

特に培養法で陰性となる残留塩素濃度の高い検体においては、死菌も含めたレジオネラ属菌の遺伝子を検出する qPCR 法や LAMP 法によってのみ検出された。培養法による見かけの陰性が遺伝子検査法を併用することによって、浴槽水の循環系のどこかに依然として存在する汚染源の究明のために、重要な衛生管理の指標となり得るものと思われる。[A]

2) qPCR 法によりレジオネラ属菌が検出された 32 検体のうち、LAMP 法は 12 検体(37.5%)からは検出されず、培養法では 24 検体(75.0%)が陰性であった。qPCR により検出されなかった検体は、LAMP 法および培養法でも検出されなかった。[A]

3) 各検査の陽性コントロールの Ct 値は 25.66~27.44 の範囲で変化しており、検量線により求めた菌数が  $1.57 \times 10^3$  ~  $5.62 \times 10^3$  の範囲でばらついていた。したがって、より正確な定量値を出すために、陽性コントロールの Ct 値を測定間誤差を見極める指標にし、測定ごとに検量線を作成するなど、精度管理的な発想を取り入れた検査が必要である。[A]

4) キレックス法は、カラム法に比べ、安価で、操作が簡便、迅速に DNA 抽出をすることができ、PCR 阻害も認められなかったことから、核酸検出法の前処理として有用な方法であると思われる。この観点からも、抽出操作のステップが少なく、ロスが最小限に抑えられるキレックス法の方が、安定した結果が得られると思われる。(ただし、この見解は研究

班の中では、2 県に止まった。) [C,D]

5) 主に単純温泉、含硫黄・ナトリウム-硫酸塩・塩化物泉、ナトリウム-炭酸水素塩・塩化物泉で、検体をフィルター濃縮した後は一部の検体で黒色沈殿や白濁がみられた。しかし、これらの泉質や沈殿物はカラム処理後には認められず、更に qPCR の測定においてインターナルコントロールが検出されたことから、測定には影響しないことが確認された。また、従来の方法では、測定不能であった薬湯も今回推奨の DNA 抽出プロトコル(酵素溶菌法)では測定可能であった。[B]

6) LAMP は迅速に結果が早く得られることから定性的な検査には有用な方法であると思われる。しかし、菌量が高濃度の場合でも測定ごとに検量線が移動するため、測定時は検量線を作成することが必要となると思われる。また、菌量が低濃度の場合には測定値が不安定なため、未知試料についての定量は難しいと思われ、LAMP で定量するためには更に検討が必要であると思われる。[B]

## [A]

### 浴槽水等のレジオネラ属菌検出状況と検査法の比較

#### 研究要旨

平成 19 年度に浴槽水等 78 検体を採取して、遺伝子検査法(リアルタイム PCR 法、LAMP 法)と培養法により、レジオネラ属菌の検査を行った。その結果、培養法では浴槽水 7 検体 (9.3%)、湯口水 1 検体 (50%) からレジオネラ属菌が検出され、検出された菌種は *L.pneumophila* 1 群、2 群、3 群、4 群、5 群、6 群、7 群、10 群、型別不能、および *L.micdadei* で、浴槽水 3 検体と湯口水 1 検体からは複数の血清型の菌が検出された。検査法の比較では、リアルタイム PCR 法(41.0%)、LAMP 法(25.6%)、培養法(10.3%)の順に検出率が高く、リアルタイム PCR 法は他の 2 法により検出されたすべての検体から検出しており、最も検出感度が高く定量性が認められた。

#### A.研究目的

近年、入浴施設に関連したレジオネラ属菌による集団発生事例が問題となっており、入浴施設における衛生管理の重要性が指摘されている。そこで浴槽水等についてレジオネラ属菌の検査を行って汚染実態を把握するとともに、従来の培養法と遺伝子検査による迅速検査法を併用して検出率等を比較し、遺伝子検査法による結果が施設の衛生管理と菌検出後の早期営業再開のための指標として利用可能かどうかについて検討した。

#### B.研究方法

##### (1)材料

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。

##### (2)方法

検査法は、培養法と遺伝子検査法を併用して実施した。即ち、検体 500ml を滅菌したフィルター(PVDF 製)でろ過し、フィ

ルターを 50ml 滅菌 pp 製遠心管中で滅菌水 5ml を加えて 1 分間ボルテックスして菌を十分洗い出した。培養法はこの溶液 1ml を 50℃、20 分間加熱処理後、10 倍段階希釈して各希釈液の 0.1ml を GVPC 培地(日本ビオメリュー製)にコンラージで塗抹し、37℃、10 日間培養した。生えてきたコロニーを同定し、菌数を測定した。遺伝子検査は、残りの溶液のうち 2ml を 13,000rpm、5 分間遠心後、上清 1900 $\mu$ l を除去して沈渣 100 $\mu$ l を得た。これ以後の操作は本研究班から示された DNA 抽出法に従って操作し、最終的に 20 $\mu$ l の DNA 溶液として、これを 95℃、5 分間加熱した後氷中に保持し、このうち 5 $\mu$ l を各遺伝子検査法に使用した。リアルタイム PCR 法(以下 qPCR 法、タカラバイオ: Thermal Cycler Dice Real Time System, Cycleve Legionella (5S) kit 使用)及び LAMP 法(栄研化学:リアルタイム濁度測定装置 RT-160C, Loopamp レジオネラ検出試薬キット E 使用)はそれぞれのキットの説明書のとおり実施した。

遺伝子検査法による定量は、*L.pneumophila* 80-045株を用いて培養法により菌数を測定し、菌量既知の各希釈液に対する Ct 値(qPCR 法)と Tt 値(LAMP 法)を測定して検量線の作成を試みた。

### C.研究結果

各検査法による浴槽水等のレジオネラ属菌検査結果は、表 1 に示した。

培養法では、浴槽水 75 検体中 7 検体(9.3%)、湯口水 2 検体中 1 検体(50%)が陽性となった。さらに遺伝子検査法による検出を含めると浴槽水 30 検体(40.0%)、湯口水 1 検体(50%)、貯湯槽水 1 検体中 1 検体(100%)からレジオネラ属菌が検出された。培養法で分離された菌種とその血清型は、*L. pneumophila* 1群、2群、3群、4群、5群、6群、7群、10群、型別不能、および *L. micdadei* で、浴槽水 3 検体と湯口水 1 検体からは複数の血清型の菌が検出された。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。

検体中の残留塩素濃度によるレジオネラ属菌検出率への影響について、各検査法を比較して表 2 に示した。

残留塩素濃度が 0.2ppm より低い 29 検体は、どの検査法でも検出率(27.6%~79.3%)が最も高く、管理濃度として規定されている 0.2~0.4ppm およびそれ以上の濃度の検体では、培養法による結果は陰性になった。遺伝子検査法により 0.2ppm 以上の残留塩素が検出された 47 検体中 9 検体(19.1%)からレジオネラ属菌が検出され、qPCR 法と LAMP 法とも残留塩素濃度が 1ppm より高

