

レジオネラの遺伝子検査法について

2017年11月

タカラバイオ株式会社

平成27年3月31日に、厚生労働省健康局生活衛生課長通知「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」の改正について（健衛発0331第7号）が発出され、菌の生死に関わらず遺伝子を検出する方法（生菌死菌検出法）と、生菌由来の遺伝子のみを検出する方法（生菌検出法）の2種類が紹介され、遺伝子検査法の活用について述べられています。

レジオネラ検査において、培養法では、培養可能な生菌を検査対象としており、感染性を有する菌による汚染の可能性を判定します。一方、一般的な遺伝子検査では、生菌のみならず死菌であってもDNAを検出するため、すべての陽性結果が感染の危険性を示すわけではありません（生菌死菌検出法）。これに対し、LC EMA-qPCR法は、遺伝子検査の最大の特長である迅速性に加え、生菌を選択的に検出する利点を備えています（生菌検出法）。

平成29年8月には、「第4版レジオネラ症防止指針」（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター）が改訂発行され、迅速検査法のひとつとして「生菌のみを検出する遺伝子検査法」が収載されました。LC EMA-qPCR法は、浴槽水を対象とした場合に、培養法と高い相関性を示す手法として紹介されています。

LC EMA-qPCR法の詳細な結果は、厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」（平成25～27年度分担研究報告書）にあるとおりです。浴槽水518検体を用いて、従来の平板培養法とLC EMA-qPCR法によるレジオネラ属菌検出結果を比較したところ、感度89.3%、特異度78.3%で高い相関性を示す結果が得られており、培養検査前の迅速なスクリーニング検査法としての活用が可能と考えられます。

LC EMA-qPCR法における結果判定は、研究班の研究成果である科学的根拠に基づき、リアルタイムPCRによる定量結果（コピー数）を元の検水100 mL当りの菌数に換算して、所定のカットオフ値で陽性・陰性の判定を行います。後述の「試験1」の結果を参考にし、リアルタイムPCRにより算出されたコピー数を菌数に換算し、検水の濃縮率とリアルタイムPCRへの持込量を考慮して、検水100 mL当りの菌数に換算します。また、「試験2」の結果から、LC EMA-qPCR法の結果についてカットオフ値を1 CFU/100 ml相当として陽性・陰性の判定を行うと、培養法と相関の高い結果が得られると考えられます。

お問い合わせ先

タカラバイオ株式会社

受託開発部（検査キット担当）

TEL 077-567-9262

FAX 077-565-6975

【判定基準についての参考情報】

試験1：LC EMA-qPCR 法におけるレジオネラ 1 CFU 当りの 16S Positive Control コピー数の決定

「厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）」公衆浴場におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合衛生管理手法に関する研究 平成 24 年度分担研究報告書」より引用

アメーバ培養レジオネラ菌の 10 倍希釈系列を用い、それぞれ 2 連で LC EMA-qPCR を行い、検量線を作成した。この回帰式の切片と、16S Positive Control の回帰式の切片の差から、レジオネラ 1 CFU 当りの 16S Positive Control コピー数が以下の通り算出された。

(図 1)

18 時間培養 EMA 処理後のコピー数

(レジオネラ 1 CFU 当り)

