

結果を図 1、2 に示した。DNA を鋳型とした qPCR の検量線は良好な直線性を示した ($R^2=0.9998$)。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。一方、RNA を鋳型とした RT-qPCR の検量線も良好な直線性を示した ($R^2=0.9997$)。同様に、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。RT-qPCR は前処理の関係で qPCR より 1000 倍に希釈された鋳型を使用していることから、RT-qPCR の感度は qPCR に比較して 1000 倍程度高いと考えられた。

C. 浴槽水を用いた培養法と qPCR 及び RT-qPCR の比較

(1) 試料

浴場施設から採取した浴場水 100 試料 (白湯 50 試料、温泉 30 試料、薬湯 20 試料)。温泉 30 試料は、リアルタイム PCR 法を行って、反応に阻害を受けた経験のある試料とその周囲に点在する同系統の温泉とした。薬湯 20 試料も、リアルタイム PCR 法を行って、反応に阻害を受けた経験のある試料と同種類の薬湯を選定した。なお、薬湯の原水は水道水であった。

(2) 方法

前処理: 試料 600mL をポリカーボネートフィルター (ミリポア社製 ISOPORE0.22 μ m、直径 47mm) を用いてろ過し、フィルターを滅菌水 6ml が入った 100mL 三角フラスコに入れ、1 分間ボルテックスして濃縮試料を作製した。

培養法: 濃縮試料 1.0mL を加熱処理 (50 $^{\circ}$ C 30 分) し、GVPC 培地に 0.01、0.1、0.1mL ずつ塗抹し、37 $^{\circ}$ C で 5 日間培養を行った。培養中にレジオネラ属菌様コロニーを確認したら、釣菌して BCYE α 寒天培地に移植して純培養した。純培養を行うときに、同時にそのコロニーを用いて遺伝子抽出を行い、LAMP 法及びリアルタイム PCR 法を用いて

レジオネラ属菌及び *Legionella pneumophila* を確定した。培養 5 日後に培地上の青みを帯びた灰白色の湿潤コロニー (レジオネラ属菌様コロニー) を計数した。

qPCR: 「2.検量線の作成」と同様

RT-qPCR: 「2.検量線の作成」と同様

(3) 結果

結果を表 1 に示した。培養法でレジオネラ属菌が検出されたのは 30 試料であった。この 30 試料の中で qPCR 及び RT-qPCR で不検出に転じた試料はなかった。一方、qPCR 及び RT-qPCR でレジオネラ属菌が検出されたのは、それぞれ 62 試料、63 試料であった。培養法で不検出であったが、qPCR 及び RT-qPCR でレジオネラ属菌が検出された試料は、それぞれ 32 試料、33 試料であった。また、qPCR で不検出であったが、RT-qPCR でレジオネラ属菌が検出されたのは、1 試料であった。

培養法と qPCR の関係を図 3 に示した。2 つの検査法は相関係数 $R=0.573$ 、寄与率 $R^2=0.329$ と相関は低かった。また、培養法と RT-qPCR の関係を図 4 に示した。2 つの検査法は相関係数 $R=0.590$ 、寄与率 $R^2=0.348$ と相関は低かった。培養法と 2 法の相関が低い理由は、qPCR 及び RT-qPCR でレジオネラ属菌が検出された試料の中で、培養法で不検出になった試料が多いことが原因である。

qPCR と RT-qPCR の関係を図 5 に示した。2 法のレジオネラ属菌数を比較すると、ほぼ同等の値であった。2 つの検査法は相関係数 $R=0.956$ 、寄与率 $R^2=0.914$ と強い相関が得られた。

試料 No.58 及び No.97 の培養法の値は 160 及び 1900CFU/100mL であったが、qPCR 値は培養法の値を下回り、100 および 1700 CFU/100mL であった。この 2 試料の増幅曲線を見ると、明らかに PCR 反応阻害が起こっていた。試料 No.58 は塩化物泉の温泉水で、フミン質を多量に含み、蒸発残留物が

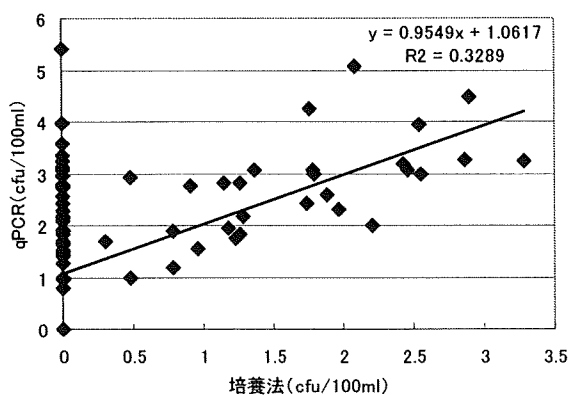


図3 培養法とqPCRの関係

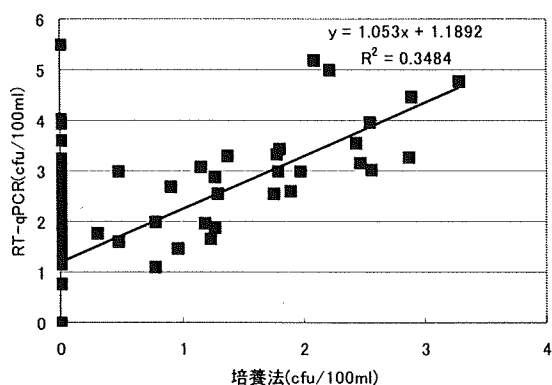


図4 培養法とRT-qPCRの関係

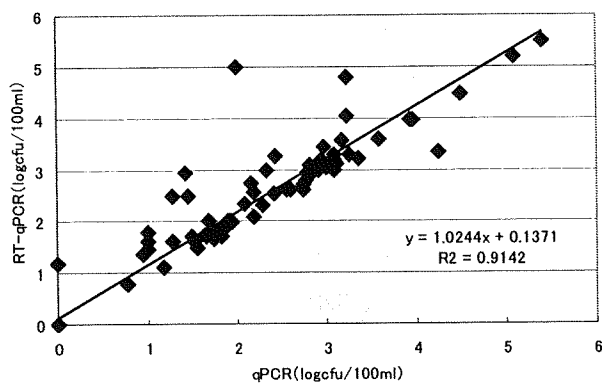


図5 qPCRとRT-qPCRの関係

8591mg/L で夾雑物も多い試料であった。試料 No.97 は水道水を原水とした薬湯で、ガーゼに実母散の生薬を入れて直接浴槽に投入した試料であった。試料 No.58 はフミン質などの温泉成分が、試料 No.97 は薬湯成分が PCR の反応を阻害したと推察された。

一方、試料 No.58 及び No.97 の RT-qPCR 値は、98000 および 61000 CFU/100mL で、培養法の値を上回っていた。増幅曲線を見ると、反応阻害は生じていなかった。この結果から、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考えられた。

(4) 考察

qPCR 及び RT-qPCR は高い相関を示し、フミン質などの温泉成分や薬湯成分による PCR 反応阻害は RT-qPCR の方がより受けづらいと考えられた。RT-qPCR は前処理が qPCR よりも簡便であり、qPCR と同程度の感度を持つことから、新たな迅速法として有用であると考えられる。