い検体でも 2 検体(8.7%)から検出された。

各検査法による検査結果を比較して、表 3 に示した。

qPCR 法によりレジオネラ属菌が検出された 32 検体のうち、LAMP 法は 12 検体(37.5%)からは検出されず、培養法では 24 検体(75.0%)が陰性であった。qPCR により検出されなかった検体は、LAMP 法および培養法でも検出されなかった。LAMP 法で検出された 20 検体中 15 検体(75.0%)は培養法で陰性となり、LAMP 法で検出されなかった 58 検体のうち 3 検体(5.2%)は培養法が陽性であった。

qPCR 法と LAMP 法は既知濃度のレジオネラ菌液を使用して検査を行い(表 4)、Ct 値および Tt 値からそれぞれ検量線の作成を試みた。qPCR 法は図 1 のように  $Y = -1.3937 \ln(x) + 37.686$  ( $R^2 = 0.9856$ )で高い相関が見られ、検出感度は 0.5cfu/tube であった。一方、LAMP 法の検量線は  $R^2$  値が 0.4326(図 2)と低く、検出感度は 5cfu/tube であった。

qPCR 法によりレジオネラ属菌が検出された検体について検量線から菌数を求め、培養法による菌数との比較を散布図で示した(図 3)。qPCR 法で検出、培養法陰性の検体は qPCR 法の菌数が高い領域に分布が集中したが、培養法陽性の 8 検体中 6 検体は qPCR 法による定量値より培養法の菌数が多かった。

また、qPCR 法でレジオネラ属菌が検出された検体について、培養法の検出感度と同じ 10cfu/100ml 以上を陽性とした場合、培養法でも陽性であった 8 検体中 3 検体と、培養法は陰性であった 24 検体中 8 検体が qPCR 法で陰性となった(表 5)。

#### D. 考察

レジオネラ属菌は従来の培養法により浴槽水等 78 検体中 8 検体(10.3%)が陽性であったが、遺伝子検査法を併用することにより計 32 検体(41.0%)から検出された。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、特に培養法で陰性となる残留塩素濃度の高い検体においては、死菌も含めたレジオネラ属菌の遺伝子を検出する qPCR 法や LAMP 法によるみ検出され、培養法による見かけの陰性が遺伝子検査法を併用することによって、浴槽水の循環系のどこかに依然として存在する汚染源の究明のために、重要な衛生管理の指標となり得るものと思われる。遺伝子検査法と培養法の結果について比較すると、qPCR 法は他の 2 法で検出されたすべての検体からレジオネラ属菌を検出した。qPCR 法の検出感度はチューブあたり 0.5cfu と高感度で、定量性においても検量線は高い相関を示すなど、最も実用的で有効な検査法に成り得ると思われる。しかし、散布図に見られるように、理由は不明であるが培養法陽性の 8 検体のうち 6 検体は qPCR 法の定量値より検出菌数が多く、両法の定量値の一致率は低かった。また培養法の検出感度 10cfu/100ml 以上を qPCR 法陽性と仮定した場合、qPCR 法が陰性となった検体が 11 検体あり、このうち 3 検体は培養法陽性、qPCR 陰性となった。これらの検体は培養法による菌数が 10~20 cfu/100ml と検出限界付近の少ない菌量もしくは培養法陰性で

あり、菌液から DNA を抽出する過程でその一部を損失したために実際の DNA 量より低く値が出た可能性がある。少量の DNA あるいは溶液を扱う遺伝子検査法において、特に定量検査を実施する際には、細心の注意を払ってバラツキや誤差を最小限に止める工夫が必要とされる。さらに遺伝子検査法は一度に実施できる検体数が使用機器により限られているため、検査ごとに測定誤差が生じる。今回の検査においても、各検査の陽性コントロールの Ct 値は 25.66~27.44 の範囲で変化しており、検量線により求めた菌数が  $1.57 \times 10^3 \sim 5.62 \times 10^3$  の範囲でばらついていった。したがって、より正確な定量値を出すために、陽性コントロールの Ct 値を測定間誤差を見極める指標にし、測定ごとに検量線を作成するなど、精度管理的な発想を取り入れた検査が必要である。LAMP 法については感度がチューブあたり 5cfu と良好であったが、LAMP でレジオネラ属菌が検出されず、培養法陽性の検体が 3.8% あり、定量においても検量線の相関が低かった。これらのことから、浴槽水等のレジオネラ属菌検査に遺伝子検査法を導入することについては、より一層バラツキを抑える工夫や手技の向上を行い、安定した結果を得る手法の検討を継続して実施していく必要があると思われる。また、将来的に入浴施設における浴槽等の洗浄・消毒など日頃の衛生管理の指標として、迅速で高感度の遺伝子検査法を導入することは効果的であり、培養法との併用によりさらに正確な結果が期待でき、迅速な行政指導に役立つものと考えられる。

表1. 検査法別レジオネラ属菌検出状況

検体名	検体数	陽性検体数(%)		
		リアルタイムPCR法	LAMP法	培養法
浴槽水	75	30(40.0)	19(25.3)	7(9.3)
湯口水	2	1(50.0)	1(50.0)	1(50.0)
貯湯槽水	1	1(100)	0(0)	0(0)
計	78	32(41.0)	20(25.6)	8(10.3)

\* : %は各検体数に対する検出率

表2. 残留塩素濃度による検査法への影響

残留塩素濃度(ppm)	検体数	陽性検体数(%)		
		リアルタイムPCR法	LAMP法	培養法
<0.2	29	23(79.3)	14(48.3)	8(27.6)
0.2 ≤, ≤0.4	9	2(22.2)	2(22.2)	0(0)
0.4 <, ≤1.0	15	5(33.3)	2(13.3)	0(0)
1.0 <	23	2(8.7)	2(8.7)	0(0)
不明	2	0(0)	0(0)	0(0)

\* : %は各検体数に対する検出率

表3. 各検査法による検査結果の比較

(陽性検体すべてを含む) (%)

①	qPCR+	qPCR-
LAMP+	20 (62.5)	0 (0)
LAMP-	12 (37.5)	46 (100)

②	qPCR+	qPCR-
培養+	8 (25.0)	0 (0)
培養-	24 (75.0)	46 (100)

③	LAMP+	LAMP-
培養+	5 (25.0)	3 (5.2)
培養-	15 (75.0)	55 (94.8)

表4. 遺伝子検査法の検出感度

菌数 (50ml 相当)	Ct 値(qPCR 法)	Tt 値(LAMP 法)
0.05/tube	—	—
0.5/tube	38.39	—
5/tube	35.13	23:48
50/tube	33.33	29:41
500/tube	28.82	14:56
5000/tube	25.5	13:48

