

33. 入浴施設におけるレジオネラ属菌迅速検査法の 阻害物質の影響とその実用化

○吉田孝子(奈良県保健研究センター)

【研究目的】

レジオネラ属菌は、劇症型の肺炎や一過性のポンティアック熱を引き起こすレジオネラ症の起因菌である。主な感染源は、入浴施設、冷却塔、加湿器等の人口水系で、特に入浴施設は集団感染の感染源になることもあり、衛生管理は非常に重要視されている。

当センターでは、レジオネラ症患者発生に伴う感染源調査、入浴施設のレジオネラ属菌汚染調査のため、浴槽水、施設の拭き取り検体の検査を実施している。しかし、従来の培養法では結果判明に10日近くを要するため、迅速検査法(遺伝子検査法)が強く求められている。迅速検査法は、検出対象遺伝子が「生菌と死菌の両方」、あるいは「生菌のみ」により、2種類に分類される。しかし、いずれも反応阻害物質等の影響を受けることが知られており、実検体への適用については検証が必要である。さらに、迅速検査法は、その対象検体を「浴槽水」と設定してあることが多く、拭き取り検体については知見に乏しい。そのため、拭き取り検体についても、迅速検査法が適用可能であるかの検討が不可欠である。

本研究では、迅速検査法の中から、生菌死菌検出法である LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法、リアルタイム PCR (以下、qPCR) 法及び生菌検出法である LC EMA-qPCR 法について、調整菌液での検出感度、定量性等の検証を実施した。さらに、実検体である県内入浴施設の浴槽水、拭き取り検体について上記3つの迅速検査法を実施し、その有効性の検証、並びに実用方法の検討を実施した。

【材料と方法】

1. 調整菌液による迅速検査法3法の比較、検証

レジオネラ属菌の標準株 (*Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株) を用い、生理食塩水で McFarland 2 の菌液としたものを原液とし、10 倍希釈系列を調整した。調整菌液は、BCYE α 寒天培地(日研生物)に塗抹し、37°C、7 日間培養後菌数を測定した。さらに LC EMA-qPCR 法における死菌抑制効果を確認するため、原液を 95°C、10 分間加熱し、死菌とした菌液についても、10 倍希釈系列を調整し検査を実施した。なお、調整菌液は、浴槽水の 100 倍濃縮液として用いた。

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、qPCR 法は、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を使用し、いずれも添付のマニュアルに従い検査を実施した。LC EMA-qPCR 法は、製品マニュアルに従い、調整菌液を 10 倍濃縮し、酸処理、液体培養、EMA 処理を行い、Lysis buffer for *Legionella*(タ

カラバイオ)でDNAを抽出し、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を用い検査を実施した。

2. 実検体(浴槽水、拭き取り検体)における検討

(1)浴槽水における迅速検査法の検討

2016年7月から2017年7月に感染源調査として搬入された浴槽水14検体を対象とし、培養法及び迅速検査法にて検査を実施した。培養法は第3版レジオネラ症防止指針に準じ実施した(検出下限値:10 CFU/100ml)。迅速検査法については、上記1.と同様に実施した。

(2)拭き取り検体における迅速検査法の検討

2016年6月から2017年6月に感染源調査及び汚染調査として搬入された拭き取り検体39検体を対象とし、培養法及び迅速検査法にて検査を実施した。拭き取りに用いたプース1個につき、滅菌水10mlを添加し、ストマッカーで処理した抽出液を検査に用いた。培養法は抽出液を酸処理若しくは熱処理を行い、250 μ lずつGVPC寒天培地(日水製薬)、GVPC α 寒天培地(日研生物)各2枚ずつに塗抹した。いずれも37 $^{\circ}$ C、5~7日培養した後、菌数を計測し、適宜同定試験を行った(検出下限値:10 CFU/プース)。LAMP法とqPCR法は、上記1.と同様に実施した。LC EMA-qPCR法では、検出感度の確認のため、最初の16検体については、抽出液を製品マニュアルに従い10倍濃縮液にしたものと、さらに濃縮率を上げ、1/10量の100倍濃縮液にしたもの両方を用い、上記1.と同様に検査を実施し、その後は100倍濃縮液のみにより実施した。さらに、培養法と迅速検査法の結果が異なる場合には、適宜、その要因確認のための検査を実施した。

