

## レジオネラ属菌の遺伝子検査～生菌死菌検出法(qPCR)～

(2025年7月改訂版)

レジオネラ症は、1976年に米国で発生した集団肺炎によってその存在が知られ、世界各国で発生事例が報告されています。わが国でも届出患者数は年々増加傾向にあり、レジオネラ症の予防対策は、いまや国民生活と深く関わる重要な健康課題となっています。

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。

qPCR法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ます。

分類	手法	用途	結果判定	検査法の特長
生菌検出法	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、確実に生菌を選択的に検出できる。
生菌死菌検出法	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。

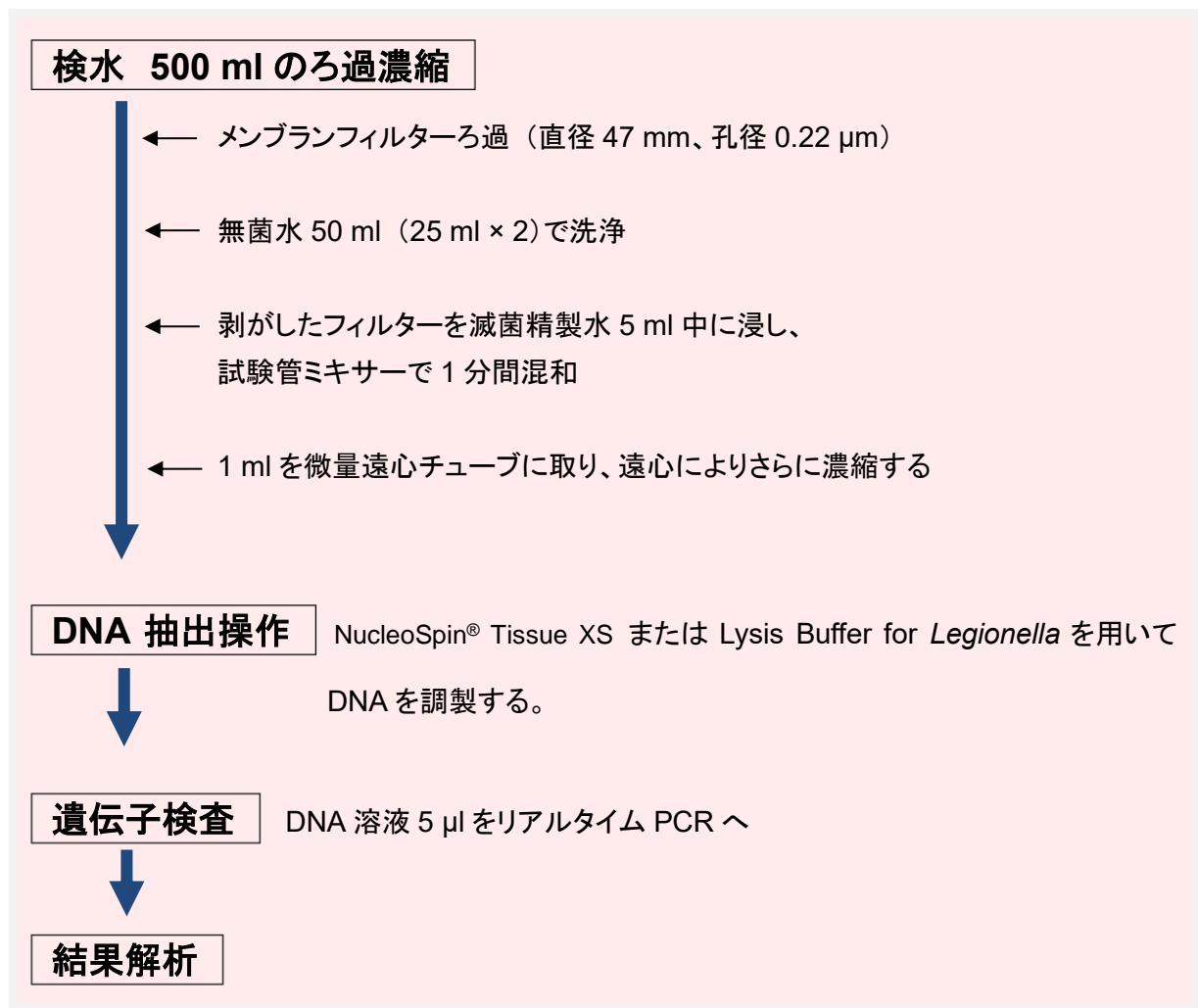
本冊子では、死菌の存在も潜在的な汚染リスクとして評価できる「生菌死菌検出法(qPCR法)」について、その原理から操作方法まで、詳しくご紹介します。

## 目次

1. qPCR法によるレジオネラ属菌検査を始めるにあたって	2
1) qPCR法による検査の流れ	
2) 必要な実験器具・装置	
3) 実験環境について	
2. リアルタイムPCR(qPCR)実験の概要	11
1) リアルタイムPCRの用途	
2) リアルタイムPCR装置による検出の原理	
3) 蛍光検出法	
4) 検量線の作成と定量について	
3. 実験操作について	14
1) 検水のろ過と濃縮サンプルの作製	
2) DNA調製	
3) リアルタイムPCR	
4) 解析(データ解析の一例)	
4. 関連製品一覧	23

## 1. qPCR法によるレジオネラ属菌検査を始めるにあたって

## 1) qPCR法による検査の流れ



## 【レジオネラ属菌検査の原則】

1. 分離されたレジオネラ属菌の取り扱いは、レベル2の実験室で行う。
2. レジオネラ属菌の検査は、第4版レジオネラ症防止指針の「第5章レジオネラ属菌の検査法」を参考に実施する。
3. 培養法における陽性結果は、感染能力を有する生菌の存在を示している。
4. 遺伝子検査法は、死菌の存在により陽性となることに注意しなければならない。
5. 遺伝子検査は、その特徴を十分に理解して利用することが必要である。
6. 同一検体であっても、培養法・分離法の違いにより異なるレジオネラ属菌が分離されてくる可能性があることに注意しなければならない。
7. 我が国におけるレジオネラ属菌検査の精度管理システムの構築が望まれる。

-第4版レジオネラ症防止指針・第4章レジオネラ属菌検査の原則(P30)より抜粋引用-

**～レジオネラ属菌生菌遺伝子検出法（LC EMA-qPCR 法）～**

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 の抑制」という 2 つの技術を組み合わせた、迅速性と生菌選択性を兼ね備えた遺伝子検査法であり、培養法と高い相関性を示す。

令和元年 9 月 19 日に発出された厚生労働省医薬・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 0910 第 1 号）に、定量可能な迅速検査法（遺伝子検査法）のひとつとして収載されており、その中で LC EMA-qPCR の用途については、「迅速検査法で [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」と記載されている。詳しくは、下記の資料を参照してください。

\* : [ ] 内の文言は補足のためにタカラバイオで追記

◆別冊のハンドブック「レジオネラ属菌の遺伝子検査～生菌検出法（LC EMA-qPCR）～」

[https://www.takara-bio.co.jp/research/kensa/pdfs/book\\_8-1.pdf](https://www.takara-bio.co.jp/research/kensa/pdfs/book_8-1.pdf)

