

図1 RT-qPCRの検量線比較

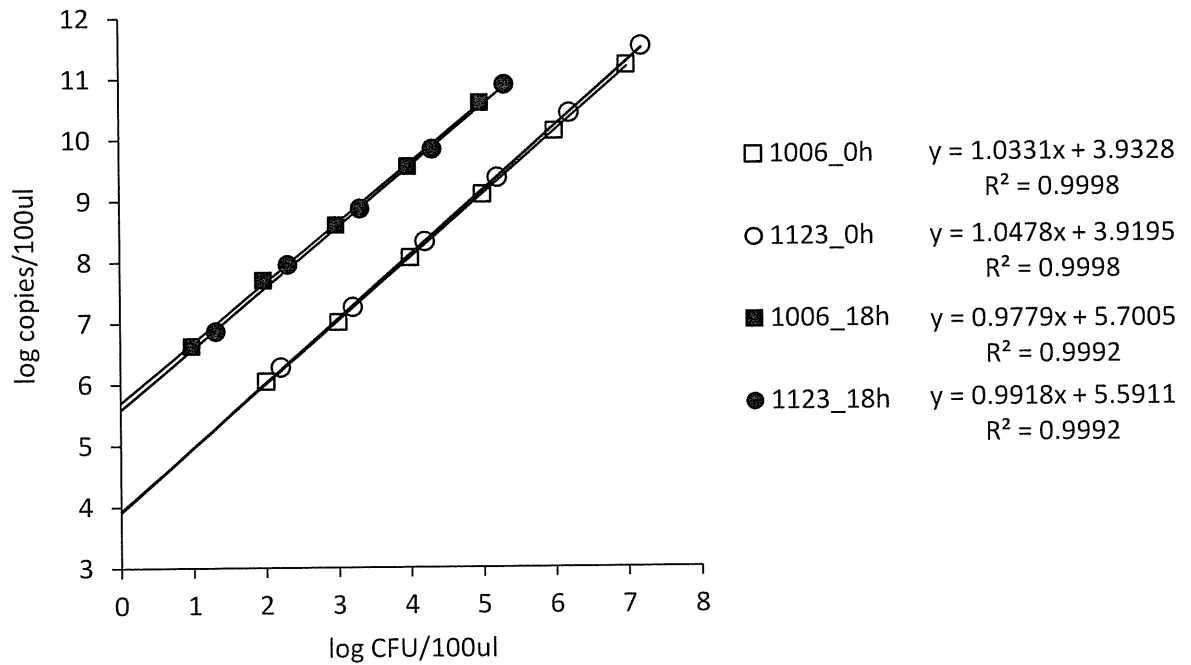
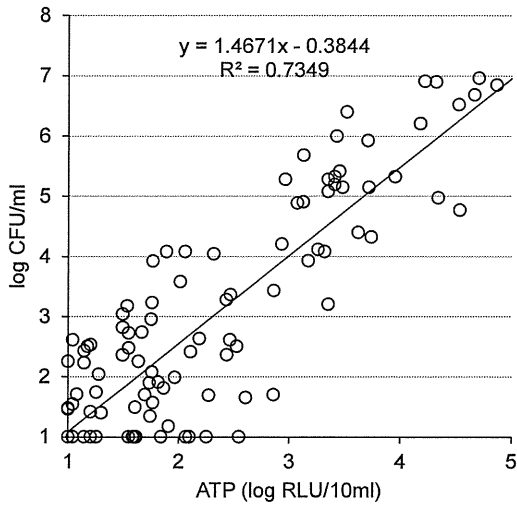
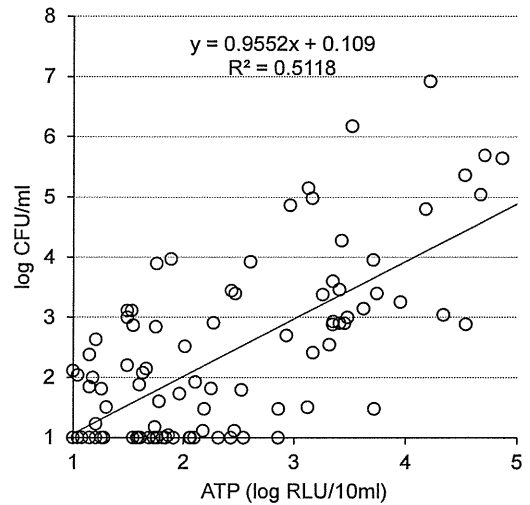


図2 アメーバ培養レジオネラにおける5S rRNAコピー数

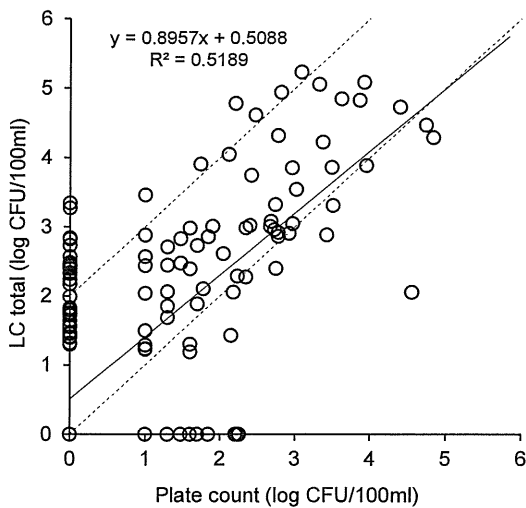


(1) 従属栄養細菌数

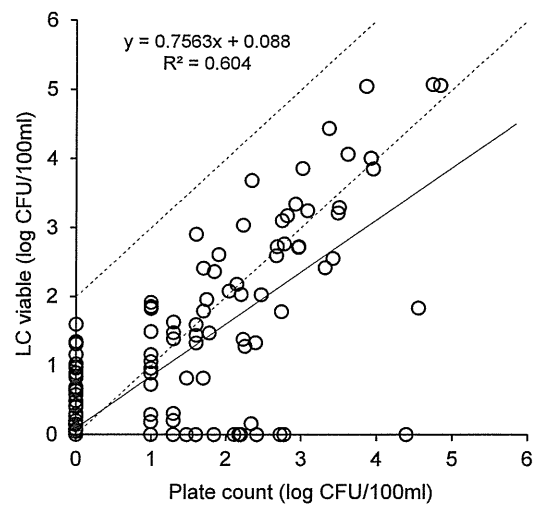


(2) 一般細菌数

図3 ATP量と微生物汚染指標菌数との相関 (n=106)



(1) LC法 Total Legionella



(2) LC法 Viable Legionella

図4 平板培養法とLC法との比較 (n=199)

表1 平板培養法とLC法との比較 (n=199)

(1) Total Legionella (総菌)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
LC法 Total Legionella	≥ 10	64	32	96
	< 10	19	84	103
計		83	116	199

感度 77.1% 特異度 72.4%

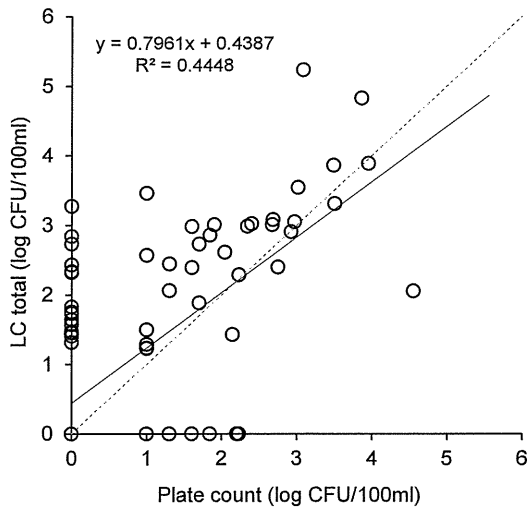
(2) Viable Legionella (生菌)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
LC法 Viable Legionella	≥ 5	50	12	62
	< 5	33	104	137
計		83	116	199

