製品コード 7714

食品・環境分析用

TaKaRa

Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0

説明書

v202503Da

微生物の検出および同定には主として培養法が用いられていますが、より簡便かつ迅速に結果が得られる方法として、PCR 法等の遺伝子検出技術を応用した手法が注目され、食品・環境分野の検査などにおいて一般的な手法として普及しつつあります。しかし、遺伝子検出技術では原理的に、生菌だけでなく死菌由来 DNA も検出されるため、目的によっては死菌検出が偽陽性と見なされることがあります。

タカラバイオの Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズは、EMA-PCR 法（下図）により生菌由来 DNA を選択的に検出するためのキットです。独自開発の技術により高い効率で EMA 処理を行い、リアルタイム PCR のように増幅サイズが短い場合でも効果的に死菌由来 DNA からの検出を抑制します。

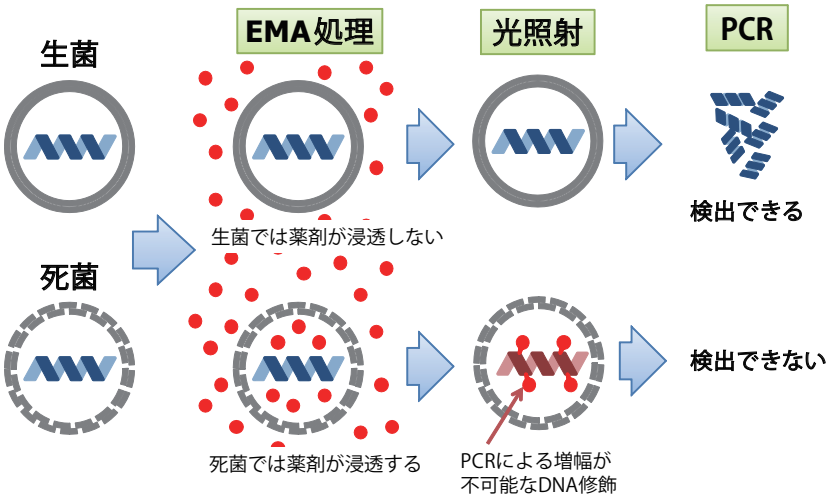


図 1. EMA-PCR 法

Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0 は、レジオネラ属菌用に至適化された EMA 処理用キットで、レジオネラ属菌の死菌由来 DNA を効率よく修飾します。本製品で検体の前処理を行った後、DNA を抽出してサンプルとすることで、CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（製品コード CY240）を用いたリアルタイム PCR により、レジオネラ属菌の生菌由来 DNA を、死菌由来 DNA の影響を除いて検出することができます。

※ レジオネラ属菌の EMA-qPCR 法は、平成 29 年 7 月に改訂発行された「第 4 版レジオネラ症防止指針」（発行：公益財団法人日本建築衛生管理教育センター）に、迅速検査法のうち「生菌のみを検出する遺伝子検査法」のひとつとして収載されています。

【注記】

別売の Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)（製品コード CY290）と併せて使用することで、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズを用いた前処理操作が、検体由来成分による反応阻害などを受けることなく正しく行われたかどうかを確認することができます。
Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズの試薬コンポーネントには反応確認用のプラスミド DNA があらかじめ混合されており、検体に対する前処理が正しく行われると、このプラスミド DNA も同時に修飾され、PCR 増幅できない状態になります。従って、前処理を行った検体に対して、このプラスミド DNA 上の領域をターゲットとする PCR 増幅を行うことで、前処理操作の成否を確認することが可能です。

I. 内容（50 検体分）

1. Solution A-leg (EP2)　250 μl × 2
2. Solution B-leg (EP2)＊　200 μl × 4
3. Dilution Buffer　1 ml

＊：光による化学反応により物質性状が変化し、核酸修飾能力が減衰しますので、遮光に留意してください。

Solution A-leg (EP2)：
レジオネラ属菌用に至適化した核酸修飾反応促進試薬です。前処理操作の成否を確認するためのプラスミド DNA を含みます。

Solution B-leg (EP2)：
レジオネラ属菌用に至適化した選択的膜透過性色素（EMA）を含む溶液です。

II. 保存

－ 20℃

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

1.5 ml マイクロチューブ
卓上遠心機
微量高速冷却遠心機
マイクロピペット
マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
ボルテックスミキサー

【サンプル調製（サンプル濃縮）】
フィルターホルダー
- 47 mm メンブレンフィルター用

メンブレンフィルター
- 直径 47 mm、孔径 0.22 μm；Millipore 社 Code. GTTP04700、Isopore メンブレフィルターなど

濾過びん
吸引ポンプ
ピンセット
滅菌 50 ml コニカルチューブ
2.0 ml マイクロチューブ

【前処理操作（EMA による死菌由来 DNA の修飾）】
光照射装置
- LED Crosslinker 30（製品コード EM300）
  または LED Crosslinker 12（製品コード EM200：終売）

