

その一方で簡便な鋳型調製法は必要であり、より簡便な鋳型調製法の模索を続けている。白湯など阻害物質が含まれないと考えられる試料に対してはアルカリ熱抽出法は適用可能である。また、何らかの方法でフミン酸等の阻害を解除できればアルカリ熱抽出法の適用範囲を広げ、鋳型調製の負担を減らすことができる。当該研究で着目した阻害回避試薬は反応液中に持ち込まれた阻害物質の影響を緩和し、反応性を高めることを目的とする試薬である。当該研究で検討した結果、この試薬を添加すると明らかに反応が陽転、あるいは Tt 値の短縮が認められた。当該研究で用いた試料は委託検査に出された循環式浴槽を中心とする浴槽水試料であり、温泉水等の割合はかならずしも多くないと予想されるが、それでも改善傾向は明らかであった。対象試料が温泉水であるか否かを問わずに、この阻害回避試薬を常用することが望ましいと考えられた。アルカリ熱抽出法の温泉水試料への適用の可否については、今後の温泉水試料を中心とした検討結果を待ちたい。

E. 結論

反応阻害を回避するための試薬を試用した結果、反応が陽転、Tt 値の短縮といった改善が認められ、この阻害回避試薬を常用することが望ましいと考えられた。偽陰性確率を低減することで迅速検査法の信頼性向上に寄与すると考えられた。

参考文献

- 1 「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」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、主任研究者 倉 文明、H20 年研究報告書より、「DNA 抽出法の改良」遠藤卓郎ら

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 測定値の比較*

検体番号	培養結果(cfu/100ml)		Tt値(秒)		Tt値の比較
	WYO培地	GVPC培地	試薬なし	試薬添加	
A0808105	10	20	0	0	(核酸不検出)
A0808058	0	0	0	1,434	陽転
A0808054	0	0	0	1,560	陽転
A0808124	0	0	0	1,596	陽転
A0807996	0	0	0	1,644	陽転
A0808104	0	0	0	1,656	陽転
A0807986	0	0	0	1,710	陽転
A0808155	0	0	0	2,952	陽転
A0808167	0	0	0	3,222	陽転
A0808144	0	0	0	3,372	陽転
A0808161	0	0	0	3,474	陽転
A0808191	140	160	1,056	942	Tt値減少
A0808241	120	400	1,068	1,020	Tt値減少
A0808322	460	1,400	1,128	1,062	Tt値減少
A0808316	330	500	1,182	1,116	Tt値減少
A0808185	200	300	1,182	1,170	Tt値減少
A0808317	210	390	1,188	1,074	Tt値減少
A0808321	100	190	1,194	1,098	Tt値減少
A0808315	80	230	1,248	1,098	Tt値減少
A0808089	170	500	1,248	1,128	Tt値減少
A0808100	0	0	1,254	1,230	Tt値減少
A0808192	0	0	1,362	1,140	Tt値減少
A0808260	30	10	1,416	1,188	Tt値減少
A0808086	0	0	1,584	1,320	Tt値減少
A0808187	0	0	1,596	1,428	Tt値減少
A0808099	0	0	1,620	1,212	Tt値減少
A0808085	0	0	1,698	1,452	Tt値減少
A0808242	0	0	1,824	1,248	Tt値減少
A0808255	0	0	1,938	1,866	Tt値減少
A0808186	0	0	1,956	1,440	Tt値減少
A0808163	0	0	3,444	2,190	Tt値減少
A0808215	0	0	3,534	1,974	Tt値減少
A0808092	0	20	1,428	1,410	Tt値減少
A0808183	2,270	4,820	1,002	1,026	Tt値増加
A0808254	0	0	1,008	1,014	Tt値増加
A0808059	80	200	1,032	1,038	Tt値増加
A0808143	0	0	1,206	1,602	Tt値増加
A0807985	0	0	1,254	1,296	Tt値増加
A0808206	0	0	1,452	1,548	Tt値増加
A0808024	0	0	1,488	1,956	Tt値増加
A0808111	360	160	1,656	2,346	Tt値増加
A0808122	20	10	1,740	1,866	Tt値増加
A0808216	0	0	2,142	2,268	Tt値増加
A0808129	0	0	2,220	3,138	Tt値増加
A0808213	0	0	1,542	0	陰転

*いずれかの測定方法で検出があった45件の測定値を抜粋した

別添

培養ならびに遺伝子検査による試料水中の *Legionella* 属菌の定量

目的 *Legionella* 属菌検査の迅速化を図る目的で、迅速に検査可能な遺伝子検査法(LAMP法)と従来の培養検査法により浴槽水を対象に *Legionella* 属菌の定性試験を行い、その結果を比較検討する。LAMP法は、栄研マニュアル法(従来法)と本法に遺伝子増幅阻害物質回避試薬を添加した方法(改良法)を併用し、両法の検出状況を比較検討する。

対象

検討試料: 1月26日～2月13日の間に、当会に搬入された浴槽水(温泉水を含む)126件を供試した。

使用培地・キット: 培養法 GVPC寒天培地(バイオメュー) , WYO α寒天培地(栄研化学)
遺伝子検査法(LAMP法) Loopampレジオネラ検出試薬キットE(栄研化学)

方法: 試料水500mlをレジオネラ症防止指針・ろ過濃縮法に従い1/100倍に濃縮した。
濃縮試料5mlのうち1mlを培養法に使用し、2mlをLAMP法に用いた。

培養法: 培養は、濃縮試料1mlを加熱処理(50℃20分間)後、GVPC培地およびWYO α培地に塗抹培養した。
培養後は、定法に従い *Legionella* 属菌の確認をした。

遺伝子検査法: 濃縮試料2mlを用いて従来法と改良法(阻害物質回避試薬を添加)の測定を行なった。

試料水126件の試験結果概要

検出状況

検出方法	陽性数	陰性数	陽性率
WYO α培地	15	111	11.9
GVPC培地	16	110	12.7
LAMP法(従来法)	34	92	27.0
LAMP法(改良法)	43	83	34.1

4種類の検出法における検出パターン

WYO α	GVPC	LAMP (従来法)	LAMP (改良法)	検出数
0	0	+	+	18
0	0	-	+	10
0	0	+	-	1
検出	検出	+	+	14
0	検出	+	+	1
検出	検出	-	-	1
0	0	-	-	81

