

表 1 委託試料よりいずれかの方法でレジオネラ属菌が検出された 45 試料の結果一覧

検体番号	培養法		培養法合計 WYO+GVPC	Tt値		
	WYO (cfu/100ml)	GVPC (cfu/100ml)		アルカリ熱 抽出法	阻害回避試 薬旧版	阻害回避試 薬新版
A0905193	0	0	0	0	0	1236
A0904154	0	0	0	0	0	1386
A0904127	0	0	0	0	1152	1248
A0904407	0	0	0	0	1488	1338
A0904172	0	0	0	0	1536	0
A0905198	0	0	0	0	1608	0
A0904174	0	0	0	0	1656	1860
A0904341	0	0	0	0	1824	1356
A0905173	0	0	0	0	2028	0
A0904152	0	0	0	1062	1062	1080
A0904238	0	0	0	1104	1122	1170
A0904126	0	0	0	1122	1056	1074
A0904128	0	0	0	1122	1074	1092
A0905152	0	0	0	1128	1188	1098
A0904196	0	20	20	1158	1146	1152
A0904295	0	0	0	1164	1122	1098
A0904374	0	0	0	1164	1164	1044
A0904340	0	0	0	1218	1254	1170
A0905182	0	0	0	1224	1296	1260
A0904239	0	0	0	1326	1224	1188
A0904339	0	0	0	1326	1284	1206
A0904400	0	0	0	1332	1326	1656
A0904398	0	0	0	1356	1248	1164
A0904258	0	0	0	1374	1164	1164
A0904048	0	0	0	1386	1260	1614
A0904373	0	10	10	1398	1458	1458
A0905183	0	0	0	1440	1368	1290
A0904312	0	0	0	1440	1398	1284
A0904050	0	0	0	1476	1464	1254
A0905197	0	0	0	1524	1428	1188
A0905185	0	0	0	1542	2454	1440
A0904447	0	0	0	1548	1332	1236
A0905200	10	10	20	1590	1368	1236
A0905168	0	0	0	1620	0	1566
A0904353	10	0	10	1692	1398	1362
A0905229	0	0	0	1788	1542	1950
A0904178	10	0	10	1800	1482	1536
A0905211	0	0	0	1806	0	1662
A0904352	0	0	0	1956	1254	1290
A0905192	0	0	0	2088	0	0
A0904175	0	0	0	2250	3402	0
A0905155	0	0	0	2478	1518	2688
A0904354	0	0	0	2676	1920	2076
A0904177	0	0	0	2934	0	0
A0904296	0	10	10	3108	1416	1314

※不検出は「0」と表示した。

## [資料]

平成 21 年度厚生労働科学研究（健康安全・  
危機管理対策総合研究事業）

### 阻害回避試薬によるレジオネラの高感度核酸 迅速検査法

研究協力者  
東京都健康安全研究センター  
猪又明子

#### 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期待が寄せられているが、反応阻害による偽陰性が生じる場合があることが問題となっている。たとえば、温泉水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ることから、培養法が陽性でも迅速検査法が陰性となる可能性がある。したがって、迅速検査法の信頼性向上には阻害物質対策が欠かせない。

近年、このような阻害物質の反応阻害を抑制する添加試薬が開発され、実用化されてきた。当該研究では、このような試薬を用いて実際の浴槽水等の試料への適用を試みた。検出感度 1CFU/100mL の培養法を比較対照として行い、迅速検査法が 1CFU/100mL レベルのレジオネラ属菌を検出できるかどうかを検討した。

#### B. 研究方法

##### 試料水

平成 21 年 6 月から 12 月に採取した浴槽水（白湯、薬湯、温泉）及びプール水計 46 検体を検討対象とした。これらの検体は、行政検体としてレジオネラ属菌検査を行った結果、基準値以上（10 CFU/100mL）のレジオネラ属菌が検出され、その後の洗浄作業後の確認検査として採水されたものである。採水は全て保健所の職員が行い、培養試験法及び迅速検査法によるレジオネラ属菌の検査を行った。

##### 試料調製

採水試料 1L を 200 倍にろ過濃縮し、濃縮試料 5mL のうち 2mL を培養法に、3mL を核酸抽出に使用した。培養法は以下の手順で行った。濃縮試料 2mL を酸処理（等量の 0.2M HCl-KCl, pH2.2 を添加し、1 分間攪拌後、室温で 2~4 分間放置）後、WY0 $\alpha$  寒天培地（栄研化学）2 枚と GVPC $\alpha$  寒天培地（日研生物医学研究所）2 枚に 0.25mL ずつ塗布し、36°C で 7 日間培養した。3 日目から出現してきた灰白色の湿潤集落をレジオネラ属菌様集落として計数し、その代表的な集落を BCYE $\alpha$  寒天培地（BBL）及び血液寒天培地に移植して 36°C で最長 5 日間培養観察した。血液寒天培地に発育せず、BCYE $\alpha$  寒天培地に発育したものをレジオネラ属菌とした。分離した菌株は、主にラテックス凝集反応（OXOID）及び免疫血清（デンカ生研）を用いた凝集反応により菌種及び血清群を同定した。本法による最小検出菌数は 1CFU/100mL となる。

##### LAMP 法

レジオネラ属菌検出用の Loopamp レジオネラ検出キット E（栄研化学）を使用し、核酸抽出にはキットの添付試薬を用いたアルカリ熱抽出を行った。200 倍に濃縮した濃縮試料 3mL を遠心濃縮し、40 $\mu$ L の再濃縮液を得た。この再濃縮液に EX Leg 試薬 50 $\mu$ L を添加し、95°C 15 分間の加熱処理を行った後、氷冷した。さらに Tris 試薬 8 $\mu$ L を添加して中和を行った。ここからサンプルを 3 分割し、1 本に阻害回避試薬 1、もう 1 本に阻害回避試薬 2、残りの 1 本はそのままとした。それぞれ小型冷却遠心機で 10 分間遠心分離した上清 5 $\mu$ L を LAMP 反応に使用した。反応条件は 65°C、1 時間で行った。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）を用いた。

#### C. 研究結果

## 1. 培養試験

全 46 検体の検査結果を表 1 に示した。培養試験で陽性 (1 CFU/100mL 以上検出) となった検体は 11 検体、陽性率は 23.9%であった。レジオネラ属菌検出 (10 CFU/100mL 以上) に伴う洗浄作業後の検体であることから、検出菌数の少ない検体が多く、1 CFU/100mL が 4 検体、2 CFU/100mL が 4 検体、3 CFU/100mL、6 CFU/100mL 及び 20 CFU/100mL が各 1 検体であった。

## 2. 阻害回避試薬の効果

阻害回避試薬 1, 又は 2 を添加した場合の陽性検体はいずれも 19 検体 (陽性率 41.3%) であり、阻害回避試薬を添加しない場合 (陽性検体 16 検体、陽性率 34.8%) に比べて、陽性となる試料が多くなった。阻害回避試薬 1 の添加により陽転した検体は 3 検体、陰転した検体はなかった。阻害回避試薬 2 の添加により陽転した検体は 5 検体 (うち 1 検体は培養法で陽性)、陰転した検体は 2 検体 (培養法で陰性) であった。

培養法で陽性にもかかわらず迅速検査法で陰性となった試料は 1 検体のみであった。この検体の菌数は 1 CFU/100mL と低かったことから、試料を分割する際の確率論的な誤差と考えられた。

迅速検査法のいずれかで陽性となった試料のうち、Tt 値データが得られた 17 検体の結果を表 2 にまとめた。阻害回避試薬の添加により Tt 値が減少した検体数は、阻害回避試薬 1 で 8 検体、阻害回避試薬 2 で 5 検体であった。しかし、Tt 値が増加した検体が阻害回避試薬 1 で 4 検体、阻害回避試薬 2 で 5 検体あり、明らかな感度の向上は認められなかった。

