

資料

浴槽水のレジオネラ属菌迅速検査法の検討について

酢谷奈津, 亀山芳彦

要 旨

浴槽水のレジオネラ属菌の迅速検査法として、近年、検水から直接レジオネラ遺伝子を検出する方法が開発されている。今回、迅速検査法のうち市販試薬を用いて LAMP 法及び LC EMA-qPCR 法の有用性を検討した。Legionella pneumophila 血清群 1 (長崎 80-045 株) を用いて各検査法の検出感度を検討したところ、LAMP 法は 10CFU/100 mL レベル、LC EMA-qPCR 法は 1CFU/100 mL レベルであった。また、LC EMA-qPCR 法において、死菌数 10^2 CFU/100 mL レベル以下では死菌由来遺伝子の検出が抑制された。

入浴施設の浴槽水 95 検体を用いて培養法、LAMP 法及び LC EMA-qPCR 法の比較を行った結果、LAMP 法は培養法に対して感度 77.8 %、特異度 76.5 % であった。一方、LC EMA-qPCR 法は遺伝子検出を陽性とした場合、培養法に対して感度 100 %、特異度 73.5 % であった。定量値 10 コピー/mL 以上を LC EMA-qPCR 法陽性とした場合、感度 96.3 %、特異度 88.2 % となり、培養法との相関が高まった。

キーワード：レジオネラ属菌、LAMP 法、LC EMA-qPCR 法

1 はじめに

浴槽水のレジオネラ属菌検査は、基本的には培養法が用いられるが、判定までに 7 日以上を要することから、感染防止対策の遅れが懸念されている。近年、環境水のレジオネラ属菌迅速検査法として、濃縮検水から直接レジオネラ属菌遺伝子を検出する方法が開発され、試薬キットの市販により、浴槽水検査においても活用が進みつつある。

濃縮検水から直接レジオネラ属菌遺伝子を検出する迅速検査法には、LAMP 法とリアルタイム PCR 法 (qPCR 法) がある。いずれも検査開始から数時間で結果が得られるが、生菌のみならず死菌由来の遺伝子も検出するため、結果の解釈には留意が必要となる。一方で、死菌由来遺伝子の検出を抑制し、生菌由来遺伝子を選択的に検出することを目的として、LC EMA-qPCR 法が新たに開発された。これは、qPCR 法に液体培養 (LC ; Liquid Culture) と EMA (ethidium monoazide) 処理の 2 つの前処理を組み合わせた方法であり、濃縮検水を液体培地で培養することで損傷菌の回復と生菌数の増加を図り、さらに液体培養後の検水に EMA (膜損傷菌の遺伝子を修飾し、その PCR 増幅を阻害する物質) を作用させることで死菌由来遺伝子の検出を抑制する効果を期待したものである。検査開始日の翌日の結果判定となるが、従来法と比較して培養法との相関が高いことが報告されている^{1,2)}。

今回、迅速検査法のうち、LAMP 法と LC EMA-qPCR

法について培養法との比較を行い、その有用性について検討した。表 1 に LAMP 法及び LC EMA-qPCR 法の特徴を示した。

表1 LAMP法及びLC EMA-qPCR法の特徴

	LAMP法	LC EMA-qPCR法
試薬	フルキット (栄研化学)	フルキット (タカラバイオ)
検査開始から結果 判定までの時間	約3時間 (当日判定)	約24時間 (翌日判定)
生菌・死菌の判別	死菌由来遺伝子も 検出	生菌由来遺伝子を選 択的に検出
判定	定性	定性・定量

2 方法

2.1 LAMP 法

Loopamp レジオネラ検出キット E (栄研化学) を用い、リアルタイム濁度測定装置 (栄研化学) で測定を行った。なお、添付文書では DNA 抽出に検水の 5000 倍濃縮液を用いるところを、本研究では検体調製の都合上、1000 倍濃縮液を用いた。それ以外の手順は添付文書に従った。

2.2 LC EMA-qPCR 法

検水の 1000 倍濃縮液 100 μ L に等量の酸処理液 (0.2M KCl-HCl, pH2.2) を加え、室温で 5 分間静置後、MWY 液体培地 900 μ L を加え 36 $^{\circ}$ C、18 時間培養した。培養後の培養液を用い、EMA 処理、DNA 抽出及び qPCR を順次実施した。EMA 処理、DNA 抽出、

qPCR にはそれぞれ Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (タカラバイオ), Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ), Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) の各キットを添付文書に従い使用した。リアルタイム PCR 装置は、StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Life Technologies) を使用した。

