

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) 常彬、前川純子、杉山寛治、田栗利紹、倉文明、: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「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成20年度 総括・分担研究報告書 pp.51-57.
- 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, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *JJID*. In press.

G. 知的所有権の取得

なし。

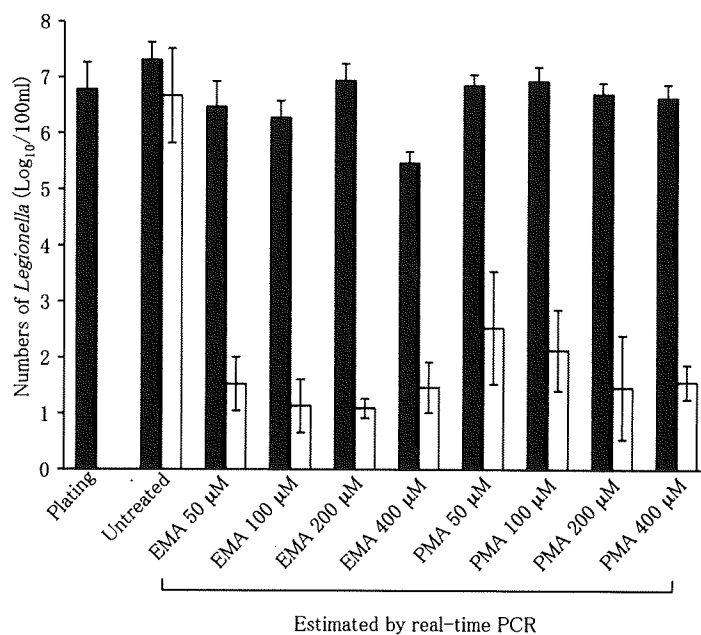


図1. *L. pneumoniae* のモックサンプルにおける生菌のみの定量検出
 ■: 生菌 □: 塩素処理した死菌

表 1. 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

Sample No. ^{a)}	The number of <i>Legionella</i> by plating (log ₁₀ CFU/100ml) ^{b)}	The number of <i>Legionella</i> estimated by real-time PCR target 16S rRNA gene (log ₁₀ CFU/100ml) ^{c)}						
		Without treatment	Treatment with EMA at			Treatment with PMA at		
			12.5 μM	25 μM	50 μM	50 μM	100 μM	200 μM
1	3.6	3.3	3.3	2.6	2.2	3.5	3.5	3.3
2	3.3	3.1	3.0	2.8	2.6	2.8	3.0	3.1
3	4.7	4.5	3.8	3.2	2.8	4.3	3.8	2.9
4	4.6	4.4	4.3	3.7	2.9	4.3	3.9	3.2
5	2.4	4.4	2.4	2.5	2.1	2.7	2.5	2.6
6	1.3	4.1	3.7	2.5	1.6	3.2	2.5	2.9
7	<1	3.7	2.6	—	—	2.6	2.3	1.3
8	<1	3.2	2.0	2.1	1.1	2.8	1.7	1.4
9	<1	2.1	—	—	—	—	—	—
10	<1	1.9	—	—	—	—	—	—

^{a)}: Samples of No.1, 3, 5, 7, and 9 were obtained from the bathtub, No. 2, 4, 6, 8, and 10 were from the filter tank of a model spa.

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

^{c)}: (—), Not detected.

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・簡便な検査法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 21 年度分担研究報告

EMA-PCR による浴槽水中のレジオネラ生菌の検出の検討

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

研究協力者 西尾智裕 静岡県環境衛生科学研究所

研究協力者 八木美弥 静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨：浴槽水中のレジオネラ属菌の迅速検出法として浴槽水を濃縮した試料から DNA を抽出し、リアルタイム PCR(qPCR)によりレジオネラ属菌の DNA を定量的に検出することができるが、生菌のみではなく死菌の DNA も検出している可能性が考えられる。そこで、生菌と死菌の DNA を区別して検出する方法として検体を ethidium monoazide (EMA) で処理する方法と qPCR を組み合わせた方法を検討した。

標準菌株を用いて作成した菌液 (1.4×10^5 CFU) の加熱死菌と生菌について EMA 処理を行い、通常の PCR を実施した結果、EMA 濃度 10、20、40mg/mL で生菌の DNA は検出されたが、加熱死菌の DNA は検出されなかった。

標準菌液を用いたレジオネラ属菌の 16S rRNA を検出する qPCR では直線性の検量線が得られ、定量的な検出が可能であった。

実検体 64 検体中 qPCR で 19 検体（菌分離陽性 15 検体と菌分離陰性 4 検体）から DNA が検出され、これらの検体のうち EMA 処理で DNA 量が減少した検体には死菌 DNA が存在していたことが推測された。

実験浴槽の試料を用いた実験では、菌分離と相関する結果が得られ、EMA 処理と qPCR を組み合わせた方法は浴槽水中のレジオネラ属菌の生菌と死菌の状況をよく反映していた。

目的

浴槽水中のレジオネラ属菌の迅速検出法として浴槽水を濃縮した試料から DNA を抽出し、市販の検出キット (5S rRNA を検出) を用いた qPCR によりレジオネラ属菌の DNA を定量的に検出することができる。しかし、この方法では生菌のみではなく死菌の DNA も検出している可能性が考えられる。そこで、生菌と死菌の DNA を区別して検出方法として、検体を EMA で処理する方法を検討した。

方法

1. 通常の PCR での EMA 処理効果の確認
標準菌株 (NIIB0058) を BCYE- α 培地で 37°C、2 日間培養後、再度 BCYE- α 培地で 37°C、1 日培養した菌を生理食塩水 5mL に懸濁して菌液 (原液) を作成した。これを希釈し、各希釈について菌数を測定し供試菌液を作成した。菌液を 1.5mL の 8 本のマイクロチューブに 500 μ L 分注し、4 本はヒートブロックで 95°C、2 分間加熱処理した。

生菌、死菌について、最終濃度 (0、10、20、40 μ g/mL) の EMA を添加し、混和後、水中、暗所で 10 分間反応させた後、氷上で 250w の電球 4 個を 5 分間照射した。これを 13,000rpm、4°C、5 分で遠心し、上清を除去し DNA 試料として -20°C で保管した。DNA 試料から Fast Pure DNA Kit (TAKARA) を用いて DNA を 100 μ L 抽出した。PCR 反応チューブ中の DNA 量は 1.4×10^5 CFU に相当する。PCR はレジオネラ属菌の 16SrRNA を検出するプライマー (LEG448E、LEG854B) を用いて、PCR (95°C、5 分、[95°C、30 秒、62°C、30 秒、

