kit 試薬を用いたリアルタイム PCR では 39 菌種 62 株が検出可能であった(表4)。すなわち、*L. pneumophila* 血清群 1~15、および臨床分離株はすべて検出可能であったこと、一方、検出不可能と判定された 11 菌種 13 株は *L. londiniensis* を除き、わが国での分離例がないものかごく稀にしか分離されないものに限られていたことから、実際の検査への利用が可能と判断された。同様に、LAMP 法では 37 菌種 61 株が検出可能で、実際の検査への利用は可能と考えられた。ただし、LAMP 法で不検出となった菌種の中に臨床菌種である *L. birminghamensis* が含まれているが、本菌種による症例は免疫抑制状態にあった臓器移植患者の 1 例が知られているのみで(Wilkinson et al., 1987)、臨床的には必ずしも重要菌種とは考えられない。なお、いずれの検査キットによっても *L. londiniensis* が検出されなかった。本菌種は培養によって環境中からしばしば分離されている(岡田ら、2005)。培養と迅速検査の不一致は避けなければならないが、標的遺伝子の配列解析から *L. londiniensis* の遺伝子配列は他の *Legionella* 属菌と相同性が低く(unpublished data)、同時検出に向けた検査キットの開発には困難が予想される。したがって、*L. londiniensis* に関しては専用の検出キットの開発等による別途対応が望まれるものと考えられる。

培養4日目の *L. pneumophila* SG1 長崎 80-045 株の若いコロニーを当面の基準株として用いた。適宜濃度調整した菌液の段階希釈液を用いてリアルタイム PCR による Ct 値測定と、培養による菌数を求めた。得られた結果をもとに作成した散布図は片対数グラフ上で高い直線性($r^2=0.9995$)を示しており(図1)、定量性は十分に保証されていた。また、標的遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて分布図を作成したところ、菌由来 DNA の検量線と平行な近似曲線が得られた。両者の関係から、1cfu 相

当の DNA は概ねプラスミド 16コピーに相当するものと計算された。ちなみに、レジオネラ属菌においてはゲノムあたりの 5S rDNA のコピー数は3個とされており、したがって培養4日目の菌体内には5ないし6倍のコピー数が存在していた計算となる。この結果を受けて、検量線の作製には培養調製された基準株 DNA に代えてプラスミド DNA の利用が可能と判断され、簡易な検量線の用意につながるものと期待される。現在、汎用されているリアルタイム PCR 装置は数種類知られており、このうちの3種類の PCR 装置(SmartCyclerII、ABI Prism7000、DICE)を用いて検量線を作成したところ(図2)、機種による若干の系統差は存在しても僅かで、菌濃度の薄い(1.5×10^1 cfu/tube)ところで菌数(cfu)に換算して最大で7倍程度、菌濃度の濃い(1.5×10^4 cfu/tube)ところでは菌数換算で3倍以内に収まっていた。

リアルタイム PCR 法における検出限界は 1 cfu/tube に相当する鋳型 DNA 量よりも少ないところにあるが(図3)、仮に1cfu/tubeを下限值と仮定した場合、200 mL の試料水(500 mL の試料水を 5 mL に濃縮して、そのうちの 2 mL を使用)を用いて DNA を回収、最終の DNA 溶液を 20 μ L に濃縮し、そのうちの 5 μ L を反応に供するものとすれば、現行の基準である 10 cfu/100mL よりもはるかに少ない 2 cfu/100mL の試料水まで検出可能と計算される。また、LAMP 法試薬キットの説明書によれば 60 cfu/tube に相当する鋳型 DNA 量での反応を保証しているが、実際的な検出限界は 1 cfu/tube 程度まで下げることが可能であった。したがって、実際の検査に際してはリアルタイム PCR と同様に 10 cfu/100mL よりも少ない試料からの検出が可能と判断された。

5. 結論

遺伝子検査によるレジオネラ検査法について検討した。本研究の成果として、温泉水を考慮した DNA 抽出法を確立した。市販されてい

る遺伝子検査用試薬キットの性能試験を行なったところ、リアルタイムPCRおよびLAMP法による菌数測定が可能となり、その際、示される菌数は今回の検討で暫定的に基準株とした *L. pneumophila* 80-045 株(30℃、4日間培養)に換算した菌数で表わすことができる。また、両検査キットはわが国に分布するレジオネラ属菌をほとんど網羅的に検出できることが示された。

6. 参考文献

1. 齊藤厚、下田照文、長沢正夫、田中光、伊藤直美、重野芳輝、山口恵三、広田正毅、中富昌夫、原耕平 本邦ではじめての Legionnaires disease(レジオネラ症)の症例と検出菌の細菌学的性状. 感染症誌 55: 124-128, 1981.
2. 岡田美香、河野喜美子、倉文明、前川純子、渡辺治雄、八木田健司、遠藤卓郎、鈴木泉. 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例—I. 発症状況と環境調査 感染症誌 79: 365-374, 2005.
3. 平成18年度 厚生労働科学研究費補助金