表1 レジオネラ属菌検査結果

試料 No	残留塩素 (mg/L)	培養法 (cfu/100mL)	qPCR (cfu/100mL)	RT-qPCR (cfu/100mL)	備考	
1	<0.05	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
2	<0.05	15	88	96	白湯	原水水道水
3	<0.05	360	990	1100	白湯	原水水道水
4	0.1	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
5	0.1	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
6	0.1	<1	19	40	白湯	原水水道水
7	0.1	6	78	100	白湯	原水水道水
8	0.1	55	260	350	白湯	原水水道水
9	0.1	60	1200	1000	白湯	原水水道水
10	0.2	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
11	0.2	2	50	60	白湯	原水水道水
12	0.2	9	35	30	白湯	原水水道水
13	0.2	58	1800	2200	白湯	原水水道水
14	0.3	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
15	0.3	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
16	0.3	6	15	13	白湯	原水水道水
17	0.3	18	66	78	白湯	原水水道水
18	0.3	92	210	970	白湯	原水水道水
19	0.3	270	1500	3600	白湯	原水水道水
20	0.5	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
21	0.5	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
22	0.5	3	10	40	白湯	原水水道水
23	0.5	17	55	46	白湯	原水水道水
24	0.5	350	8700	9200	白湯	原水水道水
25	0.6	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
26	0.6	<1	6	6	白湯	原水水道水
27	0.6	1	9	23	白湯	原水水道水
28	0.6	19	150	370	白湯	原水水道水
29	0.6	62	950	2800	白湯	原水水道水
30	0.6	120	120000	160000	白湯	原水水道水
31	0.6	780	31000	30000	白湯	原水水道水
32	0.8	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
33	0.8	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
34	0.8	<1	140	560	白湯	原水水道水
35	0.8	<1	360	420	白湯	原水水道水
36	0.8	<1	1200	970	白湯	原水水道水
37	1.0	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
38	1.0	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
39	1.0	<1	10	29	白湯	原水水道水
40	1.5	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
41	1.5	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
42	1.5	<1	43	55	白湯	原水水道水
43	1.5	<1	550	400	白湯	原水水道水
44	1.5	<1	2300	1600	白湯	原水水道水
45	2.0	<1	<1	<1	白湯	原水水道水
46	2.0	<1	<1	15	白湯	原水水道水
47	2.0	<1	85	100	白湯	原水水道水
48	>2.0	<1	<1	<1	白湯	原水水道水

49	>2.0	<1	9100	9000	白湯	原水水道水
50	>2.0	<1	250000	320000	白湯	原水水道水
51	<0.05	<1	<1	<1	溫泉	塩化物泉
52	<0.05	<1	<1	<1	溫泉	塩化物泉
53	<0.05	<1	<1	<1	溫泉	塩化物泉
54	<0.05	<1	<1	<1	溫泉	炭酸水素塩泉
55	<0.05	<1	1700	11000	溫泉	塩化物泉
56	<0.05	<1	26	850	溫泉	炭酸水素塩泉
57	<0.05	3	830	1000	溫泉	塩化物泉
58	<0.05	160	100	98000	溫泉	塩化物泉
59	0.1	<1	<1	<1	溫泉	炭酸水素塩泉
60	0.1	<1	<1	<1	溫泉	炭酸水素塩泉
61	0.1	<1	<1	<1	溫泉	炭酸水素塩泉
62	0.1	<1	<1	<1	溫泉	炭酸水素塩泉
63	0.1	<1	190	200	溫泉	塩化物泉
64	0.1	<1	270	1800	溫泉	塩化物泉
65	0.1	<1	31	50	溫泉	塩化物泉
66	0.1	8	560	500	溫泉	炭酸水素塩泉
67	0.1	77	390	400	溫泉	塩化物泉
68	0.1	290	1200	1500	溫泉	塩化物泉
69	0.2	<1	<1	<1	溫泉	塩化物泉
70	0.2	<1	<1	<1	溫泉	炭酸水素塩泉
71	0.2	<1	66	50	溫泉	炭酸水素塩泉
72	0.2	<1	3900	4000	溫泉	塩化物泉
73	0.2	14	650	1200	溫泉	塩化物泉
74	0.3	<1	<1	<1	溫泉	炭酸水素塩泉
75	0.3	<1	<1	<1	溫泉	塩化物泉
76	0.3	<1	1300	1300	溫泉	塩化物泉
77	0.3	<1	590	610	溫泉	炭酸水素塩泉
78	0.3	<1	28	300	溫泉	炭酸水素塩泉
79	0.3	<1	45	50	溫泉	塩化物泉
80	0.5	<1	<1	<1	溫泉	炭酸水素塩泉
81	<0.05	<1	<1	<1	薬湯	無機塩類
82	<0.05	<1	<1	<1	薬湯	無機塩類
83	<0.05	<1	<1	<1	薬湯	無機塩類
84	<0.05	<1	<1	<1	薬湯	無機塩類
85	<0.05	<1	48	100	薬湯	温泉成分
86	<0.05	<1	75	80	薬湯	温泉成分
87	<0.05	<1	150	120	薬湯	無機塩類
88	<0.05	<1	120	210	薬湯	温泉成分
89	<0.05	<1	600	880	薬湯	無機塩類
90	<0.05	<1	19	300	薬湯	温泉成分
91	<0.05	<1	880	1500	薬湯	生薬
92	<0.05	<1	10	60	薬湯	無機塩類
93	<0.05	<1	33	40	薬湯	生薬
94	<0.05	18	650	750	薬湯	温泉成分
95	<0.05	23	1200	2000	薬湯	温泉成分
96	<0.05	740	1800	1900	薬湯	温泉成分
97	<0.05	1900	1700	61000	薬湯	生薬(実母散)
98	0.5	<1	<1	<1	薬湯	無機塩類
99	0.5	<1	<1	<1	薬湯	無機塩類
100	0.5	<1	<1	<1	薬湯	無機塩類

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

LAMP 法を用いたレジオネラ属菌検出における前処理の検討

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）

LAMP 法を用いたレジオネラ属菌検出は、前処理が簡便でスクリーニング検査として有用である。しかし、従来から推奨されてきたアルカリ熱抽出では、温泉や薬湯に含まれる反応を阻害する物質が最終反応系まで持ち込まれ、偽陰性を示す事例が見られるようになった。そこで、前処理を PCR 法と同様に Proteinase K 処理後、カラムで DNA 抽出を行う手法に変更したところ、偽陰性を示す事例が減少した。しかし、この手法では前処理が複雑になってしまい、LAMP 法の利点である前処理の簡便さが失われる。

そこで、従来の前処理方法では阻害物質を取り除くことができなかった温泉 30 試料と薬湯 20 試料を対象に、従来の前処理を行った従来法と、従来の前処理に阻害回避薬を添加して阻害物質の除去を行った改良法の 2 種類を行い、LAMP 法で測定して結果を比較した。

その結果、従来法で陰性で改良法で陽性に転じた試料は温泉 6 試料、薬湯 4 試料であった。また、Tt 値が減少した試料は、温泉 10 試料、薬湯 7 試料であった。Tt 値の減少は反応阻害の減少を示し、改良法は従来の前処理方法よりも感度の向上が得られた。

阻害回避薬を用いた前処理方法を用いた LAMP 法は、簡便な前処理方法でありながら、温泉や薬湯に含まれる阻害物質を除去して、より感度の高い結果が得られる有用な方法であると考えられた。