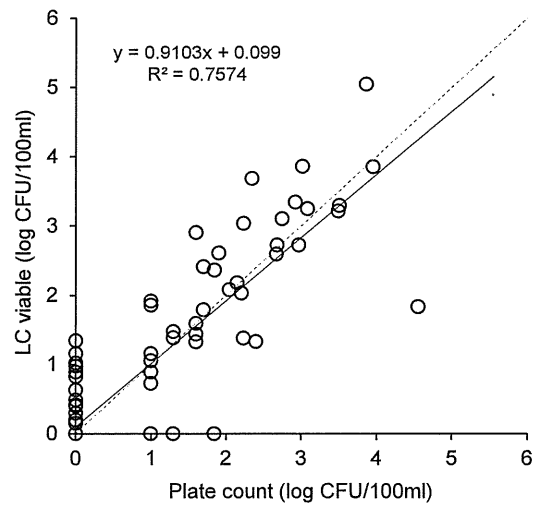
感度 60.2% 特異度 89.7%

表 2 偽陰性試料の内訳 (n=33)

Group	No.	検体 分類	水質			レジオネラ属菌			微生物汚染状況		LC RT-qPCR					
			湯温 ℃	pH	残塩 mg/L	CFU /100ml	種	血清群	ATP (/10ml)	HPC (CFU/ml)	LC Ct値		copies/tube		CFU/100ml	
											Ct(0h)	Ct(18h)	0h	18h	総菌 Total	生菌 Viable
1	1	浴槽水	41.3		0.0	25,000	L.p,L.sp.(Latex)	SG4	15,047	1.6x10 <sup>6</sup>	27.4	28.1	38639	23216	53000	< 1100
	2	浴槽水	42.6		0.0	600	L.p	SG5,7	33,484	3.3x10 <sup>6</sup>	33.7	34.1	528	416	730	< 15
	3	浴槽水	43.0		0.0	600	L.p,L.sp.	SG3,6	5,111	8.4x10 <sup>5</sup>	33.6	34.5	604	305	830	< 17
	4	浴槽水	42.3		0.0	530	L.p	SG2-14	50,721	9.1x10 <sup>6</sup>	33.4	33.9	661	452	910	< 18
	5	浴槽水	43.4		0.0	260	L.p	SG6	21,731	9.4x10 <sup>4</sup>	30.9	32.1	4025	1695	5500	< 110
	6	浴槽水	41.7		0.0	150	L.p,L.dumoffii,L.sp.	SG4,6	164,723	UT	36.3	36.1	82	95	110	< 5
	7	浴槽水	43.1		0.0	130	L.p	SG6	34,168	5.9x10 <sup>4</sup>	30.0	ND	8087	0	11000	< 220
	8	浴槽水	42.3		0.0	40	L.p	SG2-14	46,390	4.8x10 <sup>6</sup>	39.4	ND	11	0	15	< 5
	9	浴槽水	42.3		0.0	30	L.p	SG4	73,359	7.0x10 <sup>6</sup>	35.0	36.9	215	63	300	< 6
	10	浴槽水	41.9		0.0	20	L.p	SG6,10	5,497	2.1x10 <sup>4</sup>	ND	36.5	0	73	< 10	< 5
	11	浴槽水		8.4	0.0	30	L.p	UT	UT	5.2x10 <sup>5</sup>	ND	37.2	0	17	< 10	< 5
	12	浴槽水		8.0	0.0	10	L.p	UT	UT	1.2x10 <sup>6</sup>	ND	35.2	0	70	< 10	< 5
2	13	浴槽水	41.0	8.0	0.1	2,100	L.p	SG3,10	UT	UT	26.8	26.6	82505	92004	110000	< 2300
	14	浴槽水	40.0	7.6	0.2	1,210	L.p	SG4,5,6,10	4,182	2.5x10 <sup>4</sup>	26.9	26.3	123220	187088	170000	< 3400
	15	浴槽水		8.6	0.3	650	L.p	SG1	UT	UT	26.0	25.1	63261	117466	87000	< 1700
	16	浴槽水	42.3	6.9	0.4	295	L.p	SG1,5	UT	UT	28.4	28.2	29774	33630	41000	< 820
	17	浴槽水	41.9	7.4	0.3	160	L.p	SG1,6	UT	UT	27.8	28.1	43739	34725	60000	< 1200
	18	浴槽水	42.0	7.4	0.6	55	L.p, L.micdadei	SG5,10	UT	UT	30.9	30.2	5844	9153	8000	< 160
	19	浴槽水	41.0	7.4	0.4	10	L.p	SG7	719	50	32.5	32.7	2093	1852	2900	< 60
	20	浴槽水		9.0	0.7	10	L.p	SG1	UT	UT	32.4	32.3	550	606	760	< 15
3	21	原水	14.9	8.1	0.0	70	L.sp		60	< 30	39.3	40.0	2	1	< 10	< 5
4	22	浴槽水	41.0		< 0.1	20	L.p,L.micdadei	SG2-14	41	< 30	34.7	34.8	201	194	280	< 6
	23	浴槽水	43.0		0.2	10	L.sp.		2,998	1.4x10 <sup>5</sup>	40.3	38.5	6	23	< 10	< 5
	24	浴槽水	42.0		0.4	10	L.p	SG1	56	9.0x10 <sup>2</sup>	ND	ND	0	0	< 10	< 5
	25	浴槽水	41.0		< 0.1	10	L.bozemanii		269	1.9x10 <sup>3</sup>	ND	37.0	0	36	< 10	< 5
	26	浴槽水	41.9		0.1	10	L.p	SG10	344	UT	34.4	34.7	268	214	370	< 7
	27	浴槽水	41.1	8.5	0.7	10	L.p	SG6	34	1.5x10 <sup>3</sup>	ND	35.9	0	21	< 10	< 5
	28	逆洗水	38.6	9.1	1.0	10	L.p	SG4	15	3.2x10 <sup>2</sup>	35.7	35.5	23	27	30	< 5
	5	29	浴槽水	42.1	7.8	0.1	220	L.p	SG10	UT	UT	34.2	33.7	136	189	190
30		浴槽水	41.4	7.7	0.2	40	L.p	SG10	UT	UT	37.2	ND	14	0	20	< 5
31		浴槽水		8.5	0.9	30	L.p	SG1	UT	UT	32.6	32.0	489	728	670	< 13
32		浴槽水	40.6	7.6	0.3	20	L.p	SG10	UT	UT	35.5	34.5	51	109	70	< 5
33		浴槽水		9.2	0.4	20	L.p	SG1	UT	UT	32.9	33.2	372	312	510	< 10



(1) LC法 Total Legionella



(2) LC法 Viable Legionella

図5 平板培養法とLC法との比較 (ATP 5000 RLU未満、n=108)

表3 平板培養法とLC法との比較 (ATP 5000 RLU未満、n=108)

(1) Total Legionella (総菌)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
LC法 Total Legionella	≥ 10	31	16	47
	< 10	13	48	61
計		44	64	108

感度 70.5% 特異度 75.0%

(2) Viable Legionella (生菌)

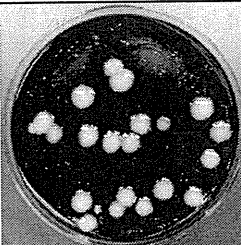
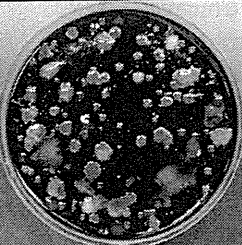
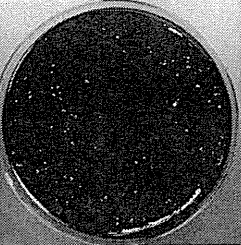
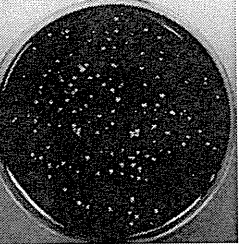
	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 5	< 5		
LC法 Viable Legionella	≥ 5	34	7	41
	< 5	10	57	67
計		44	64	108

感度 77.3% 特異度 89.1%

表4 ろ過器逆洗水のレジオネラ検出結果

水質：pH 8.3、低張性アルカリ性冷鉱泉、遊離残留塩素濃度 1.0 mg/L

ATP 16,450 RLU/10ml、従属栄養細菌数  $8.1 \times 10^6$  CFU/ml、一般細菌数  $8.3 \times 10^6$  CFU/ml

