

短 報

複数の科学分析法により病因物質を特定した有毒キノコ（ツキヨタケ）中毒例

石田 恵崇, 和田 章伸, 太田 康介, 成田 弥生, 渡部 淳, 小林 伶,
酒井 真紀子, 中島 克則

**A case of poisonous mushroom intoxication whose disease agent was
revealed by multiple scientific methods of analysis**

Yoshitaka ISHIDA, Akinobu WADA, Kosuke OTA, Yayoi NARITA, Makoto WATANABE,
Rei KOBAYASHI, Makiko SAKAI and Katsunori NAKAJIMA

令和 2 年 10 月, 山形県内において有毒キノコによる食中毒と疑われる事例が発生した。管轄保健所からの検査依頼により, 喫食残品に対して遺伝子検査及び理化学的検査を実施したところ, ツキヨタケ DNA とツキヨタケの毒性成分 (イルジン S) を検出したことから, 本事例はツキヨタケを喫食したことによる食中毒であると断定された。

キーワード: ツキヨタケ *Lampteromyces japonicas*, 食中毒 Food poisoning,
液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法 Liquid chromatography-Mass spectrometry (LC-MS/MS),
イルジン S Illudin S, PCR 法 PCR Method

I はじめに

ツキヨタケはヒラタケやムキタケ, シイタケなど可食のキノコと形態がよく似た有毒キノコである。喫食後 30 分～3 時間程度で嘔吐や下痢等の消化器症状を呈し, 過去には死亡事例も報告されている^{1,2)}。

登田らは有毒キノコ食中毒を原因キノコの種類別に統計しており, ツキヨタケは発生件数・患者数ともに最も多いと報告している³⁾。山形県においても直近の 10 年間 (平成 23 年～令和 2 年) で 33 件の事例が発生した⁴⁾。これらの事例において, 山形県衛生研究所では, 管轄保健所からの依頼により科学分析を行い, 病因物質の特定に寄与してきた。

我々は, 令和 2 年に山形県内で発生した有毒キノコによる食中毒疑い事例において, 喫食残品の検査を実施したのでその詳細について報告する。

II 食中毒疑い事例の概要

令和 2 年 10 月, 山形県内において知人から譲り受けたキノコを和え物にして喫食した家族 4 名が嘔吐や頭痛, 悪寒等の症状を呈し, 医療機関に搬送された。有毒キノコによる食中毒を疑った管轄保健所から検査依頼があり, 遺伝子検査 (PCR 法) および理化学的検査 (キノコ毒一斉分析法) を実施した。

III 実験方法

1 試料

喫食残品 1 検体

喫食残品に対し形態鑑別を行い, ツキヨタケ様キノコ (以下, キノコ 1), シメジ様キノコ (以下, キノコ 2) およびその他成分に分けた。その他成分からは野菜など汁以外のものを取り除き 2 種のキノコおよび汁を試料とした (写真 1)。

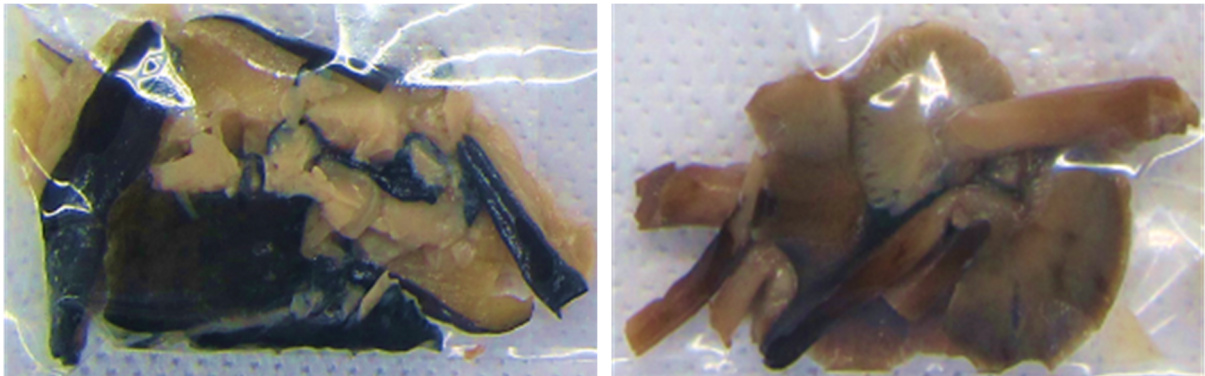


写真1：キノコ1（写真左），キノコ2（同右）

2 検査方法

1) PCR 法

試料 0.04 g からディスポーザブルホモジナイザーおよび DNA 抽出精製キットを用いて DNA 溶液を得た．これを鋳型とし，有毒キノコの検出用プライマー8種(ツキヨタケ,オオワライタケ,ニガクリタケ,スギヒラタケ,ドクササコ,カキシメジ⁵⁾,クサウラベニタケ,テングタケ)を使用してPCRを実施した．PCR産物は4%アガロースゲルで電気泳動,臭化エチジウムによる染色の後，特定の増幅断片長におけるバンドの有無を確認した（図1）．

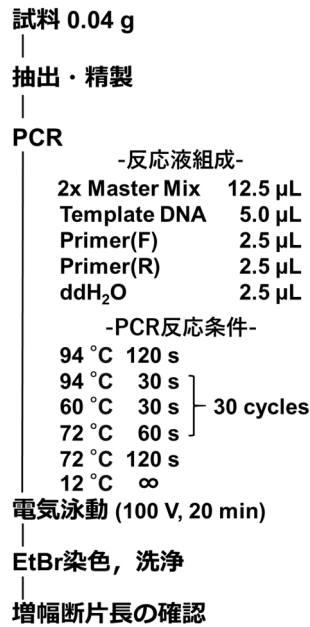


図1 PCR法の検査フロー

2) キノコ毒一斉分析法

試料 2.00 g にメタノール 20 mL を加え，ホモジナイズした後，ろ過した．ろ紙上の残渣を再度ホモジナイズおよびろ過し，ろ液を合わせて 100 mL に定容した．得られたろ液を 0.20 μ m のメンブランフィルターに通して試験溶液とし（図2），表1，2に示した条件下，LC-MS/MSにより5成分（イルジン S，ムスカリン，ムシモール， α -アマニチン，ファロイジン）の測定，定量分析を行った．

