

図6 浴槽水中のジハロアセトニトリル類濃度
施設Aについては何れの期間も不検出であった。

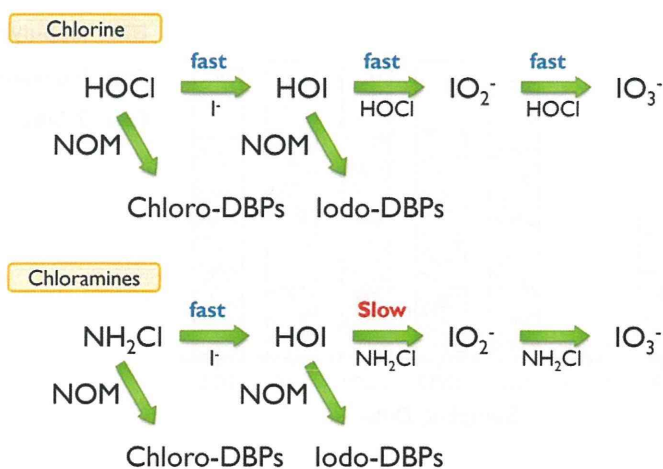


図7 塩素及びモノクロアミンによるヨウ化物イオンの酸化とヨウ素化消毒副生成物の生成
NOM, Natural Organic Matter; DBP, Disinfection By-products

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 細菌第一部 主任研究官

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生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
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	八木田 健司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	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
	吉崎 美和	タカラバイオ（株）ドラゴンジェノミクスセンター

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の開発を目指し、液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（以下、LC RT-qPCR 法）の改良を行った。夾雑菌による液体培養でのレジオネラ増殖抑制を回避するため、検水濃縮液の ATP 量に応じて前処理を追加・変更する手順を定めた。また、温泉成分等による RT-qPCR 反応阻害を回避するため、RNA 抽出液及び RT-qPCR 反応液に阻害回避試薬を加えること等の改良を行い、偽陰性反応の低減に成功した。改良 LC RT-qPCR 法を実試料で評価した結果、培養前の定量値から算出する Total Legionella（死菌＋生菌）は、平板培養法と比較して感度 90.0%、特異度 81.9%であったが、液体培養後の定量値から算出する Viable Legionella は、感度 83.3%、特異度 96.6%であり、生菌に対する特異性が極めて高い方法であることを明らかにした。平板培養法と LC RT-qPCR 法の定量値は高い相関を示し（ $R^2=0.80$ ）、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

入浴施設の浴槽水等を対象としたレジオネラ属菌生菌迅速検査法を開発するため、濃縮検水を液体培地で 1 夜培養し、培養後の rRNA 増加量を RT-qPCR で定量する（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法の検討を進めている¹⁻⁴⁾。昨年度までの検討により、迅速、簡便、安価でかつ定量性に優れた 1 step RT-qPCR の系を作成した。また、レジオネラ 5S rRNA を組み込んだ transcript RNA を用い、

Legionella pneumophila 1 CFU 当たりの 5S rRNA コピー数を明らかにし、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。一方、昨年度までの課題として、微生物汚染の激しい検体で液体培養時の増殖抑制や、RT-qPCR 反応阻害が明らかとなり、検水の ATP 量を指標に前処理を変更することや、rRNA 抽出時に反応阻害回避試薬を加えることなどの改善策を提案した。今年度は、これらの改善策の妥当性を検証するとともに

に、さらにいくつかの改良を加え、生菌迅速検査法として LC RT-qPCR 法の完成に向けた評価を行ったので、その概要を報告する。

B 研究方法及び検査材料

1 レジオネラ属菌平板培養検査

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 600ml をポリカーボネートフィルター（孔径 0.2 μ m、直径 47mm、ADVANTEC）でろ過し、滅菌蒸留水 6ml 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（日本ビオメリュー）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）

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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検体については、酸処理時間を 20 分に延長したものと 100 倍濃縮液を同時に培養した。

(4) 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 8% Chelex 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 5% Chelex、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。

(5) RT-qPCR

Diederer ら⁵⁾の 5S rRNA を標的とした qPCR を 1 step RT-qPCR に改良して用いた。すなわち、プライマーは 5S1 (ACTATAGCGATTTGGAACCA)、5S2 (GCGATGACCTACTTTCGCAT)、プローブは Leg5S (FAM-CCGCGCCAATGATAGTGTGAG GC-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、反応液中にタカラバイオから提供を受けた阻害回避試薬 Solution E を 1/10 量添加した。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 $^{\circ}$ C 5 分、95 $^{\circ}$ C 10 秒の後、95 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒を 45 サイクル行った。

(6) 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。

(7) コピー数から CFU への換算と評価方法

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。

生菌定量値「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) とした。

LC RT-qPCR 法による生菌の有無は、Ct (18h) が Ct (0h) に比較して 1 以上低下し、かつ生菌定量値「Viable Legionella」が 2 CFU/100ml 以上の場合に陽性と判定した。

「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。なお、Ct(18h) と Ct (0h) の差が 1 未満であり、かつ生菌下限値が 2 CFU/100ml 以上の検体については偽陰性の可能性が否定できないため、判定保留とした。

3 微生物汚染による液体培養抑制及びフミン酸等による RT-qPCR 反応阻害の改善に関する検討

(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

5μm 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。

(2) 液体培養でのレジオネラ増殖に与える前処理の影響

アメーバ培養レジオネラを 1/50 PBS で希釈した菌液 500μl に次の①~④の操作を加えた後、100μl を BCYE α 平板培地 (日本ビオメリユール) 2 枚に塗布し、36°C 5 日間培養後のコロニー数をカウントした。同様に、各処理後の 100μl に MWY 液体培地を 900μl 加えて 18 時間培養後の 5S rRNA コピー数を RT-qPCR で測定した (図 2、いずれも n=2)。

- ①酸処理 5 分：菌液 500μl に酸処理液 500μl を加えて室温で 5 分間静置
- ②酸処理 20 分：菌液 500μl に酸処理液 500μl を加えて室温で 20 分間静置
- ③熱処理：菌液 500μl を 50°C で 20 分間加熱
- ④熱酸処理：菌液 500μl を 50°C で 20 分間加熱後、酸処理液 500μl を加えて室温で 5 分間静置

(3) キレックス処理の効果

アメーバ培養レジオネラを MWY 液体培地で 18 時間培養後、その 50μl をマイクロチューブに分取し、RNA 抽出バッファー 150μl を加えて終濃度 0.1M NaCl、0.5% Triton X-100、5mM Dithiothreitol となるように調整することを基本とし、Proteinase K あるいは Chelex 処理の有無等の条件を変えて RNA を抽出し、抽出液の 5S rRNA コピー数を RT-qPCR で測定した (図 2、いずれも n=3)。

- ①RNA 抽出バッファーに 0.1mg/L の Proteinase K を添加
- ②RNA 抽出バッファーに 0.1mg/L の Proteinase K

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

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

$$= \frac{\text{時間培養後の検水 中の コピー数}}{\text{(時間培養後の 当たりの コピー数)}} - \frac{\text{検水 中の コピー数}}{\text{(当たりの コピー数)}}$$

$$*3 \text{ 生菌下限値 (CFU/100ml)} = \frac{\text{検水 中の コピー数}}{\text{(当たりの コピー数)}}$$

及び5%Chelex を添加

③RNA 抽出バッファーに5%Chelex を添加

④①の RNA 抽出バッファーを55°C、30 分間熱処理後の遠心上清50µl に6% Chelex 200µl を添加

⑤①の RNA 抽出バッファーを55°C、30 分間、75°C、5 分間熱処理後の遠心上清50µl に6% Chelex 200µl を添加

(4) フミン酸による RT-qPCR 反応阻害対策

不溶性フミン酸(和光純薬)をアルカリ溶解後に pH 7.4 に調整し、終濃度 3.2 mg/L~0.05 mg/L の範囲になるように2段階希釈を行った。それぞれの系列に、 10^3 コピー及び 10^5 コピーの合成 5S rRNA を添加し、RT-qPCR キット(TAKARA、RR064)でコピー数を測定した。RT-qPCR による回収率の低下が認められた濃度をフミン酸の MIC (最少阻害濃度)とした。阻害回避試薬の検証には、RT-qPCR チューブ当たり合成 5S rRNA 10^5 コピー、フミン酸 12.8 mg/L~0.8 mg/L となるように2段階希釈系列を作成し、Solution E 及び Zymo-Spin カラムを使用した場合の MIC を算出した。Zymo-Spin カラム処理は、OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO RESEARCH) をマニュアル通り用いて RNA 抽出液を処理した。

