

環境検体を対象としたレジオネラ属菌検査における前処理法の検討

Consideration of Pretreatment Method for the Detection of *Legionella* from Environmental Samples

山口 友美 有田 富和 吉川 弓林*1 畠山 敬 渡邊 節

Yumi YAMAGUCHI, Tomikazu ARITA, Yuri KIKKAWA,
Takashi HATAKEYAMA, Setsu WATANABE

雑菌が多く存在すると考えられる環境検体（水たまり）を用いてレジオネラ属菌の分離培養法および遺伝子検出法で検出率を向上させるための前処理法の検討を行った。分離培養法、遺伝子検出法ともに、検体の濃縮倍率を変えた試料を2種類実施することにより、検出率が向上した。また、PCRによる遺伝子検出法（A法）はLAMP法に比べ遺伝子増幅を阻害する物質の影響を受けやすかったが、市販のカラムを使用し阻害物質を除去することにより、10倍濃縮試料であっても遺伝子検出が可能となることが明らかとなった（B法）。B法の検出率はA法およびLAMP法に比べ高くなることから、環境中のレジオネラ属菌遺伝子検出法にカラム処理は必須の方法であると思われる。

キーワード：環境検体；LAMP法；PCR法；阻害物質

Key words : Environmental Samples ; LAMP ; PCR ; inhibitor

1 はじめに

浴槽水中のレジオネラ属菌培養検査では、検体中の雑菌を抑制するため、前処理として酸処理または熱処理を行っている。条例に基づき衛生管理が行われている浴槽水では、これらの前処理を行うことで、レジオネラ属菌は十分検出可能である。

しかし、水たまりなどの環境検体を用いる場合は、浴槽水とは異なり多数の雑菌が存在するため、浴槽水と同じ前処理法で雑菌を抑制することは困難である。

また、環境検体を用いた遺伝子検出法では、検体中の遺伝子増幅阻害物質により、目的遺伝子が増幅されずに結果として陰性となることが多々ある。平成26年度に実施した我々の研究¹⁾でも、一部の検体で分離培養法でレジオネラ属菌が検出されたがLAMP法では陰性となるなど、分離培養法とLAMP法の結果が異なる検体が確認されている。

そこで本研究では、雑菌が多く存在すると考えられる環境検体（水たまり）を用いてレジオネラ属菌の分離培養法および遺伝子検出法で検出率を向上させるための前処理法の検討を行ったので報告する。

2 対象および検査方法

2.1 対象

平成27年8月から平成28年12月までに採取した宮城県内のアスファルト道路の水たまり43件を対象検体とした。

2.2 方法

2.2.1 検体の濃縮

水たまりから採取した水をフィルター濃縮し、10倍濃

縮試料（10×試料）を作製した。実験には、10×試料および非濃縮試料の2種類を用いた。

2.2.2 分離培養法

各試料について、酸処理（0.2M KCl-HCl, pH2.2にて20分）または熱処理（50℃20分）を行った後、MWYおよびGVPC寒天培地（OXOID）に塗抹してレジオネラ属菌の分離培養を行った。

2.2.3 LAMP法

10×試料および非濃縮試料2mLを分取し、13,000×g、10分間遠心した後に40μL程度を残して上清を除去した。Loopampレジオネラ検出試薬キットE（栄研化学）添付の試薬を用いて、10×試料および非濃縮試料のDNAを抽出し、LAMP法を実施した。

2.2.4 PCR法

レジオネラ属菌を特異的に検出するLEGプライマー²⁾を用い、2.2.3で抽出したDNAを鋳型としてPCRを実施した（A法）。

さらに、2.2.3で抽出したDNAをOneStep PCR Inhibitor Removal Kit（ZYMO RESEARCH）にて遺伝子増幅を阻害する物質を除去し、精製後のDNAを鋳型として前述と同様にPCRを実施した（B法）。

3 結果

3.1 分離培養法

10×試料または非濃縮試料でレジオネラ属菌が検出されたのは26検体であった。そのうち、10×試料および非濃縮試料ともに検出されたのは9検体で、その菌数は10×試料では100～10,000 CFU/100mL、非濃縮試料では1,000～12,000 CFU/100mLであった。

10×試料のみ検出されたのは8検体で、その菌数は100～400 CFU/100mL、非濃縮試料のみ検出されたのは9

*1 現 大崎広域水道事務所

検体で、その菌数は1,000~14,000 CFU/100mLであった。10×試料および非濃縮試料の両方とも陰性であったのは17検体であった。

3.2 LAMP法

10×試料または非濃縮試料でレジオネラ属菌遺伝子が検出されたのは33検体であったが、そのうちの14検体は分離培養ではレジオネラ属菌が検出されなかった。

10×試料および非濃縮試料ともに遺伝子が検出されたのは11検体、10×試料のみ検出されたのは10検体、非濃縮試料のみ検出されたのは12検体であった。10×試料のみ検出された10検体中8検体では、分離培養でレジオネラ属菌は検出されなかった。一方、非濃縮試料のみ遺伝子が検出された12検体のうち、9検体は分離培養でも検出されたが3検体は分離培養では検出されなかった。

