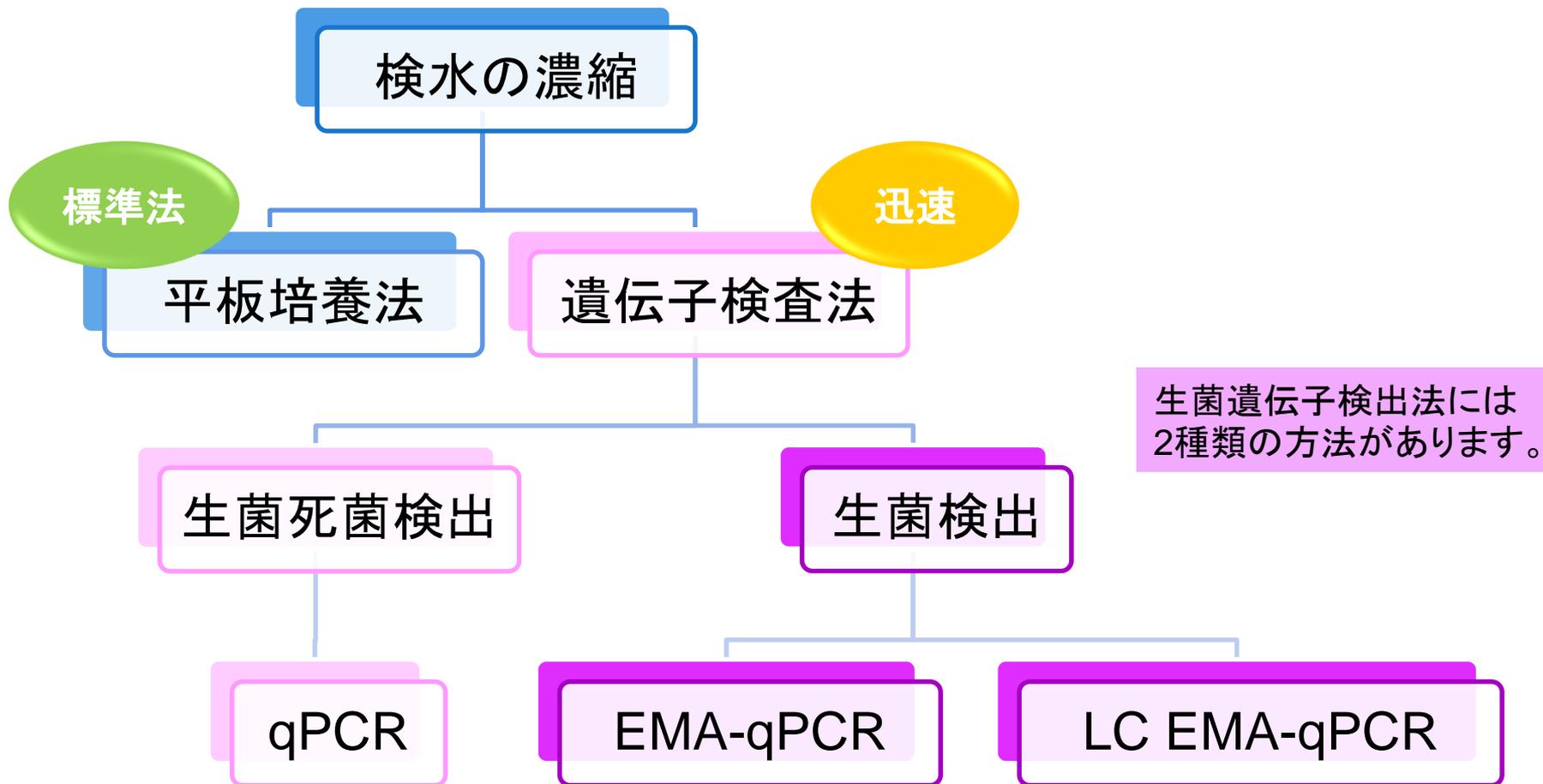


生菌選択的な レジオネラ遺伝子検査法

タカラバイオ株式会社
○吉崎美和

日本防菌防黴学会 第46回年次大会 (2019/9/25)

レジオネラ属菌の検査法



循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル

- 厚生労働省健康局生活衛生課通知「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」の改訂について(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
- 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。

第4版「レジオネラ症防止指針」

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)

