

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）  
公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究  
研究代表者 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

総合研究報告書  
レジオネラ属菌迅速検査法の評価

研究分担者

磯部 順子	富山県衛生研究所	佐々木 麻里	大分県衛生環境研究センター
田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター		

研究協力者

金谷 潤一	富山県衛生研究所	川野 みどり	長崎県環境保健研究センター
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
淀谷 雄亮	川崎市健康安全研究所	上野 潤二	栄研化学株式会社
東出 誠司	栄研化学株式会社	中筋 愛	タカラバイオ株式会社
吉崎 美和	タカラバイオ株式会社	原口 浩幸	株式会社ファスマック
森中 りえか	株式会社ファスマック		

研究要旨

本研究では、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、(EMA-) LAMP 法、(EMA-) qPCR 法(EMA 処理を 0、1 および 2 回実施)、PALSAR 法および RT-qPCR 法について、浴槽水などの実検体 906 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。

626 検体について LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 81.5%、特異度は 79.6%、一致率は 80.0% であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。205 検体について EMA-LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 69.1%、特異度は 85.3%、一致率は 81.0% であった。温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法は、感度の低下を防ぐために、N = 2 で実施するのが望ましいと考えられた。

604 検体について qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 97.6% であり、平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のほとんどを検出できる迅速検査法であったが、特異度は 46.6%、一致率は 57.0% であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、EMA 処理を 2 回実施すると、特異度は 68.5%、一致率は 75.4% まで上昇したため、死菌 DNA の遺伝子増幅を抑制でき、全体として平板培養法とより相関する迅速検査法となったと考えられた。ただし、EMA 処理回数は、1 回と 2 回で結果に有意な差はなかったことから、実用上 EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。

216 検体について PALSAR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 77.2%、特異度は 74.8%、一致率は 75.5% であった。シャワーおよびカラン水以外の検体においては感度 83.7%、特異度 68.3%、一致率 72.6% であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。しかしながら、シャワー水および

カラン水検体においては、感度が 37.5%と低かった。

92 検体（浴槽水、シャワー水およびカラン水）について RT-qPCR 法を実施した結果、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。したがって、PALSAR 法は、現時点ではシャワーおよびカラン水以外を対象として使用するのが望ましいと考えられた。

## 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、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。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 (qPCR) 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>。これらの遺伝子検出法は簡便で迅速な手法であるが、死菌由来DNAも検出するという課題があった。

近年、死菌由来DNAをEthidium monoazide (EMA) で修飾してPCR増幅を阻害するEMA-qPCR法が開発され、市販されている。平成25年には、液体培地による前培養を組み合わせた「生菌迅速検査法 (LC EMA-qPCR法)」が開発され<sup>2)</sup>、市販されている。ただし、LAMP法については、EMA処理による検討はあまり報告されていない。

また、レジオネラ属菌特異的16S rRNAを標的とし、プレート上のDNAプローブに結合させて検出するPALSAR法が開発された。他の迅速検査法と同様に濃縮検体を用いる本検査は、特殊な機器が不要で肉眼による判定が可能であり、当日中に結果が判明する方法である。しかしながら、これまでの結果から、PALSAR法については、感度の向上が必要であることが判明している<sup>3)</sup>。

今回、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、(EMA-) LAMP法、(EMA-) qPCR法およびPALSAR法について、浴槽水などの実検体を用いて、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、実検体から抽出したRNAを用いて定量逆転写PCR (RT-qPCR) を行い、PALSAR法における感度低下の原因を調査した。

## B 材料と方法

### 1 検査材料

全国6か所の地方衛生研究所 (機関A~F) に

おいて、平成28~30年度に浴用施設などから906検体の試料を採取し、迅速検査法の検討に用いた (表1)。検体の内訳は、浴槽水が616検体 (68.0%)、シャワー水が91検体 (10.0%)、採暖槽水が68検体 (7.5%)、湯口水が62検体 (6.8%)、カルン水が30検体 (3.3%)、その他の検体 (プール水、冷却塔水など) が39検体 (4.3%) であった。

### 2 平板培養法

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、10 CFU/100 ml 以上を陽性とした。

### 3 (EMA-) LAMP法

LAMP法は、Loopampレジオネラ検出試薬キットE (栄研化学) を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。EMA-LAMP法は、図1に従って実施した。いずれの方法においても、遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。また、EMA-LAMP法は、124/205検体 (60.5%) はN=2で実施した。

### 4 (EMA-) qPCR法

qPCR法は、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) および Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。EMA-qPCR法は、qPCR法におけるDNA抽出の前に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 (タカラバイオ) および LED Crosslinker 12 (タカラバイオ) を用いて、EMA処理を1および2回実施した。qPCR法、EMA-qPCR法ともに、遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。なお、qPCR法におけるレジオネラ属菌1 CFU相当から得られる16S rRNA遺伝子量は、取扱説明書を参照した。

5 EMA-qPCR法 (EMA処理1回) におけるレジオネラ属菌1 CFUあたりの16S rRNA遺伝子コピー数の決定

*L. pneumophila* 長崎80-045株をBCYE 寒天培地で30~4日間培養後、生理食塩水でMcFarland No. 2濁度の菌液 (約 $10^9$  CFU/ml) を調製した。その菌液を10倍段階希釈し、 $-1 \sim -6$  乗段階の

希釈液を EMA 処理後、Lysis Buffer for *Legionella*、NucleoSpin Tissue XS (タカラバイオ) でそれぞれ DNA 抽出し、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いて N = 3 で測定した。

