

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

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究

レジオネラ生菌を迅速に検出する遺伝子検査法の検討
(EMA-LAMP、LC-EMA-LAMP 法に関する検討)

研究分担者：横浜市衛生研究所 荒井桂子

(研究要旨)

公衆浴場等の施設の維持管理手法の妥当性を確認する手段として、死菌や培養不可能な菌も検出する遺伝子検査法と培養法の結果の差異を比較することは有用である。しかし、現在、浴槽水等のレジオネラの水質基準は培養法による生菌数で定められている。培養法は菌数が確定するまでに 10 日間程度を要するため、培養法の代替となるレジオネラの生菌だけを検出できる迅速な遺伝子検査法が切望されており、これまでに RT-PCR 法、LC RT-PCR 法などを検討してきた。しかし、PCR 法は前処理が複雑であるうえ、検量線をたてる必要があるなど煩雑であることから、簡易的な手法ではなかった。今回は生菌 DNA のみ選択的に検出することが可能であるとされている Ethidium monoazide (EMA) 処理と前処理等が簡易な LAMP 法を組み合わせた EMA-LAMP 法と、さらに液体培地による前培養を組み合わせた LC EMA-LAMP 法を検討した。

レジオネラの生菌と死菌をそれぞれ添加した滅菌生理食塩水の調製試料を LAMP 法、EMA-LAMP 法および LC EMA-LAMP 法で測定したところ、LAMP 法ではレジオネラの死菌が生菌同様に陽性と判定されたが、EMA-LAMP 法、LC-EMA-LAMP 法ではレジオネラの生菌は陽性に、死菌は陰性に判定された。次に、従属栄養細菌 1.0×10^8 cfu/ml の共存下で同様にレジオネラの生菌と死菌をそれぞれ添加した調製試料を測定したところ、同様の結果が得られた。そこで、レジオネラと従属栄養細菌を添加した滅菌生理食塩水を実試料の白湯および温泉に替えて、検査を行ったところ、白湯では滅菌生理食塩水に添加した場合と同様の結果が得られた。しかし、温泉に添加した場合は、EMA-LAMP 法および LC EMA-LAMP 法で生菌の検出が困難な事例があった。

EMA-LAMP 法は即日、LC-EMA-LAMP 法は翌日に結果が判明する簡易的な手法である。浴槽水が白湯であれば培養法の代替法として利用できる可能性があると考えられた。しかし、成分が多様な温泉はこのままでは培養法の代替手法としては結果にばらつきが生じたため、前処理を工夫する必要があると考えられた。

A. 研究目的

レジオネラ症を発症させるレジオネラは生菌数で水質基準が定められている。現在、生菌数を確定する手法は培養法のみ確立されており、浴槽水などの検査は通常培養法で行わ

れている。培養法は菌数が判明するまで 10 日程度を要するため、緊急を要するレジオネラ症の拡大防止や感染源の究明などの健康危機管理の対応には不向きである。また、培養後のレジオネラ以外の菌や真菌に覆われた平板

からレジオネラを特定して純培養する技術も訓練が必要である。このように、迅速性に劣り、技術習練が必要な培養法に代わる検査法として、遺伝子検査法が注目されてきている。これまでに、RT-PCR 法¹⁾、LC RT-PCR 法^{2,3)}などを検討してきたが、PCR 法は前処理が複雑であるうえ、検量線をたてる必要があるなど、技術的な熟練を要するため、簡易的な手法ではなかった。そこで、今回は Ethidium monoazide (EMA) 処理と前処理等が簡易な LAMP 法を組み合わせた EMA-LAMP 法と、さらに液体培地による前培養を組み合わせた LC EMA-LAMP 法を検討した。

Ethidium monoazide (EMA) : 特異的に死菌の損傷した細胞膜を透過し、その菌の染色体 DNA に結合し、光照射によって DNA を切断する DNA インターカレート剤。

B. 材料および研究方法

1. 生菌と死菌の判別の確認試験の材料

(1) レジオネラ生菌調製試料

浴槽水由来の *Legionella pneumophila* SG1 を BCYE α 培地 (関東化学、レジオネラ CYE 寒天基礎培地、OXOID、レジオネラ BCYE α 発育サプリメント) で 37°C 3 日間培養後、小コロニーを滅菌生理食塩水中に攪拌して菌液を作製 (培養結果 960cfu/100ml) し、5ml を滅菌生理食塩水 45ml に添加した。

(2) レジオネラ死菌調製試料

1(1) で作成した菌液 5ml を 95°C 2 分加熱して死菌化し、(BCYE α 培地 37°C 7 日間培養、コロニー不形成を確認) 滅菌生理食塩水 45ml に添加した。