◆Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR（製品コード 7730）の説明書

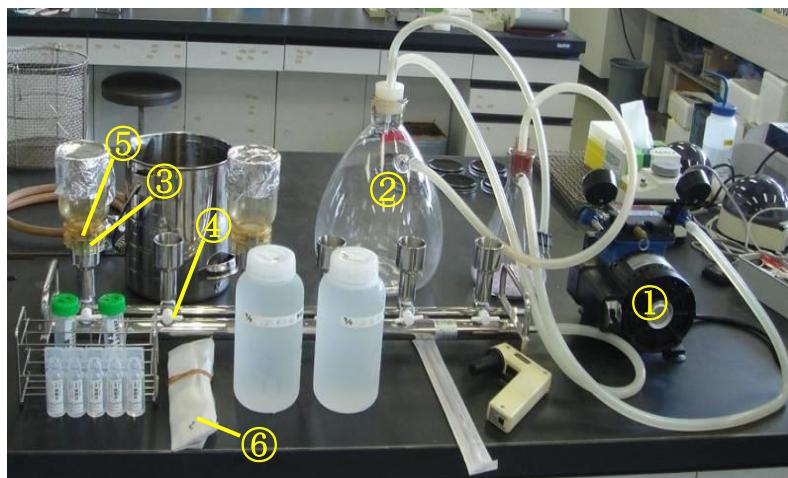
[https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/7730\\_7730s\\_j.pdf](https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/7730_7730s_j.pdf)



## 2) 必要な実験器具・装置

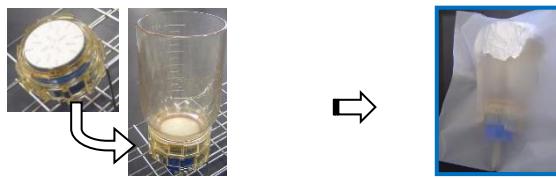
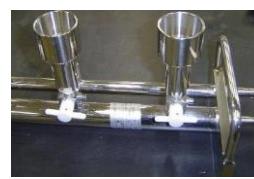
Thermal Cycler Dice® Real Time SystemシリーズとCycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (製品コード CY240/CY240S)を用いたレジオネラ属菌検出を実施するにあたって必要な器具類について、ご紹介します。

### 【ろ過濃縮法】



※器具類はすべて、滅菌済のものを使用

洗剤でしっかり洗浄  
↓  
蒸留水で洗い流す  
↓  
オートクレーブ or 乾熱滅菌

	器具名称	参考
①	吸引ポンプ	
②	吸引ピン	
③	フィルターホルダー	滅菌済のピンセットを使用し、滅菌メンブランフィルターをホルダーにセットした後で、カップを装着する(使用するまでは、カップ上部をアルミホイル等で覆っておく)。   組立て後、専用バックに入れてオートクレーブ処理をして保管しておくと便利。
④	フィルターホルダー マニホールド	フィルターホルダーを複数接続できるマニホールド。使用後は、よく洗浄する。  
⑤	滅菌メンブランフィルター	必ず滅菌済ピンセットで取り扱いを行う。フィルターホルダーへの装着は、レジオネラ属菌の存在しないクリーンな環境で、滅菌済ピンセットや手袋を用いて実施すること。  



⑥	滅菌ピンセット	検体ろ過済のフィルターを取り扱うときは、検体ごとに必ず別々のピンセットを使用する(コンタミネーションの原因となるため、ピンセットの使いまわしは厳禁)。ピンセットを洗浄後、ひとつひとつアルミホイルなどに包んで、オートクレーブあるいは乾熱滅菌を行い、準備しておくと便利。
⑦	滅菌 50 ml ポリプロ ピレンチューブ	ろ過済のフィルターからろ過物をバッファー中に懸濁する。
⑧	攪拌機	ろ過済のフィルター上にトラップされたレジオネラ属菌をバッファー中に懸濁するため使用する。

#### ＜クロスコンタミネーション防止のための注意事項＞

- ホルダーにフィルターをセットする際には、最大限、汚染に留意をする。  
    鋳型となるものが存在し得ない環境で、手袋を着用の上、滅菌済のピンセットを用いてセットする。  
    ここで使用するピンセットは、他用途と兼用にしない。
- ろ過済フィルターを扱うときは、検体ごとに滅菌済のピンセットを準備する。  
    コンタミネーションを避けるため、必ず徹底する。
- 器具は乾熱滅菌する。  
    基本的に、使用器具はディスポーザブルが理想であるが、乾熱滅菌したうえで繰り返し使用してもよい。乾熱滅菌できないフィルターホルダーなどは、2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液中で処理し、よく洗浄してから使用する。(オートクレーブは変性や滅菌には効果があるが、完全なDNA分解はできない。)



## 【DNA 調製】

器具名称	参照
50 mlポリプロピレンチューブ	—
マイクロピペット	①
マイクロピペット用フィルター付きチップ	②
攪拌機	③
小型卓上遠心機	④
アイスボックス	⑥
ヒートブロック	⑦
微量高速遠心機	⑧

## 【リアルタイム PCR】

器具名称	参照
マイクロピペット	①
マイクロピペット用フィルター付きチップ	②
攪拌機	③
小型卓上遠心機	④
チューブスタンド	⑤
アイスボックス	⑥
リアルタイムPCR用装置	⑨
リアルタイムPCR用反応チューブ	⑩

## 【その他】

- ディスポーザブル手袋(パウダーフリータイプ)、白衣、スリッパ、マスク  
実験エリアごとに専用のものを用意することで、コンタミネーション防止に役立ちます。

## 【器具詳細一覧】

器具名称	用途・詳細
① マイクロピペット	少量の液体の分取等に使用する器具です。扱う液量に応じて、適切なサイズ(20 $\mu$ l用、200 $\mu$ l用、1,000 $\mu$ l用、10 $\mu$ l用等)のものを使用します。 コンタミネーション防止のため、必ず用途別に分けてください。それぞれの実験エリアからの持ち出しあは禁止することをお勧めします。(コンタミネーションの原因となるため、兼用は避けてください)
② マイクロピペット用 フィルター付きチップ	マイクロピペットの先端に取り付けて使用する消耗品です。エアロゾルによるコンタミネーションを防止するため疎水性フィルター付きのチップを使用します。各メーカー、マイクロピペットに対応した滅菌済のものが販売されています。 リアルタイムPCRはわずか1分子の鑄型の検出も可能であるため、反応液調製時に鑄型となりうる核酸等が混入しないように細心の注意が必要です。
③ 搅拌機	サンプルと試薬を混合するためなどに使用します。
④ 小型卓上遠心機	反応液をチューブに分注後、チューブ壁などに飛散した反応液をスピンダウンするときに使用します。
⑤ チューブスタンド	1.5 ml と 0.2 ml の PCR チューブに対応したものがあると、便利です。 PCRチューブ(96穴プレート)に対応した金属製スタンドは、氷上にセットすることで冷却しながら反応液を調製できるのでお勧めです。
⑥ アイスボックス	発泡スチロール製などのアイスボックスにクラッシュアイスを入れて使用します。反応液調製時に試薬や反応液のチューブを立てて冷却し、試薬の劣化を防ぎます。
⑦ ヒートブロック	DNAの熱抽出(95°C)等に使用します。
⑧ 微量高速遠心機	1.5 mlチューブを遠心する装置。EMA処理後の集菌やDNA抽出の際に使用します。
⑨ リアルタイムPCR用 装置	リアルタイム PCR 反応に使用します。結果の解析は、付属のソフトウェアで行います。  Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC(製品コード TP1010 等)
⑩ リアルタイムPCR用反応 チューブ	独立型フラットキャップ付き8連チューブをお勧めします。ひとつひとつふたの開閉ができる、コンタミネーション回避に役立ちます。切り離せばシングルチューブとしても利用できます。  0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps(製品コードNJ902) Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (製品コードTP1010)向け8連チューブ



### 3) 実験環境について

菌体の取り扱いには十分に注意し、必要に応じて安全キャビネット内で操作してください。また、PCR による検出は非常に高感度です。コンタミネーションを防止するために、サンプルの調製から PCR 検出まで次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。正しい結果を得るために、以下の注意点をご確認ください。

#### ・バイオセーフティ規定を順守する

病原微生物感染が疑われる検体を取り扱う際の検査担当者の安全を目的とします。施設内の該当規則を遵守すると共に、適切なバイオセーフティレベルの実験施設で取り扱ってください。バイオセーフティに関する規定については「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」で確認できます。