(5) 微生物汚染検体を用いた RT-qPCR 反応阻害対策の比較

RT-qPCR 反応阻害が確認された微生物汚染検体(ろ過器逆洗水、pH 8.3、ATP 16,450 RLU/10ml、従属栄養細菌数 8.1×10^6 CFU/ml、レジオネラ属細菌数 3,100 CFU/100ml)を試料として用いた。RNA 抽出時の Chelex 及び RT-qPCR 反応時の Solution E を添加しない LC RT-qPCR をコントロールとし、Chelex あるいは Solution E を使用した場合の 5S rRNA コピー数を算出した。

4 検査材料及び検査方法

平成 24 年度に調査を行った入浴施設から 154 件(浴槽水 129 件、原水 18 件、ろ過器逆洗水 7 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。

一般細菌数は標準寒天培地で 36°C 2 日間培養後、従属栄養細菌数は R2A 寒天培地で 42°C 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 微生物汚染による液体培養抑制及びフミン酸等による RT-qPCR 反応阻害の改善に関する検討
(1) 液体培養でのレジオネラ増殖に与える前処理の影響

アメーバ培養菌に対する前処理の影響を確認するため、①酸処理 5 分、②酸処理 20 分、③熱処理(50°C 5 分)、④熱酸処理(50°C 5 分後、酸処理 5 分)の前処理を行い、平板培養により出現するコロニー数を比較した。その結果、①酸処理 5 分が 130 CFU/100µl と最も高値を示したのに対し、②酸処理 20 分では 77%、③熱処理及び④熱酸処理は 65%前後に低下したが、有意な低下ではなかった(図 1(1)、t 検定により棄却)。一方、液体培養 18 時間培養後の 5S rRNA コピー数は、①酸処理 5 分が 10^6 copies/PCR tube と最も高値を示し、②酸処理 20 分では 78%に低下したのに対し(有意差なし)、③熱処理は 33%、④熱酸処理では 5%と有意に低下した(図 1(2)、t 検定 $P < 0.05$)。

(2) キレックス処理の追加条件の検討

抽出バッファーにキレックス処理を追加する際の最適化を行うため、Proteinase K あるいは Chelex 処理の有無等の条件を変えて RNA を抽出し、抽出液の 5S rRNA コピー数を RT-qPCR で測定した(図 2)。RNA 抽出の際の終濃度 0.1M NaCl、0.5% Triton X-100、5mM Dithiothreitol、0.1mg/ml Proteinase K とし、55°C 30 分、95°C 10 分の熱処理を行った場合の 5S rRNA コピー数を 100%とし、回収率を比較した。その結果、②5% Chelex を加えた場合、③5% Chelex を加えて Proteinases K を除いた場合の回収率はほぼ 100%であったが、

RNA 抽出操作後の希釈時に 5% Chelex 処理を行うと、回収率が低下する傾向がみられた。RNase 等の活性を抑えるため、②の抽出バッファーに Chelex を加える方法を採用することとした。

(2) RT-qPCR 反応阻害の回避

RT-qPCR 反応阻害の要因として、高度の微生物汚染とフミン酸等反応阻害物質の混入が挙げられる。高度の微生物汚染により RT-qPCR 反応阻害が認められたろ過器逆洗水を使用し、阻害回避試薬等の効果を検証した。RT-qPCR 反応液への Solution E の添加及び RNA 抽出液の Zymo-Spin カラム処理では、いずれの方法でも培養前後ともに改善効果は認められなかった。一方、RNA 抽出液に終濃度 5% の Chelex を添加した場合には、コントロールと比較して、培養前検体で 10 倍、培養後検体で 40~50 倍程度の感度増加が認められた (図 3)。

また、フミン質が含まれた温泉水では、qPCR 反応が阻害されることが知られている。そこで、RT-qPCR キット (TAKARA、RR064) におけるフミン酸の MIC 値を算出し、各阻害回避試薬の効果を検証した。RT-qPCR 反応液中のフミン酸最終濃度 1.6 mg/L で 5S rRNA の回収率が 1/3~1/4 に低下したことから、当該キットにおけるフミン酸の MIC は 1.6 mg/L と考えられた (図 4)。一方、RT-qPCR 反応液中に Solution E を添加した場合の MIC は 3.2 mg/L に上昇し、当該試薬の阻害回避効果が確認できた。RNA 抽出液を Zymo-Spin カラムに通した場合は、終濃度 12.8 mg/L でも反応阻害は認められず、高い阻害回避効果が確認できた (図 5)。

以上の検討から、塩素消毒を行っていない掛け流し式温泉や、配管・ろ過器洗浄水など高度の微生物汚染が想定される検体では、酸処理時間を 5 分から 20 分に延長し、1000 倍濃縮液に加えて 100 倍濃縮液も評価することとした。また、RNA 抽出時には終濃度 5% となるように Chelex 樹脂を添加し、Solution E を含んだ RT-qPCR 反応液を使用することとした。

3 浴槽水等における検査結果

平成 24 年度に採取した検水 154 件について、平板培養法と LC RT-qPCR 法の定量値を比較した (図 6、表 1)。平板培養法では 39.0% (60/154) がレジオネラ陽性 (10 CFU/100ml 以上) であったのに対し、LC RT-qPCR 法 Total Legionella (生菌+死菌) は 46.1% (71/154) が陽性 (10 CFU/100ml 以上) であり、LC RT-qPCR 法 Total Legionella の平板培養法に対する感度は 90.0%、特異度は 81.9%であった (表 1 (1))。一方、LC RT-qPCR 法 Viable Legionella (生菌) では、大量のレジオネラ死菌由来の 5S rRNA が検出された 18 件については、生菌由来の rRNA の増加が検出できない可能性があるため判定保留とし、残りの 136 件について平板培養法の結果と比較した。平板培養法では 35.3% (48/136) がレジオネラ陽性 (10 CFU/100ml 以上) であったのに対し、LC RT-qPCR 法 Viable Legionella (生菌) は 31.6% (43/136) が陽性 (2 CFU/100ml 以上) であり、LC RT-qPCR 法 Viable Legionella の平板培養法に対する感度は 83.3%、特異度は 96.6%であった (表 1 (2))。平板培養法と LC RT-qPCR 法の定量値を比較すると、Total Legionella (近似曲線の傾き 0.92、 $R^2=0.63$)、Viable Legionella (0.93、 $R^2=0.80$) のいずれも平板培養法と良好な相関を示し、平板培養法の結果を精度良く予測可能なことを明らかにした (図 6)。

なお、判定保留とした 18 件中 12 件 (66.7%) が平板培養法陽性であり、LC RT-qPCR 法 Total Legionella 定量値は 100~13,000 CFU/100ml、平板培養法定量値は 10~5,300 CFU/100ml と多様であった (表 2)。

4 平板培養法と LC RT-qPCR 法の不一致例の内訳 (表 3)

平板培養法陽性かつ LC RT-qPCR 法陰性 (偽陰性) 8 件のうち、平板培養法 200 CFU/100ml のレジオネラが検出された No.1 は、*L. pneumophila* SG6、SG8 や *L. dumoffii* が分離されていたが、ATP

が30,538 RLU/10mlと高度な微生物汚染が示唆されたこと、白濁の強い温泉水であったことなどから、RT-qPCR 反応の特異性による偽陰性ではなく、液体培養抑制あるいは RT-qPCR 反応阻害の可能性が考えられた(表 3-1)。また、40 CFU/100ml のレジオネラが検出された No.2 は、血清群不明の *L.pneumophilla* が分離され、ATP が 637 RLU/10ml、従属栄養細菌数 6.2×10^4 CFU/ml と微生物汚染の進んだ逆洗水であり、液体培養抑制あるいは RT-qPCR 反応阻害の可能性が考えられた。他の 6 検体は 30 CFU/100ml 以下の低濃度汚染検体であった(表 3-1)。