また、液体培養前後及び EMA 処理前後の遺伝子検出の変化を観察するため、液体培養前 (0hLC) 及び液体培養後 (18hLC) 時点の検体についても同様に DNA 抽出及び qPCR を実施した。

2.3 調製菌液を用いた検出限界等の検討

BCYE α 寒天培地で 30°C, 4 日間培養した *Legionella pneumophila* 血清群 1 (長崎 80-045 株) を滅菌生理食塩水に懸濁し、希釈し、約 10⁶~10¹ CFU/mL の 10 倍希釈系列の菌液を調製した。各希釈菌液を WYO α 寒天培地に 100 μ L ずつ塗布し、37°C, 7 日間培養し生菌数を測定した。同時に、各希釈菌液を上記 2.2 及び 2.1 の 1000 倍濃縮液として用い、LAMP 法及び LC EMA-qPCR 法を行った。さらに、LC EMA-qPCR 法における死菌検出抑制効果を確認するため、各希釈菌液を 95°C, 5 分間加熱して作製した死菌液を用いて同様に LC EMA-qPCR 法を実施した。

2.4 浴槽水を用いた検討

平成 25 年 9 月~平成 26 年 11 月に採取された県内入浴施設の浴槽水 95 検体を試料として、培養法、LAMP 法及び LC EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌の検出を行った。培養法は、新版レジオネラ症防止指針記載のろ過濃縮法に準じ、当所の他、県内 4 機関 (岐阜保健所 (平成 25 年度), 西濃保健所, 東濃保健所, 飛騨保健所) において分担して実施した。

3 結果

3.1 各検査法の検出限界等

Legionella pneumophila 血清群 1 (長崎 80-045 株)

菌液を用いた各検査法の結果を表 2 に示す。

LAMP 法では生菌数 6.3 \times 10¹ CFU/100 mL 以上の菌液でレジオネラ属菌遺伝子が検出された。

一方、LC EMA-qPCR 法では、生菌数 6.3 CFU/100 mL 以上の菌液でレジオネラ属菌遺伝子が検出された。また、各菌液において液体培養の前後で、遺伝子定量値にそれぞれ 2~3 オーダーの増加がみられた。死菌液では推定死菌数 6.3 \times 10² CFU/100 mL 以下の菌液では死菌由来遺伝子の検出が完全に抑制された。また、生菌数 (CFU/100 mL) と遺伝子定量値 (コピー/mL) の間には良好な相関が得られた (図 1)。

3.2 培養法との比較

浴槽水 95 検体中、培養法では 27 検体 (28.4%) から 10 CFU/100 mL 以上のレジオネラ属菌が検出され、LAMP 法では 37 検体 (38.9%) から、LC EMA-qPCR 法では 45 検体 (47.4%) からレジオネラ属菌遺伝子が検出された。

LAMP 法では、培養法陽性 27 検体中 21 検体が陽性となり、培養法に対する感度は 77.8% であった (表 3)。また、培養法陰性 68 検体中 52 検体が陰性となり、特異度は 76.5% であった。培養法陽性かつ LAMP 法陰性となった 6 検体の菌数の内訳は、10 CFU/100 mL が 4 検体、20 CFU/100 mL 及び 100 CFU/100 mL が各 1 検体であった。

LC EMA-qPCR 法では、培養法陽性 27 検体すべてにおいてレジオネラ属菌遺伝子が検出され、遺伝子検出を陽性とした場合、培養法に対する感度は 100% であった (表 4)。一方、培養法陰性 68 検体中 50 検体がレジオネラ属菌遺伝子不検出であり、特異度は 73.5% であった。

培養法による生菌数 (CFU/100 mL) と遺伝子定量値 (コピー/mL) の間には、ややばらつきはみられるものの比較的良好的な相関が認められた (図 2)。定量値 10 コピー/mL 以上を LC EMA-qPCR 法陽性とした場合、培養法に対する感度は 96.3%, 特異度 88.2% となり、