2. 他の細菌共存下でのレジオネラ生菌と死菌の判別の確認試験の材料

(1) 従属栄養細菌共存レジオネラ生菌調製試料

浴槽水由来の従属栄養細菌を R2A 培地 (日水製薬) で 20°C 7 日間培養後、コロニーを釣

菌して滅菌生理食塩水中に攪拌して菌液を作製 (培養結果 1.03×10^8 cfu/ml) し、5ml を滅菌生理食塩水 40ml に添加した。ここに 1(1) と同様に作製したレジオネラ生菌液 5ml を添加した。

(2) 従属栄養細菌共存レジオネラ死菌調製試料

2(1) と同様に作製し、最後に 1(2) と同様に作製したレジオネラ死菌液 5ml を添加した。

3. 実試料をもとにした他の細菌共存下でのレジオネラ生菌と死菌の判別の確認試験の材料

(1) 実試料の調製

公衆浴場水 200ml を 0.22 μ m ポリカーボネート製メンブランフィルター (ミリポア) でろ過した。このろ液 (GVPC 培地 37°C 7 日間培養、コロニー不形成を確認。R2A 培地 20°C 7 日間培養、コロニー不形成を確認) を 50ml の遠沈管に 40ml ずつ 3 本に分注し、残りを保存した。遠沈管 3 本 (①、②、③) にレジオネラ菌液 5ml と従属栄養細菌液 5ml を添加し、50ml とした。①にはレジオネラ死菌調製試料 (培養結果コロニー不形成) 5ml と従属栄養細菌を含まない滅菌生理食塩水 5ml を添加した。②にはレジオネラ生菌調製試料 (培養結果 960cfu/100ml) 5ml と従属栄養細菌液 (培養結果 1.01×10^4 cfu/ml) 5ml を添加した。③にはレジオネラ生菌調製試料 (培養結果 960cfu/100ml) 5ml と従属栄養細菌液 (培養結果 1.03×10^8 cfu/ml) 5ml を添加した。

(2) 実試料の種類

3(1) に用いた実試料は、横浜市内の公衆浴場の浴槽水で白湯 5 試料 (白-1、白-2、白-3、白-4、白-5)、温泉 5 試料 (温-1、温-2、温-3、温-4、温-5)。温泉はすべてナトリウム-炭酸水素塩泉。

4. 検査方法

(1) 前処理

調製試料 50ml を 0.22 μ m ポリカーボネート製メンブランフィルターでろ過した。そのろ

紙を 5ml の滅菌生理食塩水の入った遠沈管に入れて攪拌した。この 5ml を 1ml ずつ 4 本のマイクロチューブに分注し、残りを保存した。マイクロチューブ 4 本を 4℃、10 分間、13,000 ×g で遠心し、3 本を 100 μl に、1 本を 40 μl に濃縮した。

(2) 培養法

100 μl に濃縮した試料に pH2.2 の 0.2M 塩酸・塩化カリウム緩衝液（武藤化学）を等量加え、室温で 20 分静置した。その後ボルテックスで攪拌後、GVPC 培地（極東製薬）に塗抹し、37℃、7 日間培養した。

(3) LAMP 法

40 μl に濃縮した試料に LAMP 試薬（栄研化学、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E）を用いてアルカリ熱抽出を行った後、リアルタイム濁度測定装置（栄研化学）で測定を行った。

(4) EMA-LAMP 法

100 μl に濃縮した試料に EMA 試薬（タカラバイオ、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR）を添加し、遮光して室温で 15 分静置した。その後、15 分間光照射（タカラバイオ、LED Crosslinker）を行い、4℃、10 分間、13,000 ×g で 40 μl に遠心濃縮した。この後 4 (3) と同様に操作を行った。

(5) LC-EMA-LAMP 法

100 μl に濃縮した試料に pH2.2 の 0.2M 塩酸・塩化カリウム緩衝液を等量加え、室温で 20 分静置した。その後 MWY 液体培地（タカラバイオ、Legionella LC Medium Base。OXOID、レジオネラ BCYE α 発育サプリメント、レジオネラ MWY 選択サプリメント）900 μl を加えて攪拌した後、36℃18 時間静置培養した。培養後軽く攪拌してから 500 ×g で 15 秒遠心し、上清 100 μl をマイクロチューブに分取した。この後 4 (4) と同様に操作を行った。

C. 結果と考察

1. 生菌と死菌の判別の確認

LAMP 法、EMA-LAMP 法、LC-EMA-LAMP 法、培養法で検査を行った結果を表 1 に示した。LAMP 法ではレジオネラの死菌が生菌同様に陽性と判定されたが、EMA-LAMP 法、LC-EMA-LAMP 法ではレジオネラの生菌は陽性に、死菌は陰性に判定された。

2. 他の細菌共存下でのレジオネラ生菌と死菌の判別の確認

浴槽水にはレジオネラ以外にも多くの細菌が存在する場合があります、温泉や薬湯などで検出される菌数の 10 倍以上を想定して従属栄養細菌 1.0×10^8 cfu/ml を設定した。従属栄養細菌の共存下で LAMP 法、EMA-LAMP 法、LC-EMA-LAMP 法、培養法の検査を行った結果を表 2 に示した。LAMP 法ではレジオネラの死菌が生菌同様に陽性と判定されたが、EMA-LAMP 法、LC-EMA-LAMP 法ではレジオネラの生菌は陽性に、死菌は陰性に判定された。この結果から、EMA のインターカレート作用は阻害されておらず、EMA の量は不足していなかったと思われた。

3. 実試料をもとにした他の細菌共存下でのレジオネラ生菌と死菌の判別の確認

レジオネラと従属栄養細菌を添加する水溶液を滅菌生理食塩水から実試料に替えて、LAMP 法、EMA-LAMP 法、LC-EMA-LAMP 法、培養法の検査を行った結果を表 3、4 に示した。

実試料が白湯の場合、レジオネラの死菌のみを添加したグループ (①) は LAMP 法のみ陽性と判定されたが、EMA-LAMP 法、LC-EMA-LAMP 法では陰性であった。また、従属栄養細菌が共存している 2 つのグループ (②、③) は、レジオネラの生菌が検出され、結果は良好であった。

一方、実試料が温泉の場合、白湯とは異なる結果を示した。レジオネラの死菌のみを添加したグループ (①) の中で 1 試料 (温-5) は LAMP 法が陰性を示した。添加したレジオネラの菌数は LAMP 法で十分に検出できる量であったことから、温泉成分が LAMP 反応を阻害

したと考えられた。

次に、レジオネラの生菌に従属栄養細菌 (1.01×10^4 cfu/ml) を添加したグループ (②) のうち、温-2、5 が LAMP 法で、温-2、3、5 が EMA-LAMP 法で、温-5 が LC-EMA-LAMP 法で陰性を示し、生菌が検出できなかった。レジオネラの生菌に従属栄養細菌 (1.03×10^8 cfu/ml) を添加したグループ (③) も同様の結果であった。温-5 は温泉成分が LAMP 反応を阻害したと考えられたが、温-2、3 は従属栄養細菌の添加によって何らかの阻害が生じたと考えられた。

D. まとめ

EMA-LAMP 法は即日、LC-EMA-LAMP 法は翌日に結果が判明する簡易的な手法である。浴槽水が白湯であれば培養法の代替法として利用できる可能性があると考えられた。しかし、成分が複雑な温泉はこのままでは培養法の代替手法としては結果にばらつきが生じたため、前処理を工夫する必要があると考えられた。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と思われた。

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 21 年度総括・分担研究報告書
- 2 「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
- 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 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

表 1 生菌と死菌の判別の確認

	LAMP	EMA-LAMP	LC-EMA-LAMP	培養法
レジオネラ生菌	+	+	+	+
レジオネラ死菌	+	-	-	-

表 2 他の細菌共存下でのレジオネラ生菌と死菌の判別の確認

	LAMP	EMA-LAMP	LC-EMA-LAMP	培養法
レジオネラ生菌+従属栄養細菌	+	+	+	+
レジオネラ死菌+従属栄養細菌	+	-	-	-

表3 実試料（白湯）をもとにした他の細菌共存下でのレジオネラ生菌と死菌の判別の確認

	試料	LAMP	EMA-LAMP	LC-EMA-LAMP	培養法
①レジオネラ死菌のみ	白-1	+	-	-	-
	白-2	+	-	-	-
	白-3	+	-	-	-
	白-4	+	-	-	-
	白-5	+	-	-	-
②レジオネラ生菌+従属栄養細菌 (1.01×10^4 cfu/ml)	白-1	+	+	+	+
	白-2	+	+	+	+
	白-3	+	+	+	+
	白-4	+	+	+	+
	白-5	+	+	+	+
③レジオネラ生菌+従属栄養細菌 (1.03×10^8 cfu/ml)	白-1	+	+	+	+
	白-2	+	+	+	+
	白-3	+	+	+	+
	白-4	+	+	+	+
	白-5	+	+	+	+

表4 実試料（温泉）をもとにした他の細菌共存下でのレジオネラ生菌と死菌の判別の確認

	試料	LAMP	EMA-LAMP	LC-EMA-LAMP	培養法
①レジオネラ死菌のみ	温-1	+	-	-	-
	温-2	+	-	-	-
	温-3	+	-	-	-
	温-4	+	-	-	-
	温-5	-	-	-	-
②レジオネラ生菌+従属栄養細菌 (1.01×10^4 cfu/ml)	温-1	+	+	+	+
	温-2	-	-	+	+
	温-3	+	-	+	+
	温-4	+	+	+	+
	温-5	-	-	-	+
③レジオネラ生菌+従属栄養細菌 (1.03×10^8 cfu/ml)	温-1	+	+	+	+
	温-2	-	-	+	+
	温-3	+	-	+	+
	温-4	+	+	+	+
	温-5	-	-	-	+