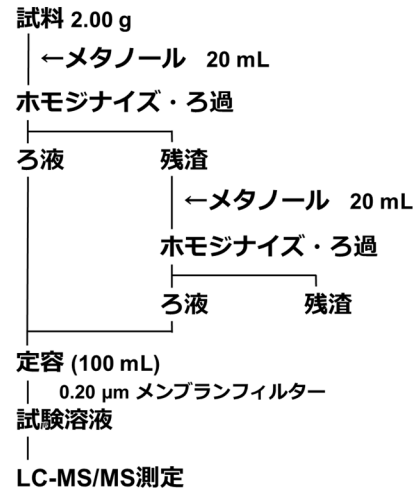


図2 キノコ毒一斉分析法の検査フロー

表 1 LC-MS/MS 測定条件 (LC 部)

装置 (LC) : SCIEX製 ExionLC AC	
カラム	Scherzo SS-C18 (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
移動相	A : 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム含有0.1 % 酢酸溶液 B : 0.2 % 酢酸含有アセトニトリル
B液グラジエント	30 %(0 min)-30 %(3 min)-90 %(35 min)- 90 %(45 min)-30 %(45.1 min)-30 %(60 min)
流量	0.2 mL / min
カラム温度	40.0 °C
注入量	5 μL

表 2 LC-MS/MS 測定条件 (MS 部)

装置 (MS) : SCIEX製 QTRAP4500			
イオン化方法	ESI (Positive)		
	有毒キノコ	成分名	測定イオン (m/z)
測定イオン	ツキヨタケ	イルジン S	265 > 217
	テングタケ 等	ムシモール	115 > 98
		ムスカリン	174 > 115
	ドクツルタケ 等	α-アマニチン	919 > 901
		ファロイジン	789 > 753
イオンスプレー電圧	5500 V		
脱溶媒温度	400 °C		

IV 結果および考察

1) PCR 法

PCR 法の結果を写真 2 に示した。陽性コントロール (ツキヨタケ) において、ツキヨタケ特異的プライマーを用いて増幅させた Lane 1 から増幅産物を示すバンドを理論値 107 bp 付近に検出した。同様に各試料について Lane 1 を確認したところ、キノコ 1 および汁からは理論値 107 bp 付近にバンドを検出したが、

キノコ 2 からは検出されなかった。また、いずれの試料についても Lane 2-8 においてバンドは検出されなかった。以上のことから、キノコ 1 はツキヨタケ、キノコ 2 は今回対象とした 8 種の有毒キノコのいずれでもないと推定した。また、本来キノコ子実体を含まない汁からもツキヨタケ由来のバンドが検出されたが、これは微量の DNA が汁中に溶出、あるいは微細なキノコ片が混入したためと考える。

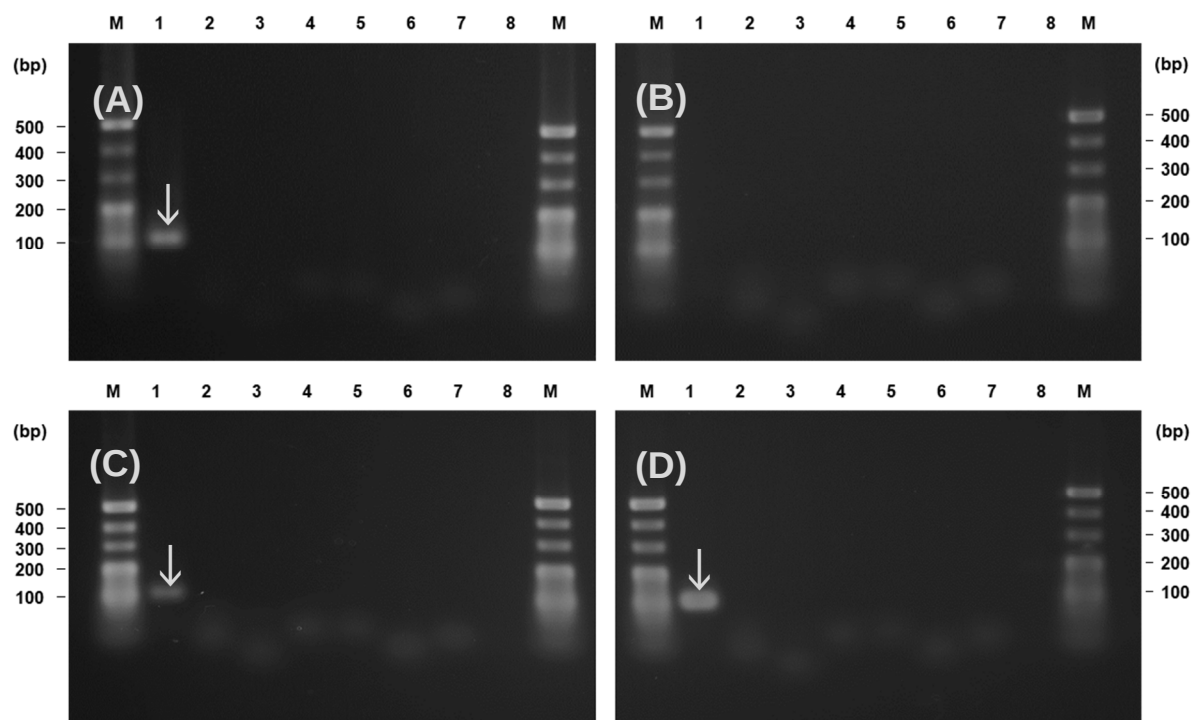


写真 2 PCR 法の結果 : (A) キノコ 1, (B) キノコ 2, (C) 汁, (D) 陽性コントロール (ツキヨタケ)

Lane 1: ツキヨタケ, Lane 2: オオワライタケ, Lane 3: ニガクリタケ, Lane 4: スギヒラタケ,
Lane 5: クサウラベニタケ, Lane 6: ドクササコ, Lane 7: カキシメジ, Lane 8: テングタケ,
Lane M: 20 bp マーカー

2) キノコ毒一斉分析法

キノコ 1, 2 および汁からツキヨタケの毒性成分イルジン S が検出され, その濃度はそれぞれ 158, 168, 171 $\mu\text{g/g}$ であった (図 3). イルジン S の確認イオン ($m/z: 217 > 201$) も同様に検出され, それ以外の成分は検出されなかった. ここで, 形態鑑別および PCR 法の結果からキノコ 1 はツキヨタケ, キノコ 2 はツキヨタケではないと結論付けたが, 本法では異なる結果が得られたことについて次のように考察した.

