

レジオネラ属菌の遺伝子検査～生菌検出法(LC EMA-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。

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

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、確実かつ高感度に生菌選択的な検出が可能な「LC 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. LC EMA-qPCR法を始めるにあたって	2
1) EMA-PCR法について	
2) LC EMA-qPCR法の原理と検査の流れ	
3) レジオネラ属菌検査の原則	
2. 準備	6
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. 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) 液体培養	
3) EMA処理	
4) DNA抽出	
5) リアルタイムPCR	
4. 解析	21
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. 関連製品一覧	23



1. LC EMA-qPCR 法を始めるにあたって

まず初めに、LC EMA-qPCR 法の基本となる「EMA-PCR 法」について簡単にご紹介します。EMA-PCR 法は PCR による生菌由来 DNA 検出法であり、LC EMA-qPCR 法は、この EMA-PCR 法と液体培養 (LC: Liquid Culture) による生菌の選択的な増殖とを組み合わせた手法です。

1) EMA-PCR 法について

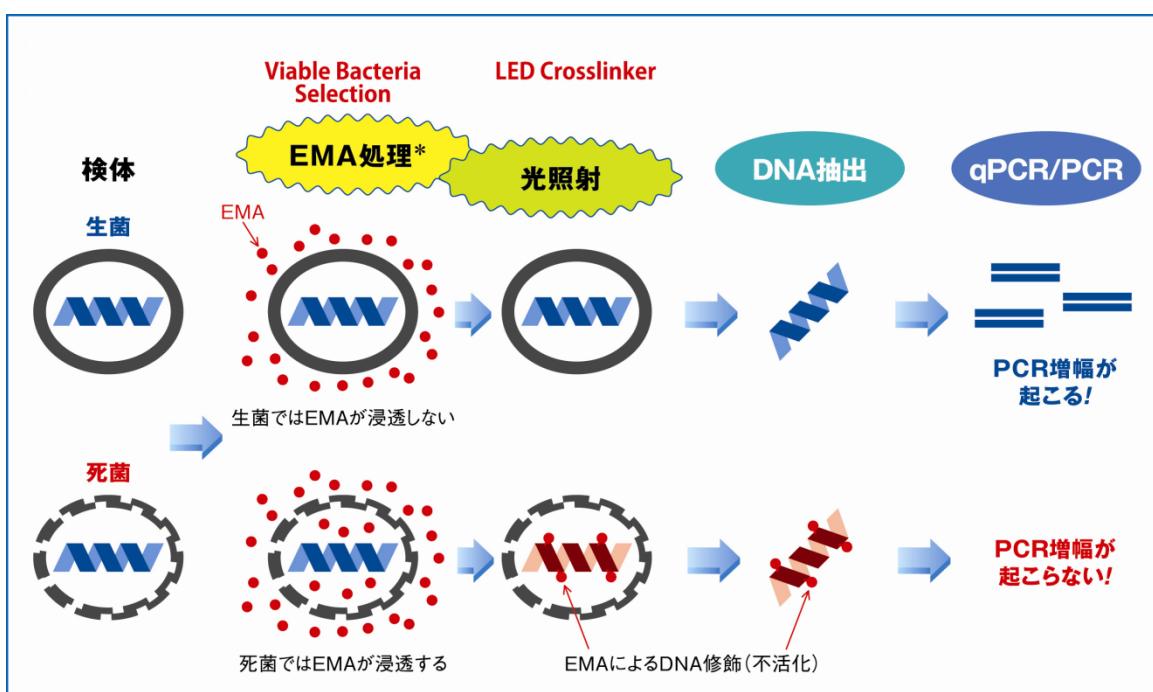
【EMA-PCR 法の用途】

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。

【EMA-PCR 法の原理】

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 反応の錆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 を行うと生菌由来 DNA が選択的に検出されます。