また、平板培養法陰性かつ LC RT-qPCR 法陽性(偽陽性)となった 2 件の内訳は、18 時間培養後の Ct 値が 32 程度と明らかに低下しており、微量のレジオネラ生菌が存在した可能性が示唆された(表 3-2)。

D 考 察

我々は、液体培養(Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法(LC RT-qPCR) に様々な改良を加え、簡便かつ再現性に優れたレジオネラ生菌迅速検査法を開発した。

本法は、鋳型量が豊富な 5S rRNA そのものを標的とする高感度な RT-qPCR をベースに開発を進め、カラム精製の不要な簡便な操作で検体の調整を可能としている。また、濃縮検体を液体培地で一夜(18 時間) 培養し、rRNA の増加量から生菌の有無と生菌数を定量するため、本法で陽性と判定された検体のほとんどが平板培養法でも陽性であり、平板培養法の結果を事前に予測する極めて特異性の高い検査法であることを明らかにしている。

しかし、その一方で、微生物汚染の激しい検体(塩素消毒を行っていない掛け流し式温泉や配管・ろ過器洗浄水等)で、液体培地中のレジオネラ属菌の増殖が競合的に抑制される場合や、増加した夾雑菌による RT-qPCR 反応阻害が原因とみられる偽陰性が発生し、その対策が必要となった。

今年度は、検水の ATP 量を指標に前処理を選択する手順を具体的に定めることで、液体培養時のレジオネラ増殖抑制をできるだけ低減させることを試みた。また、RNA 抽出液への Chelex 樹脂の添加や、RT-qPCR 反応液への阻害回避試薬 Solution E の追加などの改良により、偽陰性反応の低減に成功し、温泉を利用した浴槽水にも適用可能な迅速検査法を確立した。改良 LC RT-qPCR 法を実試料で評価した結果、培養前の定量値から算出する Total Legionella(死菌+生菌)は、平板培養法と比較して感度 90.0%、特異度 81.9%であったが、液体培養後の定量値から算出する Viable Legionella は、感度 83.3%、特異度 96.6%と、生菌に対する特異性が極めて高い方法であることを明らかにした。平板培養法と LC RT-qPCR 法の定量値は高い相関を示し($R^2=0.80$)、施設の汚染状況を迅速に評価できると考えられた。

一つの問題点としては、LC RT-qPCR 法が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、rRNA の増加を上回る大量の死菌があらかじめ存在する検体では、生菌としての検出が不可能となることである。しかし、LC RT-qPCR 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 のほか、「判定保留」の基準を設けて生菌検出下限値を明示し、生菌の存在が否定できないという注意喚起に利用することを提案した。判定保留すなわち大量の死菌検出は、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ており、これを潜在的なハイリスクとして捉え、洗浄等の対策を講じる指標に活用することで、生菌汚染や事故発生を未然に防ぐ管理技術の向上に貢献できるものと考えられる。

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。

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数を迅速に評価可能な液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（LC RT-qPCR）の改良を行った。本法の評価を実試料で行ったところ、培養前の定量値から算出する Total Legionella（死菌＋生菌）は、平板培養法と比較して感度 90.0%、特異度 81.9%であったが、液体培養後の定量値から算出する Viable Legionella は、感度 83.3%、特異度 96.6%と、生菌に対する特異性が極めて高い方法であることを明らかにした。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) 「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
- 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、研究代表者 倉 文明、平成 21 年度総括・分担研究報告書
- 3) 「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
- 4) 「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 23 年度総括・分担研究報告書
- 5) Diederens BM et al., Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila*

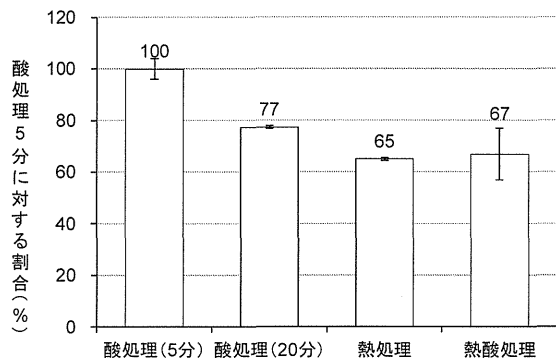
DNA in serum samples. J Med Microbiol. 2007 Jan; 56(1): 94-101

F 論文発表

なし

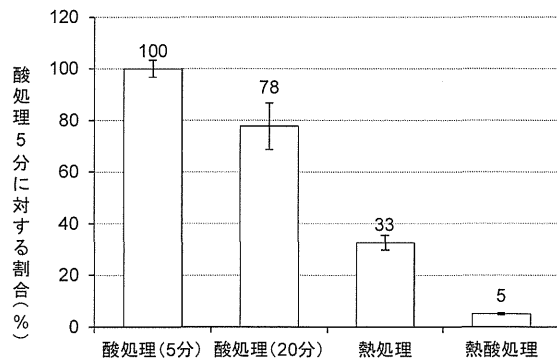
G 知的財産権の出願・登録状況

なし



(1) 前処理直後の菌数低下

アメーバ培養菌液・酸処理 5 分後の菌数 (130 CFU/100 μ l) を 100% とし、各処理直後の菌数を平板培養法で比較



(2) 18 時間液体培養後のコピー数

アメーバ培養菌液・酸処理 5 分→18 時間液体培養後の rRNA 量 (10⁶ コピー/PCR tube) を 100% とし、各処理後のコピー数を RT-qPCR 法で比較

図 1 液体培養でのレジオネラ増殖に与える前処理の影響

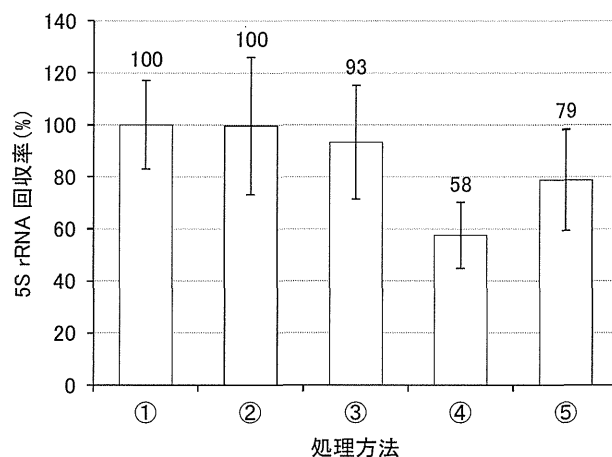
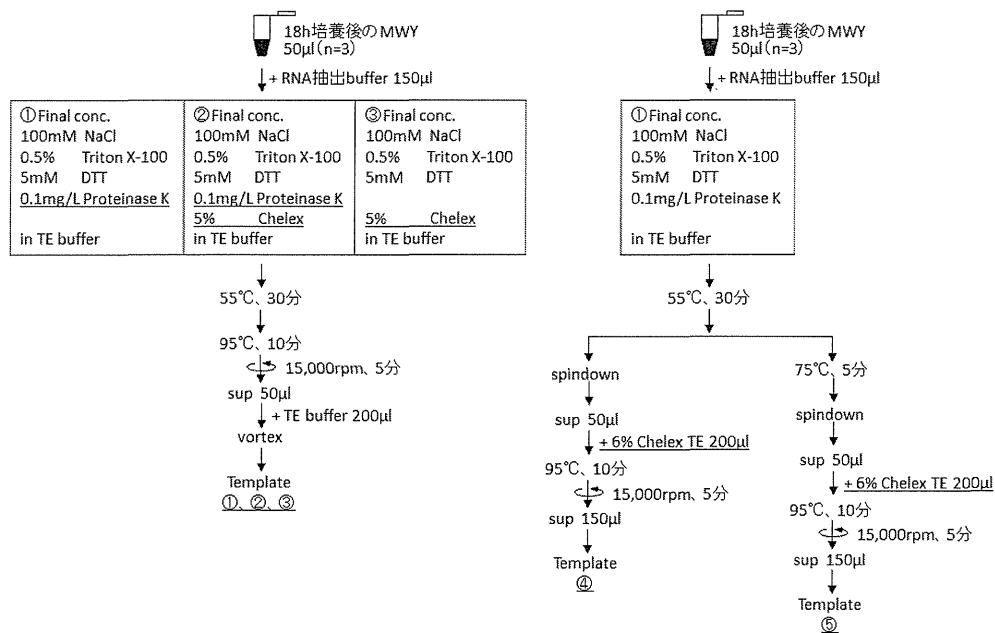