第5章レジオネラ属菌の検査法

5.2 迅速検査法

<5.2.1 試験法の概要より>

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。

<5.2.2 生菌のみを検出する遺伝子検査法より>

(1) EMA-qPCR法

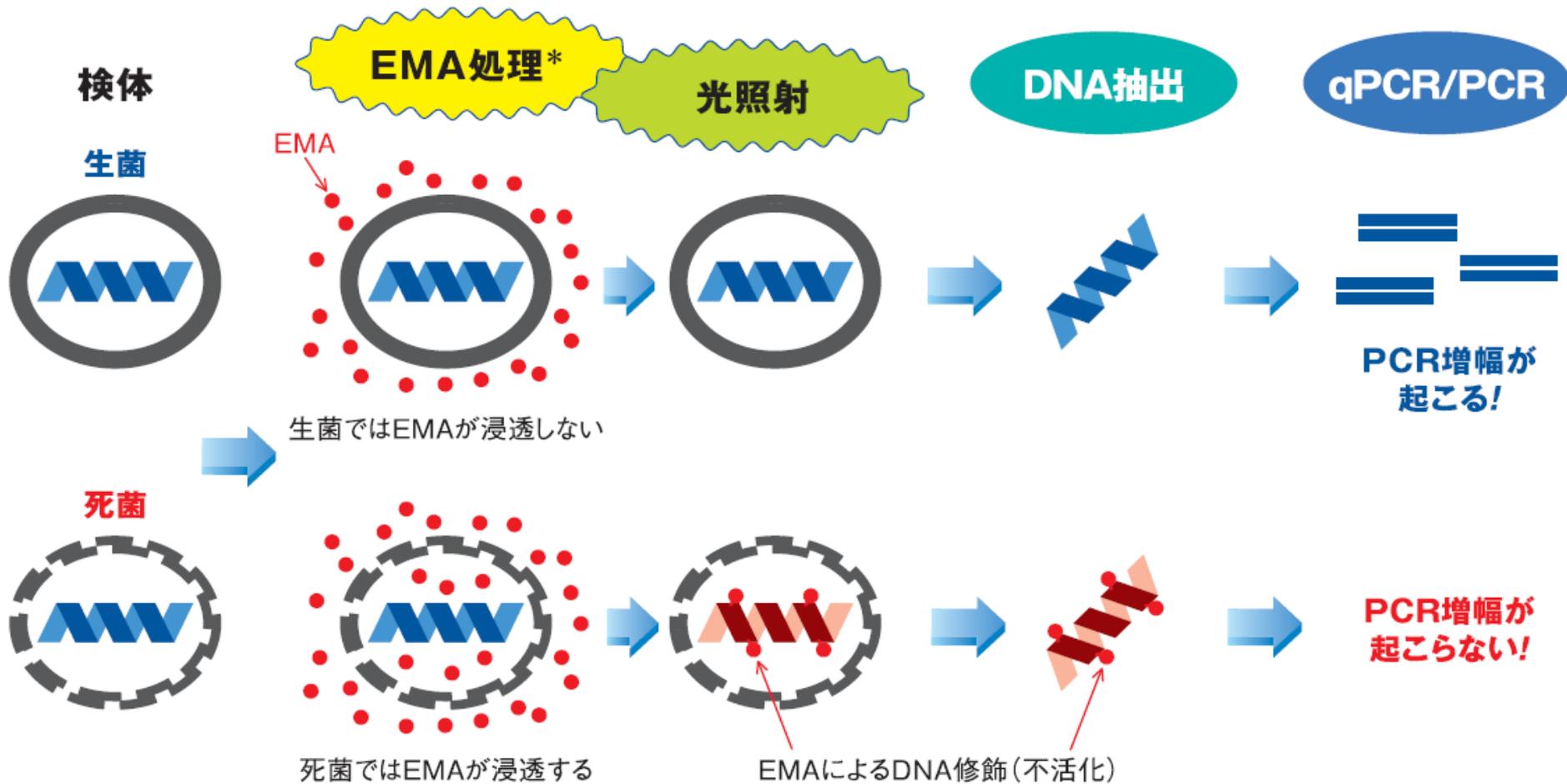
EMA処理により、培養法不検出でリアルタイムPCR陽性となる結果の不一致を減ずることができる。

(2) LC EMA-qPCR法

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。

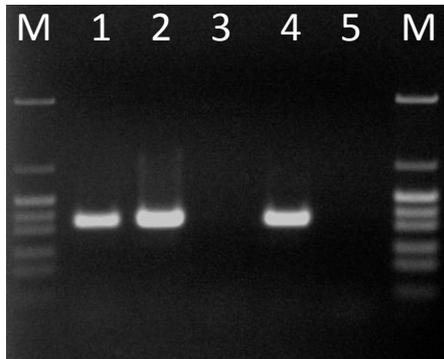
- 第4版では、迅速検査法の項目に生菌検出法に関する記載が追加されました。

EMA-PCR法の原理



EMA-PCR法の実験例

E. coli 生菌および死菌についてEMA処理の効果を確認



M: pHY Marker

1: 生菌 EMA処理(+)

2: 生菌 EMA処理(-)

3: 死菌 EMA処理(+)

4: 死菌 EMA処理(-)

5: Negative Control

E. coli 生菌・死菌: 2×10^7 個

* 死菌は加熱処理により調製。

EMA処理: #7700使用

DNA抽出: NucleoSpin Tissue XS使用

PCR: TaKaRa Ex Taq HS使用

増幅サイズ: 1002 bp

Gel: 1% LO3

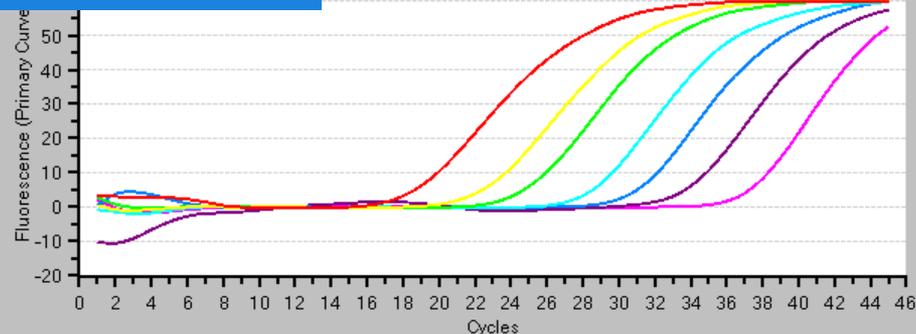
Apply volume: 5 ul

★EMA処理により、死菌由来のDNA増幅が抑制され、生菌のみが検出されました。

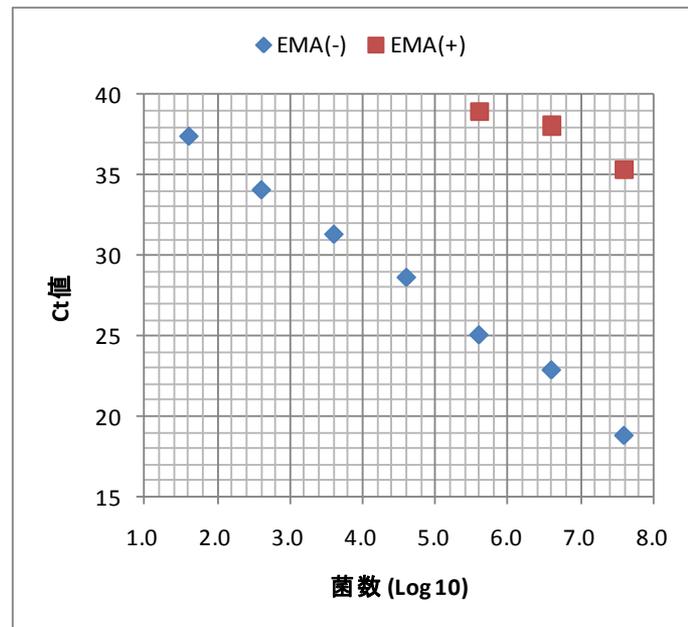
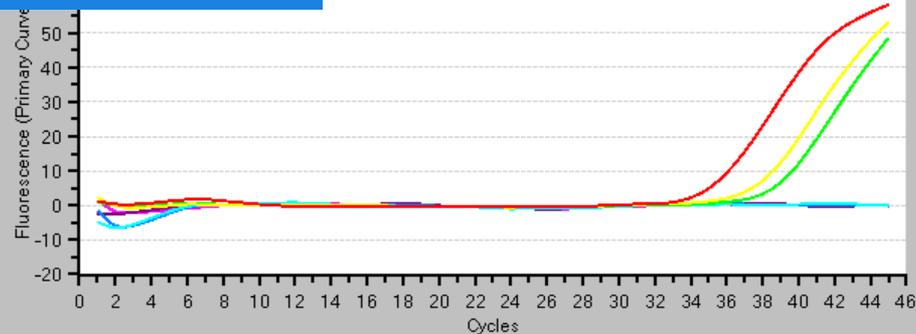
EMA-qPCR法によるレジオネラ死菌検出