ヒートブロック（95℃で使用可能なもの）
1.5 ml マイクロチューブ＊1

【DNA 抽出】
カラム精製法の場合
- NucloSpin Tissue XS（製品コード 740901.10/.50/.250）＊2
- 特級エタノール（＞99%）
- ヒートブロック（56℃および 70℃で使用可能なもの）

簡易抽出法の場合
- Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2（製品コード 9183）＊3
  または Lysis Buffer for *Legionella*（製品コード 9181）

【リアルタイム PCR】
CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（製品コード CY240）
リアルタイム PCR 用増幅装置および専用チューブ
- Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC（製品コード TP970）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960：終売）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760：終売）
- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）など

＊1： 透明チューブの使用を推奨します。弊社では下記のチューブで実績があります。
- DNA LoBind チューブ, 1.5 ml PCR clean（Eppendorf：Code. 0030108051）
- 1.5 ml ループ付凍結保存チューブ（SARSTEDT：Code. 72.692.100）

＊2： 使用検体に着色や濁りがあるなど夾雑物の混入が疑われる場合は NucleoSpin Soil（製品コード 740780.10/.50/.250）の使用をお勧めします。

＊3： Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 では、夾雑物を Filter Column で除去できるため DNA 溶液をより簡便に回収できます。

IV. 使用に関して

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

使用目的：本製品は環境分析に使用する製品です。

測定結果：本製品は検体の前処理を行い、続いて CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いてリアルタイム PCR を行うことにより、レジオネラ属菌の生菌由来 DNA を死菌由来 DNA と区別して検出することを目的としていますが、死菌の量や試料水の組成によっては前処理に影響が生じ、死菌由来 DNA が検出される場合もあります。従って、培養法による検査も実施の上で、総合的に結果を判定することをお勧めします。
（検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。）

廃棄：　試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。EMA を含む試薬を廃棄する際は、活性炭を通して色素を吸着させてから捨ててください。この際に使用した活性炭は、危険物として処理してください。プラスチックの試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

V. 操作上の注意

1. 装置および試薬などの取扱いは該当品の取扱説明書に従ってください。

2. 万一、Solution B-leg (EP2) が光により劣化すると、死菌由来 DNA への修飾効果が薄れ、生菌および死菌由来 DNA の区別を行うことができません。操作中は遮光に細心の注意を払ってください。使用しない間は、チューブをアルミホイルなどで覆って遮光してください。使用後は、アルミパックに入れて早めに冷凍庫に戻してください。

3. Solution A-leg (EP2) は粘性が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。

4. 各試薬は、溶解後、よく混合しスピンダウンしてから使用してください。

5. 試薬の分注を行うときは、必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。

VI. 実験の進め方について

1. 前処理（EMA 処理）条件の検討

（1）はじめに

下記に示したレジオネラ属菌の標準的な EMA 処理条件は、予めレジオネラ属菌に対して最適化したものですが、検体に含まれる夾雑物の影響により、EMA 処理の効果が変化することがあります。そのような可能性が考えられる場合には、夾雑物存在下で EMA 処理の条件検討を行います。具体的には、純培養菌の生菌と死菌に夾雑物を混合したものを準備し、下記条件をもとに EMA 処理の回数を変えて、その効果を確認します。

[死菌を用いての確認]

死菌抑制効果を確認します。
夾雑物を加えた死菌サンプル＊1 を用いて、最適な死菌抑制効果が得られる EMA 処理条件を検討します。またその条件で EMA 処理を行った際に、どの菌数まで死菌抑制効果があるかを確認します。

＊ 1：死菌サンプルは、生菌サンプルを 100 μl 程度分取し、95℃ 2 分の熱処理を行う方法で調製してください。

[生菌を用いての確認]

EMA 処理の生菌への影響を確認します。
夾雑物を加えた生菌サンプルを用いて、EMA 処理あり／なしの結果を比較し、検出感度に影響を与えない EMA 処理条件を検討します。

◆ レジオネラ属菌の標準的な EMA 処理条件

光照射装置 [LED Crosslinker 30（製品コード EM300）、または LED Crosslinker 12（製品コード EM200：終売）] を使用する場合

1. Solution B-leg (EP2) を Dilution Buffer で 2 倍に希釈する。（用時調製）
2. 1.5 ml チューブに調製したサンプル 40 μl を準備する。
3. Solution A-leg (EP2) を 10 μl 添加する。
4. 1. で希釈した Solution B-leg (EP2) を 5 μl 添加し、混合＊2 後、軽くスピンダウンする。
5. 遮光して室温で 15 分間静置する。
6. 光照射装置にセットし、15 分間光照射する。
7. サンプルをスピンダウンし、95℃ 2 分間ヒートブロックで加熱する。[加熱殺菌]

