

200840029A

厚生労働科学研究費補助金  
健康安全・危機管理対策総合研究事業

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 倉 文 明

平成21（2009）年3月

厚生労働科学研究費補助金  
健康安全・危機管理対策総合研究事業

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 倉 文 明

平成21（2009）年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

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---1

倉 文明

## II. 分担研究報告

1. 阻害回避試薬を用いた迅速検査-----13  
泉山信司、遠藤卓郎
2. DNA 抽出法の改良-----25  
田栗利紹、遠藤卓郎
3. RT-qPCR を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討-----37  
烏谷竜哉、泉山信司、遠藤卓郎
4. Ethidium monoazide (EMA) 処理とリアルタイム PCR のコンビネーションによる  
環境中のレジオネラ生菌のみを定量検出する方法に関する研究-----51  
常 彬、前川純子、杉山寛治、田栗利紹、倉 文明
5. 市販 DNA 抽出キットを用いたレジオネラ核酸検出法の検討-----59  
杉山寛治
6. 専用試薬による *Legionella londiniensis* の迅速検査-----65  
泉山信司、前川純子、烏谷竜哉、佐々木美江、遠藤卓郎
7. 浴槽水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討-----69  
緒方喜久代、中嶋 洋、磯部順子、佐々木美江、泉山信司、遠藤卓郎、倉 文明
8. ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究-----91  
黒木俊郎、荒井桂子、杉山寛治、中嶋 洋、田栗利紹、緒方喜久代、佐々木美江、  
藤田雅弘、磯部順子
9. *Legionella pneumophila* の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析  
-由来による違いについて- -----107  
前川純子
10. 土壌から分離された *Legionella pneumophila* の鞭毛遺伝子型別について  
-浴槽・給湯水、冷却塔水および臨床分離株との比較- -----119  
前川純子、常 彬、倉 文明
11. レジオネラ属菌迅速測定法の有用性の検討-----125  
荒井桂子

12. 検査法の検討2 効率の良いコロニー観察法の普及-----	133
森本 洋、緒方喜久代、佐々木美江、磯部順子	
13. 検査法の検討3 濃縮についての検討、分離培地としてのBCYE $\alpha$ 培地活用に関する検討-----	147
森本 洋	
14. 免疫磁気分離法による浴槽水からのレジオネラの濃縮法-----	157
倉 文明、荒井桂子、緒方喜久代、中嶋 洋、森本 洋、渡辺祐子、磯部順子、佐々木美江	
15. 標準試料配付による精度管理の改良-----	177
渡辺祐子、倉 文明	
16. DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌種の同定法の確立--	193
山崎利雄、前川純子	
17. ヒト感染性が見られない <i>Legionella londiniensis</i> の宿主アメーバ-----	199
八木田健司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	209
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	211

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

総括研究報告書

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

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所
	常 彬	国立感染症研究所 細菌第一部
	前川 純子	国立感染症研究所 細菌第一部
	八木田 健司	国立感染症研究所 寄生動物部
	山崎 利雄	国立感染症研究所 バイオセーフティー管理室
	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
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
	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
	森本 洋	北海道立衛生研究所
	渡辺 祐子	神奈川県衛生研究所

研究要旨： わが国におけるレジオネラ症の集団発生は主として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。そこで、今年度は以下の検討を行い、成果を得た。

- 1) 浴槽水等（428 試料）のレジオネラを DNA 迅速検査により定量し、阻害物質の混入を避ける DNA 抽出法を開発し、検出感度を向上させた。また、リボソーム RNA を鋳型として検出する RT-qPCR（逆転写産物を鋳型とした定量 PCR）の条件を検討し、感度を 1000 倍向上させた。
- 2) 生菌を検出する DNA 迅速検査を開発して浴槽水中のレジオネラ数の測定を実施した。
- 3) バイオマスの指標としての ATP について、現場で浴槽水の ATP を測定して、迅速に浴槽を衛生管理する指標値を提案した。
- 4) 菌の遺伝子型と生息環境(感染源)との関係を検索し、冷却塔水由来および土壌由来に特徴的な遺伝子型を確認した。
- 5) 菌株識別法であるパルスフィールド電気泳動法を改良し、結果が判明するまでの日数を 4 日から 2 日に半減させた。
- 6) 迅速検査の対照となる培養法の改善法（非濃縮検体の並行培養、非選択培地の活用）を提言した。培養法と遺伝子検査法を組み合わせ、早期のコロニーを遺伝子検査法で同定することにより、結果が得られる時期を 4 日間以上短縮した。
- 7) 環境水の濃縮、培養の段階ごとにレジオネラ属菌数の外部精度管理を行った。
- 8) レジオネラ属菌の同定のための DNA-DNA ハイブリダイゼーション(DDH)キットに新たな菌種を追加した。
- 9) 浴槽水中に大量に検出されることのある *L. londiniensis* の宿主アメーバの検索を行い、*Naegleria* 属のアメーバと一部の *Acanthamoeba* 株への感染性を認めた。



## A. 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。

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。また、迅速でかつ現行の培養法の結果とよく対応できるようにするために生菌を検出するPCR法を開発し浴槽水に応用した。

わが国においてレジオネラ症の主要な感染源は温泉などの入浴施設であると推測されているが感染源の不明な例も多い。そこで、レジオネラ症の起因菌株について、レジオネラレファレンスセンターにおいて収集し、遺伝子型別(SBT)を行なった。さらに、SBTにおいて生息環境の推定に有用な*flaA*について、土壌から分離される*L. pneumophila*について*flaA*の型別をおこない、その特徴付けを行なった。

## B. 研究方法および材料

### 1. 標準菌

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長崎80-045株(斉藤ら, 1981)を暫定的な基準株とした。この保存株をBCYE $\alpha$ 培地(DIFCO)に植え、30℃、4日間培養した。35℃で培養しないのは、細長い形態の菌となるのを防ぎ正しいDNA-cfu関係を求めるためである。得られた菌を生理食塩水にMcFarland No. 2程度の濃度に懸濁し、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なった。

### 2. DNA抽出とDNA増幅

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。酵素溶菌法では、DNA抽出工程を中性域(pH 7.6のTE緩衝液使用)で行い、Proteinase Kにより溶菌する。さらにDNA回収用シリカ・カラムを使用した。

