

磁気ビーズによる濃縮を併用して行った。即ち、検体 500ml をフィルター(PVDF 製あるいはポリカーボネート製、0.45 μ m)でろ過し、フィルターを滅菌水 5ml で1分間ボルテックスして菌を十分洗い出した。培養法はこの溶液1mlを50°C、20分間加熱処理後、10 倍段階希釈し、その 0.1ml を GVPC 培地(日本ビオメュー製)にコンラージで塗抹して 37°C、10 日間培養後、コロニーの同定と菌数測定を行った。遺伝子検査は、残りの溶液 2ml を 13,000rpm、5 分間遠心後、上清を除去して沈渣 100 μ l を得た。この濃縮液を研究班の DNA 抽出法で抽出して、5 μ l を qPCR 法と LAMP 法に使用した。qRT-PCR 法は上記遠心濃縮液 100 μ l を研究班の RNA 抽出法により抽出後、RT 反応を行って調製した溶液の 5 μ l を使用して qPCR を行った。qPCR 法(タカラバイオ: Thermal Cycler Dice Real Time System, Cycleve Legionella (5S) kit 使用)及び LAMP 法(栄研化学:リアルタイム濁度測定装置 RT-160C, Loopamp レジオネラ検出試薬キットE使用)はそれぞれのキットの説明書のとおり実施した。遺伝子検査法による定量は、*L.pneumophila* 80-045 株で作製した 10 倍段階希釈液を用いて培養法により菌数を測定し、菌量既知の各希釈液に対する Ct 値(qPCR 法および qRT-PCR 法)と Tt 値(LAMP 法)を測定して検量線を作成した。各検体の菌数はそれぞれの Ct 値と Tt 値を測定して検量線により算出した。磁気ビーズは *L.pneumophila*, *L.bozemanii*, *L.brunensis*, *L.dumoffii*, *L.micdadei*, *L.anisa* の 6 菌種と結合する Dynabeads MAX Legionella

Kit ((株)ベリタス)を用いた。濃縮は検体 45ml に磁気ビーズ用 10X バッファー5ml と磁気ビーズ 150 μ l を加えて 1 時間攪拌し、磁石にセットして洗浄後 1ml に濃縮した。この濃縮液 0.4ml と、残りの液を 50°C、30 分間加熱処理した 0.4ml を各々 GVPC 培地に塗抹して培養後、菌数測定を行った。また、検体のろ過前後の ATP 値の変化を測定するため、ろ過前の検体 100 μ l とフィルターろ過(0.45 μ m)した検体 100 μ l で 3 回ずつ ATP 値の測定(キッコーマン:ルシパックワイド)を行った。同時に一般細菌数(SPC)と従属栄養細菌数(HPC)を測定して、ATP 値の変化との関連を検討した。

C.研究結果

浴槽水等について、検査法別のレジオネラ属菌検査結果を、表 1 に示した。培養法では、224 検体中 23 検体(10.3%)、qPCR 法は 224 検体中 111 検体(49.6%)、LAMP 法は 167 検体中 42 検体(25.1%)、qRT-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た。培養法で分離された菌種とその血清型は、*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、12 検体(5.4%)からは複数の血清型の菌が検出された。検査法別のレジオネラ検出率は qRT-PCR 法が最も高く、次いで qPCR 法>LAMP 法>培養法の順であった。

qRT-PCR 法、qPCR 法および LAMP 法は既知濃度のレジオネラ菌液を使用して検査を行い、Ct 値および Tt 値からそれぞれ検量線を作成した(図 1-1、1-2、1-3)。その結果、

qRT-PCR 法 ($R^2=0.990$) > qPCR 法 ($R^2=0.988$) > LAMP 法(0.973)の順に高い相関が見られた。

各検査法でレジオネラ属菌陽性となった122検体のうち、qPCR法、LAMP法および培養法の3法により検査したものは79検体、qRT-PCR法、qPCR法および培養法の3法を実施したものが43検体であった。このうちqPCR法、LAMP法、培養法の3法で陽性となった検体は15検体(19.0%)で、qPCR法と他のいずれかの方法の2法が陽性は32検体(40.5%)、qPCR法のみ陽性は32検体(40.5%)であり、qPCR法は79検体すべてが陽性であった(表 2-1)。qPCR法との陽性一致率はLAMP法が42検体(53.2%)、培養法は20検体(25.3%)で、LAMP法の一致率が高かった。また、検出率の高かった検査法はそれより低い検出率の検査法で陽性となった検体すべてが陽性であった。一方、qRT-PCR法、qPCR法、培養法の3法で検査し陽性となった検体は3検体(7.0%)で、qRT-PCR法とqPCR法の2法が陽性は28検体(65.1%)、qRT-PCR法のみ陽性は11検体(25.6%)でqRT-PCR法(42検体陽性) > qPCR法(32検体陽性)の順に検出率が高かったが、qPCR法のみ陽性が1検体(2.3%)あった。培養法で陽性の検体は、他の2法でも陽性であった(表 2-2)。

qPCR法、LAMP法および培養法で検出された検体について、検査法相互の菌数分布を100mlあたりの菌数に換算して、図 2-1～2-3に示した。また、qRT-PCR法とqPCR法で検出された検体についても、同様にして菌数分布を図 2-4に示した。

qPCR法と培養法(図 2-1)およびqPCR法と

LAMP法(図 2-2)の相関係数はそれぞれ $R^2=0.6193$ と $R^2=0.4027$ で、qPCR法と培養法がより強い相関が見られた。LAMP法と培養法(図 2-3)は $R^2=0.0801$ で、ほとんど相関は認められなかった。qRT-PCR法とqPCR法(図 2-4)は $R^2=0.6248$ で、最も強い相関が見られた。

残留塩素濃度による各検査法のレジオネラ属菌検出率への影響について、表 3に示した。

残留塩素濃度が0.2ppmより低い26検体はどの検査法でも検出率(42.3%～88.5%)が高く、管理濃度(0.2～0.4ppm)以上の検体は培養法が21検体中1検体(4.8%)、qPCR法は61検体中15検体(24.6%)が陽性で、qPCR法では残留塩素濃度1ppm以上の29検体でも4検体(13.8%)が陽性であった。

培養法における磁気ビーズ濃縮の有無によるレジオネラ属菌検出率の比較は、表 4に示した。

69検体のうち通常の培養法と磁気ビーズ濃縮法の両方で陽性になったのは4検体(5.8%)で、磁気ビーズ濃縮法によりさらに4検体の計8検体(11.6%)が陽性となり、検出率が向上した。しかし、両法陽性の4検体のうち2検体は通常の培養法でレジオネラ属菌が多数検出されており、磁気ビーズ濃縮では菌数の測定は不可能であった。

60検体についてフィルターろ過前後のATP値を測定し、ATP値の変化とレジオネラ属菌、SPCおよびHPCの検査結果を、表 5に示した。

ATP値の平均減少率が最も大きかったグル

ープ A は、レジオネラ陽性検体が 7 検体中 6 検体で、SPC は 10^5 cfu/ml、HPC も 10^6 cfu/ml オーダーであった。ATP 実測値の高低もあるが、ろ過前後の ATP 値の減少率が大きいグループほど、HPC および SPC の菌数が多く、レジオネラ属菌の検出率も高かった。

D. 考察

浴槽水等のレジオネラ属菌の検査において遺伝子検査法(qPCR)を併用すれば検出率が 41.0(平成 19 年度)、43.8(平成 20 年度)、56.1(平成 21 年度)と増加していた。しかし、培養法による検出率は、10.3%(平成 19 年度)、13.5%(平成 20 年度)とわずかに増加したが、平成 21 年度には 5.3%と大きく減少し、衛生管理に対する意識の向上や保健所などによる指導が効果を現してきた結果ではないかと思われる。

遺伝子検査法はどの方法も培養法に比べて高感度で高い検出率を示し、迅速に結果が得られ、残留塩素による検査結果への影響も培養法に比べて少なく潜在的な汚染状況が把握できるなど、衛生管理指標としては有用な検査方法であることが示された。ただ、遺伝子検査法は高価な機器や試薬を使用し、遺伝子の抽出が比較的煩雑であるため安定した結果を得るためにはある程度のトレーニングが必要で、一般的に普及するためには多少時間が掛かると思われる。

検査法別では、qRT-PCR 法 > qPCR 法 > LAMP 法 > 培養法の順に検出率が高く、遺伝子検査法の検量線はどれも高い定量性を示した。陽性検体の菌数分布による検査法相互の相関でも、qRT-PCR 法と qPCR 法は $R^2=0.6248$ で最も強い相関を示し、これ