＊ 2：短時間の緩やかなボルテックスもしくは数回のタッピングで混合してください。

（注 1）操作方法の全体は、「VII. 操作」を確認してください。

（注 2）EMA 処理条件の検討で EMA 処理を複数回行う場合は、4.～6. の工程を繰り返して行ってください。その場合、各回の処理で 5 分間光照射を行い、最後の回のみ 15 分間光照射を行ってください。

(2) 条件検討の流れ

純培養菌の生菌と死菌に夾雑物を加えたサンプルを準備し、EMA 処理回数（1、2、3 回）の検討を行います＊3。EMA 処理を複数回行う場合は、各回の処理で 5 分間光照射を行い、最後の回のみ 15 分間光照射を行ってください。

＊ 3：まずは、EMA 処理 1 回で試してみて、死菌の抑制効果が不十分な場合に、EMA 処理 2 回、3 回の検討を行うという手順でも良いです。

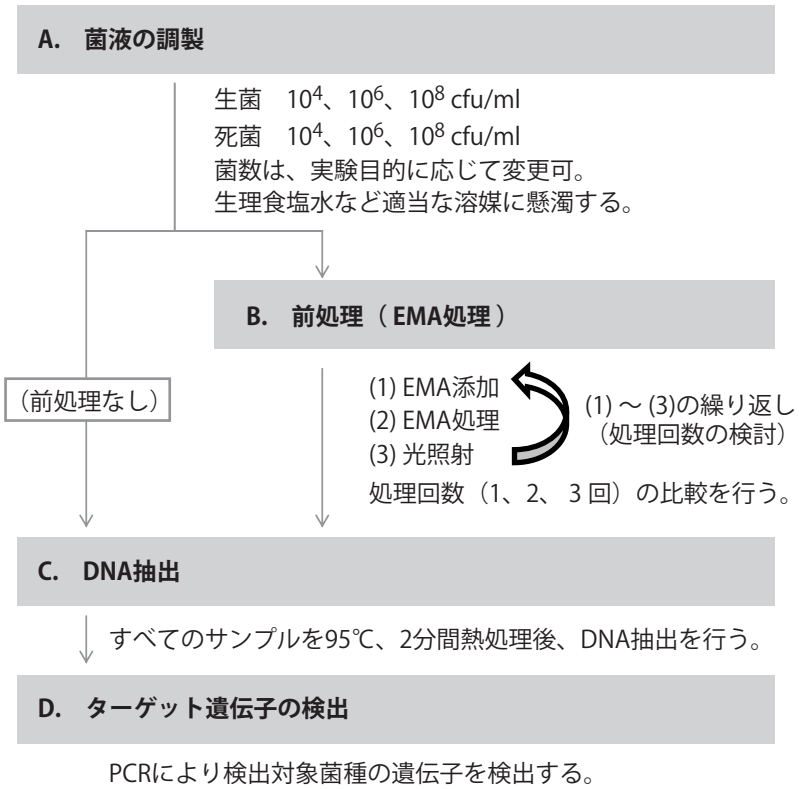


図 2. 条件検討のフロー

(3) 結果の解析

EMA 処理なしの結果と各種条件で EMA 処理を行った結果を比較して、生菌への影響と死菌抑制効果を確認します。
図 3 は、培養したレジオネラ属菌を生理食塩水に懸濁したものを生菌サンプルとし、その懸濁液の一部を 95℃ 2 分間熱処理したものを死菌サンプルとして、EMA 処理を 1 回実施した場合の実験例です。左図には Ct 値を、右図には EMA 処理なしとありの Ct 値の差（ΔCt 値）を示しています。

[生菌への影響]

生菌を用いた際の EMA 処理ありとなしの Ct 値の差（ΔCt 値）が EMA 処理による生菌の検出感度の低下を表します。適切な EMA 処理条件では、ΔCt 値は 1.5 以下となることが多く、その値が小さい程、生菌への影響が小さい EMA 処理条件です。EMA は死菌由来 DNA を効率よく修飾しますが、菌種や菌数、処理条件によっては生菌にも若干の影響を与えることが知られています。
図 3 の実験例では、ΔCt 値がいずれも 0 に近い値となっています。

[死菌抑制効果]

死菌を用いた際の EMA 処理ありとなしの Ct 値の差（ΔCt 値）が死菌抑制効果を表します。適切な EMA 処理条件では、ΔCt 値は 10.0 以上となることが多く、その値が大きい程､効果的に死菌を抑制できる EMA 処理条件です。結果を正しく解釈するために、どの程度まで死菌抑制効果があるかをあらかじめ確認しておくことが重要です。
図 3 の実験例では、ΔCt 値が 15 程度であったことから、10^{-4}～10^{-5} 程度の死菌抑制効果があると推測されます。

