

レジオネラに汚染されているのか??
消毒や洗浄はうまくいっているのか??

レジオネラ培養検査で調べよう。
でも日数がかかってしまう。

頻繁に調べたい!
現場で調べたい!
すぐに結果を知りたい!

そこで

ATP検査
キットを使って浴場で検査
誰でも簡単
その場で判定

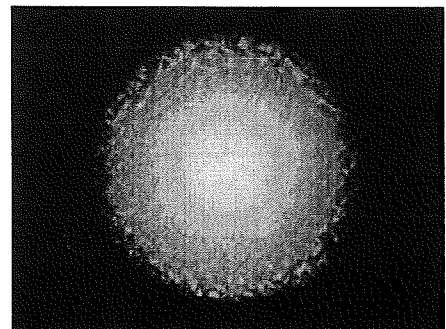
ATP検査の結果でレジオネラがいる危険性を判定します。
ATP検査は浴槽水中の細菌や入浴者に由来するATP量を測定します。
浴槽水中の菌数が多いと、レジオネラが増殖する危険性が高くなり、
細菌や汚れが多ければATP測定値は高くなります。
目標値は50RLUです。

図6 浴槽水のレジオネラ汚染指標としてATPを測定

同じ浴槽水から複数種
のレジオネラ属菌をひ
ろえました。

雑菌が増えて培
地が混雑しても
レジオネラ属菌
の確認検査がで
きました。

遺伝子検査
(PCR)と組み合
わせて集落がレジ
オネラ属菌かどう
か、集落の検査日
にわかりました。



モザイク様の模様

2日目に同定で
きたこともあります。

図7 斜光法でレジオネラ属菌の集落を見つける

表 2. 臨床分離株と土壌分離株の ST の分布

ST	臨床分離株	土壌分離株	MAb
48	0	9	Bellingham
739	0	6	OLDA
22	0	5	OLDA
505	4	0	Benidorm
138	3	0	Allent./France, Benidorm
352	1	2	Allent./France
384	3	0	Benidorm
448	0	3	Benidorm, OLDA, Oxford
593	1	2	OLDA
120	2	0	Benidorm
129	0	2	Bellingham
132	2	0	Allent./France
353	2	0	Knoxville
445	0	2	OLDA
507	2	0	Allent./France, Benidorm
609	2	0	Philadelphia
Others	41	4	Allent./France, Bellingham, Benidorm, Knoxville, OLDA, Oxford, 血清群 2, 3, 4, 6, 9
合計	63	35	

表 3. 臨床分離株と土壌分離株におけるモノクローナル抗体型の分布

MAb 型	臨床分離株	土壌分離株
Allent./France	12	3
Bellingham	1	11
Benidorm	28	1
Knoxville	6	0
OLDA	1	18
Oxford	2	1
Philadelphia	4	1
小計	54	35

A.

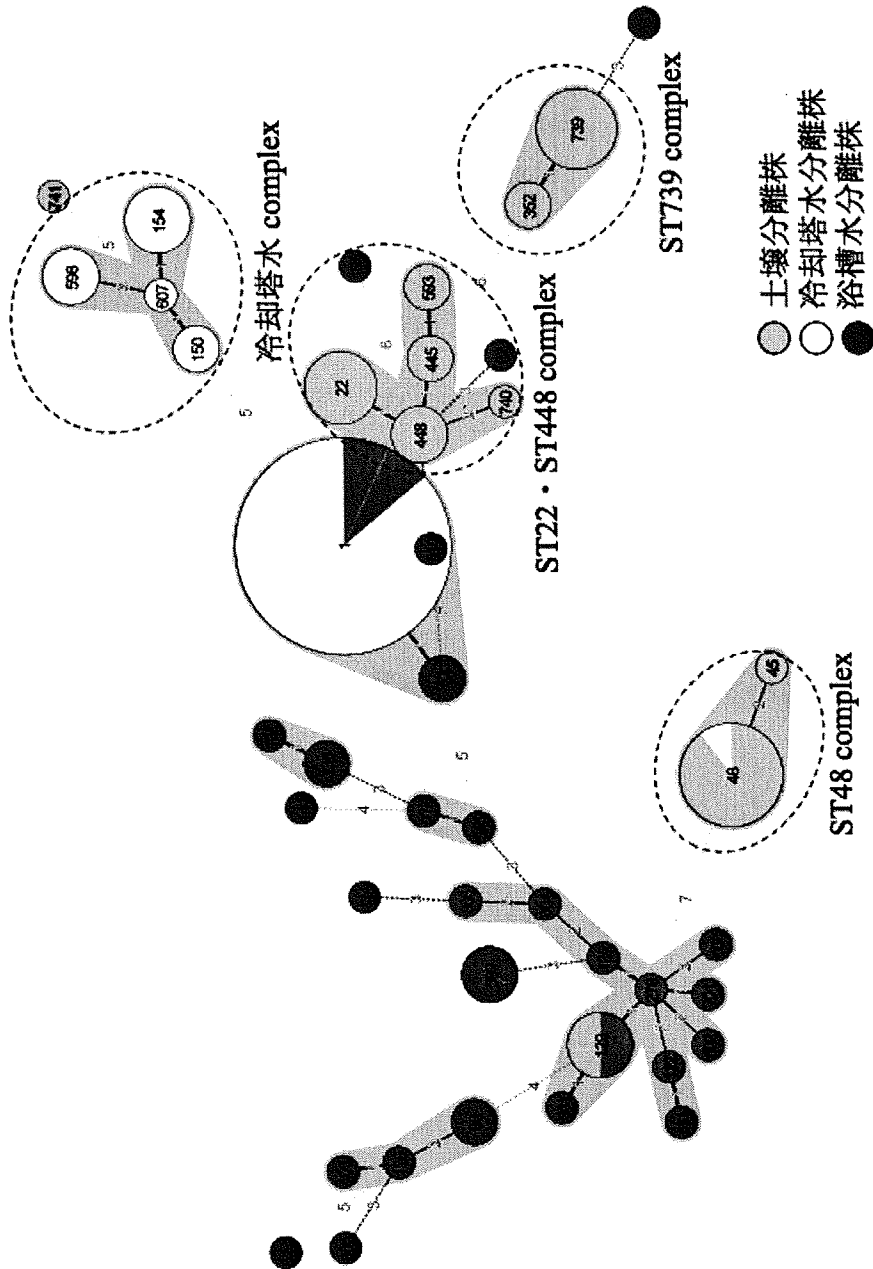


図 8A *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株の ST 同士の類縁関係。今年度調べた土壌分離株 (35 株) と昨年度調べた浴槽水分離株 (40 株) および冷却塔水分離株 (48 株) の結果を Minimum Spanning tree 法により示した。円の中の数字は ST ナンバーを示し、その大きさはそれぞれの ST を有する株数に比例している。“枝”の長さは互いの ST で異なる遺伝子座の数に比例している。隣り合う遺伝子座の違いが 2 つ以下の ST およびそれらをつなぐ枝の周囲は灰色に塗られ、complex を形成していることを示している。