A. 研究目的

浴槽水をはじめとする環境水中からのレジオネラ属菌の迅速な検出は、公衆浴場等の衛生管理の確認や指導に重要である。現在、迅速な検出は遺伝子検査によって行われている。そのひとつである LAMP 法は、前処理が簡便でスクリーニング検査として有用である。しかし、従来から推奨されてきたアルカリ熱抽出では、反応を阻害する温泉に含まれるフミン質や薬湯の成分が最終反応系まで持ち込ま

れ、偽陰性を示す事例が見られるようになった。遊離残留塩素が消費されやすい温泉や薬湯はレジオネラ属菌が増殖しやすい条件を備えており、このままでは温泉や薬湯に LAMP 法を適用できなくなる。そこで、そこで、前処理の段階で阻害回避薬を添加し、LAMP 法の簡便性を損なうことなく、阻害物質を除去する方法を検討した。

B. 試料

浴場施設から採取した浴場水 50 試料(温泉 30 試料、薬湯 20 試料)を試料とした。温泉 30 試料は、アルカリ熱抽出の前処理を行って、LAMP 反応に阻害を受けた経験のある試料とその周囲に点在する同系統の温泉とした。薬湯 20 試料も、LAMP 反応に阻害を受けた経験のある試料と同種類の薬湯を選定した。なお、薬湯の原水は水道水であった。

C. 方法

試料を前処理して濃縮試料を作製し、培養法、LAMP 従来法、LAMP 改良法で測定を行った。LAMP 法は定性結果ではなく、Tt 値を記載し、従来法と改良法の比較を行った。また、採水時に遊離残留塩素を DPD 法で測定し、温泉の泉質及び薬湯に使用した薬剤を調査した。

前処理: 試料 600mL をポリカーボネートフィルター (ミリポア社製 ISOPORE0.22 μ m、直径 47mm) を用いてろ過し、フィルターを滅菌水 6ml がが入った 100mL 三角フラスコに入れ、1 分間ボルテックスして濃縮試料を作製した。

培養法: 濃縮試料 1.0mL を加熱処理 (50°C30 分) し、GVPC 培地に 0.01、0.1、0.1mL ずつ塗抹し、37°C で 5 日間培養を行った。培養中にレジオネラ属菌様コロニーを確認したら、釣菌して BCYE α 寒天培地に移植して純培養した。純培養を行うときに、同時にそのコロニーを用いて遺伝子抽出を行い、LAMP 法及びリアルタイム PCR 法を用いてレジオネラ属菌及び *Legionella pneumophila* を確定した。培養 5 日後に培地上の青みを帯びた灰白色の湿潤コロニー (レジオネラ属菌様コロニー) を計数した。

LAMP 従来法: 濃縮試料 2mL を滅菌チュー

ブに入れ、4°C、13,000 \times g、10 分間遠心した後上清を除去して 40 μ L にした。

Extraction Solution for Legionella 50 μ L を添加して混合した後、95°C15 分加熱処理した。氷上で冷却後、1M Tris-HCL (pH7.0) 8 μ L を入れて混合した。4°C、13,000 \times g、10 分間遠心した後、氷上に移し、上清 5 μ L を採取した。サンプル溶液、陽性コントロール、陰性コントロール各 5 μ L に試薬を 20 μ L 添加し、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で測定を行った。

LAMP 改良法: LAMP 従来法と同様な手順で処理を行い、1M Tris-HCL (pH7.0) 8 μ L を入れて混合した後に阻害回避薬 10 μ L を添加して混合した。4°C、13,000 \times g、10 分間遠心した後、氷上に移し、上清 5 μ L を採取した。サンプル溶液、陽性コントロール、陰性コントロール各 5 μ L に試薬を 20 μ L 添加し、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で測定を行った。

D. 結果

結果を表 1 及び表 2 に示した。培養法では温泉 6 試料、薬湯 4 試料からレジオネラ属菌が検出された (検出率 20%)。検出菌数は 10⁰cfu/100mL が 2 試料、10¹cfu/100mL が 4 試料、10²cfu/100mL が 3 試料、10⁴cfu/100mL が 1 試料であった。レジオネラ属菌が検出された浴槽水の残留塩素は 10 試料とも 0.2mg/L 以下であった。

LAMP 従来法では、温泉 11 試料、薬湯 9 試料がレジオネラ属菌陽性を示した (陽性率 40%)。培養法で菌が検出されなかった温泉 6 試料、薬湯 7 試料が、LAMP 従来法で陽性を示した。しかし、培養法で菌が検出された 3 試料 (試料 No.16、44、47) は陰性を示した。

LAMP 改良法では、温泉 17 試料、薬湯 13 試料がレジオネラ属菌陽性を示した (陽性率

60%)。培養法で菌が検出されなかった温泉 11 試料、薬湯 9 試料が、LAMP 改良法で陽性を示した。培養法で菌が検出されたが、従来法で陰性を示した 3 試料 (試料 No.16、44、47) は、改良法で陽性に転じた。また、従来法で陰性を示した試料のうち、改良法で陽性に転じた試料は温泉 6 試料、薬湯 4 試料であった。

従来法と改良法の Tt 値を比較すると、「核酸不検出」が 20 試料、「陽転」が 10 試料 (温泉 6 試料、薬湯 4 試料)、「減少」が 17 試料 (温泉 10 試料、薬湯 7 試料)、「変化なし」が薬湯 1 試料、「増加」が 2 試料 (温泉 1 試料、薬湯 1 試料) であった。

E. 考察

LAMP 従来法は、培養法でレジオネラ属菌が検出された 10 試料のうち、3 試料が陰性と判定した。このうちの 1 試料は温泉 (塩化物泉) で非常に濃い茶色を呈しており、フミン質を多量に含んでいた。残りの 2 試料は薬湯で、1 つは温泉成分を、もう 1 つは生薬を浴槽中に投入していた。この 3 試料は目視でも他の試料に比較して、フミン質や温泉成分が多量に含まれており、そのために従来法の前処理では、LAMP 反応に対する阻害物質を全て除去することができなかつたと考えられた。

一方、改良法は培養法でレジオネラ属菌が検出された 10 試料全てを陽性と判定した。従来法で陰性を示した 3 試料も陽性を示した。

この結果から、従来法で除去できなかった量の阻害物質でも、改良法では除去できることが判明した。しかし、今回用いた試料以上に阻害物質を含有する試料も考えられるため、阻害回避薬の使用量を調整する必要があると思われた。また、従来法と改良法では、Tt 値が減少した試料は、温泉 10 試料、薬湯 7 試料であった。Tt 値の減少は反応阻害の減少を示し、改良法は従来の前処理方法よりも感度の向上が認められた。

しかし、従来法に比べ改良法の Tt 値が増加した 2 試料については原因が不明であった。

F. まとめ

浴槽水は 0.2~0.4mg/L の残留塩素を維持することが望ましいが、検査を行った 50 試料の 70%にあたる試料の残留塩素が 0.2 mg/L 未満であった。このように、温泉や薬湯は残留塩素を保持することが難しく、水道水を利用した白湯に比較して、レジオネラ属菌が検出される可能性が高い。しかし、温泉はフミン質をはじめ多種の成分が含まれており、LAMP 従来法では阻害を受けてレジオネラ属菌を検出できないことが見受けられた。しかし、阻害回避薬を用いた LAMP 改良法は、従来法よりも感度の向上が得られたことから、簡便な前処理方法でありながら、温泉や薬湯に含まれる阻害物質を除去して、より感度の高い結果が得られる有用な方法であると考えられた。

