

# 浴場水中の *Legionella* 属菌および *Legionella pneumophila* のリアルタイム PCR による迅速検出

江淵寿美・瓜生佳世・馬場愛・樋脇弘・宮本敬久\*

福岡市保健環境研究所保健科学部門

\*九州大学大学院農学研究院

## Detection of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in Bath Water by Real Time PCR Assay

Sumi EBUCHI, Kayo URYU, Ai BABA, Hiroshi HIWAKI and Takahisa MIYAMOTO \*

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

\* Food Hygienic Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University

### Summary

Quantitative detection of *Legionella* spp. in bath water was performed by real time PCR assay (qPCR). In 16 samples where *L. spp.* strains were isolated by culture method, all of the samples were positive by qPCR; however, the bacterial count of *L. spp.* obtained from qPCR was  $10^1$ - $10^5$  times more than from the culture method. In the other 16 samples where *L. spp.* strains were negative by culture method, 10 samples were negative and 6 samples were positive by qPCR.

Also, qPCR for the detection of *L. pneumophila* was carried out. From 13 of the 16 samples mentioned above where *L. spp.* were positive by culture method, *L. pneumophila* strains were isolated; however, the results of qPCR were positive in all of the 16 samples. In the other 16 samples mentioned above where *L. spp.* were not isolated, 6 samples were positive by qPCR and 10 samples were negative by qPCR.

The qPCR assay was 100% specific for *L. spp.* or *L. pneumophila* with the detection limit of  $2.2 \times 10^3$  CFU/mL, and showed excellent correlation coefficient and PCR efficiency. Improvement of the qPCR and the culture method (specimen-preprocessing, culture medium and isolation) is necessary to correspond with both of the results better.

**Key Words** : リアルタイム PCR Real time PCR , 定量検出 Quantitative detection ,  
浴場水 Bath water , レジオネラ属菌 *Legionella* spp. ,  
レジオネラニューモフィラ *Legionella pneumophila*

### はじめに

レジオネラ感染症は、高齢者や乳幼児、免疫機能が弱った病人がかかりやすい劇症性の肺炎型と、一過性のポントィアック熱の2つの病型に大別され、その起因菌としては *Legionella pneumophila* が多い<sup>1)</sup>。

浴場水を発生源とするレジオネラ症が集団発生した場合、原因究明のため、浴場水中のレジオネラ属菌(以下 *L.*

spp.) の検査を行う必要があるが、従来の培養法<sup>2)</sup>は結果を得るのに7～10日間の長い日数を要する。

このため、浴場水から迅速に *L. spp.* と *L. pneumophila* を定量検出するため、二重蛍光標識プローブを用いたリアルタイム PCR (以下 qPCR) の応用を検討した。

### 実験方法

### 1. 試験菌株と鋳型 DNA の調製

検量線用の標準試料は、当研究所の保存株である浴場水由来の *L. pneumophila* serogroup (以下 SG) 1 の菌液を使用した。qPCR の特異性確認のため、各種血清型の *L. pneumophila* 10 株 (SG1 ~ 10)、*L. pneumophila* 以外の *L. spp.* 6 菌種 (*L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. maceachernii*, *L. oakridgensis*, *L. micdadei*, *L. feeleeii*) 6 株を供試した。

非 *Legionella* 属との反応性については、当研究所で保存されていた腸内細菌 (大腸菌, 赤痢菌, サルモネラなどの 8 菌種 11 株)、ピブリオ属 3 菌種 4 株, エロモナス属 2 菌種 2 株, カンピロバクター-ジェジュニ 1 株, クロストリジウム属 2 菌種 2 株, 腸球菌 1 株, ブドウ球菌 2 菌種 2 株, マイクロコッカス 1 株, パチルス属 3 菌種 3 株, 計 27 株を用いて確認を行った。

qPCR 用の鋳型 DNA は、TE に浮遊させた各菌の懸濁液から QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) で抽出した。

### 2. プライマーおよび二重蛍光標識プローブの作製

二重蛍光標識プローブは、Molecular Beacon (以下 MB) および TaqMan probe (以下 Tmp) を使用した。

MB による qPCR (以下 MB-qPCR) では、*L. spp.* を検出するため 16S rRNA gene の領域に対して<sup>3)</sup> MB およびそのプライマーを作製した (Table 1)。

