

レジオネラ属菌の遺伝子検査 ～生菌検査法(EMA-qPCR)～

(2024 年 12 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。

レジオネラ属菌の遺伝子検査法には、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 種類があります。

平成 29 年 7 月に改訂発行された「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)には、従来の qPCR 法に加えて、迅速検査法のひとつとして「生菌のみを検出する遺伝子検査法」が収載され、LC EMA-qPCR 法や EMA-qPCR 法が紹介されています。各手法には、下表のような特長があります。

分類	手法	概要	結果判定	検査法の特長
生菌 検出法	LC EMA-qPCR (通知収載※)	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	液体培養と EMA 処理の組み合わせによ り、確実かつ高感度に生菌選択的な検 出ができる。
	EMA-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 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こ とがメリット。(採水当日に判定可能)
生菌死菌 検出法	qPCR (通知収載※)	ろ過濃縮検体から qPCR 検出を行う。	検査開始 1 日目	菌の生死にかかわらず遺伝子を検出す る。死菌の存在も潜在的な汚染リスクと して評価できる。

※厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知(令和元年 9 月 19 日)「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)に、迅速検査法のひとつとして収載

本冊子では、採水当日に迅速な生菌選択的検出が可能となる「EMA-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。

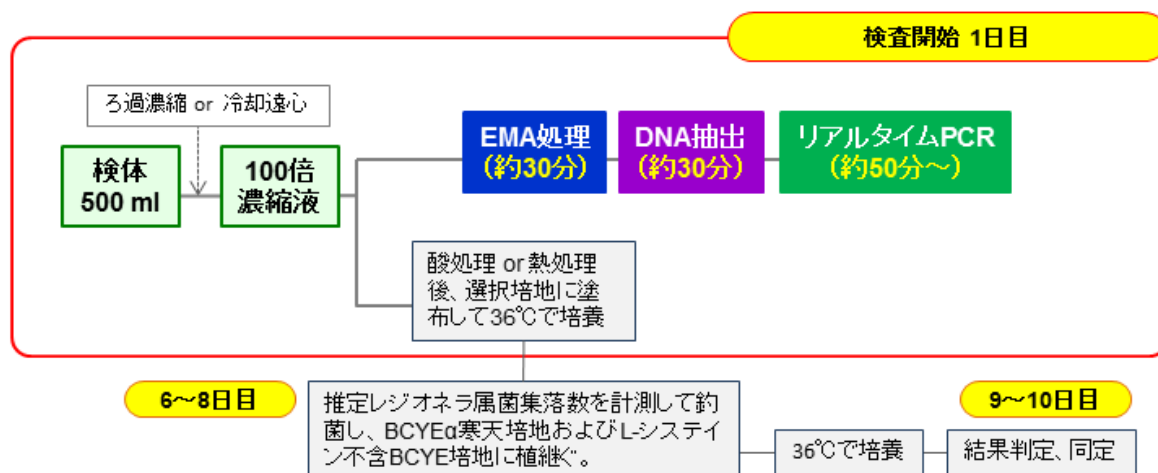
目次

1. EMA-qPCR 法を始めるにあたって.....	2
1) EMA-qPCR 法による検査の流れ	
2) EMA-PCR 法について	
3) レジオネラ属菌検査の原則	
2. 準備.....	4
1) 必要な試薬類	
2) 必要な実験器具・装置	
3) 実験環境について	
3. 操作法.....	12
1) 検水のろ過濃縮	
2) EMA 処理	
3) DNA 抽出	
4) リアルタイム PCR	
4. 解析.....	18
1) 検出結果の判断基準についての参考情報	
2) 解析手順	
5. EMA 処理条件の検討方法.....	20
1) はじめに	
2) 条件検討の流れ	
3) 結果の解析	
6. 関連製品一覧.....	23

1. EMA-qPCR 法を始めるにあたって

1) EMA-qPCR 法による検査の流れ

EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌検出は、採水当日に結果判定が可能です。検水をろ過濃縮した後、EMA 処理を行い、DNA 抽出後、リアルタイム PCR による検出を行います。



① EMA 処理

死菌由来 DNA を EMA 修飾することで PCR 増幅を抑制し、生菌由来 DNA の選択的な検出を可能にします。

② DNA 抽出

カラム精製法または簡易抽出法により、リアルタイム PCR 用の鋳型 DNA を調製します。

③ リアルタイム PCR

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。キットに添付のポジティブコントロールを用いた定量解析が可能です。

2) EMA-PCR 法について

【用途】

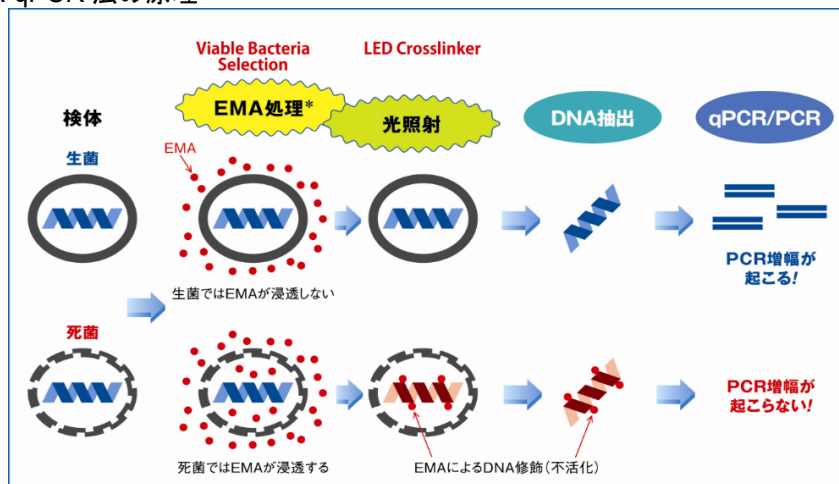
現在、微生物の検出および同定には主として培養法が用いられていますが、より簡便かつ迅速に結果が得られる方法として、PCR 法等の遺伝子検出技術を応用した手法が注目され、食品・環境分野等の検査においても普及しつつあります。しかし、遺伝子検出技術では原理的に、生菌だけでなく死菌由来 DNA も検出されるため、目的によっては死菌検出が偽陽性と見なされることがあります。