表2 調整菌液希釈系列のLAMP法及びLC EMA-qPCR法結果

菌数 (CFU/100mL)	LAMP法	LC EMA-qPCR法(コピー/mL)			
		生菌液			死菌液
		0hLC	18hLC	18hLC・EMA(+)	18hLC・EMA(+)
6.3 \times 10 ⁵	NT	3.8 \times 10 ⁵	1.5 \times 10 ⁷	9.3 \times 10 ⁶	2.4 \times 10 ³
6.3 \times 10 ⁴	NT	2.3 \times 10 ⁴	8.1 \times 10 ⁶	3.6 \times 10 ⁶	1.3 \times 10 ²
6.3 \times 10 ³	NT	1.4 \times 10 ³	5.8 \times 10 ⁵	3.8 \times 10 ⁵	7.0
6.3 \times 10 ²	+	8.2 \times 10 ¹	2.6 \times 10 ⁴	1.2 \times 10 ⁴	ND
6.3 \times 10 ¹	+	12	1.8 \times 10 ³	1.4 \times 10 ³	ND
6.3	-	ND	2.9 \times 10 ²	2.2 \times 10 ²	ND
6.3 \times 10 ⁻¹	-	ND	ND	ND	ND
6.3 \times 10 ⁻²	-	ND	ND	ND	ND

NT:未実施 ND:不検出

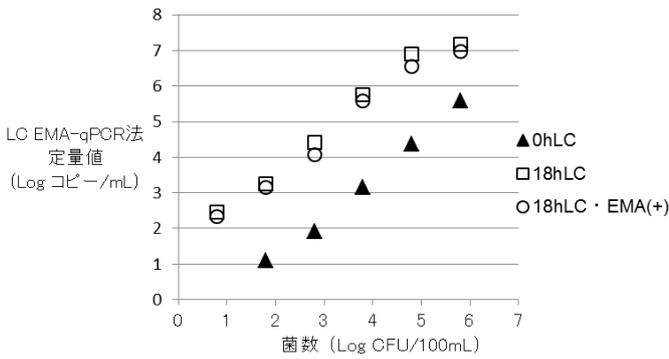


図1 LC EMA-qPCR法による遺伝子定量値と菌数の相関

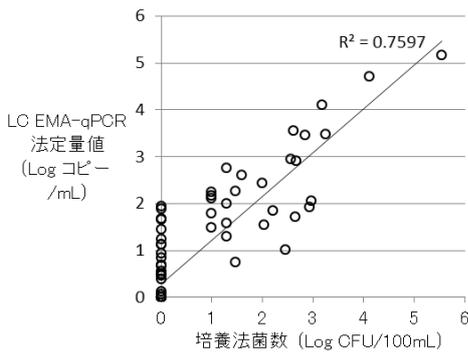


図2 LC EMA-qPCR法(18hLC/EMA(+))定量値と培養法菌数との相関

表3 LAMP法と培養法の比較

LAMP法	培養法		計
	陽性	陰性	
陽性	21	16	37
陰性	6	52	58
計	27	68	95
感度	77.8%	陽性的中率	56.8%
特異度	76.5%	陰性的中率	89.7%

表4 LC EMA-qPCR法と培養法の比較 (遺伝子検出=陽性)

LC EMA-qPCR法	培養法		計
	陽性	陰性	
陽性	27	18	45
陰性	0	50	50
計	27	68	95
感度	100.0%	陽性的中率	60.0%
特異度	73.5%	陰性的中率	100.0%

表5 LC EMA-qPCR法と培養法の比較 (10コピー/mL以上=陽性)

LC EMA-qPCR法	培養法		計
	陽性	陰性	
陽性	26	8	34
陰性	1	60	61
計	27	68	95
感度	96.3%	陽性的中率	76.5%
特異度	88.2%	陰性的中率	98.4%