Tmp による qPCR (以下 Tmp-qPCR) では、*L. spp.* と *L. pneumophila* を検出するため 23S-5S spacer sequences の領域<sup>4)</sup> に対して Tmp およびそのプライマーを作製した (Table 1)。

Table 1. Oligonucleotides used in qPCR assay for *L. spp.* and *L. pneumophila* detection

Assay	Name	Sequences
MB-qPCR for <i>L. spp.</i> (16S rRNA gene)	Primer-16SLF	5'-Agg CTA ATC TTA AAg CgC C-3'
	Primer-16SLR	5'-CCT ggC TCA gAT TgA ACg-3'
	MB-16SMB	5'-FAM-CCg AgC ggT gAg TAA CgC gTA ggA ATA Tgg CTC gg-Dabcyl-3'
Tmp-qPCR for <i>L. spp.</i> and <i>L. pneumophila</i> (23S-5S spacer sequences)	Primer-LegF	5'-CTA ATT ggC TgA TTg TCT TgA C-3'
	Primer-LegR	5'-ggC gAT gAC CTA CTT TCg-3'
	Tmp-LGP <sup>a</sup>	5'-VIC-CgA ACT CAg AAg TgA AAC-TAMRA-3'
	Tmp-LPP <sup>b</sup>	5'-FAM-ATC gTg TAA ACT CTg ACT CTT TAC CAA ACC TgT gg-TAMRA-3'

<sup>a</sup> TaqMan probe for *L. spp.* detection

<sup>b</sup> TaqMan probe for *L. pneumophila* detection

### 3. qPCR

PCR 試薬には Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen) を用い、MB-qPCR では 10 μL の鋳型 DNA を、Tmp-qPCR では 5 μL の鋳型 DNA を加えて計 50 μL の反応系とした。

MB-qPCR では終濃度 0.3 μM のプライマーと終濃度 0.44 μM の MB を、Tmp-qPCR では終濃度 0.2 μM のプライマーおよび Tmp を使用した。また、*L. spp.* と *L. pneumophila* を同時に定量検出する Tmp-qPCR multiplex assay では、Tmp の終濃度を半量の 0.1 μM とした。

リアルタイム定量 PCR 装置には Stratagene Mx3000P Real Time PCR System を使用し、Mx3000P Multiplex Quantitative PCR System を用いて実験データを解析した。

反応条件は文献<sup>3,4)</sup>を参考に、MB-qPCR では 95 15 秒-56 30 秒 (蛍光収集)-72 30 秒を 45 サイクル行った。Tmp-qPCR では、94 15 秒-60 60 秒 (蛍光収集) を 45 サイクル行った。なお、Tmp-qPCR multiplex assay については、MB-qPCR と同じ条件で 3 step-PCR を行った。

### 4. qPCR による浴場水中の *L. spp.* および *L. pneumophila* の検出

培養法で *L. spp.* が検出された浴場水 16 検体および不検出であった浴場水 16 検体の計 32 検体を用いて、qPCR による *L. spp.* および *L. pneumophila* の検出を行った。なお、培養法の分離培地には MWY 寒天培地を用いた。

qPCR では、培養法で濃縮・酸処理した試料をさらに 5 倍に濃縮し、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出を行い、鋳型 DNA とした。

## 実験結果

### 1. MB-qPCR と Tmp-qPCR の定量性、検出限界

標準試料を用いた qPCR の結果を Table 2 に示した。

*L. spp.* 検出の MB-qPCR は相関係数が 1.00、検出感度はもとの菌液に換算して  $2.2 \times 10^3$  CFU/mL (PCR 反応液中 22CFU) であった。また、*L. spp.* 検出の Tmp-qPCR では、monoassay, multiplex assay の相関係数がいずれも 1.00 であり、検出感度は  $2.2 \times 10^3$  CFU/mL (PCR 反応

液中 11CFU) であった。

*L. pneumophila* 検出の Tmp-qPCR monoassay , multiplex assay では相関係数がいずれも 1.00 であり, 検

出感度は  $2.2 \times 10^3$ CFU/mL (PCR 反応液中 11CFU) であった。

Fig. 1 および Fig. 2 に実験データの一部を示した。

Table 2. The result of qPCR with standard suspensions of *L. pneumophila* SG1 strain