【結果】

1. 調整菌液による迅速検査法3法の比較、検証

結果を表1に示す。調整菌液の菌数は、希釈段階の6、7段階目を計数し、希釈倍率により換算した。LAMP法は 1.0×10^1 CFU/100ml、qPCR法、LC EMA-qPCR法は 1.0×10^1 CFU/100mlまで検出が可能であった。定量値と菌数(培養法による実測に基づく換算数)との相関はqPCR法で、 $y=0.8871x+0.4242$ ($R^2=0.9665$)、LC

表1. 迅速検査結果

希釈段階	換算数(CFU/100ml)	LAMP法	qPCR法	LC EMA-qPCR法	
				生菌	死菌
0	$1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$	NT	NT	NT	+
-1	$1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$	NT	NT	NT	+
-2	$1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$	NT	+	+	+
-3	$1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$	NT	+	+	-
-4	$1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$	+	+	+	-
-5	$1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$	+	+	+	-
-6	$1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$	+	+	+	-
-7	$1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^2$	+	+	+	-
-8	$1 \sim 1.0 \times 10^1$	-	+	+	NT

NT: Not Test

EMA-qPCR法で、 $y=1.1327x-0.2427$ ($R^2=0.9519$)であった。LC EMA-qPCR法におけるEMAによる死菌抑制については、 6.4×10^5 CFU/100mlまで、死菌の検出を抑制する効果を確認できた。

2. 実検体(浴槽水、拭き取り検体)における検討

(1)浴槽水における迅速検査法の検討

培養法の結果は、14検体中6検体陽性(43%)で、菌数は、50 CFU/100ml~ 1.5×10^4

CFU/100ml であった。検出した菌種は全て *L. pneumophila* であった。

培養法と迅速検査法 3 法を比較したところ、LAMP 法では、14 検体中 10 検体 (71%) で陽性で、培養法に対する感度は 100% (6/6 検体)、特異度は 50% (4/8 検体) であった。

qPCR 法では、14 検体中 13 検体 (93%) で陽性で、培養法に対する感度は 100% (6/6 検体)、特異度は 13% (1/8 検体) であった。培養法との菌数の相関は、 $y=1.0011x+0.8306$ ($R^2=0.7132$) であった。

LC EMA-qPCR 法では、14 検体中 10 検体 (71%) で陽性 (1CFU/100ml 以上) で、培養法に対する感度は 100% (6/6 検体)、特異度は 50% (4/8 検体) であった。培養法陰性で、LC EMA-qPCR 法陽性となった 4 検体の定量値は、3 検体は 1~9 CFU/100ml、1 検体は 12 CFU/100ml であった。培養法との菌数の相関は $y=0.9296x+0.3988$ ($R^2=0.8917$) であった。

(2) 拭き取り検体における迅速検査法の検討

① LC EMA-qPCR 法における検出感度の検討

搬入された拭き取り検体のうち、16 検体については、拭き取り抽出液を 10 倍濃縮液 100 μ l、若しくは 100 倍濃縮液 10 μ l として検査を実施した (図 1)。その結果、コピー数 1 以上を陽性とした場合、3 検体 (19%) では、100 倍濃縮液でのみ陽性となった。3 検体中 2 検体は、培養法 10 CFU/プースと培養法の検出下限値相当であった。また、他の 1 検体は、夾雑菌が多く、培養法で菌の検出が難しいケースであったが、LC EMA-qPCR 法で、抽出液を 100 倍濃縮した場合には、レジオネラ属菌の遺伝子を検出 (定量値 6 CFU/プース) した。

② 拭き取り検体における迅速検査法の評価

上記の検出感度の検討で用いた 16 検体を含む 39 検体について検査を実施した。

培養法の結果は、39 検体中 15 検体 (38%) で陽性で、菌数は、10 CFU/100ml~ 1.4×10^6 CFU/100ml であった。検出した菌種は *L. pneumophila* (14 検体)、*L. quinlivanii* (1 検体) であった。