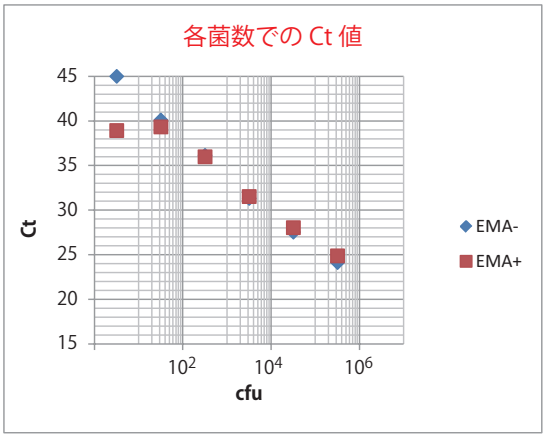
[EMA 処理条件の選定]

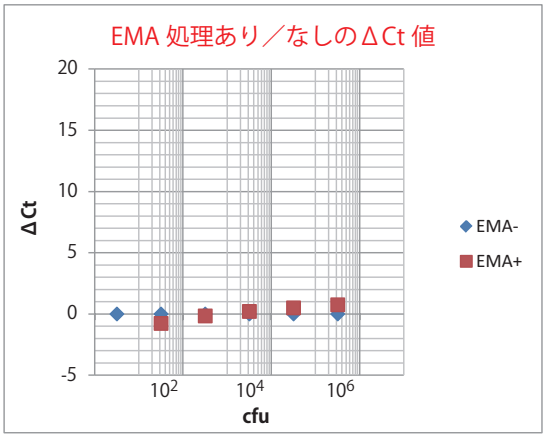
生菌と死菌の結果を踏まえて、生菌への影響が小さく、死菌抑制効果が十分な EMA 処理条件を選択します。
図 3 の実験例では、生菌への影響が小さく、死菌抑制効果も十分であることから、EMA 処理 1 回で十分と考えられます。

【注意】夾雑物により EMA 処理効果に影響が生じると推測される場合には、EMA 処理回数の検討を行ってください。

[生菌への影響]

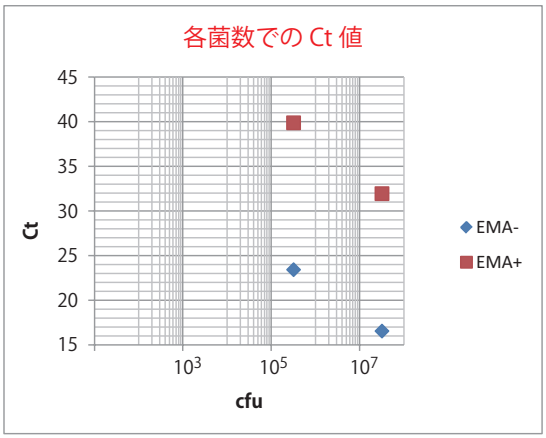
方法：生菌サンプルを段階希釈して、3.2×10^5～3.2 個を EMA 処理し、EMA 処理なしの場合と比較することにより、生菌への影響を確認した。





[死菌抑制効果]

方法：死菌サンプルを段階希釈して、3.2×10^7、3.2×10^5 個を EMA 処理し、EMA 処理なしの場合と比較することにより、死菌抑制効果を確認した。



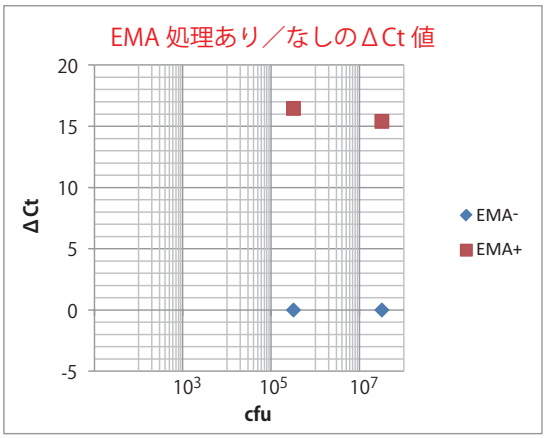


図 3. 生菌への影響および死菌抑制効果

2. 実検体の測定

(1) はじめに

「1. 前処理（EMA 処理）条件の検討」で決めた条件で実検体の EMA 処理を行います。この場合にも、EMA 処理なしと EMA 処理ありの比較を行います。EMA 処理なしの結果は生菌と死菌を合わせた総菌数を、EMA 処理ありの結果は主に生菌数を表しますので、これらの結果から生菌および死菌の存在を推定することができます。なお、EMA 処理を行った検体に関しては、別途 Control Test Kit を用いて EMA 処理効果の確認を行います。

(2) 実験の流れ

EMA 処理に供する菌数は、その処理条件で抑制可能な死菌数以下になるようにします。また、検体に含まれる夾雑物が EMA 処理に影響を及ぼすことが明らかな場合は、必要に応じて検体を希釈します。

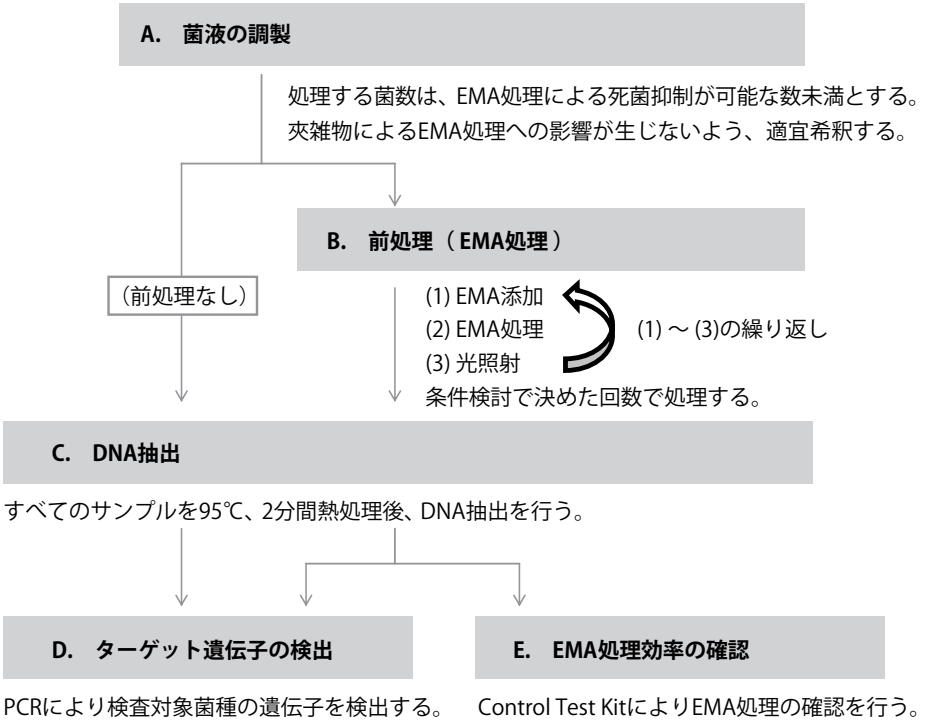


図 4. 実検体での実験フロー

(3) 結果の解析

同一検体由来の EMA 処理あり／なしの結果を比較して、生菌と死菌の存在の有無を下表の通り判断します（陽性コントロール、陰性コントロール、インターナルコントロールが妥当な結果を示すことを前提とする）。

		前処理 (EMA 処理) あり	
		検出	不検出
前処理（EMA 処理）なし	検出	生菌　＋／－ *6 死菌　＋／－	生菌　－ *5 死菌　＋
	不検出		生菌　－ *4 死菌　－

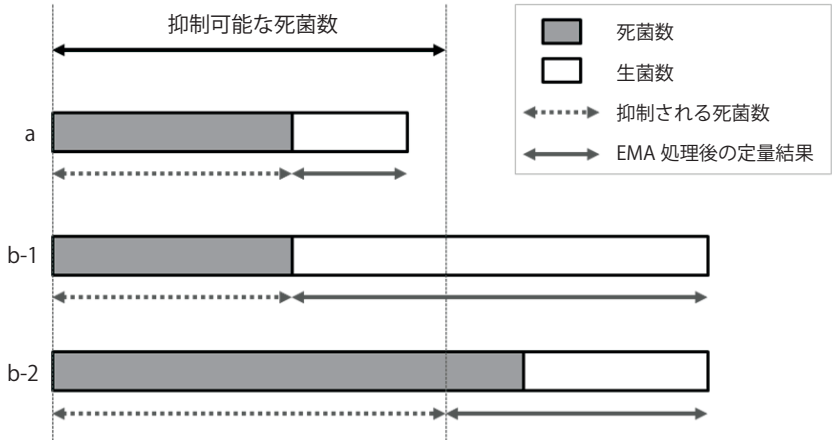
＊4：パターン 1
EMA 処理ありサンプルで不検出 → 生菌由来 DNA が検出限界以下
EMA 処理なしサンプルで不検出 → 死菌由来 DNA も検出限界以下
⇒　検体サンプル中のレジオネラ属菌が検出限界以下である。

＊5：パターン 2
EMA 処理ありサンプルで不検出 → 生菌由来 DNA が検出限界以下
EMA 処理なしサンプルで検出 → 死菌由来 DNA は EMA 処理で完全に修飾済み
⇒　検体サンプル中のレジオネラ属菌の生菌が検出限界以下である。

