

表 1. 平成 22 年度浴用水におけるレジオネラ属菌汚染状況

		LAMP 法		qRT-PCR		
		陽性	陰性	陽性	陰性	計
培養法	陽性	4	11	7	8	15
	陰性	3	27	5	25	30
計		7	38	12	33	

表 2. 培養法と遺伝子検査の菌数の比較(結果が乖離した浴用水の結果)

No.	採水日	培養法	LAMP 法	LC qRT-PCR	総菌定量値 (死菌+生菌) 単位: cfu/100ml	遊離残 留塩素 濃度 mg/ml	検出された血清型					
				法		SG2	SG3	SG5	SG6	SG10	ミクダディ	UT
1	9/30	20	0	2.2	0.0	0.05	SG2					
2	9/30	200	0	132.4	485.3	0	SG3	SG5	SG6	ミクダディ	UT	
3	10/5	<10	0	21.0	0.0	2.0						
4	10/12	10	0	5.9	0.0	0.8	SG1					
5	10/12	60	0.1	0.0	738.6	0.45	SG1	SG6				
6	10/12	50	0	0.0	3172.7	0.4	SG1	SG6	SG10			
7	10/12	20	0	0.0	1696.7	0.7	SG1	SG6				
8	10/18	20	23.1	0.0	1782.7	1.11	SG1	SG6				
9	10/18	<10	0	28.7	167.8	1.86						
10	10/25	10	0.0	0.0	0.0	0.3	SG1					
11	10/25	10	0	17.4	0.0	0.4	SG6					
12	10/25	10	0	4.9	0.0	0.4	SG6					
13	11/12	<10	2699.2	19.5	189.0	0.2						
14	11/12	<10	978.9	0.0	844.9	0.3						
15	11/12	<10	448.6	0.0	2576.0	0.5						
16	11/18	<10	0	19.8	0.0	2						
17	12/6	50	0.9	379.1	132.2	0.4	SG1	SG9	SG10	ミクダディ		
18	12/6	<10	0	10.3	254.5	0.3						
19	12/6	<10	0	10.3	0.0	1						
20	12/6	160	0	386.2	373.3	0.5	SG1					

## 資料[C]

### 浴槽水等のレジオネラ属菌検出状況と迅速検査法の検討(平成22年度)

#### 研究要旨

平成22年度は浴槽水等 30 検体について、迅速検査法(リアルタイム PCR 法、逆転写反応後のリアルタイムPCR法およびMWY液体培地を用いた生菌を検出するリアルタイムPCR法)と培養法を併用してレジオネラ属菌の検査を行った。培養法では浴槽水 30 検体中 8 検体(26.7%)からレジオネラ属菌が検出され、それらの菌種および血清群は *L.pneumophila* 1 群、5群、6群、8群、9群、型別不能(UT)と *L.gormanii* で、3検体は複数の血清群の菌が検出された。迅速検査法の検出率を比較すると、逆転写反応後のリアルタイム PCR 法(46.7%)、リアルタイムPCR法(43.3%)、MWY液体培地を用いた生菌を検出するリアルタイムPCR法(23.3%)の順に高かったが、培養法と各検査法の間で両法ともに陽性の検体における定量値の相関は、MWY液体培地を用いた生菌を検出するリアルタイムPCR法( $R^2=0.713$ )が培養法と最も強い相関を示した。今後培養法の陽性結果との定性的な一致率を向上させるための検討が必要と考える。

#### A.研究目的

公衆浴場等の入浴施設の衛生管理については、近年レジオネラ属菌の汚染が問題となっていることから十分な配慮が必要とされている。衛生管理の指標として従来から用いられている培養法は、結果判明までに時間が掛かることから、遺伝子検査を用いた迅速検査法について厚労省研究班で継続して検討している。本年度は入浴施設のレジオネラによる汚染実態把握のための調査と、生菌を検出する迅速検査法等の有用性の検討を行った。

#### B.研究方法

##### (1)材料

浴槽水 30 検体を採水し、レジオネラ属菌の検査を実施した。

##### (2)方法

検査法は従来の培養法と、Thermal Cycler Dice Real Time System(タカラバイオ)を用いた遺伝子検査法のリアルタイムPCR(qPCR)法、逆転写反応後のリアルタイムPCR(RT-qPCR)法およびMWY液体培地を用いて生菌を検出するリアルタイムPCR(LC RT-qPCR)法の3つの迅速検査法を併用して実施した。

即ち、検体500mlをフィルター(ポリカーボネート製: 0.45  $\mu$ l)でろ過し、フィルターを滅菌水 5ml 中で1分間ボルテックスして菌を十分洗い出した。培養法はこの検体濃縮液 0.5ml をとり、酸処理液(0.2M HCl・KCl 溶液: pH2.2、武藤化学製) 0.5ml を加えて混和後、室温で5分間処理して原液とし、これを更に滅菌生食で10倍希釈液を調製して、原液および10倍希釈液の各 0.2ml をGVPC寒天生培地(OXOID 製)およびMWY寒天生培地(OXOID 製)にコンラージ棒で塗抹して、

37°C、10 日間培養した。この間、疑わしいコロニーを斜光法で確認し、同定して菌数測定を行った。遺伝子検査による迅速検査法については、qPCR 法は検体濃縮液 2ml を 15,000rpm、4°C、5 分間遠心後、上清を除去して沈渣 100  $\mu$ l を得た。この再濃縮液について、平成 21 年度の研究班報告書に示した操作と同様に、リゾチーム処理を省略した DNA 抽出法を実施し、カラムからの最終溶出は AE バッファー 25  $\mu$ l で 2 回実施して 50  $\mu$ l の DNA 溶液を回収し、その 5  $\mu$ l を qPCR 法に使用した。RT-qPCR 法および LC RT-qPCR 法は、以下のように実施した。即ち、検体濃縮液 1ml を 2ml マイクロチューブにとり、15,000rpm、4°C、5 分間遠心後、上清 900  $\mu$ l を除去して 1000 倍濃縮液 100  $\mu$ l を作成した。これに等量の酸処理液を加えて室温で 5 分間処理し、MWY 液体培地 900  $\mu$ l を添加・混和して酸処理を中止したのち、この 100  $\mu$ l を分取して -30°C で保存した (Ct(0h) とする)。残りの溶液 1000  $\mu$ l はウォーターバス中で 36°C、18 時間静置培養したのち、直ちに氷冷し 100  $\mu$ l を分取して、-30°C で保存した (Ct(18h) とする)。RT 反応は、保存した Ct(0h) および Ct(18h) の溶液に RNA 抽出液 300  $\mu$ l を添加して 55°C、30 分間反応を行って溶菌し、95°C、10 分間処理して ProteinaseK の不活化を行った。これを 15,000rpm、4°C、5 分間遠心し、上清 50  $\mu$ l を TE 緩衝液 200  $\mu$ l の入ったマイクロチューブに加えて、RNA 希釈液とした。この RNA 希釈液 5  $\mu$ l を用いて PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa 製) の RT Master Mix 5  $\mu$ l と逆転写反応を行い、反応後のチューブに

Easy dilution 15  $\mu$ l を加えて鋳型 DNA とした。この 5  $\mu$ l を使って Cycleave PCR Legionella (5S rRNA) Detection kit (TaKaRa 製) の qPCR Master Mix 20  $\mu$ l とリアルタイム PCR 反応を行い、Ct(0h) および Ct(18h) の Ct 値を求めた。一方、定量値を求めるための検量線の作成のため、長崎 80-045 株を BCYE  $\alpha$  寒天培地で 30°C、4 日間培養し、この菌を用いてマクファーランド 1 の菌液を作成した。これを 10 倍段階希釈した菌液で生菌数を測定し、この菌量既知の菌液の希釈系列を用いて qPCR、Ct(0h) および Ct(18h) の検量線を作成した。また、リアルタイム PCR 用試薬キットに附属している陽性対照のプラスミド DNA 溶液 (コピー数既知) を用いて qPCR を行い、コピー数を菌数に換算 (17 コピー = 1cfu) して検量線を作成した。総菌定量値 [(生菌 + 死菌) : 従来の RT-qPCR 法による結果に相当] は Ct(0h) の検量線を用いて各検体の Ct(0h) 値により、生菌定量値 (LC RT-qPCR 法による結果) は Ct(18h) の検量線を用いて各検体の Ct(18h) 値により得た値から、同検量線で Ct(0h) 値により得た値 (バックグラウンド値) を引いた値を算出して求めた。なお、Ct(18h) < 34 で Ct(0h) 値と Ct(18h) 値の差 ( $\Delta$ Ct) が 1 以上であった検体を、生菌陽性とした。