表6 培養法陰性、LC EMA-qPCR法検出の不一致例

No.	LC EMA-qPCR法(コピー/mL)			LAMP法	培養法 CFU/100mL
	0hLC	18hLC	18hLC+EMA(+)		
1	5.2×10^2	4.6×10^2	2.8×10^1	+	<10
2	1.6×10^2	1.8×10^2	1.3×10^1	+	<10
3	1.5×10^1	9.6×10^1	4.5×10^1	+	<10
4	4.2×10^1	1.2×10^1	4.6	+	<10
5	3.2	2.1	3.6	+	<10
6	ND	2.1	7.0	+	<10
7	ND	4.3	1.3	+	<10
8	2.8×10^1	2.9×10^1	3.2	-	<10
9	2.8	2.1	1.2	-	<10
10	3.6	2.8	2.9	-	<10
11	ND	3.3	1.3×10^1	-	<10
12	2.3×10^1	2.8×10^2	8.8×10^1	+	<10
13	1.0×10^1	1.3×10^2	7.6×10^1	+	<10
14	2.9	1.0×10^2	4.7×10^1	-	<10
15	8.0	1.9×10^1	5.0	-	<10
16	2.8	2.4×10^1	2.4	-	<10
17	2.8	3.4×10^1	8.8	-	<10
18	ND	4.8×10^1	1.8×10^1	-	<10

ND: 不検出

特異度が改善された(表5)。

培養法陰性68検体のうち、LC EMA-qPCR法でレジオネラ属菌遺伝子が検出された18検体の定量値を、液体培養前(0hLC)、液体培養後(18hLC)の定量値及

びLAMP法の結果と併せて表6に示した。18検体中11検体(No.1~11)については、液体培養後に定量値の増加が認められないことから、死菌由来遺伝子を検出したものと考えられた。7検体(No.12~18)につい

では、液体培養後に定量値の増加が認められることから生菌が存在したと推察されるが、LAMP法でも不検出となる検体が多いことから、培養法では検出されない程度のわずかな生菌が存在していたと考えられた。

4 考察

今回の検討において、LAMP法の検出限界は培養法とほぼ同程度であった。実際の検体では、菌数の少ない検体では結果が安定しないことや、死菌由来遺伝子の検出により培養法と結果が一致しない場合もあったが、検査開始当日中という早期に一定以上のレジオネラ汚染の有無を確認するという点において有用であるといえた。

一方、LC EMA-qPCR法は、培養法及びLAMP法よりも高感度であり、培養法で検出されないレベルのわずかなレジオネラ属菌遺伝子も検出された。カットオフ値を設定することで培養法に対する特異度が改善され、LAMP法よりも培養法との相関が高くなった。鳥谷ら¹⁾は、EMA-qPCR法において1 CFUが100コピーに相当するとし、カットオフ値として5 CFU/100mL (5コピー/mL)を提案しているが、今回の検討においては10コピー/mLが培養法における生菌検出の一つの目安となるといえた。ただし、大量の死菌が存在する場合などはEMAが消費され死菌由来遺伝子を検出する場合がある。その他にも、実際の検体では、何らかの理由でEMAの効果が十分に発揮されず死菌由来遺伝子を検出したと考えられるケースがあった。これらこのことを踏まえると、個々のケースで生菌・死菌の存在を評価するには、液体培養EMA処理後の定量値と併せて、液体培養前及び液体培養後の定量値を補助的

データとして活用することが望ましいと考えられた。

LC EMA-qPCR法は、検査開始翌日に培養法における生菌検出をある程度予測することが可能であると同時に、ごく少量のレジオネラ属菌遺伝子も検出するため、より厳しい陰性確認ができるといえた。

遺伝子を検出する迅速検査法は、生菌を検出する培養法とは検査の原理が異なるため、各検査法の特徴を十分に理解したうえで結果を解釈する必要があるが、レジオネラ症患者の感染源調査時など緊急を要する場合には特に有用であると考えられる。また、培養法と並行して行うことにより、レジオネラ属菌による施設汚染を多角的に評価することができると思われる。

文 献

- 1) 鳥谷竜哉, 荒井桂子, 磯部順子, 緒方喜久代, 八木田健司, 泉山信司, 矢崎知子, 金谷潤一, 吉崎美和: 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, 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, 71-84, 2012.
- 2) 鳥谷竜哉, 磯部順子, 緒方喜久代, 八木田健司, 山口友美, 武藤千恵子, 金谷潤一, 泉山信司: 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, 2013.

Examination of the Rapid Test Methods for the Detection of *Legionella* in Bathtub Water

Natsu SUDANI, Yoshihiko KAMEYAMA

*Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan*