

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年度分担研究報告書

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

研究分担者 杉山寛治 静岡県環境衛生科学研究所

研究協力者

神田 隆 静岡県環境衛生科学研究所 高橋奈緒美 静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨:市販DNA抽出キットを用いて、浴槽水からレジオネラ属菌の定量的な核酸検出が可能か検討した。標準菌株の希釈系列を用い、市販DNA抽出キットでDNAを抽出し、レジオネラ属菌の5S rRNAを標的としたリアルタイム定量PCR(qPCR)を行ったところ、高い直線性を有する検量線が得られ、その検出感度は10 CFU/tubeであった。これらの成績は、昨年度使用したGLカラムとほぼ同様であった。また、市販キットにおける溶出量の選定を行ったところ、溶出量50  $\mu$ l x 2回による成績は、昨年度実施した溶出量20  $\mu$ lによるものに比べ検出感度が高く、培養法と同レベル(10 CFU/100 ml)の菌数を検出可能であった。

そこで、市販DNA抽出キットを用い、溶出量50  $\mu$ l x 2回の核酸抽出法を、入浴施設の浴槽水のろ過濃縮試料に応用したところ、抽出DNAの5  $\mu$ lを供試するqPCRで、浴槽水中のレジオネラ属菌の定量が可能であった。浴槽水に含まれる温泉成分によるqPCRの増幅阻害はみられず、今回用いた市販DNA抽出キットは温泉の泉質にかかわらず使用できることが判明した。市販DNA抽出キットを使用したqPCR法で得られたレジオネラ菌数は、培養法で求めた菌数と相関がみられ、本法が現場の浴槽水のレジオネラ属菌検査に応用できることが示された。

#### A. 研究目的

現在、浴槽水のレジオネラ属菌検査法としては培養法が広く用いられている。培養法は結果を得るまでに7~10日間を要するため、患者発生時の推定原因施設調査などの緊急時や、汚染施設の洗浄・殺菌後の安全性確認調査などの際には、より迅速な検査法の開発が求められている。

そこで、昨年度に引き続き、入浴施設の浴

槽水の濃縮試料からレジオネラ属菌のDNAを抽出し、それをリアルタイムPCR法で定量し、菌数を測定する核酸検出法の有用性を検討した。今年度は、特に市販されているDNAの抽出・精製キットが利用可能か、また抽出・精製カラムからのDNA溶出量の選定を行った。

#### B. 研究方法

1. 供試した浴槽水と検査法

検査に供した浴槽水は102検体で、その泉質別内訳は塩化物泉44検体(フミン質有機物泉を含む)、水道・井水の沸かし湯25検体、硫酸塩泉9検体、アルカリ性単純泉8検体、単純泉5検体、単純硫黄冷鉱泉2検体、低張性アルカリ冷鉱泉1検体、泉質不明8検体である。

培養法は、浴槽水500mLのメンブランフィルターによる100倍ろ過濃縮液の100 $\mu$ lをGVPC寒天培地(ビオメュー社,生培地)に塗抹培養し、菌数を測定した。なお、分離株は定法にて同定した。

核酸検出法の手順は以下のとおりである。

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

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

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

4) チューブに5mlの滅菌蒸留水(注射用蒸留水)を加え、1分間ボルテックスする。このとき、まんべんなく滅菌水がフィルターに接触するようにチューブの角度を調節する。

5) この試料を濃縮試料とする。濃縮試料5mlのうち、2mlを微量高速遠心機 13,000rpmで5分間遠心し、沈さ100 $\mu$ l(浴槽水の2,000倍濃縮液)を得、冷凍保存(-30 $^{\circ}$ C)する。

6) 核酸の抽出精製法は、TaKaRa FastPure DNA Kit のグラム陰性細菌抽出フローに記載の方法に準拠し、浴槽水の2,000倍濃縮保存液を、Tissue Lysis Buffer、Proteinase K 処理後、抽出DNAをポリマーメンブランカラムに吸着させ、Wash Bufferで2回

洗浄する。

7) 精製DNAは Elution Bufferの 20 $\mu$ l または 50 $\mu$ l $\times$ 2回 で溶出させ、その 5 $\mu$ l を用いqPCR装置(TaKaRa、Dice)で核酸増幅する。

8) 標準菌株(*Legionella pneumophila* N11B 0058株、BCYE $\alpha$ 培地)に接種し、30 $^{\circ}$ Cで4日間培養)の希釈系列から検量線を作成し、試料のCt値をもとに試料の菌数を得る。

9) 得られた菌数は溶出量試料 20 $\mu$ lの場合は50ml中の菌数に、100 $\mu$ l(50 $\mu$ l $\times$ 2回)の場合は10ml相当するので、培養法の100mlと比較するために、qPCR法の菌数をそれぞれ2倍または10倍する。両者の相関を調べる。

なお、GLカラムによる核酸の抽出精製法は、上記の6)の工程で、研究班泉山の方法に準拠し、浴槽水の2,000倍濃縮保存液を Lysozyme、Proteinase K 処理後、抽出DNAをGLカラムで精製した。精製DNAは 溶出液 20 $\mu$ l で溶出させ、その 5 $\mu$ l を用いqPCR装置で核酸増幅を行った。

## 2. 核酸検出法試薬

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

リアルタイムPCR(qPCR)法はサーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した遺伝子増幅装置で、試料中に含まれる特異遺伝子量と増幅産物の検出に至る時間との間に負の相



関が見られることを利用してリアルタイムで定量的な検出を行う。

### C. 研究結果および考察

#### 1 市販キットとGLカラムによるDNA抽出の比較

1~10<sup>6</sup> CFU までの標準菌の希釈系列から、市販キット(図1)、GLカラム(図2)で抽出・精製したDNAのqPCRによる検量線を作成した。市販キットではすべての希釈系列のデータが採用でき、直線性も高く、検出感度は10 CFU /tubeであった。図3に、標準菌の各希釈系列の培養法で求めた菌数と、市販キットまたはGLカラム抽出DNAによるqPCR測定菌数を示した。市販キットのDNA抽出性能はGLカラムと同様であった。

#### 2 市販キットにおけるDNA溶出量の検討

1~10<sup>6</sup> CFU までの標準菌の希釈系列より、市販キットを使用し、20 μl と 50 μl×2回の各溶出量でDNAを溶出させ、その 5 μl を qPCRに供試した。溶出量20 μl (図4)、溶出量 50 μl×2回(図5) で抽出・精製したDNAの qPCRによる検量線を作成したところ、どちらも直線性の高い検量線が得られた。また、図6 (溶出量20 μl) と 図7(溶出量50 μl×2回)に各希釈系列の培養法で求めた菌数とそれぞれの溶出量で得られたDNAによる qPCR測定菌数を図示した。50 μl×2回の溶出DNAの方が検出感度が高く、培養法(10 CFU/100ml)と同レベルの 5.5 CFU/100mlに相当する菌数を検出可能であった。

