

---

## 報 文

---

# ビデオカメラによるイヌワシの繁殖記録から繁殖不成功の原因を探る

前田 琢

岩手県内に営巣するイヌワシ 3 つがい (A、B、C) の巣にビデオカメラを設置し、繁殖期を通じて撮影を行なった。いずれのつがいも繁殖に成功しなかったが、映像記録をもとに造巣、抱卵、抱雛などの行動を解析し、失敗の原因について考察した。つがい A は樹上巣であったため、巣への大量かつ長期の積雪が障害となり、造巣期に繁殖中止となった。つがい B は抱卵に至ったが、積雪による再造巣や昨年生まれの幼鳥の存在が産卵の遅れや卵数の減少 (1 卵のみ) に影響したとみられる。また、雄の抱卵協力が著しく少なく (3.6 日に 1 回、平均 16 分) 負担の増した雌は抱卵後 43 日で放棄に至った。つがい C では 1 羽の雛が孵化したが、雄の餌供給の少なさや抱雛頻度の低さ (3.2 日に 1 回、平均 37 分) が雌の離巣傾向を進行させ、2 週齢で雛の死亡を招く結果となった。つがい B、C の失敗の背景には、雄が十分に餌を確保できなかった状況が推察される。

## I はじめに

イヌワシ (*Aquila chrysaetos japonica*) の繁殖成功率は、1990 年以降全国的に低下傾向が認められている<sup>1)</sup>。繁殖つがい数の多い岩手県においても、成功率は 10~24% (2002~2005 年) と低い状態が続いており、将来的に個体群を維持できるかどうか関心が集まっている。繁殖活動の中止 (失敗) は、造巣期から育雛期までのいろいろな段階で見られるが、その原因は営巣地の断片的な観察や繁殖中止後の巣内調査のみでは、特定がしばしば困難となる。原因解明のためには繁殖行動の連続的な経過を明らかにすることが重要であり、ビデオ機器を用いた繁殖モニタリングが効果的である。

本研究では岩手県内に営巣するイヌワシ 3 つがいの巣にビデオカメラを設置し、繁殖期の全期間にわたって撮影を行なった。撮影したつがいはいずれも繁殖成功に至らなかったが、映像記録をもとに造巣、抱卵、抱雛などの行動を定量的に解析し、繁殖失敗となった原因について考察を行なった。

## II 調査方法

調査は岩手県北上高地の南部、北部、東部にそれぞれ繁殖地を持つイヌワシ 3 つがい (各々 A、B、C とする) を対象に行なった。つがい A は樹上 (アカマツ) B と C は岩棚上に近年良く用いる巣を有している。繁殖開始前、巣全体が画面に入るように巣の付近に小型 CCD カメラを設置し、映像はケーブルで山麓に送りタイムラプスビデオレコーダー等で録画した。録画は 2004 年 11 月 (A のみ 12 月) より開始し、原則として毎日、日の出前から日没後まで行なったが、機器の不具合や着雪などで映像が記録できなかった時間も若干生じた。

録画映像から、個体の巣への出入り、巣材搬入、抱卵、抱雛、給餌等の開始・終了時刻を 1 秒単位で記録し、各行動の回数、頻度、継続時間を集計した。また、巣上に積雪があった場合は、積雪深を映像から目測した。

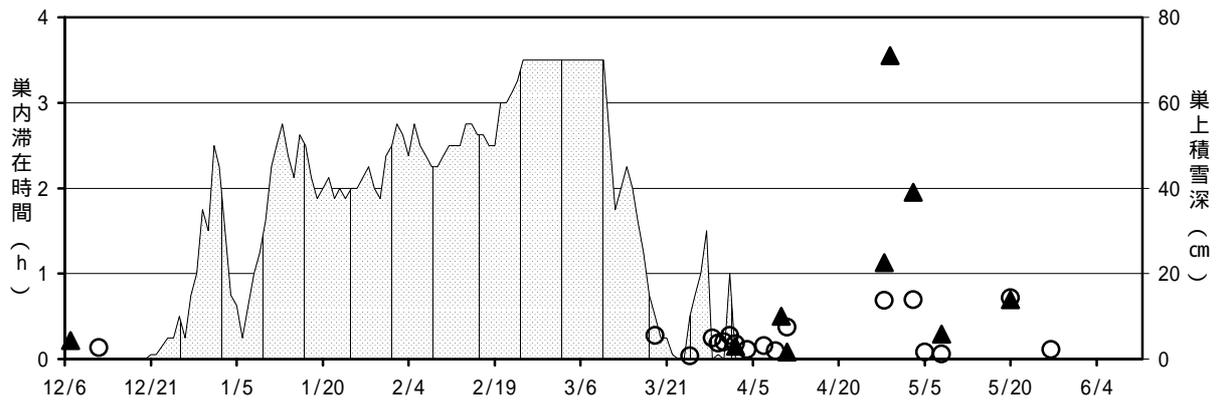


図1. つがいAの巣内滞在時間(日合計: ○:雌、△:雄) および巣上の積雪深の変化(線グラフ).