### C. 研究結果

公衆浴場の浴槽水等 30 検体について培養法で検査した結果は、表 1 に示した。

レジオネラは 8 検体 (26.7%) から検出され、その菌種と血清型は *L.pneumophila* (1 群、5

群、6群、8群、9群、UT)、*L.gormanii*であった。

遺伝子検査による迅速検査法の検量線については、長崎 80-045 株の菌液を用いた qPCR、Ct(0h)および Ct(18h)の検量線と、キット付属のプラスミド DNA と用いた検量線を、図 1 に示した。qPCR、プラスミドおよび Ct(0h)の検量線(図 1-1)は  $R^2$  値が 0.995~0.9998 といずれも良好であったが、プラスミド DNA の検量線は、qPCR および Ct(0h)に比べて同濃度における Ct 値がかなり低かった。また、Ct(0h)と Ct(18h)の検量線(図 1-2)は  $R^2$  値が 0.9932~0.9974 と良好で、 $\Delta$ Ct は 1 以上を示した。

各検体の迅速検査法による検査結果は、表 1 に示した。

培養法の検出感度である 10cfu/100ml 以上を陽性とした場合、qPCR 法では 13 検体 43.3%、RT-qPCR 法は 14 検体 46.7%が陽性となり、培養法に比べて高感度でより多くの検体からレジオネラが検出された。生菌を検出する LC RT-qPCR 法は 7 検体 23.3%が陽性で、培養法より検出率が低かった。

検査法による結果の比較(定性)は、表 2 に示した。

培養法で陽性となった8検体のうち迅速検査法でも陽性となったのは、qPCR 法が8検体 26.7%、LC RT-qPCR 法は5検体 16.6%、RT-qPCR 法は7検体 23.3%で、qPCR 法が最も培養法の結果と一致していた。また、培養法はレジオネラが陰性であったが迅速検査法では陽性となった検体は、qPCR 法が5

検体 16.6%、LC RT-qPCR 法が 2 検体 6.7%、RT-qPCR 法は 7 検体 23.3%で、RT-qPCR 法による検出率が最も高かった。一方、培養法が陽性であったにもかかわらず迅速検査法では陰性だった検体は、qPCR 法が 0 検体 0%、LC RT-qPCR 法は 3 検体 10.0%、RT-qPCR 法は 1 検体 3.3%で、qPCR 法以外は最大 3 検体が偽陰性を示した。

レジオネラ陽性検体における検査法相互の定量値の相関について、図 2 に示した。qPCR 法と RT-qPCR 法(図 2-4)は  $R^2$  値が 0.689 と高値を示し比較的強い相関が見られたが、培養法と各検査法との相関(図 2-1~2-3)については、 $R^2$  値が 0.3336~0.398 と低かった。

これに対し、両法により陽性(qPCR 法および RT-qPCR 法は、10cfu/100ml 以上検出)となった検体に限定して、それらの検査法相互の定量値の相関について、図 3 に示した。やはり qPCR 法と RT-qPCR 法間(図 3-4)では  $R^2$  値が 0.8395 と非常に強い相関を示した。一方、培養法との相関は RT-qPCR 法および qPCR 法(図 3-2、3-3)が上記同様  $R^2=0.1424\sim0.3086$  と低い値に止まったが、LC RT-qPCR 法(図 3-1)は  $R^2=0.713$  と強い相関を示した。

#### D. 考察

今年度の浴槽水等のレジオネラ汚染調査では、培養法により 30 検体中 8 検体(26.7%)が陽性となり、検出された菌は *L.pneumophila*(1群、5群、6群、8群、9群、UT)、*L.gormanii* で、例年同様多種血清群

のレジオネラが検出された。検出菌数は10cfu/100ml～1,100cfu/100mlで、これらの検体は1検体を除いて残留塩素濃度が検出されなかったことから、日常における衛生管理の徹底の重要性が再確認された。

迅速検査法の定量に用いた検量線は、どの方法でも  $R^2$  値が高い値で良好な直線性を示した。しかし、リアルタイム PCR 試薬キットに附属の陽性対照用の plasmidDNA は、長崎 80-045 株を用いた qPCR や Ct(0h) の検量線に比べて、2 サイクル以上 Ct 値が低かった。これは、検量線の傾きはほぼ同様であるため、希釈の影響によるものではなく、菌液から DNA あるいは RNA を抽出する際や、逆転写反応およびその後の DNA の回収などの過程で、DNA や RNA をロスしたことが原因であると考えられた。キット添付のすでに DNA の状態の溶液を希釈のみで検量線作成に使用する場合と、菌から幾つかの DNA 抽出・回収段階を経た DNA 溶液を使用する場合では、Ct 値に差が出ることは当然であると考えられる。また、Ct(0h) と Ct(18h) の検量線では、同じ元の菌液における Ct(0h) と Ct(18h) の値に増菌による差(1 以上の減少)が確認された。

各検査法について定性的に結果を比較すると、検出率では培養法の 26.7% に比べて RT-qPCR 法が 46.7%(1.75 倍)で最も検出率が高く、次いで qPCR 法の 43.3%(1.63 倍)、LC RT-qPCR 法の 23.3%(0.88 倍)であった。培養法が陽性になった検体との一致率は、qPCR 法が 100% で最も高く、次いで RT-qPCR 法の 87.5%、LC RT-qPCR 法の 62.5% であった。迅速検査法の qPCR 法および RT-qPCR 法は生菌および死菌の遺伝

子を検出する方法であり、培養法に比べて高感度に検出できる方法であることが、今年度の研究班の結果から示されている。今年度検討した LC RT-qPCR 法は生菌のみの遺伝子を検出する方法であるが、今回の調査では培養法より検出率が低かった。培養法が陽性で LC RT-qPCR 法では陰性の検体は、いずれも培養法により検出された菌数が 10 あるいは 20cfu/100ml と少ない検体であった。このことから、LC RT-qPCR 法について、生菌数の少ない検体を確実に検出するための検討が必要と思われた。

一方、レジオネラ陽性の検体の菌数(定量値)について、検査法相互の相関(図 2)を見ると、qPCR 法と RT-qPCR 法間では  $R^2$  値が 0.689 で比較的強い相関が見られたが、培養法との相関はどの方法でも  $R^2$  値が 0.3336～0.398 と低かった。さらに、両方法により陽性となった検体に限定した菌数の相関(図 3)でも、やはり qPCR 法と RT-qPCR 法の  $R^2$  値は 0.8395 とさらに強い相関が見られた。両法とも生菌および死菌の遺伝子を検出する迅速法であり、強い相関が見られたものとする。LC RT-qPCR 法と培養法については、両法のいずれかで陽性となったすべての検体における相関は少し弱かったが、両法とも陽性であった検体に限定した場合には  $R^2$  値が 0.713 となり、培養法と他の 2 法の場合に比べて強い相関が見られたことから、生菌を検出する遺伝子検査法として、有用であると思われた。このことから、今後さらに培養法の陽性結果(定性)との一致率を上げ、安定した結果が得られる迅速で定量性のある検査法にするための検討が必要であると考えられる。

表1 浴槽水の検査法別レジオネラ検出結果(n=30)

検査法	陽性検体数	検出率(%)	検出菌名(血清群)
培養法	8	26.7	<i>L. pneumophila</i> (1群、5群、6群、8群、9群、UT)、 <i>L. gormanii</i> 菌数:10~1,100cfu/100ml
qPCR法*	17(13)	56.7(43.3)	
LC RT-qPCR法**	7	23.3	
RT-qPCR法*	22(14)	73.3(46.7)	
計	17		

