

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

迅速検査法の整備

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	国立感染症研究所細菌第一部
	前川 純子	国立感染症研究所細菌第一部
	常 彬	国立感染症研究所細菌第一部
	八木田 健司	国立感染症研究所寄生動物部
	荒井 桂子	横浜市衛生研究所検査研究課
	田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター保健科
	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所微生物部
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター細菌科
	緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター微生物部
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
	磯部 順子	富山県衛生研究所細菌部
	矢崎 知子	宮城県保健環境センター微生物部
	佐々木 美江	宮城県保健環境センター微生物部
	神田 隆	静岡県環境衛生科学研究所微生物部
	猪又 明子	東京都健康安全研究センター環境保健部
	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、その導入に期待が寄せられている。なお、迅速検査法は従来の培養試験法と原理的に異なり、状況によっては得られる結果や解釈に差異が生じる可能性がある。違いが生じるのは死菌(由来のDNA)の検出、反応阻害の有無、反応特異性の違い、菌数と遺伝子コピー数の違いがあり、両検査法の併用(実用化)に向けてはこれらの整理が必要となる。

適正管理されている浴槽等において菌由来の DNA のみによる汚染が生じることはありえず、死菌の検出は浴槽施設内でのレジオネラ属菌の繁殖を端的に示す結果と考えられる。定量PCRは遺伝子のコピー数を測定することが可能であり、死菌を含むことで培養法に比べて菌数が多く評価される傾向となるが、安全側に寄った試験法としてレジオネラ属菌の存在量を短時間に示すことが可能となる。反応阻害を回避すれば、遺伝子増幅試験が生菌を取りこぼすことはなく、温泉施設の再開に向けた確認試験方法として有効であることを確認した。

市販の2種類のレジオネラ遺伝子検査試薬の反応特異性を検討した結果、わが国で分離されるレジオネラ属に関しては概ね検出することが示された。一方、いずれの試薬においても培養でしばしば高濃度の汚染が確認される *Legionella londiniensis* は検出されないことから、別途にコロニーPCR用のL

londiniensis 検出試薬を開発した。

現行の培養試験は 10cfu/100ml を基準とするが、迅速検査法では遺伝子の存在の有無、あるいはコピー数を測定するものであり、基準に対応させるための校正方法が必要となる。基準株として *L. pneumophila* 長崎株 80-045 株を用いて培養条件を 30°C 4 日間培養としたコロニーより、感染アメーバから遊離した菌体で作成した場合とほぼ同じ検量線が得られた。一方、異なった培養温度での培養菌体を用いた場合には検量線の再現性が保証(ズレが生じる)されないことから、検量線作成に際しては厳密な培養条件が前提となる。

温泉水試料ではフミン質等による遺伝子増幅反応の阻害が懸念されることから、核酸抽出酵素処理・カラム精製工程を中性-弱酸性下で行なうことによる核酸抽出法を提案した。一方、簡易な調製方法も求められており、アルカリ熱抽出法と反応回避試薬の組み合わせにより阻害の回避や軽減効果が得られた。rRNA を鋳型とする定量逆転写 PCR (qRT-PCR) 法を開発し、感度を 1,000 倍以上高めることができた。高感度化することで核酸抽出液を高度に希釈することが可能となり、抽出過程で特段の処理を施さなくても阻害反応を回避できることが確認された。

培養法と遺伝子検査法 (qRT-PCR) を組み合わせることで、選択的に生菌の検出も可能となった (LC qRT-PCR)。すなわち、試料水を液体培地で 18 時間程度前培養 (Liquid Culture: LC) し、得られた培養液を用いて遺伝子増幅 (qRT-PCR) を行なう方法で、培養で陽性となった (生菌) 菌種のみを対象とした定量試験が可能となる。併せて、予め死菌由来の DNA を修飾した後に PCR による増幅反応を行なうことで死菌由来の DNA を除去する EMA-PCR 法を検討した。この方法は前培養が不要であるが、EMA 処理 (Ethidium monoazide) に用いる EMA 試薬の濃度調整が難しい点が指摘される。

本研究で検討した遺伝子検査法の成果の一部は、レジオネラ症防止指針第三版 ((財)ビル管理教育センター) に記載された。

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その導入に期待が寄せられている。なお、迅速検査法は従来の培養試験法と原理的に異なることから、状況によっては得られる結果や解釈に差異が生じる可能性がある。違いが生じるのは死菌 (由来の DNA) の検出、反応阻害の有無、反応特異性の違い、菌数と遺伝子コピー数の違いがあり、両検査法の併用 (実用化) に向けてはこれらの整理が必要となる。

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があった。フミン酸はアルカリで溶解し、わずかでも混入すると核酸増幅を強く阻害することから、溶解をさせないことが必要となる。一方、抽出 DNA を濃縮するには、古典的なフェノール抽出やエタノール沈殿は試験には煩雑である。簡便な方法と

してカラム抽出などが期待されるが、抽出液量が標準で 200ul などと大きく、検査感度との兼ね合いの問題があった。こうした背景から、アルカリを使わない核酸抽出方法と、簡便に濃縮精製できる方法が必要であった。当該研究では鋳型調製にはアルカリを使用しない方法として酵素溶解・カラム精製の方法を提案した。なお手技が煩雑と感じられたことから、より簡便な方法を求め、阻害回避試薬の使用と、rRNA からの qRT-PCR による高感度検出についても検討を行った。

リボソーム RNA (rRNA) はタンパク合成が行われるリボソームのサブユニットとしてリボソーム遺伝子 (rDNA) から大量に転写合成されるものであるが、その合成量は細胞あたり数千から数万コピーと見積もられており、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。当該研究ではこの rRNA に着目し、rRNA から逆転写によつ

て cDNA を合成し、cDNA の検出を試みた。

近年、遺伝子増幅技術は環境試料のみならず、医療や食品の分野で幅広く普及が進んでいる。血液や糞便等の臨床検体は強い増幅阻害が生じる事が知られており、それを回避するための試薬が販売される状況にある。すなわち、阻害物質を直接反応チューブに入れることを可能とする試薬が販売されている。これに準じて、環境試料のフミン等の阻害を回避できるものか検討することとした。

死菌の検出は、検査の原理が異なることから避けられないが、バイオフィルムの存在を明らかにする指標と捉えて(遺伝子の変性・消失に至らない程度の近い過去において菌の増殖があった証左として)、積極的に活用することが考えられる。また、高濃度の死菌が検出されれば、ろ過装置や配管中にバイオフィルムの蓄積・残留が意味され、徹底した洗浄等が求められる。万一、塩素管理の施設において塩素消毒が停止した場合、大量の生菌が浴用水中に出現して大変危険な状態に陥ると心配されるからである。

一方、阻害物質対策がなされていれば、迅速検査法が生菌を取りこぼすことは例外的であることが経験的にも明らかとなってきた。浅野ら(平成 19 年)は、このことを利用して、レジオネラ検出で営業停止となった施設の再開に活用を始めており、この取り組みは有効と考えられる⁽¹⁾。

迅速性は失われるものの、前処理と遺伝子検査の組み合わせは生菌検出の可能性がある。当該研究では食品の分野で応用されている EMA-PCR と、培養と PCR の組み合わせ(LC qRT-PCR)に着目した。EMA(Ethidium monoazide)は死菌の細胞内に入って DNA と結合し、この状態で可視光を照射することで DNA を PCR 増幅不能な修飾状態にすることが可能である。また、濃縮試料を培地に添加して前培養(Liquid Culture: LC)を行うと生菌のみが増殖し、核酸の絶対量が増すことから、増分を迅速検査法(qRT-PCR)で検出することが期待される。

迅速検査法では遺伝子の存在の有無、あるいはコピー数を測定するものであり、現行の培養試験の基準である 10cfu/100ml と比較するための校正方法が必要となる。レジオネラ属菌は培養条件によってはき