([病原体等安全管理規程\(改訂第三版\)](#))

#### ・核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)のコンタミネーションを防止する

DNase、RNase の混入による核酸の分解防止を目的とします。万一、サンプルやプローブ、プライマーなどの核酸がヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブル手袋の交換およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。

#### ・遺伝子のコンタミネーションを防止する

器具間の核酸クロスコンタミネーションや、増幅産物の混入による誤判定防止を目的とします。PCR による検出は非常に高感度なため、ごく微量な混入でも増幅の原因となります。作業エリアを物理的に隔離し、実験器具や着衣の取り扱いにも注意してください。

## 【コンタミ対策 3箇条】

## 1. PCR 産物の拡散防止

- ・PCR 反応後のチューブのフタを開けない
- ・PCR 反応後のチューブはオートクレーブ厳禁

リアルタイム PCR の場合は電気泳動が不要なので、PCR 反応後のチューブのフタを開けさえしなければ、PCR 産物の拡散防止が可能です。誤ってオートクレーブしないよう、反応後のチューブの捨て場は他のゴミとは別にしましょう。

## 2. クロスコンタミの防止

- ・チューブのフタの開閉時は要注意
- ・エアロゾルの発生に注意
- ・チップの交換、廃棄を適切に

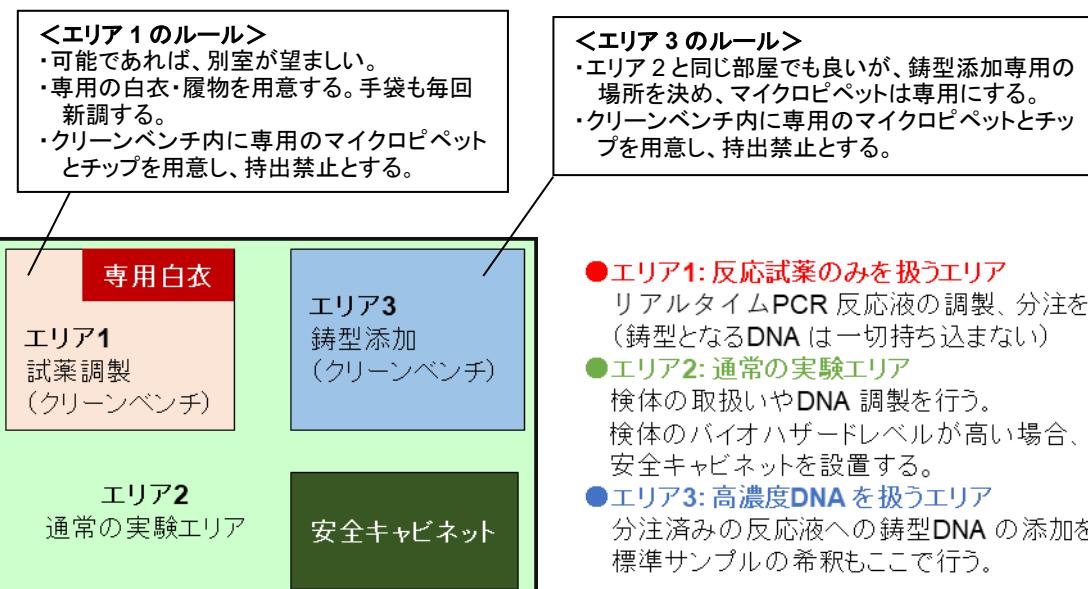
クロスコンタミを防止するには、DNA が付着している部分を想像してみます。チューブのフタから手袋へ…、チップの先の気泡がはじけてエアロゾルが発生…など。DNAが空中に舞っている可能性も想定して、フタを開ける時間は最小限にしましょう。

また、使用後のチップは使い捨てのビニール袋などに入れ、こまめに廃棄しましょう。

## 3. エリア分けの徹底

- ・作業場所をエリア1～3に区分
- ・器具類も適切に使い分けを

試験環境の整備も効果的です。エリア分けのルールを徹底し、器具類の使い分けを確実にすることで、高濃度DNA の検体が存在した場合にもクロスコンタミのリスクを抑制することができます。



※各エリアの区分けは、部屋ごとの区別でも、一部屋の中で簡易クリーンベンチによる区分けでも問題ありません。



## 【コンタミ防止に必要なもの】

- ・ フィルター付きチップ  
マイクロピペットのチップは、マイクロピペットの汚染防止のためフィルター付きを使いましょう。
- ・ DNA-OFF® (DNA コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9036)  
非アルカリ性、非腐食性、非発がん性のDNAコンタミネーション除去試薬で、実験台や器具などのあらゆる表面からDNAを除去することができます。界面活性剤を含む、安定で耐熱性のあるready-to-useなDNA除去試薬です。  
★汚染除去だけでなく、日常的な清掃にも使用することで“DNA Clean”な状態を保ちましょう。

## ～コンタミ対策チェックリスト～

- エリア1、2、3の区分けをしている。
- マイクロピペット等の器具類を作業別に使い分けている。
- マイクロピペットはフィルター付きチップを使用する。
- チューブのフタを開ける前にはしっかりスピンドウンする。

注意:PCR産物のフタは開けてはいけません！

- チューブのフタを開ける際は、フタの裏に触れないよう注意する。
- チューブは静かに開ける。
- チューブのフタを開けておく時間は最小限にする。
- フタを開けたチューブの上は極力避け、分注操作を行う。
- PCR 反応後のチューブは、専用のゴミ袋へ廃棄する。

注意:PCR反応後のチューブは、オートクレーブ厳禁です！

コンタミネーションが発生すると、実験結果に影響を及ぼすので、事前に可能な範囲で実験環境の整備をしておくことをお勧めします。万一コンタミネーションが発生した場合は、考えられる原因にひとつひとつ対処してください。

試薬へのコンタミネーションが疑われるときは、新しいものに取り替える必要があります。実験台や器具類は洗浄を徹底してください。



## 2. リアルタイムPCR(qPCR)実験の概要

### 1) リアルタイムPCRの用途

リアルタイムPCR法は、遺伝子組み換え食品の検査、ウイルスや病原菌の検出、検体中のウイルス量の解析などさまざまな用途に応用されています。反応後に電気泳動で増幅産物の確認を行う必要がないので、簡便・迅速に結果が得られ、コンタミネーションのリスクが低いといった長所があるためです。近年、従来のPCR法で行われていた遺伝子検査がリアルタイムPCRへ移行する例も多数あります。

#### ＜定性解析におけるリアルタイム PCR の利点＞

- ・ 操作が簡便で迅速に結果が得られる
- ・ コンタミネーションのリスクが低い

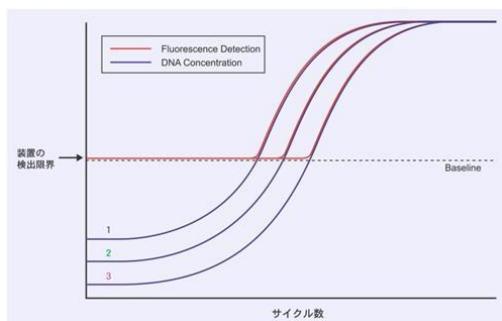
#### ＜定量解析におけるリアルタイム PCR の利点＞

- ・ 操作が簡便で迅速に結果が得られる
- ・ コンタミネーションのリスクが低い
- ・ 広いダイナミックレンジで正確な定量ができる

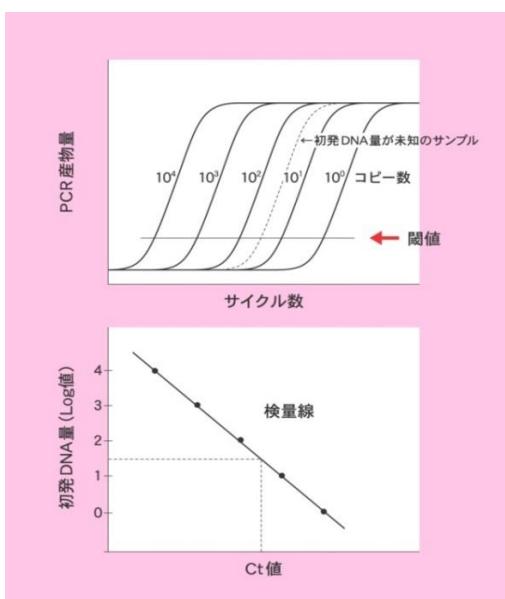
### 2) リアルタイムPCR装置による検出の原理

リアルタイムPCRでは、PCR増幅産物をリアルタイムでモニタリングするため、指数関数的増幅域での正確な検出を行うことができます。これは、エンドポイントで解析する従来のPCR法などとは大きく異なる点です。

PCRでは、1サイクルごとにDNAが2倍、4倍、8倍、……と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達します。この増幅の様子を、蛍光のシグナル強度の上昇という形で、リアルタイムPCR装置の画面でモニタリングします。得られた蛍光強度の増加量を単位時間ごとにプロットした曲線を増幅曲線と呼びます。



左記は、典型的な増幅曲線の模式図です。DNA濃度(実際の増幅産物量)を青線で示し、それを蛍光により検出したシグナル強度を赤線で示しています。PCR増幅産物量が装置の蛍光検出できる量に達すると、増幅曲線が立ち上がり始め、指数関数的にシグナルが上昇した後、プラトーに達します。Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズの結果解析画面上には、赤線部分のみが表示されます。



初発のDNA量が多いほど、増幅産物量は早く検出可能な量に達するので、増幅曲線が早いサイクルで立ち上がってきます。よって、段階希釈したスタンダードサンプルを用いてリアルタイムPCRを行うと、初発DNA量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が得られます。増幅直線上の適当なところに閾値(Threshold)を設定し、閾値と増幅曲線が交わる点をCt値(Threshold Cycle)として算出します。

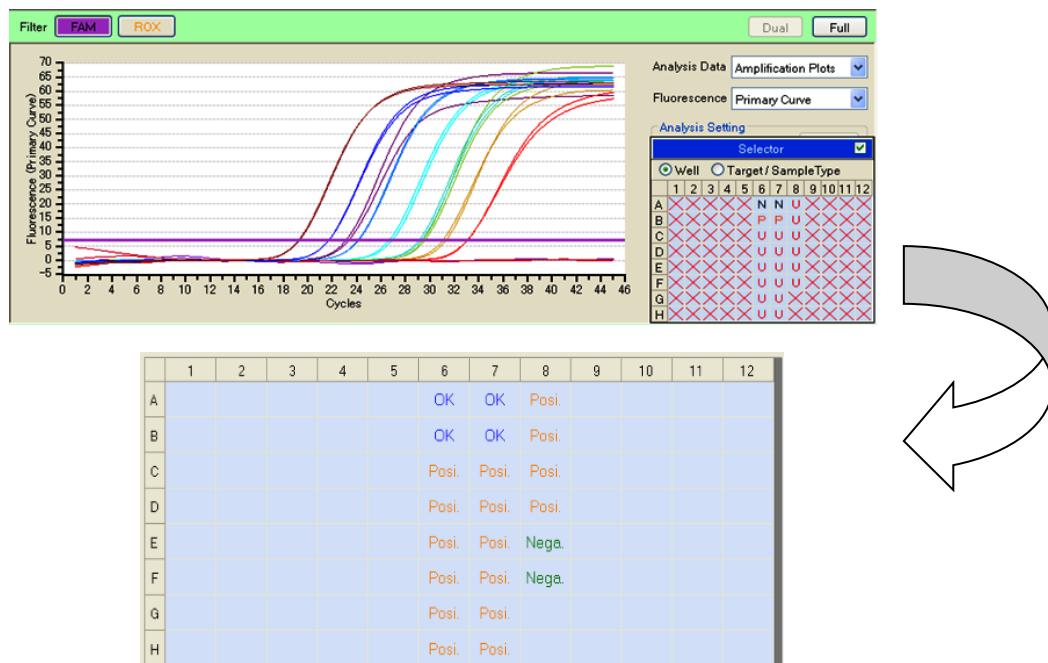
リアルタイムPCR用キットでは、こうして得られたCt値を利用し、結果判定を行っています。また、Ct値と初期鑄型量の間には直線関係があり、左図のような検量線を作成することができます。未知サンプルについてもスタンダードサンプルと同様にCt値を算出し、この検量線に当てはめれば、初期鑄型量を求めることが可能です。

◎スタンダードサンプルを用いてCt値を元に検量線を作成し、未知サンプルを定量する場合のモデルケース  
(Ct値:PCR増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数)



各種キットを利用した例では、主にPlus/Minus Assayによる定性解析法で結果を求めていきます。

ある一定サイクル数の間に目的の遺伝子が増幅し、Ct値が算出できたものをプラス（Posi）、目的遺伝子が増幅せずCt値が算出できなかったものをマイナス（Nega）と判定し、装置画面には下の図のように表示されます。



Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズの表示画面

### 3) 蛍光検出法

#### 【蛍光検出の原理】

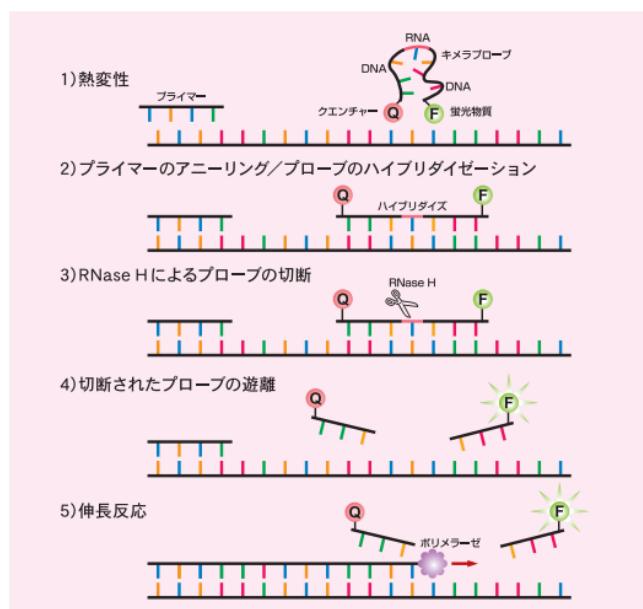
リアルタイムPCRでは、PCR増幅産物を蛍光により検出します。蛍光検出法には、インターラマーラーを用いる方法と蛍光標識プローブを用いる方法の2種類があります。

ここでは、CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (製品コード CY240/CY240S)に採用されている「サイクリングプローブ法」についてご紹介します。

#### サイクリングプローブ法

リアルタイムPCRでは、反応液の中にあらかじめ蛍光プローブあるいは蛍光色素を添加し、目的遺伝子の増幅をリアルタイムでモニタリングします。

サイクリングプローブは、RNAとDNAからなるキメラオリゴヌクレオチドで、片方の末端が蛍光物質で、もう一方の末端がクエンチャー物質で修飾されています。インタクトな状態では蛍光を発しませんが、PCR増幅産物とハイブリッドを形成すると、反応液中に含まれるRNase HによりRNA部分が切断されて蛍光を発します。サイクリングプローブのRNA付近にミスマッチが存在するとRNase Hによる切断は起こらないので、非常に配列特異性の高い検出が可能です。



