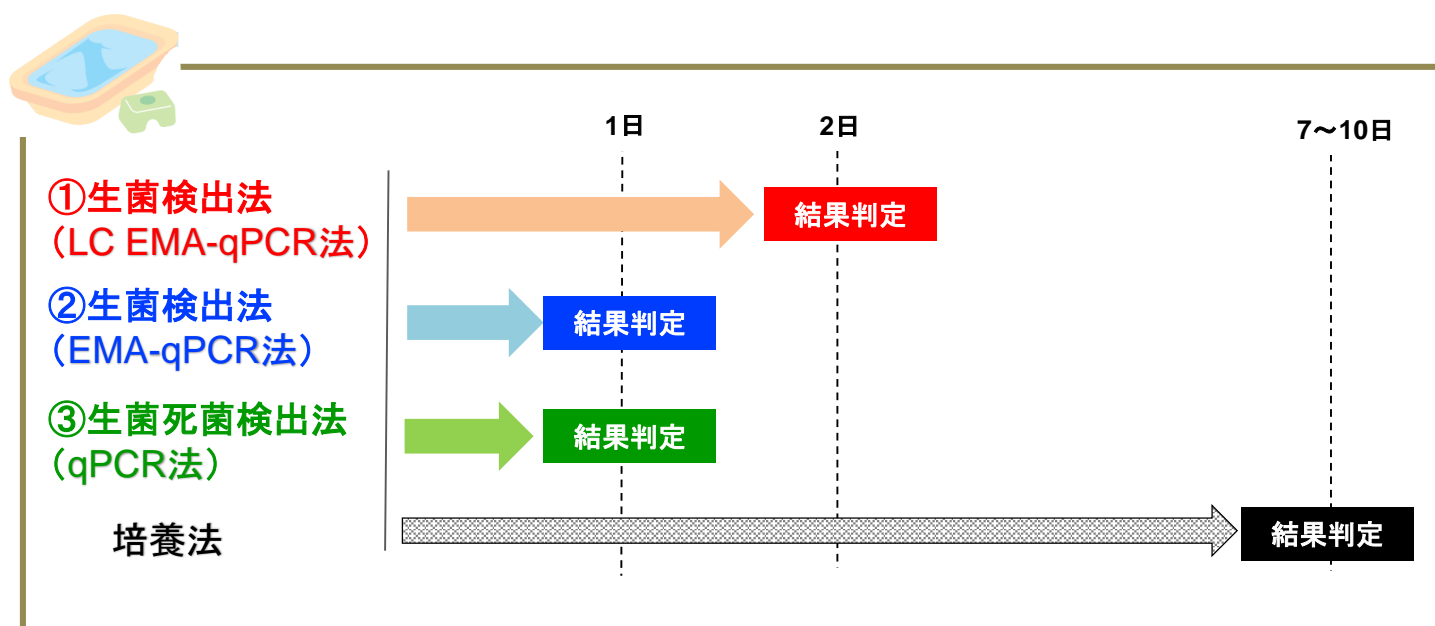


採水当日あるいは翌日の判定が可能に！

# レジオネラ属菌遺伝子検査システム

「第4版レジオネラ症防止指針」収載



＝ 培養検査前の迅速なスクリーニング検査法として活用できます ＝

平成29年8月に「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」が収載されました。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。

