

分担研究報告書

RT-qPCR を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討

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	烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	青木 紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	山本 純子	タカラバイオ（株）製品開発センター
	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部

研究要旨

簡便、迅速で定量性に優れたレジオネラ属菌の核酸検出法を開発する目的で、レジオネラのリボソーム RNA を鋳型として検出する RT-qPCR 法（逆転写産物を鋳型とした定量 PCR）を検討した。培養法と同様に濃縮した試料をさらに遠心濃縮し、Proteinase K を用いた酵素溶解反応後、カラム精製のステップを省略して希釈するだけの簡便な方法によって逆転写反応用の鋳型 RNA を調製した。これを鋳型として逆転写反応を行った後、市販の DNA 検査試薬を用いて qPCR を実施した。本法は、培養標準株を用いた検量線の検討から高感度検出が可能であること、ならびに、実試料を用いて阻害を受けないことを確認した。すなわち、RT-qPCR は qPCR と比較して 1000 倍程度高感度であり、抽出に用いる濃縮試料中に 10 CFU があれば、RT-qPCR で検出可能と考えられた。実試料の検討結果は、通常のリアルタイム PCR 法と高い相関（ $R^2=0.771$ ）を示し、これまでの DNA 検査と同様の結果が簡便かつ高感度に得られた。従来、RNA は不安定で速やかに分解されると考えられていたが、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る結果であった。死菌の RNA が安定であることは、試験管内試験においても確認した。培養法で 10 CFU/100ml 以上の検体は、RT-qPCR 法の定量値でも 10 CFU/100ml 以上の値を示し、実施した範囲では培養陽性の検体から確実に RT-qPCR 陽性を得られた。本方法を、DNA 検査法にかわる、次世代の検査法として提案したい。

A. 研究目的

現在、環境水からのレジオネラ属菌の検出には、16S rRNA あるいは 5S rRNA 遺伝子等のレジオネラ属菌に特異的な配列を標的とした LAMP 法あるいはリアルタイム PCR 法が開発されており、既に公衆浴場等の衛生管理の現場で活用されつつある。しかし、一部の温泉には核酸増幅を阻害するフミン酸等が含まれるため、安定した試験成績

を得るにはカラム精製等の前処理が必要であった。高度に DNA を精製する操作は煩雑で、時間と労力を要するのみならず、阻害物質の残留や回収率と定量結果の精度等が問題となることから、本研究班でも引き続き効果的な核酸抽出方法の検討が進められているところである⁽¹⁾。

リボソーム RNA (rRNA) はタンパク合成のリボソームのサブユニットとしてリボソーム遺伝子

(rDNA) から大量に転写合成されるものであるが、その合成量は細胞あたり数百から数万コピーと見積もられており、ゲノム上に存在する rDNA 遺伝子のわずか 3 コピーに比べれば桁違いに多い核酸である^(2, 3, 4)。当該研究ではこの rRNA に着目し、rRNA から逆転写によって cDNA を合成し、cDNA をリアルタイム PCR で定量すれば、従来の検査法に比べて高感度な検出が可能になるものと期待した。その上、高感度化が達成されれば、鋳型調製の簡略化にもつなげられることも期待した。

我々は、市販の逆転写試薬と DNA 検出キットを活用し、rRNA をターゲットとしたリアルタイム RT-PCR (RT-qPCR) 法の開発を試みた。その結果、濃縮試料を酵素溶解後、精製操作なしの希釈操作だけで反応阻害を回避し、温泉試料からレジオネラ属菌遺伝子の高感度検出を可能としたので報告する。

B. 研究方法及び材料

1. 温泉水の採取及び濃縮

温泉を利用した循環式浴槽施設 33 施設から 102 件 (浴槽水 43 件、原水 41 件、逆流水その他 18 件) の試料を採取し、レジオネラ属菌の培養及び核酸増幅検査を行った。1 リットルを採取し、そのうちの 800ml をポリカーボネートフィルター (ISOPORE、孔径 0.22 μ m、直径 47mm、ミリポア) でろ過し、滅菌蒸留水 8ml で懸濁させた 100 倍濃縮液を試料とした。レジオネラ属菌の培養は、100 倍濃縮液を 50℃、20 分間加熱処理し、その 100 μ l を GVPC 寒天培地 (日本ビオメリュー) に塗布して 37℃ で 10 日間培養し、菌数の算定及び同定を行った。核酸増幅検査用の検体は、100 倍濃縮液 2ml を 15,000rpm で 5 分間遠心し、上清 1900 μ l を除去した 2000 倍濃縮液 100 μ l について、DNA 及び RNA の抽出を行った。核酸抽出が直ちに行えない場合は、2000 倍濃縮液を -30℃ にて保存した。

2. 標準菌液の作製

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株を BCYE α 寒天培地で 30℃ 4 日間培養後、小コロニーを生理食塩水に懸濁して McFarland 2 程度に調整し、10 倍希釈系列を作製した。希釈液から培養法により生菌数を測定するとともに、DNA 及び RNA 抽出用に 100 μ l ずつ分取した。核酸抽出が直ちに行えない場合は、分取したものを -30℃ にて保存した。

培養条件が異なる菌株での DNA 量及び RNA 量を比較するため、35℃ 4 日間及び 37℃ 7 日間培養したものについても同様の方法で菌液を作製した。

3. DNA 抽出

DNA の抽出は、本研究班で作成した泉山/田栗の方法に準じて行った。すなわち、100 μ l の濃縮試料に TE 緩衝液 60 μ l、1M NaCl 20 μ l、10% Triton X-100 10 μ l 及び 20mg/ml Proteinase K (キアゲン) 10 μ l を加えて 60℃ で 1 時間保温し、75℃ で 5 分間加熱後、15,000rpm で 3 分間遠心分離を行った。上清を回収し、Buffer AL 200 μ l 及びエタノール 200 μ l を添加混合後、全量を MonoFas レジオネラ菌用カートリッジ (GL サイエンス) に添加して DNA の精製を行った。カートリッジの洗浄には Buffer AW1 300 μ l 及び Buffer AW2 300 μ l を使用し、Buffer AE 50 μ l で 2 回溶出を行った (以上の Buffer はキアゲン)。

4. RNA 抽出

(1) RNA の抽出方法

100 μ l の濃縮試料に TE 緩衝液 337.5 μ l、5M NaCl 10 μ l、10% Triton X-100 25 μ l、100mM Dithiothreitol 25 μ l 及び 20mg/ml Proteinase K 2.5 μ l を加え、55℃ で 1 時間溶解反応を行った (終濃度 0.1M NaCl、0.5% Triton X-100、5mM Dithiothreitol、0.1mg/ml Proteinase K)。95℃ で 10 分間加熱処理後、15,000rpm で 5 分間遠心し、上清 10 μ l を TE 緩衝液 390 μ l に加えて混和したものを RT 反応の鋳型とした。

(2) Proteinase K 濃度及び不活化温度の検討

TE 緩衝液を用いて 20 CFU/100 μ l 相当の濃度に調整した RNA 希釈液 100 μ l に、2 倍濃度の RNA 抽出バッファー 100 μ l を添加して Proteinase K の終濃度を 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/ml とし、55℃で 1 時間溶解反応を行った。その後、①75℃ 5 分→95℃ 5 分、②95℃ 10 分の 2 種類の加熱処理を行い、遠心上清を RT 反応の鋳型とした。

(3) 酵素反応後の希釈倍率の検討

20 CFU/100 μ l 相当の RNA 希釈液 100 μ l に、2 倍濃度の RNA 抽出バッファー 100 μ l を添加して Proteinase K の終濃度を 0.5mg/ml とし、55℃で 1 時間保持した後、95℃ 10 分の加熱処理を行った。その遠心上清について TE 緩衝液を用いて 10 倍段階希釈液を作製し、RT 反応の鋳型とした。

5. リアルタイム PCR (qPCR)

CycleavePCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) をマニュアルに従って使用した。この試薬はインターナルコントロールが含まれており、反応阻害が生じていないことを反応ごとに確認した。増幅装置は Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を用いた。

6. リアルタイム RT-PCR (RT-qPCR)

逆転写反応 (RT) には PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) と Legionella 5S rRNA reverse primer (タカラバイオ) を使用した。RNA 抽出液 5 μ l に RT 反応バッファー 2 μ l、RT 酵素 0.5 μ l 及び reverse primer 0.5 μ l を加え、RNase free dH₂O で全量を 10 μ l とし、42℃、15 分間逆転写反応を行った後、85℃ 5 秒で酵素失活を行った。この RT 反応後に、15 μ l の TE 緩衝液を加えて全量を 25 μ l とし、そのうちの 5 μ l を用いて qPCR を行った。