図 2 rRNA 抽出方法の検討 (アメーバ培養レジオネラにおける 5S rRNA コピー数)

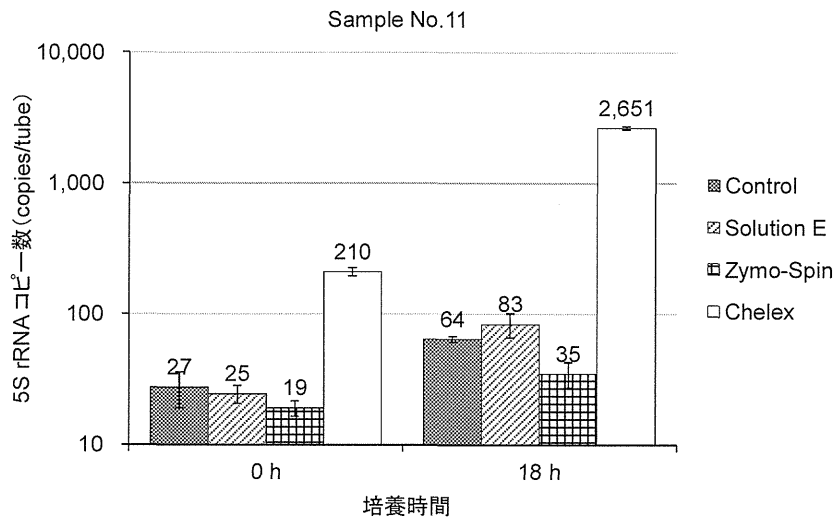


図3 微生物汚染検体における LC RT-qPCR 反応の阻害回避効果

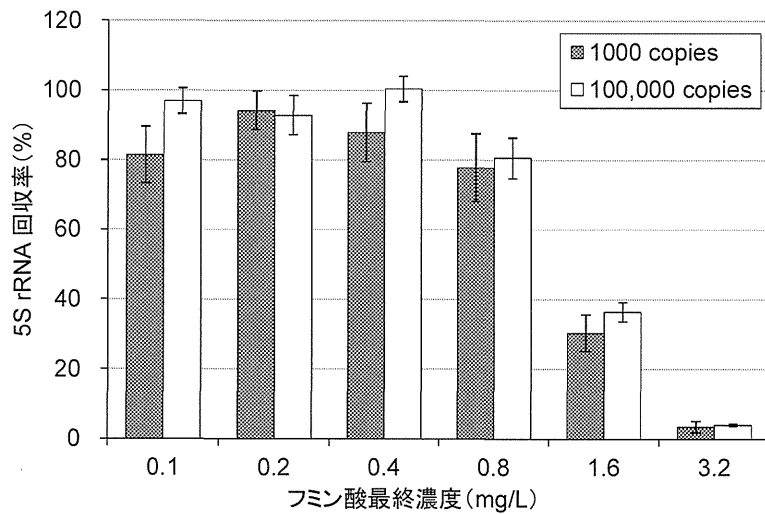


図4 RT-qPCR キット (TAKARA、RR064) におけるフミン酸の MIC 値

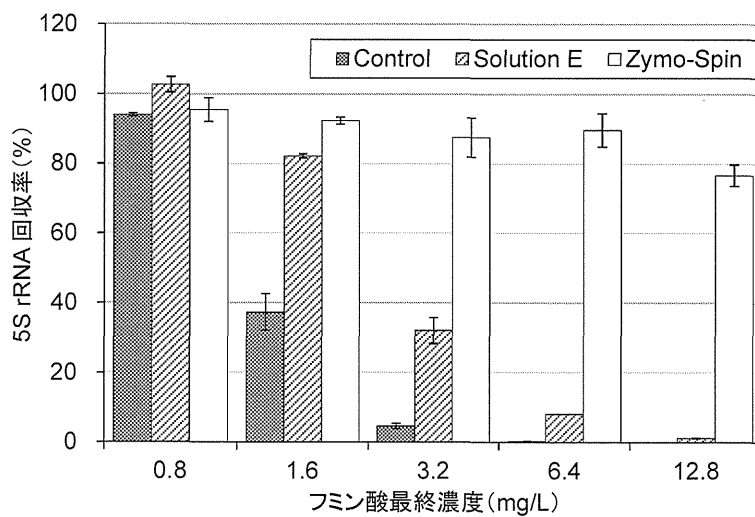
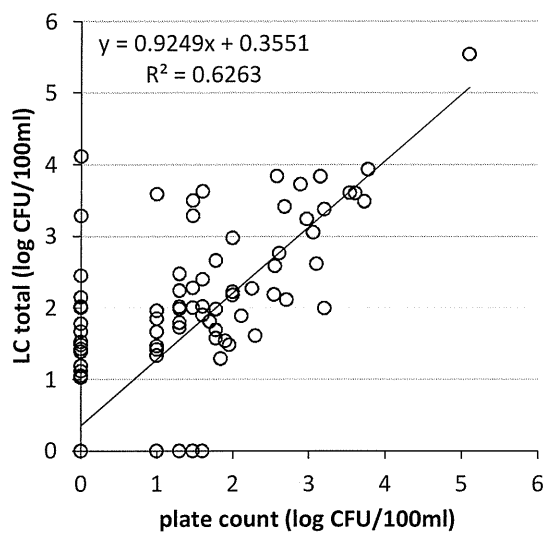
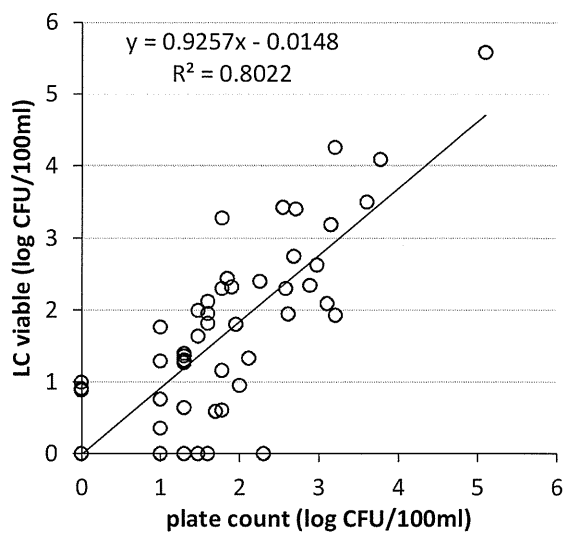


図5 RT-qPCR 阻害回避試薬の効果



(1) LC 法 Total Legionella (n=154)



(2) LC 法 Viable Legionella (n=136)

判定保留の 18 件を除く

図 6 平板培養法と LC RT-qPCR 法との比較

表 1 平板培養法と LC RT-qPCR 法との比較

(1) Total Legionella (総菌)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
LC法 Total Legionella	≥ 10	54	17	71
	< 10	6	77	83
計		60	94	154

感度 90.0% 特異度 81.9%

(2) Viable Legionella (生菌)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
LC法 Viable Legionella	≥ 2	40	3	43
	< 2	8	85	93
計		48	88	136

感度 83.3% 特異度 96.6%

表2 LC RT-qPCR 法 Viable Legionella 判定保留検体の内訳 (n=18)