74°C、30 秒] の反応を 25 サイクル、74°C、5 分) を行い、電気泳動で 430bp の DNA 断片の確認を行った。

2. qPCR による DNA の検出と検量線の作成

qPCR は、Chang ら (Appl. Environ. Microbiol. 75:147-153) の報告に従い、レジオネラ属菌の 16SrRNA 遺伝子を検出するプライマー (LEG247F、LEG880)、プローブ (P1) を用い、95°C、30 秒、[95°C、10 秒、63.5°C、1 分] 40 サイクルで、Premix Ex Taq (TAKARA) を用い、テンプレート DNA は 5 μ L で、DNA の増幅反応と検出は Dice (TAKARA) を用いて行った。

qPCR の検量線の作成は、標準菌株 (NIIB 80-045) を 35°C、3 日間培養した菌を用いて、PBS で菌液の希釈系列を作成し、菌数を測定した。各希釈菌液 1mL から Fast Pure DNA Kit (TAKARA) を用いて DNA を 100 μ L 抽出し、50 μ L ずつ小分けして -20°C で保管した。検量線は $1 \sim 10^7$ CFU の DNA 5 μ L を用いて qPCR を行い作成した。

3. 実検体の EMA 処理と qPCR

平成 21 年 6 月～11 月に県内の営業施設で採取された浴槽水 64 検体について、検体 500mL をろ過法で濃縮し 5mL の蒸留水に回収した。5mL のうち、一部を加熱処理 (50°C、20 分間) し、GVPC 培地で菌分離を行った。また、2mL を 2 本マイクロチューブに採取し、DNA 検査用の試料とし、1 本は 13,000rpm、4°C、5 分で遠心し、上清を除去し対照の DNA 試料とした。1 本は EMA 処理を行った後、同様に遠心処理後、

-20°Cで保管し、qPCRを行った。

EMA処理の濃度は、検体の残留塩素濃度が2.0mg/L以上を20 μ g/mL、2.0 mg/L以下を5 μ g/mLで行った。

4. 実験浴槽（モノクロラミンの消毒確認試験）の浴槽水を用いた qPCR

平成21年8月～9月、11月～12月に実験浴槽を用いて、最初に浴槽および循環の配管を洗浄した後、モノクロラミンを3mg/Lになるように調整して毎日数人ずつ入浴した。実験1はモノクロラミン消毒開始4日目に浴槽水（CB3）、ろ過器内水（CF3）を18日目（CB11、CF11）まで9回採取し、18日目に消毒を中止した。その後、44日後（CB12、CF12）に採取した。また、実験2ではモノクロラミン消毒開始5日目に浴槽水（CB3）、ろ過器内水（CF3）を18日目（CB8、CF8）まで6回採取し、18日目に消毒を中止した。その後、14日後（CB9、CF9）に採取し、実検体と同様の方法で菌分離とqPCRを行った。

結果および考察

1. 通常のPCRでのEMA処理効果の確認
生菌と加熱死菌（ 1.5×10^5 CFU）についてEMA処理したものと未処理の菌液でqPCRを行った結果、生菌の試料は全てのEMA濃度でレジオネラに特異的なDNAが検出された。一方、加熱死菌ではEMA濃度0 μ g/mLではDNAが検出されたが、10～40 μ g/mLではDNAは検出されなかった。この結果から、EMA処理によって生菌と死菌の鑑別PCRが可能であることが確認された（図1）。

2. qPCRによるDNAの検出および検量線の作成

標準菌株（生菌）の希釈系列から抽出したDNAを用いてqPCRを行った結果、直線性の高い検量線が得られ、qPCRによってレジオネラ属菌の定量的検出が可能であると考えられた（図2）。

3. 実検体のEMA処理とqPCR

営業施設の浴槽水64検体について、EMA処理と対照のDNAを抽出し、qPCRを行った結果、菌が分離された25検体のうち、15検体（10～4000CFU/100mL）の対照でDNAが検出され、これらの検体のうちEMA処理でDNA量が減少した検体には死菌DNAが存在していたことが推測された。また、菌分離されなかった検体の多くでDNAも検出されなかった。しかし、分離陽性の検体のうち菌数が10～220CFU/100mLの10検体でDNAが検出されたことから、検体の処理方法などさらに検体を増やして検討が必要と思われた（図3、4）。

4. 実験浴槽（モノクロラミンの消毒確認試験）の浴槽水を用いた qPCR

実験浴槽を用いたモノクロラミンの消毒効果の確認実験を行った試料（浴槽水とろ過器内水）について菌分離とqPCRを行った結果、実験1では、消毒を実施した4日目～18日目の期間は、レジオネラ属菌は分離されず、生菌のDNAも検出されなかったが、死菌のDNAは検出され徐々に減少した。また、消毒を中止して44日後の検体では、レジオネラ属菌が増殖しており、菌分離、qPCR（生菌、死菌）はよく相関した成

績が得られた。また、実験2でも同様の成績が得られた。このことから、衛生管理された浴槽水を EMA 処理しないで通常の PCR または qPCR 行った場合、死菌の DNA を検出してしまう可能性があることが確認された (図5、6、7、8)。

結論

浴槽水中のレジオネラ属菌を迅速・簡便に生菌と死菌を鑑別して検出する方法として、検体の EMA 処理と qPCR を組み合わせた方法を検討した。

その結果、EMA 処理をすることにより、通常の PCR で死菌と生菌を鑑別することが可能であった。さらに、qPCR を行うことで、死菌と生菌を定量的に検出することが可能であった。

実検体での検討でも、多くの検体で浴槽水中の実態を反映していると思われる結果が得られた。しかし、一部の検体で菌分離成績と一致しないものがみられ、検体の処理方法など検討が必要と思われた。

実験浴槽を用いた検討では、浴槽水のレジオネラ属菌の状況を高い相関で把握することができた。

以上の成績から EMA 処理と qPCR を組み合わせた方法は浴槽水中のレジオネラ属菌の状況を迅速・簡便に知る方法として実用性が高く、入浴施設等の衛生管理の検査方法として非常に有用であると考えられた。

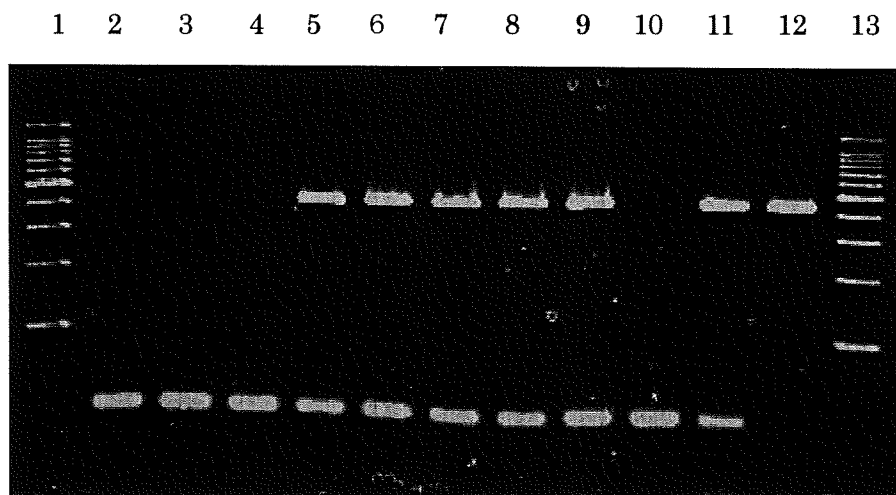
研究発表

日本防菌防黴学会第36回年次大会

「市販 DNA キットを用いたレジオネラ核酸検出法の検討」2001年9月14日(大阪)