7. 菌液中の DNA 量及び RNA 量の経時変化

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株を生理食塩水に懸濁して約 10⁵ CFU/100 μ l の生菌、加

熱死菌、塩素処理死菌を調整した。加熱死菌は、生菌液を 95℃ 2 分間の加熱処理後、直ちに室温に冷却し作製した。塩素処理死菌は、次亜塩素酸ナトリウム濃度を 1mg/L に調整した生理食塩水 99ml に、約 10⁷ CFU/100 μ l の生菌 1ml を添加し、スターで混和しながら室温 30 分間処理後、そのうちの 5ml を分取して 25%チオ硫酸ナトリウムを 10 μ l 添加し、作製した。加熱死菌及び塩素処理死菌は、処理後に培養陰性であることを確認した。一定時間後に菌液 100 μ l を分取して速やかに -30℃に保存し、一連の作業が終了した時点で DNA 及び RNA の抽出を行った。

C. 研究結果

1. RNA 抽出法の検討

(1) Proteinase K 濃度及び不活化温度の検討

抽出に使用する Proteinase K が RT 以降の反応を阻害しないことを確認した。Proteinase K 濃度を 0.05~0.5mg/ml の範囲で 6 段階の異なる反応液を調整し、それぞれ 2 通りの不活化処理 (①75℃ 5 分→95℃ 5 分、②95℃ 10 分) を行い、その後の RT-qPCR 反応への阻害の有無を Ct 値の比較によって確認した。Proteinase K 濃度別の平均 Ct 値は 28.57~29.43 で、Proteinase K 濃度が増加しても Ct 値の増加はほとんど認められず、RT-qPCR 反応への阻害は確認されなかった (図 1)。また、不活化処理別の Ct 値の平均±標準偏差は、①75→95℃で 29.20±0.39、②95℃で 29.01±0.34 であり、両者に有意差は認められなかった (図 2)。Proteinase K は最終濃度 0.05~0.5mg/ml の範囲で使用することが可能であり、不活化処理は 95℃、10 分間で良好な結果が得られることを確認した。以降の実験には 0.1mg/ml の Proteinase K 酵素濃度と 95℃ 10 分の不活化条件を基本操作とした。

(2) 酵素反応後の希釈倍率の検討

温泉水にフミン質等が存在する場合、PCR 等の核酸増幅反応に阻害的に作用することが知られている。核酸精製ではなく、試料の大希釈によって RT-qPCR 反応に対する阻害を最小限に抑えるこ

とを企図し、抽出 RNA の最大希釈倍率について検討を行った。公衆浴場等の基準値を想定し、20 CFU /100 μ l 相当の RNA 希釈液に、2 倍濃度の RNA 抽出バッファーを 100 μ l 添加し (2 倍希釈)、加熱処理後に 10 倍希釈系列を作製し、RT-qPCR 反応における Ct 値を取得した。その結果、20 CFU/100ml 相当の RNA 希釈液から換算して 2 倍、20 倍、200 倍の三点では良好な直線性を維持し ($R^2=0.998$)、感度及び再現性共に良好であった (図 3)。2000 倍希釈では検出は可能であるものの、定量性は損なわれるため、RNA 抽出時の希釈倍率は 200 倍とした。

以上の結果から、温泉等の実試料からの RNA 抽出は、検水濃縮液 100 μ l に 400 μ l の RNA 抽出バッファーを加えた 5 倍希釈で抽出を行い、遠心後上清 10 μ l に TE 緩衝液 390 μ l を加えて 40 倍に希釈することとした。すなわち、最終的に 200 倍希釈の抽出液を調製して、RT 反応の鋳型とした。

2. 検量線

(1) DNA を鋳型とした qPCR

GL カラムを用いて DNA 抽出を行った qPCR の検量線は、PCR チューブ (5 μ l) あたり $4.5 \times 10^1 \sim 4.5 \times 10^4$ CFU/tube に相当する範囲で良好な直線性を示した ($R^2=0.999$) (図 4 (a) ●)。検水 200ml の 2000 倍濃縮液から DNA 抽出を行った場合に換算すると、4.5 CFU/100ml 以上の濃度であれば定量可能な感度を有することが確認された (図 4 (b) ●)。

(2) RNA を鋳型とした RT-qPCR

カラム精製を行わず、酵素溶菌と希釈のみで RNA 抽出を行う今回の方法は、抽出の段階では 200 倍希釈であるが、その後 RT 反応に使用した鋳型 5 μ l を 25 μ l に希釈するため、qPCR 反応の段階では 1000 倍に希釈された鋳型を使用することになる。RT-qPCR の検量線は、PCR チューブ (5 μ l) あたり $4.5 \times 10^4 \sim 45$ CFU/tube に相当する濃度で良好な直線性が確認された ($R^2=0.999$) (図 4 (a) ○)。RT-qPCR の結果を 2000 倍濃縮液から RNA 抽出を行った場合に換算して、qPCR

と検量線を比較すると、両者の検量線はほとんど一致し、RT-qPCR についても 4.5 CFU/100ml 以上の濃度であれば定量可能な感度を有することが確認された (図 4 (b) ○)。以上の検討より、RT-qPCR は qPCR に比較して 1000 倍程度の感度上昇が認められ、抽出に用いる濃縮試料中に 10 CFU があれば、RT-qPCR で検出可能と考えられた。

3. 培養条件による DNA 及び RNA 量の比較

レジオネラ属菌は、培養温度や培養時間によって菌が長く伸びることが知られており、培養条件で菌体当たりの DNA 量及び RNA 量が異なることが予想された。標準菌株の培養条件が検量線に与える影響を確認するため、35 $^{\circ}$ C 4 日間及び 37 $^{\circ}$ C 7 日間培養で得られた菌体を用いて qPCR 及び RT-qPCR の検量線を作成し、30 $^{\circ}$ C 4 日間の検量線と比較した (図 5)。

各培養条件での検量線は以下の通りであった。

○ qPCR における検量線

- ・ 30 $^{\circ}$ C 4 日間培養 $y = -3.66x + 38.07$ ($R^2=0.999$)
- ・ 34 $^{\circ}$ C 4 日間培養 $y = -3.71x + 37.30$ ($R^2=0.980$)
- ・ 37 $^{\circ}$ C 7 日間培養 $y = -3.59x + 34.84$ ($R^2=0.998$)

○ RT-qPCR における検量線

- ・ 30 $^{\circ}$ C 4 日間培養 $y = -3.51x + 27.15$ ($R^2=0.999$)
- ・ 34 $^{\circ}$ C 4 日間培養 $y = -3.57x + 26.29$ ($R^2=0.996$)
- ・ 37 $^{\circ}$ C 7 日間培養 $y = -3.56x + 24.40$ ($R^2=0.996$)

35 $^{\circ}$ C 4 日間及び 37 $^{\circ}$ C 4 日間培養の検量線は、30 $^{\circ}$ C 4 日間培養の検量線と比較して qPCR の Ct 値がそれぞれ -0.77 及び -3.23、RT-qPCR の Ct 値がそれぞれ -0.86 及び -2.75 と低下した。Ct 値の減少幅から算出した菌体当たりの DNA 量は、30 $^{\circ}$ C 4 日培養と比較して 35 $^{\circ}$ C 4 日培養で 1.6 倍、37 $^{\circ}$ C 7 日培養で 7.7 倍に増加し、RNA 量はそれぞれ 1.8 倍、6.6 倍に増加すると計算された。

ちなみに、qPCR と RT-qPCR の検量線を比較すると、35 $^{\circ}$ C 4 日間及び 37 $^{\circ}$ C 7 日間のいずれも両者の検量線はほとんど一致し、培養条件が変わっても DNA と RNA の比率は変化しなかった (図

5)。

4. 菌液中の DNA 量及び RNA 量の経時変化

環境中での DNA 及び RNA の挙動を推察する目的で、①未処理菌液、②加熱死菌、③塩素処理死菌について、菌液（約 10^5 CFU/100 μ l）中の DNA 量及び RNA 量の推移を経時的に観察した（図 6）。①未処理菌液及び②加熱死菌ともに、DNA 量及び RNA 量の推移に大差は見られず、生理食塩水中の菌液においては、DNA と RNA とは同様の挙動を示した。塩素処理死菌については、今回の 1mg/L 30 分間の次亜塩素酸処理により DNA、RNA 共にほとんど検出されないレベルまで減少した。

5. 温泉水を用いた培養法と核酸検出法の比較検討

本法を用いて実際の温泉水において抽出した際の沈渣の状況を図 7 に示す。沈渣量が 50 μ l 程度の検体や、軽度の着色が認められる検体であっても、その後の増幅反応に障害は無いことをインターナルコントロールの反応性から確認した。