### 4) 検量線の作成と定量について

#### 【検量線作成用の標準サンプル】

検量線作成用の標準サンプルとしては、基本的には、目的遺伝子の配列を有しているDNAやRNAが使用できます（プラスミドDNAなど）。レジオネラ属菌の検出では、第3版レジオネラ症防止指針に*L. pneumophila*基準株を用いた検量線作成用の希釈系列を標準サンプルとして使用する方法が紹介されていますが、CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (製品コード CY240/CY240S)を使用する場合には、キットに添付されている16S Positive Controlを標準サンプルとして使用することができます。

### 3. 実験操作について

#### 1) 検水のろ過と濃縮サンプルの作製 (エリア2で実施)

##### 【操作】

1. 検水500 mlをメンブレンフィルター\* (直径47 mm、0.22  $\mu\text{m}$ ) で吸引ろ過する。

\* アイソポア (Isopore)メンブレンフィルター

(メルクミリポア(製品コード GTTP04700)、ポリカーボネート製)



2. メンブレンフィルターおよびカップを、注射用蒸留水(大塚製薬)等 50 mlにて洗浄し吸引ろ過する。蒸留水は、カップ壁面を洗うようにピペットで流しかける。(25 ml×2回)



3. 50 ml滅菌ファルコンチューブに、注射用蒸留水5 mlを入れて準備しておく。



4. 滅菌ピンセットで吸引を終えたフィルターを剥がし、準備しておいたポリプロピレンチューブに入れる。



5. 1分間ボルテックスする。フィルター全体にまんべんなく滅菌水が接触するよう、適度にチューブの角度を調整しながら実施する。



6. ポリプロピレンチューブからフィルターを取り出し、100倍濃縮液(約5 ml)が完成。

7. 100倍濃縮液 5 mlのうち1 mlをマイクロチューブに採取する。



8. 13,000 ~15,000 rpm、4°Cで5 分間遠心分離後、DNA抽出方法に応じて上清を除去する。

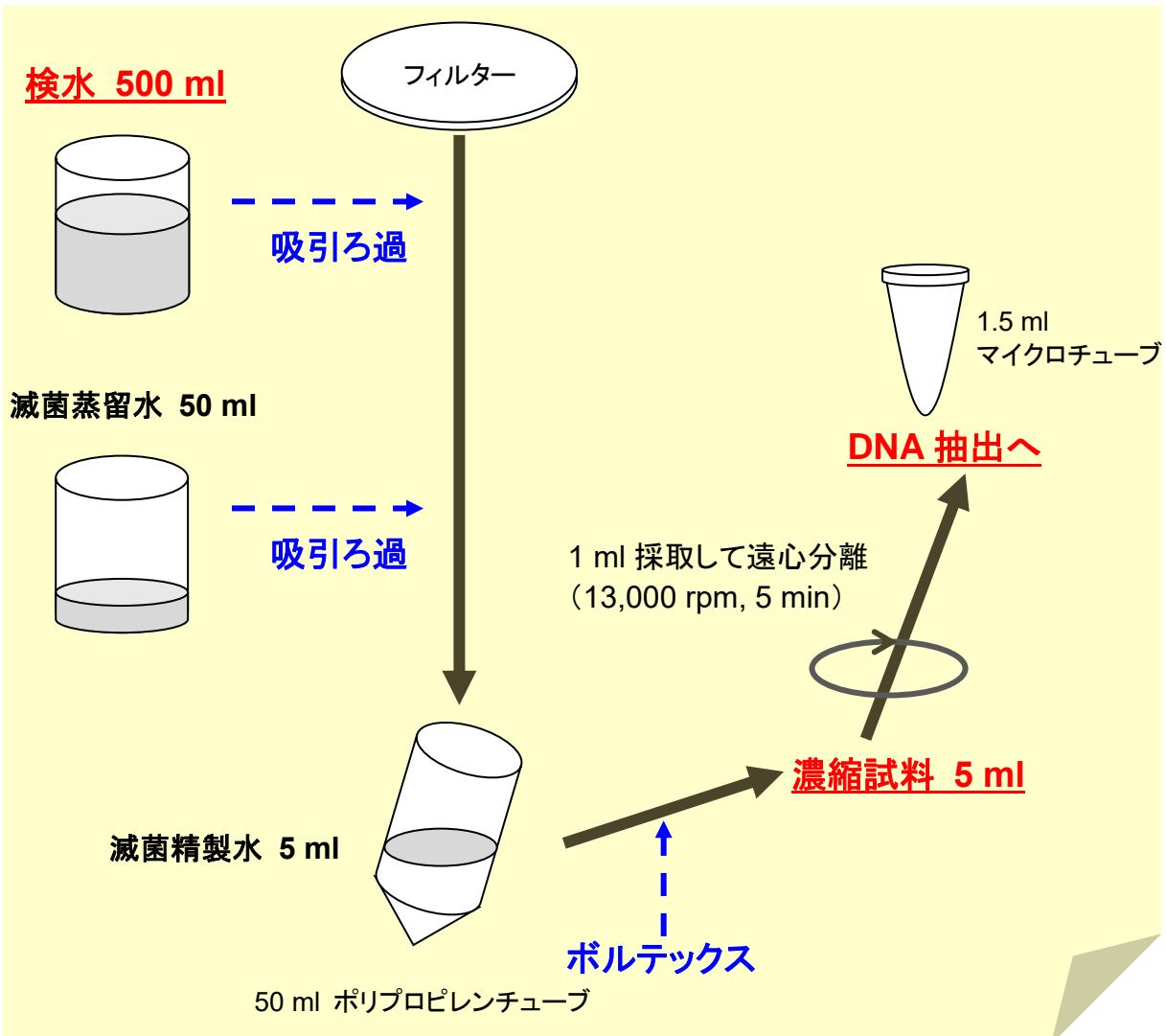
##### NucleoSpin® Tissue XSを用いる場合

上清940  $\mu\text{l}$  をマイクロピペットで穩やかに吸い取って除去し、残渣液60  $\mu\text{l}$  を残す。

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

すべての上清をマイクロピペットで穩やかに吸い取って除去する。ペレットを吸わないように注意すること(少量の液体が残っていても問題はない)。



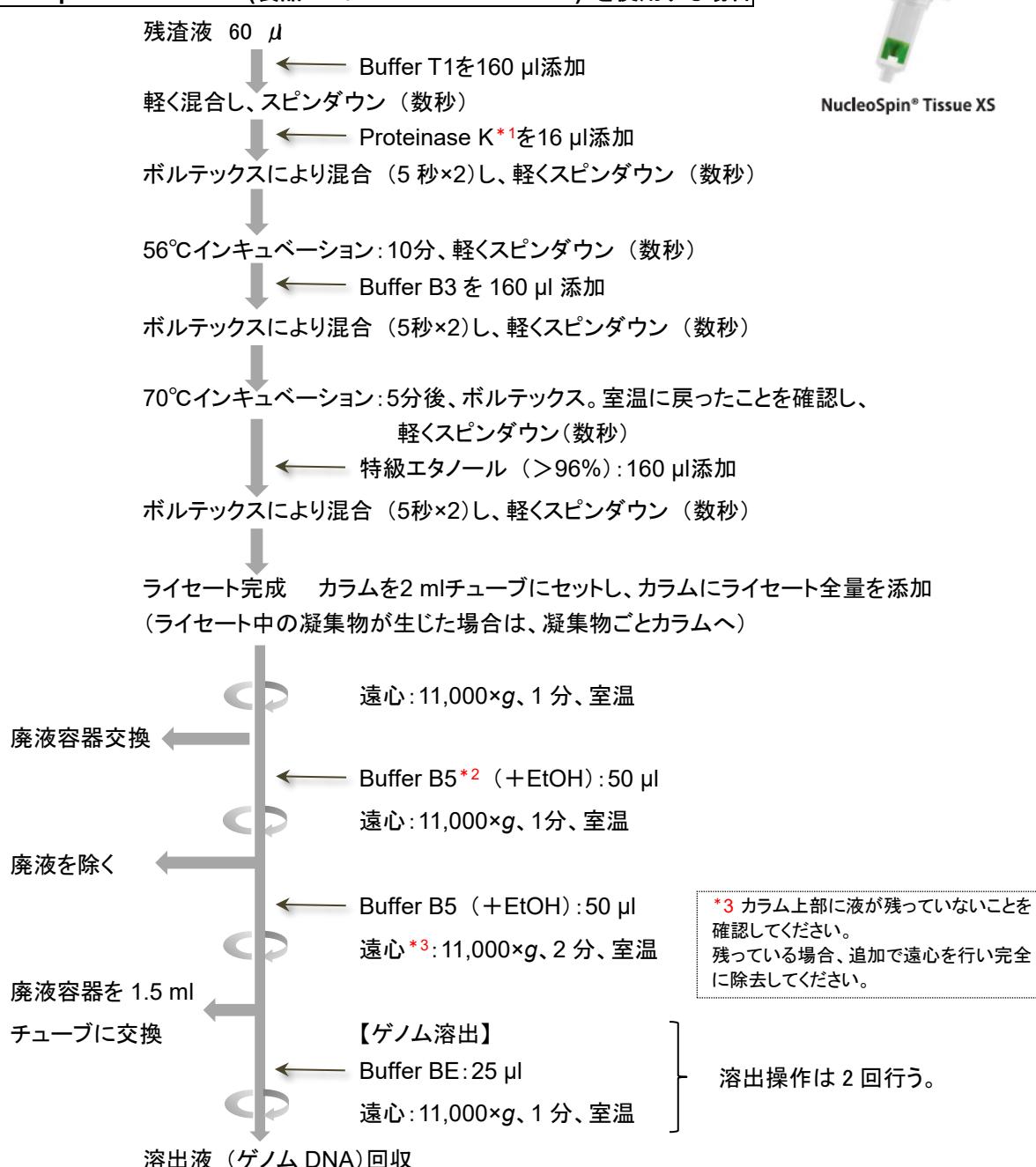




## 2) DNA調製 (エリア2で実施)

DNA抽出法には、Lysis Buffer for *Legionella*による簡易抽出法とNucleoSpin® Tissue XSによるカラム精製法の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。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。

## NucleoSpin® Tissue XS (製品コード 740901.10/.50/.250) を使用する場合



\*1 Proteinase K: NucleoSpin® Tissue XS (製品コード 740901.50 (50 回用))を使用する場合、

Proteinase K (凍結乾燥品)20 mg (1 vial) に、Proteinase Buffer 1 mlを加え溶解する。溶解後のProteinase K 溶液は-20°Cで保存する。

\*2 Buffer B5: Wash Buffer B5 (concentrate) 2 ml あたり、8 ml のエタノールを加える。

**Lysis Buffer for Legionella Ver.2 (製品コード 9183)を使用する場合**

1. 残渣液 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。
2. 95°Cで 10 分インキュベートする。
3. 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。
4. 11,000 ×g で 1 分間遠心する。
5. 溶出液 (約 50 µl)を DNA 溶液として回収する。
6. 回収液のうち、5 µl をリアルタイム PCR に用いる。

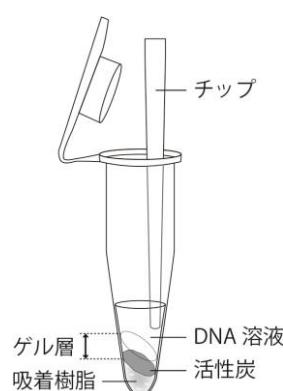
**Lysis Buffer for Legionella (製品コード 9181)を使用する場合**

1. 沈殿物に Lysis Buffer for Legionella 50 µl を添加し、ボルテックスで軽く混合した後、スピンダウンする。  
・Lysis Buffer for Legionella は、4°C保存で凍結厳禁です。  
・使用前にボルテックス等でよく混合して下さい。  
・分取する前にピペッティングで混合し、樹脂量が均一になるよう注意して下さい。  
・先端の細いチップを用いると、チップが詰まることがあります。その場合は、チップの先端を切断してご使用ください。
2. 95°Cで 10 分インキュベートする。
3. ボルテックスで軽く混合した後、15,000 rpm (最高速度)、4°Cで 10 分間遠心する。
4. 氷上で 5 分間静置する。
5. 上清 25 µl を DNA 溶液として回収する。  
・抽出液が青くになりますが、リアルタイム PCR 反応には影響ありません。  
・DNA 抽出後、直ちにリアルタイム PCR を行わない場合は、-20°Cで保存してください。

**(補足)**

Lysis Buffer for Legionella には低濃度のゲルが添加されており、3 の遠心分離後、吸着樹脂の上にゲル層が形成されます。4 の操作では、そのゲル層をしっかりと固化させるため氷上で静置します。上清を回収する際は、チップの先端がゲル層に触れないよう、液面に近いところから回収するように注意してください。

\*ゲル層は、目視では確認できません。

**◆ ここがポイント ◆**

チップの先端がゲル層に触れないように、DNA 溶液を上方からそっと吸い取ってください。



### 3) リアルタイムPCR

2)で調製したDNAサンプルを鑄型とし、リアルタイムPCRによりレジオネラ属菌の検出を行います。

#### 【必要な試薬類】

CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(製品コード CY240)

レジオネラ属菌から DNA を抽出するための試薬です。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。

#### 製品内容(50 検体分)

● 1. 2×Cycleave Reaction Mixture	2×conc.	625 $\mu$ l	PCR 試薬
● 2. 16S Primer/Probe Mix(FAM、ROX)*1	5×conc.	250 $\mu$ l	
● 3. Solution E*2	10×conc.	125 $\mu$ l	Control 試薬
● 4. 16S Positive Control*3	1×10 <sup>6</sup> copies/ $\mu$ l	100 $\mu$ l	
● 5. EASY Dilution (for Real Time PCR)*4		1 ml×2	

\*1 蛍光標識 Probe を含むため、遮光保存して下さい。

\*2 夾雑物による PCR 阻害を回避する効果のある添加剤です。

\*3 他の試薬にコンタミネーションしないよう、ご注意下さい。

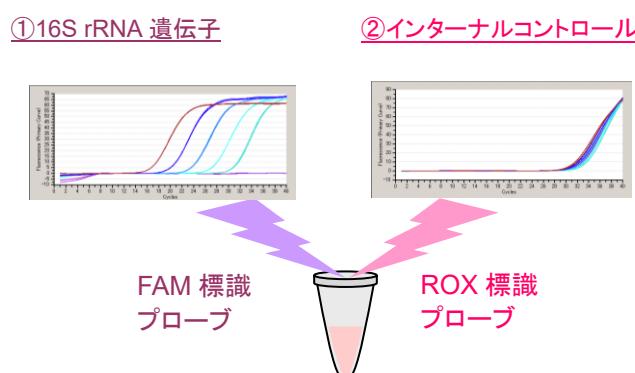
\*4 16S Positive Control 希釀用の溶液です。



#### 【検出の概要】

1本のチューブで、2波長同時検出によるマルチプレックスPCRを行います。

- ①16S rRNA遺伝子:レジオネラ属菌を幅広く検出する。
- ②インターナルコントロール:偽陰性をモニターする。





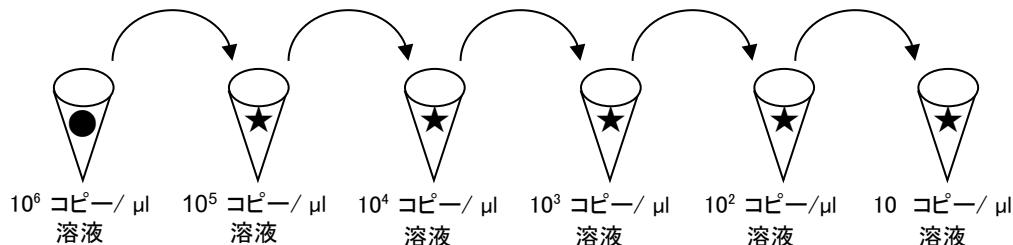
## 【操作】

## 1. 16S Positive Control を EASY Dilution で段階希釈する。(エリア3で実施)

16S Positive Control を用いて、検量線作成用のスタンダードサンプルの段階希釈液を調製します。

EASY Dilution で以下の 1~6 の濃度の段階希釈液を調製し、検量線を作成します。

(1 反応にはそれぞれ 5  $\mu$ l を使用。N=2 以上での反応を推奨)



No.	サンプル内容	濃度	希釈方法
1	Standard 1	$10^6$ コピー / $\mu$ l	16S Positive Control 2 原液
2	Standard 2	$10^5$ コピー / $\mu$ l	(EASY Dilution 45 $\mu$ l)+(10 <sup>6</sup> コピー / $\mu$ l 溶液 5 $\mu$ l)
3	Standard 3	$10^4$ コピー / $\mu$ l	(EASY Dilution 45 $\mu$ l)+(10 <sup>5</sup> コピー / $\mu$ l 溶液 5 $\mu$ l)
4	Standard 4	$10^3$ コピー / $\mu$ l	(EASY Dilution 45 $\mu$ l)+(10 <sup>4</sup> コピー / $\mu$ l 溶液 5 $\mu$ l)
5	Standard 5	$10^2$ コピー / $\mu$ l	(EASY Dilution 45 $\mu$ l)+(10 <sup>3</sup> コピー / $\mu$ l 溶液 5 $\mu$ l)
6	Standard 6	10 コピー / $\mu$ l	(EASY Dilution 45 $\mu$ l)+(10 <sup>2</sup> コピー / $\mu$ l 溶液 5 $\mu$ l)

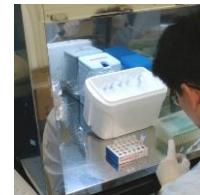
2. 鑄型以外のマスターミックスを「必要本数+ $\alpha$ 」調製し、反応チューブに分注する。(エリア1で実施)

(サンプルの反応以外に、Negative Control 反応も必ず行う。)

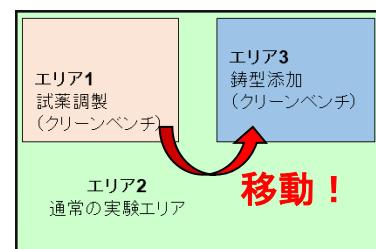
★Negative Control反応:キットに添付のEASY Dilutionを添加する

## ＜反応液組成＞

液量 (1反応)	
● 2×Cyclease Reaction Mixture	12.5 $\mu$ l
● 16S Primer / Probe Mix (5×conc.)	5.0 $\mu$ l
● Solution E	2.5 $\mu$ l
total	20.0 $\mu$ l

3. 分注済のチューブのうち、Negative Control 反応のチューブに、EASY Dilution を 5  $\mu$ l 添加する。

Negative Control 反応チューブの蓋をしっかりと閉め、エリア3へ移動。



## 4. 分注済のチューブのうち、Positive Control 反応のチューブに、段階希釈した Positive Control を

5  $\mu$ l 添加する。(エリア3で実施)

サンプル反応のチューブに、調製済 DNA を 5  $\mu$ l 添加する。



5. すべてのチューブの蓋をしっかりと閉め、  
反応チューブを軽く遠心する。(3秒程度)



6. 反応チューブをThermal Cycler Dice® Real Time System シリーズにセットする。

PCR条件

<Dicell II の場合>

初期変性(Hold) : 1サイクル

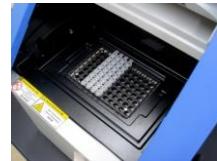
95°C 10 秒

3 step PCR : 45サイクル

95°C 5 秒

55°C 20 秒

72°C 20 秒 (検出)



<Dicell II / Lite の場合>

初期変性(Hold) : 1サイクル

95°C 10 秒

3 step PCR : 45サイクル

95°C 5 秒

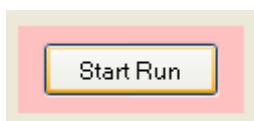
55°C 10 秒

72°C 20 秒 (検出)

#### サンプル情報

サンプル名	サンプルタイプ	初期錆型量(検量線設定)
Negative Control	NTC	-
Control DNA	STD	5.00E+001 (50コピー)
Control DNA	STD	5.00E+002 (500コピー)
Control DNA	STD	5.00E+003 (5,000コピー)
Control DNA	STD	5.00E+004 (50,000コピー)
Control DNA	STD	5.00E+005 (500,000コピー)
Control DNA	STD	5.00E+006 (5,000,000コピー)
Sample	UNKN	-
.		
.		

7. Start Run ボタンを押して、反応スタート！



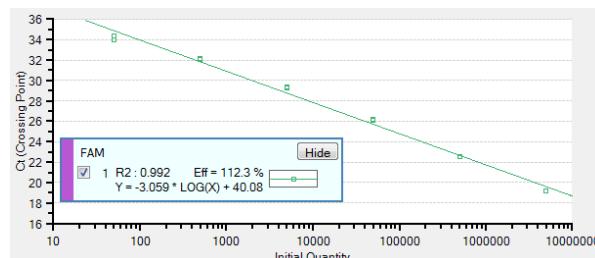
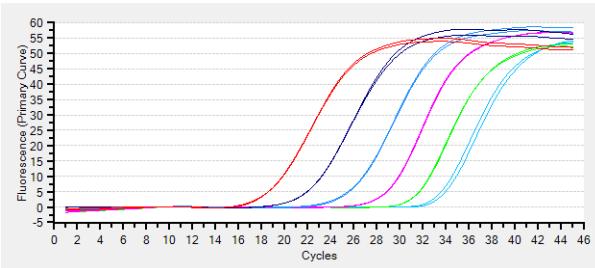


## 4) 解析（データ解析の一例）

## [ 定量解析 ]

Positive Controlを10倍段階希釈した標準サンプルの反応では、右図のように濃度の濃いサンプルから順に蛍光シグナルが増加して増幅曲線が立ち上がります。

標準サンプルの反応の結果から、算出されたCt値と初期錆型量より右図のような検量線が解析ソフトにより自動的に作成されます。



未知サンプルに関しては、検量線に基づき、それぞれの Ct 値から定量値 (Positive Controlコピー数相当量) が算出されます。

Sample ID	Ct Avg.(CP)	Ct SD(CP)	Qty Avg.(CP)	Qty SD(CP)
11	37.33	1.061E-00	1.544E+001	1.152E+000
14	38.70	9.617E-001	6.540E+000	4.119E+000
17	--	--	--	--
20	--	--	--	--
26	36.41	2.121E-001	2.953E+001	4.395E+000
38	33.84	1.202E-001	1.804E+002	1.525E+001

↑ 未知サンプル由来の Ct 値

検量線に基づいて算出された未知サンプルの定量値

次に、上記のコピー数を以下の式で菌数 (CFU) に換算します。

## (1) コピー数から菌数(CFU)への換算

- NucleoSpin® Tissue XSを用いた方法(カラム精製) : CFU = コピー数／15
- Lysis Buffer for *Legionella*を用いた方法(簡易抽出法) : CFU = コピー数／23

## (2) 検水100 ml中の菌数(CFU)への換算

3. 1)に記載の方法で操作した場合、(1)でコピー数から換算した菌数 (CFU) は検水10 ml中の値に相当します。したがって、どちらのDNA抽出法を用いた場合でも、(1)で得た菌数を10倍することで100 ml検水中の菌数(CFU)に換算できます。

計算例

NucleoSpin® Tissue XSを用いたDNA抽出法で上図の結果が得られた場合、以下のようない算結果になります。

コピー数	菌数(CFU)	検水 100 ml 当りの菌数(CFU)
15.4	1.0	10.3
6.5	0.4	4.3
ND	--	--
ND	--	--
29.5	2.0	19.7
180.4	12.0	120.3

- コピー数 : リアルタイム PCR の定量結果 (Qty(CP))
- 菌数 (CFU) : コピー数 ÷ 15
- 検水 100 ml 当りの菌数 (CFU) : 菌数 (CFU) × 10

## = 参考 =

## 16S Positive Controlを用いる定量解析について

出典: 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合事業)「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 P71-84

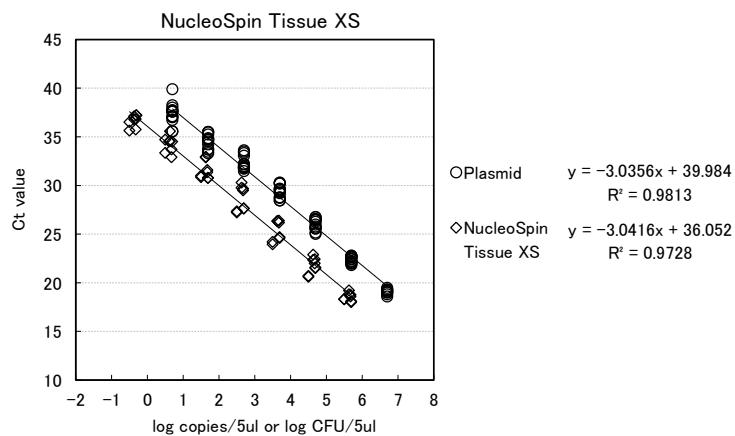


図1. NucleoSpin® Tissue XS (製品コード 740901.10/.50/.250) を用いて菌液から抽出したDNAの検量線 (16S Positive Controlとの比較)

*L.pneumophila* 長崎80-045株を30°C4日間培養した平板培養菌あるいは、アーベー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、両者の增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°C培養4日目の菌及びアーベー培養菌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<sup>3.932</sup>=15.3) に相当するものと計算された。

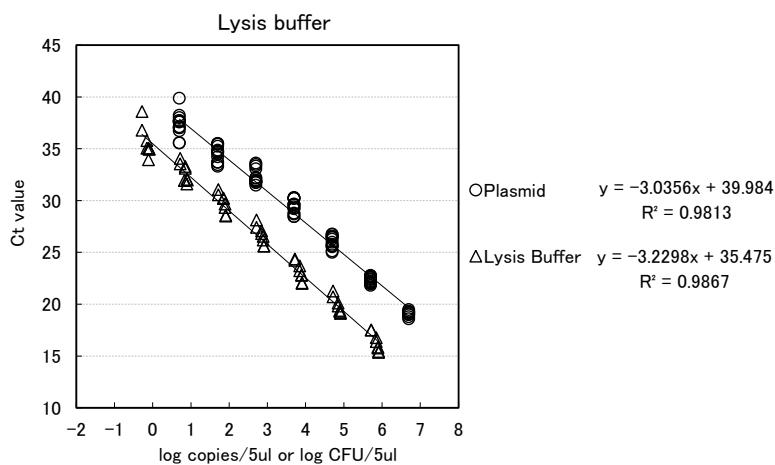


図2. Lysis Buffer (Lysis Buffer for Legionella (製品コード 9181)) を用いて菌液から抽出したDNAの検量線 (16S Positive Controlとの比較)

図1と同様な方法で実施した。プラスミドと抽出DNAの回帰直線を比較すると、抽出DNAのほうがやや傾きが大きいもののほぼ平行関係にあり、両者の增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°C培養4日目の菌及びアーベー培養菌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 (2<sup>4.509</sup>=22.8) に相当するものと計算された。



#### 4. 関連製品一覧

##### ■リアルタイムPCR装置関連製品

製品名	概要	容量	製品コード	価格
<b>リアルタイム PCR 装置</b>				
Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC	多波長解析に対応した 96 ウェルのリアルタイム PCR 装置	一式	TP1010	¥4,500,000
<b>リアルタイム PCR 装置関連消耗品</b>				
0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps	Thermal Cycler Dice® Real Time System IV 向け独立型キヤップ付き 8 連チューブ	120 strips	NJ902	¥ 30,000

##### ■CycleavePCRキットシリーズ

<b>水質検査に</b>				
CycleavePCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit	16S rRNA 遺伝子	25 回	CY240S	¥ 42,000
		50 回	CY240	¥ 73,000
<b>食品検査に</b>				
CycleavePCR™ O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0	ベロ毒素遺伝子 (VT1, VT2 遺伝子)	50 回	CY217A	¥ 74,000
		50 回	CY217B	¥135,000
CycleavePCR™ O-157 (VT1/VT2) Typing Kit	ベロ毒素遺伝子 (VT1 遺伝子、VT2 遺伝子)を識別	50 回	CY222	¥97,000
CycleavePCR™ Salmonella Detection Kit Ver.2.0	侵入性因子関連遺伝子 <i>invA</i>	50 回	CY205	¥97,000
CycleavePCR™ <i>Bacillus cereus</i> (CRS gene) Detection Kit	セレウリド合成酵素遺伝子	50 回	CY221	¥97,000
CycleavePCR™ <i>Listeria monocytogenes</i> ( <i>inlA</i> gene) Detection Kit	Internalin A ( <i>inlA</i> ) 遺伝子	50 回	CY223	¥97,000
CycleavePCR™ <i>Campylobacter</i> ( <i>jejuni/coli</i> ) Typing Kit	Cytotoxicity distending toxin 遺伝子の C サブユニット遺伝子 ( <i>cdtC</i> gene)	50 回 (C. <i>jejuni</i> , C. <i>coli</i> 各 25 回)	CY225	¥97,000
CycleavePCR™ <i>Staphylococcus aureus</i> (Dnaj gene) Detection Kit	黄色ブドウ球菌の House Keeping 遺伝子のひとつである Dnaj 遺伝子	50 回	CY228	¥97,000
CycleavePCR™ 肉種判別キット (6 種)	肉種判別 (ウシ、ブタ、ニワトリ、ウサギ、ウマ、ヒツジ)	20 サンプル分	CY218	¥112,000

表示価格はすべて税別です。



## ■抽出関連製品

製品名	概要	容量	製品コード	価格
NucleoSpin® Tissue XS	微量なサンプルからもゲノムDNA, 細菌 DNA, ウィルスDNAを効率よく精製	10回	740901.10	¥8,000
		50回	740901.50	¥36,000
		250回	740901.250	¥156,000
Lysis buffer for <i>Legionella</i> Ver.2	レジオネラ属菌からのDNA抽出試薬	50回	9183	¥21,000
Lysis buffer for <i>Legionella</i>	レジオネラ属菌からのDNA抽出試薬	50回	9181	¥17,000

表示価格はすべて税別です。

本ハンドブックは下記の URL または QR コードからダウンロードしていただけます。

[https://www.takara-bio.co.jp/research/kensa/pdfs/book\\_9-1.pdf](https://www.takara-bio.co.jp/research/kensa/pdfs/book_9-1.pdf)

- 本冊子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。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で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。
- 本冊子の内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することはご遠慮ください。
- 本冊子に記載されている社名および製品名は、特に記載なくとも各社の商標または登録商標です。
- 本冊子記載の価格は2025年7月18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。
- 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。

## タカラバイオ株式会社

営業部(東京) TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

営業部(本社) 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

Website <https://www.takara-bio.co.jp>公式X [@Takara\\_Bio\\_JP](https://x.com/Takara_Bio_JP) / [https://x.com/Takara\\_Bio\\_JP](https://x.com/Takara_Bio_JP)