そこで、PCR による生菌選択的な検出法として EMA-PCR 法が開発されました。EMA-PCR 法は、選択的に膜損傷菌を透過する色素（EMA: ethidium monoazide）を利用して、死菌由来 DNA からの検出を抑制する方法です。

【原理】

EMA は可視光に暴露すると、核酸に共有結合する色素です。細菌を EMA で処理すると、生菌では EMA が細胞内部に浸透しないため DNA への化学修飾は起こりませんが、死菌では細胞膜に生じた穴から内部に浸透し、核酸は EMA によって化学修飾されます。修飾された核酸は PCR 反応の鋳型となることができず遺伝子増幅されませんので、EMA 処理後に PCR を行くと生菌由来 DNA が選択的に検出されます。

EMA-qPCR 法の原理



※参考文献 *Biotechniques*. 2003 Apr; **34**(4):804-8, 810, 812-3. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K.

～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: qPCR 法)～

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 法が記載されました。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。詳しくは、下記の資料を参照してください。

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

https://www.takara-bio.co.jp/research/kensa/pdfs/book_9-1.pdf

◆CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(製品コード CY240/CY240S)の説明書

https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/cy240_cy240s_j.pdf

～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)のひとつとして記載されており、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

◆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



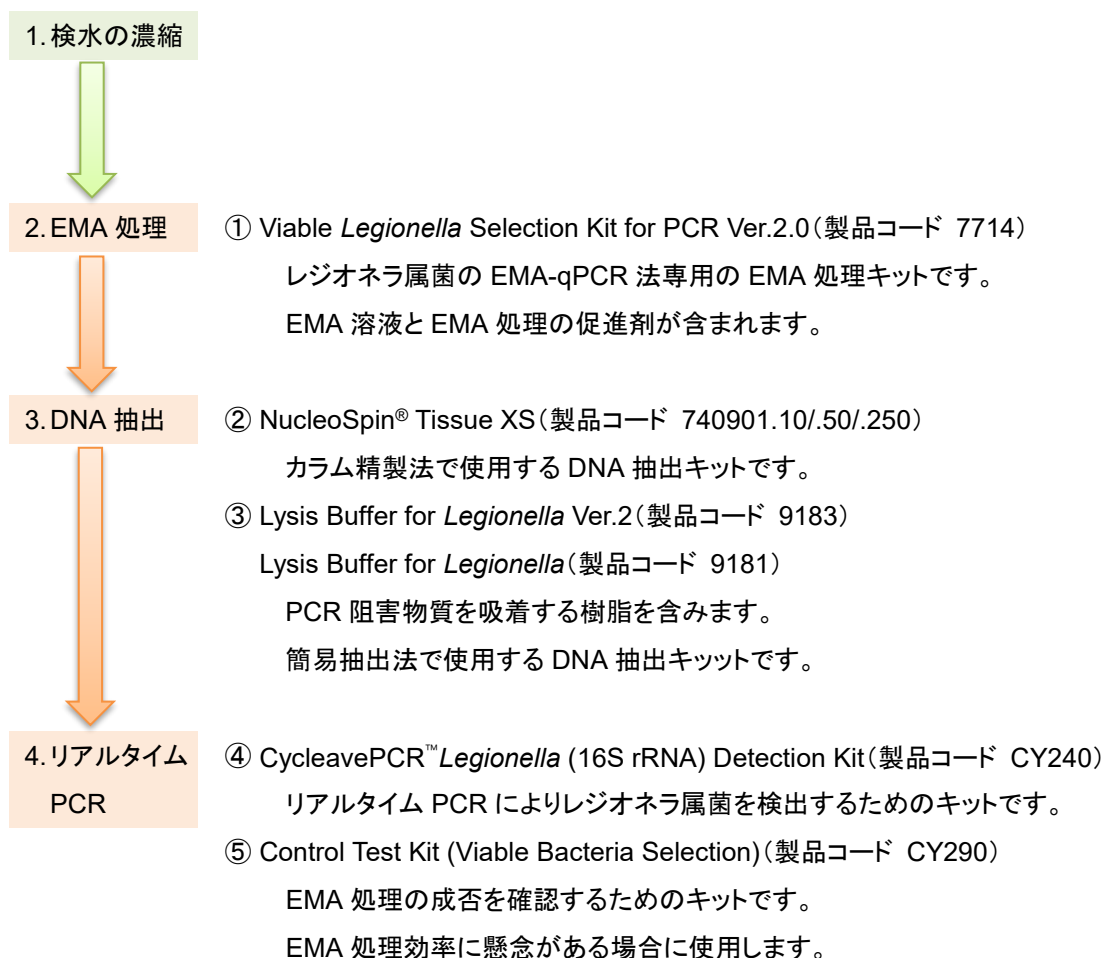
3)レジオネラ属菌検査の原則

1. 分離されたレジオネラ属菌の取り扱い、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-

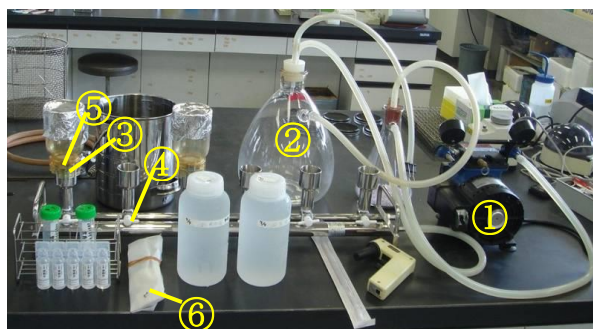
2. 準備

1)必要な試薬類



2) 必要な実験器具・装置

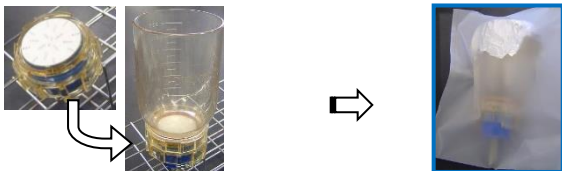
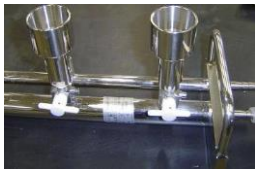
【ろ過濃縮】



※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 吸引ビン	
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to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。）

【遺伝子検査試薬の混合や分注等】

器具名称	用途・詳細