#### 3 市販DNA抽出キットの入浴施設の浴槽水検査への応用

入浴施設の浴槽水 102検体の 2,000倍濃

縮試料 100 μl から、市販DNA抽出キットで溶出量50 μl×2回でDNAを回収し、その 5 μl を qPCRに供試した。すべての検体でインターナルコントロールの増幅が確認され、温泉泉質による qPCRの増幅阻害(偽陰性)はないことがわかった。今回用いたDNA回収法によって、qPCR増幅阻害を起こす可能性のある温泉成分(フミン質成分を含む)の除去ができていると推定された。

102検体の浴槽水の qPCRと培養法の定量値をもとに図8の散布図を作成した。qPCR法と培養法の菌数に相関があることが示唆されたが、qPCR法では多くの検体で死菌との反応によると思われるDNAの増幅も確認された。

なお、一部の検体(図8の楕円内4検体)で、培養法で *L. londiniensis* が検出されたにもかかわらず、qPCRが陰性(インターナルコントロール陽性)の成績が得られた。*L. londiniensis* を含むレジオネラ属菌の一部の菌種は、今回用いた核酸検出法のプライマーと反応しないことが示されており、少数例ではあるが、培養陽性、核酸検出法陰性のケースが存在する可能性が示された。

### D. 結論

浴槽水のメンブランフィルター濾過と遠心沈殿によって得られた2,000倍濃縮液から、市販DNA抽出キットでDNAを抽出・精製し、それを用いた qPCR法でレジオネラ属菌数の定量測定を行うことができた。今回 102検体の温泉水等を検査したが、いずれの検体でも qPCR法で増幅阻害は認められず、使用したDNAの抽出・精製法は温泉成分に係らず用いることができることが判明した。市販DNA抽出キットを用いた qPCR法は現場の浴槽水のレジオネラ属菌検査に充分応用できることが示された。今後は、死菌DNAによると思われる核酸検出法

の陽性反応を衛生管理上どう評価していくか、  
 洗浄殺菌実験などでさらに検討していく必要  
 があると思われた。

E. 研究発表 なし

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

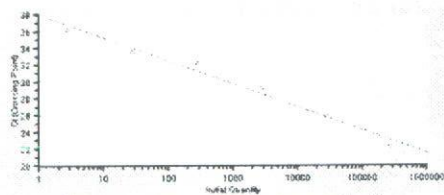


図1 GLカラム抽出による検量線  
 RSq:0.981 Eff=131.0%

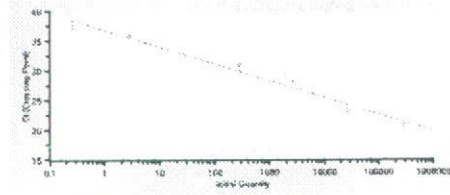


図2 市販キットによる検量線  
 RSq:0.982 Eff=124.9%

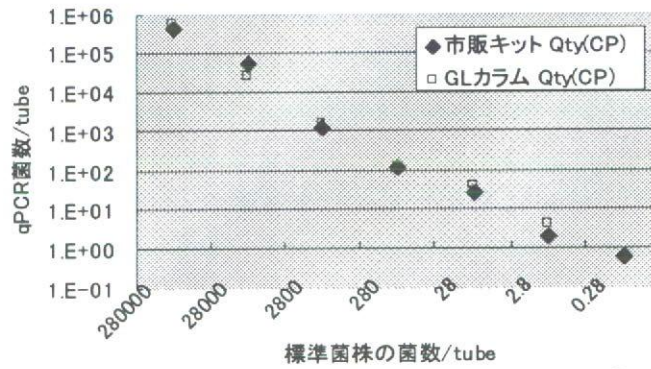


図3 市販キットとGLカラムのqPCR定量値の比較

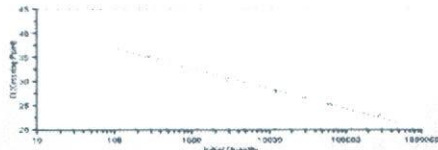


図4 溶出量20  $\mu$ l による検量線  
RSq:0.993 Eff=73.7%

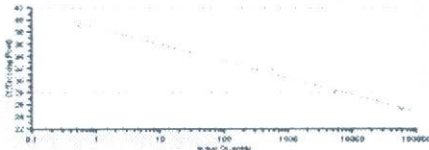


図5 溶出量50  $\mu$ l x 2回 による検量線  
RSq:0.990 Eff=128.3%

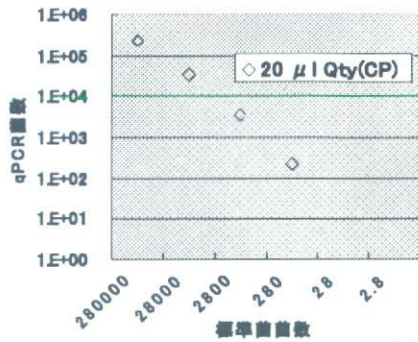


図6 溶出量20  $\mu$ l で得られたqPCR定量値

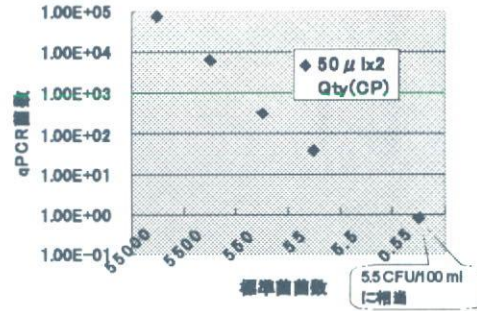


図7 溶出量50  $\mu$ l x 2回で得られたqPCR定量値

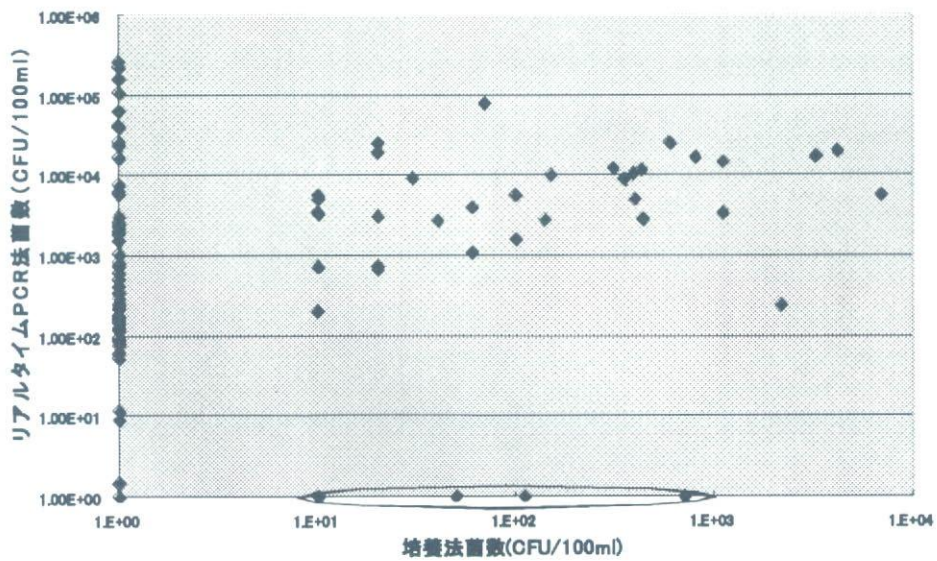


図8 浴槽水のqPCR法と培養法の定量値(散布図)



