

Propidium monoazide 処理を併用したリアルタイム PCR 法による環境水試料からの *Legionella* 属菌の検出

保健科学課 吉澤 千尋・松田 正法・徳島 智子
麻生嶋 七美・宮基 良子・樋脇 弘

第3回微生物検査を考える研究会

Legionella 属菌（以下、*L* 菌）を直接 PCR 検出する場合、検体中に死菌や損傷菌が存在するため、PCR 法と培養法の一致率は低い。このため、死菌や損傷菌の DNA と結合するインターカレート剤である propidium monoazide (PMA) を用いて環境水試料を前処理し、生きた *L* 菌だけを迅速に PCR 検出する方法（以下、PMA-PCR）を検討した。

環境水 62 検体を実験に供試した結果、12 検体で培養法と PMA-PCR 結果が一致しなかった。そのうち培養法陰性の 10 検体で Threshold cycle value（以下、Ct 値）が PMA 処理を行わない PCR の場合より 0.2～6.2 サイクル増加し、これらの検体の抽出 DNA 中に 14～99%に相当する死菌や損傷菌、あるいは VBNC 状態の菌が含まれていたことがわかった。また、培養法陰性で Ct 値が減少したものおよび培養法陽性で Ct 値が増加した 2 検体については、いずれも *L* 菌の菌数が非常に少なく、PCR で得られた Ct 値も検出限界に近い値であり、実験誤差の影響と思われた。

今後、PMA-PCR では検体処理時の濃縮率や添加濃度、培養検査では分離培地の検討等を行い、両法の一一致率を向上することで、PMA-PCR は培養法を補完する迅速な検査として十分に利用可能となると考えられる。