レジオネラ死菌についてEMA処理の効果を確認

EMA処理(-)



EMA処理(+)

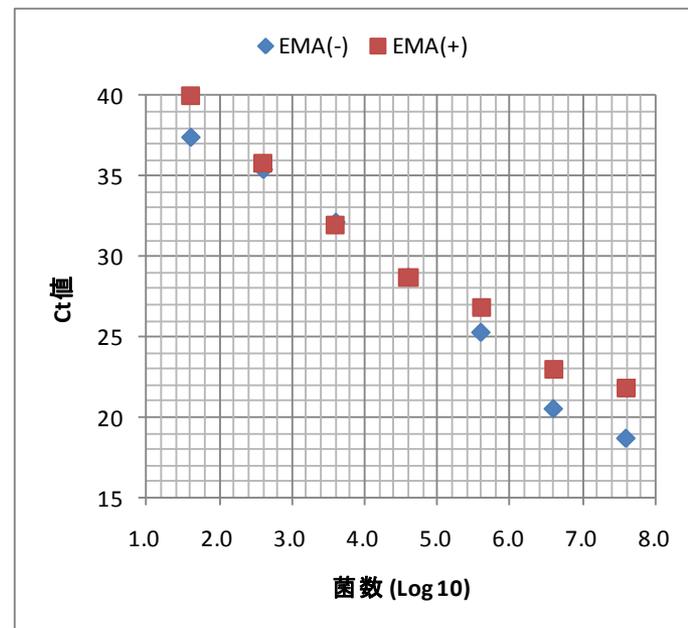
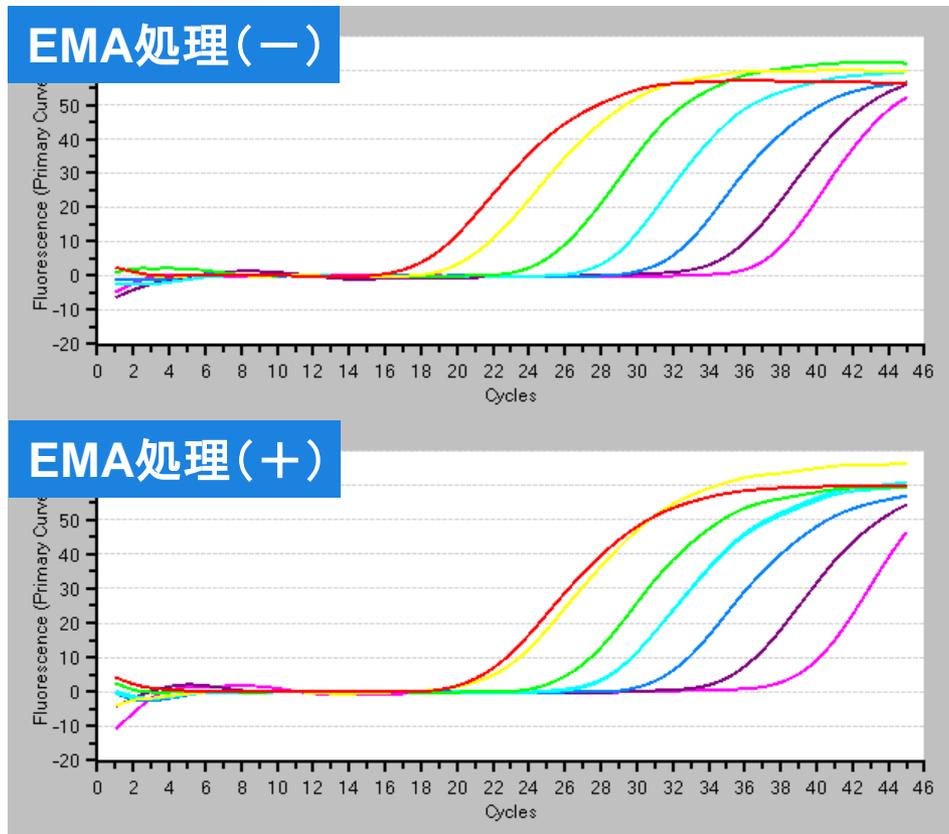


レジオネラ死菌: $4 \times 10^1 \sim 4 \times 10^7$ 個
EMA処理(あり/なし)
DNA抽出(NucleoSpin Tissue XS使用)
qPCR検出(#CY210使用)