リアルタイムPCR(ここではサイクリングプローブ法と通常のプローブ法)やLAMP法を用いた。サイクリングプローブ法は、RNAとDNAからなるキメラプローブとRNase Hの組合せにより蛍光を検出し、高感度で非常に配列特異性が高い。LAMP法は、被検試料を恒温で培養し、濁度測定によってレジオネラを検出する迅速簡便な方法である。これら2つの方法は、それぞれ5S rRNA遺伝子、16S rRNA遺伝子という異なる遺伝子を標的にしている。EMA-PCR法では16S rRNA遺伝子を標的にmolecular beacon probeを設定した。

### 3. 浴槽水の検査

200mLあるいは500mLの浴槽水をろ過濃縮(ミリポア ISOPORE GTTP02500あるいは HTTP04700、ポリカーボネー

ト 0.2  $\mu$ m, 0.4  $\mu$ m) した。ろ過のできなかった薬湯等の一部は遠心濃縮した。培養法は GVPC 培地で 37°C、5~7 日間培養した。一部には WYO $\alpha$  培地や MWY 培地も用いて比較した。DNA の抽出は酵素溶菌法により行った。同時に遊離残留塩素濃度（現場測定、DPD 法）を測定した。なお、一部にキレックス樹脂の添加と加熱の手順で DNA を抽出した。

#### 4. Ethidium monoazide (EMA) と PCR のコンビネーションによるレジオネラの生菌と死菌の区別

レジオネラ属菌 2 株 (*Legionella pneumophila* 1 株および *L. bozemanii* 1 株) を生理食塩水に懸濁し、約 10<sup>7</sup> CFU/100 ml の懸濁液を作製した。これらの菌液を遊離塩素 1 ppm で室温 30 分処理し、死菌の調製を行った。レジオネラの生菌および塩素処理した死菌を含む懸濁液それぞれを 500 mL の水道水に添加し、モックサンプルを作製した。一方、公衆浴場およびモデル浴槽から水サンプルを採集し、解析を行った。これらのサンプルは遠心により濃縮し、酸処理したサンプル 0.1 mL を BCYE または GVPG 寒天培地に塗布し、37 °C で培養した。濃縮サンプルに EMA を添加し、遮光下 4°C で 5 分間放置した後、可視光を 5 分間照射した。常法により染色体 DNA を精製し、レジオネラの 16S rDNA を標的とする qPCR による定量解析を行った。

#### 5. *Legionella pneumophila* の遺伝子型の解析

EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく

型別 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した。昨年報告した臨床分離株 61 株もあわせて、遺伝子型別によるそれらの菌株間の類縁関係を BioNumerics (Applied Maths) を用いて minimum spanning tree 法により解析した。

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがい、周辺の環境の汚染を引き起こさず、個人情報保護に十分に配慮して行われた。

#### C. 研究結果および考察

1) 浴槽水 126 検体からアルカリ熱抽出法で鋳型を調製し、LAMP 反応を実施した。反応阻害回避試薬の使用の有無で反応性を比較した結果、反応の陽転が 10 件、Tt 値の短縮(一定の濁度になるまでの時間、反応阻害がなければ短縮される)が 22 件あり、明らかな改善が認められた。環境試料における迅速検査においては、反応阻害回避試薬の利用が推奨された。

DNA 抽出のための改良酵素溶菌法として、昨年度の酵素溶菌法からリゾチーム処理を省略し最後のカラムからの回収に 20  $\mu$ L $\times$ 1 から 50  $\mu$ L $\times$ 2 に変えた。これによりフミン酸による阻害を回避し、かつ容量が増えて取り扱いやすくなった。浴槽水で検査しても培養法と同レベル (10 CFU/100 mL) の菌数を検出可能であった。これまでの成果の一部はレジオネラ症防止指針第 3 版[ビル管理教育センター] (書籍 1) に反映された。

リボソーム RNA を鋳型として検出する RT-qPCR (逆転写産物を鋳型とした定量 PCR) の開発を行い 1000 倍以上の感度の増加をみた(図 1、図 2)。RNA の抽出には酵素溶解反応後、カラム精製のステップを省略して希釈



- するだけでよかった。通常のリアルタイム PCR 法と高い相関 ( $R^2=0.771$ ) を示した。不思議なことに、RNA は DNA とほぼ同じ挙動を示し、環境中においても比較的長く保存されていることが示唆された。
- 2) 菌体の ethidium monoazide (EMA) 処理とリアルタイム PCR を組み合わせて、生菌と死菌を区別する DNA 迅速検査を開発した (図 3、論文 1、特許出願)。この方法では浴槽水中の従属栄養細菌を検出しなかった。浴槽水由来の菌は、平板培地由来の菌に比べ EMA 処理に対する感受性が高く、浴槽水の塩素濃度を目安に EMA 濃度を使い分ける必要があった。
  - 3) 浴槽水の ATP 測定により、微生物による汚染状況を迅速に把握できた。356 の浴槽水試料を検索したところ (図 4)、ATP 量を反映する相対発光値 RLU が 40 以上でレジオネラの汚染率が高くなっていた (図 5)。
  - 4) 7 つの遺伝子型 sequence-based typing によりわが国の *L. pneumophila* 臨床分離株 86 株は、53 種類に型別された (総説・報告 4 に一部報告)。菌の遺伝子型の近縁関係を示す minimum spanning tree により冷却塔水由来株が 1 つの complex を形成していると確認された (図 6)。冷却塔水由来および浴槽水由来の *L. pneumophila* 株の間で明白な *flaA* 遺伝子型の違いがあった (論文 3) が、さらに、土壌由来の株にも独自の *flaA* 型 (*flaA5*, *flaA12* が特異的に多かった) があり、感染源の推定に役立つと思われた (図 7)。
  - 5) 感染源の特定に必須の検査となっている菌株のパルスフィールド電気泳動において、酵素処理時間を短縮し、結果判明までの期間を 4 日から 2 日に短縮した (論文 2)。
  - 6) レジオネラ平板培養の効率の良い観察法 (斜光法) の研修を 10 地研に行った。この方法により早ければ 2 日でレジオネラのコロニーを確認できた。非濃縮検体による培養は、混入する雑菌の影響を受けにくく計数不能となりにくかった。非選択培地である BCYE  $\alpha$  を使用したところ、抗菌剤添加培地に比べ 13% が BCYE  $\alpha$  のみでレジオネラが検出され、35% で BCYE  $\alpha$  の方が検出率が高まった。特に清掃消毒後の浴槽水、源泉等雑菌の存在が少ないと考えられる検体に対し有用であった。