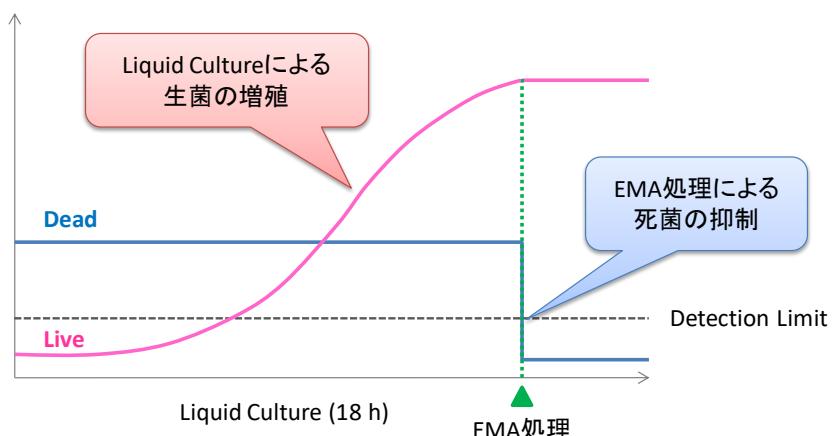


2) LC EMA-qPCR 法の原理と検査の流れ

【LC EMA-qPCR 法による生菌検出】

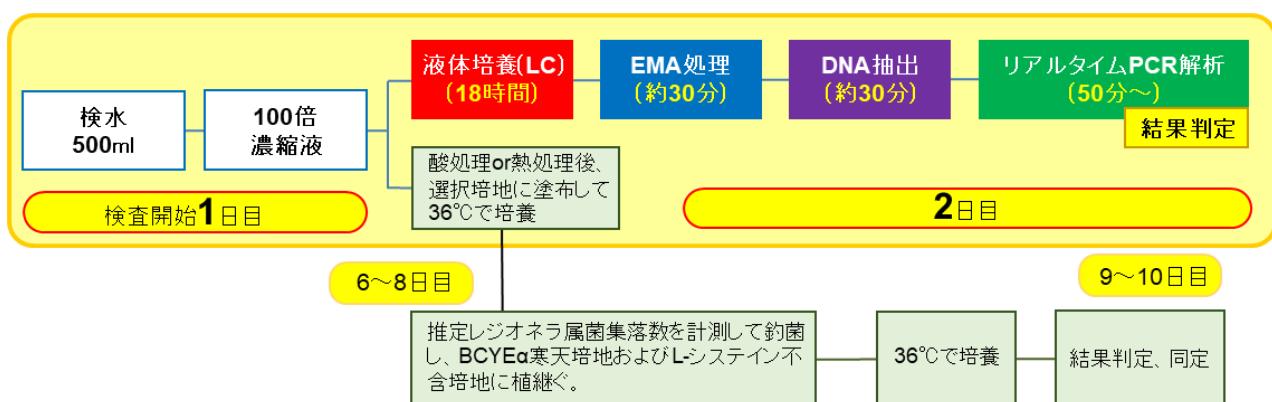
LC EMA-qPCR 法は、液体培養(LC: liquid culture)と EMA-PCR 法を組み合わせた生菌選択的な検出法です。液体培養により生菌を選択的に増殖させ、さらに EMA 处理により死菌由来の PCR 検出を抑制します。前述の EMA-PCR 法に比べ、より確実でかつ高感度な生菌検出法と言えます。

LC EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌の検出法は、遺伝子検査の迅速性を活かし、なおかつ培養法と相関の高い結果が得られる手法として、「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」で報告されました。