★およそ 4×10^4 個の死菌由来DNAの増幅を抑制できることを確認しました。

EMA-qPCR法によるレジオネラ生菌検出

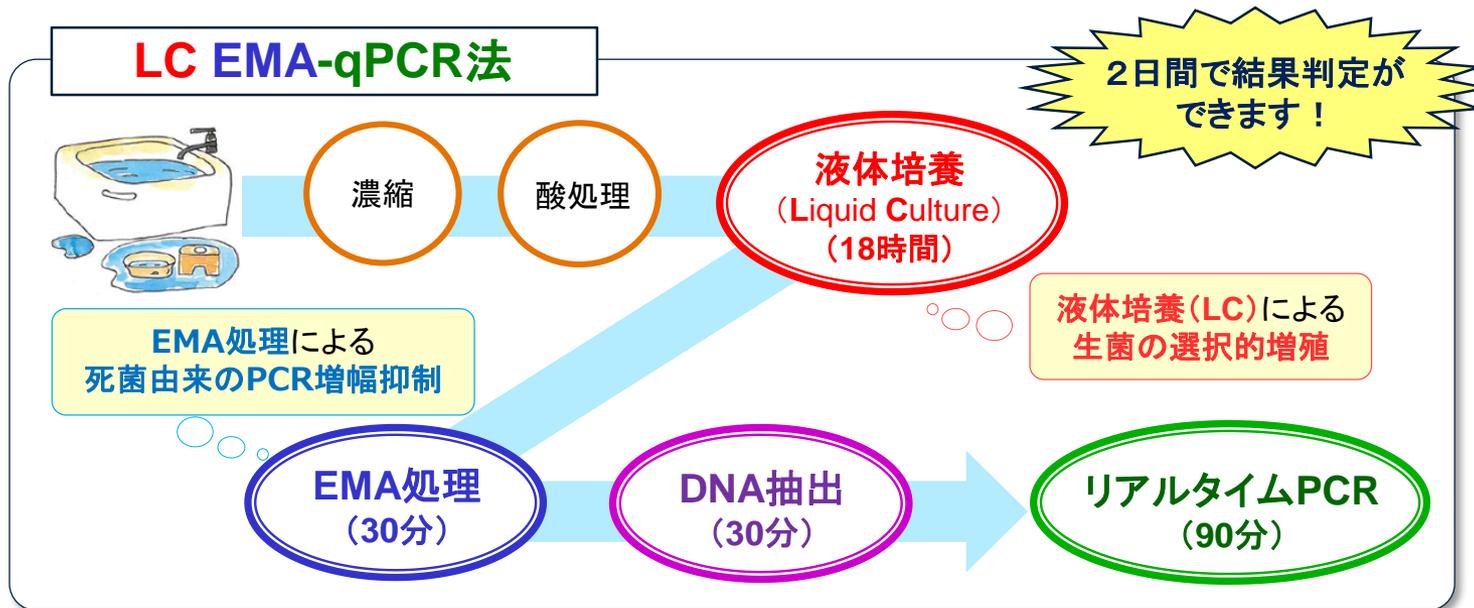
レジオネラ生菌についてEMA処理の影響を確認



レジオネラ生菌: $4 \times 10^1 \sim 4 \times 10^7$ 個
EMA処理(あり/なし)
DNA抽出(NucleoSpin Tissue XS使用)
qPCR検出(#CY210使用)

★EMA処理による検出感度の低下は認められませんでした。

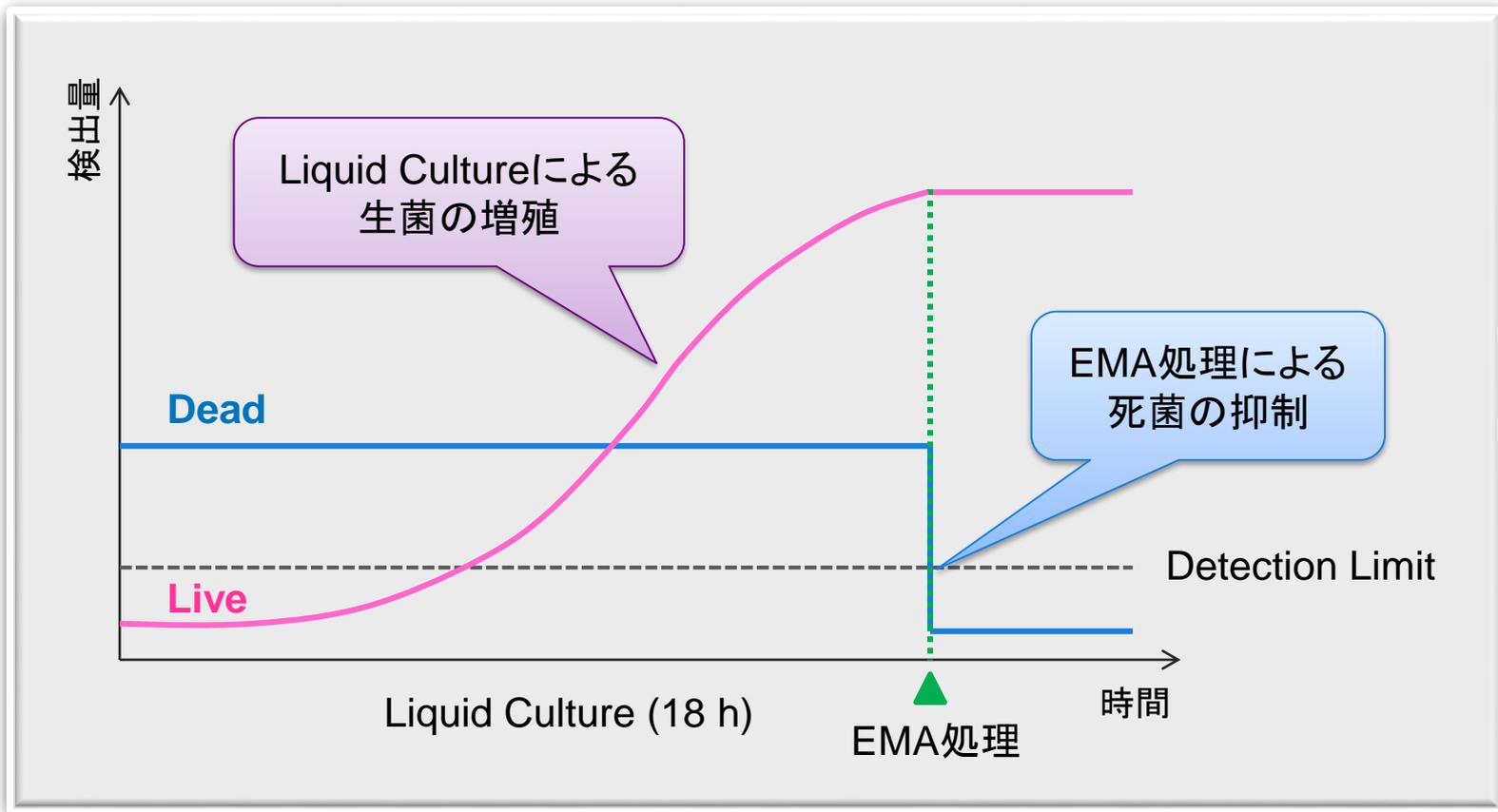
LC EMA-qPCR法とは？



リアルタイムPCRと2つの技術

- 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増幅抑制**
- を組み合わせた確実かつ高感度な“生菌遺伝子迅速検査法”です。