笠原らは, ツキヨタケを用いた汁物の調理モデル

実験において, 子実体から汁中へイルジン S が溶出し, 加熱しても大部分が残存すると報告している⁶⁾. すなわち, キノコ 1, 2 とよく汁を吸っていたことから, イルジン S が汁中に溶出し, その煮汁を介して喫食残品全体に均質化されたものと推測した.

また, 同報告では 1 mg 程度のイルジン S を摂取することで中毒症状を引き起こす可能性があるとして述べられている⁶⁾. 各試料のイルジン S 濃度を鑑みると, 汁を約 6 mL (一口程度) だけ飲んだとしても食中毒を起こす可能性があることが示唆された.

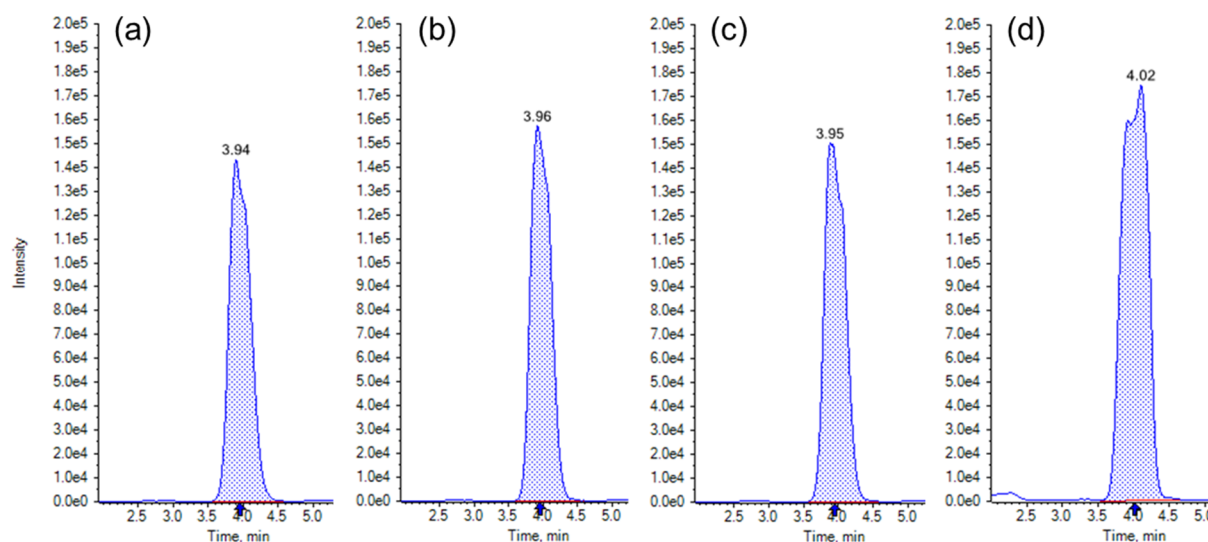


図 3 有毒キノコ一斉分析法のクロマトグラム ($m/z: 265 > 217$, イルジン S) :

(a) キノコ 1, (b) キノコ 2, (c) 汁, (d) 標準溶液 (5 $\mu\text{g/mL}$)

V まとめ

ツキヨタケによる食中毒疑い事例発生において, 喫食残品の PCR 法およびキノコ毒一斉分析法を実施した. PCR 法ではツキヨタケ DNA が, キノコ毒一斉分析法ではツキヨタケの毒性成分イルジン S が検出された. このように, 測定対象が異なる 2 種類の分析を行い, 両方からツキヨタケ中毒を示唆する結果が得られたことから, 管轄保健所が病因物質を特定する上で, 有力な結果を示すことができたと考える.

加えて, 喫食残品の汁中からもキノコ子実体と同程度の濃度でイルジン S が検出され, 子実体を直接喫食せずとも中毒症状を引き起こす可能性があるこ

とが示唆された. 一般的にキノコ毒は水溶性の高いものが多いことから, 毒キノコが少量混入しただけでも調理品全体が汚染されるリスクがある. すなわち, 天然のキノコを採取するときには 1 つ 1 つ慎重かつ丁寧に鑑別し, 判定に迷うときは食べたり人にあげたりしないことが重要である.

今後もこのような食中毒事例に関する調査結果を公表し, 有毒キノコについての正しい知識を周知することで, 食中毒を未然に防ぐことに役立てていきたい.

VI 文献

- 1) 小林 史岳, 唐澤 忠宏, 松下 智人, 他: ツキヨタケ中毒の 6 例, 日本農村医学会雑誌, **66**, 499-503, 2017
- 2) 石原 祐治, 山浦 由郎: 日本におけるきのこ中毒の発生状況, 日本衛生学雑誌, **46**, 1071-1078, 1992
- 3) 登田 美桜, 畝山 智香子, 豊福 肇, 他: わが国における自然毒による食中毒事例の傾向 (平成元年～22 年), 食品衛生学雑誌, **53**, 105-120, 2012
- 4) 厚生労働省ホームページ: 食中毒統計資料 (平成 23 年～令和 2 年)
- 5) 野村 千枝, 昌山 敦, 山口 瑞香, 他: 食中毒を引き起こす有毒キノコの種特異的プライマーによるスクリーニング法の開発, 食品衛生学雑誌, **58**, 132-142, 2017
- 6) 笠原 義正, 伊藤 健: LC/MS/MS によるツキヨタケ及び食中毒原因食品中の illudin S の分析, 食品衛生学雑誌, **50**, 167-172, 2009

短 報

蛍光免疫染色を利用したウイルス感染細胞の可視化

駒林賢一, 青木洋子, 池田陽子, 田中和佳, 水田克巳

Visualization of virus-infected cells using immunofluorescent staining

Kenichi KOMABAYASHI, Yoko AOKI, Yoko IKEDA, Waka TANAKA and Katsumi MIZUTA

ウイルスが感染して増殖した細胞は細胞変性効果（CPE）と呼ばれる形態変化を示すが、形態観察のみでウイルスの増殖を推定することは困難な場合がある。本研究では蛍光標識した抗体を用いて感染細胞を染色し、ウイルスの局在を可視化することを試みた。アデノウイルス 3 型、インフルエンザウイルス A 型 H1N1、ヒトコロナウイルス 229E、およびヒトコロナウイルス OC43 を、それぞれ HEF 細胞、MDCK 細胞、HeLa-ACE2-TMPRSS2 細胞、およびヒト正常気管支上皮細胞を用いて培養し、蛍光免疫染色標本作成に供した。微分干渉像と蛍光像でそれぞれ形態変化を示す細胞の局在とウイルスの局在を取得し比較を行ったところ、2 つの局在が一致する場合は形態変化がウイルスに起因すると判断できた。また、CPE を示さないヒトコロナウイルス OC43 の培養系においてウイルス陽性細胞が部分的に局在することが分かった。本法は培養系におけるウイルスの増殖に関して新たな視点からの情報を得ることができ有用であると考えられた。

