

Fig. 2. DPD法とFCM法による塩素要求量曲線の比較
(塩化物泉)

直線はDPD法の閾値 0.1mg/Lを示し、破線はFCM法の閾値 3.48 log bacterial counts per milliliter を示す。矢印は各方法の塩素要求量を示す。

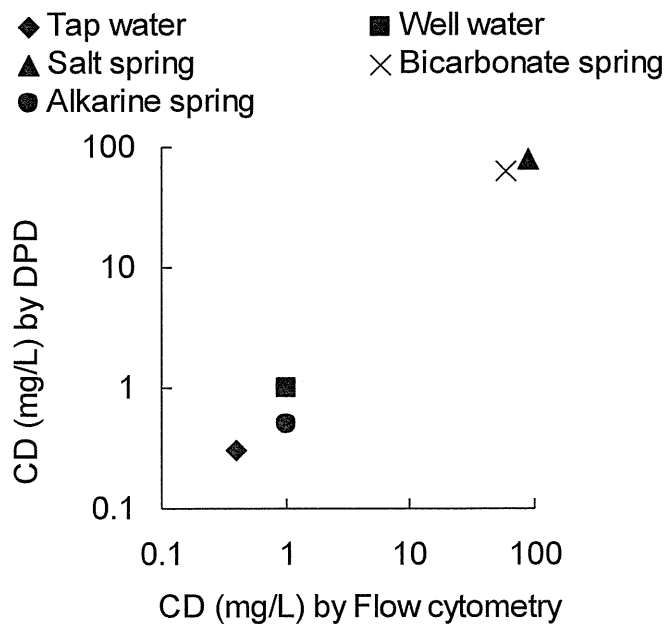
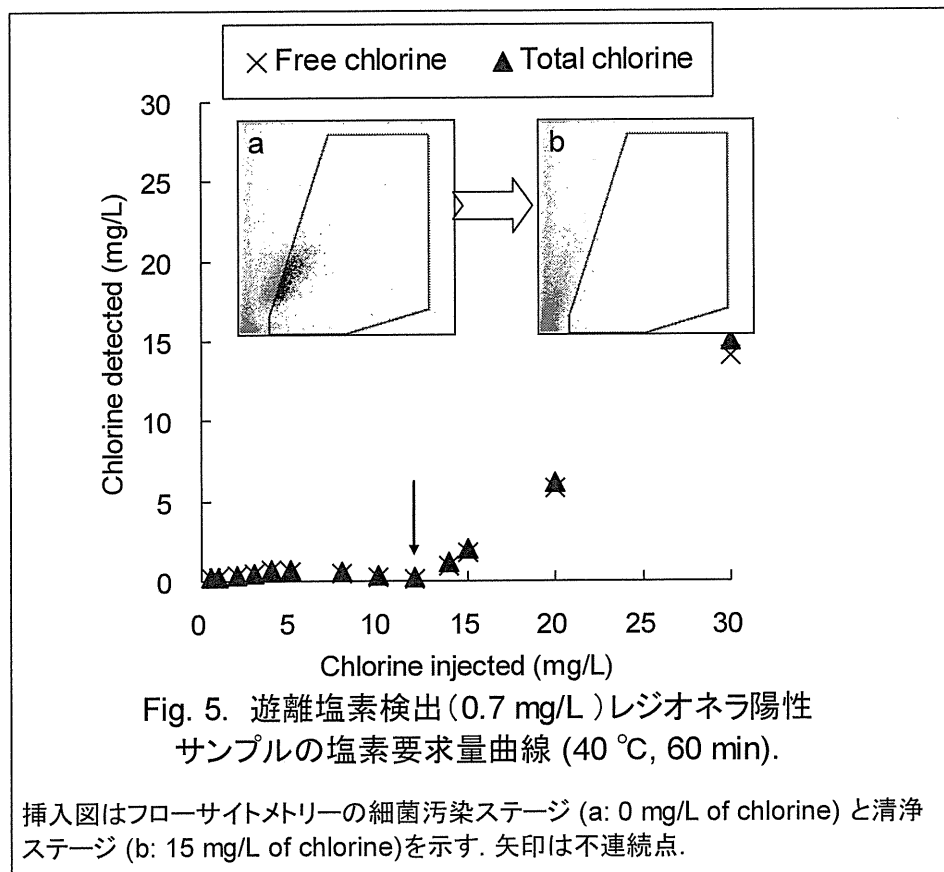
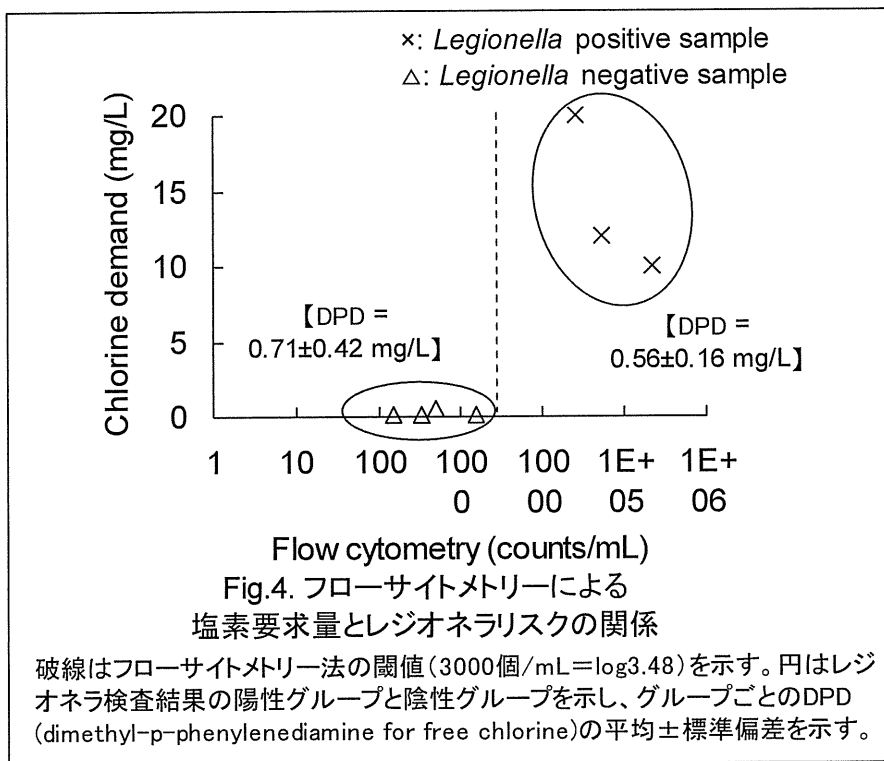


Fig. 3. DPD法とFCM法による各種温泉等の
塩素要求量の相関



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）
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
－ 消毒副生成物の暴露評価 －

研究分担者：神野 透人 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
研究協力者：竹熊 美貴子 埼玉県衛生研究所
研究協力者：高橋 淳子 桐生大学短期大学部 生活科学科
研究協力者：香川(田中) 聡子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部

研究要旨： 塩素消毒を行った水中で検出される消毒副生成物 (DBPs) 62 物質について、量子化学計算に基づく非経験的な手法 (DFT/COSMO-RS 法) を用いて、主要曝露経路を推定する際に参考となる熱力学的パラメーターの予測を行った。その結果、比較的経皮吸収が高いと考えられる DBPs としてハロケトン類やハロニトロメタン類が、揮散性が高く経気道曝露の可能性のある DBPs としてハロニトロメタン類とハロアルデヒド類が同定された。今後、実測値の取得による妥当性の検証等を進め予測精度を向上させることにより、未規制 DBPs の主要な曝露経路や経皮/経気道吸収性について *in silico* による推定が可能になると考えられる。

A. 研究目的

塩素消毒を行った水道水中には、トリハロメタン類やハロ酢酸類など既に基準値・目標値が設定されている消毒副生成物 (DBPs) の他にも、多種多様な未規制の DBPs が存在することが明らかにされつつある。一方、本研究の対象である公衆浴場の浴槽水やプール水では人の皮膚あるいは体液に由来する成分が多く含まれていると考えられることから、含窒素 DBPs の占める割合が高くなることが予想されるものの、その全容が十分に把握されているわけではない。

公衆浴場浴槽水は飲用を意図したものではなく、化学物質曝露の観点では経気道と経皮からの取込が主な曝露経路となる。いずれの経路が主要な寄与をするかについては、DBPs の揮散性 (例えばヘンリー定数) や脂溶性 (例えばオクタノール-水分配係数 (Log P)) といった物理化学的なパラメーター、いわゆる