LC EMA-qPCR法の原理



- 生菌は、**液体培養により増殖**し、EMA処理では変化しません。
- 死菌は、液体培養により増殖せず、**EMA処理で抑制**されます。

EMA-qPCR法 実検体による評価試験（平板培養法との比較）

表8. 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)		
		≥ 10	< 10	計
qPCR	陽性	120	257	377
	陰性	3	224	227
計		123	481	604

感度97.6%、特異度46.6%、陽性的中率31.8%、陰性的中率98.7%、一致率57.0%

b. 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%

c. EMA処理(2回)

		平板培養法 (CFU/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%

- EMA処理を1回または2回実施した場合の結果を比較
- EMA処理1回の場合
感度91.1%、特異度61.1%
- EMA処理2回の場合
感度94.1%、特異度68.5%
- EMA処理回数による有意な差はなく、実用上EMA処理は1回で十分であると考えられた。

「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

LC EMA-qPCR法 実検体による評価試験（平板培養法との比較）

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

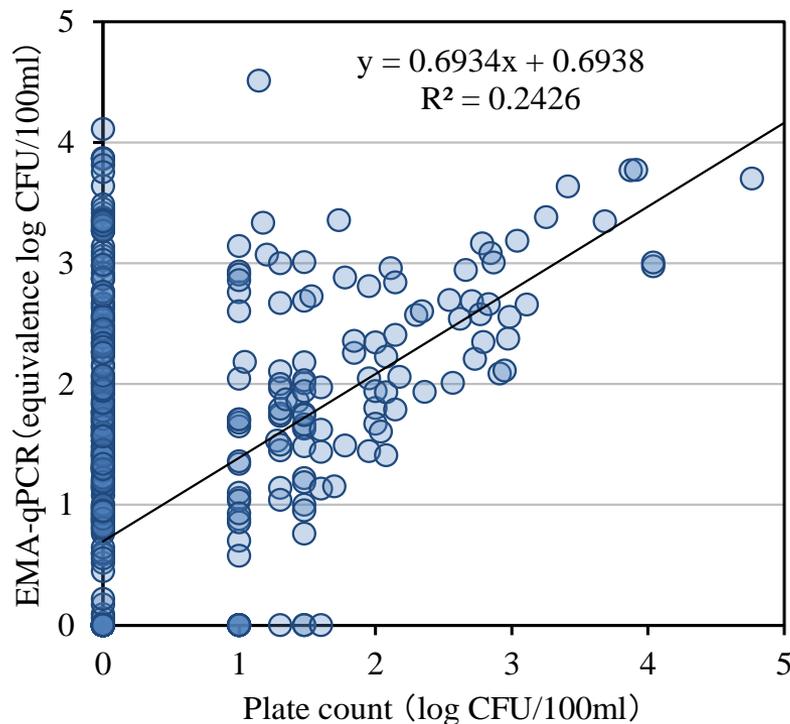
感度 89.3%、 特異度 78.3%

- 浴槽水等518件について、平板培養法とLC EMA-qPCR法を比較
- LC EMA-qPCR法の定量結果について、1 CFU/100 ml以上を陽性とする、
感度89.3%、特異度78.3%の良好な結果が得られた。

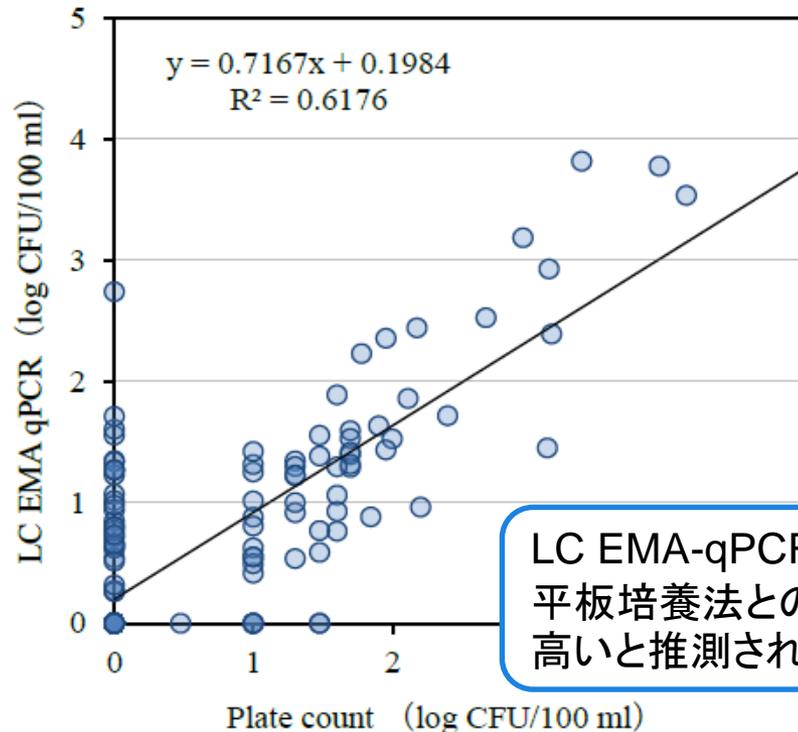
「厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理
手法に関する研究 平成25～27年度分担研究報告書」より引用

平板培養法との定量値の比較

EMA-qPCR法



LC EMA-qPCR法

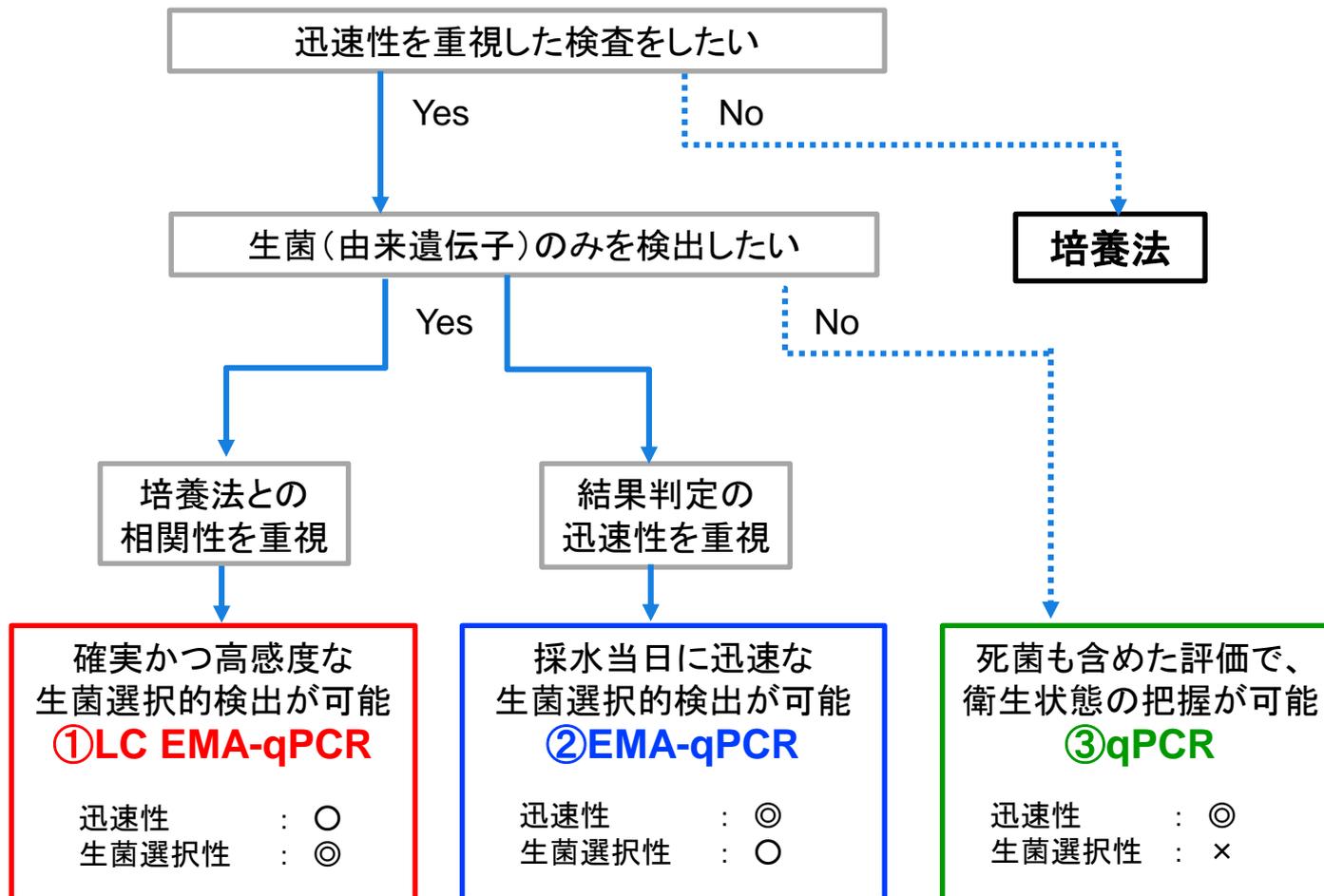


LC EMA-qPCRの方が
平板培養法との相関が
高いと推測されます。

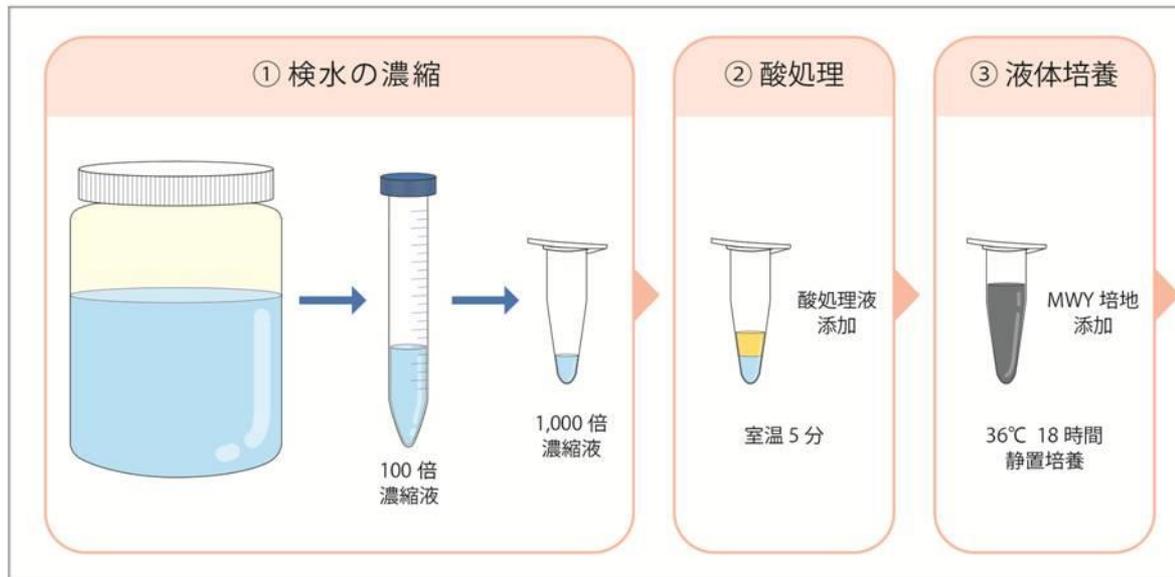
「厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究 平成28～30年度総合研究報告書」より引用