前処理	酸処理 5分	熱処理	熱酸処理	酸処理 20分
	pH2.2、5分	50°C、20分	50°C、20分 pH2.2、5分	pH2.2、20分
平板培養				
	雑菌多 レジオネラ不検出	雑菌多 レジオネラ不検出	雑菌なし レジオネラ発育遅い	雑菌なし レジオネラ発育良好 3,100 CFU/100ml

(写真は WYOα3 日目)

表5 ろ過器逆洗水を用いた LC 法前処理の比較 (レジオネラ属菌 3,100 CFU/100ml)

濃縮	LC 前処理		LC コピー数		LC 定量値 (CFU/100ml)		
	前処理	5% Chelex	0h	18h	Total 総菌	Viable 生菌	生菌 下限値
1000 倍	酸処理 (5分)	無	0	0	< 10	0	0
	熱処理		0	0	< 10	0	0
	熱酸処理		0	0	< 10	0	0
	酸処理 (20分)		0	0	< 10	0	0
	酸処理 (5分)	有	0	33	< 10	1	0
	熱処理		15	49	19	1	0
	熱酸処理		0	29	< 10	1	0
	酸処理 (20分)		3	13	< 10	0	0
100 倍	酸処理 (5分)	無	39	65	540	7	< 10
	熱処理		79	0	990	0	< 22
	熱酸処理		34	15	470	0	< 9
	酸処理 (20分)		20	58	270	10	< 5
	酸処理 (5分)	有	474	288	6,500	0	< 130
	熱処理		435	177	5,400	0	< 120
	熱酸処理		393	987	5,400	160	< 110
	酸処理 (20分)		525	6,444	7,200	1,600	< 140

表 6 使用プライマーの qPCR での特異性 (RT-qPCR では未確認)

菌種	血清群等	ATCC	増幅の有無
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia-1 (SG1)	33152	+
	Togus-1 (SG2)	33154	+
	Bloomington-2 (SG3)	33155	+
	L.A.-1 (SG4)	33156	+
	Dallas-1E (SG5)	33216	+
	Chicago-2 (SG6)	33215	+
	Chicago-8 (SG7)	33823	+
	Concord-3 (SG8)	35096	+
	IN-23 (SG9)	35289	+
	Leiden-1 (SG10)	43283	+
	797/PA/H (SG11)	43130	+
	570-CO-H (SG12)	43290	+
	82A3105 (SG13)	43736	+
	1169-MN-H (SG14)	43703	+
<i>Legionella anisa</i>		35292	+
<i>Legionella birminghamensis</i>		43702	+
<i>Legionella bozemanii-1</i>		33217	+
<i>Legionella bozemanii-2</i>		35545	+
<i>Legionella brunensis</i>			+
<i>Legionella cherii</i>		35252	+
<i>Legionella dumoffii</i>		35850	+
<i>Legionella erythra</i>		35303	+
<i>Legionella feeleeii-1</i>		35072	+
<i>Legionella feeleeii-2</i>		35849	+
<i>Legionella gormanii</i>		33297	+
<i>Legionella hackeliae-1</i>		35250	+
<i>Legionella israelensis</i>		43119	+
<i>Legionella jamestowniensis</i>		35298	+
<i>Legionella jordani</i>		33623	+
<i>Legionella longbeachae-1</i>		33462	+
<i>Legionella longbeachae-2</i>		33484	+
<i>Legionella maceachernii</i>		35300	+
<i>Legionella micdadei</i>		33218	+
<i>Legionella moravica</i>		43877	+
<i>Legionella oakridgensis</i>		33761	+
<i>Legionella parisiensis</i>		35299	+
<i>Legionella rubrilucens</i>		35304	+
<i>Legionella sainthelensi</i>		35248	+
<i>Legionella spiritensis</i>		35249	+
<i>Legionella steigerwaltii</i>		35302	+
<i>Legionella tucsonensis</i>		49180	+
<i>Legionella wadsworthii</i>		33877	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		49619	-
<i>Bordetella pertussis</i>	Tohama strain		-
<i>Bordetella parapertussis</i>	B24		-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		15293	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>		VR1355	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>			-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		27853	-
<i>Lactobacillus casei</i>			-

Diederer BM, J Med Microbiol. 2007 56: 94-101をもとに作成

資料 [A] 生菌を検出するレジオネラ属菌迅速検査法(液体培養定量 RT-PCR 法)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。このため迅速検査として遺伝子定量法の検討を行ってきたが、死菌の影響が大きく培養法との乖離が問題であった。昨年度は、生菌を検出する液体培養(Liquid Culture)定量 RT-PCR 法 (LC RT-qPCR 法、以下 LC 法)を試行し培養法と一定の相関を得たが、液体培地でのレジオネラ属菌の増殖が不十分なことに起因する偽陰性が問題となった。また、培養菌を使用した検量線の作成は行程が複雑で安定性に問題があった。

そこで、本年度は液体培地に使用する活性炭をレジオネラ属菌の増殖の良好な Norit SA2 に変更し、増殖阻害の要因と考えられる浴槽水の微生物汚染調査も併せて実験を行った。また、合成 RNA で検量線を作成し 1step 法で LC 法を試行したので報告する。

## B 方法

### 1. 材料

浴槽水検体 66 件(温泉 44 件、水道水 16 件、井戸水 5 件、薬湯 1 件)について培養法、LAMP 法、LC 法の比較を行った。

### 2. 検体の濃縮・培養

浴槽水 700ml をポリカーボネートフィルター (ISOPORE 直径 47mm 孔径 0.4 $\mu$ m ミリポア社)でろ過し、7ml の DW に混濁させた 100 倍濃縮液を試料とした。

培養法では、この試料に等量のレジオネラ前処理液(0.2M KCl-HCl 緩衝液 PH2.2、武藤化学)を加えて酸処理し 200 $\mu$ l を GVPC 培地、MWY 培地(以上 OXOID)、WYO $\alpha$  培地(栄研化学)に接種し 36 $^{\circ}$ C で 10 日間培養後レジオネラ菌数の算定および同定を行った。LC 法には試料 1ml を

15,000rpm で 5 分間遠心後上清 900 $\mu$ l を除去した 1,000 倍濃縮液 100 $\mu$ l を使用し、LAMP 法には試料 2ml を 13,000rpm で 10 分間遠心後、上清 1,960 $\mu$ l を除去した 40 $\mu$ l を用いた。

### 3. 浴槽水の微生物汚染調査

浴槽水 100 倍濃縮液 100 $\mu$ l の ATP 値をルシパックワイド、ルミテスター PD-10N (以上 kikkoman)を用いて測定した。一般細菌数(SPC)は標準寒天培地(ニッスイ)を使用し 36 $^{\circ}$ C 2 日間培養後、従属栄養細菌数(HPC)は R2A 寒天培地(BDdifco)を使用し 42 $^{\circ}$ C 7 日間培養後菌数を求めた。

### 4. LC 法

#### 4.1 検量線の作成

研究班より配布された 5.0 $\times 10^6$  copies / $\mu$ l の合成 RNA 原液を EasyDilution(タカラバイオ)を用いて 10 倍段階希釈を行い、5.0 $\times 10^1$ ~5.0 $\times 10^5$  copies / $\mu$ l の RNA 希釈液を検量線用試料とした。

#### 4.2 液体培養

浴槽水 1,000 倍濃縮液 100 $\mu$ l を等量の前処理液で酸処理し MWY 液体培地 900 $\mu$ l で中和したのち、100 $\mu$ l を培養前(Ct(0h))試料とした。また、残りの MWY 菌液 1,000 $\mu$ l を 36 $^{\circ}$ C の水浴で 18 時間培養した培養液 100 $\mu$ l を培養後(Ct(18h))試料とした。

#### 4.3 RNA 抽出

培養前および培養後試料 100 $\mu$ l に RNA 抽出液 300 $\mu$ l(5M NaCl 8.0 $\mu$ l、10%TritonX-100 20 $\mu$ l、100mM DTT 20 $\mu$ l、20mg/ml Proteinase K 2 $\mu$ l、TE 緩衝液 250 $\mu$ 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 $\mu$ l を TE 緩衝液 200 $\mu$ l で 5 倍希釈し、RT-qPCR 反応の鋳型とした。