\* ( ):10cfu/100ml以上検出

\*\* Ct(18h)<34かつΔCt≥1

図 1 検量線

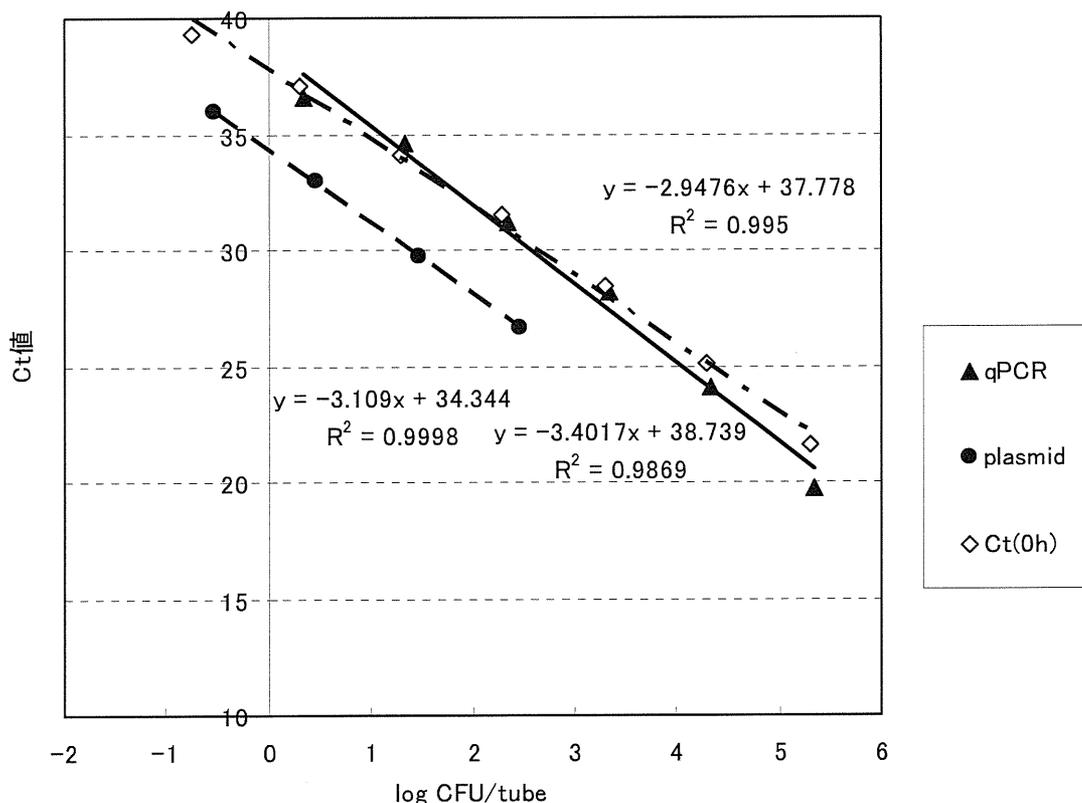


図 1-1 長崎80-045株の菌液を用いたqPCR法およびCt(0h)とplasmidを用いた検量線

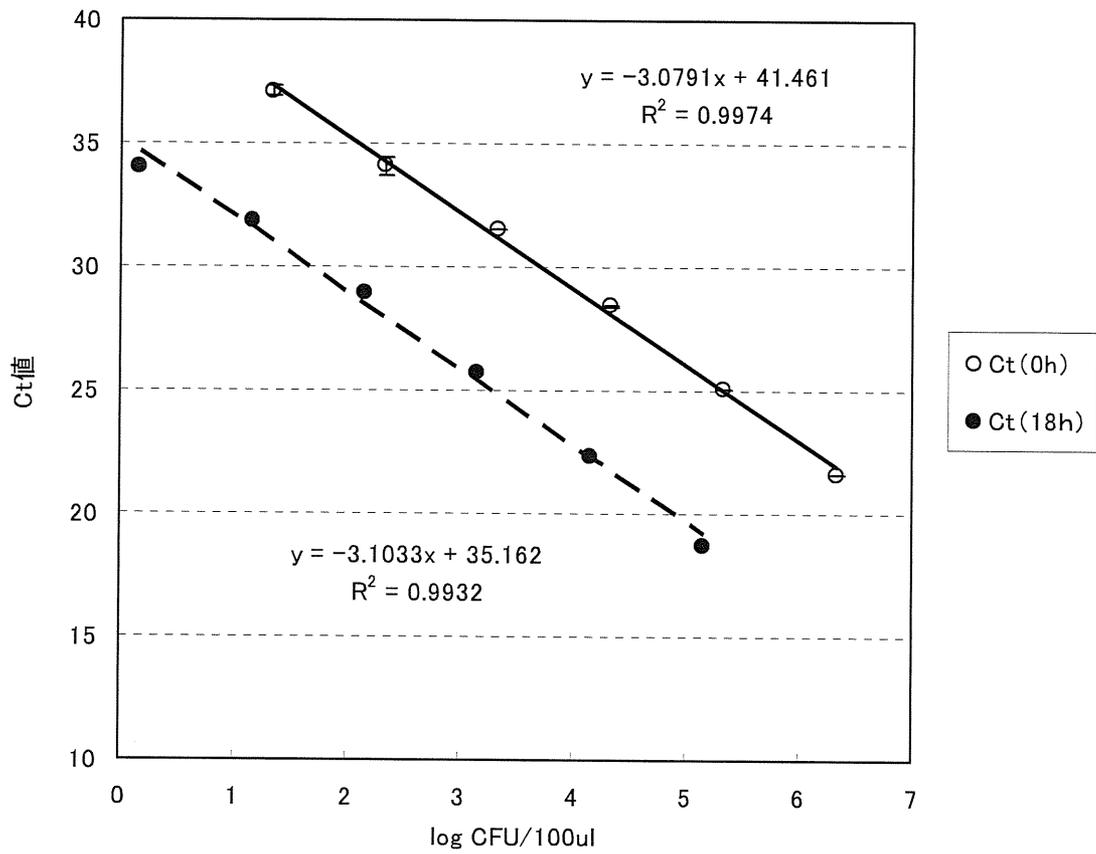


図 1-2 長崎80-045株を用いたCt(0h)およびCt(18h)の検量線

表2 検査法別検出結果の比較

①	qPCR法+	qPCR法-	計
培養法+	8(26.7)	0(0)	8(26.7)
培養法-	5(16.6)	17(56.7)	22(73.3)
計	13(43.3)	17(56.7)	

(10cfu/100ml以上検出)

培養法に対する感度: 13/8 (163%),

培養法陽性検体における一致率: 8/8 (100%)

②	LC RT-qPCR法+	LC RT-qPCR法-	計
培養法+	5(16.6)	3(10.0)	8(26.7)
培養法-	2(6.7)	20(66.7)	22(73.3)
計	7(23.3)	23(76.7)	

LC RT-qPCR法はCt(18h)<34 & ΔCt≥1

培養法に対する感度: 7/8 (87.5%),

培養法陽性検体における一致率: 5/8 (62.5%)

③	RT-qPCR法+	RT-qPCR法-	計
培養法+	7(23.3)	1(3.3)	8(26.7)
培養法-	7(23.3)	15(50.0)	22(73.3)
計	14(46.7)	16(53.3)	

(10cfu/100ml以上検出)

培養法に対する感度: 14/8 (175%),

培養法陽性検体における一致率: 7/8 (87.5%)