＊6：パターン 3
EMA 処理ありサンプルで検出
EMA 処理なしサンプルで検出

a.　EMA 処理なしの定量結果（総菌数）が抑制可能な死菌最大数より少ない場合；
EMA 処理ありの定量結果は、生菌数を表す。

b.　EMA 処理なしの定量結果（総菌数）が抑制可能な死菌最大数より多い場合；
EMA 処理ありの定量結果には、生菌数の他、抑制しきれなかった死菌数が含まれる可能性がある。EMA 処理に供する菌数が抑制可能な死菌最大数を下回るように菌数を調整して再試する。



a.　総菌数が抑制可能な死菌数より少ない場合；
EMA 処理後、生菌が検出される。

b-1. 総菌数が抑制可能な死菌数より多く、死菌数は抑制可能な死菌数より少なかった場合；
EMA 処理後、生菌が検出される。

b-2. 総菌数が抑制可能な死菌数より多く、死菌数は抑制可能な死菌数より多かった場合；
EMA 処理後、生菌と EMA 処理で抑制しきれなかった死菌が検出される。

図 5.　パターン 3 の結果の解釈について

VII. 操作

実験にあたっては、手袋、マスク、防護眼鏡を使用し、安全キャビネット内で操作してください。

A. サンプル調製

リアルタイム PCR による検出は、非常に高感度です。サンプル調製の際には、実験環境や使用器具の汚染には極力注意を払い、コンタミネーションの防止に心がけてください。

例）・可能な限り、使い捨て器具を使用する（採水容器やフィルターホルダーなど）。
・使い捨てにできないものは、洗浄後、乾熱滅菌処理を施す（ピンセットなど）。
・マイクロピペットは用途別に準備する（本製品を用いた検体前処理および DNA 抽出用とリアルタイム PCR 試薬調製用を分ける）。

【検水の濃縮】

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）の「別添 公衆浴場における 浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」等を参照し、ろ過濃縮を行い、さらに遠心分離により再濃縮します。

1. 検水 500 ml を 100 倍濃縮し 5 ml とする。
2. 100 倍濃縮液 2 ml を 13,000～15,000 rpm で 4℃ 5 分間遠心分離後、上清（950 μl × 2）を穏やかにマイクロピペットで吸い取って除去し、残渣液 100 μl を残す。
3. 残渣液 100 μl のうち、40 μl を「B. サンプルの前処理（EMA 処理）」に使用する。残りは氷上もしくは 4℃で保存し、[残渣液 40 μl] を比較のための「前処理なしサンプル」として、「B. サンプルの前処理（EMA 処理）＞7.」の加熱殺菌の処理を行った後、「C. DNA 抽出」に使用する。

B. サンプルの前処理（EMA 処理）

下記に示す標準的な EMA 処理条件、あるいは「VI. 実験の進め方について」の条件検討を行って決定した EMA 処理条件により、サンプルの EMA 処理を行います。

<u>光照射装置 [LED Crosslinker 30（製品コード EM300）、または LED Crosslinker 12（製品コード EM200：終売）] を使用する場合</u>

1. Solution B-leg (EP2) を Dilution Buffer で 2 倍に希釈する（用時調製）。
2. 1.5 ml チューブに調製したサンプル 40 μl を準備する。
3. Solution A-leg (EP2) を 10 μl 添加する。
4. 1. で希釈した Solution B-leg (EP2) を 5 μl 添加し、混合＊1 後、軽くスピンダウンする。
5. 遮光して室温で 15 分間静置する。
6. 光照射装置にセットし、15 分間光照射する。＊2
7. サンプルをスピンダウンし、95℃ 2 分間ヒートブロックで加熱する。[加熱殺菌]

＊1： 短時間の緩やかなボルテックスもしくは数回のタッピングで混合してください。

＊2： EMA 処理を複数回行う場合は、4.～6. の工程を繰り返して行ってください。その場合、各回の処理で 5 分間光照射を行い、最後の回のみ 15 分間光照射を行ってください。

C. DNA 抽出

DNA 抽出法には、NucleoSpin Tissue XS によるカラム精製法と、Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 および Lysis Buffer for *Legionella* による簡易抽出法の 2 種類の方法があります。簡易抽出法は、操作が簡便で抽出効率も高いことから、塩素消毒が施された循環式浴槽の検体など汚染の少ない検体に適しています。また、泉質による PCR 反応阻害が予想される検体にはカラム精製法が適しています。

NucleoSpin Tissue XS を用いた方法（カラム精製法）

[1] B-7. で加熱殺菌を終えたサンプル全量（55～65 μl）に、それぞれ Lysis Buffer T1 を 160 μl 加える。軽く混合して、スピンダウンする。
[2] さらに Proteinase K＊3 を 16 μl 加える。ボルテックスにて混合（5 秒×2）して、スピンダウンする。
[3] 56℃で 10 分間インキュベートする。
[4] スピンダウンしたサンプルに Lysis Buffer B3 を 160 μl 加える。ボルテックスにて混合（5 秒×2）して、スピンダウンする。
[5] 70℃で 5 分間インキュベートし、ボルテックスする。
[6] 各サンプルが室温に戻ったことを確認して、スピンダウンしたサンプルにエタノール（96～100%）を 160 μl 加え、ボルテックスにて混合（5 秒×2）して、軽くスピンダウンする。
[7] NucleoSpin Tissue XS Column を Collection Tubes (2 ml) にセットする。
[8] 6. の溶液をカラムに添加し、11,000×*g*、1 分間遠心する。
[9] カラムを新しい Collection Tubes (2 ml) にセットする。
[10] カラムに Wash Buffer B5＊4 を 50 μl 添加し、11,000×*g*、1 分間遠心する。
ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
[11] カラムに Wash Buffer B5＊4 を 50 μl 添加し、11,000×*g*、2 分間遠心する。
カラム上に液が残っていないことを確認する。
[12] カラムを 1.5 ml マイクロチューブにセットする。
[13] カラムに Elution Buffer BE を 25 μl 添加し、11,000×*g*、1 分間遠心し、DNA 溶液を回収する。（溶出 1 回目）
[14] 再度、13. の操作を行う。（溶出 2 回目）
[15] 得られた DNA 溶液の液量がおおよそ 50 μl であることを確認する。

＊3：Proteinase K：製品コード 740901.50（50 回用）を用いる場合；
Proteinase K（凍結乾燥品）20 mg (1 vial) に、Proteinase Buffer を 1 ml 加え溶解してください。溶解後の Proteinase K 溶液は、−20℃で保存してください。

＊4：Wash Buffer B5：Wash Buffer B5 (Concentrate) 2 ml あたり、8 ml のエタノールを加えてください。

Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 を用いた方法（簡易抽出法）

※ 製品の取扱説明書に従って操作してください。

（1） B-7. で加熱殺菌を終えたサンプル全量（55～65 μl）を 15,000 rpm（最高速度）、4℃で 5 分遠心し、残液が 25 μl になるよう上清を除去する。
（2） 残液 25 μl に Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 を 25 μl 添加し、ボルテックスで軽く混合した後、スピンダウンする。
（3） 95℃で 10 分インキュベートする。
（4） ボルテックスで軽く混合した後、全量を Filter Column にアプライする。
（5） 11,000 × *g* で 1 分間遠心する。
（6） 溶出液（約 50 μl）を DNA 溶液として回収する。

Lysis Buffer for *Legionella* を用いた方法（簡易抽出法）

※ 製品の取扱説明書に従って操作してください。

（1） B-7. で加熱殺菌を終えたサンプル全量（55～65 μl）を 15,000 rpm（最高速度）、4℃で 5 分遠心し、上清を除去する。
（2） （1）の沈殿物に Lysis Buffer for *Legionella* を 50 μl 添加し、ボルテックスで軽く混合した後、スピンダウンする。
（3） 95℃で 10 分インキュベートする。
（4） ボルテックスで軽く混合した後、15,000 rpm（最高速度）、4℃で 10 分間遠心する。
（5） 氷上で 5 分間静置する。
（6） 上清 25 μl を DNA 溶液として回収する。

D. リアルタイム PCR によるターゲット遺伝子の検出

C-[14] または C-(6) で調製した EMA 処理ありおよび EMA 処理なしの DNA 溶液を用いて CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（製品コード CY240/CY240S）によるリアルタイム PCR を行う。

※ CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit の取扱説明書の「VIII. 操作」の「VIII-1-2. 反応液の調製と反応開始」から、操作を行ってください。

E. EMA 処理効率の確認

EMA 処理ありサンプルについては、Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) を用いて、本製品の試薬中に含まれる反応確認用プラスミド DNA が、EMA 処理操作後、qPCR で検出されないことを確認することにより、本製品による EMA 処理操作が正しく行われたことを確認することができる。

※ Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) の取扱説明書に従って操作してください。

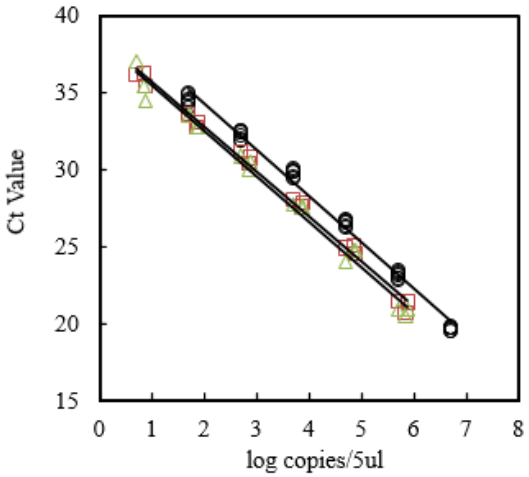
VIII. 検出結果の判断基準についての参考情報

試験 1. EMA-qPCR 法におけるレジオネラ属菌 1 CF M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）公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究：平成 28 年度分担研究報告書」より引用。

L. pneumophila 長崎 80-045 株を 30℃ 4 日間培養した平板培養菌を使用した。菌液の段階希釈液をEMA処理した後、Lysis Buffer for *Legionella* またはNucleoSpin Tissue XSでDNA抽出し、検量線を作成した。プラスミドと各抽出 DNA の回帰直線を比較すると、傾きはほぼ並行関係にあり、増幅効率に大きな差がないことが確認された。得られた切片の差から、30℃ 4 日目の菌 1 CF M相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、抽出効率や増幅効率を含めて、Lysis Buffer for *Legionella* ではプラスミド 3 コピー、NucleoSpin Tissue XS ではプラスミド 4 コピーに相当するものと計算された。（図 6）

Lysis Buffer for *Legionella* の場合：2^(40.221-38.559)=3.2 コピー
NucleoSpin Tissue XS の場合：2^(40.221-38.375)=3.6 コピー



○Plasmid＊ y = -2.9938x + 40.221 R² = 0.9903

□Lysis Buffer y = -2.9067x + 38.559 R² = 0.9929

△NucleoSpin Tissue XS y = -2.938x + 38.375 R² = 0.9868

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

図 6. EMA-qPCR の検量線

※ DNA 抽出に Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 を用いた場合も、コピー数から CFU への換算値は上記と同じ値を使用してください。

試験 2.　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）公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究　平成 30 年度分担研究報告書」より引用。

全国 5 か所の地方衛生研究所において、平成 30 年度に浴用施設から 126 検体の試料を採取し、平板培養法と迅速検査法（qPCR 法および EMA-qPCR 法）の比較を行った（表 1）。なお、EMA-qPCR 法に関しては、EMA 処理を 1 回あるいは 2 回実施し、EMA 処理効果の比較も行った。解析の際には、qPCR 法、EMA-qPCR 法ともに、遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。

126 検体について qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 100% であり、平板培養陽性検体（10 CF M /100 ml 以上）のすべてを検出できる迅速検査法であった。しかしながら、特異度は 34.8%、一致率は 52.4% であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、EMA 処理を 1 および 2 回と実施することで、特異度は 68.5%、一致率は 75.4% まで上昇したため、死菌 DNA の遺伝子増幅を抑制でき、全体として平板培養法とより相関する迅速検査法となったと考えられた。ただし、EMA 処理回数は、1 回と 2 回でほとんど差はなかったことから、実用上 EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。

表 1.　平板培養法と (EMA-)qPCR 法との比較

EMA 未処理

		平板培養法（CF M /100 ml）		
		≧ 10	＜ 10	計
qPCR	陽性	34	60	94
	陰性	0	32	32
計		34	92	126

感度 100%、特異度 34.8%、陽性的中率 36.2%、陰性的中率 100%、一致率 52.4%

EMA 処理（1 回）

		平板培養法（CF M /100 ml）		
		≧ 10	＜ 10	計
EMA-qPCR	陽性	33	35	68
	陰性	1	57	58
計		34	92	126

感度 97.1%、特異度 62.0%、陽性的中率 48.5%、陰性的中率 98.3%、一致率 71.4%

EMA 処理（2 回）

		平板培養法（CF M /100 ml）		
		≧ 10	＜ 10	計
EMA-qPCR	陽性	32	29	61
	陰性	2	63	65
計		34	92	126

感度 94.1%、特異度 68.5%、陽性的中率 52.5%、陰性的中率 96.9%、一致率 75.4%

【 結果の判定 】

前頁の試験 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、EMA-qPCR 法では、遺伝子増幅が認められた（Ct 値が算出された）場合は陽性と判定すると、培養法と相関の高い結果が得られると考えられる。

IX. 参考文献

1）Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, and Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*. 2003 Apr; **34**(4): 804-808, 810, 812-813.

2）「第 4 版レジオネラ症防止指針」（発行：公益財団法人 日本建築衛生管理教育センター）

3）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）公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究：平成 28 年度分担研究報告書

4）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）公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究：平成 30 年度分担研究報告書

5）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）

X. 関連製品

LED Crosslinker 30（製品コード EM300）
Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)（製品コード CY290）
CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（製品コード CY240/CY240S）
NucleoSpin Tissue XS（製品コード 740901.10/.50/.250）
NucleoSpin Soil（製品コード 740780.10/.50/.250）
Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2（製品コード 9183）
Lysis Buffer for *Legionella*（製品コード 9181）
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC（製品コード TP970）

Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR（製品コード 7730/7730S）
Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative)（製品コード 7700）
Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive)（製品コード 7705）

XI. 注意

- 本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。CycleavePCR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ウェブサイト　https://www.takara-bio.co.jp
タカラバイオ株式会社

v202503Da