に次いで qPCR 法と培養法が $R^2=0.6193$ と意外に強い相関を示した。qRT-PCR 法は平成 21 年度にはじめて実施した方法であり、濃縮液からの処理過程が RT 反応やその後の調製など通常の qPCR に比べて比較的煩雑であったが、高い感度と検出率は qPCR よりさらに有用な衛生管理指標になるものと思われる。

磁気ビーズ濃縮法は、温泉に含まれているフミン質などの不純物の除去・精製を目的として使用し、LAMP 法の反応阻害物質の除去による定量性の向上が期待できる。さらに、従来の培養法の検体 10ml 相当量に比べ 1.8 倍の 18ml 相当量を分離培地上に塗抹できるため、検出率を上げることができた。しかしながら、磁気ビーズ濃縮法の導入は検出率の向上が期待できるが、一方ではレジオネラ属菌の菌数が多い検体や濃縮時に磁気ビーズの洗浄が不十分などときには、分離培地上に多数のレジオネラ属菌や多くの雑菌が同時に発育し、菌数測定不能や菌の同定が困難になる。したがって、磁気ビーズ濃縮法は通常の培養法と併用するとともに、雑菌除去のために磁気ビーズの洗浄を丁寧に行うよう注意すれば、十分回避できるものと思われる。

ATP 値の測定も衛生管理指標として重要であり、特に浴槽水等のフィルターろ過前後の ATP 値の減少率は、SPC や HPC と関連が見られた。即ち、減少率が 95%と最も高かったグループでは、ろ過前の ATP 実測値が 37~362 で低い値も含まれていたが、レジオネラ属菌検出率は高率であったことから、SPC や HPC と同様、ATP 値の減少率はレジオネラ汚染の指標となり得る可能性が示唆された。

E. 結論

1. 浴槽水等 224 検体中 122 検体(54.5%) からレジオネラ属菌が検出された。
2. 培養法による検出菌は、*L.pneumophila* 血清群 1、2、3、4、5、6、7、8、9 および 10 群と型別不能、*L.micdadei* で、12 検体 (5.4%) からは複数の血清型の *L.pneumophila* が検出された。
3. 検査法別のレジオネラ検出率は、qRT-PCR 法>qPCR 法>LAMP 法>培養法の順に高かった。
4. 遺伝子検査法、浴槽水等のフィルターろ過前後の ATP 値の減少率、一般細菌数および従属栄養細菌数などは、衛生管理指標として有用と思われる。
5. 磁気ビーズ濃縮法の導入により検出率の向上が期待できるが、通常の培養法との併用や磁気ビーズの丁寧な洗浄などに注意が必要と思われた。

表1 浴槽水等の検査法別レジオネラ属菌検出結果

検査法	検体数	陽性検体数	検出率(%)	検出菌名(血清群)
培養法	224	23	10.3	<i>L. pneumophila</i> (1群、2群、3群、4群、5群、6群、7群、8群、9群、10群、型別不能)、 <i>L.micdadei</i>
qPCR法	224	111	49.6	
LAMP法	167	42	25.1	
qRT-PCR法	57	42	73.7	
計	224	122		

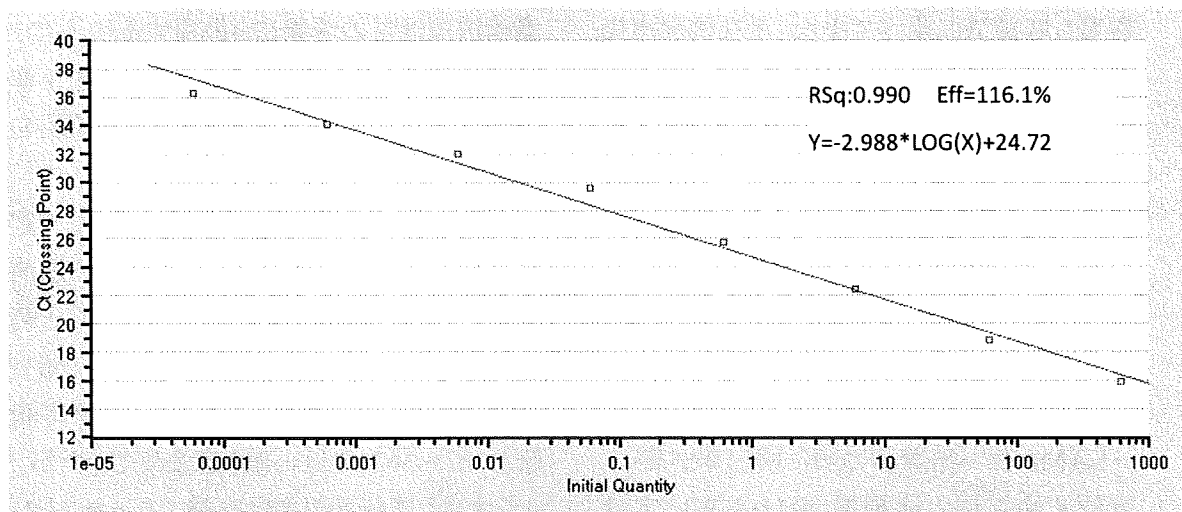


図 1-1 Standard Curve (qRT-PCR 法)

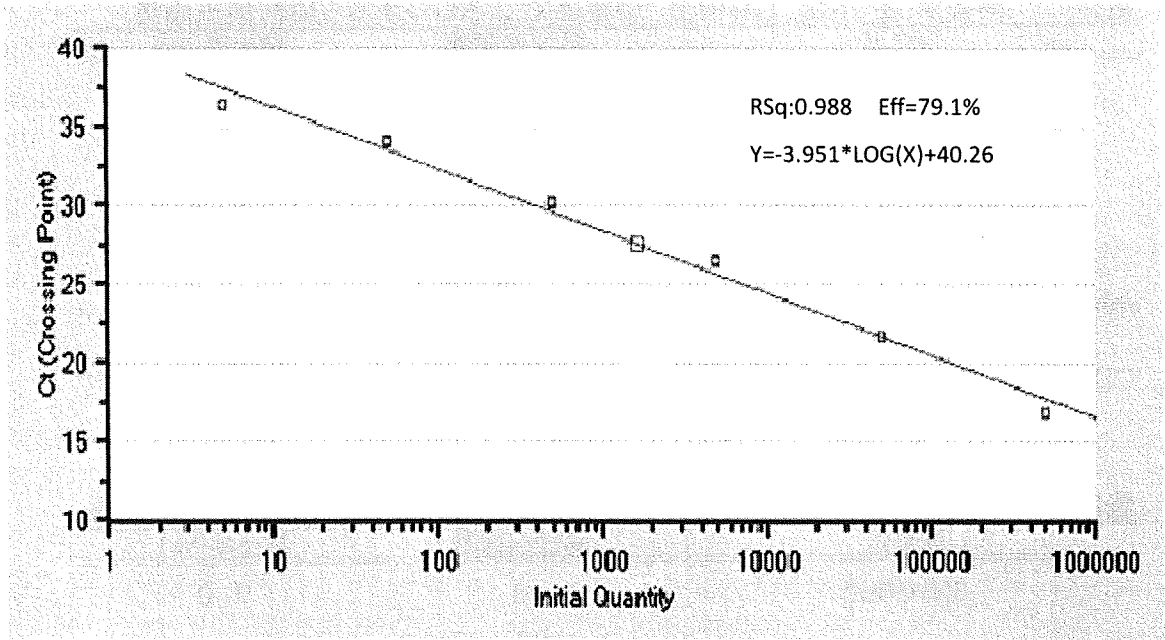


图 1-2 Standard Curve (qPCR 法)