図2 レジオネラ陽性検体における検査法相互の定量値の相関

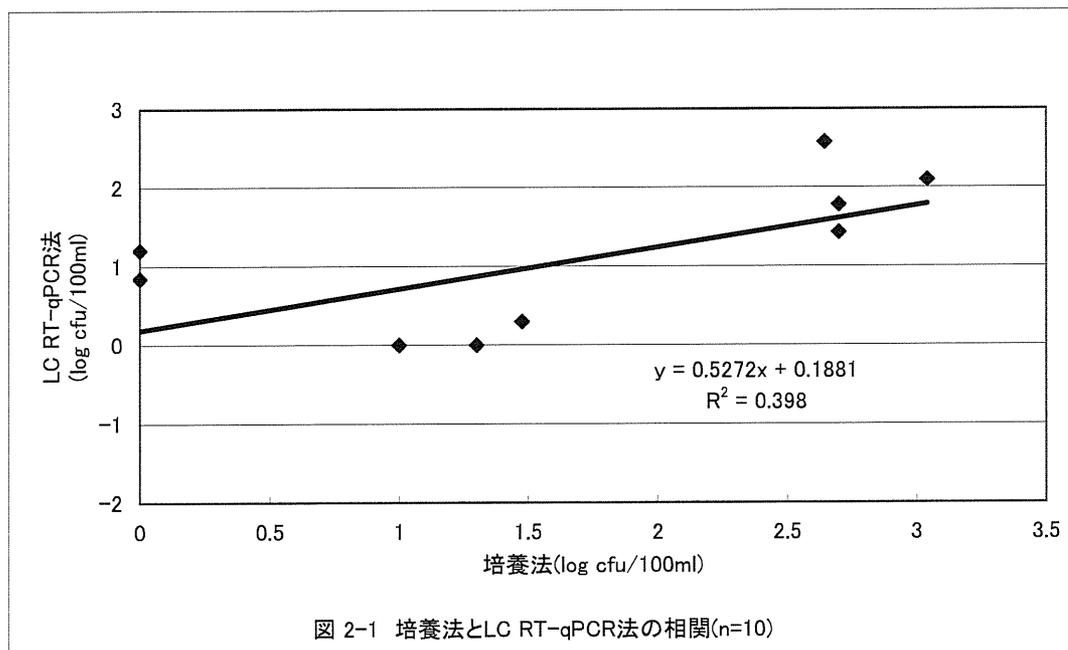
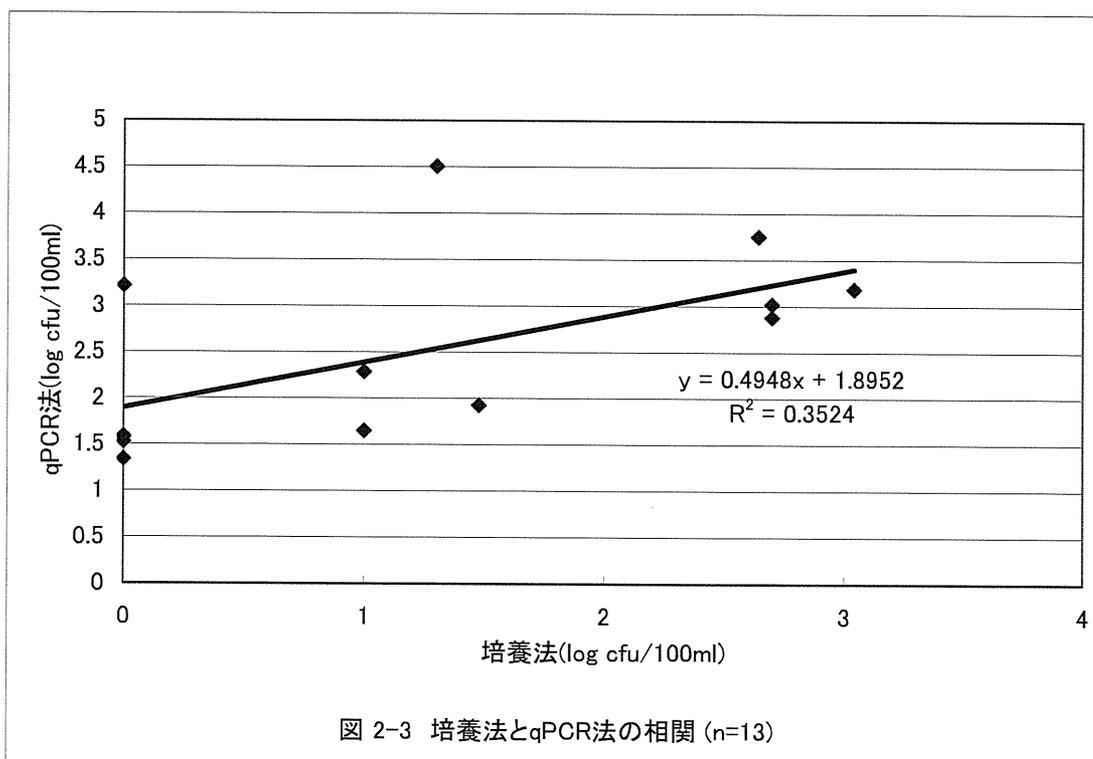
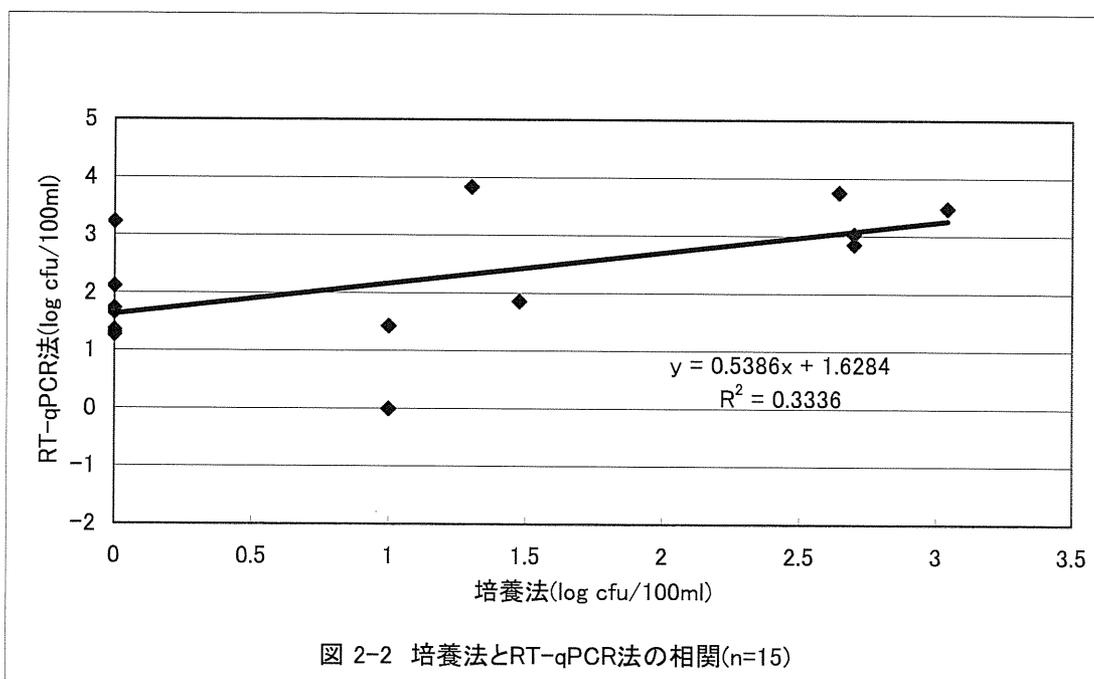


図 2-1 培養法とLC RT-qPCR法の相関(n=10)