表 1 培養法と LAMP 法の結果

		LAMP従来法		LAMP改良法		計
		陽性	陰性	陽性	陰性	
培養法	陽性	7	3	10	0	10
	陰性	13	27	20	20	40
計		20	30	30	20	

表2 レジオネラ属菌測定結果

試料 No	残留塩素 (mg/L)	培養法 (cfu/100mL)	LAMP 従来法 Tt 値 (秒)	LAMP 改良法 Tt 値 (秒)	Tt 値の比較	試料の 種類	備考
1	<0.05	<1	0	0	核酸不検出	温泉	塩化物泉
2	<0.05	<1	0	0	核酸不検出	温泉	塩化物泉
3	<0.05	<1	0	0	核酸不検出	温泉	塩化物泉
4	<0.05	<1	0	0	核酸不検出	温泉	炭酸水素塩泉
5	<0.05	<1	0	2371	陽転	温泉	塩化物泉
6	<0.05	<1	0	1928	陽転	温泉	炭酸水素塩泉
7	<0.05	3	3255	1456	減少	温泉	塩化物泉
8	<0.05	160	2416	2204	減少	温泉	塩化物泉
9	0.1	<1	0	0	核酸不検出	温泉	炭酸水素塩泉
10	0.1	<1	0	0	核酸不検出	温泉	炭酸水素塩泉
11	0.1	<1	0	0	核酸不検出	温泉	炭酸水素塩泉
12	0.1	<1	0	0	核酸不検出	温泉	炭酸水素塩泉
13	0.1	<1	0	1410	陽転	温泉	塩化物泉
14	0.1	<1	1387	1061	減少	温泉	塩化物泉
15	0.1	<1	1469	1523	増加	温泉	塩化物泉
16	0.1	8	0	1269	陽転	温泉	炭酸水素塩泉
17	0.1	77	1734	1296	減少	温泉	塩化物泉
18	0.1	290	1825	1117	減少	温泉	塩化物泉
19	0.2	<1	0	0	核酸不検出	温泉	塩化物泉
20	0.2	<1	0	0	核酸不検出	温泉	炭酸水素塩泉
21	0.2	<1	0	1561	陽転	温泉	炭酸水素塩泉
22	0.2	<1	1225	1024	減少	温泉	塩化物泉
23	0.2	14	2011	1195	減少	温泉	塩化物泉
24	0.3	<1	0	0	核酸不検出	温泉	炭酸水素塩泉
25	0.3	<1	0	0	核酸不検出	温泉	塩化物泉
26	0.3	<1	0	1344	陽転	温泉	塩化物泉
27	0.3	<1	1644	1028	減少	温泉	炭酸水素塩泉
28	0.3	<1	1993	1765	減少	温泉	炭酸水素塩泉
29	0.3	<1	2099	1409	減少	温泉	塩化物泉
30	0.5	<1	0	0	核酸不検出	温泉	炭酸水素塩泉
31	<0.05	<1	0	0	核酸不検出	薬湯	無機塩類
32	<0.05	<1	0	0	核酸不検出	薬湯	無機塩類
33	<0.05	<1	0	0	核酸不検出	薬湯	無機塩類
34	<0.05	<1	0	0	核酸不検出	薬湯	無機塩類
35	<0.05	<1	0	1654	陽転	薬湯	温泉成分
36	<0.05	<1	0	1431	陽転	薬湯	温泉成分
37	<0.05	<1	1697	1020	減少	薬湯	無機塩類
38	<0.05	<1	1583	1168	減少	薬湯	温泉成分
39	<0.05	<1	1662	1254	減少	薬湯	無機塩類
40	<0.05	<1	1524	1189	減少	薬湯	温泉成分
41	<0.05	<1	1444	1342	減少	薬湯	生薬
42	<0.05	<1	1901	1897	変化なし	薬湯	無機塩類
43	<0.05	<1	2004	2561		薬湯	生薬
44	<0.05	18	0	1977	陽転	薬湯	温泉成分
45	<0.05	23	2010	1467	減少	薬湯	温泉成分
46	<0.05	740	1999	1405	減少	薬湯	温泉成分
47	<0.05	1900	0	3356	陽転	薬湯	生薬 (実母散)
48	0.5	<1	0	0	核酸不検出	薬湯	無機塩類

49	0.5	<1	0	0	核酸不検出	薬湯	無機塩類
50	0.5	<1	0	0	核酸不検出	薬湯	無機塩類

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

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 法や LAMP 法などの遺伝子検査による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、遺伝子検査法はレジオネラ属菌の遺伝子を検出するため、菌の生死は判別できない。現在、横浜市では遺伝子検査を行政検査に活用し、施設の維持管理指導を行っている。迅速な検査の利点を活かしつつ、菌の生死が判別できれば、利用範囲は格段に広がる。

Ethidium Monoazide (EMA) は特異的に死菌の細胞膜を透過し、DNA を切断することにより、PCR の増幅を抑制する。この特性を活かし、試料を EMA 処理して生菌のみを検出できるか検討を行った。

まず、レジオネラ属菌を滅菌生理食塩水に添加した試料を用いて、レジオネラ属菌の生菌数と添加する EMA 量との関係を調査した。死菌がない状態で EMA を添加すると、生菌の検出数が低下し、死菌が多い状態で EMA 量が不足すると、生菌として検出されることが判明した。

次に、白湯の浴槽水 50 試料を対象に、EMA の添加量を 3 段階 (0、1.0、10_g/mL) にして PCR を行ったところ、培養法の値と EMA を 1.0_g/mL 添加した (+1.0 EMA 処理) PCR 値あるいは 10_g/mL 添加した (+10 EMA 処理) PCR 値のどちらかが近似値を示した。浴槽水の残留塩素濃度によって、暫定的に EMA 濃度を決定することにより、培養法と相関が高い EMA 処理 PCR 法によるデータが得られた。

このことから、EMA 処理 PCR 法は迅速に生菌を検出する手法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

リアルタイム PCR 法や LAMP 法などの遺伝子検査による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、遺伝子検査法はレジオネラ属菌の遺伝子を検出するた

め、菌の生死は判別できない。現在、横浜市では遺伝子検査を行政検査に活用し、施設の維持管理指導を行っている。迅速な検査の利点を活かしつつ、菌の生死が判別できれば、利用範囲は格段に広がる。

Ethidium Monoazide (EMA) は特異的に死

菌の細胞膜を透過し、DNA を切断することにより、PCR の増幅を抑制する。この特性を活かし、試料を EMA 処理して生菌のみを検出できるか検討を行った。

B.レジオネラ属菌を滅菌生理食塩水に添加した試料における生菌のみの検出

(1) 方法

Legionella pneumophila SG1 の 3 株 (No.1 ~3) を BCYE α 平板培地に画線して 3 日間培養してそれぞれ滅菌生理食塩水中に懸濁し、約 10^5 cfu/100mL に調整した菌液を作製した。各菌液を 4 分し、それぞれに計算上有効塩素濃度が 0、0.02、0.2、0.5、1.0mg/L になるように塩素を添加して攪拌し、室温で 1 分間処理した後、チオ硫酸ナトリウム溶液で中和した。

