

表5 浴室空气中のトリハロメタン類

Trihalomethanes ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	施設 No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chloroform	54	21	35	41	23	107	84	73	15	111
Bromodichloromethane	51	17	14	15	18	46	14	8.8	10	8.2
Dibromochloromethane	33	18	10	9.3	16	30	5.1	2.9	7.3	2.0
Bromofolm	4.5	9.4	1.5	2.0	6.7	7.3	0.7	0.6	1.1	0.8

nd: 定量下限値未満

表6 浴室空气中のハロアセトニトリル類

Haloacetonitriles ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	施設 No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dichloroacetonitrile	2.0	0.37	2.4	2.4	2.2	6.6	2.8	3.2	2.5	7.7
Bromochloroacetonitrile	2.5	1.4	1.3	2.0	2.7	5.8	1.5	1.5	0.95	1.8
Dibromoacetonitrile	0.61	1.1	0.36	0.49	0.73	1.2	0.23	0.15	0.24	nd

nd: 定量下限値未満

表7 浴室空气中のアルデヒド類

Aldehydes ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	施設 No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Formaldehyde	7.1	6.0	6.8	3.3	3.8	3.9	6.8	5.5	5.5	7.5
Acetaldehyde	43	44	48	45	38	89	65	75	43	78

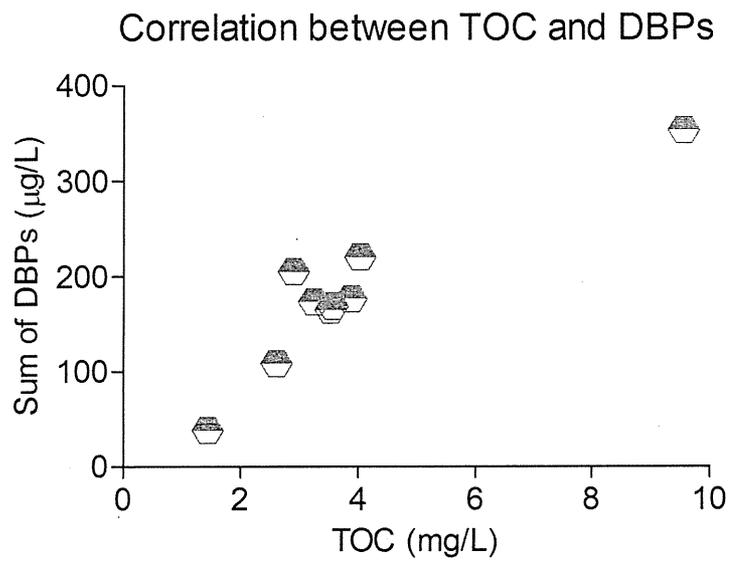


図4 TOCと浴槽水中消毒副生成物濃度の相関

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）
「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的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

液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討

研究分担者	○烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	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
	浅野 由紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	矢崎 知子	宮城県保健環境センター

研究要旨

入浴施設等の環境水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目的で、液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（以下、LC 法）の適用を検討した。①濃縮試料を液体培地で 18 時間培養した際の Ct 値（Ct（18h））が 34 未満、②培養前の Ct 値（Ct（0h））との差（ Δ Ct 値）が 1 以上、の基準①②を同時に満たす場合にレジオネラ生菌の存在が予測可能であった。公衆浴場法等で水質基準が定められている浴槽水及び原水 61 件を対象に、LC 法と平板培養法の検出結果を比較したところ、LC 法は感度 85.7%、特異度 100%であり、平板培養法の結果を迅速に予測できると考えられた。定量値においても両者は高い相関を示し（ $R^2=0.86$ ）、LC 法により施設の汚染状況を迅速に評価できることが明らかとなった。本法は、検体搬入から最短 21 時間程度で生菌の有無と汚染レベルが判明することに加え、死菌量により潜在的な汚染リスクが評価可能であり、施設の衛生管理及び指導に十分活用可能と考えられた。

A 研究目的

現在、浴槽水等の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平板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 7~10 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、遺伝子検査を用いた迅速検査法、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、現行の遺伝子検査法は、生

菌のみならず死菌に由来する遺伝子も増幅対象とするため、高濃度のレジオネラ属菌遺伝子が検出されても、通常の平板培養法で陰性となる場合があり、結果の解釈と活用方法には注意を要する。大量の死菌の存在は、浴槽や配管内にバイオフィーム等レジオネラの供給源があることを意味するため、一定以上の遺伝子が検出されれば配管洗浄を行う等、施設管理の指標として活用価値は高いと考えられる。しかし、患者発生時の原因究明検査や、レジオネラ検出時の改善確認検査を目的とした場合、死菌の影響を受けず、生菌のみを迅速に検出できる検査法の開発に期待が寄せられ

ていることは事実である。

本研究では、遺伝子検査の標的として、リボソーム RNA (rRNA) に着目した。rRNA の合成量は細胞あたり数千～数万コピーと言われ、ゲノム上に存在するリボソーム遺伝子 (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¹⁻²⁾。現在までに、rRNA から逆転写によって cDNA を合成し、cDNA をリアルタイム PCR で定量することで、従来の DNA 検査法に比べて高感度な検出が可能となることを明らかにした³⁾。さらに、通常の平板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後に希釈するだけの簡便な操作で、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 RT-qPCR) が活用可能なことを見出した⁴⁾。

今年度は、LC RT-qPCR 法において平板培養法と同程度の感度が得られるよう濃縮率等に改良を加え、実サンプルで評価を行ったのでその概要を報告する。

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

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 (孔径 0.4 μ m、直径 47mm、ADVANTEC) でろ過し、滅菌蒸留水 8ml で懸濁して 100 倍濃縮液とした。100 倍濃縮液 500 μ l に酸処理液 (0.2M HCl-KCl buffer、pH2.2、関東化学) 500 μ l を加えて室温で 5 分間反応後、GVPC 寒天培地 (日本ビオメリュー) 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 倍濃縮液 2ml を 15000rpm で 5 分間遠心後、上清 1900 μ l を除去して 2000 倍濃縮液 100 μ l を作成し、そこから DNA の抽出を行った。核酸抽出

が直ちに行えない場合は、2000 倍濃縮液を -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、15000rpm 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 25 μ l で 2 回溶出を行った (以上の Buffer はキアゲン)。

・定量 PCR (qPCR)

Cycleave PCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit Ver.2.0 (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) 液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR (LC RT-qPCR)

「(資料) LC RT-qPCR 法による浴槽水のレジオネラ生菌迅速検査 (平成 22 年度)」に基づいて実施した。概要を以下に示す。

・MWY 液体培地

Yeast Extract (Bacto) 1.0g、活性炭 (Norit SA2、日本ノリット) 0.2g を 90ml の蒸留水に加えて 121 $^{\circ}$ C、15 分間高圧蒸気滅菌後、レジオネラ BCYE 発育サプリメント (SR110、オキシイド) 及び MWY 選択サプリメント (SR118、オキシイド) を無菌的に添加し、1ml ずつ分注して -30 $^{\circ}$ C で保存した。

・試料の濃縮

100 倍濃縮液 1ml を 15000rpm で 5 分間遠心後、上清 900 μ l を除去して 1000 倍濃縮液 100 μ l を作成した。

・液体培養

1000倍濃縮液 100 μ l に酸処理液 (0.2M HCl-KCl buffer、pH2.2、関東化学) 100 μ l を加えて室温で5分間反応後、MWY液体培地 900 μ l を加えて中和した。ボルテックス後、100 μ l をマイクロチューブに分取し、-30 $^{\circ}$ Cで保存した (Ct (0h) 測定用)。残りの濃縮試料加 MWY液体培地 1000 μ l を36 $^{\circ}$ Cで18時間静置培養後、100 μ l をマイクロチューブに分取した (Ct (18h) 測定用、即時処理しない場合は-30 $^{\circ}$ C保存)。