種々の泉質の温泉由来の浴槽水等 191 検体について、従来法 (ろ過法) と、新規の免疫磁気分離法 (immunomagnetic separation : IMS) の菌濃縮方法について比較検討した。IMS 法はろ過法に比べ、感度は 78.3%、特異性は 94.7% となった。ろ過法との両対数の散布図を示した (図 8)。ろ過法より回収率は低い、雑菌の多い検体における有用性が示唆された。

これまで培養法では浴槽水の検査結果が得られるのに 7-10 日を要した。培養法と遺伝子検査法を組み合わせ、早期のコロニーを遺伝子検査法でレジオネラ属菌と同定することにより、3-5 日で結果が得られるようになった (4-7 日間短縮できた)。
  - 7) 外部精度管理で、菌数の少ないディスクを溶かした試料水におけるレジオネラの低回収率の原因を各ステップに分けて検討した。8 地研の結果では、遠心法よりろ過法、加熱処理より酸処理の方が回収率がよかった (表 1)。

8) 市販の DDH キットでは同定できないが環境から分離される *L. londiniensis*、*L. busanensis*、*L. greisilensis* について新たに DDH 同定用プレートを作製した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定では菌種の同定が困難であった環境分離株が、この新規プレートにより *L. busanensis* と同定された。

9) 宮崎の集団感染事例で浴槽水中に最も多量 (150 万/100mL) に検出されながら昨年度 *Acanthamoeba* への感染性が認められなかった *L. londiniensis* について、*Naegleria* 属のアメーバと一部の *Acanthamoeba* への感染性を認めた (表 2、図 9)。

#### D. 結論

わが国におけるレジオネラ症の集団発生は主として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。現行の培養法では、結果判定までに 1 週間程度を要しているため、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。今年度は、迅速・簡便な検査について以下のように改善した。浴槽水等のレジオネラを DNA 迅速検査により定量し、阻害物質の混入を避ける DNA 抽出法を選択し、検出感度を向上させた。また、リボソーム RNA を鋳型として検出する RT-qPCR (逆転写産物を鋳型とした定量 PCR) を行い、感度を 1000 倍向上させた。生菌を検出する DNA 迅速検査を開発して浴槽水中のレジオネラ数の測定を実施した。バイオマスの指標としての ATP について、現場で浴槽水の ATP を測定して、迅速に浴槽を衛生管理する指標値を仮設定した。菌株識別法であるパルスフィールド電気泳動法

の結果の判明するまでの日数を半減させた。培養法と遺伝子検査法を組み合わせ、早期のコロニーを遺伝子検査法でレジオネラ属菌と同定することにより、3-5 日で結果が得られるようになった (4-7 日間短縮した)。

E. 健康危険情報  
なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

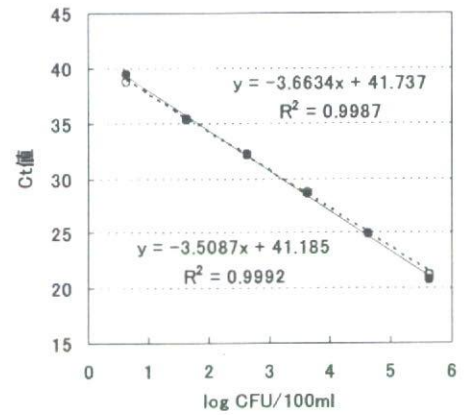
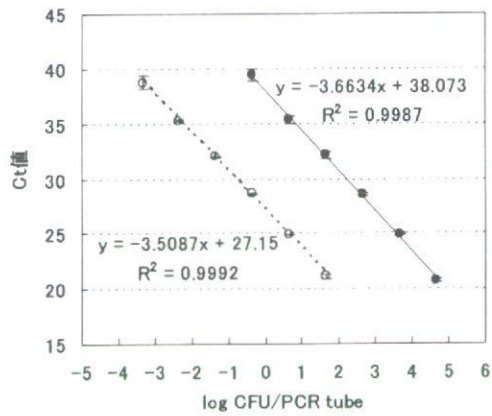
- 1) Chang B, Sugiyama K, Taguri T, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. 2009. Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 147-53.
- 2) Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. 2009. An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of PFGE agarose plugs for the analysis of *Legionella* isolates. *Jpn J Infect Dis.* 62: 54-6.
- 3) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Endo T, Watanabe H. 2008. *flaA* genotypes of *Legionella pneumophila* isolates from bath water and cooling tower water show distinct distributions. *Microbiol Immunol* 52:460-464.
- 4) 烏谷竜哉, 黒木俊郎, 大谷勝実, 山口誠一, 佐々木美江, 齊藤志保子, 藤田雅弘, 杉山寛治, 中嶋洋, 村上光一, 田栗利紹, 藏元強, 倉文明, 八木田健司, 泉山信司, 前