#### 4.4 RT-qPCR 反応

One Step PrimeScript RT-PCR Kit を使用し研究班作成の方法に準じて 1step 法で行った。増

幅装置は Thermal Cycler Dice Real Time System II TP900 (以上タカラバイオ)を使用した。

#### 4.5 定量値算出

RT-qPCR 反応で検出した Ct(0h)、Ct(18h)の値を用い、検量線によりレジオネラ属菌の総菌・生菌定量値を算出した。総菌定量値とは液体培養前の Ct(0h)で算出する死菌と生菌を併せた値であり、従来の RT-qPCR 法による定量値にあたる。なお、定量値を算出するにあたり、レジオネラ属菌 1cfu 当たりのコピー数を 8,000 コピー、18 時間培養後のコピー数を 400,000 コピーとした。

#### 4.6 濃縮倍率の違いによる LC 法の比較

浴槽水保存検体 1 件を用いて、液体培養に供する試料の濃縮倍率の違いによる LC 法の結果を比較した。前述の方法(B 方法 2. 検体の濃縮・培養)に従い 1,000 倍濃縮した再濃縮試料と、再濃縮を行わない 100 倍濃縮試料にそれぞれ酸処理を施し LC 法を行った。

### 5. 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. 浴槽水の微生物汚染調査とレジオネラ属菌培養法の結果

浴槽水検体の ATP 値の内訳は、10,000 RLU/10ml 以上が 9 件、5,000 以上 10,000 RLU/10ml 未満が 6 件、1,000 以上 5,000 RLU/10ml 未満が 16 件、1,000 RLU/10ml 未満が 32 件であり、ATP 値 5,000RLU/10ml 以上の検体が 22.7%(15/66)存在した。また、上記 ATP 値別にみたレジオネラ属菌培養法陽性率は、それぞれ 88.9%(8/9)、83.3%(5/6)、81.3%(13/16)、62.5%(20/32)であった(n=66、表 1)。

また、浴槽水の微生物汚染の指標として測定し

た ATP 値と一般細菌数、従属栄養細菌数は互いに相関が見られ、特に ATP 値と従属栄養細菌数は  $R^2=0.832$  の高い相関を示した(図 1)。

#### 2. 定性結果比較

##### 2.1 培養法と LC 法、LAMP 法との定性結果比較(n=66)

各方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 69.7%(46/66)、LAMP 法で 84.8%(56/66)、RT-qPCR 法(LC 法総菌定量値)で 62.1%(41/66)、LC 法で 48.5%(32/66)であった。培養法を基準としたレジオネラ属菌検出感度は LAMP 法で 97.8%(45/46)、RT-qPCR 法で 73.9%(34/46)、LC 法で 60.9%(28/46)、特異度は LAMP 法で 45.0%(9/20)、RT-qPCR 法で 65.0%(13/20)、LC 法で 80.0%(16/20)であった(表 2)。

培養法陽性、LC 法陰性と判定された検体は 18 件存在した。うち 9 件は培養法でレジオネラ属菌 20 cfu/100ml 以下の検体であった。残りの 9 件は ATP 値が 5,000 RLU/10ml 以上の微生物汚染の激しい検体であった(表 3)。

##### 2.2 微生物汚染と LC 法の関係

培養法 20cfu/100ml 以上を陽性とした場合の ATP 値別の LC 法の感度を(表 4)に示した。ATP 値 10,000 RLU/10ml 以上では 0%(0/8)、5,000 以上 10,000 RLU/10ml 未満で 60.0%(3/5)、1,000 以上 5,000 RLU/10ml 未満で 100.0%(11/11)であり、ATP 値が高いと LC 法の感度が低下する傾向が認められた。ATP 値 5,000 RLU/10ml 以上の検体を除いた場合、LC 法の感度は 75.8%(25/33)、特異度は 83.3%(15/18)とともに上昇した(表 5)。

### 3. LC 法の定量結果

#### 3.1 検量線の作成

測定毎に 5 回作成した検量線は、 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^6$  copies/PCRTube の範囲で  $R^2=0.997 \sim 0.999$  の直線性を示した(図 2)。



### 3.2 培養法と LC 法との定量値比較(n=66)

培養法と LC 法の相関は  $R^2=0.415$  であったが、偽陰性の多い ATP 値 5,000 RLU/10ml 以上の検体を除いた場合の両者(n=51)の相関は  $R^2=0.651$  であった(図 3(1)(2))。

### 3.3 濃縮倍率の違いと LC 法の感度

同一の保存検体を用い濃縮倍率を変えて LC 法を行った結果、1,000 倍濃縮液に比較し 100 倍濃縮液を試料とした場合に定量値が高値となった(1,000 倍濃縮 : 202 cfu/100ml、100 倍濃縮 : 2,003 cfu/100ml)(表 6)。

## D 考察

生菌と死菌を区別することなく検出する従来の遺伝子検査法と異なり、液体培養による菌数の増加を測定する LC 法は偽陽性が少なく特異度も 80.0%であった(LAMP 法 45.0%)。

一方、培養法に対する感度は 60.9%と低く、特に ATP 高値の検体で感度の低下が認められた。今回の検討には、汚染の激しい ATP 値 5,000RLU/100ml 以上の浴槽水が 22.7%と高率に含まれており、このことが LC 法の感度を低下させたと考えられた(ATP 値 5,000 RLU/10ml 未満の検体では感度 75.8%)。

培養法陽性にもかかわらず LC 法陰性の検体は 18 件存在した。うち 9 件は培養法でレジオネラ属菌 20 cfu/100ml 以下の低値の検体であり、このレベルが LC 法の検出限界と考えられた。残りの 9 件は ATP 値が 5,000 RLU/10ml 以上であり、従属栄養細菌数の非常に多い検体であった。このことから、これら 9 件の偽陰性は、混在する雑菌がレジオネラ属菌の液体培地での増殖を阻害したことに起因したと考えられた。

しかし、これら汚染の激しい検体は、レジオネラ属菌の陽性率も高いことから何らかの対処法が必要である。一例として、液体培養に供する検体の濃縮倍率を低くすることで、雑菌の影響を軽減させ、レジオネラ属菌を効果的に検出する可能性が示唆された。

全検体を対象とした場合、培養法と LC 法は  $R^2=0.415$  と低い相関であったが、ATP 値 5,000 RLU/10ml 以上を除いた場合の相関は  $R^2=0.651$  であり、LC の定量値も培養法とほぼ同等であった。

浴槽水の微生物汚染調査では、ATP 値と従属栄養細菌数の間に  $R^2=0.832$  の高い相関があることが示された。LC 法の適応に不可欠な要因である微生物汚染の指標として、簡便に測定可能な ATP 値が有効であることを確認した。

運用面では、手技が複雑であった検量線作成が合成 RNA の使用により格段に簡便となり、測定毎に作成する検量線も安定した。One step RT-qPCR 法の導入も併せれば、LC 法は短時間で簡便な測定が可能となり、ルーチン運用に適した迅速検査法であると言える。

## E まとめ

以上により、LC 法は微生物汚染の少ない検体では生菌数を良く反映した迅速検査法であった。また、汚染の激しい検体への対策として、濃縮倍率を選択することによって感度が回復する可能性も示唆された。今後 ATP 値測定と併せて様々な状況の検体で成果が確認できれば、LC 法はさらに優れた迅速検査法となるであろう。

表 1 浴槽水の ATP 値とレジオネラ属菌陽性率(n=66)

ATP値(RLU/10ml)	件数	培養陽性件数	レジオネラ属菌陽性率(%)
10,000以上	9	8	88.9
5,000以上 10,000未満	6	5	83.3
1,000以上 5,000未満	16	13	81.3
1,000未満	32	20	62.5
不明	3	0	0.0
計	66	46	69.7