WYO αとGVPCにおける検出菌数は、データの見易さを考慮し100ml中で不検出のものを'0'と表示した。また、レジオネラ属菌が検出されたものは、菌数の多少にかかわらず検出と表示した。

GVPC寒天培地及びWYO α寒天培地を用いた場合の *Legionella* 属菌検査結果の比較

		GVPC		
		+	-	合計
WYO α	+	15	0	15
	-	1	110	111
	合計	16	110	126

GVPC陽性率	(16/126)	12.7%
WYO α陽性率	(15/126)	11.9%
陽性一致率	(15/16)	93.8%
陰性一致率	(110/110)	100.0%
総一致率	(125/126)	99.2%

LAMP法(従来法)と培養法(GVPC寒天培地)による浴槽水からの*Legionella*属菌検査結果の比較

LAMP法は、増幅曲線の濁度上昇で結果判定した。

培養法は、GVPC培地にレジオネラ属菌の発育が認められたものを陽性として集計した。

		LAMP法(従来法)		
		+	-	合計
培養法 (GVPC)	+	15	1	16
	-	19	91	110
	合計	34	92	126

LAMP法陽性率 (34/126) 27.0%

GVPC陽性率 (16/126) 12.7%

陽性一致率 (15/34) 44.1%

陰性一致率 (91/92) 98.9%

総一致率 (106/126) 84.1%

LAMP法(改良法)と培養法(GVPC寒天培地)による浴槽水からの*Legionella*属菌検査結果の比較

LAMP法は、増幅曲線の濁度上昇で結果判定した。

培養法は、GVPC培地にレジオネラ属菌の発育が認められたものを陽性として集計した。

		LAMP法(改良法)		
		+	-	合計
培養法 (GVPC)	+	15	1	16
	-	28	82	110
	合計	43	83	126

LAMP法陽性率 (43/126) 34.1%

GVPC陽性率 (16/126) 12.7%

陽性一致率 (15/43) 34.9%

陰性一致率 (82/83) 98.8%

総一致率 (97/126) 77.0%

LAMP法の従来法と改良法による浴槽水からの*Legionella*属菌検査結果の比較

LAMP法は、従来法及び改良法ともに増幅曲線の濁度上昇で判定した

		LAMP法(従来法)		
		+	-	合計
LAMP法 (改良法)	+	33	10	43
	-	1	82	83
	合計	34	92	126

従来法陽性率 (34/126) 27.0%

改良法陽性率 (43/126) 34.1%

陽性一致率 (33/34) 97.1%

陰性一致率 (82/92) 89.1%

総一致率 (115/126) 91.3%

検体番号	WYO※ (cfu/100ml)	GVPC※ (cfu/100ml)	Tt値 (従来法)	Tt値 (改良法)	試料水情報	大腸菌群 (定量)	濃度	過マン ガン酸 カリウム 消費量	採取者	採水箇所*	施設 No.	2007年 度施設 No.	採水種 類1	採水種 類2	採水施設	清掃 状況	消毒 状況	消毒剤
A0807985	0	0	1,254	1,296					業者	日替り 男子浴槽	2	63	浴槽水	循環式	公衆浴場			
A0807986	0	0	0	1,710					業者	日替り 女子浴槽	2	63	浴槽水	循環式	公衆浴場			
A0807993	0	0	0	0					業者	主浴槽	8	43	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日	
A0807994	0	0	0	0					業者	スーパージェット座湯	8	43	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日	
A0807996	0	0	0	1,644					業者	露天風呂 ラジウムイオン鉱物泉	8	43	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日	
A0807997	0	0	0	0					業者	スーパージェット湯 露天風呂 縁湯	8	43	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日	
A0808009	0	0	0	0					業者	浴槽	26		浴槽水	換水式	スポーツクラブ	毎日		
A0808011	0	0	0	0					業者	ジャグジー	34		浴槽水	循環式	スポーツクラブ			
A0808012	0	0	0	0					業者	屋外ジャグジー	34		浴槽水	循環式	スポーツクラブ			
A0808013	0	0	0	0					業者	白湯	31		浴槽水		公衆浴場			
A0808014	0	0	0	0					業者	シルク湯	31		浴槽水		公衆浴場			
A0808015	0	0	0	0					業者	露天風呂	31		浴槽水		公衆浴場			
A0808018	0	0	0	0					業者	男風呂	4		浴槽水		宿泊施設			
A0808019	0	0	0	0					業者	女風呂	4		浴槽水		宿泊施設			
A0808021	0	0	0	0					業者	大浴場 男子浴槽	6		浴槽水	循環式	リゾートマンション	1週間	毎日	NaOCl
A0808022	0	0	0	0					業者	大浴場 女子浴槽	6		浴槽水	循環式	リゾートマンション	1週間	毎日	NaOCl
A0808023	0	0	0	0	0	0.5	2.3		業者	男子浴槽	30		浴槽水	循環式	学校	1週間	毎日	NaOCl
A0808024	0	0	1,488	1,956	0	<0.5	2.3		業者	女子浴槽	30		浴槽水	循環式	学校	1週間	毎日	NaOCl
A0808025	0	0	0	0					業者	一般浴槽	10		浴槽水	循環式	老人ホーム	毎日	毎日	NaOCl
A0808026	0	0	0	0					業者	アイサービス浴槽	10		浴槽水	循環式	老人ホーム	毎日	毎日	NaOCl
A0808054	0	0	0	1,560					業者	上浴 ろ過ドレン(残留塩素濃度2.0ppm)	19		浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日	
A0808055	0	0	0	0					業者	露天 ろ過ドレン(残留塩素濃度2.0ppm)	19		浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日	
A0808056	0	0	0	0	透明薄ピンク				業者	日替り湯 ろ過ドレン(残留塩素濃度2.0ppm)	19		浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日	
A0808057	0	0	0	0					業者	水風呂 ろ過ドレン(残留塩素濃度0.6ppm)	19		浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日	
A0808058	0	0	0	1,434					施設者	共同風呂	17		浴槽水	循環式	学生寮	毎日		
A0808059	80	200	1,032	1,038					施設者	個人風呂	17		浴槽水	循環式	学生寮	毎日		
A0808060	0	0	0	0					業者	使用開始前 浴槽水	15		浴槽水		老人ホーム			
A0808083	0	0	0	0					業者	女 水風呂	9		浴槽水	循環式	公衆浴場			