れいな桿菌ではなく長く伸長することがあり、細胞当たりの遺伝子コピー数が変動してしまう恐れがあった。レジオネラは自然界では原生動物に感染して細胞内で増殖すると考えられているが、感染アメーバから遊離するレジオネラはきれいな桿菌であることが観察されていた。基準株として *L. pneumophila* 長崎株 80-045 株を用いて、感染アメーバから遊離したレジオネラで作成した検量線との比較検討を行った。

迅速検査法はプライマープローブの設計により反応特異性が定まる。市販のキットでは稀に *L. londiniensis* の不検出が生じて特異性に疑問がもたれていた。現行のキットの迅速検査法の特異性はプライマープローブの設計により調整ができるかもしれないが、多数の菌株全てに対応できるようにすることは、特異性の低下をまねき、レジオネラ以外を検出する恐れがあった。当該研究では現行キットの特異性を明らかにし、*L. londiniensis* 対応検出系の用意が現実的な解決法として考えられた。

B. 研究方法及び材料

レジオネラ基準株

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株を BCYE α 寒天培地で 30°C 4 日間培養後、小コロニーを生理食塩水に懸濁して McFarland 2 程度に調整し、10 倍希釈系列を作製した。希釈液から培養法により生菌数を測定するとともに、DNA あるいは RNA 抽出用に 100µl ずつ分取した。核酸抽出が直ちに行えない場合は、冷凍保存した。

培養条件が異なる菌株での DNA 量及び RNA 量を比較するため、35°C 4 日間及び 37°C 7 日間培養したものについても同様の方法で菌液を作製した。

検出特性試験に供した菌種

Legionella pneumophila の 1~15 血清群参照株 16 株、および untypable の 3 株、7 菌種の 14 biotype を含む、50 菌種、75 株を使用した(表 1)。基本的にレジオネラは BCYE α 培地で 35°C、4~7 日間培養し、菌体より DNA を精製した。ただし、*L. pneumophila* sub sp. *fraseri*、*L. beliardensis*、*L. cherrii*、*L. drozanskii*、*L. fallonii*、*L. gresilensis*、*L. maceachernii*、

L. nautarum、*L. quateirensis*、*L. rowbothamii*、*L. santicrucis*、*L. steigerwaltii*、*Legionella* sp. LLAP-14 株は 30℃ に培養温度を調整した。また、*L. donaldsonii*、*L. drozanskii*、*L. fallonii*、*L. feeleii* biotype2、*L. gratiana*、*L. hackeliae* biotype2、*L. nautarum*、*L. rowbothamii*、*L. santicrucis*、*L. spiritensis* biotype2 株は 5%炭酸ガス存在下で培養した。

レジオネラ属菌以外との交差反応性を検討するため、全国 5 箇所の浴槽水 24 検体から R2A 寒天平板培地を用いて 37℃、48 時間の培養で分離された菌のコロニー ($10^2 \sim 10^6$ コロニー) をすべて回収し、混合菌液を作製した。これより DNA を抽出し、 10^6 cfu/tube 相当の DNA を鋳型として、リアルタイム PCR および LAMP 反応に供した。

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 2)。環境株は 16S rRNA 遺伝子の配列等により *L. londiniensis* と同定した。35℃ 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 ないし 1.9×10^9 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℃ 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℃ で 10 分加熱した死菌を迅速検査に用いた。

温泉水の採取及び濃縮

自治体の協力を得て温泉等の浴用水試料を採取し、レジオネラ属菌の培養及び核酸増幅検査を行った。阻害回避試薬の検討では、温泉試料と薬湯試料は、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あるいは同種の薬湯とした。薬湯の原水は水道水であった。定法に従い 500ml ないし 1

リットルを採取し、フィルターろ過法あるいは遠心法で濃縮し、滅菌水に懸濁した 100 倍濃縮試料を得た。レジオネラ属菌の培養は、100 倍濃縮液を加熱処理 (50℃、20 分間) あるいは酸処理して、100 μ l を GVPC 寒天培地に塗布して 37℃ で 7 日間以上培養し、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 1900 μ l ないし 1960 μ l を除去した 2000 倍濃縮液について、核酸抽出を行った。核酸抽出が直ちに行えない場合は、2000 倍濃縮液を冷凍保存した。

感染アメーバからのレジオネラ属菌の単離

レジオネラ感染宿主として自由生活性アメーバ *Acanthamoeba castellanii* を用いた。PYGC 培地を用いて培養後、10 \times PAGE'S amoeba saline で遠心洗浄したアメーバ栄養体に *L. pneumophila* 長崎 80-045 株を添加し感染させた。アメーバを洗浄して未感染のレジオネラを除去した後、10 \times PAGE'S amoeba saline で 2 日間静置し、レジオネラを増殖させた。増殖後は遊離のレジオネラを遠心洗浄で除去した後、アメーバを滅菌水に懸濁して低浸透圧下で破裂させた。低速遠心でアメーバの残体を除去した後、アメーバから遊離したレジオネラを遠心回収 (3000 \times g、4℃、15 分間) した。集めたレジオネラの懸濁液から 10 倍希釈系列を作成し、DNA 抽出と BCYE α 培地を用いて生菌数の確認を平行して行った。

DNA 抽出

DNA の抽出は、100 μ l の 2000 倍濃縮試料に TE 緩衝液 60 μ l、1M NaCl 20 μ l、10% Triton X-100 10 μ l 及び 20mg/ml Proteinase K (キアゲン) 10 μ l を加えて 60℃ で 1 時間保温し、75℃ 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 200 μ l (以下、Buffer はキアゲン) 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 300 μ l 及び Buffer AW2 300 μ l を使用し、Buffer AE 50 μ l で 2 回溶出を行った。

フミン酸による阻害

不溶性フミン酸 (和光純薬) を用いて 3×MIC から7段階 2 倍希釈した濃度列 (6.4~0.05 mg/L) となるように PCR 反応液を調製し、2logCFU/mL の試料濃縮液を添加して酵素処理・カラム精製法 (B 法)、キレックス法 (D 法)、およびアルカリ熱抽出法 (E 法) の回収率を比較した。

酵素溶菌希釈法による RNA の抽出

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 2.5 μ l を加え、55°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°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 390 μ l で希釈後混和したものを RT 反応の鋳型とした。

EMA 処理

100 倍濃縮試料 2 mL に EMA (Ethidium monoazide) 1.0~10 μ g/mL を添加し、遮光下 4°C で 5 分間静置した後、500~650W の可視光を 5 分間照射した。この後、DNA を抽出し、定量 PCR を行った。

アルカリ熱抽出法と阻害回避試薬

アルカリ熱抽出法は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) に添付の試薬を使用した。すなわち、100 倍濃縮試料 2ml から再遠心濃縮を行い、濃縮液約 40 μ L 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、この再濃縮液を冷凍保存した。再濃縮液に EX Leg 試薬 50 μ L を添加して熱処理 95°C 15 分間を行い、直後に氷冷した。そして Tris 試薬 8 μ L を添加して中和した。ここからサンプルを 2 分割し、一方に阻害回避試薬 (栄研化学) 5 μ L を添加し、もう一方はそのままとした。それぞれ小型冷却遠心機で 10 分間遠心分離した上清 5 μ L を LAMP 反応に使用した。

LAMP 法

Legionella 属菌の迅速検査には、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E を使用した。反応条件は添付文書の指示に従った。増幅装置はリアルタイム濁度測定装置 LA-320C (栄研化学) を用いた。

定量 PCR (qPCR)

Legionella 属菌の迅速検査には、CycleavePCR *Legionella* Detection Kit を使用した。反応条件は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)、SmartCyclerII (タカラバイオ)、あるいは ABI Prism7000 (アプライドバイオシステムズ) を用いた。