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 µl用、200 µl用、1,000 µl用、10 µl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）。
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はわずかに1分子の銑型の検出も可能であるため、反応液調製時に銑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。
1.5 ml チューブ	DNA抽出やPCR反応液の調製等に使用します。DNase、RNaseフリーの製品または、オートクレーブ滅菌したものを使用します。
攪拌機	サンプルと試薬を混合するためなどに使用します。
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ドウンするときに使用します。
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。
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。
ヒートブロック	DNAの熱抽出(95℃)等を使用します。
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。
ディスポーザブル手袋	着用することで、手の汚れや汗などによるコンタミネーションを防止できます（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。



【EMA 処理】

器具名称	用途・詳細
光照射装置	Viable Bacteria Selectionシリーズ専用のための光照射装置。 高輝度LEDランプを搭載した専用装置で、精度の高い安定したデータ取得に有効です。 一度に最大 30 サンプルの光照射が可能で、タッチパネルにて設定を行ったプログラムに従い光照射 ON/OFF を自動的に制御できます。  LED Crosslinker 30 (製品コードEM300)

【リアルタイム PCR】

器具名称	用途・詳細
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)
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、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。

(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biosafe/8136-biosafe-kanritaikei.html> 2024 年 12 月 20 日現在)

・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

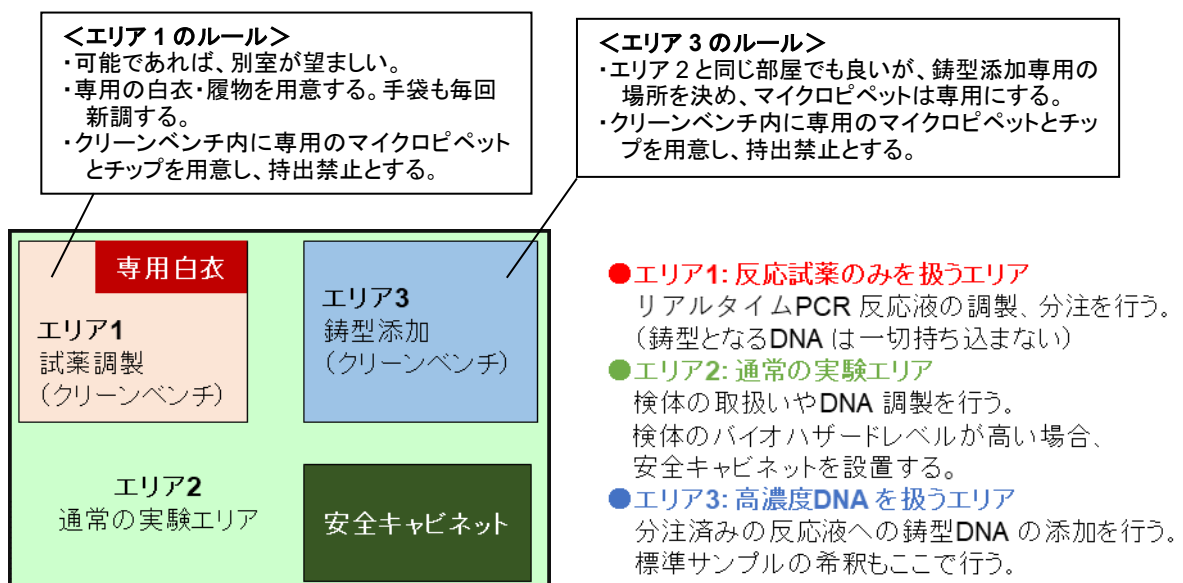
クロスコンタミを防止するには、DNA が付着している部分を想像してみます。チューブのフタから手袋へ...、チップの先の気泡がはじけてエアロゾルが発生...など。DNAが空中に舞っている可能性も想定して、フタを開ける時間は最小限にしましょう。

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。



※各エリアの分け方は、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。

3. 操作法

1) 検水のろ過と濃縮サンプルの作製 (エリア2で実施)