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」

研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所

### 分担研究報告書

#### 専用試薬による *Legionella londiniensis* の迅速検査

研究分担者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所 細菌第一部
	前川 純子	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 衛生研究課
	佐々木美江	宮城県保健環境センター 微生物部
	山本 純子	タカラバイオ（株）製品開発センター
	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、迅速検査法と従来の培養試験法の結果に不一致が生じて判断に苦慮する場面がある。特に培養陽性、迅速検査法陰性になった場合が問題となり、理由として阻害による偽陰性、あるいは迅速法で検出できない菌種の培養検出がある。後者で特に問題とされているのは *Legionella londiniensis* の不検出で、培養で検出されることはしばしばあるが、当該研究で検討を行っている市販の検査試薬 2 種のいずれも検出しないことが反応特異性の検討結果からすでに明らかとなっている。当該研究では、この *L. londiniensis* を検出するための試薬を開発し、培養陽性、迅速検査法陰性となった試料のコロニーから PCR および LAMP を行って実際に *L. londiniensis* であることの確認を行ったので報告する。

#### 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（浅野、平成 19 年）。しかし、迅速検査法と培養法は原理が異なることから、完全一致の結果が保証されるものではなく、結果が不一致となった場合が問題となる。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ため、阻害によって培養法陽性、迅速法陰性の結果に至る場合もあった。この反応阻害の問題については Proteinase K とカラム精製の前処理を行うことで回避するこ

とをすでに報告した。他方、迅速法の反応特異性が必ずしも *Legionella* の全菌種を検出するものではなく、しばしば *L. londiniensis* の不検出が目立っていた。当該研究では迅速検査法の信頼性向上を目的として、後者の問題とされる *L. londiniensis* の不検出に対処することを目的として行った。

国内集団感染の事例によると、*L. londiniensis* は高濃度に検出されたが、血清抗体価が上昇することはなく、ヒトへの感染はなかったと考えられている（河野ら、2007 年）。原生動物への感染実験でも *Naegleria fowleri* では感染増殖するが、*Acanthamoeba* 等への感染効率が低いと報告されている（八木田ら、本年度報告書）。*L. londiniensis* が検出された際には、他の *Legionella* 属菌が共存

していることもしばしば見られる（岡田ら、2005年）。こうした事例や実験結果から考えると、積極的に *L. londiniensis* の検出を行う必要はないとの考え方があり。一方、迅速検査法の開発の立場で考えると、プライマーの変更等によって特異性を広げることが偽陽性の恐れを招くので好ましくない。こうした背景から、現行のキットを変更するよりも、専用の検出試薬を別途用意することが適当と考えられた。

これを受け、当該研究では *L. londiniensis* 専用のキットを用いて *L. londiniensis* との反応性試験、ならびに実際の試料から検出されたコロニーとの反応試験を実施したので報告する。

## B. 研究方法及び材料

### 1. レジオネラ属菌

*L. londiniensis* は、基準株として ATCC の基準 2 株、ならびに国内の集団感染事例で分離された NIIB385 を含む、環境株として過去に分離保存していた 10 株を試薬の反応性検討に使用した（表 1）。環境株は 16S rRNA 遺伝子の配列等により *L. londiniensis* と同定した。35°C で BCYE 寒天培地で 3 日間培養したコロニーを McF2.0（DENSIMAT）となるよう生理食塩水に懸濁したところ、ATCC 株と宮崎株が  $1.6 \times 10^9$  CFU/mL となり、これは *L. pneumophila* と同程度の CFU だったことから、他の株も同様の濃度と見なした。それぞれの懸濁液を 95°C で 10 分加熱し死菌とし、10 倍希釈系列を作成して所定の濃度を用意して検討に用いた。

以上とは別に、当該研究で培養コロニーとして分離した 2 株を検査現場での検討に使用した。開発検討と同様にそれぞれの懸濁液を 95°C で 10 分加熱した死菌を迅速検査に用いた。

### 2. 迅速検査試薬

*L. londiniensis* の検出には、CycleavePCR *L. londiniensis* Detection Kit（仮称）ならびに、LAMP プライマーセット *L. londiniensis*（仮称）を使用し

た。*Legionella* 属菌の迅速検査には、CycleavePCR *Legionella* Detection Kit ならびに Loopamp レジオネラ検出試薬キット E を使用した。反応条件はそれぞれの添付文書の指示に従った。増幅装置は Thermal Cycler Dice Real Time System（タカラバイオ）あるいは、リアルタイム濁度測定装置 LA-320C（栄研化学）を用いた。

### 3. 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、逆洗水その他 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 0.22µm、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°C、20 分間加熱処理し、その 100µl を GVPC 寒天培地（日本ビオメリュー）に塗布して 37°C 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 1900µl を除去した 2000 倍濃縮液 100µl について、核酸抽出を行った。核酸抽出が直ちに行えない場合は、2000 倍濃縮液を -30°C にて保存した。

### 4. 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、100µl の濃縮試料に TE 緩衝液 60µl、1M NaCl 20µl、10% Triton X-100 10µl 及び 20mg/ml Proteinase K（キアゲン）10µl を加えて 60°C で 1 時間保温し、75°C 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 200µl 及びエタノール 200µl 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 300µl 及び Buffer AW2 300µl を使用し、Buffer AE 50µl で 2 回溶出を行った（以上の Buffer はキアゲン）。



## C. 結果ならびに考察

### 1. 試薬の反応性検討

データベース登録された配列に基づき設計開発された検査試薬に対し、*L. londiniensis* の基準株 2 株ならびに、環境分離株 10 株との反応性を検証した (表 1)。リアルタイム PCR の結果、ならびに LAMP 法による結果のいずれにおいても上記 12 株と良好な反応が得られ、反応チューブあたり 10cfu/test あるいは 100cfu/test において全て陽性反応が得られた。コロニー PCR あるいはコロニー LAMP には十分な感度と考えられた。

### 2. 実試料の検討

浴槽のレジオネラ検査の過程で培養陽性、リアルタイム PCR と LAMP 法のいずれにおいても迅速検査陰性となった 1 試料があり、これを精査した。すなわち、GVPC 培地上から 2 コロニーを選び、DNA を加熱抽出した。抽出 DNA が *L. londiniensis* であるか否かを *L. londiniensis* 専用迅速検査試薬を用いて試験した。専用試薬によるリアルタイム PCR と LAMP のいずれにおいても、上記 2 コロニーから陽性反応が得られ、この時の Ct 値は 21.5 と 19.1、Tt 値は 1074 と 1002 であった。このレジオネラが *L. londiniensis* であることは後に 16S 遺伝子一部領域の塩基配列決定によって確認した。現場では *L. londiniensis* であることが 1 時間の反応中に確認できたが、16S の配列決定は現場から離れた別の施設において行い、数日を要した。

