

環境水中のレジオネラ属菌の同定方法と 迅速試験方法に関する検討

平山 久子、福嶋 得忍

Study on the identification and rapid test method for *Legionella* species in an environmental water

Hisako HIRAYAMA and Tokunin FUKUSHIMA

Summary

At present, the detection and identification of *Legionella* species which is cause bacterium of Legionellosis is enforce to the culture method and Latex agglutination test. The culture method requires 7-9 days from the culture beginning to the final identification, and on the identification of Latex agglutination test have occur sometimes in the case of *Legionella* serogroup unknown (agglutination test: ± and -) in the isolates from an environmental water (bathtub water and cooling tower water etc.). Therefore, we studied the single PCR assay for secure an accuracy in the final identification by the Latex agglutination test of *Legionella* species. Furthermore, we studied the seminested PCR assay for rapid detection and identification from a concentrated sample of an environmental water. The time from the preparation of concentrated sample to recognition of *Legionella* species specific 430bp DNA fragment was 48 hours. And the result of seminested PCR assay was corresponding to the result of culture method well.

キーワード：レジオネラ属菌、環境水（浴槽水・冷却塔水等）、血清群不明のレジオネラ属菌、
レジオネララテックス凝集試験、PCR法（single PCR法・seminested PCR法）

Key Words : *Legionella* species, an environmental water, *Legionella* serogroup unknown, Legionella Latex
Agglutination Test, Polymerase Chain Reaction assay (single PCR assay, seminested PCR assay)

はじめに

最近、温泉施設や公衆浴場のほか、温泉付きマンション等において、レジオネラ属菌（肺炎及びポンティアック熱の原因菌）が検出され、問題となっている。現在、レジオネラ属菌の同定には、培養法とLatex凝集試験が実施され、培養開始から最終判定まで7～9日間を要し、Latex凝集試験による判定では、環境水（浴槽水、冷却塔水等）由来の分離菌において、凝集の判定しにくい場合や凝集を認めない場合がある。そこで、環境水からの菌の検出と同定に迅速性と確実性を確保するため、凝集試験の結果に問題のある分離菌に対し、核酸による同定¹⁾（PCR法）を併用して検討した。また、迅速な同定方法を確立するため、seminested PCR法²⁾を検討した。

実験方法

1. 試料の調製と培養

環境水（浴槽水、冷却塔水等）は、チオ硫酸ナトリウム入りポリプロピレン製のポリ容器に約2Lを採取し、そのうちの1Lをポアサイズ0.2 μmで直径90mm (ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisya Ltd) のメンブランフィルターでろ過濃縮し、細切後、0.2M HCl・KCl溶液（レジオネラ検出用前処理液、日研生物医学研究所）を加え、1分間攪拌した後、20分間室温で酸処理し、濃縮試料を調製した。レジオネラ属菌の分離培養は、濃縮試料と濃縮試料を希釈した試料のそれぞれを0.1ml ずつGVPC α寒天培地（日本ビオメリュー社）1枚に塗布し、37℃で7日間、加湿型フラン器内で培養した。塗布終了後、残りの試料は1ml ずつ小分けし、-30℃に凍結保存した。37℃で7日間の培養後、GVPC α寒天培地に

発育し、湿潤性を持ち灰白色から灰黄色を呈するコロニーを羊血液寒天培地/BCYE α寒天培地（日研生物医学研究所）に移植し、37℃の加湿型フラン器内で2日間培養した。

2. 凝集テストによる血清群別

BCYE α寒天培地に発育し、羊血液寒天培地に発育しないレジオネラ属菌の血清群別は、Legionella Latex Test Kit³⁾ (Oxoid社) を用いて*Legionella pneumophila* 血清群1 (L.p1)、血清群2-14 (L.p2-14)、その他の血清群 (L.その他) および血清群不明 (L. serogroup unknown ; L.sg. un と称す) に群別した。凝集試験の判定基準（直接法）は、反応カードをゆっくり回転させ、1分以内に明らかな凝集塊を認めた場合を陽性 (+)、凝集塊が全く認められない場合を陰性 (-)、陰性に比べてわずかにざらつきが認められるものを (±) と表記した。