LAMP 法では、39 検体中 18 検体 (46%) で陽性であった。LAMP 法の培養法に対する感度は 53%、特異度は 58% であった (表 2)。培養法陽性の検体で、LAMP 法陰性となった 7 検体中 5 検体は、50 CFU/プース以下であった。残り 2 検体中 1 検体は、濁質成分が多く検出不能となったうえ、培養法で検出した菌種は、*L. quinlivanii* であった。最後の 1 検体は、培養法で検出した菌数は 2.2×10^5 CFU/プースと多く、検出した菌種は *L. pneumophila* であった。そこで、PCR における反応阻害の影響を確認するため、DNA 抽出液に、LAMP 法のキット添付の陽性コントロールを添加¹⁾したところ、陰性とな

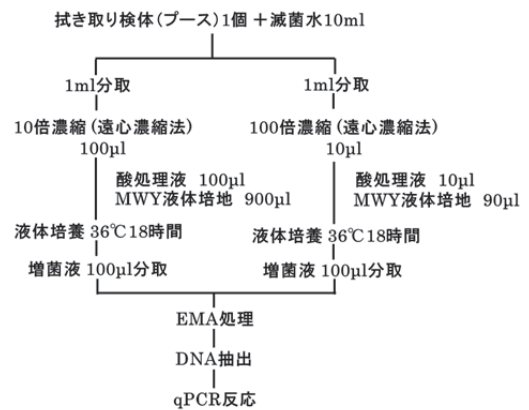


図 1. 検査フロー

表 2. 拭き取り検体における培養法に対する感度、特異度

	感度 (%)	特異度 (%)
LAMP法	53 (8/15)	58 (14/24)
qPCR法	100 (15/15)	33 (8/24)
LC EMA-qPCR法	93 (14/15)	58 (14/24)

感度=培養法陽性の内、迅速検査法陽性/培養法陽性
特異度=培養法陰性の内、迅速検査法陰性/培養法陰性

った。

qPCR 法では、39 検体中 31 検体 (79%) で陽性であった。qPCR 法の培養法に対する感度は 100%、特異度は 33% であり、培養法陽性の検体は全て陽性となった。培養法との菌数の相関は、 $y=0.4665x+1.7511$ ($R^2=0.3718$) であった (図 2)。

LC EMA-qPCR 法では、39 検体中 24 検体 (62%) で陽性 (1 CFU/プース以上) であった。LC EMA-qPCR 法の培養法に対する感度は 93%、特異度は 58% であった。培養法陽性の検体で、LC EMA-qPCR 法陰性となった 1 検体は、培養法で 20 CFU/プースであった。培養法陰性で、LC EMA-qPCR 法陽性となったのは、10 検体 (26%) であった。これらの定量値を見てみると、2 検体は 1~9 CFU/プース、6 検体は 10~99 CFU/プース、3 検体は 100 CFU/プース以上であった。なお、100 CFU/プース以上であった 3 検体は、qPCR 法でも、1,000 CFU/プース以上と定量値が非常に高い検体であった。培養法との菌数の相関は、 $y=0.6041x+0.5301$ ($R^2=0.6858$) であった (図 3)。

【考察】

調整菌液を用いて検証した結果、迅速検査法 3 法ともに、浴槽水の基準値 (10 CFU/100ml) を検出することが可能であった。また、検出に qPCR を用いる 2 法は、1 CFU/100ml を検出することができた。定量性は、qPCR 法で $R^2=0.9665$ 、LC EMA-qPCR 法で $R^2=0.9519$ と、阻害物質等の影響がない状態では、非常に相関が高いことがわかった。また、EMA 処理による死菌抑制効果は大きいですが、一定量以上の死菌の存在は、定量値に影響を及ぼすことが考えられた。

実検体による検証では、浴槽水は、培養法陽性検体は迅速検査法でも全て陽性で、相関は高く qPCR 法で $R^2=0.7132$ 、LC EMA-qPCR 法で $R^2=0.8917$ となり、有効性が確認された。