## D. 考察

迅速検査法は培養法と試験の原理が異なることから、検出される菌種に相違が生じてしまうことが避けられない。一方、レジオネラ属菌は *L. pneumophila* 以外の菌種でも感染が報告されており、またレジオネラが増殖する環境であることの指標として他の菌種を検出することも有効と考えられることから、迅速検査法により広い菌種を検出できることが望ましい。

しかしながら、生物には多様性があり、標的遺伝子の配列が菌種によって異なることから、特異性のばらつきが生じている。この問題の技術的な解決法としては、例えば共通配列に対するプライマー・プローブの設計、Degenerate プライマー・プローブによる対象となる配列の拡大、プライマー・プローブの混合によるマルチプレックス化などの手法がある。ところが、試験対象は試験管内の純培養された生物ではなく多様な環境細菌であり、どのような配列を有する生物が存在するのかは浴槽ごとに異なってもおかしくない。検出範囲を広く取ることが理論上は可能だが、広く取るほどに特異性が低下し、偽陽性の危険が増す。従って、検査試薬の設計はどこかで妥協せざるを得ない。

当該研究では *L. londiniensis* 専用試薬を用意することで、元の検査試薬を改変する危険を避けつつ、迅速性を失わずに結果が得られるように準備を行ったこととなる。*L. londiniensis* が培養で検出されることが稀にあるが、病原性は低いと考えられ、試薬を改変してまで積極的に検出する必要性がなかった。専用試薬を併用することで迅速検査法の信頼性が向上すると考えている。

## E. 結論

培養陽性、迅速検査法陰性の例に多く見られる、*L. londiniensis* を迅速に検出する試薬が使用可能となった。実際に試験現場で使用し、短時間に結果が得られた。併用により迅速検査法の信頼性が向上するものと考えられた。

## 参考文献

- 1 浅野陽子、核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について、生活と環境、平成 19 年 1 月号、89-91
- 2 河野 喜美子、岡田 美香、倉 文明、前川 純子、渡辺 治雄、循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 II 診断検査法の比較、感染症



- 学雑誌 81: 173～182, 2007
- 3 岡田 美香, 河野 喜美子, 倉 文明, 前川 純子, 渡辺 治雄, 八木田 健司, 遠藤 卓郎, 鈴木 泉、循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例—I. 発症状況と環境調査、感染症学雑誌 79: 365～374, 2005
- 4 「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、「ヒト感染性が見られない *Legionella londiniensis* の宿主アメーバ」八木田健司ら

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 専用試薬による *L. londiniensis* の検出

No.	NIIB管理番号	由来	採集年	<i>L. londiniensis</i> 専用試薬反応結果			
				qPCR (Ct値)		LAMP (Tt値)	
				100cfu/test	10cfu/test	100cfu/test	10cfu/test
1	194	ATCC49505		33.91	35.04	1206	1344
2	1255	ATCC700510		33.81	35.37	1218	1416
3	873	Miyagi	2005	33.14	36.33	1242	1548
4	879	Miyagi	2005	33.34	36.89	1113	1283
5	1223	Kanagawa	2005	32.92	35.48	1170	1350
6	2146	Kagoshima	2006	33.03	37.70	1230	1260
7	2129	Nagasaki	2005	33.07	36.01	1248	1422
8	1256	Shizuoka	2006	32.80	36.19	1266	1704
9	2435	Shizuoka	2008	32.84	35.19	1452	2160
10	1296	Yamagata	2006	33.34	35.53	1314	1476
11	385	Miyazaki	2002	34.11	37.48	1152	1380
12	1858	Wakayama	2008	32.69	34.98	1140	1344

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)

分担研究報告書

迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の

衛生管理手法に関する研究

浴槽水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討

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
	緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	佐々木美江	宮城県保健環境センター

研究要旨:浴槽水等の 224 検体(4 県の合計)についてレジオネラ属菌の検出を、定量的 PCR(qPCR)法、LAMP 法という迅速検査と培養法により行い比較検討した。DNA の抽出は、2 県で酵素溶菌法(カラム法)、他の 2 県でキレックス法で行った。検出率は昨年と同様に、qPCR 法が一番高く、LAMP 法、培養法と続いた。これまでの試薬では検出されないが浴槽水から時に培養法で検出される *Legionella londiniensis* を qPCR 法や LAMP 法で検出する専用試薬を試験し、部分的な有効性を認めた。生菌を検出する Ethidiummonoazide (EMA)-PCR 法は、予備実験で死菌の十分な減少を確認後に実施されるべきである。

以下に注目された事項について特記する。  
詳細は添付の資料を参照されたい。

1) *Legionella londiniensis* の検出された 2 検体を含む浴槽水 6 検体について、レジオネラ属菌の検査を実施した。新しく開発された *L. londiniensis* 用の試薬は、環境から分離された *L. londiniensis* 菌株を参照株として用いて  $3 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^6$  cfu/test で直線上にのる検量

線がかけた。これまでの qPCR 法、LAMP 法の試薬では *L. londiniensis* が検出されなかったが、新しく開発された *L. londiniensis* 用試薬では、培養で *L. londiniensis* が検出された浴槽水 2 検体の内 1 検体から検出された。検出されなかった検体は、菌数は 3830cfu/100mL と少なくとも、PCR の内部コントロールでも阻害はなかった。夾雑物が多くまきこまれた可能性、塩基配列の違いによ



りプライマー、プローブが有効に働かなかった可能性が考えられた。[A]

2) 35 施設 76 検体(浴槽水 39 検体、湯口水 37 検体)を qPCR 法と培養法で検索した。培養法では、31 検体(40.8%、10cfu/100mL 以上)、DICE で測定した qPCR では、45 検体(60.5%)からレジオネラ属菌が検出された。培養法について検討した結果、*Legionella* 属菌が 10CFU/100ml 以上検出された 31 検体のうち、使用した培地の違いでは WYO  $\alpha$  (32%)、GVPC(27%)、MWY(20%)順に検出感度が下がり、3 種の分離培地全てから *Legionella* 属菌が分離されたものは 12 検体(38.7%)に過ぎず、*Legionella* 属菌を感度よく分離するには、*Legionella* 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。[B]

3) 浴槽水等(足湯 1 検体を含む)89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、培養法で浴槽水 84 検体中11検体(13.1%)、足湯 1 検体中 1 検体(100%)からレジオネラ属菌が検出された。検査法ごとに検出率を比較すると、リ

アルタイム PCR 法(43.8%)、LAMP 法(20.2%)、培養法(13.5%)の順に検出率が高かった。昨年度と同様に、リアルタイム PCR 法は他の 2 法で検出された検体すべてからレジオネラ属菌を検出しており、高い検出感度と定量性は衛生管理指標として有用と思われる。[C]

4) 温泉および銭湯等から浴槽水 53 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検査法(qPCR 法、LAMP 法)を用いて調査した。検水 53 件中、レジオネラ属菌陽性(>10cfu/100ml)となったのは、培養法 20 件(37.7%)、qPCR 法 37 件(69.8%)、LAMP 法 30 件(56.6%)で、遺伝子法で検出率が高かった。今年度は、培養法陽性、遺伝子法陰性となった検水は、qPCR、LAMPいずれの方法とも3件のみで、昨年度の 11~12件に比べると大きく減少した。これは DNA 抽出を昨年度の研究の中で検出率の高かったキレックス法に変更したことによると考えられる。EMA-PCR 法については、標準株で加熱死菌が  $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$  の減少となる条件を満たしてから浴槽水試料の調査をすべきである。[D]