「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26年度分担研究報告書」より引用

レジオネラ属菌遺伝子検査選択ガイド

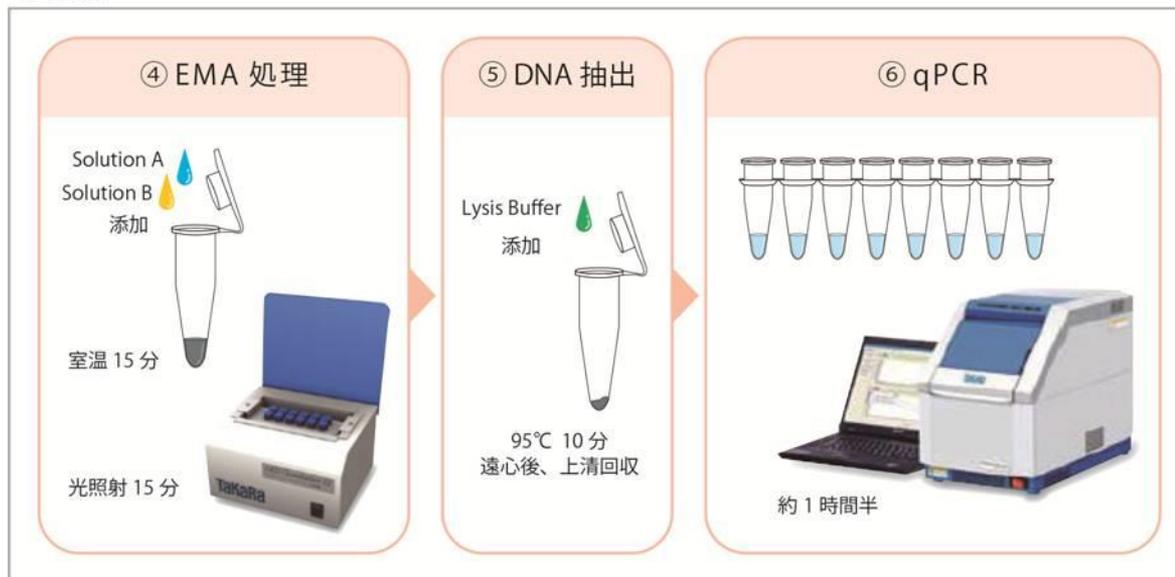


1 日目



- ① 濃縮
- ② 酸処理
✓ 培養法と同様に行います。
- ③ 液体培養
✓ 1.5 ml チューブで 18 時間 静置培養します。

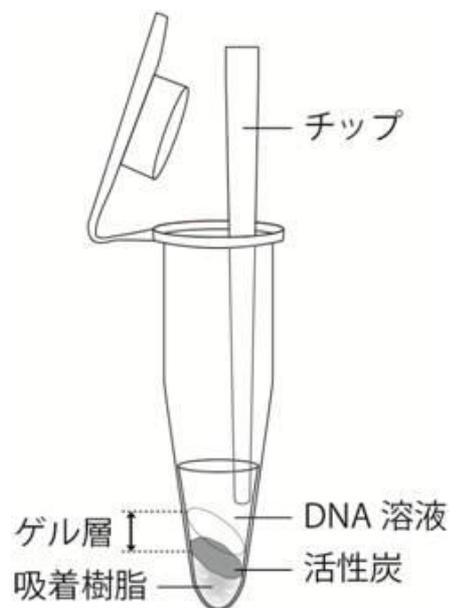
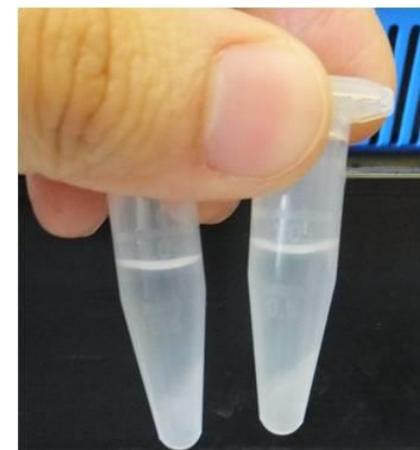
2 日目



- ④ EMA 処理
✓ 試薬を添加し、光照射を行います。
- ⑤ DNA 抽出
✓ 専用の Lysis Buffer で簡易抽出を行います。
- ⑥ qPCR
✓ 約 1 時間半の反応です。

Lysis Buffer for *Legionella*

- 加熱処理後、上清を回収するだけの簡単操作のDNA抽出試薬です。
- 試薬には、界面活性剤やPCR阻害物質を吸着する樹脂が含まれています。



<操作の流れ>

1. ペレットに抽出試薬を添加
2. 95°C、10分加熱
3. 15,000 rpm (最高速度)、4°C、10分遠心
4. 氷上で5分
5. 上清25 µlを回収

