

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）
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
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

レジオネラ属菌迅速検査法の標準化 - 市販迅速検査キットの評価 -

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
	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
研究協力者	山口 友美	宮城県保健環境センター
	武藤 千恵子	東京都健康安全研究センター
	金谷 潤一	富山県衛生研究所
	泉山 信司	国立感染症研究所

研究要旨

レジオネラ属菌迅速検査法の標準化に向けた基礎的データを得るため、現在市販されている迅速検査キット（生菌と死菌の両方を検出する qPCR 法、LAMP 法）及び生菌迅速検査キット（生菌特異的検査法として新規に開発された LC EMA-qPCR 法）の 3 法について、浴槽水等の実試料を用い、平板培養法に対する感度、特異度等の評価を行った。

迅速検査キット：新規 qPCR キットと DNA 簡易熱抽出試薬を組み合わせた検出系を検討し、平板培養法 10 CFU/100ml を検出するカットオフ値として、qPCR 法の 5 CFU/100ml 相当を用いることを提案した。qPCR 法と LAMP 法を使用した 131 件について平板培養法の結果と比較したところ、いずれも感度 100%、特異度 53.8%～57.0%と同等の成績を示し、迅速かつ簡便な操作でレジオネラ属菌汚染を評価できることを改めて明らかにした。死菌を検出して良ければ、簡便、迅速かつ高感度な検査法と言えた。

生菌迅速検査キット：qPCR 法、LAMP 法、LC EMA-qPCR 法の 3 法を使用した 131 件では、LC EMA-qPCR 法を定性試験として評価した場合、平板培養法に対する感度は 100%、特異度 69.9%であったが、ROC 解析により 1CFU 相当/100mL を陽性とする感度 97.4%、特異度 80.6%のように特異度に改善が認められた。すなわち、消毒が義務付けられている循環式浴槽においては、生菌迅速検査キットは平板培養法の代替も可能と考えられた。また、検査法に若干の改良を加えることで、さらに検査成績が改善される可能性を示した。

遺伝子を検出する迅速検査法は、培養法とは原理が異なることから完全な 1:1 対応はしないが、死菌を検出すること、生菌を検出することの各検査法の特徴を理解し、目的に応じて使い分ければ、培養法よりも迅速に結果を得ることが可能である。複数の迅速検査法を併用することも容易であり、多角的な評価を加えることで信頼性は高まると考えられた。

- A 研究目的
浴槽水等を対象としたレジオネラ属菌検査
- は、濃縮検水を平板培地上に塗布し、発育したレジオネラ集落数を計測する平板培養法により行

われている。しかし、レジオネラ属菌は発育が遅く、検出に7日~10日を要し、斜光法を組み合わせても3日を要することから、汚染状況を当日あるいは翌日の早期に把握できる迅速検査法の開発が望まれている。

濃縮検水から直接レジオネラ遺伝子を検出する「迅速検査法」(リアルタイムPCR法(以下qPCR法)及びLAMP法)は、検査開始から数時間で結果が得られる迅速性から、患者発生時の原因究明や、配管洗浄等の効果確認に活用され、一定の評価が得られている¹⁾。しかし、これらの方法は死菌も検出するため、平板培養法と結果が1:1の対応をせず、結果が微妙に異なるので、解釈と活用方法に注意を要する。例えば、迅速検査法の結果で検出した死菌を理由に、施設の営業を停止するのは行き過ぎたことになる。

一方、死菌由来遺伝子の検出を抑え、平板培養法の結果を予測することを目的とした「生菌迅速検査法」(LC EMA-qPCR法)が開発され²⁾、平成25年4月にキット化、市販された。生菌迅速検査法であれば、EMA処理により死菌のDNAが修飾されてPCR検出されないため、平板培養法と同等の結果を得ることが可能である。従来のEMA処理単独では、死菌の壊れ方やEMA修飾の程度により誤差が問題になったが、培養を加える事で損傷菌を回復させ、試薬濃度一定の条件であっても、試料によらず死菌の影響を除くことが可能としている。この方法であれば、原理的には平板培養法と代替して差支えないことになる。

本研究では、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化に向けた基礎的データを得ることを目的に、現在市販されている迅速検査キット(生菌と死菌の両方を検出するqPCR法、LAMP法)及び生菌迅速検査キット(生菌特異的検査法として新規に開発されたLC EMA-qPCR法)の3法について、浴槽水等の実試料を用い、平板培養法に対する感度、特異度等の評価を行った。また、各検査法を比較し、検査特性及び問題点等を明らかにし、現在応用可能な範囲を示した。

B 材料と方法

1 検査材料

全国4ヶ所の地方衛生研究所において、平成25年度に入浴施設から188件の試料(浴槽水149件、原水39件)を採取し、検査法の検討に用いた(表1)。泉質は温泉が50.0%、白湯が47.9%、薬湯が2.1%であり、浴槽水の使用形態は、循環式が94.6%、掛け流しが2.7%、毎日換水方式(非循環)が2.7%であった。

2 検査方法

ATP量の測定は、検水100倍濃縮液にルシパックワイド(キッコマン)の専用綿棒を浸して約100 μ lを吸い取り、携帯用簡易測定器ルミテスターPD-10で測定し、検水10ml当たりのRLU値とした。

平板培養法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した。

迅速検査法は、qPCR法としてCycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (CY240、タカラバイオ)を使用し、DNA抽出にはLysis Buffer for *Legionella* (9181、タカラバイオ)を用いた。LAMP法としてLoopamp レジオネラ検査キットE (LMP661、栄研化学)を使用し、DNA抽出にはキット添付のアルカリ熱抽出試薬を用いた。いずれも各キットのマニュアルに従い操作を行った。

生菌迅速検査キットはViable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (7730、タカラバイオ)、*Legionella* LC Medium base (9016、タカラバイオ)、Lysis Buffer for *Legionella* (9181、タカラバイオ)、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (CY240、タカラバイオ)をマニュアルに従い使用した。ATP値が5,000 RLU/100ml以上の検体は、1,000倍濃縮液及び100倍濃縮液の両方について検査を実施し、定量値の高い値を採用した。

リアルタイムPCR装置はThermal Cycler Dice Real Time System (TP900 or TP800、タカラバイオ)を使用し、キットのマニュアルに記載された方法

でコピー数から CFU に換算した。

3 ROC 解析

SPSS Statistics 19 (IBM) を用い、平板培養法におけるレジオネラ属菌検出を従属変数、迅速検査法の定量値を独立変数とした ROC 曲線を作成し、迅速検査法のカットオフ値を決定する指標とした。

4 LC EMA-qPCR 法の改良

(1) 試験菌株の調整

アメーバ培養レジオネラは、PYGC 培地で 30 日間培養した *Acanthamoeba castellanii* Neff strain (ATCC 30010) に、BCYE 寒天培地で 30 日間培養した *Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株を接種し、3 時間後に Page's amoeba saline で洗浄後、30 で 2 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ろ液を 1/50 PBS で洗浄後、実験に用いた。

加熱死菌の調整は、10⁶ CFU/100 μ l に調整したアメーバ培養レジオネラ 100 μ l をマイクロチューブに分取し、70 30 分間加熱した。

(2) レジオネラ液体培地の活性炭濃度の検討

BYE 液体培地と BCYE 液体培地を作成し、BCYE 液体培地の割合を 20%、40%、60%、80% とした活性炭濃度の異なる液体培地及び MWY 液体培地を準備した。アメーバ培養レジオネラ生菌及び加熱死菌について、液体培養前、液体培養後、EMA 処理後の rDNA コピー数の増減を評価した。

(3) 改良試験法

試験菌液あるいは 1000 倍濃縮試料 100 μ l に液体培地 900 μ l を加えて 36、18 時間培養後の増菌液を 500 x g、15 秒遠心し、上清 100 μ l を分取し、EMA 処理以降の操作を行った。

C 結果

1 各検査法の特長

(1) qPCR 法

qPCR 法を使用した 131 件について平板培養法

の結果と比較した (図 1)。平板培養法では 131 件中 38 件 (29.0%) の試料から 10 CFU/100ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、qPCR 法では 131 件中 81 件 (61.8%) からレジオネラ遺伝子が検出された。qPCR 法での遺伝子検出を指標とした場合、平板培養法陽性 38 件全てを陽性と判定し、平板培養法に対する感度は 100%であった。また、平板培養法陰性 93 件中 34 件を陰性と判定し、特異度は 36.6%であった (表 3 (a))。

qPCR 法のカットオフ値を決定するため、平板培養法でのレジオネラ属菌検出を従属変数とした ROC 曲線を作成した (図 2)。その結果、qPCR 法で 6.6 CFU/100ml 相当を超えると偽陰性が発生することから、安全を見越し 5 CFU/100ml 相当をカットオフ値とした。5 CFU/100ml 相当をカットオフ値とした場合、感度は 100%のまま平板培養法陰性 93 件中 50 件を陰性と判定し、特異度は 53.8%に上昇した (表 3 (a))。

(2) LAMP 法

LAMP 法を使用した 188 件について平板培養法の結果と比較した (表 4)。平板培養法では 188 件中 43 件 (22.9%) の試料から 10 CFU/100ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、LAMP 法では 188 件中 97 件 (51.6%) からレジオネラ遺伝子が検出された。LAMP 法は、平板培養法陽性 43 件全てを陽性と判定し、平板培養法に対する感度は 100%、平板培養法陰性 145 件中 91 件を陰性と判定し、特異度は 62.8%であった (表 4)。

(3) 生菌迅速検査法 (LC EMA-qPCR 法)

LC EMA-qPCR 法 (以下 LC EMA 法) を使用した 188 件について平板培養法の結果と比較した (図 3、表 5)。平板培養法では 188 件中 43 件 (22.9%) の試料から 10 CFU/100ml 以上のレジオネラ属菌が検出され、LC EMA 法では 79 件 (42.0%) の試料からレジオネラ遺伝子が検出された。LC EMA 法での遺伝子検出を指標とした場合、平板培養法陽性 43 件全てを陽性と判定し、

平板培養法に対する感度は 100%であった。また、平板培養法陰性 145 件中 109 件を陰性と判定し、特異度は 75.2%であった(表 5(a))。

LC EMA 法のカットオフ値を確認するため、平板培養法でのレジオネラ属菌検出を従属変数とした ROC 曲線を作成した(図 4)。その結果、0.7 CFU/100ml 相当を超えると偽陰性が発生することが明らかとなり、試算的に 1 CFU/100ml 相当をカットオフ値として再度評価を行った。1 CFU/100ml をカットオフ値とした場合、平板培養法陽性 43 件中 1 件を陰性と判定し、感度は 97.7%に低下したが、平板培養法陰性 145 件中 119 件を陰性と判定し、特異度は 82.1%に上昇した(表 5(b))。

平板培養法 10 CFU/100ml 以上かつ LC EMA 法が 10 CFU/100ml 相当未満であった 7 件の内訳は、平板培養法 50 CFU/100ml(分離菌種:*L. dumoffii*、*L. anisa*)で LC EMA 法 2.3 CFU/100ml 相当の毎日換水型浴槽水が 1 件(表 6、No.1)、平板培養法 20 CFU/100ml(分離菌種:*L. pneumophila*、*L. londiniensis*)で LC EMA 法 1.1 CFU/100ml 相当の掛け流し式温泉浴槽水が 1 件あった(表 6、No.2)。また、平板培養法で 10 CFU/100ml の *L. pneumophila* が検出され、LC EMA 法では 6.6~0.7 CFU/100ml 相当のレジオネラ遺伝子が検出された温泉使用循環式浴槽水が 5 件であった(表 6、No.3~7)。いずれの検体も qPCR キットに含まれている内部コントロールは良好に増幅されており、明らかな qPCR 反応阻害は認められなかった。

平板培養法が 10 CFU/100ml 未満にもかかわらず、LC EMA 法でレジオネラ遺伝子が検出された 36 件の内訳を表 7 に示す。No.1~7 は比較的温度の低い温泉原水、No.8~11 は遊離残留塩素濃度の高い浴槽水が多く、いずれも LC EMA 法で qPCR 法の 1/10 程度のレジオネラ遺伝子が検出されていることから、液体培養で増えず、EMA 処理でも不活化されない VBNC の可能性が考えられた。No.12~15 の 4 件は、qPCR と LC EMA 法の両法で 20~50 CFU/100ml 相当のレジオネラ遺

伝子が検出され、LAMP 法も陽性であったことから、平板培養法における偽陰性の可能性が考えられた。No.16~21 の 6 件は全て遊離残留塩素が 0.5 mg/L 以上検出された浴槽水であり、qPCR 法で検出された死菌由来遺伝子が LC EMA 法でも僅かに検出されたと考えられた。No.22~25 の 4 件は、LC EMA 法で 10 CFU/100ml 相当以上のレジオネラ遺伝子が検出されたが、他の検査項目が不明で、原因の推定に至らなかった。No.26 以降の 11 件は、LC EMA 法で検出された遺伝子量が 10 CFU/100ml 未満であり、これが微量のレジオネラ生菌の存在を意味するかどうかは不明であった。

2 qPCR 法、LAMP 法、LC EMA 法の 3 法を実施した検体での直接比較

qPCR 法、LAMP 法、LC EMA 法の 3 法を実施した 131 件について、平板培養法に対する感度、特異度を比較した(表 8)。qPCR 法及び LAMP 法は、いずれも平板培養陽性 38 件全てを陽性と判定し、平板培養法に対する感度は 100%であった。また、平板培養陰性 93 件中 qPCR 法は 50 件、LAMP 法は 53 件を陰性と判定し、平板培養法に対する特異度は qPCR 法 53.8%、LAMP 法 57.0%であった(表 8(a)(b))。以上の結果から、qPCR 法(5 CFU/100ml 相当以上陽性)と LAMP 法の感度、特異度はほぼ同等であり、いずれの方法もレジオネラ汚染のスクリーニング検査に有用と考えられた。

一方、LC EMA 法において、レジオネラ遺伝子検出を陽性とする定性試験として評価した場合、平板培養法陽性 38 件全て陽性で感度 100%、平板培養法陰性 93 件中 65 件が陰性で特異度 69.9%であった(表 8(c))。また、1 CFU/100ml 相当以上の遺伝子検出を陽性とする定量試験として評価した場合は、平板培養法陽性 38 件中 37 件が陽性で感度は 97.4%に低下したが、平板培養法陰性 93 件中 75 件が陰性で特異度は 80.6%に上昇した(表 8(d))。

平板培養法と qPCR 法、LC EMA 法の定量値を

比較したところ、平板培養法と qPCR 法の散布図における回帰直線は $y=0.751x+0.874$ ($R^2=0.390$) であったのに対し (図 1)、LC EMA 法では $y=0.942x+0.252$ ($R^2=0.671$) であり、LC EMA 法で得られる定量値は平板培養法の菌数と高い相関を示した (図 5)。

qPCR 法と LC EMA 法の ROC 曲線を比較したところ、各方法の AUC (Area Under the Curve) は、qPCR 法 0.869 に対して LC EMA 法 0.949 であり、LC EMA 法における診断能の高さが示された (図 6)。

3 LC EMA 法の改良

平板培養法における菌数が 10 CFU/100ml に近い低濃度検体で、LC EMA 法の定量値が 10 CFU/100ml 相当未満となる検体が複数みられたことから、DNA 抽出時に活性炭への吸着について検討した。

(1) 液体培養時の活性炭濃度の検討

通常の BCYE 液体培地における活性炭濃度を 100% とし、活性炭濃度が 0%(BYE)、20%、40%、60%、80% の BCYE 液体培地及び MWY 液体培地を用い、LC EMA 法でのレジオネラ 16S rDNA コピー数の増加量を検討した (図 7)。生菌、死菌とも活性炭濃度が高くなるに従い液体培養前 (0h) の 16S rDNA コピー数が低下し、活性炭への吸着が示唆された (図 7 (a)、(b))。生菌 18 時間培養後のレジオネラ増加量は活性炭濃度 80% 以上で一定であり、酸処理における希釈を考慮すると、液体培養でのレジオネラ増殖には、現行の活性炭濃度が適正であることが確認された (図 7 (a))。一方、死菌に対する EMA 処理後の PCR 増幅抑制効果は、活性炭を含まない培地では 3.5 log の低下が認められたが、活性炭濃度 80% 以上では 2 log の低下にとどまり、EMA 処理による死菌 DNA の PCR 抑制が、活性炭によって妨害されることが示唆された (図 7 (b))。

(2) 改良法の検討

液体培養後の試料を 500xg、15 秒でスピンドウ

ンすることで活性炭のみを沈殿除去し、レジオネラを含んだ上清を EMA 処理以降の操作に用いる改良法を検討した。

MWY 液体培地で増殖したレジオネラ生菌は、スピンドウン (500xg、15 秒) 操作後の上清で rDNA コピー数は低下せず、スピンドウンにより活性炭は沈殿し、レジオネラ生菌は遠心上清に残ることを確認した (図 8、18h、18h-Sup)。また、スピンドウン上清を EMA 処理すると、スピンドウンを行わない場合より qPCR で増幅する DNA 量はわずかに減少するものの、培養による増菌効果は十分維持されることを確認した (図 8、18h-EMA、18h-Sup-EMA)。

加熱死菌においても、スピンドウン操作後の上清で rDNA コピー数は低下せず、加熱死菌もスピンドウン操作で引き続き浮遊状態にあることを確認した (図 9、DEAD、DEAD-Sup)。死菌を含んだ液体培地をスピンドウンなしに EMA 処理した場合、rDNA コピー数は 4.5 log から 2.9 log に 1.6 log 減少したが (図 9、DEAD-EMA)、スピンドウン上清を EMA 処理した場合は、4.6 log から 1.3 log に 3.3 log 低下した (図 9、DEAD-Sup-EMA)。EMA 処理前にスピンドウン操作を加えるだけで、死菌由来 DNA をほぼ不検出にできる可能性が示された。

(3) 実試料への適用

36 件の試料について、スピンドウン操作を追加した改良 LC EMA 法の効果を検証した。平板培養法と通常の LC EMA 法の散布図における回帰直線が $y=1.010x+0.132$ ($R^2=0.676$) であったのに対し (図 10 (a))、改良 LC EMA 法では $y=0.993x+0.047$ ($R^2=0.791$) であり (図 10 (b))、改良 LC EMA 法で得られる定量値は、平板培養法の菌数と極めて高い相関を示すことが示唆された。

D 考察

入浴施設におけるレジオネラ属菌汚染を迅速に評価する遺伝子検査法として、2 種類の迅速検

査キット(生菌と死菌の両方を検出するqPCR法、LAMP法)及び培養可能な生菌の検出にターゲットを絞った生菌迅速検査キット(LC EMA-qPCR法)が市販されている。今回、各検査法の特徴や問題点を明らかにし、検査法の標準化に向けた基礎的資料を得ることを目的に、これら3種類の検査法について、131件の同一試料を用いて感度、特異度等の直接的な比較を行った。

1 迅速検査法(qPCR法、LAMP法)

今回の3法のうち、LAMP法は2004年に発売されたキットで使用実績も豊富であり、評価もある程度確立されている¹⁾。今回、131件の調査を行った結果、平板培養法に対する感度100%、特異度57.0%と3法のなかで2番目に良好な結果が得られた。

qPCR法は、2013年4月に新発売されたキット(16S rRNA遺伝子標的)であり、使用実績はこれから蓄積される場所である。従来の5S rRNA遺伝子を標的としたキットは、浴槽水からしばしば分離される*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されていた。今回の16S rRNA遺伝子を標的としたキットは、昨年度の我々の検討により、*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な特異性を有することが確認されている²⁾。また、従来のキットでは、DNA抽出にカラム精製法が推奨されていたが³⁾、本qPCRキットにはPCR反応液に添加する増幅阻害回避試薬が添付されたほか、簡易熱抽出法を用いたDNA抽出試薬も新たに準備されている。今回は、このDNA簡易熱抽出試薬と新規16S rRNA遺伝子検出キットを用い、温泉等を含む実試料における感度、特異性等を検討した。131件の試料で評価した結果、DNA簡易熱抽出試薬と新規16S rRNA遺伝子検出キットの組み合わせで明らかな増幅阻害は認められず、カラム精製なしに十分環境試料からの検出に適用可能と考えられた。また、qPCR法によるレジオネラ遺伝子の検出を指標と

した場合、平板培養法に対する感度は100%、特異度は36.6%であり、反応系自体はLAMP法より高感度にレジオネラ遺伝子を検出する能力を有すると考えられた。そこで、131件の測定結果を用いたROC解析を行った結果をもとに、平板培養法10 CFU/100mlを検出するカットオフ値として、qPCR法の5 CFU/100ml相当を用いることを提案した。このカットオフ値を用いた場合の平板培養法に対する感度は100%、特異度は53.8%であり、LAMP法とほぼ同等の成績が得られることを明らかにした。qPCR法、LAMP法ともに迅速かつ簡便な操作でレジオネラ属菌の存在を証明できるとともに、死菌由来の遺伝子を検出することで施設の潜在的なリスク評価が可能と考えられた。

2 生菌迅速検査法(LC EMA-qPCR法)

qPCR法、LAMP法、LC EMA法の3法を検査した131件の試料について、レジオネラ遺伝子検出を陽性とする定性試験として評価した結果、平板培養法に対する感度100%、特異度69.9%と3法のなかで最も優れた成績が得られた。LC EMA法は、濃縮試料を液体培養によって前増菌を行い、培養増殖能を有するレジオネラ属菌を選択的に検出すること、及び、EMA処理によって死菌由来DNAを増幅対象から除外することの2点により、平板培養法に近い成績を得ることを目的とした検査方法である。今回、qPCR法とLC EMA法の2法について、はじめて同一試料でROC解析を行い、AUC値を直接比較できたことは意義深い。結果として、LC EMA法のAUC値(0.949)はqPCR法(0.869)よりも高く、LC EMA法の優れた診断能が確認された。また、今回、LC EMA法での遺伝子検出をもって平板培養法10 CFU/100ml以上が予測可能な定性検査としての可能性が提案できたことは重要である。

検量線の作成は、ある程度の検査技術、労力、コストを伴い、検査の普及を妨げる一つの要因ともなっている。LC EMA法は、検量線の作成なし

に Ct 値からおおよその菌数（リスク）を予測することも可能であり、生菌迅速検査法の普及に向けた基礎的なデータが得られたと考えられる。

また、追加的なデータではあるが、LC EMA 法のプロトコルに 500xg、15 秒のスピンダウン操作を加えるだけで、さらに診断能と定量性が改善される可能性が示された。今後、検査数を増やして有効性を確認する必要がある。

なお、今回評価を行った検体は、塩素消毒を前提とした循環式浴槽が中心であったということも考慮しなければならない。液体培養法（LC 法）を用いた生菌迅速検査法は、2009 年に LC RT-qPCR 法の検討に着手したのが始まりであるが、開発当初から塩素消毒が行われていない掛け流し式浴槽では偽陰性率が高くなることが報告されている。レジオネラ属菌は培地中の発育速度が遅いため、LC 法の成否は液体培養時に共存する雑菌の増殖を抑え、レジオネラ属菌が増殖しやすい環境を如何に整えるかが課題であった^{4, 5)}。その対策として、レジオネラ属菌の増殖に競合抑制が発生する指標として ATP 5000 RLU/10ml を定め、ATP 高値検体では酸処理時間を 5 分から 20 分に延長すること、1000 倍濃縮液だけでなく 100 倍濃縮液でも液体培養を行うこと等により、レジオネラ属菌の増殖を促す工夫を施してきた⁶⁾。また、検出系を RT-qPCR 法より反応阻害を起こしにくい qPCR 法に変更し、死菌由来 DNA の増幅反応を抑える EMA 法も組み合わせた^{2, 7)}。これらの改良を行ったが、操作が煩雑になり、検査の不安定要素となることが、迅速検査法（qPCR 法、LAMP 法）に対しての難点であろう。

今回の調査で、LC EMA 法が循環式浴槽で優れた成績が得られることが明らかとなったが、今後、塩素消毒が行われていない掛け流し式温泉等、LC EMA 法の適用範囲について検討を進めていく必要がある。

E 結論

レジオネラ属菌迅速検査法の標準化に向けた

基礎的データを得るため、現在市販されている迅速検査法（生菌と死菌の両方を検出する qPCR 法、LAMP 法）及び生菌迅速検査法（LC EMA-qPCR 法）の 3 法について、浴槽水等の実試料を用い、平板培養法に対する感度、特異度等の評価を行った。

新規 qPCR キットと DNA 簡易熱抽出試薬を組み合わせた際の平板培養法 10 CFU/100ml を検出するカットオフ値として、qPCR 法の 5 CFU/100ml 相当を用いることを提案した。当該 qPCR 法と LAMP 法は感度 100%、特異度 53.8% ~ 57.0% と同等の成績を示し、いずれも迅速かつ簡便な操作でレジオネラ属菌汚染を評価できることを改めて明らかにした。死菌を検出して良ければ、簡便、迅速かつ高感度な検査法と言えた。

LC EMA-qPCR 法は、塩素消毒が行われている循環式浴槽を中心とした調査では、感度 100%、特異度 69.9% であったが、ROC 解析により 1CFU 相当/100mL を陽性とする感度 97.4%、特異度 80.6% のように特異度に改善が認められ、平板培養法と相関の高い定量値が得られたので検査法の代替も可能と考えられた。

遺伝子を検出する迅速検査法は、培養法とは原理が異なることから完全な 1:1 対応はしないが、死菌を検出すること、生菌を検出することの各検査法の特徴を理解し目的に応じて使い分ければ、培養法よりも迅速に結果を得ることが可能である。複数の迅速検査法を併用することも容易で、多角的な評価を加えることで信頼性は高まると考えられた。

参考文献

- 1) 浅野陽子、核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について、生活と環境、2007、52(1)、89-91.
- 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 24 年度

総括・分担研究報告書

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

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 21 年度総括・分担研究報告書

5) 「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

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 23 年度

総括・分担研究報告書

7) 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.

F 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 烏谷竜哉、泉山信司、吉崎美和、荒井桂子、磯部順子、緒方喜久代、金谷潤一、矢崎知子、八木田健司、倉文明、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評価、日本防菌防黴学会第 40 回年次大会、2013 年 9 月、豊中市

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 検査材料 (n=188)

区分	自治体				計
	A	B	C	D	
浴槽水	35	39	39	36	149
(方式) 循環	27	39	39	36	141
掛け流し	4				4
毎日完全換水	4				4
(泉質) 温泉	11	2	15	36	64
白湯	24	37	20		81
薬湯			4		4
原水		18		21	39
(泉質) 温泉		9		21	30
白湯		9			9
合計	35	57	39	57	188

表 2 検査方法 (n=188)

区分		自治体				計
		A	B	C	D	
迅速検査	qPCR	35		39	57	131
	LAMP	35	57	39	57	188
生菌迅速検査	LC EMA-qPCR	35	57	39	57	188

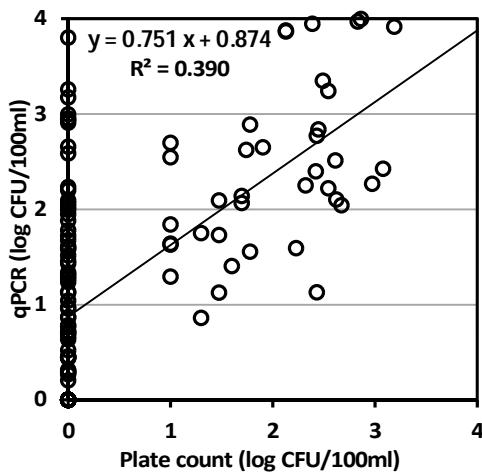


図 1 平板培養法と qPCR 法の相関 (n=131)

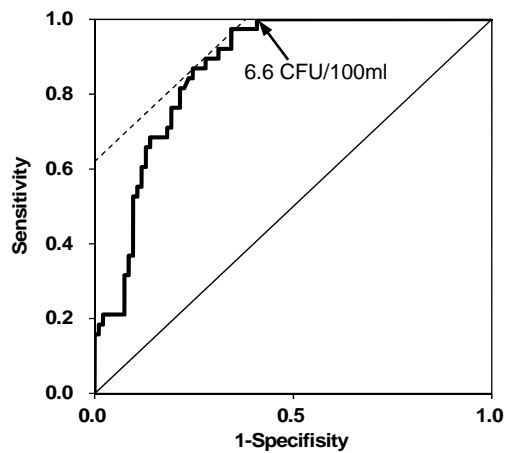


図 2 qPCR 法の ROC 曲線 (n=131)

表3 平板培養法と qPCR 法の比較 (n=131)

(a) qPCR 法陽性：レジオネラ遺伝子検出
(CFU/100ml)

		平板培養法		
		10	< 10	
qPCR	検出	38	59	97
	不検出	0	34	34
		38	93	131
感度	100%	陽性的中率		39.2%
特異度	36.6%	陰性的中率		100%

(b) qPCR 法陽性：5 CFU/100ml 以上
(CFU/100ml)

		平板培養法		
		10	< 10	
qPCR	5	38	43	81
	< 5	0	50	50
		38	93	131
感度	100%	陽性的中率		46.9%
特異度	53.8%	陰性的中率		100%

表4 平板培養法と LAMP 法との比較 (n=188)

		平板培養法		
		10	< 10	
LAMP	検出	43	54	97
	不検出	0	91	91
		43	145	188
感度	100%	陽性的中率		44.3%
特異度	62.8%	陰性的中率		100%

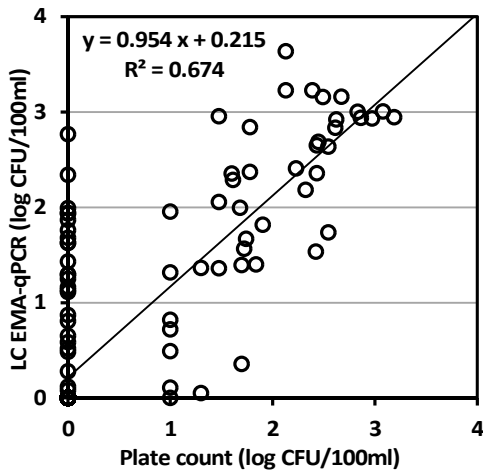


図3 平板培養法と LC EMA-qPCR 法の相関
(n=188)

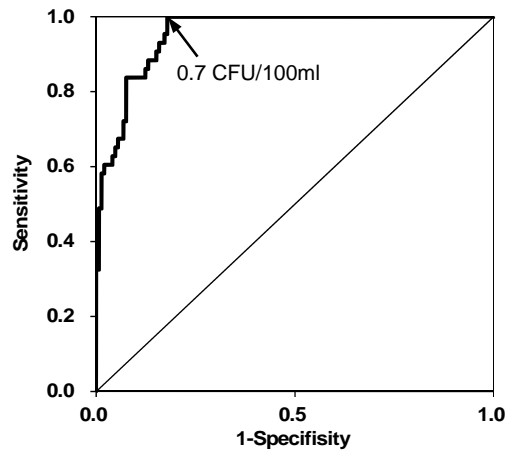


図4 LC EMA-qPCR 法の ROC 曲線
(n=188)

表5 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較

(a) LC EMA 法陽性：レジオネラ遺伝子検出

(b) LC EMA 法陽性：1 CFU/100ml 以上

		(CFU/100ml)		
		平板培養法		
		10	< 10	
LC EMA	検出	43	36	79
qPCR	不検出	0	109	109
		43	145	188
感度	100%	陽性的中率		54.4%
特異度	75.2%	陰性的中率		100%

		(CFU/100ml)		
		平板培養法		
		10	< 10	
LC EMA		1	42	68
qPCR	< 1	1	119	120
		43	145	188
感度	97.7%	陽性的中率		61.8%
特異度	82.1%	陰性的中率		99.2%

表6 平板培養法 10 CFU/100ml 以上、LC EMA-qPCR 法 10 CFU/100ml 相当未満検体の内訳

No.	試料情報						微生物量		レジオネラ属菌				
	検体分類	泉質等	循環 or 掛け流し	湯温	残塩 mg/L	pH	ATP RLU /10ml	HPC CFU/ml	平板培養法		迅速検査法		生菌迅速検査法
									CFU /100ml	菌種 血清群	qPCR CFU/100ml	LAMP	LC EMA-qPCR CFU/100ml
1	浴槽水	水道水	毎日換水	37.7	0.0	NT	8.2x10 ²	nt	50	<i>L.dumoffii</i> <i>L.anisa</i>	140	+	2.3
2	浴槽水	温泉	掛け流し	44.6	0.0	NT	4.9x10 ³	nt	20	<i>L.pneumophila</i> <i>L.londiniensis</i>	56	+	1.1
3	浴槽水	温泉	循環	40.9	2.0	NT	nt	nt	10	<i>L.pneumophila</i> SG8	nt	+	6.6
4	浴槽水	低張性弱アルカリ性 冷鉱泉	循環	40.0	0.8	8.1	6.6x10 ³	3.3x10 ⁶	10	<i>L.pneumophila</i> SG3	43	+	5.2
5	浴槽水	Na - 炭酸水素塩・塩 化物温泉	循環	40.0	0.0	8.7	5.7x10 ²	9.4x10 ⁴	10	<i>L.pneumophila</i> SG10	350	+	3.1
6	浴槽水	低張性アルカリ性冷 鉱泉	循環	42.0	2.0	8.7	3.3x10	2.5x10 ²	10	<i>L.pneumophila</i> SG7	20	+	1.3
7	浴槽水	低張性アルカリ性冷 鉱泉	循環	40.0	0.2	7.7	1.8x10 ²	1.0x10 ⁵	10	<i>L.pneumophila</i> SG9	69	+	0.7

表7 平板培養法 10 CFU/100ml 未満、LC EMA-qPCR 法陽性検体の内訳

No.	試料情報						微生物量		レジオネラ属菌			
	検体 分類	泉質等	循環 or 掛け流し	湯温	残塩 mg/L	pH	ATP	HPC	平板培養法	迅速検査法		生菌迅速検査法
							RLU /10ml	CFU/ml	CFU /100ml	qPCR CFU/100ml	LAMP	LC EMA-qPCR CFU/100ml
1	原水	低張性弱アルカリ性冷鉱泉		19.0	0.0	8.1	2.4x10 ²	< 30	< 10	6300	+	580
2	原水	Na-炭酸水素塩・塩化物温泉		26.0	0.0	8.2	2.6x10 ²	6.2x10	< 10	1800	+	200
3	原水	海水		15.0	0.0	8.0	1.8x10	4.2x10	< 10	860	+	89
4	原水	低張性アルカリ性冷鉱泉		14.5	0.0	9.1	5.4x10	< 30	< 10	810	+	78
5	原水	単純弱放射能冷鉱泉		nt	0.0	8.4	5.8x10	< 30	< 10	890	+	67
6	原水	アルカリ性単純温泉		11.0	2.0	8.3	1.5x10	< 30	< 10	990	+	44
7	原水	Na-塩化物・炭酸水素塩温泉		35.1	0.4	7.8	1.7x10 ³	2.7x10 ⁴	< 10	120	+	18
8	浴槽水	温泉	循環	40.0	>2.0	nt	8.7x10	nt	< 10	170	+	18
9	浴槽水	水道水	循環	41.0	<0.2	nt	2.6x10 ²	nt	< 10	110	+	14
10	浴槽水	温泉	循環	42.0	>2.0	nt	2.8x10	nt	< 10	27	-	1.3
11	浴槽水	温泉	循環	40.0	>2.0	nt	2.7x10	nt	< 10	5.9	-	1.9
12	浴槽水	低張性弱アルカリ性冷鉱泉	循環	40.0	1.3	8.6	1.0x10	7.9x10	< 10	41	+	52
13	浴槽水	白湯	循環	40.5	0.7	nt	1.6x10 ²	nt	< 10	47	+	38
14	浴槽水	低張性アルカリ性冷鉱泉	循環	37.0	2.0	9.1	4	< 30	< 10	22	+	38
15	浴槽水	低張性弱アルカリ性冷鉱泉	循環	42.0	0.8	8.1	2	< 30	< 10	39	+	24
16	浴槽水	Na-炭酸水素塩・塩化物温泉	循環	41.2	0.6	8.2	9	< 30	< 10	1500	+	0.5
17	浴槽水	アルカリ性単純温泉	循環	42.0	1.3	8.5	6	< 30	< 10	53	+	0.6
18	浴槽水	Na-塩化物・炭酸水素塩温泉	循環	41.0	0.5	8.0	2	5.5x10	< 10	33	+	0.4
19	浴槽水	低張性弱アルカリ性冷鉱泉	循環	36.7	2.0	8.8	4	3.9x10	< 10	21	+	0.4
20	浴槽水	Na-炭酸水素塩・塩化物温泉	循環	40.0	0.5	8.9	5	3.3x10 ²	< 10	14	-	0.2
21	浴槽水	温泉	循環	38.0	1.3	nt	3.2x10 ⁴	nt	< 10	9.1	-	0.3
22	浴槽水	井戸水 + 水道水	循環	nt	0.7	nt	nt	nt	< 10	nt	+	87
23	浴槽水	水道水	循環	nt	1.0	nt	nt	nt	< 10	nt	+	20
24	浴槽水	水道水	循環	nt	1.0	nt	nt	nt	< 10	nt	-	14
25	原水	温泉		27.8	0.0	nt	nt	nt	< 10	nt	+	13
26	浴槽水	白湯	循環	41.0	2.0	nt	9	nt	< 10	0.0	-	7.4
27	浴槽水	水道水	循環	41.0	2.0	nt	1.1x10	nt	< 10	0.2	-	6.4
28	原水	水道水		nt	nt	nt	nt	nt	< 10	nt	+	4.5
29	原水	水道水		nt	nt	nt	nt	nt	< 10	nt	+	3.1
30	浴槽水	水道水	循環	38.9	0.4	nt	nt	nt	< 10	nt	-	3.8
31	浴槽水	水道水	循環	nt	nt	nt	nt	nt	< 10	nt	+	3.3
32	浴槽水	白湯	循環	42.0	2.0	nt	1.1x10	nt	< 10	0.0	-	1.2
33	浴槽水	水道水	循環	22.5	0.9	nt	9	nt	< 10	0.0	-	0.6
34	原水	Na-塩化物・炭酸水素塩温泉		36.0	0.0	7.6	9	8.2x10	< 10	2.8	-	0.5
35	浴槽水	低張性弱アルカリ性冷鉱泉	循環	40.0	1.3	8.0	1.2x10	1.6x10 ³	< 10	0.2	-	0.5
36	浴槽水	水道水	循環	41.0	0.2	nt	9.1x10	nt	< 10	0.5	+	0.1

nt : not tested

表8 qPCR、LAMP、LC EMA-qPCR 3法実施131検体における感度、特異度の比較

(a) qPCR 法陽性：5 CFU/100ml 以上（再掲）

		(CFU/100ml)		
		平板培養法		
		10	< 10	
qPCR	5	38	43	81
	< 5	0	50	50
		38	93	131
感度	100%	陽性的中率		46.9%
特異度	53.8%	陰性的中率		100%

(b) LAMP 法陽性：レジオネラ遺伝子検出

		(CFU/100ml)		
		平板培養法		
		10	< 10	
LAMP	検出	38	40	78
	不検出	0	53	53
		38	93	131
感度	100%	陽性的中率		48.7%
特異度	57.0%	陰性的中率		100%

(c) LC EMA 法陽性：レジオネラ遺伝子検出

		(CFU/100ml)		
		平板培養法		
		10	< 10	
LC EMA	検出	38	28	66
qPCR	不検出	0	65	65
		38	93	131
感度	100%	陽性的中率		57.6%
特異度	69.9%	陰性的中率		100%

(d) LC EMA 法陽性：1 CFU/100ml 以上

		(CFU/100ml)		
		平板培養法		
		10	< 10	
LC EMA	1	37	18	55
qPCR	< 1	1	75	76
		38	93	131
感度	97.4%	陽性的中率		67.3%
特異度	80.6%	陰性的中率		98.7%

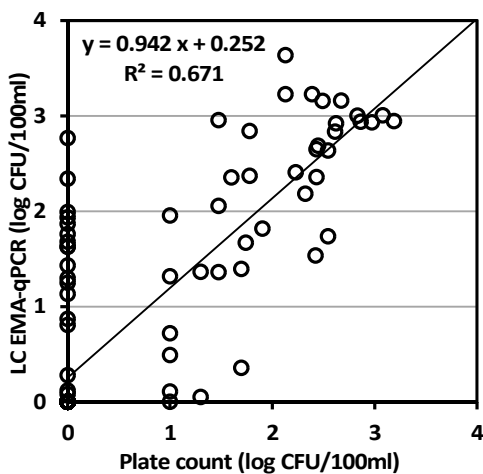


図5 平板培養法とLC EMA法の相関 (n=131)

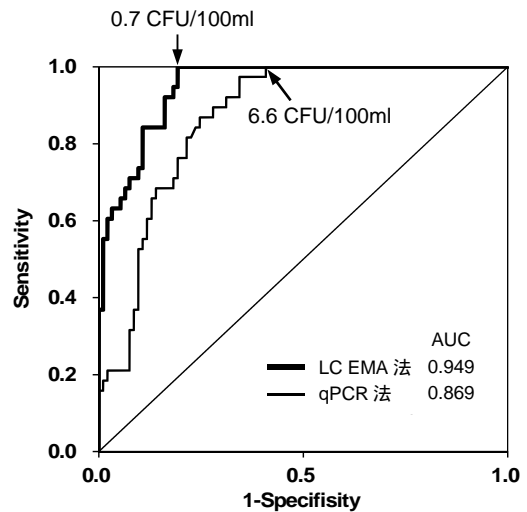
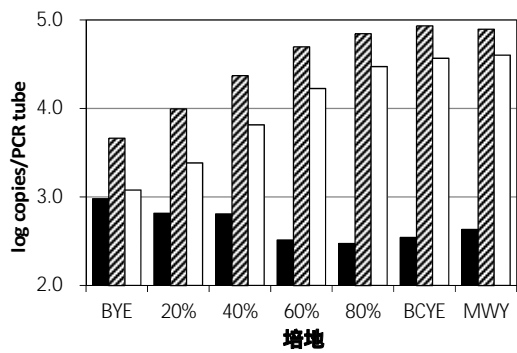
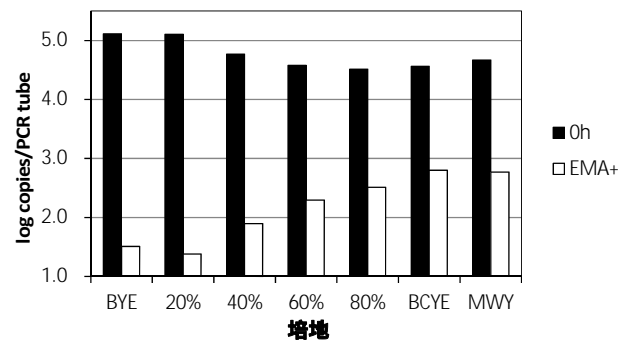


図6 qPCR法とLC EMA法のROC曲線 (n=131)

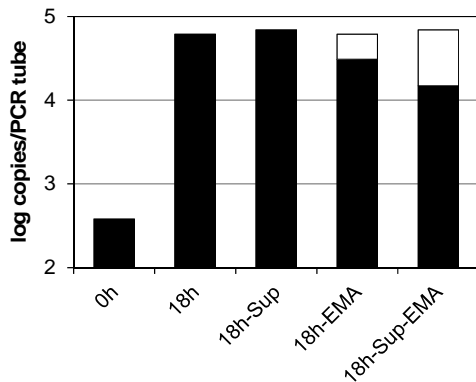


(a) レジネラ生菌の挙動 (n=3)



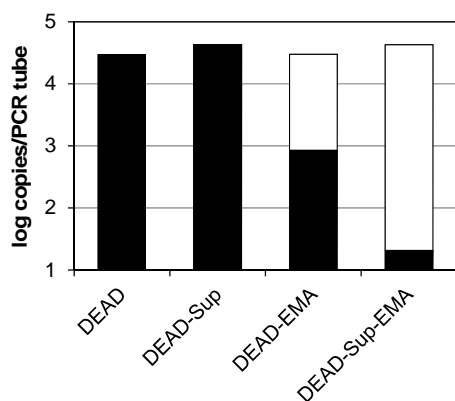
(b) レジオネラ死菌の挙動 (n=3)

図7 活性炭濃度の影響



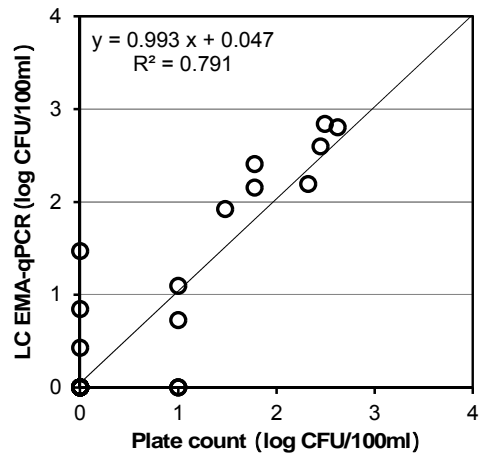
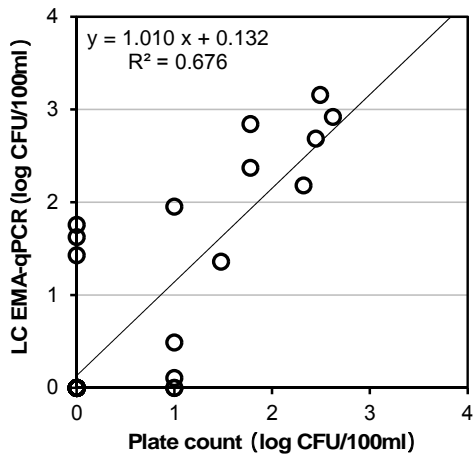
前処理	操作					DNA量 log copies /PCR tube
0h	生菌 + MWY				DNA抽出	2.6
18h	生菌 + MWY	36	18h		DNA抽出	4.8
18h-Sup	生菌 + MWY	36	18h	500xg, 15s 上清	DNA抽出	4.8
18h-EMA	生菌 + MWY	36	18h		EMA処理 DNA抽出	4.5
18h-Sup-EMA	生菌 + MWY	36	18h	500xg, 15s 上清	EMA処理 DNA抽出	4.2

図8 生菌に対するスピンドウンの影響 (n=3)



前処理	操作				DNA量 log copies /PCR tube
DEAD	死菌 + MWY			DNA抽出	4.5
DEAD-Sup	死菌 + MWY	500xg, 15s 上清		DNA抽出	4.6
DEAD-EMA	死菌 + MWY		EMA処理	DNA抽出	2.9
DEAD-Sup-EMA	死菌 + MWY	500xg, 15s 上清	EMA処理	DNA抽出	1.3

図9 死菌に対するスピンドウンの効果 (n=3)



(a) LC EMA-qPCR 法 (スピンドウンなし)

(b) 改良 LC EMA-qPCR 法 (スピンドウンあり)

図 10 平板培養法と LC EMA-qPCR 法の相関 スピンドウンの効果 (n=36)