## [A] *L. londiniensis* における核酸検出法の検討

### 1. 目的

2007年「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」班では、リアルタイム PCR、LAMP 法によるレジオネラ 50 菌種の検出を検討した。その結果、リアルタイム PCR 39 菌種、LAMP 法 37 菌種が検出可能であったが、約 10 菌種は不検出となった。不検出であった菌種の多くは環境、臨床で分離例がないものであると報告されたが、*L. londiniensis* (*L.l*)は環境中からの分離例もあり、専用の検出キットの開発が必要とされていた。

今回、*L.l* 専用の核酸検出キットを試用する機会を得たので、検量線の作成および浴槽水からの検出を試み、その有用性を検討した。

### 2. 材料

検量線作成の標準菌は、昨年、当施設で浴槽水から検出した *L.l* を用いた。

浴槽水からの検出では *L.l* と *L.pneumophila* (*L.p*) SG4 が検出された浴槽水 A、*L.l* と *L.p* SG6 が検出された浴槽水 B、*L.p* のみ検出された浴槽水 C、*Legionella* 属菌が検出されなかった浴槽水 D、E、F を検体とした。

### 3. 方法

#### 3.1 検量線の作成

標準菌の *L.l* は BCYE 培地で 30°C 3 日間培養後、菌液を滅菌生理食塩水で McF2 ( $1.0 \times 10^9$  相当) に調整し、10 倍希釈系列を作成した。希釈した菌液は GL カラムと Qiamp DNA mini kit の試薬を用いて DNA を抽出し、リアルタイム PCR および LAMP 法で測定を行い、検量線を作成した。

#### 3.2 検体の濃縮および菌数の測定

浴槽水は採水時、残留塩素濃度を DPD 法で測定した。

採水した浴槽水 500 mL は、フィルター (直

径 47 mm、0.4  $\mu$  m、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 5 mL で懸濁させたものを濃縮試料とした。この濃縮試料を 50°C、20 分間加熱処理した後、GVPC 培地 (日研) に 100  $\mu$  L 塗布して 10 日間培養し、菌数を測定した。

#### 3.3 菌の同定

検出された菌は血液寒天培地、レジオネラ LA (デンカ生研)、PCR でレジオネラ属菌であることを確認し、市販血清および、DNA-DNA ハイブリダイゼーション (極東) で菌種を同定した。これらの方法で同定できなかった菌は MicroSeq リアルタイム PCR Kit、MicroSeq Sequencing Kit (ABI) を用い、16SrRNA 領域の約 500 bp の塩基配列を決定し、BLAST で既存菌種の配列と比較して菌種を同定した。

#### 3.4 DNA の抽出および精製

濃縮試料 2 mL を 15,000 rpm 5 分間遠心後、上清を除去し、100  $\mu$  L に濃縮した。この濃縮物をリゾチーム、Protenase K で処理し、QiAamp DNA mini Kit の添付書に準じて GL カラムを用い DNA 抽出を行った。得られた精製 DNA 5  $\mu$  L を試料としてリアルタイム PCR、LAMP 法を実施した。

#### 3.5 核酸検出法

*L.l* の検出は、Cycleave PCR *L. londiniensis* Detection kit (リアルタイム PCR; タカラバイオ) および *L. londiniensis* 検出試薬キット (LAMP; 栄研化学) を用いた。

*Legionella* 属菌および *L.p* の検出は、Cycleave PCR *Legionella* Detection (5S) kit (リアルタイム PCR; タカラバイオ)、Loopamp *Legionella* 検出試薬キット (LAMP; 栄研化学) を用いた。*L.l*、*Legionella* 属菌ともにリアルタイム PCR の反応条件は step1: 95°C 10sec、step2: 95°C 5sec、55°C 10sec、72°C 20sec、45 サイクルの 2 step で行い、機器は ABI7900HI



(ABI)を使用した。LAMP 法は、Loopamp 濁度測定装置 RT-160C を使用した。

#### 4. 結果

##### 4.1 検量線の作成

リアルタイム PCR、LAMP 法ともに  $3.0 \times 10$  cfu/tube から検出可能であった。リアルタイム PCR は  $3.0 \times 10$  から  $3.0 \times 10^6$  cfu/tube まで直線 ( $Y = -2.89 \ln(x) + 39.9$ ,  $R^2 = 0.9923$ ) が得られた。LAMP 法も同様の結果 ( $Y = -290.24x + 3375.4$ ,  $R^2 = 0.9158$ ) であった (図 1、2)。

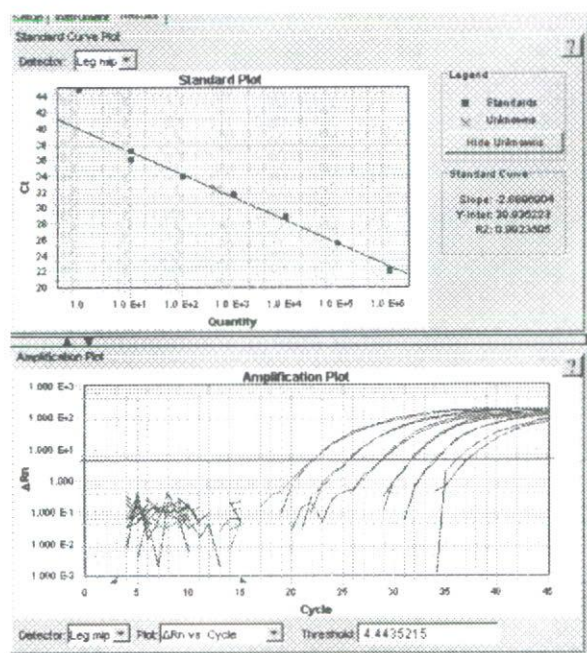


図 1 リアルタイム PCR による検量線

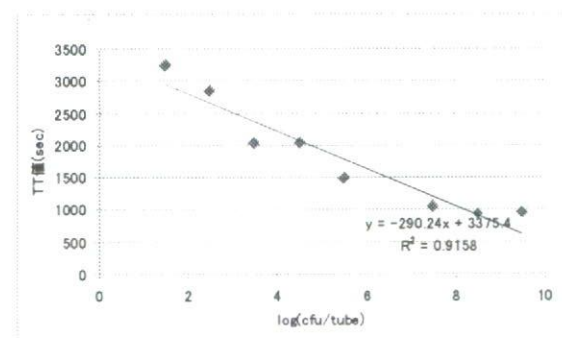


図 2 LAMP 法による検量線

##### 4.2 浴槽水からの検出

各方法による検出結果を表 1、2 に示した。浴槽水 A は残留塩素濃度が 0.1mg/L 未満で、

培養法で 890cfu/100mL、*L1* と *LpSG4* が分離された。リアルタイム PCR、LAMP 法では *L1* が検出された。浴槽水 B も残留塩素濃度が 0.1mg/L 未満で、培養法で 3,830cfu/100mL、*L1* と *LpSG6* が分離され、リアルタイム PCR では *mip* のみ増幅され、LAMP 法では *Legionella* のみ検出された。浴槽水 C は、残留塩素濃度が 1.0mg/L で、培養法で 1,280cfu/100mL、*LpSG5* が分離され、リアルタイム PCR では 5S と *mip* が増幅され、LAMP 法では *Legionella* のみ検出された。浴槽水 D は、残留塩素濃度が 2.0mg/L で、培養法は不検出であった。リアルタイム PCR では 5S と *mip* が増幅され、LAMP 法は不検出であった。浴槽水 E は、残留塩素濃度が 2.0mg/L で、培養法は不検出であった。リアルタイム PCR では 5S が増幅され、LAMP 法は不検出であった。浴槽水 F は、残留塩素濃度が 2.0mg/L で、培養法、リアルタイム PCR、LAMP 法のいずれも不検出であった。

