

## レジオネラ属菌の遺伝子検査法について

2019年6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法や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）。

また、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、従来のqPCR法に加えて「生菌のみを検出する遺伝子検査法」が記載されました。浴槽水を対象とし、従来のqPCR法に比べ、培養法との一致率がより高い方法としてLC EMA-qPCR法とEMA-qPCR法が紹介されています。

### 第4版レジオネラ症防止指針に記載された迅速検査法のまとめ

分類	検査法	概要	結果判定	検査法の特長
生菌検出法	LC EMA-qPCR	液体培養(18時間)後に、EMA処理およびqPCR検出を行う	検査開始 2日目	液体培養(18時間)によりEMA処理が効果的に作用し、より確実に生菌を選択的に検出できる
	EMA-qPCR	液体培養を行わず、ろ過濃縮検水をそのままEMA処理し、qPCR検出を行う	検査開始 1日目	LC EMA-qPCR法に比べ、18時間の液体培養が必要ないためより迅速である（採水当日に判定可能）
生菌死菌検出法	qPCR	菌の生死にかかわらず遺伝子を検出する	検査開始 1日目	死菌の存在を潜在的な汚染リスクとして評価できる

## 1) 判定基準についての参考情報

### ① LC EMA-qPCR 法

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

### 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

アメーバ培養レジオネラ属菌の 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)

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

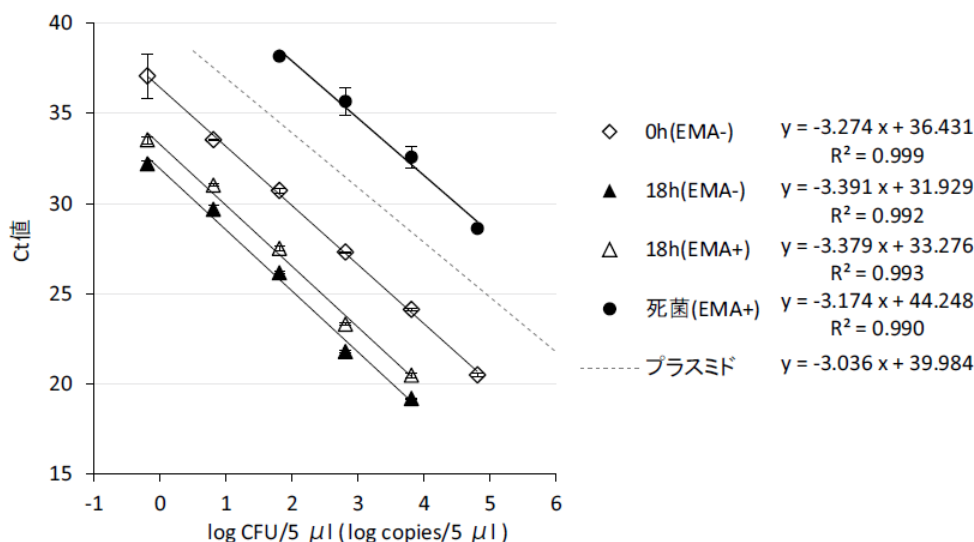


図 1 アメーバ培養レジオネラ属菌を用いた LC EMA-qPCR の検量線

◇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 EMA-qPCR 法

ステップ	製品名	製品コード
EMA 処理	Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for PCR Ver.2.0	7714
	LED Crosslinker 12	EM200
DNA 抽出	Lysis Buffer for <i>Legionella</i>	9181
	NucleoSpin® Tissue XS	740901.10
qPCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240 / CY240S

### 試験 1 : 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 CFU 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 2）