遠心操作が必要

上清回収操作に注意を要する

抽出操作の簡略化

現行法

遠心分離
上清除去

Lysis Buffer添加
熱処理

遠心分離

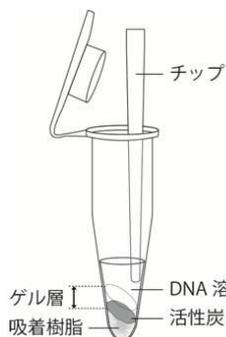
氷上で5分静置

上清回収



上清を完全に
除去する

ペレットロスに要注意



ゲル層吸引に
要注意

改良法

遠心分離
上清除去

Lysis Buffer添加
熱処理

スピнкаラム



上清を25 μ l残す
操作が容易に！



スピнкаラムで
ワンステップ処理

実検体による比較試験結果

試料情報									迅速検査				
サンプル情報			環境			レジオネラ平板培養結果			LC EMA-qPCR				
検体分類	原水の種類 (泉質等)	循環 ／ かけ流し	湯温 (°C)	残塩 (mg/l)	ATP (RLU/10ml)	CFU /100ml	種	血清群	現行法		改良法		
									copies /5ul	CFU /100ml	copies /5ul	CFU /100ml	
カラ水	井戸水	循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環 循環		0.1	11	4000	Lp	3,6	227.7	250.5	231.3	254.4	
シャワー	井戸水			0.4	19	3000	Lp,L.sp	3,6,12	155.1	170.6	214.2	235.6	
シャワー	井戸水			0.0	61	2000	Lp	6	155.1	170.6	257.5	283.3	
シャワー	井戸水			0.0	67	2000	Lp	6	298	327.8	572.3	629.5	
採暖槽水	水道水			35.6	1.1		810	Lp	SG6	332	365.2	369	405.9
採暖槽水	水道水			35.5	0.9		260			239.6	263.6	143.5	157.9
カラ水	井戸水				0.1	14	180	Lp	1,6	40.48	44.5	26.33	29.0
浴槽水	白湯			40.8	0.2	72	70	Lp	6	209.3	230.2	129	141.9
浴槽水	白湯			41.2	0.3	148	30	Lp	1,6	0.8004	0.9	7.708	8.5
浴槽水	温泉			39.0	1.0	67	10	Lp	6	0.8912	1.0	9.268	10.2
浴槽水	水道水			35.5	0.5		10			213.2	234.5	0	0.0
採暖槽水	水道水			34.4	0.0		<10			738	811.8	90.4	99.4
浴槽水	白湯		循環なし	36.5	0.3	6	<10			4.203	4.6	0	0.0
浴槽水	水道水			37.6	0.7		<10			3.41	3.8	5.32	5.9
採暖槽水	水道水			37.1	0.4		<10			0	0.0	23.9	26.3

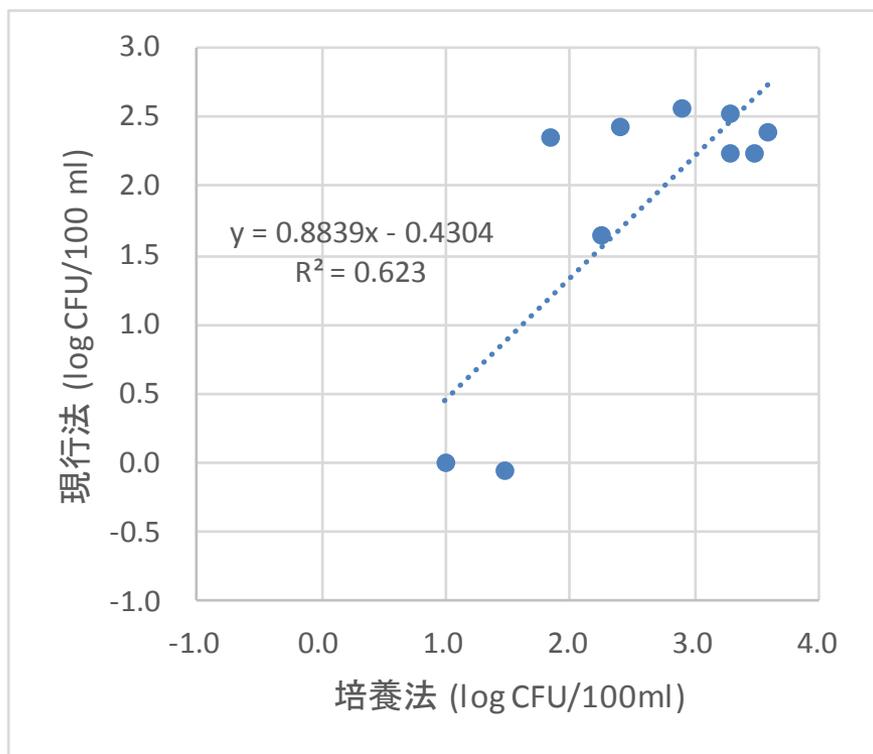


		改良法		
		陽性	陰性	計
現行法	陽性	12	2	14
	陰性	1	26	27
計		13	28	41

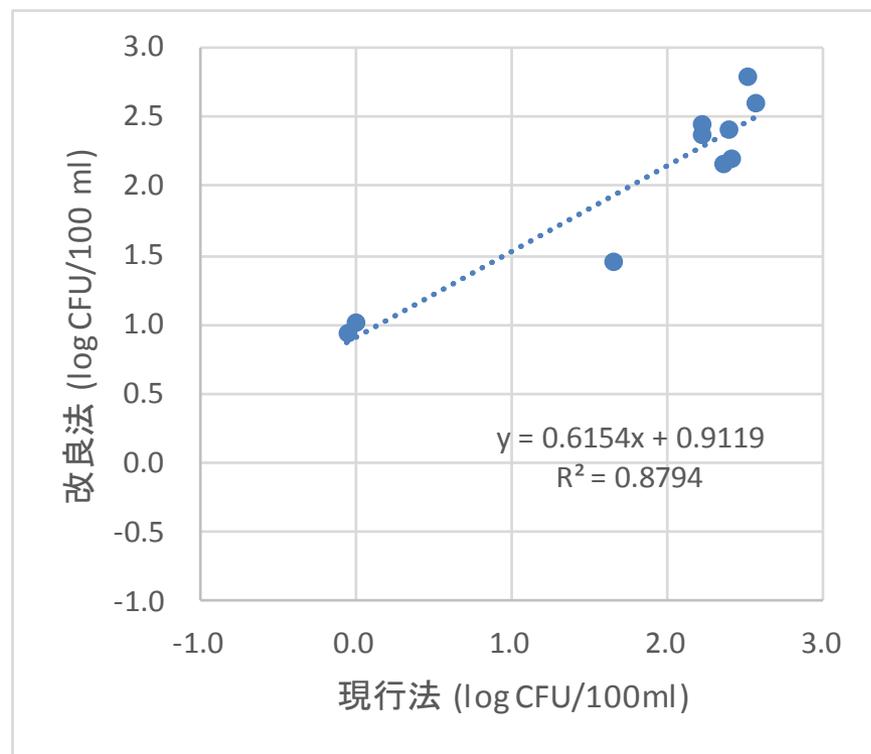
- 陽性一致率：85.7% (12/14)
- 陰性一致率：96.3% (26/27)
- 全体一致率：92.7% (38/41)

実検体による比較試験結果

培養法 vs 改良法



現行法 vs 改良法



- 改良法の定量値は、現行法の定量値との間に高い相関が認められ、培養法の定量値とも概ね相関した。

<謝辞>

実検体の試験データは、富山県衛生研究所 金谷潤一先生、川崎市健康安全研究所 淀谷雄亮先生からご提供頂きました。