(1) 培養法と核酸検出法の定性結果 (n=102)

まず、核酸検出法でレジオネラ属菌遺伝子がわずかにでも検出されたものを陽性とし、培養法の結果と比較した（表 1 (a)）。培養法の陽性率は 31.4% (32/102) に対し、qPCR 法は 66.7% (68/102)、RT-qPCR 法では 81.4% (83/102) であり、核酸検出法、特に RT-qPCR 法で高い陽性率を示した。培養法陽性、qPCR 法陰性の 4 件中 3 件は *L. londiniensis* が検出された検体であり、残りの 1 検体は培養菌数 40 CFU/100ml の原水であった。培養陽性、RT-qPCR 法陰性の 2 件はいずれも *L. londiniensis* が検出された検体であった。RT-qPCR 法では、培養法陽性検体は全て陽性であったが、培養法陰性検体の 70 件中 53 件 (75.7%) から高率にレジオネラ属菌遺伝子を検出した。qPCR 法と RT-qPCR 法の定性結果を比較すると、両者の結果が食い違ったのは 102 件中 24 件あったが、そのうちの 19 件は qPCR 法陰性、

RT-qPCR 法陽性、5 件は RT-qPCR 法陰性、qPCR 法陽性であった。食い違いを示した 24 件の定量値はすべて 52 CFU/100ml 未満と低かった。

(2) 定量結果

一方、核酸検出法で定量値が 10 CFU/100ml 以上の検体を陽性とした場合、qPCR 法及び RT-qPCR 法の陽性率はそれぞれ 52.9% (54/102) 及び 70.6% (72/102) とやや低下した（表 1 (b)）。qPCR 法においては培養法で 10~50 CFU/100ml の範囲と菌数の少ない検体 5 件が陰性と判定されたが、RT-qPCR 法では培養法で *L. londiniensis* が検出された 3 件を除き、培養陽性検体は全て陽性と判定された。qPCR 法と RT-qPCR 法の定性結果を比較すると、qPCR 法陰性かつ RT-qPCR 法陽性の検体が 19 件で、そのうちの 5 件は培養陽性検体、13 件は RT-qPCR 法の定量値が 10~52 CFU/100ml と低い検体であったことから、qPCR 法で 10 CFU/100ml 以上の検体を陽性とするには不安が残る結果となった。

(3) 培養法、qPCR 及び RT-qPCR 法の相関 (n=99)

L. londiniensis 陽性検体を除いた 99 件（浴槽水 43 件、原水 38 件、逆流水その他 18 件）を用いて、培養法、qPCR 法、RT-qPCR 法の相関を検討した（図 8）。培養検査が陰性にもかかわらず、核酸検出法が陽性の検体が多数みられ、qPCR 法及び RT-qPCR 法のそれぞれ 40.4% (40/99) 及び 53.5% (53/99) を占めた。そこで、培養陽性検体を対象に培養法と核酸検出法との相関を求めたところ、qPCR 法では $R^2=0.321$ 、RT-qPCR 法で $R^2=0.310$ と、弱い相関が認められた（図 8-1 (a、b)）。一方、qPCR 法と RT-qPCR 法の間には $R^2=0.771$ と強い相関が認められ、RNA は DNA と同じ挙動をすることが示唆された（図 8-1 (c)）。

培養法との相関を低下させる要因について、検体種別、遊離残留塩素濃度、一般細菌数、従属栄養細菌数等について検討した。その結果、検体種別を「浴槽水及び逆流水等」と「原水」の 2 つのグループに分けた場合に、「浴槽水及び逆流水等」において培養法と核酸検査法との相関が高くなり、

培養法と qPCR 法あるいは RT-qPCR 法との相関係数はそれぞれ $R^2=0.461$ 及び $R^2=0.432$ であった (図 8-2)。

(4) 検体種別による核酸検出法定量値の分布

検体を「浴槽水及び逆流水等」と「原水」とに分けて、培養結果別の定量値度数分布を検討した (図 9)。浴槽水及び逆流水等は、特に RT-qPCR 法の定量値が高くなるほど度数が減少する傾向が顕著であったが (図 9-2)、原水においては、2~3 log CFU/100ml 付近に検体が集積する傾向がみられた (図 9-3)。原水の 69.4%は消毒を実施していないことから、原水中には方法の培養条件では検出されないレジオネラの菌種、あるいは、VNC (viable but non-culturable) 状態のレジオネラ属菌が存在する可能性が示唆された。

D. 考察

迅速、簡便かつ精度の高い検査法を開発する目的で、リアルタイム RT-PCR (RT-qPCR) の適用を試みた。検討の要点は、リボソーム RNA の鋳型量の多さに着目し、阻害物質の影響を受けないレベルまで RNA 溶解液を希釈することで煩雑なカラム精製を省略し、なおかつ培養法を凌ぐ安定した検出感度を保つことであった。

今回検討した RNA 抽出法は酵素溶菌処理後、熱処理により Proteinase K を不活化し、TE 緩衝液で希釈するという簡便な操作であるが、培養菌液で作製した検量線は 2 連測定間の誤差も小さく、基準値 (10CFU/100ml) より低いレベル (4.5 CFU/100ml) まで直線性が維持され、高感度な定量が可能であった (図 4)。実際の温泉試料に適用した場合にも、検討した限りでは増幅阻害は認められず、十分使用可能であると考えられた。今後調査対象を広げて確認を行ないたい。

今回、RNA を対象とした検査法を検討するにあたり、抽出精製法の簡便化とともに、培養法との相関が高くなるとの期待が当初あったが、実試料の RNA の定量値は、培養法よりも DNA 法の定量値とより高い相関を示した (図 8)。生菌及び死菌の RNA の消長を試験管内で検討したが、実施

した条件では DNA と同様の挙動を示した (図 6)。RNA は DNA に比べて不安定とされるが、死菌中でも長時間維持されることが培養法との相関を低くする一つの要因と考えられた。しかし、RNA が DNA 同様に安定であるということは、当該研究で提案の試験法にとっては都合がよく、今後 RT-qPCR 法が簡便かつ高感度な検査法との位置付けで普及されることを期待したい。

培養法と核酸検出法は異なる原理で検査する以上、検量線による換算を要し、1 CFU あたりの DNA 量及び RNA 量について考慮する必要がある。実際問題として、培養条件が異なれば菌体内の核酸量は大きく異なることを示した (図 5)。検量線の作成毎に定量値が桁違いの変動をするのは避けなければならず、基準株を決められた条件で培養することを徹底するよう併せて提案したい。

今回、温泉由来の試料を用いて、培養法、qPCR 法及び RT-qPCR 法の結果を比較したが、培養法と qPCR 法では、低濃度のデータにおいて結果が不安定な印象を受けた。一方、RT-qPCR 法では、低レベルでも安定した定量性が得られたと考えられ、定量値 10 CFU/100ml を基準に陽性を判定しても培養陽性検体を見逃す可能性は低いと考えられた。

温泉等実試料における培養法と核酸検出法との相関を低下させる要因について、検体種別、遊離残留塩素濃度、一般細菌数、従属栄養細菌数等を検討した結果、検体種別に最も影響されることに注目した。「浴槽水及び逆流水等」においては、培養法と核酸検査法との相関がやや認められるものの、「原水」では相関が認められなかった (図 8-3)。検体種別ごとに核酸検査法の度数分布を見ると、浴槽及び逆流水等の検体では、RT-qPCR 法では 1 log CFU/100ml 未満の度数が最も高く、定量値が増すごとに度数が減少する傾向が顕著であった。レジオネラ属菌はバイオフィームでの増殖と消毒による減少が拮抗しつつ、幅広い菌数分布を取る。RT-qPCR 法では定量性に優れているため、理想的な度数分布がみられたものと推察された (図

9・2 (b))。一方、原水については、特に培養法陰性の検体において、核酸検査法で $10^2 \sim 10^3$ CFU/100ml に相当する検体の度数が高かったことは注意すべきかもしれない (図 9・3 (a, b))。浴槽等に比較して貧栄養であること、23℃以下が 48.7% (19/39) と低温の検体が多く、培養法で検出される割合は低いからである。その上、原水の約 7 割は塩素消毒が行なわれておらず、消毒や加温による死菌を検出したとも考えにくい。可能性としては、方法の条件では培養できない種、あるいは VNC (viable but non-culturable) 状態にあるレジオネラ属菌が、もともと温泉原水中に存在したことが考えられた。今後、範囲を拡大しての調査を通じて、明らかにしたい。

