

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)

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

平成19年度分担研究報告書

浴槽水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討、
および循環式モデル浴槽による迅速検査の有用性の確認

分担研究者 杉山寛治 静岡県環境衛生科学研究所

研究協力者

神田 隆 静岡県環境衛生科学研究所 高橋奈緒美 静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨:入浴施設の浴槽水の濃縮試料からレジオネラ属菌DNAを抽出し、その核酸をリアルタイムPCR法(qPCRと略す)とLAMP法の2方法で、1時間程度の反応時間で定量検出を可能にした。特に、レジオネラ属菌数が $10^2 \sim 10^3$ CFU/100mL以上の浴槽水においては、核酸検出法と培養法の菌数に相関がみとめられた。qPCR法とLAMP法の菌数の比較ではさらにより相関が得られたが、qPCR法の検量線は直線性が高いのに比べ、LAMP法では検量線の作成が困難で、検出感度に影響を与えていた。温泉水の検体でも qPCR法で増幅阻害は認められず、今回用いたDNAの抽出・精製法は温泉成分に係らず採用できることがわかった。

さらに、循環式モデル浴槽の実験から、qPCR法を用いて、適切な塩素管理がされ菌検出がない期間と、無殺菌循環で菌数の増加した期間の菌数の変化を正確につかむことができた。qPCR法は現場の浴槽水のレジオネラ属菌検査に充分応用できることが示された。

A. 研究目的

現在、浴槽水のレジオネラ属菌検査法としては培養法が広く用いられている。培養法は結果を得るまでに7~10日間を要するため、患者発生時の推定原因施設調査などの緊急時や、汚染施設の洗浄・殺菌後の安全性確認調査などの際には、より迅速な検査法の開発が求められている。そこで、入浴施設の浴槽水の濃縮試料からレジオネラ属菌DNAを抽出し、その核酸をリアルタイムPCR法(qPCRと略す)とLAMP法の2方法で、1時間程度の反応時間で定量検出を試みた。

ここでは、核酸検出法2方法の検出感度、定量性などについて培養法と比較検討した。

B. 研究方法

1. 供試した浴槽水と検査法

検査に供した浴槽水は、温泉水を使ったもの40検体、水道・井水の沸かし湯のもの19検体、所内に設置したモデル浴槽の循環浴槽水15検体の計74検体である。

培養法は、浴槽水400mLの100倍遠心濃縮液の100 μ LをGVPC寒天培地(ピオメリュー社, 生培地)に塗抹培養し、分離株は定法に

て同定した。

核酸検出法の手順は以下のとおりである。

1) 検水500mLをメンブランフィルター(直径47mm、0.2 μ m、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE)で吸引ろ過する。

2) 注射用蒸留水(大塚製薬)50mLでメンブランフィルター及びカップを洗浄し、吸引ろ過する。このとき、カップ壁面を洗うように滅菌水をピペットで流しかける。

3) 引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50mL 滅菌コニカルチューブに入れる。

4) チューブに 5.0mL の滅菌蒸留水(注射用蒸留水)を加え、1 分間ボルテックスする。このとき、まんべんなく滅菌水がフィルターに接触するようにチューブの角度を調節する。

5) この試料を濃縮試料とする。濃縮試料 5.0mL のうち、2.0mL を微量高速遠心機 13,000rpm 5 分間、沈さ 100 μ l を得、冷凍保存(-30 $^{\circ}$ C)。

6) 核酸の抽出精製法は、研究班泉山の方法に準拠し、浴槽水の2,000倍濃縮保存液をL ysozyme、Proteinase K 処理後、抽出DNA をGLカラムで精製した。

7) 精製DNAを95 $^{\circ}$ C、5分間加熱後、冷却試料の 5 μ lをqPCR装置(TaKaRa、Dice)、LAMP装置で核酸増幅。

8) 標準菌株(*Legionella pneumophila* NII D0058株、BCYE α 培地に接種し、30 $^{\circ}$ Cで4日間培養)の希釈系列から検量線を作成し、試料のCt値、またはTt値(qPCR:Ct値、LAMP: Tt値CSVファイル16行目に記載)をもとに試料の菌数を得る。

9) 得られた菌数は試料50mL中の菌数に相当するので、培養法の100mLと比較するために、核酸法の菌数を2倍にする。両者の相

関を調べる。

2. 核酸検出法試薬

1) qPCR試薬

CycleavePCR *Legionella* Detection Kit (TaKaRa)は、レジオネラ属菌を網羅的に検出する5S rRNA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、特異性が高いサイクリングプローブ法を用いている。本キットにはインターナルコントロールが含まれており、濃縮試料中の温泉成分の残留などによるPCRの増幅阻害の有無が確認できる。

リアルタイムPCR(qPCR) 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遺伝子増幅装置で、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にしている。

2) LAMP法試薬

Loopampレジオネラ検出試薬キットE(栄研化学)はレジオネラ属菌の保有する16S rRNAをコードする遺伝子領域内にLAMP法用プライマー設定した専用試薬である。

LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplificationの略)は、わが国の企業が独自に開発した遺伝子増幅法で、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濃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 $^{\circ}$ C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15~1時間で 10^9 ~ 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。

C. 研究結果および考察

1) 検量線の作成

1~10⁶ CFU までの標準菌の希釈系列から作製したDNAから、qPCR(図1)、LAMP(図2)の検量線を作成した。qPCR法ではすべての希釈系列のデータが採用でき、直線性も高かった。一方、LAMP法の検量線は希釈系列で菌数の少ないものを採用すると直線性が悪くなる(図3)ので、最少菌数のデータは採用しなかった。

2) 核酸検出法と培養法の定性試験での比較

74検体の浴槽水の成績について、qPCRと培養法の定性試験結果の比較(表1)、LAMPと培養法の定性試験結果の比較(表2)、qPCRとLAMPの定性試験結果の比較(表3)を行った。いずれの方法でも陽性、陰性の一致率は高かった。培養陰性、核酸検出法陽性の検体はqPCRで20%(15/74)、LAMPで8%(6/74)にみられた。培養法陽性で、qPCRとLAMPが陰性のものがそれぞれ2検体、3検体あったが、いずれも培養法で20CFU/100mL以下の検体であり、核酸検出法では少数菌の検出ができないケースがあることが考えられた。qPCRとLAMPの比較では、qPCR陽性、LAMP陰性が15%(11/74)と核酸検出法のなかではqPCRの方が感度が高いことが示唆された。

また、培養陽性、核酸検出法陰性の検体を含む74検体(うち20検体が温泉水)すべてで、qPCRによるインターナルコントロールの増幅などが確認され、PCR増幅阻害がないとのデータが得られた。今回用いたDNA回収法によって、PCR増幅阻害を起こす可能性のある温泉

成分の除去ができていたことが推定された。

なお、データには示していないが、培養法で *L. londiniensis* が 820 CFU/100mL検出された温泉配管水のqPCR成績が陰性(インターナルコントロール陽性)の検体があった。レジオネラ属菌の一部には、核酸検出法のプライマーと反応しないものがあることが示されているので、少数例ではあるが、培養陽性、核酸検出法陰性のケースが存在する可能性が示唆された。

3) 培養法の検出感度(10 CFU/100mL)に合わせ、核酸検出法の検出数を10CFU/100mL以上、未満で設定した場合の比較

74検体の浴槽水の成績について、qPCRと培養法の10 CFU/100mL以上、未満での比較(表4)、LAMPと培養法の10 CFU/100 mL以上、未満での比較(表5)、qPCRとLAMPの10 CFU/100mL以上、未満での比較(表6)を行った。qPCRと培養法の比較では陰性の一致率が上がったが、培養陰性でqPCR 10 CFU/100mL未満の検体が5検体あったことによる。LAMPと培養法の比較では陽性の一致率が下がったが、培養陽性でLAMP 10 CFU/100mL未満の検体が7検体あったことによる。qPCRとLAMPの比較では、qPCR陽性、LAMP陰性が20%(15/74)と核酸検出法のなかではqPCRの方がより感度が高いことが示唆された。