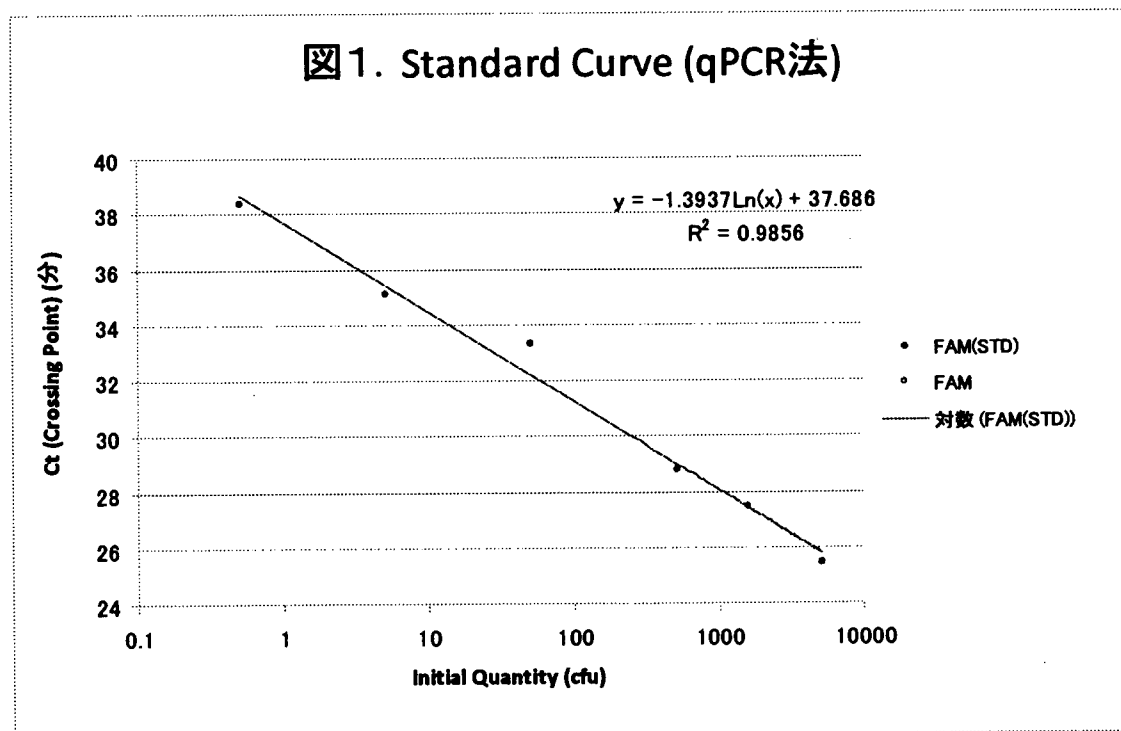
表5. 検査法別検出結果の比較

(10cfu/100ml 以上を陽性としたとき)

(%)

	qPCR+	qPCR-
培養+	5 (23.8)	3 (5.3)
培養-	16 (76.2)	54 (94.7)

図1. Standard Curve (qPCR法)





## [B]

### 研究要旨

短時間に結果が得られる迅速測定法(qPCR、LAMP)と従来法である培養法について比較検討した。標準菌では、培養法(菌数)とqPCR(Ct値)はLog<sub>2</sub>以上、LAMP(Tt値)はLog<sub>3</sub>以上で、双方に強い負の相関が認められたものの、それぞれLog<sub>2</sub>未満、Log<sub>3</sub>未満ではバラツキが大きかった。検体では、前処理として用いたカラムの有用性は認められたが、培養法と迅速測定法には相関は認められなかった。qPCRは培養法より検出感度が高くなったが、LAMPは、定性的検査法として使用可能であるものの、定量法として使用するにはさらに検討する必要があるものと思われた。

### A. 研究目的

レジオネラ症感染防止には浴槽水中のレジオネラ属菌の存在と菌数を迅速に把握する必要がある。しかし、現在の培養法による検査では、結果が得られるまで7~10日を要するため、迅速性に欠ける。そこで、短時間で結果の得られるレジオネラの迅速測定法(qPCR、LAMP)を用いて菌数を測定し、培養法と比較して迅速測定法の有用性を検討した。

### B. 研究方法

#### 標準菌(検量線の作成)

*L.pneumophilla* Nagasaki80-045 を標準菌として30°C3日間培養後、菌液を滅菌生理食塩水でMcF2(1.0×10<sup>8</sup>相当)に調整し、10倍希釈系列を作成した。希釈した菌液のDNA抽出をGLカラムで行い、qPCRおよびLAMPで測定した。希釈は2系列作成後、qPCR、LAMPで測定し、検量線を作成した。

#### 1) 検体の濃縮・DNA抽出

浴槽水500mLをフィルター(直径47mm、0.4μm、ミリポア社ポリカーボネートISOPORE)でろ過し、フィルターを滅菌蒸留水5mLで懸濁させたものを試料とした。この試料を濃縮試料として加熱処理後、GVPC培地(自家調整:BD社製BBL BCYE Agar BaseにOxoid製GVPCサブ

リメントを添加)に100μL塗布してレジオネラの菌数の算定および同定を行った。

qPCRおよびLAMPには、濃縮試料2mLを15,000rpm5分間遠心後、上清を除去した濃縮物100μLを用いた。この濃縮物100μLをリゾチーム、Protenase Kで処理後、QIAamp mini Kitの添付書に準じてGLカラムを用いDNA抽出を行い、得られた精製DNA5μLを試料としてqPCR、LAMPを測定した。

#### 2) qPCR

qPCRは、Cycleve Legionella(5S)kit(タカラバイオ)およびABI7900HI(ABI)を使用した。

反応条件は、step1:95°C10sec、step2:95°C10sec,55°C10sec,72°C30sec,45サイクルの2stepで行った。

#### 3) LAMP

レジオネラ検出用の専用試薬を用い、Loopamp濁度測定装置RT-160Cで測定した。

### C. 研究結果

#### 1) 標準菌(検量線の作成)

##### (1) qPCR

菌数は、10倍希釈系列2系列を測定した。Ct値は、菌数Log<sub>2</sub>以下で値が低くなる傾向がみられたが、双方には高い負の相関



( $R^2=0.9521$ )を示した(図1)。

## (2) LAMP

Tt 値と菌数は、相関( $R^2=0.3882$ )は認められなかった。菌数  $\text{Log}_3$  以上では双方に強い負の相関( $R^2=0.9952$ )がみられた(図23)。 $\text{Log}_3$  以上の希釈菌液を2回測定したところ、測定ごとに検量線が平行に移動する傾向が見られた(図4)。

## 2) 検体

### (1) qPCR

qPCR で数値が得られたものを陽性として培養法と検出数を比較すると、qPCR と培養ともに陽性(+)は17件、双方とも陰性(-)は11件で、qPCR(+)培養(-)は24件、qPCR(-)培養(+)は1件であった(表1-①)。qPCR で検出されたもののうち  $10\text{cfu}/100\text{ml}$  以上を陽性とした場合、qPCR と培養ともに陽性(+)は16件、双方とも陰性(-)は17件で、qPCR(+)培養(-)は18件、qPCR(-)培養(+)は2件となった(表1-②)。

更に、qPCR と培養法の菌数を比較したところ双方に相関はなかった(図5)。

今回調査した水道水、井戸水12件、薬湯1件、温泉40件からレジオネラの検出を試み、水質や泉質によって検出に差がでることはなく、すべての検体でインターナルコントロールが検出された。

### (2) LAMP

LAMP と培養ともに陽性(+)は14件、双方とも陰性(-)は26件、LAMP(+)培養(-)は9件、LAMP(-)培養(+)は4件であった(表1-③)。

### (3) qPCR と LAMP

qPCR、LAMP ともに陽性(+)23件、双方とも陰性(-)が12件、qPCR(-)LAMP(+)は皆無であったが、qPCR(+), LAMP(-)が18件あった(表1-④)。さらにqPCRで

$10\text{cfu}/100\text{ml}$  以上を陽性とした場合、qPCR(+)LAMP(+)20件、両方法とも陰性が24件、qPCR(-)LAMP(+)は3件、qPCR(+)LAMP(-)が6件あった(表1-⑤)

## D. 考察

今回、検査した温泉は、主に単純温泉、含硫黄・ナトリウム-硫酸塩・塩化物泉、ナトリウム-炭酸水素塩・塩化物泉で、検体をフィルター濃縮した後は一部の検体で黒色沈殿や白濁がみられた。しかし、これらの泉質や沈殿物はカラム処理後には認められず、更にqPCRの測定においてインターナルコントロールが検出されたことから、測定には影響しないことが確認された。また、従来の方法では、測定不能であった薬湯も今回は測定可能であった。

このように、カラムを用いたDNA抽出は、簡便でしかも浴槽の水質による阻害物質の影響も認められないためqPCRやLAMPなど迅速測定法の前処理として有用な方法であると思われる。