CFU/mL	MB-qPCR	TmP-qPCR monoassay			TmP-qPCR multiplex assay	
	<i>L. spp.</i>	<i>L. spp.</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. spp.</i>	<i>L. pneumophila</i>	
$2.2 \times 10^3$	35.44	38.51	36.92	38.19	37.59	
$2.2 \times 10^4$	32.02	35.24	33.66	35.40	34.15	
$2.2 \times 10^5$	28.61	30.92	30.51	32.26	31.21	
$2.2 \times 10^6$	25.14	27.42	27.24	28.12	27.93	
$2.2 \times 10^7$	21.61	23.17	23.58	24.92	24.31	
$2.2 \times 10^8$	18.05	19.61	20.36	21.19	20.53	
R squared value	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
PCR efficiency(%)	94.0	82.3	100.0	95.1	97.9	
Slope	-3.48	-3.83	-3.32	-3.45	-3.37	

<sup>a</sup> Threshold cycle

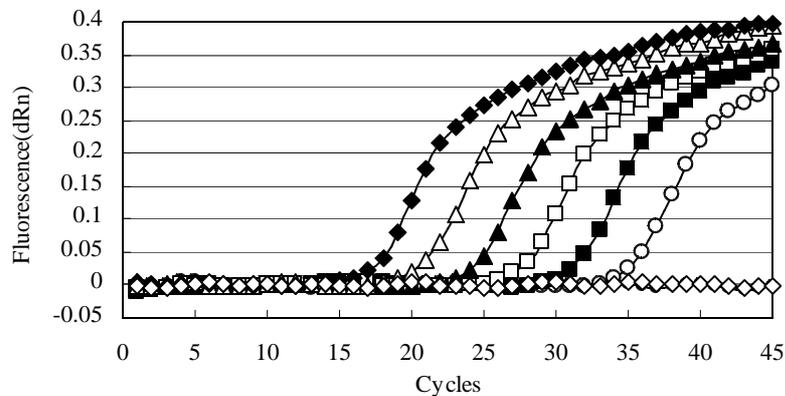


Fig. 1. Amplification plots of *L. pneumophila* SG1 strain amplified by MB-qPCR assay.

,  $2.2 \times 10^2$ CFU/mL; ,  $2.2 \times 10^3$ CFU/mL; ,  $2.2 \times 10^4$ CFU/mL; ,  $2.2 \times 10^5$ CFU/mL; ,  $2.2 \times 10^6$ CFU/mL; ,  $2.2 \times 10^7$ CFU/mL; ,  $2.2 \times 10^8$ CFU/mL; , 0CFU/mL.

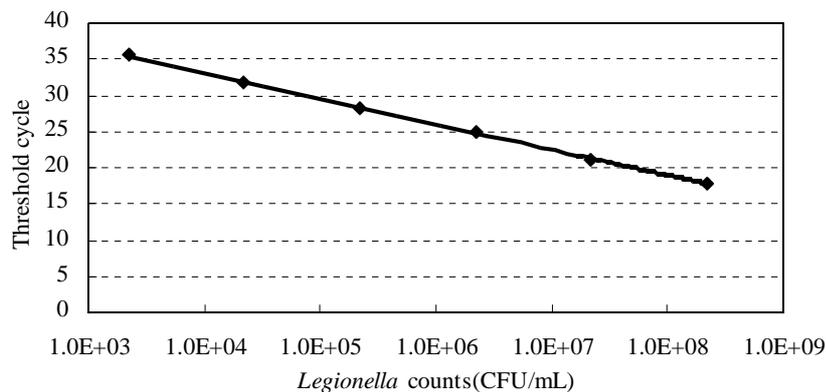


Fig. 2. Standard curve for *L. pneumophila* SG1 strain ( $2.2 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^8$ CFU/mL) by MB-qPCR assay.