4) 核酸検出法と培養法の相関

74検体の浴槽水の各検査法での定量値をもとに、qPCRと培養法(図4)、LAMPと培養法(図5)、qPCRとLAMP(図6)の散布図を作成した。核酸検出法と培養法では10²~10³CFU/100mL以上の菌数であれば相関があることが示唆された。qPCR法とLAMP法の菌数の比較ではさらにより相関が得られたが、qPCR法で10³CFU/100mL以下の菌数で検出

される検体において、LAMP法で不検出のものが多くあった。LAMP法で今回使用した検量線(図2)は、菌数の少ない部分(Tt値が多い部分)の定量が困難なことが影響したものと思われる。

5) モデル浴槽でのレジオネラ属菌の推移をqPCR法と培養法で比較

モデル浴槽において、塩素管理入浴中、塩素消失後、無殺菌循環後のレジオネラ属菌数の推移を長期間にわたって経日的に測定し、qPCR法と培養法の両方で比較した(図7)。

残留塩素濃度が0.4mg/Lで塩素管理中の浴槽水は qPCR法、培養法のいずれでもレジオネラ属菌は検出されなかったが、無殺菌循環2日目以降、レジオネラ属菌は増加し、無殺菌循環7日目には 10^6 CFU/100mL以上の最高菌数に達した。qPCR法と培養法の菌数はよく一致し、菌数の推移のグラフも類似していた。また、培養法の菌数が 10^5 CFU/100mL以上では qPCR法の菌数が1オーダー程度低く検出される傾向があった。qPCR法で、適切な塩素管理がされ菌検出がない期間と、無殺菌循環で菌数の増加した期間の菌数の変化を正確につかむことができたことから、qPCR法を現場の浴槽水のレジオネラ属菌検査に応用可能と思われる。

無殺菌9日目の浴槽水(培養法で 10^6 CFU/100mLの菌数)の循環浴槽系を過酸化水素水で洗浄した後、2回換水してから採水した検体からは、培養法で菌検出がなかったが、qPCR法で 10^4 CFU/100mLの菌数相当のDNAが検出された。これは、ろ過材に残った菌の残渣(死菌DNA)が洗浄後の浴槽水に含まれたことによると推定した。モデル浴槽では、洗浄に使用した薬剤等の濃度が1回の

換水毎に10分の1ずつ減少するので、薬剤でDNAが破壊されない場合は、菌濃度も同様に減少して100分の1になった検出された可能性がある。この点については薬剤の種類等を変えてさらに検討する必要がある。さらに、このことは一旦レジオネラ属菌数の顕著な増加があったときには、薬剤等で洗浄し、換水しても死菌に由来するDNAが相当な量で検出されることを示唆しており、洗浄前のレジオネラの著しい汚染状況を推定できる可能性を示すものである。

D. 結論

浴槽水のメンブランフィルター濾過と遠心沈殿によって得られた2,000倍濃縮菌液から、DNAを抽出・精製し、それを用いた核酸検出法(qPCR法とLAMP法)でレジオネラ属菌数の定量測定を行うことができた。特に、レジオネラ属菌数が $10^2 \sim 10^3$ CFU/100mL以上の浴槽水においては、核酸検出法と培養法の菌数に相関がみとめられた。qPCR法とLAMP法の菌数の比較ではさらにより相関が得られたが、qPCR法の検量線は直線性が高いのに比べ、LAMP法では検量線の作成が困難で、検出感度に影響を与えていた。今回40検体の温泉水を検査したが、いずれの検体でも qPCR法で増幅阻害は認められず、今回用いたDNAの抽出・精製法が温泉成分に係らず用いることができることがわかった。さらに、循環式モデル浴槽の実験から、qPCR法を用いて、適切な塩素管理がされ菌検出がない期間と、無殺菌循環で菌数の増加した期間の菌数の変化を正確につかむことができた。qPCR法は現場の浴槽水のレジオネラ属菌検査に充分応用できることが示された。今後は、死菌DNAによると思われる核酸検出法の陽性反応を衛生管理上