物性値が決定要因となることが一般に知られている。

そこで、本研究では塩素消毒を行ったプール水で検出例が報告されている未規制物質を含む DBPs (Richardson ら, 2010) の主要曝露経路を予測する目的で、計算化学的な手法による物性値の推定について検討を行った。

B. 実験方法

図 1 に構造式を示したハロケトン類 20 物質、ハロアミド類 9 物質、ハロアセトニトリル類 9 物質、ハロアルデヒド類 11 物質、ハロニトロメタン類 9 物質及びハロキノロン類 4 物質の計 62 種類の DBPs を対象に検討を行った。

まず、これらの DBPs の 3 次元分子構造を ChemBio3D Ultra ver. 12 (CambridgeSoft) を用いて作成した。この 3 次元座標データ (MDL-MOL 形式) を初期構造として、配座探索プログラム CONFLEX ver. 6 により 10

kcal/mol 以内のエネルギー範囲の配座空間を探索し、最安定構造を取得した。

得られた最安定配座について密度汎関数 (DFT) 法による量子化学計算を行った。計算には PQSMol ver. 1.2-20-win 及び PQS *ab initio* ver. 3.3 (Parallel Quantum Solutions) を使用し、汎関数 BVP86、基底関数 tzvp_ahlrachs により構造最適化及び表面電荷を算出した。

COSMO-RS 法による物性値の算出には COSMOtherm ver. C21_0111 (COSMOlogic) を使用した。併せて、定量的構造活性相関 (QSAR) による物性値の推算についても、EPI Suite ver. 4 を利用して検討を行った。

C. 結果と考察

化学物質の物性値推定方法として、EPI Suite など QSAR に基づく手法が従来から汎用されている。ただし、一般に QSAR 法では学習に使用したデータセットと構造が大きく異なる化合物では予測精度が低下することや、異性体や混合物の取扱が困難であることなどが問題点として指摘されている。特に、構造的に多様あるいは新規な未規制 DBPs への適用を考えた場合、これらの問題が顕在化する可能性が考えられる。そこで、本研究では実験値を用いることなく量子化学計算のみで物性値を予測する DFT/COSMO-RS 法の適用可能性について検討を行った。

DFT/COSMO-RS 法及び EPI Suite ver.4 により推算した DBPs の Log P 値及びヘンリー一定数の一覧を表 1 にまとめて示した。

表 2 は LogP 値の大きい DBPs、すなわち脂溶性が高く皮膚を透過しやすいと考えられる DBPs 20 化合物を抜粋したものである。DFT/COSMO-RS 法と EPI Suite ver.4 の両方に含まれる DBPs は 12 化合物であり、前者ではハロケトン類やハロニトロメタン類が 70% を占め、後者では化学構造にかかわらずおしな

べてハロゲン置換数の多い DBPs が選択される傾向が認められた。

一方、ヘンリー一定数について同様の比較を行った結果では (表 3)、高い揮散性が予想される DBPs として両者に共通する化合物はハロニトロメタン類 (Dichloronitromethane、Trichloronitromethane)、ハロアルデヒド類 (Trichloroacetaldehyde、Dichloroacetaldehyde、Bromochloroacetaldehyde) 及びハロケトン類 (1,1,1-Trichloro-2-propanone) の 6 化合物のみであり、DFT/COSMO-RS 法ではハロニトロメタン類とハロアルデヒド類、EPI Suite ver.4 ではハロケトン類とハロアルデヒド類が大きな値を示すことが予測された。DFT/COSMO-RS 法の結果では、ハロニトロメタン類は高い脂溶性と揮散性を兼ね備えていることから、浴槽水中に存在した場合には比較的経皮及び経気道の経路から曝露されやすい DBPs であると言えるであろう。

図 2 と図 3 は、それぞれ LogP 及びヘンリー一定数について DFT/COSMO-RS 法と EPI Suite ver.4 による推定値の相関を示したものである。LogP については非経験的な量子化学計算による結果と定量的構造活性相関による結果とは比較的良い相関関係を示したのに対し、ヘンリー一定数については明瞭な相関は認められなかった。現時点では、本研究で検討を行った大部分の DBPs についてヘンリー一定数の文献値 (実測値) が得られないために両手法による予測値の妥当性を議論することは出来ないが、ヘッドスペース-GC/MS 等による気液分配係数の測定等により検証を行う予定である。一方、LogP 実験値が入手可能な一部の DBPs について予測値との関係を図 4 に示した。いずれの手法でも相関係数はほぼ同等であり、経皮曝露については非経験的な手法により比較的精度良く予測できる可能性が示唆された。

D. 結論

本研究では、塩素消毒を行った水中で検出される未規制物質を含む DBPs 62 物質について、主要曝露経路を推定する際に参考となる熱力学的パラメーターの予測を量子化学計算に基づく非経験的な手法により行った。その結果、比較的経皮吸収が高いと考えられる DBPs としてハロケトン類やハロニトロメタン類が、揮散性が高く経気道曝露の可能性のある DBPs としてハロニトロメタン類とハロアルデヒド類が同定された。今後、実測値の取得による妥当性の検証等を進め予測精度を向上させることにより、未規制 DBPs の主要な曝露経路や経皮/経気道吸収性について *in silico* による推定が可能になると考えられる。

[参考文献]

Richardson SD, DeMarini DM, Kogevinas M, Fernandez P, Marco E, Lourencetti C, Ballesté C, Heederik D, Meliefste K, McKague AB, Marcos R, Font-Ribera L, Grimalt JO, Villanueva CM. (2010) What's in the pool? A comprehensive identification of disinfection by-products and assessment of mutagenicity of chlorinated and brominated swimming pool water. *Environ Health Perspect.* **118**: 1523-1530.

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 竹熊美貴子, 野本かほる, 柴田 穰, 高橋 淳子, 古川容子, 香川 (田中) 聡子, 神野透人, 西村哲治: 公衆浴場における消毒副生成物の実態調査: 含窒素消毒副生成物とアルデヒド類. 第 48 回全国衛生化学技術協議会年会 (2011.11)
- 2) 神野透人, 香川 (田中) 聡子, 西村哲治: コンピューターケミストリーを利用した家

庭用品中の化学物質の物性値予測法に関する研究. 平成 23 年度 室内環境学会学術大会 (2011.12)

- 3) 竹熊美貴子, 吉田栄充, 野本かほる, 柴田 穰, 香川 (田中) 聡子, 神野透人, 西村哲治: 公衆浴場および遊泳用プールにおける消毒副生成物の実態調査. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