★ 試薬キット

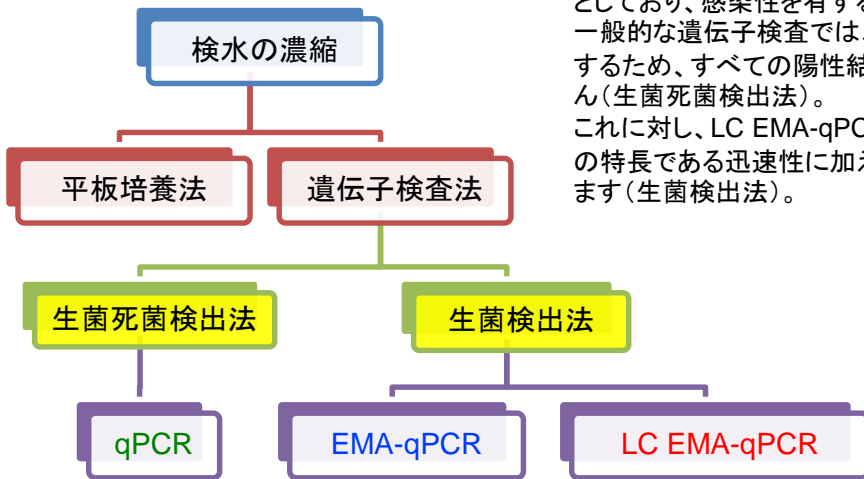
★ 装置

「レジオネラ属菌遺伝子検査システム」



# 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



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)。



## 遺伝子検査の活用について

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。

「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  
(平成27年3月31日、厚生労働省健康局生活衛生課通知 健衛発0331第7号)(6)  
レジオネラ迅速検査法(遺伝子検査法)の活用について より引用

・生菌死菌検出法

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。

・生菌検出法

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ります。

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に収載

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」が収載されました。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」(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)  
P42 5.2.5 生菌のみを検出する遺伝子検査法 より引用

(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ずることができる。**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。

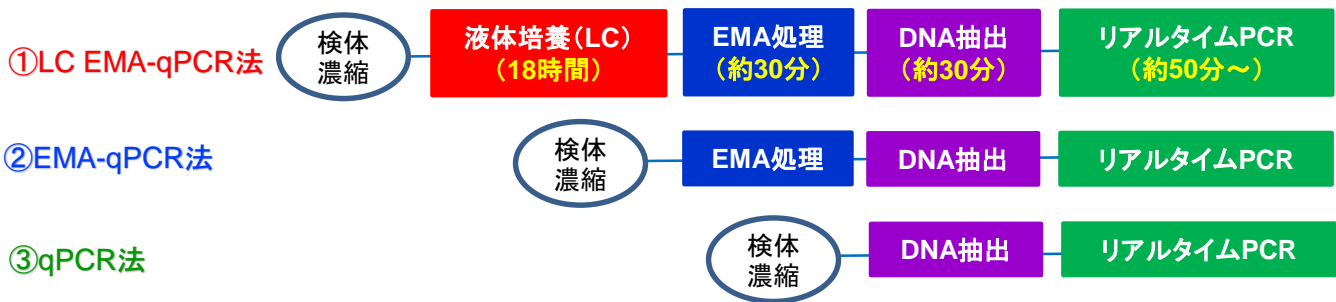
(2) LC EMA-qPCR法

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。**

## レジオネラ属菌の遺伝子検査法

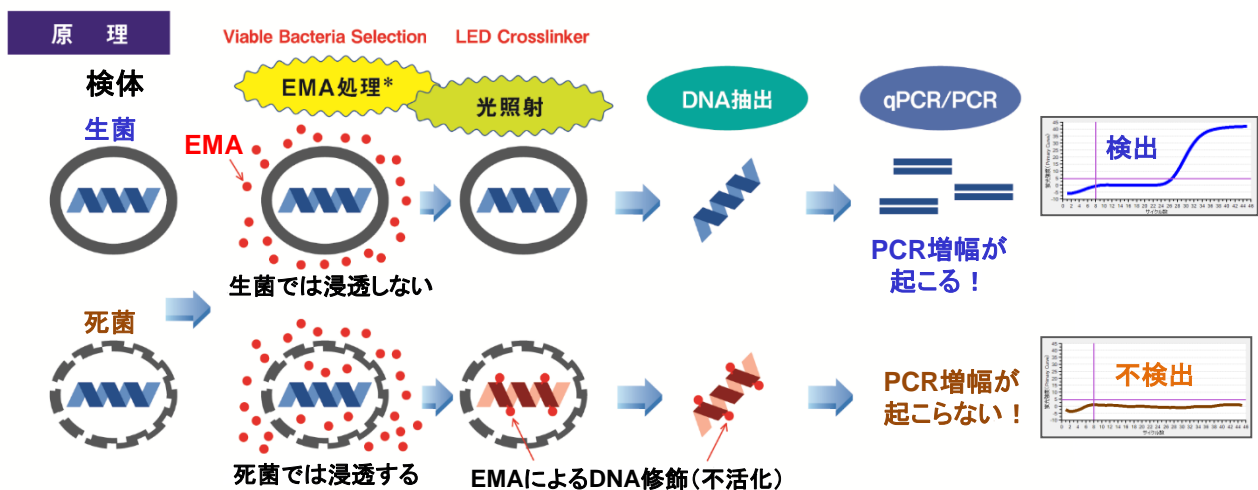
タカラバイオでは3タイプのレジオネラ属菌の検査法をご用意しております。いずれの方法も「第4版レジオネラ症防止指針」に迅速検査法として記載されており、採水当日もしくは翌日の結果報告が可能です。