標準菌をスタンダードとしたqPCR、培養法で検出された菌数を比較すると、PCRは培養法より高い菌数を示す傾向が見られた。しかし、qPCRの標準菌を使用した検量線は高濃度に比べ低濃度側の数値が安定しなかったため、低濃度では、菌数が正確に測定できないことがあるものと思われ、低濃度の菌量では、DNA抽出効率が低いと推測された。しかし、既知濃度の精製DNAを用いてqPCRで測定して比較検討したところ、同様の結果であったことから、DNA抽出効率が要因ではないことがわかった。qPCR操作には熟練した手技が必要であるが、特に低濃度でのピペット操作を慎重に行うことで改善されるものと思う。

一方、LAMPは迅速に結果が早く得られることから定性的な検査には有用な方法であると思われた。しかし、菌量が高濃度の場合でも測定ごとに検量線が移動するため、測定時は検量

線を作成することが必要となることがわかった。また、菌量が低濃度の場合は測定値が不安定なため、未知試料についての定量は難しいと思われ、LAMPで定量するためには更に検討が必要であると思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

なし

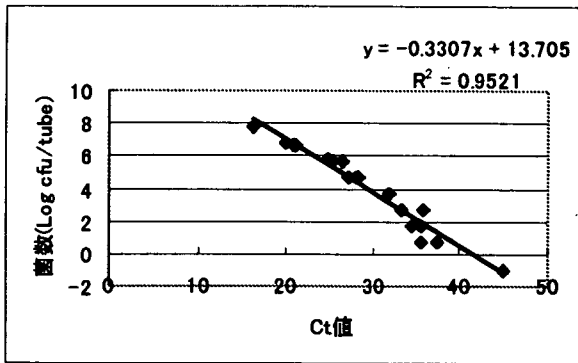


図1 qPCR検量線

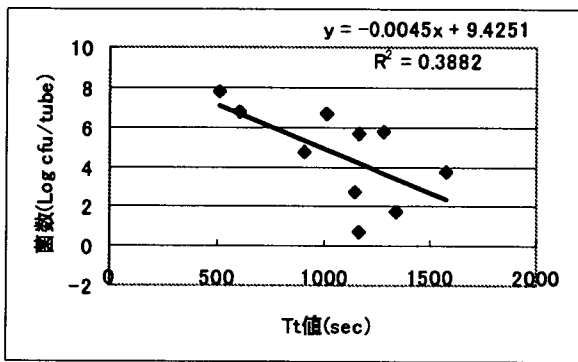


図2 LAMP 検量線

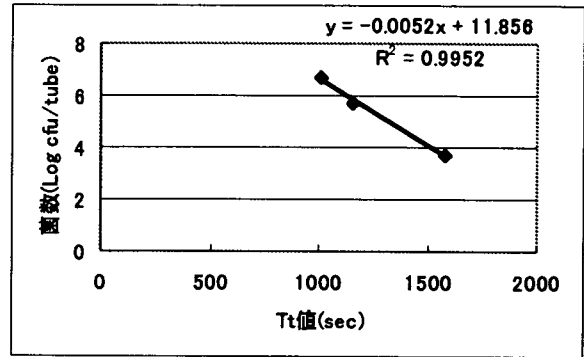


図3 LAMP 検量線(Log3以上)

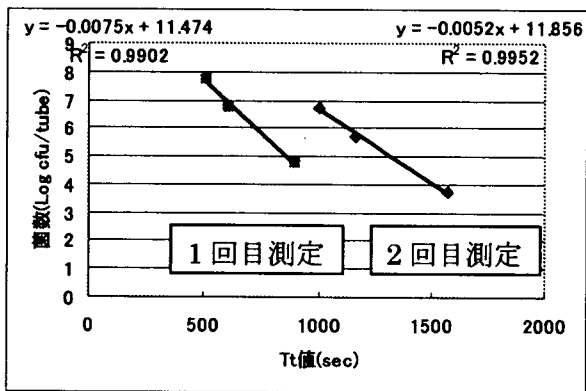


図4 測定別 LAMP 検量線(Log3以上)

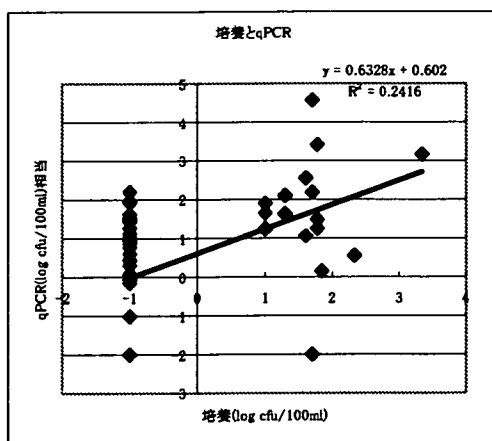


図5 培養法とqPCRの相関

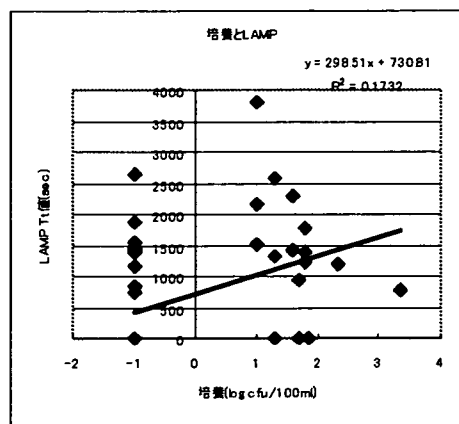


図6 培養法とLAMPの相関

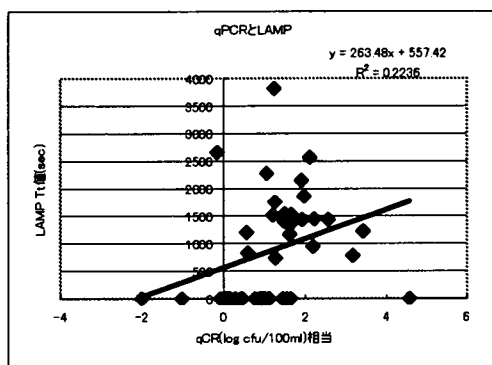


表1 検査法による検出数の比較

①培養とqPCR

		qPCR	
		陽性(+)	陰性(-)
培養	陽性(+)	17	1
	陰性(-)	24	11

②培養とqPCR(qPCR 10cfu/100ml以上を陽性とした場合)

		qPCR	
		陽性(+)	陰性(-)
培養	陽性(+)	16	2
	陰性(-)	18	17

③培養とLAMP

		LAMP	
		陽性(+)	陰性(-)
培養	陽性(+)	14	4
	陰性(-)	9	26

④qPCRとLAMP

		LAMP	
		陽性(+)	陰性(-)
qPCR	陽性(+)	23	18
	陰性(-)	0	12

⑤qPCRとLAMP(qPCR 10cfu/100ml以上を陽性とした場合)

		LAMP	
		陽性(+)	陰性(-)
qPCR	陽性(+)	20	6
	陰性(-)	3	24

[C]

## 温泉水等を用いた核酸検出法と培養法の比較検討

【目的】様々な泉質を有する温泉水等について、レジオネラ菌の迅速核酸検出法(qPCR,LAMP)と培養法を行い、それらの有用性を比較検討する。

【対象】公衆浴場、旅館 56 施設の浴槽水および湯口水を調査対象とした。

### 【方法】

#### 1. 検量線の作成

*Legionella pneumophila* SG1,Nagasaki 80-045 を指標菌株とし、30℃ 3日間培養後、滅菌生理食塩水で McF2 程度の菌液を調整し、10 倍希釈系列を作成した。希釈した菌液(10<sup>2</sup> から 10<sup>6</sup>)について、GL カラムを用いた DNA 抽出(以下、カラム法)とキレックス溶液を用いた DNA 抽出(以下、キレックス法)を行い、qPCR および LAMP で測定し、各々検量線を作成した。