定量 RT-PCR (qRT-PCR)

逆転写反応 (RT) 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°C、15 分間逆転写反応を行った後、85°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 を用いて qPCR を行った。

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のと同じ、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 液体培地にオキソイド MWY 選択サプリメントを添加して作成) 900 μ l に加えて 37°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 抽出は qRT-PCR の酵素溶菌希釈法に準じ、最終希釈は TE 緩衝液 990 μ l とした。逆転写反応以降の操作は、通常の qRT-PCR 法に準じた。また、コントロールとして、100 倍濃縮液 500 μ l を 95°C 5 分間加熱処理した死菌液に、同量の酸処理を加えて室温で 5 分間反応させた酸処理液について、同様に処理した。

L. londiniensis の検出

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。

C. 結果

反応特異性

Legionella 属に属する 51 菌種、75 株(含む、*L. pneumophila* SG 1~15、untypable 3 株、7 菌種の 14biotype)を用いてリアルタイム PCR 試薬キット、および LAMP 試薬キットの検出特性を検討した(表 1)。このうち、臨床分離株は 13 種 26 株で、他は環境分離株である。リアルタイム PCR 法では 10 cfu/tube 相当の DNA 量を用いて 40 サイクル以内の増幅反応が閾値を超えた場合に「検出可能な菌種・菌株」とし、 10^4 cfu/tube 相当以上の鋳型 DNA を用いても増幅反応が閾値に達しない場合を「検出不可能な菌種・菌株」とした。また、LAMP 法では 60 cfu/tube 相当の鋳型 DNA 以下で増幅反応が閾値を越えた場合に「検出可能な菌種・菌株」とし、 10^4 cfu/tube 相当以上の鋳型 DNA 量を用いても増幅反応が閾値に達しなかった場合を「検出不可能な菌種・菌株」とした。

リアルタイム PCR では 39 菌種 62 株の検出が可能であった。LAMP 法では 37 菌種 61 株が検出可能と判断された。この中には LAMP 法で *L. birminghamensis* が不検出となったのを除き、*L. pneumophila* 血清群 1~15、および臨床分離株が含まれていた。

一方、リアルタイム PCR では 11 菌種 13 株(*L. geestiana* は 10 cfu/tube 相当の鋳型 DNA では不検出、100 cfu/tube 相当以上で陽性)、また、LAMP 法では 13 菌種 14 株が不検出となったが、それらの多くはわが国での分離例がないか、あるいは稀にしか分離されない菌種に限られた。なお、環境からはしばしば *L. londiniensis* が培養分離されているが、いずれの方法によっても不検出であった。

一方、非特異反応の検証として、全国 5 地域で採取し採取した浴槽水試料 24 検体から従属栄養細菌を分離し、その DNA を鋳型として両方法により DNA 増幅を試みた。すなわち、24 件の試料水から R2A 培

地で分離されたコロニーを全て回収し、混合菌液を作製した。これより、 10^6 cfu/tube 程度の希釈菌液を調整し、鋳型 DNA を抽出した。これを用い両検査方法により DNA 増幅を試みた結果、リアルタイム PCR 試薬キットと LAMP 試薬キットのいずれの反応においても陽性反応は認められなかった。

L. londiniensis 検出系

培養陽性迅速検査法陰性の一因と考えられる *L. londiniensis* の検出系を用意した。データベース登録配列に基づき *L. londiniensis* を含む *Legionella* 属菌を標的に新規に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 2)。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。

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* 検出試薬を用いて試験した。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 *Legionella* 属菌であることが 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。

定量 PCR

3 種類の PCR 装置を使用し、 $2 \times 10^{-1} \sim 1.5 \times 10^7$ cfu の範囲にある既知濃度の菌液の Ct 値を少なくとも 3 回以上測定し、その分布図(図 1)と近似曲線を計算した。SmartCyclerII (CycleavePCR *Legionella* Detection Kit 使用)、DICE および ABI Prism7000

(CycleavePCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit 使用)により得られた近似曲線は

$$y = -1.39 \ln(x) + 39.22 \quad (r^2=0.975) \dots$$

[SmartCyclerII]

$$y = -1.37 \ln(x) + 37.82 \quad (r^2=0.975) \dots$$

[DICE realtime]

$$y = -1.26 \ln(x) + 38.63 \quad (r^2=0.950) \dots$$

[ABI Prism7000]

と計算され、3 装置間の測定誤差は僅かであった。また、これらのデータを1つにまとめた下述の近似式が得られた。

$$y = -1.32 \ln(x) + 38.7, \quad (r^2=0.9528) \dots [3$$

機種]

なお、該検査方法では 1 cfu/tube に相当する鋳型 DNA 量で確実に陽性反応が得られた。

培養条件が検量線に与える影響

35°C 4 日間及び 37°C 7 日間培養で得られた生菌を用いて qPCR 及び qRT-PCR の検量線を作成し、30°C 4 日間の検量線と比較した(図2)。35°C 4 日間及び 37°C 4 日間培養の検量線は、30°C 4 日間培養の検量線と比較して qPCR の Ct 値がそれぞれ -0.77 及び -3.23、qRT-PCR の Ct 値がそれぞれ -0.86 及び -2.75 と低下した。Ct 値の減少幅から算出した菌体あたりの DNA 量は、30°C 4 日培養と比較して 35°C 4 日培養で 1.6 倍、37°C 7 日培養で 7.7 倍に増加し、RNA 量はそれぞれ 1.8 倍、6.6 倍に増加すると計算された。

アメーバ由来のレジオネラによる検量線

レジオネラは BCYE α 寒天培地上で 30°C、4 日間の培養で用意したが、この条件は動物への感染実験に適していることで経験的に知られていた。温度が 37°C と高温だった場合、4 日以上培養した場合等では菌体の伸長が顕微鏡下で観察され、感染実験には不相当となり、検量線にも系統誤差の生じる恐れが考えられた。当該研究では浴槽水中で生じている

のと同等と考えられる感染アメーバから回収したレジオネラを用いて検量線を作成し、培地からの検量線と比較した。アメーバ内で増殖した菌は理想的な桿菌となり、伸長した菌は全く観察されない。アメーバに感染させて増殖したレジオネラの段階希釈から cfu 値と抽出 DNA・リアルタイム PCR の Ct 値を得て、検量線を作成した(図 3)。培地由来とアメーバ由来のレジオネラで作成した検量線は、測定誤差の範囲内で重なった。

環境水中の菌数の定量には感染アメーバで増殖させた菌から抽出した DNA を用いて検量線を作成することが理想的と考えられるが、施設ごとに実施するには技術的負担が大きく実際的ではない。当該研究の結果から、今後は *L. pneumophila* serogroup 1 長崎 80045 株を用いて BCYE α 培地で 30°C 4 日間の培養方法を基準とすることを提案する。

フミン酸による阻害の回避

簡便なアルカリ熱抽出法とキレックス法、阻害を回避するための酵素処理・カラム抽出法の比較を行った。不溶性フミン酸をレジオネラに添加し(終濃度 6.40、3.20、1.60、0.80、0.40、0.20、0.10、及び 0.05mg/L)、3 つの方法で DNA 抽出を行い、qPCR で評価した(図 4)。酵素処理・カラム抽出法(B 法)において DNA の回収率は 100%前後と良好な結果であった。しかし、キレックス法(D 法)とアルカリ熱抽出法(E 法)の回収率はともに 0.4mg/L まで完全に阻害された。以上より、阻害を受けない酵素処理・カラム抽出法(B 法)が試料調製に適していた。