検水をろ過濃縮し、2,000倍濃縮液を調製します。

【操作】

1. 検水500 mlをメンブレンフィルター(直径47 mm、0.22 μ m)で吸引ろ過する。
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 $\times$ 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2 mlをマイクロチューブに採取する。
8. 15,000 rpm、4 $^{\circ}$ Cで5分遠心分離後、上清1,900 μ l (950 μ l $\times$ 2回)をピペットでおだやかに吸い取って除去し、2,000倍濃縮液100 μ l とする。

*残りの100倍濃縮液は、必要に応じて4 $^{\circ}$ Cで保存してください。



2) EMA 処理

1)で調製した 2,000 倍濃縮液に対し、EMA 処理を行います。

【必要な試薬類】

①Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0 (製品コード 7714)

レジオネラ属菌の EMA-qPCR 法専用の EMA 処理キットです。

製品内容 (50 検体分)

Solution A-leg (EP2) ^{*1}	250 μ l $\times$ 2
Solution B-leg (EP2) ^{*2}	200 μ l $\times$ 4
Dilution Buffer	1 ml



^{*1} EMA 処理の促進剤です。EMA 処理の成否を確認するためのプラスミド DNA を含みます。

^{*2} EMA を含む溶液です。

※光による化学反応により物質性状が変化し、核酸修飾能力が減衰しますので、遮光に留意してください。

-20℃で保存する際には、アルミパックに入れて下さい。実験操作中は、アルミホイル等で覆い、できるだけ光に当てないように注意してください。

【操作】

★事前に EMA 処理条件の検討を行い、最適な条件を決定することをお勧めします（「5. EMA 処理条件の検討方法」を参照）。以下では、標準的な EMA 処理条件での操作法をご紹介します。

1. Solution B-leg (EP2)を Dilution Buffer で 2 倍に希釈する（用時調製）。

2. 検体濃縮液 40 μ l に Solution A-leg (EP2)を 10 μ l添加する。

※Solution A-leg (EP2)は粘性が高いため、ピペットマンでの操作はゆっくりと行い、分取した量を目視で確認してから添加してください。

3. 1 で希釈した Solution B-leg (EP2)を 5 μ l 添加する。

●検体数が多い場合は、予め必要量+ α の Solution A-leg (EP2)&Solution B-leg (EP2)の混合液を調製し、それを各チューブに分注してご使用ください。その際には、溶液の粘性が高いため、よく混合し、分注操作にも留意してください。

4. ボルテックスで混合した後、軽くスピンドウンする（チューブの蓋や壁に付いた水滴がだいたいチューブ底に落ちる程度に）。あるいは、ピペッティングにより混合する。

5. チューブを LED Crosslinker にセットし蓋を閉じる。

6. 操作パネルの＜Set Time＞で照射時間を OFF Time 15:00、ON Time 15:00 にセットし、START を押して、光照射を行う。

7. 軽くスピンドウンし、ヒートブロックで 95℃、2 分間加熱して殺菌する。



3) DNA 抽出

EMA 処理後の検体から DNA を抽出します。

DNA 抽出法には NucleoSpin® Tissue XS によるカラム精製法と Lysis Buffer for *Legionella* による簡易抽出法の 2 種類があります。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。また、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。

【操作】

NucleoSpin® Tissue XS (製品コード 740901.10/50/250)を用いたカラム精製法

1. 2)-7.で加熱殺菌を終えたサンプル全量 (55~65 µl)に、それぞれ Buffer T1 を 160 µl 加える。軽く混合して、スピンドウンする。
2. さらに Proteinase K^{*1} を 16 µl 加える。ボルテックスにて混合 (5 秒×2)して、スピンドウンする。
3. 56°C、10 分間インキュベートする。
4. スピンドウンしたサンプルに Buffer B3 を 160 µl 加える。ボルテックスにて混合 (5 秒×2)して、スピンドウンする。
5. 70°C、5 分間インキュベートし、ボルテックスする。
6. 各サンプルが室温に戻ったことを確認して、スピンドウンしたサンプルにエタノール (96~100%)を 160 µl 加え、ボルテックスにて混合 (5 秒×2)して、軽くスピンドウンする。
7. NucleoSpin® Tissue XS Column を Collection Tube (2 ml)にセットする。
8. 6 の溶液をカラムに添加し、11,000 ×g、1 分間遠心する。
9. カラムを新しい Collection Tube (2 ml)にセットする。
10. カラムに Buffer B5^{*2} を 50 µl 添加し、11,000 ×g、1 分間遠心する。ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
11. カラムに Buffer B5^{*2} を 50 µl 添加し、11,000 ×g、2 分間遠心する。カラム上に液が残っていないことを確認する。
12. カラムを 1.5 ml マイクロチューブにセットする。
13. カラムに Buffer BE を 25 µl 添加し、11,000 ×g、1 分間遠心し、DNA 溶液を回収する (溶出 1 回目)。
14. 再度、13 の操作を行う (溶出 2 回目)。
15. 得られた DNA 溶液の液量がおおよそ 50 µl であることを確認する。