機器別の検量線作成には、上述の方法で DNA を抽出後、N = 2 で実施し、その平均値を用いて作成した。

#### 6 Thermal Cycler Dice Real Time System III (TP950)を用いた検討

近年発売された TP950 について、Thermal Cycler Dice Real Time System II (TP900)との相関を見るため、上述した 16S rRNA 遺伝子コピー数決定のための DNA 検体と、平成 27 年度に抽出した LC EMA-qPCR 用 DNA 検体、平成 28 年度に抽出した qPCR および EMA-qPCR 用 DNA 検体をそれぞれ 20 検体ランダムに選択し、両方の機器で測定した (TP900 は fast mode、TP950 は normal および fast mode で実施) 。なお、TP950 の fast mode では、アニーリング時間を 10 秒から 20 秒に変更して実施した。

#### 7 PALSAR 法

PALSAR 法は、100 倍濃縮検体 4 ml を遠心後、上清を除去し、添付の取扱説明書に従い実施した。目視の発色確認により 16S rRNA が検出された場合を陽性と判定した。

#### 8 RT-qPCR 法

RT-qPCR 法は、烏谷らの方法に従って実施した<sup>4)</sup>。検量線は、*L. pneumophila* 長崎 80-045 株を用いて作成した。菌株を BCYE 寒天培地で 30 4 日間培養後、生理食塩水で調製した McFarland No. 2 濁度の菌液 (約  $10^9$  CFU/ml) を 10 倍段階希釈し、 $10^{-1}$  ~  $10^{-8}$  乗段階の希釈液を用いて RNA を抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、研究機関内外の倫理委員会等における承認手続きが必要となる研究には該当しない。

### C 結果

#### 1 平板培養法による結果

906 検体について検査した結果、213 検体 (23.5%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された (表 2)。菌数別に見ると、10 ~ 99 CFU/100 ml が 117 検体 (12.9%)、100 ~ 999 CFU/100 ml が 65 検体 (7.2%)、1,000 CFU/100 ml 以上が 31 検体 (3.4%) であった。最も多かった検体では、58,000 CFU/100 ml のレジオネラ属菌が検出された。分離菌の血清群別を実施した結果、*L. pneumophila* 血清群 (SG) 6 が 72 検体から分離され、最も多かった (表 3)。次に多かったのは、*L. pneumophila* SG 1 (68 検体)、*L. pneumophila* SG 5 (57 検体)、*L. pneumophila* SG 3 (46 検体) であった。また、*L. pneumophila* 以外の菌種が 48 検体から分離された。このうち、1 検体からは 3 菌種、9 検体からは 2 菌種が分離された。

#### 2 LAMP 法による結果

LAMP 法を用いた 626 検体について、平板培養法と比較した (表 4a)。LAMP 法は平板培養法に対して、感度 81.5%、特異度 79.6%、陽性的中率 54.8%、陰性的中率 93.4%、一致率 80.0% であった。

#### 3 EMA-LAMP 法による結果

205 検体について、EMA-LAMP 法を実施した (表 4b および 4c、EMA 未処理は 76 検体について実施)。EMA 未処理の場合、平板培養法に対して感度 86.7%、特異度 54.1%、陽性的中率 31.7%、陰性的中率 94.3%、一致率 60.5% であった。EMA 処理を実施することで、感度 69.1%、特異度 85.3%、陽性的中率 63.3%、陰性的中率 88.3%、一致率 81.0% となった。

#### 4 (EMA-) LAMP 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となったが、LAMP 法で陰性となった検体数は 27 であった (表 5)。このうち、12 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml と検出下限値であった。一方、平板培養法での菌数が 50 CFU/100 ml 以上であった 7 検体のうち、5 検体は温泉であり、6 検体は機関 D で実施した浴槽水および湯口水であった。

平板培養法で陽性となったが、EMA-LAMP 法

で陰性となった検体数は 17 であった (表 6)。このうち、8 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml と検出下限値であった。一方、平板培養法での菌数が 50 CFU/100 ml 以上であった 7 検体は、すべて温泉であった。また、6 検体は機関 D で実施した浴槽水および湯口水であった。

泉種別に結果を見ると、温泉を対象とした場合、LAMP 法の感度は 91.7% であったのに対し、EMA-LAMP 法の感度は 70.6% であった (表 7)。一方、水道水などを対象とした場合、LAMP 法の感度は 70.0%、EMA-LAMP 法の感度は 66.7% であった。

#### 5 (EMA-) qPCR 法による結果

(EMA-) qPCR 法を用いた各検体について、それぞれ平板培養法と比較した (表 8)。604 検体について qPCR 法を検討した結果、平板培養法に対する感度は 97.6%、特異度は 46.6%、陽性的中率は 31.8%、陰性的中率は 98.7%、一致率は 57.0% であった。613 検体について EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) を検討した結果、平板培養法に対する感度は 91.1%、特異度は 61.1%、陽性的中率は 37.3%、陰性的中率は 96.5%、一致率は 67.2% であった。126 検体について EMA-qPCR 法 (EMA 処理 2 回) を検討した結果、平板培養法に対する感度は 94.1%、特異度は 68.5%、陽性的中率は 52.5%、陰性的中率は 96.9%、一致率は 75.4% であった。

平板培養レジオネラ属菌の 10 倍段階希釈液を EMA 処理して作成した検量線を図 2 に示した。プラスミド DNA と、Lysis Buffer for *Legionella*、NucleoSpin Tissue XS で抽出した DNA の回帰直線を比較すると、傾きはほぼ平行関係にあり、増幅効率に大きな差がないことが確認された。得られた切片の差が Lysis Buffer for *Legionella* で 1.662、NucleoSpin Tissue XS で 1.846 であったことから (プラスミドの切片と抽出 DNA の切片の差) 各 DNA 抽出キットを用いて 30 培養 4 日目の菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、抽出効率や増幅効率を含めてプラスミド 3 コ