$$2^{(39.984-33.276)}=104.5 \div 100 \text{ コピー}$$

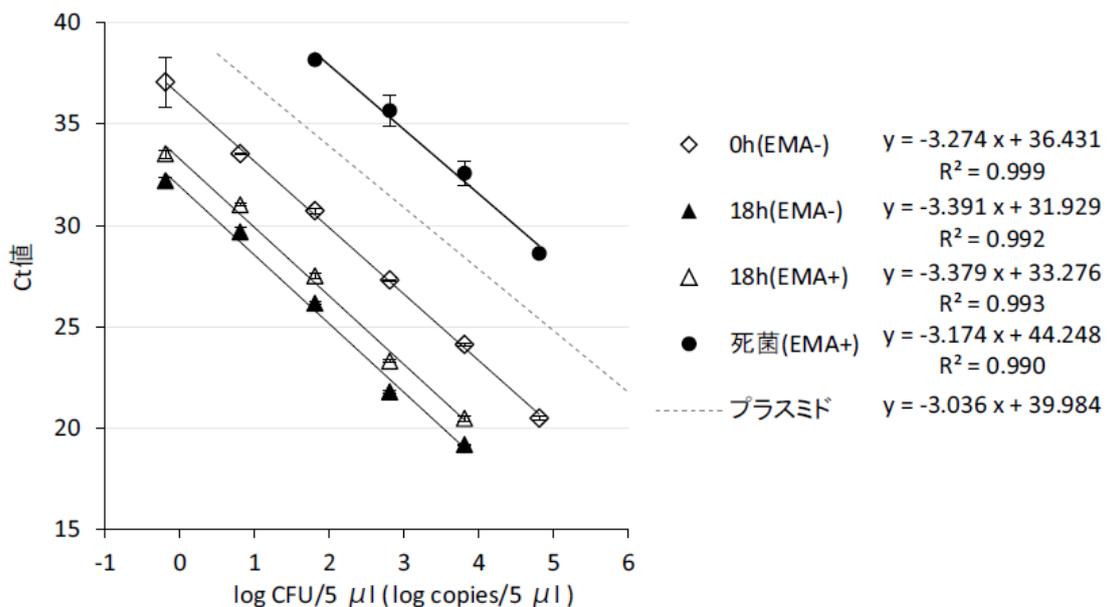


図 1 アメーバ培養レジオネラを用いた LC EMA-qPCR の検量線

◇0h(EMA-): 0h (液体培養前) EMA 処理なし

▲18h(EMA-): 18h (液体培養後) EMA 処理なし

△18h(EMA+): 18h (液体培養後) EMA 処理あり

●死菌(EMA+): 死菌 EMA 処理あり

---プラスミド: 16S Positive Control (log copies/5 μl)

試験 2 : LC EMA-qPCR を用いた浴槽水等における検査結果

「厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）」レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究 平成 25～27 年度分担研究報告書」より引用

全国 6 か所の地方衛生研究所において、平成 26～27 年度に浴用施設から採取された 518 検体の試料について、平板培養法と LC EMA-qPCR 法の比較を行った。平板培養法では 140/518 検体 (27.0%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、LC EMA-qPCR 法では、カットオフ値を 1 CFU/100 ml 相当とした場合、207/518 検体 (40.0%) の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。LC EMA-qPCR 法の平板培養法に対する感度は 89.3% (125/140 検体)、特異度は 78.3% (296/378 検体) であり、高い相関を示した。(表 1)

表 1 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較

a. LC EMA qPCR法のカットオフ値1 CFU/100 ml相当				
		平板培養法		
		≥10	<10	計
LC EMA qPCR法	≥1	125	82	207
	<1	15	296	311
計		140	378	518

感度 89.3%、 特異度 78.3%

【結果の判定】

上述の試験 1 の結果を参考にして、リアルタイム PCR により算出されたコピー数を菌数に換算することができる。さらに、検水の濃縮率とリアルタイム PCR への持込量を考慮して、検水 100 mL 当りの菌数に換算すると培養法との比較が容易となる。

また、試験 2 の結果から、LC EMA-qPCR 法の結果につきカットオフ値を 1 CFU/100 ml 相当として陽性・陰性の判定を行うと培養法と相関の高い結果が得られると考えられる。

厚生労働省健康局生活衛生課通知（平成 27 年 3 月 31 日）

「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」の改訂について（健衛発 0331 第 7 号）より引用

P29(6) レジオネラ迅速検査法（遺伝子検査法）の活用について

培養検査法は結果が得られるまでに 7 日～10 日を要しますが、迅速検査法（遺伝子検査法）は採水当日あるいは翌日に判定が可能であり、現在いくつかの市販検査キットが利用可能です。迅速検査法は死菌の DNA を検出する可能性があることなどの理由から、最終的にレジオネラ属菌の有無は培養検査法で判定する必要がありますが、迅速検査法では結果が迅速に得られるため、現在は主に次の目的で使用されています。

- ・患者発生時の感染源調査（原因究明）
- ・改善措置後の陰性確認検査（営業再開の目安）
- ・洗浄効果の判定（陰性証明）等

迅速検査法には、菌の生死に関わらず遺伝子を検出する方法（生菌死菌検出法）と、生菌由来の遺伝子のみを検出する方法（生菌検出法）の 2 種類があり、それぞれ結果の解釈には注意が必要です。

前者（生菌死菌検出法）は、死菌由来の遺伝子も増幅対象とするため、遺伝子検査法が陽性でも培養検査法が陰性になる場合がありますが、採水当日に結果が判明し、死菌の存在を潜在的なリスクとして評価することが可能です。

後者（生菌検出法）は、液体培養による生菌の選択的増殖と、化学修飾による死菌由来 DNA の増幅抑制を組み合わせたもので、採水翌日に培養検査結果の予測が可能ですが、菌数が少ない場合には培養検査の結果と食い違う場合があることがわかっています。いずれにしても、これらの特徴を理解したうえで、培養検査法と組み合わせて使用するのが良いでしょう。

＝通知に対応するタカラバイオ製品＝

生菌死菌検出法：リアルタイム PCR 法

概要	製品名	製品コード
DNA 抽出	Lysis buffer for <i>Legionella</i>	9181
リアルタイム PCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection	CY240/CY240S

生菌検出法：LC EMA-qPCR 法

概要	製品名	製品コード
液体培養 (LC)	<i>Legionella</i> LC Medium Base	9016
EMA 処理	Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for LC EMA-qPCR	7730/7730S
	LED Crosslinker 12	EM200
DNA 抽出	Lysis buffer for <i>Legionella</i>	9181
リアルタイム PCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240/CY240S