・ 酵素溶菌希釈法による RNA の抽出

分取した培養液 100 μ l に TE 緩衝液 250 μ l、5M NaCl 8 μ l、10% Triton X-100 20 μ l、100mM Dithiothreitol 20 μ l 及び 20mg/ml Proteinase K 2 μ l を加え、55 $^{\circ}$ Cで30分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、15000rpmで5分間遠心し、上清 50 μ l を TE 緩衝液 200 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 (RT-qPCR)

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 EASY Dilution (タカラバイオ) 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。

・ LC RT-qPCR 法の結果判定

LC 法によるレジオネラ陽性の判定は、次の①、②の基準を同時に満たす場合にレジオネラ生菌が存在すると判断した。

① Ct (18h) が濃縮試料 100 μ l 中 1 CFU に相当する Ct 値以下であった場合

② 液体培養前の Ct 値 (Ct (0h)) に比較して培養 18 時間後の Ct 値 (Ct (18h)) が有意に低下した場合 (Δ Ct = Ct (0h) - Ct (18h) としたとき、 Δ Ct が一定値以上になった場合)

LC 法による定量値の算出は、Ct (18h) 及び Ct (0h) を生菌培養液で作成した検量線に代入し、得られた菌数 (真数) の差を生菌の定量値 (LC 法生菌定量値) 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 1 程度に調整し、10 倍希釈系列を作製した。希釈液及び酸処理後の希釈液 100 μ l を BCYE α 寒天培地 (ビオメリュー) に塗布し、平板 2 枚の平均値から各系列 100 μ l 中の菌数を算出した。

3 検量線の作成

(1) qPCR における 5S rRNA 遺伝子コピー数

Cycleave PCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit Ver.2.0 (タカラバイオ) に付属したコピー数既知のプラスミド DNA (5S Positive Control 2、 1×10^4 copies/ μ l) の 10 倍希釈系列を作成し、Ct 値からコピー数を算出する検量線を作成した。

(2) 総菌 (生菌 + 死菌) 定量用検量線

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株で作成した 10 倍希釈系列を用い、平板培養で算出した菌数と LC RT-qPCR 法で測定した Ct (0h) をプロットすることにより、液体培養前の rRNA 量から総菌数を算出する検量線を作成した。

(3) 生菌定量用検量線

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株で作成した 10 倍希釈系列を用い、酸処理後の平板培養で算出した菌数と LC RT-qPCR 法で測定した Ct (18h) をプロットすることにより、液体培養後の rRNA 量から生菌数を算出する検量線を作成した。

4 検査材料

平成 22 年 11 月 ~ 平成 23 年 2 月に、循環式浴槽施設 19 施設から 68 件 (浴槽水 39 件、原水 22 件、逆洗水 7 件) の試料を採取し、レジオネラ属

菌の平板培養、qPCR及びLC RT-qPCRを行った。一般細菌数は標準寒天培地（ニッスイ）で36℃ 2日間培養後、従属栄養細菌数はR2A寒天培地（メルク）で42℃ 7日間培養後の菌数を求めた。

C 結果及び考察

1 液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR（LC RT-qPCR）の定性結果

循環式浴槽施設から得られた68件の試料を用い、平板培養法におけるレジオネラ検出の有無と、LC RT-qPCR法における液体培養前後のCt値の推移について検討した（図1）。レジオネラ陰性検体（○）はCt（0h）とCt（18h）の値がほぼ一致し、図1の右上から左下に掛けての対角線上にプロットされたが、Ct値が大きい検体（図1左下）ほどプロットが対角線から離れ、データの安定性が損なわれる傾向がみられた。一方、レジオネラ陽性検体（●）ではCt（0h）よりもCt（18h）が低値を示し、対角線の左上方にプロットされた。図1対角線左上の点線は $\Delta Ct=1$ のラインを示す。

レジオネラ陽性検体の割合は、Ct（18h）が34未満で有意に高くなることから（16/21、76.2%）、Ct（18h）<34がレジオネラ陽性を判断する指標の一つと考えられた（表1（1））。さらに、 ΔCt が1.0以上であればレジオネラ陽性検体の割合が極めて高くなることから、Ct（18h）<34かつ $\Delta Ct \geq 1.0$ の検体をLC法陽性と判断することが適当と考えた。この基準値によりLC法の評価を行ったところ、特異度は100%であったものの、偽陰性が8件あったため感度は60.0%にとどまった（表2（1））。偽陰性の内訳は、8件中6件が微生物汚染の激しいろ過器逆洗水であり、共存微生物との競合で液体培養時のレジオネラ増殖が阻害され、LC法で偽陰性となった可能性が考えられた（表3）。また、残りの2件については遊離残留塩素濃度が0.8mg/L以上検出され、一般細菌数、従属栄養細菌数ともに30 CFU/ml未満と塩素消毒の効果が確認されていることから、平板培養法で10 CFU/100mlとされた検体ではあるが、実際

には非常に低レベルのレジオネラ汚染検体であったと推察された。

なお、公衆浴場法等で水質基準が定められているのは浴槽水及び原水であり、ろ過器逆洗水は通常の検査対象には含まれないことから、逆洗水7件を除いた61件について、再度評価を行った（図1（2）、表1（2）、表2（2））。その結果、レジオネラ陽性検体は、2件を除いてCt（18h）<34及び $\Delta Ct \geq 1.0$ の範囲に集積し、LC法の定性試験としては感度85.7%、特異度100%と良好な成績が得られた。

2 LC RT-qPCR法の定量結果

（1）検量線の作成

Legionella pneumophila 長崎80-045株で作成した検量線を図2に示す。総菌（生菌+死菌）定量用Ct（0h）及び生菌定量用Ct（18h）検量線の回帰式は、それぞれ次のとおりであった。

$$\text{Ct (0h)} : y = -3.008x + 40.873 \quad \dots \text{①式} \\ (R^2 = 0.9982)$$

$$\text{Ct (18h)} : y = -3.208x + 36.471 \quad \dots \text{②式} \\ (R^2 = 0.9990)$$

両検量線ともに R^2 は0.998以上で良好な直線性を示し、それぞれの検量線はほぼ平行で、18時間培養後でも十分な定量性は確保できると考えられた。また、各検量線で直線性を示す最低菌数から、検水の1000倍濃縮液を用いてLC法を行った場合、総菌数としては約30 CFU/100ml、生菌数としては基準値である10 CFU/100mlが定量可能と考えられた。

（2）コピー数の推定

LC法の検量線作成は操作が煩雑であり、検査の都度検量線を作成するのは非現実的である。今回レジオネラ属菌遺伝子の定量に用いたCycleave PCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit Ver.2.0（タカラバイオ）には、コピー数が明らかな定量用プラスミドDNAが添付されており、それを利用してLC法のcDNAコピー数を見積もることを試みた。まず、プラスミドDNAの検量線