EMA-通常の PCR

使用プライマー LEG448A, LEG854B



DNA 増幅 (430bp)

1	DNA マーカー			
2	加熱死菌 (1.4×10^5)	EMA 処理	(40 μ g/mL)	-
3	"	"	(20 μ g/mL)	-
4	"	"	(10 μ g/mL)	-
5	"	"	(0 μ g/mL)	+
6	生菌 (1.4×10^5)	EMA 処理	(40 μ g/mL)	+
7	"	"	(20 μ g/mL)	+
8	"	"	(10 μ g/mL)	+
9	"	"	(0 μ g/mL)	+
10	陰性対照 (DW)			-
11	陽性対照 (加熱菌液)			+
12	陽性対照 (DNA 抽出 2.8×10^5)			+
13	DNA マーカー			

DNA 量 (菌数) は反応チューブ中の菌数

以上の成績から加熱死菌は EMA 処理により目的の DNA (16SrRNA) は増幅されず、生菌と鑑別することができた。

図 1 通常の PCR による EMA 処理効果の確認

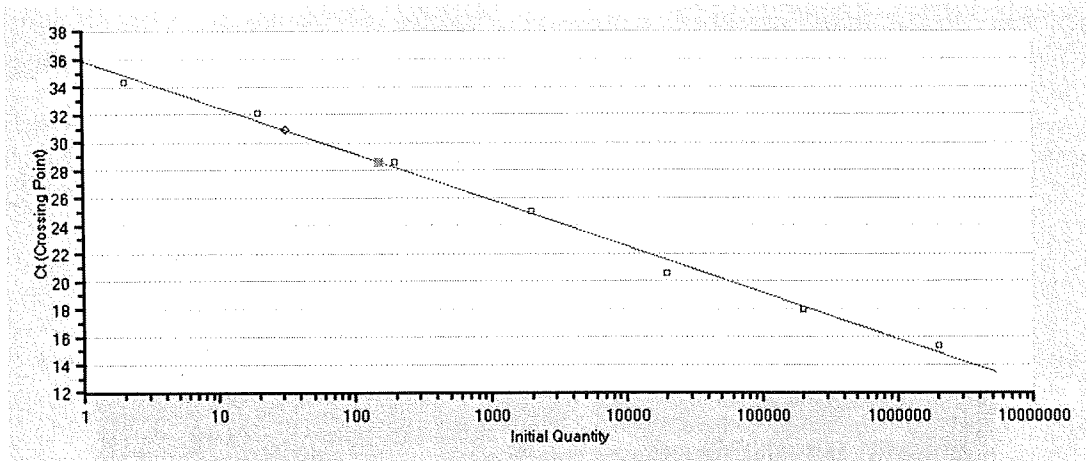


図2 qPCRの検量線

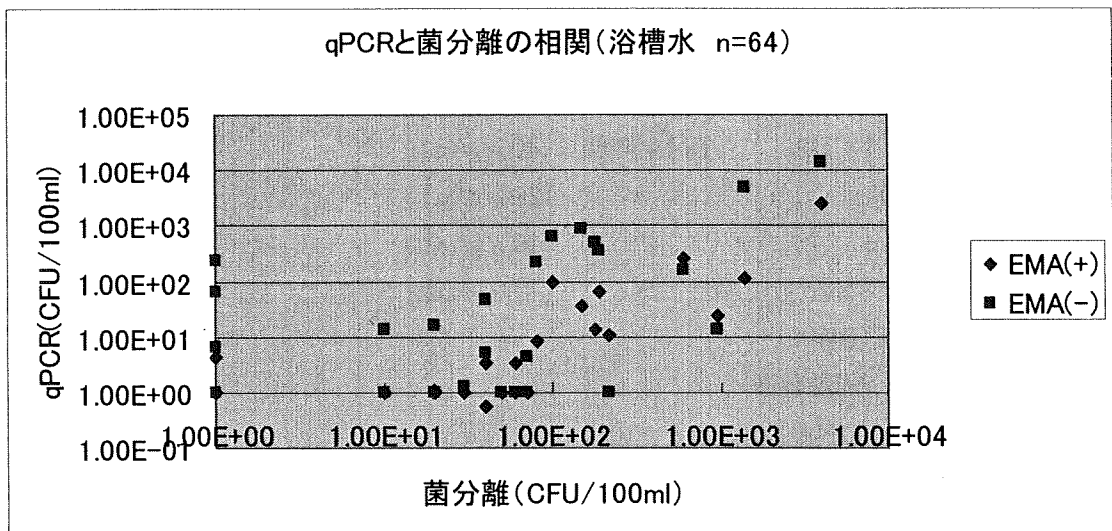


図3 実検体の EMA-qPCR と菌分離の相関 (1)

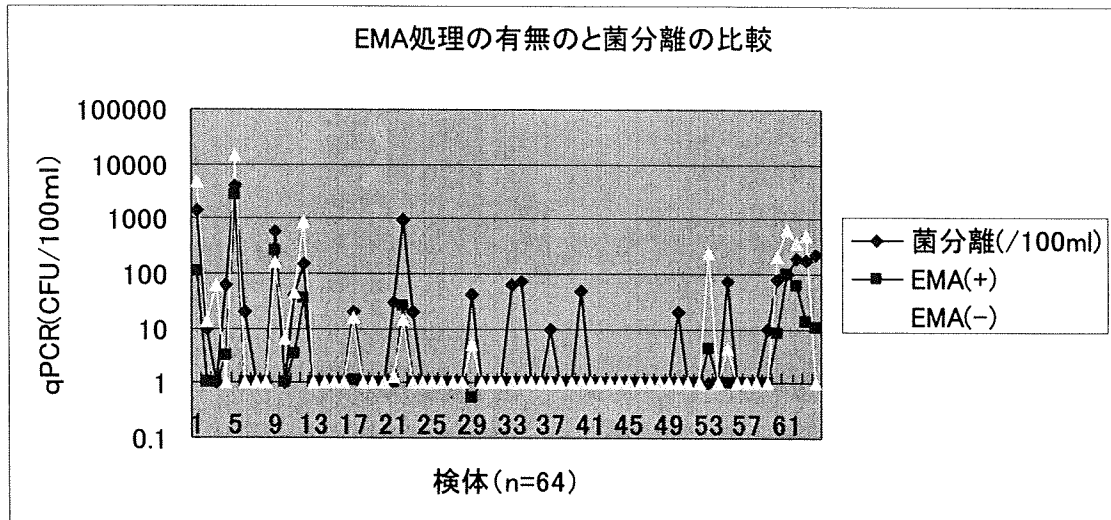


図4 実検体の EMA-qPCR と菌分離の相関 (2)