阻害回避試薬の効果

より簡易な試料調製法として、アルカリ熱抽出法と阻害回避試薬の組み合わせを検討した(表3)。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。従来のアルカリ熱抽出法では、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。阻害回避試薬を使用した改良アルカリ熱抽出法では、従来法で陰性であった 3 試料(試料 No.16、44、47)は陽性に転じた。これに加えて、培養陰性だが、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 試料があった。従来法と改良法の Tt 値を比較すると、「陽転」が 10 試料(温泉 6 試料、薬湯 4 試料)、「減少、すなわち感度の上昇」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、感度低下」が 2 試料(温泉 1 試料、薬湯 1 試料)であり、明らかな改善傾向にあった。阻害回避試薬はレジオネラ検査に常時用いることが望ましいと考えられた。

RNA を鋳型とした qRT-PCR

rRNA を鋳型とすると、高感度化が期待できたことから、定量逆転写 PCR (qRT-PCR) 法を開発した。高感度化することで核酸抽出液を高度に希釈することが可能となり、抽出過程で特段の処理を施さなくても阻害反応を回避できることも期待した。

qRT-PCR の検量線は、PCR チューブ (5 μ l) あたり $4.5 \times 10^{-4} \sim 45$ CFU/tube に相当する濃度で良好な直線性が確認された ($R^2=0.999$) (図 5(a)○)。検水 200ml の 2000 倍濃縮液から RNA 抽出を行った場合に換算し、qPCR と検量線を比較すると、両者の検量線はほとんど一致し、qRT-PCR についても 4.5 CFU/100ml 以上の濃度であれば定量可能な感度を有することが確認された(図 5(b)○)。以上の検討より、抽出に用いる濃縮試料中に 1 CFU があれば、qRT-PCR で検出可能と考えられた。

温泉水を用いた培養法と核酸増幅検査(qPCR 及び qRT-PCR)の比較検討

酵素溶菌希釈法を用いて実際の温泉水から抽出した際の沈渣を図 6 に示す。沈渣量が 50 μ l 程度の検体や、軽度の着色が認められる検体であっても、その後の増幅反応に阻害が無いことをインターナルコントロールの反応性から確認した。

培養法、qPCR 及び qRT-PCR 法の相関(n=99)を検討した結果、*L. londiniensis* 陽性検体を除いた 99 件(浴槽水 43 件、原水 38 件、逆洗水その他 18 件)について、培養法、qPCR 法、qRT-PCR 法の相関を検討した(図 7)。培養検査が陰性にもかかわらず、核酸増幅法が陽性の検体が多数みられ、qPCR 及び qRT-PCR のそれぞれ 40.4% (40/99) 及び 53.5%

(53/99) を占めた。培養陽性検体を対象に培養法と核酸増幅法との相関を求めたところ、qPCR では $R^2=0.321$ 、qRT-PCR で $R^2=0.310$ と、弱い相関が認められた(図 7-1 (a), (b))。原水を除く浴槽水及び逆洗水等 (n=61) に限れば、培養法と核酸増幅法との相関はやや高くなり、培養法と qPCR あるいは qRT-PCR の R^2 は、それぞれ 0.461 及び 0.432 となった(図 7-2 (a), (b))。一方、qPCR 法と qRT-PCR 法の間には $R^2=0.771$ と強い相関が認められ、rRNA は DNA と同様の挙動を示すと考えられた(図 7-1 (c))。

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

液体培地におけるレジオネラの前培養を行った結果、MWY (酸処理) 液体培地による前処理を確立することができた。これを応用して、温泉水を用いた平板培養法と LC qRT-PCR でいずれかが 10cfu/100ml の陽性判定された試料について、菌数の相関を検討した(図 8)。LC qRT-PCR は、 $10 \sim 10^5$ CFU/100ml の範囲で平板培養法と高い相関 ($R^2=0.863$) を示し、qPCR あるいは qRT-PCR と比較して、平板培養法の菌数をより正確に予測できることが示唆された。平板培養法陽性 21 件中 6 件が LC qRT-PCR で陰性、平板培養法陰性 16 件中 9 件が LC qRT-PCR で陰性となった。培養法を基準とした場合、LC qRT-PCR の感度は 71.4%、特異度は 56.3% であり、これをより高める検討を行いたい。

EMA-PCR

予め死菌由来の DNA を修飾することで死菌由来の増幅をしない EMA-PCR 法を検討した。白湯実試料 50 検体に対して 2 つの EMA 濃度で実施した結果(表 4)、+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)。死菌の量に注目し、培養法の値に対する+1.0 EMA 処理と+10EMA 処理の PCR 値を比較したところ、ほぼ死菌の量の log 値が 3 前後で、適度な EMA 濃度が変化することが判明した。EMA 処理の濃度が難しい点が指摘されたが、複数の濃度を利用して結果の状況から、生菌の存在を推定できるのではない

かと期待された。

D. 考察

迅速検査法は培養法と試験の原理的に異なることから、結果に相違が生じることは十分に考えられる。相違が生じる理由を整理することで、両検査法を併用できる環境を整えることが迅速検査法導入への課題と捉えて、整備を進めてきた。

死菌、反応阻害物質、反応特異性、菌数と遺伝子コピー数について、現状と対策を検討した。

フミン酸が反応阻害を引き起こすことから、アルカリ溶解を避けて、中性域の酵素溶解・カラム精製が培養陽性、迅速法陰性の相違を避けるには最も重要と考えられ、この方法を提案した。それほど強い阻害が生じない試料については、アルカリ熱抽出法＋阻害回避試薬の簡便な抽出法が有効であることを示した。qRT-PCR によって 1000 倍以上の高感度試験を達成し、希釈のみの鋳型調整法も可能となることを示した。

反応特異性については市販の 2 キットがいずれもレジオネラ属菌の多くの菌種を検出可能であった。*L. londiniensis* 等が検出できないことについては、キットの特異性を改変するのではなく、現行キットを相補する追加検出系の用意によって対策することを提案した。

死菌は管理に反映させるための指標として活用することを提案し、生菌を迅速検査法で検出するための方法としては EMA-PCR あるいは LC qRT-PCR 法を今後の検討課題とすることができた。

迅速検査法は遺伝子の存在の有無あるいはコピー数を評価するものであり、菌数は検量線から間接的に求めることになる。その際、培養条件、あるいは感染アメーバあるいは培地の由来によって細胞当たりのコピー数が変動する恐れがあり、実際に温度と培養時間の変更により生じたが、これを抑制するための、標準試料の作成方法を提案した。

レジオネラ属菌は環境中で増殖し、その濃度は連続的な分布を取ることから、基準値を設けて検出・不検出の 2 つの状態に分けることは、必ずしも適当ではなかったのかもしれない。もしこれが感染発症した

患者由来の臨床検体であれば、たくさんの病原体が排出されているのか、あるいは全くないか、を検査される。ところがレジオネラでは、環境中で増殖中の病原体がどこまで増えたか、ということの評価する。したがって、将来のレジオネラ試験は定量性が重要になると思われる。一方、レジオネラが検出されたということは、病原体がその環境中に存在したことを端的に表している。低濃度だから無視しても良い、というコンセンサスは得られていない。

特に qPCR と qRT-PCR は定量性に重点が置かれた検査法であり、10cfu/100ml 未満の濃度の定量に到達している。これらは培養法より高感度であり、実際に培養法よりも反応する率が高い。繰り返しになるが、低濃度でも病原体は存在しており、無視してよいのかは別の話となる。この問題は、培養法でも同様であり、一部高感度な培養法が実施されることもあるが、その検出結果をどのように取り扱うのか、10cfu/100ml より低い値を不検出と扱ってよいのかについては結論されていない。培養法で解決されていないことを、迅速検査法だけで解決することはできないことをここで整理しておきたい。