- 川純子, 山崎利雄, 縣邦雄, 井上博雄. 2009. 掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子. 感染症学会誌 83:36-44.
2. 書籍刊行
- 1) 縣 邦雄, 泉山信司, 市川憲良, 遠藤卓郎, 大高道也, 小川正晃, 倉文明, 後藤 元, 舘田一博, 中島博志, 中村 勉, 古畑勝則, 養島 稔, 柳 宇, 山口恵三, 山崎 和生. 第3版 レジオネラ症防止指針. 財団法人 ビル管理センター. 東京. 平成21年3月.
3. 総説、報告
- 1) レジオネラ症 2003.1-2008.9. 病原微生物検出情報. 29:327-328. 2008.
  - 2) 木股裕子, 南出正之, 貫名正文, 常彬, 前川純子. 2008年1月、神戸市における公衆浴場でのレジオネラ症集団発生事例. 病原微生物検出情報. 29:329-330. 2008.
  - 3) 中嶋 洋, 狩屋英明, 大島律子, 小林正和, 岩藤弘子, 後藤幸子, 浜裕志, 野山幸子, 難波 勉, 阿部孝一郎. 老人福祉施設におけるレジオネラ集団感染事例ー岡山県. 病原微生物検出情報. 29:330-321. 2008.
  - 4) 前川純子, 倉 文明, 金子紀子, 渡辺祐子, 磯部順子, 貫名正文, 中嶋洋, 河野喜美子, 多田有希. レジオネラ臨床分離株の収集と型別から得られた知見. 病原微生物検出情報. 29:332-323. 2008.
  - 5) 常 彬, 前川純子, 渡辺治雄. レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の改良. 病原微生物検出情報. 29:333-324. 2008.
3. 学会発表
- 1) 渡辺祐子, 高橋智恵子, 大屋日登美, 岡崎則男: VNTR 法を利用した *Legionella pneumophila* の遺伝子型別. 第82回日本感染症学会総会. 2008, 島根.
  - 2) Kura F, Amemura-Maekawa J, Yamazaki T, Endo T, Watanabe H, Morimoto Y, Iwabuchi K, Kumada H, Fujita M, Kuroki, T, Sugiyama K, Niikawa A, Hara N, Saishu N, Ogata, K, and Agata K. Surveillance of *Legionella* in hot springs with physicochemical and microbiological water quality parameters. 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Madrid, Spain. May 2008.
  - 3) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H, and Helbig JH. Sequence based typing and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in Japan. 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Madrid, Spain. May 2008.
  - 4) Chang B, Honda N, Yoshida S-I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H: Discrimination of viable and dead *Legionella* by photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR combination. XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Istanbul. August 2008.
  - 5) 森本 洋, 清水俊一, 池田徹也, 山口敬治: レジオネラ選択分離生培地の違いが検査結果に影響を与

- えるか？ 第 60 回北海道公衆衛生学会， 2008 年 11 月， 札幌。
- 6) 倉 文明：浴槽水環境におけるレジオネラの増殖リスクおよび必要とされる迅速検査。ワークショップ「環境改変と感染症」。第 82 回日本細菌学会総会。 2009 年 3 月， 名古屋。
- 7) 前川純子， 倉 文明， 常 彬， 市瀬正之， 渡辺治雄： *Legionella pneumophila* 血清群 1 分離株の遺伝子型別およびモノクローナル抗体型別。 第 82 回日本細菌学会総会。 2009 年 3 月， 名古屋。
- 8) 常 彬， 前川純子， 渡辺治雄：レジオネラ解析用パルスフィールドゲル電気泳動法の改良。 第 82 回日本細菌学会総会。 2009 年 3 月， 名古屋。
- 9) 前川純子：レジオネラの検査法の進歩。ワークショップ「レジオネラの細菌学」。 第 82 回日本細菌学会総会。 2009 年 3 月， 名古屋。
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
特許出願中  
「特願 2008-181272. 常彬、前川純子、倉文明、渡辺治雄、吉田眞一、副島隆志：レジオネラ属菌の検出方法及び検出キット」



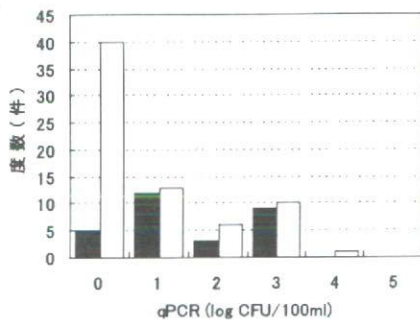


(a) PCR チューブあたりの検量線

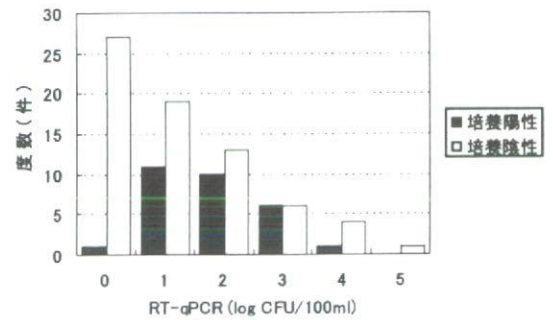
(b) 濃縮前の試料濃度に換算した検量線

図 1 RT-qPCR と qPCR の検量線

1) 全試料 (n=99)

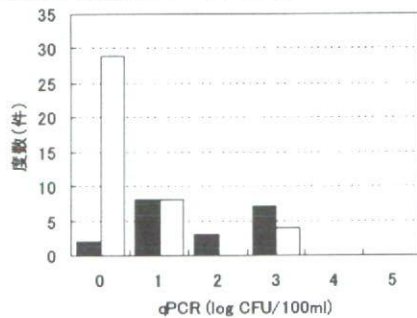


(a) qPCR 法

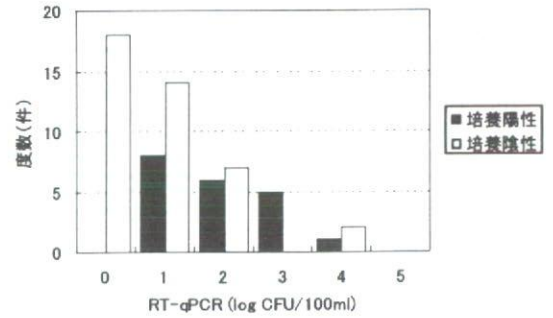


(b) RT-qPCR 法

2) 浴槽及び逆流水等 (n=61)

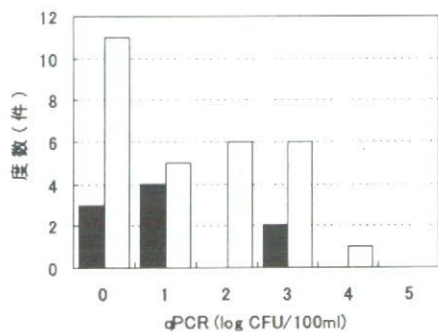


(a) qPCR 法

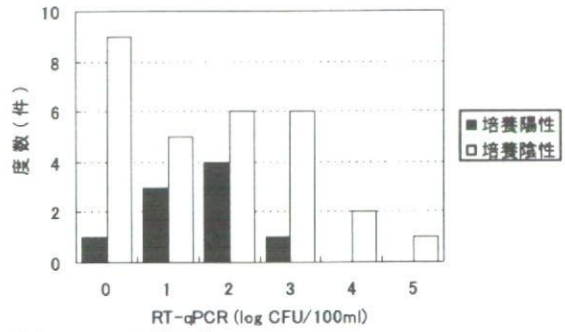


(b) RT-qPCR 法

3) 原水 (n=38)