拭き取り検体においては、LC EMA-qPCR 法において、qPCR の検出下限を 1 コピー/tube と仮定すると、計算上、定量値の下限値は拭き取り抽出液を 10 倍濃縮した場合は 11 CFU/プース、100 倍濃縮した場合は 1 CFU/プースとなる。実際に検体を用いて、両方を比較した結果、培養法で 10 CFU/プースの検体は、100 倍濃縮液でのみ陽性になった。これより、100 倍濃縮を行うことで、低濃度検体においても、培養法陽性検体を、LC EMA-qPCR 法陽性と判定可能であることが分かった。そこで、LC EMA-qPCR 法については 100 倍濃縮を行うこととして、迅速検査法 3 法の評価を行った。その結果、LAMP 法は、他の方法より感度が

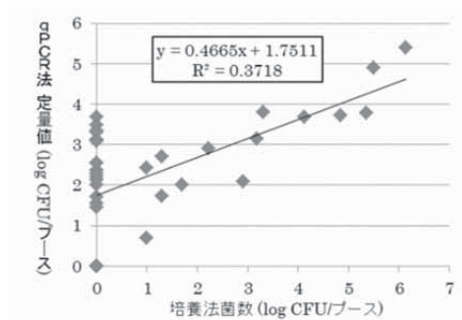


図 2. 平板培養法と qPCR 法の相関

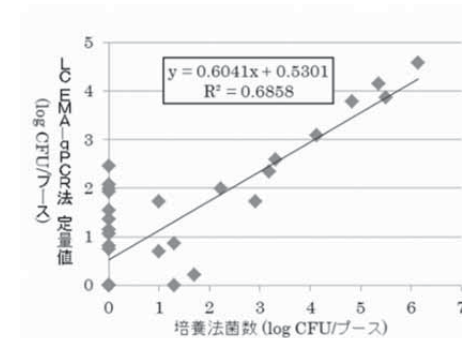


図 3. 平板培養法と LC EMA-qPCR 法の相関

低く、特に低濃度検体における検出で問題が認められた。また、一部、検出対象外菌種²⁾の存在や、阻害物質の影響等も感度を低くする要因と考えられた。qPCR法は、感度は良好であったが、特異度が低く、相関は $R^2=0.3718$ と低かった。これは、死菌も含めて検出するため、生菌のみが検出対象となる培養法の結果と乖離した検体が存在したと考えられた。LC EMA-qPCR法は、感度、相関($R^2=0.6858$)共に高く、浴槽水を対象とした報告³⁾と近い値になった。特異度も高く、LC EMA-qPCR法で、拭き取り検体の抽出液を100倍濃縮した方法は、平板培養法と高い相関を示す検査法であることが分かった。

今後、今回の検討を基に、実際の検体搬入時において、それぞれの迅速検査法の特性を生かし、有効なスクリーニング法として活用することで、レジオネラ症の感染予防、感染拡大防止に貢献していきたい。

【参考文献】

- 1) 枝川亜希子, 土井 均, 木村明生, 他: 防菌防黴誌, 37, 3-8, (2009)
- 2) 倉文明: 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)平成19年度分担研究報告書, 23-36, (2007)
- 3) 磯部順子: 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26年度分担研究報告書, 63-72, (2014)

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成をいただきました公益財団法人大同生命厚生事業団に心より深謝いたします。また、検体の採取にご協力いただきました奈良県内各保健所の皆様に厚くお礼申し上げます。

【経費使途明細】

使途	金額
レジオネラ生菌遺伝子検査Reスターターセット(<i>Legionella</i> LC Medium Base, Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for LC EMA-qPCR, Lysis buffer for <i>Legionella</i> , CycleavePCR <i>Legionella</i> (16SrRNA) Detection Kit)×2	116,640
CycleavePCR <i>Legionella</i> (16SrRNA) Detection Kit×3	149,979
平板培地(GVPC 寒天培地等)	12,353
消耗品(チップ, チューブ等)	21,028
大同生命厚生事業団助成金	300,000

【本研究に関する学会発表】

- ・「拭き取り検体におけるレジオネラ属菌生菌迅速検査法の評価」
○吉田孝子, 河口友理, 辻本真弓, 橋田みさを, 内田美枝(奈良県保健研究センター)
日本防菌防黴学会 第44回年次大会(2017.9.26-27, 大阪市)