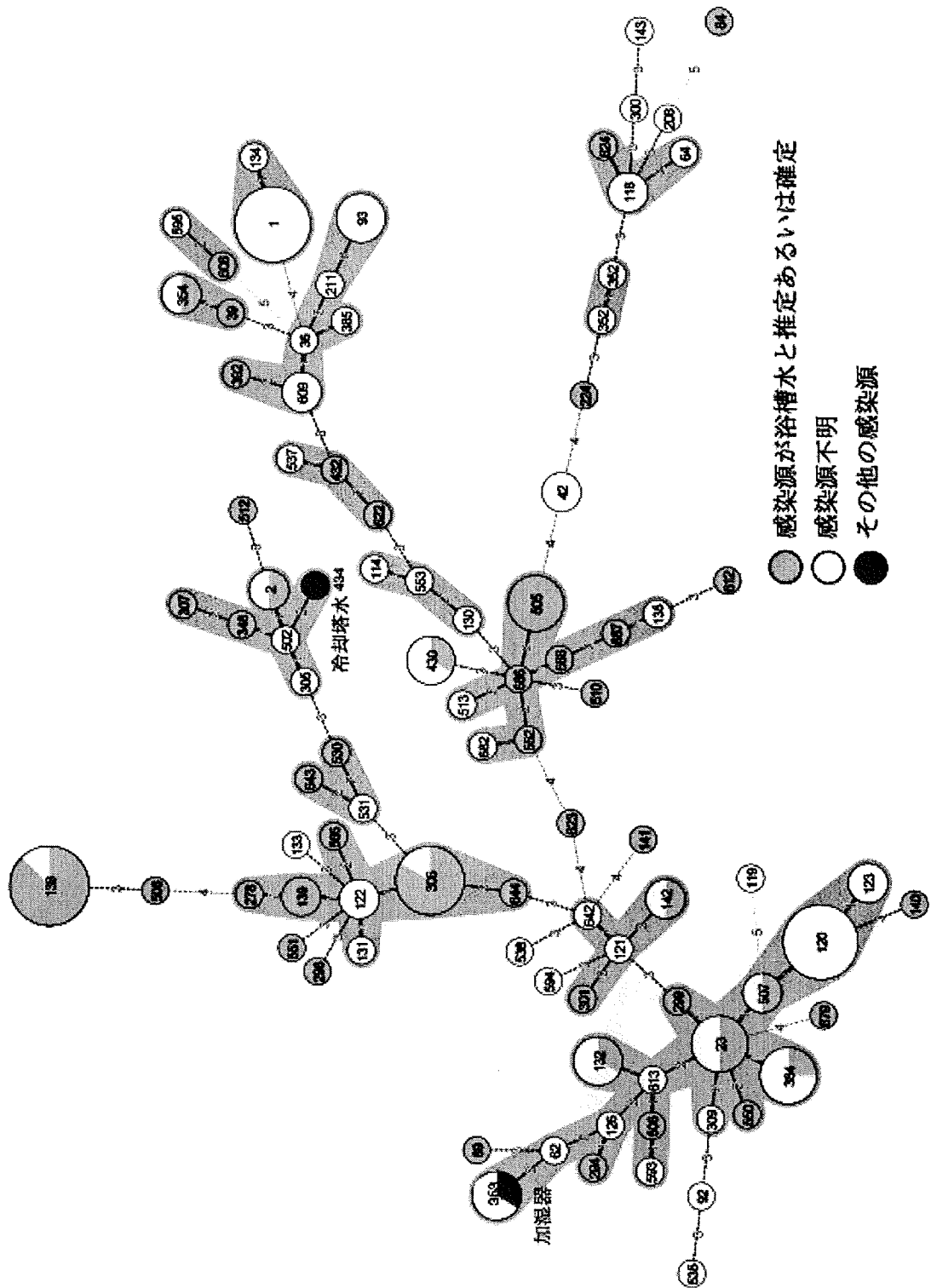


図 8B Minimum Spanning tree 法による *L. pneumophila* 分離株の ST 同士の類縁関係。
 臨床分離株の ST 同士の類縁関係。3 年間で検査した 149 株のうち、*neuA* が増幅されず、
 ST が決定できなかった 8 株を除いた 141 株の結果を示す。

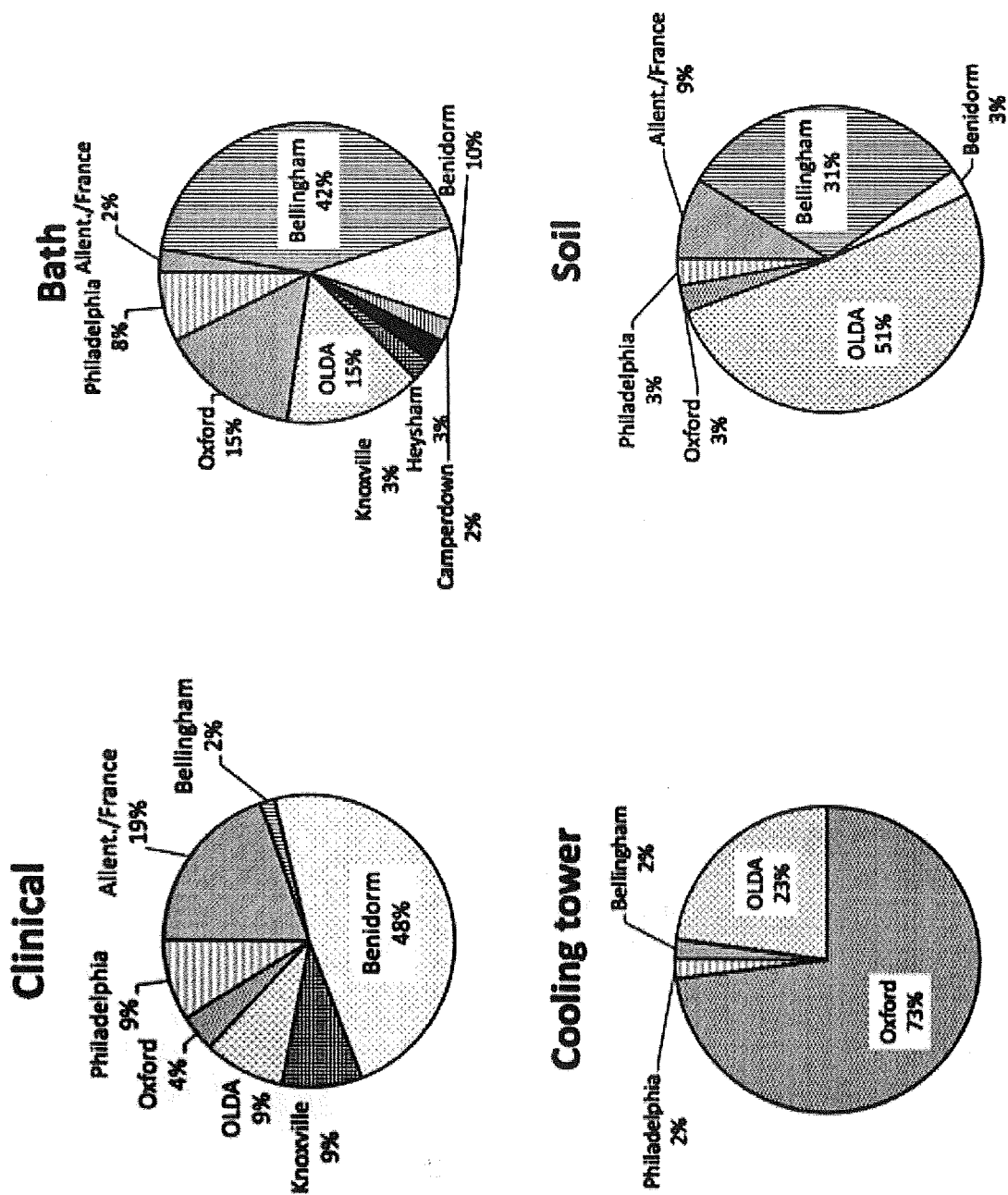


図9 *L. pneumophila* 血清群1の臨床分離株123株および環境分離株（浴槽水分離株40株、冷却塔水分離株48株、土壌分離株35株）におけるモノクローナル抗体型の分布