各試料を、塩素処理をしていない試料 (A)、0.02 mg/L 塩素処理した試料 (B)、0.2 mg/L 塩素処理した試料 (C)、0.5mg/L 塩素処理した試料 (D)、1.0mg/L 塩素処理した試料 (E) とした。

各試料 500mL を 5 mL にろ過濃縮し (ミリポア社製 ISOPORE ポリカーボネートフィルター 0.22 μ m、直径 47mm)、加熱処理 (50 $^{\circ}$ C 30 分) した 0.1mL を GVPC10 枚に塗布して 37 $^{\circ}$ C

で培養を行った。濃縮試料 2 mL に EMA (A ~D は 1.0 μ g/mL、E は 1.0 及び 10 μ g/mL) を添加し、遮光下 4 $^{\circ}$ C 5 分間放置した後、500 ~650W の可視光を 5 分間照射した。この後、常法に従って定量リアルタイム PCR を行った。また、A の濃縮試料 2 mL に EMA を添加せず、同様の作業を行った。

(2) 結果

GVPC 培地での培養菌数の結果を表 1 に示した。処理する塩素濃度を 5 段階にし、処理時間を短縮したことにより、試料 C にまで生菌が確保された。これらの試料を EMA 処理し、リアルタイム PCR で検出した結果を表 2 に示した。EMA 処理をしていない試料 A の PCR 値は培養値と同程度であった。しかし、EMA 処理を行った試料 A では PCR 値が処理を行わない場合に比較し、Log1~2 低下した。試料 B の PCR 値は培養値と同程度であった。一方、培養法で生菌が確認された試料 C は、PCR 値では不検出を示した。また、培養法で生菌が検出されなかった試料 D と 10 μ g/mL EMA 処理を行った試料 E の PCR 値は不検出を示し、培養値と合致した。しかし、1.0 μ g/mL EMA 処理を行った試料 E の PCR 値は、逆に Log2 ~3 の値を示した。

表 1 GVPC 培地での培養菌数

	A 塩素処理をしていない試料 (cfu/100mL)	B 0.02 mg/L 塩素 処理した試料 (cfu/100mL)	C 0.2 mg/L 塩素 処理した試料 (cfu/100mL)	D 0.5mg/L 塩素 処理した試料 (cfu/100mL)	E 1.0mg/L 塩素 処理した試料 (cfu/100mL)
No. 1	2.3×10^5	4.5×10^2	6	0	0
No. 2	1.6×10^5	8.8×10^1	3	0	0
No. 3	9.6×10^4	3.1×10^1	1	0	0

表 2 EMA 処理後のリアルタイム PCR による検出菌数

	A -EMA (cfu/100mL)	A +1.0EMA (cfu/100mL)	B +1.0EMA (cfu/100mL)	C +1.0EMA (cfu/100mL)	D +1.0EMA (cfu/100mL)	E +1.0EMA (cfu/100mL)	E +10EMA (cfu/100mL)
No. 1	1.2×10^5	6.5×10^3	9.6×10^1	<1	<1	4.6×10^2	<1
No. 2	3.9×10^5	8.6×10^3	2.3×10^1	<1	<1	2.7×10^3	<1
No. 3	1.0×10^5	2.3×10^4	8.7×10^0	<1	<1	5.6×10^2	<1

(3) 考察

低濃度の塩素処理を行った試料 B～D では、ほぼ培養法と同程度の菌数が PCR 法で示されたことから、実用が可能であると推察された。しかし、 10^0 cfu/100mL の生菌が PCR 法で検出できなかったことから、現在の条件では培養法の感度を下回るため、前処理等に工夫が必要であると考えられた。また、塩素処理を行っていない試料に対して EMA 処理を行うと、培養値より PCR 値が低下したことから、塩素処理を行っていない試料または遊離残留塩素が確認できない試料に対しては、EMA 処理は注意する必要があることが推察された。一方、高濃度の塩素処理した試料 E に対して、 $1.0\mu\text{g/mL}$ EMA 処理と $10\mu\text{g/mL}$ EMA 処理では結果が異なったことから、遊離残留塩素濃度が高い場合、EMA 濃度も高い必要があることが推察された。

ここで、残留塩素が 1.0mg/L で含有する死菌が 10^1 cfu/100mL と少ない場合、 $1.0\mu\text{g/mL}$ EMA 処理と $10\mu\text{g/mL}$ EMA 処理では結果が異なるか、同様の手法で追加実験を行った。その結果、No.1～3 の試料は全て PCR 法で不検出 (<1cfu/100mL) であった。この結果から、必要な EMA 濃度は残留塩素濃度に左右されるのではなく、含まれる死菌の量によると推察された。

C. 公衆浴場水を試料とした生菌のみの検出

(1) 試料

浴場施設から採取した白湯の浴槽水 50 試料。

(2) 方法

前処理：各試料 800mL をポリカーボネートフィルター(ミリポア社製 ISOPORE0.22 μm 、直径 47mm) を用いてろ過し、フィルターを滅菌水 8ml 入った 100mL 三角フラスコに入れ、1 分間ボルテックスして濃縮試料を作製した。

培養法：濃縮試料 1.0mL を加熱処理 (50°C30 分) し、GVPC 培地に 0.01、0.1、0.1mL ずつ塗抹し、37°C で 5 日間培養を行った。培養中にレジオネラ属菌様コロニーを確認したら、釣菌して BCYE α 寒天培地に移植して純培養した。純培養を行うときに、同時にそのコロニーを用いて遺伝子抽出を行い、LAMP 法及びリアルタイム PCR 法を用いてレジオネラ属菌及び *Legionella pneumophila* を確定した。培養 5 日後に培地上の青みを帯びた灰白色の湿潤コロニー (レジオネラ属菌様コロニー) を計数した。

EMA 処理 PCR 法：濃縮試料 2 mL に EMA (0、1.0、 $10\mu\text{g/mL}$) を添加し、遮光下 4°C 5 分間放置した後、500～650W の可視光を 5 分間照射した。この後、常法に従って定量リアルタイム PCR を行った。

残留塩素：DPD 法

一般細菌数：標準寒天培地法

(3) 結果および考察

結果を表 3 に示した。培養法と EMA 処理をしていない (-EMA) 試料の PCR 法の差をレジオネラ属菌の死菌量と仮定して、(死菌量 = 「PCR 法での測定値」 - 「培養法での測定値」)、表中に log 表記した。

培養法でレジオネラの生菌が検出された試

料は 20 試料であった。一方、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMA 処理を行った (+1.0EMA) 試料で生菌が検出されたのは 22 試料、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMA 処理を行った (+10EMA) 試料では 10 試料であった。

図 1 に結果をプロットすると、培養法と EMA 処理 PCR 法の結果が 1:1 の直線上に集約しなかった。培養法と+1.0 EMA 処理 PCR 法及び+10 EMA 処理 PCR 法の相関は、それぞれ $R = -0.020$ 及び $R = 0.8930$ で、培養法と+10 EMA 処理 PCR 法に相関が認められた。

しかし、培養でレジオネラ属菌が検出されているにもかかわらず、+10 EMA 処理で検出できなかった試料が 10 試料あり、このうち+1.0 EMA 処理では 6 試料からレジオネラ属菌を検出している。培養法の結果と同等の結果を求めるならば、+10EMA 処理だけでなく、+1.0 EMA 処理も行う必要があると思われる。この 6 試料以外にも、50 試料の中でも、+1.0 EMA 処理と+10EMA 処理の PCR 値が大きく異なる試料が複数見られた (試料 No.50 など)。