^{*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 を 1 ml 加え溶解する。

溶解後の Proteinase K 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) を用いた場合

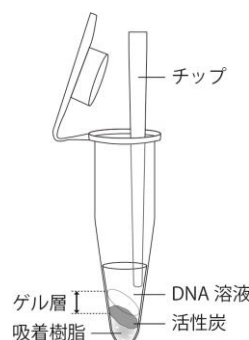
- 2)-7 で加熱殺菌を終えたサンプル全量 (55~65 μ l) を 15,000 rpm (最高速度)、4℃で 5 分間遠心し、残液が 25 μ l になるように上清を除去する。
- 残液 25 μ l に Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 を 25 μ l 添加し、ボルテックスで軽く混合した後、スピンドウンする。
 - ・Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 は、4℃保存で凍結厳禁です。
 - ・使用前にボルテックス等でよく混合して下さい。
 - ・分取する前にピペッティングで混合し、樹脂量が均一になるよう注意して下さい。
 - ・先端の細いチップを用いると、チップが詰まる場合があります。その場合は、チップの先端を切断してご使用ください。
- 95℃で 10 分インキュベートする。
- 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。
- 11,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。
- 溶出液 (約 50 μ l) を DNA 溶液として回収する。
- 回収液のうち、5 μ l をリアルタイム PCR に用いる。

Lysis Buffer for *Legionella* (製品コード 9181) を用いた場合

- 2)-7 で加熱殺菌を終えたサンプル全量 (55~65 μ l) を 15,000 rpm (最高速度)、4℃で 5 分間遠心し、上清を除去する。
- 1 の沈殿物に Lysis Buffer for *Legionella* を 50 μ l を添加し、ボルテックスで軽く混合した後、スピンドウンする。
 - ・Lysis Buffer for *Legionella* は、4℃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、チップが詰まる場合があります。その場合は、チップの先端を切断してご使用ください。
- 95℃で 10 分インキュベートする。
- ボルテックスで軽く混合した後、15,000 rpm (最高速度)、4℃で 10 分間遠心する。
- 氷上で 5 分間静置する。
- 上清 25 μ l を DNA 溶液として回収する。
 - ・抽出液が青くなりますが、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℃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。5 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。



◆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 溶液を上の方からそっと吸い取ってください。

*ゲル層は、目視では確認できません。

4)リアルタイム PCR

DNA 溶液 5 μ l を鋳型としてリアルタイム PCR によりレジオネラ属菌の検出を行います。また、必要に応じて、Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)により EMA 処理の成否の確認を行います。

【必要な試薬類】

① CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (製品コード CY240)

リアルタイム PCR によりレジオネラ属菌を検出するためのキットです。

製品内容 (50 検体分)

2× Cycleave Reaction Mixture	625 μ l × 1
16S Primer/Probe Mix(FAM, ROX) ^{*1}	250 μ l × 1
Solution E ^{*2}	125 μ l × 1
16S Positive Control (1×10 ⁶ copies/ μ l) ^{*3}	100 μ l × 1
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、ご注意ください。

^{*4} 16S Positive Control 希釈用の溶液です。

② Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)(製品コード CY290) Optional

EMA 処理の成否を確認するためのキットです。EMA 処理効率に懸念がある場合に使用します。

製品内容 (50 検体分)

2× Cycleave Reaction Mixture	625 μ l × 1
Primer/Probe Mix ^{*5}	250 μ l × 1
dH ₂ O	1 ml × 1
Positive Control ^{*6}	125 μ l × 1

^{*5} 蛍光標識 Probe を含むため、遮光保存して下さい。

^{*6} 他の試薬にコンタミネーションしないよう、ご注意ください。

【操作】

レジオネラ 16S rRNA 検出

操作法の詳細は、CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (製品コード CY240/CY240S) の説明書および別冊のハンドブック「レジオネラ属菌の遺伝子検査 ～生菌死菌検出法 (qPCR)～」をご参照ください。

1. 16S Positive Control を EASY Dilution で段階希釈する。
2. 氷上で必要数+α のマスターミックスを調製する。

2× Cycleave Reaction Mix	12.5 μl
16S Primer/Probe Mix	5.0 μl
Solution E	2.5 μl
Total	20.0 μl

3. リアルタイム PCR 用チューブに 20 μl ずつ分注し、軽く蓋をする。
4. Negative Control 用に EASY Dilution を 5 μl 添加し、しっかり蓋をする。
5. 16S Positive Control と DNA 抽出液を 5 μl 添加し、しっかり蓋をする。
6. チューブを軽くスピンドウンし、リアルタイム PCR 装置にセットする。
7. 以下の条件でリアルタイム PCR を実施する。

Thermal Cycler Dice® Real Time III の場合 ※Speed は“Fast” を選択

初期変性(Hold) (95°C 10 秒) × 1 サイクル

↓

3 step PCR (95°C 5 秒、55°C 20 秒、72°C 20 秒) × 45 サイクル

EMA 処理の成否の確認

操作法の詳細は、Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (製品コード CY290) の説明書をご参照ください。

1. 氷上で必要数+α のマスターミックスを調製する

2× Cycleave Reaction Mix	12.5 μl
Primer/Probe Mix	5.0 μl
dH ₂ O	2.5 μl
Total	20.0 μl

2. リアルタイム PCR 用チューブに 20 μl ずつ分注し、軽く蓋をする。
3. Negative Control 用に滅菌水を 5 μl 添加し、しっかり蓋をする。
4. Positive Control と DNA 抽出液を 5 μl 添加し、しっかり蓋をする。
5. チューブを軽くスピンドウンし、リアルタイム PCR 装置にセットする。
6. 以下の条件でリアルタイム PCR を実施する。

Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズを用いる場合

※Speed は“Fast” を選択

初期変性(Hold) (95°C 10 秒) × 1 サイクル

↓

3 step PCR (95°C 5 秒、55°C 10 秒、72°C 20 秒) × 45 サイクル

4. 解析

1) 検出結果の判断基準についての参考情報

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。

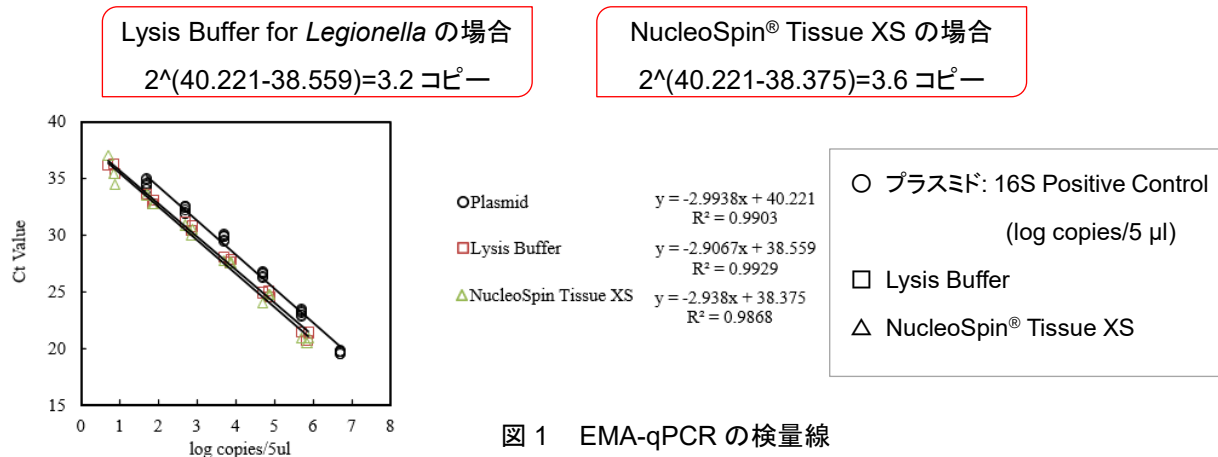


図 1 EMA-qPCR の検量線

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-

表 1. 平板培養法と(EMA)-qPCR 法との比較

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%				
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%				
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%				

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 1)。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。

【結果の判定】

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、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。

2) 解析手順

まずリアルタイム PCR 結果 (定量値)を確認し、次にその値を菌数に換算します。その後、検査目的に応じて、結果の判定を行います

- リアルタイム PCR によるレジオネラ属菌の解析結果の内、定量値 (16S Positive Control コピー数換算値)を取得する。

Sample Type	Sample ID	Ct Avg.(CP)	Ct SD(CP)	Qty Avg.(CP)	Qty SD(CP)
UNKN	11	37.33	1.061E-001	3.220E+000	2.938E-001
UNKN	14	38.70	9.617E-001	1.156E+000	8.616E-001
UNKN	17	--	--	--	--
UNKN	20	--	--	--	--
UNKN	26	36.41	2.121E-001	7.126E+000	1.295E+000
UNKN	38	33.84	1.202E-001	6.512E+001	6.731E+000

Thermal Cycler Dice® Real Time System の場合

- 「4. 解析 1) 検討結果の判断基準についての参考情報」を参考に、1.のコピー数を菌数に換算する。
簡易抽出法 (Lysis Buffer for *Legionella* 使用) の場合 : 3 コピー $\div$ 1 CFU なので 1.の値を 3 で割る。
カラム抽出法 (NucleoSpin Tissue XS 使用) の場合 : 4 コピー $\div$ 1 CFU なので 1.の値を 4 で割る。
- 2.の菌数を 100 ml あたりの菌数に換算する。
2,000 倍濃縮液を使用し、「3. 操作法」の通りに操作した場合、2.の値を 12.5 倍する。
- 「4. 解析 1) 検討結果の判断基準についての参考情報」を参考に、判定を行う。
Ct 値が得られた場合を陽性とする。

手順 1. Qty(CP)	手順 2. 1 反応あたりの菌数 「1.」 $\div$ 3	手順 3. 100 ml あたりの菌数 「2.」 $\times$ 12.5	手順 4. 判定
3.2	1.1	13.3	陽性
1.2	0.4	5.0	陽性
ND	--	--	陰性
ND	--	--	陰性
7.1	2.4	29.6	陽性
65.1	21.7	271.0	陽性

ND: Not detected (不検出)



5. EMA 処理条件の検討方法

1) はじめに

下記に示したレジオネラ属菌の標準的な EMA 処理条件は、予めレジオネラ属菌に対して最適化したものですが、検体に含まれる夾雑物の影響により、EMA 処理の効果が変化することがあります。そのような可能性が考えられる場合には、夾雑物存在下で EMA 処理の条件検討を行います。具体的には、純培養菌の生菌と死菌に夾雑物を混合したものを準備し、下記条件をもとに EMA 処理の時間や回数を変えて、その効果を確認します。