### III 結果

#### 1 つがいAの繁殖経過

12月6日の撮影開始後、7日に雌、12日に雄が巣へ飛来し、巣材の搬入も認められた(図1)。しかし、12月21日より巣上に雪が積り始め、深さ約50cmにも達したため巣への出入りは途絶えた。積雪は1月5日に約5cmにまで減少したものの、再び増加して常時40cm以上の状態となり、雪解けまで約3か月間、個体の利用は見られなかった。

3月19日、雪が巣中央部に約10cm残る程度に減少すると巣材搬入が再開された。雄個体のみが、枯枝、青い葉のついた松の枝、茅葉などを多い日には1日に3回運び入れた。しかし、雌も含めて産座を作成するような行動はほとんど見られず、巣材は雑然と積まれたままであった。4月13日から27日までの約2週間は雄雌ともに出入りが見られなかったが、その後また雄による断続的な巣材搬入が行なわれ、5月下旬まで続いた。また、雌は4月下旬から

5月上旬にかけて、巣に1時間以上滞在する日が見られ、4月28日の夜から翌朝にかけて巣上で就埒したほか、5月3日には巣上での日光浴が観察された。しかし、巣材を動かすなど巣を補修する行動は全く見られず、産卵には至らなかった。

#### 2 つがいBの繁殖経過

12月9日より造巣行動が開始され、雌雄による巣材搬入が頻繁に見られるようになった。前年巣立った幼鳥1羽がまだ繁殖地に残っており、しばしば親の後を追って巣に入り、餌をねだったり巣材をいじる行動が見られた。1月19日には大量の積雪に巣が埋まったが、積雪上に新たな巣材を積み上げて巣は作り直された(1月30日)。雌は2月9日より巣に数時間座る行動が断続的に現れた(図2)。この擬抱卵行動は1回平均1時間3分、1日の合計では最長6時間42分に及んだ(2月21日)。しかし、第1卵の産卵は2月26日と遅れ、第2卵は見られな

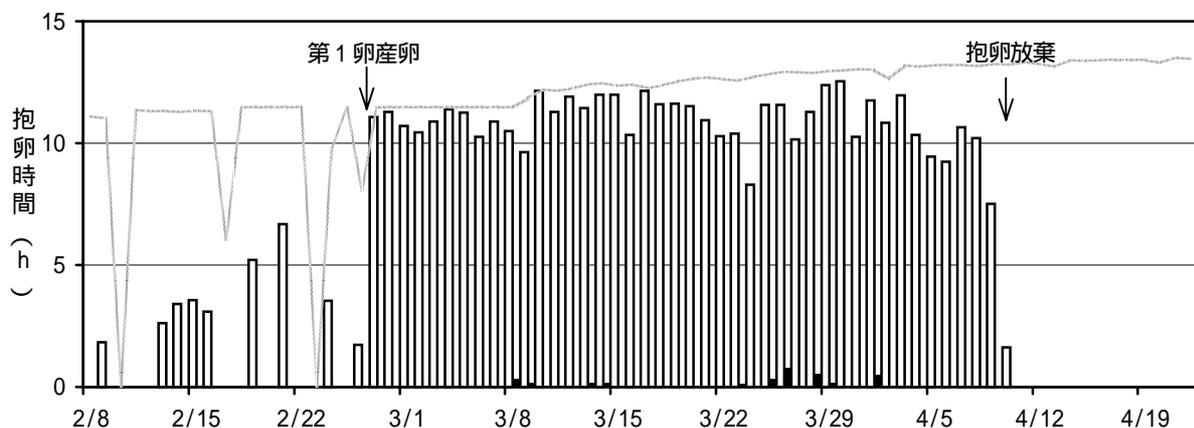


図2. つがいBの抱卵時間(日合計)の推移。白棒は雌、黒棒は雄、線は総撮影時間を示す。

った。幼鳥の巣への出入りは産卵の4日前(2月22日)を最後に見られなくなり、3月6日以降は営巣地付近での出現も途絶えた(目視観察による)。

抱卵の分担は、夜間については100%雌が行ない、日中も99.3%を雌が担った。雄の抱卵は平均3.6日に1回と少なく、1回の抱卵時間も平均16分(最長31分)と短かった。さらに、雄は8~9日間抱卵に来ないことが3回あり、その度に雌は卵を残して巣を空ける時間を次第に増加させた。4月1日(産卵後34日)を最後に雄の抱卵は見られなくなり、4月9日には雌の合計抱卵時間は7時間32分にまで低下した。翌日の朝以降、雌は抱卵を放棄した(産卵後43日)。その後も巣への出入りや巣材搬入行動はしばしば見られたが、雌雄とも卵には全く関心を示さなくなった。

### 3 つがいの繁殖経過

造巣活動は11月下旬より開始され、雌雄ともに巣材の搬入を行なった。巣全体に5cm程度の積雪ができることはあったが、雪の影響は比較的少なかった。雌は1月24日から1日に34分~2時間27分巣に座る行動を見せ、1月27日に第1卵、1月31日に第2卵を産んだ(図3)。夜間の抱卵は雌のみが行ない、日中の抱卵も91.3%を雌が受け持った。しかし、雄も毎日数回抱卵を交代し、1回の抱卵時間は平均53分(最長3時間13分)であった。雄は2月5日頃から、けがのためか右足が不自由となり、巣上では右足に体重をかけられず、ほとんど左足の

みを頼りに歩行していたが、抱卵には支障がないようであった。右足の不具合は3月に入るとかなり回復し、3月6日には普通に歩行できる状態に戻った。

抱卵中の1卵は2月22日に破損したが(原因不明)もう1卵は3月11日に孵化した(第1卵産卵後43日)。孵化後、3月18日までに3回の餌の搬入があり(ノウサギ下半身2回、不明1回)、雛への給餌や雌個体の食料として消費された。雛の毎日の食餌率(総観察時間に対する採食時間の割合)<sup>2)</sup>は0.045~0.077(平均0.054)で推移し、3月12~22日の累積食餌率は0.059であった。しかし、餌量はすぐに不足をきたしたとみられ、雌は可食部のほとんどなくなった残渣をむしり取るような採食が続く状態となった。空腹のためか雌は次第に巣を空ける時間が増加し、3月22日(孵化後11日)以降は合計抱雛時間が大きく減少し、ほぼ6時間を下回るようになった。一方、雄の抱雛頻度や時間も抱卵時より低く(3.2日に1回、平均37分、最長1時間52分)3月18日を最後に雄の抱雛は見られなくなった。