を異なる施設で計4回作成したところ、qPCRの検量線はほとんど一致し、当該キットの再現性は良好であった(図3)。4回の検量線を平均した回帰式は以下のとおりである。

$$\text{プラスミドDNA} : y = -3.055x + 37.941 \quad \text{③式} \\ (r^2 = 0.9986)$$

この検量線の傾きは、LC法におけるCt(0h)の検量線①式及びCt(18h)の検量線②式とほぼ一致し、LC法におけるcDNAを鋳型としたRT-qPCRの増幅効率(Ct(0h):115%、Ct(18h):104%)と、通常のqPCRの増幅効率(113%)に差がないことが示された(図2、3)。次に、LC法におけるRT反応にロスがないと仮定し、③式から求めたcDNAコピー数にLC法の希釈倍率を乗じることで、1CFU当りのrRNAコピー数を算出した。LC法の抽出過程で菌液が1100倍に希釈されるため、検量線を作成する際の初期液量100 μ l中には、③式から計算したコピー数の22000倍のrRNAがあったと考えられる。そこで、①式の切片40.873及び②式の切片36.471から、液体培養前の菌1CFU相当から得られるrRNAは2400コピーであり、それが18時間の液体培養によって67000コピーへと約28倍増加すると推定された。今回の試算により、Ct(18h)から算出したコピー数を67000で割ることで、培養前の生菌数を推定することが可能と考えられた。

(3) 生菌を選択しない遺伝子検査定量値と平板培養法との比較

DNAを標的としたqPCR法と平板培養法の定量結果を比較すると、培養陽性検体では両者にある程度の相関がみられるものの、qPCR法で10CFU/100ml以上の定量値を示した検体の48.0%(12/25)が平板培養法では陰性であった(図4(1)、表4(1))。rRNAを標的としたLC法総菌定量値でも同様な傾向がみられ、10CFU/100ml以上の定量値を示した検体の46.9%(15/32)が平板培養法陰性であった(図4(2)、表4(2))。qPCR法とLC法総菌定量値を比較すると、平板培養法と比較した場合よりも相関は高く、 R^2 は0.65で

あった(図4(3))。

(4) LC法生菌定量値と平板培養法との比較

LC法生菌定量値は、従来の遺伝子検査法と比較して遺伝子検査陽性、平板培養法陰性となる検体(見かけ上の偽陽性反応)が極めて少なく、LC法で10CFU/100ml以上と定量された検体はすべて平板培養法陽性であった(図5(1))。前述のとおり、平板培養法陽性にもかかわらずLC法陰性であった6件はろ過器逆洗水であり、これら逆洗水を除く61件では平板培養法とLC法とで極めて高い相関を示した(図5(2)、 $R^2=0.86$)。

(5) 資料

愛媛県以外の3地方衛生研究所の報告を添付した。

D 考察

レジオネラ属菌DNAやrRNAを特異的に検出する現行の遺伝子検査法は、生菌と死菌を区別せず両方の遺伝子量を測定対象とする。そのため、レジオネラ症防止指針に書かれている平板培養法の結果と比較すると、感度の点では問題ないものの、特異度はそれほど高くなく、結果の解釈と活用方法には注意を要する。平板培養法と遺伝子検査法の結果の食い違いの主な原因である死菌の検出(見かけ上の偽陽性反応)を低減できれば、遺伝子検査を用いたリスク評価の活用がさらに進むと考えられる。現在、死菌由来DNAの増幅を抑制し、生菌由来のDNAを選択的に検出するEMA-qPCR法が開発され、実験室レベルでは一定の成果が得られている。しかし、塩素消毒が行われている浴槽等では定量値が不安定になる場合があり、現場で活用されるまでには至っていない。

我々は、浴用水等の環境検体を濃縮後、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 RT-qPCR)を開発し、実際の浴用水を用いて検討を進めている。今年度は、昨年の方法から濃縮倍率を調整することで、レジオネラの基準値が定められている

浴槽水及び原水においては、通常の平板培養法と同等の感度を得られること確認した（感度 85.7%、特異度 100%）。得られる定量値も平板培養法と高い相関を示し（ $R^2=0.86$ ）、生菌迅速検査法として十分活用できる可能性を示した。本法は、液体培養によるレジオネラ rRNA の増加量から定量値を算出するため、検体搬入から結果判明までに最短で 21 時間程度を要する。しかし、検体を夕方検査室に搬入すれば、翌日の午後にはレジオネラ生菌の有無と汚染レベルが判明することとなり、対象施設及び行政の迅速な対応に活用する意義は高いと考えられる。また、生菌のみならず、同時に死菌量も定量できる点は、衛生管理上重要である。大量の死菌検出は、ろ過器や循環配管等へのバイオフィルムの蓄積を示唆する。潜在的なリスクとして洗浄等の対策を講じる指標と位置付ければ、生菌汚染や事故発生を未然に防ぐことも可能と考えられる。

ただし、今年度の検討でいくつかの解決すべき問題が明らかとなった。ろ過器逆洗水等の微生物汚染が激しい検体では、通常の培養で生菌が検出されるにも関わらず、LC 法の Ct (18h) が減少しない検体が複数観察された。他施設の検討では、塩素消毒を行っていない掛け流し式温泉において同様の傾向がみられている（資料参照）。この原因の一つとして、試料中の共雑菌の影響で培養液中のレジオネラ増殖が阻害されている可能性が考えられた。LC 法は、培養による菌の増殖を捕らえるという点で、平板培養法と同じ原理で生菌を検出する方法である。平板培養法では、微生物汚染が激しいと予測される検体は、濃縮サンプルを希釈して培地に塗布することや、前処理に熱処理と酸処理を組み合わせるなど、状況に応じて検査法を追加することが求められている。LC 法においても、平板培養法で行う場合と同様、希釈サンプルでの定量や熱処理の追加を必要に応じて併用すべきと考えられる。

LC 法のもう一つの問題として、検量線作成の煩雑さと不安定さが挙げられる。菌株の状態や液

体培地の組成などの条件を統一しても、検量線にバラつきがみられる傾向にあった（データ未掲載）。今回は、複数の施設で一致した検量線を採用して定量値を算出した結果、平板培養法と高い相関が得られたが、それ以外の検量線を用いれば、定量値が平板培養法の結果を予測できず、誤判定を招く原因となる。この理由としては、環境から検出されるレジオネラと、培地上で作成したレジオネラの rRNA 量の違いが考えられる。環境から検出されるレジオネラは、バイオフィルム中に棲息するアメーバ内で増殖していると考えられるが、平板培地上で作成したレジオネラは、採取するコロニーの大きさ、密集状態等に影響を受け、菌体あたりの rRNA 量を一定に保ち難い可能性がある。アメーバで増殖した菌を検量線作成に使用することで、検量線の安定性が改善されるか、今後検討したい。

また、濃度既知のプラスミド DNA の検量線から環境水のレジオネラを定量する前段として、菌体あたりの rRNA 量と培養による増加量を試算した。今回の試算では、RT 反応の効率を考慮していないため、今後、濃度既知の rRNA コントロールを合成し、アメーバや平板で培養した菌体の rRNA 量及び培養による増加量を決定する必要がある。それにより、検査の都度検量線を作成する労力から開放され、迅速、簡便で、定量性に優れた遺伝子増幅検査の確立に近づくものと考えられる。

E 結論

入浴施設等の環境水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目的で、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC RT-qPCR) の適用を検討した。公衆浴場法等で水質基準が定められている浴槽水及び原水を対象に、LC 法と平板培養法の検出結果を比較したところ、LC 法は感度 85.7%、特異度 100% であり、平板培養法の結果を迅速に予測できることが明らかとなった。定量値においても、両者は

高い相関を示し ($R^2=0.86$)、施設の汚染状況を迅速に評価できると考えられた。本法は、検体搬入から最短 21 時間程度で生菌の有無と汚染レベルが判明することに加え、死菌量から潜在的な汚染リスクが評価可能であり、施設の衛生管理及び指導に十分活用可能と考えられた。