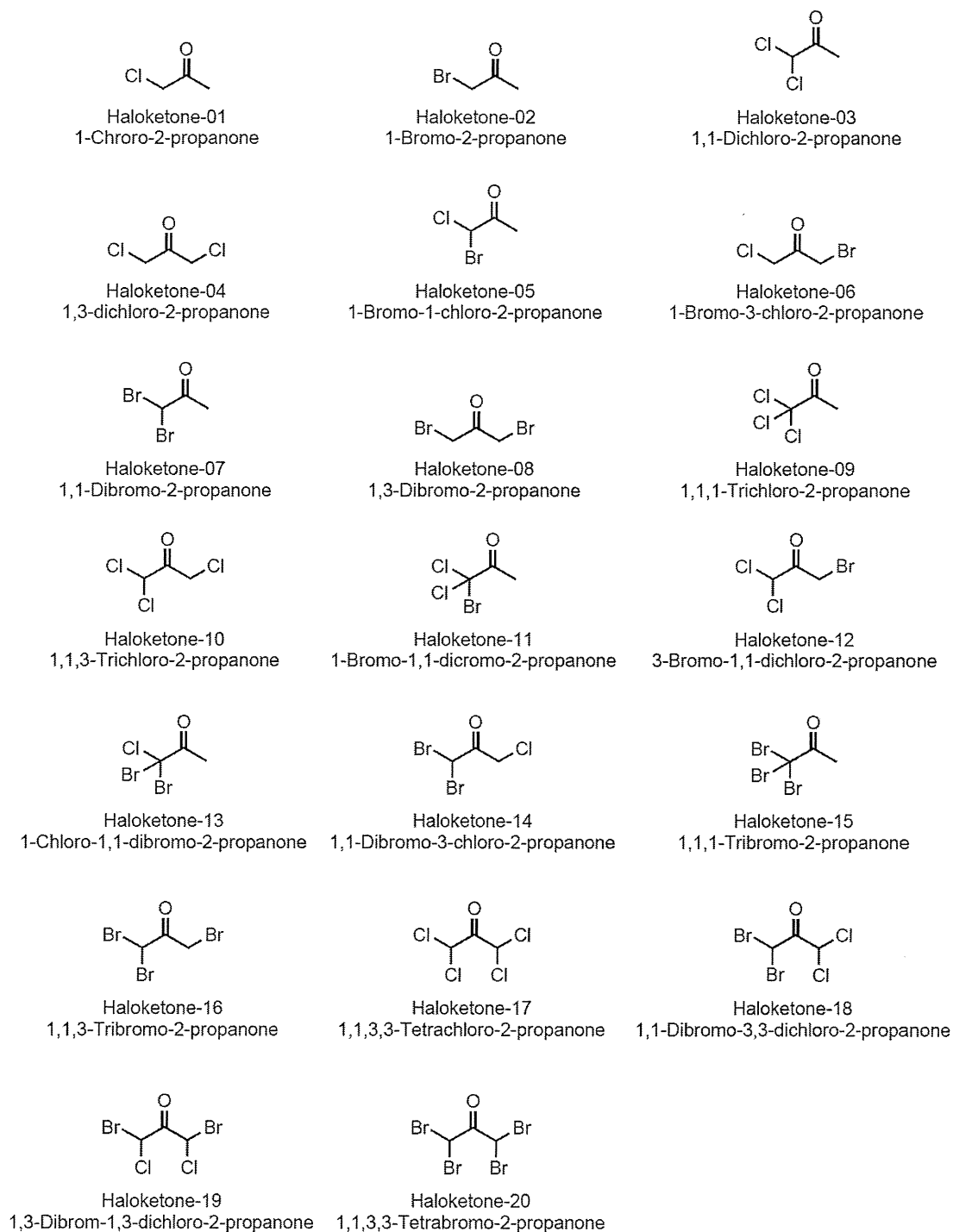


図1 DFT/COSMO-RS 法による物性値の予測を行った DBPs の構造式

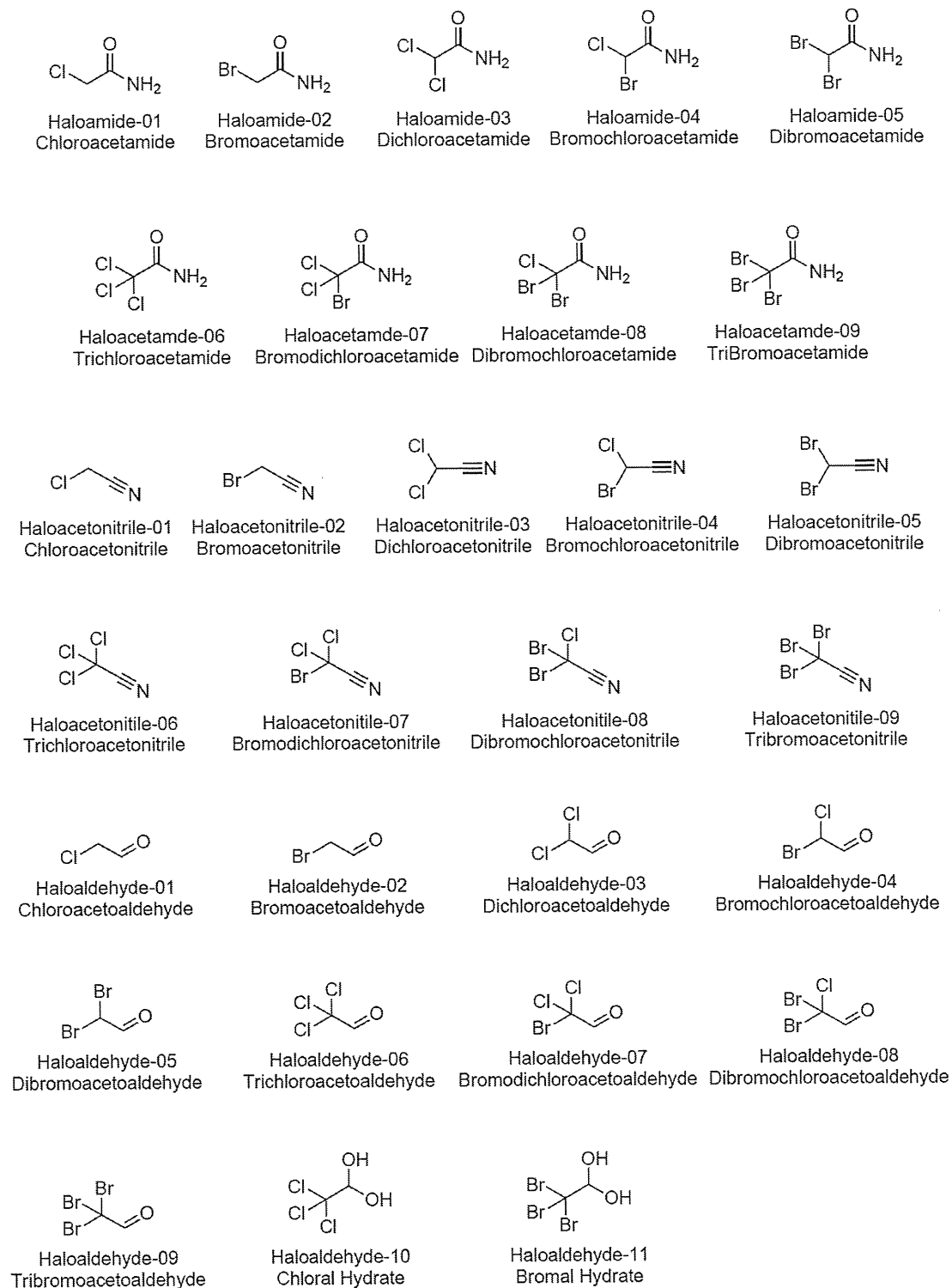


図1 DFT/COSMO-RS法による物性値の予測を行ったDBPsの構造式(続き)

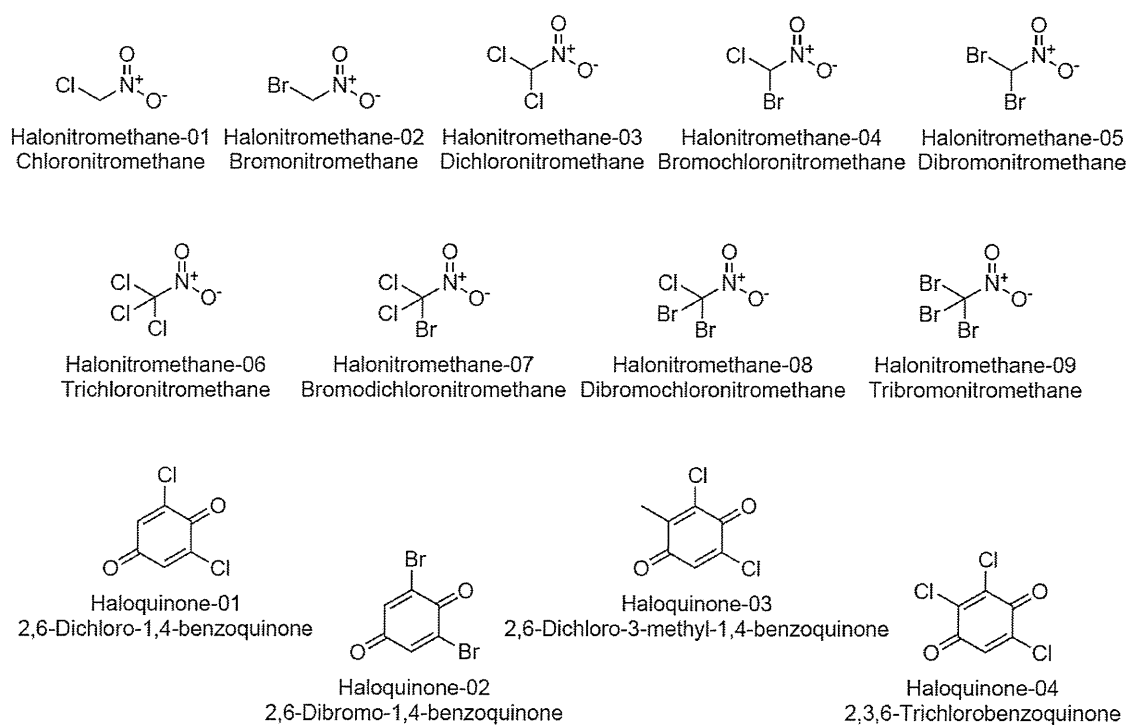


図 1 DFT/COSMO-RS 法による物性値の予測を行った DBPs の構造式 (続き)