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

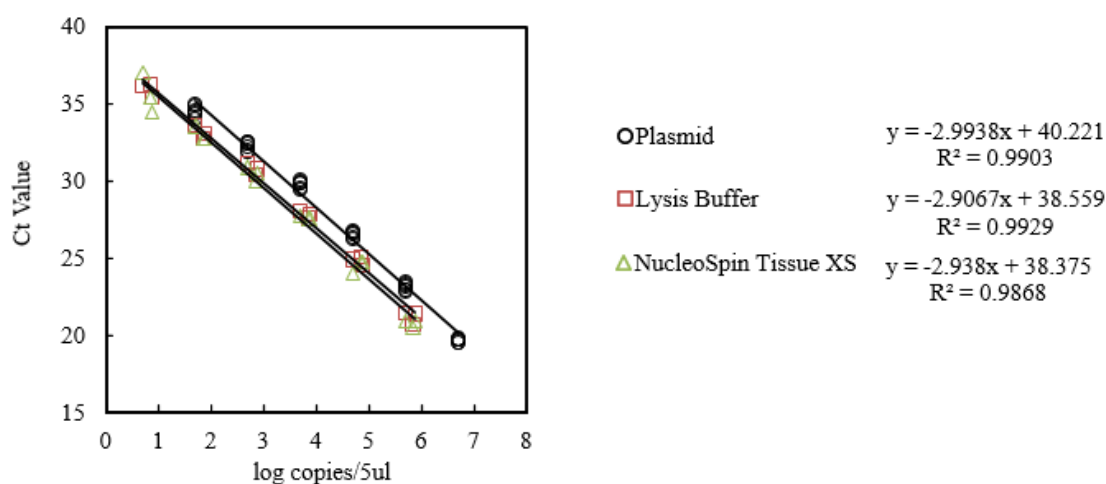


図 2 EMA-qPCR の検量線

□Lysis Buffer

△NucleoSpin® Tissue XS

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

## 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 2）。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 CFU/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 2 平板培養法と(EMA-)qPCR 法との比較

### a. EMA未処理

		平板培養法(CFU/100 ml)		計
		≥10	<10	
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%

### b. EMA処理(1回)

		平板培養法(CFU/100 ml)		計
		≥10	<10	
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%

### c. EMA処理(2回)

		平板培養法(CFU/100 ml)		計
		≥10	<10	
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%

### 試験3：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28～30年度総合研究報告書」より引用

全国6か所の地方衛生研究所において、平成28～30年度に浴用施設などから613検体の試料を採取し、平板培養法とEMA-qPCR法の比較を行った（表3）。なお、EMA-qPCR法に関しては、EMA処理は1回実施とし、解析の際には遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。

613検体についてEMA-qPCR法を実施した結果、平板培養法に対する感度は91.1%、特異度は61.1%、陽性的中率は37.3%、陰性的中率は96.5%、一致率は67.2%であった。

表3 平板培養法とEMA-qPCR法（EMA処理1回）との比較

▶ EMA処理(1回)

		平板培養法(CFU/100 ml)		
		≧ 10	< 10	計
EMA-qPCR	陽性	113	190	303
	陰性	11	299	310
計		124	489	613

感度91.1%、特異度61.1%、陽性的中率37.3%、陰性的中率96.5%、一致率67.2%

#### 【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および3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。

### ③ qPCR 法

ステップ	製品名	製品コード
DNA 抽出	Lysis Buffer for <i>Legionella</i>	9181
	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 3）