活動性が鈍り衰弱しているとみられた雛は、3月25日(孵化後14日)から26日朝までの間に死亡した。25日は1日で20mmの降水があり、平均気温も前日までより3~5度低くなったことから(気象庁気象統計情報より)寒さによる影響が強かったと考えられる。雌個体は死亡後も半日間雛を抱いていたが、やがて死体をくわえて巣外へと持ち去った。

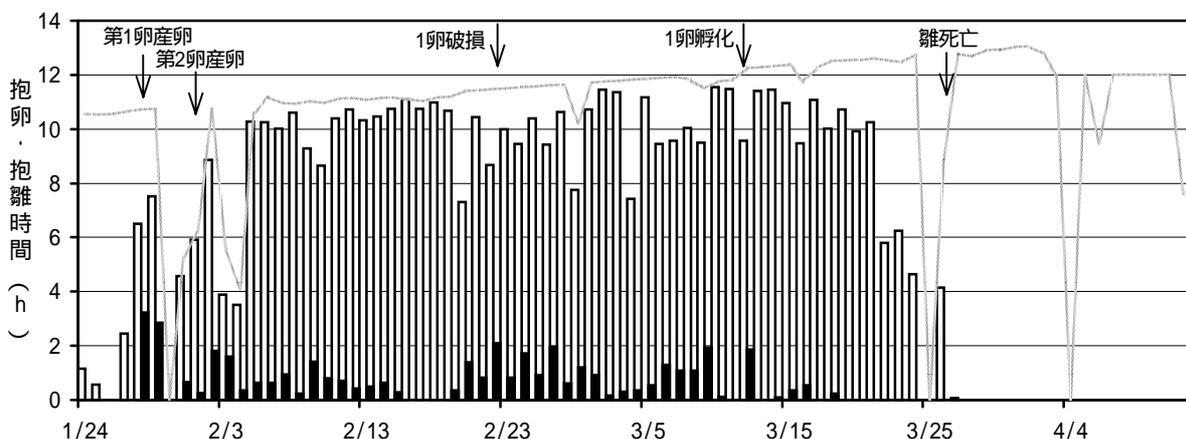


図3. つがいの抱卵および抱雛時間(日合計)の推移。白棒は雌、黒棒は雄、線は総撮影時間を示す。

雌雄の巣への出入りは雛の死亡後も続き、巣材をいじる行動などが観察された。

#### IV 考察

十分な底のない岩棚や樹上に営巣するつがいが多い北上高地のイヌワシは、積雪によって繁殖が阻害されることが少なくない。つがいAは樹上巣であったため、例年になく大量の降雪の影響をまともに受ける結果となった。一時的な積雪であれば、つがいBのように新たに巣材を積むことで巣を復活させることも可能であるが、40cmを越す積雪が長期間続いたため巣への出入りも困難になり、繁殖活動の大幅な遅れをもたらした。雄は雪解け後すぐに造巣を再開したことから、繁殖の機会を待ち続けていたとみられるが、通常1月下旬～2月上旬に産卵する雌にとっては、3月下旬の雪解けはあまりに遅過ぎた。

雪による障害を克服して繁殖活動を継続させたつがいBでも、1月下旬の巣への積雪は産卵を遅らせる原因となり、卵数の減少に影響した可能性が考えられる。また、2月下旬まで昨年の幼鳥がつきまっていたことも、産卵遅延に関与したかもしれない。つがいBにおける雄の抱卵協力は、つがいCや北上高地における過去の事例<sup>3)</sup>に比べて著しく少なかった。雄の抱卵交代が全くない数日間、雌の離巢傾向が徐々に増加していたことは、雄による餌供給もその間途絶え、飢えにより雌自ら採餌に出る欲求が高まったものと推測される。福井県においても、つがいの捕食頻度が低い場合に抱卵時間が漸減し放棄に至る事例が報告されており、餌不足の影響が示唆されている<sup>2)</sup>。

つがいCでは1卵破損の不運はあったものの、雄の抱卵交代頻度は高く、育雛期にまで進むことができた。福井県での調査から、累積食餌率が0.05に満たないと雛が巣立ちまで生存できないという傾向が示されているが<sup>2)</sup>、つがいCでは0.059あり、採食頻度の点では不足していたようすは見られなかった。また、3回にわたって搬入された餌の量をおよそ2～2.5kgと見積ると、1～2週齢の雛の食餌量(50～100g/日)<sup>4)</sup>には見かけ上不足はない。しかし、雌親が消費する分も考慮すると十分な量とは言い難い。

実際、搬入された餌はすぐになくなり、雌はひからびた残渣から可食部をちぎり取るのに長い時間を費やしていた。餌の搬入頻度(0.21回/日)も他事例(0.74～1.19回/日)に比較して著しく低い傾向にある<sup>5)</sup>。これらのことから、餌供給の少なさが雌の離巢傾向を進行させ、栄養不良と寒さが雛の衰弱死を招いたものと推察される。

つがいCの近年の繁殖成功率は75%(1993～2004年)と著しく高く、十分な餌が確保できる環境にあるつがいと考えられていた。今回の餌供給不足の原因は明確でないが、雄の片足が不自由であったことが、ハンティング効率を低下させた可能性も考えられる。

#### 謝辞

本研究を行なうにあたり、環境省猛禽類保護センター、猛禽類調査会、早池峰クマタカ研究会、その他多くの方々に機材設置や管理においてご協力を頂いた。なお本研究は日本学術振興会の平成15年度科学研究費補助金による基盤研究(課題番号15380112)の一環として行なわれた。

#### 文献

- 1) 日本イヌワシ研究会：全国イヌワシ生息数・繁殖成功率調査報告。Aquila chrysaetos, 17: 1-9, 2001.
- 2) 福井県自然保護センター編：希少野生生物種の保存事業(イヌワシ保護対策)調査報告書。福井県自然保護センター, pp54, 2001.
- 3) 青山一郎・関山房兵・小原徳応・田村剛・坂口齊：北上高地におけるニホンイヌワシの繁殖行動。Aquila chrysaetos, 8: 14-23, 1988.
- 4) Watson, J.: The Golden Eagle. pp374, T & AD Poyser, 1997.
- 5) 日本自然保護協会編：秋田県田沢湖町駒ヶ岳山麓イヌワシ調査報告書。pp113, 日本自然保護協会, 1994



## 報 文

### カキからのノロウイルス検出状況

保健科学部 齋藤幸一 佐藤直人 高橋朱実  
( 現・中央家畜保健衛生所 )

#### 1. はじめに

ノロウイルス(NV)は小児から成人までの幅広い年齢層に胃腸炎を起こす病原である<sup>1)</sup>。NV感染のうち食品を介する感染は、行政的には食中毒として取り扱われる。NV食中毒では生カキの喫食を原因とする事例も多く、カキのNV汚染が公衆衛生および水産振興の両面から問題となっている。これまでに岩手県で発生したNVによる集団食中毒事例の調査の結果、カキの喫食を原因とする事例では一事例から数種類のNVが検出される場合が多く<sup>2)</sup>、食中毒の原因となったカキは数種類のNVに汚染されていたのではないかと推察された。今回、養殖中のカキを対象としてNV汚染状況調査を実施したのでその概要について報告する。

#### 2. 材料及び方法

Y湾を対象地域とし、2001年10月から2004年3月までの30ヵ月間、月に1~2回、毎回10個のカキを養殖筏から採取し検査対象とした。カキ1個を1検体として、中腸腺を取り出し、マイクロチューブに入れ、凍結後、65のヒートブロック上で蒸留水を加え融解し、爪楊枝を用いて浮遊液を作成した。粗遠心(3,000rpm 30min)を2回実施後、得られた上清を30%シヨ糖液に重層し超遠心(150,000g 150min)を行った。得られた沈殿を300µlの蒸留水で再浮遊し、RNA抽出用試料とした。

RNAの抽出はグアニジン塩化セシウム超遠心法<sup>3)</sup>によった。RNA抽出用試料100µlにグアニジン溶液を300µl加えよく混和後、ポリアロマー製の超遠心チューブに入れた5.7M CsCl溶液(700µl)に重層し、小型超遠心機(BECKMAN TL-100)で70,000rpm 3hr超

遠心を行った。得られた沈殿を蒸留水200µlに再浮遊し、エタノール沈殿を2回実施後、乾固した沈殿を蒸留水30µlで溶解し、抽出RNAとした。抽出したRNAは使用時まで-20.0に保存した。

NVの検出は、RT-seminested PCRよった。増幅領域はORF1で、使用したプライマーは、RT-1st PCRには5側プライマーとしてNV82、SM82<sup>4)</sup>を、3側プライマーとしてSR33<sup>5)</sup>を、2nd PCRにはSRプライマー<sup>5)</sup>を用いた。

DNA産物はPCR Purification kit(QIAGEN)を用いて精製後、BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit(AB)によりサイクルシーケンス反応を行った。反応産物はスピンカラム(CENTRI SEP: AB)により精製後、3100 Genetic Analyzer(ABI PRISM)により塩基配列を決定し、増幅領域からプライマー部分を除いた81bpの塩基配列についてGENETYX-WIN Ver.5を用い遺伝子解析を行った。

#### 2. 結果

##### 2.1 カキからのNV検出状況

表にNVの検出状況を示した。42回のうち18回の調査においてNVが検出された。検出時期はヒトでの流行シーズンである冬季と春季で、2001年~2002年の流行シーズン(01/02シーズン)は2002年1月から5月、02/03シーズンは2002年12月から2003年3月、03/04シーズンは2004年1月から調査を終了した2004年3月であった。NVが検出された検体数は55検体で、NVが検出された大部分の検体では1検体から検出されるNVは1種類であった。3検体からは1検体から2種類のNVが検出された。1回の調査で何種類のNVが検出されたかをみると、NVが検

出された 18 回の調査の内訳は、1 種類が 7 回、2 種類が 6 回、3 種類が 3 回、4 種類が 2 回であった。

## 2.2 検出された NV の遺伝子解析結果

図に 3 シーズンの調査において検出された NV により作成した系統樹を示した。検出され NV は遺伝子的に多様で、3 シーズンとも 1 シーズンに 5 種類の NV が検出された。検出された NV の殆どは 1 シーズンだけの検出で、シーズン毎に検出された NV の種類が異なっていた。2 つのシーズンにおいて検出された NV は 1 種類で、系統樹では最も下に位置するブランチの株で、01/02 シーズンに 8 株、2 年後の 03/04 シーズンに 2 株検出された。また、各シーズンとも優勢に検出された株（優勢株）がみられ、01/02 シーズンは 2 種類の優勢株が、02/03 シーズンと 03/04 シーズンは 1 種類の優勢株が検出された。

## 3. 考察及びまとめ

カキが NV に汚染される経路は、感染者から排泄された NV が下水処理施設や河川を介して海を汚染し、その海域で養殖されているカキが食餌としてプランクトンを摂取する際に NV も体内に取り込みカキが NV に汚染されるとされている<sup>6)</sup>。岩手県内で発生したカキの喫食が原因と推定された集団食中毒事例の検査の結果からカキは何種類かの NV に同時に汚染されると推察された。我々は小児の散発性胃腸炎を対象にした調査により、NV 胃腸炎は毎年冬季に流行し、同一シーズンに数種類の NV が同時に流行しその内には優勢株が認められる等の疫学的特徴を有することを確認している<sup>2)</sup>。これらの疫学的特徴からも、カキの養殖海域は多数の感染者に由来する数種類の NV により汚染され、カキは何種類かの NV に同時に汚染されると推測される。今回の養殖中のカキを対象とした NV 汚染状況調査では、NV が検出された大部分のカキにおいては検出された NV は 1 種類で、数種類の NV が検出されたカキは 2 種類の NV が検出された 3 個のみであった。このように数種類の NV が検出されたカキが少なかった原因としては、PCR 法による NV の検出においては、カキが何種類かの NV に同時に汚染されていたとしても増幅反応において選択がかかり、用いたプライマーとの親和性が高い NV

やウイルス量の多い NV が増幅・検出されるため、材料中に何種類かの NV が存在していたとしても検出される NV は 1 種類となることが多いのではないかと考えられた。一方で、調査ごとに NV の検出状況を見ると、NV が検出された 18 回の内 11 回の調査において 2 種類以上の NV が検出されたことは、一回の調査に用いた 10 個のカキは同じ筏から採取したもので、各カキは養殖条件も同じで、NV の汚染状況も同一と考えられ、NV が検出された 11 回の調査において 2 種類以上の NV が検出されたことから、個々のカキから検出された NV は殆どが 1 種類であったが、実際には対象としたカキは何種類かの NV に汚染されていたと推測された。

なお、カキの NV 汚染は短い期間には清浄化できないとされているが、今回の調査においてカキからの NV 検出はヒトでの流行シーズンに一致し、冬と春で、次に再び検出されたのは、次の冬であったこと、さらに、再び検出された NV の種類は前のシーズンの NV とは遺伝的に異なっていたことからカキの NV 汚染は長期には持続しないと考えられた。

## 5. 参考文献

- 1) Green KY, Kapikian KZ and Chanock RM: Human calicivirus. In Field's Virology 4th ed vol 2 New York Lippincott-Raven, 841-874 (2001).
- 2) 齋藤幸一, 佐藤卓, 熊谷学, 小林良雄, 堤玲子, 高橋清実, 佐藤成大: 急性胃腸炎の集団事例及び散発事例から検出された SRSV の遺伝子解析結果. 2000; HACCP 6(7), 54 - 59, (2000)
- 3) 西方敬人: RNA の抽出. バイオ実験イラストレイテッド 2 遺伝子解析の基礎 秀潤社 東京, 153-166(1995).
- 4) 林直志他: 未発表
- 5) Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin QI, Lewis DC and Glass RI: Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. J Clin Microbiol 33(1), 64-71 (1995)
- 6) Metcalf TG: Viruses in shellfish growing waters, Environ Int 7:21-27, (1982)

表 カキからの NV 検出状況

採取年月日			調査番号	NV 検出	
年	月	日		陽性数	種類
2001	10	23	OY0101	0	
	11	13	OY0102	0	
	12	11	OY0103	0	
2002	1	15	OY0201	5	3 種類
		29	OY0202	4	3 種類
	2	14	OY0203	5	4 種類
		26	OY0204	3	2 種類
	3	12	OY0205	3	4 種類
	4	9	OY0206	2	2 種類
	5	14	OY0207	1	1 種類
	6	21	OY0208	0	
	7	9	OY0209	0	
	8	6	OY0210	0	
	9	10	OY0211	0	
	10	8	OY0212	0	
		22	OY0213	0	
	11	12	OY0214	0	
		26	OY0215	0	
		26	OY0217	2	3 種類
	2003	1	22	OY0302	3
2		13	OY0303	5	1 種類
		25	OY0304	3	1 種類
3		11	OY0305	0	
		25	OY0306	2	2 種類
4		22	OY0307	0	
5		27	OY0308	0	
6		26	OY0309	0	
7		27	OY0310	0	
8		26	OY0311	0	
9		25	OY0312	0	
10		17	OY0313	0	
11		11	OY0314	0	
		26	OY0315	0	
		26	OY0316	0	
		26	OY0317	0	
2004		1	5	OY0401	1
		23	OY0402	1	1 種類
	2	3	OY0403	2	1 種類
		24	OY0404	4	2 種類
	3	9	OY0405	7	2 種類
		23	OY0406	2	1 種類

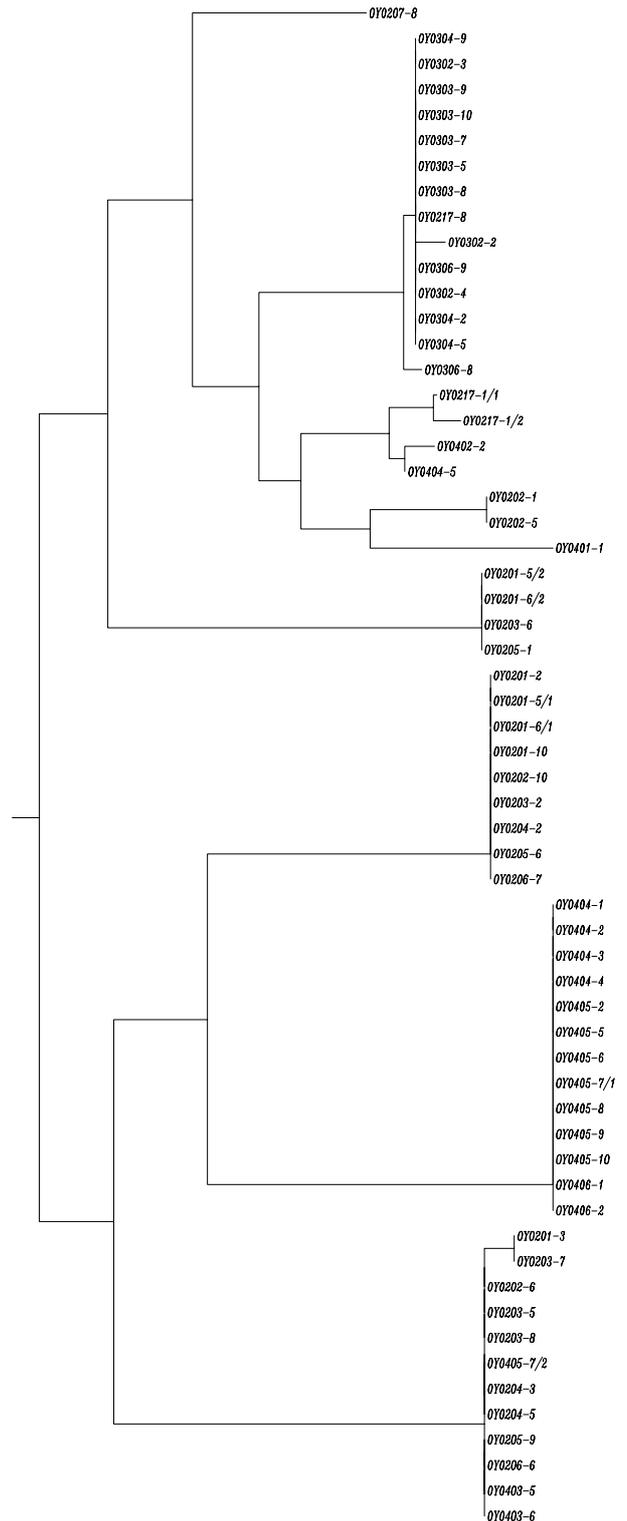


図 検出された NV により作成した系統樹

株名表記は、OY0217-1/2 を例にすると、OY0217 は調査番号 (2002 年の 17 回目の調査) で、1 番のカキから検出された NV であることを示し、/2 は 1 検体から検出された 2 株の一方の株であることを示す。

## 報 文

# リアルタイム - PCR を用いたレジオネラ属菌の迅速検査法の開発

## (第2報)

保健科学部 佐藤 卓 藤井 伸一郎

レジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子領域をターゲットとしたリアルタイム - PCR を用いたレジオネラ属菌の迅速検査法を開発した。本反応系では敏感度 100.0%、特異度 97.0%、定量下限値は 100copy/reaction 程度であった。また、環境試料について本法を試みたところ、直ちに培養法の代替とはならないが、汚染リスクの検索には十分有用であることがわかった。

### 1 はじめに

レジオネラ属菌はヒトに肺炎などを引き起こす病原体であり、浴槽水などの同菌による汚染状況の把握は公衆衛生上重要であるが、通常の培養法では1週間以上の検査期間が必要である。

リアルタイム - PCR法は、短時間で病原体の同定と定量が可能であり、我々は同法を用いたレジオネラ属菌の迅速検査法を開発を試みた。

平成15年度はレジオネラ属菌の5S rRNA 遺伝子領域をターゲットとするプライマー・プローブセットを用いた検出系について検討したが、十分な感度が得られなかったため、今年度は新たに16S rRNA 遺伝子領域をターゲットとするプライマー・プローブセットを開発した。

### 2 方法

#### (1) 対象菌株

レジオネラ属菌：ATCC 標準株及び環境由来株  
計 51 菌株

レジオネラ属以外：ATCC, JCM 等標準株及び臨床分離株 30 菌種 計 33 菌株

#### (2) 菌数定量及び DNA 抽出

レジオネラ属菌 ATCC 標準株（以下標準株）11 株は、1 白金耳量の菌塊を生食で 10 倍段階希釈し、その 100 µl を BCYE 培地に接種、5 日間培養後菌数を計測した。DNA の抽出は、標準株につ

いては、菌数 10<sup>5</sup>CFU/100 µl の菌液、標準菌株以外の細菌は、約 10<sup>5</sup>CFU/100 µl 程度に希釈した菌液、それぞれ 200 µl を QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN 社)で処理し、DNA 抽出液 200 µl を得た。

#### (3) リアルタイム - PCR

プライマー・プローブセットは、レジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子領域を増幅及びハイブリダイゼーションするセットを Primer express Ver 2.0.0(Applied Biosystems 社)を用いて設計した。

LEG16S4F

5'-GCTTTCGTGCCTCAGTGTCA-3'

LEG16S4R

5'-GCGTAGAGATCGGAAGGAACA-3'

LEG16S4P

5'-FAM-CCAGGTAGCCGCCTTCGCCAC-TAMRA-3'

Product size 73bp

リアルタイム - PCR 装置は、ABI PRISM 7900HT(Applied Biosystems 社)を用いた。テンプレートは、レジオネラ属菌は DNA 抽出液を 10<sup>3</sup>CFU/100 µl に希釈したもの、レジオネラ属菌以外は DNA 抽出液原液とし、それぞれ 2.5 µl とした。反応系は 25 µl とし、DNA ポリメラーゼ活性処理後、95 5sec, 60 30sec を 40 サイクル反

応させた。

標準液には *L.pneumophila* ATCC33152 株の DNA 抽出液を、1000copy/  $\mu$ l ~ 1copy/  $\mu$ l に 7 段階希釈した液 2.5  $\mu$ l を用いた。

(4) 環境検体

環境検体は、入浴水、冷却水などの用途水 137 検体について、冷却遠心法によるレジオネラ属菌の培養（新版レジオネラ病防止指針による）と、同遠心濃縮液 200  $\mu$ l を QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN 社)で処理して得た DNA 抽出液 200  $\mu$ l についてリアルタイム - PCR を行った。

3 結果

(1) 特異度及び敏感度

レジオネラ属菌及びレジオネラ属菌以外の細菌についてリアルタイム - PCR を実施した結果を表 1 - 1 及び表 1 - 2 に示す。カットオフ値を 100copy/reaction とした時、レジオネラ属菌は 51 菌株がすべて陽性、レジオネラ属菌以外は 33 菌株のうち 1 菌株が陽性で、特異度は 97.0%、敏感度は 100%であった（表 2）。

表 1 - 2 レジオネラ属菌以外結果

レジオネラ属菌以外		
菌種	由来	結果
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	JCM 6842	0/1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	JCM 2360,臨床由来株	1/2
<i>Bacillus cereus</i>	IFO 3134	0/1
<i>Bacillus subtilis</i>	IFO 3836	0/1
<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC 9340	0/1
<i>Citrobacter freundii</i>	JCM 1657	0/1
<i>Citrobacter spp.</i>	臨床由来株	0/1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	JCM 1233	0/1
<i>Escherichia coli</i>	臨床由来株	0/1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JCM 1662,臨床由来株	0/2
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	0/1
<i>Micrococcus luteus</i>	IFO 12708	0/1
<i>Morganella morganii</i>	臨床由来株	0/1
<i>Presiomonas shigelloides</i>	臨床由来株	0/1
<i>Proteus vulgaris</i>	JCM 1668,臨床由来株	0/2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JCM 5962	0/1
<i>Salmonella Enteritidis</i>	臨床由来株	0/1
<i>Salmonella Infantis</i>	臨床由来株	0/1
<i>Staphylococcus aureus</i>	臨床由来株	0/1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	0/1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 12386	0/1
<i>Streptococcus Group C</i>	ATCC 12388	0/1
<i>Streptococcus Group D</i>	ATCC 27284	0/1
<i>Streptococcus Group F</i>	ATCC 12392	0/1
<i>Streptococcus Group G</i>	ATCC 12394	0/1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	臨床由来株	0/1
<i>Vibrio fluvialis</i>	臨床由来株	0/1
<i>Vibrio mimicus</i>	臨床由来株	0/1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	臨床由来株	0/1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	臨床由来株	0/1
計		1/33 (陽性株数/確認株数)

表 1 - 1 レジオネラ属菌結果

レジオネラ属菌		
菌種	由来	結果
<i>L.pneumophila</i>		
血清群 1	ATCC 33152,33153, 環境由来株	9/9 1/1
血清群 2	ATCC 33154	1/1
血清群 3	ATCC 33155,環境由来株	7/7
血清群 4	ATCC 33156,環境由来株	2/2
血清群 5	ATCC 33216,環境由来株	8/8
血清群 6	ATCC 33215,環境由来株	12/12
血清群不明	環境由来株	4/4
<i>L.bozemae</i>	ATCC 33217	1/1
<i>L.micadadei</i>	ATCC 33218	1/1
<i>L.dumoffii</i>	ATCC 33279	1/1
<i>L.gormanii</i>	ATCC 33297	1/1
<i>L.anisa</i>	環境由来株	1/1
<i>Legionella spp.</i>	環境由来株	2/2
計		51/51 (陽性株数/確認株数)

(2) 定量

検量線を図 1 に示す。2,500copy/reaction から 25copy/reaction までは良好な直線性を示すが、7.5copy/reaction 以下では直線性が得られず、また、ばらつきが大きい。

今回実施した反応系では、定量下限値は 25copy/reaction 程度であることが示唆された。

表 2 リアルタイム - PCR 結果

リアルタイム - PCR	リアルタイム - PCR	
	陽性	陰性
レジオネラ属菌	51	0
レジオネラ属以外の菌	1	32
特異度：96.8%	敏感度：100%	
陽性適中度：98.1%	陰性適中度：100%	