3. DNA抽出

1) 分離菌からの抽出

GVPC α寒天培地およびBCYE α寒天培地に発育したレジオネラ属菌のDNAは、滅菌した超純水 (MILLIPORE ULTRA-PURE WATER SYSTEM で作製) 500 μl に1白金耳の菌を懸濁し、攪拌後、99℃で10分間の加熱処理を行い抽出した (Fig. 1)。

2) ろ過濃縮試料からの抽出

ろ過濃縮後酸処理した試料のDNAは、-30℃に凍結保存した濃縮試料 (1ml / tube) を室温で溶解した後、15 × 10³ rpmで10分間の室温遠心後上清を除去し、その沈査からQIAGEN QIAamp DNA Mini Kit⁴⁾ (QIAGEN社) を用いて抽出した (Fig. 1)。

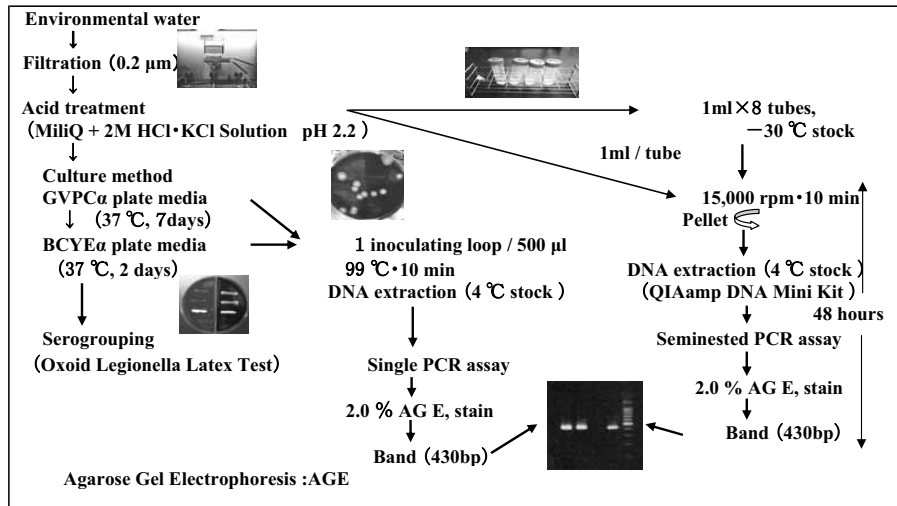


Fig. 1. Detection and identification process of *Legionella* species.

4. Primer と PCR 反応条件

1) single PCR法

single PCR法は、レジオネラ属菌特異的16S rRNA gene 領域の LEG プライマー：LEG448A；5'-GAGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3' と LEG854B；5'-CGGTCAACTTATCGCGTTTGCT-3'の各20μMを含むPCR混合液（TaKaRa Ex Taq™ 5U/μl、10×Ex Taq buffer 20mM Mg2+Plus、各濃度2.5mM dNTPmixture：タカラバイオ⁶⁾、超純水）24.75μlに加熱処理方法で抽出したDNAの0.25μlを加えスピンドウンした後、変性（denaturation）；95°Cで30秒間、アニーリング（annealing）；60°Cで1分間、伸長（extension）；72°Cで1分間を40サイクル行う条件で、TaKaRa PCR Thermal Cycler MPTP3000を用いて増幅し、430bpのDNA断片を確認した。

2) seminested PCR法

seminested PCR法の1st step PCRには、プライマーとして、LEG225；5'-AAGATTAGCTGCGTCCGAT-3'と LEG858；5'-GTCAACTTATCGCGTTTGCT-3'を使用し、濃縮試料から抽出したDNAの2.5μlをPCR混合液22.5

μlに加えスピンドウンした後、最初の変性；95°Cで90秒間行い、次に、変性；95°Cで10秒間、アニーリング；64°Cで1分間、伸長；74°Cで1分間の30サイクルで645bpのDNA断片を増幅した。2nd stepのseminested PCRには、single PCR法に使用したプライマーと同一のLEG448と1st step PCRに用いたLEG858プライマーを使用し、1st step PCR増幅産物の0.5μlをPCR混合液24.5μlに加え、スピンドウンした後、初期の変性；95°Cで90秒間行い、次に、変性；95°Cで30秒間、アニーリング；66°Cで1分間、伸長；74°Cで1分間の20サイクルで430bpのDNA断片を増幅した。