A0808256	0	0	0	0	0						業者	男子風呂	18	56	浴槽水	換水式	宿泊施設	毎日	
A0808257	0	0	0	0	0						業者	***** 1階 一般浴槽	11		浴槽水	循環式	老人ホーム		
A0808260	30	10	1,416	1,188							業者	浴槽	38		浴槽水		寮		
A0808315	80	230	1,248	1,098	0	<0.5				1.3	施設者	男性風呂	23	96	温泉水		宿泊施設	毎日	毎日
A0808316	330	500	1,182	1,116	0	0.5				2.4	施設者	女性風呂	23	96	温泉水		宿泊施設	毎日	毎日
A0808317	210	390	1,188	1,074	0	0.5				1.3	施設者	貴一の湯	23	96	温泉水		宿泊施設	毎日	毎日
A0808321	100	190	1,194	1,098	0	<0.5				1.7	施設者	****風呂	23	96	温泉水		宿泊施設	毎日	毎日
A0808322	460	1,400	1,128	1,062	0	0.5				1.1	施設者	ひのきの湯	23	96	温泉水		宿泊施設	毎日	毎日

※：培養法における菌数は、データの見易さを考慮し100ml中で不検出のものを'0'と表示した。

飲料水情報について 飲料水の着色は、5ml濃縮以降の工程では認められなかった

*公表に支障のある固有名称は削除した

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 年度分担研究報告書

DNA 抽出法の改良

研究分担者 遠藤卓郎 国立感染症研究所

研究分担者 田栗利紹 長崎県環境保健研究センター

研究協力者 泉山信司 国立感染症研究所

研究概要： H19 年度提案した DNA 抽出法(酵素溶菌法)の簡便性や精度などに対する改良の必要性から、リゾチーム処理の削除と繰り返し溶出(50 μ L で 2 回、計 100 μ L)を追加した新プロトコルを作成したことにより、簡便性と精度の改善を実現できた。2log 菌液を用いた 3 連の繰り返し回収実験における回収率の平均 \pm 標準偏差は 113.63 \pm 9.07%となり、高濃度菌液における回収率も向上した(30 \sim 70% \rightarrow 全て 100%超)。改良酵素溶菌法はフミン酸の影響をほとんど受けなかったのに対し、キレックス樹脂法とアルカリ抽出法は、共に 1.6 mg/L 水溶性フミン酸および 0.1mg/L 不溶性フミン酸で阻害されることが明らかとなり、前者のフミン質含有温泉試料適用における優位性が示された。後二者はフミン酸含有試料への適用は制限されるが、簡便性は十分確認されたため白湯などへの応用は可能であると考えられた。さらに、改良酵素溶菌法を基盤とした試作キットが有効であることを実証した。

1. 研究目的

我々は、これまでに遺伝子検査法を用いたレジオネラの定量方法(quantitative Polymerase Chain Reaction 法, 以下 qPCR 法と略す)を検討した中で、浴槽水を対象とした核酸抽出方法として新たに酵素溶菌法¹⁾を提案しその有効性を証明してきた。しかしながら、全国各地の幅広い種類の浴槽水を対象としてきたために、研究分担者や研究協力者の成績が安定しなかったこと、技術の簡便性や再現性を理由として別の方法が提案されたこと、並びに実験用循環ろ過式浴槽を用いたモデル実験で高濃度のレジオネラ属

菌を含むサンプル群の回収率が低かったことなどの問題点を受けて、抽出方法を改良する必要性を認めた。

本研究では、酵素溶菌法を簡略化と精度向上を目途として改良し、基準株の添加回収実験により昨年度法と比較した。また、酵素溶菌法の普及を考慮してキット化を試み、その有効性を検証するとともに、改良酵素溶菌法について、キレックス樹脂法やアルカリ抽出法との回収率を比較した。さらに、酵素溶菌法提案の根拠であった温泉水等に含まれるフミン質の PCR 反応阻害作用に対する回避能力を比較するために、フミン酸標準品を用

いて添加回収実験を行った。

2. 研究方法および材料

2.1. 供試菌株と添加試料の調製

Legionella pneumophila serogroup 1 長崎 80-045 株を暫定基準株として用いた。²⁾ -80°C に凍結保存したものを BCYE α 培地 (ビオメリュー・シスメックス) に接種して復元し、 30°C で 3 日間培養して試験に供した。McFarland 2.0 程度に調製した菌懸濁液を希釈して 1log ~ 8logCFU/mL の菌液を調製した。培養法により菌数測定して初期値を決定するとともに、各希釈段階液 2mL を 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 μL を後述する各種 DNA 抽出法により処理した (-30°C 凍結保存可)。フミン酸の Taq DNA polymerase に対する最小阻害濃度決定実験には 1log と 3log の菌液を用いた。酵素溶菌法の改良およびキット化に関する比較実験では高濃度側菌液の回収率を観察する必要があるため 1log ~ 8log の希釈列全てを用いた。異なる検査方法の比較実験では 2log の菌液を用いて 3 連の繰り返し検査を実施し、平均と標準偏差を比較した。フミン酸含有試料による添加回収実験は再現性を見るために 2log 菌液を用いて 2 回繰り返し実施した。

なお、後述する D 法:キレックス法と E 法:アルカリ抽出法では 100 μL の状態で凍結保存すると再遠心濃縮時に菌体が溶菌されて成績に影響を与える危険があるため冷凍保管する場合にはそれぞれの最終液量 (D 法 20 μL 、E 法 40 μL) まで濃縮する必要がある。

2.2. DNA 抽出方法

2.2.1 A 法:酵素溶菌法

試料濃縮液 100 μL 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 μL と 20mg/mL リゾチーム (和光純薬) 溶液 10 μL を加えて 40°C \times 15 分間反応させた後、20mg/mL プロテイナーゼ K 溶液 (キアゲン) 10 μL をさらに加えて 60°C \times 1 時間反応させた。その後、さらに 75°C \times 5 分間反応させて 1 分間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 μL と 99.5% エタノール (和光純薬) 200 μL を追加して転倒混和した。全量をモノリスカラム (GL サイエンス) 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。10,000 \times 1 分間遠心分離してエタノール成分を蒸発させた後、最後に、Buffer AE (QIAamp DNA mini kit, キアゲン) 20 μL をモノリス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 \times 1 分間遠心したろ液を DNA 試料とした。qPCR には抽出 DNA 5 μL を供し、得られた定量値の 2 倍量を 100mL 中のレジオネラ属菌数とした。