表 1 DFT/COSMO-RS 法と EPI Suite で推算した DBPs の物性値

Class	Name	EPI Suite		DFT/COSMO-RS	
		Henry [atm·m ³ /mole]	LogP	Henry [atm·m ³ /mole]	LogP
Halonnitriles	Chloroacetonitrile	1.08E-05	0.11	1.361E-05	0.21
	Bromoacetonitrile	3.52E-06	0.20	1.057E-05	0.40
	Dichloroacetonitrile	3.79E-06	0.29	1.459E-04	1.40
	Bromochloroacetonitrile	1.24E-06	0.38	9.447E-05	1.55
	Dibromoacetonitrile	4.06E-07	0.47	6.430E-05	1.69
	Trichloroacetonitrile	1.34E-06	1.21	9.471E-03	2.35
	Bromodichloroacetonitrile	4.37E-07	1.30	5.078E-03	2.46
	Dibromochloroacetonitrile	1.43E-07	1.39	2.689E-03	2.58
	Tribromoacetonitrile	4.68E-08	1.48	1.416E-03	2.69
Haloaldehydes	Chloroacetaldehyde	2.39E-05	0.09	2.432E-04	0.54
	Bromoacetaldehyde	7.82E-06	0.18	1.713E-04	0.75
	Dichloroacetaldehyde	8.42E-06	0.27	1.501E-03	1.70
	Bromochloroacetaldehyde	2.75E-06	0.36	1.119E-03	1.87
	Dibromoacetaldehyde	9.01E-07	0.45	8.521E-04	2.08
	Trichloroacetaldehyde	2.97E-06	1.19	4.498E-03	2.38
	Bromodichloroacetaldehyde	9.70E-07	1.28	3.270E-03	2.55
	Dibromochloroacetaldehyde	3.17E-07	1.37	2.003E-03	2.68
	Tribromoacetaldehyde	1.04E-07	1.46	1.335E-03	2.82
	Chloral Hydrate	5.71E-09	0.98	7.662E-09	1.55
Haloamides	Bromal Hydrate	2.00E-10	1.25	4.643E-09	2.02
	Chloroacetamide	3.94E-09	-0.58	7.656E-09	-0.98
	Bromoacetamide	1.29E-09	-0.49	9.058E-09	-0.70
	Dichloroacetamide	1.39E-09	-0.09	2.091E-08	0.23
	Bromochloroacetamide	4.54E-10	0.00	9.979E-09	0.17
	Dibromoacetamide	1.49E-10	0.09	1.499E-08	0.64
	Trichloroacetamide	4.89E-10	0.83	2.281E-08	0.68
	Bromodichloroacetamide	1.60E-10	0.92	2.010E-08	0.88
	Dibromochloroacetamide	5.23E-11	1.01	8.598E-09	0.92
Tribromoacetamide	1.71E-11	1.10	2.200E-08	1.44	
Haloketones	1-Chloro-2-propanone	1.75E-05	0.02	7.483E-05	0.61
	1-Bromo-2-propanone	5.71E-06	0.11	7.237E-05	0.94
	1,1-Dichloro-2-propanone	6.15E-06	0.20	6.839E-04	1.86
	1,3-Dichloro-2-propanone	6.15E-06	0.27	1.438E-04	1.50
	1-Bromo-1-chloro-2-propanone	2.01E-06	0.29	4.472E-04	1.99
	1-Bromo-3-chloro-2-propanone	2.01E-06	0.36	9.952E-05	1.59
	1,1-Dibromo-2-propanone	6.58E-07	0.38	3.940E-04	2.21
	1,3-Dibromo-2-propanone	6.58E-07	0.45	7.917E-05	1.95
	1,1,1-Trichloro-2-propanone	2.17E-06	1.12	1.409E-03	2.48
	1,1,3-Trichloro-2-propanone	2.17E-06	0.45	6.127E-05	2.18
	1-Bromo-1,1-dichloro-2-propanone	7.09E-07	1.21	9.084E-04	2.65
	3-Bromo-1,1-dichloro-2-propanone	7.09E-07	0.54	4.301E-05	2.43
	1-Chloro-1,1-dibromo-2-propanone	2.32E-07	1.30	6.071E-04	2.76
	1,1-Dibromo-3-chloro-2-propanone	2.32E-07	0.63	4.499E-05	2.56
	1,1,1-Tribromo-2-propanone	7.59E-08	1.39	4.274E-04	2.92
	1,1,3-Tribromo-2-propanone	7.59E-08	0.72	2.454E-05	2.70
	1,1,3,3-Tetrachloro-2-propanone	7.63E-07	0.63	2.720E-04	3.08
	1,1-Dibromo-3,3-dichloro-2-propanone	8.17E-08	0.81	1.565E-04	3.37
	1,3-Dibromo-1,3-dichloro-2-propanone	8.17E-08	0.81	1.324E-04	3.33
	1,1,3,3-Tetrabromo-2-propanone	8.74E-09	0.99	8.246E-05	3.67
Halonnitromethanes	Chloronitromethane	1.48E-05	0.22	1.815E-04	1.18
	Bromonitromethane	4.85E-06	0.31	1.305E-04	1.38
	Dichloronitromethane	5.23E-06	0.40	2.450E-03	2.26
	Bromochloronitromethane	1.71E-06	0.49	1.319E-03	2.36
	Dibromonitromethane	5.59E-07	0.58	1.281E-03	2.60
	Trichloronitromethane	1.84E-06	1.32	4.847E-02	3.03
	Bromodichloronitromethane	6.02E-07	1.41	2.620E-02	3.12
	Dibromochloronitromethane	1.97E-07	1.50	1.719E-02	3.29
	Tribromonitromethane	6.45E-08	1.59	1.038E-02	3.41
Haloquinones	2,6-Dichloro-1,4-benzoquinone	6.31E-10	1.23	5.694E-06	1.98
	2,6-Dibromo-1,4-benzoquinone	4.84E-11	1.03	3.399E-06	2.37
	2,6-Dichloro-3-methyl-1,4-benzoquinone	9.89E-10	1.78	1.114E-05	2.49
	2,3,6-Trichlorobenzoquinone	4.54E-10	1.72	1.054E-05	2.62

表 2 比較的脂溶性の高い (LogP 値の大きい) DBPs

LogP: EPI Suite		LogP: COSMOtherm	
Haloquinone-03	2,6-Dichloro-3-methyl-1,4-benzoquinone	Haloketone-20	1,1,3,3-Tetrabromo-2-propanone
Haloquinone-04	2,3,6-Trichlorobenzoquinone	Halonitromethane-09	Tribromonitromethane
Halonitromethane-09	Tribromonitromethane	Haloketone-18	1,1-Dibromo-3,3-dichloro-2-propanone
Halonitromethane-08	Dibromochloronitromethane	Haloketone-19	1,3-Dibromo-1,3-dichloro-2-propanone
Haloacetonitrile-09	Tribromoacetonitrile	Halonitromethane-08	Dibromochloronitromethane
Haloacetaldehyde-09	Tribromoacetaldehyde	Halonitromethane-07	Bromodichloronitromethane
Halonitromethane-07	Bromodichloronitromethane	Haloketone-17	1,1,3,3-Tetrachloro-2-propanone
Haloacetonitrile-08	Dibromochloroacetonitrile	Halonitromethane-06	Trichloronitromethane
Haloketone-15	1,1,1-Tribromo-2-propanone	Haloketone-15	1,1,1-Tribromo-2-propanone
Haloacetaldehyde-08	Dibromochloroacetaldehyde	Haloacetaldehyde-09	Tribromoacetaldehyde
Halonitromethane-06	Trichloronitromethane	Haloketone-13	1-Chloro-1,1-dibromo-2-propanone
Haloacetonitrile-07	Bromodichloroacetonitrile	Haloketone-16	1,1,3-Tribromo-2-propanone
Haloketone-13	1-Chloro-1,1-dibromo-2-propanone	Haloacetonitrile-09	Tribromoacetonitrile
Haloacetaldehyde-07	Bromodichloroacetaldehyde	Haloacetaldehyde-08	Dibromochloroacetaldehyde
Haloacetaldehyde-11	Bromal Hydrate	Haloketone-11	1-Bromo-1,1-dichloro-2-propanone
Haloquinone-01	2,6-Dichloro-1,4-benzoquinone	Haloquinone-04	2,3,6-Trichlorobenzoquinone
Haloacetonitrile-06	Trichloroacetonitrile	Halonitromethane-05	Dibromonitromethane
Haloketone-11	1-Bromo-1,1-dichloro-2-propanone	Haloacetonitrile-08	Dibromochloroacetonitrile
Haloacetaldehyde-06	Trichloroacetaldehyde	Haloketone-14	1,1-Dibromo-3-chloro-2-propanone
Haloketone-09	1,1,1-Trichloro-2-propanone	Haloacetaldehyde-07	Bromodichloroacetaldehyde