#### 2. 検体の濃縮

検水 1000mL をメンブランフィルター(直径 47mm、0.2μm、ADVANTEC 社 CELLULOSE ACETATE)で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 10mL を無菌的に分注した 100mL 滅菌コニカルチューブに入れ、5 分間ボルテックスし、50℃ 20 分加熱、氷冷後、この試料を濃縮試料とした。

#### 3. 菌数測定および同定

未処理の検水および濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、その 100μL を WYOα 寒天平板(市販品)、GVPC 寒天平板(自家製)、MWY 寒天平板(自家製)、各々 2 枚にコンラージ棒で塗布し、36℃ 7 日間培養・観察後、菌数測定および同定、血清群型別を行った。

#### 4. 核酸抽出法

カラム法は濃縮試料 2000μL を分取し 12000rpm 10 分遠心後、上清を除去して濃縮物 100μL とした。この濃縮物を Lysozyme、ProteinaseK で処理後、QIAamp DNA mini Kit の添付プロトコールに従

い DNA 抽出を行った。抽出時、使用するカラムは GL カラム(GL サイエンス製)を用いた。

キレックス法は濃縮試料 1000μL を分取し 12000rpm で 5 分遠心後、上清を除去して沈渣に 5%キレックス溶液 200μL を添加、99℃ 5 分加熱処理し DNA 抽出を行った。

LAMP 測定時には、各々の DNA 抽出液を 95℃5 分加熱処理し、検査に供した。

### 5. 核酸検出法

qPCR については、CyclevePCR *Legionella*(5SrRNA)Detection Kit(タカラバイオ)を用い、Thermal Cycler Dice Real Time System(タカラバイオ)で測定した。

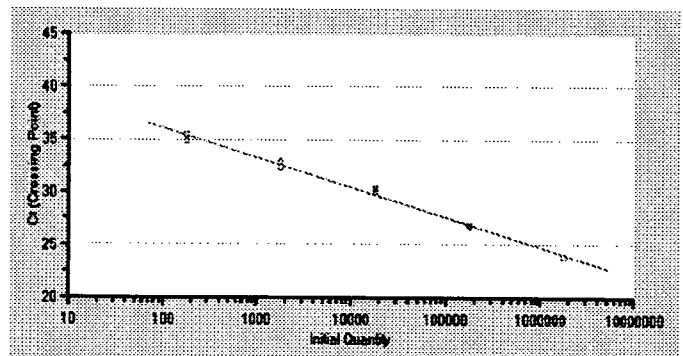
LAMP については、*Legionella* Detection Kit E(栄研化学)を用い、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で測定した。

### 【結果】

#### 1. 検量線

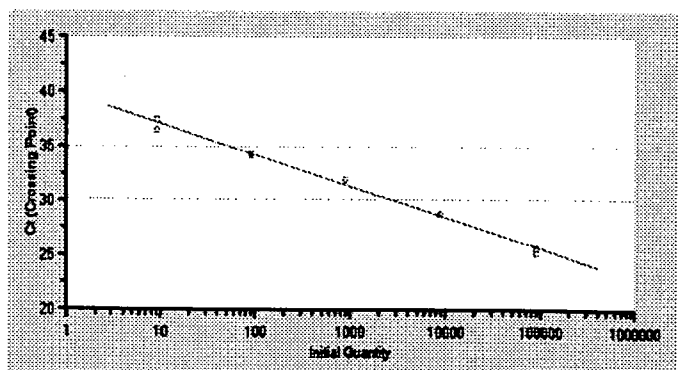
##### (1)qPCR

##### カラム法



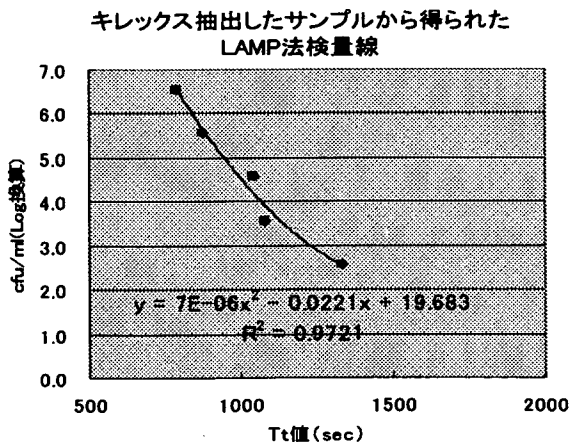
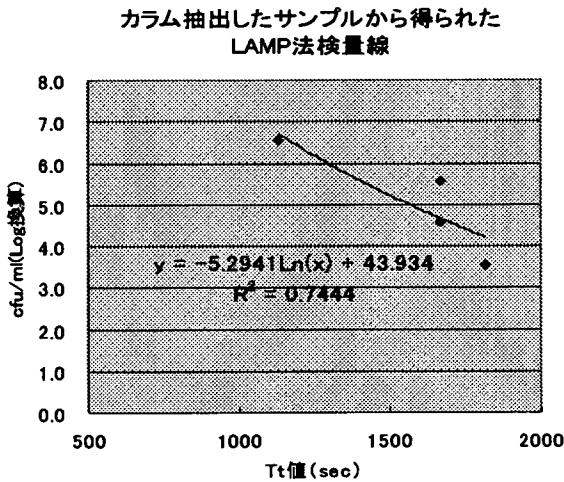
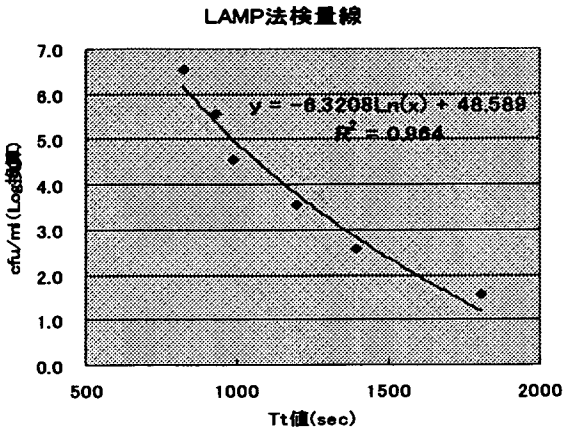
$$FAMY = -2.835 * \text{LOG}(X) + 41.75 \text{ RSq: } 0.993 \text{ Eff} = 125.3 \%$$

##### キレックス法



FAMY = -2.853 \* LOG(X) + 39.87 RSq: 0.990 Eff = 124.1 %  
 カラム法、キレックス法ともに高い負の相関 (R<sup>2</sup>=0.993, R<sup>2</sup>=0.990) を示した。

(2) LAMP



下、従来法)、キレックス法は高い負の相関 (R<sup>2</sup>=0.964, R<sup>2</sup>=0.972) を示し、カラム法も前の 2 法には劣るものの、高い負の相関 (R<sup>2</sup>=0.744) を示した。

2. 培養法

培養結果の概要を表 1 に示した。33 施設中 14 施設 (42%)、56 検体中 20 検体 (36%) から基準値 10cfu/100mL をオーバーするレジオネラ属菌が検出された。浴槽水は 33 検体中 13 検体 (39%)、湯口水は 23 検体中 7 検体 (30%) から検出され、このうち 6 施設は浴槽水と湯口水ともに検出された。