2.2.2 B 法:改良酵素溶菌法

時間短縮のためにリゾチーム反応を省略し、精度向上のために溶出時に反復回収を行った。即ち、試料濃縮液 100 μL に A 法と同じ 2 倍溶解液 90 μL と 20mg/mL プロテイナーゼ K 溶液 10 μL を加えて 60°C \times 1 時間反応させた。その後、さらに 75°C \times 5 分間反応させて 1 分間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 200 μ L と 99.5%エタノール 200 μ L を追加して転倒混和した。全量をモノリスカラムに移して 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 を用いてカラムを洗浄した。10,000 \times 1 分間遠心分離してエタノール成分を蒸発させた後、最後に、Buffer AE 50 μ L で2回遠心回収したろ液 100 μ L を DNA 試料とした。qPCR には抽出 DNA 5 μ L を供し、得られた定量値の 10 倍量を 100mL 中レジオネラ属菌数とした。

2.2.3 C 法:試作キット法

試料濃縮液 100 μ L に Buffer A4 (GL サイエンス) 80 μ L と 20mg/mL リゾチーム溶液 10 μ L を添加し、40 $^{\circ}$ C、15 分間反応させた後、20mg/mL プロテイナーゼ K を 10 μ L 追加して、60 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。次いで、75 $^{\circ}$ C、5 分間加温し、ボルテックス攪拌 15,000rpm、3 分間の遠心分離後、上清 160~200 μ L を新しい遠心チューブに移した。Buffer B4 (GL サイエンス) 200 μ L を添加してボルテックス攪拌し、さらに 99.5%エタノール 200 μ L を添加してボルテックス攪拌した。モノリスカラムをコレクションチューブ (GL サイエンス) にセットし、遠心チューブ内溶解液の全量をモノリスカラムにロードして、5,000rpm、30 秒遠心分離後、洗浄用 Buffer C4 (GL サイエンス) 300 μ L を添加し、5,000rpm、30 秒間遠心分離した。さらに、洗浄用 Buffer D4 (GL サイエンス) 300 μ L を添加し、15,000rpm、2 分間遠心分離した。モノリスカラムを新しい 1.5ml 遠心チューブにセットして、溶出用 Buffer E4 (GL サイエンス) 20 μ L を添加し、1 分間静置後、10,000rpm、1 分間遠心分離したろ液を DNA 試料とした。qPCR には抽出 DNA 5 μ L を供し、得られた定量値の 2 倍

量を 100mL 中レジオネラ属菌数とした。

2.2.4 D 法:キレックス樹脂法

試料 2mL を 15,000rpm 5 分間遠心分離し、上清を捨て濃縮試料 20 μ L とした。5%キレックス (Chelex100, BioRad) 懸濁液 (注射用蒸留水を用いて作製し、0.5mL チューブに小分けして冷蔵保存) を調製し、その 100 μ L を十分にボルテックス攪拌して濃縮試料に加えて、95 $^{\circ}$ C、5 分間加温した。その全量をカラム Sprec01 (タカラバイオ) に移して 15,000rpm で 5 分間遠心分離後のろ液を試料とした。qPCR には抽出 DNA 試料 5 μ L を供し、得られた定量値の 10 倍量を 100mL 中レジオネラ属菌数とした。

2.2.5 E 法:アルカリ抽出法

方法は Loopamp レジオネラ検出試薬キット E の使用説明書に準拠した。即ち、試料 2mL を 2.0mL 滅菌チューブに入れ、冷却遠心機で 4 $^{\circ}$ C、12,000rpm、10 分間遠心し、上清液 (約 1,960 μ L) を除去して約 40 μ L とした。キット添付の抽出液 (EX Leg, 栄研化学) 50 μ L を添加してボルテックスミキサーで混和し 95 $^{\circ}$ C、15 分間の加熱処理をおこなった後、直ちに氷上で冷却しスピンドウンした。キット添付の 1M Tris-HCL (pH7.0, 栄研化学) 8 μ L を追加、ボルテックスミキサー混和後、冷却遠心機で 4 $^{\circ}$ C、12,000rpm、10 分間遠心した上清を DNA 試料とした。qPCR には抽出 DNA 試料 5 μ L を供し、得られた定量値の 10 倍量を 100mL 中レジオネラ属菌数とした。

2.2.6 改良 C 法

試料濃縮液 100 μ L に改良 Buffer A4 80 μ L と 20mg/mL リゾチーム溶液 10 μ L を添加し、40 $^{\circ}$ C、15 分間反応させた後、20mg/mL プロテイナーゼ K を 10 μ L 追加して、60 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。次いで、75 $^{\circ}$ C、5 分間加温し、ボルテックス攪拌

15,000rpm、3 分間の遠心分離後、上清 160~200 μ L を新しい遠心チューブに移した。改良 Buffer B4 200 μ L を添加してボルテックス攪拌し、さらに 99.5%エタノール 200 μ L を添加してボルテックス攪拌した。改良モノリスカラム C20(あるいは C50, GL サイエンス)をコレクションチューブにセットし、遠心チューブ内溶解液の全量をモノリスカラムにロードして、5,000rpm、30 秒遠心分離後、改良 Buffer C4 300 μ L を用いて洗浄し、5,000rpm、30 秒間遠心分離した。さらに、改良 Buffer D4 300 μ L を用いて洗浄し、15,000rpm、2 分間遠心分離した。モノリスカラムを新しい 1.5ml 遠心チューブにセットして、改良 Buffer E4 50 μ L を添加し、1 分間静置後、10,000rpm、1 分間遠心分離する作業を 2 回繰り返した溶出液 100 μ L を DNA 試料とした。qPCR には抽出 DNA5 μ L を供し、得られた定量値の 10 倍量を 100mL 中レジオネラ属菌数とした。

なお、本法は B 法を基本としたプロトコルであるが、使用説明書にリゾチーム処理が記載されていたため、本実験では同処理を省略しなかった。

2.3. 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 \times 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 Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 で測定した。PCR 条件は 95 $^{\circ}$ C \times 10 秒の前反応のち、95 $^{\circ}$ C \times 5 秒、55 $^{\circ}$ C \times 10 秒、72 $^{\circ}$ C \times 20 秒を 1 サイクルとして 45 サイクル反応させた。