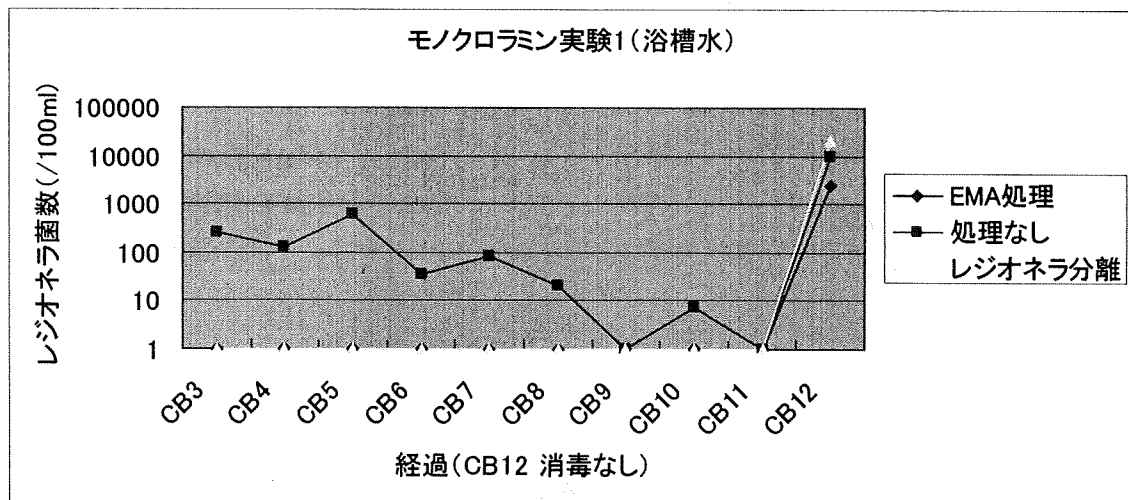


図5 実験浴槽のモノクロロミン消毒効果確認試験 (実験1 浴槽水)

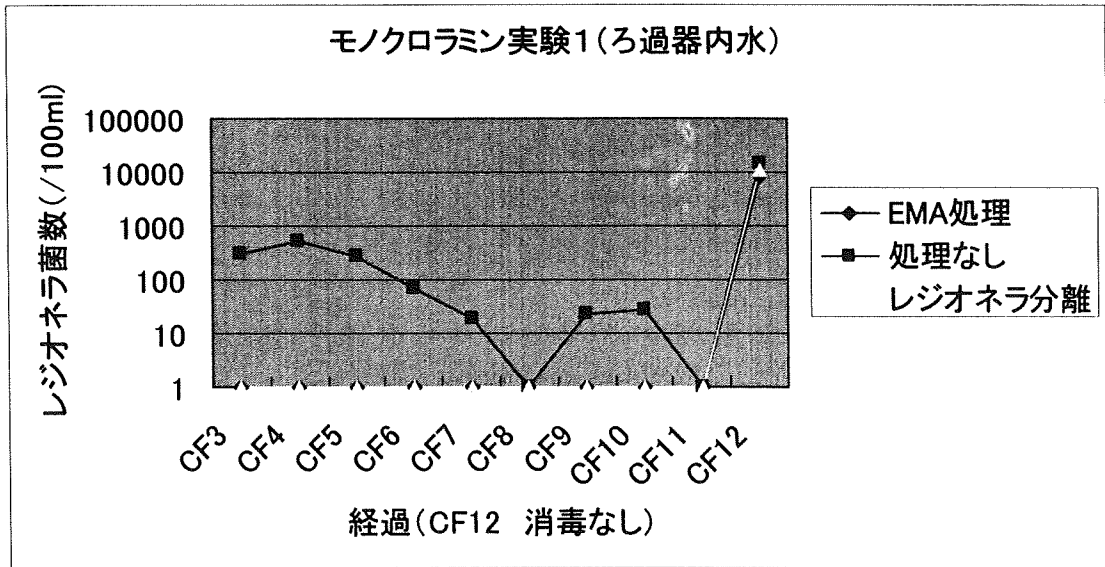


図6 実験浴槽のモノクロラミン消毒効果確認試験 (実験1 ろ過器内水)

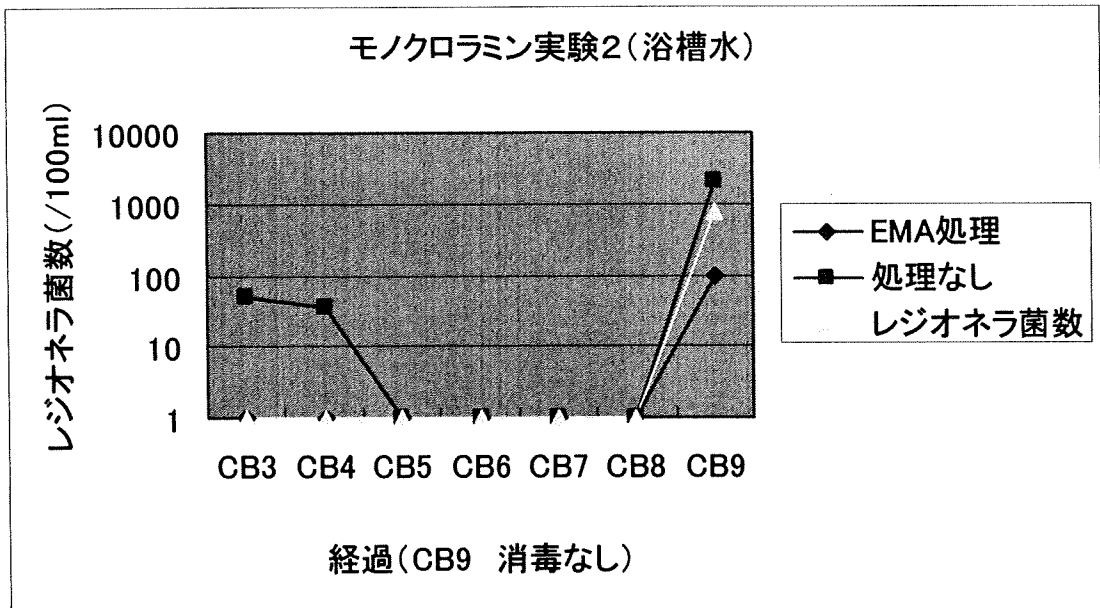


図7 実験浴槽のモノクロラミン消毒効果確認試験 (実験2 浴槽水)