No.	分類	水質		レジオネラ属菌 (CFU/100ml)	微生物汚染		LC RT-qPCR				備考
		湯温 (°C)	残塩 (mg/L)		ATP (/10ml)	HPC (CFU/ml)	Ct値		CFU/100ml		
							0h	18h	Total	Viable	
1	浴槽水	42.0	ND	5,300	1,610	NT	29.47	29.51	3,100	< 61	淡茶色 褐色 褐色 白濁++ 淡黄色
2	浴槽水	41.6	ND	3,400	4,178	NT	29.25	29.41	4,000	< 80	
3	浴槽水	41.4	0.2	1,140	172	NT	31.07	30.09	1,100	< 23	
4	浴槽水	42.3	ND	360	2,158	NT	32.61	31.62	380	< 8	
5	浴槽水	28.0	ND	100	1,769	NT	31.33	31.27	940	< 19	
6	浴槽水	41.4	ND	100	1,031	NT	33.54	33.56	170	< 3	
7	浴槽水	39.0	0.5	40	865	NT	29.19	29.23	4,200	< 84	
8	浴槽水	40.0	0.4	30	19	NT	29.97	30.07	3,100	< 63	
9	浴槽水	41.0	ND	30	11,674	NT	34.59	--	100	< 2	
10	浴槽水	41.0	1.0	20	7	2,300	32.80	31.86	300	< 6	
11	逆洗水	41.0	1.5	20	7	49	35.23	35.92	110	< 2	
12	浴槽水	26.0	2.0	10	120	NT	29.14	28.54	3,900	< 77	
13	浴槽水	38.5	0.1	< 10	1,099	NT	27.92	27.79	13,000	< 260	
14	原水	40.0	0.9	< 10	43	< 30	30.45	30.46	1,900	< 39	
15	浴槽水	42.0	0.5	< 10	117	NT	32.80	32.23	280	< 6	
16	浴槽水	42.1	0.2	< 10	16	70	33.85	34.81	140	< 3	
17	浴槽水	42.0	0.2	< 10	4	< 30	35.13	35.06	130	< 3	
18	原水	54.3	0.7	< 10	14	< 30	34.70	34.24	100	< 2	

表3-1 平板培養法と LC RT-qPCR 法の不一致例の内訳 (偽陰性検体、n=8)

No.	分類	水質		レジオネラ属菌 (CFU/100ml)	微生物汚染		LC RT-qPCR				備考
		湯温 (°C)	残塩 (mg/L)		ATP (/10ml)	HPC (CFU/ml)	Ct値		CFU/100ml		
							0h	18h	Total	Viable	
1	浴槽水	40.6	ND	200	30,538	NT	35.85	34.98	41	< 2	白濁+++ 黄色 黄 淡茶色
2	逆洗水	20.0	0.6	40	637	62,000	--	--	< 10	< 2	
3	原水	26.0	ND	30	75	65	--	--	< 10	< 2	
4	浴槽水	43.0	ND	20	347	NT	--	37.14	< 10	< 2	
5	浴槽水	41.0	0.1	10	48	NT	35.64	34.64	46	< 2	
6	原水	42.4	0.5	10	6	< 30	36.32	35.95	26	< 2	
7	浴槽水	41.6	0.2	10	13	NT	--	--	< 10	< 2	
8	浴槽水	42.0	0.5	10	8	NT	--	36.61	< 10	< 2	

表3-2 平板培養法と LC RT-qPCR 法の不一致例の内訳 (偽陽性検体、n=3)

No.	分類	水質		レジオネラ属菌 (CFU/100ml)	微生物汚染		LC RT-qPCR				備考
		湯温 (°C)	残塩 (mg/L)		ATP (/10ml)	HPC (CFU/ml)	Ct値		CFU/100ml		
							0h	18h	Total	Viable	
1	浴槽水	39.3	1.0	< 10	7		--	32.26	< 10	10	褐色
2	浴槽水	40.5	1.3	< 10	5	79	38.38	32.43	< 10	8	
3	浴槽水	39.5	1.3	< 10	10	1,900	38.79	32.36	< 10	8	

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 細菌第一部 主任研究官

分担研究報告書

液体培養（Liquid Culture）EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生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
	荒井 桂子	横浜市衛生研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター
	八木田 健司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	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
	吉崎 美和	タカラバイオ（株）ドラゴンジェノミクスセンター

研究要旨

液体培養（Liquid Culture）EMA-qPCR 法（LC EMA-qPCR）を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討を行った。新規 16S rRNA 遺伝子検出系の検出感度は、レジオネラ標準菌（*Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株）0.5 CFU/PCR tube 以上であり、*L. cherrii* 及び *L. oakridgensis* を除く 47 種のレジオネラ属菌はすべて検出可能であることを確認した。新規 16S rRNA 遺伝子検出系を用いてレジオネラ標準菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子コピー数は、DNA 抽出にカラム精製法を用いた場合、抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 15 コピー、簡易熱抽出法では 23 コピーと算出された。レジオネラ標準菌を用いて LC EMA-qPCR を行った場合、1 CFU 当たりの 16S rRNA 遺伝子コピー数は、液体培養前 12 コピー、18 時間培養後 270 コピー、18 時間培養 EMA 処理後 100 コピーと見積もられ、これをコピー数から CFU に換算するための係数とした。浴槽水等の実試料 113 件を用いて LC EMA-qPCR 法の評価を行った結果、カットオフ値を 5 CFU/100ml 相当に設定した場合の感度は 95.5%、特異度は 75.4% であり、得られる定量値は、EMA 処理による死菌増幅抑制効果により、平板培養法と高い相関を示した ($R^2=0.627$)。本法は、簡便な操作で平板培養法の結果を迅速に予測可能であり、浴槽水等におけるレジオネラ生菌遺伝子検査法としての活用が期待される。

A 研究目的

病原微生物の生菌迅速検査法として、死菌由来 DNA を EMA（Ethidium monoazide）で修飾して PCR 増幅を抑制し、生菌由来 DNA のみを選択的に検出する EMA-qPCR 法が開発され¹⁻⁵⁾、種々の

病原微生物に対する市販キットが発売されている。環境水中のレジオネラ属菌検出用に至適化されたキットも既に存在するが、操作が煩雑なうえ、塩素消毒による死菌量の大小あるいは膜の損傷の程度により EMA の必要量が異なる等の問題が

あり、安定した結果を得るための改良が望まれているところである。

一方、我々は既に、原理の異なる生菌迅速検査法として、濃縮試料を液体培地に加えて18時間培養し、rRNAの増加量を評価することで生菌の有無及び生菌量を測定するLC RT-qPCRを開発した⁵⁻⁷⁾。本法でrRNAの増加が認められた検体は、ほとんどが平板培養法でレジオネラが検出され、極めて特異度の高い方法であることを明らかにしている。しかし、大量のレジオネラ死菌が存在する検体では、数個の生菌によるrRNAの増加を検出することができず、判定保留となることが欠点である。

今回、2つの方法を組み合わせ、液体培養後の試料にEMA処理を施すことにより、生菌を選択的に検出するキットが開発され、実試料で改良する機会を得たので、その成績を報告する。

B 研究方法及び検査材料

1 レジオネラ属菌標準菌液の作成

本研究班で標準菌株として使用している *Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株の平板培養菌とアメーバ培養菌を作成し、レジオネラ属菌標準菌の希釈系列を作成した。

平板培養菌は、標準菌株を BCYE α 寒天培地上で 30°C 4 日間培養し、培地上に発育した小さな単コロニーを生理食塩水に懸濁して McFarland 2 の菌液を調整し、そこから 10 倍希釈系列を作成した。

アメーバ培養菌は、*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。

EMA の効果を確認するための加熱死菌の調整は、アメーバ培養菌の希釈系列から 100 μ l をマイクロチューブに分取したものを、95°C 2 分間加熱後すみやかに冷却し、LC EMA-qPCR に供した。

2 希釈系列からの DNA の抽出

希釈系列からの DNA の抽出には、NucleoSpin Tissue XS (タカラバイオ、740901) 及びレジオネラ用 Lysis Buffer を用いた。