ちなみに、アルカリ熱抽出法は 200ml 分の水試料を 100ul 弱に抽出して 5ul を検査することから、1 回の検査で元の水試料 10ml 分を検査していることになる。このことは、培養法でも 10ml 分の濃縮物を培養検査していることと、見かけ上は同等としていることの妙がある。当該研究でも核酸抽出方法を変更し、水試料 200ml 分を 100ul に抽出し、5ul を検査に使用することとした。これは核酸の回収率の向上とこの背景に基づく。

E. 結論

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その導入に期待が寄せられている。なお、迅速検査法は従来の培養試験法と原理的に異なることから状況によっては得られる結果や解釈に差異が生じる可能性がある。結果に違いが生じる原因は死菌(由来のDNA)の検出の可否、反応阻害の有無、反応特異性の違い、菌数と遺伝子コピー数の違いがあり、両検査法の併用

(実用化)に向けてこれらの点を整理した。

適正管理されている浴槽等において菌由来の DNA のみによる汚染が生じることはありえず、浴槽施設の内でのレジオネラ属菌の繁殖を端的に示す結果と考えられる。定量 PCR は遺伝子のコピー数を測定することが可能であり、死菌を含むことで培養法に比べて菌数が多く評価される傾向となるが、安全側に寄った試験法としてレジオネラ属菌の存在量を示すことができる。反応阻害を回避すれば、遺伝子増幅試験が生菌を取りこぼすことはなく、温泉施設の再開に向けた確認試験方法として有効である。温泉水試料ではフミン質等による遺伝子増幅反応の阻害が懸念されることから、核酸抽出酵素処理・カラム精製を中性～弱酸性下で行なうことによる核酸抽出法を提案した。一方、簡易な調製方法も求められており、アルカリ熱抽出法と反応回避試薬の組み合わせ、さらに、rRNA を鋳型とする高感度な定量逆転写 PCR (qRT-PCR) 法を開発し、抽出過程で特段の処理を施さなくても、核酸抽出液の希釈操作だけで阻害反応を回避できることが確認された。培養法と遺伝子検査法 (qRT-PCR) を組み合わせることで、選択的に生菌の検出も可能となった (LC qRT-PCR)。予め死菌由来の DNA を修飾酵素分解した後に PCR による増幅反応を行なうことで死菌由来の DNA を除去する EMA-PCR 法も検討した。市販の 2 種類のレジオネラ遺伝子検査試薬の反応特異性を検討し、わが国で分離されるレジオネラ属に関しては概ね検出することを示した。いずれの試薬においても検出されない *Legionella londiniensis* 用の検出試薬を開発した。qPCR の検量線を作成するため、基準株として *L. pneumophila* 長崎株 80-045 株を用いて培養条件を 30°C 4 日間培養としたコロニーから作成することを提案した。

本研究で検討した遺伝子検査法の成果の一部は、レジオネラ症防止指針第三版 ((財)ビル管理教育センター) に記載された。

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

F. 研究発表

紙上発表

村上光一、長野英俊、野田多美枝、濱崎光宏、堀川和美、石黒靖尚、乙藤武志、迎田恵之、泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎、浴場施設でのレジオネラ属菌と宿主アメーバの関連、およびレジオネラ属菌を塩素消毒により制御する場合の問題点、防菌防黴、Vol.36, No.11, pp.749-756 (2008)

烏谷 竜哉、黒木 俊郎、大谷 勝実、山口 誠一、佐々木 美江、齊藤 志保子、藤田 雅弘、杉山 寛治、中嶋 洋、村上 光一、田栗 利紹、藏元 強、倉 文明、八木田 健司、泉山 信司、前川 純子、山崎 利雄、縣 邦雄、井上 博雄 掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子、感染症学雑誌 83: 36~44, 2009

学会発表

倉 文明、泉山信司、伊藤雅代、遠藤卓郎、クロラミン B によるレジオネラ属菌の消毒、日本防菌防黴学会第 35 回年次大会、平成 20 年 9 月、浜松市

神田隆、高橋奈緒美、杉山寛治、泉山信司、倉文明、遠藤卓郎、浴槽水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討、日本防菌防黴学会第 35 回年次大会、平成 20 年 9 月、浜松市

遠藤卓郎、泉山信司、倉 文明、クロラミン B によるレジオネラ属菌と *Naegleria* 属アメーバの消毒、第 8 回環境技術学会研究発表大会、2008 年 9 月、大阪市