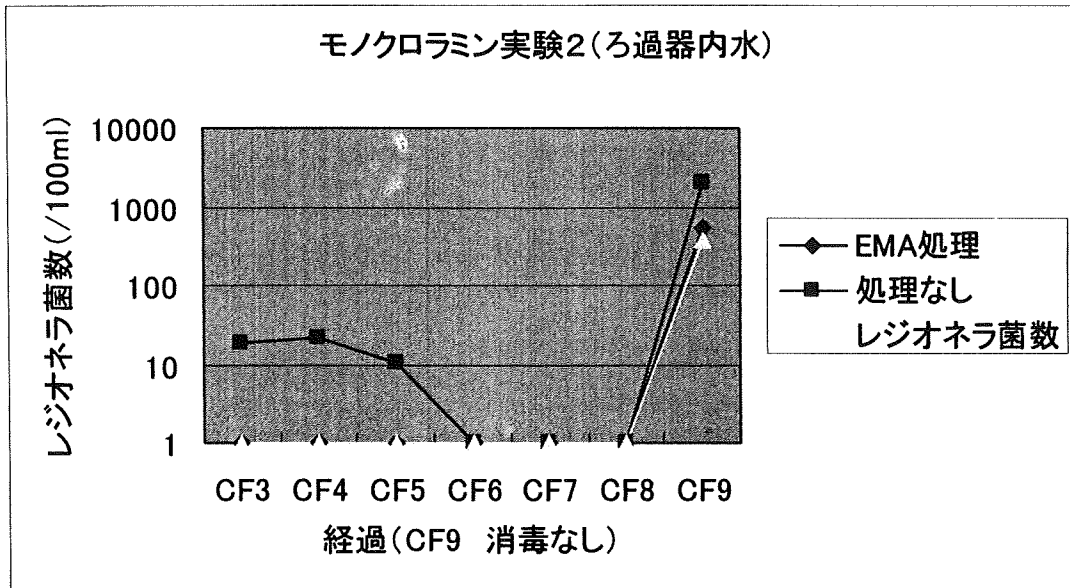


図8 実験浴槽のモノクロラミン消毒効果確認試験 (実験2 ろ過器内水)

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
浴槽水を対象にした各種遺伝子検査法成績の比較

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

(研究要旨)レジオネラ属菌の迅速定量方法として知られる quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法、quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 法、および Ethidium monoazide 処理とリアルタイム PCR のコンビネーションによる定量 (EMA-qPCR) 法、並びに同菌の迅速検出方法として知られる Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法について、それぞれの結果を標準法である培養法の結果と対比させて解析することで、浴槽水からのレジオネラ属菌検出に対する各種検査法の有効性を検討した。培養法でレジオネラ属菌陽性を示した 4 検体を含む 36 検体の浴槽水の試験において、それぞれの有効度 (efficiency) は qPCR 法、qRT-PCR 法、EMA-PCR 法、および LAMP 法の順で高く、全ての検査法で 70% を超えており、解析試料の検体数と陽性例が少ない状況を考慮すると十分有効な成績であると考えられた。qRT-PCR 法、qPCR 法、および LAMP 法で多く認められた偽陽性例が、EMA-PCR 法ではほとんど認められなくなり、EMA 処理が非培養系検査法の弱点であった高い偽陽性率の改善に有効であることが確かめられた。一方で、偽陰性例は EMA-PCR 法と LAMP 法でそれぞれ 1 例のみ認められ、高濃度塩素の影響や検査法の検出限界が課題として残った。LAMP 法は、他の検査と異なる特異性を持っていた。能力に一長一短あったものの、4 検査法には浴槽水を対象とした非培養系レジオネラ属菌検査としての有効性が認められた。

A. 研究目的

環境水からのレジオネラ属菌検査において、一般的に用いられている培養法は標準法として確固たる地位を占めているが、レジオネラ症の感染源として知られる入浴施設においては、7～10 日と長い検査期間を要するために改善措置の確認など衛生管理への利用手段としては必ずしも最善であるとは限らない。

今回、大幅な時間短縮を期待できるレジオネラ属菌遺伝子を標的とした遺伝子増幅法のうち、3 種の定量法、即ち quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法、quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 法、および Ethidium monoazide

処理とリアルタイム PCR のコンビネーションによる定量 (EMA-qPCR) 法、並びに同菌の迅速検出方法として知られる Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を併せて実施して、浴槽水を対象とした成績を培養法と比較することで、これらの有用性を検討した。

B. 研究方法

1) 供試試料

N 県内 15 施設の塩化物泉、炭酸水素塩泉、単純温泉、酸性泉、井水及び水道水からなる 36 浴槽水を試験した(表 1)。

2) 採水方法

検水 1000 mL を 25% チオ硫酸ナトリウム 1 mL

入り滅菌ポリプロピレン採水容器に採取し、冷蔵で運搬して、次の方法でろ過濃縮した。即ち、各検水を直径 47 mm、孔径 0.4 μm のポリカーボネート製メンブランフィルター（ミリポア、ISOPORE-HTTP 04700）で吸引ろ過した後、フィルターを滅菌蒸留水（大塚製薬、20 mL 注射用蒸留水）5 mL に挿入し、1分間攪拌した試料濃縮液の 1 mL を培養検査に、2 mL を定量 PCR 法および LAMP 法に供した。

3) レジオネラ属菌培養法

培養検査では、50°C \times 20 分加温後の試料濃縮液を1分間攪拌した後、その 0.1 mL を GVPC 培地（日本ビオメリュー）に接種した。35°C で数日間好気培養し、レジオネラ属菌を疑うコロニーを検出した場合は血清型別試験および PCR 試験を用いて同定した。最終的に 10 日間まで培養して発育しなかった試料を検出限界以下と判定した。

4) 定量 PCR 法

4-1) qRT-PCR 法

遺伝子検査では、試料濃縮液 2 mL を微量高速遠心機にて 4°C で 15,000rpm \times 5 分間処理した後、上清を除去して 100 μL の再濃縮試料として -30°C で凍結保存しておき、抽出時に室温融解させて試験に供した。RNA 抽出は倉らの方法¹⁾によった。即ち、再濃縮試料 100 μL に RNA 抽出液 400 μL (5 M NaCl 10 μL 、10 % Triton X-100 25 μL 、100 mM DTT 25 μL 、20 mg/mL Proteinase K 2.5 μL 、および TE buffer 337.5 μL) を添加した後、55°C \times 60 分間反応させた。95°C \times 10 分間の加熱で Proteinase K を不活化させた後、15,000rpm \times 5 分間遠心分離した上清 10 μL を、あらかじめ 390 μL の TE 緩衝液を分注したマイクロチューブに加えて RT 反応用の RNA 希釈液とした。

逆転写反応は PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa Code RR037A) を使用した。氷上で RT Master Mix 5 μL (6 μM Reverse Primer 2.5 μL 、

5 \times PrimeScript Buffer 2.0 μL 、RT Enzyme Mix I 0.5 μL) と RNA 希釈液 5.0 μL を混合し、42°C \times 15 分間反応させた。85°C \times 5 秒間で逆転写酵素を失活させた後、15 μL TE buffer を加えた混合液の 5 μL を qPCR 反応の鋳型 DNA とした。

4-2) qPCR 法

DNA 抽出には、改良酵素溶菌法を用いた。¹⁾ 溶解液は TE buffer (pH8.0)、1M NaCl、および 10% TritonX-100 を 50:20:10 の割合で混合して、2 倍濃度に調製して使用した。溶解液以外の Buffer 類は QIAamp DNA mini kit (キアゲン) を使い、カラムはモノリスカラム (GL サイエンス社) を用いた。qRT-PCR 法と同様にして処理した再濃縮試料 100 μL に、2 倍溶解液 90 μL と 20 mg/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 分間攪拌した後、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 1.5 mL マイクロチューブに移し、Buffer AL 200 μL と 99.5% エタノール 200 μL 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除去した後、最後に、Buffer AE 50 μL で 2 回遠心回収したろ液 100 μL を DNA 試料とした。qPCR には DNA 試料 5 μL を使い、得られた定量値の 10 倍量を 100 mL 中レジオネラ属菌数とした。