NucleoSpin Tissue XS を用いたカラム精製法は、マニュアルを一部変更して行った。すなわち、菌液 60 μ l に Buffer T1 160 μ l と Proteinase K 16 μ l を加えて 56°C 10 分間保温後、Buffer D3 を 160 μ l 加えて 70°C 5 分間保温し溶解反応を行った。エタノールを 160 μ l 加えて混和後、全量をカラムに添加し、11,000 \times g で 1 分間遠心してカラムに吸着させた後、Buffer B5 50 μ l でカラムを 2 回洗浄し (1 回目 11,000 \times g で 1 分、2 回目 11,000 \times g で 2 分)、最後に Buffer BE 25 μ l で 2 回溶出 (11,000 \times g で 1 分) して DNA を回収した。

Lysis Buffer を用いた簡易熱抽出法は、菌液 100 μ l を 13,000 \times g で 5 分間遠心した沈渣に Lysis Buffer を 50 μ l 加えて混和し、95°C で 10 分加温した。ボルテックス混合後、15,000rpm、4°C で 10 分間遠心し、氷上で 5 分間静置後、上清 25 μ l を DNA 溶液として回収した。

3 新規 16S rRNA 遺伝子検出系を用いた qPCR 反応及びコピー数の算出

(1) qPCR 反応

Legionella (16S rRNA 遺伝子) 検出キット (タカラバイオ) を用いた。すなわち、2 x Cycleave Reaction Mixture 12.5 μ l、5 x 16S Primer/Probe Mix 5 μ l、Solution E 2.5 μ l を加えて 20 μ l の反応液を調整し、DNA 抽出液 5 μ l を加えて全量を 25 μ l とし、qPCR 反応を行った (n=2)。測定機器は、Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ、

TP900) を使用し、反応条件は 95°C10 秒の後、95°C5 秒、55°C10 秒、72°C20 秒を 45 サイクル行った。

(2) コピー数の算出

キットに添付されたレジオネラ 16S rRNA 遺伝子標的領域を組み込んだプラスミド溶液 (16S Positive Control、 10^6 コピー/ μ l) の 5 μ l に 45 μ l の EasyDilution を加えてボルテックスし、 10^5 コピー/ μ l とした。以下、同様に 5 コピー/ μ l まで 10 倍希釈を行い、7 点の希釈系列を作成した。2 連で qPCR 反応を実施し、作成した検量線からコピー数を算出した。

4 16S rRNA 遺伝子検出系の特異性評価

レジオネラ属菌 49 種の標準菌株 74 株を純培養後、NucleoSpin Tissue (タカラバイオ、740952) を用いて DNA を抽出した。DNA 抽出液 (83~542 ng) を鋳型とし、*Legionella* (16S rRNA 遺伝子) 検出キットにて qPCR 反応を実施した。qPCR 定量値を鋳型 DNA 濃度で補正した後、*L. pneumophila* の平均定量値に対して相対化し、特異性を評価した。

5 レジオネラ属菌平板培養検査

レジオネラ症防止指針第 3 版に準じて実施した。即ち、検水を孔径 0.2 μ m のポリカーボネートフィルターでろ過し、100 倍濃縮液を調整した。100 倍濃縮液に等量の酸処理液 (0.2M HCl-KCl buffer、pH2.2) を加えて室温で 5~20 分間反応後、GVPC 寒天培地や WYO α 寒天培地等の選択培地 2 枚に 100 μ l ずつ塗布し、36°C で 7 日間培養した。

6 LC EMA-qPCR

タカラバイオが新たに開発した LC EMA-qPCR キットに改良を加えて用いた。概略を以下に示す。

(1) 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。

(2) 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た (0h LC)。残りの濃縮試料加 MWY 液体培地を 36°C で 18 時間静置培養後、ボルテックスで混合し、100 μ l \times 2 本をマイクロチューブに分取した (18h LC (-) 及び 18h LC (+))。

(3) EMA 処理

18 LC (+) に Solution A を 25 μ l、Solution B を 6.25 μ l 添加し、ボルテックスで混合後、遮光下、室温で 15 分静置した。その後、LED Crosslinker (タカラバイオ、#EM100 または #EM200) で 15 分間光照射を行った。

(4) DNA 抽出

0h LC、18h LC (+)、18h LC (-) を 15,000rpm で 5 分遠心し、上清を除去した。得られた沈渣に Lysis Buffer を 50 μ l 添加し、95°C で 10 分加温した。ボルテックス混合後、15,000rpm、4°C で 10 分間遠心し、そのまま氷上で 5 分間静置後、上清 25 μ l を DNA 溶液として回収した。

(5) qPCR 反応及びコピー数の算出

「3 新規 16S rRNA 遺伝子検出系を用いた qPCR 反応及びコピー数の算出」に従って実施した。

7 検査材料及び検査方法

平成 24 年度に調査を行った入浴施設から 113 件 (浴槽水 94 件、原水 16 件、逆洗水 3 件) の試料を採取し、平板培養法及び LC EMA-qPCR 法によりレジオネラ属菌数を算出した。LC EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌数への換算は、0h LC、18h LC (-)、18h LC (+) から検水 100ml 中の 16S rRNA 遺伝子コピー数を算出し、それぞれ 1 CFU 当たりのコピー数 (0h LC、12 コピー；18h LC (-)、270 コピー；18h LC (+)、100 コピー) で除して菌数 (CFU/100ml) とした。

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)

をマニュアルに従って使用した。検水 100 倍濃縮液に専用綿棒を浸して約 100 μ l を吸い取ったものを速やかに測定することで、検水 10ml 当たりの RLU 値とした。

C 結果

1 新規 16S rRNA 遺伝子検出系を用いたレジオネラ 1 CFU 当たりの 16S rRNA 遺伝子コピー数

Legionella (16S rRNA 遺伝子) 検出キット (タカラバイオ) と Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を使用し、3 施設で検量線の作成を行った。キットに添付されたレジオネラ 16S rRNA 遺伝子コントロールプラスミドの希釈系列を測定した結果、得られた検量線は、

$$\text{回帰式 } y = -3.036 + 39.984 (R^2 = 0.981)$$

で表される良好な直線性を示し、本キットでは 5 コピー/5 μ l \sim 5 \times 10⁶ コピー/5 μ l の範囲で定量可能であると考えられた (図 1)。

レジオネラ標準菌液 (*Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株) の希釈系列を用い、カラム精製法及び簡易熱抽出法の 2 種類のキットで抽出した DNA の検量線をそれぞれ作成した。いずれのキットも、3 施設で独立して菌液調整、DNA 抽出、検量線の作成を実施し、得られた結果について集計・解析を行った。

NucleoSpin Tissue XS を使用した場合の検量線は、0.5 CFU/5 μ l \sim 5 \times 10⁵ CFU/5 μ l の範囲で、

$$\text{回帰式 } y = -3.042 + 36.052 (R^2 = 0.973)$$

で表される良好な直線性を示した (図 2 (a))。プラスミドと抽出 DNA の回帰直線を比較すると、いずれも傾き -3.04 で平行関係にあり、両者の増幅効率に差がないことが示された (図 2 (b))。得られた切片の差が 3.932 (プラスミドの切片 39.984 と抽出 DNA の切片 36.052 の差) であったことから、30 $^{\circ}$ C 培養 4 日目の菌及びアメーバ培養菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子コピー数は、抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 15 コピー ($2^{3.932} = 15.3$) に相当するものと計算された。

LC EMA-qPCR に使用する Lysis Buffer についても同様の検討を行った。Lysis Buffer を使用した場合の検量線は、0.5 CFU/5 μ l でややばらつきがみられるものの、0.5 CFU/5 μ l \sim 5 \times 10⁵ CFU/5 μ l の範囲で、

$$\text{回帰式 } y = -3.230 + 35.475 (R^2 = 0.987)$$

で表される良好な直線性を示した (図 3 (a))。プラスミドと抽出 DNA の回帰直線を比較すると、抽出 DNA のほうがやや傾きが大きいもののほぼ平行関係にあり、両者の増幅効率に大きな差がないことが確認された (図 3 (b))。得られた切片の差が 4.509 (プラスミドの切片 39.984 と抽出 DNA の切片 35.475 の差) であったことから、Lysis Buffer を用いて 30 $^{\circ}$ C 培養 4 日目の菌及びアメーバ培養菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子コピー数は、抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 23 コピー ($2^{4.509} = 22.8$) に相当するものと計算された。