## 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、阻害の回避が不可欠である。また、これまでの検討では、菌数が 10~20 CFU/100mL と少ない場合に、迅速検査

法が陰性となる場合があった。迅速検査法の信頼性を高めるためには、低レベルの汚染を感度良く検出できることを確認する必要がある。

そこで、当該研究では試料水を従来の 500mL から 1L に増加し、200 倍に濃縮した試料各 1mL を迅速検査法に用いた。培養法には 100 倍に濃縮した試料 1mL を用いた (最小検出菌数 1 CFU/100mL)。その結果、培養法で 1~6 CFU/100mL のわずかな菌数であった 10 検体のうち、8 検体について阻害回避試薬を用いない迅速検査法により検出することができた。さらに、阻害回避試薬 2 の添加により菌数 1 CFU/100mL の 1 検体が陽転した。この陽転試料は白湯であることから、阻害回避試薬は温泉水だけでなく、白湯にも有効であることが示された。したがって、検査試料が温泉であるかどうかにかかわらず、阻害回避試薬を常用することが望ましいと考えられた。今回の検討では、温泉や薬湯の検体が少ないため、これらに対する阻害回避試薬の効果を十分に検証することはできなかった。今後は温泉や薬湯への阻害回避試薬の効果を検証したい。

東京都では、平成 21 年度から行政検査時のレジオネラ属菌検査で 10CFU/100mL 以上検出された後の施設再開のための確認検査に、迅速検査法を導入した。迅速検査法の結果が陰性の場合には、培養法の結果を待たずに施設の再開を認める。この結果、従来レジオネラ属菌陰性の結果を得るまでに最低 1 週間必要であったが、迅速法の導入により 1~2 日で結果が判定できることとなり、施設停止期間の大幅な短縮化が図れるようになった。迅速検査法で陽性の場合には、培養法の結果が出るまで施設の再開を待ってもらうことにしているが、培養法の結果を待たずに自主的に再度洗浄を行う施設もあった。迅速検査法の結果が陰性で培養法が陽性となったのはわずか 1 検体であり、その菌数は基準値よりはるかに低い 1CFU/100mL であった。したがって、迅速検査

査法の結果が陰性であれば施設再開を認めるという行政対応に問題はなく、迅速検査法の導入によるメリットは非常に大きいと考えられる。

#### E. 結論

試料水の濃縮倍率を 200 倍にすることにより、10 CFU/100mL 未満の低レベルのレジオネラ属菌汚染を迅速検査法により検出できることがわかった。阻害回避試薬の添加により、迅速検査法の陽性率の向上が見られ、この阻害回避試薬の常用が望ましいと考えられた。試料水の濃縮倍率の向上と阻害回避試薬の利用により、迅速検査法の偽陰性率が低減でき、信頼性の向上に寄与すると考えられる。

表 1. 迅速検査法と培養法の検査結果

No.	種類	残留塩素濃度 (mg/L)	迅速検査法			培養法 (CFU/100mL)
			なし	阻害回避剤1	阻害回避剤2	
1	白湯	2.5	-	-	+	0
2	白湯	2.5	-	-	-	0
3	白湯	2.5	+	+	+	2
4	白湯	2.5<	-	-	-	0
5	白湯	2.5<	-	-	-	0
6	白湯	1.5	-	-	-	0
7	白湯	1.5	+	+	+	1
8	白湯	2.5	-	-	-	0
9	白湯	1	-	-	-	0
10	薬湯	2	-	-	+	0
11	白湯	2	-	-	-	0
12	白湯	2.5<	-	-	-	0
13	プール	1	+	+	+	1
14	白湯	2.5<	-	+	+	0
15	白湯	欠測	-	-	-	0
16	白湯	欠測	-	-	-	0
17	白湯	0.5	-	-	-	0
18	温泉	欠測	-	-	-	0
19	白湯	2	-	-	-	0
20	温泉	1.5	-	-	-	0
21	温泉	1.5	-	-	-	0
22	温泉	1	-	-	-	0
23	白湯	2	+	+	+	0
24	白湯	1	+	+	+	2
25	白湯	0.7	-	-	+	1
26	白湯	2.5	-	-	-	0
27	白湯	0.4	+	+	+	0
28	白湯	0	-	-	-	1
29	白湯	0.8	-	-	-	0
30	白湯	0.7	-	-	-	0
31	白湯	2	-	-	-	0
32	白湯	0.8	+	+	+	0
33	白湯	2	-	-	-	0
34	白湯	2<	-	-	-	0
35	白湯	0.7	+	+	+	2
36	白湯	痕跡	+	+	+	0
37	温泉	0.05	+	+	+	2

38	温泉	0.05	+	+	+	6
39	白湯	1.5	-	+	-	0
40	温泉	0	+	+	+	3
41	温泉	1.5	+	+	-	0
42	温泉	2	-	+	+	0
43	温泉	2.5<	+	+	+	20
44	白湯	2.5<	-	-	-	0
45	温泉	1	+	+	+	0
46	温泉	1.2	+	+	-	0
陽性数			16	19	19	11

表2. 阻害回避剤の有無による Tt 値の変化

No.	Tt 値(秒)			Tt 値の比較		培養法 (CFU/100mL)
	なし	阻害回避剤 1	阻害回避剤 2	阻害回避 剤1	阻害回避 剤2	
13	1152	1326	1164	増加	増加	1
14	-	2010	1914	陽転	陽転	0
24	1554	1512	1782	減少	増加	2
25	-	-	1428	-	陽転	1
27	2196	2052	2874	減少	増加	0
32	1332	1494	1038	増加	減少	0
35	1356	1458	1356	増加	-	2
36	1098	1068	1200	減少	増加	0
37	954	1152	870	増加	減少	2
38	1002	930	900	減少	減少	6
39	-	1128	-	陽転	-	0
40	1542	1488	1362	減少	減少	3
41	2412	1284	-	減少	陰転	0
42	-	2178	1218	陽転	陽転	0
43	978	978	1002	-	増加	20
45	1980	1236	1242	減少	減少	0
46	1470	1350	-	減少	陰転	0
			Tt 値減少	8	5	
			変化無し	2	2	
			Tt 値増加	4	5	

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

qRT-PCR 及び阻害回避試薬を用いた LAMP 法の浴槽水等試料における検討

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
	矢崎 知子	宮城県保健環境センター

研究要旨：浴槽水等の 227 検体（4 県の合計）及び昨年度保存した浴槽水濃縮試料 40 検体についてレジオネラ属菌の検出を行った。RNA を鋳型とした定量的 PCR（qRT-PCR）法、新しい阻害回避試薬を用いた LAMP 法という迅速検査を、従来の qPCR 法及び培養法と比較検討した。qRT-PCR 法は、qPCR 法に比べさらに検出率が高く、qPCR 法陽性の検体における両法の菌数分布も比較的強い相関が見られたことから、qPCR 法よりもさらに高感度で定量性のある検査法であると考えられた。新しい阻害回避試薬を用いた LAMP 法では、従来のアルカリ熱処理法、キレックス法に比べ検出感度が大幅に改善された。

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。

[A] 培養法、qPCR 法、qRT-PCR 法の 3 法を定性判定で比較検討した結果(56 検体)、レジオネラ属菌の検出率は、培養法で 46.4%、qPCR 法で 75.0%、qRT-PCR 法で 96.4 %となり qRT-PCR は高感度であった。10cfu/100ml を検出下限とした定量判定での

検出率は、qPCR 法で 67.9%、qRT-PCR 法で 76.9 %であった。両者とも、定量判定の方がより培養法に近い結果を示した。qPCR 法と qRT-PCR 法は高い相関 ( $R^2=0.806$ ) を示した。

なお、定量判定において、培養法陽性で qRT-PCR 法陰性例が 2 例存在した（定性判定では陽性）。いずれもインターナルコントロールの反応からは PCR 反応阻害の無いこ

