

レジオネラ属菌遺伝子検査システム

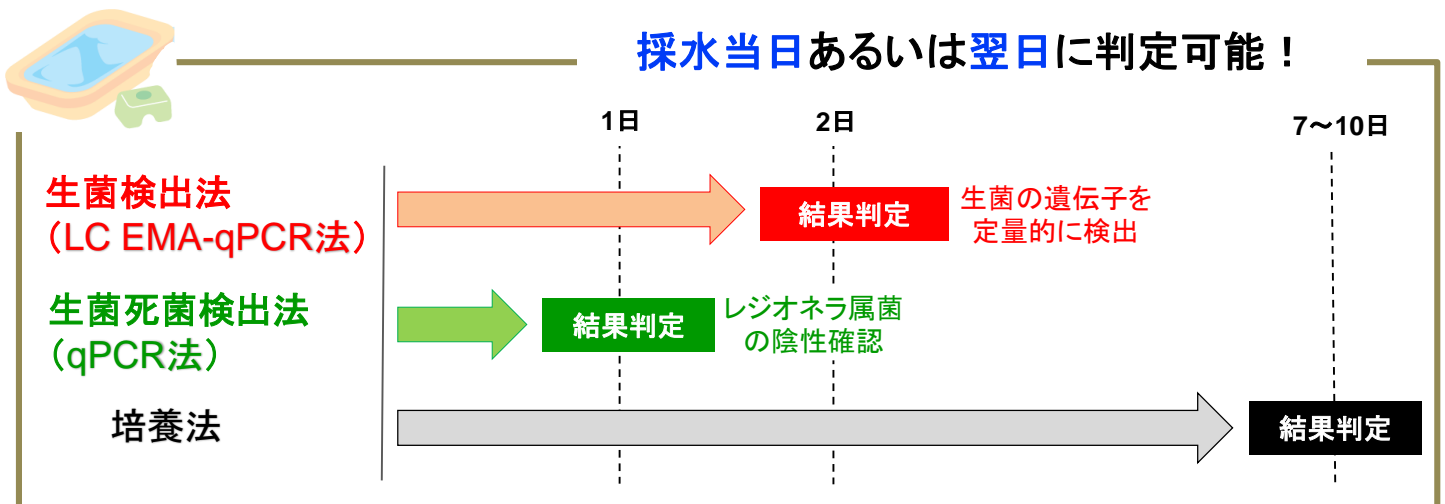
2020年12月改訂

LC EMA-qPCR法による迅速検査法で レジオネラ属菌の水質基準適合判断が可能※に！

※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。

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。その中で、LC EMA-qPCR法の用途については、「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。

(*: []内の文言は補足のためにタカラバイオで追記)



レジオネラ属菌遺伝子検査システム

★ 試薬キット



★ 装置

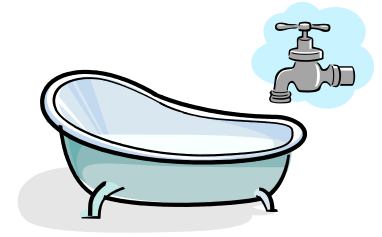


that's GOOD science!

レジオネラ属菌の遺伝子検査について

レジオネラ属菌の検査法

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)。



厚生労働省通知の「迅速検査法」についての記載

厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課通知「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)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 Alternation Link 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。

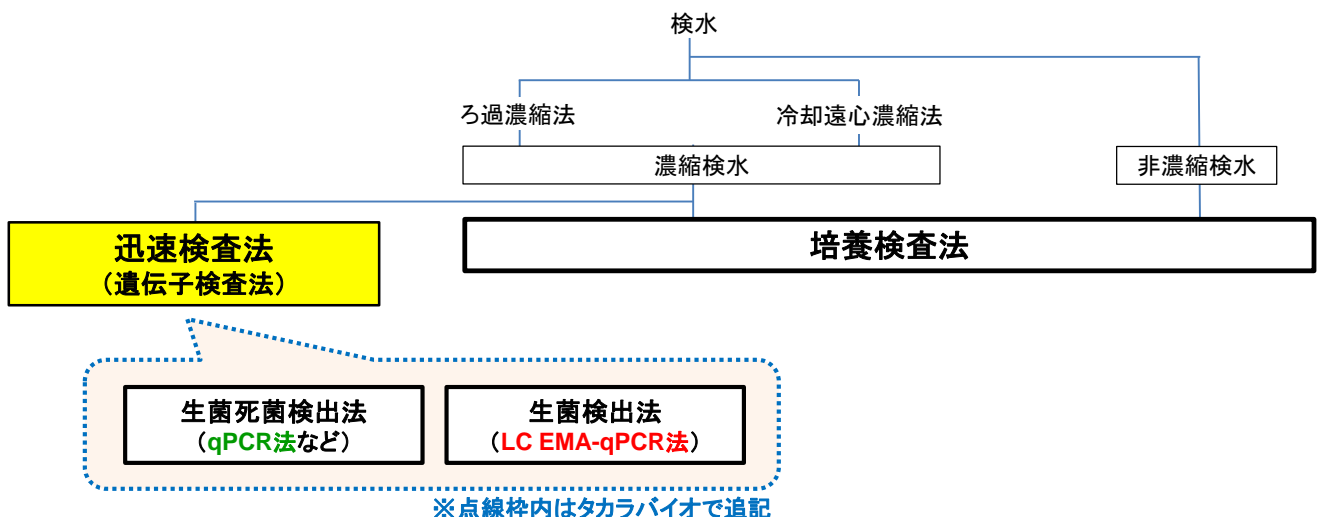
迅速検査法で生菌のみを検出するには、DNA増幅反応前にEMA(ethidium monoazide)処理をおこなうことで、死菌由来DNA、膜損傷菌由来DNAの増幅を抑制し、生菌由来DNAを選択的に増幅させる(※注39)。EMA処理前に液体培養を加えてリアルタイムPCR法を行うと、より平板培養法と高い相関を示す生菌検出方法となる(LC EMA-qPCR法)。培養法との整合性の観点から、迅速検査法のみで[レジオネラ属菌の]*水質基準に適合しているか否かを判断する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法(LC EMA-qPCR法)を用いる。

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。

(以下略)

※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

<上記通知に示された公衆浴場における浴槽水などのレジオネラ属菌検査方法の概要>



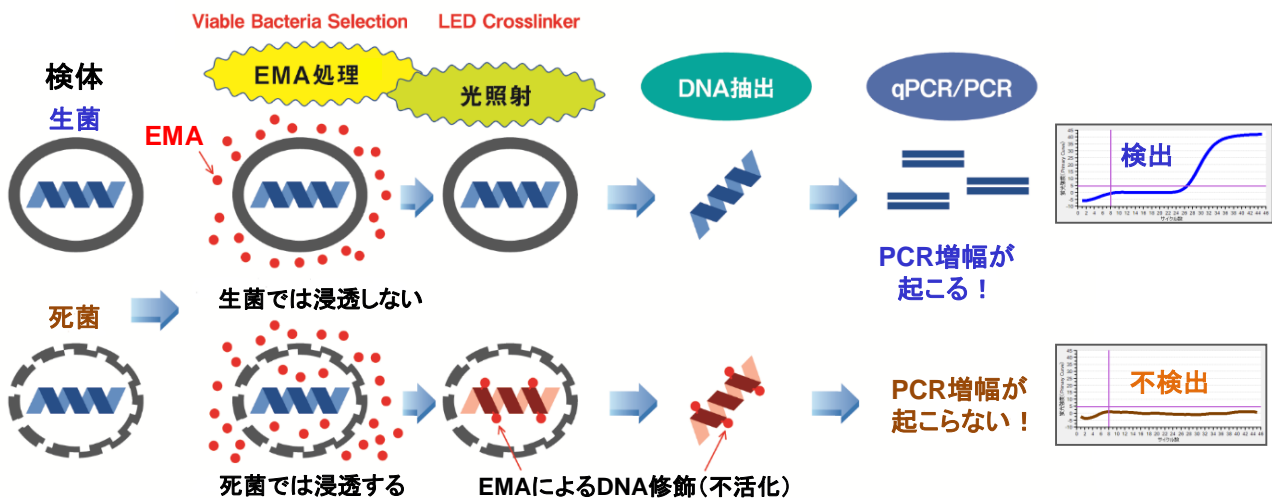
LC EMA-qPCR法とqPCR法の比較

分類	手法	用途	結果判定	検査法の特長
生菌 検出法	① LC EMA- qPCR	◎(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	検査開始 2日目	液体培養(18時間)とEMA処理の 組み合わせにより、生菌を選択的 に検出できる。
生菌死菌 検出法	② qPCR	◎陰性確認 ○スクリーニング検査	検査開始 1日目	ろ過濃縮検体からqPCR検出を 行う。死菌の存在も潜在的な汚 染リスクとして評価できる。