ピー ( $2^{1.662} = 3.2$ 、Lysis Buffer for *Legionella*) および 4 コピー ( $2^{1.846} = 3.6$ 、NucleoSpin Tissue XS) に相当するものと計算された。

実検体を用いた qPCR 法および EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) と平板培養法との菌数 (定量値) の相関は、 $R^2 = 0.2316$  および  $R^2 = 0.2426$  であった (図 3)。

#### 6 TP900 と TP950 を用いた測定値の比較

平板培養レジオネラ属菌の 10 倍段階希釈液を用いて作成した機器別の検量線を図 4 に示した。機器、測定モード、DNA 抽出法による大きな差は認められなかった。実検体を用いた比較を図 5 に示した。qPCR 法および EMA-qPCR 法では、TP900 よりも TP950 の normal mode および fast mode の方がやや定量値が高い傾向であったが、概ね同等の定量値であった。

#### 7 PALSAR 法による結果

PALSAR 法を用いた 216 検体について、平板培養法と比較した (表 9)。PALSAR 法は平板培養法に対して、感度 77.2%、特異度 74.8%、陽性的中率 52.4%、陰性的中率 90.2%、一致率 75.5% であった。

検体別に見ると、シャワー水およびカラン水検体のみを対象とした場合、感度 37.5%、特異度 100%、陽性的中率 100%、陰性的中率 86.8%、一致率 87.8% であった。その他の検体を対象とした場合、感度 83.7%、特異度 68.3%、陽性的中率 50.6%、陰性的中率 91.5%、一致率 72.6% であった。

平板培養法で陽性となったが、PALSAR 法で陰性となった検体を表 10 に示した。シャワー水およびカラン水以外の 8 検体のうち、6 検体は平板培養法での菌数が 10 ~ 20 CFU/100 ml と低かった。残りの 2 検体は LAMP 法も陰性であり、反応阻害物質など遺伝子反応を阻害する要因の存在が示唆された。シャワー水およびカラン水検体については、平板培養法の菌数が 50 CFU/100 ml 以下の 5 検体全てで PALSAR 法が陰性となった。

#### 8 RT-qPCR 法による結果

RT-qPCR 法を用いた 92 検体について、平板培

養法と定量値および菌数を比較した(図6)。検体別に見ると、浴槽水49検体を対象とした場合、 $R^2$ 値は0.3842であった。一方、シャワー水およびカラン水43検体を対象とした場合、 $R^2$ 値は0.1775であった。

#### D 考察

3年間で、各種迅速検査法[(EMA-) LAMP法、(EMA-) qPCR法(EMA処理0、1および2回)、PALSAR法およびRT-qPCR法]について、平板培養法の結果と比較し、評価した。また、EMA-qPCR法(EMA処理1回)におけるレジオネラ属菌1CFUあたりの16S rRNA遺伝子コピー数の決定、近年発売されたThermal Cycler Dice Real Time System III (TP950)とThermal Cycler Dice Real Time System II (TP900)との性能比較も行った。

LAMP法では、平板培養法に対する感度は81.5%であった。LAMP法における偽陰性検体の半数近く(12/27検体)は、平板培養法での菌数が検出下限値の10CFU/100mlであったことから、各種検査に検体を分取する際のばらつきの影響が考えられた。LAMP法は、一致率80.0%、陰性的中率93.4%であることから、迅速検査法として有用であると考えられた。しかしながら、2検体においては、平板培養法で1,000CFU/100ml以上のレジオネラ属菌数が検出されたが、LAMP法は陰性であった。ただし、これらの検体には、LAMP法では検出できない*L. londiniensis*や、感度の低い*L. micdadei*が含まれていた。*L. micdadei*が検出された検体は、菌数が7,520CFU/100mlであったが、その他の菌種としては、Lp1が1コロニー検出されたのみであった(10CFU/100ml相当、データ未掲載)。したがって、LAMP法で検出できない(感度が低い)菌種が多く生息しており、陰性となった可能性が考えられた。また、特定の地域の温泉検体においては、反応阻害などの影響が考えられる結果であったため、LAMP法実施の際には、反応阻害の有無の確認が重要であ

る。

EMA-LAMP法については、平成28~29年度の検討結果から、濃縮倍率、EMA処理濃度などプロトコルを改良し、平成30年度に実検体を用いて評価した。その結果、感度は69.1%とLAMP法より低かったものの、特異度は85.3%まで上昇した。LAMP法と同様に、EMA-LAMP法における偽陰性検体の約半数(8/17検体)は、平板培養法での菌数が検出下限値の10CFU/100mlであった。それ以外の偽陰性検体のほとんど(7/9検体)は、機関Dで温泉検体を対象に検査した結果であった。全体として、温泉を対象とした場合、EMA-LAMP法の感度が低下する傾向であった。温泉成分がEMA処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対するEMA処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP法に用いるDNAが抽出されやすかったため、LAMP法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP法をN=2で実施し、EMA-LAMP法および平板培養法が陽性となった24検体のうち、9検体(37.5%)は1回のみ増幅反応が認められた(データ未掲載)。EMA-LAMP法の感度低下を防ぐためには、N=2で実施するのが望ましいと考えられた。

qPCR法は、平板培養法に対する感度は97.6%であり、平板培養陽性検体(10CFU/100ml以上)のほとんどを検出できる迅速検査法であった。しかしながら、特異度は46.6%、一致率は57.0%であり、死菌DNAを検出していると考えられる検体が多かった。一方、EMA処理を1および2回と実施することで、特異度は68.5%、一致率は75.4%まで上昇したため、死菌DNAの遺伝子増幅を抑制でき、全体として平板培養法とより相關する迅速検査法となったと考えられた。EMA処理回数は、1回と2回で、一致率に差がある傾向(カイ二乗検定、 $P = 0.07$ )はあったが、同一検体(126検体)での比較において有意な差はなかつ