#### 5. 考察

レジオネラは、残留塩素濃度 0.2mg/L のとき 15 分間で死滅するが、遺伝子はその後もある一定時間、残存することが知られている。今回、残留塩素濃度 1.0mg/L 以上であった浴槽水 D、E は培養が陰性で、遺伝子のみが検出されことから、死菌を検出していると考えられ、D は *L.p*、E はレジオネラ属菌が浴槽水中に存在していたものと思われた。また、残留塩素濃度 0.1mg/L 未満の浴槽水 C は、培養、遺伝子とも検出され、昨年と同様にリアルタイム PCR、LAMP が有用な検査法あることが確認された。このリアルタイム PCR、LAMP を利用して *L1* の検出を行った結果、*L1* のリアルタイム PCR および LAMP 法の検量線は、どちらも  $R^2$  が 0.9 以上で利用可能であると考えられた。また、浴槽水からの検出結果において、A、B では、培養法で *L1* が分離され

でも、リアルタイム PCR、LAMP 法で検出、不検出がみられた。この A、B は温泉水で、A は単純温泉低張性中性高温泉、B はナトリウム・カルシウム-塩化物泉高張性アルカリ性低温泉であった。B の浴槽水は、褐色で磁気ビーズ法を行ったときには、緩衝液と反応して沈殿物が生じるなど夾雑物が多かった。リアルタイム PCR のインターナルコントロールは検出されていたことから、夾雑物の影響

で抽出効率が低く標的遺伝子の検出ができなかったものと考えられた。

今回の検討から単純温泉低張性中性高温泉（浴槽水 A）における *Ll* 専用の核酸検出キットは利用可能であることが判明した。今後、ナトリウム・カルシウム-塩化物泉高張性アルカリ性低温泉（浴槽水 B）以外の泉質についても検討する必要があると思われた。

表 1 浴槽水からの菌の検出状況

Sample No.	培養法 (cfu/100mL)	残留塩素濃度 (mg/L)	菌種
A	890	<0.1	<i>L. londiniensis</i> , LP SG4
B	3,830	<0.1	<i>L. londiniensis</i> , LP SG6
C	1,280	<0.1	LP SG6
D	<10	1.0	-
E	<10	2.0	-
F	<10	2.0	-

表 2 リアルタイム PCR、LAMP 法による検出

Sample No.	リアルタイムPCR			LAMP	
	<i>Ll</i>	Legionella 属( 5S)	<i>Lp</i> (mip)	<i>Ll</i>	Legionella 属菌
A	+	-	-	+	-
	(663)			(0.71)	
B	-	-	+	-	+
			(7.5)		(54.8)
C	-	+	+	-	+
		(58.0)	(29.7)		(58.6)
D	-	+	+	-	-
		(2.2)	(12.4)		
E	-	+	-	-	-
		(7.9)			
F	-	-	-	-	-

( ) 内は菌数 : cfu/100ml



## [B] 温泉水等を用いた迅速核酸検出法と培養法の比較検討

### A. 研究目的

浴槽水の *Legionella* 属菌の検査法としては培養法が広く用いられているが、結果を得るまでに7日から10日を要する。一方、患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時や *Legionella* 属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中の *Legionella* 属菌の存在あるいは菌数を速やかに把握する必要がある場合が多々あり、監視現場からはより迅速で、かつ正確な検査法が求められている。そこで、様々な泉質を有する温泉水等を対象に、培養法と迅速核酸検出法 (qPCR, LAMP) を行い、*Legionella* 属菌の検出感度、定量性などについて比較検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 材料および検査法

調査対象は、公衆浴場業または旅館業の許可を受けている営業施設内にある入浴施設とし、35施設から採取した浴槽水および湯口水計76検体を材料とした。

検査法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した。すなわち、検水1000mlをメンブランフィルター(直径47mm、0.2 $\mu$ m、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入りの滅菌コニカルビーカー(100ml容量)に移し、ボルテックスミキサーにて5分間激しく振とうした。次いで、50 $^{\circ}$ C 20分間の熱処理後、急冷し、この試料を濃縮試料(100倍濃縮)とした。

*Legionella* 属菌の分離培地として WYO $\alpha$  寒天平板(栄研化学)、GVPC 寒天平板(日研生物)、MWY 寒天平板(自家製)を用いた。未濃縮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100 $\mu$ Lを

各分離平板2枚にコンラージ棒で塗布し、これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36 $^{\circ}$ Cで7~10日間培養した。分離平板上に出現した灰白色の *Legionella* 様コロニーについて、BCYE $\alpha$  寒天培地(栄研化学)及びL-システイン不含BCYE培地(自家製)に接種し、36 $^{\circ}$ C 3~5日間培養観察した。L-システイン不含BCYE培地に発育せず、BCYE $\alpha$  寒天培地のみに発育した菌についてグラム染色、PCR法で確認検査を行い、*Legionella* 属菌と同定した。その同定されたコロニー数をもって検水100mlあたりの *Legionella* 属菌数に換算した。分離した菌株は、*Legionella* Latex Test Kit(OXOID)及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

#### 2. 検量線の作成

*Legionella pneumophila* SG1, Nagasaki 80-045 を指標菌株とし、30 $^{\circ}$ C 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DNA抽出を行い、検量線を作成した。

#### 3. 核酸抽出法

濃縮試料1000 $\mu$ L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200 $\mu$ Lを添加、99 $^{\circ}$ C 5分加熱処理しDNA抽出を行った。LAMP測定時には、本DNA抽出液を95 $^{\circ}$ C 5分加熱処理し、検査に供した。

また、LAMP法については、検査キットに添付されている抽出方法についても併せて検討を行った。

#### 4. 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(以下、DICE)およびLightCycler 2.0 Roche Diagnostics(以下、Roche)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。

### C. 研究結果

#### 1. 検量線の作成

10<sup>2</sup>から10<sup>6</sup>CFUまでの希釈系列から作成したDNAを用い、qPCR(図1)、LAMP(図2)の検量線を作成した。qPCR法はR<sup>2</sup>=0.992、LAMP法はR<sup>2</sup>=0.89とともに高い負の相関を示した。