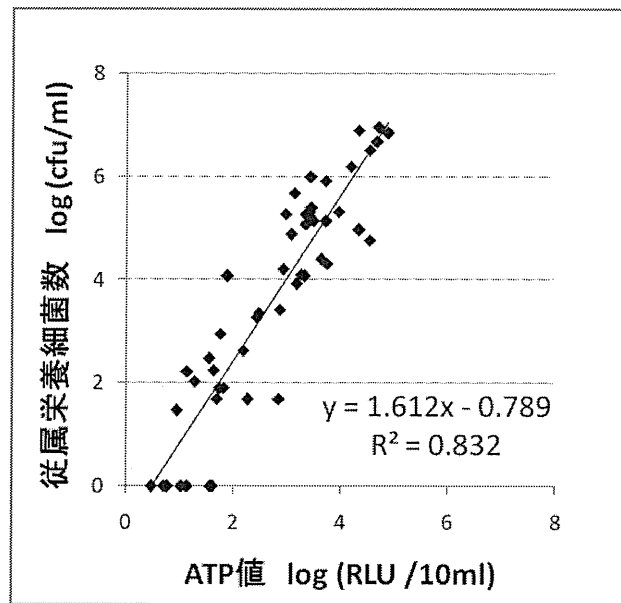


図 1 ATP 値と従属栄養細菌数の相関 (n=50)

表 2 培養法と各遺伝子検査法の定性結果比較(全検体 n=66)

		培養法		計
		陽性	陰性	
LAMP法	陽性	45	11	56
	陰性	1	9	10
RT-qPCR法 (LC法総菌定量値)	陽性	34	7	41
	陰性	12	13	25
LC法	陽性	28	4	32
	陰性	18	16	34
		46	20	66

	感度	特異度
LAMP法	97.8%	45.0%
RT-qPCR法	73.9%	65.0%
LC法	60.9%	80.0%

表3 LC法の偽陰性例(n=18)

施設 No	培養法		LC法		微生物汚染状況			原水の種類	残塩 mg/l
	cfu /100ml	種	総菌定量値 cfu/100ml	生菌定量値 cfu/100ml	ATP RLU/10ml	SPC cfu/ml	HPC cfu/ml		
11	25,000	L.p,L.sp.	53,128	-424	15,047	63,000	1,600,000	温泉水	0.0
8	600	L.p	726	-3	33,484	230,000	3,300,000	温泉水	0.0
65	600	L.p,L.sp.	830	-8	5,111	9,000	840,000	温泉水	0.0
9	530	L.p	909	-6	50,721	490,000	9,100,000	温泉水	0.0
67	260	L.p	5,534	-64	21,731	1,100	94,000	温泉水	0.0
36	150	L.p,L.dumoffii,L.sp.	113	0	164,723	NT	NT	温泉水	0.0
68	130	L.p	11,120	-222	34,168	770	59,000	温泉水	0.0
10	40	L.p	15	0	46,390	110,000	4,800,000	温泉水	0.0
7	30	L.p	296	-4	73,359	440,000	7,000,000	温泉水	0.0
72	20	L.p	< 10	2	5,497	2,500	21,000	温泉水	0.0
105	20	L.p,L.micdadei	277	0	41	<30	<30	温泉水	<0.1
5	10	L.p	< 10	5	6	<30	<30	温泉水	0.5
80	10	L.p	2878	-7	719	不明	50	温泉水	0.4
94	10	L.sp.	< 10	0	2,998	1,000	140,000	温泉水	0.2
99	10	L.p	< 10	0	56	700	900	水道水	0.4
100	10	L.p	17	8	43	120	180	水道水	0.3
106	10	L.bozemanii	< 10	1	269	<30	1,900	温泉水	<0.1
34	10	L.p	369	-1	344	NT	NT	温泉水	0.1

表4 ATP値別にみたLC法感度 (20cfu/100ml以上を陽性とした場合、n=63)

ATP値(RLU/10ml)	件数	培養法陽性件数	培養法・LC法 双方陽性件数	LC法感度(%)
10,000以上	9	8	0	0.0
5,000以上 10,000未満	6	5	3	60.0
1,000以上 5,000未満	16	11	11	100.0
1,000未満	32	12	11	91.7
計	63	36	25	69.4

表5 培養法と各遺伝子検査法の定性結果比較(ATP≥5,000 RLUを除く、n=51)

		培養法		
		陽性	陰性	計
LAMP法	陽性	32	10	42
	陰性	1	8	9
RT-qPCR法 (LC法総菌定量値)	陽性	22	6	28
	陰性	11	12	23
LC法	陽性	25	3	28
	陰性	8	15	23
		33	18	51

	感度	特異度
LAMP法	97.0%	44.4%
RT-qPCR法	66.7%	66.7%
LC法	75.8%	83.3%

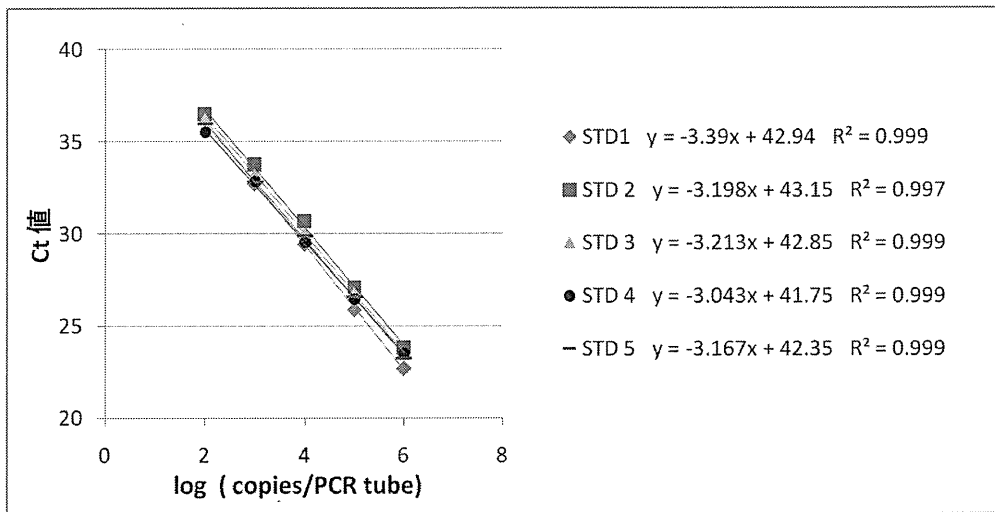
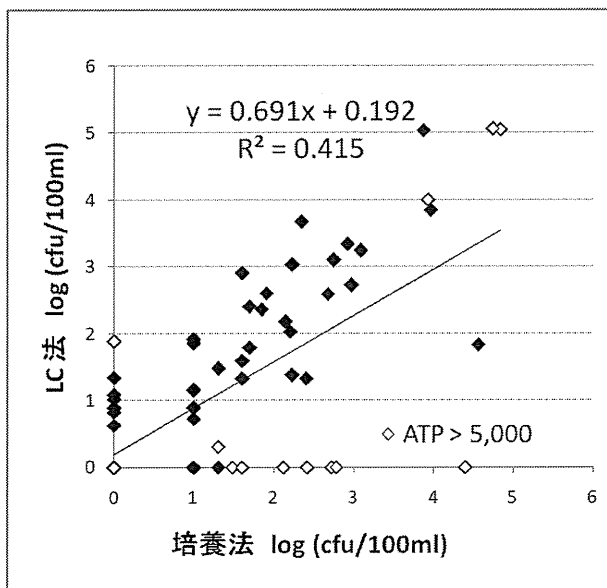


図2 LC 法検量線

(1)全検体 (n=66)



(2) ATP ≥ 5,000 RLU を除く (n=51)