2.4. 検量線の作成方法

凍結保存した DNA 抽出液を室温融解・希釈して 5log~0log CFU/assay の 6 段階 DNA 抽出液を作製した。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。

2.5. 比較実験

2.5.1. A 法と B 法の比較

1~8logCFU/mL の試料濃縮液各 100 μ L から A 法と B 法のプロトコルに従って DNA を抽出し、抽出液 5 μ L を qPCR に供して、両者の回収率を比較した。

2.5.2. B 法、C 法、D 法、及び E 法における回収率の比較

2logCFU/mL の試料濃縮液 3 対から、各々 B 法、C 法、D 法、および E 法のプロトコルに従って抽出した DNA 試料 5 μ L を qPCR に供して、4 者の回収率 (三重検査の平均 \pm 標準偏差) を比較した。

2.5.3. 水溶性フミン酸の qPCR に対する最小阻害濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, 以下 MIC) 測定

フミン酸 (塩酸塩、50%力価, Acros) の 256mg を正確に秤量して注射用蒸留水 (大塚製薬) 100mL に溶解して原液 (1280mg/L) とした。原液を 20 倍希釈液から 7 段階 2 倍段階希釈した希釈列 (64~0.5mg/L) の各 2.5 μ L を、2.3. の要領で作成したマスターミックスに挿入し (終濃度 6.4~0.05mg/L)、5000 および 50CFU 相当の抽出 DNA 2.5 μ L を添加して qPCR を行った。増幅を阻害した最小濃度を MIC とした。

2.5.4 水溶性フミン酸添加試料を用いた添加回収実験 (B 法、D 法、および E 法の比較)

水溶性フミン酸 (塩酸塩、50%力価, Acros 社製) を用いて PCR 反応液中のフミン酸濃度が 2.5.3. で求めた 1 \times MIC、

2×MIC、および3×MICとなるように調製し、2logCFU/mLの試料濃縮液を添加してB法、D法、およびE法の回収率を比較した。

2.5.5. 不溶性フミン酸添加試料を用いた添加回収実験(B法、D法、およびE法の比較)

不溶性フミン酸(和光純薬)を用いて3×MICから7段階2倍希釈した濃度列(6.4~0.05 mg/L)となるようにPCR反応液を調製し、2logCFU/mLの試料濃縮液を添加してB法、D法、およびE法の回収率を比較した。

2.5.6. 試作キットの改良

C法試作キットの高DNA試料でのキャパシティー不足の指摘を受けて作成された2種類のモノスカラム(C20カラムとC50カラム)と改良バッファーによる試作キットを検証した。モノスカラムのC20とC50の違いはカラム厚であり、それぞれ2mmと5mmの厚さでつくられていた。なお、特に断り書きがない場合はC20のカラムを使用した。3logCFU/mLの試料濃縮液各100μLについて、C20カラムとC50カラムを用いた3連の繰り返し回収実験を行った。それぞれ改良C法のプロトコルに従ってDNAを抽出し5μLをqPCRに供して、回収率の平均と標準偏差をB法と比較した。この時に、カラム厚(C20とC50)と溶出方法(溶出量20μL×溶出回数1回と同50μL×同2回)の関係を検討して最適な組み合わせを選抜した。

最終的にC20カラムを用いた溶出量50μL×溶出回数2回を選抜し、これにより1~8logCFU/mL(3log除く)の試料濃縮液各100μLを用いて回収実験を行って、B法と比較した。

3. 研究結果

3.1. 比較実験

3.1.1. A法とB法の比較

希釈列(添加菌数:1~8log10CFU/mL)に対するA法とB法の回収率の比較実験結果を図1aと図1bに示した。A法の1回目では、全ての段階で回収率が100%に達しない低い結果を示した上に、3logと4logではほとんど回収できていなかった。同法の2回目の回収率は若干改善されたが、3log、6log、および8logの回収率は低いままであった。全体的な回収率の傾向を見ても、ばらつきが大きく再現性に乏しい結果であった。B法では、1回目の2logと3logを除く全ての試料で80%を越す良好な回収率を示した。全体的な回収率は、2回の実験で類似した結果であり、低濃度側と高濃度側に二峰性の極大が生ずる傾向にあった。

以上のように、回収率と精度の点から、A法に対するB法の優位性が確認されたため、これ以降の検討はB法のプロトコルにより実施した。

3.1.2. B法、C法、D法、及びE法の比較

供試した各種試験方法によるqPCRの回収実験結果を、図2に示した。B法、C法、D法、及びE法の回収率(3連の繰り返し検査の平均±標準偏差)は、それぞれ113.63%±9.07%、1.28%±1.39%、107.16%±13.13%、及び96.77%±28.03%であった。

なお、D法とE法については、最終液量の変動が回収率に影響する可能性がある。D法とE法の最終液各10サンプルを測定した平均±標準偏差は、それぞれ120±21と115±12であった。

3.1.3. 水溶性フミン酸のqPCRに対する最小阻害濃度(Minimum Inhibitory Concentration, 以下MIC)測定

段階希釈した水溶性フミン酸を反応液に直接添加した中での qPCR による定量結果を図 3 に示した。qPCR は、終濃度 1.6mg/L の水溶性フミン酸により回収率として約 50%の増幅阻害を受け、同じく終濃度 3.2mg/L では完全に阻害された。これらの反応はレジオネラ属菌の添加量 (50CFU/mL と 5000CFU/mL) で変わらず同様な態度を示した。従って、本実験において、フミン酸の qPCR に対する MIC は 1.6mg/L とした。

3.1.4. 水溶性フミン酸添加試料を用いた添加回収実験 (B 法、D 法、および E 法の比較)

水溶性フミン酸の終濃度が $4 \times \text{MIC} \sim 1 \times \text{MIC}$ となるように調製して添加回収実験を行った結果を図 4 に示した。B 法において、終濃度 6.4mg/L、3.2mg/L、および 1.6mg/L (MIC) に調製した場合の回収率はそれぞれ 89.80%、75.99%、および 101.08%であり、良好な回収率を維持していた。しかし、同じ実験における D 法の回収率はそれぞれ 27.13%、45.40%、および 44.16%、E 法はそれぞれ 0.00%、61.67%、および 96.28%であり、ほとんどの試料で阻害が認められた。

3.1.5. 不溶性フミン酸添加試料を用いた添加回収実験 (B 法、D 法、および E 法の比較)