どう評価していくか、洗浄殺菌実験などでの検討が必要と思われた。

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

E. 研究発表 なし

表1 定性での比較

	qPCR+	qPCR-
培養+	28	2
培養-	15	29

表2 定性での比較

	LAMP+	LAMP-
培養+	27	3
培養-	6	38

表3 定性での比較

	qPCR+	qPCR-
LAMP+	32	1
LAMP-	11	30

表4 +:10以上、 -:10未満比較

	qPCR+	qPCR-
培養+	28	3
培養-	9	34

表5 +:10以上、 -:10未満比較

	LAMP+	LAMP-
培養+	20	11
培養-	2	41

表6 +:10以上、 -:10未満比較

	qPCR+	qPCR-
LAMP+	22	0
LAMP-	15	37

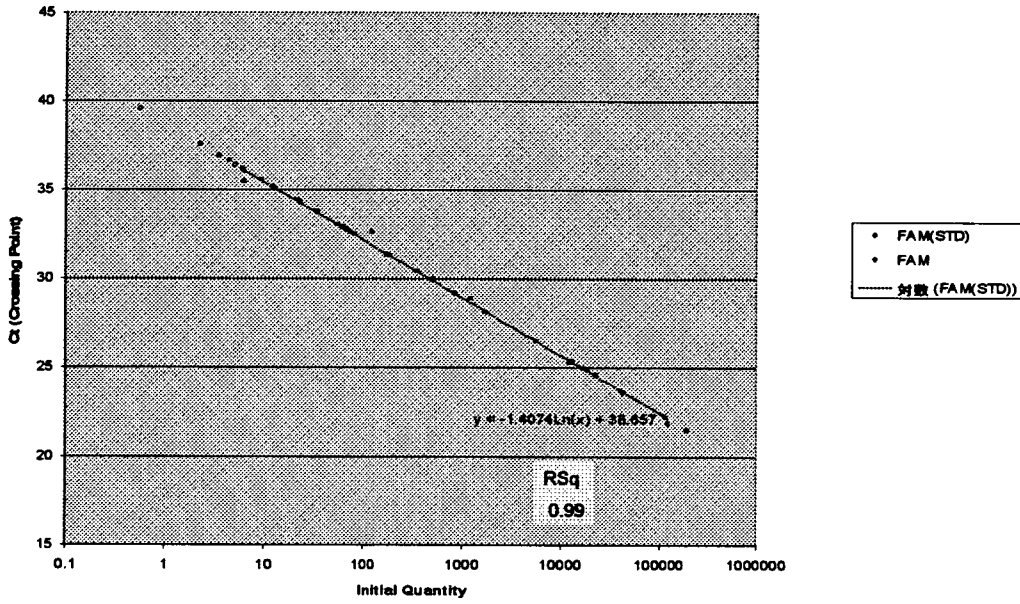


図1 リアルタイムPCR(qPCR)検量線

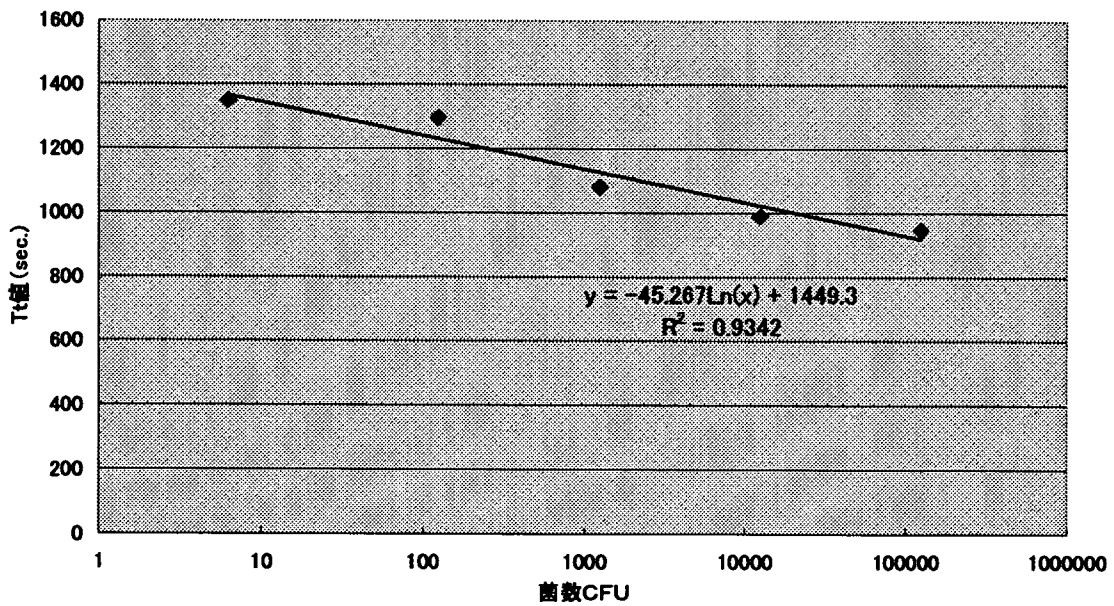


図2 LAMP検量線(5点採用)

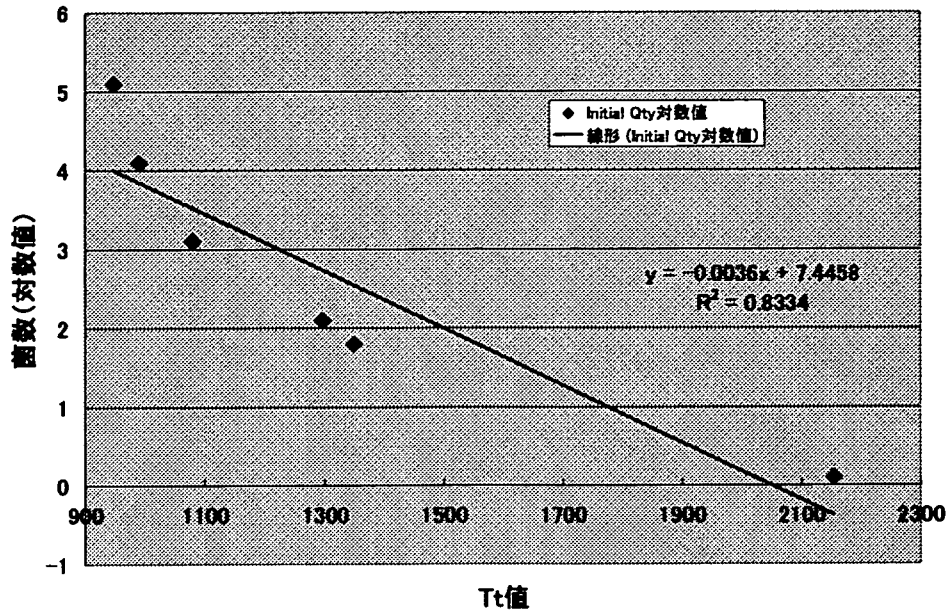


図3 LAMP検量線(6点採用)