とが確認されている。うち 1 件は *L. londiniensis* が検出され、用いたプライマー、プローブによる qRT-PCR 法で検出困難な菌種であった。もう 1 件は、褐色沈殿の多く認められた昨年度の保存試料であった。

今回検討を行った浴槽水は 6 割以上が温泉水であり、有色沈殿が見られる試料も 4 割程度存在したが、qPCR 法、qRT-PCR 法ともに、培養法陽性検体ではすべて遺伝子が検出可能であった。qRT-PCR 法は培養法との比較において qPCR 法と同等以上であり、手技も比較的簡易なことから、温泉水からのレジオネラ属菌迅速検出に有用な試験法と考えられた。

[B] DNA の抽出法を 3 通りに変えて LAMP 法によるレジオネラ検出結果を比較した。検水 46 件中、レジオネラ属菌陽性 (> 10cfu/100ml) となったのは、培養法 21 件 (46%)、LAMP 法ではキレックス法で 21 件 (46%)、従来のアルカリ熱処理法で 19 件 (42%)、阻害回避試薬によるアルカリ熱抽出で 23 件 (50%) であり、阻害回避試薬を併用した DNA 抽出法が最も検出率が高かった。培養でレジオネラ属菌が分離されたにも関わらず、LAMP 法で算出されるレジオネラ属菌数がいずれの遺伝子抽出法でも基準値 10cfu/100ml より少なかった検水は 4 件で、培養法の菌数は 10cfu/100ml と少なく、濃縮液を検討項目別に分けた時にレジオネラ属菌がそれぞれの濃縮液に含まれる確率の問題と考えられた。キレックス法、アルカリ熱抽出法で 10cfu/100ml 未満で、阻害回避試薬併用法で 10cfu/100ml 以上となった浴槽水は 2 件、その 1 件は薬湯であった。

阻害回避試薬併用で Tt 値が減少 (感度上昇) したのは、従来法と比べ 27 件、キレックス法と比べると 30 件であった (一方、Tt 値が増加したのは、従来法と比べ 3 件、キレックス法と比べ 5 件と少なかった)。

LAMP 法はおもに定性試験として用い、Tt 値が確認できた検体を基準値によらずすべて陽性として改めて培養法との比較を行うと、培養陽性、LAMP 法陰性という検体は大きく減少した。

[C] 浴槽水 57 検体について、培養法では、3 検体 (5.3%) が陽性となり、遺伝子検査法では qPCR 法が 32 検体 (56.1%)、qRT-PCR 法は 42 検体 (73.7%) が陽性となった。また、培養法の基準値 (10cfu/100ml) を超過して検出された検体は、qPCR 法が 5 検体 (8.8%)、qRT-PCR 法は 7 検体 (12.3%) で、基準値の区分によらず検出率は qRT-PCR 法 > qPCR 法 > 培養法の順に高かった。培養法で検出されたレジオネラは、すべて *L. pneumophila* であった。

培養法で陽性となった検体は遺伝子検査法でも陽性であり、qRT-PCR 法が陽性の検体はほとんどが qPCR 法でも陽性であった (1 検体のみ qRT-PCR 法で陰性、qPCR 法は陽性)。また、遺伝子検査法で検出された菌数が培養法の基準値 (10cfu/100ml) を超過して検出された検体では、培養陽性検体は qRT-PCR 法および qPCR 法とも陽性で、また qPCR 法陽性検体は qRT-PCR 法でも陽性であった。

培養法陽性の検体は、残留塩素濃度は 0mg/L であったことから、衛生管理が不十分であったためと思われる。また、これ以



外では 9 検体が残留塩素濃度 0~0.2mg/L 未満で、培養法ではレジオネラは検出されなかったが、qRT-PCR 法により 9 検体すべてが、qPCR 法では 6 検体が陽性となったことから、これらの浴槽水では潜在的なレジオネラ汚染が示され、衛生管理の徹底が必要であると思われた。5 検体の RNA 抽出液において遠心後の管底に夾雑物の沈渣が残っていたが、4 検体は qRT-PCR 法陽性であったことから、高希釈して使用する方法で RT 反応や qPCR 反応の阻害は回避できるものと思われた。

[D]キレックス溶液による抽出量を 200  $\mu$ l から 40  $\mu$ l に変更することにより、検出感度

が高くなり、qPCR について安定した成績が得られた。浴槽水等のろ過濃縮試料で、簡便で、安価な DNA 抽出方法としての汎用性が期待される。一方、*Legionella* 属菌数が少ない検体の場合等は、培養法 (+) LAMP 法 (-) の不一致の一因となった。

併せて、斜光法を取り入れた培養法の迅速化についても検討を行った。その結果、より短い期間で正確な培養結果が得られ、特殊な分析機器も必要としないことから、浴槽水等の *Legionella* 属菌培養検査に大いに役立つことが示された。

## [A]

### 浴槽水を用いた迅速検査法と培養法の比較検討

#### A 目的

レジオネラ属菌は発育が遅く、菌種の同定までに約1週間を要することから、短時間での検査法の開発が求められている。そこで、19年度に迅速検査法であるLAMP法、qPCR法と培養法の比較を行ったが、DNA抽出法、検査法ともに課題が残った。本年度は、改良された核酸抽出法を用いたqPCR法に加え、本研究班が新たに提唱したqRT-PCR法を用い培養法との比較検討を行ったので報告する。

#### B 方法

##### 1. 材料

本年度搬入された浴槽水検体56件（温泉36件、白湯17件、井戸水3件）について、qPCR法、qRT-PCR法と培養法の比較を行った。加えて、昨年度採取し保存していた浴槽水濃縮試料40件（温泉24件、白湯13件、井戸水3件）について、qRT-PCR法と培養法の比較を行った。

##### 2. 検体の濃縮・培養

浴槽水500mlをポリカーボネートISOPORE（直径47mm 0.4 $\mu$ m ミリポア社）でろ過し、5mlのDWに再浮遊させた100倍濃縮液を試料とした。この試料を加熱処理後、100 $\mu$ lをGVPC培地で培養しレジオネラ属菌数の算定および同定を行った。核酸増幅検査用には上記100倍濃縮試料2mlを15,000rpmで5分間遠心後上清1,900 $\mu$ lを除去した2,000倍濃縮液100 $\mu$ lを使用した。

##### 3. 検量線の作成

*L.pneumophila* 長崎 80-045 を BCYE  $\alpha$  培地で30 $^{\circ}$ C4日間培養後、菌液を生理食塩水でMcF2程度に調整し、10倍希釈系列を作成した。各希釈系列を培養し菌数を測定すると共に、各希釈液1mlを100 $\mu$ lに遠心濃縮し、DNA及びRNA

抽出を行いqPCR、qRT-PCRのための検量線を作成した。

#### 4. 核酸抽出

DNA抽出は本研究班作成の泉山・田栗のB法（改良酵素溶菌法）に準じた。抽出カラム、及びBufferはMonoFasレジオネラ属菌ゲノムDNA抽出キット（GLサイエンス社）を使用した。RNA抽出は研究班作成の泉山・鳥谷の方法に従った。

#### 5. リアルタイムPCR（qPCR）

CycleavePCR Legionella (5SRNA) 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。

#### 6. リアルタイムRT-PCR（qRT-PCR）

逆転写反応（RT）にはPrimeScript RT reagent KitとLegionella 5S rRNA reverse primer（以上タカラバイオ）を使用した。

#### C 結果

##### 1. 検量線の作成

qPCRの検量線は $9.8 \times 10^0 \sim 9.8 \times 10^5$  (cfu/tube)の範囲で( $R^2=0.994$ )の直線性を示した。qRT-PCRの検量線では、 $4.9 \times 10^{-4} \sim 4.9 \times 10^2$  (cfu/tube)の範囲で( $R^2=0.996$ )の直線性を確認した（図1）。