【死菌を用いての確認】

死菌抑制効果を確認します。

夾雑物を加えた死菌サンプルを用いて、最適な死菌抑制効果が得られる EMA 処理条件を検討します。

またその条件で EMA 処理を行った際に、どの菌数まで死菌抑制効果があるかを確認します。

【生菌を用いての確認】

EMA 処理の生菌への影響を確認します。

夾雑物を加えた生菌サンプルを用いて、EMA 処理あり／なしの結果を比較し、検出感度に影響を与えない EMA 処理条件を検討します。

＜レジオネラ属菌の標準的な EMA 処理条件＞

光照射装置 LED Crosslinker 30 (製品コード EM300)を使用する場合

1. Solution B-leg (EP2)を Dilution Buffer で 2 倍に希釈する(用時調製)。
2. 1.5 ml チューブに検体濃縮液を 40 μ l とり、Solution A-leg (EP2)を 10 μ l 添加する。
3. 1.で希釈した Solution B-leg (EP2)を 5 μ l 添加する。
4. ボルテックスで混合した後、軽くスピンドウンする(チューブの蓋や壁に付いた水滴がだいたいチューブ底に落ちる程度に)。あるいは、ピペッティングにより混合する。
5. チューブを LED Crosslinker にセットし蓋を閉じる。
6. 操作パネルの＜Set Time＞で照射時間を OFF Time 15:00、ON Time 15:00 にセットし、START を押して、光照射を行う。
7. 軽くスピンドウンし、ヒートブロックで 95°C、2 分間加熱して殺菌する。

※操作方法の全体は、「3. 操作法」を確認してください。

※EMA 処理条件の検討で EMA 処理を複数回行う場合は、3～6 の工程を繰り返し行ってください。

その場合、各回の処理で 5 分間光照射を行い、最後の回のみ 15 分間光照射を行ってください。

2) 条件検討の流れ

純培養菌の生菌と死菌に夾雑物を加えたサンプルを準備し、EMA 処理回数（1、2、3 回）の検討を行います*。EMA 処理を複数回行う場合は、各回の処理で 5 分間光照射を行い、最後の回のみ 15 分間光照射を行ってください。

* まずは、EMA 処理 1 回で試してみて、死菌の抑制効果が不十分な場合に、EMA 処理 2 回、3 回の検討を行うという手順でも良い。

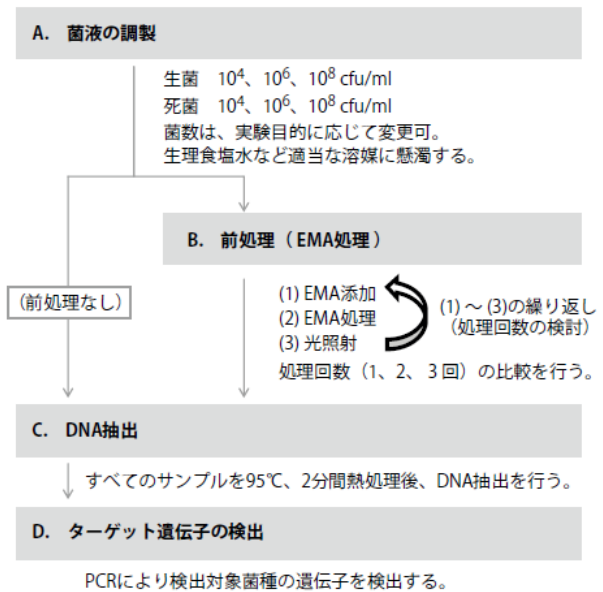


図 2 条件検討のフロー

3) 結果の解析

EMA 処理なしの結果と各種条件で EMA 処理を行った結果を比較して、生菌への影響と死菌抑制効果を確認します。図3は、培養したレジオネラ属菌を生理食塩水に懸濁したものを生菌サンプルとし、その懸濁液の一部を 95℃、2 分間熱処理したものを死菌サンプルとして、EMA 処理を 1 回実施した場合の実験例です。左図には Ct 値を、右図には EMA 処理なしとありの Ct 値の差（ Δ Ct 値）を示しています。

【生菌への影響】

生菌を用いた際の EMA 処理ありとなしの Ct 値の差（ Δ Ct 値）が EMA 処理による生菌の検出感度の低下を表します。適切な EMA 処理条件では、 Δ Ct 値は 1.5 以下となることが多く、その値が小さい程、生菌への影響が小さい EMA 処理条件です。EMA は死菌由来 DNA を効率よく修飾しますが、菌種や菌数、処理条件によっては生菌にも若干の影響を与えることが知られています。

図 3 の実験例では、 Δ Ct 値がいずれも 0 に近い値となっています。

【死菌抑制効果】

死菌を用いた際の EMA 処理ありとなしの Ct 値の差（ Δ Ct 値）が死菌抑制効果を表します。適切な EMA 処理条件では、 Δ Ct 値は 10.0 以上となることが多く、その値が大きい程、効果的に死菌を抑制できる EMA 処理条件です。結果を正しく解釈するために、どの程度まで死菌抑制効果があるかをあらかじめ確認しておくことが重要です。