## 2.MB-qPCR と Tmp-qPCR の特異性

各試験菌株に対して行った MB-qPCR および Tmp-qPCR の結果を Table 3 に示した。

*L. spp.*を検出する MB-qPCR と Tmp-qPCR では, *L. pneumophila* を含む全ての *L. spp.*だけを検出した。また *L. pneumophila* を検出する Tmp-qPCR では, *L.*

*pneumophila* だけを特異的に検出した。

### 3.qPCRによる浴場水中の *L. spp.*および *L. pneumophila* の検出結果

qPCRによる *L. spp.*の検出結果を Table 4 に示した。培養法で *L. spp.*が分離された 16 検体 (P1 ~ P16) は、MB-qPCR でも Tmp-qPCR でも陽性となった。qPCR で測定された菌数は、培養法が  $10^1 \sim 10^4$ CFU/100mL であったのに対し、 $10^5 \sim 10^7$ CFU/100mL であった。

*L. spp.*不検出 (10CFU/100mL 未満) の 16 検体 (N1 ~ N16) は qPCR では 6 検体が陰性とならず、MB-qPCR、Tmp-qPCR monoassay および multiplex assay でも同じ検体が陽性となり、これらの菌数は  $10^3 \sim 10^5$ CFU/100mL と算出された。

さらに、32 検体の同一試料を用いて Tmp-qPCR multiplex assay を行い *L. pneumophila* の検出を実施した (Table 5)。培養法で *L. spp.*が検出された 16 検体 (P1 ~ P16) 中 13 検体から *L. pneumophila* が分離されたが、Tmp-qPCR multiplex assay では、16 検体すべてが *L. pneumophila* 陽性となった。

また、培養法で *L. spp.*不検出の 16 検体 (N1 ~ N16) では、6 検体が *L. pneumophila* 陽性となった。なお、この 6 検体は、MB-qPCR、Tmp-qPCR monoassay および multiplex assay で *L. spp.*が陽性となった検体であった。

Table 3. Specificity of the qPCR assay

Species	MB-qPCR <sup>a</sup>	Tmp-qPCR <sup>b</sup>	Tmp-qPCR <sup>c</sup>
<i>L. pneumophila</i> <sup>d</sup>	+(10/10)	+(10/10)	+(10/10)
<i>L. spp.</i> <sup>e</sup>	+(6/6)	+(6/6)	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>C. botulinum</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
<i>A. sobria</i>	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> (2 <sup>f</sup> )	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>V. fluvialis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (2 <sup>g</sup> )	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-

( ) : Number of strains tested

<sup>a</sup> MB-qPCR for *L. spp.* detection

<sup>b</sup> Tmp-qPCR for *L. spp.* detection

<sup>c</sup> Tmp-qPCR for *L. pneumophila* detection

<sup>d</sup> *L. pneumophila* comprises 10 serogroups ; SG1, SG2,SG3,SG4,SG5,SG6,SG7,SG8,SG9,SG10.

<sup>e</sup> *L. spp.* comprise 6 species ; *bozemanii*, *dumoffii*, *maceachernii*, *oakridgensis*, *micdadei*, *feeleeii*.

<sup>f</sup> *Vibrio cholerae* and NAG-*Vibrio* strain

<sup>g</sup> STEC ( O 157 : H 7 ) and ETEC ( O 6 : H 16 )