表4 Lp コロニー直径別斜光法、L-システイン要求性、コロニーPCRの結果

		Lp コロニーの直径				
		0.2mm	0.5mm	1.0mm	1.5mm	2.0mm
培養日数		2～3日	2～3日	3日	3～4日	4日
斜光法	コロニー色	白、灰白	白、灰白	白、灰白	白、灰白	白、灰白
	カットガラス模様	－～±	+	+	+	+
コロニーPCR	LEG 陽性数 (%)	5/9(55.6)	10/10	10/10	10/10	10/10
	Lmip 陽性数 (%)	1/9(11.1)	9/10(90)	9/10(90)	10/10	10/10

羊血液寒天培地は全て発育－、BCYE- α は全て発育＋

(山形県衛生研究所、瀬戸順次)

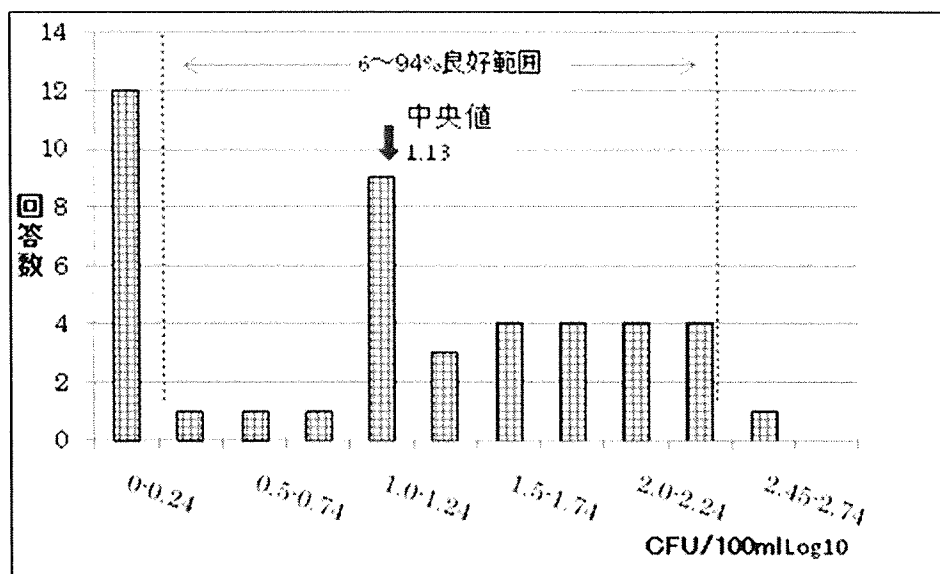


図10 試料1の検出菌数分布

Ⅱ. 分担研究報告書

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）

「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

液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 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 寄生動物部
研究協力者	烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	浅野 由紀子	愛媛県立衛生環境研究所

研究要旨

簡便、迅速で定量性に優れたレジオネラ属菌の生菌検出法を開発する目的で、液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（LC qRT-PCR）を検討した。昨年度開発したレジオネラのリボソーム RNA を鋳型として検出する定量 RT-PCR 法（qRT-PCR）の核酸抽出に先立ち、濃縮試料を液体培地で培養し生菌の rRNA を増幅させ、生菌の rRNA を優先的に検出する方法を試みた。通常の培養法に用いる酸処理検体をレジオネラ液体培地に加えて 1 夜培養すると、rRNA は 100 倍に増加した。培養液の一部を酵素溶解して精製操作なしに希釈するだけの簡便な操作で、鋳型調整を行うことが可能であった。以上より、温泉試料から生菌数の測定が可能な LC qRT-PCR を確立した。本法で得られた定量値は、 $50 \sim 10^5$ CFU/100ml の範囲で培養法と極めて高い相関 ($R^2=0.866$) を示した。培養法に代わる生菌迅速検査法として活用が期待された。

A 研究目的

現在、環境水からのレジオネラ属菌の検出は、濃縮した検水を培地平板上に塗布し、発育した集落数を計測する培養法により行われている。現行法の問題点としては、判定までに 7 日以上を要し、汚染状況の把握に時間がかかることが挙げられる。このため、遺伝子検査を利用した迅速検査法、すなわち 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 法及びリアルタイム PCR 法が開発され、行政対応の判断材料として活用が始まっている。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、煩雑なカラム精製等の前処理が必要であった。

また、迅速検査法のもう一つの問題点は、死菌の検出である。塩素消毒によって管理された入浴施設では、浴槽水中に生菌よりも多くの死菌が存在している。培養によらない遺伝子検査法は、死菌に由来する遺伝子も増幅対象とするため、通常の培養法で陰性となる検体であっても高濃度のレジオネラ属菌遺伝子が検出される場合があり、結果の解釈に注意を要する。

平成 20 年度は、迅速、簡便かつ精度の高い検査法の開発を目指し、標的にリボソーム RNA 遺伝子（rDNA）の転写産物であるリボソーム RNA（rRNA）そのものを利用する定量 RT-PCR 法（qRT-PCR）を検討した¹⁾。rRNA の合成量は細胞あたり数万コピーと見積もられ、ゲノム上に存在

する rDNA のわずか数コピーに比べれば桁違いに多い核酸である^{2,4)}。検討の結果、酵素溶菌処理後の検体を TE 緩衝液で希釈するだけという簡便な操作で（酵素溶菌希釈法）、阻害物質の影響を受けることなく、培養法を凌ぐ感度が得られる qRT-PCR 法を確立した。

今年度は、核酸抽出に先立ち、濃縮試料を液体培地に加えて培養し、生菌の rRNA を増幅することで、生菌の rRNA を優先的に検出する方法の開発を試みた。その結果、通常の培養法に用いる酸処理検体を、レジオネラ液体培地に加えて1夜培養し、培養液の一部を酵素溶解して精製操作なしに希釈するだけの簡便な操作で鑄型調整を行うことにより、温泉試料から生菌数の測定が可能な液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（LC qRT-PCR）を確立したので報告する。

B 研究方法及び材料

1 レジオネラ属菌検査

(1) 平板培養法

レジオネラ症防止指針第 3 版に従い実施した。即ち、試料 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 で懸濁して 100 倍濃縮試料とした。その 100 倍濃縮試料 500 μ l に酸処理液（0.2M HCl-KCl buffer、pH2.2）500 μ l を加えて室温で 5 分間反応後、GVPC 寒天培地（日本ビオメリユー）及び WYO α 寒天培地（栄研化学）に 100 μ l ずつ塗布し、37 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

(2) 液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR（LC qRT-PCR）

平板培養法で培地に塗布したものと同一、100 倍濃縮液の酸処理検体 200 μ l を、MWY 液体培地（自家調整した BCYE α 液体培地にオキシイド MWY 選択サプリメントを添加して作成）900 μ l に加えて 37 $^{\circ}$ C で 18 時間培養後、100 μ l を新しいチューブに分取した。

RNA の抽出は、qRT-PCR の酵素溶菌希釈法に

準じた¹⁾。すなわち、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（キアゲン）2.5 μ l を加え、55 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 990 μ l で希釈後混和したものを逆転写（RT）反応の鑄型とした。