たことから（カイ二乗検定、 $P = 0.48$ 、データは H30 分担研究報告書に記載）実用上 EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。

EMA-qPCR 法（EMA 処理 1 回）と平板培養法における菌数（定量値）の比較は、 $R^2 = 0.2426$  であり、qPCR 法（ $R^2 = 0.2316$ ）と同等であった。これらの値は、過去に検討した LC EMA-qPCR 法と平板培養法における値（ $R^2 = 0.6672$ ）<sup>5)</sup>よりも低かったため、平板培養法の菌数を反映する方法としては、LC EMA-qPCR 法の方が優れていた。

近年、タカラバイオから新しいリアルタイム装置（TP950）が発売された。従来の機器（TP900）では PCR 反応時間に約 1 時間半を要したが、本装置の fast mode では約 1 時間で反応が終了する。実検体を用いた結果では、どちらの機器を用いた場合でも結果は概ね相関していたため、TP950（fast mode）を用いることで検査時間を短縮することができる。

PALSAR 法については、平成 28 年度の検討結果から、濃縮倍率、溶菌条件などプロトコルを改良（取扱説明書にも反映）し、平成 29 年度に実検体を用いて評価した。その結果、平板培養法に対する感度は 77.2% となった。とりわけシャワー水およびカラン水以外の検体においては、感度は 83.7% まで上がり、検体数は異なるものの LAMP 法と同等であった。特異度および一致率は約 7 割、陰性的中率は約 9 割であったため、シャワー水およびカラン水以外の検体を対象とした場合は、PALSAR 法は平板培養法と相関していると考えられた。

一方、シャワー水およびカラン水については、感度が 37.5%（3/8 検体）と低かった。また、RT-qPCR 法の結果から、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。したがって、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 1 CFU あたりの RNA 量は、浴槽水より少ない可能性が考えられた。検査に用いたシャワー水およびカラン水は、80% 以上（36/43 検体）が混合水栓であり、

レジオネラ属菌の増殖に適した温度である 37 付近で滞留している検体が少ないと考えられた。そのため、レジオネラ属菌の遺伝子発現量が低かった可能性が考えられた。PALSAR 法は、現時点では、シャワーおよびカラン水以外を対象として使用するのが望ましい。

LAMP 法、(EMA-) qPCR 法、PALSAR 法（シャワーおよびカラン水以外を対象）は、いずれの方法においても陰性的中率が 90% 以上であり、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であると考えられた。また、EMA-LAMP 法は、LAMP 法と比較し、感度はやや低下するが、特異度および一致率は上昇する方法であった。

## E 結論

各種迅速検査法について、浴槽水などの実検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

LAMP 法は、平板培養法と相関する迅速検査法であると考えられた。EMA-LAMP 法は、LAMP 法より平板培養法と相関する方法であったが、感度はやや低下した。

温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法の感度低下を防ぐために、 $N = 2$  で実施するのが望ましいと考えられた。

qPCR 法は、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のすべてを検出できる迅速検査法であったが、死菌 DNA を検出している検体が多かった。しかしながら EMA 処理を実施することで、全体として平板培養法とより相関する迅速検査法（EMA-qPCR 法）となると考えられた。実用上、

EMA 処理回数は1回で十分であると考えられた。

EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) と平板培養法における菌数 (定量値) の比較値 ( $R^2 = 0.2426$ ) は、過去に検討した LC EMA-qPCR 法と平板培養法における値 ( $R^2 = 0.6672$ ) よりも低かったため、平板培養法の菌数を反映する方法としては、LC EMA-qPCR 法の方が優れていた。

TP900 と TP950 を用いた測定値の比較では、実検体を用いた結果 (定量値) は概ね相関していたため、TP950 (fast mode) を用いることで検査時間 (増幅反応時間) を短縮することができる。

PALSAR 法は、シャワーおよびカラン水以外を対象として使用することで、平板培養法と関連する方法であることが明らかとなった。

#### 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、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、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 年度分担研究報告書、71-84.
- 3) 磯部 順子 他、レジオネラ属菌迅速検査法の評価、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 27 年度 総括・分担研究報告書、61-70.
- 4) 烏谷 竜哉 他、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、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 年度分担研究報告書、59-69.

5) 磯部 順子 他、レジオネラ属菌迅速検査法の評価、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 25-27 年度 総合研究報告書、53-60.

#### F 研究発表

なし

#### G 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 検体内訳と検査方法

		機関						計
		A	B	C	D	E	F	
検体内訳	浴槽水	128	56	84	74	173	101	616
	湯口水				62			62
	採暖槽水		68					68
	シャワー水	89	2					91
	カラン水	30						30
	その他		5	14			20	39
	計	247	131	98	136	173	121	906
検査方法	LAMP							
	EMA-LAMP (EMA未処理)							
	EMA-LAMP (EMA処理)							
	qPCR							
	EMA-qPCR (EMA処理1回)							
	EMA-qPCR (EMA処理2回)							
	PALSAR RT-qPCR							

図1. EMA-LAMP法プロトコル

100倍濃縮液1.5 ml×2本

遠心(13,000×g, 4、5分)

上清1 ml除去

残った500 µlを用いて懸濁後、1本にまとめる(300倍濃縮液1 ml)

遠心(13,000×g, 4、5分)

上清950 µl除去

2% Yeast Extractを50 µl添加後、ピペティングで懸濁

EMA溶液(302.5 µg/ml)を10 µl添加後、十分に混和(終濃度27.5 µg/ml)  
(7回タッピング後、スナップを利かせて1回だけ手で振り落とす)

遮光して室温放置15分  
(4分毎に7回タッピングし、スナップを利かせて1回だけ手で振り落とす)

光照射15分(LED Crosslinker 12使用)

遠心(13,000×g, 4、5分)

10 µl程度残して上清除去

10% Chelex溶液を40 µl添加(添加後はピペティング禁止)

ボルテックス後、スピンドウン

加熱(95、10分)

氷上静置2分

ボルテックス後、遠心(13,000×g, 4、10分)

上清25 µl回収

EMA未処理の場合は実施せず

表2. 平板培養法による検出率

菌数 (CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	693	(76.5)
10-99	117	(12.9)
100-999	65	(7.2)
1,000以上	31	(3.4)
計	906	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 6	72
SG 1	68
SG 5	57
SG 3	46
SG 4	35
SG 9	21
SG 8	18
SG 15	18
SG 2	12
SG 7	7
SG 13	5
SG 10	2
SG 12	2
SG 14	1
UT	64
<i>L. micdadei</i>	7
<i>L. londiniensis</i>	5
<i>L. gormanii</i>	3
<i>L. dumoffii</i>	2
<i>L. bozemanii</i>	1
<i>L. oakridgensis</i>	1
<i>Legionella</i> spp.	40

表4. 平板培養法と (EMA-) LAMP法との比較

a. LAMP法

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	119	98	217
陰性	27	382	409
計	146	480	626

感度81.5%、特異度79.6%、陽性的中率54.8%、陰性的中率93.4%、一致率80.0%

b. EMA-LAMP法 (EMA未処理)

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	13	28	41
陰性	2	33	35
計	15	61	76

感度86.7%、特異度54.1%、陽性的中率31.7%、陰性的中率94.3%、一致率60.5%

c. EMA-LAMP法 (EMA処理)

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	38	22	60
陰性	17	128	145
計	55	150	205

感度69.1%、特異度85.3%、陽性的中率63.3%、陰性的中率88.3%、一致率81.0%

表5. LAMP法における偽陰性検体

No.	施設	年	検体	泉質など	湯温 ( )	残塩 (mg/l)	pH	ATP (/10 ml)	平板培養法 (CFU/100 ml)		血清型	LAMP法				EMA-qPCR法 (2回)	EMA-qPCR法 (1回)	EMA-qPCR法 (2回)	PALSAAR法		
									ATP (/10 ml)	CFU/100 ml		LAMP法 (EMA処理)	EMA-LAMP法 (EMA未処理)	EMA-LAMP法 (EMA未処理)	qPCR法					EMA-qPCR法 (1回)	EMA-qPCR法 (2回)
1	A	H29	シャワー水	水道水	40	0.1	7.58	10	10	Lp UT	-	NT	+	+	+	NT	NT	NT			
2	A	H29	浴槽水	温泉	45.3	0.05未満	7.19	10	10	Lp 5	-	NT	+	+	+	NT	-	NT			
3	E	H29	浴槽水	温泉	35.8	<0.1		10	10	Lp UT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
4	B	H29	採暖槽水	白湯	36.8	0	7.79	10	10	Lp 1	-	NT	+	+	+	NT	+	NT			
5	B	H29	採暖槽水	白湯	42	0.8	8.27	10	10	Lp 1	-	NT	+	+	+	NT	-	NT			
6	A	H30	浴槽水	温泉	32.5	2	7.98	12	10	Lp 1	-	-	+	+	+	+	+	NT			
7	B	H30	採暖槽水	水道水	39	0.5		11	10	Lp 1	-	NT	+	+	+	NT	NT	NT			
8	A	H30	浴槽水	白湯	40	0		12	10	Lp 3	-	+	+	+	+	+	+	NT			
9	A	H30	カラシ水	井戸水	42.0	0.2		20	10	Lp 5	-	+	+	+	+	+	+	NT			
10	A	H30	シャワー水	水道水	37.2	0.2		24	10	Lp 5	-	+	+	+	+	+	+	NT			
11	A	H30	カラシ水	水道水	31.0	0.0		10	10	Lp 5	-	+	+	+	+	+	+	NT			
12	F	H28	浴槽水	井戸水	51.0	0.6		11	11	Lp 3	-	NT	+	+	+	+	+	NT			
13	F	H28	その他	ブルー水	42.0	0.11	7.41	20	20	Lp 5	-	NT	+	+	+	+	+	NT			
14	A	H29	カラシ水	井戸水	41.5	0.5		22	20	Lp 1, Lp 5, Lp 6	-	NT	+	+	+	+	+	NT			
15	F	H28	浴槽水	水道水	40.0	0.1		22	22	Lp 5, Lp 6, L. sp	-	NT	+	+	+	+	+	NT			
16	F	H28	浴槽水	水道水	40.0	1.5		27	27	Lp 3, Lp 5	-	NT	+	+	+	+	+	NT			
17	F	H28	浴槽水	水道水	39.7	0.5		30	30	Lp UT	-	NT	+	+	+	+	+	NT			
18	A	H29	シャワー水	井戸水	42.0	0.07	8.22	7	30	Lp 5, Lp 6	-	+	+	+	+	+	+	NT			
19	A	H30	カラシ水	井戸水	40.4	0.1		34	34	Lp 4, Lp 9, L. oakridgensis	-	NT	+	+	+	+	+	NT			
20	F	H28	浴槽水	水道水	44	0.8		50	50	Lp 3	-	NT	+	+	+	+	+	NT			
21	D	H29	浴槽水	自家ボーリング水	44	0.27		50	50	Lp 6, Lp UT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT		
22	D	H29	浴槽水	水道水	39.7	0.5		50	50	Lp 1, Lp 8, Lp 12, Lp UT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	
23	D	H29	湯口水	温泉	40	0	8.8	55	55	Lp 4, L. sp	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	
24	D	H30	浴槽水	温泉	35.9	0		500	500	Lp 2, Lp 3, Lp 15, UT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
25	D	H28	湯口水	温泉	39.5	0		1500	1500	Lp 3, Lp 13, L. kondienseis, L. sp	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
26	D	H29	湯口水	温泉	42	0.5	7.09	7520	7520	Lp 1, L. mitchidei	-	NT	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
27	A	H29	浴槽水	温泉	32.5	2		12	10	Lp 1	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+

表6. EMA-LAMP法における偽陰性検体

No.	施設	年	検体	泉質など	湯温 ( )	残塩 (mg/l)	pH	ATP (/10 ml)	平板培養法 (CFU/100 ml)		血清型	LAMP法				EMA-qPCR法 (2回)	EMA-qPCR法 (1回)	EMA-qPCR法 (2回)	PALSAAR法		
									ATP (/10 ml)	CFU/100 ml		LAMP法 (EMA処理)	EMA-LAMP法 (EMA未処理)	EMA-LAMP法 (EMA未処理)	qPCR法					EMA-qPCR法 (1回)	EMA-qPCR法 (2回)
1	A	H30	浴槽水	温泉	42	2		12	10	Lp 1	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
2	B	H30	採暖槽水	水道水	32.5	2	7.98	9	10	Lp 1	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
3	E	H30	浴槽水	白湯	39.3	0.1		52	10	Lp 5	-	NT	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
4	E	H30	浴槽水	温泉	41.3	0.1		8	10	Lp 1	-	NT	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
5	A	H30	シャワー水	井戸水	37.4	0.2		8	10	Lp 4	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
6	B	H30	採暖槽水	水道水	35.9	0.2	8.12	7.96	10	Lp 6	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
7	B	H30	浴槽水	水道水	40.5	0.4		261	20	Lp 1	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
8	D	H30	浴槽水	自家ボーリング水	40.5	0.05		17	30	Lp 3, Lp 5, Lp 6	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
9	A	H30	カラシ水	井戸水	43.7	0.05		980	60	Lp 4, Lp 6	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
10	A	H30	カラシ水	温泉	43.7	0.05	6.9	9	50	Lp 3, Lp 6	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
11	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0.05	8.8	100	100	Lp 3, Lp 5	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
12	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0.05	8.8	100	100	Lp 1, Lp 4, L. mitchidei, L. sf NT	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
13	E	H30	浴槽水	温泉	43.7	0.05	8.8	100	100	Lp 4, L. sp	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
14	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0.6		7.2	500	Lp 3, Lp 4, Lp 6, Lp UT	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
15	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0		7.2	500	Lp 2, Lp 3, Lp 13, Lp UT	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
16	D	H30	浴槽水	温泉	43.7	0		8.2	500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+
17	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0		8.2	500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	-	-	+	+	+	+	+	+	NT	NT	+

表7. 泉種別における(EMA-) LAMP法の感度、特異度および一致率

検体	由来	方法	n	培養陽性	感度 (%)	特異度 (%)	一致率 (%)
温泉	浴槽水、湯口水	LAMP法	63	24	91.7	66.7	76.2
		EMA-LAMP法 (EMA処理)	82	34	70.6	83.3	78.0
その他(水道水、井戸水)	浴槽水、湯口水、シャワー水、カラシ水、採暖槽水、冷却塔水など	LAMP法	120	20	70.0	71.0	70.8
		EMA-LAMP法 (EMA処理)	123	21	66.7	86.3	82.9

表8. 平板培養法と(EMA-) qPCR法との比較

a. EMA未処理

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
qPCR	陽性	120	257	377
	陰性	3	224	227
計		123	481	604

感度97.6%、特異度46.6%、陽性的中率31.8%、陰性的中率98.7%、一致率57.0%

b. EMA処理(1回)

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
EMA-qPCR	陽性	113	190	303
	陰性	11	299	310
計		124	489	613

感度91.1%、特異度61.1%、陽性的中率37.3%、陰性的中率96.5%、一致率67.2%

c. EMA処理(2回)

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
EMA-qPCR	陽性	32	29	61
	陰性	2	63	65
計		34	92	126

感度94.1%、特異度68.5%、陽性的中率52.5%、陰性的中率96.9%、一致率75.4%

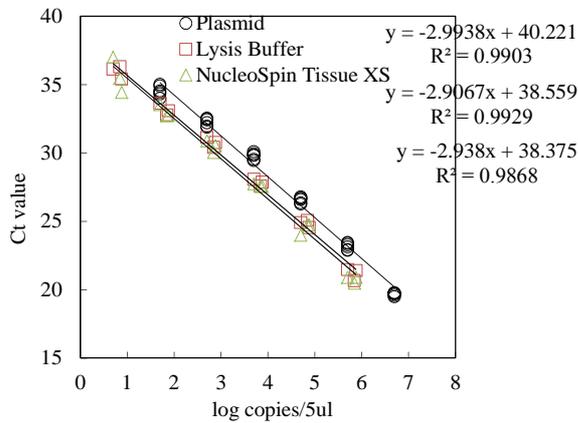


図 2 . DNA 抽出キットを用いて EMA 処理を 1 回実施した平板培養レジオネラ属菌液から抽出した DNA およびプラスミド DNA の検量線

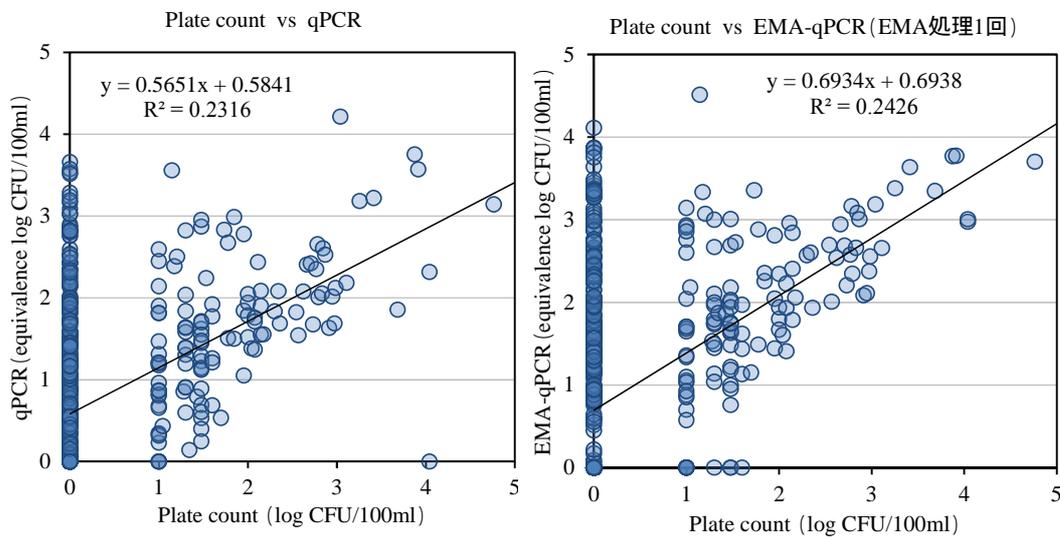


図 3 . 平板培養法と qPCR 法および EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) との相関

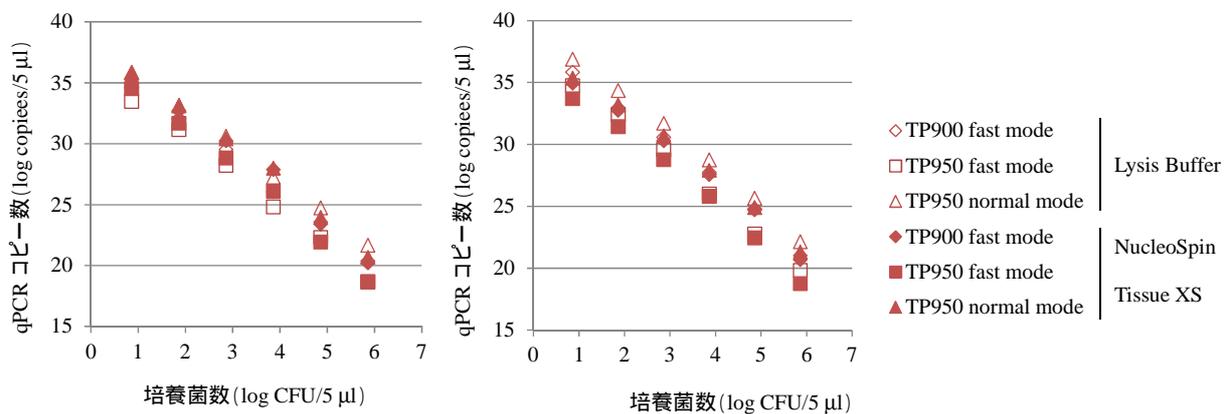


図 4 . TP950 および TP900 における平板培養レジオネラ属菌液から抽出した DNA の検量線

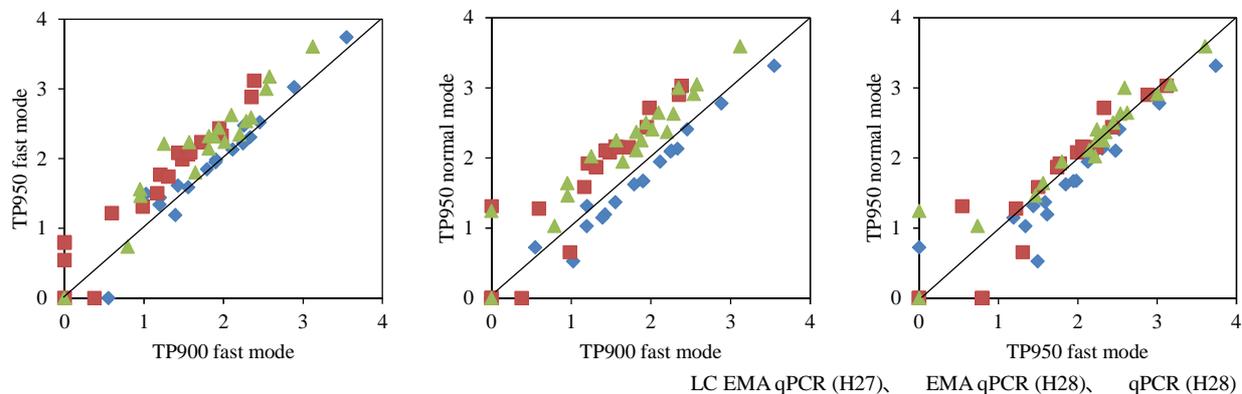


図5. TP950 および TP900 における実検体を用いた定量値 (equivalence log CFU/100 ml) の比較

表9. 平板培養法とPALSAR法との比較

a. 全検体

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
PALSAR法	陽性	44	40	84
	陰性	13	119	132
計		57	159	216

感度77.2%、特異度74.8%、陽性的中率52.4%、陰性的中率90.2%、一致率75.5%

b. シャワー水・カラン水

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
PALSAR法	陽性	3	0	3
	陰性	5	33	38
計		8	33	41

感度37.5%、特異度100%、陽性的中率100%、陰性的中率86.8%、一致率87.8%

c. シャワー水・カラン水以外

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
PALSAR法	陽性	41	40	81
	陰性	8	86	94
計		49	126	175

感度83.7%、特異度68.3%、陽性的中率50.6%、陰性的中率91.5%、一致率72.6%

表10. PALSAR法における偽陰性検体

a. シャワー・カラン水以外(偽陰性検体のみ)

No.	検体	泉質など	湯温 ( )	残塩 (mg/L)	平板培養法		血清群	PALSAR法	EMA-qPCR法	LAMP法
					pH	(CFU/100 ml)				
1	浴槽水	白湯	41	0.6	7.43	10	Lp1	-	+	+
2	浴槽水	温泉	40	<0.05	7.19	10	Lp5	-	-	-
3	浴槽水	温泉	41	0.6		10	Lp9	-	NT	+
4	採暖槽水	白湯	38	1.3	8.3	10	Lp3	-	-	+
5	採暖槽水	白湯	36.8	0.8	8.27	10	Lp1	-	-	-
6	浴槽水	井戸水	42	0.4		20	Lp5	-	NT	+
7	湯口水	単純泉	39.7	0.5		50	Lp1, Lp8, Lp12, LpUT	-	NT	-
8	湯口水	温泉		0		1500	Lp3, Lp13, LpUT, <i>L. londiniensis</i>	-	NT	-

b. シャワー・カラン水(平板培養陽性検体すべて記載)

No.	検体	泉質など	湯温 ( )	残塩 (mg/L)	平板培養法		血清群	PALSAR法	EMA-qPCR法	LAMP法
					pH	(CFU/100 ml)				
1	カラン水	井戸水		0.1	7.41	20	Lp5	-	+	-
2	シャワー水	井戸水		0.3	8.19	30	LpUT	-	+	+
3	シャワー水	井戸水		0.3	8.22	30	LpUT	-	-	-
4	カラン水	井戸水		0.3	8.17	30	Lp5, LpUT	-	+	+
5	カラン水	井戸水		0.3	8.27	50	LpUT	-	+	+
6	シャワー水	井戸水		0	7.21	100	Lp3	+	+	+
7	シャワー水	井戸水		0	7.26	120	Lp3, Lp6	+	+	+
8	シャワー水	井戸水		0.08	7.59	680	Lp5	+	+	+

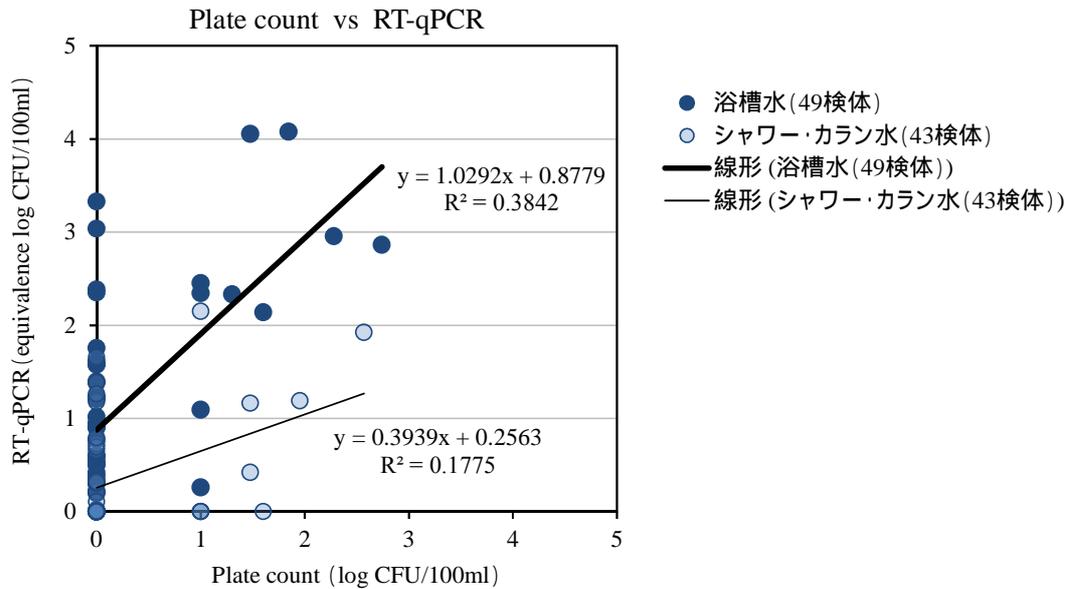


図6. 平板培養法と RT-qPCR 法との相関