泉山信司、倉 文明、縣 邦雄、八木田健司、遠藤卓郎、クロラミン B による *Naegleria* アメーバの消毒、第 68 回日本寄生虫学会東日本支部大会、

2008年10月、浜松市

阪府堺市

泉山信司・八木田健司・倉 文明・遠藤卓郎、モノ
クロミンによる Naegleria アメーバの消毒、第 8
回環境技術学会研究発表大会、2009年9月、大

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 リアルタイムPCR および LAMP 法の検出特異性

ID-No	Species	Serogroup or Biotype	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	qPCR	LAMP
1	NII0145 <i>L. adelaidensis</i>		E	1762-AUS-E	49625	-	-
2	NII0040 <i>L. anisa</i>		E	WA-316-C3	35292	+	+
3	NII0405 <i>L. beliardensis</i>		E	Montbe'liard A1	700512	-	+
4	NII0057 <i>L. birminghamensis</i>		C	1407-AL-H	43702	+	-
5	NII0009 <i>L. bozemanii</i>	1	C	WIGA	33217	+	+
6	NII0687 <i>L. bozemanii</i>	2	C	Tronto-3	35545	+	+
7	NII0114 <i>L. brunensis</i>		E	441-1	43878	+	-
8	NII01254 <i>L. busanensis</i>		E	KCTC 12084, K9951	700510	-	+
9	NII0047 <i>L. cherrii</i>		E	ORW	35252	+	+
10	NII0113 <i>L. cincinnatiensis</i>		C	72-OH-H	43753	+	+
11	NII0417 <i>L. donaldsonii</i>		C	MDA 2706	BAA-693	+	+
12	NII0406 <i>L. drozanskii</i>		E	LLAP-1	700990	-	+
13	NII0078 <i>L. dumoffii</i>	BT-1	E	NY 23	33279	+	+
14	NII0234 <i>L. gormanii</i>		E	LS-13	33297	+	+
15	NII0049 <i>L. erythra</i>	1	E	SE-32A-C8	35303	+	+
16	NII0146 <i>L. fairfieldensis</i>		E	1725-AUS-E	49588	-	+
17	NII0408 <i>L. fallonii</i>		E	LLAP-10	700992	+	+
18	NII0688 <i>L. feeleii</i>	1	E	WO-44C	35072	+	+
19	NII0689 <i>L. feeleii</i>	2	C	691-WI-H	35849	+	+
20	NII0193 <i>L. geestiana</i>		E	1308	49504	(+)*	-
21	NII0147 <i>L. gratiana</i>		E	Lyon 8420412	49413	+	+
22	NII0404 <i>L. gresilensis</i>		E	Gre'oux 11D13	700509	-	+
23	NII0690 <i>L. hackeliae</i>	1	C	Lansing 2	35250	+	+
24	NII0691 <i>L. hackeliae</i>	2	C	798-PA-H	35999	+	+
25	NII0053 <i>L. israelensis</i>		E	Bercovier 4	43119	-	-
26	NII0046 <i>L. jamestowniensis</i>		E	JA-26-G1-E2	35298	+	+
27	NII0014 <i>L. jordani</i>		E	BL-540	33623	+	+
28	NII0148 <i>L. lansingensis</i>		C	1677-MI-H	49751	+	+
29	NII0194 <i>L. londiniensis</i>	1	E	1477	49505	-	-
30	NII01255 <i>L. londiniensis</i>	2	E	Mulhouse B26	BAA-518	-	-
31	NII0692 <i>L. longbeachae</i>	1	C	Long Beach 4	33462	+	+
32	NII0693 <i>L. longbeachae</i>	2	C	Tucker 1	33484	+	+
33	NII0045 <i>L. maceachernii</i>		E	PX-1-G2-E2	35300	+	+
34	NII0008 <i>L. micdadei</i>		C	TATLOCK	33218	+	+
35	NII0116 <i>L. moravica</i>		E	316-36	43877	+	-
36	NII0195 <i>L. nautarium</i>		E	1224	49506	+	+
37	NII0036 <i>L. oakridgensis</i>		E	OR-10	33761	-	+
38	NII0042 <i>L. parisiensis</i>		E	PF-209C-C2	35299	+	+
39	NII0001 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1	C	Philadelphia-1	33152	+	+
40	NII0002 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	2	C	Togus-1	33154	+	+
41	NII0003 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	3	E	Bloomington-2	33155	+	+
42	NII0004 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	4	C	Los Angeles-1	33156	+	+
43	NII0005 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	5	E	Dallas 1E	33216	+	+
44	NII0150 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	5	E	U8W	33737	+	+
45	NII0006 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	6	C	Chicago 2	33215	+	+
46	NII0033 <i>L. pneumophila</i>	7	E	Chicago 8	33823	+	+
47	NII0034 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	8	C	Concord 3	35096	+	+
48	NII0304 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	9	E	IN-23-G1-C2	35289	+	+
49	NII0050 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	10	C	Leiden 1	43283	+	+
50	NII0051 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	11	C	797-PA-H	43130	+	+
51	NII0060 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	12	C	570-CO-H	43290	+	+
52	NII0061 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	13	C	82A3105	43736	+	+
53	NII0062 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	14	C	1169-MN-H	43703	+	+
54	NII0063 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	15	C	Lansing 3	35251	+	+
55	NII0451 <i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-192		+	+
56	NII0453 <i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-206		+	+
57	NII0462 <i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-239		+	+
58	NII0196 <i>L. quateirensis</i>		E	1335	49507	+	-
59	NII0260 <i>L. quinlivanii</i>	2	E	LC870	BAA-538	+	-
60	NII0407 <i>L. rowbothamii</i>		E	LLAP-6	700991	+	+
61	NII0048 <i>L. rubrilucens</i>		E	WA-270A-C2	35304	+	+
62	NII0039 <i>L. sainthelensi</i>	1	E	Mt St Helens 4	35248	+	+
63	NII0207 <i>L. sainthelensi</i>	2	C	Ly176.97	700517	+	+
64	NII0409 <i>L. santicrucis</i>		E	SC-63-C7	35301	+	+
65	NII0149 <i>L. shakespearei</i>		E	214	49655	+	-
66	NII0043 <i>L. spiritensis</i>	1	E	Mt St Helens 9	35249	-	+
67	NII0261 <i>L. spiritensis</i>	2	E	ML76	BAA-537	-	+
68	NII0041 <i>L. steigerwaltii</i>		E	SC-18-C9	35302	+	+
69	NII0262 <i>L. taurinensis</i>		E	Turin I no 1	700508	+	+
70	NII0117 <i>L. tucsonensis</i>		C	1087-AZ-H	49180	+	+
71	NII0032 <i>L. wadsworthii</i>		C	81-716A	33877	+	+
72	NII0206 <i>L. waltersii</i>		E	2074-AUS-E	51914	+	+
73	NII0197 <i>L. worsleiensis</i>		E	1347	49508	+	-
74	NII0305 <i>Legionella</i> genomospecies 1		E	2055-AUS-E	51913	+	-
75	NII0306 <i>Legionella</i> sp.		E	LLAP-14	700313	+	-

* 感度が低く 本文では検出数に含めていない

表 2 *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

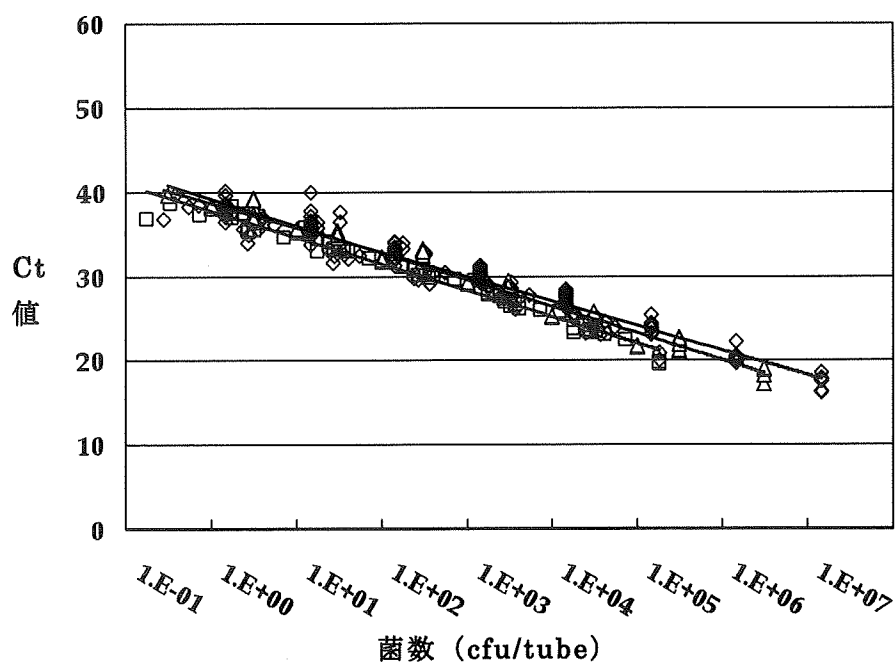


図 1 3 種類のリアルタイム PCR 装置を用いた Ct 値測定結果

SmartCyclerII(△)、DICE(□)およびABI Prism7000(◇)による Ct 値の分布図とその近似曲線を示す。それぞれの近似式は $y = -1.39\text{Ln}(x) + 39.22$ ($r^2=0.975$)、 $y = -1.37\text{Ln}(x) + 37.82$ ($r^2=0.975$)、および $y = -1.26\text{Ln}(x) + 38.63$ ($r^2=0.9502$)であった。その結果、異なった PCR 装置を用いても得られる Ct 値に大きな誤差は生じないことが示された。