※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。

EMA-PCR法の原理

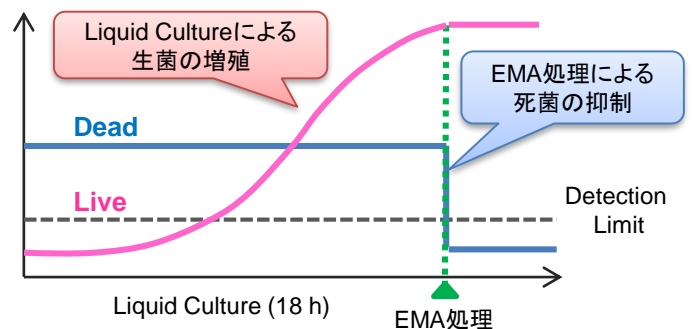
EMA(ethidium monoazide)は可視光に暴露すると核酸に共有結合する選択的膜透過性色素です。生菌を含む検体にEMAを含む試薬を添加して光を照射しても、生菌では薬剤が内部に浸透せずDNAへの化学修飾は起こりませんが、死菌由来DNAやその他、検体に含まれるDNAはEMAによって化学修飾されます。EMAにより修飾されたDNAは、PCR反応の鋳型とならないため、EMA処理後は生菌由来DNAのみが検出されます。EMA-PCR法とは、EMAが死菌由来DNAを修飾し、修飾を受けたDNAがPCR増幅できない状態となることを利用して、生菌由来DNAを選択的に検出する方法です。



LC EMA-qPCR法とは

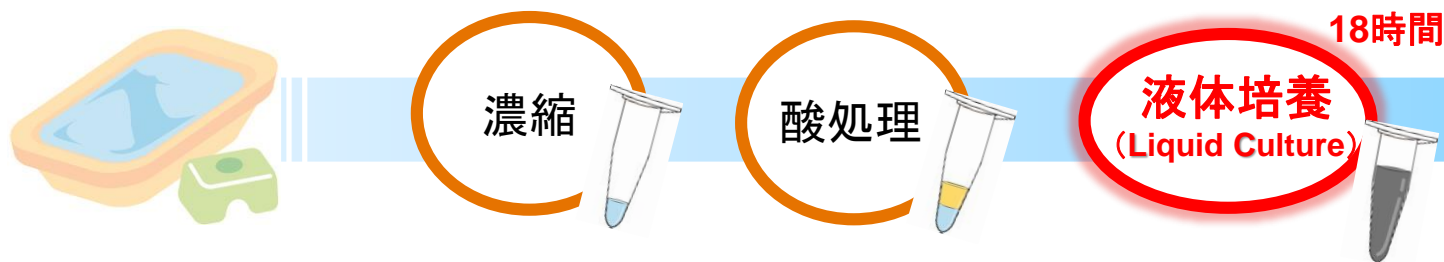
1. 液体培養(LC:Liquid Culture)による生菌の選択的増殖 ※
2. EMA処理による死菌由来DNAからのPCR増幅の抑制

を組み合わせた、「迅速性」と「生菌選択性」を兼ね備えた遺伝子検査法です。EMA-PCR法に比べ、より確実でかつ高感度な生菌検出法と言えます。



※ MWY液体培地で36℃18時間 培養することで生菌のみが増殖し、相対的に生菌の選択性が向上します。定量性を保った状態で増菌させ、定量的な解析を行うために、一定時間(18時間)の培養を行います。

① レジオネラ属菌 生菌検出法 (LC EMA-qPCR法)



液体培養

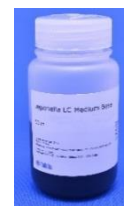
液体培養に使用する培地のベース

Legionella LC Medium Base

Legionella LC EMA Medium Baseを使用するには下記のサプリメントが必要です。

- ・レジオネラBCYE α 発育サプリメント (関東化学 (Oxoid)、Code: 713110-1)
- ・レジオネラMWY選択サプリメント (関東化学 (Oxoid)、Code: 713118-1)