表 3 比較的揮散性の高い (Henry 定数の大きい) DBPs

Henry's Law Constants: EPI Suite		Henry's Law Constants: COSMOtherm	
Haloacetoaldehyde-01	Chloroacetaldehyde	Halonitromethane-06	Trichloronitromethane
Haloketone-01	1-Chloro-2-propanone	Halonitromethane-07	Bromodichloronitromethane
Halonitromethane-01	Chloronitromethane	Halonitromethane-08	Dibromochloronitromethane
Haloacetonitrile-01	Chloroacetonitrile	Halonitromethane-09	Tribromonitromethane
Haloacetoaldehyde-03	Dichloroacetaldehyde	Haloacetonitrile-06	Trichloroacetonitrile
Haloacetoaldehyde-02	Bromoacetaldehyde	Haloacetonitrile-07	Bromodichloroacetonitrile
Haloketone-03	1,1-Dichloro-2-propanone	Haloacetaldehyde-06	Trichloroacetaldehyde
Haloketone-04	1,3-Dichloro-2-propanone	Haloacetaldehyde-07	Bromodichloroacetaldehyde
Haloketone-02	1-Bromo-2-propanone	Haloacetonitrile-08	Dibromochloroacetonitrile
Halonitromethane-03	Dichloronitromethane	Halonitromethane-03	Dichloronitromethane
Halonitromethane-02	Bromonitromethane	Haloacetaldehyde-08	Dibromochloroacetaldehyde
Haloacetonitrile-03	Dichloroacetonitrile	Haloacetoaldehyde-03	Dichloroacetaldehyde
Haloacetonitrile-02	Bromoacetonitrile	Haloacetonitrile-09	Tribromoacetonitrile
Haloacetaldehyde-06	Trichloroacetaldehyde	Haloketone-09	1,1,1-Trichloro-2-propanone
Haloacetaldehyde-04	Bromochloroacetaldehyde	Haloacetaldehyde-09	Tribromoacetaldehyde
Haloketone-09	1,1,1-Trichloro-2-propanone	Halonitromethane-04	Bromochloronitromethane
Haloketone-10	1,1,3-Trichloro-2-propanone	Halonitromethane-05	Dibromonitromethane
Haloketone-05	1-Bromo-1-chloro-2-propanone	Haloacetaldehyde-04	Bromochloroacetaldehyde
Haloketone-06	1-Bromo-3-chloro-2-propanone	Haloketone-11	1-Bromo-1,1-dichloro-2-propanone
Halonitromethane-06	Trichloronitromethane	Haloacetaldehyde-05	Dibromoacetaldehyde

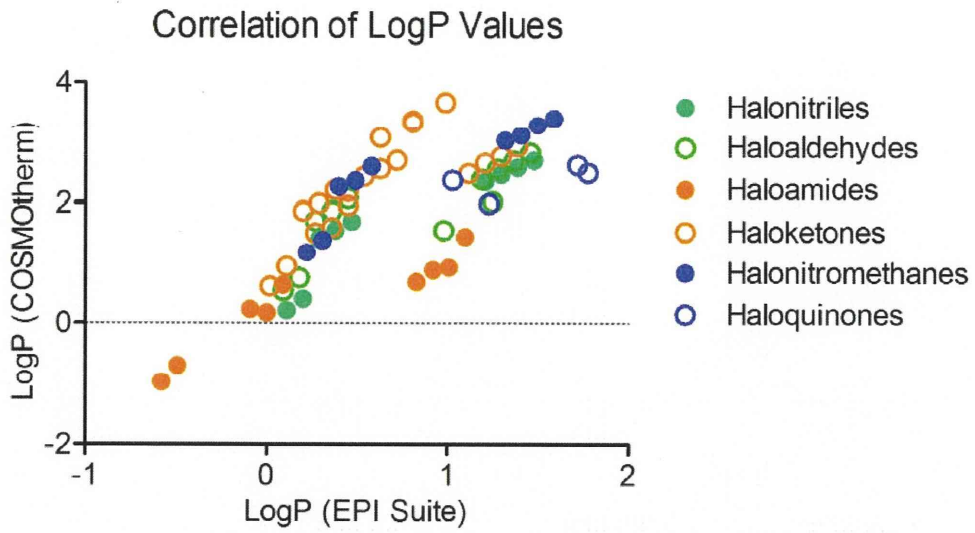


図2 DFT/COSMO-RS 法と EPI Suite で推算した LogP 値の相関

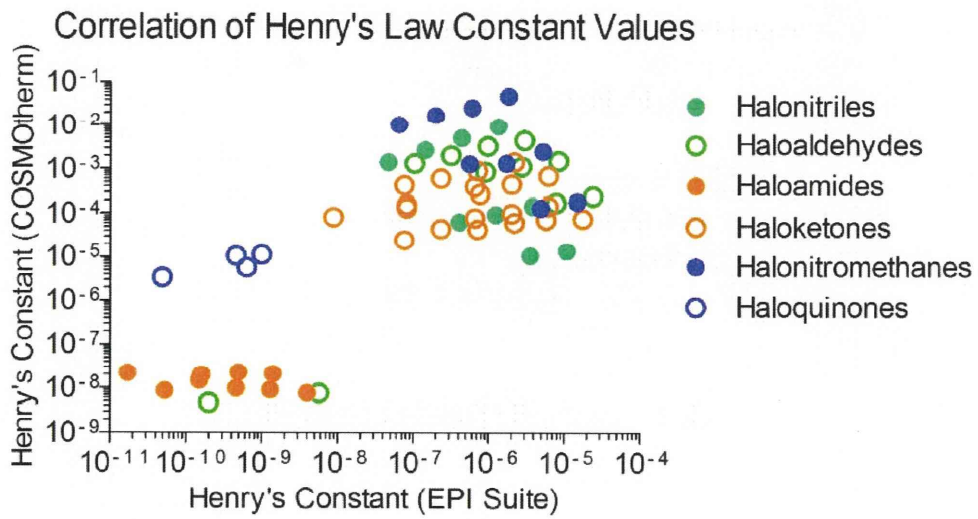
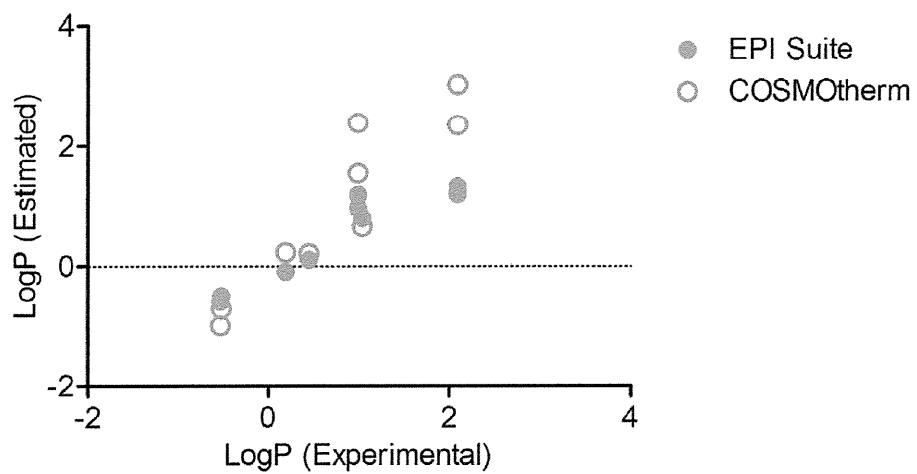


図3 DFT/COSMO-RS 法と EPI Suite で推算したヘンリー定数の相関

Correlation of LogP with the Experimental Values



[EPI Suite]
 $r = 0.938$, Slope = 0.74
[COSMOtherm]
 $r = 0.932$, Slope = 1.38

図4 LogP 実験値と推定値の相関

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改良

研究分担者	○烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	荒井 桂子	横浜市衛生研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	田栗 利紹	長崎県保健環境研究センター
	八木田 健司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	矢崎 知子	宮城県保健環境センター
	金谷 潤一	富山県衛生研究所

研究要旨

入浴施設の浴槽水等を対象としたレジオネラ属菌の生菌迅速検査法を開発するため、液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（以下、LC 法）の改良を行った。従来の 2 step RT-qPCR よりも迅速、簡便、安価でかつ定量性に優れた 1 step RT-qPCR を作成した。検量線の作成及びコピー数の算出を簡素化するため、レジオネラ 5S rRNA と同じ配列の transcript RNA を合成し、コピー数が明らかなコントロール RNA を作成した。また、レジオネラ属菌 1 CFU 当たりの 5S rRNA コピー数は 8,000 コピーであり、18 時間培養後に 400,000 コピーに増加することを明らかにし、検水中の rRNA コピー数から CFU に換算することを可能とした。改良 LC 法を実試料で評価した結果、通常の平板培養法と比較して感度 60.2%、特異度 89.7%（n=199）であったが、ATP を指標として微生物汚染の進んだ検体の前処理を追加・変更することで、感度 77.3%、特異度 89.1%（n=108）まで改善できる可能性を示した。平板培養法と LC 法の定量値は高い相関を示し（ $R^2=0.76$ ）、LC 法により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。