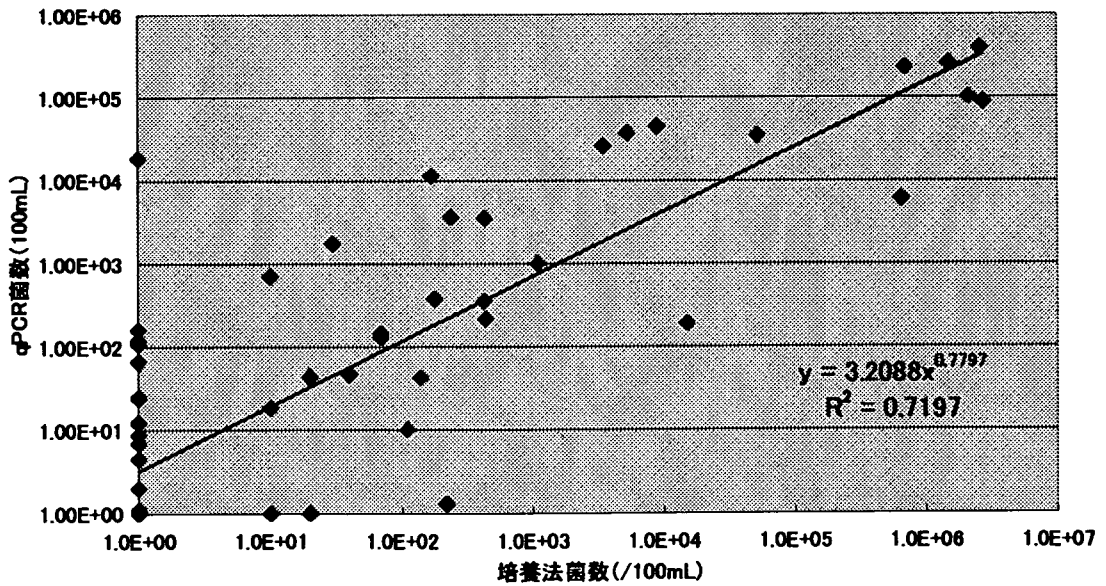


図4 qPCR菌数と培養法菌数の相関

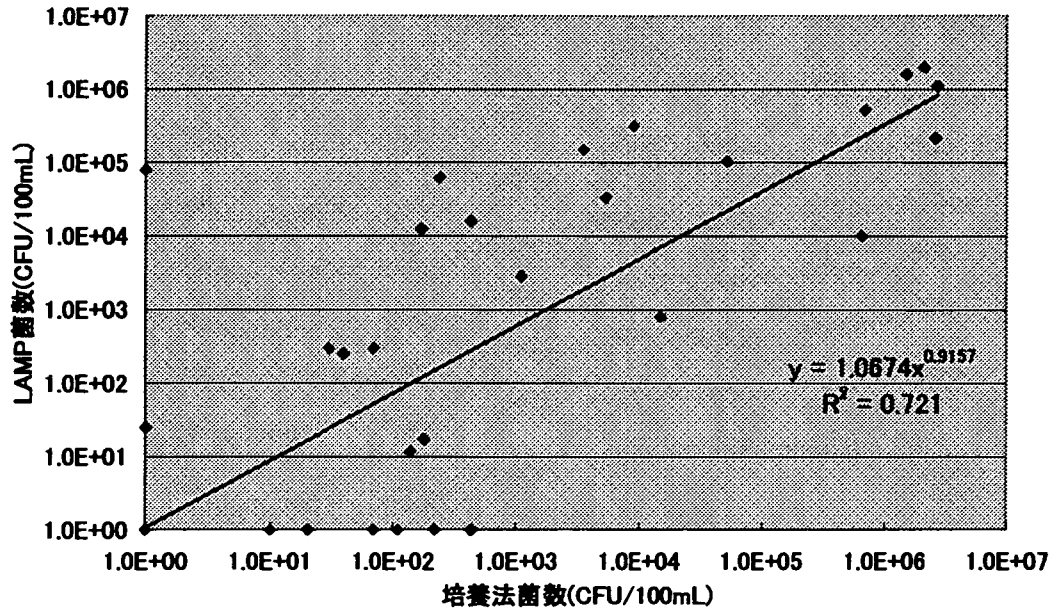


図5 LAMP菌数と培養法菌数の相関

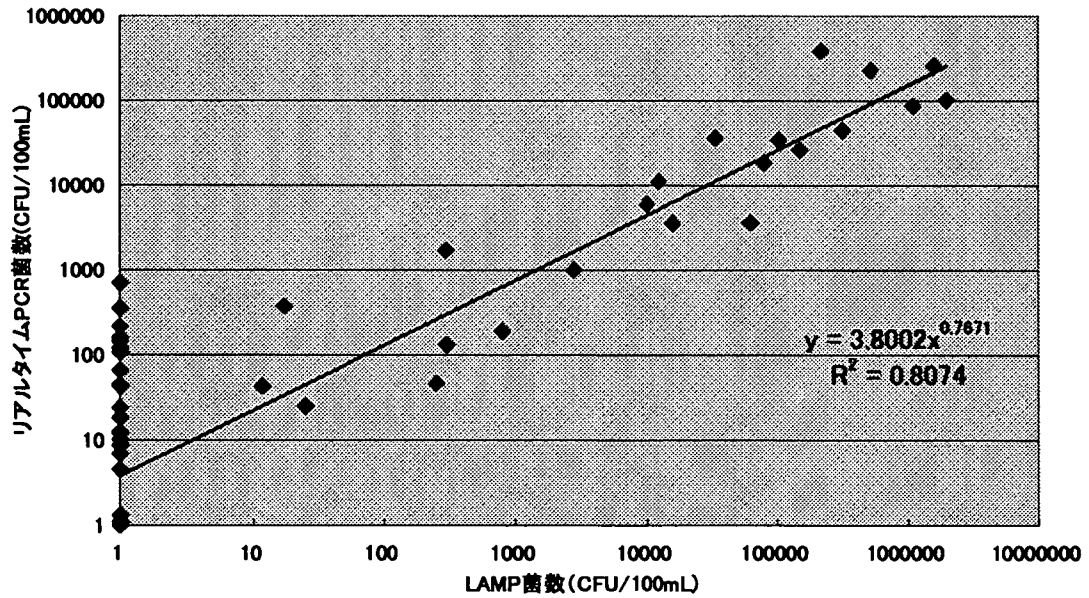


図6 リアルタイムPCR菌数とLAMP菌数の相関

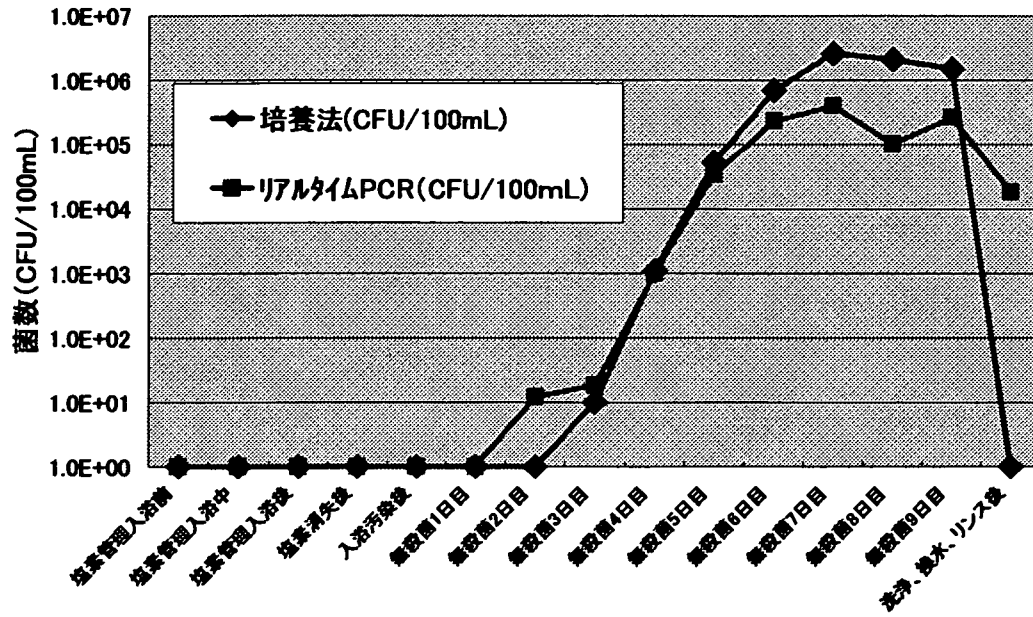


図7 モデル浴槽でのレジオネラ属菌数の推移

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

主任研究者 倉 文明

浴槽水からのレジオネラ属菌の分離培養と DNA の検出

および反応阻害の改善

分担研究者 田栗利紹 長崎県環境保健研究センター 主任研究員

【リアルタイムPCR法における検量線作成方法の検討】

A. 研究目的

リアルタイムPCR法(quantitative Polymerase Chain Reaction法,以下qPCR法と略す)における検量線の再現性は定量性に影響する最も重要な要素のひとつであるが、検査ごとに菌液からDNAを抽出して作成・検証することは現実的でない。そこでDNA抽出液を一度に抽出・小分けして凍結保存したもとのから安定した検量線を得ることができないかと考え、凍結融解操作の繰り返しにおける定量性の変化および再現性を検討した。また抽出方法の違いによる影響をみるために、同じ菌液を平成18年度の抽出方法と今年度の抽出方法でそれぞれ抽出して得た検量線を比較した。

B. 研究方法

1) 供試菌株

-80℃に凍結保存した *Legionella pneumophila* NIID0058 株(国立感染症研究所からの分与株)を用い BCYE α 培地に接種して復元し、30℃で3日間培養したものを試験に供した。McFarland 2.0 程度に調製した菌懸濁液を適宜希釈して培養法により菌数測定するとともに、2mL マイクロチューブ(アシスト)に移して13,000rpm \times 5分間

遠心分離した濃縮液 100 μ L を後述する GL カラム法により処理して、DNA 液を得た。

2) DNA 抽出方法

GLカラムを用いたDNA抽出方法¹⁾は、泉山の方法に準拠した。即ち、融解させた試料濃縮液に2倍溶解液(TE buffer (pH8.0):1MNaCl:10%TritonX-100をそれぞれ50:20:10の比で混合する)80 μ Lと20mg/L リゾチーム溶液 10 μ Lを加えて40℃ \times 15分間反応させた後、20mg/L プロテイナーゼK溶液 10 μ Lをさらに加えて60℃ \times 1時間反応させた。その後、さらに75℃ \times 5分間反応させて1分間十分にボルテックスした後、15,000 \times 5分間遠心分離して沈渣に触れないように上清を別の新しい1.5mL マイクロチューブに移し、Buffer AL(QIAamp DNA mini kit, キアゲン)200 μ Lと99.5%エタノール(和光純薬)200 μ Lを追加して転倒混和した。全量をGLカラムに移して10,000 \times 1分間遠心分離した後、ろ液をチューブごと廃棄して、新しいチューブに交換した。同じ要領でBuffer AW1およびBuffer AW2(QIAamp DNA mini kit, キアゲン)を用いてカラムを洗浄した後、15,000 \times 10分間遠心分離してエチルアルコール成分を完全に蒸発させた。最後に、Buffer AE(QIAamp DNA mini kit, キアゲン)20 μ LをGLカラムのフィルター部分に