製品コード	容量	価格 (税別)
9016	90 ml	¥16,500



EMA処理

EMA試薬キット

Viable Legionella Selection Kit for LC EMA-qPCR

LC EMA-qPCR法に適した専用のEMA試薬です。

光照射装置

LED Closslinker 12

EMA処理検体 (1.5 ml チューブ) 12本を一度に処理できます。



製品コード	容量	価格 (税別)
7730S	25回	¥18,000
7730	50回	¥33,000

製品コード	容量	価格 (税別)
EM200	一式	¥118,000

●死菌由来のPCR増幅を抑制し、生菌由来DNAを選択的に検出

EMAで修飾された死菌DNAがPCR増幅できない状態となることを利用して、生菌DNAを選択的に検出します。

DNA抽出

レジオネラ属菌専用のDNA抽出試薬

Lysis Buffer for Legionella Ver.2

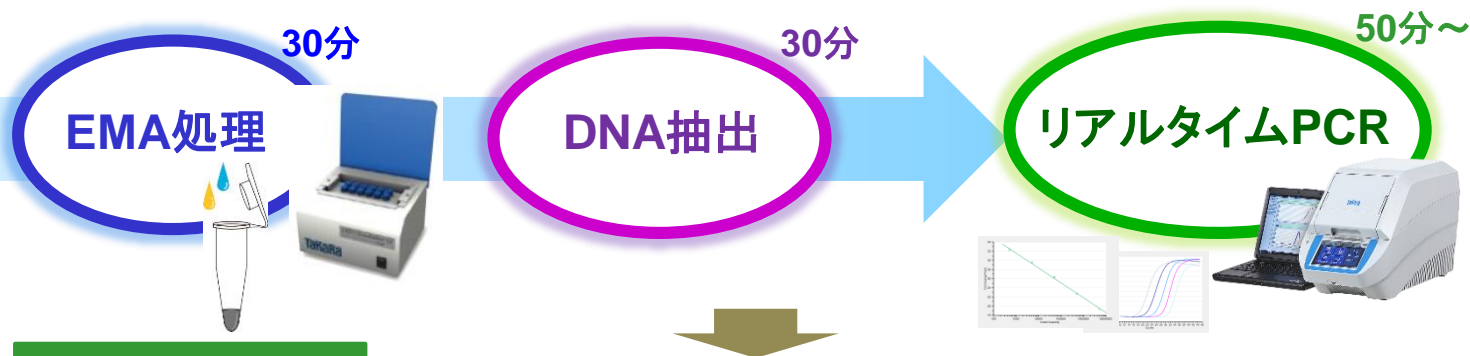


製品コード	容量	価格 (税別)
9183	50回	¥15,000

●Filter ColumnによりDNA抽出がさらに簡便に！

界面活性剤とPCR阻害物質を吸着する樹脂からなり、熱処理によりDNAを抽出します。吸着樹脂等の夾雑物はFilter Columnで除去できるため、簡便にDNA溶液の回収が可能です。

※従来品Lysis Buffer for Legionella (製品コード 9181) については、ウェブカタログをご覧ください。



リアルタイムPCR

レジオネラ属菌検出キット CycleavePCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit

(次ページをご参照ください)

製品コード	容量	価格(税別)
CY240S	25回	¥31,000
CY240	50回	¥57,000



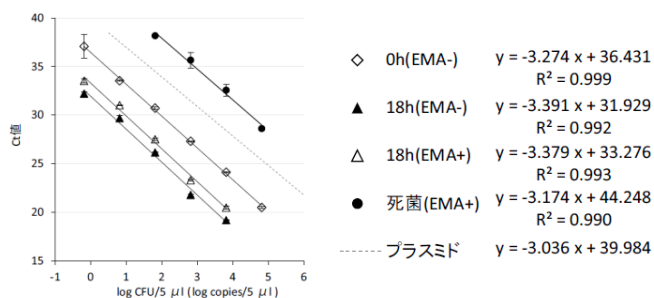
検出結果の判断基準について

■ LC EMA-qPCR法におけるレジオネラ属菌1 CFUあたりの16S Positive Controlコピー数の決定 (参考情報2より)

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。

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

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



■ LC EMA-qPCRによる浴槽水等における検査結果 (参考情報3より)

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%)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。

< 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%

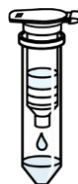
② レジオネラ属菌 生菌死菌検出法 (qPCR法)



DNA抽出

簡易抽出法

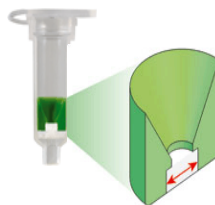
Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2



製品コード	容量	価格(税別)
9183	50回	¥15,000

カラム精製法

NucleoSpin® Tissue XS



製品コード	容量	価格(税別)
740901.10	10回	¥7,900
740901.50	50回	¥30,000
740901.250	250回	¥135,000

● 簡易抽出法、カラム精製法から選択可能

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水など汚染の少ない検体に適し、一方、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。



リアルタイムPCR

CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit

製品コード	容量	価格(税別)
CY240S	25回	¥31,000
CY240	50回	¥57,000

● 広範囲なレジオネラ属菌の検出をカバー

*L. londiniensis*を含む48菌種74株でターゲット遺伝子の増幅を確認しています。

● 定性検査、定量検査どちらにも使用可能

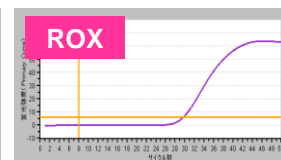
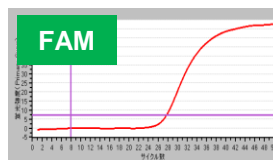
● インターナルコントロールによる偽陰性チェックが可能

厚生労働省通知では、インターナルコントロールによる偽陰性確認が推奨されています。

<キットの内容>

- 2 × Cycleave Reaction Mixture
- 16S Primer/Probe Mix
- Solution E
- 16S Positive Control
- EASY Dilution(for Real Time PCR)

レジオネラ
16S rRNA
遺伝子



インターナル
コントロール
(IC) 遺伝子

<厚生労働省通知>

1. 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)

<厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書>

2. 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) 公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 平成24年度分担研究報告書
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) 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

<その他指針など>

4. 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)

ウェブサイトのご紹介

レジオネラ属菌遺伝子検査法の情報をまとめた特設ウェブサイト「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(生菌検出法、生菌死菌検出法)」をぜひご活用ください。右のQRコードからアクセスしてください。



● 検査法をわかりやすくご紹介

① LC-EMA-qPCR法



② qPCR法



● 実験の準備から応用例まで 詳しく解説したハンドブック



● LC-EMA-qPCR実験動画



▼ 動画視聴はこちら ▼



訪問説明・デモンストレーションをご希望の方は
右の画像をクリックし、お申込みください。



レジオネラ属菌遺伝子検査

訪問説明・デモ

▶ 受付中!

<製品一覧>

	製品名	概要	容量	製品コード	価格 (税別)	LC EMA- qPCR法	qPCR 法
液体培養	Legionella LC Medium Base	液体培養に使用する培地のBase	90 ml	9016	¥16,500	○	/
EMA処理	Viable Legionella Selection Kit for LC EMA-qPCR	LC EMA-qPCR専用のEMA処理試薬	25回	7730S	¥18,000	○	/
			50回	7730	¥33,000		
	LED Crosslinker 12	EMA処理用光照射装置	一式	EM200	¥118,000	○	/
DNA抽出	Lysis Buffer for Legionella Ver.2	レジオネラ属菌専用の簡易DNA抽出試薬	50回	9183	¥15,000	○	○
	NucleoSpin® Tissue XS	泉質によるPCR反応阻害が予想される検体に	10回	740901.10	¥7,900	/	(○)
			50回	740901.50	¥30,000		
250回	740901.250	¥135,000					
リアルタイムPCR	CycleavePCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit	リアルタイムPCR試薬。レジオネラ属菌の16S rRNA遺伝子を検出	25回	CY240S	¥31,000	○	○
			50回	CY240	¥57,000		
リアルタイムPCR装置	Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC	2波長タイプ	一式	TP970	¥3,500,000	○	○

※「第4版レジオネラ症防止指針」記載のEMA-qPCR用製品もご用意しています。詳しくは弊社ウェブサイトをご覧ください。

★Thermal Cycler Dice® Real Time System III なら……



- 基本表示もレポート出力も日本語の「**完全日本語サポート**」
- **検査現場での使いやすさを追求した「食品環境検査用ソフトウェア」**搭載
- 出力ファイルは、「**専用解析ツール**」でらくらく解析！

リアルタイムPCR装置の実機を用いたデモを受付中です。お気軽にお問い合わせください。

■ 水質検査試薬 関連製品

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Cycleave RT-PCR <i>Cryptosporidium</i> (18S rRNA) Detection Kit	50回	CY230	¥72,500
Cycleave RT-PCR <i>Giardia</i> (18S rRNA) Detection Kit	50回	CY231	¥72,500

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。
 ・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。
 ・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
 ・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
 ・本パンフレット記載の価格は2020年11月26日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2020年11月作成N

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

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 <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店