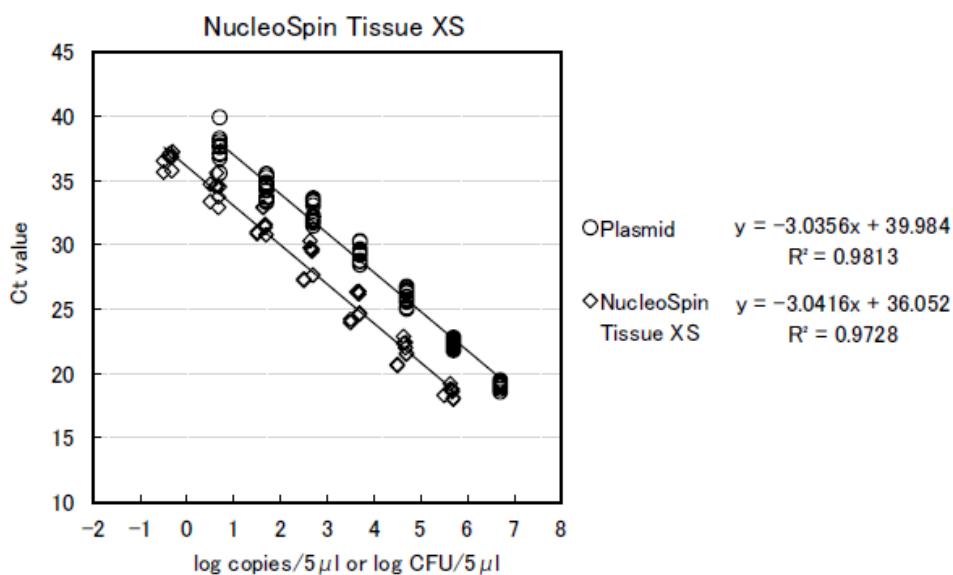


図 3. NucleoSpin® Tissue XS を用いて菌液から抽出した DNA の検量線（16S Positive Control との比較）

○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 4）

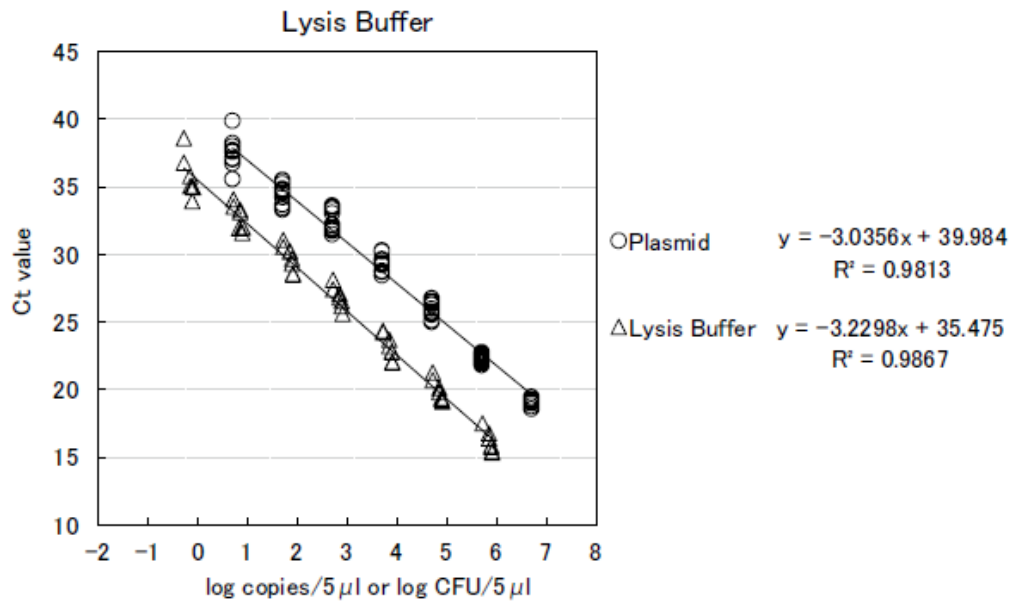


図 4. Lysis Buffer for *Legionella* を用いて菌液から抽出した DNA の検量線（16S Positive Control との比較）

○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) LC EMA-qPCR 法と EMA-qPCR 法の定量性の比較

### 試験 1：平板培養法と LC EMA-qPCR 法との相関

「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 法の定量値（菌数）の比較を行った（図 5）。その結果、 $R^2 = 0.6672$  と高い相関を示し、LC EMA-qPCR 法は全体として平板培養法の菌数を反映していた。