4-3) EMA-qPCR 法

試料濃縮液 2 mL を 4°C で 15,000rpm \times 5 分間遠心して生理食塩水 500 mL で再懸濁したものに、10 mg/mL EMA 溶液を 1 mL 加えて終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ として遮光下で氷上に 10 分間静置し、可視光線を 5 分間照射した。遠心 (15,000rpm, 4°C、5 分) して上清を除去した後、残りの沈渣を 100 μL 生理食塩水に懸濁して DNA 抽出用試

料とした。後は qPCR 法と同様に改良酵素溶菌法で処理した。

4-4) 核酸の増幅と定量

生理食塩水を用いて約 8~9 log cfu/mL に懸濁した *Legionella pneumophila* SG1 長崎 80-045 株の菌液から、改良酵素溶菌法により DNA を抽出し(約 7 log cfu/ μ L の濃度に調製)、検量線作成用 DNA 溶液として-30°C で凍結保存した。並行して培養検査を実施して菌数を決定した。使用時に室温融解、希釈して 5 log ~ 0 log cfu/assay の 6 段階 DNA 希釈列を得た。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成した。qPCR 反応は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)を用いた。キットの試薬を用いてマスターミックスを調製し(2×Cycleave Reaction Mixture 12.5 μ L、5S Primer/Probe Mix 5 μ L、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°C×10 秒間の前反応ののち、95°C×5 秒間、55°C×10 秒間、72°C×20 秒間を 1 サイクルとして 45 サイクル反応させた。試料の Ct 値をもとに試料の菌数を得た。

5) LAMP 法

レジオネラ属菌検出用の Loopamp レジオネラ検出キット E(栄研化学)を使用し、添付試薬によるアルカリ熱抽出法を行った。即ち、試料濃縮液 2 mL を 15,000rpm×10 分間遠心処理し、再濃縮液 40 μ L に EX Leg 試薬 50mL を添加して 95°C×15 分熱処理の直後に急冷した。Tris 試薬 8 μ L にて中和した後、阻害回避試薬(栄研化学)5 μ L を添加した。4°C で 15,000rpm×10 分間冷却遠心した上清 5 μ L を LAMP 反応に供した。測定装置には Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C(栄研化学)を用いて、65°C×1 時間反応させた。

qPCR 法との定量的な比較のために LAMP 法の陽性結果は Tt 値によって <20、20≤x<24、24≤x<31、および ≥31 min の 4 段階に分けて、それぞれ +++、++、+、および - で表記した。過去に実施した LAMP 法による遺伝子定量法で作成した検量線を参考にすると、それぞれ ≥5000、500≤x<5000、5≤x<50、および <5 cfu/mL に該当していた。

6) 解析方法

閾値を培養法の検出限界値 10 cfu/100mL とし、培養法と、三種の定量 PCR 法および LAMP 法それぞれの定性結果とを対比させてクロス集計表を作成した。それぞれの検査方法について培養検査結果に対する感度(Sensitivity)と特異度(Specificity)を求め、さらに陽性的中度(Positive predictive value)と陰性的中度(Negative predictive value)で比較した。

C. 研究結果

1) 培養法の結果と陽性施設の管理状況

36 検体中 4 検体が陽性を示し、菌数の範囲は 10~410 cfu/100mL であった(表 2)。これらの泉質の種類は単純アルカリ泉と井水で、試料 1、2、3、および 4 の遊離塩素濃度はそれぞれ 0.6、1.2、2.0、および 0.6 であり、pH はそれぞれ 8.2、8.5、8.6、および 7.7 を示した(表 2)。このうち試料 2 と 3 は同一施設からの試料であった。換水頻度は 3~4 日間で、1~4 日前には全ての浴槽水が換水されていた(表 2)。

2) 培養検査陽性例における各種検査法定量値の比較

qRT-PCR 法と qPCR 法の結果は類似しており、試料 1 に対しては培養結果よりも 4 倍高く、試料 2 に対しては培養結果よりも 7~8 倍低く、試料 3 と 4 に対してはほぼ同等の値を示した(表 2)。EMA-PCR 法は、試料 1、3、および 4 とほぼ同等の値を示したが、試料 2 に対しては不検出であった(表 2)。LAMP 法は、試料 1~3 に対して高

い濃度を示唆する増幅曲線が得られたが、試料 4 を検出できなかった(表 2)。

3) クロス集計表の比較

10 cfu/100mL を閾値とした場合の各検査法の定性結果は、qRT-PCR 法が陽性 15 例と陰性 20 例、qPCR 法が陽性 10 例と陰性 26 例、EMA-PCR 法が陽性 4 例と陰性 31 例、および LAMP 法が陽性 12 例と陰性 24 例であった(表 3)。培養法の定性結果と対比させた各検査法の感度 (sensitivity) と特異度 (specificity) は、qRT-PCR 法が 100%と 62.5%、qPCR 法が 100%と 81.3%、EMA-PCR 法が 66.7%と 93.8%、および LAMP 法が 75%と 71.9%であった(図 1)。qRT-PCR 法、qPCR 法、EMA-PCR 法、および LAMP 法の偽陽性例は、それぞれ 12 例、6 例、2 例、および 9 例であった(表 3)。これらの陽性的中度は、それぞれ 20%、40%、50%、および 25%であった(図 2)。qRT-PCR 法、qPCR 法、EMA-PCR 法、および LAMP 法の偽陰性例は、それぞれ 0 例、0 例、1 例、および 1 例であった(表 3)。これらの陰性的中度は、それぞれ 100%、100%、96.8%、および 95.8%であった(図 2)。

D. 考察

qRT-PCR 法、qPCR 法、および EMA-qPCR 法はレジオネラ属菌の迅速定量方法として知られ、LAMP 法は同菌の迅速検出方法として報告されている。¹⁾ これらは前処理を含めて 3 時間以内に判定できるとされ、レジオネラ症の感染源として知られる入浴施設においては、7~10 日と長い検査期間を要する培養法の代用法として検討されてきた。しかし、EMA-qPCR 法を除いた 3 法は死菌をも検出する弱点から培養法と比較して偽陽性が多いことが指摘され、生死判別できるとされる EMA-qPCR 法も十分なフィールド調査が行われていなかった。