E. 結論

- 1 レジオネラ属菌の迅速検査法を開発する目的で、リアルタイム RT-PCR (RT-qPCR 法) 法の検討を行った。
- 2 RT-qPCR 法の鑄型の調整に、カラム精製が不要な簡易抽出法を用いることで、簡便かつ迅速に、再現性の高い検査が可能であった。
- 3 RT-qPCR は qPCR と比較して 1000 倍程度高感度であり、抽出に用いる濃縮試料中に 10 CFU があれば、RT-qPCR で検出可能と考えられた。
- 4 生菌、死菌を問わず、レジオネラ属菌の RNA は安定であり、DNA と RNA はほぼ同じ挙動を示した。
- 5 培養条件によりレジオネラ属菌の 1 CFU 中の DNA 及び RNA 量は異なるため、検量線作成時の菌株の培養条件を厳密にコントロールすることが重要と考えられた。
- 6 温泉入浴施設から採取した試料を用いて各検査法の結果を比較したところ、RT-qPCR 法と培養法との間に弱い相関が認められ ($R^2=0.432$)、RT-qPCR 法と qPCR 法との間では高い相関が得られた ($R^2=0.771$)。
- 7 RT-qPCR 法は、高感度で定量性に優れた試験法で有用と考えられた。

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、H19 年総括研究報告書
- 2 Beste DJ, Peters J, Hooper T, Avignone-Rossa C, Bushell ME, McFadden J. Compiling a molecular inventory for *Mycobacterium bovis* BCG at two growth rates: evidence for growth rate-mediated regulation of ribosome biosynthesis and lipid metabolism. *J Bacteriol.* 2005 Mar;187(5):1677-84.
- 3 Fegatella F, Lim J, Kjelleberg S, Cavicchioli R. Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Nov;64(11):4433-8.
- 4 Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, Asamani G, Hill K, Nuara J, Feder M, Rineer J, Greenberg JJ, Steshenko V, Park SH, Zhao B, Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georgiou A, Chou IC, Iannuccilli W, Ulz ME, Kim DH, Geringer-Sameth A, Goldsberry C, Morozov P, Fischer SG, Segal G, Qu X, Rzhetsky A, Zhang P, Cayanis E, De Jong PJ, Ju J, Kalachikov S, Shuman HA, Russo JJ. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science.* 2004 Sep 24;305(5692):1966-8.

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

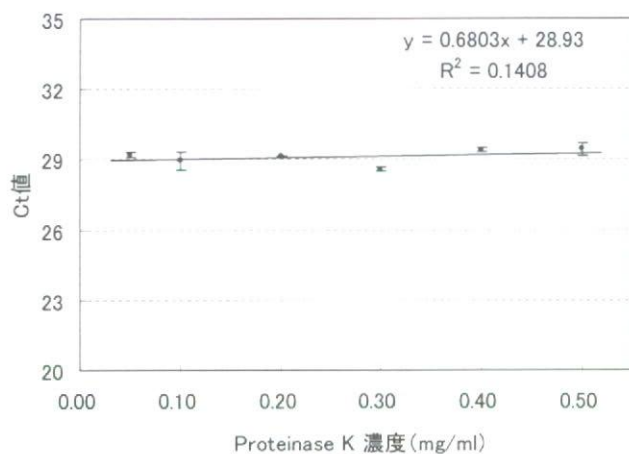


図 1 Proteinase K 濃度の検討

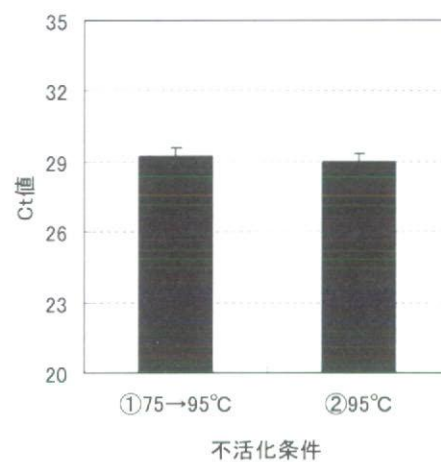


図 2 不活化温度の検討

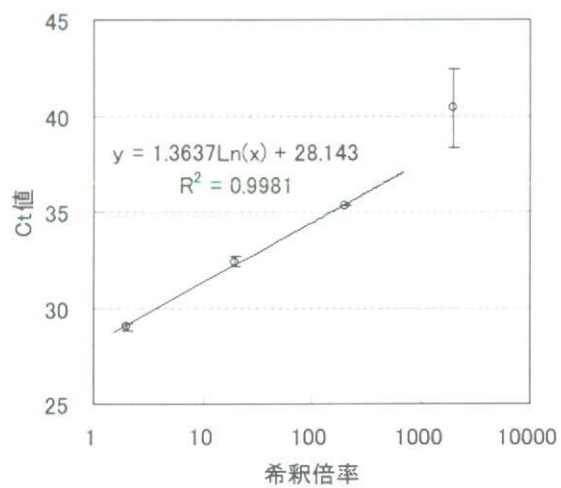
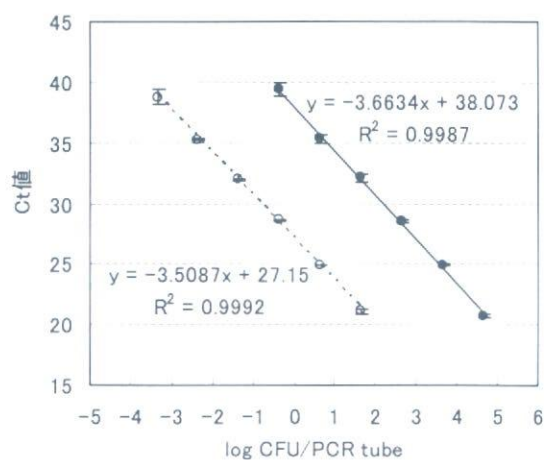
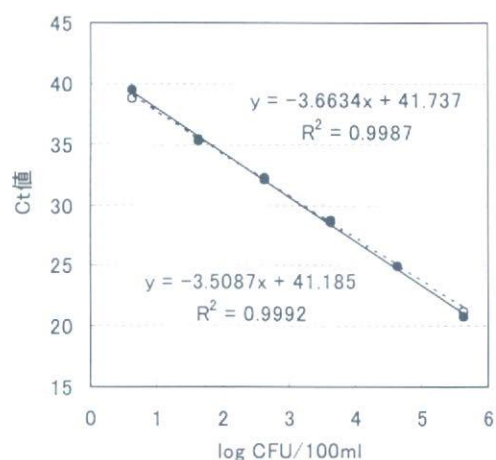