不溶性フミン酸の終濃度が $4 \times \text{MIC} \sim 1/32 \times \text{MIC}$ となるように調製して添加回収実験を行った結果を図 5 に示した。B 法において、終濃度 6.40、3.20、1.60、0.80、0.40、0.20、0.10、及び 0.05mg/L に調製した場合の回収率はそれぞれ 139.22%、94.29%、79.24%、163.92%、102.25%、127.65%、135.88%、118.24%、および 101.08%であり、良好な回収率を維持していた。しかし、同じ実験における D 法と E 法の回収率はともに 0.4mg/L ま

で完全に阻害され、0.20、0.10、及び 0.05mg/L に調製した場合の回収率は、D 法がそれぞれ 66.91%、67.37%、および 94.04%、E 法がそれぞれ 86.52%、42.30%、および 108.04%であった。

以上のことから、D 法と E 法はともに 0.1mg/L という微量の不溶性フミン酸を含む試料からでも阻害を受けることが示された。

3.1.6. 試作キットの改良

改良試作キットの 2 種類のモノリスカラム (C20 カラムと C50 カラム) と溶出量および溶出回数による回収率の平均と標準偏差を B 法と比較した結果を図 6a に示した。C20 カラムと C50 カラムを用いて溶出量 20mL \times 溶出回数 1 回で実施した回収率はそれぞれ $22.44\% \pm 3.27\%$ と $59.71\% \pm 9.94\%$ であった。同じく溶出量 50 μ L \times 溶出回数 2 回で実施した回収率はそれぞれ $67.49\% \pm 19.82\%$ と $95.86\% \pm 37.22\%$ であった。両カラム共に溶出量の増量と溶出回数の増加により明らかに回収率が向上したので、最終的に C20 カラムを用いた溶出量 50 μ L \times 溶出回数 2 回を選抜した。

最終選抜した改良 C 法により、1 \sim 8logCFU/mL (3log 除く) の試料濃縮液を処理した回収率の結果を図 6b に示した。全ての試料で 100%を超え、1log 試料を除いて B 法とほとんど変わらない結果を示した。

なお、C50 カラムは試料の質によっては詰まる傾向にあり、遠心条件を強くする必要があった。キャパシティーの増加と処理性は必ずしも両立せず、微量な DNA の回収に特化できる C20 カラムがよりよいと思われた。

D. 考察

H19 年度に浴槽水を対象とした核酸

抽出方法として新たに提案した酵素溶菌法¹⁾について、全国各地の成績が不安定であったこと、キレックス法とアルカリ熱抽出法が再度提案されたこと、並びにモデル実験で高濃度サンプル群の回収率が低かったことなどの問題点が生じたことを受けて、本研究では、簡略化と精度の向上を目的として従来法を改良した改良酵素溶菌法を定めて、その有効性証明のために様々な検証を行った。

まず、H19年度法であるA法と改良法であるB法の比較を行った。A法は回収率が100%に達しない低い数値を示した上に、ばらつきが大きく再現性に乏しい結果であったが、B法ではほとんどの試料の回収率が80%を超し再現性のある良好な結果を示した(図1a、1b)。これらのことから、従来法からの改良点であったリゾチーム反応の省略はDNA抽出に影響を与えず、溶出時における溶出量と溶出回数増加は測定精度の保持に有効であると考えられた。特にDNA溶出液量の増加は、微量な抽出に対応可能なカラムに制限されることなく、50ないし100 μ Lに対応可能なカラムの選択も可能で、DNA精製カラムの選択の幅が広がったものと考えられた。B法を、試作キット法(C法)、キレックス樹脂法(D法)、およびアルカリ抽出法(E法)と比較したところ、B法の回収率が最も優れており、バラツキもなく安定した結果であった(図2)。しかし、ほとんど回収できていなかったC法を除き、D法とE法においても、共に若干のバラツキを認めたものの100%前後の回収率を保持していたため(図2)、簡便法としての十分な有効性が認められた。但し、これらの抽出方法については、3.1.2.に示したとおり、最終液量と回収率がほぼ同等のバラツキを示したために、回収率に対する最終液量の影響が示唆され、これら

を考慮した適用が望まれる。

フミン質のPCR反応に対する阻害作用について追試した。本事項については、既にH19年度報告書の中で検討しており、600mg/Lを含む試料からの回収実験でPCR反応阻害が認められることを報告したが、他にフミン酸のTaq DNA Polymeraseに対する最小阻害濃度が0.08~0.64mg/Lであるという報告³⁾もあり、より詳細な阻害作用を検証する必要があった。本研究で、フミン酸のTaq DNA Polymeraseに対する阻害作用は、1.6mg/Lであったが、不溶性フミン酸は、キレックス樹脂やアルカリを用いた抽出法を0.1~0.4 mg/Lとごく少量でも阻害することが明らかとなり、これらの数値は既報値とほぼ同等の値を示した。温泉試料からのDNA抽出においてフミン酸の影響を無視できないことは明白であり、フミン酸除去を考慮して設計された酵素溶菌法のその他の抽出法に対する優位性が改めて支持された。一方で、適用範囲を限定すれば、簡略化されたキレックス樹脂法やアルカリ抽出法は使用可能であると考えられた。

当初C法の有効性がほとんど認められなかったが、その後の改良により回収率は改善されており(図6a)、最終的に選抜したC20カラムと溶出量50 μ L \times 溶出回数2回の組み合わせにより、B法とほとんど変わらない回収率を再現することができた(図6b)。

E. 結論

簡略化と精度向上を目的としてH19年度提案の酵素溶菌法を改良し、これまでの課題であった簡便性と精度の改善を実現できた。フミン酸を含有する温泉試料からの回収において、改良酵素溶菌法はキレックス樹脂法やアルカリ抽出法よりも阻害作用を受けず安定的にDNA

を抽出できることが改めて示された。試料の性質を把握した上であれば、キレックス法とアルカリ熱抽出法も簡便な DNA 抽出法として使用可能と考えられた。

F. 参考文献

- 1)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年度総括・分担研究報告書 主任研究者:倉 文明(2008)
- 2) 齊藤厚ら、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)

- 3)Christoph C. Tebbe and Wilfried Vahjen, Interference of Humic Acids and DNA Extracted Directly from Soil in Detection and Transformation of Recombinant DNA from Bacteria and a Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2657-2665 (1993)