| 分類          | 手法           | 概要                                    | 結果判定        | 検査法の特長   |
|-------------|--------------|---------------------------------------|-------------|--|
| 生菌<br>検出法   | ①LC 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<br>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       |
|             | ②EMA-qPCR    | 液体培養を行わず、ろ過濃縮検体をそのままEMA処理し、qPCR検出を行う。 | 検査開始<br>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<br>検出法 | ③qPCR        | ろ過濃縮検体からqPCR検出を行う。                    | 検査開始<br>1日目 | 死菌の存在も潜在的な汚染リスクとして評価できる                            |



## EMA-PCR法の原理

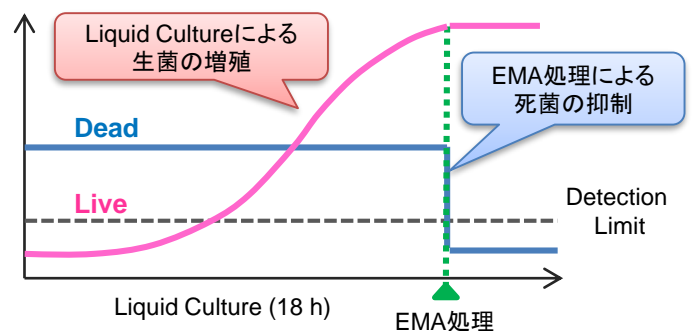
EMA (ethidium monoazide) は可視光に暴露すると核酸に共有結合する選択的膜透過性色素です。生菌を含む検体にEMAを含む試薬を添加して光を照射しても、生菌では薬剤が内部に浸透せずDNAへの化学修飾は起こりませんが、死菌由来DNAやその他、検体に含まれるDNAはEMAによって化学修飾されます。EMAにより修飾されたDNAは、PCR反応の鋳型とならないため、EMA処理後は生菌由来DNAのみが検出されます。EMA-PCR法とは、EMAが死菌由来DNAを修飾し、修飾を受けたDNAがPCR増幅できない状態となることを利用して、生菌由来DNAを選択的に検出する方法です。



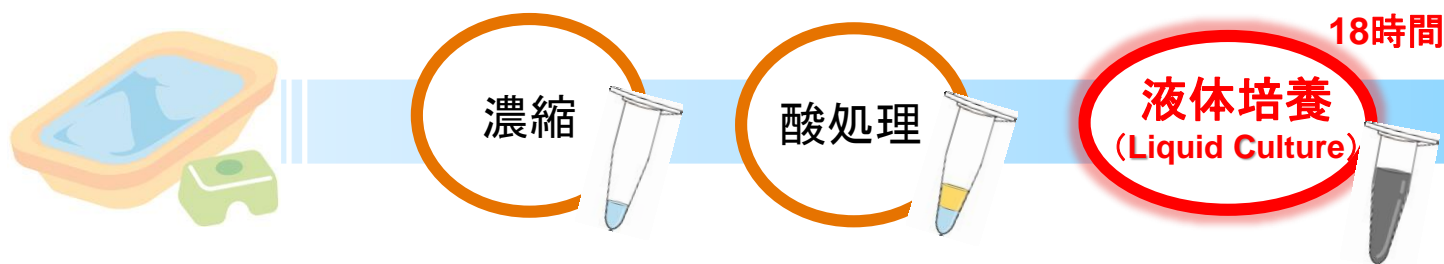
## LC EMA-qPCR法とは

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。18時間の液体培養により生菌のみが増殖し、相対的に生菌の選択性が向上します。



# ①レジオネラ属菌 生菌検出法(LC EMA-qPCR法)



## 採水翌日に、確実な生菌選択的検出が可能

LC EMA-qPCR法は、「液体培養による生菌の選択的増殖」と「EMA処理による死菌由来DNAからのPCR増幅の抑制」を組み合わせた生菌遺伝子検査法です。2つの技術の組合せにより、確実かつ高感度に生菌選択的な検出を行うことができ、浴槽水を対象とした場合に、培養法と高い相関性を示します。

### 液体培養

#### 液体培養に使用する培地のベース *Legionella* LC Medium Base

| 製品コード | 容量    | 価格(税別)  |
|-------|-------|---------|
| 9016  | 90 ml | ¥16,500 |

#### ●より確実な生菌の選択的検出に

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。

注: *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 発育サプリメント(関東化学(Oxoid)、Code:SR110)
- ・レジオネラMWY 選択サプリメント(関東化学(Oxoid)、Code:SR118)



### 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 | ¥107,800 |

#### ●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

#### レジオネラ菌専用のDNA抽出試薬

#### Lysis Buffer for *Legionella*

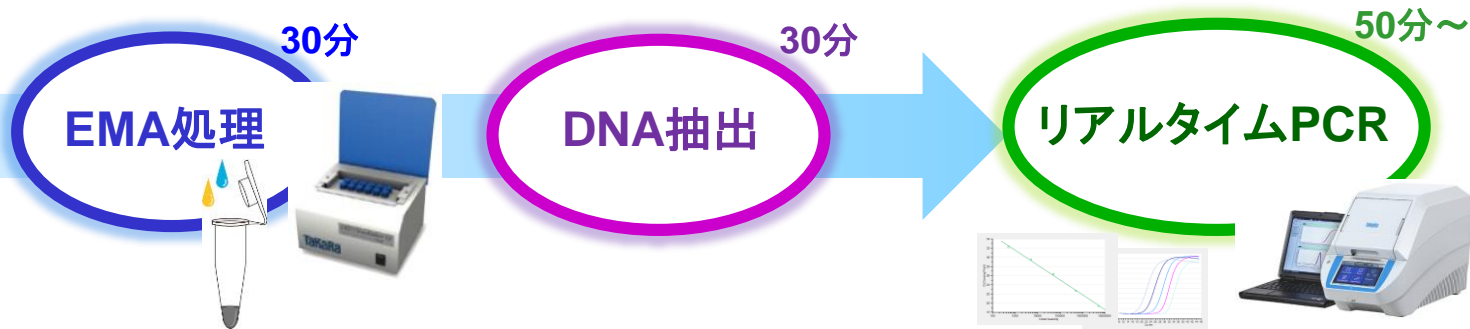
試薬を加えて95℃10分間加熱後、4℃で遠心分離、さらに5分間氷冷するだけです。

#### ●簡便な操作でDNA抽出

界面活性剤とPCR阻害物質吸着樹脂からなり、遠心後は吸着樹脂の上にゲル層が形成される仕組みで、初心者でも簡便にDNA溶液の回収が可能です。

| 製品コード | 容量  | 価格(税別)  |
|-------|-----|---------|
| 9181  | 50回 | ¥11,000 |





## リアルタイムPCR

### レジオネラ属菌検出キット

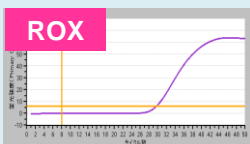
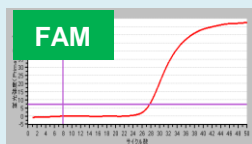
## CycleavePCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit

- 広範囲なレジオネラ属菌を検出可能  
L. londiniensisを含む74種で増幅を確認しています。

- 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

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

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



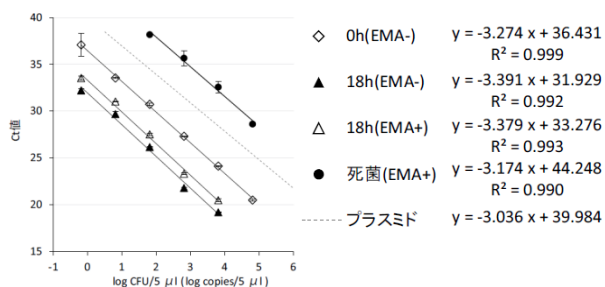
## 検出結果の判断基準について

「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」より引用

### ■ LC EMA-qPCR法におけるレジオネラ1 CFU あたりの16S Positive Control コピー数の決定

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。

$$18 \text{ 時間培養EMA処理後のコピー数(レジオネラ1 CFU 当り)} \\ 2^{(39.984 - 33.276)} = 104.5 \approx 100 \text{ コピー}$$



アメーバ培養レジオネラを用いたLC EMA-qPCR の検量線

「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

### ■ LC EMA-qPCR による浴槽水等における検査結果

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。

### 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

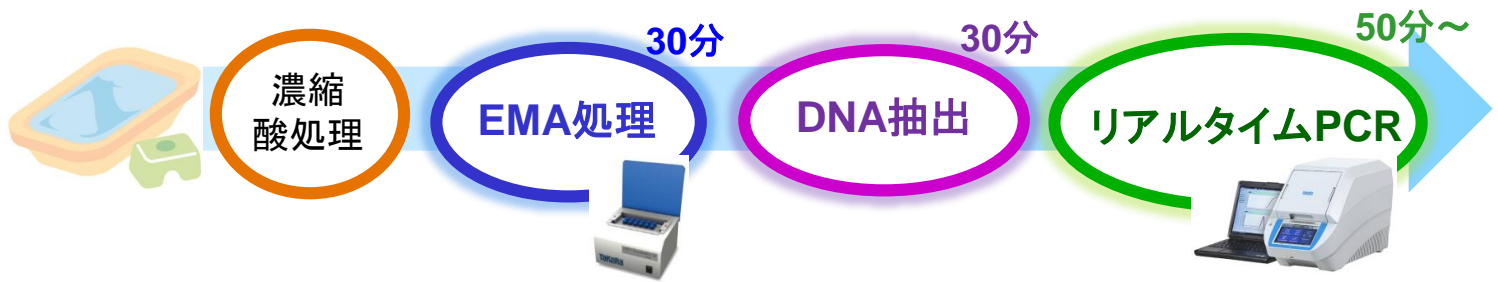
| LC EMA qPCR法 | 平板培養法 |      | 計   |
|--------------|-------|------|-----|
|              | ≥ 10  | < 10 |     |
| ≥ 1          | 125   | 82   | 207 |
| < 1          | 15    | 296  | 311 |
| 計            | 140   | 378  | 518 |

感度 89.3%、 特異度 78.3%

## ②レジオネラ属菌 生菌検出法(EMA-qPCR法)

採水当日に、迅速な生菌検出が可能

EMA-qPCR法は、液体培養を行わず、ろ過濃縮検水をそのままEMA処理し、リアルタイムPCRにより検出します。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ことがメリットです。  
(採水当日に判定可能)



<検出結果の判断基準について(EMA-qPCR法)>

Viabile *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0(製品コード7714)の取扱説明書において、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年度分担研究報告書)からの引用を参考情報としてご紹介しています。

### EMA処理

#### EMA試薬キット

#### Viabile *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0

EMA-qPCR法に至適化された専用のEMA試薬です。

#### 光照射装置

#### LED Closslinker 12



| 製品コード | 容量  | 価格(税別)  |
|-------|-----|---------|
| 7714  | 50回 | ¥55,000 |

| 製品コード | 容量 | 価格(税別)   |
|-------|----|----------|
| EM200 | 一式 | ¥107,800 |

### DNA抽出

#### 簡易抽出法

#### Lysis Buffer for *Legionella*

or

#### カラム精製法

#### NucleoSpin® Tissue XS



| 製品コード | 容量  | 価格(税別)  |
|-------|-----|---------|
| 9181  | 50回 | ¥11,000 |

| 製品コード      | 容量   | 価格(税別)   |
|------------|------|----------|
| 740901.10  | 10回  | ¥7,900   |
| 740901.50  | 50回  | ¥29,400  |
| 740901.250 | 250回 | ¥132,000 |

#### ● 簡易抽出法、カラム精製法から選択可能

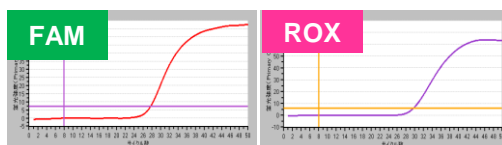
簡易抽出法は、操作が簡便で抽出効率も高いことから、塩素消毒が施された循環式浴槽水など汚染の少ない検体に適しており、泉質によるPCR 反応阻害が予想される検体にはカラム精製法が適しています。

### リアルタイムPCR

#### レジオネラ属菌検出キット

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

レジオネラ  
16S rRNA  
遺伝子



インターナルコントロール  
ロール(IC)  
遺伝子

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

### ③レジオネラ属菌 生菌死菌検出法(qPCR法)

採水当日に、死菌も含めたリスク評価が可能

レジオネラ属菌の16S rRNA遺伝子をターゲットとして、レジオネラ属の広範囲な菌種をリアルタイムPCRにより検出します。生菌死菌検出法では、死菌の存在も潜在的なリスクとして評価できます。



<検出結果の判断基準について(qPCR法)>

CycleavePCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit(製品コードCY240)の取扱説明書において、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)からの引用を参考情報としてご紹介しています。

#### リアルタイムPCR

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

● 広範囲なレジオネラ属菌の検出をカバー

L. londiniensisを含む74種でターゲット遺伝子の増幅を確認しています。検出可能な菌種リストは、説明書を参照してください。

● DNA抽出は、簡易抽出 or カラム精製法 から選択可能

簡易抽出法(Lysis Buffer for Legionella)は、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、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(NucleoSpin Tissue XS)が適しています。

● 定性検査、定量検査どちらにも使用可能

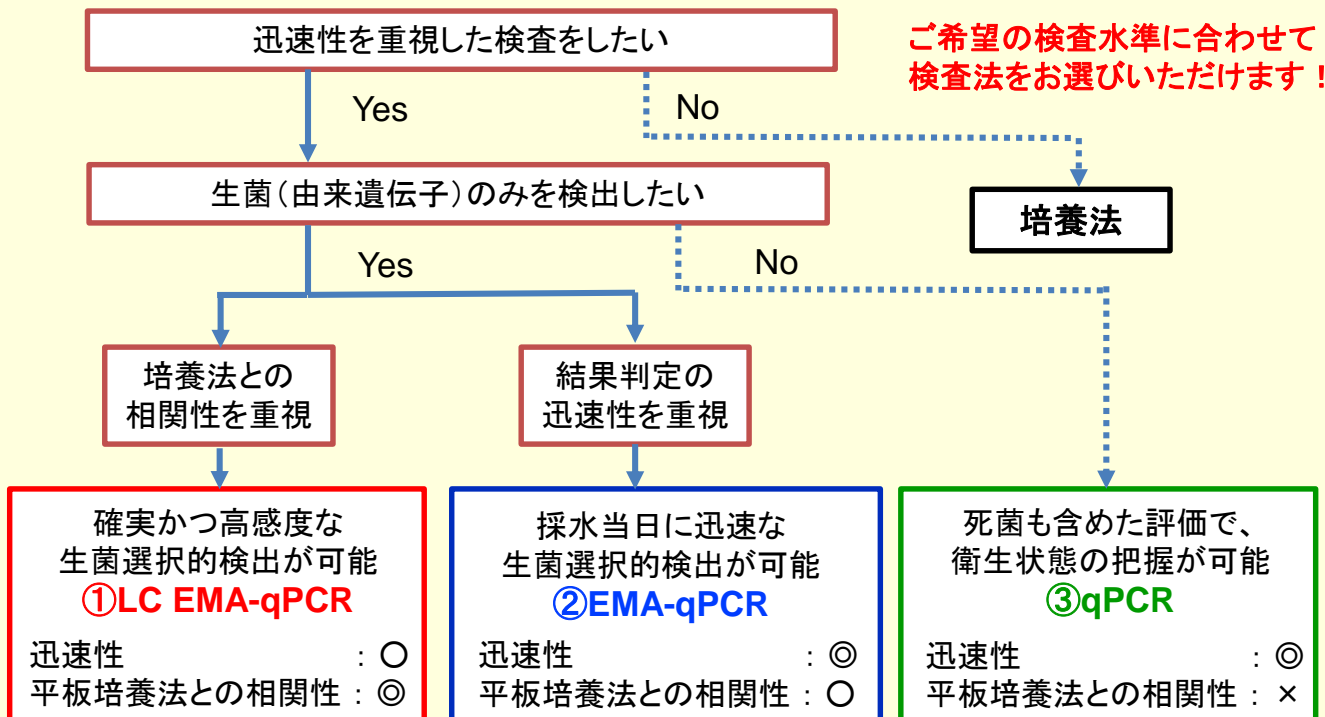
● インターナルコントロールによる偽陰性チェックが可能

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

<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)

### レジオネラ属菌 遺伝子検査選択ガイド



## <製品一覧>

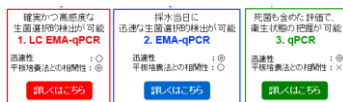
|           | 製品名   | 概要                                    | 容量    | 製品コード      | 価格<br>(税別) | LC EMA-<br>qPCR法 | EMA-<br>qPCR法 | qPCR<br>法 |
|-----------|---|---------------------------------------|-------|------------|------------|------------------|---------------|-----------|
| 液体培養      | <b>Legionella LC Medium Base</b>                        | 液体培養に使用する培地のBase                      | 90 ml | 9016       | ¥16,500    | ○                |               |           |
| EMA処理     | <b>Viable Legionella Selection Kit for LC EMA-qPCR</b>  | LC EMA-qPCR専用のEMA処理試薬                 | 25回   | 7730S      | ¥18,000    | ○                |               |           |
|           |   |                                       | 50回   | 7730       | ¥33,000    |                  |               |           |
|           | <b>Viable Legionella Selection Kit for PCR Ver.2.0</b>  | EMA-qPCR専用のEMA処理試薬                    | 50回   | 7714       | ¥55,000    |                  | ○             |           |
|           | <b>LED Crosslinker 12</b>                               | EMA処理用光照射装置                           | EM200 | EM200      | ¥107,800   | ○                | ○             |           |
| DNA抽出     | <b>Lysis Buffer for Legionella</b>                      | レジオネラ属菌専用の簡易DNA抽出試薬                   | 9181  | 9181       | ¥11,000    | ○                | ○             | ○         |
|           | <b>NucleoSpin® Tissue XS</b>                            | 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  | ¥29,400    |                  |               |           |
|           |   |                                       | 250回  | 740901.250 | ¥132,000   |                  |               |           |
| リアルタイムPCR | <b>CycleavePCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit</b> | リアルタイムPCR試薬<br>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    |                  |               |           |

### ウェブサイトのご紹介

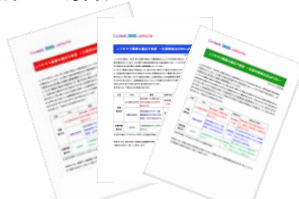
レジオネラ属菌遺伝子検査法の情報をまとめた特設ウェブサイトをご用意しています。ぜひご活用ください。

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

3タイプの検査法を  
わかりやすくご紹介



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法  
実験動画



視聴はこちらから



訪問説明・デモンストレーションもウェブサイトから受け付けております。

申込サイトURL : <http://www.takara-bio.co.jp/r/LegiDEMO/>

レジオネラ属菌遺伝子検査

訪問説明・デモ ▶ 受付中!

### ■ 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2019年4月1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。

2019年4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