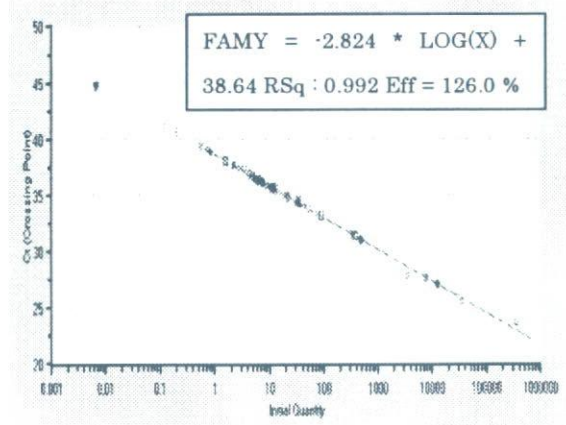


図1 qPCR法(DICE)

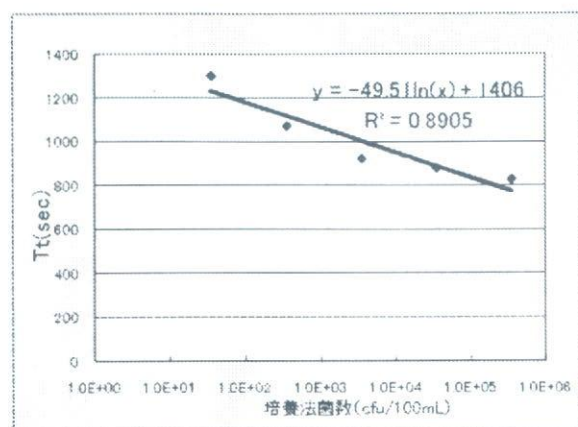


図2 LAMP法

#### 2. 培養法

培養結果の概要を表1に示した。76検体中31検体(40.8%)から基準値10cfu/100mLをオーバーする*Legionella*属菌が検出された。浴槽水は39検体中14検体(35.9%)、湯口水は37検体中17検体(45.9%)から検出された。

*Legionella*属菌が検出された31検体について分離培地の検出感度を比較した(表2)。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12検体、WYOα+GVPCから分離されたものが5検体、WYOαのみから7検体、GVPCのみから4検体、MWYのみから3検体が分離された。

分離された*L. pneumophila*の主な血清群はSG1、SG2、SG3、SG4、SG5、SG6、SG7、SG9で、*L. saintelensi*が1施設から検出された。検出31検体のうち、複数の血清群の*Legionella*属菌が同一の検体から分離されたものが13検体(41.9%)あった。

表1 培養法の結果

	採水箇所	検査検体数	検出数	WYOα市販品	GVPC市販品	MWY自製
掛け流し式	浴槽水	23	8	6	6	5
	湯口水	23	8	6	5	2
循環式	浴槽水	16	6	6	3	2
	湯口水	14	9	6	7	6
計		76	31	24	21	15

表2 分離培地の検出感度

WYOα	GVPC	MWY	検出数
WYOα	GVPC		12
WYOα	GVPC		5
WYOα		MWY	0
	GVPC	MWY	0
WYOα			7
	GVPC		4
		MWY	3



### 3. 核酸検出法と培養法の相関

(1) 基準値(10CFU/100ml)に合わせた定量の結果

76 検体について、qPCR 法と培養法の 10CFU/100ml 以上、未満での比較を行った(表 3、表 4)。DICE で培養法(+)qPCR(-)の不一致が 7 検体、Roche で培養法(+)qPCR(-)の不一致が 8 検体、qPCR 法全体では培養法(+)qPCR(-)の不一致が 4 検体であった。

培養(+)qPCR(-)となった検体を含む 76 検体すべてで、qPCR によるインターナルコントロールの増幅が確認され、PCR 増幅阻害は認められなかった。

表 3 培養法と qPCR 法の比較

		DICE		計	Roche		計
		+	-		+	-	
培養	+	24	7	31	23	8	31
	-	21	24	45	18	27	45
計		45	31	76	41	35	76

表 4 培養法と qPCR 法の比較 (全体)

		qPCR		計
		+	-	
培養	+	27	4	31
	-	23	22	45
計		50	26	76

(2) 基準値(10CFU/100ml)によらない定性の結果

76 検体について、qPCR 法と培養法、LAMP 法と培養法および qPCR 法と LAMP 法の定性結果の比較を行った(表 5、表 6)。培養法(+)で qPCR と LAMP が(-)のものがそれぞれ 6 検体、9 検体あった。

qPCR と LAMP の比較では、qPCR(+)LAMP(-)が 16 検体(21.1%)あり、qPCR の方が感度が高いことが示唆されたものの、qPCR(-)LAMP(+)も 6 検体(7.9%)あった。

表 5 定性での比較

		qPCR		計	LAMP		計
		+	-		+	-	
培養	+	30	6	36	27	9	36
	-	20	20	40	16	24	40
計		50	26	76	43	33	76

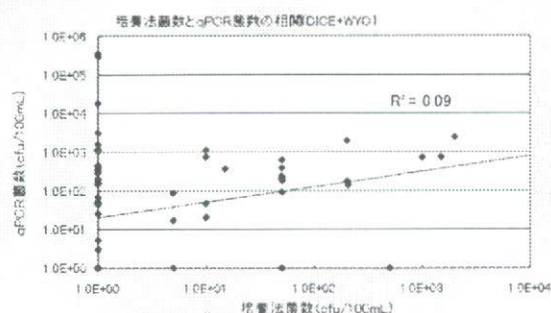
表 6 定性での比較(核酸検出法のみ)

		qPCR		計
		+	-	
LAMP	+	37	6	43
	-	16	17	33
計		53	23	76

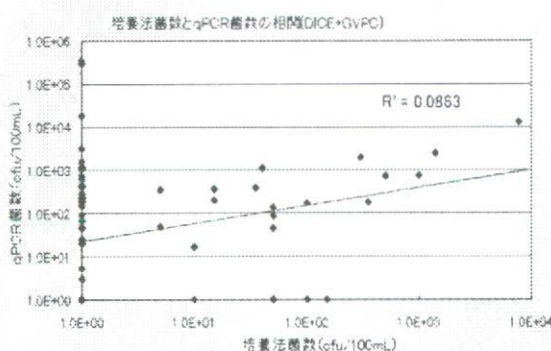
### (3)核酸抽出法と培養法の相関

76 検体について、各検査法の定量値をもとに散布図を作製した。

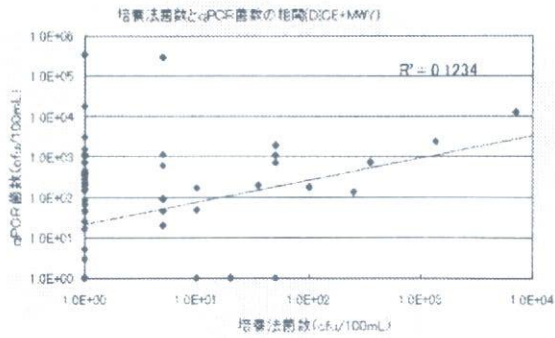
qPCR(DICE)と WYO α



qPCR(DICE)と GVPC



## qPCR (DICE)とMWY



## D. 考察

培養法について検討した結果、*Legionella* 菌が 10CFU/100ml 以上検出された 31 検体のうち、使用した WYO $\alpha$ 、GVPC、MWY の分離培地全てから *Legionella* 属菌が分離されたものは 12 検体(38.7%)に過ぎず、*Legionella* 属菌を感度よく分離するには、*Legionella* 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。