接種して1分間保持した後、10,000rpm×1分間遠心したろ液をDNA試料とした。

フィルターろ過-DEXPAT 抽出法²⁾は、荒井らの方法を一部改変して用いた。即ち、試料再濃縮液 100 μ Lを吸引した2.5ml ディスポジシングを孔径 0.22 μ m×径 25mmメンブランフィルター(DURAPORE 0.22GV, ミリポア)入り径 25mm フィルターカートリッジ(スウィネクス)にセットして、吸引ろ過した。注射用蒸留水(大塚製薬)1mLで試料再濃縮液の入っていたマイクロチューブを洗浄し、試料と同様に吸引ろ過する操作を二度繰り返した。洗浄終了後、フィルターをDEXPAT(タカラバイオ)500 μ L入り1.5mLマイクロチューブに移して1分間十分にボルテックスした。フィルターを取り出し、100 $^{\circ}$ C×10分間ヒートブロックで加熱処理した後、DEXPATのビーズごと全量をカラム(タカラバイオ)に移して、常温で12,000rpm×10分間遠心した。遠心後のろ液を、イソプロパノール(和光純薬)350 μ Lと20mg/L glycogen(ナカライテスク)2 μ Lを入れた1.5mLマイクロチューブに移した。マイクロチューブを1分間ボルテックスし、常温で14,000rpm×10分間遠心した後、沈殿を残してデカントした。70%エタノール(99.5%エタノールを注射用蒸留水で希釈したもの)700 μ Lを用いてリンスし、常温で14,000rpm×10分間遠心した後、上清をデカントして除去した。沈殿物を風乾させてアルコール成分を十分に蒸発させた後、Buffer AE 20 μ Lを入れた溶解液を精製DNA試料とした。

¹⁾H19年度新たに提案された浴用水のDNA抽出方法、²⁾H18年度に提案された浴用水のDNA抽出方法

3)qPCR法の測定方法

レジオネラ属菌測定用リアルタイムPCRキット(Cycleave PCR Legionella Detection Kit (5S), タカラバイオ)に含まれる試薬を調製してマスターミックスを作製し(1サンプルあ

たり2×Cycleave Reaction Mixture 12.5 μ L、5S Primer/Probe Mix 5 μ L および dH₂O 2.5 μ L)、抽出DNA試料5 μ Lを加えて、リアルタイムPCR測定装置ABI Prism7000で測定した。PCR条件は95 $^{\circ}$ C×10秒の前反応ののち、95 $^{\circ}$ C×5秒、55 $^{\circ}$ C×10秒、72 $^{\circ}$ C×31秒を1サイクルとして45サイクル反応させた。

4)検量線の作成方法

凍結保存した精製DNA試料を室温融解・希釈して0.1~10⁴CFU/assayの6段階精製DNA希釈列を作製した。各測定値から得られるCt値と培養検査菌数により検量線を作製した。

5)Ct値のばらつき

凍結融解回数別に4)で得られるCt平均値と標準偏差を算出してそれぞれの検量線を比較した。また、異なる初期菌量の懸濁液をGLカラム法およびフィルター・Dexpat法で処理し、得られる精製DNA希釈列を用いて、抽出方法および初期菌量による検量線の違いを検討した。

C. 研究結果

1)qPCR法の定量限界

GLカラム法により得られたDNA抽出液を用いて16回繰り返して作製した検量線成績のほとんどにおいて、1.45CFUは定量できたが0.145CFUは定量できなかった。加えて、1.45CFU溶液の二倍希釈液(0.725CFU)は定量できたため、この値を今回の定量下限値とした(図1)。同じDNA抽出液を用いた凍結融解回数による繰り返し再現性を検討したところ、第9回までは安定していたが、第10回以降は定量下限値が1オーダー高くなった(データ示さず)。

2)Ct値のばらつき

繰り返した全てのCt平均値から得られた回帰直線を示した(図2)。異なる菌量の懸濁液をGLカラム法およびフィルター

・Dexpat 法で処理して得られた精製 DNA 希釈列を用いて、抽出方法および初期調製菌量による検量線の違いを検討したところ、定量限界値に若干の差を認めたが、ほとんどが重なった直線を描きほとんど違いを認めなかった(図3)。

D. 考察

サイクリングプローブ法を用いた qPCR 法は、凍結融解のくりかえし(9 回以内)にかかわらず、安定した検量線を得られることが明らかとなった。定量下限値は 0.725 CFU/assay であり、H17 年度に報告された荒井らの成績(0.5 CFU/assay)と同等であった。10 回以降でも定量下限値が1オーダー下がる程度で直線性に問題はなく、当初調製液を分注保管することでさらに保存性は増すと考えられた。抽出方法および初期菌量による検量線の違いもほとんど認められなかったため、検水中に阻害物質が無い場合、本法により再現性のよい定量値を得られると予測された。

E. 結論

精製 DNA を凍結保存する検量線作成方法は、サイクリングプローブ法を用いたリアルタイム PCR 法において有用である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的所有権の取得状況 なし

【フミン質などを多く含む温泉水を対象としたリアルタイム PCR 法添加回収試験】

A. 研究目的

温泉浴槽水からの DNA 検出方法を検討

する場合、温泉はさまざまな無機・有機物質を一定量含むことにより、DNA抽出阻害の危険性を否定できない。従って、リアルタイム PCR 法(quantitative Polymerase Chain Reaction 法、以下 qPCR 法と略す)を行う上で、予め泉質ごとに添加回収試験を実施して抽出阻害の程度を検証することが望ましい。

今回、フミン質等温泉由来成分を多量に含む温泉に遭遇し、qPCR法のレジオネラ属菌回収試験を行った。

B. 研究方法

1) 供試した試料および菌株

試料調製時の希釈の影響を除外するために、浴槽水よりも温泉由来成分を多く含む泉源水と貯湯タンク水(表1)を試料として適宜希釈して用いた。施設管理者からの聞き取りによると、これらの施設水は温度調整時に 1.25~1.5 倍希釈されて浴槽水として供給される。採水日あるいは採水箇所の異なる4種類の施設水 500mLを、次の方法でろ過濃縮した。即ち、各検水 500mL を直径 47mm、孔径 0.4 μ m のポリカーボネート製メンブランフィルター(ミリポア、ISOPORE HHTP04700)で吸引ろ過した後、フィルターを滅菌蒸留水(大塚製薬、20mL 注射用蒸留水)5mLに挿入して1分間十分にボルテックスして試料濃縮液を得た。なお、これら4つの濃縮試料については、培養検査と定性PCR法によりレジオネラ属菌非検出を確認している。

接種菌として *Legionella pneumophila* NIID0058 株(国立感染症研究所から分与)を用い、-80℃に凍結保存した同株を BCYE α 培地に接種して復元し、30℃で 3 日間培養した。McFarland 2.0 程度に調製した菌懸濁液を菌数計算するとともに適当に希釈し、先に調製した4種類の試料濃縮液に適量加えて、約 10³CFU/mL の菌添加済

み試料濃縮液 2mL を作製した。同様に、pH7.2 リン酸緩衝生理食塩水(以下 PBS と略す、シグマ)に希釈菌液の適量を加えて対照とした。

各々の試料濃縮液および対照 2mL を、微量高速遠心機 15,000rpm 5 分間処理して上清 1900 μ L を除去した沈さ 100 μ L を DNA 抽出に供した。各試料再濃縮液の懸濁時と遠心時の状態を図4に示した。

2) DNA 抽出方法

DNA 抽出法は、「リアルタイムPCR法における検量線調製方法の検討」の研究手法、GLカラムを用いた DNA 抽出方法に同じ。

3) タンパク質分解酵素処理時間および希釈の影響

全試料について、1 時間と 24 時間でタンパク質分解酵素の処理時間による回収率を比較した。No1 および No2 については、2倍希釈による回収率の変化を比較した。