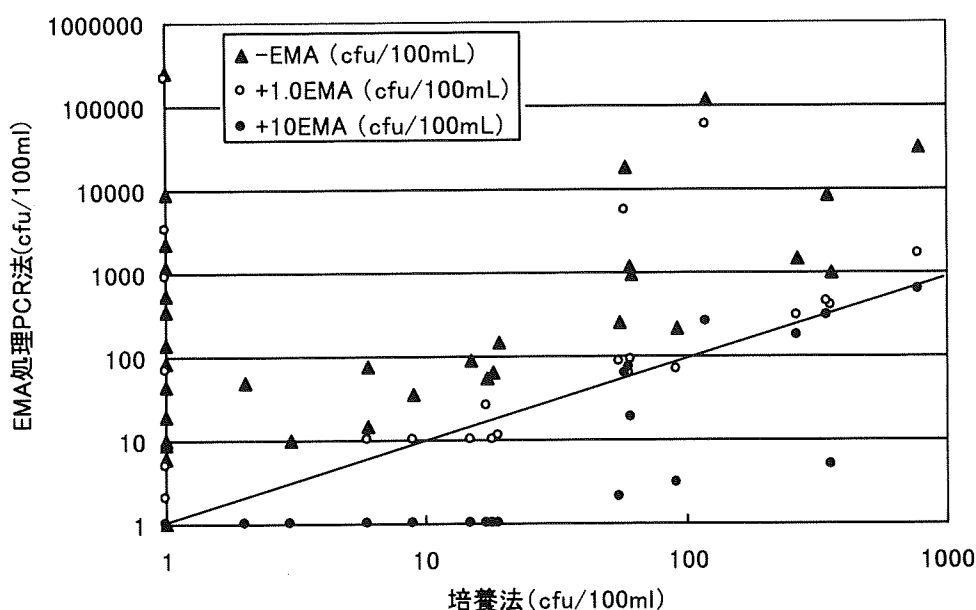


図1 培養法とEMA処理PCR法によるレジオネラ属菌の検出結果

そこで、残留塩素の値に注目し、残留塩素が 0.4 mg/L 未満の試料は+1.0 EMA 処理、0.4 mg/L 以上の試料は+10 EMA 処理の値を採用し、培養法と比較した結果を図 2 に示した。図示の都合上、不検出 ($<1\text{cfu}/100\text{mL}$) は 1 として表記した。この EMA 処理を残留塩素値 0.4 mg/L で変更する方法では、培養法でレジオネラ属菌が検出されているにもかかわらず、PCR 法で捕捉できなかった試料が 5 試料存在した。この方法と培養法の値を log 換算して相関を調べたところ (不検出は検出限界値 $1\text{cfu}/100\text{mL}$ の $1/10$ とした)、 $R = 0.8853$ と

高い相関を示した。

次に、死菌の量に注目した。死菌量の log 値が 3 未満の試料は+1.0 EMA 処理、3 以上の試料は+10 EMA 処理の値を採用し、培養法と比較した結果を図 3 に示した。この手法と培養法との相関を見たところ、 $R = 0.9679$ (寄与率 $R^2 = 0.9349$) と高い相関を示した。このことから、生菌のみを EMA 処理 PCR 法で検出させるには、死菌の DNA を切断し、なおかつ生菌に影響を与えない EMA 濃度で処理を行う必要があることが判明した。

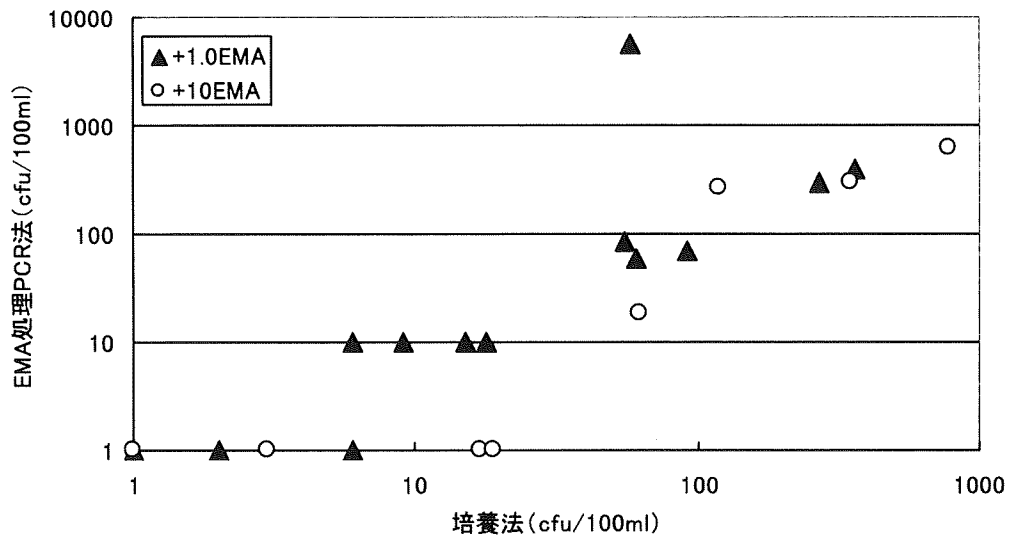


図2 残留塩素値によるレジオネラ属菌検出値

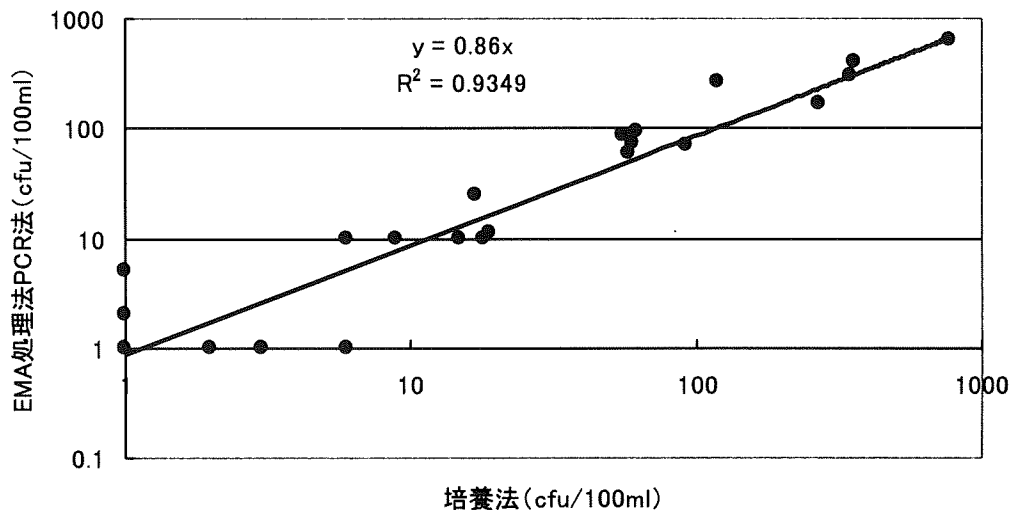


図3 死菌の量によるEMA処理濃度を変えた場合のレジオネラ属菌検出と培養法との比較

(4) まとめ

EMA 処理 PCR 法は、現在の測定条件では培養法の感度を下回るため、前処理等に工夫が必要であると考えられた。EMA は生菌には影響しないと考えられていたが、死菌の量が少なければ生菌の検出を抑制し、死菌の量が多ければ、多量の EMA が必要となる。EMA 処理試料から正確な生菌数を検出するには、死菌の量に対して適正な EMA 量が必要であ