今回、これらの検査法の定性結果を標準法である培養法結果と対比させて解析することで、浴

槽水からのレジオネラ属菌検出に対する各種検査法の有効性を検討した。培養法でレジオネラ属菌陽性を示した 4 検体を含む 36 検体の浴槽水の試験において、それぞれの有効度 (efficiency) は qPCR 法、EMA-PCR 法、qRT-PCR 法、および LAMP 法の順で高く(図 1)、全ての検査法で 70%を超えており、解析試料の検体数と陽性例が少ない状況を考慮すると十分有効な成績であると考えられた。qRT-PCR 法、qPCR 法、および LAMP 法では、偽陽性がそれぞれ 12 例、6 例、および 9 例と多く認められたが、EMA-PCR 法では偽陽性 2 例、陽性的中度 50%と、比較的優れた結果が得られた(図 2)。EMA 処理が非培養系検査法の弱点であった高い偽陽性率の改善に有効であることが確かめられた。一方で、偽陰性例は EMA-PCR 法と LAMP 法にそれぞれ 1 例認められた。表 2 のとおり、EMA-PCR 法が偽陰性を示した試料 2 は遊離塩素濃度 1.2 mg/L を検出していたことに加えて、該施設は過去の調査例でもほとんどの浴槽水で 1.5~3.0mg/L を示していた(データ未掲載)。この試料は qRT-PCR 法と qPCR 法においても培養法と比較して低い値が得られたことから(表 2)、高濃度塩素による反応への影響が原因の一つとして考えられた。EMA 処理は高濃度塩素に影響されると言われており、²⁾ 高濃度塩素投与がわかっている試料については、予め EMA 処理濃度の調製が必要かもしれない。LAMP 法が偽陰性を示した試料 4 では培養検査結果が培養法の検出限界値 10 cfu/100mL であった。今回 LAMP 法において、DNA 抽出に阻害回避試薬を使用していること、本試料の他に偽陰性は認められなかったこと、メーカー保証の検出限界が 100 cfu/100mL 程度とされていることなどから、本事例は同法の検出限界によるものかもしれない。一方で、試料 2 のように、LAMP 法は、他の検査法が明らかに検出値の低下を招いていた高濃度塩素試料ですら、培養法の成績どおりに

検出できていた(表 2)。

E. 結論

全ての検査法で有効度 (efficiency) が 70% を超えており、解析試料の検体数と陽性例が少ない状況では十分有効な成績であると考えられた。EMA 処理は非培養系検査法の弱点であった高い偽陽性率の改善に有効であった。LAMP 法は他の検査法と異なる特異性を持っていた。一方で、EMA-PCR 法と LAMP 法でそれぞれ 1 例の偽陰性例が認められ、高濃度塩素の影響や検査法の検出限界が課題として残った。能力に一長一短あったものの、4 検査法には浴槽水を対象とした非培養系レジオネラ属菌検査としての有効性が認められた。

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 20 年度総括・分担研究報告書 主任研究者:倉 文明 (2009)

2) Chang, B, *et al.*, Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 75:147-53. (2009)

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
権の取得状況 なし

表1 供試検体

泉質	施設数	浴槽数
塩化物泉	1	8
炭酸水素塩泉	2	3
単純アルカリ泉	1	2
酸性泉	3	7
井水	2	5
水道水	6	11
合計	15	36

表2 培養陽性検体の管理状況と各種レジオネラ検査法定量結果の比較

試料番号	浴槽水の管理状況					各種レジオネラ検査法定量結果の比較				
	泉質	遊離/全塩素濃度(mg/L)	pH	換水頻度	換水日	培養法 (cfu/100mL)	qRT-PCR法 (cfu/100mL)	qPCR法 (cfu/100mL)	EMA-qPCR法 (cfu/100mL)	LAMP法 ^a
1	単純アルカリ泉	0.6/0.6	8.2	4日間	1日前	30	127	115	18	+++
2 ^b	井水	1.2/1.2	8.5	4日間	2日前	410	54	65	—	+++
3 ^b	井水	2.0/2.0	8.6	4日間	4日前	20	29	22	NT ^c	+++
4	井水	0.6/0.6	7.7	3日間	3日前	10	NT ^c	21	12	—

^aLAMP法の判定基準は本文に記載、^b番号2と3は同一施設、^cnot tested

表3 各種検査法と培養法のクロス集計表の比較

閾値=10 cfu/100mL		培養法		閾値=10 cfu/100mL		培養法	
		陽性 ^a	陰性			陽性	陰性
qRT-PCR法		3	32	qPCR法		4	32
陽性	15	3	12	陽性	10	4	6
陰性	20	0	20	陰性	26	0	26

閾値=10 cfu/100mL		培養法		閾値=10 cfu/100mL		培養法	
		陽性 ^a	陰性			陽性	陰性
EMA-qPCR法		3	32	LAMP法		4	32
陽性	4	2	2	陽性	12	3	9
陰性	31	1	30	陰性	24	1	23

^aqRT-PCR法とEMA-PCR法は1試料を検査せず

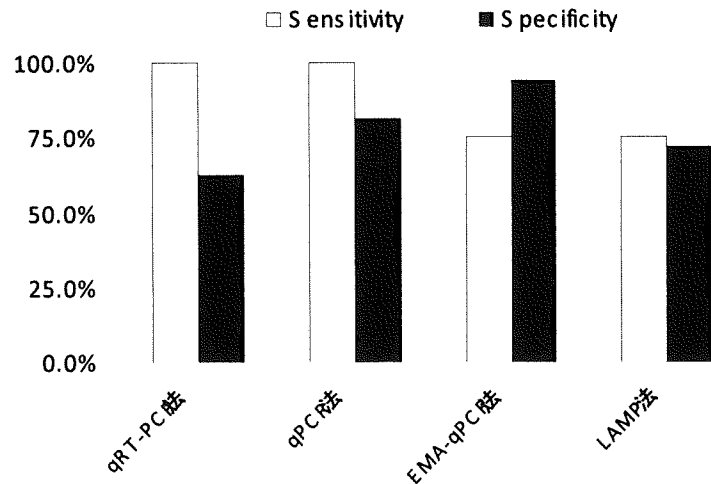


図1 各種検査法の感度と特異度の比較

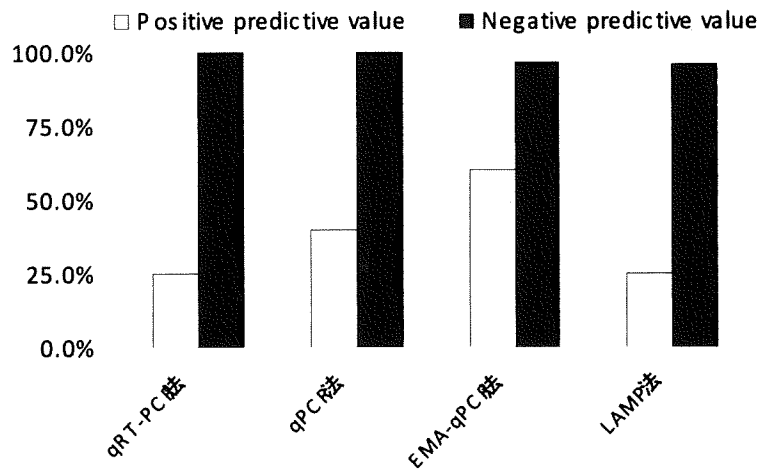


図2 各種検査法の陽性的中度和陰性的中度の比較

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

リアルタイム RT-PCR 法を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討

研究分担者：横浜市衛生研究所 荒井桂子

研究協力者：横浜市衛生研究所 吉川循江、田中礼子、堀切佳代、北爪稔、山口正

(研究要旨)