図 3 の実験例では、 Δ Ct 値が 15 程度であったことから、 10^{-4} ～ 10^{-5} 程度の死菌抑制効果があると推測されます。

【EMA 処理条件の選定】

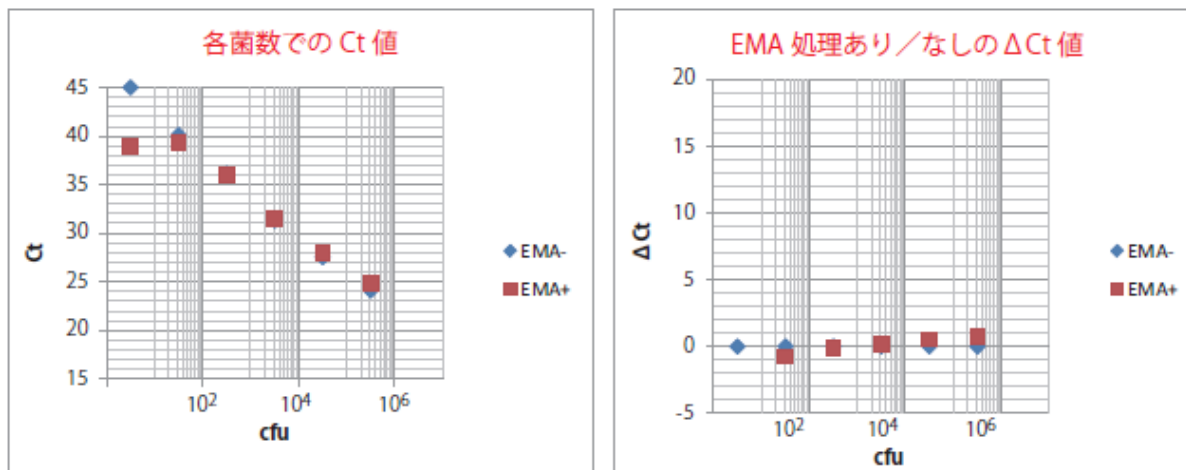
生菌と死菌の結果を踏まえて、生菌への影響が小さく、死菌抑制効果が十分な EMA 処理条件を選択します。

図 3 の実験例では、生菌への影響が小さく、死菌抑制効果も十分であることから、EMA 処理 1 回で十分と考えられます。

※夾雑物により EMA 処理効果に影響が生じると推測される場合には、EMA 処理回数の検討を行ってください。

【生菌への影響】

方法：生菌サンプルを段階希釈して、 $3.2 \times 10^5 \sim 3.2$ 個を EMA 処理し、EMA 処理なしの場合と比較することにより、生菌への影響を確認した。



【死菌抑制効果】

方法：死菌サンプルを段階希釈して、 3.2×10^7 、 3.2×10^5 個を EMA 処理し、EMA 処理なしの場合と比較することにより、死菌抑制効果を確認した。

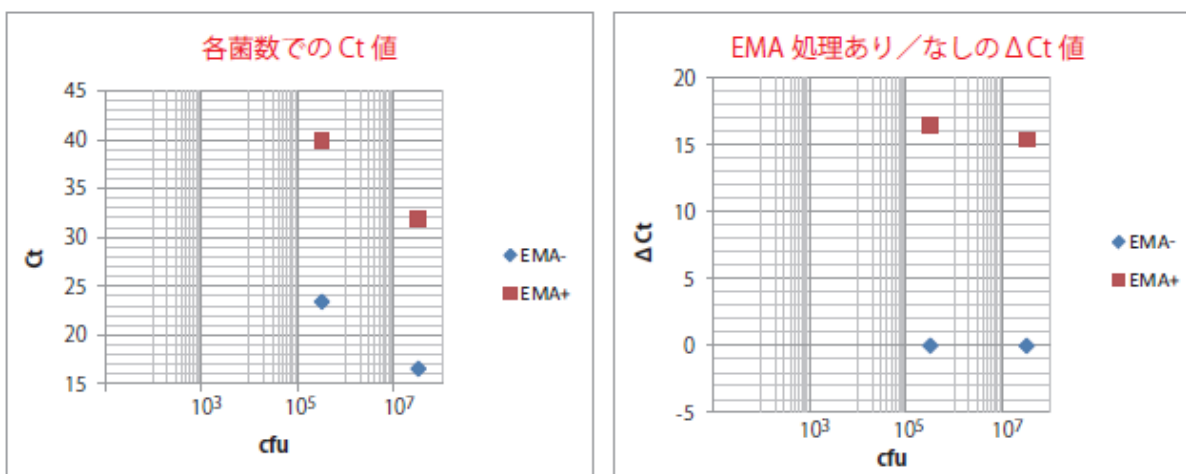


図 3 生菌への影響および死菌抑制効果

※光照射装置 LED Crosslinker 12 (製品コード EM200:終売)を使用

6. 関連製品一覧

製品名	概要	容量	製品コード	価格
EMA 処理試薬				
Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for PCR Ver.2.0	レジオネラ属菌の EMA-qPCR 法専用の EMA 処理試薬キット	50 回	7714	¥ 71,000
DNA 抽出試薬				
Lysis buffer for <i>Legionella</i> Ver.2	レジオネラ属菌からの DNA 簡易抽出用試薬	50 回	9183	¥ 21,000
Lysis buffer for <i>Legionella</i>	レジオネラ属菌からの DNA 簡易抽出用試薬	50 回	9181	¥ 17,000
NucleoSpin® Tissue XS	カラム精製法で使用するレジオネラ属菌からの DNA 抽出キット	10 回	740901.10	¥ 8,000
		50 回	740901.50	¥ 36,000
		250 回	740901.250	¥ 156,000
リアルタイム PCR 試薬				
CycleavePCR™ <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	広範囲なレジオネラ属菌を検出するキット	25 回	CY240S	¥ 42,000
		50 回	CY240	¥ 73,000
EMA 反応確認用試薬				
Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)	EMA 処理の成否を確認するキット	50 回	CY290	¥ 42,000
光照射装置				
LED Crosslinker 30	1.5 ml チューブ 30 本を一度に処理可能な EMA 処理専用装置	一式	EM300	¥ 200,000
リアルタイム PCR 装置				
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
リアルタイム PCR 装置関連消耗品				
0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps	Thermal Cycler Dice® Real Time System IV 向け独立型キャップ付き 8 連チューブ	120 strips	NJ902	¥ 30,000

・表示価格はすべて税別です。



- 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、特に記載なくても各社の商標または登録商標です。
- 本冊子記載の価格は2024年12月20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