キーワード：ウイルス培養，蛍光免疫染色，細胞変性効果

I はじめに

一般的にウイルスは、感受性がある細胞に感染することで増殖が可能である。ヒトに病原性があるウイルス粒子の多くは大きさが約 20～300nm であり、光学顕微鏡で直接観察することができない¹⁾。増殖したウイルスの影響を受けると細胞は形態変化を示すことが多いが、この細胞変性効果（CPE: Cytopathic effect）を観察することにより、ウイルスの存在を間接的に察知できる。しかし、播種した細胞は増殖過程に伴う形態変化や、時間経過に伴う栄養の枯渇などの影響で形態変化を示すため、細胞の形態変化がウイルスによる変化かどうかを区別できるようになるまでは相当な経験が必要である。

培養系のウイルス量が増加するほど CPE の観察

が容易になるウイルスがある一方、ウイルス量が増加しても CPE がわかりにくいウイルスもある。例えば、パラインフルエンザウイルスは LLC-MK2 細胞で増殖が可能であるが、複数の細胞が融合した合胞体を形成する 2 型、4 型とは違い、1 型、3 型は CPE がわかりにくいいため光学顕微鏡での観察ではウイルスの存在を知ることが難しい²⁾。また、ヒトの正常気管支上皮細胞を気液界面培養によって分化させ、ヒトコロナウイルスを培養する場合、ウイルスが増殖しても細胞は CPE を示さない³⁾。このような場合は CPE の観察に代わるスクリーニング手段（HA 価の測定、血球吸着試験など）でウイルスの存在を察知するか、リアルタイム PCR 法などでウイルス量の増加を繰り返し検査する必要がある。

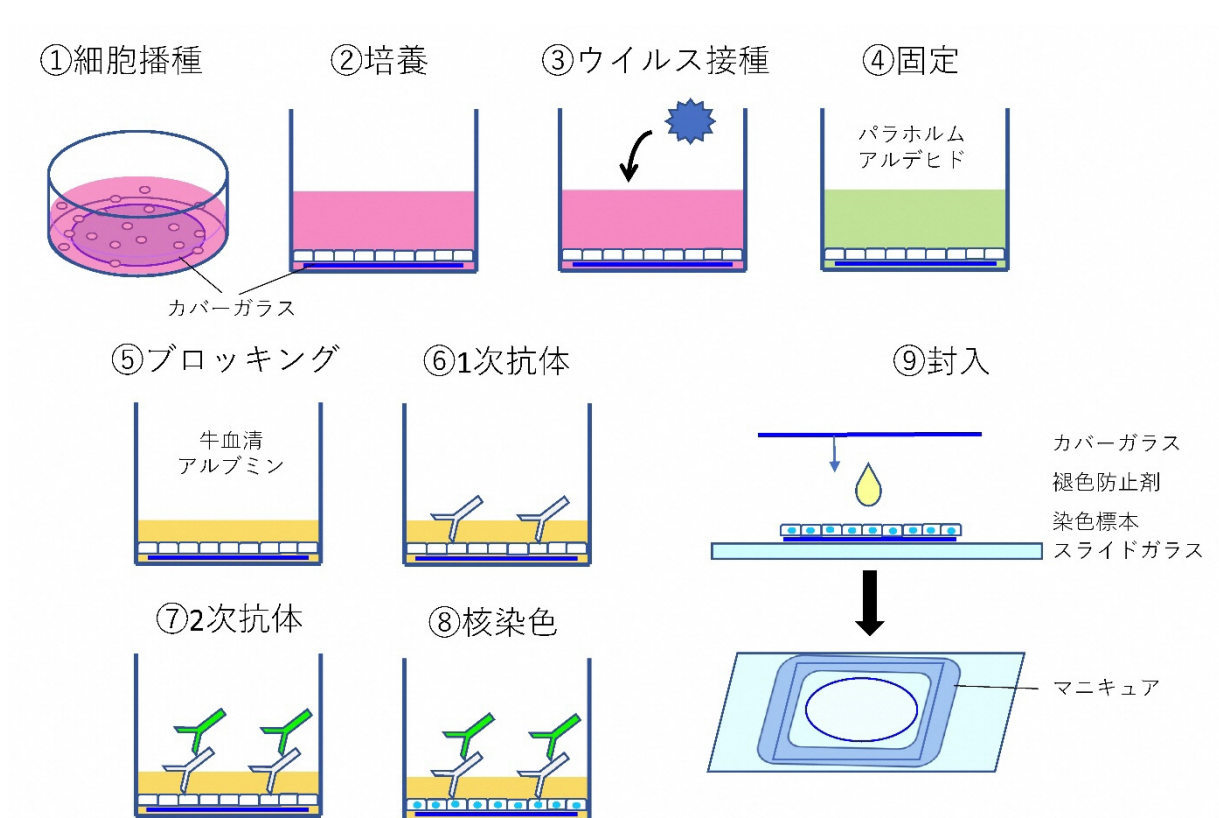


図1 株化細胞を用いてウイルス培養を実施する場合の蛍光免疫染色標本の作製手順概要

本研究では、培養細胞に感染したウイルスを蛍光免疫染色法により可視化することを試み、複数のウイルスを標的として染色を行った。

II 材料と方法

株化細胞を用いてウイルス培養を実施した場合の蛍光免疫染色標本の作製手順の概要を図1に示す。初めに滅菌した丸カバーガラス（#C015001，松波硝子工業，大阪府）を24穴培養プレート（#92424，Trasadingen, Switzerland）の底部に設置し，ウイルスに感受性がある細胞をその上に播種して培養した。細胞とウイルスの組み合わせ，および用いた染色条件は表に示す。アデノウイルス3型，インフルエンザウイルスA型H1N1，ヒトコロナウイルス229Eの3種は株化細胞を用い，細胞のコンフルエンスがHEF細胞とMDCK細胞は100%，HeLa-ACE2-TMPRSS2細胞は70%程度に達したら，ウイルスを含む試料を接種した。ウイルスを接種後それぞれ72