(地域健康危機管理研究事業) 総合研究報告書「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」主任研究者: 遠藤卓郎

4. Wilkinson HW, Thacker WL, Benson RF, Polt SS, Brooking EB, Mayerry WR, Brenner DJ, Gilley RG, & Kirklin JK 1987. *Legionella birminghamensis* sp.nov. Isolated from a Cardiac Transplant Recient. J Clin Microbiol 25(11): 2120-2122.
5. 厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)平成14年度研究報告書「生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究」主任研究者: 吉田真一

7. 研究発表 なし

表1 リアルタイムPCRおよびLAMP法の検出特異性

ID-No	Species	Serogroup or Biotype	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	qPCR	LAMP	
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. belliardensis</i>		E	Montbelliard A1	700512	-	+
4	NIIB0057	<i>L. birminghamensis</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. drozanskii</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. erythra</i>	1	E	SE-32A-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. feeleii</i>	1	E	WO-44C	35072	+	+
19	NIIB0689	<i>L. feeleii</i>	2	C	691-WI-H	35849	+	+
20	NIIB0193	<i>L. geestiana</i>		E	1308	49504	+	-
21	NIIB0147	<i>L. gratiana</i>		E	Lyon 8420412	49413	+	+
22	NIIB0404	<i>L. gresilensis</i>		E	Gre'oux 11D13	700509	-	+
23	NIIB0690	<i>L. hackeliae</i>	1	C	Lansing 2	35250	+	+
24	NIIB0691	<i>L. hackeliae</i>	2	C	798-PA-H	35999	+	+
25	NIIB0053	<i>L. israelensis</i>		E	Bercovier 4	43119	-	-
26	NIIB0046	<i>L. jamestowniensis</i>		E	JA-26-G1-E2	35298	+	+
27	NIIB0014	<i>L. jordanis</i>		E	BL-540	33623	+	+
28	NIIB0148	<i>L. lansingensis</i>		C	1677-MI-H	49751	+	+
29	NIIB0194	<i>L. londiniensis</i>	1	E	1477	49505	-	-
30	NIIB1255	<i>L. londiniensis</i>	2	E	Mulhouse 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. maceachernii</i>		E	PX-1-G2-E2	35300	+	+
34	NIIB0008	<i>L. micdadei</i>		C	TATLOCK	33218	+	+
35	NIIB0116	<i>L. moravica</i>		E	316-36	43877	+	-
36	NIIB0195	<i>L. nautarum</i>		E	1224	49506	+	+
37	NIIB0036	<i>L. oakridgensis</i>		E	OR-10	33761	-	+
38	NIIB0042	<i>L. parisiensis</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>pascullei</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. quateirensis</i>		E	1335	49507	+	-
59	NIIB0260	<i>L. quinlivanii</i>	2	E	LC870	BAA-538	+	-
60	NIIB0407	<i>L. rowbothamii</i>		E	LLAP-6	700991	+	+
61	NIIB0048	<i>L. rubrilucens</i>		E	WA-270A-C2	35304	+	+
62	NIIB0039	<i>L. sainthelensi</i>	1	E	Mt St Helens 4	35248	+	+
63	NIIB0207	<i>L. sainthelensi</i>	2	C	Ly176.97	700517	+	+
64	NIIB0409	<i>L. santacrucis</i>		E	SC-63-C7	35301	+	+
65	NIIB0149	<i>L. shakespearei</i>		E	214	49655	+	-
66	NIIB0043	<i>L. spiritensis</i>	1	E	Mt St Helens 9	35249	-	+
67	NIIB0261	<i>L. spiritensis</i>	2	E	ML76	BAA-537	-	+
68	NIIB0041	<i>L. steigerwaltii</i>		E	SC-18-C9	35302	+	+
69	NIIB0262	<i>L. taurinensis</i>		E	Turin I no 1	700508	+	+
70	NIIB0117	<i>L. tucsonensis</i>		C	1087-AZ-H	49180	+	+
71	NIIB0032	<i>L. wadsworthii</i>		C	81-716A	33877	+	+
72	NIIB0206	<i>L. waltersii</i>		E	2074-AUS-E	51914	+	+
73	NIIB0197	<i>L. worsleiensis</i>		E	1347	49508	+	-
74	NIIB0305	<i>Legionella</i> genomospecies 1		E	2055-AUS-E	51913	+	-
75	NIIB0306	<i>Legionella</i> sp.		E	LLAP-14	700313	+	-