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、通常の遺伝子検査法は、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、遺伝子検査が陽性であっ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、施設管理の指標としての意義は認められるが、平板培養法の結果を迅速に予測できる生菌迅速検査法への期待は高い。現在、EMA 等の前処理試薬を用いて生菌由来の DNA のみを増幅する EMA-qPCR 法等が開発され¹⁻³⁾、市販キットを用いた評価が始まっているところである。

我々は、5S rRNA 遺伝子を標的とした市販のリアルタイム PCR キットに RT 反応を組み合わせることで、従来の DNA 検査法に比べて高感度な 2 step RT-qPCR を検討し、簡便な抽出操作で高感度検出が可能となることを示した⁴⁾。さらに、濃縮検体を酸処理後、MWY 液体培地に加えて 1 夜培養し、培養後の rRNA 増加量を定量することにより、浴槽水等の生菌数の測定が可能な液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC RT-qPCR) を開発した^{5,6)}。

今年度は、簡便な 1 step RT-qPCR 法に検出系を改良するとともに、コピー数既知の 5S rRNA を合成し、定量検査に必須となる検量線作成の簡素化と安定化を図った。さらに、レジオネラ 1 CFU 当たりの 5S rRNA コピー数と、18 時間培養後の増加量を決定し、実サンプルを用いて定量値の妥当性等を評価したのでその概要を報告する。

B 研究方法及び検査材料

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 版に準じて実施した。即ち、検水 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、武藤化学) 500 μ l を加えて室温で 5~20 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、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

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

・ 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、Oxoid) 及び MWY 選択サプリメント (SR118、Oxoid) 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 15,000rpm 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、武藤化学) 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)。なお、微生物汚染の激しい逆洗水については、酸処理時間を 20 分に延長したものを同時に培養した。

・ 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、15,000rpm 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、RNA 抽出液とした。Chelex 処理を行う場合は、TE 緩衝液 200 μ l の代わりに 5% Chelex 200 μ l を添加、混合し、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱後、10,000rpm で 5 分間遠心し、上清を RNA 抽出液とした。

・ 1 step RT-PCR (RT-qPCR)

Diederer ら⁷⁾の 5S rRNA を標的とした qPCR を改良し、1 step RT-qPCR の反応系を作成した。すなわち、プライマーは 5S1 (ACTATAGCGATTTGGAACCA)、5S2 (GCGATGACCTACTTTTCGCAT)、プローブは Leg5S (FAM-CCGCGCCAATGATAGTGTGAGGC-TAMRA)、反応試薬は One Step Prime Script RT-PCR Kit (TAKARA、RR064) を使用し、RNA 抽出液 2 μ l を加えて全量を 20 μ l とし RT-qPCR 反応を行った。プライマー、プローブの最終濃度はそれぞれ 400nM、250nM とした。測定機器は、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Life Technologies) を使用し、反応条件は 45°C 5 分、95°C 10 秒の後、95°C 5 秒、60°C 30 秒を 45 サイクル行った。

2 5S rRNA コントロールの合成とコピー数の算出

(1) 5S rRNA コントロールの合成

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株の 5S rRNA 領域を PCR で増幅し、T7 RNA Polymerase を用いた *in vitro* transcription 反応により、一本鎖 RNA を合成した。まず、T7 プロモーター配列を付加したセンスプライマー-LEG5S-FT7 (TAATACGACTCACTATAGGGTCTCCTGGCGACTATAGCGATTTGGAACCA) とアンチセンスプライマー-LEG5S-R (ACCCTGGCGATGACCTACTTTTCGCAT) を用い、TAKARA EX Taq HS (TAKARA) により 5S rRNA 全領域を含む二本鎖 DNA を合成した。PCR 反応には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用し、94°C 1 分の後、94°C 10 秒、60°C 10 秒、72°C 30 秒を 30 サイクル行った。増幅産物を QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) により精製し、*in vitro* Transcription T7 kit (TAKARA) をマニュアルに従い使用し、一本鎖 RNA を合成した。Transcript RNA を MEGAclear kit (Ambion) で精製後、Quant-iT RNA Assay Kit (Molecular Probes) によりコピー数を決定した。Transcript RNA は TE バッファーで希釈して 5 \times 10⁶ コピー/ μ l に調整し、-80°C で保存した。

(2) RT-qPCR を用いた検量線の作成

5 \times 10⁶ コピー/ μ l の 5S rRNA 原液 5 μ l に 45 μ l の EasyDilution (TAKARA) を加えてボルテックスし、5.0 \times 10⁵ コピー/ μ l とした。以下、同様に 5.0 コピー/ μ l まで 10 倍希釈を行い、6 点の希釈系列を作成した。RT-qPCR 反応は 2 連で行い、コピー数算出の検量線を作成した。検量線の比較のため、1 ステップ RT-qPCR 試薬として SuperScript III Platinum One Step qRT-PCR Kits (invitrogen) 及び 2 ステップ RT-qPCR 試薬として PrimeScript RT reagent kit (TAKARA) + Cycleave PCR Legionella (5S rRNA) Detection kit (TAKARA) を、リアルタイム PCR 装置として Thermal Cycler Dice Real Time System TP 800 (TAKARA) を使用した。

3 レジオネラ菌体当たりの 5S rRNA コピー数の決定

レジオネラをアメーバに感染させ、アメーバ内で増殖したレジオネラを回収し、その菌を用いてコピー数の決定を行った。

(1) アメーバ培養レジオネラの調整

Acanthamoeba castellanii Neff strain (ATCC 30010) を PYGC 培地で 30°C 4 日間培養後、フラスコに付着したアメーバを 1/50 PBS で洗浄し、PYGC 培地を 1/50 PBS に置き換えた。そこに BCYE α 寒天培地で 30°C 4 日間培養した *Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株を少量接種し、30°C で 4~5 日間培養した。得られたレジオネラ菌液を孔径 5 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、アメーバの残骸等を除去した。そのろ液 (約 10⁸ CFU/ml) を検量線作成用のレジオネラ菌液とし、1/50 PBS で 10 倍希釈系列を作成した。希釈液 100 μ l を BCYE α 寒天培地 (ビオメリュー) 2 枚に塗布し、その平均値から各系列 100 μ l 中の菌数を算出した。

(2) 5S rRNA コピー数の決定

アメーバ培養レジオネラで作成した 10 倍希釈系列の 100 μ l を用い、平板培養で算出した菌数を横軸に、LC RT-qPCR 法で算出した培養前の 5S

rRNA コピー数及び 18 時間培養後のコピー数を縦軸にプロットし、切片からレジオネラ 1 CFU 当たりのコピー数及び 18 時間培養後のコピー数を算出した。

4 検査材料及び検査方法

平成 23 年 6 月～平成 24 年 1 月に、全国 5 地区（愛媛県、横浜市、富山県、長崎県、宮城県）の入浴施設から 199 件（浴槽水 176 件、原水 17 件、ろ過器逆洗水 6 件）の試料を採取し、平板培養法及び LC RT-qPCR 法によりレジオネラ属菌数を算出した。平板培養法はレジオネラ症防止指針第 3 版に従った。LC RT-qPCR 法による「Total Legionella*¹」は、Ct (0h) から算出した検水 100ml 中の 5S rRNA コピー数を 1 CFU 当たりのコピー数 (8,000) で除すことによって生菌数+死菌数の総菌数 (CFU/100ml) に換算し、10 CFU/100ml 以上を陽性とした。LC RT-qPCR 法による「Viable Legionella*²」は、Ct (18h) から算出した検水 100ml 中の 5S rRNA コピー数を 18 時間培養後の 1 CFU 当たりコピー数 (400,000) で除し、同様に Ct (0h) から算出した菌数の差を生菌数 (CFU/100ml) とし、5 CFU/100ml 以上を陽性とした。「生菌下限値*³」は、Ct (0h) から算出した検水 100ml 中の 5S rRNA コピー数を 18 時間培養後の 1 CFU 当たりのコピー数 (400,000) で除すことで、生菌の検出下限値を示した。

一般細菌数は標準寒天培地で 36℃ 2 日間培養後、従属栄養細菌数は R2A 寒天培地で 42℃ 7 日間培養後の菌数を求めた。ATP 量の測定は、携帯用簡易測定器ルミテスター PD-10 及びルシパッ