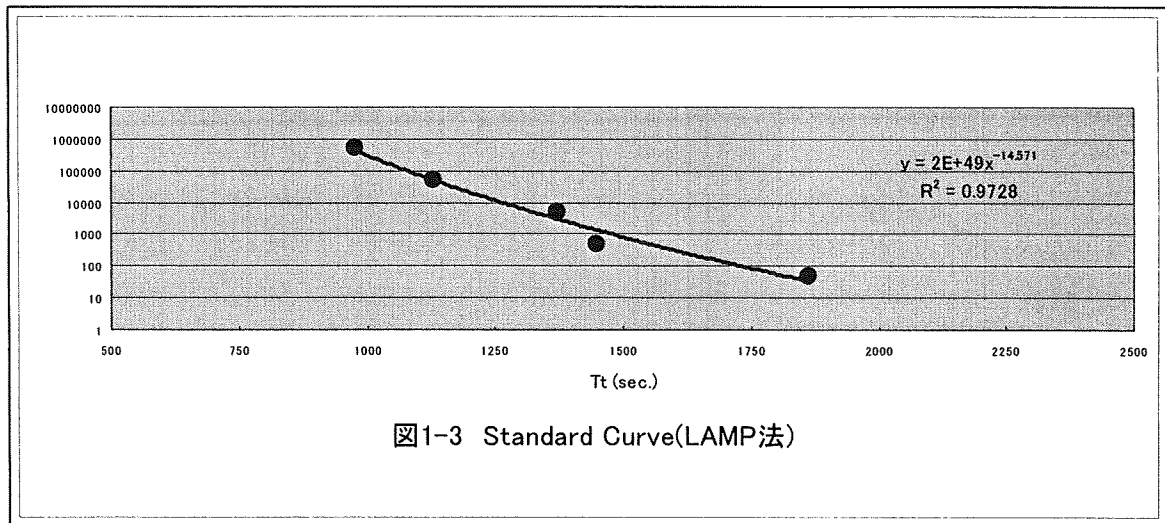


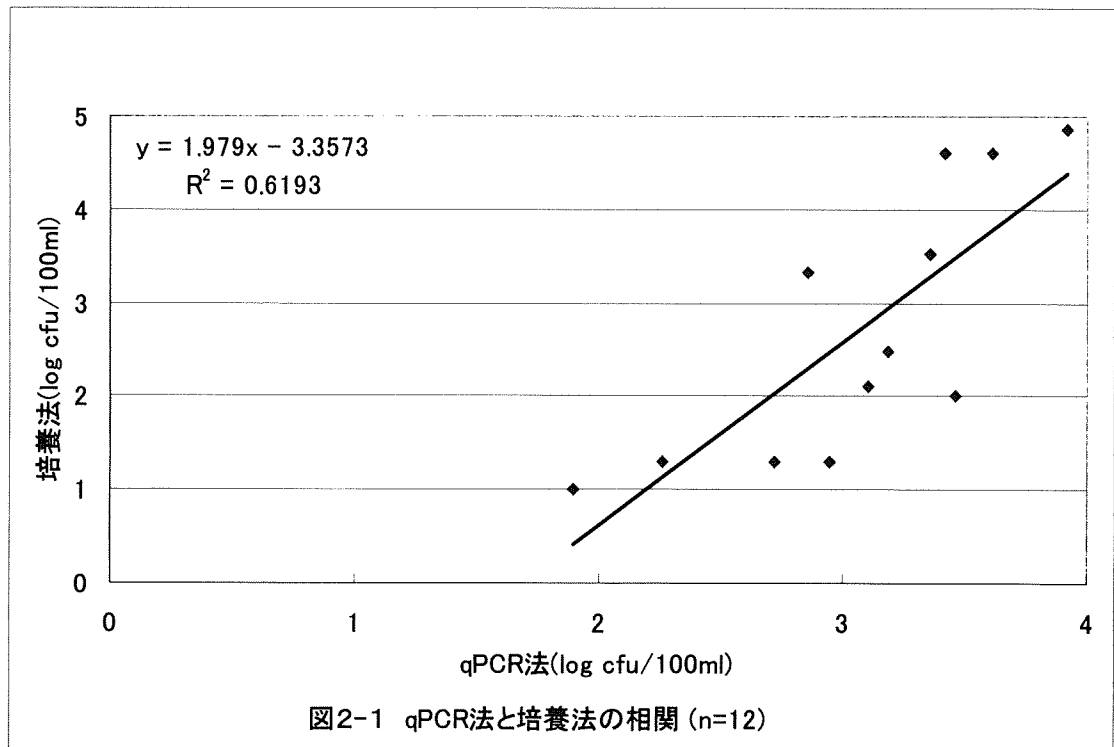
图 1-3 Standard Curve (LAMP 法)

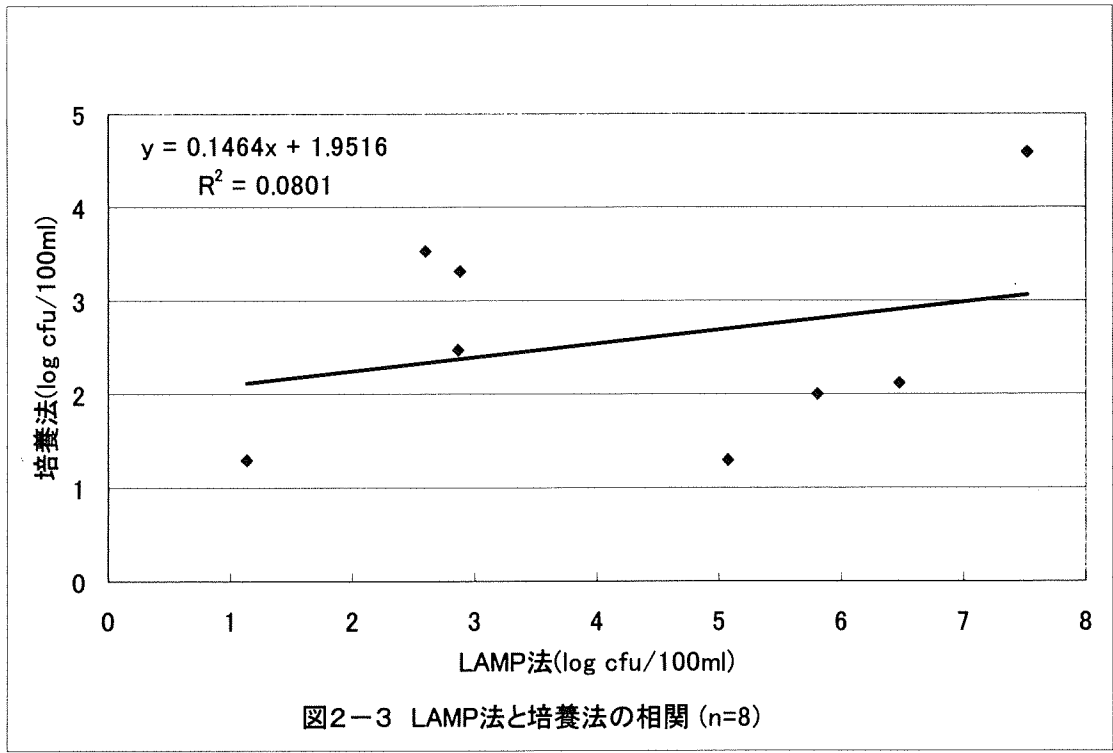
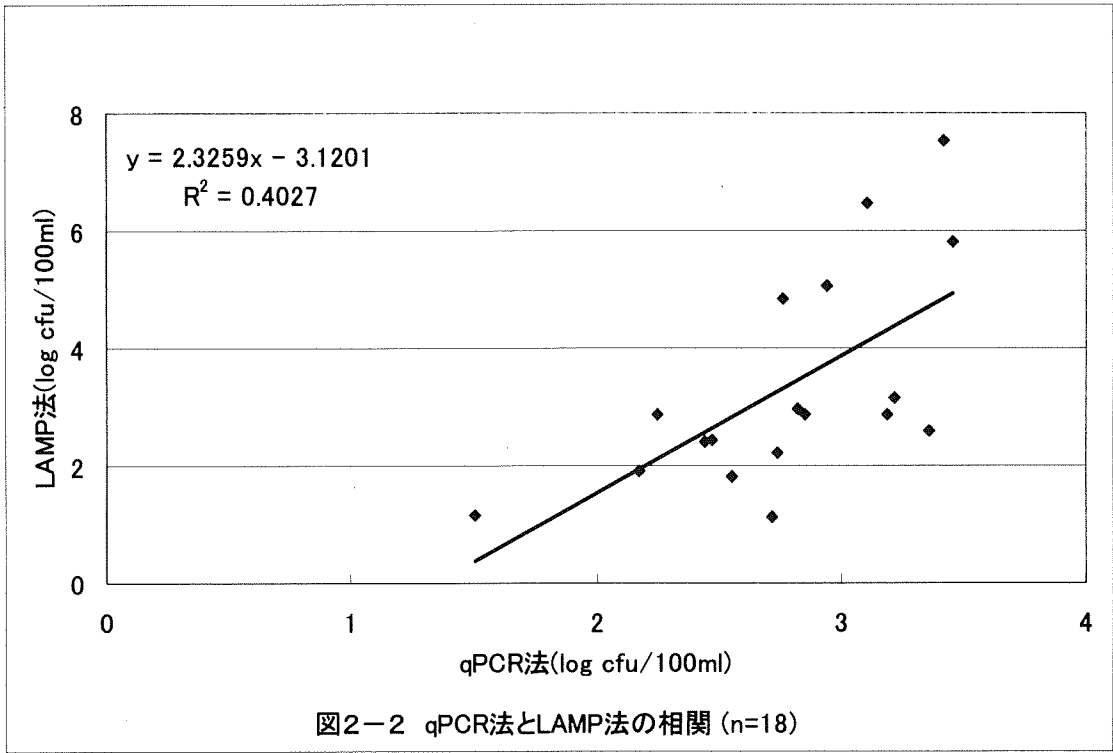
表2-1 検査法(qPCR法、LAMP法、培養法)によるレジオネラ属菌検出結果