図 3 希釈倍率の検討

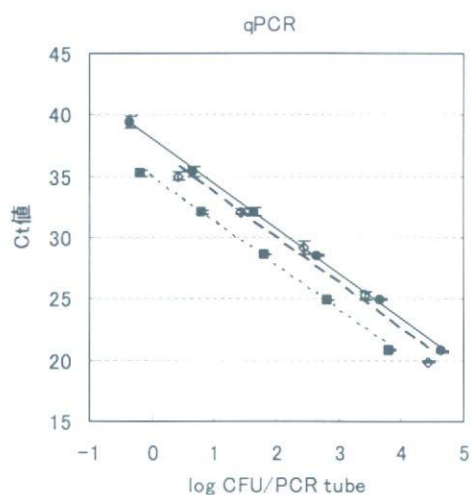


(a) PCR チューブあたりの検量線

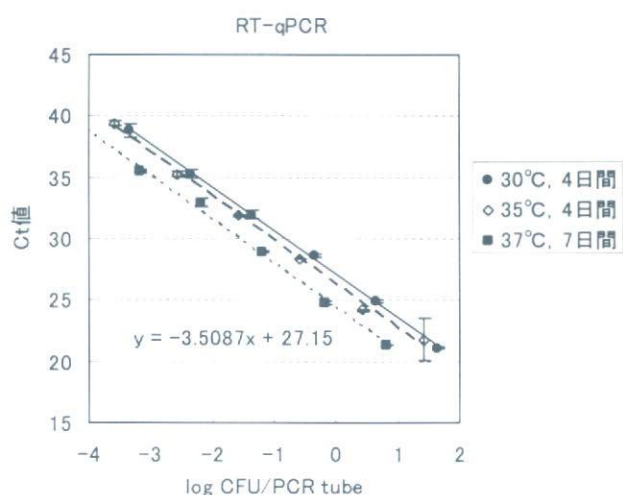


(b) 濃縮前の試料濃度に換算した検量線

図 4 RT-qPCR と qPCR の検量線



(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培養条件別の検量線

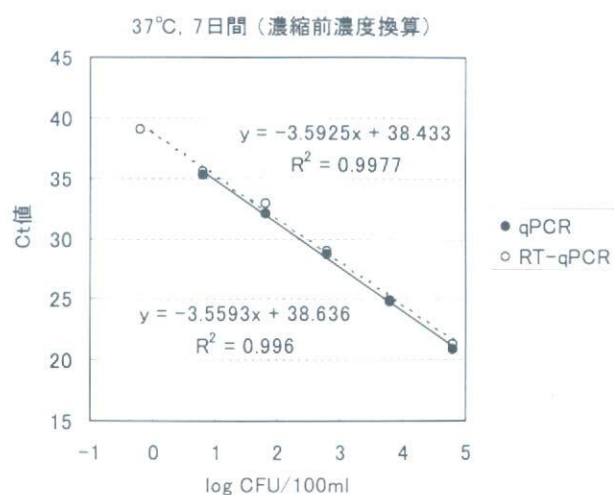
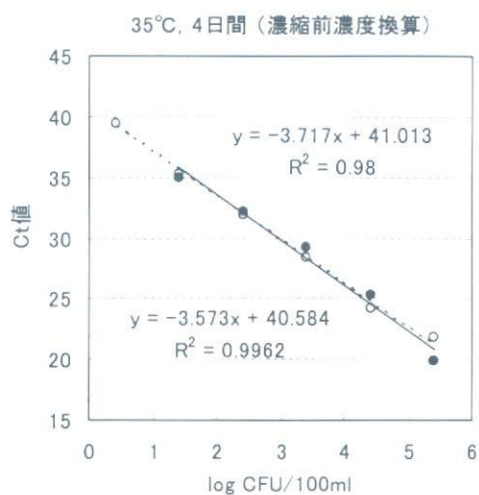


図 5 培養条件による DNA 及び RNA 量の比較

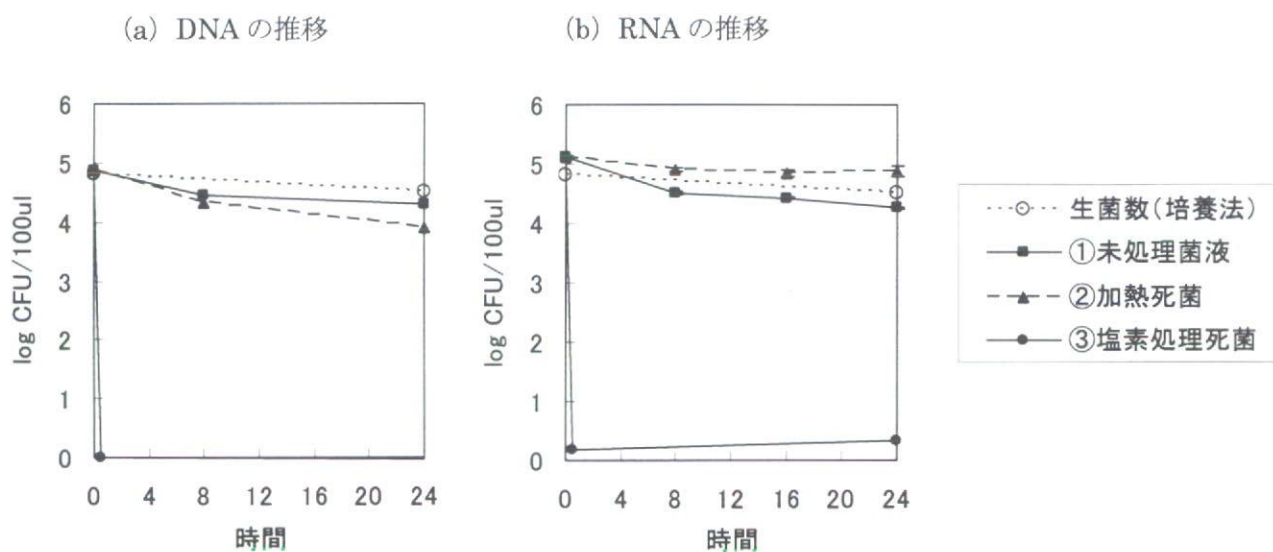


図 6 菌液中の DNA 量及び RNA 量の経時変化

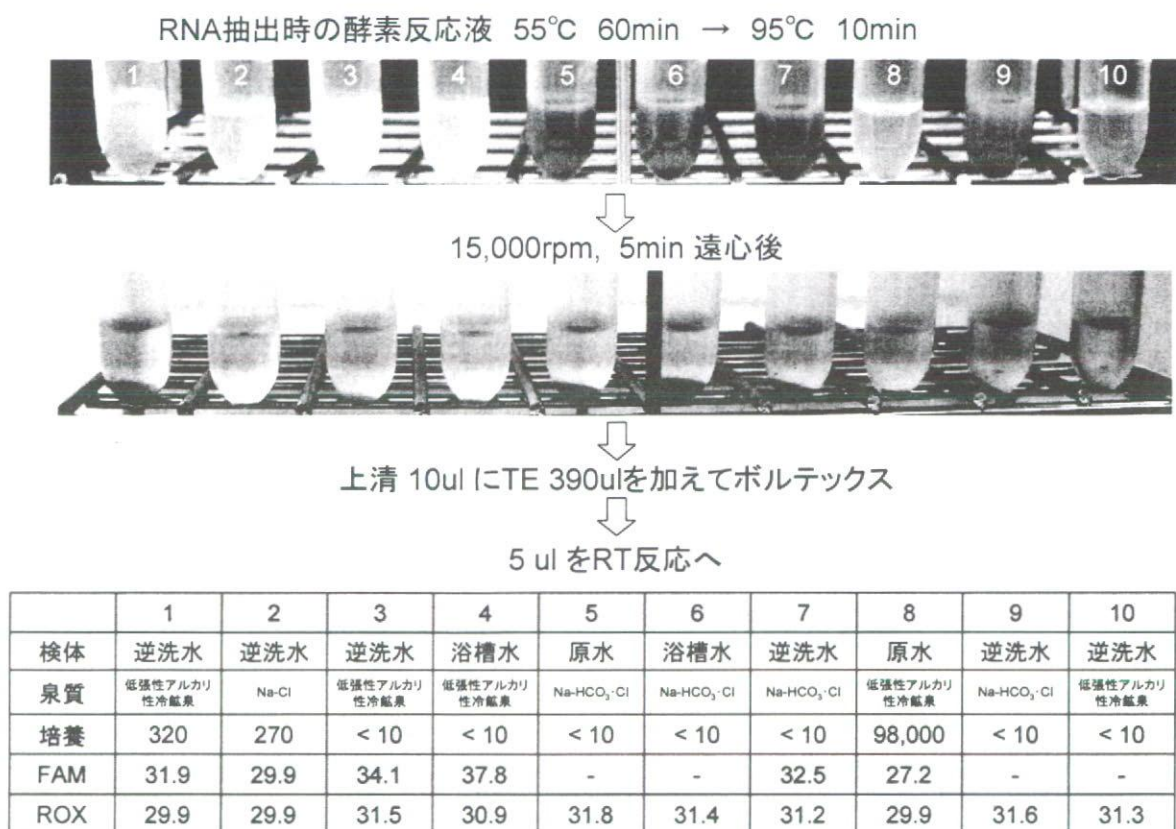


図 7 RNA 抽出時の沈渣と検査結果

表1 培養法、qPCR、RT-qPCR の比較 (n=102)

(a) 核酸検出法でわずかでもレジオネラ属菌遺伝子検出を検出した場合 (定性)

○ qPCR 法と培養法

		qPCR		計
		陽 性	陰 性	
培養法	陽 性	28	4*	32
	陰 性	40	30	70
計		68	34	102

*) 3 件は *L. londiniensis* を検出
1 件は 40CFU/100ml の原水

○ RT-qPCR 法と培養法

		RT-qPCR		計
		陽 性	陰 性	
培養法	陽 性	30	2*	32
	陰 性	53	17	70
計		83	19	102

**) 2 件とも *L. londiniensis* を検出

○ qPCR 法と RT-qPCR 法

		RT-qPCR		計
		陽 性	陰 性	
qPCR	陽 性	63	5*	68
	陰 性	19**	15	34
計		82	20	102

*) 5 件すべて培養陰性、qPCR で 37 CFU/ml の原水が 1 件、残り 4 件は全て 10CFU/100ml 未満

**) 2 件は培養陽性、9 件は RT-qPCR で 10~52CFU/100ml、8 件は 10CFU/100ml 未満

(b) 核酸検出法で 10 CFU/100ml 以上を陽性とした場合 (定量)