4) リアルタイム PCR 法の測定条件および回収率の計算

試薬の種類、調製方法、および qPCR の測定条件は「リアルタイムPCR法における検量線調製方法の検討」の研究手法、qPCR 法の測定方法に同じ。レジオネラ属菌測定用リアルタイム PCR キット(Cycleave PCR Legionella Detection Kit (5S), タカラバイオ)の使用説明書に準拠してデータを解析し、試料ごとの定量値を得た。各々の試料および条件ごとに、3回の繰り返し試験から得られた平均定量値を添加菌量で除した値を回収率とした。

C. 研究結果

高アンモニアを含有する No2 では、タンパク処理時間や希釈と関係なく高い回収率が得られた。遠心上清に茶褐色色素を含む No1 と多量の沈さを含む No 3 において、回収率が阻害されたが、No3 ではタンパク質消化時間の延長により、No1 では希釈により回

収率が向上した。

D. 考察

GL カラム法は、高アンモニアの影響を受けず十分な回収率を維持できたが、遠心上清の色素成分や多量の沈さを含む試料では阻害が認められた。しかしながら、タンパク質消化時間の延長や希釈(或いは洗浄)といった処理の追加により回収率が劇的に改善された(図5, 6)。

E. 結論

色素や細胞成分を多量に含む温泉試料においては、GL カラム法を用いても回収率の低下が認められたが、試料の外観から阻害が容易に予想される場合は、タンパク質消化時間の延長や希釈(或いは洗浄)といった処理の追加により、ほぼ対照と同程度の回収率を期待することができる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的所有権の取得状況 なし

【平成 19 年度浴用水からのレジオネラ属菌検査結果】

A. 研究目的

環境水からのレジオネラ属菌検査において、一般的に用いられている培養法は標準法として確固たる地位を占めているが、レジオネラ属菌汚染と関連の深い公衆浴場等の営業施設においては、7~10 日と長い検査期間を要するため、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。

今回、大幅な時間短縮を期待できる遺伝

子増幅による迅速測定法 2 法(リアルタイム PCR 法(quantitative Polymerase Chain Reaction 法, 以下 qPCR 法と略す)および LAMP 法)に着目して、浴槽水を対象とした成績を培養法と比較し、これらの有用性を検討した。

B. 研究方法

1) 供試した試料および菌株

25 施設の塩化物泉、炭酸水素塩泉、単純温泉、酸性泉、井水及び水道水からなる 45 浴槽水を試験した(表2)。

2) レジオネラ属菌の測定方法

検水 500mL を 25%チオ硫酸ナトリウム 1mL 入り滅菌ポリビン(アズワン)に採取し、冷蔵で運搬して、次の方法でろ過濃縮した。即ち、各検水 500mL を直径 47mm、孔径 0.4 μ m のポリカーボネート製メンブランフィルター(ミリポア、ISOPORE・HTTP04700)で吸引ろ過した後、フィルターを滅菌蒸留水(大塚製薬、20mL 注射用蒸留水)5mL に挿入して1分間十分にボルテックスして試料濃縮液を得て、1mL を培養検査に、2mL を後述する DNA 抽出に供した。

1mL 試料濃縮液は、50°C、20 分間加熱した後、もう一度1分間十分にボルテックスした試料濃縮液の 0.1mL、および等量の 0.2M HCL・KCL 緩衝液と混合して4分間静置した 0.1mL それぞれを GVPC 培地(日本ビオメュー)に接種した。35°C で数日間好気培養し、レジオネラ属菌を疑うコロニーが検出された場合は血清型別試験および PCR 試験を用いて同定した。最終的に 10 日間まで培養して発育しなかったものを検出限界以下と判定した。

3) DNA 抽出方法

フィルター濃縮した後の試料濃縮液 2mL を、微量高速遠心機 15,000rpm 5 分間処理して上清 1.9mL を除去した沈さ 0.1mL を -30°C で凍結保存しておき、抽出時に室温

融解させて試験に供した。

DNA 抽出方法は、GLカラム法を用いた。即ち、融解させた試料濃縮液に 2 倍溶解液(TE buffer(pH8.0): 1M NaCL: 10% TritonX-100 をそれぞれ 50:20:10 の比で混合する)80 μ L と 20mg/L リゾチーム溶液 10 μ L を加えて 40°C × 15 分間反応させた後、20mg/L プロテイナーゼK溶液 10 μ L をさらに加えて 60°C × 1 時間反応させた。その後、さらに 75°C × 5 分間反応させて 1 分間十分にボルテックスした後、15,000 × 5 分間遠心分離して沈渣に触れないように上清を別の新しい 1.5mL マイクロチューブに移し、Buffer AL(QIAamp DNA mini kit, キアゲン)200 μ L と 99.5%エタノール(和光純薬)200 μ L を追加して転倒混和した。全量を GL カラムに移して 10,000 × 1 分間遠心分離した後、ろ液をチューブごと廃棄して、新しいチューブに交換した。同じ要領で Buffer AW1 および Buffer AW2(QIAamp DNA mini kit, キアゲン)を用いてカラムを洗浄した後、15,000 × 10 分間遠心分離してエチルアルコール成分を完全に蒸発させた。最後に、Buffer AE(QIAamp DNA mini kit, キアゲン)20 μ L を GL カラムのフィルター部分に接種して 1 分間保持した後、10,000rpm × 1 分間遠心したろ液を精製 DNA 試料とした。その精製 DNA 5 μ L を qPCR 装置(ABI, ABI Prism7000)で核酸増幅し、同じく精製 DNA の 1 μ L に 4 μ L ExLeg Buffer(栄研化学、レジオネラ検出キット E)を加え、95°C、5 分間加熱急冷した試料 5 μ L を LAMP 装置で核酸増幅した。

4) 核酸の増幅と定量

標準菌株の希釈系列から検量線を作成し、試料の Ct 値、または Tt 値(qPCR: Ct 値、LAMP: Tt 値)をもとに試料の菌数を得た。qPCR 法で得られた菌数は試料 50mL 中の菌数に相当するので、培養法の 100mL と比較するために、核酸法の菌数を 2 倍にし、LAM

P法で得られた菌数は試料 10mL 中の菌数に相当するので、核酸法の菌数を 10 倍にした。

5) 解析方法

培養方法と、qPCR および LAMP 法それぞれの定性結果とを対比し、培養方法の検出限界値 10CFU/100mL に基づく判定基準と、2つの DNA 増幅法それぞれの検出限界値に基づく判定基準で比較して、それぞれ 2×2 表を作り χ 二乗検定を行った。培養検査方法で検出された試料について、培養方法の定量値と、リアルタイム PCR および LAMP 法それぞれの定量値との相関を調べた。

C. 研究結果

1) qPCR 法と培養法の定性結果および定量結果の比較

10 個/100mL を基準として qPCR 法と培養法それぞれの判定結果を比較すると、偽陰性 (qPCR 法不検出/培養法検出) は認められなかったが、偽陽性 (qPCR 法検出/培養法不検出) は 45 例中 15 例認められた。両者の間には χ 二乗検定による有意差が認められ、11.733 と高いオッズ比が認められた (表 3-a: 但しオッズ比は qPCR 法不検出/培養法検出が 0 となり計算できなかったの、この値を 1 として計算した)。次に、qPCR で得られた有効値を基準として、qPCR 法と培養法それぞれの判定結果の相関を見たとき、 χ 二乗検定による有意差は認められなかった (表 3-b)。両者ともに検出された 8 検体において、相関係数 $R^2=0.9036$ の高い相関が認められた (図 7)。

2) LAMP 法における検量線

2回作製した検量線において、相関係数は $R^2=0.9634$ と高い値を示した (図 8) が、低菌量領域 (1~3 オーダー未満の三点) と高菌量領域 (4 オーダー以上の四点) の間では直線性に違いが認められ、増幅曲線でも両