リアルタイム PCR 法を用いたレジオネラ属菌検出は、前処理を含めて 1 日で結果が判明することから、迅速法として有用である。しかし、リアルタイム PCR 法は温泉や薬湯の成分によって反応に阻害がかかり、カラム精製等の煩雑な前処理が必要となる。これらの前処理では回収率を維持することは難しく、熟練が必要である。そこで、カラム精製を省略して前処理を簡略し、試料を希釈することによって阻害物質による PCR 法の反応阻害を除去するため、DNA よりも感度の高い RNA を鋳型としたリアルタイム RT-PCR 法の検討を行った。

標準菌液による検量線を作製したところ、DNA を鋳型としたリアルタイム PCR 法 (qPCR) と RNA を鋳型としたリアルタイム RT-PCR 法 (RT-qPCR) の検量線は、それぞれ良好な直線性を示した。今回新たに用いる RT-PCR 法は試料中に 2.1cfu/100mL 以上の濃度であれば、定量が可能であることが確認された。

そこで、阻害物質が含まれると予測される浴場水 100 試料 (白湯 50 試料、温泉 30 試料、薬湯 20 試料) を対象に、qPCR と RT-qPCR を行ったところ、検出されたレジオネラ属菌数を比較すると、ほぼ同等の値であった。この 2 法の相関を求めると、 $R^2=0.956$ と強い相関が得られた。

しかし、温泉 1 試料と薬湯 1 試料が、培養法よりも qPCR が低い値を示し、反応阻害を受けていることが示唆された。一方、この 2 試料の RT-qPCR の値は培養法より高く、増幅曲線からも反応阻害を受けていないことが確認された。RT-qPCR は qPCR よりも、フミン質などの温泉成分や薬湯成分による PCR 反応阻害を受けづらいと推察された。

RT-qPCR は前処理を qPCR よりもはるかに簡便にすることが可能であり、より利用しやすい新たな迅速法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

従来の培養法によるレジオネラ属菌検出は、結果が判明するまでに約 10 日を要する。一方、浴槽水等の環境試料中から前処理も含めて 1 日でレジオネラ属菌が検出できるリアルタイ

ム PCR 法 (qPCR) は、施設の維持管理を確認するうえで有用な測定方法である。しかし、qPCR は温泉や薬湯の成分によって PCR 反応に阻害がかかり、カラム精製等の煩雑な前処理によって阻害物質を除去する必要が生じる。

この前処理では高い回収率を維持することは難しく、熟練が必要である。そこで、リボソーム DNA (rDNA) から大量に転写合成されるリボソーム RNA (rRNA) を鋳型とすれば、希釈によって PCR 反応の阻害物質の影響を除去できる可能性を考え、リアルタイム RT-PCR 法 (RT-qPCR) の検討を行った。

B. 検量線の作成

標準試料を作製し、qPCR 及び RT-qPCR を使ってそれぞれ検量線を作成し、相関性を調べた。

(1) 検量線用標準菌液

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株を BCYE α で 30 度 4 日培養後、生理食塩水に懸濁し、McFarland 1 程度に調整し、10 倍希釈系列を作製した。培養法により各希釈段階の生菌数を測定し、100 μ L ずつ DNA 及び RNA 抽出に分取した。

(2) DNA 抽出

DNA 抽出は本研究班の方法に従った。100 μ L の試料に TE-Buffer60 μ L、1M NaCl 20 μ L、10% Triton X-100 10 μ L 及び 20mg/ml ProteinaseK 10 μ L を加え、60 $^{\circ}$ C、60 分加温した。その後、75 $^{\circ}$ C、5 分加熱し、4 $^{\circ}$ C、15000rpm、3 分遠心を行った。上清を回収して Buffer-AL 200 μ L

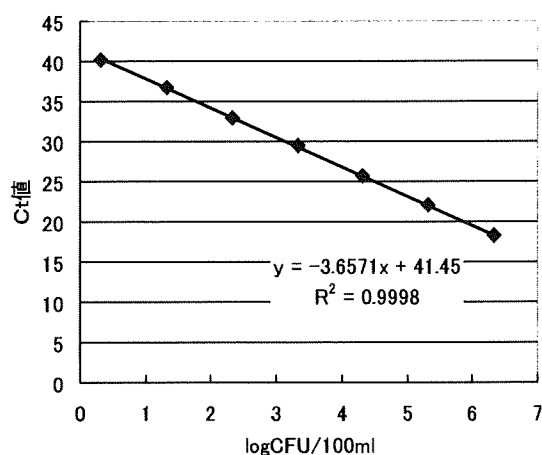


図 1 qPCR による検量線

及びエタノール 200 μ L を添加混合後、全量を MonoFas レジオネラ用カートリッジに添加して DNA の精製を行った。Buffer-AW1 300 μ L 及び Buffer-AW2 300 μ L でカートリッジの洗浄を行い、Buffer-AE 50 μ L で溶出を行った。

(3) RNA 抽出

RNA 抽出は本研究班の方法に従った。

100 μ L の試料に RNA 抽出液 400 μ L を添加し、激しく攪拌した。その後、55 $^{\circ}$ C60 分加温し、95 $^{\circ}$ C10 分加熱した後激しく攪拌し、直ちに氷冷した。4 $^{\circ}$ C、15000rpm、5 分遠心を行った上清 10 μ L を、あらかじめマイクロチューブに分注した TE-Buffer390 μ L に加えた。

(4) リアルタイム PCR 法

CycleavePCR[®] Legionella Detection Kit を使い、Smart Cycler[®] II システムで測定を行った。

(5) リアルタイム RT-PCR 法

逆転写反応には PrimeScript RT reagent Kit を用いた。RT Master Mix 5 μ L に RNA 抽出液 5 μ L を加えて混和し、42 $^{\circ}$ C15 分、85 $^{\circ}$ C5 秒、4 $^{\circ}$ Cで逆転写反応を行った。そこに TE-Buffer15 μ L を加え、そのうち 5 μ L を用いて qPCR を行った。qPCR は (4) のとおり。

(6) 結果

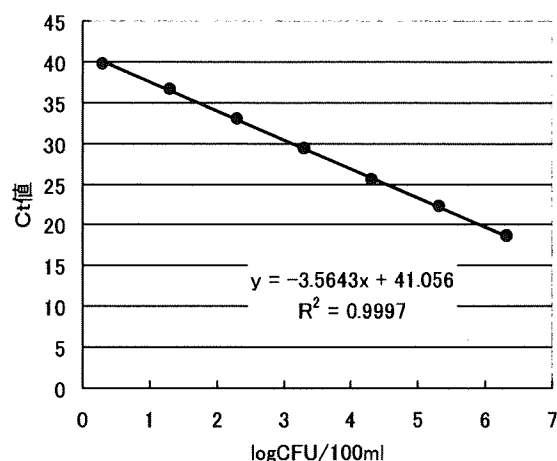


図 2 RT-qPCR による検量線