(a) qPCR 法



(b) RT-qPCR 法

図 2 核酸検出法における定量値の分布

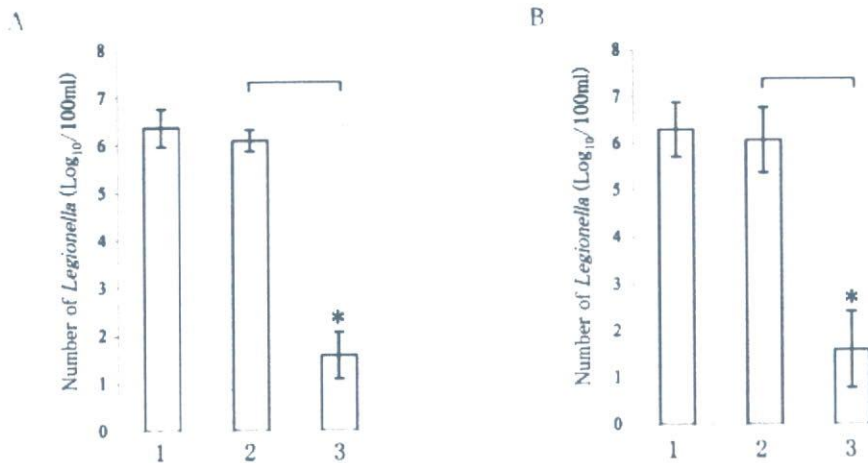


図3. レジオネラのモックサンプルにおける生菌のみの定量検出

A: *L. pneumophila*      B: *L. bozemanii*

Bar 1: real number of viable *Legionella* cells determined by plating on the BCYE plates;

Bar 2: number of EMA-treated, viable *Legionella* cells determined by real-time PCR;

Bar 3: number of EMA-treated, chlorine-killed *Legionella* cells determined by real-time PCR. No viable cells of chlorine-killed *Legionella* cells were detected by plating on BCYE agar. Asterisks (\*) indicate significant decrease in the number of the EMA-treated chlorine-killed *Legionella* cells determined by real-time PCR.