レジオネラ属菌が検出された 17 検体について分離培地の検出感度を比較した。その結果、使用した 3 種類の分離培地全てから分離されたものが 10 検体、WYOα + GVPC から分離されたものが 2 検体、GVPC + MWY、WYOα のみ、GVPC のみ、MWY のみから分離されたものが各 1 検体であった。

分離された *L. pneumophila* の主な血清群は SG1、SG3、SG4、SG5、SG6 で、*L. gormanii* が 1 施設 (浴槽水、湯口水) から検出された。同一の検体から複数の血清群のレジオネラ属菌が分離された施設が 14 施設中 12 施設 (86%) と多かった。

表 1 検出状況および分離培地の検出感度比較

	採水	検査	検出	WYOα	GVPC	MWY
	箇所	検体数	数	市販品	自製	自製
掛け流	浴槽水	21	10	9	7	8
	湯口水	16	6	4(2)	3	3(2)
循環式	浴槽水	12	3	2	3	2
	湯口水	7	1	1	1	1
計		56	20	16	14	14

3. 核酸検出法

(1) qPCR 対培養

カラム法で、qPCR と培養ともに (+) は 9 検体、両方法ともに (-) は 21 検体、qPCR (+) 培養 (-) は 15 検体、qPCR (-) 培養 (+) は 11 検体であった (表 2)。qPCR (-) 培養 (+) となったもののうち、4 検体はイン

試薬に添付されたプロトコールに従った方法(以

ターナルコントロールも(-)であった。

キレックス法で、qPCR と培養ともに(+)は 16 検体、両方法ともに(-)は 18 検体、qPCR(+)培養(-)は 18 検体、qPCR(-)培養(+)は 4 検体であった(表 2)。インターナルコントロールは全て(+)で PCR 阻害は認められなかった。

カラム法、キレックス法でqPCR(-)培養(+)となったものは 3 検体であった。

qPCR と培養法の菌数を比較したところ、相関係数はカラム法が 0.35、キレックス法が 0.25 で弱い相関しか認められなかった(図 1)。

表 2 qPCR と培養法の比較

	カラム法		計	キレックス法		計
	+	-		+	-	
培養 +	9	11	20	16	4	20
培養 -	15	21	36	18	18	36
計	24	32	56	34	22	56

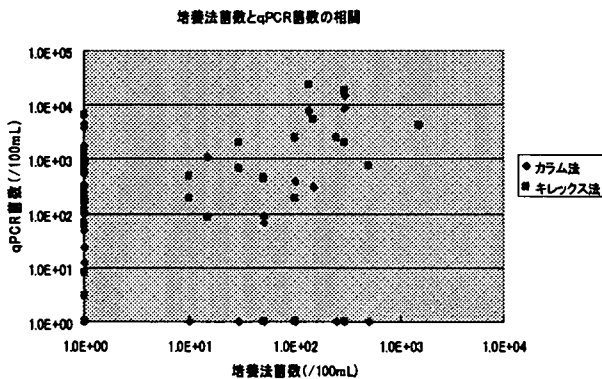


図 1 菌数の比較

### (2) LAMP 対培養

LAMP と培養ともに(+)は 14 検体、両方法ともに(-)は 29 検体で、LAMP(+)培養(-)は 7 検体、LAMP(-)培養(+)は 6 検体であった(表 3)。

LAMP と培養法の菌数を比較した結果を図 2 に示した。従来法が 0.38、キレックス法が 0.32 で弱い相関が認められたが、カラム法は 0.15 でほとんど相関が認められなかった。

表 3 LAMP と培養法の比較

	LAMP	
	+	-
培養 +	14	6
培養 -	7	29
計	21	35

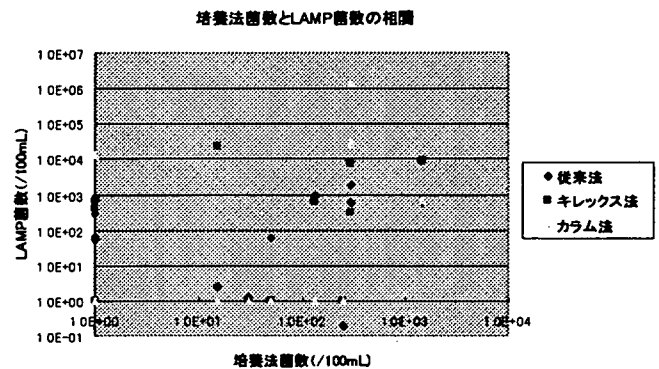


図 2 菌数の比較

### (3) qPCR と LAMP

カラム法で、qPCR と LAMP ともに(+)は 12 検体、両方法ともに(-)は 23 検体、qPCR(+)LAMP(-)は 12 検体、qPCR(-)LAMP(+)は 9 検体であった(表 4)。

キレックス法で、qPCR と LAMP ともに(+)は 18 検体、両方法ともに(-)は 19 検体、qPCR(+)LAMP(-)は 17 検体、qPCR(-)LAMP(+)は 2 検体であった(表 4)。

qPCR と LAMP の菌数を比較した結果を図 3 に示した。相関係数はカラム法が-0.05、キレックス法が-0.04 で相関が認められなかった。

表 4 qPCR と LAMP の比較

	カラム法		計	キレックス法		計
	+	-		+	-	
LAMP +	12	9	21	18	2	21
LAMP -	12	23	35	17	19	35
計	24	32	56	35	21	56

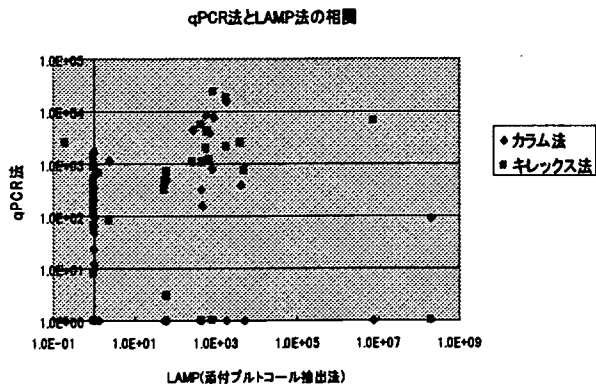


図3 菌数の比較

【考察】培養法について検討した結果、レジオネラ属菌が検出された17検体のうち、使用したWYO $\alpha$ 、GVPC、MWYの分離培地全てからレジオネラ属菌が分離されたものは10検体(59%)に過ぎず、レジオネラ属菌を感度よく分離するには、レジオネラ属菌の発育特性に配慮し、選択性の異なる培地を併用することが望ましい。

また、qPCR、LAMPが濃縮加熱後の「濃縮試料」から実施されること、当県の条例で「濃縮・加熱法で10cfu/100mL未満」という基準が定められていることから、本研究では濃縮・加熱後の試料から10cfu/100mL以上のレジオネラ属菌が検出された検体について検出感度などの解析を行った。しかし、濃縮・加熱後の試料からはレジオネラ属菌が検出されず、非濃縮・未加熱試料のみから検出される場合も多々あり、今後、濃縮フィルターから効率的にレジオネラ属菌を剥がす方法などを含めた分離培養法の見直し、検討を行う必要があると思われる。

qPCRにおいて、培養(+)にもかかわらずqPCR(-)となった不一致は、カラム法で11検体、キレックス法で4検体あった。カラム法でのqPCR(-)となった検体にインターナルコントロール(-)となるものが認められたため、PCR反応阻害がその一因と考えられる。キレックス法は、カラム法に比べ、培養法との相関係数が少し劣るものの、安価で、操作が簡便、迅速にDNA抽出をすることができ、PCR阻害も認められなかったことから、核酸検出法の前処理として有用な方法であると思われる。しかし、カラム法、

キレックス法ともに培養(+)qPCR(-)の不一致が特定の泉質に偏らず見られることから、人為的なミスを含めた他の要因も考慮する必要がある。この観点からも、抽出操作のステップが少なく、ロスが最小限に抑えられるキレックス法の方が、安定した結果が得られると思われる。

一方、核酸検査法としてLAMPは民間検査機関においても汎用されているが、培養(+)LAMP(-)の不一致が6検体あり、一致率を近づけるために早期の原因究明が求められる。



[D]

## Legionella 属菌迅速検査の有用性に関する 検討

### A 研究目的

レジオネラ症を防止するため、浴場施設の維持管理状況を把握、監視しなければならない。そのため、レジオネラ属菌による汚染状況をリアルタイムに把握することが必要となっている。そこで遺伝子増幅を利用した迅速測定法について、その有用性を検討した。

### B 研究方法

県内の温泉および銭湯等から浴用水 64 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 (qPCR 法、LAMP 法) を用いて調査した。検水の採取は県内の厚生センターの職員の協力を得た。

#### ① 検水の濃縮

浴用水 500ml をメンブランフィルター (直径 47mm、0.2  $\mu$ m、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE) で吸引ろ過し、フィルターを 5.0ml の滅菌蒸留水で 5 分間ボルテックスしたものを試料とした。

#### ② 培養法

試料を 50°C 20 分加熱処理後、GVPC 培地 (バイオキュー)、WYO 培地 (栄研化学) にそれぞれの培地毎に 100  $\mu$ l、10  $\mu$ l 量をコンラージし、35°C で 7 日間培養した。

#### ③ DNA 抽出法

遺伝子増幅法に用いる DNA は、最適の条件を得るため、研究班で検討するカラム法と、以下 2 法に示す DNA 抽出法について検討した。

カラム法 本研究班のプロトコールに従っ

た(資料①)

Chelex(Bio-rad)法とアルカリ熱抽出法

資料②③に示すプロトコールに従った (以下 Chelex 法・アルカリ法と記載)。それぞれ得られた抽出 DNA を用い、遺伝子増幅法 (qPCR 法、LAMP 法) にてレジオネラ属菌を算定した。

#### ④ qPCR 法

試薬は Cycleve Legionella(5S)kit (タカラバイオ) を用いて ABI PRISM7000 (アプライドバイオシステムズ) で測定した。反応条件は試薬キットのプロトコールに従った。

#### ⑤ LAMP 法

Loopamp レジオネラ検出試薬キット E を用い、濁度測定装置 LA-320C で判定した。

#### ⑥ 検量線の作成

研究班で指定された *L.pneumophilla* Nagasaki 80-045 を標準菌として、30°C 3 日間培養後、滅菌生理食塩水で菌を懸濁し、McF2 (10<sup>8</sup>cfu/ml 相当) になるよう調整した。それをを用いて 10 倍段階希釈系列を作製した。この 2ml あるいは 1ml を用いて DNA を抽出した。また、この希釈系列の 100  $\mu$ l をコンラージし、菌数を測定した。

### C 研究結果

#### 1. 浴用水中のレジオネラ属菌の検出

カラム法抽出 DNA を用いて、次のような結果を得た。

検水 64 件中、レジオネラ属菌陽性 (10cfu/100ml) となったのは、培養法 27 件 (42.2%)、qPCR 法 27 件 (42.2%)、LAMP 法 25 件 (39.1%) で、検出率に大きな差は認められなかった (表 1)。ただし、培養法が陽性の検水 27 件のうち、遺伝子法が陰性の検

水は、qPCR法で12件、LAMP法で11件、うち9件は遺伝子増幅法のいずれも陰性であった。一方、培養法で陰性となった検水37件のうち遺伝子増幅法が陽性となったのは、qPCR法7件、LAMP法12件、いずれも陽性となったのは5件であった(表2)。一方、qPCR法とLAMP法を同様に比較したところ、結果が一致したのは50件(78.1%)であった(表3)。

表1 浴用水中のレジオネラ属菌検出率

	検体数	陽性数	%
培養法		27	42.2
qPCR	64	27	42.2
LAMP法		25	39.1

陽性：>10cfu/100ml

表2 方法別レジオネラ属菌検出数の比較

		Real-Time		計	LAMP		計
		+	-		+	-	
培 養	+	15	12	27	16	9	25
	-	7	30	37	9	30	39
計		22	42	64	25	39	64

+ : >10cfu/100ml

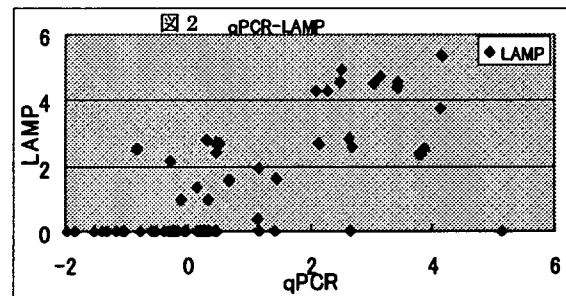
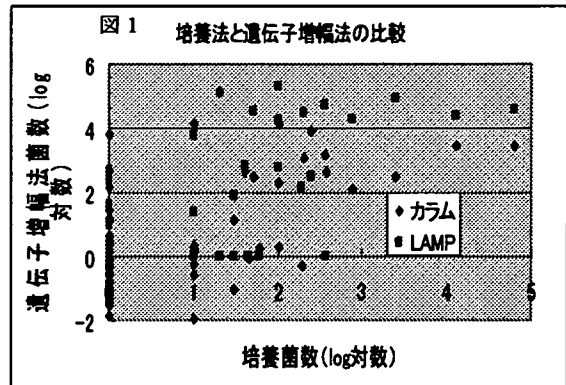
表3 qPCRとLAMPのレジオネラ属菌検出数の比較

	Real-Time PCR法	LAMP法		計	一致 率
		+	-		
	+	17	5	22	
	-	8	34	42	
	計	28	36	64	79.7

+ : >10cfu/100ml

レジオネラ属菌数について、それぞれの方法で得られた菌数をlog対数で比較したところ、培養菌数との相関係数はqPCR法で

$R^2=0.4132$ 、LAMP法で  $R^2=0.318$  とqPCRのほうが高かった(図1)。



## 2. DNA抽出法の検討

-Chlex法・アルカリ法との比較-

カラム法・Chlex法・アルカリ法の検量線は、菌液  $7.0 \times 10^5 \sim 10^{-1}$  の6段階での菌数とCt値に直線性が見られた。それぞれの係数は  $R^2=0.771967$ 、 $R^2=0.962134$ 、 $R^2=0.991707$ (図3-5)で、アルカリ法の直線性がもっとも良かった。