○ qPCR 法と培養法

		qPCR		計
		陽 性	陰 性	
培養法	陽 性	24	8*	32
	陰 性	30	40	70
計		54	48	102

*) 3 件は *L. londiniensis* を検出
5 件の培養菌数は 10~50 CFU/100ml の原水

○ RT-qPCR 法と培養法

		RT-qPCR		計
		陽 性	陰 性	
培養法	陽 性	29	3*	32
	陰 性	43	27	70
計		72	30	102

*) 3 件とも *L. londiniensis* を検出

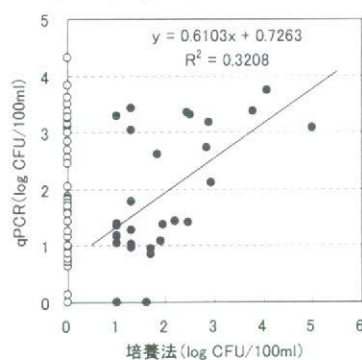
○ qPCR 法と RT-qPCR 法

		RT-qPCR		計
		陽 性	陰 性	
qPCR	陽 性	53	1*	54
	陰 性	19**	29	48
計		72	30	102

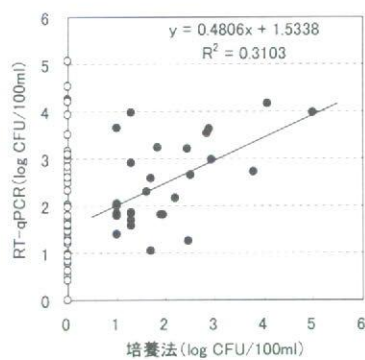
*) 培養陰性、qPCR で 37 CFU/ml の原水が 1 件

**) 5 件は培養陽性、13 件は RT-qPCR で 10~52CFU/100ml、1 件は 360 CFU/100ml 未満

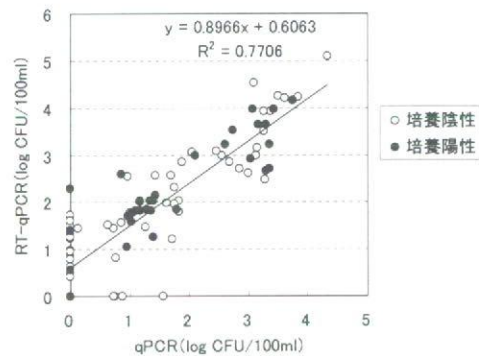
1) 全試料 (n=99)



(a) 培養法と qPCR

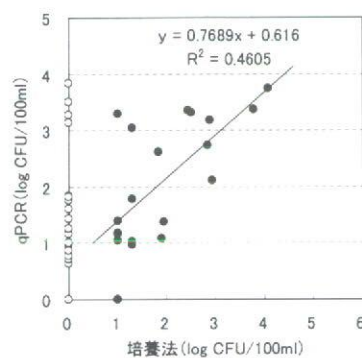


(b) 培養法と RT-qPCR

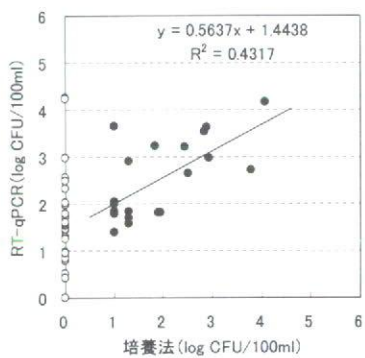


(c) qPCR と RT-qPCR

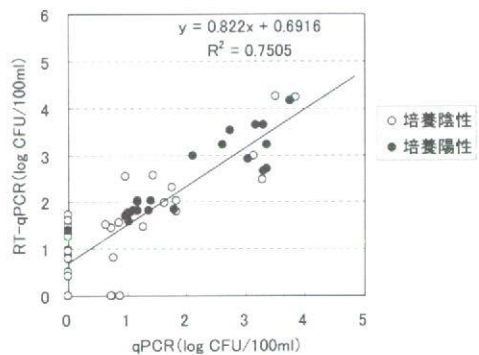
2) 浴槽水、逆洗水等 (n=61)



(a) 培養法と qPCR

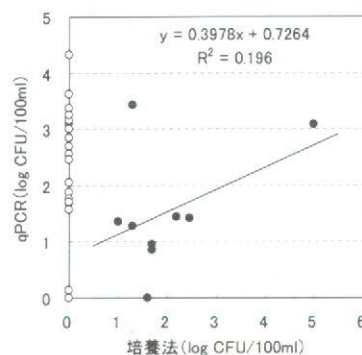


(b) 培養法と RT-qPCR

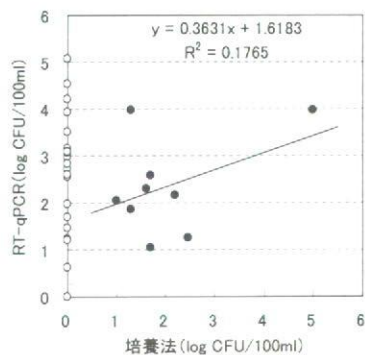


(c) qPCR と RT-qPCR

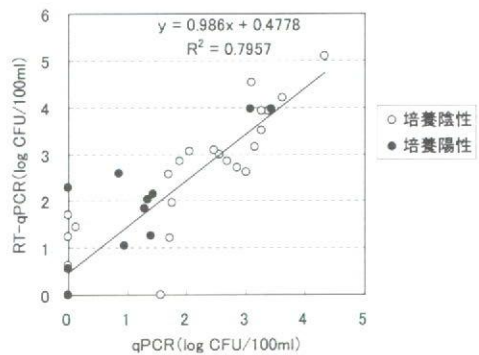
3) 原水 (n=38)



(a) 培養法と qPCR



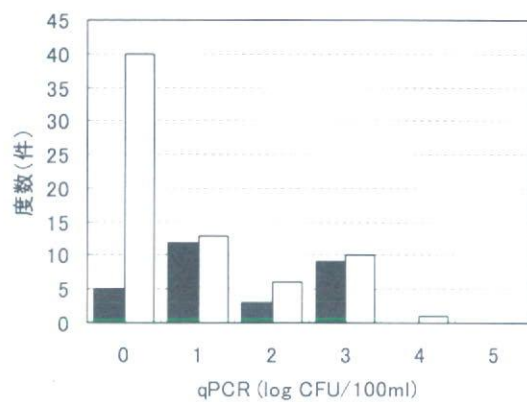
(b) 培養法と RT-qPCR



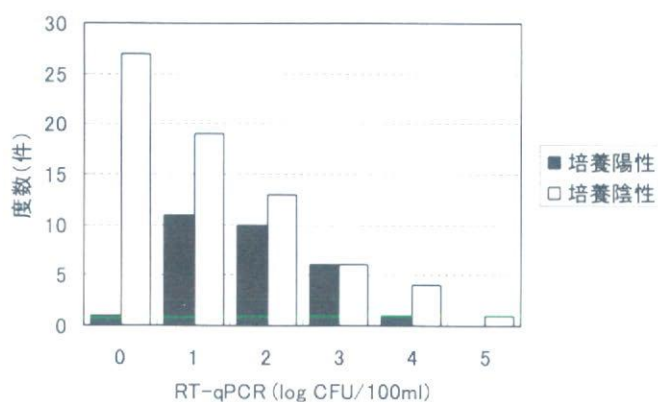
(c) qPCR と RT-qPCR

図 8 培養法、qPCR 法及び RT-qPCR 法の相関
(*L. londiniensis* が検出された 3 件を除く)

1) 全試料 (n=99)

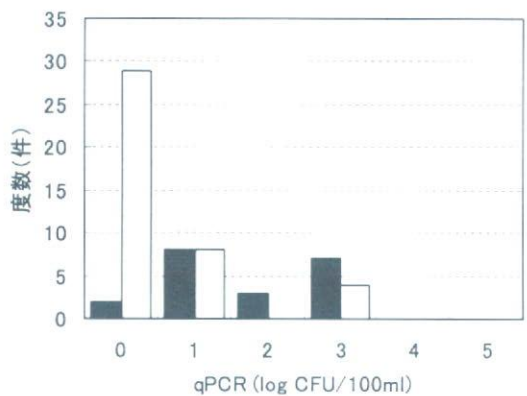


(a) qPCR 法

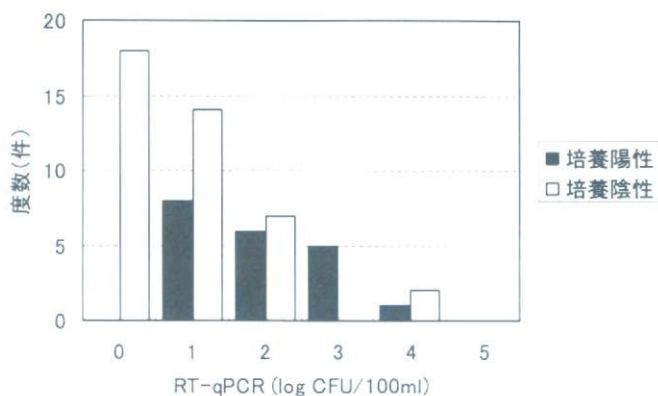


(b) RT-qPCR 法

2) 浴槽及び逆洗水等 (n=61)