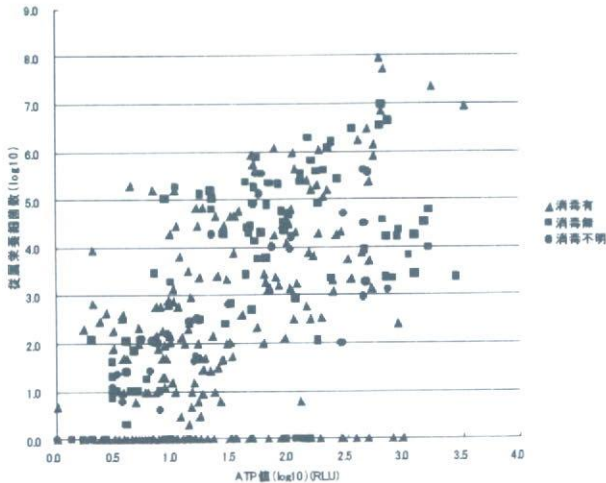


図4 従属栄養細菌数と試料水の ATP 値の相関

全体:  $R=0.60$   $y=1.62x+0.08$

消毒有:  $R=0.56$   $y=1.58x-0.15$

消毒無:  $R=0.58$   $y=1.34x+1.19$

消毒不明:  $R=0.72$   $y=1.48x+0.72$

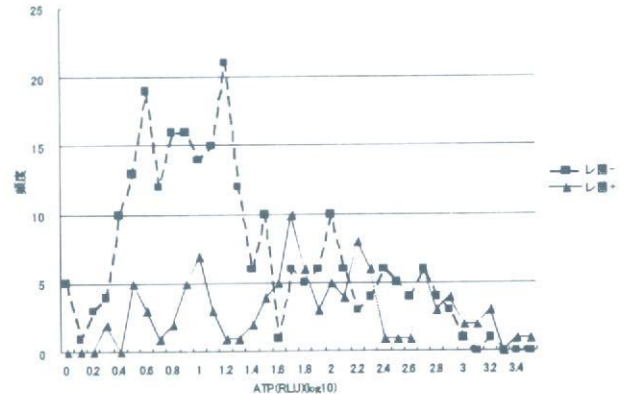


図5 ATP 測定値におけるレジオネラ属菌検出・不検出検体数の頻度

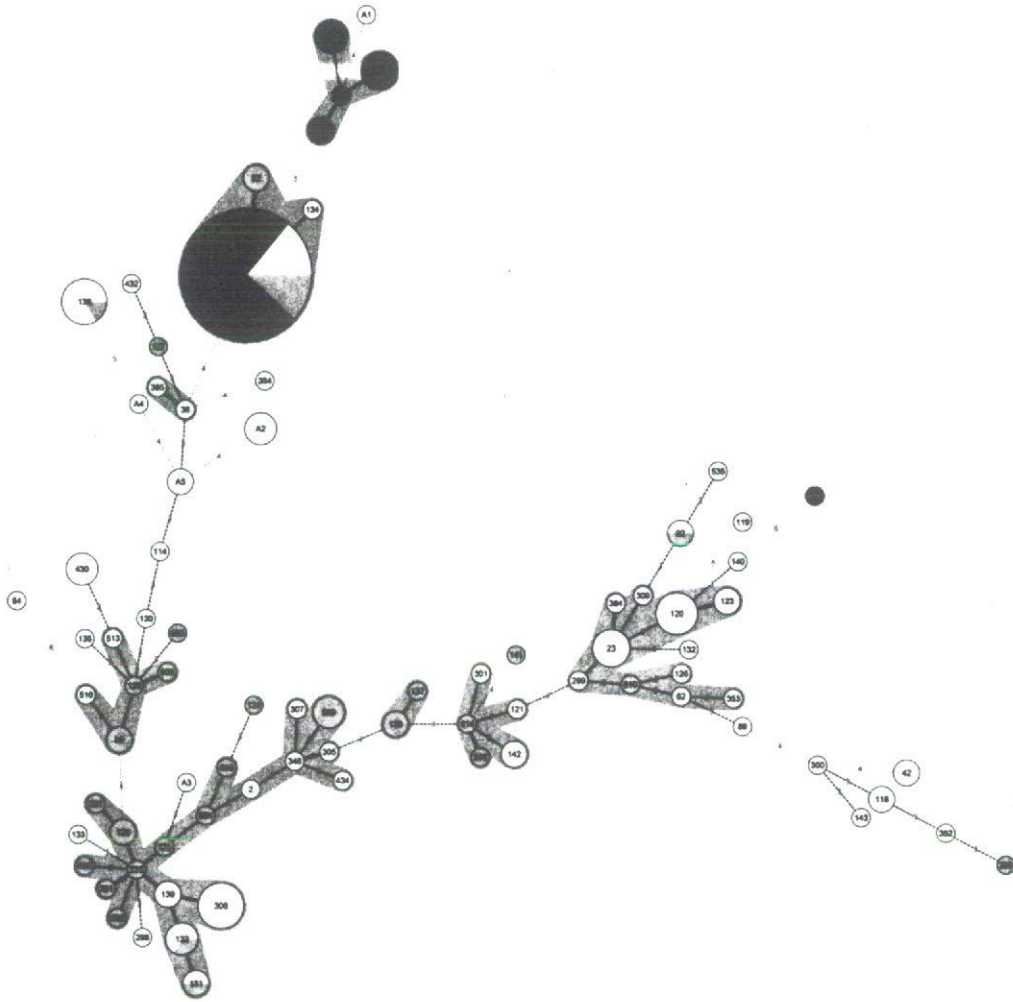


図6 Minimum spanning tree 法による *L. pneumophila* 分離株の ST 同士の類縁関係。“枝”の長さは互いの ST で異なる遺伝子座の数に比例している。円の大きさはそれぞれの ST を有する株数に比例している。円の色は各 ST を示す分離株の由来を示している。白は臨床分離株、灰色は浴槽水分離株、黒は冷却塔水分離株である。隣り合う遺伝子座の違いが2つ以下の ST およびそれらをつなぐ枝の周囲は灰色に塗られ、complex を形成していることを示している。

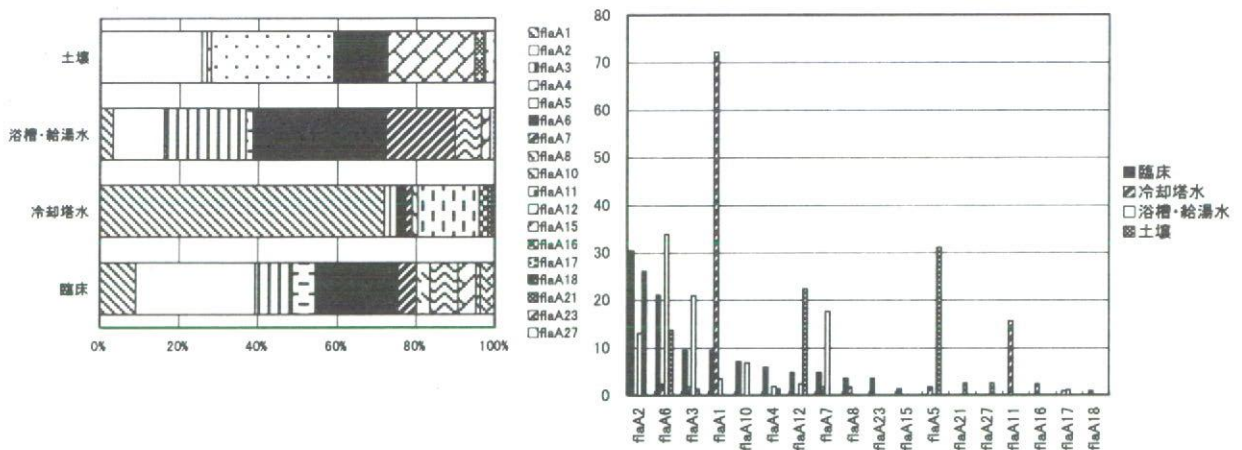
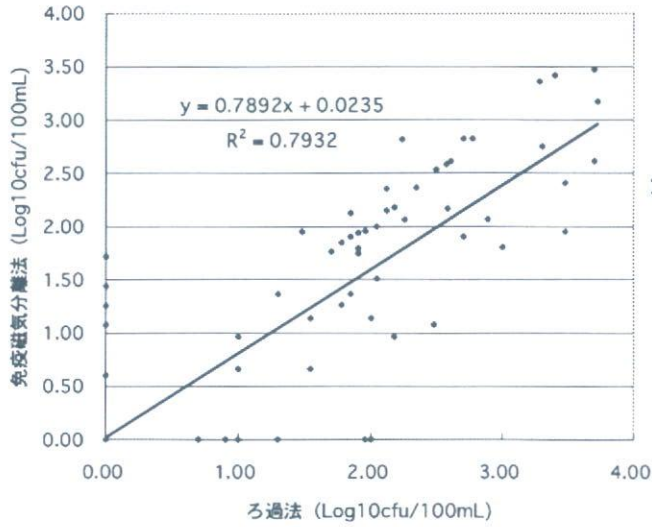


図7 それぞれの由来からの分離株における各 *flaA* 遺伝子型の占める割合。  
 (左) 分離株の由来別に各 *flaA* 遺伝子型の占める割合を示した。  
 (右) 各 *flaA* 型についてそれぞれの由来株における頻度を示した。



		ろ過法		
		陽性	陰性	合計
免疫磁気分離法	陽性	47	7	54
	陰性	13	124	137
	合計	60	131	191

感度 78.3 %  
特異性 94.7 %

図8 免疫磁気分離法の評価 (191 検体)