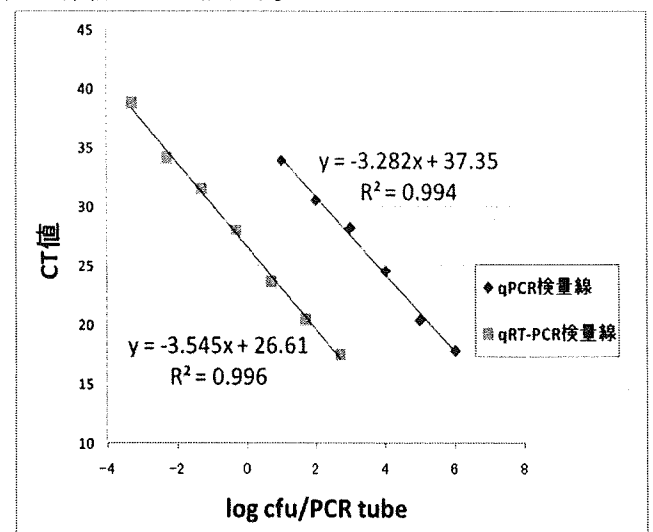


図1 qPCR 検量線と qRT-PCR 検量線

## 2. 培養法と qPCR 法、qRT-PCR 法との比較 (n=56)

56 件を用いて 3 法を定性判定で比較検討した結果、レジオネラ属菌の検出率は、培養法で 46.4% (26/56)、qPCR 法で 75% (42/56)、qRT-PCR 法で 96.4% (54/56) であった (表 1-a)。10cfu/100ml を検出下限とした定量判定での検出率は、qPCR 法で 67.9% (38/56)、qRT-PCR 法で 76.9% (43/56) であった (表 1-b)。両者とも、定量判定の方がより培養法に近い結果を示した。培養で陽性であった検体は qPCR 法、qRT-PCR 法ともに全てが陽性であった。

qPCR 法、qRT-PCR 法と培養法との相関は、それぞれ  $R^2=0.466$ 、 $R^2=0.533$  であり、2 法の比較においては qRT-PCR 法がやや高い値を示した (図 2、3)。また、qPCR 法と qRT-PCR 法は高い相関 ( $R^2=0.806$ ) を示した (図 4)。qPCR 法、qRT-PCR 法ともに、インターナルコントロールの反応から、PCR 反応阻害の無いことを確認した。

## 3. 培養法と qRT-PCR との比較 (n=40、n=96)

更に昨年度採取した濃縮試料 40 件についても qRT-PCR 法を行い、培養結果と比較した。定性判定でのレジオネラ属菌の検出率は、培養法で 72.5% (29/40)、qRT-PCR 法で 97.5% (39/40) であり、本年度とほぼ同様の結果であった (表 2-a)。定量判定では、qRT-PCR 法での検出率は 82.5% (33/40) であり (表 2-b)、培養法との相関は  $R^2=0.378$  であった (図 5)。なお、定量判定において、培養法陽性で qRT-PCR 法陰性例が 2 例存在した。これらは微量ながら遺伝子は検出されており (定性判定では陽性)、いずれもインターナルコントロールの反応からは PCR 反応阻害の無いことが確認されている。うち 1 件は DDH 等で同定不可能な

レジオネラ属菌が検出された浴槽水サンプルであり、qRT-PCR 法で検出不可能な菌種である可能性が考えられた。もう 1 件は、原因の特定には至らないが、褐色沈殿の多く認められた昨年度の試料であり、保存や濃縮、RNA 抽出等のいずれかに問題があったものと考えられた。

本年度と昨年度を合わせた 96 件の浴槽水検体でのレジオネラ属菌の検出率は、培養法で 57.3% (55/96)、qRT-PCR 法では定性で 96.9% (93/96)、定量では 79.2% (76/96) であった (表 3-a、b)。また、qRT-PCR 法と培養法との相関は  $R^2=0.466$  であった (図 6)。

## D 考察

今回検討を行った浴槽水は 6 割以上が温泉水であり、有色沈殿が見られる試料も 4 割程度存在したが、qPCR 法、qRT-PCR 法ともに、培養法陽性検体ではすべて遺伝子が検出可能であった。浴槽水からの改良酵素溶菌法による DNA 抽出検体、泉山・鳥谷の方法による RNA 抽出検体は、ともに qPCR 時の増幅阻害は認められなかった。また、qRT-PCR 法は qPCR 法と高い相関を示すことを確認した。qRT-PCR 法では、RT 反応のステップが追加されるが、RNA 抽出処理はカラムを使用する DNA 抽出と比較して手技の煩雑さが少なく、同数の検体処理に要する時間も DNA カラム抽出の 2/3 程度であった。また、昨年度の保存濃縮試料を使用した qRT-PCR 法の測定においても、本年度と同様の結果が得られることを確認した。

以上により、qRT-PCR 法は培養法との比較において qPCR 法と同等以上であり、手技も比較的簡易なことから、温泉水からのレジオネラ属菌迅速検出に有用な試験法と考えられた。

表 1 培養法、qPCR 法、qRT-PCR 法の比較  
(n=56)

a) 定性

●培養法とqPCR法

		qPCR		計
		陽性	陰性	
培養	陽性	26	0	26
	陰性	16	14	30
計		42	14	56

●培養法とqRT-PCR法

		qRT-PCR		計
		陽性	陰性	
培養	陽性	26	0	26
	陰性	28	2	30
計		54	2	56

●qPCR法とqRT-PCR法

		qRT-PCR		計
		陽性	陰性	
qPCR	陽性	42	0	42
	陰性	12	2	14
計		54	2	56

b) 定量 (核酸検出法陽性 10cfu/100ml 以上)

●培養法とqPCR法

		qPCR		計
		陽性	陰性	
培養	陽性	26	0	26
	陰性	12	18	30
計		38	18	56

●培養法とqRT-PCR法

		qRT-PCR		計
		陽性	陰性	
培養	陽性	26	0	26
	陰性	17	13	30
計		43	13	56

●qPCR法とqRT-PCR法

		qRT-PCR		計
		陽性	陰性	
qPCR	陽性	39	0	39
	陰性	4	13	17
計		43	13	56

表 2 培養法、qRT-PCR 法の比較 (n=40)

a) 定性

		qRT-PCR		計
		陽性	陰性	
培養	陽性	29	0	29
	陰性	10	1	11
計		39	1	40

b) 定量 (核酸検出法陽性 10cfu/100ml 以上)

		qRT-PCR		計
		陽性	陰性	
培養	陽性	27	2	29
	陰性	6	5	11
計		33	7	40

表 3 培養法、qRT-PCR 法の比較 (n=96)

a) 定性

		qRT-PCR		計
		陽性	陰性	
培養	陽性	55	0	55
	陰性	38	3	41
計		93	3	96

b) 定量 (核酸検出法陽性 10cfu/100ml 以上)

		qRT-PCR		計
		陽性	陰性	
培養	陽性	53	2	55
	陰性	23	18	41
計		76	20	96

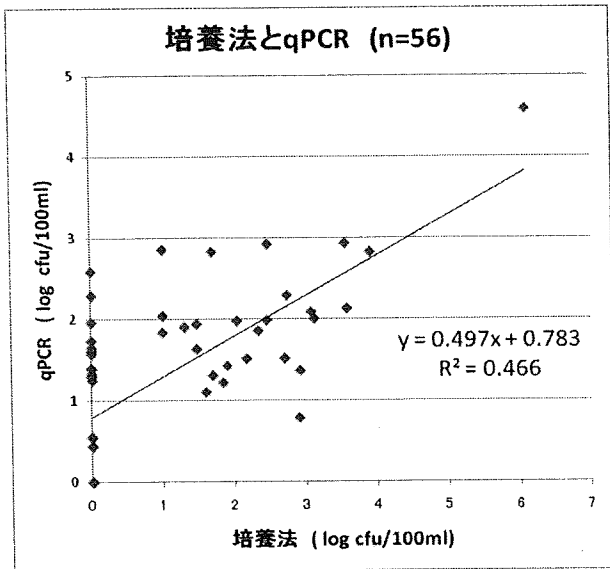


図2 培養法とqPCR法の相関 (n=56)