10×試料および非濃縮試料ともに陰性であったのは10検体であったが、そのうちの7検体では分離培養でレジオネラ属菌が検出され、その菌数は200~3,000 CFU/100mLであった。

3.3 A法

A法では、10×試料または非濃縮試料でレジオネラ属菌遺伝子が検出されたのは30検体であった。そのうち、10×試料および非濃縮試料ともに遺伝子が検出されたのは5検体、非濃縮試料のみ検出されたのは24検体、10×試料のみ検出されたのは1検体であった。10×試料および非濃縮試料ともに陰性であったのは13検体であったが、そのうちの9検体では分離培養でレジオネラ属菌が検出され、その菌数は100~12,000 CFU/100mLであった。

表1 培養法における濃縮倍率別の結果

		10×試料		計
		検出	非検出	
非濃縮試料	検出	9	9	18
	非検出	8	17	25
計		17	26	43

表2 LAMP法における濃縮倍率別の結果

		10×試料		計
		検出	非検出	
非濃縮試料	検出	11(8)	12(9)	23(17)
	非検出	10(2)	10(7)	20(9)
計		21(10)	22(16)	43(26)

()内は培養法における陽性検体数

3.4 B法

B法では、10×試料または非濃縮試料でレジオネラ属菌遺伝子が検出されたのは41検体であった。そのうち、10×試料および非濃縮試料ともに遺伝子が検出されたのは31検体、非濃縮試料のみ検出されたのは4検体、10×試料のみ検出されたのは6検体であった。10×試料および非濃縮試料ともに遺伝子陰性であったのは2検体であったが、そのうちの1検体では分離培養でレジオネラ属菌が検出され、その菌数は2,800~3,000 CFU/100mLであった。

3.5 LAMP法、A法およびB法の比較

LAMP法、A法およびB法のレジオネラ属菌遺伝子検出率を濃縮倍率別にグラフに示した(図1)。10×試料

表3 A法における濃縮倍率別の結果

		10×試料		計
		検出	非検出	
非濃縮試料	検出	5(1)	24(15)	29(16)
	非検出	1(1)	13(9)	14(10)
計		6(2)	37(24)	43(26)

()内は培養法における陽性検体数

表4 B法における濃縮倍率別の結果

		10×試料		計
		検出	非検出	
非濃縮試料	検出	31(20)	4(2)	35(22)
	非検出	6(3)	2(1)	8(4)
計		37(23)	6(3)	43(26)

()内は培養法における陽性検体数

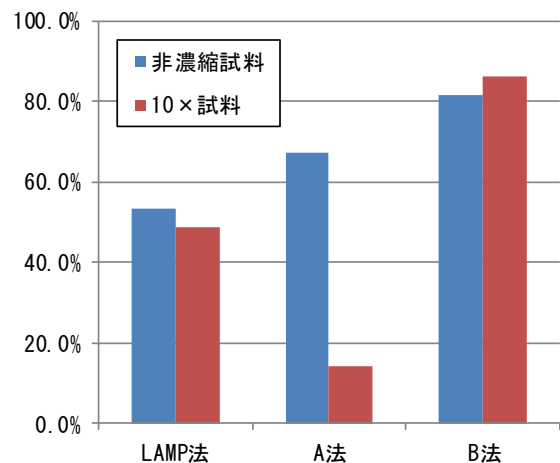


図1 LAMP法、A法およびB法の検出率

ではA法が最も検出率が低く14.0%，B法が最も高く86.0%であり，非濃縮試料ではLAMP法が最も低く53.5%，B法が最も高く81.4%であった。

なお，全43件の培養法によるレジオネラ属菌数，LAMP法，A法およびB法の結果を表5に示した。

4 考察

分離培養法では，レジオネラ属菌がより多く検出され

るはずの10×試料で検出されていないにもかかわらず，非濃縮試料で検出された検体が9検体確認された。これは，酸処理や熱処理等の前処理を行っても雑菌が死滅せず，培地に多数発育したため，培養に時間のかかるレジオネラ属菌の発育を抑制しているものと考えられた。