RT 反応には PrimeScript RT reagent Kit（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 $^{\circ}$ C、15 分間逆転写反応を行った。反応後、85 $^{\circ}$ C 5 秒で酵素失活を行った。この RT 反応液に、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 を定量 PCR（qPCR）の鑄型とした。

qPCR は、Cycleave PCR *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。増幅装置は Thermal Cycler Dice Real Time System（タカラバイオ）を用いた。

また、生菌培養の対照として、100 倍濃縮試料 500 μ l を 95 $^{\circ}$ C 5 分間加熱した死菌液を作成し、未加熱の生菌試料と同様に酸処理以降の操作を行った。

LC qRT-PCR 法によるレジオネラ陽性の判定は、加熱殺菌試料の Ct 値（Ct (H)）と未加熱試料の Ct 値（Ct (N)）を比較し、未加熱試料において Ct 値の有意な減少がみられた場合にレジオネラ生菌が存在すると判断した。すなわち、下式により Δ Ct 値を算出し、一定以上の Δ Ct が得られた試料をレジオネラ属菌陽性とした。

$$\Delta Ct = Ct (H) - Ct (N)$$

Ct (H) : 加熱殺菌試料（Heat-killed）の 18hr 培養後の Ct 値

Ct (N) : 未加熱試料（Nontreated）の 18hr 培養後の Ct 値

LC qRT-PCR 法による定量値の算出は、Ct (N) 及び Ct (H) をそれぞれ生菌培養液の検量線に代

入し、得られた菌数（真数）の差を生菌の定量値とした。

2 標準菌液

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株を BCYE α 寒天培地で 30°C 4 日間培養後、小コロニーを滅菌蒸留水に懸濁して McFarland 2 程度に調整し、10 倍希釈系列を作製した。分取した希釈液に加熱処理（50°C、5 分間）あるいは酸処理を施し、培養法により生菌数を測定するとともに、未処理液及び加熱処理液は 100 μ l、酸処理液は 200 μ l を液体培地 900 μ l に添加し、LC qRT-PCR を行った。核酸抽出が直ちに行えない場合は、一夜培養後の液体培地 100 μ l を -30°C にて保存した。

3 LC qRT-PCR 法における rRNA の増幅

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株を滅菌蒸留水で $10^3 \sim 10^4$ CFU/100 μ l に調整し、生菌液及び加熱死菌液（95°C、5 分）を作成した。100 μ l を滅菌蒸留水、BCYE α 液体培地、BYE α 液体培地（BCYE α 液体培地から活性炭を除いた培地）にそれぞれ添加し、ボルテックス後 37°C の水浴で静置培養を行った。BCYE α 液体培地については、菌液を培地に添加した 2ml チューブを 37°C ふ卵器中で回転培養し、静置培養と比較した。一定時間経過後、再度ボルテックスを行い、上清 100 μ l を新たなチューブに分取し、qRT-PCR 法にて rRNA 量を定量した。

4 実試料を用いた評価

平成 21 年 11 月～平成 22 年 1 月に、温泉を利用した循環式浴槽施設 23 施設から 83 件（浴槽水 49 件、原水 22 件、逆洗水 12 件）の試料を採取し、レジオネラ属菌の培養及び LC qRT-PCR を行った。

5 DNA 量及び RNA 量の経時変化

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株を滅菌蒸留水 500ml に懸濁し、 6.5×10^4 CFU/100 μ l の生菌液を調整した。スターラーで攪拌しながら 42°C で

保温し、一定時間後に菌液 100 μ l 中の菌数を測定すると共に、核酸検査用に 100 μ l を分取して速やかに -30°C に保存した。

C 結果

1 液体培地中での rRNA の増幅

液体培地におけるレジオネラ属菌の培養条件を検討した。滅菌蒸留水では、生菌及び加熱死菌共に RNA 量に変化はみられなかった（図 1(b)）。BYE α では、生菌、死菌共に培養直後に RNA 量が一旦減少し、生菌が培養開始時の RNA 量まで回復するのに 7 時間を要した。18 時間後では 1 log の増加であった（図 1(a)）。一方、BCYE α では培養初期の減少がみられず、2 時間後から指数増殖が始まり、18 時間後に 2 log の増加が認められた（図 2）。BCYE α の回転培養と静置培養を比較すると、どちらも良好な増殖がみられたが、回転培養の方がやや増殖が速い一方、静置培養の方が高い直線性 ($R^2=0.999$) を示した。

2 LC qRT-PCR の検量線

MWY 液体培地を用い、生菌及び加熱死菌について、前処理方法（未処理、酸処理及び熱処理）の影響を検討した（図 3）。37°C、18 時間培養における各条件の検量線は以下のとおりであった。

(1) 生菌

①BCYE α (未処理) $y = -3.42x + 38.99$ ($R^2=0.998$)

②MWY (未処理) $y = -3.11x + 38.99$ ($R^2=0.991$)

③MWY (酸処理) $y = -2.98x + 39.14$ ($R^2=0.998$)

④MWY (熱処理) $y = -2.78x + 39.46$ ($R^2=0.973$)

(2) 加熱死菌

①MWY (未処理) $y = -2.56x + 42.60$ ($R^2=0.985$)

②MWY (酸処理) $y = -2.83x + 44.70$ ($R^2=0.992$)

③MWY (熱処理) $y = -2.56x + 42.48$ ($R^2=0.988$)

生菌では、BCYE α (未処理)、MWY (未処理)、MWY (酸処理) のいずれの条件でも、培養前の菌数が 1 or $2 \sim 10^5$ CFU/100 μ l の範囲で $R^2=0.991$ 以上の良好な直線を示したが、MWY (熱処理) は

他法と比較して Ct 値が高く、直線性も劣った ($R^2=0.973$)。一方、加熱死菌ではいずれも $10^2\sim 10^7$ CFU/100 μ l の範囲で $R^2=0.985$ 以上の良好な直線を示したものの、MWY (未処理) 及び MWY (熱処理) では低濃度側で Ct 値が低くなる傾向がみられ、生菌とほぼ並行な検量線が得られたのは MWY (酸処理) のみであった (図 3 (b))。以上の結果から、液体培地による培養の前処理として、MWY (酸処理) を使用することとした。

3 LC qRT-PCR のカットオフ値

温泉試料を、培養法におけるレジオネラ陽性検体と陰性検体に分け、培養 18 時間後の Ct 値の減少幅 (Δ Ct) を比較した (図 4)。

培養法でレジオネラ属菌が陰性であった 55 件の Δ Ct 値は、 0.22 ± 1.73 (平均 \pm 標準偏差) で分布し、1.5 未満が 80.0 % (44/55) を占めた (図 4(a)○)。しかし、培養法で 10 CFU/100ml 以上のレジオネラが検出された 28 件の Δ Ct 値は 1.51 ± 2.35 (平均 \pm 標準偏差) で、1.5 未満が 46.4 % (13/28)、1.5 以上が 53.6 % (15/28) と両群に頻度の差は認められなかった (図 4(a)●)。

一方、培養法で 50 CFU/100ml 以上が検出されたか否かで Δ Ct 値の分布を比較したところ、培養法 50 CFU/100ml 未満であった 68 件の Δ Ct 値は 0.20 ± 1.72 (平均 \pm 標準偏差) で、1.5 未満が 80.9 % (55/68) を占めた (図 4(b)○)。それに対し、培養法で 50 CFU/100ml 以上検出された 15 件の Δ Ct 値は 2.71 ± 2.23 で、1.5 以上が 86.7 % (13/15) を占めた。

LC qRT-PCR 法における Δ Ct のカットオフ値を決定するため、 Δ Ct 値-1.5 \sim 4.5 の範囲で ROC 曲線 (receiver operating characteristic curve : 受信者操作特性曲線) を作成した。培養法で 10 CFU/100ml 以上を陽性とした場合の ROC 曲線は、 $x=y$ の直線に近いプロットを示し、感度、特異度共に低値を示した (図 5 Δ)。一方、培養法で 50 CFU/100ml を陽性とした場合の ROC 曲線は、 Δ Ct=1.5 の時に最も感度 1、特異度 1 に近づいた (図 5 ●)。

以上の結果から、現在の濃縮・抽出方法を用いた場合のカットオフ値は Δ Ct ≥ 1.5 が適当と判断した。この基準を適用すると、培養法 10 CFU/100ml を検出する際の感度は 53.6 %、特異度は 80.0 %であったが (表 1(a))、50 CFU/100ml を検出する際の感度は 86.7 %、特異度は 80.9 %に上昇し (表 1(b))、LC qRT-PCR 法の検出限界は 50 CFU/100ml が妥当と考えられた。

4 温泉水を用いた培養法と LC qRT-PCR の比較

LC qRT-PCR 法で Δ Ct ≥ 1.5 をカットオフ値とし、培養法との相関を検討した (図 6)。培養法陽性かつ LC qRT-PCR 陰性の検体が 13 件、培養法陰性かつ LC qRT-PCR 陽性の検体が 11 件あったが、培養法と LC qRT-PCR との間には有意な相関が認められた (図 6 (a)、 $R^2=0.487$ 、 $p<0.01$)。なお、培養法、LC qRT-PCR 法ともに 50 CFU/100ml 以上の定量値を示した検体に限定すると、両検査法の間さらに高い相関が認められた (図 6(c)、 $R^2=0.866$ 、 $p<0.01$)。

培養法陽性にもかかわらず LC qRT-PCR で陰性と判定された 13 件の内訳を表 2 に示した。No.1 は培養法で *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が 750 CFU/100ml 分離されたが、LC qRT-PCR では全く増幅が認められなかった。分離株の 16S rRNA 遺伝子の一部について塩基配列を決定し、Blast でデータベースと比較したところ、登録されている「*Legionella* sp.」と 100%一致し、種名は特定できなかった。No.2 は培養法で *L. pneumophila* SG3, 4 が 110 CFU/100ml 検出されたが、 Δ Ct は 0.47 とカットオフ値 (1.5) に満たなかったため LC qRT-PCR で陰性と判定された。この検体の Ct(N)は 35.81 で、そのまま検量線から菌数に換算すると 100 CFU/100ml に相当する。Ct(H)が 36.28 を示すことから、検体に死菌が大量に含まれていたため、生菌による Ct 値の低下が検出できなかったものと考えられた。No.3 においても、No.2 と同様の傾向がみられた。なお、No.4 \sim 13 の 10 検体はいずれも菌濃度が 40 CFU/100ml 以下であり、

培養法及び LC qRT-PCR 法の定量限界の可能性が考えられた。

一方、平板培養法陰性にもかかわらず、LC qRT-PCR で陽性と判定された 11 件の内訳を表 3 に示した。No.1 及び No.2 は、 Δ Ct がそれぞれ 4.08 及び 3.61 と高く、LC qRT-PCR でそれぞれ 1200 及び 160 CFU/100ml の定量値が検出されたが、No.5~11 は 40 CFU/100ml 以下の低値であった。

5 DNA 量及び RNA 量の経時変化

浴槽水中のレジオネラ属菌の消長を推察するため、 6.5×10^4 CFU/100 μ l 滅菌水のレジオネラ属菌液を調整し、スターラーで攪拌しながら 42°C で保温した (図 7)。培養法による菌数は、5 日後に 1/10、8 日後に 1/100 に減少し、11 日目に概ね不検出となった。RNA 量は、14 日目で 1/10、30 日目で 1/100 に減少したが、DNA 量はほとんど低下せず、30 日目でも 3.7×10^4 CFU/100 μ l 相当の DNA が検出された。

D 考 察

温泉入浴施設を対象としたレジオネラ属菌の迅速、簡便かつ精度の高い検査法を開発するため、生菌を特異的に検出する液体培養 (Liquid culture) 定量 RT-PCR (LC qRT-PCR) の適用を検討した。

平成 20 年度の成果として、rRNA の鋳型量の多さに着目し、酵素溶菌処理後の RNA 溶解液を希釈するだけという簡便な操作で (酵素溶菌希釈法)、阻害物質の影響を受けることなく培養法を凌ぐ検出感度を保つ qRT-PCR 法を確立した。rRNA は DNA より分解が進みやすいものの、比較的長期にわたって検出されることを今年度に改めて確認した (図 7)。qRT-PCR 法を、塩素濃度を維持することで安全を確保しながら、配管やろ過器等の汚染蓄積状況を監視するリスク評価法と位置付けることで、入浴施設の衛生管理の指標に十分活用可能であると考えられた。

一方、生菌のみを検出する標準法すなわち寒天平板による培養法が、結果の判定までに 7 日以上

を要することから、施設管理者や施設を指導する行政側から、生菌を特異的に検出する迅速検査法が切望されている。そこで、平成 21 年度は、qRT-PCR に先立ち、濃縮試料を液体培地中で 1 夜培養するステップを追加した、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC qRT-PCR) を検討した。今年度の検討では、平板に塗布する濃縮酸処理検体と同じ分量の試料を用いて評価することにより、加熱殺菌試料と比較した Ct 値の低下がそのまま検水 100ml 中の生菌の存在を証明できるよう配慮した。しかし、結果的に検出限界付近の測定値がばらつき、今回の操作法で LC qRT-PCR と培養法の相関が維持できるのは 50 CFU/100ml と考えられた。少なくとも、50 CFU/100ml 以上の濃度であれば、昨年度検討を行った qPCR 及び qRT-PCR を凌ぐ、培養法との高い相関が得られ (図 6 (c)、 $R^2=0.866$)、LC qRT-PCR が培養法に代わる生菌迅速検査法として十分適用できる能力を持つことを明らかにした。

検出限界付近の定量値を安定させる対策としては、qPCR 及び qRT-PCR と同様に、100 倍濃縮試料 1ml を 100 μ l に再濃縮する操作を追加して LC qRT-PCR を実施すれば、LC qRT-PCR の感度を向上させることが可能と考えられる。あるいは、何らかの方法で加熱殺菌試料でのバックグラウンド値を低減させれば、さらに低濃度まで検査の信頼性を増すことができると考えられる。今後、生菌検出のみならず加熱殺菌試料から得た死菌数を管理指標に活用できる可能性も含め、多様な温泉を対象に件数を増やして解析する必要がある。

E 結 論

温泉入浴施設を対象としたレジオネラ属菌の迅速、簡便かつ精度の高い生菌検出法を開発した。通常の培養法に用いる酸処理検体を、レジオネラ液体培地に加えて 1 夜培養し、培養液の一部を酵素溶解して精製操作なしに希釈するだけの簡便な操作で鋳型調整を行うことにより、温泉試料から生菌数の測定が可能な液体培養 (Liquid Culture)

定量 RT-PCR 法 (LC qRT-PCR) を確立した。本法で得られた定量値は、 $50 \sim 10^5$ CFU/100ml の範囲で培養法と極めて高い相関が得られ ($R^2=0.866$)、培養法に代わる生菌迅速検査法として十分適用できる可能性を示した。

なし

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、平成 20 年度総括・分担研究報告書
- 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, Zaho B, Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georghiou 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 accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science.* 2004 Sep 24; 305(5692): 1966-8.