時間，24時間，17時間培養した。細胞はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（#T900，タカラバイオ，滋賀県）で洗浄後，PBSに溶解した4%パラホルムアルデヒド（#160-16061，富士フィルム和光，大阪府）を用いて室温で40分固定し，PBSで3回洗浄した。細胞膜に穴をあけて抗体が浸透しやすくするために，0.5%Triton X-100（#203-03215，富士フィルム和光）を含むPBSを用い，室温で13分インキュベートした。非特異的な抗体の付着を抑えるため，5%の牛血清アルブミン（#F9130，三光純薬，東京都，現積水メディカル）及び0.1%のTween-20（#40350-32，関東化学，東京都）を含むPBS（BSA-PBST）を用い，室温で1時間インキュベートしブロッキングを行った。1次抗体は，Anti-Adenovirus Antibody（#MAB8051，Merck，Darmstadt，Germany），Anti-Influenza A Antibody, nucleoprotein（#MAB8251，Merck），Anti-human coronavirus 229E ATCC VR740 strain（国立感染症研究所，白戸憲也先生より分与）⁴⁾を用いた。1次

表 蛍光免疫染色標本作成時の使用素材と染色条件

ウイルス種	アデノウイルス 3 型	インフルエンザ ウイルス A 型 H1N1	ヒトコロナウイルス 229E	ヒトコロナウイルス OC43
検体番号	2019-0537	2019-0489	2018-0330	2014-0375
培養細胞	HEF (株化細胞)	MDCK (株化細胞)	HeLa-ACE2- TMPRSS2 (株化細胞)	ヒト正常気管支上皮 (初代培養細胞)
1 次抗体				
使用抗体	#MAB8051, Merck	#MAB8251, Merck	Anti-HCoV-229E	#MAB9012, Merck
希釈倍数	500 倍	500 倍	500 倍	500 倍
染色条件	室温, 1.5 時間	室温, 1.5 時間	4°C, 一晚	4°C, 一晚
2 次抗体				
使用抗体	#A90-216F, Bethyl	#A90-216F, Bethyl	#F0205, Agilent	#A90-216F, Bethyl
希釈倍数	200 倍	200 倍	40 倍	500 倍
染色条件	室温, 1 時間	室温, 1 時間	室温, 1 時間	室温, 1 時間

抗体は BSA-PBST で希釈し、表の条件に従いインキュベートした。以降の操作から観察までは遮光下で実施した。FITC で標識された 2 次抗体は、Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/FITC (#F0205, Agilent Technologies inc., Santa Clara, CA, USA), Goat anti-Mouse IgG-heavy and light chain cross-adsorbed Antibody FITC Conjugated (#A90-216F, Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA) を BSA-PBST に希釈しインキュベートした。PBST で 2 回洗浄後、4',6-ジエミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) (#043-18804, 富士フイルム和光) を 300nM 含有する PBST でリンスし核の染色を行った。陰性コントロールとして、ウイルスを感染させていない細胞についても同様に染色を実施した。染色した細胞は丸カバーガラスとともにスライドガラスに載せ、フルオロキーパー褪色防止剤 (#12593-64, ナカライテスク, 京都府) を滴下し、20 mm 角のカバーガラスで覆ったのち、その 4 辺をマニキュアで被覆して不動化した。

ヒトの正常気管支上皮細胞を気液界面培養によって分化させる場合、トランズウェル (#3413, コーニング, NY, USA) と呼ばれるカップ状の容器の底部

にある多孔性ポリカーボネート膜上に細胞を培養した。それを用いてヒトコロナウイルス OC43 を 7 日間培養し、パラホルムアルデヒドで固定した。細胞が載っている膜を剃刀または 18G 注射針の先端でくり抜き数分割し、染色と封入を丸カバーガラスの場合と同様に実施した。1 次抗体は Anti-Coronavirus Antibody, OC-43 strain (#MAB9012, Merck), 2 次抗体は Goat anti-Mouse IgG-heavy and light chain cross-adsorbed Antibody FITC Conjugated を使用した。

標本の観察は Axioplan2 (カールツァイス株式会社, 東京都) を用いて実施し、蛍光像と微分干渉像を取得した。それらの画像は AxioVision release 4.8.2 (カールツァイス) を用いて 1 枚の画像に合成した。

III 結果

株化細胞を用いた蛍光免疫染色標本での蛍光像ならびに微分干渉像を図 2 に示す。アデノウイルス 3 型は微分干渉像では細胞や核の膨化、核の泡沫化が観察できた。それらの変化を示した細胞に一致して、ウイルス陽性を示す FITC のシグナルが観察できた。インフルエンザウイルス A 型 H1N1 は微分干渉像では細胞が球状化を示し、シート状の細胞集団

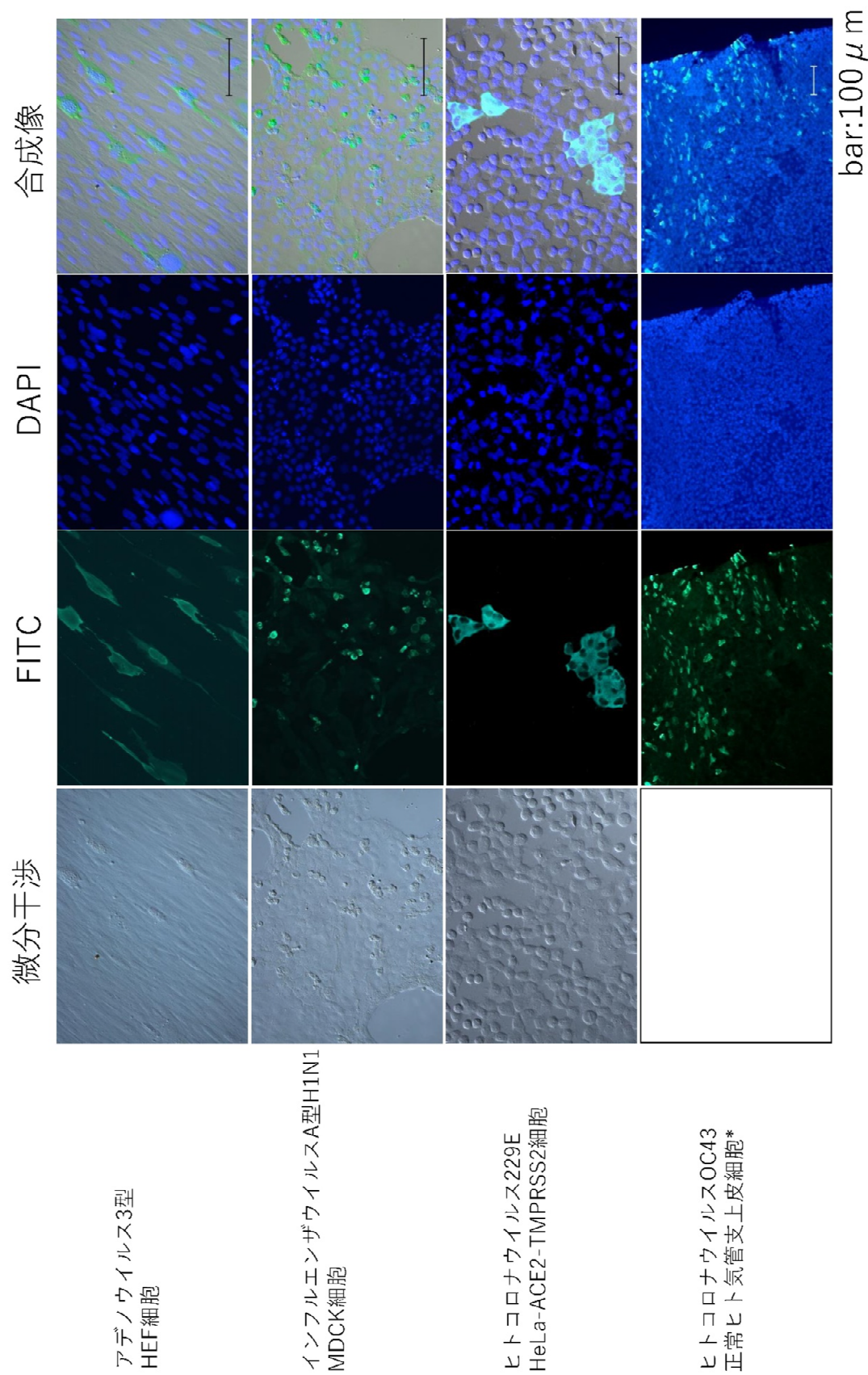


図2 蛍光免疫染色標本の蛍光像、微分干涉像、ならびに合成像
*: 微分干涉像は個々の細胞形態の観察に適さなかったため取得していない。

との結合が弱くなっていると考えられる細胞が観察された。FITC のシグナルはその細胞の一部に一致して強く観察された。ヒトコロナウイルス 229E は、微分干渉像において細胞間の境界が不明瞭であり、合胞体あるいは細胞分裂の途中と考えられる細胞が観察できた。そのうち一部において FITC シグナルが強く観察できた。

正常ヒト気管支上皮細胞の培養系を用いた蛍光免疫染色標本での蛍光像を図 2 に示す。ヒトコロナウイルス OC43 を接種した標本では DAPI が示す細胞核が密集しており、重なりも多くみられた。正常気管支上皮細胞が分化し偽重層扁平上皮細胞の構造を成すという報告に一致していた⁵⁾。FITC のシグナルは密集した細胞のうち散在する一部の細胞において強く観察された。細胞の密集により微分干渉像において個々の細胞を区別することができず、有用な情報が得られなかったため、微分干渉像は掲載していない。

アデノウイルス 3 型とヒトコロナウイルス 229E はバックグラウンドのシグナルが低く、陽性細胞とその周囲の細胞のシグナルのコントラストが明瞭であったのに対し、インフルエンザウイルス A 型とヒトコロナウイルス OC43 はシグナルが強い陽性細胞の他に、周囲の細胞もごく弱いシグナルが検出された。ウイルスを感染させた培養系において、シグナルが中等度の場合はウイルス陽性であると判断できたが、ごく弱いシグナルの場合は陽性かバックグラウンドなのかの判断ができなかった。

IV 考察

本研究では、細胞に感染したウイルス粒子を蛍光色素で標識した抗体で検出し、ウイルスの局在と形態変化を示す細胞の局在との比較を行った。また、CPE を示さないヒトコロナウイルス OC43 の培養系におけるウイルスの局在も示すことができた。ウイルスの局在を可視化することは、培養系におけるウイルスの増殖に関して新たな視点からの情報を得る

ことができ有用であると考えられた。

微分干渉像から得た細胞形態の情報に、蛍光像によるウイルス陽性領域の情報を重ねることにより、形態変化を示す細胞の多くはウイルスが陽性であることが確認でき、その形態変化が CPE と考えられた。しかしながら、インフルエンザウイルス A 型とヒトコロナウイルス 229E では一部の細胞は形態変化を示しているにも関わらず、FITC シグナルは陰性であった。これは分裂過程にある細胞が示す球状化や 2 核化が CPE 様に見えた可能性が考えられた。感染細胞に対し、分裂過程に似た形態変化を起こすウイルスでは、光学顕微鏡での観察のみからウイルスの有無を判断することは難しい場合があると考えられた。

細胞が形態変化を示さないヒトコロナウイルス OC43 の培養系においてもウイルスの局在を示すことができ、培養系の一部の細胞のみが感染していることが分かった。感染している細胞の割合は、感染後の時間経過によっても変化する可能性があり、今後解明すべき課題と考えた。

培養細胞を足場となるカバーガラスやポリカーボネートの膜と一緒に固定して染色することにより、個々の細胞や細胞同士の構造が崩れずに保たれていたと考えられた。CPE の観察は通常は生きた細胞に対して実施するが、パラホルムアルデヒドでの固定による細胞形態への影響は少ないものと考えられた。

免疫染色においては抗体が非特異的に細胞や組織の蛋白質に結合して、バックグラウンドとして検出されてしまうことが問題となる。本研究ではインフルエンザウイルス A 型とヒトコロナウイルス OC43 で見られた弱いシグナルがバックグラウンドであるか弱い陽性反応であるかの断定ができなかった。本研究ではブロッキング剤に BSA を用いたが、今後他のブロッキング剤（スキムミルク、2 次抗体の免疫動物種の正常血清など）⁶⁾による検討が必要と考えられた。

また、画像取得段階の撮影条件や、取得後のコントラスト調整などによっても弱いシグナルが強調さ

れ、バックグラウンドあるいは陽性のように見えることがある。ネガティブコントロールと陽性検体とで同じ露出時間で撮影し、調整条件を統一するなどしてバックグラウンドの検討を行う必要があると考えられた。

特異的な抗体が入手可能な他のウイルス種についても、蛍光免疫染色法によって CPE とウイルス局在の関係を比較することで、CPE 観察の一助となる情報を得ることが可能と考える。また、ウイルス量の定量を行って接種条件を統一し、接種から経時的に観察を行えば、ウイルスが培養系内でどのように広がって行くのかという情報が得られるかもしれない。

結論として、蛍光免疫染色法を用いてウイルスの局在を可視化することは、形態変化を示す細胞がウイルスによる CPE を示しているかどうかを理解する上で有用であると考えられた。

V 文献

- 1) 高田賢蔵. 医科ウイルス学, 改訂第 3 版. 南江堂, 東京; 2009. pp. 23-32.
- 2) Sato K, Watanabe O, Ohmiya S et al. Efficient isolation of human parainfluenza viruses 1 and 3 using MNT-1, a human malignant melanoma cell line system that exhibits an apparent cytopathic effect. *Microbiol Immunol.* 2016;60:801-805.
- 3) Komabayashi K, Matoba Y, Seto J et al. Isolation of human coronaviruses OC43, HKU1, NL63, and 229E in Yamagata, Japan, using primary human airway epithelium cells cultured by employing an air-liquid interface culture. *Jpn J Infect Dis.* (in press)
- 4) Shirato K, Kawase M, Watanabe O et al. Differences in neutralizing antigenicity between laboratory and clinical isolates of HCoV-229E isolated in Japan in 2004-2008 depend on the S1 region sequence of the spike protein. *J Gen Virol.* 2012;93:1908-1917.
- 5) Jonsdottir HR and Dijkman R. Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. *Virol J.* 2016;13:24.
- 6) 井関祥子, 太田正人. バイオ実験で失敗しない! 免疫染色・イメージングのコツ. 羊土社, 東京; 2007. pp. 82-101.

短 報

喀痰検体のレジオネラ属菌検査結果（2014-2021 年）

三瓶美香，瀬戸順次，田中静佳

Result of testing of *Legionella* species in sputum specimens, 2014-2021

Mika SAMPEI, Junji SETO and Shizuka TANAKA

2014 年から 2021 年に届出されたレジオネラ症患者由来喀痰 81 検体を対象に，レジオネラ属菌の培養と遺伝子検査の結果を比較した．レジオネラ属菌特異的 LAMP 法が 55 検体（67.9%）陽性だったのに対し，培養法は 30 検体（37.0%）の陽性に留まった．培養結果別に LAMP 法 Tt 値を比較したところ，培養陽性群と陰性群の Tt 値に有意差は確認されなかった．このことから，培養陰性群における喀痰中のレジオネラ死菌の存在が培養結果に影響を与えた可能性が示唆された．培養成功率上昇に向け，今後，抗菌薬投与前の喀痰の提供を医療機関に呼びかけるなどの改善が必要と考えられる．

キーワード：レジオネラ症，*Legionella pneumophila*，培養法，LAMP 法，尿中抗原

I はじめに

レジオネラ症はレジオネラ属菌による呼吸器系の感染症で，感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下，感染症法）において全数報告対象の四類感染症に分類されている．当所では，感染症法第 15 条に基づき保健所が実施する積極的疫学調査の一環として，レジオネラ症患者および疑い患者由来検体からのレジオネラ属菌の分離と遺伝子検査を行っている．今回，今後の検査陽性率向上にむけた一助とするため，当所でレジオネラ属菌特異的 LAMP 法を導入した 2014 年 11 月以降の培養法および遺伝子検査の結果を取りまとめた．

II 対象と方法

2014 年 11 月から 2021 年 1 月に届出されたレジオネラ症患者 81 人の初回喀痰検体を対象とした．これら患者の尿中レジオネラ抗原検査結果は，陽性 77 人，陰性 2 人，不明 2 人だった．はじめに，

喀痰を等量のスプタザイム（極東製薬工業㈱）により均質化した．均質化済み喀痰が 1.45mL 以上あった場合，1.25mL を培養法に，残りを遺伝子検査に用いた．均質化済み喀痰が 1.45mL に満たなかった場合，検査開始時点でレジオネラ症として届出されていた症例では培養法（熱処理後酸処理）に，未届出の症例では遺伝子検査に優先的に検体を配分した．

培養法は，均質化済み喀痰 0.5mL を未処理検体，0.5mL を熱処理（50℃，20 分間加熱）検体，0.25mL を熱処理後酸処理（熱処理後に等量のレジオネラ検体用前処理液（極東製薬工業㈱）と混和し，4 分間室温静置）検体とし，それぞれ WYOα 培地（栄研化学）に接種，37℃で最長 7 日間培養した．斜光法¹⁾でレジオネラ様コロニーが観察された場合，PCR 法によるレジオネラ属菌の同定およびレジオネラ免疫血清（デンカ㈱）による血清群の決定を行った²⁾．

遺伝子検査では，均質化済み喀痰が 200μL 以上

の場合、微量高速遠心機で 12,000 rpm、10 分間遠心後、残りが 200μL となるように上清を除いた。200μL に満たなかった場合は、滅菌 PBS を加えて 200μL とした。DNA 抽出には QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用い、工程はキット説明書に従った。ただし、最終工程のカラム溶出は半量の緩衝液 100μL とした。抽出した DNA を鋳型として、Loopamp レジオネラ検出試薬キット C(栄研化学)を用いた LAMP 法（以下、LAMP 法）によりレジオネラ属菌遺伝子を検出した。LAMP 法陽性となった場合、Lmip プライマーを用いた nested-PCR 法（以下、PCR 法）により *Legionella pneumophila* 特異的遺伝子を検出した²⁾。

LAMP 法 Tt 値（濁度 0.1 に達するまでの時間）と PCR 法結果、または培養法結果の関係を検討するため、ウィルコクソンの順位和検定を実施した。解析には R version 3.4.3 を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

Ⅲ 結果

1 培養法結果

81 検体中 30 検体（37.0%）から *L. pneumophila* が分離された。血清群（以下、SG）は、SG1 が 28 検体（93.3%）、SG1 および SG3（重複感染例）が 1 検体（3.3%）、SG10 が 1 検体（3.3%）であった。なお、SG10 は、リボテストレジオネラ（旭化成ファーマ[®]）を用いた尿中レジオネラ抗原検査陽性により届け出された患者検体から分離された。

2 LAMP 法と PCR 法の比較

LAMP 法は 81 検体中 55 検体（67.9%）が陽性であった。当該 55 検体の PCR 法は、陽性が 48 検体、陰性が 7 検体であった。PCR 法の結果別に LAMP 法の Tt 値を比較した箱ひげ図の結果を図 1 に示す。Tt 値の中央値は陽性群が 25.1、陰性群が 35.6 であり、両群の Tt 値に統計学的な有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）（図 1）。

3 LAMP 法と培養法の比較

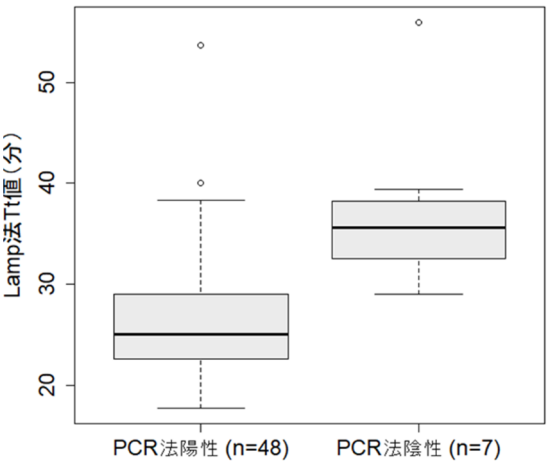


図 1 LAMP 法 Tt 値 と PCR 法の比較結果

表1 レジオネラLAMP法と培養法の比較結果

		レジオネラ培養		計
		陽性	陰性	
LAMP法	陽性	26	29	55
	陰性	4	22	26
計		30	51	81

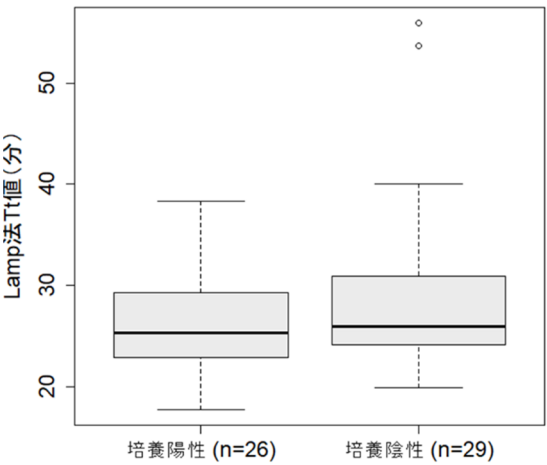


図 2 LAMP 法 Tt 値 と培養法の比較結果

LAMP 法と培養法の比較結果を表 1 に示す。培養陽性となった 30 検体中 26 検体（86.7%）は LAMP 法も陽性であった。一方、残る 4 検体（13.3%）は、LAMP 法陰性ながら培養法で陽性となった。また、81 検体中 22 検体（27.2%）は、LAMP 法、培養法ともに陰性となった。

LAMP 法陽性 55 検体について培養法の結果別に Tt 値を比較したところ、培養陽性群と陰性群の

Tt 値に有意差は認められなかった ($P = 0.26$) (図 2)。

Ⅳ 考察

本研究では、喀痰からのレジオネラ検出率向上にむけた一助とするため、当所におけるこれまでのレジオネラ属菌検査結果を比較検討した。検出率は培養法が 37.0%, LAMP 法が 67.9%であり、煩雑で技術を要する培養法³⁾の成功率が低い結果であった。積極的疫学調査に基づくレジオネラ検査の主目的は菌株を確保して感染源調査につなげることであるため、今後、培養成功率の向上を目指していく必要がある。

培養成功率を高めるためには、喀痰中にレジオネラ生菌がいる状況で検査をおこなうことが必要と考えられる。LAMP 法陽性検体の培養結果別比較では、2 群の Tt 値に有意差は確認されなかった (図 2)。したがって、培養陰性群では喀痰中に菌が存在しなかったというよりも、死菌の存在により培養に失敗した可能性が示唆される。今後、抗菌薬投与前の喀痰の採取を医療機関に呼びかける、検体採取から培養開始までの時間を可能な限り短くするなどの改善が必要と考えられた。

81 検体中 4 検体は、LAMP 法陰性ながら培養法で陽性となった (表 1)。LAMP 法は感度の高い遺伝子検査法ではあるものの⁴⁾、検出感度を高めるという意味においては、異なる検査法を組み合わせることが重要であることが改めて認識された。

81 検体中 22 検体は LAMP 法、培養法ともに陰性であった (表 1)。培養に適している膿性痰はレジオネラ患者の約 50%からしか採取できないこと³⁾、実際に当所に搬入された喀痰には少量かつ水様性のものが少なくなかったことを踏まえると、レジオネラ症に関しては、常時良質な喀痰を確保できるわけではないという認識が必要かもしれない。

PCR 法の結果別に LAMP 法 Tt 値を比較したところ、PCR 法陰性群で有意に Tt 値が高い、すな

わちレジオネラ遺伝子量が少ない結果となった

(図 1)。本研究では LAMP 法陰性検体について PCR 法を実施していないという限界があるものの、今回の結果は、PCR 法に比べて LAMP 法が高感度であることを示唆している。したがって、スクリーニングに LAMP 法を用いた今回の遺伝子検査工程については現状のままでよいものと考えられた。

培養に成功した 30 検体中 29 検体からは *L. pneumophila* SG1 が分離された。一方、残る 1 検体は *L. pneumophila* SG1-15 と一部のレジオネラ属菌の検出が可能な尿中レジオネラ抗原検査キット陽性を契機に、当所で SG10 が分離された。当該キットについては、本県の一部医療機関においても導入済みであることを確認している。レジオネラ症の原因菌は *L. pneumophila* SG1 が大半を占めるとされているが⁵⁾、今後、SG1 以外によるレジオネラ症患者がどの程度存在するのかについて注視していく必要がある。

結論として、われわれが実施した喀痰検体のレジオネラ属菌検査では、遺伝子検査に比べて培養の陽性率が低いという課題が浮き彫りとなった。今後、医療機関の協力を得ながら抗菌薬投与前の良質な喀痰の入手を目指し、迅速に培養を開始するなどの改善により、感染源調査に必要なレジオネラ属菌の培養成功率を高めていく必要がある。

Ⅴ 文献

- 1) 森本洋. 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 日本環境感染学会誌. 2010;25:8-14.
- 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 (令和 2 年 9 月 1 日改訂).
- 3) Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. Lancet. 2016;387:376-385.
- 4) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic

Acids Res. 2000;28:E63.

5) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, et al.:
Legionella pneumophila and other *Legionella* species
isolated from Legionellosis patients in Japan between
2008 and 2016. Appl Environ Microbiol. 2018;84:
e00721-18.