

厚生労働省通知に収載されたレジオネラ属菌の遺伝子検査法について

2022年6月

タカラバイオ株式会社

令和元年9月19日に、厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（薬生衛発 0919 第1号）が発出されました。これは水質基準の項目の一つであるレジオネラ属菌の検査方法につき具体的な手順を示したもので、定量可能な迅速検査法（遺伝子検査法）として LC EMA-qPCR 法と qPCR 法が収載されました。

レジオネラ属菌検査において、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 DNA や VNC 状態の菌も検出するため、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。これに対し、EMA 処理を応用した生菌遺伝子検査法は、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。qPCR 反応前に EMA 処理を行うことで、死菌あるいは膜損傷菌由来 DNA の増幅を抑制し、生菌由来 DNA を選択的に検出可能です。また、EMA 処理前に液体培養を加えて qPCR 法を行うと、より培養法と高い相関性を示す生菌遺伝子検査法となります（LC EMA-qPCR 法）。

前述のとおり、通知には「培養法との整合性の観点から、迅速検査法のみで[レジオネラ属菌の]*水質基準に適合しているか否かを判断する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法（LC EMA-qPCR 法）を用いる。」と記載されています。遺伝子検査を有効活用できる場として、従来の「清掃・消毒管理された検水におけるレジオネラ属菌の陰性確認」および「培養法と併用したスクリーニング検査」に加え、「迅速検査法での（レジオネラ属菌の）水質基準適合判断」に広がりを見せています。

*：[] 内の文言は補足のためにタカラバイオで追記

厚労省通知「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（薬生衛発 0919 第1号）に収載された迅速検査法のまとめ

分類	生菌検出法	生菌死菌検出法
検査法	LC EMA-qPCR	リアルタイム PCR(qPCR)
用途	◎(レジオネラ属菌の) 水質基準適合判断* ○スクリーニング検査	◎陰性確認 ○スクリーニング検査
結果判定	検査開始 2 日目	検査開始 1 日目

※検査法は、各自治体の条例等で規定されている場合があります。

1) 判定基準についての参考情報

① LC EMA-qPCR 法

使用する製品：

ステップ	製品名	製品コード
液体培養	<i>Legionella</i> LC Medium Base Ver.2	9017
EMA 処理	Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for LC EMA-qPCR	7730
	LED Crosslinker 30	EM300※
DNA 抽出	Lysis buffer for <i>Legionella</i> Ver.2	9183
qPCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240 / CY240S

※LED Crosslinker 12 (製品コード EM200) は終売しました。

試験 1 : LC EMA-qPCR 法におけるレジオネラ属菌 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 *Legionella pneumophila* 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、レジオネラ属菌 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 (レジオネラ属菌 1 CFU 当り)