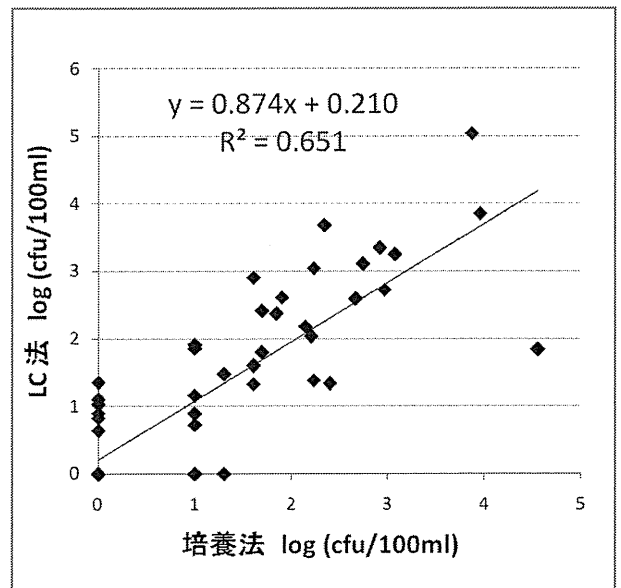


図3 培養法とLC法の相関

表6 浴槽水保存検体における濃縮倍率の違いによるLC法の結果

培養法 cfu/100ml	微生物汚染状況 種	ATP RLU/10ml	LC法		
			検体濃縮倍率	総菌定量値 生菌+死菌	LC法 cfu/100ml 生菌定量値
50	Lp,Lsp	4,116	100倍	2,451	2,003
			1,000倍	413	202

[B] 平成 23 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。研究班の烏谷らは、これまでに確立した LC qRT-PCR 法をさらに改良すべく、検量線に合成 RNA の使用、簡便な 1 step 法について検討している。今年度は、これらの方法を取り入れた LC qRT-PCR 法について、当所で収集した浴用水検体を用いて、培養法や既知の LAMP 法と比較した。また、近年 RNA を測定し生菌を定量する Transcription Reverse Transcription Concerted Reaction (TRC) 法を用いたキットが市販されたので、上記の LC qRT-PCR 法と同様に培養法や他の遺伝子検査法と比較した。

B 研究方法

浴用水のレジオネラ属菌による汚染状況について、培養法、LC qRT-PCR 法、LAMP 法及び TRC 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行い、LAMP 法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。なおレジオネラ属菌数は、採水から 7~10 日目までに生育したレジオネラ属菌と疑われるコロニーについて、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確定した。

(1) 検水の濃縮

浴用水 500ml をメンブレンフィルター（直径 47mm、0.22  $\mu$ 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 5ml 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

濃縮検体を酸処理液（0.2M KCl-HCl、pH2.2）と等量混合後、室温で 5 分静置した。混合液 200  $\mu$ l を GVPC 培地（日研生物）に 2 枚ずつコンラージし、35°C で 7 日間培養した。

(3) LC qRT-PCR 法

前述した濃縮試料 1ml を 15,000rpm で 5 分間遠心し、上清 900  $\mu$ l を除去した。残った 100  $\mu$ l に酸処理液（0.2M KCl-HCl、pH2.2）と等量混合しボルテックス後、室温で 5 分静置した。その後自家製 MWY 培地 900  $\mu$ l を添加し、ボルテックスで混合した。その 100  $\mu$ l を Ct (0h) として -20°C に保存した。残りの MWY 培地加濃縮試料 1ml は、36°C の水浴で 18 時間静置培養後ただちに氷冷し、ボルテックス後に 100  $\mu$ l を Ct (18h) として -20°C で保存した。1 検体につき、これら Ct (0h) と Ct (18h) の液体培養液の RNA 量を測定し、その差から生菌数を算出した。検体からの RNA 抽出は、全ての浴用水検査が終了した時点で行った。

RNA の抽出、逆転写反応については、研究班の烏谷らのプロトコールに従った。逆転写反応は One Step PrimeScript RT-PCR Kit（Perfect Real Time）（TaKaRa）を使用し、1 step 法で増幅した。増幅装置は Thermal Cycler DICE（TaKaRa）を用いた。

検量線は、烏谷らが作製したプロトコールに従い、コピー数既知の合成 RNA の

10 倍段階希釈系列を作製し、用いた。

#### (4) LAMP 法

LAMP 法に使用する DNA は、キレックス (Bio - Rad) を用いて抽出した。濃縮試料 1ml を 15,000rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。この沈渣に 5%キレックス溶液 (TE、pH8.8) 100  $\mu$  l を加え、懸濁した。懸濁液を 100°C で 10 分間加熱後、15,000rpm で 5 分間遠心し、上清をテンプレート DNA とした。Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) を用い、濁度測定装置 LA-320C (栄研化学) 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) TRC 法

テンプレート RNA は、濃縮試料 1ml を RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、最終溶液量 100  $\mu$  l となるよう抽出した。

#### (6) 検量線の作成

LAMP 法及び TRC 法の検量線の作成には、*L. pneumophila* Nagasaki 80-045 を標準菌株として使用した。30°C で 4 日間培養後、滅菌生理食塩水で菌を懸濁し、McFarland No. 1 (約 10<sup>8</sup>cfu/ml) になるよう調製した。この懸濁液から 10 倍段階希釈系列を作製した。LAMP 法及び qRT-PCR 法に使用するテンプレートは、懸濁液 1ml を用いてそれぞれ浴用水検体と同様の方法で抽出した。

調製した懸濁液の菌数は、100  $\mu$  l を BCYE  $\alpha$  培地 (ビオメリュー) にコンラージし、35°C で 5 日間培養後、測定した。

### C 研究結果

検水 45 件中、レジオネラ属菌陽性 (> 10cfu/100ml) となったのは、培養法では 15 件 (33.3%)、LAMP 法では 23 件 (51.1%)、TRC 法では 38 件 (84.4%) であった (表 1)。LC qRT-PCR 法では、40 検体中 12 件 (30.0%)

が陽性であった (5 検体未実施)。

培養法と遺伝子検査法による結果 (LC qRT-PCR 法は 10cfu/100ml 未満を陰性とした。) を表 2 に示した。培養法でレジオネラ属菌が分離されたにも関わらず、LC qRT-PCR 法、LAMP 法及び TRC 法のいずれかでレジオネラ属菌数が陰性であった検体は、LC qRT-PCR 法で 2 件 (検体 No. 31、43)、LAMP 法で 1 件 (検体 No. 2)、TRC 法で 1 件 (検体 No. 27) であった。これらの検体は、LC qRT-PCR 法の 1 件 (検体 No. 43) を除き、培養法での菌数が 10 - 20cfu/100ml と少なかった。一方、培養法での菌数が 10cfu/100ml 未満であったにも関わらず、遺伝子検査が陽性を示したのは LC qRT-PCR 法で 2 件、LAMP 法で 9 件、TRC 法で 24 件であった。

各遺伝子検査から算出した菌数を log 対数でそれぞれ培養法と比較した (図 1、2、3)。相関係数は LC qRT-PCR 法で  $R^2=0.7092$ 、LAMP 法で  $R^2=0.5814$ 、TRC 法で  $R^2=0.4781$  となり、LC qRT-PCR 法が最も高かった。

### D 考察

培養法と各遺伝子検査法を定性の結果 ( $\geq 10$ cfu/100ml) で比較すると、LC qRT-PCR 法が最も培養法と相関していた (図 1)。LC qRT-PCR 法については、昨年度より検討課題であった検量線の安定性確保のために合成 RNA を用いる点と、手技の誤差を少なくするため 1 step 法を取り入れた点を改良したことにより、より安定した結果を得ることが出来、培養法と相関したと考えられる。LAMP 法、TRC 法では、培養法より陽性率が高く、これらの方法の検出感度が高いことが考えられた。LAMP 法及び TRC 法は生菌だけでなく死菌の DNA または RNA も検出することがわかっ

ている。実際、今回の LC qRT-PCR 法の総菌量値（生菌値＋死菌値）を見ると、死菌の多い検体で LAMP 法または TRC 法で陽性となった検体が複数確認された。しかしながら、これらの方法での検出率が高かった理由の一つとして、現行の培養法では検出できないレジオネラ属菌の DNA または RNA を抽出している可能性、すなわち菌が培地等により抑制される場合、VNC 状態である場合等も考えられる。そして、アメーバを用いて増菌培養することで検出率が高くなる報告もあることから、このことについては遺伝子検査法と共に培養法も合わせて検討が必要である。