### 試験 2：平板培養法と EMA-qPCR 法との相関

「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 28～30 年度総合研究報告書」より引用

全国 6 か所の地方衛生研究所において、平成 28～30 年度に浴用施設などから採取された 613 検体の試料について、平板培養法と EMA-qPCR 法（EMA 処理 1 回）の定量値（菌数）の比較を行った（図 6）。その結果、 $R^2 = 0.2426$  となり、この値は LC EMA-qPCR 法の場合（ $R^2 = 0.6672$ 、図 5）よりも低かったため、平板培養法の菌数を反映する方法としては、LC EMA-qPCR 法の方が優れていることが分かった。

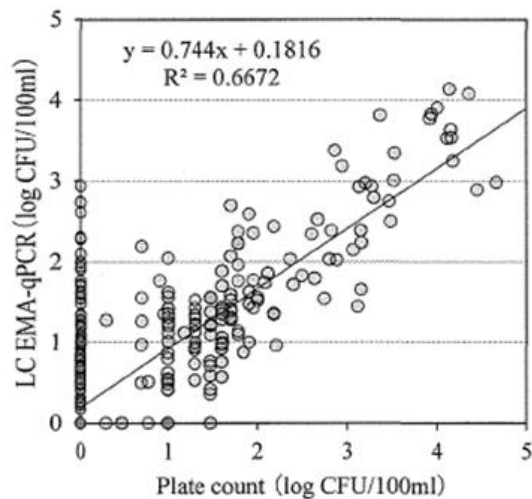


図 5. 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との相関

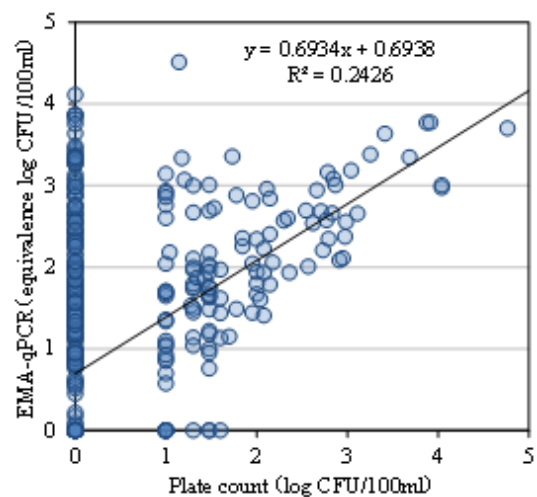


図 6. 平板培養法と EMA-qPCR 法（EMA 処理 1 回）との相関

### 3) 通知および指針等からの抜粋紹介

① 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

② 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。

### ＝対応するタカラバイオ製品＝

	概要	製品名	製品コード
生菌 検出法	<b>LC EMA-qPCR</b> : 液体培養 (18 時間) 後に、EMA 処理および qPCR 検出を行う		
	液体培養	<i>Legionella</i> LC Medium Base	9016
	EMA 処理	Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for LC EMA-qPCR	7730
		LED Crosslinker 12	EM200
	DNA 抽出	Lysis buffer for <i>Legionella</i>	9181
	qPCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240 CY240S
	<b>EMA-qPCR</b> : 液体培養を行わず、そのまま EMA 処理し qPCR 検出を行う		
	EMA 処理	Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for PCR Ver.2.0	7714
		LED Crosslinker 12	EM200
	DNA 抽出	Lysis Buffer for <i>Legionella</i>	9181
		NucleoSpin® Tissue XS	740901.10
	qPCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240 CY240S

生菌 死菌 検出法	qPCR : 菌の生死にかかわらず遺伝子を検出する		
	DNA 抽出	Lysis Buffer for <i>Legionella</i>	9181
		NucleoSpin® Tissue XS	740901.10
qPCR	CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240 CY240S	

お問い合わせ先  
 タカラバイオ株式会社  
 営業企画部（検査キット担当）  
 TEL 077-565-6972  
 FAX 077-565-6987