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

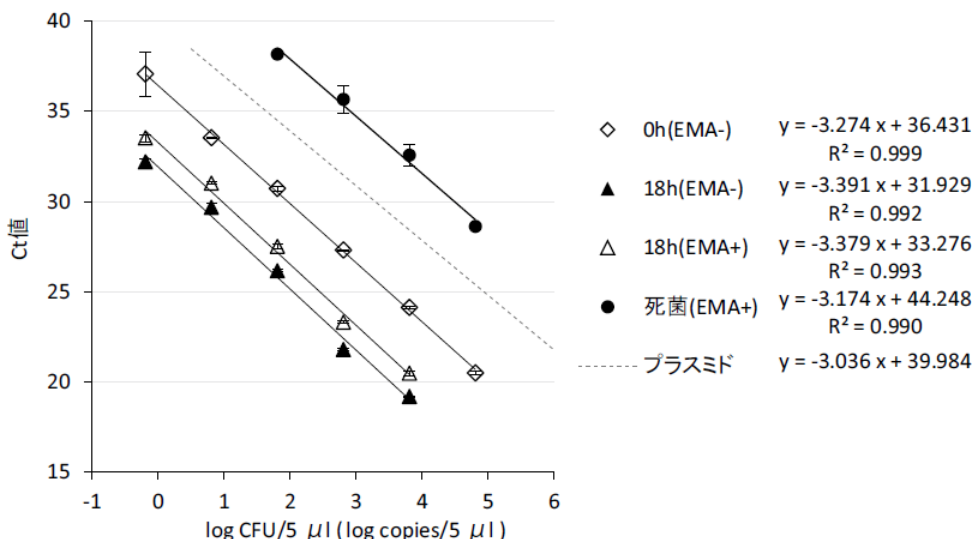


図 1 アメーバ培養 *L. pneumophila* を用いた LC EMA-qPCR の検量線

◇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		計
		≥10	<10	
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。

② qPCR 法

使用する製品：

ステップ	製品名	製品コード
DNA 抽出	Lysis Buffer for <i>Legionella</i> Ver.2	9183
	NucleoSpin® Tissue XS	740901.10
qPCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240/ CY240S

試験 1：qPCR 法におけるレジオネラ属菌 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

・ NucleoSpin® Tissue XS を用いる場合

L.pneumophila 長崎 80-045 株を 30℃ 4 日間培養した平板培養菌あるいは、アメーバで増殖した菌を使用した。3 施設で独立して菌液調製、DNA 抽出、検量線作成を実施した。プラスミドと抽出 DNA の回帰直線を比較すると、いずれも傾き-3.04 で平行関係にあり、両者の増幅効率に差がないことが示された。得られた切片の差が 3.932（プラスミドの切片 39.984 と抽出 DNA の切片 36.052 の差）であったことから、30℃培養 4 日目の菌及びアメーバ培養菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 15 コピー（ $2^{3.932}=15.3$ ）に相当するものと計算された。（図 2）

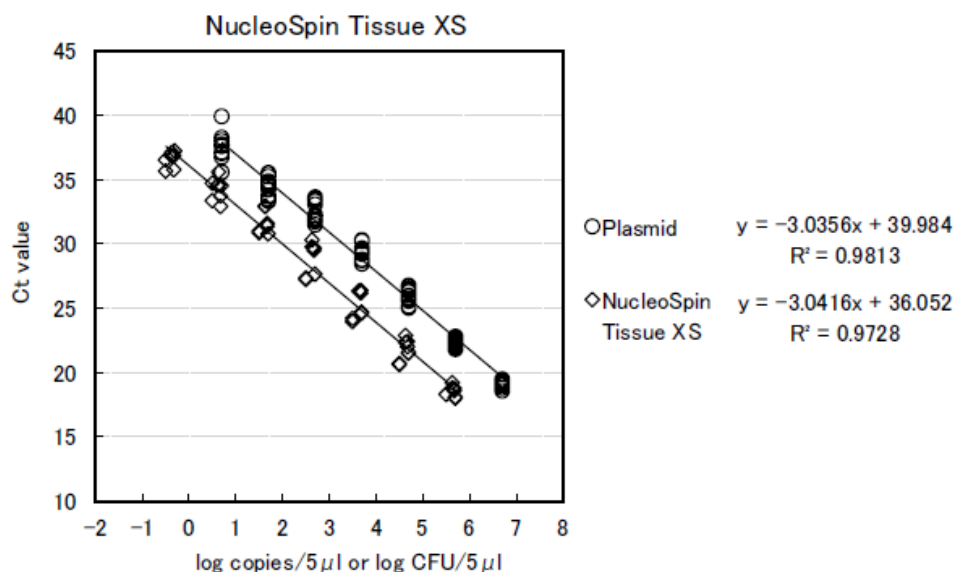


図 2. NucleoSpin® Tissue XS を用いて菌液から抽出した DNA の検量線（16S Positive Control との比較）

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

◇NucleoSpin® Tissue XS

・ Lysis Buffer for *Legionella* を用いる場合

プラスミド DNA と抽出 DNA の回帰直線を比較すると、抽出 DNA の方がやや傾きが大きいもののほぼ平行関係にあり、両者の増幅効率に大きな差がないことが確認された。得られた切片の差が 4.509（プラスミドの切片 39.984 と抽出 DNA の切片 35.475 の差）であったことから、Lysis Buffer を用いて 30℃培養 4 日目の菌およびアメーバ培養菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 23 コピー（ $24.509=22.8$ ）に相当するものと計算された。（図 3）

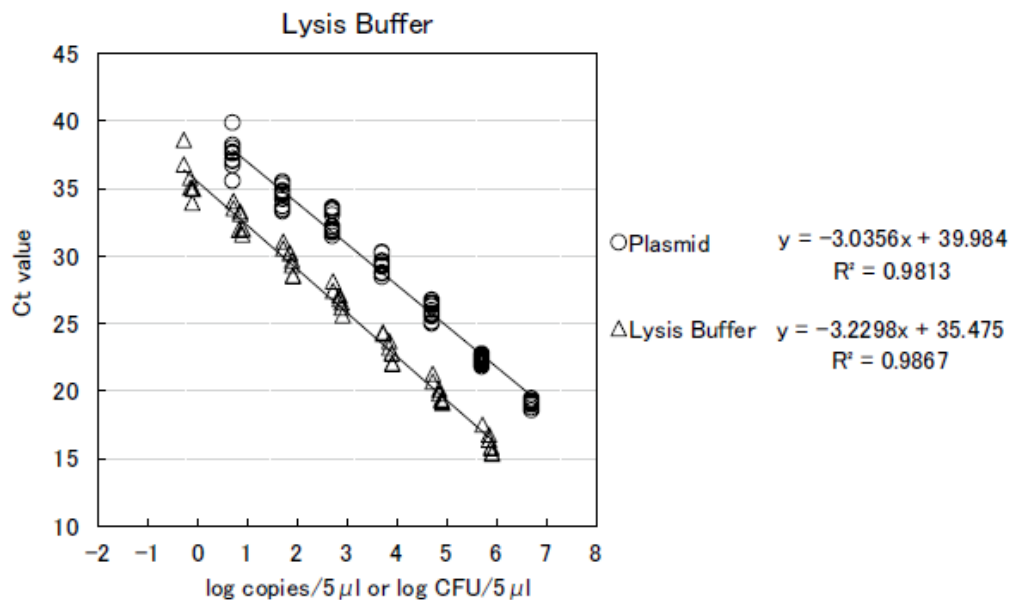


図 3. Lysis Buffer for *Legionella* を用いて菌液から抽出した DNA の検量線（16S Positive Control との比較）

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

◇Lysis Buffer

【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。

2) 厚労省通知からの抜粋紹介

厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課通知（令和元年 9 月 19 日）

「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」より引用

P11 2.9 迅速検査法

検水中のレジオネラ属菌由来の核酸（DNA、RNA）を直接検出する方法（迅速検査法）としては、リアルタイムPCR（qPCR）法、LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)法、PALSAR(Probe AlternationLink Self-Assembly Reaction)法等を利用した検出試薬キットが市販されている。これらは、レジオネラ属菌の16S rRNA等の配列特異性が高く、多コピー存在する核酸を標的としている。

一般的に、迅速検査法は生菌のみならず死菌 DNA や VNC(viable but non-culturable)状態の菌も検出する。すなわち、迅速検査により陽性となった検水にその時点で必ず生菌が存在するわけではない。しかしながら、その結果はレジオネラ属菌の存在履歴を示すことから、衛生管理上の注意が促される。この特性を有効活用する場としては、清掃・消毒管理された検水におけるレジオネラ属菌の陰性確認や、培養法と併用したスクリーニング検査としての利用が挙げられる。迅速検査法のうち、リアルタイム PCR 法は検出試薬キットに添付されている試薬を用いて検量線を作成することにより、遺伝子の定量的な検出が可能である。