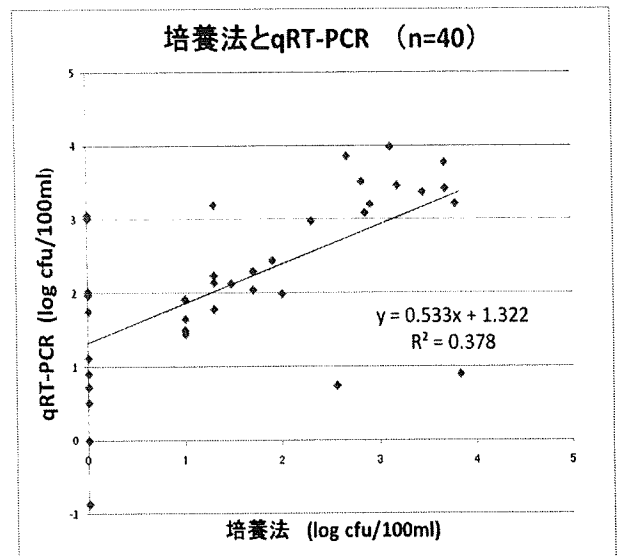


図5 培養法とqRT-PCR法の相関 (n=40)

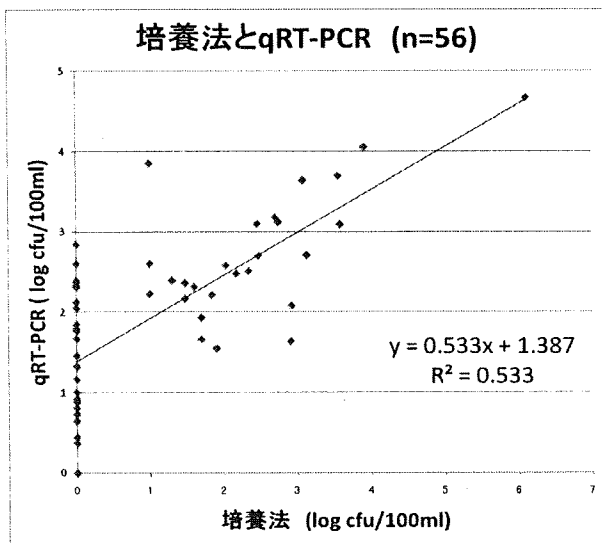


図3 培養法とqRT-PCR法の相関 (n=56)

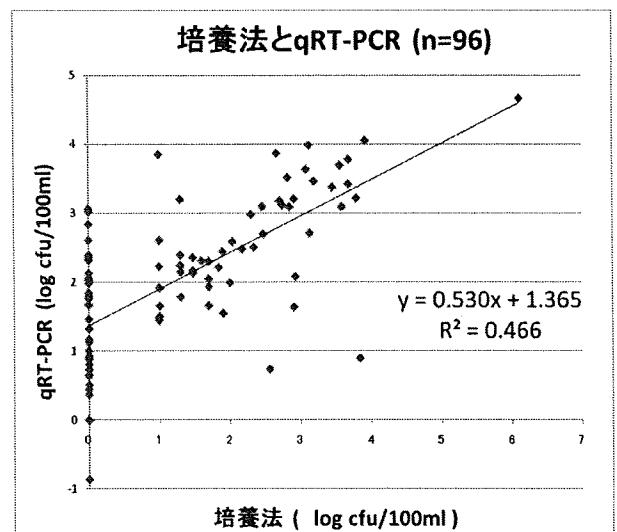


図6 培養法とqRT-PCR法の相関 (n=96)

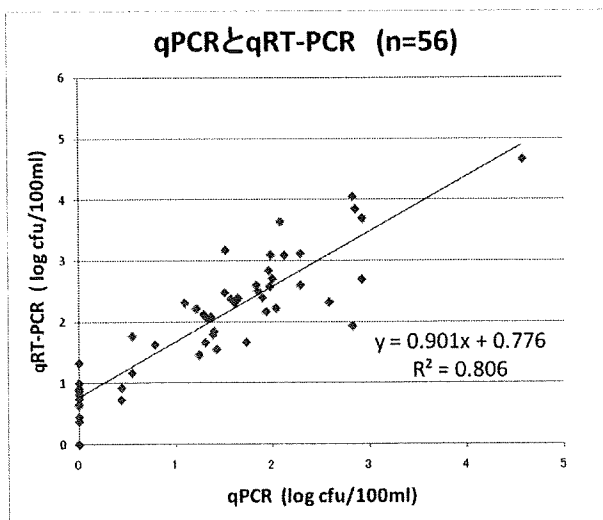


図4 qPCR法とqRT-PCR法の相関 (n=56)

[B] 平成 21 年度報告書  
*Legionella* 属菌迅速検査の有用性に関する  
検討

A 研究目的

浴用水中のレジオネラ属菌を迅速に検出するため、遺伝子増幅を利用した測定法について有用性を検討してきた。その中で、培養法でレジオネラ属菌が分離されているにも関わらず、遺伝子増幅法では検出できない検体があり、その原因として①増幅反応を阻害する物質、②現在のプライマーでは検出できない *L. londiniensis* を含む *L. spp* の存在が考えられた。

そこで本年は①LAMP 阻害回避試薬を用いた熱抽出法を用いてゲノム DNA を調整し、レジオネラ属菌の検出を試みる②昨年より検討中の *L. londiniensis* の LAMP 試薬による核酸検出法の検討をおこなった。

B 研究方法

1. LAMP 阻害回避試薬を用いた熱抽出法の検討

管内の温泉および銭湯等から浴用水検体を採取、レジオネラ属菌の汚染状況について培養法および LAMP 法を用いて調査した。検水の採取は県内の厚生センターの職員の協力を得た。

(1) 検水の濃縮

浴用水 500ml をメンブランフィルター(直径 47mm、0.2 μm、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE)で吸引ろ過し、フィルターを 5.0ml の滅菌蒸留水で 5 分間ボルテックスしたものを試料とした。

(2) 培養法

試料を 50°C 20 分加熱処理後、GVPC 培地(日研生物)、MWY 培地(関東化学)にそれぞれ 100 μl、10 μl 量を各 2 枚ずつコンラージシ、35°C で 7 日間培養した。今年度は未

処理の濃縮液についても GVPC に同様に塗抹した。

(3) DNA 抽出法

LAMP 法に用いる DNA は、LAMP 阻害回避試薬を用いた熱抽出法、アルカリ熱抽出法(栄研化学)および キレックス(Bio-rad)法(資料1)に示すプロトコールに従って抽出した。

(4) LAMP 法

Loopamp レジオネラ検出試薬キット E および *L. londiniensis* を特異的に検出する Loopamp レジオネラ検出試薬を用い、濁度測定装置 LA320C で判定した。菌数は(7)に示す検量線から求め、100cfu/100ml 以上を陽性と判定した。

(5) Ethidiummonoazide (EMA) 処理 DNA を

用いた生菌 qPCR (EMA-qPCR) の検討  
濃縮液 1ml を遠心(15000rpm 5 分)後、上清を除去し、生理食塩水 500 μl にて懸濁した。このうち 250 μl に EMA 濃度 0 μg/ml を、残る 250 μl に 10 μg/ml を添加し、遮光、可視光照射 5 分後に遠心した。上清除去のもの 5% キレックス 25 μl で懸濁したものを用いて、qPCR 法で遺伝子定量を試みた。