り、死菌量の log 値が 3 前後で、適正な EMA 濃度に変化することが判明した。しかし、死菌量は測定前に推測することはできないため、残留塩素濃度で暫定的に EMA 濃度を決定することが有効であると考えられた。

これらのことから、EMA 処理 PCR 法は迅速に生菌を検出する手法として有用であると考えられた。

表3 浴場水 50 試料における測定結果

試料 No	培養法 (cfu/100mL)	-EMA (cfu/100mL)	+1.0EMA (cfu/100mL)	+10EMA (cfu/100mL)	残留塩素 (mg/L)	一般細菌数 (cfu/mL)	死菌の量 (log cfu/100mL)	備考
1	<1	<1	<1	<1	<0.05	30		白湯
2	15	88	10	<1	<0.05	66	1.86	白湯
3	360	990	400	5	<0.05	18	2.80	白湯
4	<1	<1	<1	<1	0.1	25		白湯
5	<1	<1	<1	<1	0.1	50		白湯
6	<1	19	<1	<1	0.1	13	1.28	白湯
7	6	78	10	<1	0.1	61	1.86	白湯
8	55	260	86	2	0.1	210	2.31	白湯
9	60	1200	60	71	0.1	690	3.06	白湯
10	<1	<1	<1	<1	0.2	37		白湯
11	2	50	<1	<1	0.2	77	1.68	白湯
12	9	35	10	<1	0.2	72	1.41	白湯
13	58	18000	5600	60	0.2	510	4.25	白湯
14	<1	<1	<1	<1	0.3	15		白湯
15	<1	<1	<1	<1	0.3	44		白湯
16	6	15	<1	<1	0.3	16	0.95	白湯
17	18	66	10	<1	0.3	29	1.68	白湯
18	92	210	70	3	0.3	93	2.07	白湯
19	270	1500	300	170	0.3	33	3.09	白湯
20	<1	<1	<1	<1	0.5	16		白湯
21	<1	<1	<1	<1	0.5	59		白湯
22	3	10	<1	<1	0.5	11	0.85	白湯
23	17	55	25	<1	0.5	130	1.58	白湯
24	350	8700	430	300	0.5	22	3.92	白湯
25	<1	<1	<1	<1	0.6	3		白湯
26	<1	6	<1	<1	0.6	0	0.78	白湯
27	1	9	<1	<1	0.6	2	0.90	白湯
28	19	150	11	<1	0.6	0	2.12	白湯
29	62	950	92	18	0.6	8	2.95	白湯
30	120	120000	59000	260	0.6	15	5.08	白湯
31	780	31000	1600	620	0.6	61	4.48	白湯
32	<1	<1	<1	<1	0.8	0		白湯
33	<1	<1	<1	<1	0.8	3		白湯
34	<1	140	<1	<1	0.8	0	2.15	白湯
35	<1	360	5	<1	0.8	0	2.56	白湯
36	<1	1200	68	<1	0.8	0	3.08	白湯
37	<1	<1	<1	<1	1.0	0		白湯
38	<1	<1	<1	<1	1.0	0		白湯
39	<1	10	<1	<1	1.0	0	1.00	白湯
40	<1	<1	<1	<1	1.5	0		白湯
41	<1	<1	<1	<1	1.5	0		白湯
42	<1	43	<1	<1	1.5	0	1.63	白湯
43	<1	550	2	<1	1.5	0	2.74	白湯
44	<1	2300	910	<1	1.5	0	3.36	白湯
45	<1	<1	<1	<1	2.0	0		白湯
46	<1	<1	<1	<1	2.0	0		白湯
47	<1	85	<1	<1	2.0	0	1.93	白湯

48	<1	<1	<1	<1	>2.0	0		白湯
49	<1	9100	3400	<1	>2.0	0	3.96	白湯
50	<1	250000	210000	<1	>2.0	0	5.40	白湯

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

迅速検査用阻害回避試薬の変更対応

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	猪又 明子	東京都健康安全研究センター環境保健部
	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、迅速検査法は阻害物質による偽陰性が問題となる。これまでに阻害回避試薬とアルカリ熱抽出による簡易抽出法の感度等向上を報告したが、昨年度に使用した阻害回避試薬の改良が行われ、同じ試薬が将来的に入手できなくなることが予定された。本研究では新しい試薬が昨年度と同等の性能を発揮するものか比較検討を行い、併せて阻害回避試薬の機能を改めて検証することとした。

昨年同様に依頼検体として持ち込まれた不特定多数の浴槽水 116 件からアルカリ熱抽出法の場合と、新旧の反応阻害回避試薬を用いての鋳型調製を行い、LAMP 反応の結果を比較した。アルカリ熱抽出法を基準として阻害回避試薬使用で反応が陽転したのは、阻害回避試薬の新版では 6 件、旧版が 7 件あった。反応の陰転は新版では 3 件、旧版では 4 件であったが、いずれも Tt 値が高く、少ない鋳型を分割した際の誤差が理由と考えられた。感度向上を意味する Tt 値の短縮は新版が 25 件、感度低下を意味する Tt 値の増加が 8 件と感度向上が明らかに認められた。旧版では短縮が 23 件、増加が 7 件と、新版との差はなかった。また Tt 値が短縮する場合は大きく短縮され、増加する場合はわずかであった。このことは Tt 値の平均値からも理解でき、アルカリ熱抽出のみでは 1603 秒、旧版では 1448 秒、新版では 1371 秒と、阻害回避試薬の効果による Tt 値の短縮が認められた。

依頼検体とは異なる、保健所が採水した洗浄指導後の施設浴槽水 46 件の場合、Tt 値の平均はアルカリ熱抽出法が 1464 秒、旧版が 1415 秒、新版が 1382 秒と、新版が最も Tt 値が少ない傾向にはあったが、差が少なかった。この保健所試料 46 件の場合は、反応の陽転などの顕著な改善は認められなかったが、元々の試料の阻害が少なく、見かけ上、改善効果が乏しく見えたと考えられた。保健所指導があった施設再開の判断に迅速検査の陰性結果を有効活用することができたが、これには阻害回避試薬があったほうがより安心できるものと思われた。

環境試料における迅速検査において、阻害が予想される試料に対して反応阻害回避試薬の利用が推奨された。

A. 研究目的

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活用に期待が寄せられているが、反応阻害による偽陰性が問題となる。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場合があり、培養法陽性、迅速検査法陰性の結果に至る場合もありえる。迅速検査法の信頼性向上にはこうした阻害物質対策が欠かせないことから、当該研究では阻害回避試薬の検討を行っている。本方法を用いるとカラム精製などを行わずに、簡便な鋳型調製が可能である。

昨年度の検討で使用した阻害回避試薬は製造に係る負担が大きく、より簡便に安定した製造を行うよう一部改良が企図された。一方、この改良により性能が低下することは避けたい。当該研究ではこれら新旧の阻害回避試薬を比較し、新しい製造に移行した場合も所定の性能が担保されること、ならびに昨年度の結果に再現性があること、を検証することとした。