G. 健康危険情報 なし

H. 研究発表 なし

I. 知的所有権の取得状況 なし

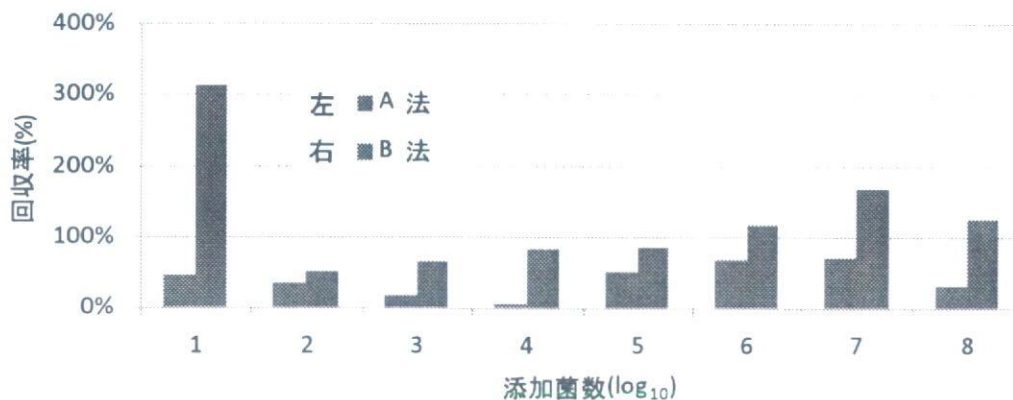


図1a 希釈列(添加菌数:1~8log₁₀ CFU/mL)に対するA法とB法の回収率の比較(第1回)

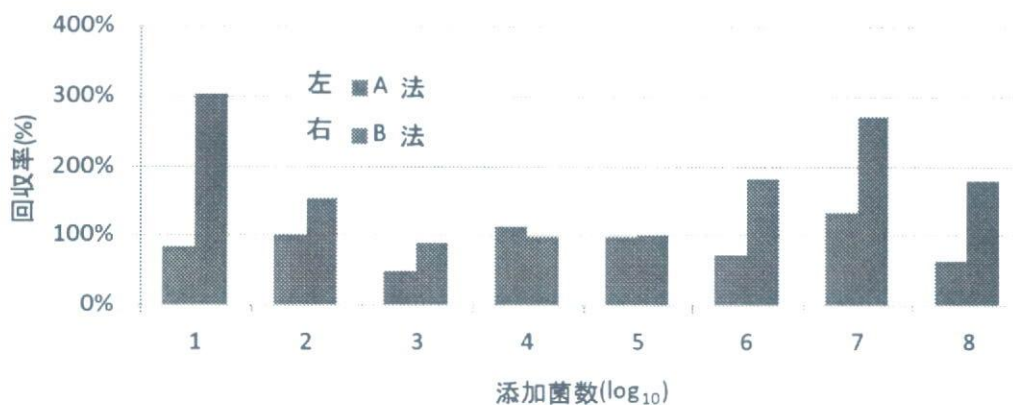


図1b 希釈列(添加菌数:1~8log₁₀CFU/mL)に対するA法とB法の回収率の比較(第2回)
 回収率=測定値/添加菌数×100(%)

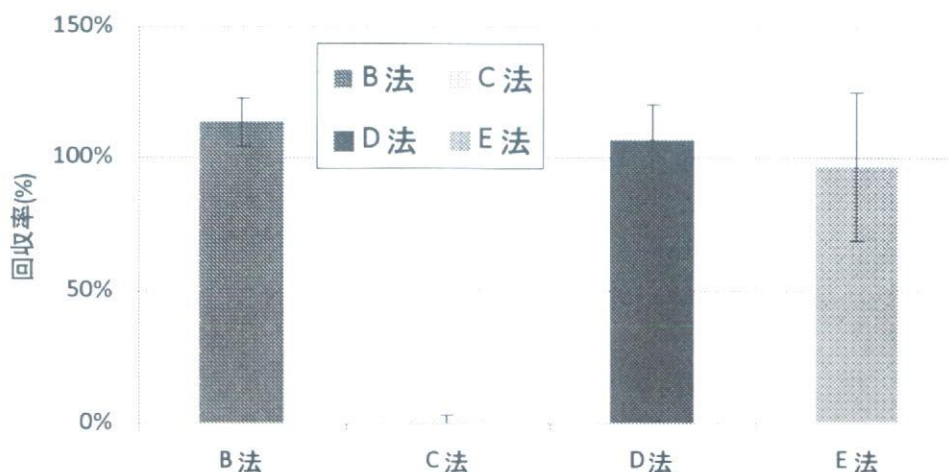


図2 各種DNA抽出法回収率の比較
 (添加菌数:2log₁₀CFU/assay)