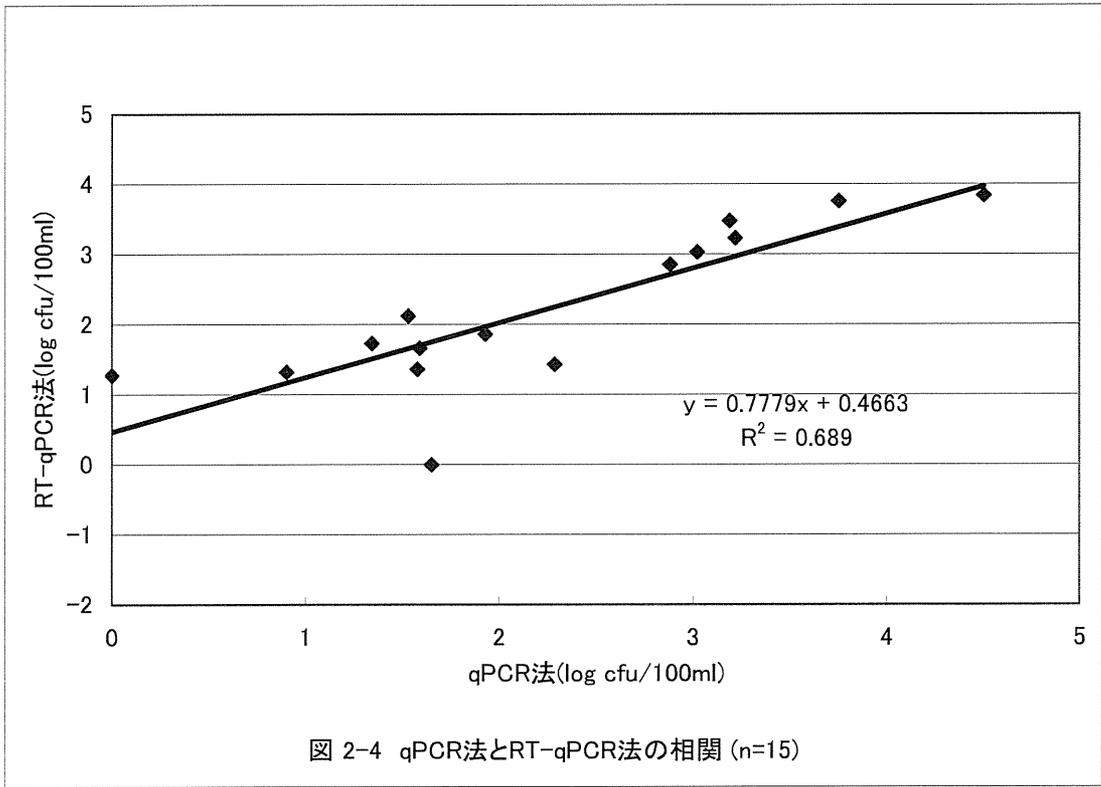
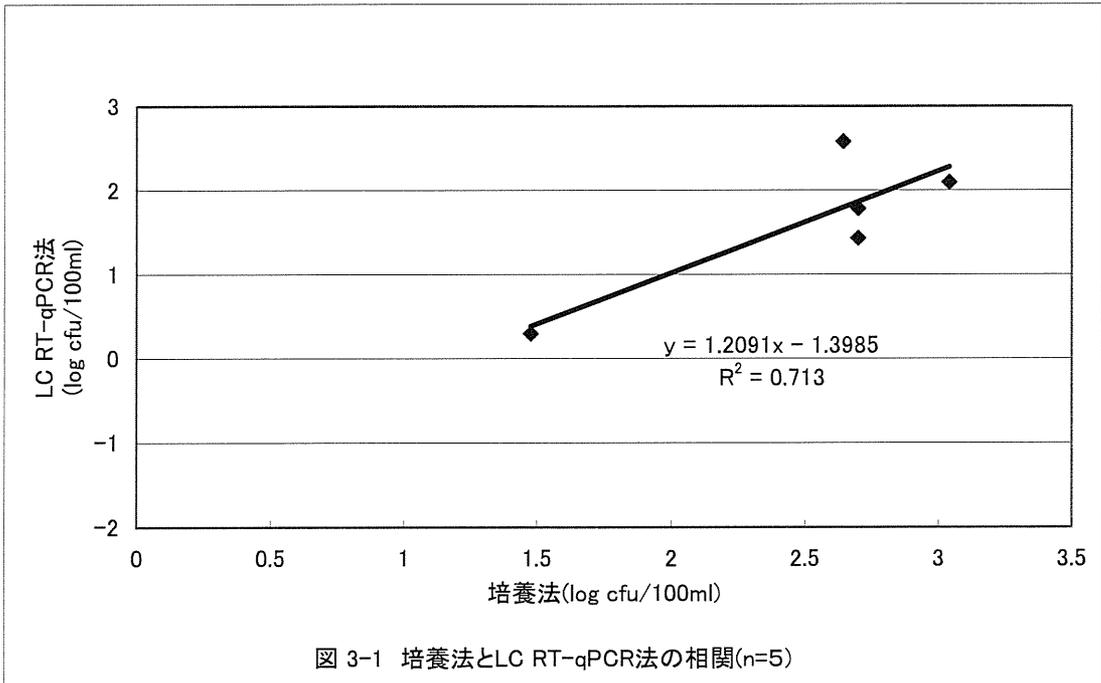
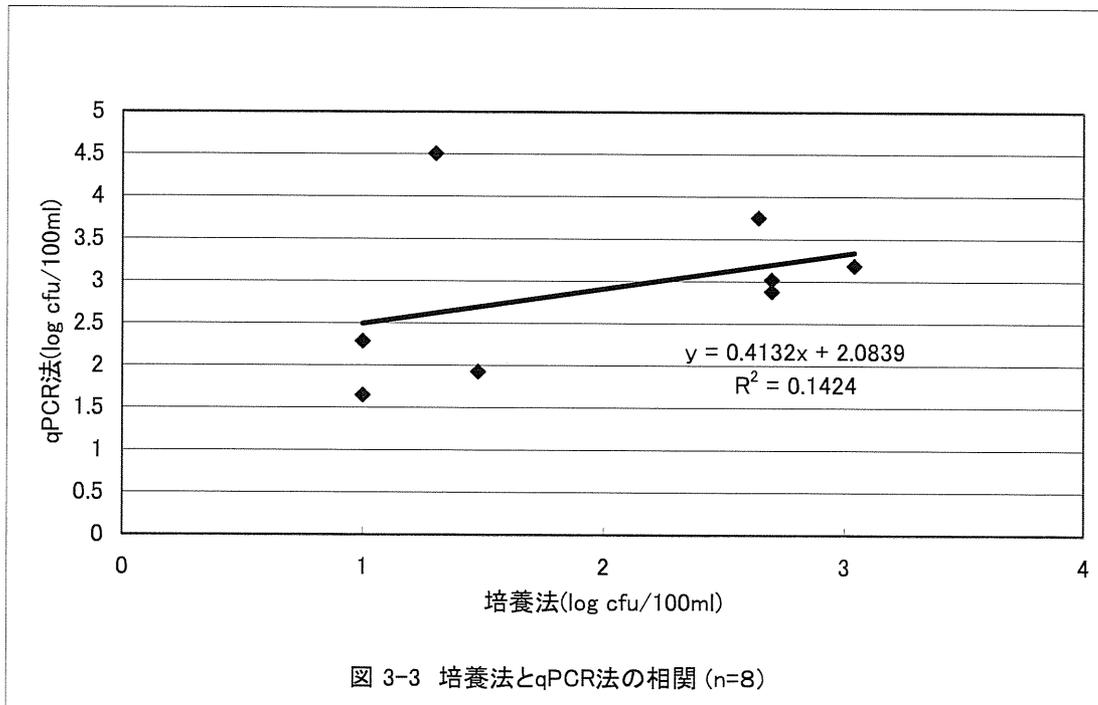
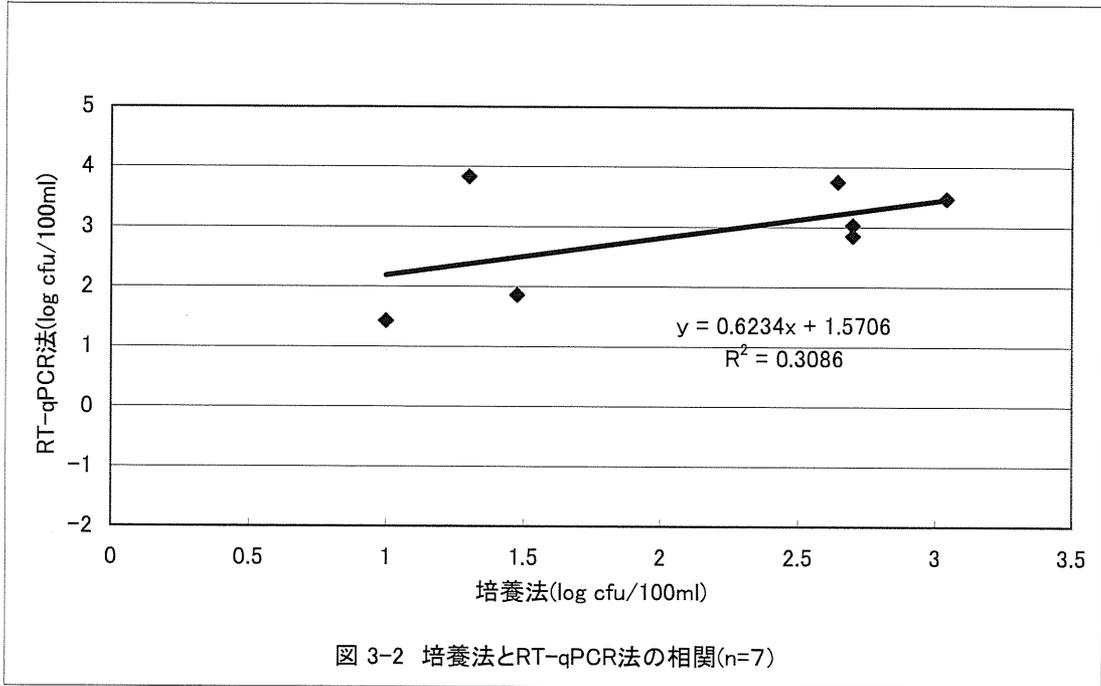
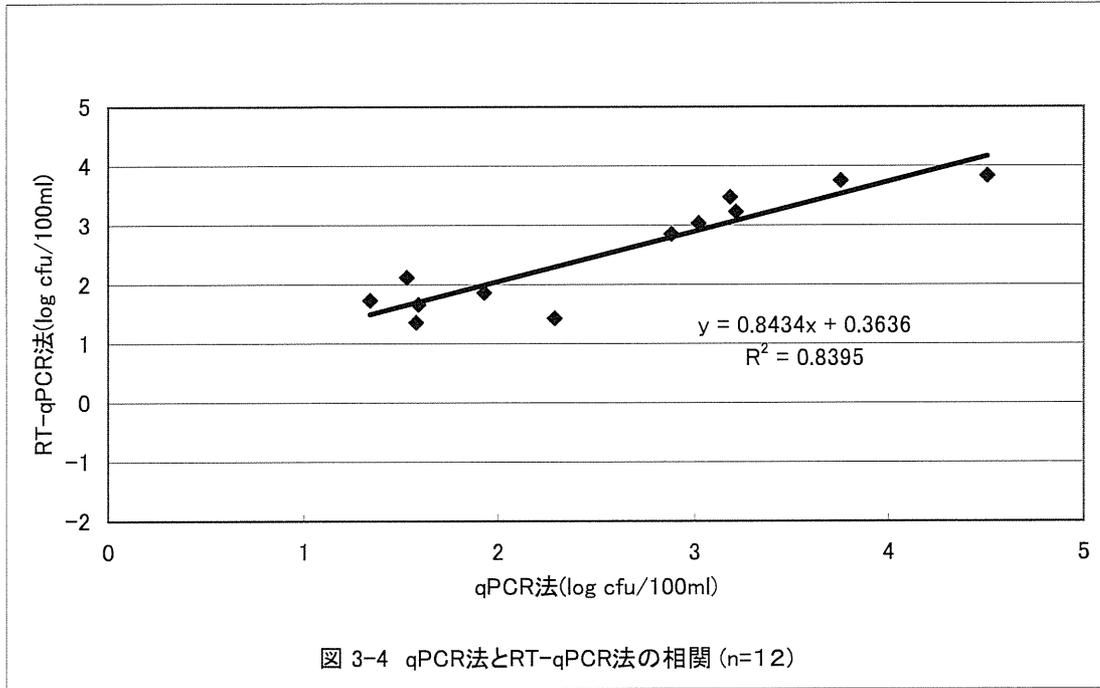