5. アガロースゲル電気泳動

レジオネラ属菌特異的16S rRNA gene 領域の LEG プライマーを用いた single PCR法による増幅産物（430bp）のDNA断片とseminested PCR法による1st及び2nd step PCR増幅産物（1st：645bp、2nd：430bp）のDNA断片は、各々の5μlを0.5×TBE緩衝液と2.0%アガロースゲルで泳動した後、エチジウムプロミド（Et.Br、1mg/ml）で染色し、超純水で水洗した後、トランスイルミネーターで観察した。

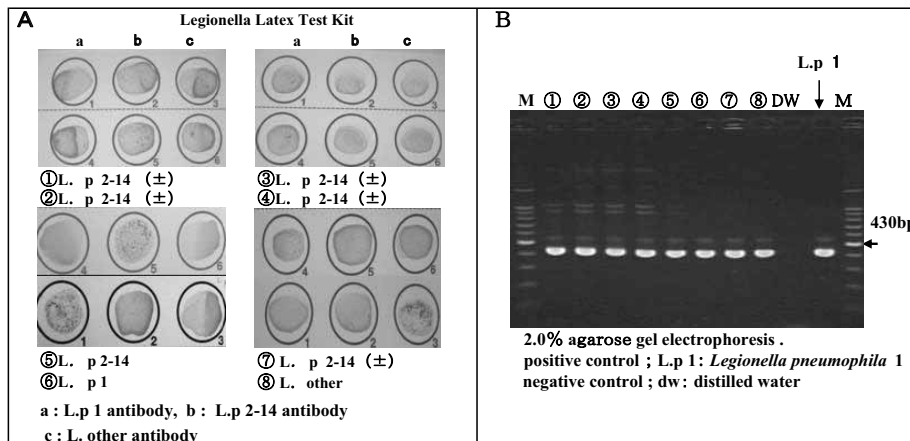


Fig. 2. Results of serogrouping (A) and single PCR products (B) from *Legionella* species.

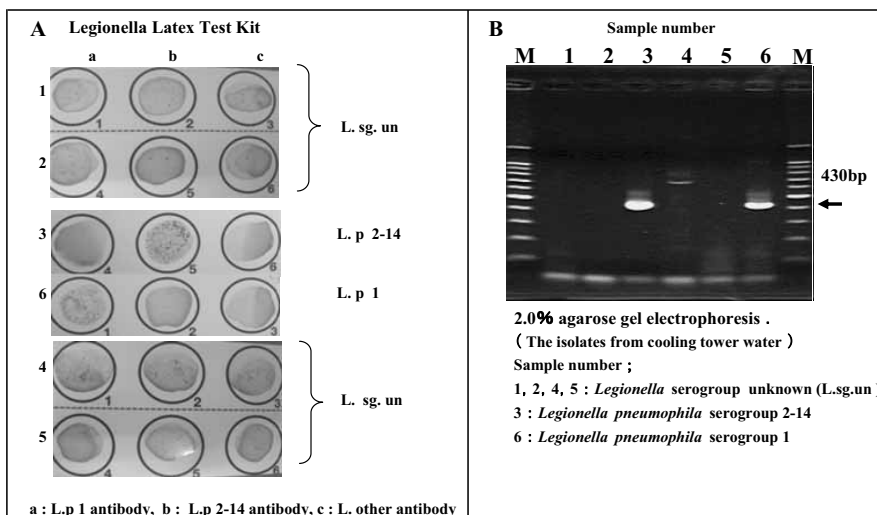


Fig. 3. Result of serotyping (A) and single PCR products (B) from *Legionella* species.