(6) qPCR 法

使用したプライマーは LEG427F : 5'-GTAAAGCACTTTCAGTGGGGAG-3' および LEG880R : 5'-GGTCAACTTATC GCGTTTGCT-3'、Premix Ex TaqTM (タカラバイオ)を用い、DNA 2 μl、全量 25 μl の系でおこない、ABI PRISM 7000 (アプライドバイオシステムズ)で測定した。反応は前熱変性 95°C 30 秒の後、変性 95°C 10 秒、アニーリング と伸長反応は 63.5°C 60 秒を 40 サイクルの条件でおこなった

(7) 検量線の作成

*L. pneumophila* Nagasaki 80-045 を標準菌として、30°C 4 日間培養後、滅菌生理食

塩水で菌を懸濁し、McF2( $10^8$ cfu/ml 相当)になるよう調製した。それを用いて 10 倍段階希釈系列を作製した。この 2ml あるいは 1ml を用いて DNA を抽出した。また、この希釈系列の  $100 \mu\text{l}$  を BCYE $\alpha$  (ビオメリュ) にコンラージし、菌数を測定した。

## 2. *L. londiniensis* の LAMP 法による核酸検出法

これまでに培養法でレジオネラ属菌であると同定したにも関わらず、種や血清型を決めることができなかった 15 菌株 (16SrRNA シーケンスで *L. londiniensis* と決定した) を用いて、*L. londiniensis* を特異的に検出する Loopamp レジオネラ検出試薬の特異性を検討した。

### C 研究結果

#### 1. 浴用水中のレジオネラ属菌の検出

##### ① 培養法と LAMP 法の比較

検水 46 件中、レジオネラ属菌陽性 ( $> 10\text{cfu}/100\text{ml}$ ) となったのは、培養法 21 件 (46%)、LAMP 法ではキレックス法で 21 件 (46%)、アルカリ熱抽出法で 19 件 (42%)、阻害回避試薬によるアルカリ熱抽出 23 (50%) と、阻害回避試薬を併用した DNA 抽出法が最も検出率が高かった (表 1)。培養でレジオネラ属菌が分離されたにも関わらず、LAMP 法で算出されるレジオネラ属菌数が  $10\text{cfu}/100\text{ml}$  より少なかった検水は、キレックス法 7 件、アルカリ熱抽出法 7 件、阻害回避試薬併用法 6 件で、昨年度の 3 件に比べると多かった。これらのうち、いずれの遺伝子抽出法も  $10\text{cfu}/100\text{ml}$  未満となった検水は 4 件で、培養法の菌数  $10\text{cfu}/100\text{ml}$  であった。また、これらの検水から分離されたレジオネラ属菌の血清群は SG5 と SG6 及び UT であった。この *L. pneumophilla* SG5, SG6 が LAMP 法で検出できなかった原因については明確ではないが、菌数が少な

い検水については、濃縮液を検討項目別に分けた時にレジオネラ属菌がそれぞれの濃縮液に含まれる確率の問題と考えられた。ただし、1 検水で、 $100\text{ml}$  中のレジオネラ属菌が、培養法で  $440\text{cfu}$ 、LAMP 法では、キレックス法、アルカリ熱抽出法、阻害回避試薬併用法でそれぞれ  $3\text{cfu}$ 、 $1\text{cfu}$  未満、 $18\text{cfu}$  と少なかった。分離されたレジオネラ属菌は *L. pneumophilla* SG1 と SG9 で LAMP の特異性には問題が無く、菌数が少なく評価された原因は強い阻害と考えられた。

##### ② DNA 抽出 3 法と培養による菌数の比較

菌数を log 対数で培養法と比較した (図 1~3)。相関係数はキレックス法で  $R^2=0.293$ 、アルカリ熱抽出法で  $R^2=0.287$ 、阻害回避試薬併用法で  $R^2=0.125$  となり、わずかにキレックス法が高かった。これを  $10\text{cfu}/100\text{ml}$  未満を 0 として改めて相関をみると (図 4~6)、キレックス法  $R^2=0.669$ 、アルカリ熱抽出法で  $R^2=0.370$ 、阻害回避試薬併用法で  $R^2=0.246$  となった。これらをまとめた図 7 をみると、阻害回避試薬併用法で菌数が他の 2 法より多いことを示している。キレックス法、アルカリ熱抽出法で  $10\text{cfu}/100\text{ml}$  未満で、阻害回避試薬併用法で  $10\text{cfu}/100\text{ml}$  以上となった浴用水は 2 件、その 1 件は薬湯であった。

##### ③ Tt 値による阻害回避試薬の効果検証

表 2 に DNA 抽出別の LAMP 反応 Tt 値を示した。阻害回避試薬併用法で Tt 値が減少したのは、従来法と比べ 27 件、キレックス法と比べると 30 件であった。これに対し、この Tt 値が増加したのは、従来法と比べ 3 件、キレックス法と比べ 5 件であった。阻害回避試薬併用法で Tt 値が増加した検体の培養法の菌数はすべてが  $30\text{cfu}/100\text{ml}$  と少なく、Tt 値も 1600 秒以上と長いことから、菌が少ないことによる分割の誤差であると考えられ

た。

#### ④EMA-qPCRによる生菌の検出

EMA-qPCRによるレジオネラ属菌の菌数がEMA未処理(EMA0 $\mu$ g/ml)DNAより減少した検体は30件で、これはEMA未処理DNAでの定量値も0cfu/100mlを示した13件を除く33検体(91%)であった。このうちEMA処理後の菌数が基準値(10cfu/100ml)以下に陰転した検体は8検体であった。しかし、3検体はEMA処理後に定量値が増加した。この原因については不明である(表3)。

#### 2. *L. londiniensis* の LAMP 法による核酸検出法

供試した当所保存の16SrRNAシーケンスで*L. londiniensis*と決定した15株は、*L. londiniensis*検出試薬を用いたLAMP反応で、すべてがコントロール株(北海道衛研森本先生)と同様の増幅を示した(図8)。

#### 考察

今年度の検討を全体的にみると、LAMP反応に供試するDNAの抽出時にLAMP阻害回避試薬併用法で実施した結果、その遺伝子数から計算される菌数は、ベースとなるアルカリ熱抽出法やキレックス法と比べて明らかに多く、これは薬湯や浴用水由来の反応阻害を低減したと思われた。件数は少なかったが、従来使用していたキレックス法、アルカリ熱抽出法で陰性と判断される検水についてレジオネラ属菌の遺伝子を検出することができた。したがって、実際の検査での遺伝子検査の取りこぼしを回避できる重要なステップとして、有用性が示された。ただし、LAMP法定量値とレジオネラ属の培養菌数は必ずしも相関していないことから、LAMP法はおもに定性試験として用い、その定量値(Tt値)は簡易法として活用するこ

とが適切と考えられた。そこで、Tt値が確認できた検体を陽性として改めて培養法との比較を行うと(表4)、培養陽性、LAMP法陰性という検体は大きく減少した。本年のLAMP法の定量値のばらつきは、培養法で菌数が少ない検体でのレジオネラ属菌が濃縮液に含まれる確率およびこの方法における再現性等の問題に由来するのではないかと考えられた。

一方、EMA処理を用いてレジオネラ属菌を定量すると、検体数の91%で定量値が減少し、EMAの効果が明らかとなった。とくに8検体で陰性となり、培養法との結果の不一致を回避できることが明らかとなった。ただし、培養法との菌数の相関をみると(図9)、EMA処理しない方法と差は認められなかった。培養陽性検体における菌数が、EMA処理をしないDNAから算出される菌数により近いこと、また、残留塩素濃度が0~0.1mg/Lの検体でEMA処理後の定量値が低い傾向であったことを考えると、今回のEMA濃度(10 $\mu$ g/ml)が生菌のDNAに損傷を与えた可能性が考えられた。EMA濃度については、その効果が死菌量と関連することも指摘されていることから、それを残留塩素濃度だけで決めることは困難である。実際の検査では各濃度で処理することは負担が大きすぎることから、EMA濃度を決定する指標が示されることを期待する。