者は乖離しているように思われた (図 9, 10)。

3) LAMP 法と培養法の定性結果および定量結果の比較

10 個/100ml を基準とした LAMP 法と培養法それぞれの定性的判定結果の比較で、偽陰性 (LAMP 法不検出/培養法検出) が 45 例中 1 例、偽陽性 (LAMP 法検出/培養法不検出) が同じく 2 例認められた。ただし、偽陰性の 1 検体も検出はされていた (0.95 個/100ml)。LAMP 法と培養法の間には χ 二乗検定による有意差が認められるとともに、オッズ比から強い関連が推察された (表 4-a)。次に、LAMP 法で得られた有効値を基準として、LAMP 法と培養法それぞれの判定結果の相関を見たとき、 χ 二乗検定による有意差が認められるとともに、オッズ比から強い関連が推察された (表 4-b)。

両者ともに検出された 6 検体の相関係数は $R^2=0.1595$ で、はっきりした相関は認められなかった (図 11)。

D. 考察

1) qPCR 法と培養法の定性結果および定量結果の比較

qPCR 法は高感度であるが故に、一定の基準値を設けない条件では定性結果における培養法との相関をほとんど認めなかった。しかし、両方法ともに陽性であった 8 試料において高い相関を認めたので、高い定量性を期待できると考えられた。また、定性結果の比較で偽陽性 (qPCR 検出/培養不検出) を多く認めたことから死菌を検出していることが示唆され、生死判別を組みした判定基準の設定が期待される。

2) LAMP 法と培養法の定性結果および定量結果の比較

LAMP 法は qPCR と異なり、基準値にかかわらず培養法との間で定性結果の高い相関および高いオッズ比を認め、偽陽性

(LAMP 検出／培養不検出)もほとんど認めなかったため、定性的な迅速評価方法としての有用性が期待された。しかし、1 検体であるが偽陰性(LAMP 不検出／培養検出)を認めたことや、両方法ともに陽性であった 7 試料において有意な相関を認めず、定量検査方法としては疑問が残る結果であった。定量性が乏しく評価された 7 検体については、LAMP 法検量線における低菌量領域のばらつきに由来するものと考えられたが、qPCRと等量の DNA 試料を用いていないため精査が必要である。

E. 結論

qPCR 法は浴槽水を対象としたレジオネラ

属菌遺伝子現存量の定量方法として有用であるが、偽陽性(qPCR 検出／培養不検出)の検体をどのように処理するかが今後の課題としてあげられる。LAMP 法は遺伝子現存量の定性方法として有用であるが、偽陰性(LAMP 検出／培養不検出)の検証と低菌量領域を中心とした定量性についての精査が今後の課題としてあげられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的所有権の取得状況 なし

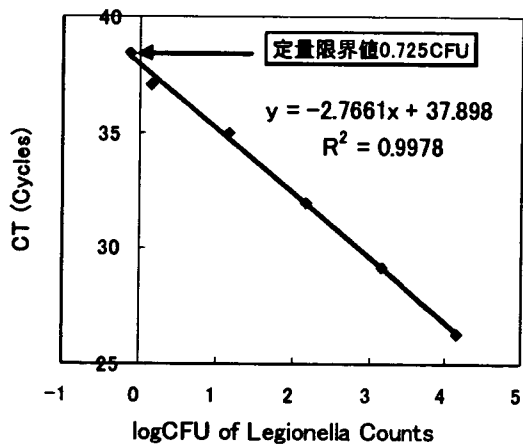


図1 リアルタイムPCR法の定量限界 (GLカラム抽出法)

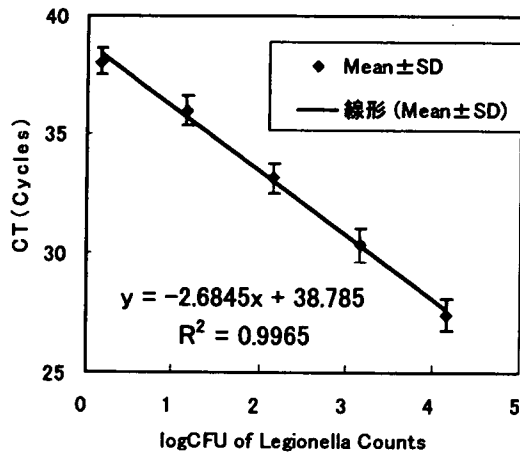


図2 Ct値のばらつき (GLカラム抽出法)

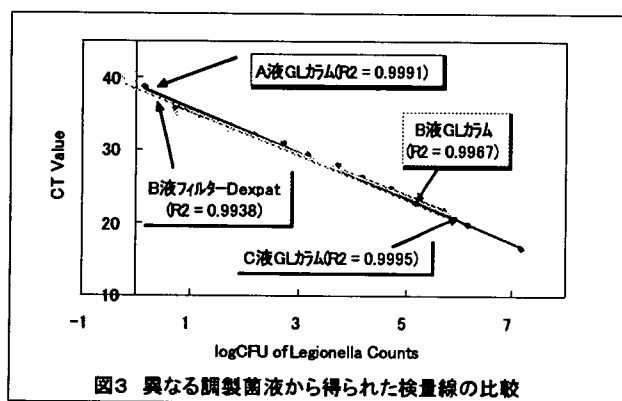


図3 異なる調製菌液から得られた検量線の比較

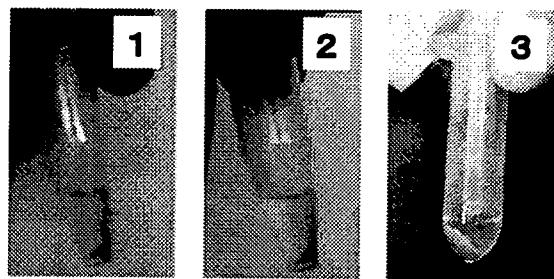


図4 各試料再濃縮液の沈さ

表1 検水の性状

No	水の種類	泉質	pH	NH ₄ ⁺ ** (mg/l)	Fe ²⁺ ** (mg/l)	遊離残留塩素** (mg/l)	従属栄養細菌数 (CFU/ml)	遠心上清含有色素
1	泉源水	Na・Ca 炭酸水素塩・食塩泉	7.6	0.50	ND	ND	1.83E+06	茶褐色
2	泉源水	Na・Ca 炭酸水素塩・食塩泉	7.4	3.00	ND	ND	9.00E+03	透明
3	泉源水	Na・Ca 炭酸水素塩・食塩泉	7.6	0.92	ND	ND	2.88E+06	透明

※:バックテスト, ※※DPD (ジエチル-p-フェニレンジアミン)法

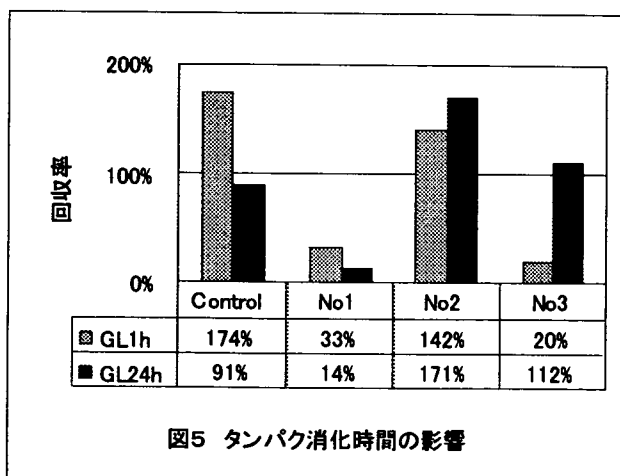


図5 タンパク消化時間の影響

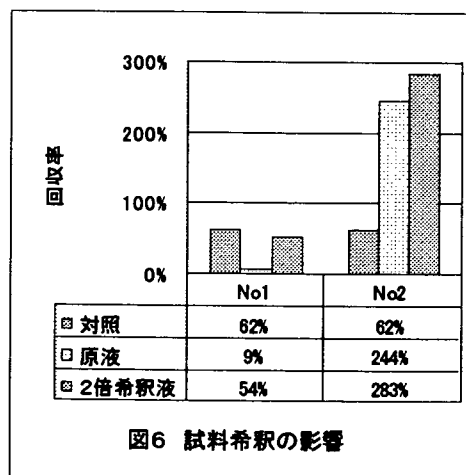


図6 試料希釈の影響

表2 供試浴用水の泉質

泉質等	試料数
塩化物泉	8
炭酸水素塩泉	12
単純温泉	2
酸性泉	2
井水・ボーリング水	7
水道水	14
合計	45(25施設)

表3-a リアルタイムPCRと培養法の成績比較
(qPCR計測値を10Counts/100mLに基づき判定)

	レジオネラ属菌検査成績 (基準 10 CFU/100ml)	
	検出 8検体	不検出 37検体
qPCR検査成績 (基準10 Counts/100ml)	検出 (8検体) 8	不検出 (22検体) 15
	不検出 (22検体) 0	検出 (8検体) 22
	P値	オッズ比 ***
qPCR法/培養法	0.0078 **	11.7333
		95%信頼区間 ***
		1.3264-103.7953

表3-b リアルタイムPCRと培養法の成績比較
(qPCR計測値を有効値/100mLに基づき判定)

	レジオネラ属菌検査成績 (基準 10 CFU/100ml)	
	検出 8検体	不検出 37検体
qPCR検査成績 (基準Available Counts/100ml)	検出 (8検体) 8	不検出 (22検体) 31
	不検出 (22検体) 0	検出 (8検体) 6
	P値	オッズ比 ***
qPCR法/培養法	0.5157	-
		95%信頼区間 ***
		-

P<0.01, *qPCR(-)/培養(+))を1として計算

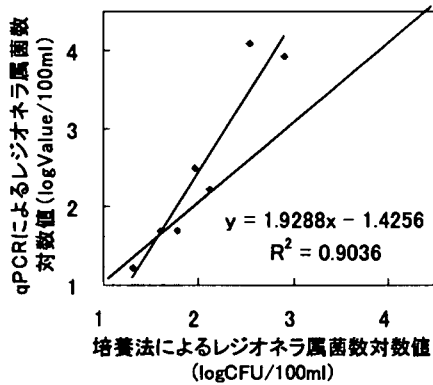


図7 リアルタイムPCR法と培養法の
定量値比較

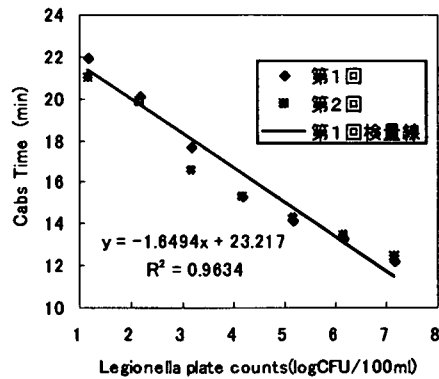


図8 LAMP法検量線

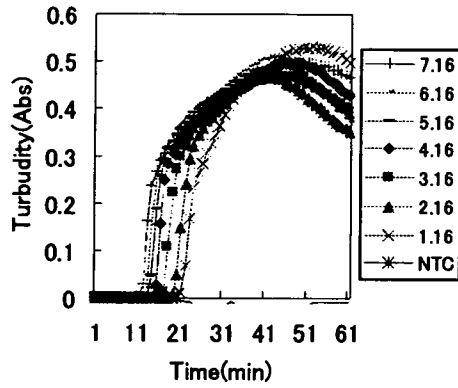


図9 第1回検査線の増幅曲線

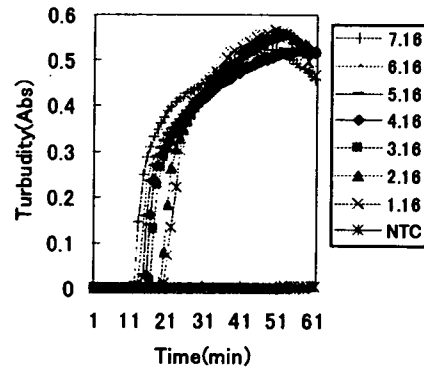


図10 第2回検査線の増幅曲線

表4-a LAMP法と培養法の成績比較
(LAMP計測値を10個/100mLに基づき判定)

	レジオネラ属菌検査成績 (基準 10 CFU/100ml)	
	検出	不検出
	8検体	37検体
LAMP法成績 (基準10個/100ml)	検出 (9検体)	2
	不検出 (36検体)	35
	P値	オッズ比
LAMP法/培養法	1.78E-06 ***	122.5
	95%信頼区間	
	9.72-1543.8	

**P<0.01

表4-b LAMP法と培養法の成績比較
(qPCR計測値を有効値/100mLに基づき判定)

	レジオネラ属菌検査成績 (基準 10 CFU/100ml)	
	検出	不検出
	8検体	37検体
LAMP法成績 (基準有効値/100ml)	検出 (15検体)	7
	不検出 (30検体)	30
	P値	オッズ比 ***
LAMP法/培養法	0.0001**	34.2857
	95%信頼区間 ***	
	3.67-320.68	

P<0.01, *LAMP(-)培養(+)を1として計算

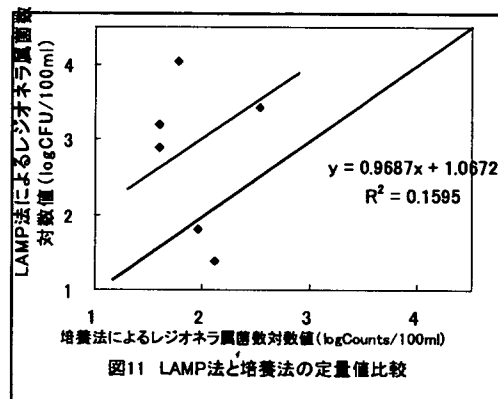


図11 LAMP法と培養法の定量値比較

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

浴槽水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討および衛生管理事例

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
	緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	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
	山口 誠一	山形県村山保健所

研究要旨： 浴槽水等の 251 試料についてレジオネラ属菌の検出を、定量的 PCR 法、LAMP 法という迅速検査と培養法により行い比較検討した。今年度の推奨プロトコルである酵素溶菌法（カラム法）で DNA を抽出した県その他、阻害物質の吸着する樹脂を用いるキレックス法を試み、検出の定性的陽性率を向上できた県もあった。核酸検出による迅速検査法は、培養法と異なりレジオネラの死菌も検出するため、レジオネラの増殖しない衛生環境の維持管理に有用である。

入浴施設の衛生管理事例として、1) 浴槽間仕切り板からの菌の検出と ATP 拭き取り検査の有用性、2) 冷却装置構造と内部汚染の事例を紹介した。

以下に注目された事項について特記する。詳細は、添付の資料を参照されたい。

1) 浴槽水 75 検体、湯口水 2 検体、貯湯槽水 1 検体の計 78 検体について、レジオネラ属菌の検査を実施したところ、レ

ジオネラ属菌陽性率は、検査法では qPCR 法(41.0%)が最も検出率が高く、次いで LAMP 法(25.6%)、培養法(10.3%)の順であった。残留塩素濃度が規定値の 0.2ppm 以下の 29 検体では培養法および遺伝子検査法とも検出率が高かったのに対して、