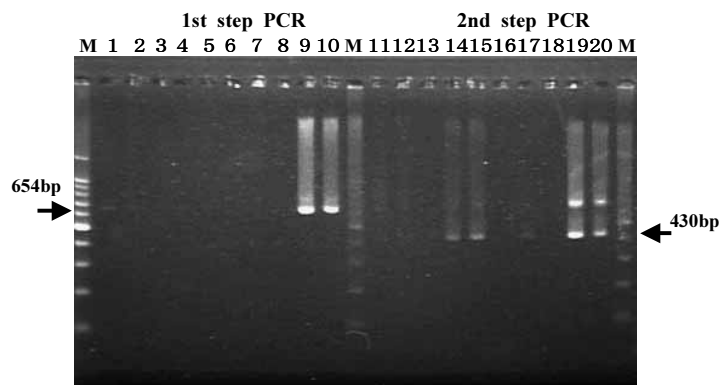


Fig. 4. PCR products of *Legionella* species in 2.0%AGE.

M : Marker 100 b p rudder
 No. 1, 2 : 18E-24 h -⑤⑥ (L. serogroup unknown ; 10CFU/100ml)
 No. 3 : 18E-4 (<5CFU/100ml) ,No. 4 : 18E-5 (L.p1 ; 360CFU/100ml)
 No. 5 : 18E-6 (L.p1 ; 9000CFU/100ml) ,No. 6 : 18-13 (L.p2-14 ; 80CFU/100ml)
 No. 7 : 18-14 (L.p2-14 ; 40CFU/100ml) ,No. 8 : DW (negative control)
 No. 9, 10 : *Legionella pneumophila* (positive control)
 No. 11~20 (2nd step PCR = seminested PCR products from 1st step PCR products)
 AGE: Agarose Gel Electrophoresis

Table 1. Comparison of result by culture method and seminested PCR assay

Sample No.	Sample name	Culture		Seminested PCR	
		CFU/100ml	Legionella latex test	1st step PCR products	2nd step PCR products
1	18E-24h-⑤	10	L. sg.un	-	-
2	18E-24h-⑥	10	L. sg.un	-	-
3	18E-4	<5	NT	-	-
4	18E-5	360	L. p 1	-	+
5	18E-6	9,000	L. p 1	-	+
6	18-13	80	L.p2-14	-	-
7	18-14	40	L.p2-14	-	+
8	DW	Nega.cont	NT	-	-
9	Posi.cont-1	∞	L. p 1	+	+
10	Posi.cont-2	∞	L. p 1	+	+

L.p 1 : *Legionella pneumophila* serogroup 1, L.p 2-14 : *Legionella pneumophila* serogroup 2-14
 Sample No.1-5 : cooling tower water, No.6-7 : bathtub water
 L.sg.un : *Legionella* serogroup unknown, Posi.cont : Positive control
 DW : Distilled Water, Nega.cont : Negative control, NT : No Test , ∞ : infinity

試験結果

1. レジオネラ属菌の凝集試験と電気泳動像

羊血液寒天培地に発育せず、BCYE α 寒天培地に発育したレジオネラ属菌のうち、Legionella Latex Test Kitによる凝集試験で、血清群L.p1、L.p2-14、L.その他およびL.p2-14（凝集試験：±）に群別された菌は、single PCR産物の2.0%アガロースゲル電気泳動でレジオネラ属菌特異的430bpのDNA断片を認めた（Fig. 2）。しかし、凝集試験で凝集を認めなかった血清群不明（L.sg. un）の4検体（No.1、2、4、5）は、430bpのDNA断片を認めなかった。（Fig. 3）。

2. 培養法による成績と seminested PCR法による成績

培養法による環境水（浴槽水および冷却塔水等）7検体（No.1～7）の成績は、レジオネラ属菌< 5/100mlから9×10³/100mlであった。ラテックス凝集試験では、検体18E-24h-⑤と18E-24h-⑥において凝集を認めなかった（Table 1）。環境水7検体（No.1～7）の濃縮試料から直接抽出したDNAと陽性コントロールの抽出DNA（2検体）および陰性コントロール（DW）についてのseminested PCR法の2nd step PCRにおいて、検体18E-5、18E-6、18E-14は、430bpのDNA断片を認めた。しかし、ラテックス凝集試験において凝集を認めなかった血清群不明（L.sg. un）の検体18E-24h-⑤と18E-24h-⑥は、seminested PCRを実施してもsingle PCR試験の4検体（No.1、2、4、5）（Fig. 3）と同様、430bpのDNA断片を認めなかった（Table 1とFig. 4）。