クワイド (キッコーマン) を使用し、検水 100 倍濃縮液 100µl から検水 10ml 当たりの RLU 値を求めた。

C 結果

1 1 ステップ RT-qPCR の検量線と定量下限値

今回作成した 1 ステップ RT-qPCR の検量線を作成し、1 ステップ RT-qPCR の定量下限値を求めるとともに、従来から検討していた 2 ステップ RT-qPCR の検量線と比較した (図 1)。2 step RT-qPCR キット (TAKARA) では、増幅効率 116%、 $R^2=0.9987$ の検量線に対し、1 step RT-qPCR では、2 社の定量用キット (TAKARA、invitrogen) 及び 2 社のリアルタイム PCR 装置 (TAKARA DICE、Life technologies StepOnePlus) のいずれを用いても、増幅効率 100~108%、 $R^2=0.9990\sim0.9997$ の良好な検量線が作成できることを確認した。また、1 ステップ RT-qPCR においては、1 反応当たり 10 コピーが定量下限と考えられた。

2 レジオネラ菌体当たりの 5S rRNA コピー数の決定

アメーバ培養レジオネラ菌の 10 倍希釈系列を用い、平板培養で算出した菌数を横軸に、LC RT-qPCR 法で算出した培養前の 5S rRNA コピー数及び 18 時間培養後のコピー数を縦軸にプロットした検量線を作成した (図 2)。各検量線の回帰式は次のとおりであった。

○レジオネラ培養前の検量線

$$1 \text{ 回目} : y = 1.0331x + 3.9328 \quad R^2 = 0.9998$$

$$2 \text{ 回目} : y = 1.0478x + 3.9195 \quad R^2 = 0.9998$$

$$*1 \text{ Total Legionella (CFU/100ml)} = \frac{\text{検水 100ml 中の 5S rRNA コピー数}}{8,000 \text{ (1 CFU 当たりの 5S rRNA コピー数)}}$$

$$*2 \text{ Viable Legionella (CFU/100ml)} = 18 \text{ 時間培養後の生菌換算数} - \text{培養前の生菌換算数 (バックグラウンド値)}$$

$$= \frac{18 \text{ 時間培養後の検水 100ml 中の 5S rRNA コピー数}}{400,000 \text{ (18 時間培養後の 1CFU 当たりの 5S rRNA コピー数)}}$$

$$\frac{\text{検水 100ml 中の 5S rRNA コピー数}}{400,000}$$

○18時間培養後の検量線

$$1 \text{ 回目} : y = 0.9779x + 5.7005 \quad R^2 = 0.9992$$

$$2 \text{ 回目} : y = 0.9918x + 5.5911 \quad R^2 = 0.9992$$

これらの検量線の切片から、レジオネラ菌体 (1 CFU) 当たりの 5S rRNA コピー数及び 18 時間培養後のコピー数を次のとおり算出した。

○レジオネラ菌体 (1 CFU) 当たりのコピー数

$$10^{(3.9328+3.9195)/2} = 8,437 \div \underline{8,000 \text{ コピー}}$$

○18時間培養後のコピー数

$$10^{(5.7005+5.5911)/2} = 442,385 \div \underline{400,000 \text{ コピー}}$$

以上のことから、レジオネラの 5S rRNA は、菌体 (1 CFU) 当たり約 8,000 コピーであり、液体培地で 18 時間培養後には約 400,000 コピーに、約 50 倍増加するものと考えられた。

3 浴槽水等における検査結果

(1) ATP 量と微生物汚染指標菌数との相関

検水 199 件のうち、ATP 及び従属栄養細菌数等の微生物汚染指標菌を測定した 106 件について、各指標の相関を検討した (図 3)。ATP 量と従属栄養細菌数との間には高い相関が認められ ($R^2=0.73$)、回帰式から ATP 値 5,000 RLU は概ね従属栄養細菌数 10^5 CFU/ml に相当すると考えられた。一般細菌数においても ATP 量と弱い相関が認められたが ($R^2=0.51$)、従属栄養細菌数よりも劣るものであった。ATP 量は、検水の微生物汚染の指標となることが確認された。

(2) レジオネラ属菌検査における平板培養法と LC 法との比較

検水 199 件について、平板培養法と LC 法の定量値を比較した (図 4、表 1)。平板培養法では 41.7% (83/199) がレジオネラ陽性 (10 CFU/100ml 以上) であったのに対し、LC 法 Total Legionella (生菌+死菌) は 48.2% (96/199) が陽性 (10 CFU/100ml 以上) であり、LC 法 Total Legionella の感度は 77.1%、特異度は 72.4%であった (表 1 (1))。一方、LC 法 Viable Legionella (生菌) では 31.2% (62/199) が陽性 (5 CFU/100ml 以上) であり、平板培養法に対する感度は 60.2%に低下

したが、特異度は 89.7%に上昇した (表 1 (2))。平板培養法と LC 法の定量値を比較すると、LC 法 Total Legionella では、平板培養法よりも菌数が 1 log~2 log 高い検体が多く、検水中の死菌により定量値が高値を示す傾向がみられたが (図 4 (1))、LC 法 Viable Legionella では平板培養法に近い定量値が得られた (図 4 (2))。

(3) 不一致例の内訳

LC 法 Viable Legionella で偽陰性となった 33 件の内訳を表 2 に示す。Group 1 の 12 件は ATP が 5,000 RLU/10ml 以上あるいは従属栄養細菌数が 10^5 CFU/ml 以上の検体であり、いずれも遊離残留塩素が検出されず、高度に微生物汚染の進んだ浴槽水であった。そのため、LC 法における液体培養の際、レジオネラの増殖が雑菌の増殖の競合阻害を受けたことにより、生菌として検出できなかった可能性が考えられた。Group 2 の 8 件はすべて塩素消毒が行われている浴槽水であり、LC 法 Total Legionella が $10^3 \sim 10^5$ CFU/100ml 程度と非常に高濃度に検出され、大量の死菌の存在が示唆された。この結果、生菌の定量下限値が液体培養での生菌数を上回ったため、判定不能状態であったと考えられた。Group 3 の 1 件は、平板培養開始後 4 日目以降に確認された発育の遅い菌であり、分離菌株の 16S rRNA 遺伝子を標的としたレジオネラ特異的 PCR で陽性が確認されたが、5S rRNA を標的とした今回のリアルタイム PCR 及び市販検出キット (Cycleave PCR Legionella (5S rRNA) Detection kit (TAKARA)) のいずれも陰性であった。16S rRNA のユニバーサルプライマーを用いた 487bp の塩基配列をデータベースと比較した結果、種不明の *Legionella* sp. NML 93L054 (Accession No. GU062706) と 1 塩基違いであり、5S rRNA の配列が異なるレジオネラ菌株であると考えられた。Group 4 の 7 件は平板培養法で 10~20 CFU/100ml の低レベル汚染検体であり、異なる検出系での不一致は避けられない可能性が考えられた。Group 5 については、ATP や従属栄養細菌数等の微生物汚染データが得られなかつ

たため、偽陰性の原因は不明であった。

(4) 微生物汚染の少ない検体での相関

微生物汚染の激しい検体における LC 法での増殖抑制が明らかであることから、ATP 5,000 RLU/10ml 未満の 108 件を抽出し、再度平板培養法と LC 法との定量値を比較した (図 5、表 3)。Total Legionella では感度 70.5%、特異度 75.0%、Viable Legionella では感度 77.3%、特異度 89.1% といずれの値も改善され、定量性においても Viable Legionella で切片 0.1、傾き 0.91、 $R^2=0.76$ の良好な回帰直線が得られるなど、平板培養法と Viable Legionella との間の高い相関が明らかとなった。

4 高度微生物汚染検体への改善策

高度に微生物汚染が進んだろ過器逆洗水を用い、LC 法での前処理の効果を検討した。用いた逆洗水の水質は、pH 8.3 の低張性アルカリ性冷鉱泉、遊離残留塩素は 1.0 mg/L で、ATP 16,450 RLU/10ml、従属栄養細菌数 8.1×10^6 CFU/ml、一般細菌数 8.3×10^6 CFU/ml と大量の微生物汚染が確認された検体である。前処理として、①酸処理 5 分 (pH 2.2)、②熱処理 (50°C、20 分)、③熱酸処理 (50°C、20 分→pH 2.2、5 分)、④酸処理 20 分 (pH 2.2) の 4 種類を用いた。検水 100 倍濃縮液 100 μ l を WYO α 寒天培地に塗布し、37°C で 3 日目の写真を表 4 に示す。酸処理 5 分及び熱処理では、レジオネラよりも増殖の速い雑菌を除去できず、平板上にレジオネラのコロニーを確認できなかった。熱酸処理及び酸処理 20 分では雑菌の増殖を抑えることができたが、熱酸処理では酸処理 20 分に比べてレジオネラの発育速度が遅かった。本検体では酸処理 20 分の前処理が最も良好であり、最終的に *Legionella pneumophila* SG1 が 3,100 CFU/100ml 検出された。