培養法と各遺伝子検査法との菌数の相関は、LC qRT-PCR 法との相関係数が最も高かった ( $R^2=0.7092$ )。しかしながら、培養法で 10、160cfu/100ml となった検体（検体 No. 31、43）では、LC qRT-PCR 法で遺伝子の増幅は確認されなかった。菌数の少ない検体については、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。但し、培養法におけるレジオネラ属菌数が 160cfu/100ml であった浴用水（検体 No. 43）は、LC qRT-PCR 法での菌数が 10cfu/100ml 未満であった。内部コントロールとなる蛍光色素 Rox 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。酸処理後の濃縮液を 36°C の水浴で培養する際、雑菌等の夾雑物が大量に混入していた場合、レジオネラ属菌の増殖が抑制される可能性は考えられる。今年度は、検体汚染の指標となる従属栄養細菌数や ATP 値を測定していなかったため、浴用水のレジオネラ属菌以外の汚染状況は不明である。従って今後、これらの値を浴用水の微生物汚染

の指標とし、汚染の多い検体については更なる雑菌の処理等の検討が必要である。

今回の結果では、LC qRT-PCR 法が既存の LAMP 法や TRC 法に比べ培養法との相関は良好であったが、今後遺伝子検査法を現場で応用するためには、更なる検討が必要である。

謝辞 本実態調査を実施するにあたり、県生活衛生課、各厚生センター、市保健所の担当者および採水にご協力いただいた浴用施設の皆様に深謝いたします。

表1. 平成23年度浴用水におけるレジオネラ属菌汚染状況

		培養法		
		陽性	陰性	計
LC qRT-PCR法	陽性	10	2	12
	陰性	2	26	28
	計	12	28	40
LAMP法	陽性	14	9	23
	陰性	1	21	22
	計	15	30	45
TRC法	陽性	14	24	38
	陰性	1	6	7
	計	15	30	45

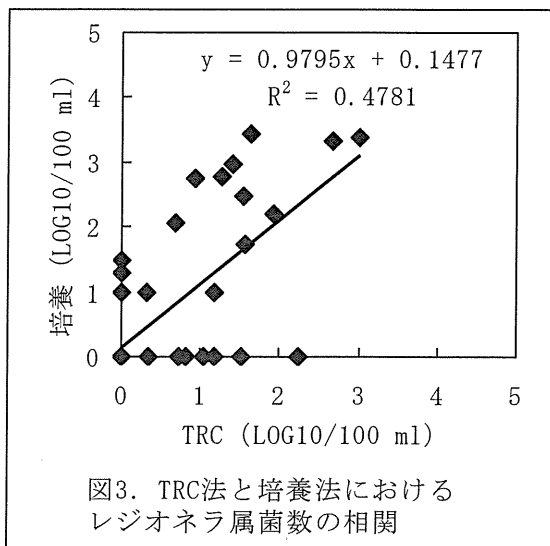
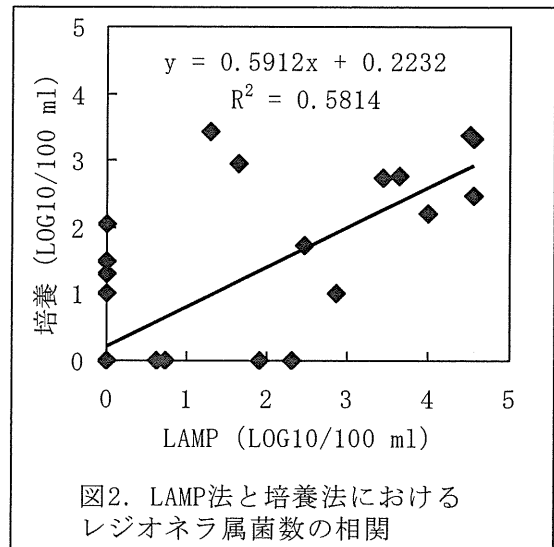
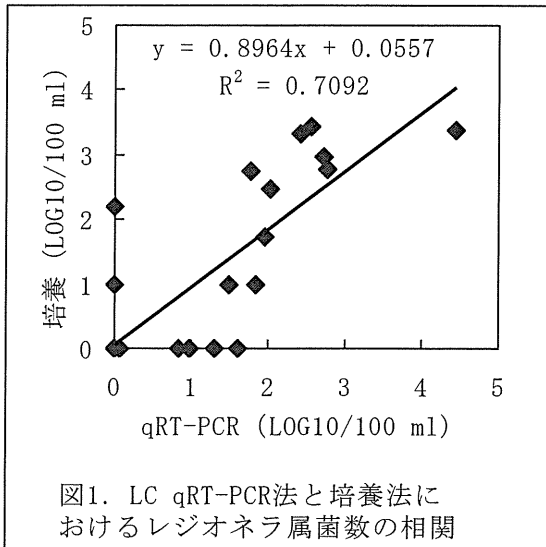




表2. 培養法と遺伝子検査法による結果

検体No.	採取日	LAMP	TRC	qRT-PCR(cfu/100 ml)		培養法 (cfu/100ml)	検出された血清群
		定性	定性	(死菌+生菌)	生菌		
1	9/26	-	-	0	0	<10	
2	9/26	-	+	109	67	10	SG3
3	9/26	-	+	62	21	<10	
4	9/26	+	+	764	357	2655	SG1、SG9、UT
5	9/26	+	+	2201	40	<10	
6	10/3	+	+	272	31	10	SG3
7	10/3	+	+	16687	27308	2350	SG1
8	10/3	-	+	0	0	<10	
9	10/3	+	+	0	0	<10	
10	10/3	+	-	0	0	<10	
11	10/17	-	+	247	0	<10	
12	10/17	-	+	664	0	<10	
13	10/17	-	+	370	0	<10	
14	10/17	+	+	113445	261	2100	SG3、SG10
15	10/17	+	+	2091	60	545	SG3、SG10
16	10/24	-	+	0	0	<10	
17	10/24	-	+	0	0	<10	
18	10/24	-	+	0	0	<10	
19	10/24	-	+	0	0	<10	
20	10/24	-	-	0	0	<10	
21	10/31	+	+	0	0	<10	
22	10/31	+	+	0	0	<10	
23	10/31	+	+	7114	516	920	SG1、SG2、SG4、SG5
24	10/31	-	+	64	0	<10	
25	10/31	-	-	98	0	<10	
26	11/7	+	+	N. T.	0	30	SG1
27	11/7	+	-	N. T.	0	20	SG1、SG9
28	11/7	+	+	N. T.	0	<10	
29	11/7	+	+	N. T.	0	115	SG1、SG5、SG8
30	11/7	-	+	N. T.	0	<10	
31	11/14	+	+	0	0	10	SG3
32	11/14	-	-	304	0	<10	
33	11/14	-	+	148	9	<10	
34	11/14	-	-	0	0	<10	
35	11/14	-	+	0	0	<10	
36	11/21	+	+	0	0	<10	
37	11/21	-	+	56	7	<10	
38	11/21	-	+	0	0	<10	
39	11/21	+	+	25	1	<10	
40	11/21	-	+	0	0	<10	
41	11/28	+	+	40939	106	295	SG1、SG5
42	11/28	+	+	0	0	<10	
43	11/28	+	+	60141	0	160	SG1、SG6
44	11/28	+	+	20751	577	595	SG1、SG5
45	11/28	+	+	8035	91	55	SG5、SG10、ミクダディ

\*N. T. 未測定

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

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  
＜阻害作用の解明と 1-STEP の検討＞

研究分担者：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、堀切佳代、坂井清、前沢仁、  
森本敏昭、刈込高子

（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。

LC RT-PCR 法はフミン質、細菌（従属栄養細菌）を多量に含むと阻害を受けた。しかし、低フミン質、低細菌の試料（水道水を原水とする白湯）では、LC RT-PCR 法と培養法は高い相関を示したことから、フィールドにおける白湯への利用の可能性が考えられた。

また、簡便な 1-STEP LC RT-PCR 法は培養法に対する相関が従来の 2-STEP LC RT-PCR 法と同程度であったことから、1-STEP LC RT-PCR 法に切り替えを考えたい。

LC RT-PCR 法は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。

A. 研究目的

昨年度に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）を検討したところ、標準菌液による検量線は良好な直線性を示し（ $R^2=1$ ）、再現性にも問題がなかった。また、浴場施設から採取した浴場水に対して LC RT-PCR 法と培養法を行ったところ、2 法の相関は  $R^2=0.6877$  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。反応を阻害する要因を取り除ければ、LC RT-PCR 法は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。