2 16S rRNA 遺伝子検出系の特異性評価

Legionella (16S rRNA 遺伝子) 検出キット (タカラバイオ) の特異性を評価するため、入手可能であったレジオネラ属菌 49 種 74 株に対する検出効率を検討した。その結果、*L. cherrii* 及び *L. oakridgensis* の 2 種は検出されにくいものの (*L. pneumophila* の 1/100 未満)、残りの 47 種はすべて検出可能であることを確認した (表 1)。

また、次の食中毒菌についてクロス反応がないことを確認した。*Shigella sonnei*, *Escherichia coli* VT1/VT2, *Escherichia coli* VT2, *Escherichia coli* LT (LTEC), *Escherichia coli* ST (ETEC), *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*

3 LC EMA-qPCR を用いたレジオネラ 1 CFU 当たりの 16S rRNA 遺伝子コピー数の決定

アメーバ培養レジオネラ菌の 10 倍希釈系列を

用い、それぞれ2連でLC EMA-qPCRを行い、0h LC (-)、18h LC (-)、18h LC (+) 及び加熱死菌 EMA 処理検体の検量線を作成した(図4)。各検量線の回帰式は次のとおりであった。

○液体培養前：0h LC (-)

$$y = -3.274x + 36.431 \quad R^2 = 0.999$$

○18時間培養後：18h LC (-)

$$y = -3.391x + 31.929 \quad R^2 = 0.992$$

○18時間培養 EMA 処理後：18h LC (+)

$$y = -3.379x + 33.276 \quad R^2 = 0.993$$

○加熱死菌 EMA 処理後

$$y = -3.174x + 44.248 \quad R^2 = 0.990$$

これらの回帰式の切片と、先に算出した16S rRNA 遺伝子コントロールプラスミドの切片の差から、レジオネラ1 CFU当たりの16S rRNA 遺伝子コピー数をそれぞれ次のとおり算出した。

○レジオネラ1 CFU当たりのコピー数

$$2^{(39.984-36.431)} = 11.7 \approx \underline{12 \text{ コピー}}$$

○18時間培養後のコピー数

$$2^{(39.984-31.929)} = 265.9 \approx \underline{270 \text{ コピー}}$$

○18時間培養 EMA 処理後のコピー数

$$2^{(39.984-33.276)} = 104.5 \approx \underline{100 \text{ コピー}}$$

○加熱死菌のEMA処理による減少率

$$2^{(36.431-44.248)} \approx -2.4 \text{ log}$$

以上のことから、LC EMA-qPCRにおけるレジオネラ1 CFU当たりの16S rRNA 遺伝子は約12コピーであり、液体培地での18時間の培養で20倍(1.3 log)程度増加するものの、その後のEMA処理による減少を合わせると、培養前の状態から10倍(1.0 log)程度に増加すると考えられた。しかし、死菌から検出される16S rRNA 遺伝子は、EMA処理によって1/200(-2.4 log)に減少するため、最終的に液体培養後のEMA処理によって生菌と死菌との差は2,000倍(3.3 log)程度と見込まれた(図5)。

4 LC EMA-qPCR を用いた浴槽水等における検査結果

平成24年度に採取した浴槽水等113件につい

て、平板培養法とLC EMA-qPCR法の定量値を比較した(図6、表2)。平板培養法では38.9%(44/113)がレジオネラ陽性(10 CFU/100ml以上)であったのに対し、0h LC (-)は69.9%(79/113)が陽性(1 CFU/100ml以上)であり、液体培養前の0h LC (-)の感度は90.9%、特異度は43.5%であった(表2(1))。18h LC (-)では69.0%(78/113)が陽性(1 CFU/100ml以上)であったが、平板培養法で10 CFU/100ml以上検出された44件はすべてqPCRで1 CFU/100ml以上のDNAが検出され、18時間培養後の18h LC (-)の感度は100%、特異度は50.7%であった(表2(2))。また、18h LC (+)では63.7%(72/113)が陽性(1 CFU/100ml以上)であり、18時間培養後にEMA処理を行った18h LC (+)の感度は95.5%、特異度は56.5%であり、特異度に改善がみられた(表2(3))。LC EMA-qPCR法の定量値を回帰式で比較すると、

$$\text{○ } 0\text{h LC } (-) \quad y = 0.364x + 1.156 \quad (R^2 = 0.124)$$

$$\text{○ } 18\text{h LC } (-) \quad y = 0.617x + 0.602 \quad (R^2 = 0.515)$$

$$\text{○ } 18\text{h LC } (+) \quad y = 0.704x + 0.448 \quad (R^2 = 0.627)$$

であり、平板培養法との相関は、傾き、切片、決定係数のいずれの指標においても、18時間培養後及びEMA処理後で明らかな改善が確認された(図6)。特に、18時間培養後にEMA処理を行った18h LC (+)では、平板培養陰性検体において定量値が5 CFU/100ml(0.7 log CFU/100ml)未満に低下する検体が多数みられた(図7)。18h LC (+)において5 CFU/100ml以上を陽性とする、感度95.5%、特異度75.4%の良好な結果が得られたことから、18時間培養後にEMA処理を行った18h LC (+)で評価を行う場合は、カットオフ値を5 CFU/100ml相当の定量値とすることで、平板培養陽性(10 CFU/100ml)が検出可能と考えられた(表2(4))。

5 平板培養法とLC EMA-qPCR法の不一致例の内訳

平板培養法陽性かつLC EMA-qPCR法陰性(偽陰性)となった2件のうち、1件は平板培養法50

CFU/100ml のマグネシウム・ナトリウム-炭酸水素・硫酸塩泉で、フィルターに黒褐色の着色がみられており qPCR 反応阻害の可能性、1 件は平板培養法 10 CFU/100ml の単純温泉であり、低濃度検体による食い違いが考えられた (表 3-1)。

平板培養法陰性かつ LC EMA-qPCR 法陽性 (偽陽性) となった 17 件の内訳は、9 件 (表 3-2、1~9) が 18 時間培養で Ct 値が低下せず、EMA 処理で Ct 値が増加していることから、大量のレジオネラ死菌が存在し EMA 処理で除外できなかったと考えられた。3 件 (表 3-2、10~12) は、18 時間培養で Ct 値が低下し、EMA 処理で Ct 値の顕著な増加が認められないことから、微量のレジオネラ生菌が存在していた可能性が考えられた。残りの 5 件 (表 3-2、13~17) は 18 時間培養での Ct 値の低下、EMA 処理での Ct 値の増加いずれも認められず、生菌は存在しないものの、EMA の効果が得られにくい可能性が考えられた。

D 考察

本研究班で検討を行ってきた EMA-qPCR 及び LC RT-qPCR で得られた知見をもとに、新規に開発された LC EMA-qPCR キットの検討を行った。その結果、LC EMA-qPCR 法は、簡便な操作で平板培養法の結果を迅速に予測可能で、浴槽水等におけるレジオネラ生菌遺伝子検査法として十分活用可能なレベルにあることが明らかとなった。

既にキット化されている EMA-qPCR 法が標的とした 5S rRNA 遺伝子は、増幅領域が 100 bp 程度と短いため、EMA が死菌由来 DNA に共有結合することで増幅抑制効果を得るには限界があった。今回、新規に開発された 16S rRNA 遺伝子を標的とした qPCR キットは、増幅領域が 240bp 程度と長く、EMA 処理の効果を上げることを前提に設計されたものである。qPCR では、増幅領域が長くなれば増幅効率や感度が低下することが知られている。レジオネラ 16S rRNA 遺伝子の標的領域を組み込んだプラスミドを用いて検討を行った結果、PCR 反応当たり 5 コピー/5 μ l~5 \times