参考文献

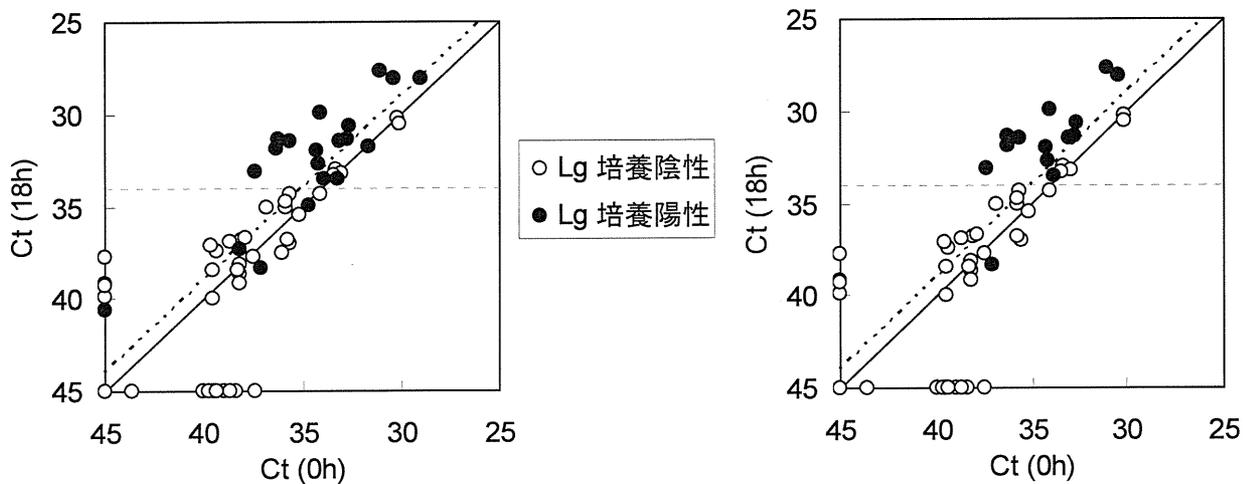
- 1) Beste DJ et al., Compiling a molecular inventory for *Mycobacterium bovis* BCG at two growth rates: evidence for growth rate-mediated regulation of ribosome biosynthesis and lipid metabolism. J Bacteriol. 2005 Mar; 187(5): 1677-84.
- 2) Fegatella F et al., Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. Appl Environ Microbiol. 1998 Nov; 64(11): 4433-8.
- 3) 「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、研究代表者 倉 文明、平成 20 年度総括・分担研究報告書
- 4) 「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、研究代表者 倉 文明、平成 21 年度総括・分担研究報告書

F 論文発表

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

なし



(1) 全試料 (n=68) (2) ろ過器逆洗水を除く (n=61)

図1 液体培養前後の Ct 値の推移 (Ct (0h) と Ct (18h) の比較)

表1 Ct (18h) < 34 を指標とした感度、特異度

(1) 全検体、n=68

Ct値	培養法		計	
	陽性	陰性		
Ct(18h)	<34	16	5	21
	≥34	4	43	47
計	20	48	68	

感度: 80.0% 特異度: 89.6% p<0.0001

(2) 逆洗水除く、n=61

Ct値	培養法		計	
	陽性	陰性		
Ct(18h)	<34	13	5	18
	≥34	1	42	43
計	14	47	61	

感度: 92.9% 特異度: 89.4% p<0.0001

表2 Ct (18h) < 34 かつ ΔCt ≥ 1.0 を指標とした感度、特異度

(1) 全検体、n=68

LC RT-qPCR	培養法		計
	陽性	陰性	
陽性	12	0	12
陰性	8	48	56
計	20	48	68

感度: 60.0% 特異度: 100.0% p<0.0001

(2) 逆洗水除く、n=61

LC RT-qPCR	培養法		計
	陽性	陰性	
陽性	12	0	12
陰性	2	47	49
計	14	47	61

感度: 85.7% 特異度: 100.0% p<0.0001

表 3 偽陰性試料の内訳

No	区分	pH	残塩 mg/L	レジオネラ cfu/100ml	種	Ct(0h)	Ct(18h)	Δ Ct	SPC cfu/ml	HPC cfu/ml	泉質
1	ろ過器逆洗水	7.7	0.8	1,500	pneumophila, sp.	29.04	28.09	0.95	40,000	140,000	低張性弱アルカリ性冷鉱泉
2	ろ過器逆洗水	8.1	1.2	370	pneumophila	34.68	34.95	-0.27	80,000	110,000	低張性弱アルカリ性冷鉱泉
3	ろ過器逆洗水	9.3	0.4	80	pneumophila, sp.	31.65	31.76	-0.11	70,000	61,000	ナトリウム-炭酸水素塩・塩化物泉
4	ろ過器逆洗水	8.4	2.0	80	pneumophila	33.16	33.56	-0.40	180	600	白湯
5	ろ過器逆洗水	8.7		70	pneumophila	-	40.64		11,000	14,000	白湯
6	ろ過器逆洗水	8.5	2.0	30	pneumophila	38.19	37.31	0.88	< 30	30	ナトリウム-塩化物泉
7	浴槽水	8.4	0.8	10	pneumophila	37.09	38.32	-1.23	< 30	< 30	低張性弱アルカリ性冷鉱泉
8	原水	8.5	1.3	10	pneumophila	33.88	33.56	0.32	< 30	< 30	ナトリウム-塩化物泉