検査法	陽性検体数	検出率(%)
3法で検出	15	19.0
qPCR法とLAMP法で検出	27	34.2
qPCR法と培養法で検出	5	6.3
qPCR法で検出	32	40.5
計	79	

表2-2 検査法(qRT-PCR法、qPCR法、培養法)によるレジオネラ属菌検出結果

検査法	陽性検体数	検出率(%)
3法で検出	3	7.0
qRT-PCR法とqPCR法で検出	28	65.1
qRT-PCR法で検出	11	25.6
qPCR法で検出	1	2.3
計	43	





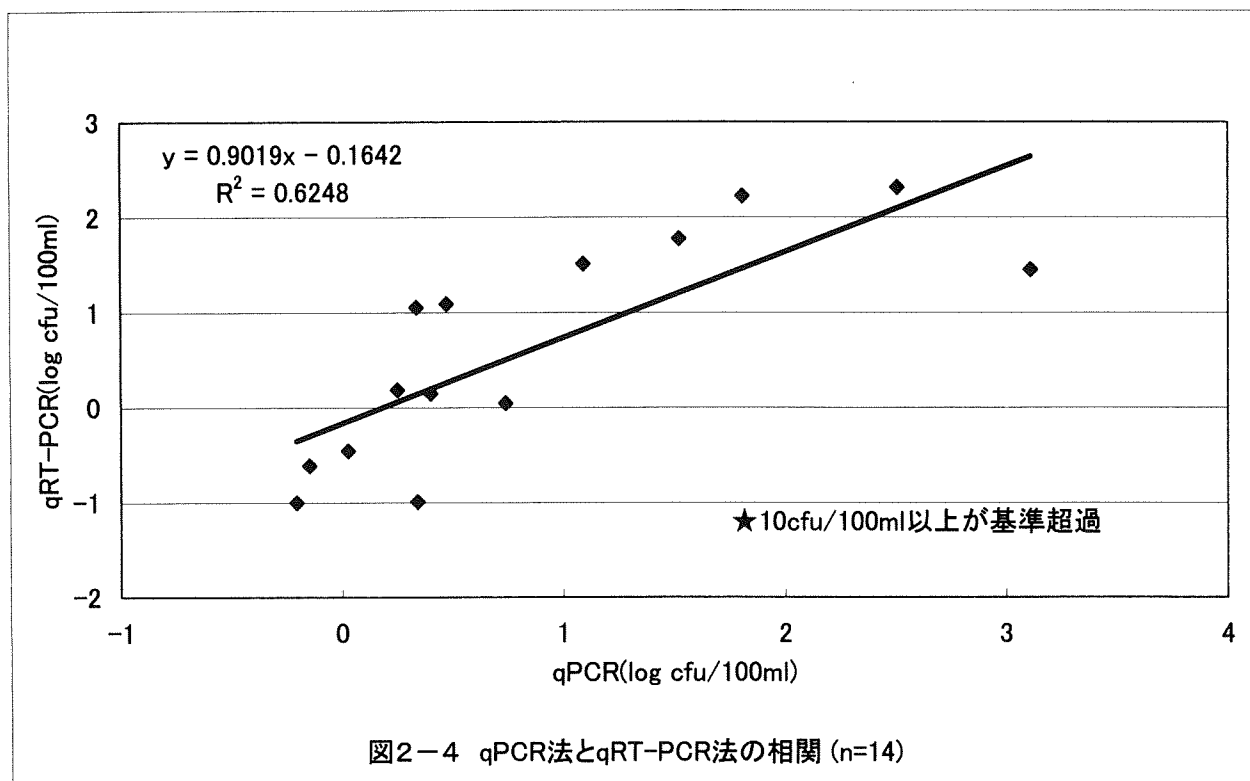


図2-4 qPCR法とqRT-PCR法の相関 (n=14)

表3 残留塩素濃度による各検査法のレジオネラ属菌検出率への影響

残留塩素濃度(ppm)	検体数	陽性検体数(%)		
		培養法	qPCR法	LAMP法
<0.2	26	11 (42.3)	23 (88.5)	15 (57.7)
0.2 ≤, ≤0.4	11	0 (0)	6 (54.5)	2 (18.2)
0.4 <, ≤1.0	21	1 (4.8)	5 (23.8)	1 (4.8)
1.0 <	29	0 (0)	4 (13.8)	0 (0)
不明	2	0 (0)	1 (50.0)	0 (0)

* : %は各検体数に対する検出率

表4 培養法における磁気ビーズ濃縮の有無によるレジオネラ属菌検出率の比較 (検体数:69)

磁気ビーズ処理	加熱処理	陽性検体数	検出率(%)
なし	50°C、20分間	4	5.8
	なし	6*	8.7
あり	50°C、30分間	8*	11.6
	ビーズ法計	8*	11.6

* : 磁気ビーズ処理した検体のうち2検体は菌数が多かったため、菌数測定不能であった

表5 ろ過前後のATP値とレジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌の検出状況

グループ	検体数	ATP値[平均値](RLU)		ATP値の平均 減少率(%)	レジオネラ(培養)		一般細菌数 (cfu/ml)	従属栄養細菌数 (cfu/ml)
		ろ過前	ろ過後		陽性	陰性		
A	7	37~362[146]	4~13[7]	95	6	1	264960	1058800
B	2	17~239[128]	53~71[39]	70	0	2	652065	775160
C	3	10~103[59]	5~65[34]	42	1	2	1307	24087
D	48	1~341[37]	2~342[37]	0	0	48	9	4938
計	60				7	53		

*一般細菌数及び従属栄養細菌数は、各グループ毎の平均値

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

定量 RT-PCR 法を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討（平成 20～21 年度）

研究分担者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	青木 紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	浅野 由紀子	愛媛県立衛生環境研究所

研究要旨

簡便、迅速で定量性に優れたレジオネラ属菌の生菌検出法を開発する目的で、レジオネラのリボソーム RNA を鋳型として検出する定量 RT-PCR 法（qRT-PCR）を検討した。培養法と同様に濃縮した試料をさらに遠心濃縮し、Proteinase K を用いた酵素溶解反応後、カラム精製のステップを省略して希釈するだけの簡便な方法によって逆転写反作用の鋳型 RNA を調製した。逆転写反応後、市販の DNA 検査試薬を用いて qPCR を実施した。本法は、培養標準株を用いた検量線の検討から高感度検出が可能であること、ならびに、実試料を用いて阻害を受けないことを確認した。実試料の検討結果は、通常のリアルタイム PCR 法と高い相関 ($R^2=0.771$) を示し、これまでの DNA 検査と同様の結果が簡便かつ高感度に得られた。

平成 21 年度は、qRT-PCR 法の核酸抽出に先立ち、濃縮試料を液体培地で培養し生菌の rRNA を増幅させることで、生菌の rRNA を優先的に検出する方法の開発を試みた。その結果、通常の培養法に用いる酸処理検体を、レジオネラ液体培地に加えて 1 夜培養し、培養液の一部を酵素溶解して精製操作なしに希釈するだけの簡便な操作で鋳型調整を行うことにより、温泉試料から生菌数の測定が可能な液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（LC qRT-PCR）を確立した。本法で得られた定量値は、 $50\sim 10^5$ CFU/100ml の範囲で培養法と極めて高い相関が得られることを明らかにした ($R^2=0.866$)。液体培養に用いる試料を再濃縮することで、さらに 10 倍の感度上昇は容易に達成可能と考えられ、培養法に代わる生菌迅速検査法として十分適用できる可能性を示した。

A 研究目的

現在、環境水からのレジオネラ属菌の検出は、濃縮した検水を培地平板上に塗布し、発育した集落数を計測する培養法により行われている。現行法の問題点としては、判定までに 7～12 日を要し、汚染状況の把握に時間がかかることが挙げられ

る。このため、遺伝子検査を利用した迅速検査法、すなわち 16S rRNA あるいは 5S rRNA 遺伝子等のレジオネラ属菌に特異的な配列を標的とした LAMP 法及びリアルタイム PCR 法が開発され、行政対応の判断材料として活用が始まっている。しかし、一部の温泉には核酸増幅を阻害するフミン

酸等が含まれるため、安定した試験成績を得るにはカラム精製等の前処理が必要であった。高度に DNA を精製する操作は煩雑で、時間と労力を要するのみならず、阻害物質の残留や回収率と定量結果の精度等が問題となることから、引き続き効果的な核酸抽出法の検討が進められている。また、迅速検査法のもう一つの問題点は、死菌の検出である。塩素消毒によって管理された入浴施設では、浴槽水中に生菌よりも多くの死菌が存在している。培養によらない遺伝子検査法は、死菌に由来する遺伝子も増幅対象とするため、通常の培養法で陰性となる検体であっても高濃度のレジオネラ属菌遺伝子が検出される場合があり、結果の解釈には注意が必要である。

本研究では、遺伝子検査の標的として、リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の転写産物である rRNA そのものを利用することを企図した。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¹⁻³⁾。本研究ではこの rRNA に着目し、rRNA から逆転写によって cDNA を合成し、cDNA をリアルタイム PCR で定量すれば、従来の検査法に比べて高感度な検出が可能となり、鋳型調製の簡略化にもつながることを期待した。さらに、核酸抽出に先立ち、濃縮試料を液体培地に加えて1夜培養し、生菌の rRNA を増幅させることで、生菌の rRNA を優先的に検出する方法の開発を試みた。

その結果、濃縮試料を酵素溶解後、精製操作なしの希釈操作だけで反応阻害を受けない RNA 抽出法を確立した。また、市販の逆転写試薬と DNA 検出キットを活用し、温泉試料からレジオネラ属菌遺伝子の高感度検出が可能な、rRNA をターゲットとしたリアルタイム RT-PCR (qRT-PCR) 法を開発した。さらに、通常の培養法に用いる酸処理検体を、レジオネラ液体培地に加えて1夜培養

し、培養液の一部を酵素溶解して精製操作なしに希釈するだけの簡便な操作で鋳型調整を行うことにより、温泉試料から生菌数の測定が可能な液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC qRT-PCR) を確立したので報告する。

B 研究方法及び材料

1 レジオネラ属菌検査

(1) 平板培養法

平成 20 年度は新版レジオネラ症防止指針、平成 21 年度はレジオネラ症防止指針第 3 版に従い実施した。即ち、試料 1 リットルを採取し、そのうちの 800ml をポリカーボネートフィルター (ISOPORE、孔径 0.22 μ m、直径 47mm、ミリポア) でろ過し、滅菌蒸留水 8ml で懸濁して 100 倍濃縮試料とした。平成 20 年度は、100 倍濃縮試料 1ml を 50 $^{\circ}$ C、20 分間加熱処理し、その 100 μ l を GVPC 寒天培地 (日本ビオメリユー) に塗布して 37 $^{\circ}$ C で 10 日間培養し、菌数の算定及び同定を行った。また、平成 21 年度は、100 倍濃縮試料 500 μ l に酸処理液 (0.2M HCl-KCl buffer、pH2.2) 500 μ l を加えて室温で 5 分間反応後、GVPC 寒天培地 (日本ビオメリユー) 及び WYO α 寒天培地 (栄研化学) に 100 μ l ずつ塗布し、37 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

(2) 定量 PCR 法 (qPCR)

・試料の濃縮

100 倍濃縮試料 2ml を 15,000rpm で 5 分間遠心し、上清 1900 μ l を除去した 2000 倍濃縮試料 100 μ l について、DNA の抽出を行った。核酸抽出が直ちに行えない場合は、2000 倍濃縮試料を -30 $^{\circ}$ C にて保存した。

・酵素溶菌-カラム法による DNA の抽出

DNA の抽出は、本研究班で作成した泉山/田栗の方法に準じて行った。すなわち、100 μ l の濃縮試料に 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 $^{\circ}$ C で 1 時間保温し、75 $^{\circ}$ C 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 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 (以上の Buffer はキアゲン)。

- ・ 定量 PCR (qPCR)

CycleavePCR *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) をマニュアルに従って使用した。増幅装置は Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を用いた。

(3) 定量 RT-PCR 法 (qRT-PCR)

- ・ 試料の濃縮

qPCR 法に準じて行った。

- ・ 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 $^{\circ}$ C で 1 時間溶解反応を行った (終濃度 0.1M NaCl、0.5% Triton X-100、5mM Dithiothreitol、0.1mg/ml Proteinase K)。95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱処理後、15,000rpm で 5 分間遠心し、上清 10 μ l を TE 緩衝液 390 μ l で希釈後混和したものを RT 反応の鋳型とした。

- ・ 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 $^{\circ}$ C、15 分間逆転写反応を行った後、85 $^{\circ}$ C 5 秒で酵素失活を行った。この RT 反応液に、15 μ l の TE 緩衝液を加えて全量を 25 μ l とし、そのうちの 5 μ l を用いて qPCR を行った。

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

平板培養法で培地に塗布したものと同一、100 倍濃縮試料の酸処理検体 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 $^{\circ}$ C で 18 時間培養後、100 μ l を新しいチューブに分取した。RNA 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、生菌培養の対象として、100 倍濃縮試料 500 μ l を 95 $^{\circ}$ C 5 分間加熱処理した死菌液を作成し、未加熱の生菌試料と同様に酸処理以降の操作を行った。

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

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

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

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

LC-qRT-PCR 法による定量値の算出は、Ct (N) 及び Ct (H) をそれぞれ生菌培養液の検量線に代入し、得られた菌数 (真数) の差を生菌の定量値とした。

2 標準菌液

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株を BCYE α 寒天培地で 30 $^{\circ}$ 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 及び RNA 抽出用に 100 μ l ずつ分取した。核酸抽出が直ちに行えない場合は、-30 $^{\circ}$ C にて保存した。

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 $^{\circ}$ C 4 日間及び 37 $^{\circ}$ 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。

3 DNA 量及び RNA 量の経時変化

(1) 生菌及び死菌の短期挙動

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株を生理食塩水に懸濁して約 10^5 CFU/100 μ l の生菌、加熱死菌、塩素処理死菌を調整した。加熱死菌は、生菌液を 95 $^{\circ}$ C 2 分間の加熱処理後、直ちに室温に冷却し作製した。塩素処理死菌は、次亜塩素酸ナトリウム濃度を 1mg/L に調整した生理食塩水 99ml に、約 10^7 CFU/100 μ l の生菌 1ml を添加し、スターラーで混和しながら室温 30 分間処理後、そのうちの 5ml を分取して 25% チオ硫酸ナトリウムを 10 μ l 添加し、作製した。加熱死菌及び塩素処理死菌は、処理後に培養陰性であることを確認した。生菌、加熱死菌、塩素処理死菌を室温で放置し、一定時間後に菌液 100 μ l を分取して速やかに -30 $^{\circ}$ C に保存した。一連の作業が終了した時点で DNA 及び RNA の抽出を行った。

(2) 生菌の長期挙動

生菌の培養菌数、DNA 及び RNA 量の長期的な挙動を確認するため、*Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株を滅菌蒸留水 500ml に懸濁し、 6.5×10^4 CFU/100 μ l の生菌液を調整した。スターラーで攪拌しながら 42 $^{\circ}$ C で保温し、一定時間後に菌液 100 μ l 中の菌数を測定すると共に、核酸検査用に 100 μ l を分取して速やかに -30 $^{\circ}$ C に保存した。

4 LC qRT-PCR 法における rRNA の増幅

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

5 実試料による評価

(1) qPCR 及び qRT-PCR

平成 20 年 10 月～平成 21 年 1 月に、温泉を利用した循環式浴槽施設 33 施設から 102 件 (浴槽水 43 件、原水 41 件、逆洗水その他 18 件) の試料を採取し、レジオネラ属菌の培養及び核酸増幅検査 (qPCR 及び qRT-PCR) を行った。

(2) LC qRT-PCR

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

C 結果

1 定量 RT-PCR (qRT-PCR) 法

(1) 定量 RT-PCR (qRT-PCR) 法の検量線

a) DNA を鋳型とした qPCR

GL カラムを用いて DNA 抽出を行った qPCR の検量線は、PCR チューブ (5 μ l) あたり $4.5 \times 10^1 \sim 4.5 \times 10^4$ CFU/tube に相当する範囲で良好な直線性を示した ($R^2=0.999$) (図 1 (a) ●)。検水 200ml の 2000 倍濃縮試料から DNA 抽出を行った場合に換算すると、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 1 (b) ●)。

b) RNA を鋳型とした qRT-PCR

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 1 (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 4 (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。

(2) 標準菌株の培養条件が検量線に与える影響

35 $^{\circ}$ C 4 日間及び 37 $^{\circ}$ 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℃ 4 日間の検量線と比較した (図 2)。

各培養条件での検量線は以下の通りであった。

① qPCR における検量線

・ 30℃ 4 日間培養 $y = -3.66x + 38.07$ ($R^2 = 0.999$)

・ 34℃ 4 日間培養 $y = -3.71x + 37.30$ ($R^2 = 0.980$)

・ 37℃ 7 日間培養 $y = -3.59x + 34.84$ ($R^2 = 0.998$)

② qRT-PCR における検量線

・ 30℃ 4 日間培養 $y = -3.51x + 27.15$ ($R^2 = 0.999$)

・ 34℃ 4 日間培養 $y = -3.57x + 26.29$ ($R^2 = 0.996$)

・ 37℃ 7 日間培養 $y = -3.56x + 24.40$ ($R^2 = 0.996$)

35℃ 4 日間及び 37℃ 4 日間培養の検量線は、30℃ 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℃ 4 日培養と比較して 35℃ 4 日培養で 1.6 倍、37℃ 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。

ちなみに、qPCR と qRT-PCR の検量線と比較すると、35℃ 4 日間及び 37℃ 7 日間のいずれも両者の検量線はほとんど一致し、培養条件が変わっても DNA と RNA の比率は変化しなかった (図 2)。

(3) DNA 量及び RNA 量の経時変化

a) 生菌及び死菌の短期挙動

環境中での DNA 及び RNA の挙動を推察する目的で、レジオネラ属菌①未処理菌液、②加熱死菌、③塩素処理死菌について、菌液 (約 10^5 CFU/100 μ l) 中の DNA 量及び RNA 量の推移を経時的に観察した (図 3)。①未処理菌液及び②加熱死菌ともに、DNA 量及び RNA 量の推移に大差は見られず、生理食塩水中の菌液においては、DNA と RNA とは同様の挙動を示した。塩素処理死菌については、今回の 1mg/L 30 分間の次亜塩素酸処理により DNA、RNA 共にほとんど検出されないレベルまで減少した。

b) 生菌の長期挙動

浴槽水中のレジオネラ属菌の消長を推察する

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

(4) 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 5 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障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。

a) 培養法と核酸増幅検査結果の比較 (n=102)

核酸増幅検査で定量値が 10 CFU/100ml 以上の検体を陽性とし、培養法の結果と比較した。培養法の陽性率は 31.4% (32/102) に対し、qPCR 法は 52.9% (54/102)、qRT-PCR 法では 70.6% (72/102) であり、核酸増幅検査、特に qRT-PCR 法で高い陽性率を示した (表 1)。qPCR 法においては培養法で 10~50 CFU/100ml の範囲にある菌数の少ない検体 5 件が陰性と判定されたが、qRT-PCR 法では *L. londiniensis* が検出された 3 件を除き、培養陽性検体は全て陽性と判定された。qPCR 法と qRT-PCR 法の結果を比較すると、qPCR 陰性かつ qRT-PCR 陽性検体が 19 件あり、そのうちの 5 件は培養法陽性で、残りの 13 件は qRT-PCR 法が 10~52 CFU/100ml の低レベル汚染検体であったことから、今回の qPCR の抽出法 (酵素溶菌カラム法、50 μ l 2 回溶出) では感度不足が示唆された。

b) 培養法、qPCR 及び qRT-PCR 法の相関 (n=99)

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 6)。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 6-1 (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 6-2 (a), (b))。一方、qPCR 法と qRT-PCR 法との間には $R^2=0.771$ 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 6-1 (c))。

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

(1) 液体培地中での rRNA の増幅

液体培地におけるレジオネラ属菌 rRNA の培養条件を検討した。滅菌蒸留水では、生菌及び加熱死菌共に RNA 量に変化はみられなかった (図 7(b))。BYE α (BCYE α 液体培地から活性炭を除いた培地) では、生菌、死菌共に培養直後に RNA 量が一旦減少し、生菌が培養開始時の RNA 量まで回復するのに 7 時間を要した。18 時間後では 1 log の増加であった (図 7(a))。一方、BCYE α では、培養初期の減少がみられず、2 時間後から指数増殖が始まり、18 時間後に 2 log の増加が認められた (図 8)。BCYE α の回転培養と静置培養 (いずれも 37°C) を比較すると、静置培養のほうが高い直線性 ($R^2=0.999$) を示した。

(2) LC qRT-PCR の検量線

MWY 液体培地を用い、生菌及び加熱死菌について、前処理方法 (未処理、酸処理及び熱処理) の影響を検討した (図 9)。37°C、18 時間培養における各条件の検量線は以下のとおりである。

① 生菌

- ・ BCYE α (未処理) $y = -3.42x + 38.99$ ($R^2=0.998$)
- ・ MWY (未処理) $y = -3.11x + 38.99$ ($R^2=0.991$)
- ・ MWY (酸処理) $y = -2.98x + 39.12$ ($R^2=0.998$)
- ・ MWY (熱処理) $y = -2.78x + 39.46$ ($R^2=0.973$)

② 加熱死菌

- ・ MWY (未処理) $y = -2.56x + 42.60$ ($R^2=0.985$)
- ・ MWY (酸処理) $y = -2.83x + 44.70$ ($R^2=0.992$)
- ・ MWY (熱処理) $y = -2.56x + 42.48$ ($R^2=0.988$)

生菌では、BCYE α (未処理)、MWY (未処理)、MWY (酸処理) のいずれの条件でも、培養前の菌数が 1 or 2 $\sim 10^5$ CFU/100 μ l の範囲で $R^2=0.991$ 以上の良好な直線を示したが、MWY (熱処理) は他法と比較して Ct 値が高く、直線性も劣った ($R^2=0.973$)。一方、加熱死菌ではいずれも $10^2 \sim 10^7$ CFU/100 μ l の範囲で $R^2=0.985$ 以上の良好な直線を示したものの、MWY (未処理) 及び MWY (熱処理) では低濃度側で Ct 値が低くなる傾向がみられ、生菌とほぼ並行な検量線が得られたのは MWY (酸処理) のみであった (図 9(b))。以上の結果から、液体培地による培養の前処理として、MWY (酸処理) を使用することとした。

(3) LC qRT-PCR のカットオフ値

温泉試料を、培養法におけるレジオネラ陽性検体と陰性検体に分け、培養 18 時間後の Ct 値の減少幅 (Δ Ct) を比較した (図 10)。

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

一方、培養法で 50 CFU/100ml 以上が検出されたか否かで Δ Ct 値の分布を比較したところ、培養法 50 CFU/100ml 未満であった 68 件の Δ Ct 値は 0.20 ± 1.72 (平均 \pm 標準偏差) で、1.5 未満が 80.9% (55/68) を占めた (図 10(b) ○)。それに対し、培養法で 50 CFU/100ml 以上検出された 15 件の Δ Ct 値は 2.71 ± 2.23 で、1.5 以上が 86.7% (13/15) を占めた。

LC qRT-PCR 法における Δ Ct のカットオフ値を決定するため、 Δ Ct 値 -1.5 \sim 4.5 の範囲で ROC 曲

線 (receiver operating characteristic curve : 受信者操作特性曲線) を作成した。培養法で 10 CFU/100ml 以上を陽性とした場合の ROC 曲線は、 $x = y$ の直線に近いプロットを示し、感度、特異度共に低値を示した (図 11 △)。一方、培養法で 50 CFU/100ml を陽性とした場合の ROC 曲線は、 $\Delta Ct = 1.5$ の時に最も感度 1、特異度 1 に近づいた (図 11 ●)。以上の結果から、現在の濃縮・抽出方法を用いた場合のカットオフ値は $\Delta Ct \geq 1.5$ が適当と判断した。この基準を適用すると、培養法 10 CFU/100ml を検出する際の感度は 53.6%、特異度は 80.0%であったが (表 2(a))、50 CFU/100ml を検出する際の感度は 86.7%、特異度は 80.9% に上昇し (表 2(b))、LC qRT-PCR 法の検出限界は 50 CFU/100ml が妥当と考えられた。

(3) 温泉水を用いた培養法と LC qRT-PCR の比較

LC qRT-PCR 法で $\Delta Ct \geq 1.5$ をカットオフ値とし、培養法との相関を検討した (図 12)。培養法陽性かつ LC qRT-PCR 陰性の検体が 13 件、培養法陰性かつ LC qRT-PCR 陽性の検体が 11 件あったが、培養法と LC qRT-PCR との間には有意な相関が認められた (図 12 (a)、 $R^2 = 0.487$ 、 $p < 0.01$)。なお、培養法、LC qRT-PCR 法ともに 50 CFU/100ml 以上の定量値を示した検体に限定すると、両検査法の間さらに高い相関が認められた (図 12 (c)、 $R^2 = 0.866$ 、 $p < 0.01$)。

培養法陽性にもかかわらず LC qRT-PCR で陰性と判定された 13 件の内訳を表 3 に示した。No.1 は培養法で *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が 750 CFU/100ml 分離されたが、LC qRT-PCR では全く増幅が認められなかった。分離株の 16S rRNA 遺伝子の一部について塩基配列を決定し、Blast でデータベースと比較したところ、登録されている「*Legionella* sp.」と 100%一致し、種名は特定できなかった。No.2 は培養法で *L. pneumophila* SG3, 4 が 110 CFU/100ml 検出されたが、 ΔCt は 0.47 とカットオフ値 (1.5) に満たなかったため LC qRT-PCR で陰性と判定された。この検体の $Ct(N)$ は 35.81 で、そのまま検量線から菌数に換算

すると 100 CFU/100ml に相当する。 $Ct(H)$ が 36.28 を示すことから、検体に死菌が大量に含まれていたため、生菌による Ct 値の低下が検出できなかったものと考えられた。No.3 においても、No.2 と同様の傾向がみられた。なお、No.4~13 の 10 検体はいずれも菌濃度が 40 CFU/100ml 以下であり、培養法及び LC qRT-PCR 法の定量限界の可能性が考えられた。

一方、平板培養法陰性にもかかわらず、LC qRT-PCR で陽性と判定された 11 件の内訳を表 4 に示した。No.1 及び No.2 は、 ΔCt がそれぞれ 4.08 及び 3.61 と高く、LC qRT-PCR でそれぞれ 1200 及び 160 CFU/100ml の定量値が検出されたが、No.5~11 は 40 CFU/100ml 以下の低値であった。

D 考察

平成 20 及び 21 年度の 2 年間、温泉入浴施設を対象としたレジオネラ属菌の迅速、簡便かつ精度の高い検査法を開発するため、定量 RT-PCR (qRT-PCR) の適用を検討した。平成 20 年度は、リボソーム RNA (rRNA) の鋳型量の多さに着目し、酵素溶菌処理後の検体を熱処理により不活化後、RNA 溶解液を希釈するだけという簡便な操作により (酵素溶菌希釈法)、阻害物質の影響を受けることなく培養法を凌ぐ検出感度を保つ qRT-PCR 法を確立した。本法の利点は、煩雑なカラム精製を省略した簡便な操作にあり、実際の温泉試料でも増幅阻害を受けることなく、基準値 (10CFU/100ml) より低いレベルまで定量できる十分な感度を有することを明らかにした。ただし、検出の標的とした rRNA の特性として、DNA より分解が進みやすいものの、比較的長期にわたって検出されることが確認された。今回、 10^5 CFU/100ml の生菌が 10 日余りで培養陰性となる条件下において、30 日後でも 10^3 CFU/100ml 相当の rRNA が検出されたことは重要である。低濃度まで高感度に定量できる本法の特徴を考慮すれば、実際の温泉試料に培養陰性かつ qRT-PCR 陽性検体が多数存在することは当然の結果と言える。

しかし、rRNA が DNA と同様に比較的長期間安定であるという事実は、入浴施設の衛生管理の指標としては都合が良いとも考えられる。すなわち、入浴施設において、塩素濃度を維持することで安全を確保しながら、配管やろ過器等の汚染蓄積状況を監視するリスク評価法と位置付けることで、普及されることを期待したい。

以上のように、qRT-PCR 法を衛生管理の指標として活用することは意義深いが、その一方で、生菌のみを検出する標準法すなわち平板培養法が、結果の判定までに 7 日以上を要することから、施設管理者や施設を指導する行政側から、生菌を特異的に検出する迅速検査法が切望されているのも事実である。そこで、平成 21 年度は、qRT-PCR に先立ち、濃縮試料を液体培地中で 1 夜培養するステップを追加した、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC qRT-PCR) を検討した。培養には、平板に塗布する濃縮酸処理検体と同じ分量の試料を用いて評価することにより、加熱殺菌試料と比較した Ct 値の低下がそのまま検水 100ml 中の生菌の存在を証明できるよう配慮した。しかし、結果的に検出限界付近の測定値がばらつき、今回の操作法で LC qRT-PCR と培養法の相関が維持できるのは 50 CFU/100ml と考えられた。少なくとも、50 CFU/100ml 以上の濃度であれば、平成 20 年度に検討を行った qPCR 及び qRT-PCR を凌ぐ、培養法との高い相関が得られ (図 12 (c)、 $R^2=0.866$)、LC qRT-PCR が培養法に代わる生菌迅速検査法として十分適用できる能力を持つことを明らかにした。

検出限界付近の定量値を安定させる対策としては、qPCR 及び qRT-PCR と同様に、100 倍濃縮試料 1ml を 100 μ l に再濃縮する操作を追加して LC qRT-PCR を実施すれば、LC qRT-PCR の感度を向上させることが可能と考えられる。あるいは、何らかの方法で加熱殺菌試料でのバックグラウンド値を低下させれば、さらに低濃度まで検査の信頼性を増すことができると考えられる。今後、生菌検出のみならず加熱殺菌試料から得た死菌数

を管理指標に活用できる可能性も含め、多様な温泉を対象に件数を増やして解析する必要がある。

E 結 論

温泉入浴施設を対象としたレジオネラ属菌の迅速、簡便かつ精度の高い検査法を開発するため、定量 RT-PCR (qRT-PCR) の適用を検討した。その結果、煩雑なカラム精製を省略した簡便な操作で、増幅阻害を受けることなく、基準値 (10CFU/100ml) より低いレベルまで定量できることを明らかにした。温水中の rRNA は、DNA より分解が進みやすいものの、比較的長期にわたって検出されるため、塩素消毒により管理された施設のリスク評価に有用であると考えられる。

また、生菌検出を目的に、qRT-PCR に先立ち、濃縮試料を液体培地中で 1 夜培養するステップを追加した、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC qRT-PCR) を検討した。その結果、通常の培養法に用いる酸処理検体を、レジオネラ液体培地に加えて 1 夜培養し、培養液の一部を酵素溶解して精製操作なしに希釈するだけの簡便な操作で鑄型調整を行うことにより、温泉試料から生菌数の測定が可能な液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC qRT-PCR) を確立した。本法で得られた定量値は、50~10⁵ CFU/100ml の範囲で培養法と極めて高い相関が得られ ($R^2=0.866$)、培養法に代わる生菌迅速検査法として十分適用できる可能性を示した。

参考文献

- 1 Beste DJ, Peters J, Hooper T, Avignone-Rossa C, Bushell ME, McFadden J. Compiling a molecular inventory for *Mycobacterium bovis* BCG at two growth rates: evidence for growth rate-mediated regulation of ribosome biosynthesis and lipid metabolism. J Bacteriol. 2005 Mar; 187(5): 1677-84.
- 2 Fegatella F, Lim J, Kjelleberg S, Cavicchioli R. Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic

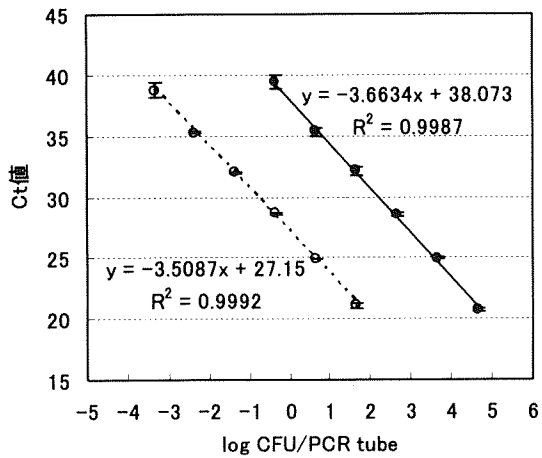
ultramicrobacterium *Sphingomonas sp.* Strain RB2256.
Appl Environ Microbiol. 1998 Nov; 64(11): 4433-8.
3 Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J,
Gomez SM, Asamani G, Hill K, Nuara J, Feder M,
Rineer J, Greenberg JJ, Steshenko V, Park SH, Zaho B,
Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georghiou A,
Chou IC, Iannuccilli W, Ulz ME, Kim DH, Geringer-
Sameth A, Goldsberry C, Morozov P, Fischer SG,
Segal G, Qu X, Rzhetsky A, Zhang P, Cayanis E, De
Jong PJ, Ju J, Kalachikov S, Shuman HA, Russo JJ.
The genomic sequence of accidental pathogen
Legionella pneumophila. Science. 2004 Sep 24;
305(5692): 1966-8.

F 論文発表

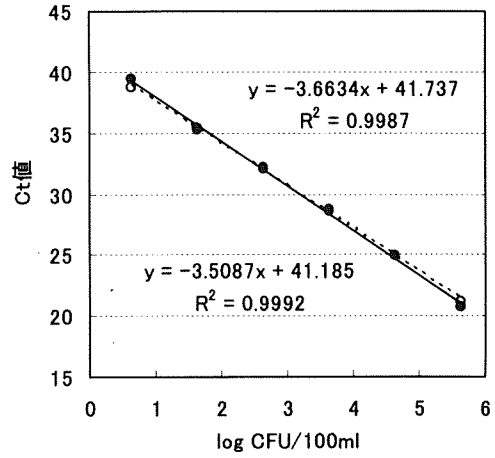
なし

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

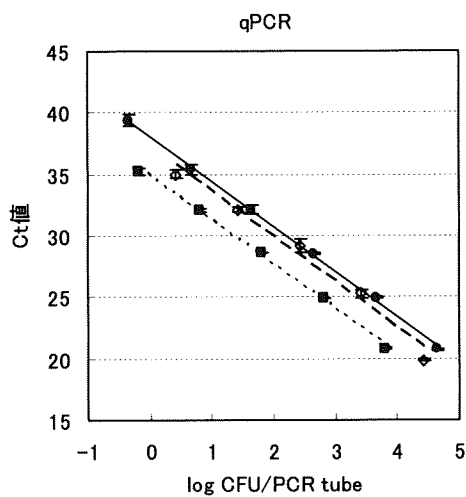


(a) PCR チューブあたりの検量線

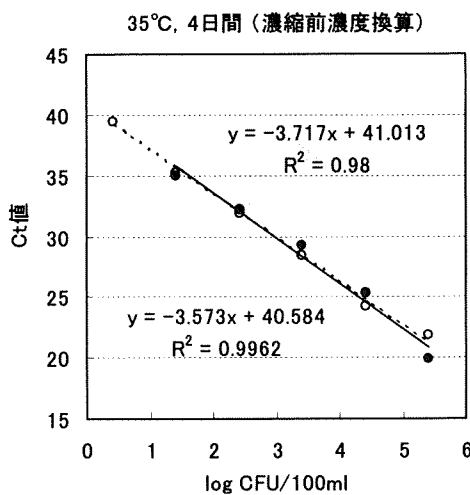
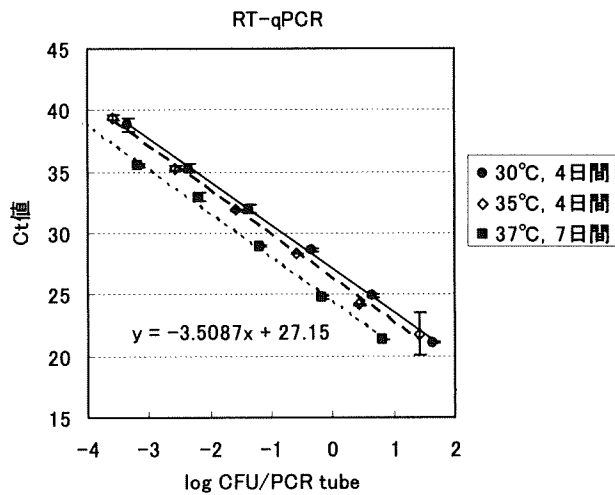


(b) 濃縮前の試料濃度に換算した検量線

図1 qRT-PCR と qPCR の検量線



(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培養条件別の検量線

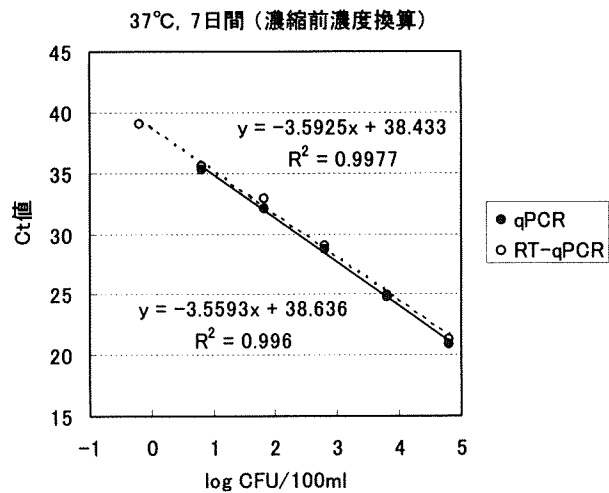


図2 培養条件による DNA 及び RNA 量の比較

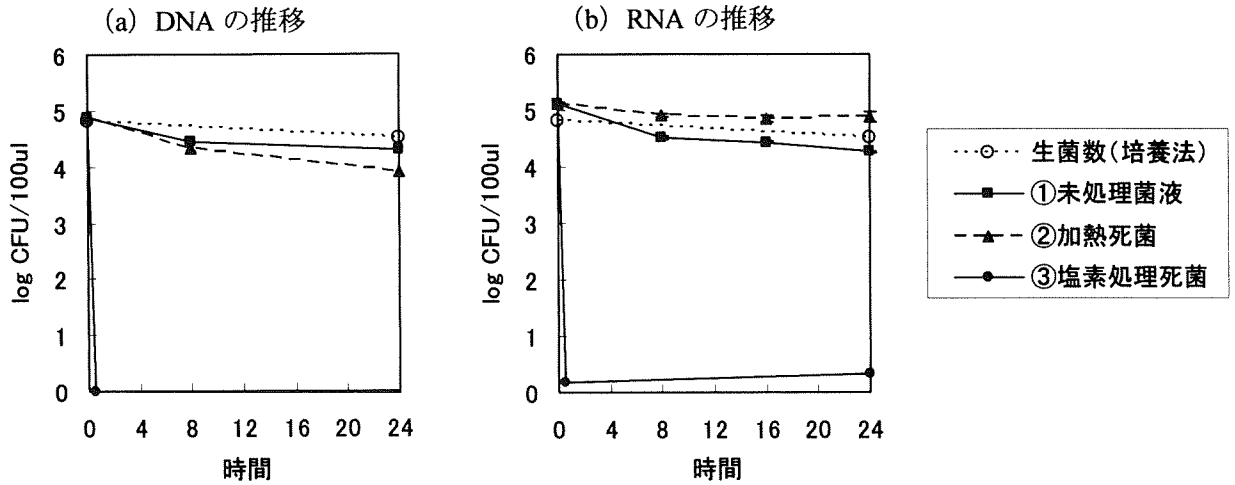


図3 菌液中のDNA量及びRNA量の経時変化

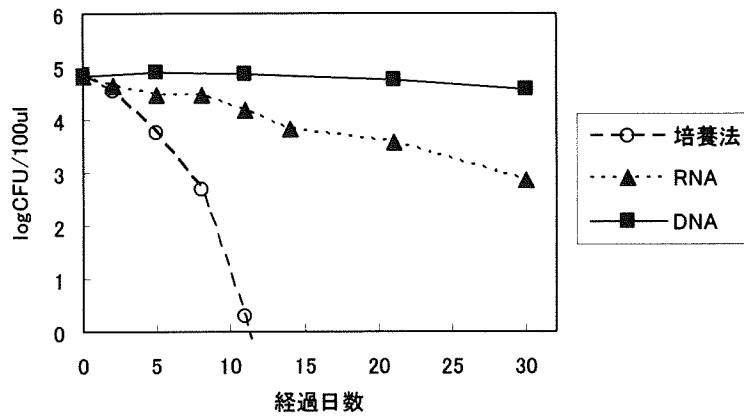


図4 生菌の推移 (42°C、滅菌蒸留水)

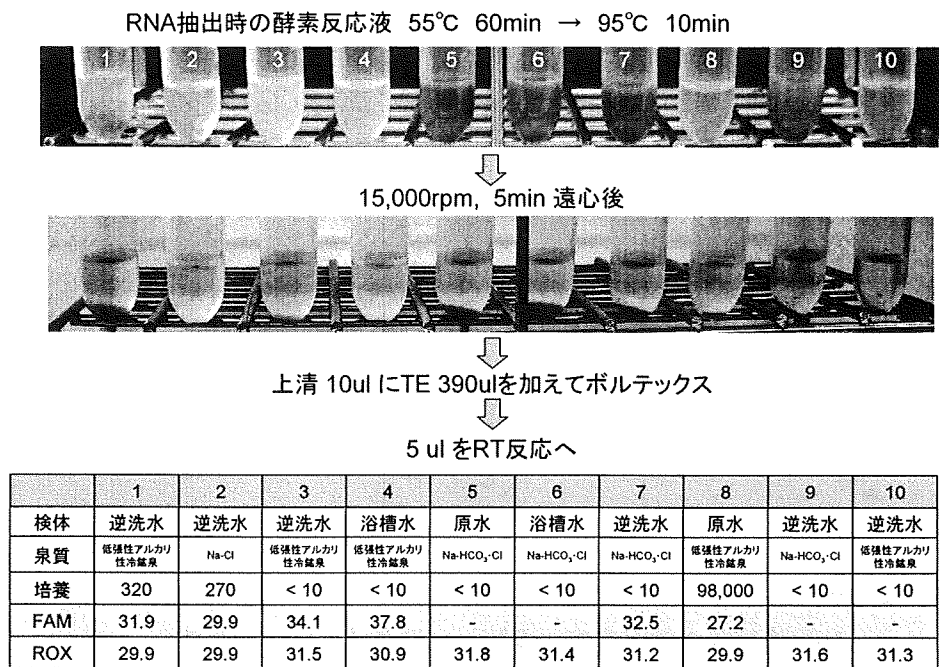


図5 RNA抽出時の沈渣と検査結果