表1 検査行程の組み合わせによる回収率

	試料1		試料2	
	ろ過法	遠心法	ろ過法	遠心法
酸処理	69.9(n=10)	13.4(n=10)	67.0(n=10)	10.4(n=10)
CV%	31.4	99.5	22.2	88.8
加熱処理	15.3(n=30)	9.1(n=10)	18.8(n=30)	14.8(n=10)
CV%	120.3	84.6	91.6	47.6

表2 アメーバ分離株の遺伝型あるいは種と *L. londiniensis* 感染率の関係 (アメーバは感染後4日間培養)

Genus	Mt DNA RFLP type or Species	Strain	Infected amoeba %
<i>Acanthamoeba</i>	Castellani	Castellani	0.6
	JAC/E4	L1a	0
	Ma	Oost	8.5
	MDC	MDC	4.2
<i>Naegleria</i>	<i>N. fowleri</i>	KURUME	79.0
		Nf66	45.6
		KUL	49.4
	<i>N. lovaniensis</i>	TS	7.9
		Aq	0.4
<i>N. gruberi</i>	EG	0	



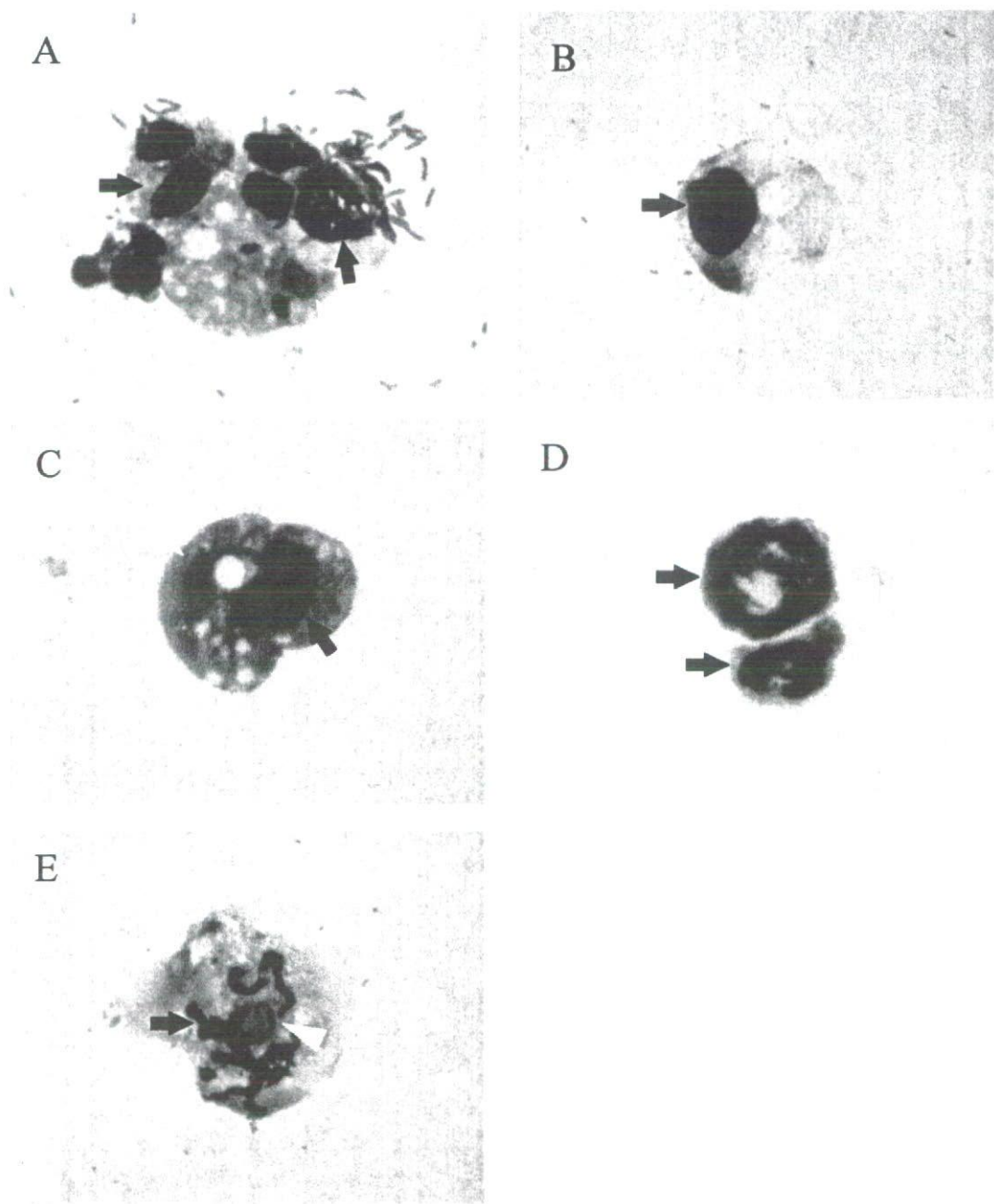


図9 *L. londiniensis* の感染アメーバ細胞内増殖(感染2日後)

A: KURUME 株 (*N. fowleri*) では細胞内での菌増殖は早く、*L. pneumophila* を感染させた場合 (B) と同様な増殖性を示す。

C: PP397 株 (*N. australiensis*) および D: TS 株 (*N. lovaniensis*) においても、KURUME 株と同様な増殖性が見られる。

E: Oost 株 (*Acanthamoeba* sp. Ma type) は、*Acanthamoeba* の中で最も高い感染率を示したが、菌の細胞内増殖性は KURUME 株と比較して遅い。増殖の形態も異なっている。

## II. 分担研究報告書

分担研究報告書

阻害回避試薬を用いた迅速検査

研究分担者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	安中 敏光	栄研化学（株）生物化学研究所
	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部