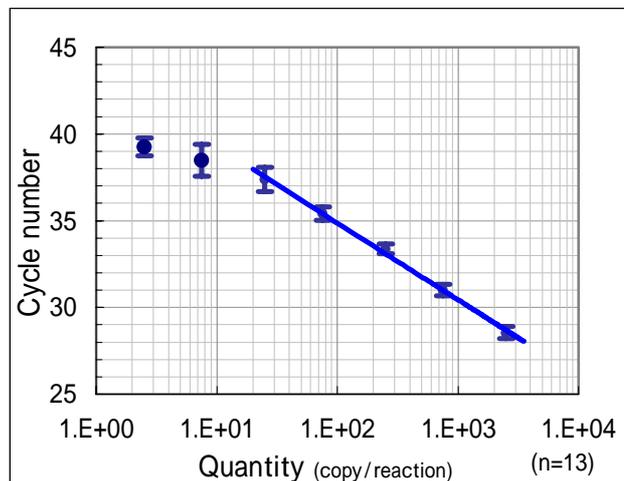


図 1 検量線

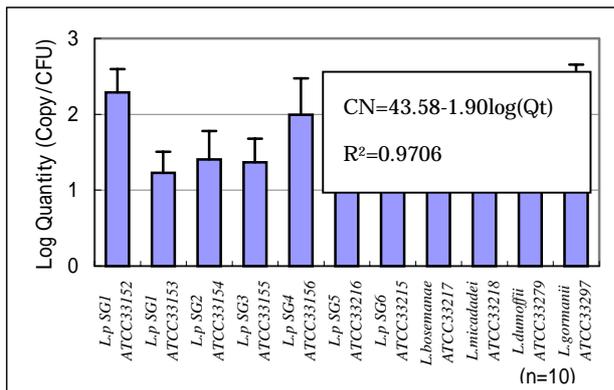


図2 培養による菌数定量値とリアルタイム - PCR 法による定量値

(3) 培養による菌数定量値とリアルタイム - PCR 法による定量値との比較検討

菌量を 1,000CFU/100  $\mu$ l に調製したレジオネラ属菌標準菌株 11 菌株のリアルタイム - PCR 定量値を図 2 に示す。各菌株の 1CFU あたりの copy 数は 11.1 ~ 193.6 であり、菌株間で定量値に有意に差がみられた ( $P < 0.005$  Kruskal Wallis test)。

(4) 環境検体についての検討

環境検体について行った培養によって得られた菌数測定結果と、リアルタイム - PCR 結果を表 3 及び図 3 に示す。カットオフ値は培養法については 10CFU/100ml (0.05CFU/reaction)、リアルタイム - PCR については 100copy/reaction とした。

培養法で陰性であった 114 検体のうち 30 検体は、リアルタイム - PCR で陽性であった。また、リアルタイム - PCR で陰性であった 88 検体のうち 4 検体は培養法では陽性であった。

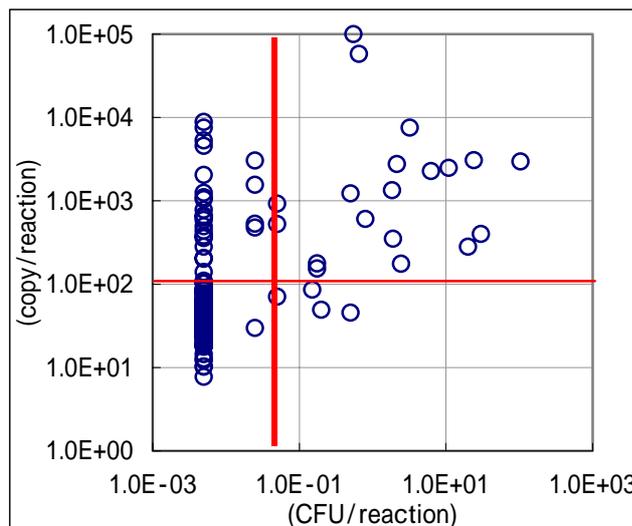


図3 環境検体の培養による菌数測定結果とリアルタイム - PCR 結果

4 考察

今回新たに設計した 16SrRNA 遺伝子領域をターゲットとした反応系では、供試したすべてのレジオネラ属菌を検出することができ、前回検討した反応系よりも感度が向上した。しかし、非レジオネラ属菌で陽性を示した菌株が存在し、今後、反応条件等の検討が必用である。また、本反応系の定量下限値は 25copy/reaction 程度であることが示唆された。しかし、様々な検体から DNA を抽出したテンプレートを用いると、約 36cycle 付近から非特異なシグナルの上昇が見られることから、本反応系の定量下限値は 100copy/reaction 程度であると思われる。

培養法と本法では菌株によって定量値に 100 倍程度の差が認められた。レジオネラ属菌は培養条件が厳しく、温度・湿度などの培養条件や菌株の

CFU/100ml	(CFU/reaction)	copy/reaction				Total
		<100	100-990	1000-9900	>=10000	
<10	(<0.05)	84	19	11	0	114
10-99	(0.05-0.49)	3	4	0	0	7
100-990	(0.5-4.9)	1	3	4	2	10
1000-9900	(5-49)	0	2	3	0	5
>=10000	(>=50)	0	1	0	0	1
Total		88	29	18	2	137

特異度: 73.7%      感度: 82.6%  
陽性適中度: 46.9%      陰性適中度: 95.4%

表 3 環境検体の培養による菌数測定結果とリアルタイム - PCR 結果

状態の差が定量値に大きく影響を及ぼすものと思われる。また、環境検体では、培養陰性でもリアルタイム - PCR 陽性の検体が約 30%程度存在し、レジオネラ属菌の曝露があったものの、何らかの要因で培地での増殖活性を失っている状態にある用途水が比較的多く存在することが示唆された。

レジオネラ属菌のリアルタイム - PCR による定量法は、今回までの研究では、菌株間の定量値のばらつきが大きく、また、培養法を基にした陽性適中度が 46.9%と低いことから、直ちにはレジオネラ症防止指針に基づく基準値に代替できるものではないことがわかった。しかし、培養陰性でもレジオネラ属菌による汚染の履歴を示唆する結果を示す検体があること、陰性適中度が 95.4%と比較的高いこと、結果判明までの時間が培養法と比べて格段に短いことなどから、入浴施設やクーリングタワーの汚染実態や清掃効果を評価する目的にはかなり有用な検査法であるものと思われる。

今後さらに、反応条件の検討、環境検体への応用を加えることにより、レジオネラ属菌による健康被害の未然防止に寄与できるものと思われる。