回収率=測定値/添加菌数×100(%)
 3連検査の平均±標準偏差

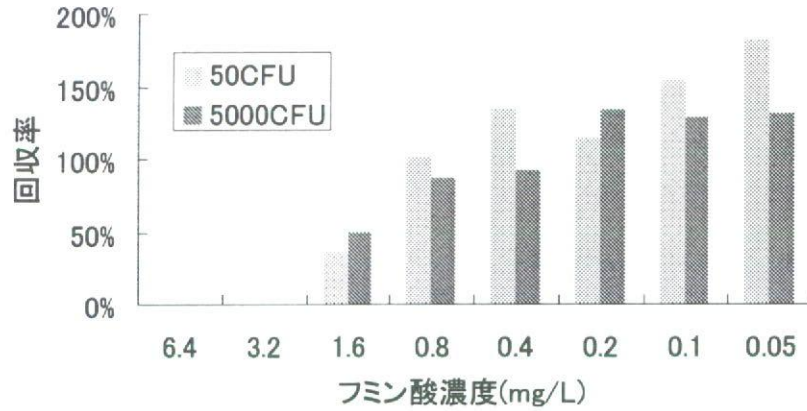


図3 水溶性フミン酸の定量PCR阻害作用

回収率は、定量PCRで得られた菌数を初期菌数（凡例）で除した割合(%)で示し、初期菌数は、添加したレジオネラ属菌DNAの菌数(CFU)換算値で示した

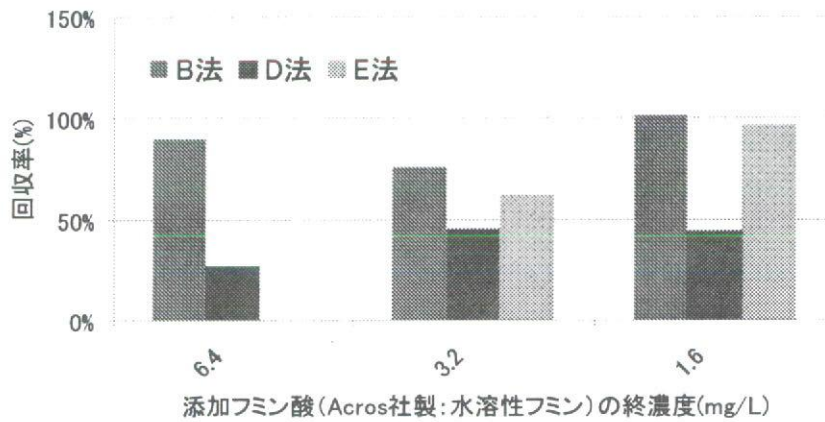


図4 水溶性フミン酸添加時の各種抽出法による回収率の比較 (添加菌数: $2 \log_{10}$ CFU/assay)

回収率 = 測定値 / 添加菌数 × 100(%)

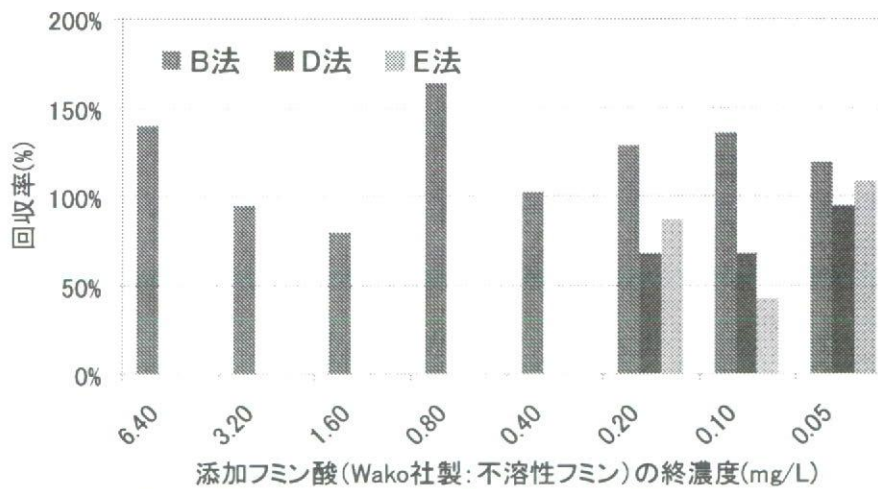


図5 不溶性フミン酸添加時の各種抽出法による回収率の比較 (接種菌量: $2 \log_{10}$ CFU/assay)

回収率 = 測定値 / 添加菌数 × 100(%)

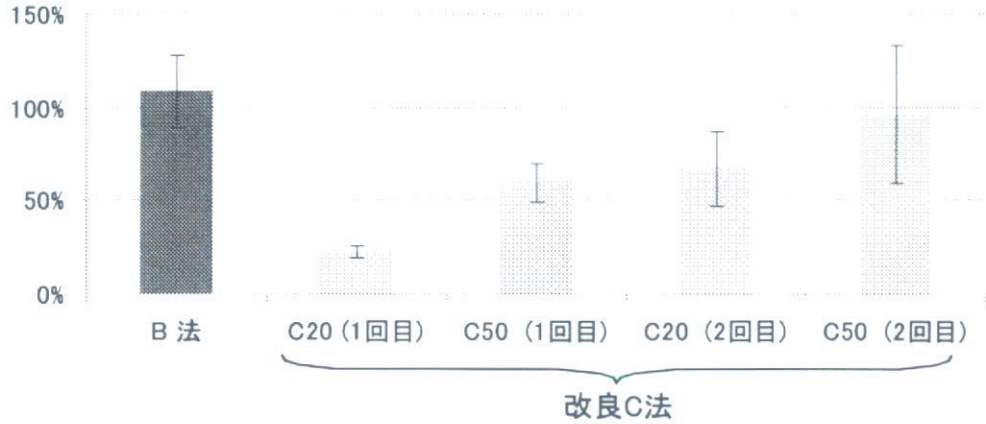


図6a B法(第2回)と改良C法(C20カラムとC50カラム)の回収率の比較(添加菌数 $2\log_{10}$ CFU/assay)

1回目: 溶出量 $20\mu\text{L}$ ×溶出回数1回

2回目: 溶出量 $50\mu\text{L}$ ×溶出回数2回

回収率=測定値/添加菌数×100(%)、3連検査の平均±標準偏差

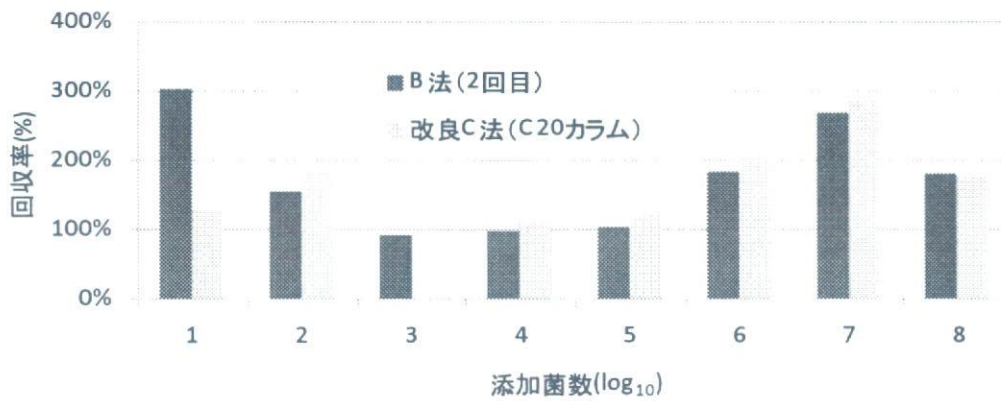


図6b 希釈列(添加菌数:1~ $8\log_{10}$ CFU/mL)に対するB法(第2回)と改良C法(C20カラム)の回収率の比較

回収率=測定値/添加菌数×100(%)

改良C法の3logは検査実施していない