迅速検査法で生菌のみを検出するには、DNA増幅反応前にEMA (ethidium monoazide) 処理をおこなうことで、死菌由来DNA、膜損傷菌由来DNAの増幅を抑制し、生菌由来DNAを選択的に増幅させる（※注39）。EMA処理前に液体培養を加えてリアルタイムPCR法を行うと、より平板培養法と高い相関を示す生菌検出方法となる（LC EMA-qPCR法）。培養法との整合性の観点から、迅速検査法のみで[レジオネラ属菌の]*水質基準に適合しているか否かを判断する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法（LC EMA-qPCR法）を用いる。

迅速検査法は反応系によりそれぞれ特性があるので、検出試薬キットの説明書をよく読み理解して用いる。特に注意を要するのは、検水に含まれる物質により反応が阻害され、偽陰性となることである。したがって、インターナルコントロールを用いるなど、偽陰性確認が可能な検出試薬キットの使用が望ましい。各迅速検査法における結果の判定は、取扱説明書に従う。

※注 39：VNC 菌を検出する場合もある。 *：[] 内の文言は補足のためにタカラバイオで追記

＝通知収載のタカラバイオ製品＝

LC EMA-qPCR : 生菌（由来遺伝子）を定量的に検出する			
生菌 検出法	ステップ	製品名	製品コード
	液体培養	<i>Legionella</i> LC Medium Base Ver.2	9017
	EMA 処理	Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for LC EMA-qPCR	7730
		LED Crosslinker 30	EM300※
	DNA 抽出	Lysis buffer for <i>Legionella</i> Ver.2	9183
	qPCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240 / CY240S
qPCR : 菌の生死にかかわらず遺伝子を検出する			
生菌 死菌 検出法	ステップ	製品名	製品コード
	DNA 抽出	Lysis Buffer for <i>Legionella</i> Ver.2	9183
		NucleoSpin® Tissue XS	740901.10
	qPCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240 / CY240S

※LED Crosslinker 12（製品コード EM200）は終売しました。

3) その他の指針等からの抜粋紹介

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。

第 4 版レジオネラ症防止指針（平成 29 年 8 月、公益財団法人日本建築衛生管理教育センター）より引用

5.2 迅速検査法（P41～42）

5.2.1 試験法の概要

検査試料中のレジオネラ属菌由来の遺伝子（DNA）を定性的あるいは定量的に直接検出する遺伝子検査法は、培養法に比べ、検査に要する時間が大幅に短縮されるので、多くの検査機関で積極的に活用されている。

迅速検査法は、通常菌の生死に関わらず遺伝子を検出する（生菌死菌検出法）が、近年、生菌由来の遺伝子のみを検出する方法（生菌検出法）が開発された。それぞれの特性を理解して使用しなければならない。

5.2.5 生菌のみを検出する遺伝子検査法

(1) EMA-qPCR 法

本法は、リアルタイム PCR の前に、EMA（ethidium monoazide）処理を行うことで、死菌由来 DNA の増幅を抑制し、生菌由来の DNA を選択的に増幅させる方法である。専用の EMA 処理試薬キットが市販されているので、リアルタイム PCR 試薬キットと組み合わせて使用する。EMA 処理により、培養法不検出でリアルタイム PCR 陽性となる結果の不一致を減らすことができる。検体が浴槽水の場合は有効だが、冷却水の場合は EMA 処理の効果が見

られず本法は適していない。

(2) LC EMA-qPCR 法

本法は、濃縮検体を液体培地 (Liquid Culture:LC) に添加して 18 時間培養を行った後に、上記と同様の EMA 処理を行う方法である。上記の方法に比べ、迅速性に劣るものの EMA 処理がより効果的に働く。浴槽水を対象とした場合、培養法と高い相関性を示す。

お問合せ先

タカラバイオ株式会社

営業企画部 (検査キット担当)

TEL 077-500-3211

FAX 077-565-6995