B. 研究方法及び材料

試料水

平成 21 年 9 月から 11 月に浴槽施設あるいは管理会社から検査会社に委託された試料の一部、浴槽水等 116 件を検討対象とした。施設の種類としては公衆浴場、宿泊施設、スポーツクラブ、寮、病院、老人ホーム等で、浴槽の多くは循環式であった。試料は浴槽施設あるいは管理会社から自発的にレジオネラの検査依頼として出されたもので、実態に即した試料と考えられた。検討は、ここから培養試験法ならびに迅速検査法によるレジオネラ属菌の検出を行った。採水箇所等の情報は受付票を用いた自己申告に従った。

以上とは別に、保健所の指導目的で採水されたレジオネラ陽性施設の洗浄後確認検査のための採水浴槽水 46 件を測定対象とした。

試料調製

委託試料では採水試料 500ml を定法に従い 100

倍にろ過濃縮し、濃縮試料 5ml のうち 1ml を培養法に、4ml を核酸抽出に使用した。培養は濃縮試料 1ml を加熱処理 (50°C、30 分間) 後、GVPC 寒天培地 (ビオメリュー) および WYO α 寒天培地 (栄研化学) に植菌した。

保健所試料では 1L を 5ml の 200 倍にろ過濃縮し、2ml を培養法、3ml を遺伝子検査法に使用した。培養には酸処理 (0.1M HCl-KCl、pH2.2、1 分間攪拌、2~4 分間静置) 後、WYO α 寒天培地、GVPC α 寒天培地に各 2 枚ずつ、1 枚あたり 0.25ml を塗布した。この場合の最小検出菌数は 1cfu/100ml となる。

LAMP 法

レジオネラ属菌検出用の Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) を使用した。核酸抽出は添付試薬によるアルカリ熱抽出を行った。

委託試料では 2ml チューブ 2 本を用いて濃縮試料 4ml から再遠心濃縮を行い、濃縮液約 80 μ L (40 μ L \times 2) を得て、ここから核酸抽出を行った。直ちに核酸抽出しない場合は、この再濃縮液を -20 $^{\circ}$ C にて冷凍保存した。再濃縮液に EX Leg 試薬 100 μ L を添加して 2 本のチューブを 1 本にまとめた後、熱処理 95 $^{\circ}$ C 15 分間を行い、直後に氷冷した。そして Tris 試薬 16 μ L を添加して中和した。ここから 49 μ L ずつ新しいチューブ 2 本に取り分け、一方に阻害回避試薬新版 (栄研化学) 5 μ L を添加し、もう一方に旧版 5 μ L を加えた。残りはアルカリ熱抽出のみとした。

保健所試料では 3ml 濃縮試料より再遠心濃縮し、40 μ L の濃縮試料を得た。EX Leg 試薬 50 μ L を添加し熱処理と氷冷後、試料を 3 分割し、アルカリ抽出のみ、阻害回避試薬新版、旧版とした。

それぞれ小型冷却遠心機で 10 分間遠心分離を行い、上清 5 μ L を LAMP 反応に使用した。反応条件は添付文書の指示に従い、65 $^{\circ}$ C 1 時間とした。測定装置は Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C (栄研化学) を用いた。

C. 結果ならびに考察

1. 培養試験

委託試料から得た測定値のうち、いずれかの方法で検出された 45 試料の結果を抜粋して表 1 に示した。WYO α 培地で3% (3/116 試料)、GVPC 培地で 3% (4/116 試料) が培養陽性となった。いずれも低濃度の検出で、培養が一致したのは 1 件だけで他は不一致となり、試料を分割する際に生じた確率論的な誤差が大きいと考えられた。

保健所試料よりいずれかの方法で検出された 17 試料については、別添資料の表 2 にまとめられている。培養法で 10cfu/100ml を超過したのは 46 試料中 1 件のみで、7 件は 1~6cfu/100ml であった。洗浄指導後の試料なので、基本的に生菌検出はないことを期待しているはずだが、洗浄の難しさが改めて指摘されるものと考えられた。

2. 委託試料における阻害回避試薬の効果

アルカリ熱抽出法を基準として阻害回避試薬使用で反応が陽転したのは、阻害回避試薬の新版では 6 件、旧版が 7 件あった。反応の陰転は新版では 3 件、旧版では 4 件であったが、いずれも Tt 値が高く、少ない鑄型量によるぶれが原因と考えられた。

感度向上を意味する Tt 値の短縮は新版が 25 件、旧版が 23 件、感度低下を意味する Tt 値の増加が新版は 8 件、旧版は 7 件と感度向上が明らかに認められた。Tt 値が短縮する場合は大きく短縮され、増加する場合はわずかな傾向にあり、Tt 値の平均値は、アルカリ熱抽出のみでは 1603 秒、旧版では 1448 秒、新版では 1371 秒と、阻害回避試薬の効果による Tt 値の短縮が認められた。

培養菌数が少なく、LAMP 陽性の多くは死菌の検出と考えられた。確率論的な誤差が大きな評価になったかもしれないが、それでも阻害回避試薬の効果を得ることができた。

3. 保健所試料における阻害回避試薬の効果

アルカリ熱抽出法を基準として阻害回避試薬使用で反応が陽転したのは、阻害回避試薬の新版では 3 件、旧版が 3 件あった。反応の陰転は新版

では 2 件、旧版では 0 件であった。

感度向上を意味する Tt 値の短縮は新版が 5 件、旧版が 8 件、感度低下を意味する Tt 値の増加が新版は 5 件、旧版は 4 件と感度向上の効果は乏しかった。

Tt 値の平均値は、アルカリ熱抽出のみでは 1464 秒、旧版では 1415 秒、新版では 1382 秒と、阻害回避試薬の効果による Tt 値の短縮が認められたが、アルカリ熱抽出のみの Tt 平均値は委託試料に比べて最初から短く、阻害回避試薬の平均値に近く、阻害がほとんど無かったものと考えられた。

D. 考察

迅速検査法は阻害物質による偽陰性が生じる場合があることから、阻害物質を回避することが必要である。一方、簡便な鑄型調製法は必要であり、当該研究ではアルカリ熱抽出法と阻害回避試薬の組み合わせ使用を検討してきた。阻害回避試薬の改良に伴い、新旧の試薬を比較し、併せて試薬により所定の効果が得られることを確認した。

阻害回避試薬を使用した結果、Tt 値は多くの場合で短縮され、反応性が高まった。特に当該研究で用いた委託検査に出された試料において、改善傾向は明らかであった。一方、保健所試料では改善に乏しく、Tt 値の平均値から考えて、最初から阻害が少なかったものと考えられた。なお、保健所指導があった施設再開の判断に迅速検査の陰性結果を有効活用することができた。これには阻害回避試薬があったほうがより安心できるものと思われた。

環境試料における迅速検査において、阻害が予想される試料に対して反応阻害回避試薬の利用が望ましいと考えられた。

E. 結論

アルカリ熱抽出法への反応阻害試薬の利用による Tt 値の短縮等の改善を再確認した。新旧のいずれの阻害回避試薬を用いても同様の効果が得ら

れ、試薬改良の影響は受けなかった。保健所指導があった施設再開の判断に迅速検査の陰性結果を有効活用することができた。迅速検査法の信頼性向上に、阻害が予想される試料に対して阻害回避試薬の利用が望ましいと考えられた。

参考文献

- 1 「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」厚生労働科学研究費補助金健

康安全・危機管理対策総合研究事業、主任研究者 倉 文明、H20 年研究報告書より、「DNA 抽出法の改良」遠藤卓郎ら

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし