

養のレジオネラ属菌クローンの塩基配列は検出されなかった。浴槽水 F からは未培養のレジオネラ属菌クローンの塩基配列が検出されたが、クローンの半数は *L. pneumophila* であった。

各クローンライブラリーの Good's coverage は 82.9% から 98.9% を示しており、解析クローンは十分であり主要なレジオネラ属菌のクローンは回収できていると判断する。クローンライブラリー解析の結果を重視すれば、冷却水中に存在するレジオネラ属菌の 80% 以上は既存種に該当しない未知のレジオネラ属菌だと予測できる。これは、培養法では冷却水中に存在するレジオネラ属菌の一部しか検出できないことを示している。冷却水 B, G, H, J, K (CMI 連続注入) および冷却水 L (遊離塩素処理) の培養法による *L. pneumophila* の菌数は  $<10$  から  $2.9 \times 10^2$  CFU/100ml と比較的少なかったが、これらの冷却水中では全レジオネラに対する *L. pneumophila* の存在比率が低かったため、*L. pneumophila* のクローンが回収できなかったと推察する。

一方、浴槽水の多様性は冷却水と比較して明らかに低く、*L. pneumophila* のクローンが多く検出される結果となった。冷却水の場合も、遊離塩素処理の L は多様性が低くなっており、浴槽水のレジオネラ属菌の多様性が低い要因として、遊離塩素処理の影響が考えられる。

昨年度は、塩素処理レジオネラ属菌の種別調査 (培養法) を行い、無処理と比較して塩素処理では、*Legionella pneumophila* SG1 及び SG6 の比率が高くなっていることを報告した。殺菌処理法による菌叢の変化の関連は、更なる調査が必要である。

浴槽水や冷却水におけるレジオネラ属菌検査では、培養法検査「陰性」、遺伝子検査「陽性」の不一致が発生していた。これは、死菌由来と考えられ、ENA-q PCR 法により解消する可能性が考えられた。ところが調査<sup>9)</sup>の結果、浴槽水では 111 検体中 q-PCR 法で 56 検体の不一致が、EMA 処理により 23 検体に減少した。一方、冷却水の場合、82 検体中 q-PCR 法 53 検体の不一致は EMA 処理によっても 53 検体のままであった。冷却水で EMA の効果が得られない原因は、今回のクローンライブ

ラリー解析の傾向から推定される通り、冷却水中に多く存在する培養不能の未記載のレジオネラ属菌であることが考えられた。浴槽水の場合は、培養されないレジオネラ属菌の割合が小さいので、ある程度 EMA 処理の効果が得られている。本研究の結果から、培養法「陰性」、遺伝子法「陽性」の不一致は解消できないことが確認された。

#### D. 結論

(1) 2013 年 4 月から 2014 年 12 月の期間の、冷却水におけるレジオネラ属菌の存在実態を調査した。無処理の冷却水では、52.5% からレジオネラ属菌が検出された。殺菌剤種類別の検出率は、CMI 系が 12.1%, CMI+カチオン系が 11.3%, カチオン系が 17.9%, グルタルアルデヒドが 3.4%, 塩素系が 35.9% であった。殺菌剤処理により検出率は低下するが、不検出にはなっておらず、特に塩素系では高菌数が検出されている。有効な殺菌剤の選定、及び維持管理に注意する必要がある。

(2) モデル冷却塔により、各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果を評価した。無処理と、結合塩素 (全塩素 3mg/L) 処理では  $10^2 \sim 10^4$  CFU/100mL のレジオネラ属菌が継続的に検出された。結合塩素はレジオネラ属菌の抑制効果は無かった。

CMI+カチオン処理は、常時不検出を維持し、効果の持続性が確認された。

遊離塩素 (0.2mg/L) 処理は、休日や夜間の運転停止による残留塩素の消失、pH が 8.7 に上昇したことによるアメーバが増殖等の要因により、レジオネラ属菌が検出されるようになった。冷却水の遊離塩素処理では、こうした点に注意して維持管理を行う必要があることを確認できた。

(3) クローンライブラリー解析による冷却水のレジオネラ属菌の多様性調査を行った。クローンライブラリー解析の結果、冷却水では、培養法で検出されない既存種に属さないレジオネラ属菌クローンの塩基配列が大部分を占め、多様なレジオネラ菌種の存在が確認された。一方浴槽水では、*L. pneumophila* のクローンが多く検出されており、多様性は低かった。多様性の低さは、塩素による殺菌処理が関係している可能性が示唆された。

環境水中のレジオネラ属菌検査における培養法「陰性」、遺伝子「陽性」の不一致の要因として、培養不可能、未記載のレジオネラ属菌の存在があり、不一致の解消はできないことが確認された。

—以上—

#### E. 参考文献

- 1) レジオネラ症 2008.1~2012.12, IASR Vol. 34 p. 155-157 (2013)
- 2) 井上浩章, 高間朋子, 石間智生, 縣邦雄: 各種水利用設備のレジオネラ属菌検出実態, 防菌防黴誌. Vol. 41, NO. 12, pp659-661 (2013)
- 3) 財団法人ビル管理教育センター: レジオネラ症防止指針(第3版), p4 (2009)
- 4) 倉文明, 前川純子: レジオネラ症—最近の多様な感染源, IASR Vol. 34 pp169-170(2013)
- 5) Inoue, H., Noda, A., Takama, T., Ishima, T., and Agata, K. :Enhanced antifungal effect of the selective medium for the detection of *Legionella* species by a combination of cycloheximide, amphotericin B and thiabendazole. *Biocontrol Sci.*, 11, pp69-74(2006)
- 6) Inoue, H., R. Fujimura, K. Agata, and H. Ohta (2015) Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. *Microbes and Environments*, 30.pp108-112(2015)
- 7) Miyamoto, H., H. Yamamoto, K. Arima, J. Fujii, K. Murata, K. Izu, T. Shiomori, and S. Yoshida (1997) PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of Legionellae in hospital cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2489-2494.
- 8) 財団法人ビル管理教育センター: 第3版レジオネラ症防止指針, p87 (2009)
- 9) Inoue, H., Takama, T., Yoshizaki, M., and Agata, K. (2015) Detection of *Legionella* species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment. *Biocontrol Science*, 20. pp71-74(2015)

#### F. 研究発表

##### (1) 学会発表

井上浩章, 藤村玲子, 縣邦雄, 太田寛行 (2014) EMA-qPCR 法とクローンライブラリーによる環境水中のレジオネラ属菌の多様性解析. 日本防菌防黴学会第41回年次大会要旨集, 264.

##### (2) 論文発表

- ① Inoue, H., Takama, T., Yoshizaki, M., and Agata, K. (2015) Detection of *Legionella* species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment. *Biocontrol Science*, 20.pp71-74(2015)
- ② Inoue, H., Fujimura, R., Agata, K., and Ohta, H. (2015) Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. *Microbes and Environments*, 30. pp108-112(2015)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) なし

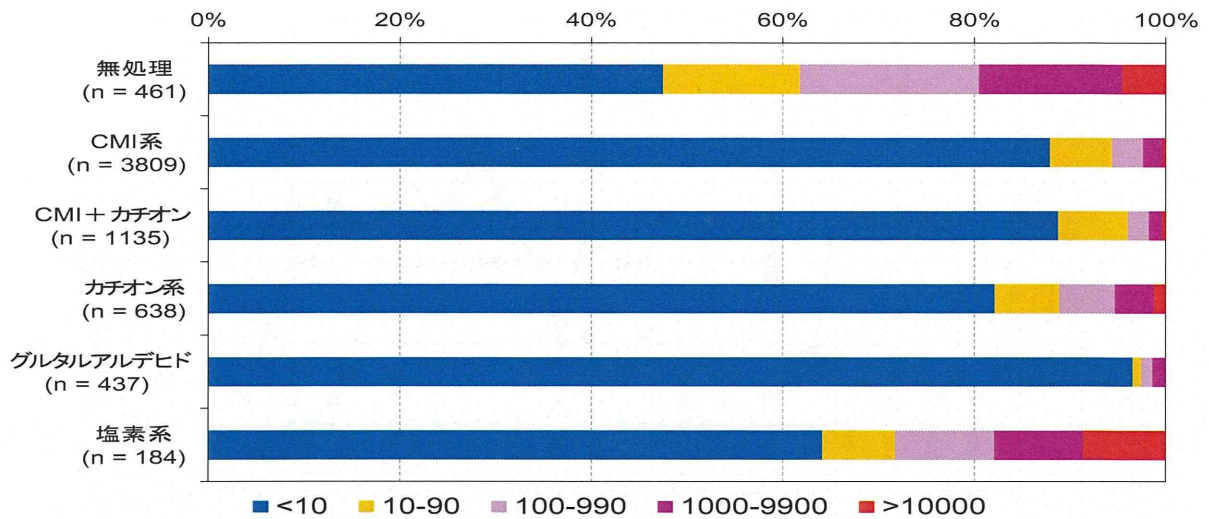


図1. 殺菌剤の種類別レジオネラ属菌の菌数分布  
 (凡例は、レジオネラ属菌数の範囲を示す 単位: CFU/100mL)



図2. モデル冷却塔の設置状況

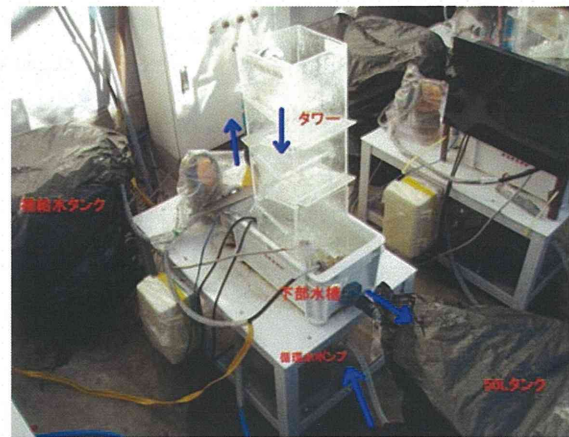


図3. モデル冷却塔の構成

(タンク類、タワー部を黒く覆っているのは、藻類の繁殖を防止するためである)

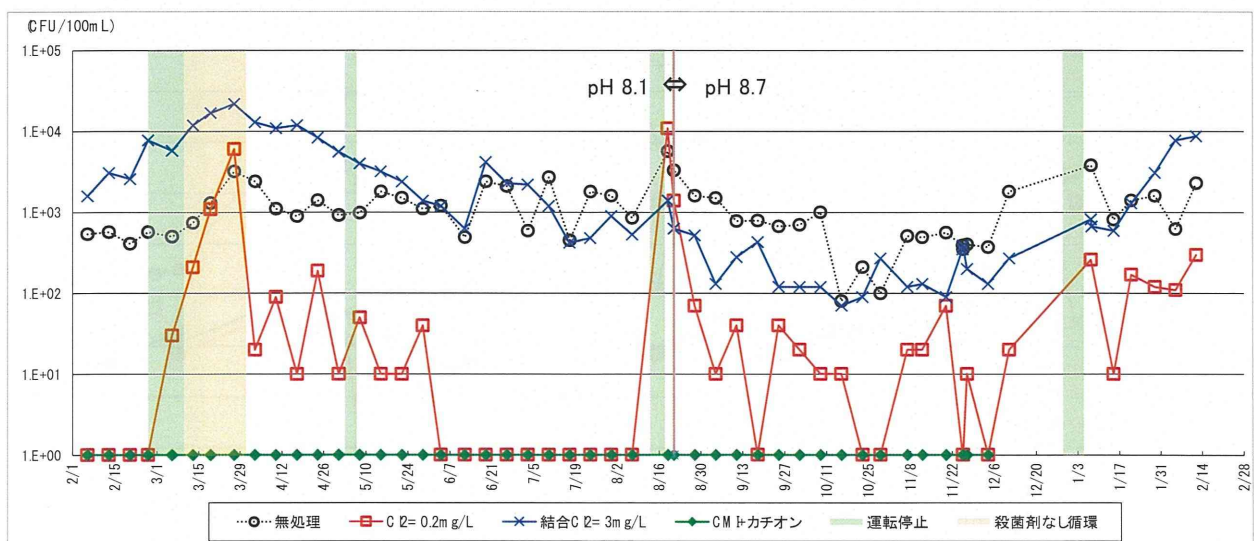


図4. モデル冷却水のレジオネラ属菌の推移

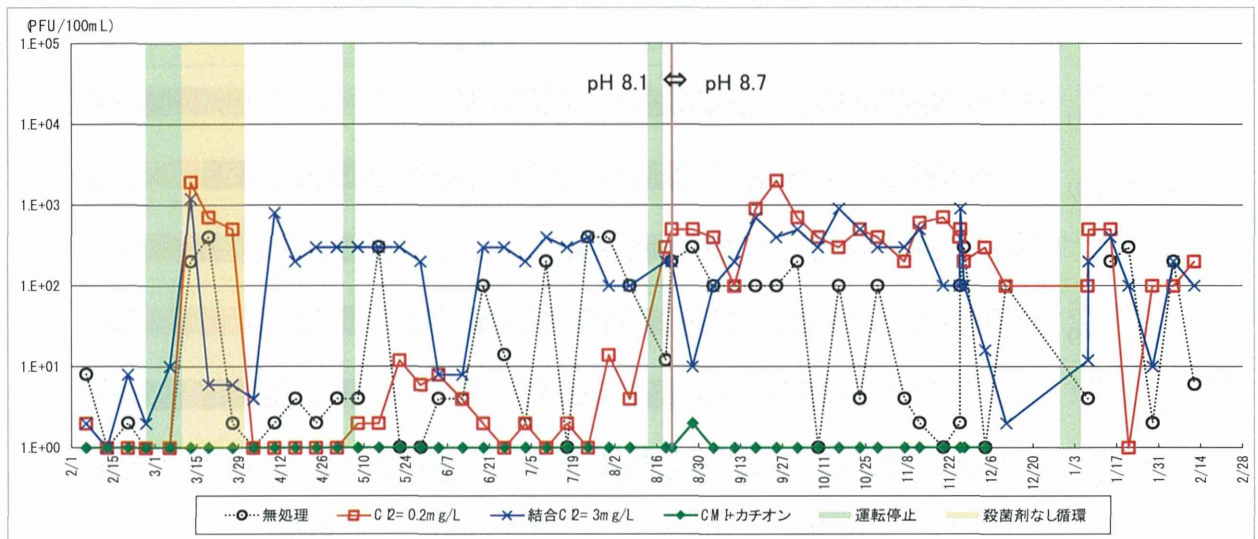


図5. モデル冷却水のアメーバ数の推移

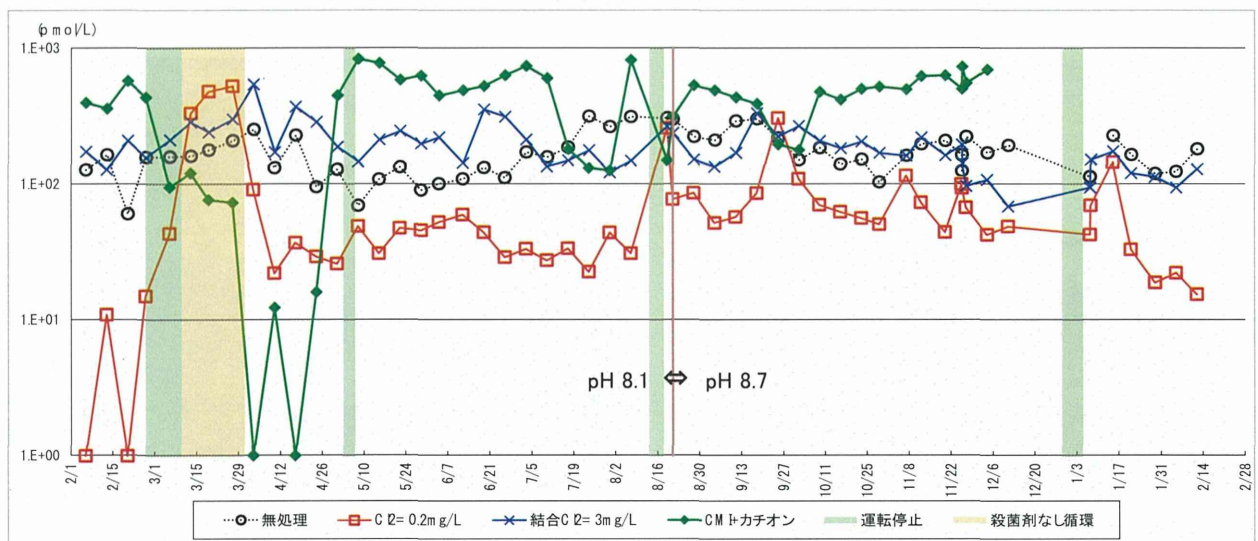


図6. モデル冷却水のATP値の推移

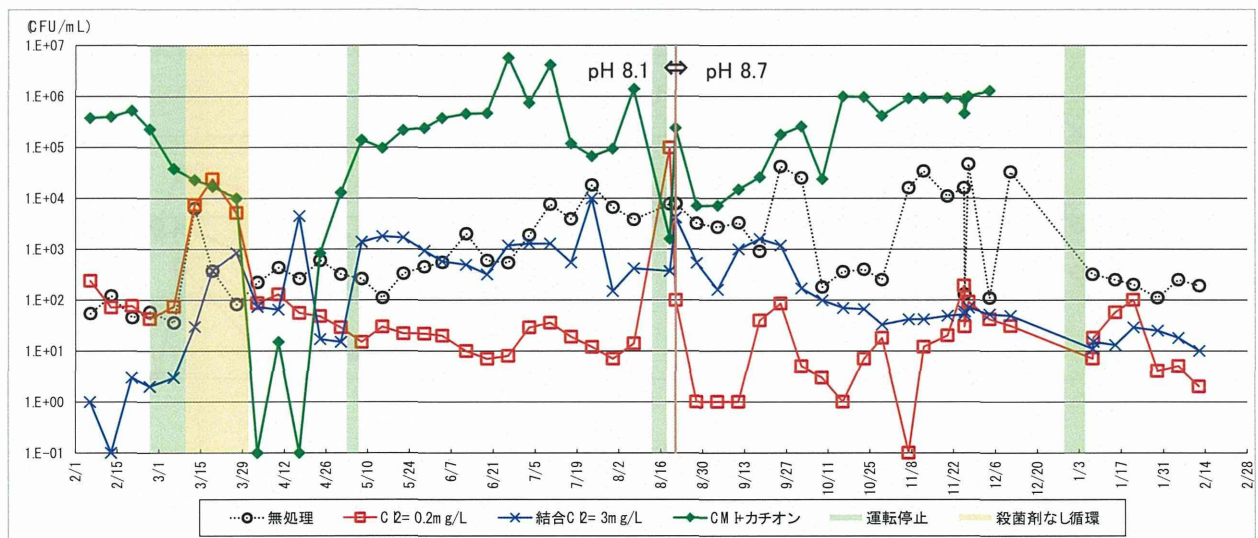


図7. モデル冷却水の一般細菌数の推移

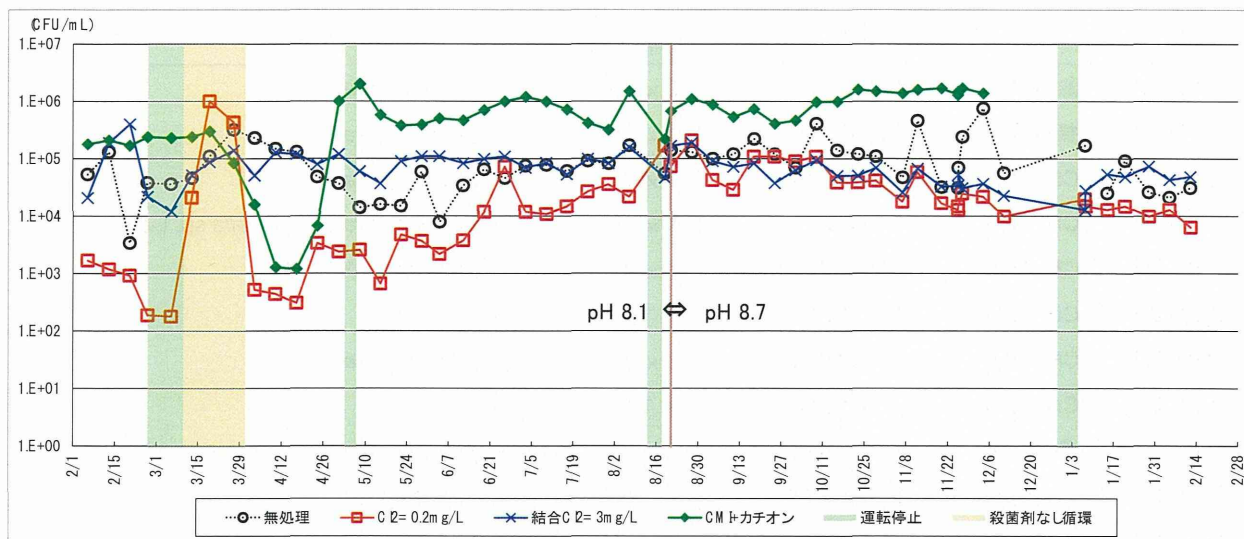


図 8. モデル冷却水の従属栄養細菌数の推移

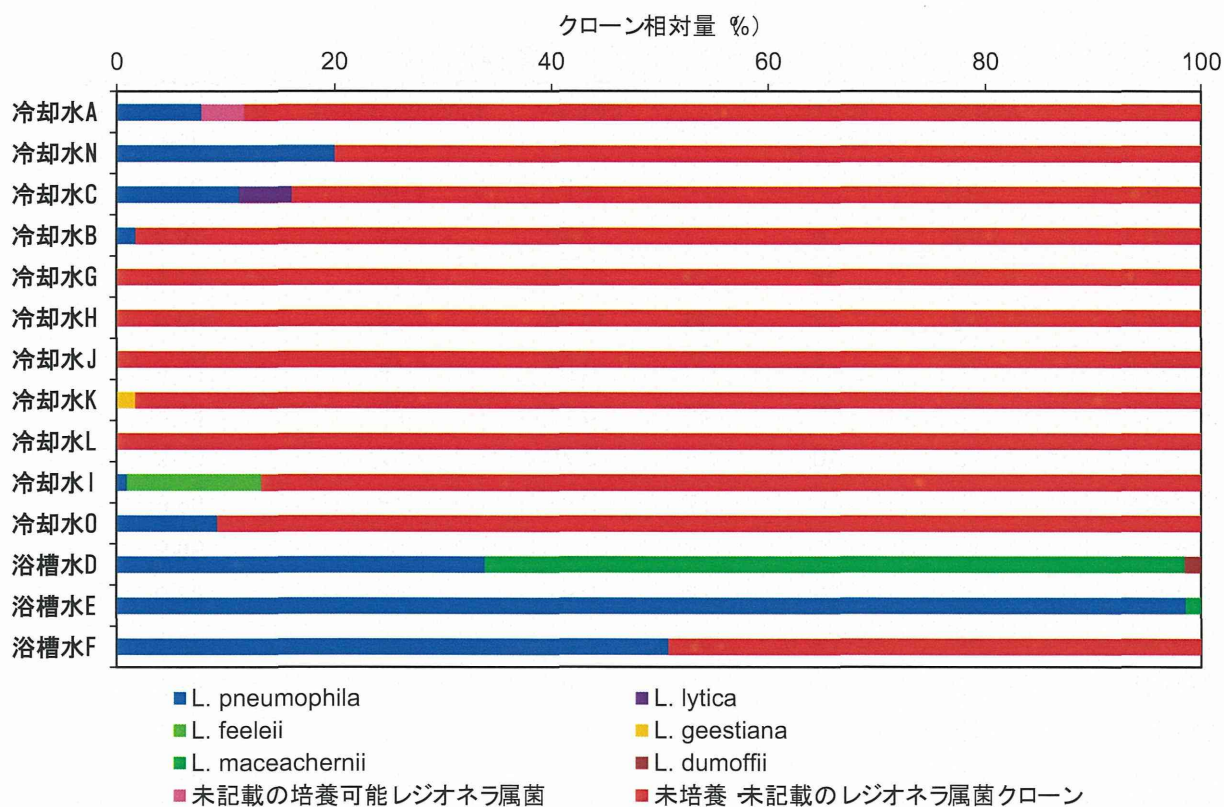


図 9. 各クローンライブラリーを構成するクローンの相対量

表 1. クローンライブラリー解析した冷却水および浴槽水

試料	処理状況	採水日	レジオネラ属菌数 (CFU/100 ml)	菌種
冷却水 A	無処理	2012/11/6	$1.2 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 N	無処理	2014/ 6/27	$6.8 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 C	CMI 間欠	2013/ 2/14	$7.6 \times 10^4$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 B	CMI 連続	2013 /2/ 7	$2.9 \times 10^2$	<i>L. pneumophila</i> , <i>Legionella</i> sp. L-29
冷却水 G	CMI 連続	2013/12/ 3	$4 \times 10$	<i>Legionella</i> sp. LC2720
冷却水 H	CMI 連続	2014/ 1/17	< 10	—
冷却水 J	CMI 連続	2013/12/ 3	$2 \times 10$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 K	CMI 連続	2013/12/ 5	< 10	—
冷却水 L	遊離塩素	2014/ 7/15	$5 \times 10$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 I	結合塩素	2013/11/29	$2.7 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>
冷却水 O	結合塩素	2014 /9/ 9	$9.8 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>
浴槽水 D	遊離塩素	2013/ 3/21	$3.2 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. dumoffii</i>
浴槽水 E	遊離塩素	2013/ 4/23	$4.0 \times 10^4$	<i>L. pneumophila</i>
浴槽水 F	遊離塩素	2013/ 5/15	$6.1 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i>

表 2. 各試料から得られたクローンライブラリーの多様性指数

試料	解析した クローン数	得られた OTU 数	Chao1	Simpson ( $1/\lambda$ )	Shannon-Wiener ( $H'$ )	Good's coverage (%)
冷却水 A	51	11	15	7.87	2.16	92.2
冷却水 N	64	6	7	3.25	1.29	96.9
冷却水 C	62	16	28	13.32	2.63	87.1
冷却水 B	58	17	23	10.60	2.53	87.9
冷却水 G	75	8	10	2.08	1.14	96.0
冷却水 H	66	19	30	9.71	2.45	84.8
冷却水 J	82	10	14	2.70	1.37	93.9
冷却水 K	58	6	7	2.44	1.15	96.6
冷却水 L	87	2	2	1.02	0.06	98.9
冷却水 I	105	29	67	9.91	2.67	82.9
冷却水 O	86	22	52	7.41	2.35	83.7
浴槽水 D	65	3	3	1.90	0.71	98.5
浴槽水 E	70	2	2	1.03	0.07	98.6
浴槽水 F	65	7	7	2.58	1.16	96.9

**OTU (Operational taxonomic units)**: クローンを分類する際に、その塩基配列の一致率から分類されるグループの単位で、試料から得られたクローンが多くの OTU に分類されれば多様な塩基配列が含まれることを示す。

**Chao1**: 試料に含まれていると推測される OTU 数の予測値。

**Simpson ( $1/\lambda$ )** 及び **Shannon-Wiener ( $H'$ )**: どちらも多様性指数で数値が大きいほど多様性が高いことを示す。

**Good's coverage**: クローンライブラリーのカバー率で、解析クローン数が不足していると値が低くなる。

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

#### Liquid Culture EMA qPCR によるレジオネラ生菌迅速検査法の改良と評価

研究分担者	磯部 順子	富山県衛生研究所
研究協力者	飯高 順子	川崎市健康安全研究所
	金谷 潤一	富山県衛生研究所
	武藤 千恵子	東京都健康安全研究センター
	山口 友美	宮城県保健環境センター

#### 研究要旨

本研究では、レジオネラ生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、昨年度までの検討をもとに従来のLiquid-culture ethidium-monoazide (LC EMA) qPCR法を少し改変し、主に循環式浴槽水などの実試料176検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。また、市販されている他の迅速検査キット（生菌と死菌の両方を検出するLAMP法）についても平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行い、LC EMA qPCR法と比較した。

LC EMA qPCR法について、平板培養法による10 CFU/100 ml以上の検体を検出するカットオフ値として1 CFU/100 ml相当を用いて解析を行った結果、平板培養法に対する感度は89.5%（51/57検体）、特異度は73.9%（88/119検体）であり、平板培養法と高い相関を示した。

LAMP法およびLC EMA qPCR法を実施した98検体について、平板培養法に対する感度、特異度をそれぞれ比較した結果、LAMP法の平板培養法に対する感度は77.5%（31/40検体）、特異度は69.0%（40/58検体）であった。一方、LC EMA qPCR法の平板培養法に対する感度は90.0%（36/40検体）、特異度は74.1%（43/58検体）であり、いずれもLAMP法より高かった。

LC EMA qPCR法と平板培養法の菌数（定量値）の比較では、 $R^2 = 0.6176$ と高い相関を示し、全体として平板培養法の菌数を反映していた。ワーキンググループ推奨法を用いて平板培養を実施した場合、LC EMA qPCR法のカットオフ値に5 CFU/100 ml相当を用いて解析を行うと感度が低下するため、昨年度の結果と同様にLC EMA qPCR法のカットオフ値は1 CFU/100 ml相当が良いと考えられた。

今年度の結果から、主に循環式浴槽水を対象とした場合、LC EMA qPCR法は、カットオフ値1 CFU/100 ml相当を用いることで平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。

## A 研究目的

現在、浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は平板培養法が用いられている。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに7~10日を要する。一方、濃縮検体から直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法(リアルタイムPCR法およびLAMP法)は、検査開始から数時間で結果を得られるため、配管洗浄などの効果確認に活用されている<sup>1)</sup>。しかしながら、これらの方法は死菌も検出するため、解釈と活用方法に注意を要する。そこで近年、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、平成25年4月にキット化、市販された。

本研究では、レジオネラ生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、昨年度までの検討をもとにLC EMA qPCR法の方法を少し改変し、浴槽水などの実試料を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。また、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LAMP法)についても平板培養法に対する感度、特異度等の評価を行い、LC EMA qPCR法と比較した。

## B 材料と方法

### 1 検査材料

全国4か所の地方衛生研究所において、平成26年度に浴用施設から176検体の試料を採取し、検査法の検討に用いた(表1)。検体の内訳は、浴槽水が151検体(85.8%)、原水が7検体(4.0%)、シャワー水が9検体(5.1%)、採暖槽水が6検体(3.4%)、足湯が3検体(1.7%)であった。浴槽水の泉質は、温泉が53検体(35.1%)、白湯が94検体(62.3%)、薬湯が4検体(2.6%)であった。調査可能であった95検体の浴槽水のうち、83検体(87.4%)が循環式浴槽、12検体(12.6%)がかけ流し式浴槽であった。

### 2 検査方法

ATP値は、検水100倍濃縮液にルシパックワイドまたはルシパックPen(キッコーマン)の専用綿棒を浸して約100 $\mu$ lを吸い取り、携帯用簡易測定器を用いて検水10ml当たりのRLU値を測定した。

平板培養法は新版レジオネラ症防止指針に準じ、各機関の方法で実施した。

LAMP法は、Loopampレジオネラ検査キットE(LMP661、栄研化学)を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。

LC EMA qPCR法は、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)を用い、方法を少し改変して使用した。すなわち、活性炭によるEMA光照射の阻害を回避するため、18時間培養後のMWY液体培地を500 $\times$ gで15秒間遠心し、上清100 $\mu$ lを用いてEMA処理を行った。また、ATP値が5,000RLU/10ml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。さらに、ATP値5,000RLU/100ml以上の検体の各濃縮液について、酸処理とは別に熱処理(50 $^{\circ}$ C20分間)も実施し、検討した。

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、EMA試薬に添付の取扱説明書に記載された方法でコピー数からCFUに換算した。3機関においては、手技の安定化のためリアルタイムPCRをN=2で実施した。

## C 結果

### 1 平板培養法による結果

176検体について検査した結果、57検体(32.4%)から10CFU/100ml以上のレジオネラ属菌が検出された。菌数別に見ると、10~99CFU/100mlが44検体、100~999CFU/100mlが7検体、1,000



CFU/100 ml 以上が 6 検体であった。最も多かった検体では、13,000 CFU/100 ml のレジオネラ属菌が検出された。血清群別の結果、*L. pneumophila* が 57 検体すべてから分離された。中でも、*L. pneumophila* 血清群 (SG) 1 が 23 検体 (40.4%) から分離され、最も多かった (表 2)。次に多かったのは *L. pneumophila* SG 5 と *L. pneumophila* SG 6 で、それぞれ 16 検体 (28.1%) から分離された。*L. pneumophila* 以外の菌種では、*L. londiniensis* が 4 検体 (7.0%)、*L. dumoffii* が 2 検体 (3.5%)、*L. bozemanii* が 1 検体 (1.8%)、*L. micdadei* が 1 検体 (1.8%)、*Legionella* spp. が 2 検体 (3.5%) から分離された。

## 2 LAMP 法による結果

### (1) 平板培養法との比較

LAMP 法を使用した 98 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 3)。平板培養法では 40/98 検体 (40.8%) の検体から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、LAMP 法では 49/98 検体 (50.0%) の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。LAMP 法の平板培養法に対する感度は 77.5% (31/40 検体)、特異度は 69.0% (40/58 検体) であった。

### (2) LAMP 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性 (10 CFU/100 ml 以上) となったが LAMP 法で陰性となった 9 検体のうち、7 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml であった (表 4、No.1~7)。

## 3 LC EMA qPCR 法による結果

### (1) 平板培養法との比較

昨年度の検討結果<sup>2)</sup>を参考に、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った。LC EMA qPCR 法を使用した 176 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 5a)。平板培養法では 57/176 検体 (32.4%) の検体から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、LC EMA qPCR 法では 82/176 検体 (46.6%) の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出され

た。LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 89.5% (51/57 検体)、特異度は 73.9% (88/119 検体) であった。LC EMA qPCR 法と平板培養法との菌数 (定量値) の相関は、 $R^2 = 0.6176$  であった (図 1)。

平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 5 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った場合、LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 77.2% (44/57 検体)、特異度は 83.2% (99/119 検体) であった (表 5b)。

なお、平板培養法低濃度陽性検体 (10 CFU/100 ml) における LC EMA qPCR 法の感度は 73.3% (11/15 検体) であった。

### (2) LC EMA qPCR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性 (10 CFU/100 ml 以上) となったが LC EMA qPCR 法で陰性 (1 CFU/100 ml 相当未満) となった 6 検体のうち、4 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml であった (表 6、No.1~4)。残りの 2 検体 (No. 5、No. 6) は源泉が温泉であり、検体の ATP 値は No. 5 の検体が 76,093 RLU/10 ml、No. 6 の検体が 40,590 RLU/10 ml と高く、採水時の遊離残留塩素濃度 (mg/L) はどちらも 0.05 未満であった。また、No. 5 の検体は検水が白濁していた。

### (3) LC EMA qPCR 法における偽陽性検体

平板培養法の結果が陰性 (10 CFU/100 ml 未満) となったが LC EMA qPCR 法で陽性 (1 CFU/100 ml 相当以上) となったのは、31 検体 (17.2%) であった。これら 31 検体における LC EMA qPCR 法の定量値を見ると、19 検体は 1~9 CFU/100 ml 相当、11 検体は 10~99 CFU/100 ml 相当、1 検体は 546.3 CFU/100 ml 相当であった。546.3 CFU/100 ml 相当の菌数が検出された検体は、源泉が温泉であり、検水が白濁していた。

### (4) 同一検体における LAMP 法と LC EMA qPCR 法との比較

LAMP 法および LC EMA qPCR 法を実施した 98 検体について、平板培養法に対する感度、特異度をそれぞれ比較した (表 3、7)。LAMP 法の

平板培養法に対する感度および特異度は上述したとおり 77.5% (31/40 検体)、69.0% (40/58 検体) であった。一方、LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 90.0% (36/40 検体)、特異度は 74.1% (43/58 検体) であり、いずれも LAMP 法より高かった。

#### (5) 夾雑菌汚染検体における結果

採水時の ATP 値が 5,000 RLU/10 ml 以上の 14 検体について、LC EMA qPCR 法の前処理として酸処理法を用いた場合と、熱処理法を用いた場合の定量値を、それぞれ平板培養法の結果と比較した (表 8)。平板培養法と LC EMA qPCR 法の不一致検体を見ると、酸処理法では、平板培養陽性・LC EMA qPCR 陰性は 2 検体、平板培養陰性・LC EMA qPCR 陽性は 4 検体であった。一方、熱処理法では、平板培養陽性・LC EMA qPCR 陰性は 1 検体、平板培養陰性・LC EMA qPCR 陽性は 3 検体であった。14 検体の定量値を、前処理別にそれぞれ平板培養法の菌数と比較すると、酸処理法では  $R^2 = 0.559$ 、熱処理法では  $R^2 = 0.6274$  であった (図 2)。

#### (6) 平板培養法における前処理別結果と LC EMA qPCR 法との比較

2 機関においては、平板培養法の前処理として未処理、酸処理、熱処理すべての方法をそれぞれ実施し、一番高い菌数を検体の培養結果とした。また、必要に応じて非濃縮検体も同様に実施した (ワーキンググループ推奨法)。この 2 機関において、ワーキンググループ推奨法の結果と、酸処理法のみで測定した結果を、それぞれ LC EMA qPCR 法の結果と比較した (表 9、10)。

平板培養法に酸処理法のみを用いた場合、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出する LC EMA qPCR 法のカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った結果、LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 91.7% (22/24 検体)、特異度は 67.1% (47/70 検体) であった (表 9a)。カットオフ値 5 CFU/100 ml 相当を用い場合、感度は 91.7% (22/24 検体)、特

異度は 81.4% (57/70 検体) であった (表 9b)。

平板培養法にワーキンググループ推奨法を用いた場合、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出する LC EMA qPCR 法のカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った結果、LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 88.9% (32/36 検体)、特異度は 77.6% (45/58 検体) であった (表 10a)。カットオフ値 5 CFU/100ml 相当を用い場合、感度は 75.0% (27/36 検体)、特異度は 86.2% (50/58 検体) であった (表 10b)。

## D 考 察

今年度は、市販されている生菌迅速検査キット (LC EMA qPCR 法) について、培養後の活性炭を除去するなど一部改良したプロトコルで実施し、平板培養法や LAMP 法の結果と比較し、評価した。

LC EMA qPCR 法について、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った結果、平板培養法に対する感度は 89.5%、特異度は 73.9% であり、平板培養法と高い相関を示した。カットオフ値を 5 CFU/100 ml 相当にした場合、特異度は 83.2% に向上するが、感度は 77.2% に低下するため、平板培養陽性検体を見逃すリスクを避けるため、LC EMA qPCR 法のカットオフ値は 1 CFU/100 ml 相当が良いと考えられた。同一検体における LAMP 法との比較の結果、LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 90.0%、特異度は 74.1% であり、LAMP 法の感度 (77.5%)、特異度 (69.0%) よりも高く、より平板培養法と相関している方法であると考えられた。

LAMP 法で偽陰性となった 7/9 検体は、平板培養法の菌数が 10 CFU/100 ml と低濃度であった。LC EMA qPCR 法においても、偽陰性となった 4/6 検体は平板培養法の菌数が 10 CFU/100 ml であり、低濃度平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml) にお

ける LC EMA qPCR 法の感度は 73.3% (11/15 検体) であったことから、低濃度培養陽性検体においては、迅速検査法の感度がやや低下すると考えられた。

LC EMA qPCR 法と平板培養法の菌数(定量値)の比較では、 $R^2 = 0.6176$  と高い相関を示した。LC EMA qPCR 法で偽陰性となった 4/6 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml と低濃度であった。残りの 2 検体は、ATP 値が高く、採水時の遊離残留塩素濃度も低かったため、夾雑菌汚染によって MWY 液体培地でのレジオネラ属菌の培養が阻害された可能性は考えられる。LC EMA qPCR 法で偽陽性となった検体の 61.3% (19/31 検体) は 1~9 CFU/100 ml 相当と低い定量値であった。546.3 CFU/100 ml 相当の菌数が検出された 1 検体は、源泉が温泉(白濁)のため、手技の問題以外に温泉成分による EMA 効果の阻害や、viable but non-culturable 状態のレジオネラ属菌が多く存在していた可能性も考えられる。ただし、LC EMA qPCR 法は、全体として平板培養法の菌数を反映していた。

昨年度の検討結果<sup>2)</sup>から、活性炭を除去することで EMA 光照射の阻害を回避できるが、平板培養法で陰性となった検体の 25.2% (31/123 検体) が LC EMA qPCR 法で陽性となった。これらの検体については、viable but non-culturable 状態のレジオネラ属菌など、平板培養法で検出できないレジオネラ属菌が存在している可能性が示唆された。

夾雑菌汚染検体が考えられる(採水時の ATP 値が 5,000 RLU/10 ml 以上である) 14 検体では、前処理に熱処理法を用いたほうが平板培養の結果と高い相関を示した。しかしながら、今後熱処理法を導入するべきかどうかについては、検体数を増やして検討する必要がある。

平板培養法に酸処理法のみを用いて実施した場合、LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は、カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当と 5 CFU/100 ml 相当を用いた場合で同等であった

(特異度は 5 CFU/100 ml 相当を用いた場合のほうが高かった)。しかしながら近年、研究班として平板培養における推奨法を提示している<sup>3)</sup>。この方法を用いて平板培養を実施した場合、LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は、カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当を用いた場合 88.9% であり、5 CFU/100 ml 相当を用いた場合 (75.0%) よりも高かった。ワーキンググループ推奨法では、複数の前処理を行った後、それぞれの処理ごとに平板培養するので、平板培養法の感度が高くなると考えられる。そのため、LC EMA qPCR 法において低濃度平板培養陽性検体を見逃すリスクを避けるため、この結果からも LC EMA qPCR 法のカットオフ値は 1 CFU/100 ml 相当が良いと考えられた。

今年度の結果から、主に循環式浴槽水を対象とした場合、LC EMA qPCR 法は、カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当を用いることで平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。

## E 結論

市販されている生菌迅速検査キット(LC EMA qPCR 法)について、培養後の活性炭を除去するなど一部改良した方法で実施し、平板培養法や LAMP 法の結果と比較し、評価した。

LC EMA qPCR 法について、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った結果、平板培養法に対する感度は 89.5%、特異度は 73.9% であり、平板培養法と高い相関を示した。LC EMA qPCR 法と平板培養法の菌数(定量値)の比較では、 $R^2 = 0.6176$  と高い相関を示し、全体として平板培養法の菌数を反映していた。ワーキンググループ推奨法を用いて平板培養を実施した場合、LC EMA qPCR 法のカットオフ値に 5 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行うと感度が低下するため、昨年度の結果と同様に LC EMA qPCR 法のカットオフ値は 1 CFU/100 ml 相当が良いと考えられた。

今年度の結果から、主に循環式浴槽水を対象とした場合、LC EMA qPCR 法は、カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当を用いることで平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。

#### 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) 烏谷 竜哉 他、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化ー市販迅速キットの評価ー、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、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平成 25 年度 総括・分担研究報告書、89-103.
- 3) 森本 洋 他、レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み、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 平成 24 年度 総括・分担研究報告書、93-130.

#### F 研究発表

なし

#### G 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 検体内訳

		機関				
		A	B	C	D	計
浴槽水	温泉	15	27	3	8	53
	白湯	26	23	11	34	94
	薬湯	3		1		4
原水	温泉			7		7
シャワー水				6	3	9
採暖槽水					6	6
足湯					3	3
計		44	50	28	54	176

表 2. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 1	23
SG 5	16
SG 6	16
SG 3	9
SG 9	6
SG 8	5
SG 10	4
SG 11	3
SG 4	1
SG 12	1
血清群不明	4
<i>L. londiniensis</i>	4
<i>L. dumoffii</i>	2
<i>L. bozemanii</i>	1
<i>L. micdadei</i>	1
<i>Legionella spp.</i>	2

表 3. 平板培養法とLAMP法との比較

		平板培養法		
		≥ 10	< 10	計
LAMP法	検出	31	18	49
	不検出	9	40	49
計		40	58	98

感度 77.5%、特異度 69.0%

表 4. LAMP法における偽陰性検体

No.	検体	泉質	着色など	湯温 (°C)	残塩 (mg/L)	pH	ATP値 (RLU/10 ml)	平板培養法 (CFU/100 ml)	菌種	LC EMA qPCR法 (CFU/100 ml相当)
1	浴槽水	白湯		41	0.28	8.08	18	10	<i>L. pneumophila</i>	10.3
2	浴槽水	白湯		39.3	0.1	8.18	50	10	<i>L. pneumophila</i>	7.5
3	浴槽水	白湯		39	1.25	8.16	12	10	<i>L. pneumophila</i>	0.0
4	浴槽水	白湯		41	>2.0	NT	11	10	<i>L. pneumophila</i>	17.7
5	浴槽水	温泉	白濁	41.7	<0.05	NT	177,849	10	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. dumoffii</i>	20.4
6	浴槽水	温泉	うす茶色	39.6	0.1	NT	144	10	<i>L. pneumophila</i>	3.1
7	採暖槽水	白湯		36.9	1.3	8.28	NT	10	<i>L. pneumophila</i>	3.5
8	浴槽水	温泉		42	0.2	NT	442	20	<i>L. pneumophila</i>	16.8
9	浴槽水	温泉		40	<0.05	NT	16,188	30	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. londiniensis</i>	24.0

表 5. 平板培養法とLC EMA qPCR法との比較

a. LC EMA qPCR法のカットオフ値1 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 1	51	31	82
	< 1	6	88	94
計		57	119	176

感度 89.5%、 特異度 73.9%

b. LC EMA qPCR法のカットオフ値5 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 5	44	20	64
	< 5	13	99	112
計		57	119	176

感度 77.2%、 特異度 83.2%

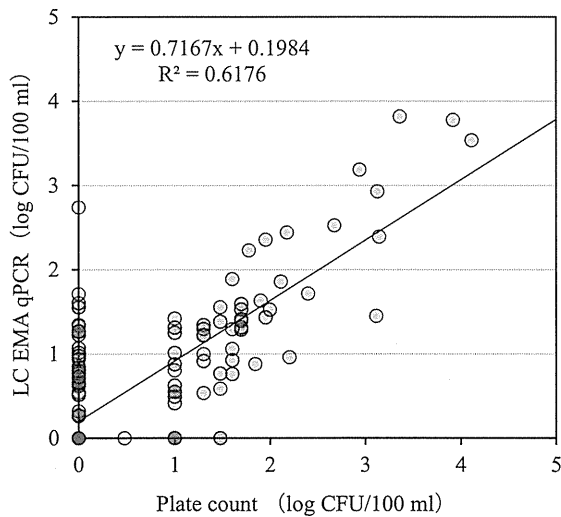


図1. 平板培養法とLC EMA qPCR法との相関

表 6. LC EMA qPCR法における偽陰性検体

No.	検体	泉質	着色など	湯温 (°C)	残塩 (mg/L)	pH	ATP値 (RLU/10 ml)	平板培養法 (CFU/100 ml)	菌種	LAMP法
1	浴槽水	白湯		39	1.25	8.16	12	10	<i>L. pneumophila</i>	-
2	浴槽水	白湯		43	<0.1	NT	1,006	10	<i>L. pneumophila</i>	+
3	浴槽水	白湯		37.4	0.4	6.7	NT	10	<i>L. pneumophila</i>	NT
4	浴槽水	白湯		39.4	0	6.56	NT	10	<i>L. pneumophila</i>	NT
5	浴槽水	温泉	白濁	45.6	<0.05	NT	76,093	30	<i>L. pneumophila</i>	+
6	浴槽水	温泉		42.6	<0.05	NT	40,590	30	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. dumoffii</i>	+

表 7. LAMP実施検体におけるLC EMA qPCR法（カットオフ値 1 CFU/100 ml相当）と平板培養法との比較

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 1	36	15	51
	< 1	4	43	47
計		40	58	98

感度 90.0%、 特異度 74.1%

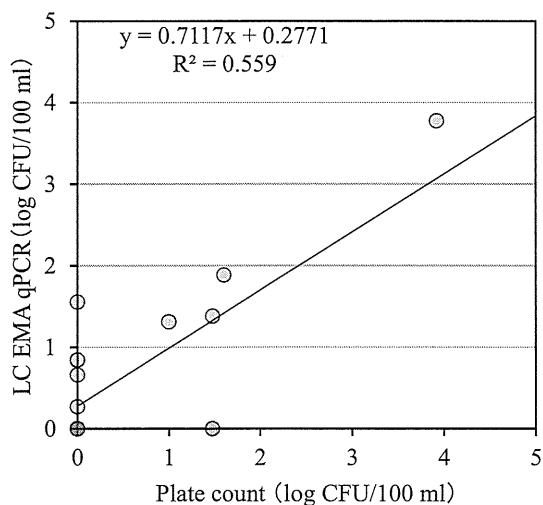
表 8. 夾雑菌汚染検体（ATP値5,000 RLU/10 ml以上）における前処理別のLC EMA qPCR法の結果

a. 酸処理20分間

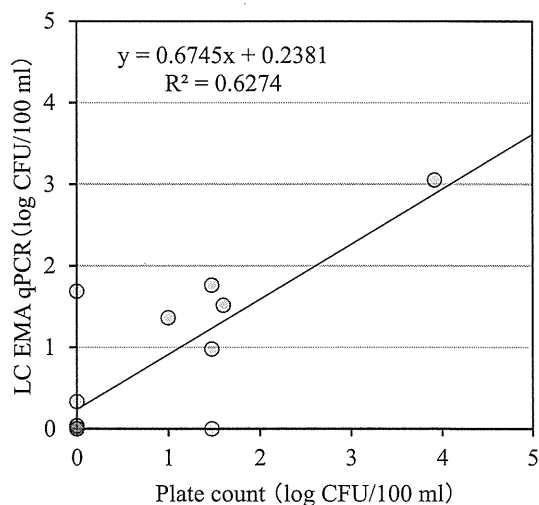
		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 1	4	4	8
	< 1	2	4	6
計		6	8	14

b. 熱処理20分間

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 1	5	3	8
	< 1	1	5	6
計		6	8	14



a. 酸処理法



b. 熱処理法

図 2. 前処理別における平板培養法と LC EMA qPCR 法との相関

表 9. 酸処理法による平板培養と LC EMA qPCR との比較

a. LC EMA qPCR法のカットオフ値1 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 1	22	23	45
	< 1	2	47	49
計		24	70	94

感度 91.7%、 特異度 67.1%

b. LC EMA qPCR法のカットオフ値5 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 5	22	13	35
	< 5	2	57	59
計		24	70	94

感度 91.7%、 特異度 81.4%

表 10. ワーキンググループ推奨法による平板培養と LC EMA qPCR との比較

a. LC EMA qPCR法のカットオフ値1 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 1	32	13	45
	< 1	4	45	49
計		36	58	94

感度 88.9%、 特異度 77.6%

b. LC EMA qPCR法のカットオフ値5 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 5	27	8	35
	< 5	9	50	59
計		36	58	94

感度 75.0%、 特異度 86.2%



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

生菌遺伝子検査法(Liquid Culture EMA-quantitative PCR, 以下 LC EMA-qPCR)の標準化

—浸漬実験由来レジオネラ属菌を用いた長崎県の実施例—

研究協力者: 浦山みどり 長崎県環境保健研究センター

研究協力者: 田栗利紹 長崎県環境保健研究センター

A. 研究目的

LC EMA-qPCR の改良と評価の研究に、本年度より研究協力者として参加した。レジオネラ属菌はアメーバ等の原虫に寄生して増殖し、土壌や環境水に生息している。当センターでは観賞用水槽による浸漬式実験モデルを構築し、レジオネラ自然汚染を再現した検水について、平板培養法と LC EMA-qPCR との比較を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 採水方法

1) 浸漬式実験モデルは観賞用水槽(12 L)を用いて作製した。即ち、入浴施設から入手した水と汚染ろ材を一定温度(40~42°C)で攪拌して、レジオネラ属菌発生に適する環境を作り出した。循環式浴槽では塩素管理下において有機物が蓄積し、レジオネラの自然汚染に影響することが知られている。水は、高濃度の有機物含有水が得られるように、循環式入浴施設から塩素管理下で換水前の井水と温泉水を採取し、使用直前に塩素を不活化させたものを用いた。これらの過マンガン酸カリウム消費量をパックテストで測定した結果はそれぞれ 12 mg/L と 6 mg/L であった。ろ材は入浴施設から入手した約 3 kg の汚染ろ材(多孔質ろ材と砂の混合物)を用い、水きりネットで包装したものを水槽に浸漬させた。本ろ材は 1 日あたり客数 500 人規模の施設で約 6 年間使用したもので、使用前まで-30°C

で凍結保存していた。採水は、実験開始直後、24h、48h...と定期的に行い、2.5%チオ硫酸ナトリウム 1 ml を添加した滅菌済みポリプロピレン採水容器に 500 ml 採取した。

2. 検査方法

1) 試料の濃縮と前処理

採水後の 500 ml 検水を、直径 47 mm、孔径 0.4  $\mu\text{m}$  のポリカーボネートタイプメンブレンフィルター(ミリポア)で吸引ろ過した後に、フィルターを滅菌蒸留水 5 ml で洗い出し、1 分間攪拌した懸濁液を検水原液(100 倍濃縮液)とした。ATP 量は、ルシパックワイド(キッコーマン)の専用綿棒を用いて 100  $\mu\text{l}$  をルミテスター PD-10 で測定し、検水 100 mL あたりの RLU 値を算出した。5000 RLU/100ml 以上の検体は、1000 倍濃縮液 100  $\mu\text{l}$  と 100 倍濃縮液 100  $\mu\text{l}$  について LC EMA-qPCR を検討した。

1000 倍濃縮液は 100 倍濃縮液 1 ml を 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を 900  $\mu\text{l}$  除去して 100  $\mu\text{l}$  とした。

迅速検査班から提示されたプロトコル<sup>1)</sup>に従い、前処理を行った。ATP 値が 5000 RLU/100ml 未満の検体は、1000 倍濃縮液 100  $\mu\text{l}$  に酸処理液(酸処理液:0.2 M HCl-KCl buffer, pH2.2(武藤化学))を 100  $\mu\text{l}$  添加し室温で 4 分間静置した(以下、酸処理)。また、5000 RLU/100ml 以上の検体は、1000 倍濃縮液及び 100 倍濃縮液の両方について①酸処理 20 分間、②熱処理(50°C×20 分間)、③熱処理(50°C×

20 分間) + 酸処理 4 分間 (以下熱酸処理) を実施した。

## 2) 平板培養法

平板培養法は研究班の精度管理ワーキンググループ推奨法<sup>2)</sup>に準じて行った。培地はシステム添加 GVPC 培地 (シスメックスバイオメリユー) を使用し、塗抹後 35°C で 3~7 日間培養し、システム要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。

## 3) LC EMA-qPCR

前処理をした試料に MWY 液体培地 (*Legionella* LC Medium base ; 9016、タカラバイオ) 900  $\mu$ l を添加し、36°C、18 時間静置培養した。培養後、軽くボルテックスし、15 秒間スピンドウン、上清 100  $\mu$ l を分取した。Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (7730、タカラバイオ) で EMA 処理を行い、死菌由来の PCR の増幅を抑制させ、引き続き Lysis Buffer for *Legionella* (9181、タカラバイオ) を 50  $\mu$ l 添加し、95°C で 10 分間インキュベートした。ボルテックスで軽く混和し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。5 分間氷浴後、上清の 25  $\mu$ l を DNA 溶液とした (直ちに測定しない場合は -20°C で保存した)。

定量 PCR は Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (CY240、タカラバイオ) をマニュアルに沿って使用し、N=2 で実施した。リアルタイム PCR 装置は Thermal Cycler Dice Real Time System (TP900、タカラバイオ) を使用した。反応条件は 95°C、10 秒間の初期変性のうち、95°C  $\times$  5 秒間、55°C  $\times$  10 秒間、72°C  $\times$  20 秒間 (検出) を 1 サイクルとして 45 サイクル反応させた。

LC EMA-qPCR の結果として得られたコピー数から迅速検査班提示のプロトコル<sup>3)</sup>に従って、検水 100 ml 中の菌数を換算した。また、ATP 値が 5000 RLU/100ml 以上の検体については、1000 倍濃縮液と 100 倍濃縮液の定量値

が高い値を採用した。

## C. 結果及び考察

本実験で採水した合計 34 件のうち、平板培養法の熱処理を行った 5 件がコンタミネーションにより計測不能、熱処理+酸処理を行った 2 件が希釈不足により計測不能であったため、評価から除外し、計 27 件について平板培養法の結果と LC EMA-qPCR 法の結果を比較した。平板培養法では 27 件中 23 件 (85.2%) の試料から 10 CFU/100ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。LC EMA-qPCR 法での遺伝子検出を指標とした場合、平板培養法陽性 23 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 4 件中 3 件を陰性と判定し、特異度は 75.0% であった。鳥谷らの報告に従ってカットオフ値は 1 CFU/100ml とした<sup>3)</sup>。

LC EMA-qPCR 法と平板培養法について、前処理法別に平板培養法と LC EMA-qPCR 法の回帰直線は、酸処理法 :  $y=0.8715x+0.348$  ( $R^2=0.8715$ )、熱処理 + 酸処理法 :  $y=1.4403x-1.299$  ( $R^2=0.9811$ ) となり、高い相関性が示された (図 1-a, c)。また、浸漬実験において、レジオネラ属菌数は塩化物泉が井水に比べグラフの山型が抑制されて低く推移した (図 2)。これは塩化物泉によってアメーバ等のレジオネラ属菌の宿主となる微生物が抑えられたためと考えられた。

## D. まとめ

今回の浸漬式モデル実験は、循環式浴槽モデルと同じ汚染様式を再現し、レジオネラ属菌を増殖させることが出来た。また、泉質によってレジオネラ属菌の増殖が異なってくることが示唆された。熱処理によるコンタミネーションの影響と、熱処理+酸処理での高濃度試料による計測不備事例を除くと、各前処理方法の間に有

意な差は見られず、偽陽性もなかった。また、酸処理法と熱処理+酸処理法では平板培養法との高い定量性が示された。今後は、実際の入浴施設等から採取した検体を用いて LC EMA-qPCR 法の標準化に向けた検討を行いたい。

E. 参考文献

- 1) 金谷潤一ら：Liquid Culture EMA qPCR によるレジオネラ生菌迅速検査法の改良と評価、厚生労働科学研究補助金（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」平成 26 年度分担研究報告書、研究代表者：倉文明（2015）
- 2) 森本洋ら：標準的な検査培養法、厚生労働科学研究補助金（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」平成 26 年度分担研究報告書、研究代表者：倉文明（2015）

- 3) 鳥谷竜哉ら：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—、厚生労働科学研究補助金（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」平成 25 年度分担研究報告書、研究代表者：倉文明、p.89-103（2014）

F. 健康危険情報

なし

G. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 平板培養法と LC EMA-qPCR法との比較 (n = 27)

		平板培養法(CFU/100ml)		
		≥ 10	< 10	
LC EMA-qPCR (CFU- equivalent/100mL)	≥ 1	23	1	24
	< 1	0	3	3
		23	4	
感度	100%	陽性的中率	95.80%	
特異度	75.00%	陰性的中率	100%	

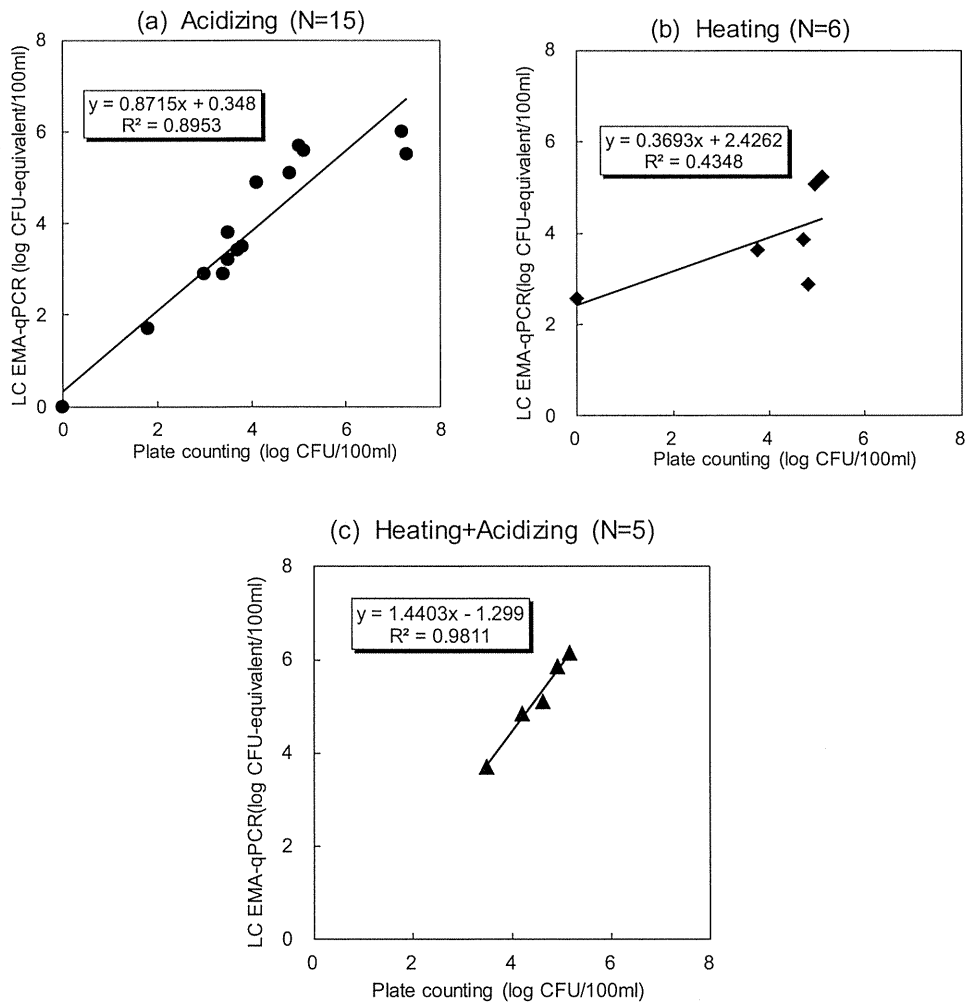


図1 (a)~(c) 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との相関

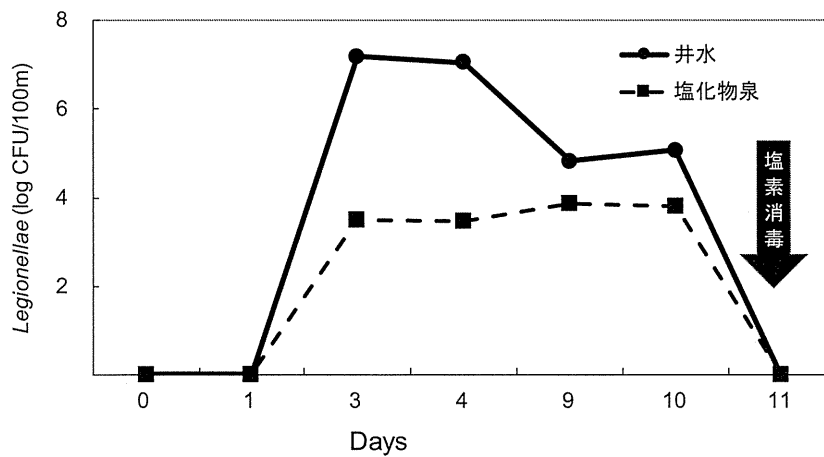


図2 経過日数とレジオネラ属菌数の推移