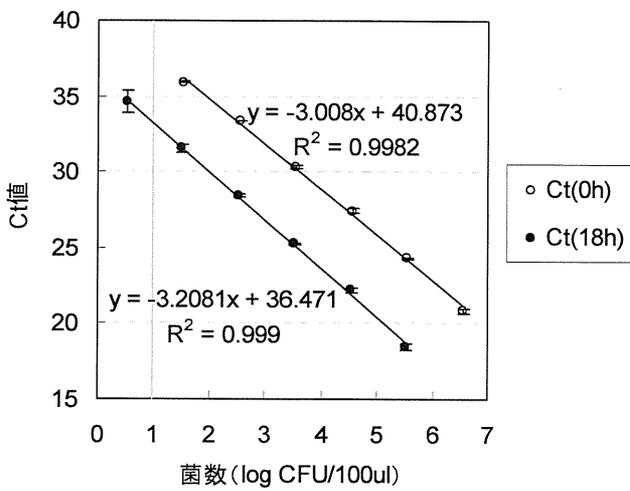


図 2 LC RT-qPCR 法の検量線

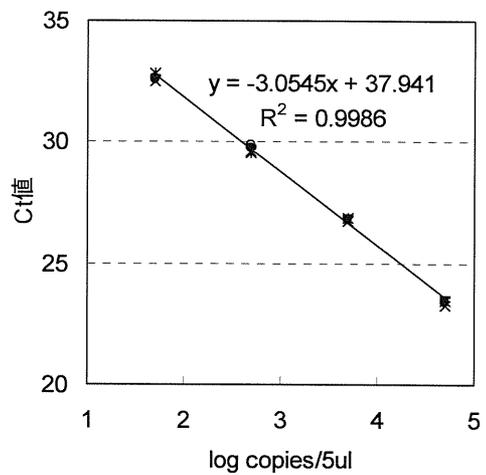
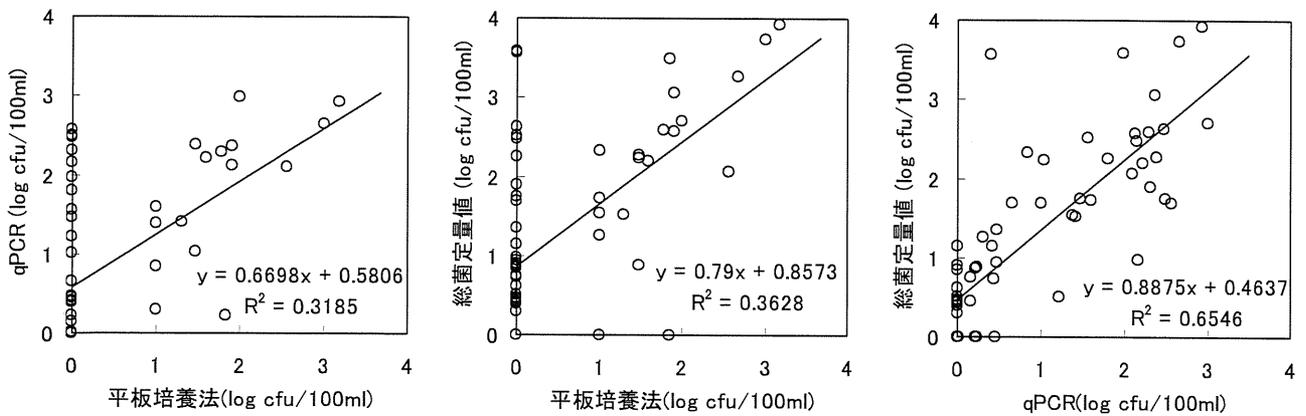


図 3 キット添付プラスミド DNA の検量線



(1) qPCR 法と平板培養法 (2) LC 法総菌定量値と平板培養法 (3) qPCR と LC 法総菌定量値

図 4 生菌を選択しない遺伝子検査法と平板培養法との比較

表4 生菌を選択しない遺伝子検査定量値と平板培養法との比較

(1) qPCR法 (全検体、n=63)

		培養法		計
		陽性	陰性	
qPCR	≥10CFU/100ml	13	12	25
	<10CFU/100ml	4	34	38
計		17	46	63

感度: 76.5%

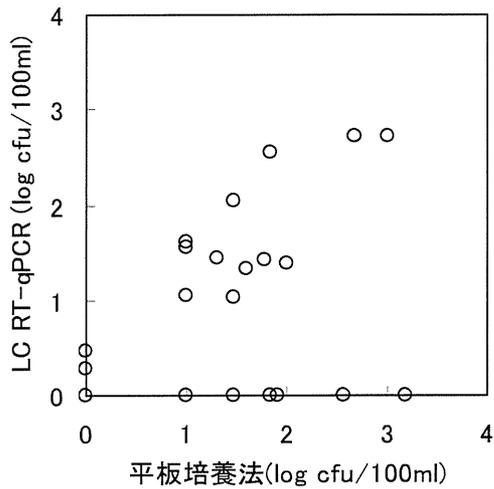
特異度: 73.9%

(2) LC法総菌定量値

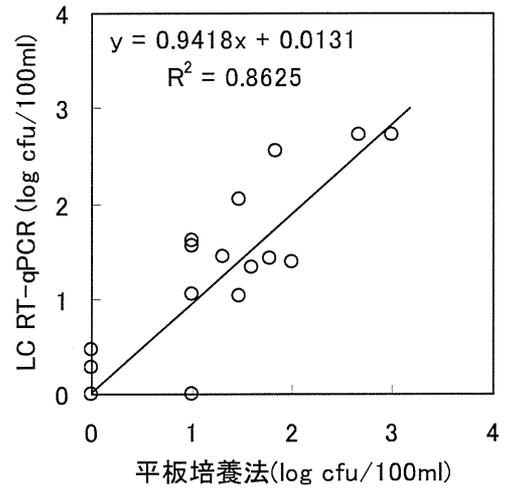
		培養法		計
		陽性	陰性	
LC法 総菌定量値	≥10CFU/100ml	17	15	32
	<10CFU/100ml	3	33	36
計		20	48	68

感度: 85.0%

特異度: 68.8%



(1) 全試料 (n=68)



(2) 逆洗水を除く (n=61)

図5 LC RT-qPCR法の定量値と平板培養法の定量値との比較

資料[A]

液体培養定量 RT-PCR(LC qRT-PCR)法を用いたレジオネラ属菌迅速検査の検討

A 目的

レジオネラ属菌の培養法での判定には一週間以上の日数を要するため、これに代わる迅速検査法として、これまで LAMP 法、qPCR 法、qRT-PCR 法等の遺伝子検査の検討を行ってきた。なかでも前処理が比較的簡便な qRT-PCR 法は、qPCR 法に代わる優れた遺伝子検査法であることが確認されたが、死菌も含めた検査結果であるため培養法との乖離が問題であった。本年度は、浴槽水濃縮試料を液体培地で 18 時間培養し、培養前後でのリボゾーム RNA (rRNA) 量の差から生菌数を算出する液体培養定量 RT-PCR (LC qRT-PCR)法を試行し、培養法、LAMP 法との比較を行ったので報告する。

B 方法

1. 材料

浴槽水検体 51 件(温泉 26 件、水道水 19 件、井戸水 6 件)について培養法、LC qRT-PCR 法、LAMP 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フィルター (ISOPORE 直径 47mm 孔径 0.4 μ m ミリポア社)でろ過し、5ml の DW に混濁させた 100 倍濃縮液を試料とした。この試料を酸処理し 200 μ l を GVPC 培地、WYO α 培地に接種・培養しレジオネラ菌数の算定および同定を行った。LC qRT-PCR 法には上記 100 倍濃縮液 1ml を 15,000rpm で 5 分間遠心後上清 900 μ l を除去した 1,000 倍濃縮液 100 μ l を、LAMP 法には 100 倍濃縮液 2ml を 13,000rpm で 10 分間遠心後、上清 1960 μ l を除去した 40 μ l を使用した。

3. LC qRT-PCR 法

3.1 検量線用標準菌液の作製

L.pneumophila 長崎 80-045 を BCYE α 培地で 30 $^{\circ}$ C 4 日間培養後、菌液を生理食塩水で McF1 程度に調整し 10 倍希釈系列を作製した。平板培養法で菌数を算定するとともに、各希釈液 100 μ l を検量線用試料として -30 $^{\circ}$ C で保存した。

3.2 MWY 液体培地での培養

浴槽水 1000 倍濃縮液、または検量線用試料 100 μ l を等量の酸処理液で処理し MWY 液体培地 900 μ l で中和したのち、100 μ l を培養前 (Ct(0h))試料として -30 $^{\circ}$ C に保存した。残りの MWY 菌液 1000 μ l を 36 $^{\circ}$ C の水浴で 18 時間培養した培養液 100 μ l を、培養後 (Ct(18h))試料として -30 $^{\circ}$ C に保存した。

3.3 RNA 抽出

培養前および培養後試料 100 μ l に RNA 抽出液 300 μ l (5M NaCl 8.0 μ l, 10% Triton X-100 20 μ l, 100mM DTT 20 μ l, 20mg/ml Proteinase K 2 μ l, TE 緩衝液 250 μ l) を加え、55 $^{\circ}$ C 30 分溶解反応を行った。95 $^{\circ}$ C 10 分反応後、15,000rpm で 5 分間遠心した上清 50 μ l を TE 緩衝液 200 μ l で 5 倍希釈し、RT 反応の鋳型とした。

3.4 qRT-PCR 法

逆転写反応 (RT) は PrimeScript RT reagent Kit を使用し研究班作成の方法に準じて行った。qPCR には Cycleave PCR *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit を使用し、増幅装置 Thermal Cycler Dice Real Time System (以上タカラバイオ) を用いて、マニュアルに従い測定を行った。