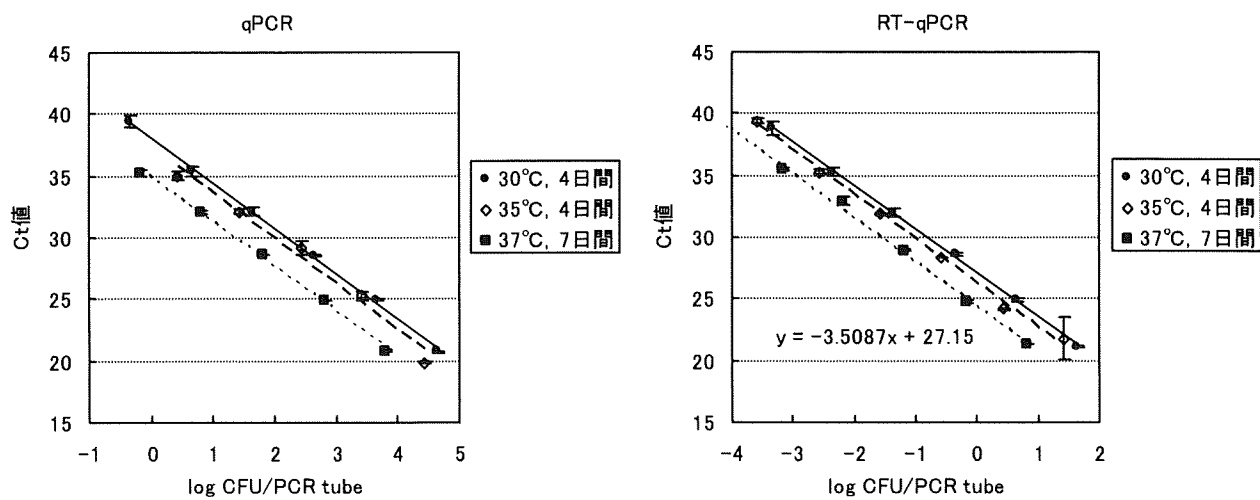


図2 培養条件による DNA 及び RNA 量の比較 PCR チューブあたりの検量線

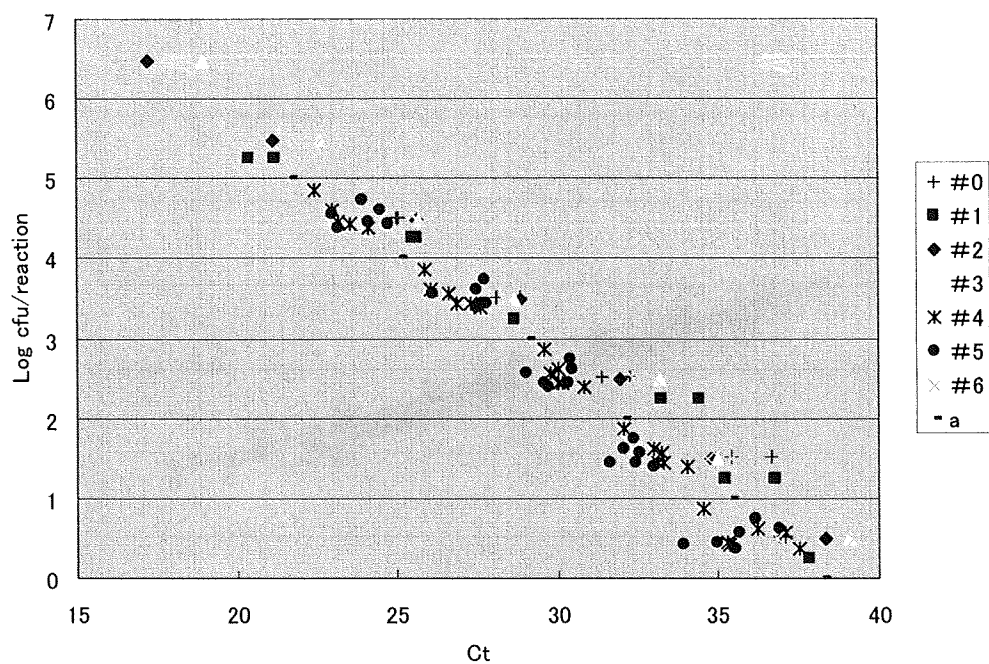


図3 感染 Acanthamoeba 由来レジオネラ (#0 +, #1 ■) と BCYE α 培地上コロニー (#2 ほか) から作成した検量線

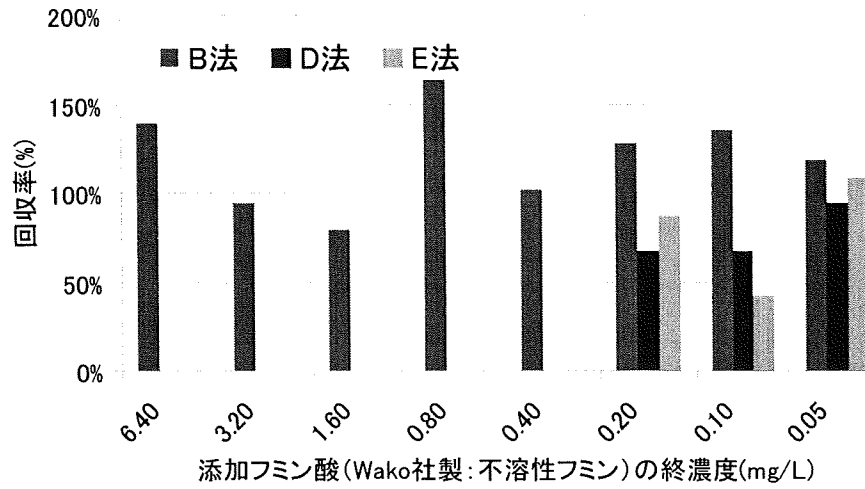
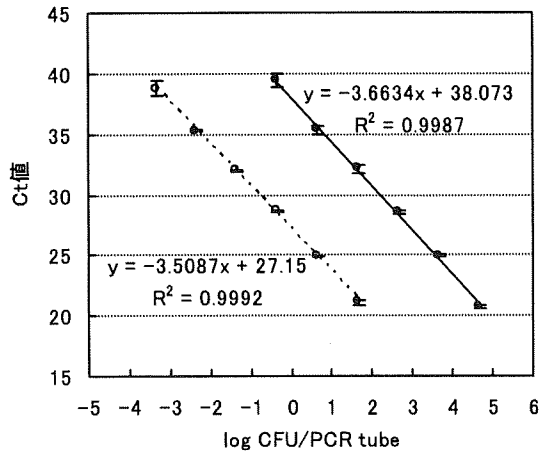


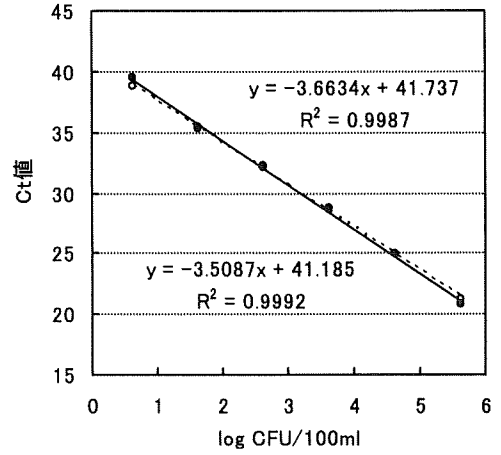
図4 不溶性フミン酸添加時のDNA抽出法の比較
 qPCR による評価、酵素処理・カラム抽出法 (B 法)、キレックス法 (D 法)、アルカリ熱抽出法 (E 法)

表3 阻害回避試薬の検討

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	減少	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	減少	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



(a) PCR チューブあたりの検量線



(b) 濃縮前の試料濃度に換算した検量線

図5 qRT-PCR と qPCR の検量線

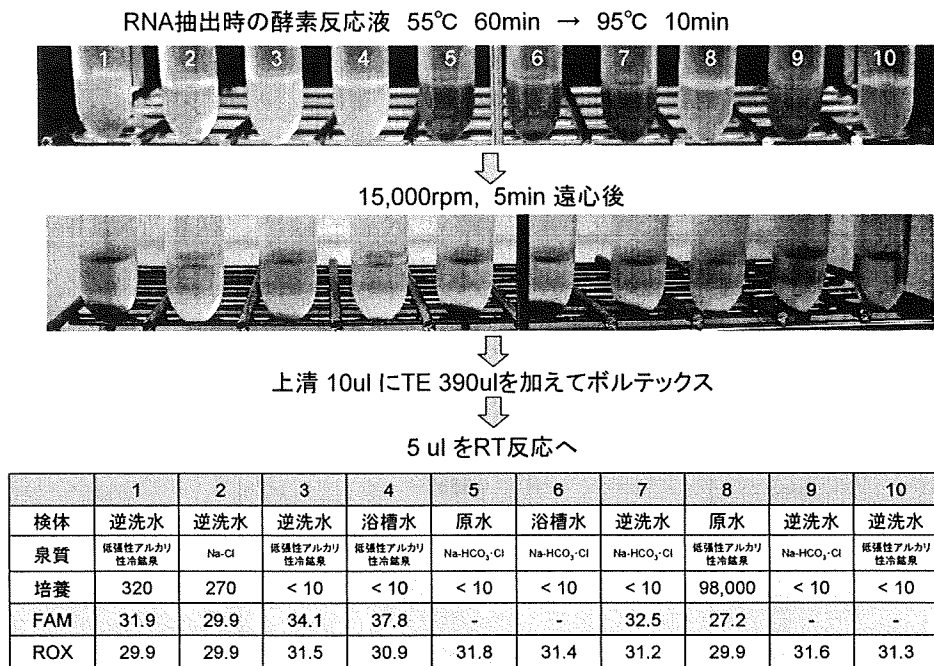
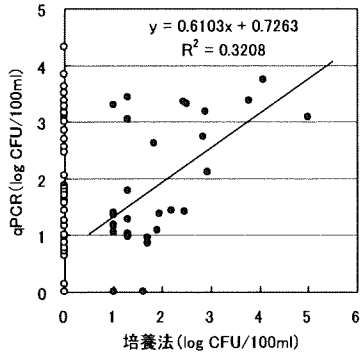
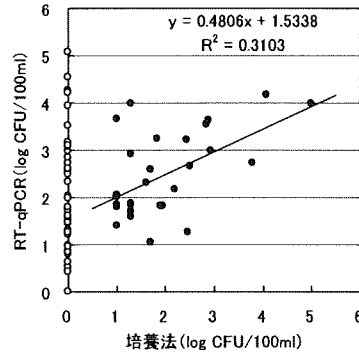