そこで、今年度は LC RT-PCR 法の反応を阻害する要因の究明と LC RT-PCR 法の手法の検討を行った。

B. 研究方法および材料

1. レジオネラ検査

(1) 試料の濃縮

「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（以下 22 年度報告書）」のとおり。

(2) 雑菌処理

22 年度報告書のとおり。

(3) 平板培養法

22 年度報告書のとおり。

#### (4) LC RT-PCR 法

##### (ア) 前培養に用いる液体培地の作製

22 年度報告書のとおり。

##### (イ) 前培養

22 年度報告書のとおり。

##### (ウ) RNA 抽出

22 年度報告書のとおり。

##### (エ) LC RT-PCR 測定

鳥谷の方法に準じる。2STEP 法（従来法）及び 1STEP 法（簡便法）で RT-PCR 法を行った。検出限界値は 20cfu/100ml。

#### 2. 検量線用標準菌液

22 年度報告書のとおり。

#### 3. レジオネラ以外の検査

一般細菌、従属栄養細菌、過マンガン酸カリウム (KMnO<sub>4</sub>) 消費量、総有機物量 (TOC)、色度、濁度、金属類 (Fe、Mn、Zn、Cu 等)、アンモニア性窒素、亜硝酸性窒素、硝酸性窒素、pH、遊離残留塩素、結合残留塩素：水道法告示法に準じた。

腐植質（フミン質）：衛生試験法に準じた。

ATP：ルミノメーター UNG3 (3M 社製) の説明書のとおり。

#### 4. 培養法 (+)、LC RT-PCR 法 (-) 試料の詳細な水質検査

##### (1) 試料

昨年度に検討を行った際に、培養法 (+)、LC RT-PCR 法 (-) となった試料が 2 試料存在した。培養法 (+)、LC RT-PCR 法 (-) を示した原因を探るため、再度採水を行った。この 2 試料は異なる温泉利用施設の浴槽水（塩化物泉 (A 試料)、炭酸水素塩泉 (B 試料)) でフミン質（腐植質）が多い特徴があった。

##### (2) 培養法 (+)、LC RT-PCR 法 (-) の確認

2 試料について培養法と LC RT-PCR 法を用いてレジオネラ検査を行ったところ、培養法で検出されなかったため、浴槽水由来の *Legionella pneumophila* SG1 を添加して再度測定を行ったところ、培養法で 2 試料とも 1,200cfu/100ml が検出されたが、LC RT-PCR

法では不検出 (20cfu/100ml 未満) であった。

##### (3) 水質検査

3. に示した検査項目を行った。これらの項目のうち、pH、遊離残留塩素、結合残留塩素は現場で測定を行った。

##### 5. 阻害物質の絞込み

4. (3) の結果から、LC RT-PCR 法を阻害していると考えられる物質を絞り込み、調整試料で阻害の有無を確認した。

##### (1) 調整試料水

PCR 法でレジオネラ属菌が不検出 (10 cfu/100ml 未満) であることを確認し、0.22 μm でろ過した温泉水（腐植質 18mg/l、色度 90 度、残留塩素は 0.05mg/l 未満）及び 0.22 μm でろ過した後、一晚紫外線照射した水道水（残留塩素は 0.05mg/l 未満に減少）。

##### (2) 添加物質

###### (ア) レジオネラ

浴槽水由来の *Legionella pneumophila* SG1 を (1) に添加し、 $1 \times 10^1$  及び  $1 \times 10^3$  cfu/100ml の 2 種類の濃度に調製した。培養後の実濃度はそれぞれ 10、1100cfu/100ml であった。

###### (イ) 細菌

浴槽水由来の従属栄養細菌を用いて (1) に添加し、 $1 \times 10^7$  cfu/ml に調製した。

###### (ウ) 濁質

水道法の標準物質であるポリスチレンを用いて (1) に添加し、濁度 5 度に調製した。

##### (3) 方法

###### LC RT-PCR 法

#### 6. LC RT-PCR 法の 2-STEP 法（従来法）及び 1-STEP 法（簡便法）の比較

##### (1) 試料

水道水を原水とした浴槽水（白湯）10 試料。

##### (2) 添加物質

浴槽水由来の *Legionella pneumophila* SG1 を (1) に添加後 0、10、100 cfu/ml の 3 種類の濃度に調製した。それぞれを無添加群、

10 cfu/ml 添加群、100 cfu/ml 添加群とした。

### (3) 方法

2-STEP 法（従来法）及び 1-STEP 法（簡便法）を用いた LC RT-PCR 法

## C. 結果と考察

### 1. 培養法 (+)、LC RT-PCR 法 (-) 試料の詳細な水質検査

#### (1) 結果

結果を表 1 に示した。金属類のうち、水道法水質基準値に達した項目はなかった。一方、有機物量を示す項目 (KMnO<sub>4</sub> 消費量、TOC、フミン質) や細菌項目 (一般細菌、従属栄養細菌、ATP)、色度、濁度が 2 試料とも高い値を示した。また、アンモニア性窒素は B 試料のみ検出された。

#### (2) 考察

KMnO<sub>4</sub> 消費量、TOC、ATP は従属栄養細菌が 10<sup>5</sup>cfu/100ml 及びフミン質が 10<sup>1</sup>mg/l 検出されているためと考えられた。また、色度はフミン質により高くなったと考えられた。

A、B 試料に共通に高い値を示し、LC RT-PCR 法を阻害したと考えられる物質は、従属栄養細菌、フミン質、濁質が考えられた。

### 2. 阻害物質の絞込み

#### (1) 結果

結果を表 2 に示した。水道水を調製試料水に用いた場合、培養法と LC RT-PCR 法のレジオネラの検出値はほぼ一致しており、濁質を添加しても変化がなかった。しかし、従属栄養細菌を添加した場合、LC RT-PCR 法の値が著しく減少し、培養法の 10~40%を示した。一方、温泉水を調製試料水に用いた場合、細菌や濁質を添加しなくても、培養法に比較して LC RT-PCR 法のレジオネラの検出値は約 50%であった。これに濁質を添加すると LC RT-PCR 法の検出値は培養法の 20~30%に減少し、従属栄養細菌を添加すると、検出できなくなった。

#### (2) 考察

LC RT-PCR 法の阻害物質として疑われた従属栄養細菌、フミン質、濁質のうち、単品で添加した場合、従属栄養細菌及びフミン質に阻害が生じた。しかも、フミン質を含む温泉に従属栄養細菌を添加すると、全くレジオネラを検出できなかった。LC RT-PCR 法は液体培地による前培養を行う必要があり、この前培養の段階でレジオネラの増殖が従属栄養細菌で阻害されている可能性が考えられた。

### 3. LC RT-PCR 法の 2STEP 法（従来法）及び 1STEP 法（簡便法）の比較

#### (1) 結果

結果を表 3 に示した。

#### (2) 考察

2-STEP 法（従来法）と培養法の相関をみると (図 1)、 $y = 0.9994x + 1.1058$ 、 $R^2 = 0.9992$  で高い相関を示した。同様に、1-STEP 法（簡便法）と培養法の相関をみると (図 2)、 $y = 1.0551x + 4.1859$ 、 $R^2 = 0.9972$  で高い相関を示した。

1-STEP 法（簡便法）と培養法の相関は、2-STEP 法（従来法）と同程度の値を示した。1-STEP 法（簡便法）は 2-STEP 法（従来法）より簡便であるため、今後、1-STEP 法（簡便法）への切り替えを考えたい。

## D. まとめ

LC RT-PCR 法はフミン質、細菌（従属栄養細菌）を多量に含むと阻害を受けた。しかし、低フミン質、低細菌の試料（水道水を原水とする白湯）では、LC RT-PCR 法と培養法は高い相関を示したことから、フィールドにおける白湯への利用の可能性が考えられた。

また、簡便な 1-STEP LC RT-PCR 法は培養法に対する相関が従来の 2-STEP LC RT-PCR 法と同程度であったことから、1-STEP LC RT-PCR 法に切り替えを考えたい。

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。