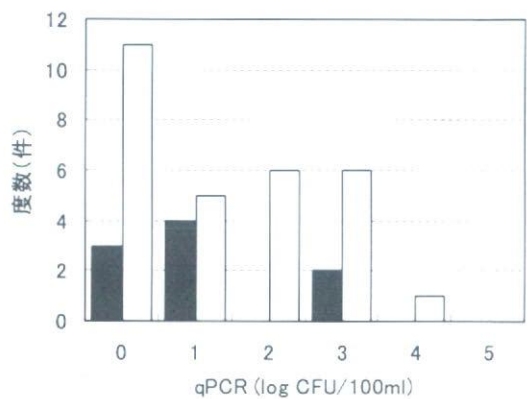


(a) qPCR 法

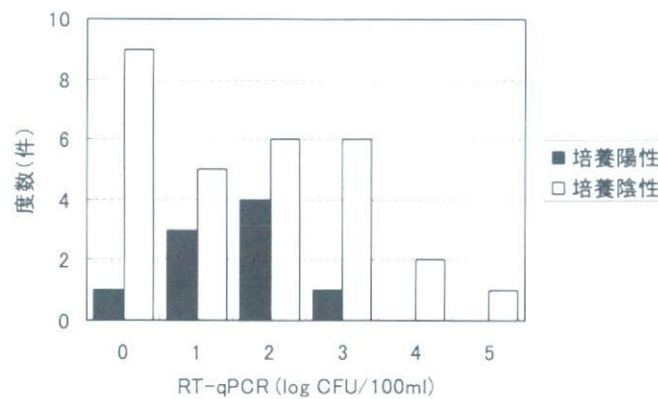


(b) RT-qPCR 法

3) 原水 (n=38)



(a) qPCR 法



(b) RT-qPCR 法

図9 核酸検出法における定量値の分布

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

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

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 常 彬 国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者 前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者 杉山寛治 静岡県環境衛生科学研究所
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 吉田真一 九州大学大学院医学研究院細菌学分野

研究要旨: Ethidium monoazide (EMA) は特異的に死菌のみの細胞膜を透過し、染色体 DNA を切断することにより、PCR の増幅を抑制する。この特性を利用し、EMA 処理およびリアルタイム PCR のコンビネーションによるレジオネラ生菌のみの定量解析を試した。リアルタイム PCR の結果、EMA 処理を行ったレジオネラ死菌の推測された菌数は EMA 処理をしない場合の 10^{-4} – 10^{-5} となった。このことにより、レジオネラ生菌の DNA のみを迅速検出できる可能性が示唆されたので、我々は環境由来およびモデル浴槽由来サンプルを用いて、レジオネラ生菌のみの定量検出を行った。その結果、EMA 処理とリアルタイム PCR のコンビネーション使用による人工的水利用設備のレジオネラ生菌のみの定量検出ができることが明らかになった。

A. 研究目的

近年、リアルタイム PCR は病原細菌を定量的に検出する方法として、レジオネラ検査にも使われている。しかし、生菌と死菌の DNA 両方が検出される欠点がある。EMA は特異的に死菌の損傷された細胞膜を透過し、その菌の染色体 DNA に結合し、光照

射により DNA を切断することができる^{1,2)}。EMA により切断された染色体 DNA は PCR で増幅されなくなることが報告されている^{1,2)}。この特性を利用し、我々は EMA 処理と PCR のコンビネーションによって、レジオネラ生菌のみの DNA の存在を特異的に検出する方法を昨年度報告した³⁾。今年度

は、EMA 処理とリアルタイム PCR の使用によるレジオネラ生菌のみの定量解析を試した結果を報告する。

B. 研究方法

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 10^7 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⁴⁾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℃で培養した。濃縮サンプルに EMA を添加し、遮光下 4℃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 をターゲット³⁾とするリアルタイム PCR による定量解析を行った。

C. 研究結果および考察

1. レジオネラを加えたモックサンプルにおける生菌のみの定量検出

はじめに、EMA 処理およびリアルタイム PCR によるレジオネラ生菌のみの定量ができるか否かを調べるために、レジオネラを水道水に懸濁したモックサンプルを用いて、解析を行った。その結果を図 1 に示した (A:

L. pneumophila, B: *L. bozemanii*)。水道水に加えた実際の菌数は BCYE 培地に接種して決定した (図 1, bar 1)。レジオネラ生菌を含むサンプルを EMA 処理し、リアルタイム PCR により推測した菌数は、実際に懸濁した菌数と差が見られなかった (図 1, bar 2)。塩素処理を行ったレジオネラを培養した結果は、10 CFU/100 ml 以下だったが、リアルタイム PCR により推測された菌数は生菌の場合との差がなく、約 10^6 – 10^7 CFU/100 ml となった (データは示さない)。しかし、同一のサンプルを EMA (20 µg/ml) 処理した後に、リアルタイム PCR により推測した菌数は実際に懸濁した死菌の 10^{-4} – 10^{-5} となり、約 10^1 – 10^2 CFU/100 ml だった (図 1, bar 3)。

本研究班による人工的水利用設備のサーベイランス検査の結果では、90% 以上の環境検体のリアルタイム PCR により推測されたレジオネラの菌数 (生菌と死菌の和) は 10^5 CFU/100ml 以下であった。EMA 処理およびリアルタイム PCR のコンビネーションは約 10^4 – 10^5 CFU/100 ml の死菌の DNA を切断し、PCR 増幅を抑制することができたため、この方法は環境中に存在するレジオネラの生菌のみの染色体 DNA を迅速に検出できると示唆された。

2. 公衆浴場およびモデル浴槽サンプルにおけるレジオネラ生菌のみの定量検出

EMA 処理およびリアルタイム PCR による環境サンプル中のレジオネラ生菌のみの定量検出ができるか否かを調べるために、公

衆浴場由来の 9 サンプル (表 1、No. 1-9) およびモデル浴槽由来の 16 サンプル (表 1、No. 10-25) を用いて、解析を行った。すべてのサンプルを遠心によって濃縮した。そのうちの 1 ml 濃縮液を常法により酸処理を行い、GVPC 培地に塗布し、含まれたレジオネラの生菌数を決定した。さらに、0.5 ml の濃縮液を 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ の EMA で前処理を行った後、染色体 DNA の精製を行った。また、EMA 処理を行わない 0.5 ml の濃縮液から染色体 DNA を精製し、コントロールとした。レジオネラの 16S rDNA をターゲットとするリアルタイム PCR により菌数を推定した。培養により決めた実際の生菌数およびリアルタイム PCR により推定された菌数を表 1 に示した。

検査された 25 サンプルのうち 9 サンプル (No. 5-9, 10-13) でリアルタイム PCR によるレジオネラの検出が見られなかった。GVPC 培地で培養した結果では、そのうち 7 サンプルではレジオネラの生菌が検出されず、残り 2 サンプル (No. 5, 8) では 20 CFU/100ml および 10 CFU/100ml のレジオネラが検出された。その他の 16 サンプル (No. 1, 3-4, 14-25) では 100 CFU/100 ml 以上のレジオネラ (生菌と死菌の和) が存在していることがリアルタイム PCR (EMA 処理なし) により推測された。そのうちの 9 サンプル (No. 3-4, 14-20) は 1 または 5 $\mu\text{g/ml}$ の EMA 処理をすることにより、リアルタイム PCR で推測された菌数と培養により得られた菌数がほぼ一致した。10 または 20 $\mu\text{g/ml}$ の EMA 処理を行った後のリアル

タイム PCR で推測された菌数は培養の菌数より少なかった。これらのサンプルに含まれていたレジオネラの死菌が少なく、低濃度の EMA が PCR による死菌 DNA の増幅を抑制できたと考えられた。また、この結果から高濃度の EMA はレジオネラに対して抗菌効果があることが示唆された。その一方、残り 6 サンプル (No. 1, 21-25) では、10 または 20 $\mu\text{g/ml}$ での EMA 処理後のリアルタイム PCR で推測されたレジオネラ菌数と、培養により得られた菌数がほぼ一致した。1 または 5 $\mu\text{g/ml}$ の EMA 処理を行った後のリアルタイム PCR で推測された菌数は培養の菌数より多かった。これらのサンプルにはレジオネラの死菌が多く含まれていて、全部の死菌の染色体 DNA が PCR により増幅されるのを抑制するためには、高濃度の EMA 処理を行う必要があると考えられた。

D. 結論

臨床検体や環境からレジオネラを分離するには 4-7 日間が必要であり、時間がかかる。本研究では EMA 処理およびリアルタイム PCR のコンビネーションによりレジオネラ生菌のみ検出できることを証明した。しかし、EMA はレジオネラに対して抗菌効果があつて、環境由来サンプルの中に存在しているレジオネラ死菌の量が違うため、EMA の使用量の調整が必要である。死菌が多く存在する場合 (例えば、塩素濃度が高いとき) は、多量の EMA が必要である。その一方、死菌が少ないサン

プルには、少量の EMA で十分である。

E. 参考文献

- 1) Rudi K, Moen B, Drømtorp SM, Holck AL. 2005. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1018-24.
- 2) Soejima T, Iida K, Qin T, Tani H, Seki M, Takade A, and Yoshida S. 2007. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. *Microbiol. Immunol.* 51:763-75.
- 3) 倉 文明、前川純子、常 彬: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 pp107-109.
- 4) Sugiyama K, Ohata K, Suzuki M, Shimogawara R, Izumiyama S, Yagita K, and Endo T. 2006. Inhibition of *Legionella* growth in circulating bathing water by filter refreshment method using high concentration chlorine. In Cianciotto NP, Abu Kwaik Y, Edelstein PH, Fields BS, Geary DF, Harrison TG, Joseph CB, Ratcliff RM, Stout JE, and Swanson MS.

(ed.), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp497-500.

F. 研究発表

- 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. *JJID.* 62: 54-6.

G. 知的所有権の取得状況

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」

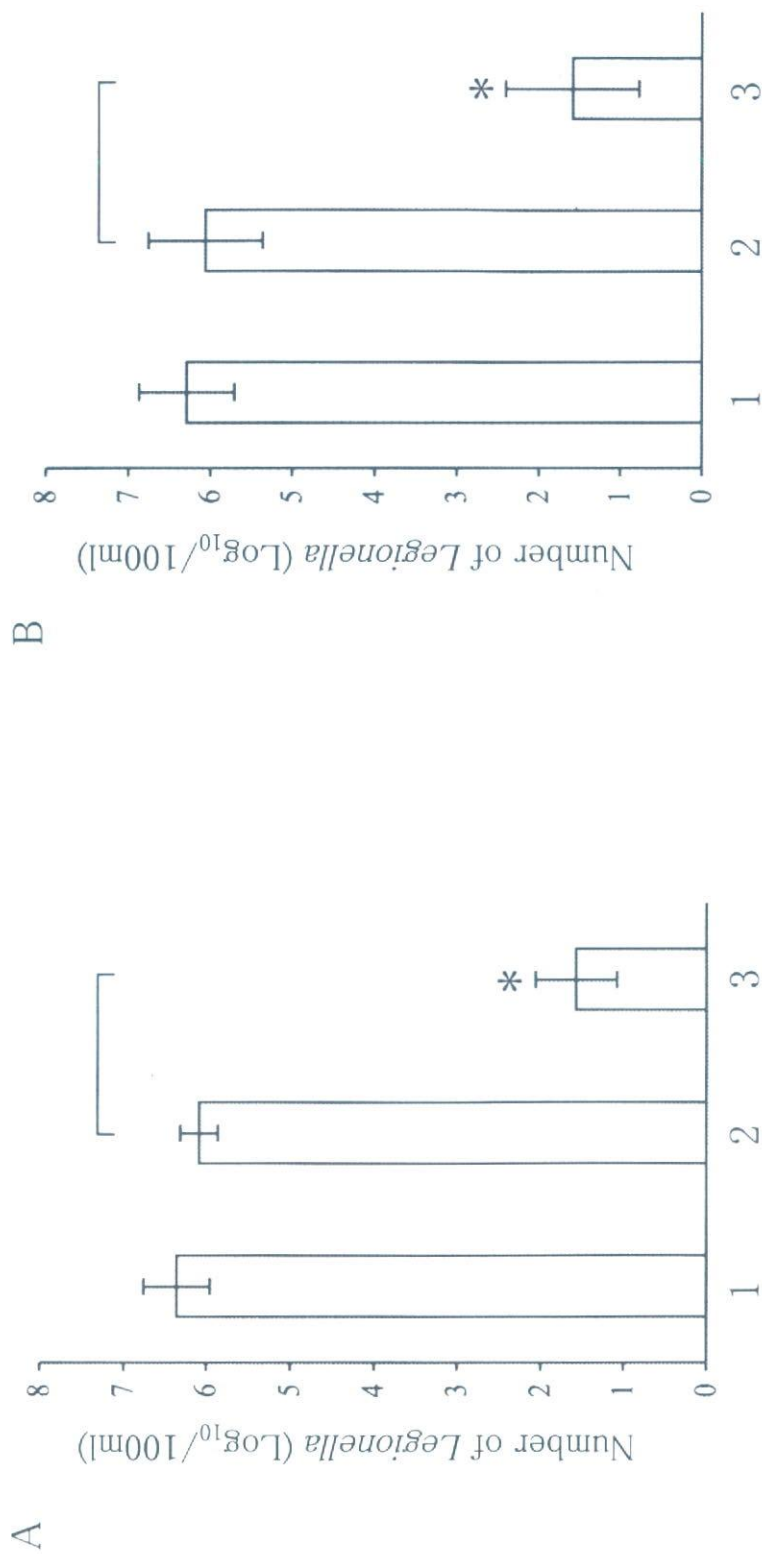


図1. レジオネラのモックサンプルにおける生菌のみの定量検出

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.

表 1.公衆浴場およびモデル浴槽サンプルにおけるレジオネラ菌のみの定量検出

Sample No. ^{a)}	Free chlorine concentration (ppm)	The number of <i>Legionella</i> by plating (log ₁₀ CFU/100ml) ^{b)}	The number of <i>Legionella</i> estimated by real-time PCR (log ₁₀ CFU/100ml) ^{c)}					
			Without treatment	Treatment with EMA at				
				1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	
1	1.0	1.3	3.2	ND	ND	ND	1.4	
2	0.1	2.4	2.2	ND	ND	ND	1.3	
3	0.5	1.3	2.8	1.9	1.3	—	—	
4	0	3.0	3.2	2.9	2.4	2.2	1.9	
5	0.1	1.3	—	—	—	—	—	
6	3	<1	—	—	—	—	—	
7	2	<1	—	—	—	—	—	
8	0	1	—	—	—	—	—	
9	2.4	<1	—	—	—	—	—	
10	0	<1	—	—	—	—	—	
11	0	<1	—	—	—	—	—	
12	0	<1	—	—	—	—	—	
13	0	<1	—	—	—	—	—	
14	0	2.9	3.0	3.1	3.0	2.7	1.9	
15	0	3.8	4.0	3.9	3.8	3.1	3.0	

Sample No. ^{a)}	Free chlorine concentration (ppm)	The number of <i>Legionella</i> by plating (log ₁₀ CFU/100ml) ^{b)}	The number of <i>Legionella</i> estimated by real-time PCR (log ₁₀ CFU/100ml) ^{c)}				
			Without EMA treatment	Treatment with EMA at			
				1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
16	0	4.8	5.2	4.7	3.8	3.1	—
17	0	4.8	5.4	4.3	3.5	2.9	2.3
18	0	4.6	5.2	4.4	3.5	2.5	2.2
19	0.01	5.4	5.9	5.5	5.5	4.0	3.0
20	2.5	3.6	5.5	4.8	3.8	3.1	2.8
21	3.5	1.8	5.2	3.3	2.6	2.1	1.6
22	6.4	1.5	4.0	3.6	3.4	1.6	—
23	8.1	<1	3.3	1.4	1.3	0.7	0
24	8.2	<1	3.0	1.2	1.3	0.7	—
25	8.3	<1	3.8	3.6	1.1	1	—

^{a)}: No.1, 2, and 7-9 samples were obtained from bathtub, No. 3-5 were from filter tank, and No. 6 was from pipeline of public spas.

No.10-17 were obtained from bathtub and No. 18-25 were from filter tank of a model spa.

^{b)}: The number of bacteria were determined by plating on the GVPC plates.

^{c)}: ND, Not done. (-), Not detected.