*L. londiniensis*を検出する試薬については、*L. londiniensis*について、確実に増幅、検出されることが明らかとなった。*L. londiniensis*が多く生息する浴用水の検査では、これらの遺伝子の取りこぼしは回避できるものと期待できた。



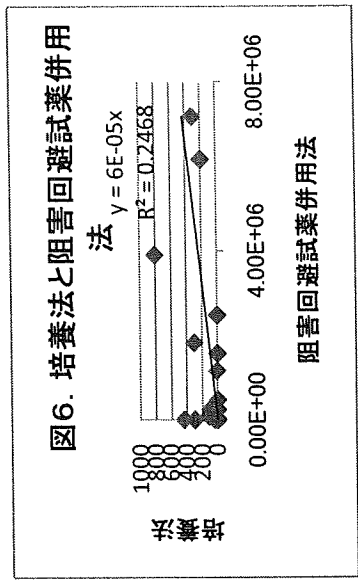
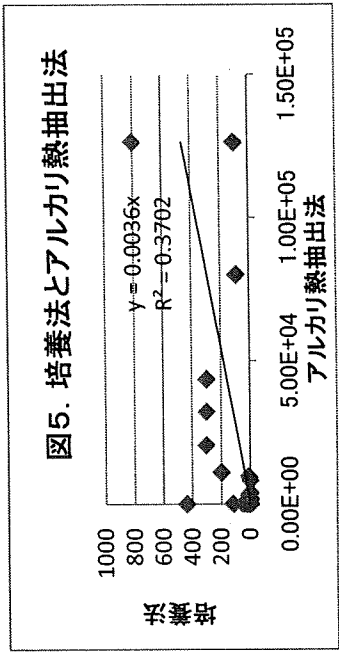
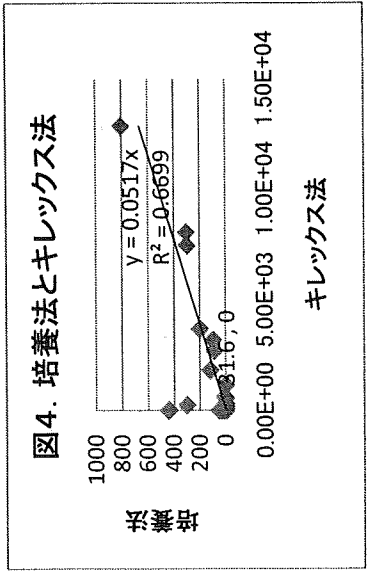
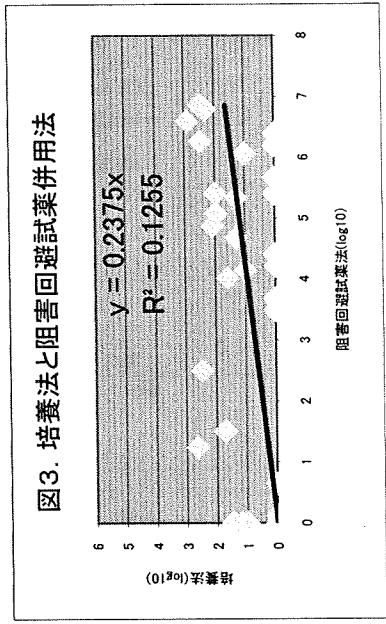
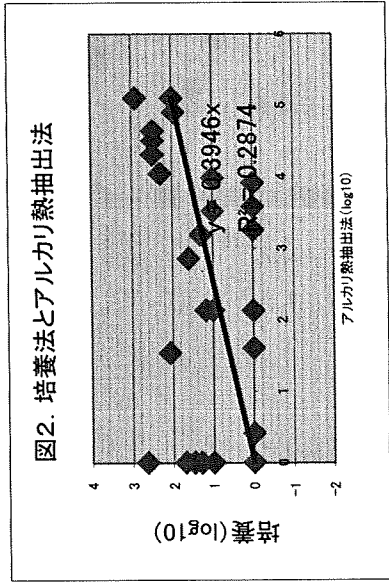
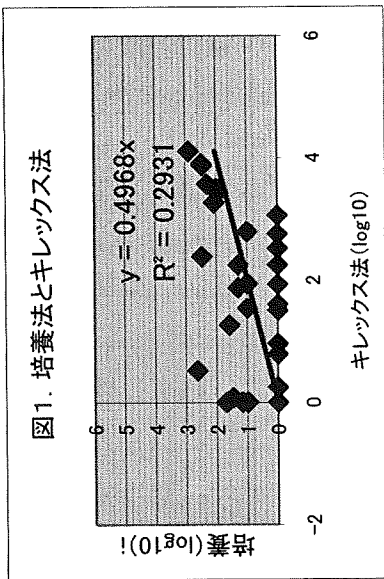