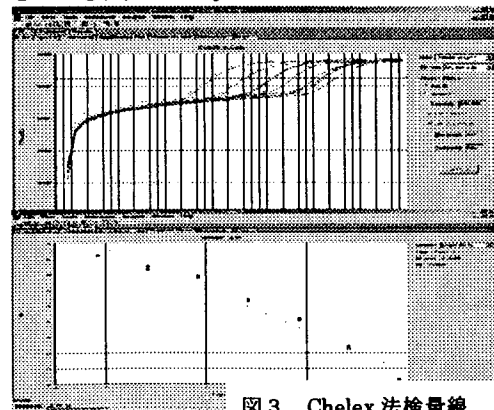


図3. Chelex法検量線

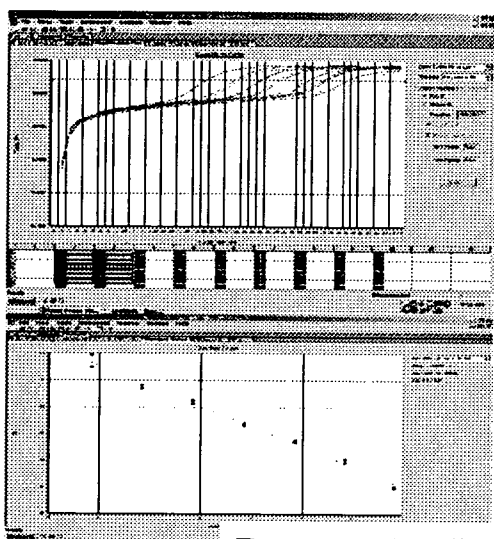


図4. アルカリ法検量線

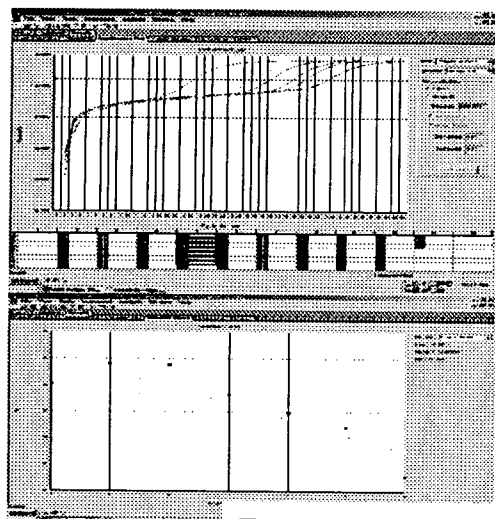
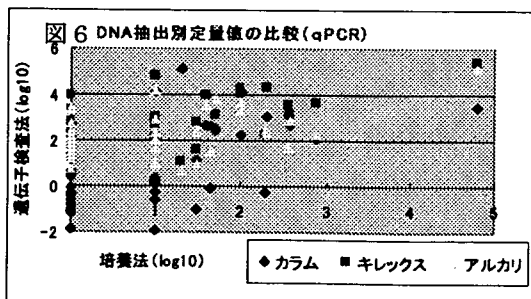


図5. カラム法検量線

これらの検量線から求められるレジオネラ属菌の DNA 抽出法別の定量値を比較した(図6)。培養法と比較するとChelex 法がもっとも高い相関を示した。



LAMP での定量性については、その反応

特性から検量線に正確な直線性を求めるのは困難であると思われるが、結果的に  $10^3$  cfu/ml 以上では、定量性が認められた(図7-9)。

図7 LAMP 法における検量線

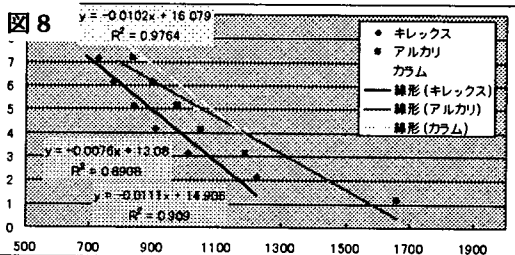
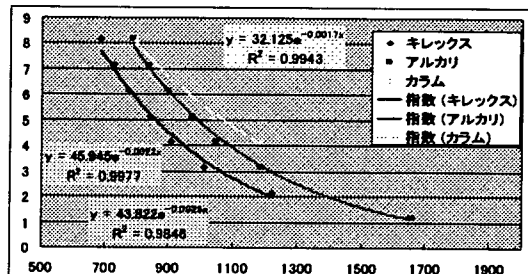
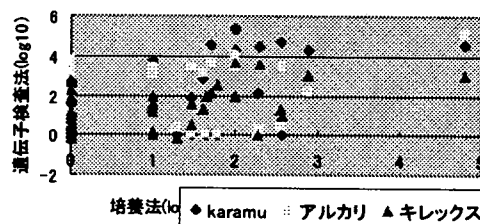
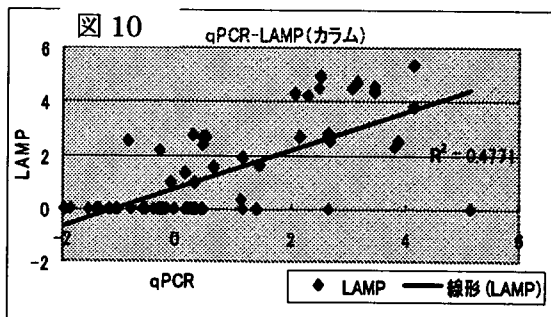


図9 DNA抽出別定量値の比較(LAMP)



LAMP の検量線から算定した菌数を培養法と比較すると、カラム法がもっとも高い相関を示した。

カラム法抽出DNAを用いて算定した菌数をqPCR と LAMP で比較するとわずかにqPCR の値が高かった(図10)。



これらの定量値を 10cfu/ml 以上を陽性として、浴用水のレジオネラ属菌検出率を培養法と比較した(表 4)。Chelex 法で抽出した DNA を用いた場合、培養法でレジオネラ陽

られる。浴用水管理基準がレジオネラ属菌数であることから、阻害物質の混在による定量性への影響の少ない DNA 抽出法を用いる必要がある。

表 4 DNA 抽出法別レジオネラ属菌検出数 (培養法との比較)

	カラム法				アルカリ熱抽出法				Chelex抽出法			
	LAMP法		Real-Time PCR法		LAMP法		Real-Time PCR法		LAMP法		Real-Time PCR法	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
培 陽性	16	11	15	12	14	9	19	3	21	2	23	0
養 陰性	12	25	7	20	13	19	18	5	17	12	23	6
法 未検査					4	5	5	14	4	8	4	8

性の検水は qPCR 法では全て陽性、LAMP 法では 2 件が陰性であった。

培養法と結果が一致した件数は、qPCR 法では、Chelex 法が 29/52 件 (55.8%)、アルカリ法が 24/45 件 (53.3%)、カラム法が 45/64 件 (70.3%) であった。

#### D 考察

研究班ではカラム法抽出 DNA を用いてレジオネラ属菌を迅速に検出できるかを検討した。64 浴用水について検討したところ、レジオネラ属菌陽性 (>10 cfu/100 ml) となったのは、培養、qPCR、LAMP いずれの方法でも結果に大きな差は認められなかった。しかし、すべての方法で陽性となったのは 13 件で、一部の検水では、培養法でレジオネラ属菌が検出されたにも関わらず、qPCR、LAMP では検出されなかった。また、qPCR で検量線は直線性を示したが相関係数は高くなかった。死菌 DNA も検出するという PCR の機序を考慮すると、その定量値が培養法と同等あるいはより低いという結果は DNA を抽出する過程におけるロスや遺伝子増幅時に反応阻害を受けていることが考え

検討した DNA 抽出法 (Chelex 法、アルカリ法) を用いた場合、レジオネラ属菌の検出率は qPCR、LAMP いずれの反応においても高く、また、菌数も qPCR では培養法より多いという結果であった。これらの結果は、遺伝子検査法が迅速検査法として利用できることを示すものである。

今後、この DNA 抽出法に検討を加えて、誰でも簡便に使えるプロトコールを作成すること、培養法との整合性をどうとるかについて、より多くの検体での評価が必要と思われる。

#### 謝辞

浴用水採取にご協力いただいた厚生センターの職員の皆様に深謝します。