研究要旨

レジオネラ属菌の迅速検査法は培養試験法に比べて短時間に結果が得られることから期待が寄せられているが、迅速検査法は阻害物質による偽陰性が問題となる場合がある。これまでに核酸精製の方法として Proteinase K とカラム精製の組み合わせによる阻害回避の方法を報告したが、手技が煩雑で時間を要するため、より簡便な鋳型調製法が望まれている。アルカリ熱抽出法は簡便な鋳型調製法として好まれているが、フミン酸等の影響を受ける場合があることから温泉試料等への適用には注意が必要で、利用は白湯など阻害物質が含まれないと考えられる試料に限定されていた。当該研究では反応阻害回避試薬に着目し、アルカリ熱抽出法との併用を検討した。依頼検体として持ち込まれた不特定多数の浴槽水 126 件からアルカリ熱抽出法で鋳型を調製し LAMP 反応を実施した。反応阻害回避試薬の使用の有無で反応性を比較した結果、反応の陽転が 10 件、Tt 値の短縮が 22 件あり、明らかな改善が認められた。環境試料における迅速検査においては、反応阻害回避試薬の利用が推奨された。

A. 研究目的

レジオネラ属菌の迅速検査法は、培養試験法に比べて短時間に結果が得られることから期待が寄せられているが、反応阻害による偽陰性が生じる場合があることが問題となる。例えば温泉には核酸増幅を阻害するフミン酸等が含まれる場合があるため、阻害によっては培養法陽性、迅速検査法陰性の結果に至る場合もありえる。反応阻害はフミン酸の他に、血液、糞便等でも知られており、迅速検査法の信頼性向上にはこうした阻害物質対策が欠かせない。これまで、本研究班では Proteinase K とカラム精製の組み合わせによる阻害回避の方法を提案し、フミン酸等の影響を受けることなく試験が可能になることを示してきた<sup>1)</sup>。しかし、操作が煩雑で時間を要することから、よ

り簡便な鋳型調製法の模索を続けている。

従来の研究室における遺伝子増幅は高度に精製した核酸を鋳型として行うことを前提としていたように思われるが、近年の遺伝子増幅技術の環境試験への導入にあたっては、簡便性、迅速性、回収率、反応性等を考慮しつつ、鋳型の調製と純度に十分な配慮が必要となる。試験には実施者がその責を負うと考えられるが、この負担を軽減し、迅速検査法全般の確度と精度の向上を図る必要がある。

近年、核酸増幅反応のチューブにこうした阻害物質が持ち込まれても、反応阻害を抑えて、反応が進むように工夫がなされるようになってきた。すなわち、血液、糞便等の阻害を軽減する添加試薬が開発され、多少の全血、微量の糞便が反応液



に混入しても増幅産物が得られるようである。当該研究ではこのような試薬に着目し、実際の浴槽水試料への適用を試みたので報告する。

## B. 研究方法及び材料

### 試料水

平成 21 年 1～2 月中に浴槽施設あるいは管理会社から検査会社に委託された試料の一部、38 施設からの浴槽水等 126 件を検討対象とした。そのうち、30 施設 108 件は循環式、2 施設 5 件は換水式、6 施設 13 件は不明であり、ほとんどが循環式であった。施設の種類としては公衆浴場、宿泊施設、スポーツクラブ、マンション、学校、寮、老人ホーム等であった。試料は浴槽施設あるいは管理会社から自発的にレジオネラの検査依頼として出されたもので、実態に即した試料と考えられた。検討は、ここから培養試験法ならびに迅速検査法によるレジオネラ属菌の検出を行った。採水箇所等の情報は受付票を用いた自己申告に従った。

### 試料調製

採水試料 500ml をレジオネラ症防止指針に従って 1/100 倍にろ過濃縮し、濃縮試料 5ml のうち 1ml を培養法に、2ml を核酸抽出に使用した。一部試料は濃縮前に着色が見られたが、濃縮後は無色であった。培養は濃縮試料 1ml を加熱処理 (50°C、20 分間) 後、GVPC 寒天培地 (ビオメリュー) および WYO $\alpha$  寒天培地 (栄研化学) に植菌した。一部試料は一般細菌、大腸菌群、過マンガン酸カリウム消費量、濁度、pH、色度等を併せて測定した。

### LAMP 法

レジオネラ属菌検出用の Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) を使用した。核酸抽出は添付試薬によるアルカリ熱抽出を行った。すなわち、濃縮試料 2ml から再遠心濃縮を行い、濃縮液約 40 $\mu$ L を得て、ここから核酸抽出を行った。直ちに核酸抽出しない場合は、この再濃縮液を -20°C にて冷凍保存した。再濃縮液に EX Leg

試薬 50 $\mu$ L を添加して熱処理 95°C 15 分間を行い、直後に氷冷した。そして Tris 試薬 8 $\mu$ L を添加して中和した。ここからサンプルを 2 分割し、一方に阻害回避試薬 (仮名、栄研化学) 5 $\mu$ L を添加し、もう一方はそのままとした。それぞれ小型冷却遠心機で 10 分間遠心分離した上清 5 $\mu$ L を LAMP 反応に使用した。反応条件は添付文書の指示に従い、65°C 1 時間とした。測定装置は Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C (栄研化学) を用いた。

## C. 結果ならびに考察

### 1. 培養試験

当該研究で得た測定値のうち、いずれかの方法で検出された 45 試料の結果を抜粋して表 1 に示した。WYO $\alpha$  培地で 12% (15/126 試料)、GVPC 培地で 13% (16/126 試料) が培養陽性となった。なお、培養不一致は 1 件だけで、GVPC 培地上で 20cfu/100ml と低濃度であったことから、培地に接種する際に生じた確率論的な誤差と考えられた。

### 2. 阻害回避試薬の効果

阻害回避試薬を添加した場合の陽性率は 34% (43/126 試料) となり、添加しなかった場合の 27% (34/126 試料) に比べて陽性となる試料が多かった。阻害回避試薬添加によって 10 試料の反応が陽転したが、陰転したのは 1 試料のみであった。

阻害回避試薬の有無に関わらずいずれの迅速検査法でも陽性となった 33 件を見ると、22 件は Tt 値が短縮し、感度の向上が得られていた。

培養陽性、迅速検査法陰性の試料が 1 例のみ存在したが、菌数が 10 ないし 20cfu/100ml と低く、試料を分割する際の確率論的な誤差と考えられた。

## D. 考察

迅速検査法は阻害物質による偽陰性が生じる場合があることから、阻害物質を回避することが必要である。フミン酸等による阻害を回避するにあたり、アルカリ熱抽出法ではなく、Proteinase K とカラム精製の方法を本研究班で提案したが<sup>(4)</sup>、