考察

レジオネラ属菌の同定において、血清群L.p2-14（凝集試験：±）と凝集を認めない血清群不明（凝集試験：-）に対し、single PCR法でレジオネラ属菌特異的430bpのDNA断片の有無を確認することは、レジオネラ属菌であるかどうかを最終判定する上で確実性を確保する手段として有効であった（Fig. 2とFig. 3）。また、培養法による環境水（浴槽水および冷却塔水等）からのレジオネラ属菌の検出成績とseminested PCR法による成績が、良く一致したことから、最終判定までに7～9日間要する培養法に対し、濃縮試料のDNA抽出から最終判定のレジオネラ属菌特異的430bpのDNA断片の確認まで48時間であるseminested PCR法は、迅速な試験方法であり、スクリーニングとして活用可能な迅速同定法と思われる。さらに、seminested PCR法の成績（2nd step PCR泳動像）と培養法（検体100mlあたりのコロニー数；CFU/100ml）の成績との比較から、seminested PCR法による検出感度は、0.4～0.8CFU/ml（培養法：40～80CFU/100ml）であり、比嘉らのnested PCR法の感度試験結果（0.1CFU/ml）⁷⁾とほぼ類似する感度であった（Table 1）。従来、レジオネラ属菌同定用培地である羊血液寒天培地/BCYE α 寒天培地の羊血液寒天培地に発育せず、BCYE α 寒天培地に発育する分離菌は、レジオネラ属菌と同定されているが、ラテックス凝集試験で凝集を認め

ない血清群不明（凝集試験：-、L.sg. un）の分離菌は、レジオネラ属菌特異的16S rRNA gene領域のLEGプライマーを用いた増幅産物に430bpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動で認めない場合、確かにレジオネラ属菌なのか疑問である（Fig. 3）。

最近、私たちは、培養開始後7日目の観察で極小のコロニー（1mm以下）を認めた。培養をさらに続け、培養開始後10日目にGVPC α 寒天培地からBCYE α 寒天培地に移植し、増殖した菌についてレジオネラ属菌であるかどうかを調べた。その結果、Legionella Latex凝集試験で凝集を認めない血清群不明（凝集試験：-）であったが、single PCR法においてレジオネラ属菌特異的430bpのDNA断片を認めた。この事は、浴槽水中には、7日間の培養期間では十分に発育しきれず、極小コロニーを呈する増殖のかなり遅いレジオネラ属菌が存在することを示唆している。今後、GVPC α 寒天培地に発育したコロニーのうち、発育の遅い極小コロニーに対し、十分に注意する必要がある。

まとめ

環境水（浴槽水、冷却塔水）中のレジオネラ属菌の検出と同定は、PCR法の検討から凝集試験において判定困難な血清群不明（凝集試験：±および-）の分離菌に対しsingle PCR法を実施することで、最終判定に正確性を確保することができた。また、環境水中のレジオネラ属菌の同定は、培養法の7～9日間に対し、seminested PCR法を採用することによって48時間に短縮された。

文献

- 1) 病原体検出マニュアル：レジオネラ症；国立感染症研究所 平成15年8月29日改訂
- 2) 山本 啓之：レジオネラ属菌とレジオネラ症- 最近の知見、遺伝子による検出法；臨床と微生物 25：035-039,1998.
- 3) Miyamoto H. Yamamoto H. Akira K. et al. : Development of a new seminested PCR method for detection of Legionella species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. Appl.Environ.Microbiol, 63 : 2489-2494, 1997.
- 4) OXOID DR0800M Legionella Latex Test Protocol, January 2005.
- 5) QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit Protocol, February 2003.
- 6) Ta Ka Ra Bio Ex Taq DNA Polymerase Protocol, October 2004.
- 7) 比嘉 太、小出道夫、新里 敬、中本 敦、宮良高雄、我謝道弘、健山正男、大湾勤子、草野展周、橘川桂三、重野芳輝、斉藤 厚：Nested polymerase chain reaction 法を用いたLegionella pneumophila 検出の基礎的検討：感染症学雑誌 66：1084-1089, 1992.