76 検体すべての検体において、qPCR 法で増幅阻害は認められず、今回、核酸検出法として用いたキレックス法は安価で、操作が簡便、迅速に DNA 抽出をすることができる有用な方法として、汎用が期待される。一方、培養法 (+) にもかかわらず qPCR (-) となった不一致は DICE で 7 検体、Roche で 8 検体あったが、両測定法を組み合わせると不一致が 4 検体に減少することから、複数回測定することで改善されるものと思われた。*Legionella* 菌数が少ない検体の場合等は、バラツキや誤差が生じやすく、繰り返し(同一 DNA 抽出液を複数回)の測定やピペット操作の熟練など細心の注意を払う必要があり、また、5%キレックス液による抽出を液量 200  $\mu$ l から 40  $\mu$ l に変更することにより、抽出効率を高める改善がなされるものと思われる。

一方、核酸検査法として LAMP 法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 9 検体(11.8%)

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。

入浴施設における浴槽等の清掃・消毒効果を確認するための衛生管理手法として、迅速で高感度の核酸検査法を導入することは効果的ではあるが、少菌数の場合は見逃しの危険性もあることから、培養法の併用は必須であろう。そこで、培養法における迅速化を図るため、斜光法を取り入れた培養法を併用することにより、さらに正確な結果が期待でき、迅速な行政対応が可能になるものと考えられる。



## [C] 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 20 年度は浴槽水等 89 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。また、一部の検体について ATP 測定、一般細菌数および従属栄養細菌数の測定を並行して実施した。その結果、培養法で浴槽水 84 検体中 11 検体(13.1%)、足湯 1 検体中 1 検体(100%)からレジオネラ属菌が検出された。検出された菌種は *L. pneumophila* 1 群、3 群、4 群、5 群、6 群、10 群、型別不能、および *L. micdadei* で、浴槽水5検体は複数の血清型の菌が検出された。検査法ごとに検出率を比較すると、リアルタイム PCR 法(43.8%)、LAMP 法(20.2%)、培養法(13.5%)の順に検出率が高かった。リアルタイム PCR 法は他の 2 法で検出された検体すべてからレジオネラ属菌を検出しており、高い検出感度と定量性は衛生管理指標として有用と思われる。浴槽水等のフィルターろ過前後の ATP 値の減少率は、一般細菌数および従属栄養細菌数と同様に、レジオネラ汚染との関連が見られた。

### A. 研究目的

入浴施設に関連したレジオネラ属菌による集団発生あるいは散発事例が近年問題となっており、入浴施設の衛生管理は感染予防に重要である。このため昨年に引き続いて浴槽水等のレジオネラ属菌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法との比較、ATP 測定や遺伝子検査による衛生管理指標の有用性を検討した。

### B. 研究方法

#### (1) 材料

浴槽水 84 検体、湯口水 2 検体、その他(原水 2 検体、足湯 1 検体)3 検体の計 89 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、培養法と遺伝子検査法は昨年度の報告書の方法と同様に、

検体 500ml をフィルター(PVDF 製)でろ過し、フィルターを滅菌水 5ml で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、その 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て 37℃、10 日間培養後、コロニーの同定と菌数測定を行った。遺伝子検査は、残りの溶液 2ml を 13,000rpm、5 分間遠心後、上清を除去して沈渣 100  $\mu$ l を得た。これを研究班の DNA 抽出法で抽出して、20  $\mu$ l の DNA 溶液とし、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)を測定して検量線を作成した。菌数は実際の検体の測定値(Ct 値と Tt 値)からこの検量線により算出し、10cfu/100ml 以上を陽性とした。また、検体のろ過前後の ATP 値の変化を測定するため、ろ過前の検体 100 μl とフィルターろ過(0.45 μm)した検体 100 μl で 3 回ずつ ATP 値の測定(キッコーマン:ルシパックワイド)を行った。同時に一般細菌数(以下 SPC)と従属栄養細菌数(以下 HPC)を測定して、ATP 値の変化との関連を検討した。

### C. 研究結果

浴槽水等 89 検体について、検査法別のレジオネラ属菌検査結果を、表 1 に示した。培養法では、浴槽水 84 検体中 11 検体(13.1%)、足湯 1 検体中 1 検体(100%)が陽性となった。遺伝子検査法で検出された検体を含めると、浴槽水 35 検体(41.7%)、湯口水 2 検体中 1 検体(50%)、原水 2 検体中 2 検体(100%)、足湯 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、3 群、4 群、5 群、6 群、10 群、型別不能、および *L. micdadei* で、浴槽水 5 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 法が 89 検体中 39 検体(43.8%)で最も検出率が高く、次いで LAMP 法(20.2%)、培養法(13.5%)の順であった。

残留塩素濃度による各検査法のレジオネラ属菌検出率への影響について、表 2 に示した。

残留塩素濃度が 0.2ppm より低い 26 検体

については、どの検査法でも検出率(42.3%~88.5%)が最も高かった。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、培養法は 0.4ppm~1.0ppm の 21 検体中 1 検体(4.8%)のみが陽性で、それ以外は陰性であった。これに対して、遺伝子検査法は残留塩素濃度 0.2ppm 以上の 61 検体のうち 15 検体(24.6%)が陽性となり、qPCR 法では残留塩素濃度 1ppm 以上の 29 検体中 4 検体(13.8%)が陽性であった。

各検査法によるレジオネラ属菌検出結果は、表 3 に示した。

レジオネラ属菌陽性の 39 検体のうち、qPCR 法、LAMP 法および培養法の 3 法とも陽性は 8 検体(9.0%)で、2 法で陽性は 14 検体(15.7%)、qPCR 法のみ陽性は 17 検体(19.1%)であり、qPCR 法は 39 検体すべてが陽性であった。qPCR 法との陽性一致率は LAMP 法が 18 検体(20.2%)、培養法は 12 検体(13.5%)で、LAMP 法の一致率が高かった。

遺伝子検査法による定量は、昨年同様既知濃度のレジオネラ菌液を使用して qPCR 法と LAMP 法で検査を行い、Ct 値および Tt 値からそれぞれ検量線を作成した(図 1 および 2)。qPCR 法の検量線は図 1 のように  $Y = -3.951 \cdot \text{LOG}(x) + 40.26$  ( $R^2 = 0.988$ )で高い相関が見られた。一方、LAMP 法は  $R^2$  値が 0.9728 と昨年より良好な値であった。

qPCR 法および LAMP 法によりレジオネラ属菌が検出された検体について各々の検量線から菌数を求め、培養法で検出された菌数と 3 法相互の菌数分布を図 3~5 に示した。

qPCR 法と培養法(図 3)および qPCR 法と