Table 4. Detection of *L. spp.* in bath water by cultivation and the qPCR assay

Sample	CFU/100mL			
	Cultivation	MB <sup>a</sup>	Tmp-Mo <sup>b</sup>	Tmp-Mu <sup>c</sup>
P1	1.1E+04	7.9E+06	5.2E+06	5.9E+06
P2	4.3E+03	3.5E+05	2.1E+05	6.7E+05
P3	9.8E+03	7.0E+05	5.7E+05	4.5E+05
P4	1.8E+03	3.2E+05	3.8E+05	8.0E+05
P5	1.2E+03	4.9E+06	5.8E+06	1.1E+07
P6	1.2E+03	1.7E+06	3.1E+06	3.4E+06
P7	6.1E+02	2.6E+06	9.0E+05	1.4E+06
P8	2.4E+02	1.0E+05	2.2E+05	1.4E+05
P9	1.0E+02	1.6E+05	3.6E+05	1.2E+05
P10	9.0E+01	5.9E+05	4.0E+05	3.3E+05
P11	7.0E+01	6.4E+06	1.0E+07	1.7E+07
P12	5.0E+01	1.7E+05	1.9E+05	1.4E+05
P13	3.0E+01	2.5E+05	1.5E+05	2.7E+05
P14	2.0E+01	1.9E+05	2.6E+05	3.1E+05
P15	1.0E+01	1.2E+05	1.6E+05	1.6E+05
P16	1.0E+01	1.6E+05	2.7E+05	2.8E+05
N1	<1.0E+01	5.9E+04	6.4E+05	9.1E+03
N2	<1.0E+01	6.5E+04	5.6E+04	5.7E+04
N3	<1.0E+01	8.3E+04	1.0E+05	7.7E+04
N4	<1.0E+01	3.4E+04	1.6E+05	5.1E+04
N5	<1.0E+01	6.4E+04	2.3E+05	9.6E+04
N6	<1.0E+01	7.8E+04	3.3E+05	1.5E+05
N7	<1.0E+01	ND	ND	ND
N8	<1.0E+01	ND	ND	ND
N9	<1.0E+01	ND	ND	ND
N10	<1.0E+01	ND	ND	ND
N11	<1.0E+01	ND	ND	ND
N12	<1.0E+01	ND	ND	ND
N13	<1.0E+01	ND	ND	ND
N14	<1.0E+01	ND	ND	ND
N15	<1.0E+01	ND	ND	ND
N16	<1.0E+01	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Molecular Beacon assay for *L. spp.* detection

<sup>c</sup> TaqMan probe multiplex assay for *L. spp.* detection

<sup>b</sup> TaqMan probe monoassay for *L. spp.* detection

Table 5. Detection of *L. pneumophila* in bath water by cultivation and Tmp-qPCR multiplex assay

Sample	Isolation of <i>L. pneumophila</i>	TMp-Mu <sup>a</sup> (CFU/100mL)	Sample	Isolation of <i>L. pneumophila</i>	TMp-Mu <sup>a</sup> (CFU/100mL)
P1	+	1.5E+07	N1	-	1.5E+04
P2	+	5.4E+05	N2	-	7.5E+04
P3	-	1.3E+06	N3	-	6.8E+04
P4	+	3.8E+05	N4	-	4.0E+04
P5	+	3.7E+06	N5	-	6.0E+04
P6	+	2.4E+06	N6	-	8.3E+04
P7	+	8.0E+05	N7	-	ND
P8	+	8.1E+04	N8	-	ND
P9	+	1.4E+05	N9	-	ND
P10	-	3.9E+05	N10	-	ND
P11	+	1.2E+07	N11	-	ND
P12	+	1.2E+05	N12	-	ND
P13	+	2.5E+05	N13	-	ND
P14	+	2.4E+05	N14	-	ND
P15	-	7.9E+04	N15	-	ND
P16	+	1.6E+05	N16	-	ND

<sup>a</sup> TaqMan probe multiplex assay for *L. pneumophila* detection

## 考 察

遺伝子の迅速な検出と定量が可能な qPCR を、浴場水中の *L. spp.* および *L. pneumophila* の検査に応用した。近年報告された *L. spp.*, *L. pneumophila* 検出用の二重蛍光標識プローブとプライマーを用いて、MB-qPCR および Tmp-qPCR monoassay による *L. spp.* 検出と、Tmp-qPCR multiplex assay による *L. spp.* および *L. pneumophila* 同時検出を行った。

qPCR による *L. spp.* 検出の場合、培養法で *L. spp.* が検出された 16 検体は、MB-qPCR でも Tmp-qPCR でも陽性となり、培養法と qPCR の定性結果は一致した。しかし、qPCR で測定された菌数は、培養法と比較すると  $10^1 \sim 10^5$  倍多かった。培養法で *L. spp.* 不検出の 16 検体は、qPCR で 10 検体が陰性となったが、残りの 6 検体は陽性となり、培養法と qPCR の結果は一致しなかった。

qPCR による *L. pneumophila* 検出の場合、培養法においては *L. spp.* が検出された 16 検体中 13 検体から *L. pneumophila* が分離されたが、Tmp-qPCR multiplex assay では 16 検体すべてが *L. pneumophila* 陽性となった。また、培養法で *L. spp.* 不検出の 16 検体についても、うち 6 検体が *L. pneumophila* 陽性となった。