この検水の 1,000 倍濃縮液及び 100 倍濃縮液を用いて①～④の前処理を行った後、LC 法による液体培養を行い、RNA 抽出時の Chelex 処理の有無によって LC 法の定量値を比較した (表 5)。1,000 倍濃縮液では、前処理及び Chelex 処理の有

無に関わらず LC 法ではすべて陰性であり、高濃度の雑菌による RT-qPCR 反応阻害が示唆された。100 倍濃縮液では、Chelex 処理を行わない場合の Total Legionella が 270~990 CFU/100ml に対し、Chelex 処理を追加すると 5,400~7,200 CFU/100ml に増加し、Chelex 処理による RT-qPCR 反応阻害の改善効果が確認された。また、100 倍濃縮液で Chelex 処理を行った場合の前処理を比較すると、酸処理 5 分及び熱処理では液体培養後の Ct 値の低下が認められず、Viable Legionella は陰性であったが、熱酸処理では 160 CFU/100ml、酸処理 20 分では 1,600 CFU/100ml と液体培養での増殖抑制が改善され、平板培養で確認した前処理の効果が液体培養でも同様に有効であることが確認された。以上の結果から、微生物汚染の進んだ検体では、100 倍濃縮検体に酸処理 20 分の前処理を行い、抽出操作時に Chelex 処理を追加することで、LC 法での液体培養抑制及び RT-qPCR 反応阻害を改善できる可能性を示した。

D 考 察

我々は、昨年度までに開発した液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC RT-qPCR) に改良を加え、より簡便かつ再現性に優れたレジオネラ生菌迅速検査法の検討を進めた。昨年度の課題として、検量線作成が煩雑かつ不安定で定量値が安定しないこと、微生物汚染の激しい検体でレジオネラの増殖抑制が起こることの 2 点が主に挙げられ、それらの問題点をクリアすべく次の改良を行った。

第 1 の改良は、1 ステップ RT-qPCR 法の採用である。昨年度までは、市販のレジオネラ遺伝子定量検出キットと RT 反応試薬を組み合わせた 2 ステップ RT-qPCR を用いたが、さらに操作を簡略化するため、既に報告されているリアルタイム PCR のプライマー、プローブを用い、1 ステップ RT-qPCR を作成した。使用したリアルタイム PCR 反応系は、文献調査で最も特異性、感度に優れたと考えられるものを採用した⁷⁾。参考までに、

Diedererら⁷⁾が確認した今回の qPCR 反応の特異性を表 6 に示す (RT-qPCR では未確認)。今回の抽出法と反応系での感度は、1 反応当たり 10 コピーの検出が可能で、実試料でも十分活用可能な感度が確保できた。また、操作性の面では、従来の 2 ステップ法が RT 反応後の cDNA を qPCR 反応系に加える操作が必要で、ピペット操作による測定誤差やコンタミネーションの可能性が危惧されていたが、1 ステップ化によってこれらの問題が解消された。また、2 ステップ法では RT-qPCR 反応自体に 100 分程度を要していたが、1 ステップでは 60 分に短縮され、検量線の増幅効率や直線性も優れていることから、1 ステップ化のメリットは大きいと考えられた。なお、特異性の面では、従来用いた市販キットにおいて *L. londiniensis* 等の一部のレジオネラ属菌が検出できないことが明らかになっているが⁸⁾、今回の反応系も同じ 5S rRNA を標的としており、同様に一部の菌種で検出できない可能性がある。実際、今回調査した中で、両試薬で増幅しないレジオネラ菌株が分離された原水が 1 件認められている (種不明の *Legionella* sp)。平板上に 4 日目以降に出現する増殖の遅い菌であり、病原性は低い種の可能性があるが、遺伝子検査を行う場合には留意すべき点であると考えられる。

第 2 の改良は、検量線作成用の 5S rRNA コントロールの合成と、レジオネラ 1 CFU 当たりのコピー数の決定である。昨年度は、BCYE α 寒天培地で 30°C、4 日間培養した標準株を用いて希釈系列を作成し、検量線を作成していたが、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あり、施設間の定量値が異なる要因となっていた。そこで、5S rRNA の全領域⁹⁾(118 bp) をカバーした Transcript RNA を合成し、検量線作成用のコントロール RNA として協力地研に配布した。また、環境から検出されるレジオネラに近い状態の菌を再現するため、アメーバ内で増殖したレジオネラを調整し、菌体 1 CFU 当たりの 5S rRNA コピー数が 8,000 copies/CFU であり、18

時間培養後には 400,000 copies/CFU に約 50 倍増加することを明らかにした。この係数を用いて検水の定量値を算出した結果は、通常の平板培養法で得られた定量値と極めて高い相関 ($r^2=0.76$) を示し、今回決定したコピー数が妥当であることが確認された。

第 3 の改良は、検水の ATP を指標にした LC 法における反応阻害、培養抑制の予測と、それに応じた前処理の提案である。昨年度までの検討で、塩素消毒を行わない掛け流し式温泉やろ過器逆洗水等の微生物汚染が激しい検体では、LC 法で偽陰性となる検体が少なからず存在した。原因は、検水中の共雑菌による RT-qPCR 反応阻害と、液体培養時の増殖抑制の 2 点が考えられた。今回、ATP 5,000 RLU/10ml 以上の検体について 100 倍濃縮液を用い、抽出時に 5% Chelex を使用することで反応阻害が解消されること、及び、前処理を酸処理 5 分から酸処理 20 分に延長することで増殖抑制が解消されることがわかった。今後、サンプル数を増やして ATP 値の妥当性の確認や、前処理の効果について検証を行う予定である。

一方、LC 法は液体培養によるレジオネラ 5S rRNA の増加量から生菌数を算出するため、死菌が大量に存在する検体では少量の生菌が検出できない場合がある。培養時間を延長することで改善の余地はあるが、迅速検査としての位置付けから考えると、過度の検査時間の延長は望ましくない。そこで、LC 法が生菌のみならず、同時に死菌量も定量できる点を活用し、検査結果として Total Legionella、Viable Legionella、生菌検出下限値の 3 つのデータを明示し、一定量の生菌が否定できないことを明示することとした。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し、これらを潜在的なリスクとして捉え、洗浄等の対策を講じる指標に活用すれば、生菌汚染や事故発生を未然に防ぐことにつながると考えられる。さらに検体数を増やし、リスク評価の基準値を提示できるよう、検討を続けたい。

E 結 論

入浴施設の浴槽水等を対象としたレジオネラ属菌の生菌迅速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) の改良を行った。昨年度まで検討してきた 2 step RT-qPCR よりも迅速、簡便、安価でかつ定量性に優れた 1 step RT-qPCR を作成した。標的とする 5S rRNA と同じ配列の transcript RNA を合成し、コピー数が明らかなコントロール RNA として配布することにより、定量検査に不可欠な検量線作成が容易に可能となった。また、レジオネラ属菌 1 CFU 当たりの 5S rRNA コピー数が 8,000 copies/CFU であり、18 時間培養後に 400,000 copies/CFU に増加することを明らかにし、検水中の rRNA コピー数から CFU に換算することが可能となった。これらの改良を加えた LC RT-qPCR 法の評価を実試料で行ったところ、通常の平板培養法と比較して感度 60.2%、特異度 89.7%であったが、ATP を指標として微生物汚染の進んだ検体の前処理を追加・変更することで、感度 77.3%、特異度 89.1%まで改善できる可能性を示した。平板培養法と LC 法の定量値は高い相関を示し ($R^2=0.76$)、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) Chang B et al., Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. Appl Environ Microbiol. 2009 Jan; 75(1): 147-53.
- 2) Chang B et al., Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. Jpn J Infect Dis. 2010 Mar; 63(2): 119-23.
- 3) Delgado-Viscogliosi P et al., Viability PCR, a

culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. Appl Environ Microbiol. 2009 Jun; 75(11): 3502-12.

- 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 20 年度総括・分担研究報告書
- 5) 「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
- 6) 「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」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 22 年度総括・分担研究報告書
- 7) Diaderen BM et al., Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. J Med Microbiol. 2007 Jan; 56(1): 94-101
- 8) 「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 19 年度総括・分担研究報告書
- 9) MacDonell MT et al., The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella*. Nucleic Acids Res. 1987 Feb 11; 15(3): 1335

F 論文発表

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

なし