図7. 培養法とDNA抽出法別レジオネラ属菌数の比較

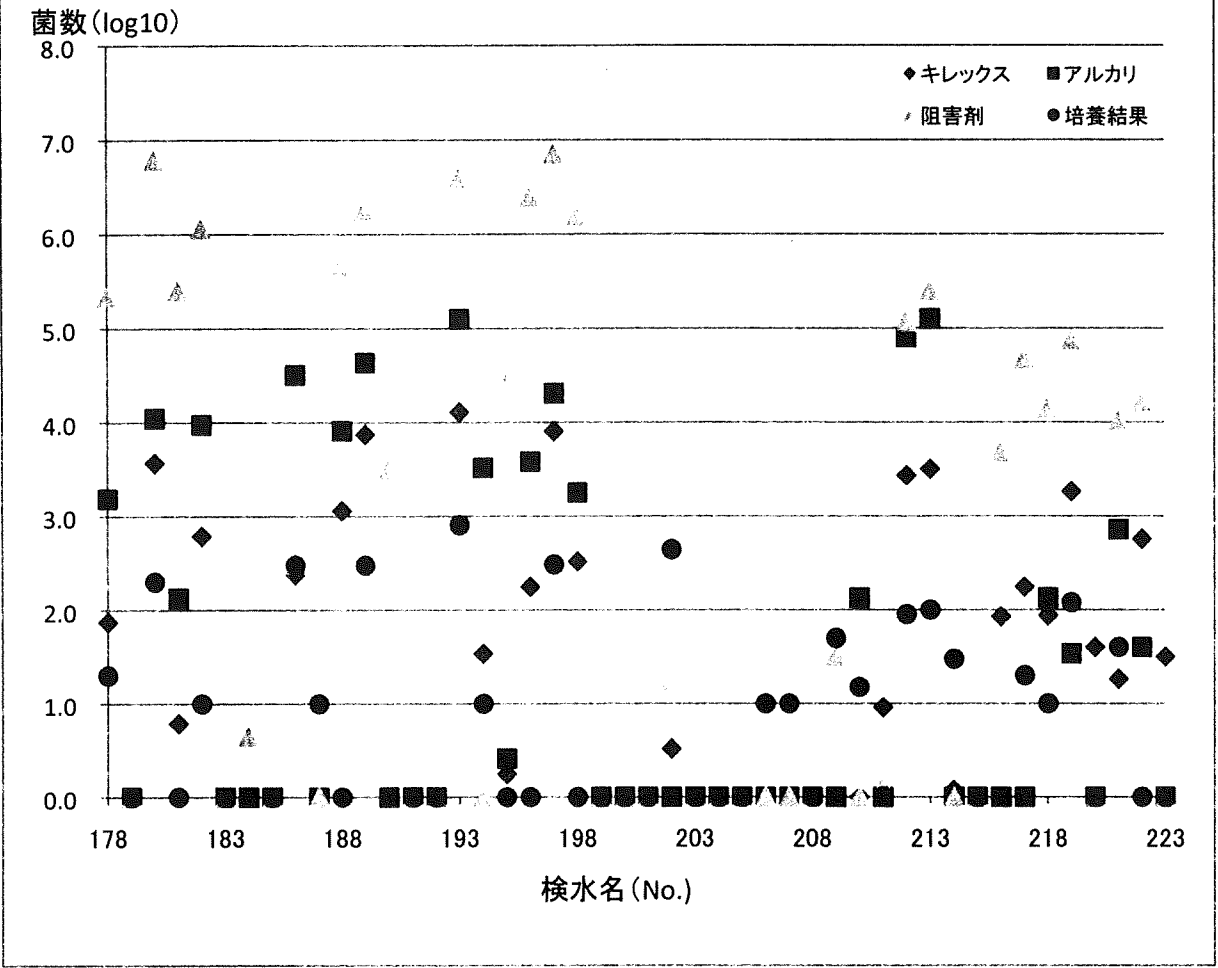


図9. qPCR法(EMA処理の有無)と培養法によるレジオネラ属菌数の比較

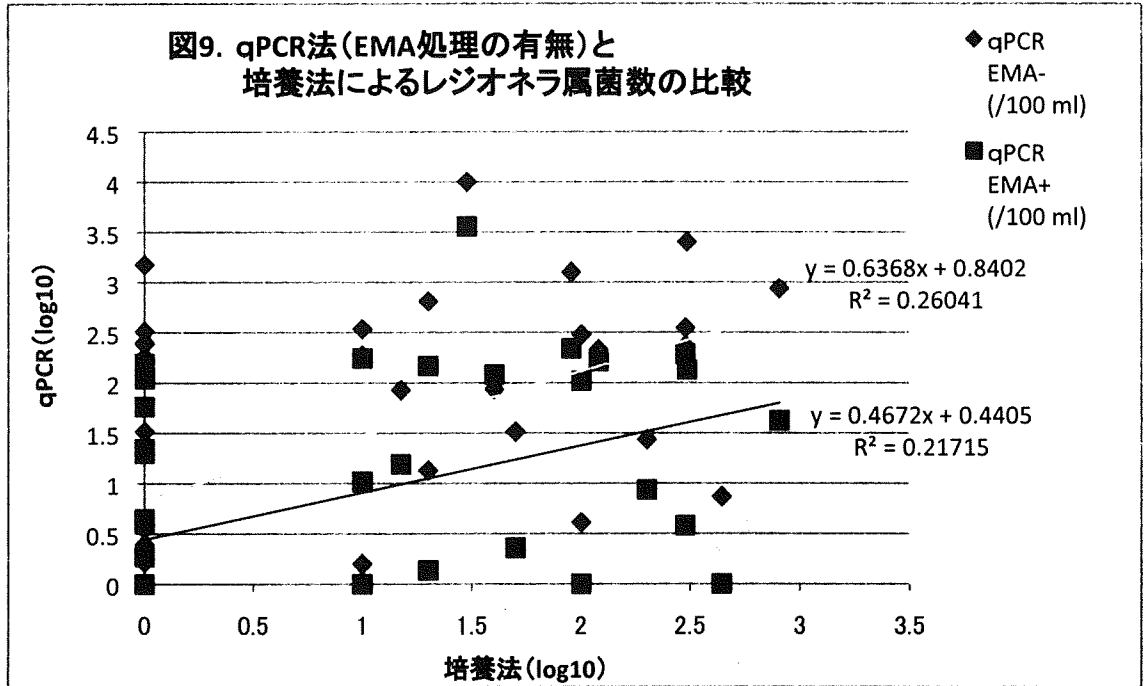


表1. 平成 21 年度浴用水におけるレジオネラ属菌汚染状況

		Chelex 法		Alkali 熱抽出法		阻害回避試薬アルカリ熱抽出法		
		10<	10>	10<	10>	10<	10>	
培養	陽性	14	7	14	7	15	6	21
	陰性	7	18	5	20	8	17	25
		21	25	19	27	23	23	

表 2. 平成 21 年度浴用水におけるレジオネラ属菌汚染状況qPCR 法

		EMA 処理法		EMA 未処理法	
		10<	10>	10<	10>
培養	陽性	12	9	17	4
	陰性	5	20	9	16
		17	29	26	20

表 4. 平成 21 年度浴用水におけるレジオネラ属菌汚染状況

		Chelex 法		アルカリ熱抽出法				
				従来法		阻害回避試薬併用法		
Tt 値		0<	0	0<	0	0<	0	
培養	陽性	18	3	21	0	19	2	21
	陰性	10	15	14	11	14	11	25
		28	18	35	11	33	13	

図 8. *L. londiniensis* 検出試薬の検討

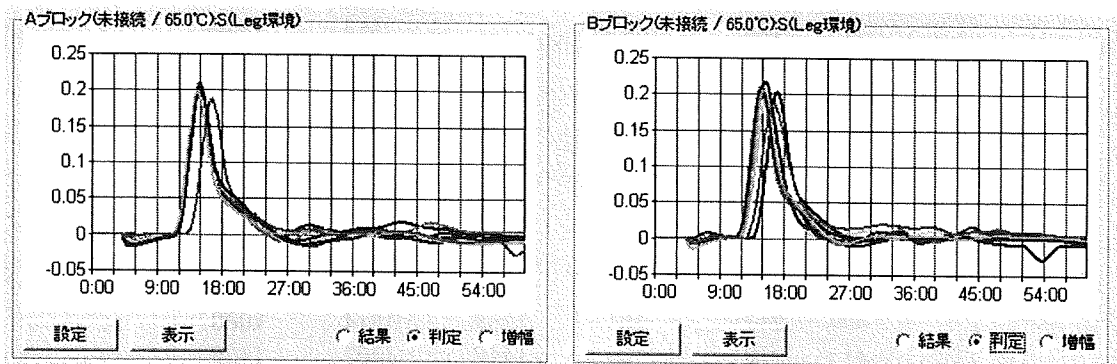


表3. DNA抽出方法別のLAMP法Tt値の比較

	培養法		LAMP法(Tt値)		
	菌数 (CFU/100ml)	キレックス	アルカリ熱抽出法		試薬2
			従来法	秒	
1	178	20	1428	1206	1020
2	179	10未満			
3	180	200	1128	1128	888
4	181	10未満	1620	1302	1014
5	182	10	1266	1134	954
6	183	10未満			1650
7	184	10未満			1446
8	185	10未満			1842
9	186	300	1338	1086	1278
10	187	100		2610	1626
11	188	10未満	1218	1140	990
12	189	300	1074	1074	936
13	190	10未満		1518	1188
14	191	10未満			
15	192	10未満			
16	193	805	1032	1032	906
17	194	10	1488	1176	1686
18	195	10未満	1716	1458	1104
19	196	10未満	1362	1170	924
20	197	305	1068	1104	882
21	198	10未満	1314	1200	942
22	199	10未満			
23	200	10未満			
24	201	10未満			
25	202	440	1668	1776	1392
26	203	10未満		1506	
27	204	10未満			
28	205	10未満		1890	
29	206	20		1824	2070
30	207	10		2406	
31	208	10未満		1914	1539
32	209	50	1908	2046	1368
33	210	15	1770	1302	
34	211	10未満	1590	1914	1494
35	212	90	1152	1050	1044
36	213	100	1140	1032	1014
37	214	30	1746	3450	2220
38	215	10未満			
39	216	10未満	1418	1614	1170
40	217	20	1362	1614	1080
41	218	10	1416	1302	1128
42	219	120	1182	1356	1062
43	220	10未満	1476	1549	
44	221	40	1536	1236	1140
45	222	10未満	1272	1350	1122
46	223	10未満	1494	2022	1688