LAMP法では，非濃縮試料で遺伝子が検出されたが，10×試料では陰性であった検体が12検体確認された。LAMP法はPCR法に比べ反応阻害を受けにくい³⁾とさ

表5 全検体の培養法における菌数，LAMP法，A法およびB法の結果

	培養法 菌数	LAMP法	A法	B法
D20	非 10×	(-) (-)	(-) (-)	(-) (-)
D21	非 10×	(-) (-)	+ +	+ +
D22	非 10×	(-) (-)	+ +	+ +
D23	非 10×	1,000 1,700	+ (-)	+ +
D24	非 10×	3,000 (-)	+ +	+ +
D25	非 10×	2,000 1,800	+ +	+ +
D26	非 10×	(-) 100	(-) +	+ +
D27	非 10×	3,000 (-)	(-) +	+ +
D28	非 10×	(-) (-)	+ +	+ (-)
D29	非 10×	2,000 100	+ (-)	(-) +
D30	非 10×	12,000 (-)	+ +	(-) +
D31	非 10×	(-) (-)	(-) (-)	(-) +
D32	非 10×	2,000 200	+ (-)	+ (-)
D33	非 10×	(-) (-)	(-) +	(-) +
D34	非 10×	1,000 (-)	(-) (-)	(-) +
D35	非 10×	(-) 300	(-) (-)	+ +
D36	非 10×	(-) (-)	+ (-)	+ +
D37	非 10×	1,000 (-)	(-) (-)	(-) +
D38	非 10×	2,000 (-)	+ +	(-) +

非：非濃縮試料
10×：10倍濃縮試料

	培養法 菌数	LAMP法	A法	B法
E1	非 10×	1,000 300	+ (-)	(-) (-)
E2	非 10×	(-) (-)	(-) +	+ +
E3	非 10×	(-) 100	+ +	+ +
E4	非 10×	(-) 100	+ (-)	+ +
E5	非 10×	(-) (-)	(-) (-)	+ +
E6	非 10×	10,000 (-)	+ (-)	(-) (-)
E7	非 10×	(-) (-)	(-) +	+ +
E8	非 10×	7,000 (-)	+ (-)	+ +
E9	非 10×	(-) (-)	(-) +	(-) +
E10	非 10×	14,000 (-)	+ +	+ +
E11	非 10×	(-) (-)	+ +	+ +
E12	非 10×	(-) 200	(-) (-)	+ +
E13	非 10×	(-) 100	+ +	+ (-)
E14	非 10×	(-) 100	+ (-)	+ (-)
E15	非 10×	12,000 10,000	+ +	+ (-)
E16	非 10×	3,000 300	(-) (-)	(-) (-)
E17	非 10×	1,000 500	+ (-)	+ (-)
E18	非 10×	(-) 400	(-) (-)	+ (-)
E19	非 10×	(-) (-)	+ +	+ (-)
E20	非 10×	(-) (-)	+ (-)	+ +
E21	非 10×	(-) (-)	(-) +	+ +
E22	非 10×	(-) (-)	(-) +	+ +
E23	非 10×	3,000 2,800	(-) (-)	(-) (-)
E24	非 10×	(-) (-)	+ (-)	(-) (-)

れているが、説明書によると鉄イオンは $3\mu\text{mol/L}$ 以上、マンガニオンは $500\mu\text{mol/L}$ 以上でLAMP反応が阻害されるため、濃縮試料ではLAMP法であっても反応阻害を受けると考えられた。

またLAMP法と培養法を比較した場合、 $10\times$ 試料のみLAMP法で検出された検体と $10\times$ 試料および非濃縮試料ともLAMP法陰性であった検体で結果に乖離が認められた。前者の場合、菌数が少なかったために培養法で検出できなかった、もしくはLAMP法では死菌のDNAを検出していた可能性が考えられる。後者の場合は、何らかの反応阻害により偽陰性となった、もしくはLAMP法の検出感度以下であったために、偽陰性となった可能性が考えられた。

PCR法であるA法では、 $10\times$ 試料で遺伝子が検出されたのはわずかに6検体であった。これは、PCR法では濃縮に伴う阻害物質の影響により遺伝子の検出が困難となることを示しており、LAMP法と比較した場合、 $10\times$ 試料での検出率においてLAMP法がPCR法の3倍以上と明らかに高いことがわかる。そこで、DNA抽出試料から阻害物質を除去することを目的として、B法を実

施した。

B法では、 $10\times$ 試料で遺伝子が検出されたのは37検体で、LAMP法と比較して検出率が1.8倍高くなっており、阻害物質の影響が考えられる検体においてB法は有用であると思われた。しかし、B法を用いても培養法でレジオネラ属菌が検出されているにもかかわらず遺伝子が全く検出できない検体が1検体存在することから、阻害物質に抵抗性が高いPCR酵素等を用いた方法等を用いて再度検討する必要があると思われた。また、非濃縮試料でもLAMP法に対し1.5倍の検出感度であったことから、B法はLAMP法に比べ検出感度が高いと考えられた。

参考文献

- 1) 山口友美, 畠山 敬, 渡邊 節: 宮城県保健環境センター年報, No.33, 33 (2015)
- 2) 国立感染症研究所, 病原体検出マニュアル「レジオネラ症」
- 3) 池戸正成: 日本水産学会誌, **73**, 296 (2007)