3.5 定量値算出

培養後 (Ct(18h)) 検量線に浴槽水試料 Ct(18h) の値を代入したものを生菌換算値、Ct(0h) の値を代入したものをバックグラウンド値とし、その差を生菌定量値とした。なお、Ct(0h) と Ct(18h) の差 Δ Ct が 1 以上の場合を生菌存在の基準とした。

4. LAMP 法

Loopamp レジオネラ検出試薬キット E と

Loopamp リアルタイム濁度測定装置 RT-160C (以上栄研化学)を用いて、マニュアルに従って測定し定性判定を行った。

C 結果

1. 検量線の作成

LC qRT-PCR 法の検量線は Ct(0h)では $2.28 \times 10^1 \sim 2.28 \times 10^6$ (cfu/100 μ l)の範囲で、Ct(18h)では $1.57 \times 10^1 \sim 1.57 \times 10^6$ (cfu/100 μ l)の範囲でともに直線性 $R^2=0.999$ を示した。二つの検量線はほぼ平行であった(図 1)。これらは A 社の活性炭を使用した液体 MWY 培地で培養して作成した検量線であるが、日本ノリット社の活性炭 NoritSA2 を使用して検量線を作成した場合には、18 時間後の増幅が A 社活性炭使用時より良好であり、Ct(0h)と Ct(18h)の差 Δ Ct は A 社活性炭使用時の 1.5 倍程度に増加していることが確認された(図 2)。

2. 培養法と LC qRT-PCR 法、LAMP 法との定性結果比較(n=51)

三法におけるレジオネラ属菌の検出率(定性判定)は、培養法で 49.0%(25/51)、LC qRT-PCR 法で 33.3%(17/51)、LAMP 法で 58.8 %(30/51)であった(表 1)。培養法を基準としたレジオネラ属菌検出感度は LCqRT-PCR 法で 60.0%(15/25)、LAMP 法で 88.0 %(22/25)、特異度は LC qRT-PCR 法で 92.3%(24/26)、LAMP 法で 69.2 %(18/26)であった。培養法陽性、LC qRT-PCR 法で陰性と判定された検体は 10 件存在し、うち 7 件は培養法で 40(cfu/100ml)以下の検体であったが、100~390(cfu/100ml)の検体も 3 件存在した。

3. 培養法と LC qRT-PCR 法との定量値の相関(n=51)

培養法と LC qRT-PCR 法の定量値の相関は、 $R^2=0.511$ であったが、双方陽性の検体 15 件の

みを比較した場合には $R^2=0.688$ であった(図 3(a),(b))。なお、LC qRT-PCR 法の定量値は A 社活性炭で作製した液体培地を使用し測定した値である。

D 考察

通常の遺伝子検査は生菌に加えて死菌をも検出するため、培養法に比較して検出率が高く、培養法陰性例でも陽性と判定される例が多いのが特徴である。今回実施した LC qRT-PCR 法では、従来の遺伝子検査法である LAMP 法に比較して、偽陽性が少ないことが確認できた。また培養前後の rRNA 量を測定しその差を利用することで、生菌の存在を証明することが可能な遺伝子検査法であることが確認された。

一方、培養法が陽性であっても LC qRT-PCR 法陰性の検体が 10 件存在した。また、培養法と LC qRT-PCR 法には、陽性検体で弱い相関が見られたものの、LC qRT-PCR 法の定量値が低い傾向にあり(図 3)、原因のひとつとして、液体培地での菌の増殖効率の低さが考えられた。

今回の検討で LC qRT-PCR 法はこれまで困難だった生菌数を反映した遺伝子検査法としての可能性を示した。しかし、液体培地に使用する活性炭の種類によって、レジオネラ属菌の 18 時間後の増幅が大きく異なることから、液体培地での菌の発育効率が試験の精度に非常に重要であることが確認された。レジオネラ属菌の増殖に適する NoritSA2 を使用すれば、実検体での菌の増幅も改善し、LC qRT-PCR 法と培養法の一致率が向上し、定量値も培養法とより相関すると思われる。

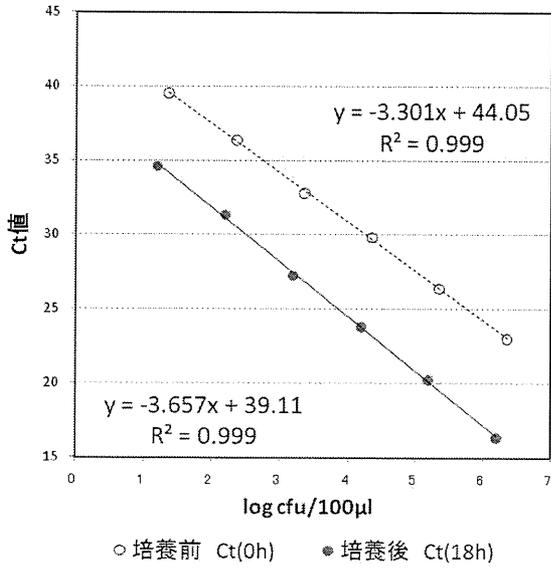


図1 LCqRT-PCR 検量線

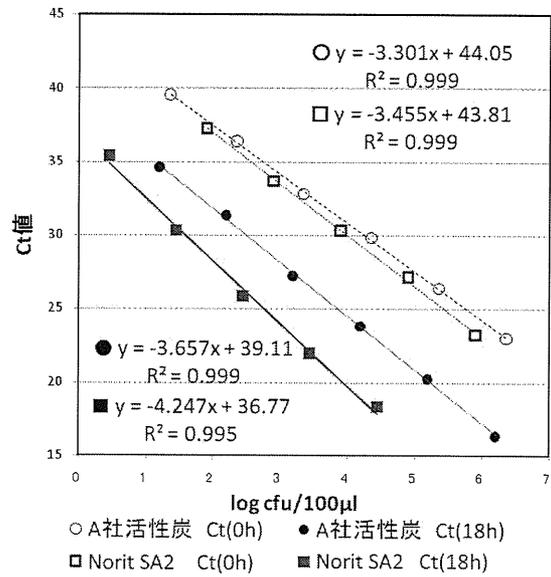


図2 活性炭による検量線の違い

表1 培養法,LCqRT-PCR法,LAMP法の比較 (n=51)

培養法	LC RT-qPCR法			LAMP法			
		陽性	陰性	計	陽性	陰性	計
培養法	陽性	15	10	25	22	3	25
	陰性	2	24	26	8	18	26
		17	34	51	30	21	51

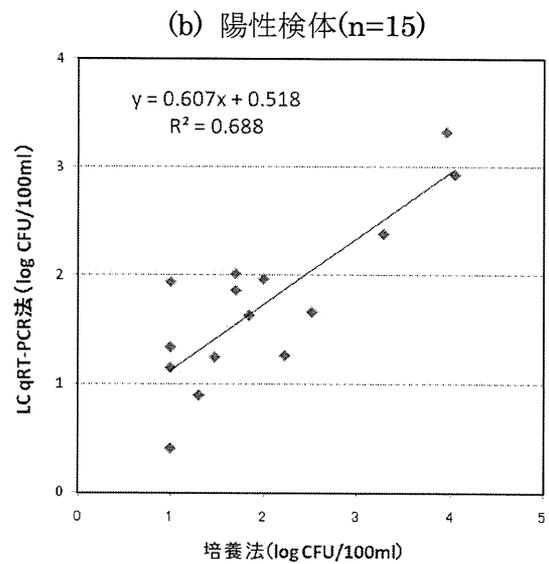
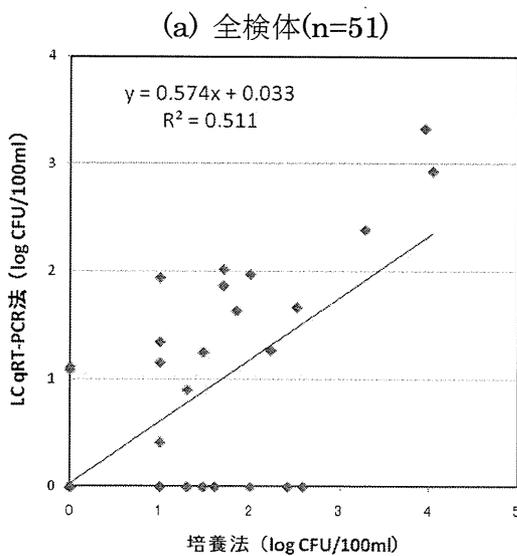


図3 培養法とLCqRT-PCR法の相関

資料[B]平成 22 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検査は、結果判定までにおよそ 7~10 日間を要する。そこで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の有用性について検討してきた。今年度は新たに、烏谷らがこれまで検討した液体培養液 (Liquid Culture : LC) 定量 RT-PCR (qRT-PCR) について、実際の浴用水検査における有用性を培養法、LAMP 法との菌数の比較で検討した。また、迅速に結果を報告することを目的として、斜光法による顕微鏡での観察、同定を実施し、その有用性について調べた。

B 研究方法

1. 培養法と遺伝子検査によるレジオネラ属菌数の比較

レジオネラ属菌の汚染状況について、培養法、LAMP 法および qRT-PCR 法を用いて調査した。今年度は採水した日に濃縮処理と LAMP 法による遺伝子検査をおこない、LAMP の結果は可能であれば当日、遅くとも翌朝には厚生センター担当者に報告した。次いで、培養法として斜光法によりレジオネラ属菌に特有のカットガラスあるいはモザイク模様を確認し、3 日目には生菌が存在することを報告した。なお、菌数の確定は採水から 7~10 日目にシステインの要求性と血清学的検査、必要に応じて遺伝子検査によりおこなった。

(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 μ m、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

試料は加熱処理 (50 $^{\circ}$ C, 20 分)、酸処理 (0.2M KCl-HCl, pH2.2 等量混合、2 分) および未処理とした。これらの試料を GVPC 培地 (日研生物)、MWY 培地 (関東化学) にそれぞれ 100 μ l、10 μ l 量を各 1 枚ずつコンラージし、35 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

(3) DNA 抽出法

LAMP 法に用いる DNA は、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 を用い、濁度測定装置 LA320C で判定した。菌数は検量線から求め、10cfu/100ml 以上を陽性と判定した。

(5) qRT-PCR

前述した酸処理液 200 μ l に自家製 MWY 培地 900 μ l を添加し、ボルテックスで混合する。その 100 μ l を Ct (0h) として -30 $^{\circ}$ C に保存した。残りの濃縮試料加 MWY 培地 1000 μ l を 36 $^{\circ}$ C の水浴で 18 時間静置培養し、ただちに氷冷、ボルテックス後 Ct (18h) として冷凍 (-30 $^{\circ}$ C) で保存した。1 浴用水につき、これら 0h と 18h の液体培養液の RNA 量を測定し、その差を生菌数とした。検体からの RNA の抽出はすべての浴用水検査が終了した時点で行った。したがって、液体培地での増菌培養の前後の検体は指示どおりの段階で -20 $^{\circ}$ C 保管した。RNA の抽出、逆転写 (RT) 反応については、研究班の烏谷らのプロトコールに従った。

(6) qPCR 法

Cycleave PCR Legionella (5SRNA) Detection Kit (takara) をマニュアルに従って使用した。増幅装置は Thermal Cycler DICE (takara) で測定した。

(7) 検量線の作成

L. pneumophilla Nagasaki 80-045 を標準菌として、30 $^{\circ}$ C 4 日間培養後、滅菌生理食塩水で菌を懸濁し、McFl (10⁸cfu/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。LAMP 法にはこの 1ml を用いて浴用水検体と同様の方法で DNA を抽出し、100 μ l を BCYE α (ビオメリュー) にコンラージし、菌数を測定した。qRT-PCR 法には、検体と同様に酸処理したのち、その 100 μ l をコンラージ棒で塗抹し、35°C 7 日間培養後、菌数を測定した。

2. 斜光法による迅速培養法の検討

培養した培地上のすべてのコロニーについて、3 日目と 7 日目に斜光法によりレジオネラ属菌の性状を観察した。レジオネラ属菌の発育が認められた平板について、菌数測定をおこない、また、コロニーの一部について LAMP 法により遺伝子検査を行った。

C 研究結果

1. 培養法と LAMP 法、LC qRT-PCR 法の比較

検水 45 件中、レジオネラ属菌陽性 (>10cfu/100ml) となったのは、培養法 15 件 (33.3%)、LAMP 法では 7 件 (15.6%)、LC qRT-PCR 法では 12 件 (26.7%) であった (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 法あるいは LC qRT-PCR 法のいずれかで算出されるレジオネラ属菌数が 10cfu/100ml より少なかった浴用水は、LAMP 法で 11 件、LC qRT-PCR 法で 8 件、全体で 12 件あった (表 2)。これらのうち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。しかしながら、培養法におけるレジオネラ属菌数が 200、160、60、50cfu/100ml であった浴用水 (No. 2, 5, 6, 17, 20) について、遺伝子検査法で 10cfu/100ml 未満となる理由は明らかではない。LAMP 法については阻害物質があったかは確認できないが LC qRT-PCR 法については内部標準となる蛍光色素 Rox での反応を見る限り、PCR 阻害物質が存在していた

とは考えられない。これらのうち、No. 5 ~ 8 の浴用水では、総菌定量値が 738.6 ~ 3172.7cfu/100ml と算出されているが、18 時間後の菌数との差が 10cfu/100ml 未満という結果となった。原因のひとつとして、0 時間での遺伝子量が多く、18 時間で増加した生菌量が少ない場合には、それが結果に反映されない可能性が考えられよう。あるいは、浴用水の採水日を見ると、No. 4 ~ 7、No. 10 ~ 12 はいずれも同一日であり、この浴用水は同じ施設から採水されている。このことからその日の操作工程に原因があった可能性が考えられる。一方、培養法での菌数が 10cfu/100ml 未満であったにも関わらず、遺伝子検査 10cfu/100ml 以上を示したのは LAMP 法で 3 件、LC qRT-PCR 法で 6 件であった。LAMP 法の 3 件は算出された菌数が多く、死菌 DNA を検出している可能性が高いと思われた。また、LC qRT-PCR 法での 6 件はいずれも 10 ~ 30cfu/100ml と菌数は少なかった。

菌数を log 対数で培養法と比較した (図 1 ~ 2)。相関係数は LAMP 法で $R^2 = 0.02$ 、LC qRT-PCR 法で 0.32 と、LC qRT-PCR 法で高かった。LAMP 法については昨年までの研究結果から、とりわけ菌数の少ないところでの定量性はよくないことが分かっている。今年度の浴用水のレジオネラ属菌数が全体的に少なく、LAMP 法での菌数の相関がよくない結果となったと推定される。

2. 斜光法による迅速培養法の検討

今年度、釣菌してシステイン要求性と血液寒天での発育の確認をしたコロニー数は 312 個で、うち斜光法によりレジオネラ属菌であると判断 (確信) して釣菌したのは 203 個、レジオネラ属菌の可能性は低いと判断したが、念のため釣菌したのは 109 個であった。これらのうち、確信して釣菌したにも関わらずレジオネラ属菌ではなかったのは 3 株、レジオネラ属菌である可能性は低いと思ったにも関わらず、レジ

オネラ属菌であったのは5株であった。今年度、斜光法の未経験者も鏡検したが、経験者と結果はおおむね一致した。これは、レジオネラ属菌を同定する方法として、斜光法が初心者にも有用であることを示す。ただし、初心者にあつては、7日目の判断に問題はなかったが、3日目における極めて小さなコロニーを見落とすことがあった。

D 考察

今年度のおもな検討課題である LC qRT-PCR 法について、培養法との菌数の相関は、LAMP 法など、これまでに検討してきた方法に比べ良好であった。ただし、培養法で 60、50cfu/100ml の菌数となった浴用水で、LC qRT-PCR 法では全く増幅していない結果となるなど、いくつかの問題点があった。この原因は明確ではないが、一つは結果に記載したように、0 時間での RNA 量が多い場合には増幅してもその量が結果に反映されない可能性が考えられた。これは、死菌からもある程度の RNA が抽出されていることを示すものではないかと考える。また、菌株によって、その発育速度に違いがあれば、検量線から算出される菌数に違いが生じる可能性があり、この点はこの方法における課題の一つだと言える。実際、培養法においても、3 日目に比べ、7 日目で菌数が増加する浴用水が認められることから、18 時間培養で得られる生菌数をどのような結果として意味付けるかなど、今後更なる検討が必要であると思われた。

本県においては発育が遅いことが分かっている *L. londiniensis* が頻繁に検出される浴用水があることから、この問題は検査結果に影響するため、重要であると考える。一方、この方法は相対的に定量するものであり、安定した検量線が常時求められる。しかしながら、今年度 2 回検量線を作成したが、1 回目の検量線を用いると、浴用水の菌数がかなり少なく定量され、培養法との相関が取れない結果となった（未提示）。おそらく検量線での立ち上がりが速いため、総じて定量値が少なくなったものと考えられる。RNA を抽出するまでかなりの工程を踏むことから、この検量線の差にどの手技が影響したかは明らかではない。再現性の良い検量線の求め方について検討が必要であろう。少なくとも、検量線が正確であるか確認できるコントロール（RNA など）が必要であると思われる。しかしながら、死菌 DNA も検出するこれまでの方法に比べ、培養法との相関は良好であることから、現場での応用に向けてさらに検討を続けるべき方法であると思われた。

一方、斜光法によるレジオネラ属菌の同定は、初心者においても良好な結果を示した。これは、迅速に結果を報告できるという点で、これまでの培養法の欠点を補う方法として、現場で広く取り入れるべきであろう。ただし、3 日目で発育できない菌や、同定困難な株もあることから、定量方法としての報告について何らかの基準が必要であると思われた。

資料 1

核酸検出法の手順 (Chelex100 法)

1. 検水 500ml メンブランフィルター (直径 47mm、0.2 μ m、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE) で吸引ろ過する。
2. 滅菌蒸留水 50ml でメンブランフィルター及びカップを洗浄し、吸引ろ過する。このとき、カップ壁面を洗うように滅菌水をピペットで流しかける。
3. 吸引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50ml 滅菌コニカルチューブに入れる。
4. チューブに 5.0ml の滅菌蒸留水を加え、5 分間ボルテックスする。このとき、まんべんなく滅菌水がフィルターに接触するようにチューブの角度を調節する。
5. この試料を濃縮試料とする。
6. 濃縮試料 5.0ml のうち、1.0mL を微量高速遠心機 15,000rpm 5 分間遠心し、上清を除去する。
7. この沈さに 5%Chelex (TE, pH8.8) 50 μ l を加え、ボルテックスする。このとき、均一に添加するため、Chelex はスターで攪拌しながら採取する。
8. 7 の試料を 100°C で 10 分加熱し、15,000rpm 5 分遠心し、この上清を精製 DNA とする。
9. 精製 DNA を 95°C、5 分間加熱後、冷却試料の 5 μ l を LAMP 装置で核酸増幅する。
10. 標準菌株の希釈系列から検量線 (LAMP 法の検量線は希釈系列で菌数の少ないものを採用すると直線性が悪くなるので、菌数の高いほうで得られた直線を採用) を作成し、試料の Ct 値、または Tt 値をもとに試料の菌数とした。
11. 得られた菌数は試料 10ml 中の菌数に相当するので、培養法の 100ml と比較するために、核酸法の菌数を 10 倍にする。

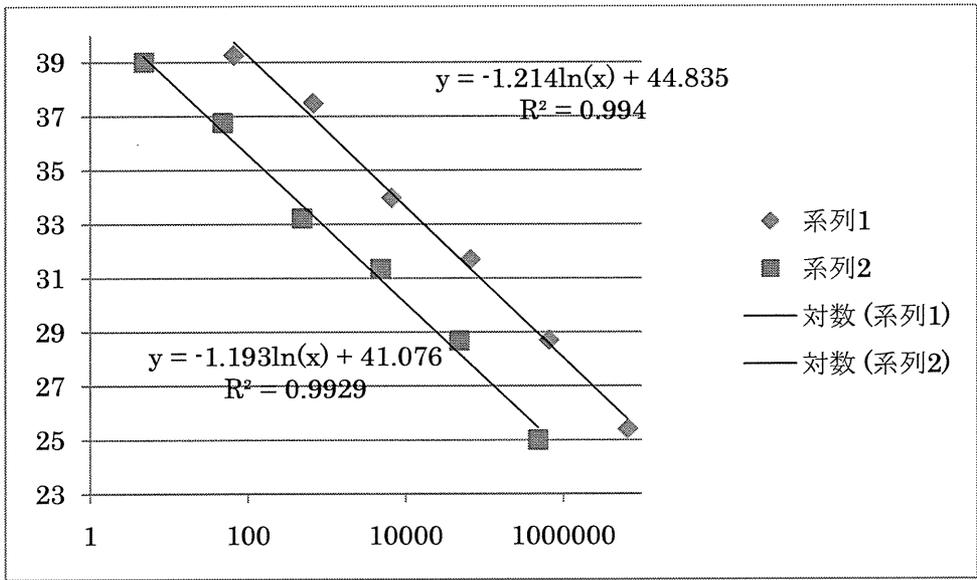


図1. LC qRT-PCRと培養法における
レジオネラ属生菌数の相関

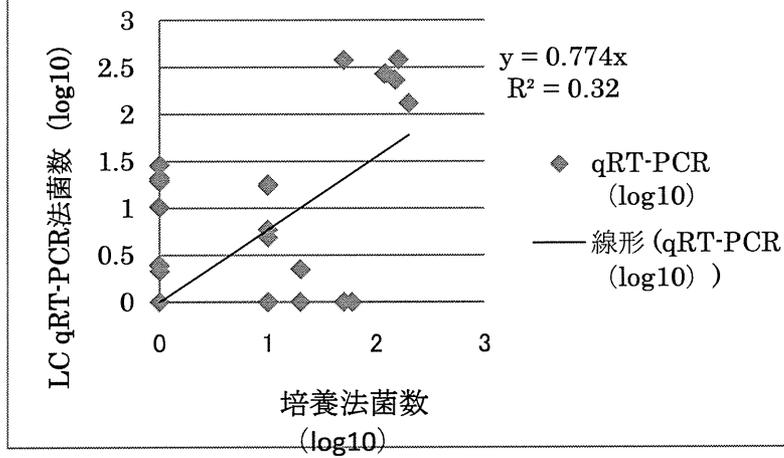


図2. LAMP法と培養法における
レジオネラ属菌数の相関