10⁶ コピー/5 μ l の範囲で良好な直線性と蛍光強度が確保できており、定量検査として十分機能することを確認した。また、従来の 5S rRNA 遺伝子検出系では、浴槽水から検出されることがある *L. londiniensis* など、検討を行った 49 種中 10 種で増幅しないことが明らかとなっていたが、今回の 16S rRNA 遺伝子検出系では、*L. cherrii* 及び *L. oakridgensis* 以外の 47 種が検出可能であり、特異性の面でも改善が確認された。

レジオネラ標準菌液 (*Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株) の希釈系列を用い、今回の 16S rRNA 遺伝子検出系を用いた際の 1 CFU 当たりのコピー数を検討した結果、30 $^{\circ}$ C 培養 4 日目の菌及びアメーバ培養菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、カラム精製を行った場合、抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 15 コピーに相当し、カラム精製を行わない簡易熱抽出法ではプラスミド 23 コピーに相当すると考えられた。5S rRNA 遺伝子検出系を用いた過去の検討では、17 コピー相当と算出されており、レジオネラゲノム当たりのコピー数は 5S、16S とともに同じ 3 コピーであることから、今回算出された 1 CFU 当たりのコピー数 (15~23 コピー) は妥当な結果と考えられる。Lysis Buffer を用いた簡易熱抽出法は、極めて簡便で抽出効率も高いことから、塩素消毒が施された循環式浴槽の検体など汚染の少ない検体では、通常の遺伝子増幅検査の検体調整法として十分使用可能であり、また、泉質による PCR 反応阻害が予想される検体ではカラム精製法を選択するなど、検査対象による使い分けが可能と考えられた。

この 16S rRNA 遺伝子検出系を用い、液体培養と EMA 処理を組み合わせた LC EMA-qPCR キットの検討を行った。従来から EMA-qPCR 法を用いた検討が行われてきたが、実試料では共存する大量の死菌に EMA が消費され、死菌の増幅抑制効果が発揮できない場合や、殺菌によって膜に損傷を受けた菌の EMA 感受性の違いなどにより、使用する EMA 量や反応時間を調整する必要があ

った。既存キットでは、対策としてEMA処理を3回行った後にqPCR反応を行うことを勧めていたが、煩雑な操作が普及を妨げる原因となっていた。これらの点を解消するため、従来から本研究班で検討を行っていた液体培養生菌検出法と、EMA用に最適化された新規検出系を組み合わせ、今回のLC EMA-qPCRが開発された。本法の利点としては、液体培養による生菌の増加が見込まれることで、DNA抽出に供する検水を結果的に1/10に減らすことが可能となった点が挙げられる。これにより、EMAを消費する死菌量を相対的に減らすことができ、EMAの死菌抑制効果が安定して得られるようになった。また、DNA抽出に供する検水を減らすこと、及び、qPCR反応液に新たに追加した阻害回避試薬の効果により、qPCR阻害物質の影響を受けにくくなり、カラム精製不要の簡便な熱抽出のみで、qPCRを安定して行うことが可能となった。さらに、液体培養で損傷菌を回復させ、EMAに対する感受性を均一にすることで、偽陰性を低減する効果も期待した。実際の検体を用いて評価を行った限りでは、レジオネラ死菌由来のDNA増幅を完全に抑えるには至らなかったが、得られる定量値は、EMA処理による死菌増幅抑制効果により、平板培養法と高い相関を示した($R^2=0.627$) (図6(3)、図7)。最終的に、LC EMA-qPCRのカットオフ値を5 CFU/100ml相当に設定した場合の感度は95.5%、特異度は75.4%であり、実試料を用いた迅速検査の成績として十分満足できる結果と考えられた。

課題としては、LC RT-qPCRと同様、液体培養時にレジオネラ生菌の増殖を妨げないよう、検水の微生物汚染状況に応じた前処理(酸処理時間の延長、100倍濃縮液の併用等)を選択する必要がある点が挙げられる。しかし、これは通常の平板培養法においても共通の課題であり、検水のATP量を指標とする、あるいは消毒の有無や過去の成績を参考にすることなどにより、対応は可能であると考える。

E 結論

液体培養(Liquid Culture) EMA-qPCR法(LC EMA-qPCR)を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の評価を行った。新規16S rRNA遺伝子検出系は感度、特異性共に良好であり、*L. cherrii*及び*L. oakridgensis*を除くほとんどのレジオネラ属菌が検出可能であった。レジオネラ標準菌を用いてコピー数をCFUに換算するための係数を設定し、浴槽水等の実試料113件を用いてLC EMA-qPCR法の評価を行った結果、EMA処理による死菌増幅抑制効果により、平板培養法に対する感度は95.5%、特異度は75.4%と良好な成績が得られることを明らかにした。本法は、簡便な操作で平板培養法の結果を迅速に予測可能であり、浴槽水等におけるレジオネラ生菌遺伝子検査法としての活用が期待される。

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) 「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 23 年度総括・分担研究報告書

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 23 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

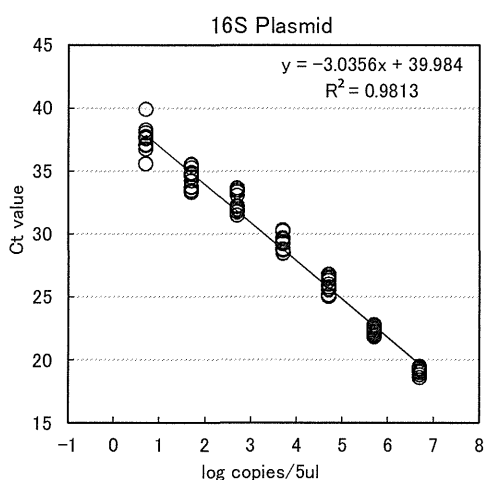
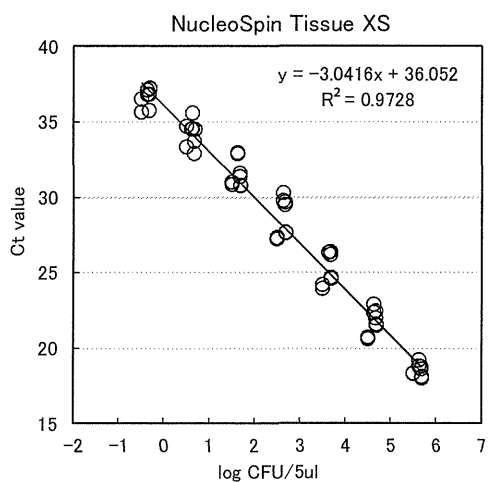
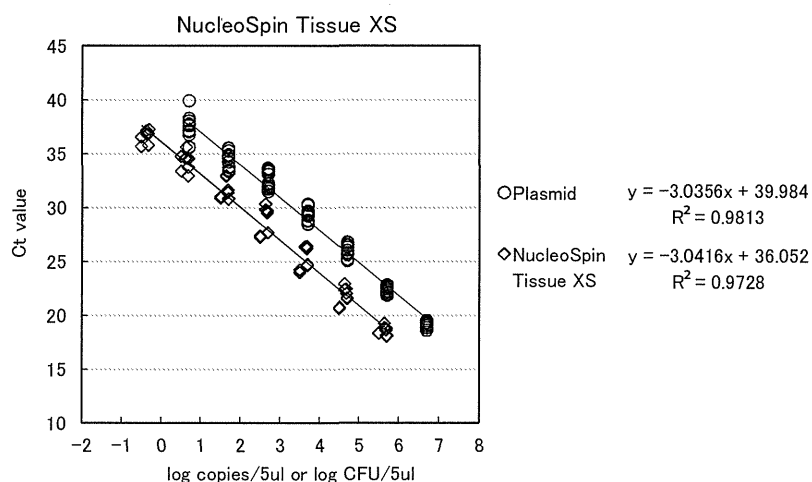


図1 16S rRNA 遺伝子プラスミドを用いた qPCR の検量線



(a) NucleoSpin Tissue XS の検量線



(b) プラスミドと抽出 DNA との比較

図2 NucleoSpin Tissue XS を用いて菌液から抽出した DNA の検量線