図3 両法とも陽性の検体における検査法相互の定量値の相関







厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）  
分担研究報告書

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

液体培地による前培養を組み合わせた RT-PCR 法（LC RT-PCR 法）を用いた  
レジオネラ生菌を迅速に検出する検査法の検討

分担研究者：横浜市衛生研究所 荒井桂子

研究協力者：横浜市衛生研究所 吉川循江、田中礼子、坂井清、北爪稔、前沢仁、高津和弘

（研究要旨）

リアルタイム PCR 法を用いて浴槽水中のレジオネラの生菌を検出する検査法として、液体培地による前培養を組み合わせた RT-PCR 法（LC RT-PCR 法）を検討した。

標準菌液による検量線を作製したところ、良好な直線性を示し（ $R^2=1$ ）、再現性にも問題がなかった。

そこで、浴場施設から採取した浴場水 10 試料に対して LC RT-PCR 法と培養法を行い、比較を行った。その結果、培養法と LC RT-PCR 法の 2 法の相関を求めると、 $R^2=0.6877$  であった。しかし、培養法で検出されながら LC RT-PCR 法で不検出であった 2 試料を除くと、その相関は非常に高い値（ $R^2=0.9730$ ）が得られた。

LC RT-PCR 法で不検出となった 2 試料の性状を調査し、反応を阻害する要因を取り除ければ、培養法に代わる生菌数が迅速に判明する非常に有用な検査手法と考えられた。

A. 研究目的

従来の培養法によるレジオネラの検出は、結果が判明するまでに約 10 日を要する。一方、浴槽水等の環境試料中から前処理も含めて 1～2 日でレジオネラが検出できる遺伝子検査法（DNA をターゲットとするリアルタイム PCR 法、以下 PCR 法）は、施設の維持管理の確認や水質をリアルタイムに把握するうえで有用な測定方法である。しかし、PCR 法は死菌や培養不可能菌の DNA まで捕捉するため、生菌のみを把握することが困難である。そのため、PCR 法は培養法と相関がなく、PCR 法の迅速性が十分に現場で活用されない。そこで、生菌に多く存在する RNA をターゲットとした RT-PCR 法（RT-PCR 法）が考えられたが、殺菌後も RNA が破壊されずに存在し、

生菌のみを検出することができないことが判明した。そこで、液体培地による前培養を組み合わせた RT-PCR 法（LC RT-PCR 法）を用いてレジオネラの生菌を迅速に検出する検査法の検討を行った。

B. 研究方法および材料

1 レジオネラ検査

レジオネラ検査は平板培養法、DNA をターゲットにした PCR 法（PCR 法）、RT-PCR 法、LC RT-PCR 法の 4 法を行い、比較検討を行った。

(1) 試料の濃縮

1 次濃縮：試料 600ml を 6ml にろ過濃縮し（ミリポア社製 ISOPORE ポリカーボネートフィルター 0.22  $\mu\text{m}$ 、直径 47mm）、100 倍濃縮試料を作製した。

2次濃縮：1次濃縮試料を1ml分取し、15,000rpm、5分遠心し上清900 $\mu$ lを除去し、1000倍濃縮試料を作製した。

#### (2) 雑菌処理

平板培養法：1次濃縮試料1.0mlに0.2M HCl-KCl溶液(pH 2.2)1.0mlを添加し、1分間ボルテックス後室温で4分静置。

LC RT-PCR法：2次濃縮試料100 $\mu$ Lに0.2M HCl-KCl溶液(pH 2.2)100 $\mu$ lを添加し、1分間ボルテックス後室温で4分静置。その後MWY液体培地900 $\mu$ Lを加え、ボルテックス後100 $\mu$ lを分取した(Ct(0h)用)。残りを36 $^{\circ}$ C 18時間静置培養し、氷冷後に100 $\mu$ lを分取した(Ct(18h)用)。

#### (3) 平板培養法

(1)の1次濃縮試料を(2)の手法で雑菌処理し、0.1mlをMWY平板(OXOID)2枚、GVPC平板(極東)2枚に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで5~7日間培養した。検出限界値は10cfu/100ml。

#### (4) PCR法

##### (ア) DNA抽出

DNA抽出は本研究班の方法に従った。

2次濃縮試料100 $\mu$ LにTE-Buffer60 $\mu$ L、1M NaCl 20 $\mu$ L、10% Triton X-100 10 $\mu$ L及び20mg/ml ProteinaseK 10 $\mu$ Lを加え、60 $^{\circ}$ C、60分加温した。その後、75 $^{\circ}$ C、5分加熱し、4 $^{\circ}$ C、15000rpm、3分遠心を行った。上清を回収してBuffer-AL 200 $\mu$ L及びエタノール 200 $\mu$ Lを添加混合後、全量をMonoFas レジオネラ用カートリッジに添加してDNAの精製を行った。Buffer-AW1 300 $\mu$ L及びBuffer-AW2 300 $\mu$ Lでカートリッジの洗浄を行い、Buffer-AE 50 $\mu$ Lで溶出を行った。

##### (イ) PCR測定

CycleavePCR<sup>®</sup> Legionella Detection Kit(TAKARA CY210)を用い、Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System (TAKARABAI0)で測定を行った。検出限界値は10cfu/100ml。

#### (5) RT-PCR法

#### (ア) RNA抽出

RNA抽出は本研究班の方法に従った。

2次濃縮試料100 $\mu$ LにRNA抽出液400 $\mu$ Lを添加し、激しく攪拌した。その後、55 $^{\circ}$ C 30分加温し、95 $^{\circ}$ C 10分加熱した後激しく攪拌し、直ちに氷冷した。4 $^{\circ}$ C、15000rpm、5分遠心を行った上清50 $\mu$ Lを、あらかじめマイクロチューブに分注したTE-Buffer200 $\mu$ Lに加えた。

##### (イ) RT-PCR測定

逆転写反応にはPrimeScript RT reagent Kit (TAKARABAI0)を用いた。RT Master Mix 5 $\mu$ LにRNA抽出液5 $\mu$ Lを加えて混和し、42 $^{\circ}$ C 15分、85 $^{\circ}$ C 5秒、4 $^{\circ}$ Cで逆転写反応を行った。そこにTE-Buffer15 $\mu$ Lを加え、そのうち5 $\mu$ Lを用いてPCR測定を行った。PCR測定は(4)の(イ)のとおり。検出限界値は10cfu/100ml。

#### (6) LC RT-PCR法

##### (ア) 前培養に用いる液体培地の作製

Bact Yeast Extract1.0g、活性炭(Norit SA2) 0.2g、蒸留水90mlを121 $^{\circ}$ C、15分オートクレーブにかけて冷却後、BCYE発育サプリメント(OXOID SR100)及びMWY選択サプリメント(OXOID SR118)を添加し、マイクロチューブに1mlずつ分注し、MWY液体培地を作製した。

##### (イ) 前培養

(2)のとおり雑菌処理した検体を(6)(ア)の培地に加え、100 $\mu$ lをチューブに分取した(Ct(0h)用)。残りを37 $^{\circ}$ C、18時間培養し、同様に100 $\mu$ lをチューブに分取した(Ct(18h)用)。

##### (イ) RNA抽出

分取したMWY培養液にRNA抽出Buffer 300 $\mu$ Lを添加し、激しく攪拌した。その後、(5)(ア)のとおり。

##### (イ) LC RT-PCR測定

鳥谷の方法に準じる。検出限界値は20cfu/100ml。

## 2 検量線用標準菌液

*Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株を BCYE  $\alpha$  で 30 度 4 日培養後、生理食塩水に懸濁し、McFarland 1 程度に調整し、10 倍希釈系列を作製した。培養法により各希釈段階の生菌数を測定し、100  $\mu$ L ずつ DNA 及び RNA 抽出に分取した。

## 3 LC RT-PCR 法の検量線

結果を図 1 に示した。LC RT-PCR 法の検量線は、0 時間培養及び 18 時間培養共に 20~10<sup>6</sup>cfu/100ml の範囲で良好な直線性を示した ( $R^2=1$ )。検量線作製は 3 回行い、ほぼ同一の検量線が得られたことから、再現性にも問題がないと考えられた。

## 4 実試料

浴場施設から採取した浴場水 35 試料 (上水白湯 10 試料、地下水白湯 10 試料、温泉 10 試料、レジオネラ検出後清掃・殺菌処理確認 5 試料 (地下水白湯 1 試料、温泉 4 試料)) を用いた。

温泉 10 試料は、PCR 法を行って、反応に障害を受けた経験のある試料とその周囲に点在する同系統の温泉とした。地下水白湯 10 試料はアンモニア性窒素や亜硝酸性窒素が多く含まれる地層帯の試料を選定した。

## C. 結果

結果を表 1 に示した。

35 試料のうち、培養法でレジオネラが検出されたのは、13 試料であった。この 13 試料で PCR 法、RT-PCR 法で不検出に転じた試料はなかったが、LC RT-PCR 法では不検出になった試料が 2 試料あった (試料 No. 28、30)。この 2 試料は温泉で残留塩素が検出されておらず、従属栄養細菌数が 120,000 及び 560,000cfu/ml であった。2 試料とも濃い茶色に着色しており、過マンガン酸カリウム消費

量は 25mg/l を超過しており、濁度は 2.5 度及び 3.1 度であった。試料 No. 28 および 30 の LC RT-PCR 法の増幅曲線が立ち上がってこなかったため、温泉成分などによって PCR 反応が阻害されたか、前培養での増殖が阻害された可能性が考えられた。

PCR 法、RT-PCR 法、LC RT-PCR 法でレジオネラが検出されたのは、それぞれ 17 試料、17 試料、11 試料であった。培養法で不検出であったが、PCR 法、RT-PCR 法でレジオネラが検出されたのは、それぞれ 4 試料、4 試料、LC RT-PCR 法では 0 試料であった。

PCR 法と RT-PCR 法のレジオネラ数を比較すると、ほぼ同等の値であった。この 2 法の相関を求めると、 $R^2=0.9388$  と強い相関が得られた (図 2)。しかも、下記で述べる試料 No. 27~30 を除いたデータでは、 $R^2=0.9997$  と非常に強い相関を示した (図 3)。一方、培養法と PCR 法及び RT-PCR 法の相関は非常に低く、それぞれ  $R^2=0.4639$  (図 4) 及び  $R^2=0.5986$  (図 5) であった。

試料 No. 27~30 の培養法の値は 210、300、390、400cfu/100ml であったが、PCR 法値は培養法の値を下回り、10、50、120、300 cfu/100ml であった。試料 No. 27~30 は温泉水で、フミン質を多量に含み、過マンガン酸カリウム消費量が 25mg/L を超過していた試料であったことから、温泉成分による障害を受けたと考えられた。一方、RT-PCR 法では培養法と同等かそれ以上の値を示しており、PCR 法に比較して障害を受けづらいと推察された。

培養法と LC RT-PCR 法の 2 法の相関を求めると、 $R^2=0.6877$  であった。しかし、培養法で検出されながら LC RT-PCR 法で不検出であった 2 試料を除くと、 $R^2=0.9730$  とその相関は非常に高い値になった。

## D. 考察

LC RT-PCR 法は培養法で検出されながら、LC RT-PCR 法で不検出となった 2 試料を除く

と、培養法と非常に高い相関を示した。LC RT-PCR 法 で不検出となった 2 試料の性状を調査し、反応を阻害する要因を取り除ければ、非常に有用な検査手法と考えられた。LC RT-PCR 法が培養法の代替として使用が可能となれば、最短で翌日に結果が判明することになり、リアルタイムに衛生状態の把握が可能となる。しかし、反応を阻害する要因が現時点では特定できないため、多様な試料で、試料数を増やして検討を行う必要がある。

#### E. まとめ

LC RT-PCR 法は培養法の代替手法として有望で、今後、多様な試料で、試料数を増やして検討を行う必要がある。

#### 参考文献

1 「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業、主任研究員 倉文明、平成 19

年度総括・分担研究報告書

2 「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業、主任研究員 倉文明、平成 20 年度総括・分担研究報告書

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、主任研究員 倉文明、平成 21 年度総括・分担研究報告書

4 「第 3 版レジオネラ症防止指針」ビル管理教育センター、2009

#### F. 論文発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

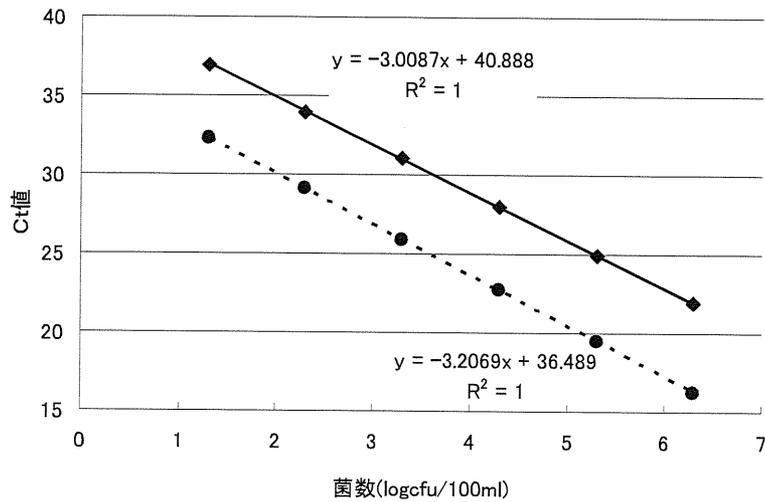


図1 0時間培養および18時間培養のLC RT-PCR法の検量線  
(実線は0時間培養、破線は18時間培養)

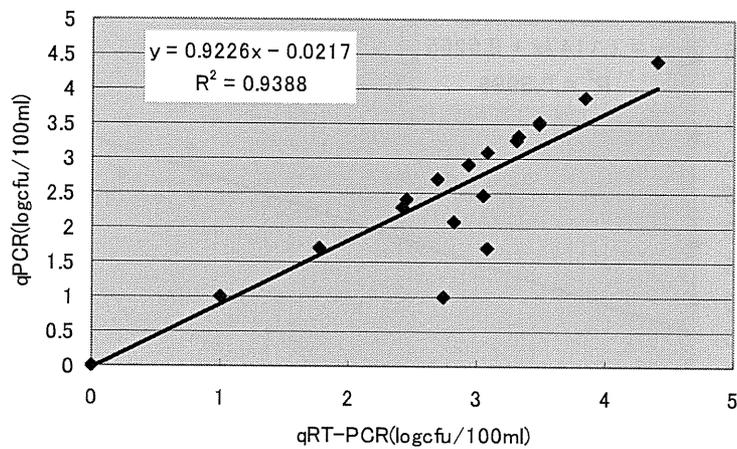


図2 qPCRとqRT-PCRの相関

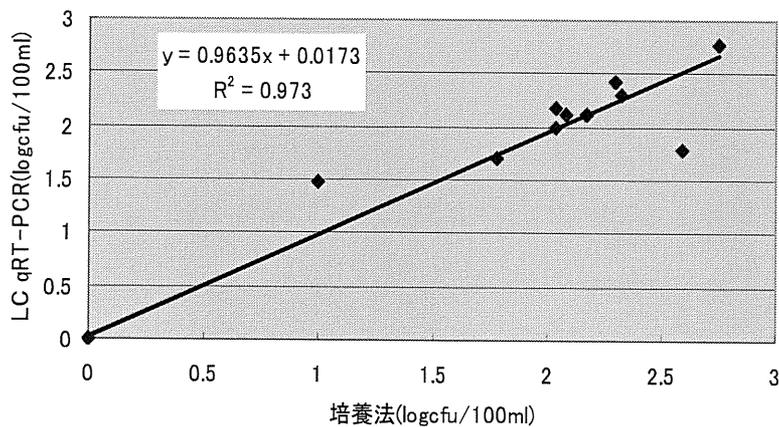


図3 培養法とLC qRT-PCRの相関

図3はレジオネラが培養法検出、LC RT-PCR法不検出であった2試料を除いて作図した

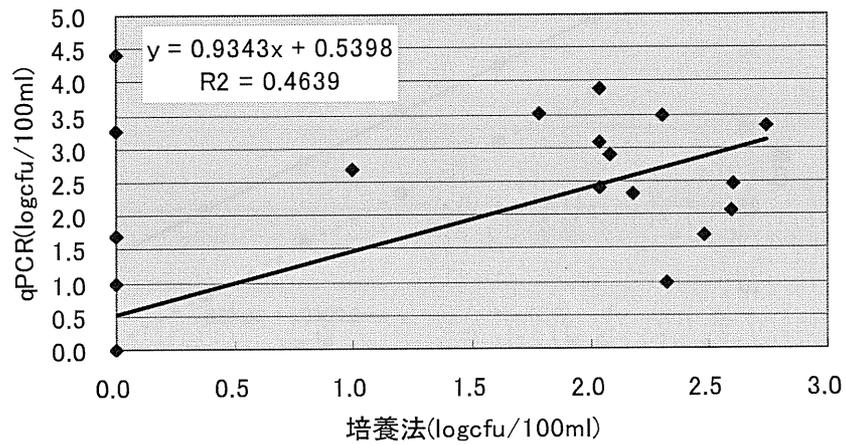


図4 培養法とqPCRの相関

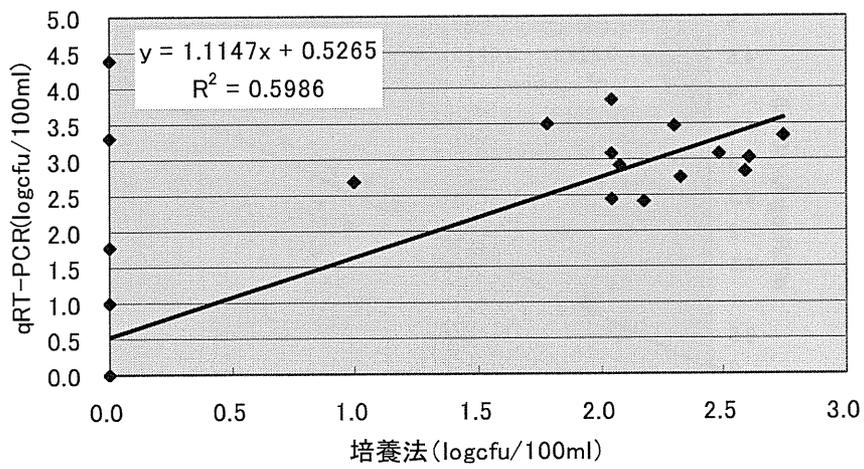


図5 培養法とqRT-PCRの相関

表1 レジオネラ検査結果

試料No	残留塩素 (mg/L)	培養法 (cfu/100mL)	PCR法 (cfu/100mL)	RT-PCR法 (cfu/100mL)	LC RT-PCR法 (cfu/100mL)	過マンガン酸カリウム消費量 (mg/L)	濁度 (度)	一般細菌 (cfu/mL)	従属栄養細菌 (cfu/mL)	備考
1	2	<10	<10	<10	<20	3.5	<0.1	0	0	上水白湯 原水水道水
2	2	<10	26000	25000	<20	2.1	<0.1	0	0	上水白湯 原水水道水
3	1.5	<10	<10	<10	<20	2.8	<0.1	0	0	上水白湯 原水水道水
4	1.5	<10	<10	<10	<20	2.5	<0.1	0	0	上水白湯 原水水道水
5	1	<10	<10	<10	<20	1.9	<0.1	0	0	上水白湯 原水水道水
6	0.8	<10	<10	<10	<20	4.1	<0.1	0	0	上水白湯 原水水道水
7	0.8	<10	<10	<10	<20	2.6	<0.1	0	0	上水白湯 原水水道水
8	0.6	<10	<10	<10	<20	3.1	<0.1	0	0	上水白湯 原水水道水
9	0.2	<10	<10	<10	<20	2.7	<0.1	2	15	上水白湯 原水水道水
10	0.2	<10	10	10	<20	2.2	<0.1	4	9	上水白湯 原水水道水
11	1.0	<10	<10	<10	<20	3.1	<0.1	0	0	地下水白湯 地下水
12	1.0	<10	1900	2000	<20	5.6	<0.1	0	0	地下水白湯 地下水
13	0.8	<10	<10	<10	<20	3.1	<0.1	0	0	地下水白湯 地下水
14	0.6	<10	<10	<10	<20	3.3	<0.1	0	0	地下水白湯 地下水
15	0.6	<10	<10	<10	<20	2.9	<0.1	0	0	地下水白湯 地下水
16	0.4	<10	50	60	<20	3.7	<0.1	19	350	地下水白湯 地下水
17	0.4	110	7600	7000	100	6.8	0.2	35	120	地下水白湯 地下水
18	0.3	110	1200	1200	100	4.9	<0.1	55	190	地下水白湯 地下水
19	0.3	120	800	850	130	5.5	0.1	29	310	地下水白湯 地下水
20	<0.1	150	200	260	130	4.2	<0.1	600	2400	地下水白湯 地下水
21	<10	<10	<10	<10	<20	16	0.2	0	0	温泉 塩化物泉
22	<10	<10	<10	<10	<20	10	0.3	0	0	温泉 塩化物泉
23	0.8	560	2100	2100	590	9.8	0.1	0	0	温泉 塩化物泉
24	0.2	60	3300	3100	50	6.5	0.5	45	160	温泉 炭酸水素塩泉
25	0.1	110	250	280	150	19	0.8	120	980	温泉 塩化物泉
26	0.1	200	3100	3000	260	21	1.2	32	360	温泉 炭酸水素塩泉
27	<0.1	210	10	550	200	<25	1.1	210	900	温泉 塩化物泉
28	<0.1	300	50	1200	<20	<25	2.5	5900	120000	温泉 塩化物泉
29	<0.1	390	120	660	60	<25	0.5	100	23000	温泉 炭酸水素塩泉
30	<0.1	400	300	1100	<20	<25	3.1	1300	560000	温泉 炭酸水素塩泉
31	0.6	<10	<10	<10	<20	2.0	0.1	0	0	地白湯再
32	0.8	<10	<10	<10	<20	<25	0.2	0	0	温泉再 塩化物泉
33	0.8	<10	<10	<10	<20	<25	0.1	0	0	温泉再 塩化物泉
34	0.8	<10	<10	<10	<20	<25	0.1	0	0	温泉再 炭酸水素塩泉
35	0.8	10	500	500	30	<25	0.2	0	60	温泉再 炭酸水素塩泉

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  
LC qRT-PCR (Liquid Culture Quantitative Reverse Transcription  
Polymerase Chain Reaction) による浴槽水中レジオネラ属菌の定量(長崎県の実施例)

研究分担者: ○田栗利紹 長崎県環境保健研究センター

烏谷竜哉 愛媛県立衛生環境研究所

研究協力者: 泉山信司 国立感染症研究所

(研究要旨)長崎県内の入浴施設の浴槽水を用いて、昨年度報告の液体培養定量 RT-PCR 法(LC qRT-PCR)によるレジオネラ属菌検査方法の有効性を検証した。34 浴槽水を対象としてレジオネラ属菌培養法に対する LC qRT-PCR の有効性を評価したところ、91.2%と定性的に高い有効度(感度 85.7%、特異度 92.6%)を示した。さらに、両検査方法は定量的な相関が得られた( $R^2=0.6729$ )。レジオネラ生菌を標的とした定量 PCR 法の実地試料検査における有用性が示された。

#### A. 研究目的

入浴施設のレジオネラ属菌を監視する技術としてレジオネラ遺伝子定量方法は有効であるが、死菌検出により偽陽性が多く認められるために、実用上不利である。レジオネラの液体培地内での増菌能を判別するレジオネラ遺伝子の定量方法(LC-qRT-PCR法)であれば、生菌の検出が可能と期待されている<sup>1)</sup>。今回、同方法を長崎県内入浴施設のレジオネラ汚染調査に適用して培養検査と比較することで、その効果を検証した。

#### B. 研究方法

- 1) 水試料の採水方法: 採水方法は、新版レジオネラ症防止指針に準拠して実施した。即ち、検水 500 mL を 2.5%チオ硫酸ナトリウム 1 mL 入り滅菌済みポリプロピレン採水容器に採取し、冷蔵輸送した。
- 2) レジオネラ属菌培養検査: 国立感染症研究所病原体検査マニュアルに準拠した。即ち、各検水を直径 47 mm、孔径 0.4  $\mu$ m のポリカーボネート製メンブランフィルター(ミリポア、Isopore-HHTP 04700)で吸引ろ

過した後、フィルターを滅菌蒸留水(大塚製薬、20 mL 注射用蒸留水) 5 mL に挿入し、1 分間攪拌した懸濁水を 50°C、20 分間加温処理してから再度 1 分間攪拌した後、その 0.1 mL を、GVPC $\alpha$ 培地(ビオメリューシスメックス)に接種した。35°C で 10 日間培養して、システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。

- 3) 液体培養定量 RT-PCR: 昨年度の報告から希釈倍率を調整し、検出感度を向上させた今年度のプロトコルに準拠して実施した<sup>1)</sup>。即ち、レジオネラ属菌培養検査で得られた試料濃縮液 2 mL を微量高速遠心機にて 4°C で 15,000rpm $\times$ 5 分間処理した後、上清を除去して 100  $\mu$ L の再濃縮試料とした。引き続き、等量の酸処理液(0.2M HCl-KCl buffer, pH2.2) 200  $\mu$ L を、MWY 液体培地(自家調製した BCYE $\alpha$ 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  $\mu$ L に加えて 100  $\mu$ L を新しい 1.5mL 滅菌済みチューブに分取して(増菌前試料 Ct(0h)) -30°C で冷凍保存した。残