図6 RNA 抽出時の沈渣と検査結果

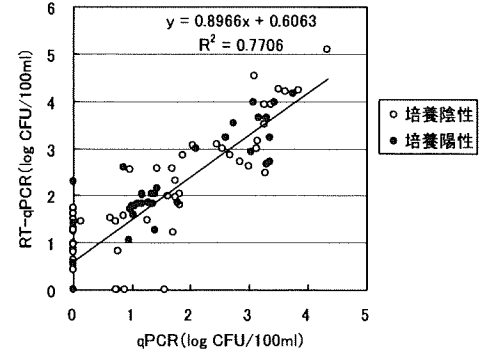
1) 全試料 (n=99)



(a) 培養法と qPCR

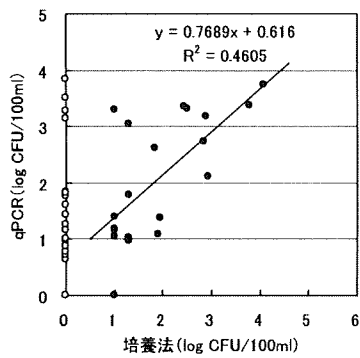


(b) 培養法と RT-qPCR

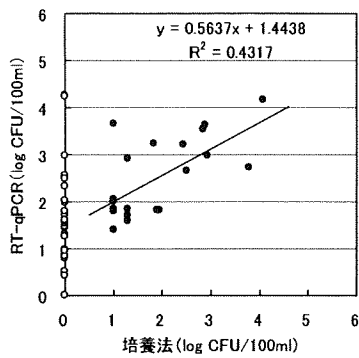


(c) qPCR と RT-qPCR

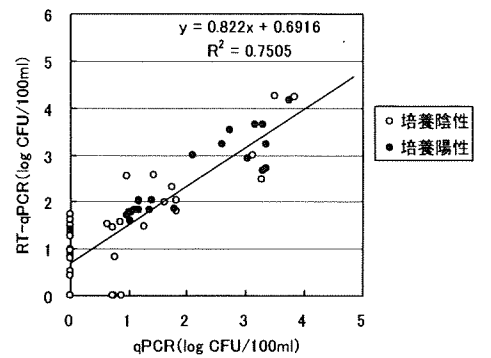
2) 浴槽水、逆洗水等 (n=61)



(a) 培養法と qPCR



(b) 培養法と RT-qPCR



(c) qPCR と RT-qPCR

図7 培養法、qPCR法及びRT-qPCR法の相関 (*L. londiniensis*が検出された3件を除く)

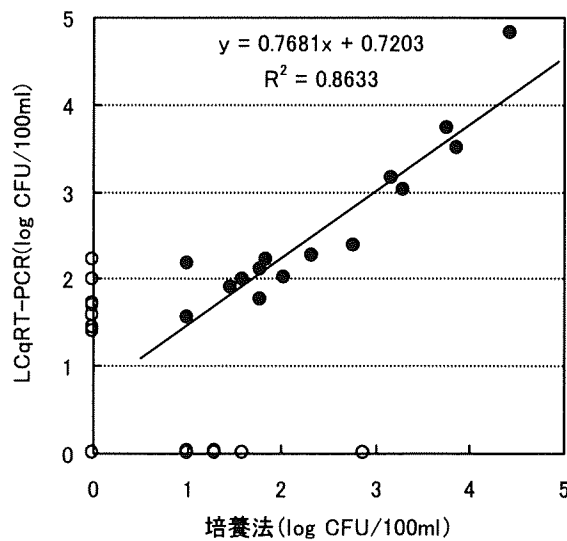


図8 培養法と LC qRT-PCR 法の相関

表4 白湯50試料に対するEMA-PCRの結果

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	2.8	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	0.9	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		白湯
38	<1	<1	<1	<1	1	0		白湯
39	<1	10	<1	<1	1	0	1	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		白湯
46	<1	<1	<1	<1	2	0		白湯
47	<1	85	<1	<1	2	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	5.4	白湯

[資料]

浴槽水等のレジオネラ属菌検出状況と検査法の比較(平成19年度～21年度)

研究要旨

近年事例数が増加し問題となっているレジオネラ感染症について、原因として重要な浴槽水等の汚染調査と、衛生管理のための指標として各種の検査法を検討した。平成19年度から21年度の期間に浴槽水等224検体を採取し、遺伝子検査法(リアルタイムPCR法、LAMP法あるいは逆転写反応後のリアルタイムPCR法)と培養法によりレジオネラ属菌の検査を行った。同時に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、一部の検体については磁気ビーズによる濃縮処理やATP測定を行った。その結果、培養法は浴槽水等224検体中23検体(10.3%)、リアルタイムPCR法は224検体中111検体(49.6%)、LAMP法は167検体中42検体(25.1%)、逆転写反応後のリアルタイムPCR法は57検体中42検体(73.7%)からレジオネラ属菌が検出され、逆転写反応後のリアルタイムPCR法>リアルタイムPCR法>LAMP法>培養法の順に検出率が高かった。培養法により検出された菌種は*L.pneumophila* 1群、2群、3群、4群、5群、6群、7群、8群、9群、10群、型別不能、および*L.micdadei*で、浴槽水等12検体(5.4%)からは複数の血清型の*L.pneumophila*が検出された。また、磁気ビーズを用いた濃縮法により、検出率を向上することができた。逆転写反応後のリアルタイムPCR法とリアルタイムPCR法は他の検査法に比べて高い検出感度と定量性を示し、衛生管理指標として有用と思われた。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

近年、入浴施設に関連したレジオネラ属菌による感染症の集団発生や散発事例が問題となっており、入浴施設の衛生管理はレジオネラ感染症の予防に重要である。そこで、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、従来から実施している培養法に加えて遺伝子検査法や磁気ビーズによる濃縮法、ATP測定などを実施して、各検査法を比較し有用な衛生管理指標を検討した。

B.研究方法

(1)材料

浴槽水等について平成19年度は78検体、平成20年度は89検体、平成21年度は57検体の計224検体を採取して、レジオネラ属菌の検査を実施した。

(2)方法

レジオネラ検査法は、平成19年度～21年度に従来より実施している培養法(濾過法)と遺伝子検査法のリアルタイムPCR法(qPCR法)を用い、さらにLAMP法(平成19年度～20年度)および逆転写(RT)反応後のリアルタイムPCR法(qRT-PCR法:平成21年度のみ)を併用して実施した。培養法については、一部の検体について