*L. spp.* は、自然環境下では、培養可能な生菌、VBNC (Viable but Non-Culturable)、あるいは死菌という様々な形態を示す<sup>5-8)</sup>。PCR 法で細菌を検出する場合、生菌のみを検出する培養法と異なり、VBNC や死菌、あるいは損傷菌の DNA までが鋳型となる。また、標的とする遺伝子の細胞内コピー数が多い場合は、培養法よりも検出感度が高くなる。これらのことが、qPCR と培養法

の結果の差に反映したものと考えられた。

今回行った MB-qPCR および Tmp-qPCR の検出限界は  $2.2 \times 10^3$  CFU/mL (PCR 反応液中それぞれ 22CFU, 11CFU) と高感度であり、相関係数はいずれも 1.00 で定量性に優れ、PCR 効率も 82.3 ~ 100% と良好であった。特異性についても、*L. spp.* 検出の MB-qPCR と Tmp-qPCR monoassay, multiplex assay では *L. pneumophila* を含めた *L. spp.* だけを検出し、*L. pneumophila* 検出の Tmp-qPCR multiplex assay では *L. pneumophila* だけを検出した。qPCR は前処理も含めて約 3 時間で *L. spp.* を定量検出するため、一週間程かかる培養法と比較すると大幅に時間が短縮でき、スクリーニング法としては非常に有効である。

今後は qPCR と培養法の結果を一致させるため、鋳型 DNA 調製時における死菌の除去を検討するとともに、培養法では直接分離法から増菌培地による MPN 法へ変更し、選択性の弱い分離培地を併用することが必要と考えられた。

## ま と め

qPCR による浴場水中の *L. spp.* の定量検出を行った。培養法で *L. spp.* が検出された 16 検体は、qPCR でも陽性となったが、PCR で測定された菌数は、培養法と比較すると  $10^1 \sim 10^5$  倍多かった。培養法で *L. spp.* 不検出の 16 検体は、PCR で 10 検体が陰性となったが、残りの 6 検体は陽性となり、培養法と PCR の結果は一致しなかった。

qPCR による *L. pneumophila* 検出の場合、培養法にお

いては *L. spp.* が検出された 16 検体中 13 検体から *L. pneumophila* が分離されたが、PCR では 16 検体すべてが *L. pneumophila* 陽性となった。また、培養法で *L. spp.* 不検出の 16 検体についても、うち 6 検体が *L. pneumophila* 陽性となり、培養法と PCR の結果は一致しなかった。

今回行った qPCR は約 3 時間で *L. spp.* の定量検出が可能であり、検出限界は  $2.2 \times 10^3$  CFU/mL と高感度であり、相関係数、PCR 効率、特異性いずれも良好であった。今後は qPCR と培養法の結果を一致させるため、鋳型 DNA 調製時における死菌の除去および損傷菌を含めた培養可能な菌を検出できる培養法を検討する必要がある。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所厚生省保健医療局エイズ結核感染症課：病原菌検出情報月報，24(2)，2003
- 2) 厚生省生活衛生局企画課監修：新版 レジオネラ症防止指針 財団法人 ビル管理教育管理センター(東京)，2000
- 3) Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Sillekens, P., Crielaard, J. W., van Dam, A. P., Goossens, H., and Claas, E. C. J. : Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species, *J. Clin. Microbiol.*, 41(9), 4016 ~ 4021, 2003
- 4) Herpers, B. L., de Jongh, B. M., van der Zwaluw, K., and van Hannen, E. J. : Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella spp.* and *Legionella pneumophila*, *J. Clin. Microbiol.*, 41(10), 4815 ~ 4816, 2003
- 5) Hussong, D., Colwell, R. R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A. D., Weiner, R. M., and Burge, W. D. : Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media, *Bio/Technology*, 5(9), 947 ~ 950, 1987
- 6) Palmer, C. J., Tsai, Y. L., Paszco-Kolva, C., Mayer, C., and Sangermano, L. R. : Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture method, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(11), 3618 ~ 3624, 1993
- 7) Steinert, M., Emödy, L., Amann, R., and Hacker, J. : Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(5), 2047 ~ 2053, 1997
- 8) Yamamoto, H., Hashimoto, Y., and Ezaki, T. : Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 20(3), 149 ~ 154, 1996