F 論文発表

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

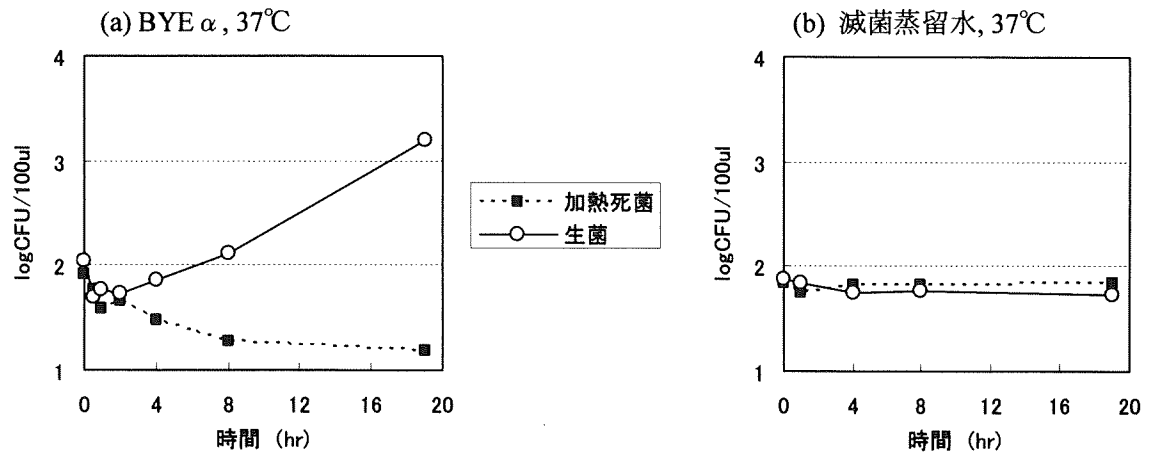


図1 LC qRT-PCR 法における rRNA の増幅 (BYE α 液体培地)

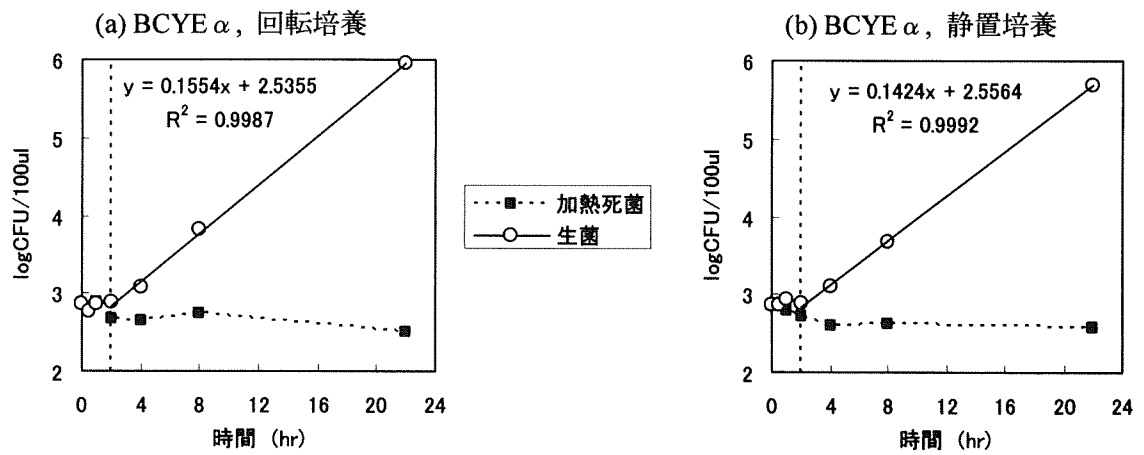


図2 LC qRT-PCR 法における rRNA の増幅 (BCYE α 液体培地)

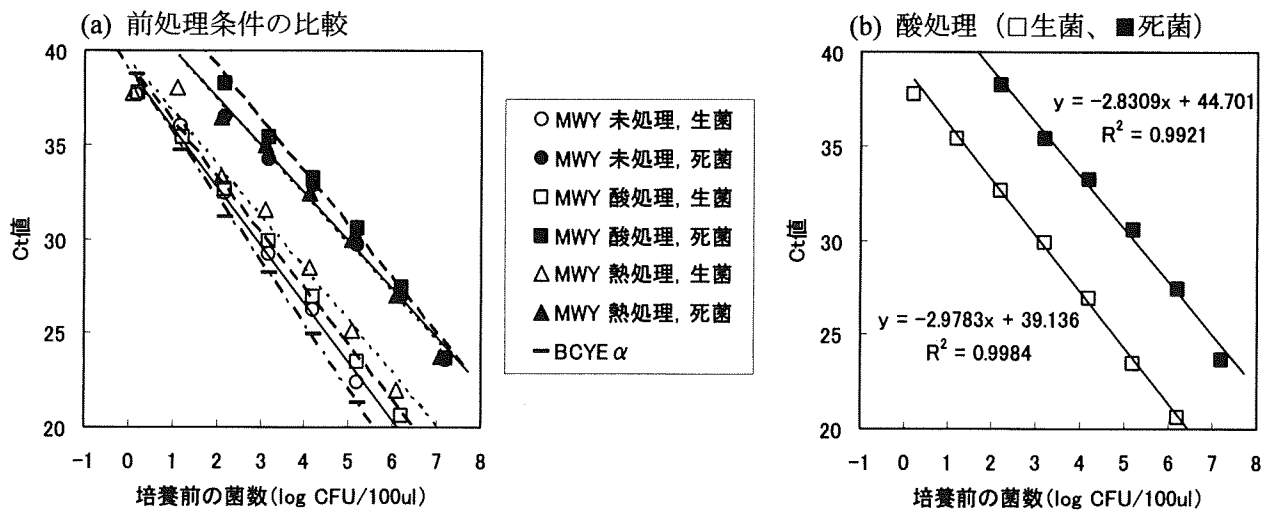
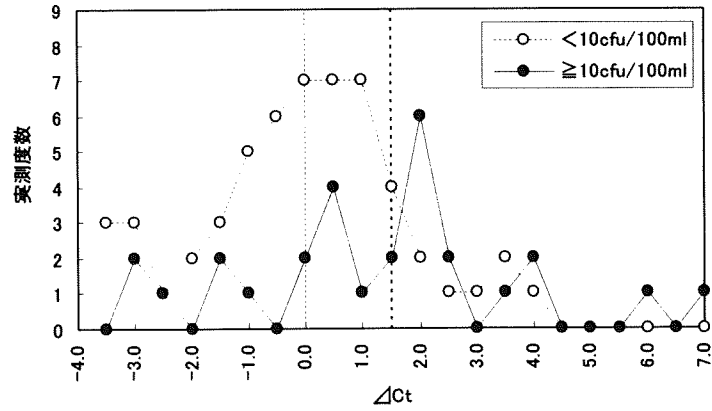


図3 LC qRT-PCR の検量線

(a) 培養法 10 CFU/100ml を基準とした場合



(b) 培養法 50 CFU/100ml を基準とした場合

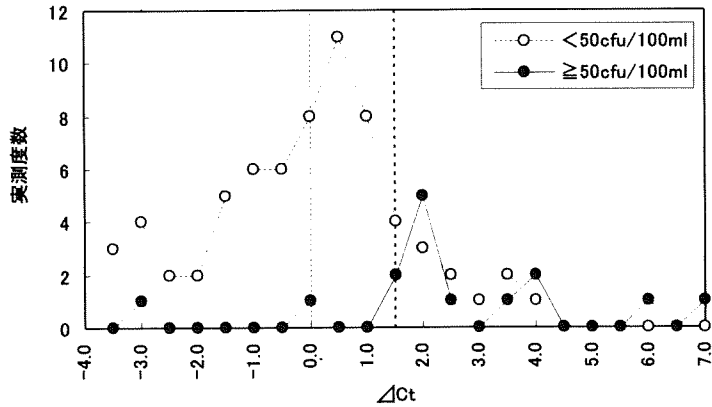


図4 温泉試料における ΔCt 値の度数分布

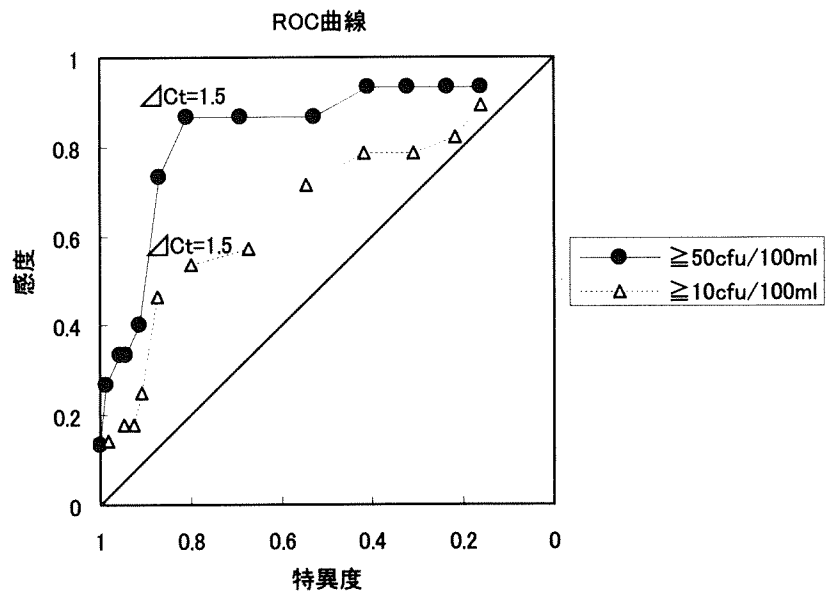


図5 温泉試料を用いた ΔCt 値のROC曲線

表1 培養法と LC qRT-PCR 法の比較

(a) 培養法 10 CFU/100ml を基準とした場合

		培養法		計
		≥10 CFU/100ml	<10 CFU/100ml	
LC qRT-PCR	$\Delta Ct \geq 1.5$	15	11	26
	$\Delta Ct < 1.5$	13	44	57
計		28	55	83

感度: 53.6% Fisher exact test p=0.0027
 特異度: 80.0%

(b) 培養法 50 CFU/100ml を基準とした場合

		培養法		計
		≥50 CFU/100ml	<50 CFU/100ml	
LC qRT-PCR	$\Delta Ct \geq 1.5$	13	13	26
	$\Delta Ct < 1.5$	2	55	57
計		15	68	83

感度: 86.7% Fisher exact test p=0.000001
 特異度: 80.9%

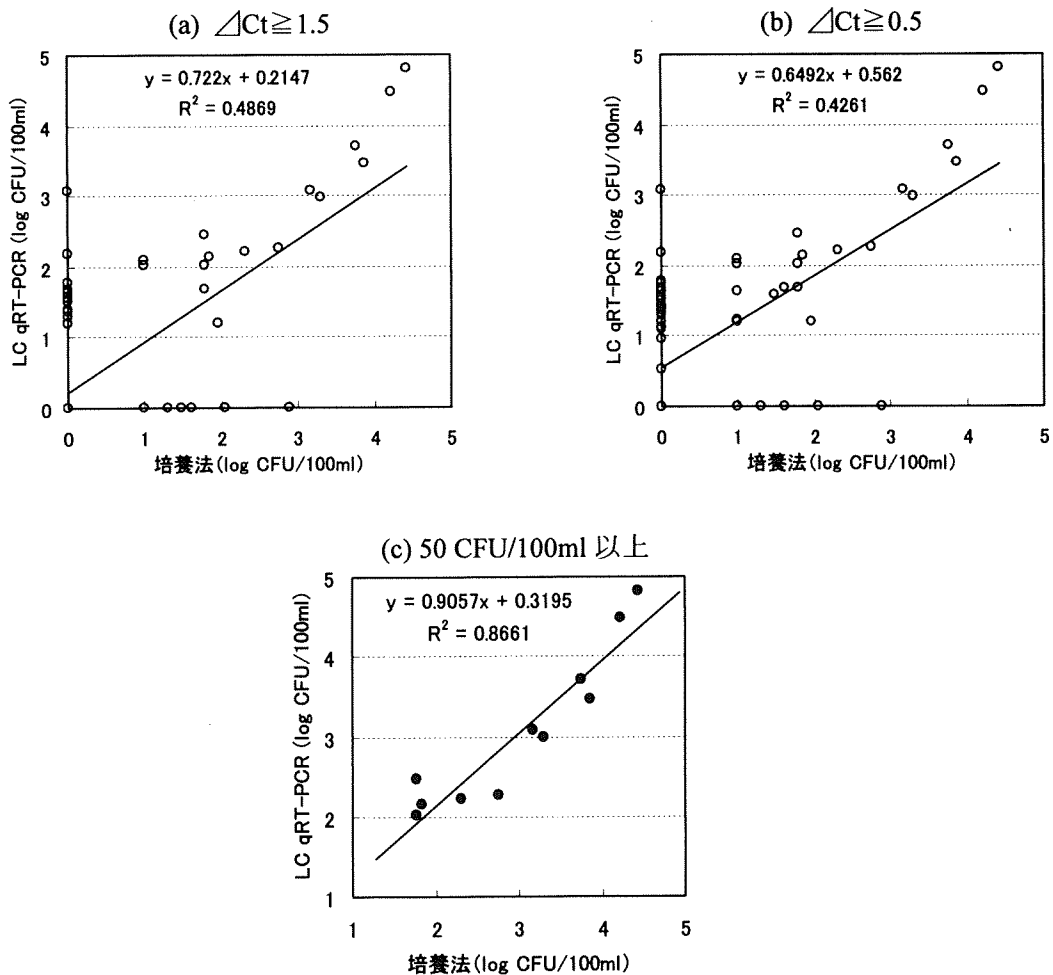


図6 培養法と LC qRT-PCR 法の相関

表2 培養法陽性、LC qRT-PCR 法陰性検体の内訳

No.	平板培養法		LC qRT-PCR			種別	遊離残留塩素 (mg/L)
	定量値 (CFU/100ml)	菌種	Ct(N)	Ct(H)	Δ Ct (H-N)		
1	750	Legionella sp.	—	37.40	—	浴槽水	0.2
2	110	L. pneumophila SG 3,4	35.81	36.28	0.47	浴槽水	0.2
3	40	L. pneumophila SG 3,4,8,UT	35.89	36.77	0.88	浴槽水	0.3
4	40	L. pneumophila SG 1,6	37.91	36.81	-1.10	浴槽水	0.1
5	30	L. pneumophila SG 5,6,UT	36.20	37.08	0.88	浴槽水	0.3
6	20	L. pneumophila SG 1,6	39.02	36.64	-2.38	浴槽水	1.0
7	20	L. pneumophila SG 3	37.18	37.25	0.07	逆洗水	不明
8	20	L. pneumophila SG UT	37.46	36.55	-0.91	浴槽水	1.0
9	10	L. pneumophila SG 8	—	37.13	—	浴槽水	0.6
10	10	L. pneumophila SG 1	37.25	36.23	-1.02	浴槽水	1.0
11	10	L. pneumophila SG 6	37.14	37.90	0.76	浴槽水	0.6
12	10	L. pneumophila SG 1	36.43	37.80	1.37	浴槽水	0.4
13	10	L. pneumophila SG 6	37.17	37.92	0.75	浴槽水	2.0

表3 培養法陰性、LC qRT-PCR 法陽性検体の内訳

No.	LC qRT-PCR				種別	遊離残留塩素 (mg/L)
	定量値 (CFU/100ml)	Ct値 (N)	Ct値 (H)	Δ Ct (H-N)		
1	1200	32.69	36.77	4.08	浴槽水	0.6
2	160	35.24	38.85	3.61	浴槽水	0.4
3	60	36.43	—	—	浴槽水	0.4
4	50	36.48	38.37	1.89	原水	0.0
5	40	36.80	—	—	原水	0.0
6	40	36.82	38.60	1.78	浴槽水	0.4
7	30	36.95	38.82	1.87	浴槽水	0.3
8	20	37.53	39.23	1.70	原水	0.0
9	20	37.93	—	—	浴槽水	0.3
10	20	37.45	—	—	原水	0.0
11	20	37.51	—	—	原水	2.0

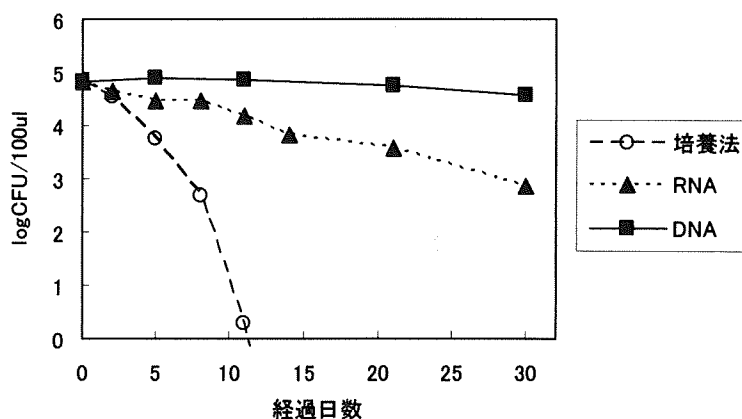


図7 生菌の推移 (42°C、滅菌蒸留水)

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

リアルタイム PCR によるレジオネラ生菌のみを迅速検出する方法における
ethidium monoazide (EMA) と propidium monoazide (PMA) の効果の比較研究

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 田栗利紹 長崎県環境保健研究センター
研究分担者 杉山寛治 静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨: Ethidium monoazide (EMA) と propidium monoazide (PMA) は特異的に死菌のみの細胞膜を透過し、その染色体 DNA を切断することにより、PCR の増幅を抑制できる。我々はこの特性を利用し、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することを昨年度に報告した。本年度は、PMA 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、環境中のレジオネラ生菌のみを迅速検出における EMA と PMA の効果を比較した。その結果、PMA 処理とリアルタイム PCR のコンビネーション使用も EMA と同様に、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を証明した。しかし、レジオネラの死菌由来 DNA の PCR 増幅を抑制するために必要とする PMA の量は EMA の約 4 倍であった。また、PMA は高価であるため、人工的水利用設備のレジオネラのサーベイランス調査には EMA がもっとも実用的であることを示唆された。

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 および PMA 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 に結合する^{1,2)}。結合された染色体 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

検出する方法を報告した³⁾。今年度は、PMA 処理とリアルタイム PCR の使用による人工的水利用設備レジオネラ生菌のみの定量解析を試し、その結果を EMA 処理とリアルタイム PCR による解析結果と比較し、環境中のレジオネラ生菌のみを迅速検出における EMA と PMA の適応性を明らかにした。

B. 研究方法

Legionella pneumophila 80-045 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、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、0.2 M KCl-HCl (pH 2.2) で処理したサンプル 0.1 ml を BCYE または GVPG 寒天培地に塗布し、37°C で培養した。また、濃縮サンプルに EMA または PMA 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. モックサンプルのレジオネラ生菌の定量検出における EMA と PMA の効果

50、100、200 または 400 μ M の EMA と PMA を用い、モックサンプルを処理し、リ

アルタイム PCR を行った。その結果を図 1 に示した。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、Plating)。*L. pneumophila* 生菌を含むサンプルのリアルタイム 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、Untreated)。また、塩素処理を行った *L. pneumophila* 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かった (図 1、Untreated)。しかし、同一のサンプルを EMA (50-200 μ M) 処理した後に、リアルタイム PCR により推測され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。400 μ M の EMA で *L. pneumophila* を処理した場合、リアルタイム PCR により推測した生菌の菌数は実際に懸濁した生菌より少なくなった。一部分の生菌の染色体 DNA は高濃度の EMA により PCR の増幅が抑制されたことを示唆された。一方、PMA 処理を行った場合も、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より少なくなったことが証明された。しかし、懸濁した死菌の数の 10^{-4} - 10^{-5} となるために、200 μ M PMA が必要であり、EMA の 4 倍であった。

2. モデル浴槽サンプルのレジオネラ生菌の定量検出における EMA と PMA の効果

EMA または PMA 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、モデル浴槽由来の 10 サンプル

(表 1) を用いて、解析を行った。酸処理を行った 1 ml の濃縮液を 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 12.5、25、50 μ M の EMA または 50、100、200 μ M の PMA で前処理を行った後、染色体 DNA の精製を行った。また、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 10 サンプルのうち 6 サンプル (No. 1-6) は GVPC 培地で培養した結果では 10 CFU/100ml 以上のレジオネラが検出された。残り 4 サンプル (No. 7-10) は培養ではレジオネラの検出が見られなかった。リアルタイム PCR によるレジオネラの検出では、6 サンプル (No. 1-4、9-10) は 12.5 μ M の EMA または 50 μ M の PMA 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。高濃度の EMA や PMA 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 または PMA が PCR による死菌 DNA の増幅を抑制できたと考えられた。一方、残りのサンプル (No. 5-8) では、50 μ M の EMA または 200 μ M の PMA で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。低濃度の EMA や PMA 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 と PMA 処理を行う必要があると考えられた。

モデル浴槽サンプルを解析した結果では、死菌の染色体 DNA の PCR 増幅を抑制するには、PMA の使用量は EMA の 4 倍であることが明らかにした。さらに、PMA は EMA に比べ高価であったため、環境水中からレジオネラ生菌のみを検出するには、EMA は優れることを示唆された。

D. 結論

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 または PMA 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。PMA に比べて、EMA は環境中レジオネラ生菌のみの検出に優れることを明らかにした。また、水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 や PMA 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 または PMA 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 または PMA で十分である。