【LC EMA-qPCR 法による検査の流れ】

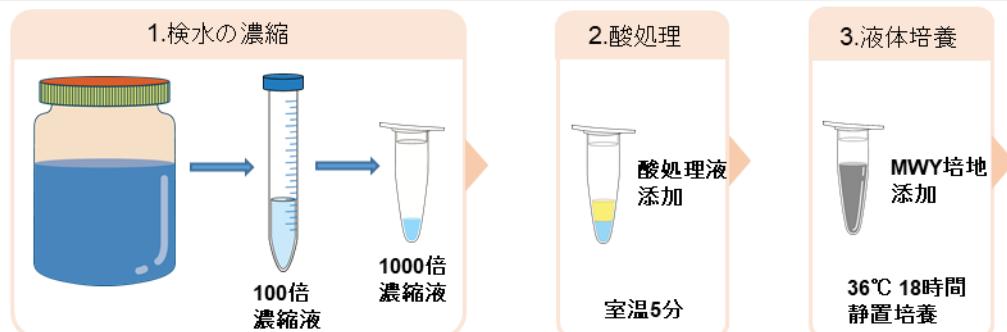
LC EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌検出は、2 日間で結果判定ができます。





1日目は、検水をろ過濃縮し、酸処理を行った後、液体培養を開始します。2日目は、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日目



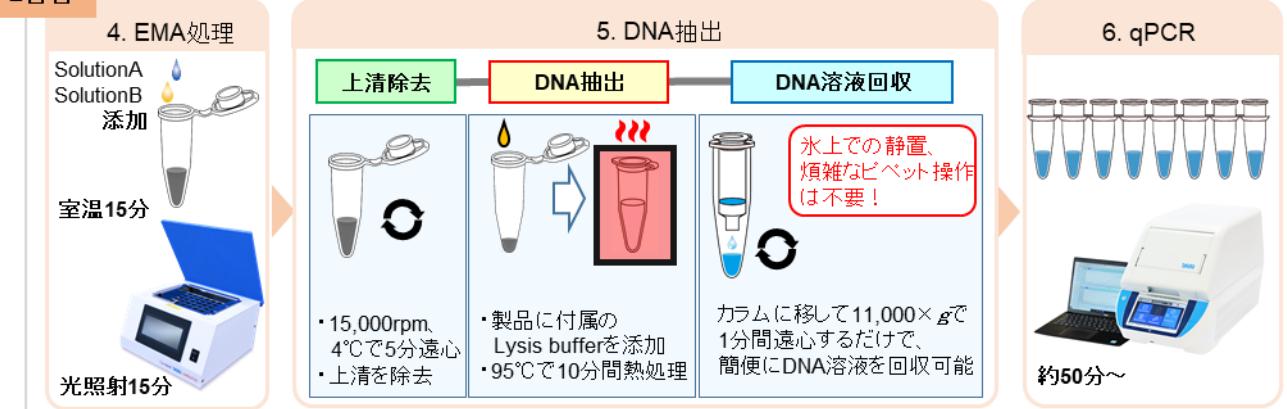
1. 検水の濃縮

2. 酸処理

3. 液体培養: Liquid Culture

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。

2日目



4. EMA処理

死菌由来DNAをEMA修飾することでPCR增幅を抑制し、生菌由来DNAの選択性的検出を可能にします。

5. DNA抽出

簡易抽出試薬により、リアルタイムPCR用の鑄型DNAを調製します。

6. 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。



～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。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

◆CycleasePCR™ 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

～液体培養を行わないレジオネラ属菌生菌遺伝子検出法(EMA-qPCR 法)～

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 法に比べて、(1)18 時間の液体培養が必要ないためより迅速であること、(2)生菌の培養増殖性に左右されないことがメリットであり、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」(発行: 公益財団法人日本建築衛生管理教育センター)に、迅速検査法のうち「生菌のみを検出する遺伝子検査法」のひとつとして収載されています。EMA-qPCR に使用する試薬は、LC EMA-qPCR 用とは異なります。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～生菌検出法(EMA-qPCR)～」

https://www.takara-bio.co.jp/research/kensa/pdfs/book_7-1.pdf

◆Viable Legionella Selection Kit for PCR Ver.2.0(製品コード 7714)の説明書

https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/7714_j.pdf

3) レジオネラ属菌検査の原則

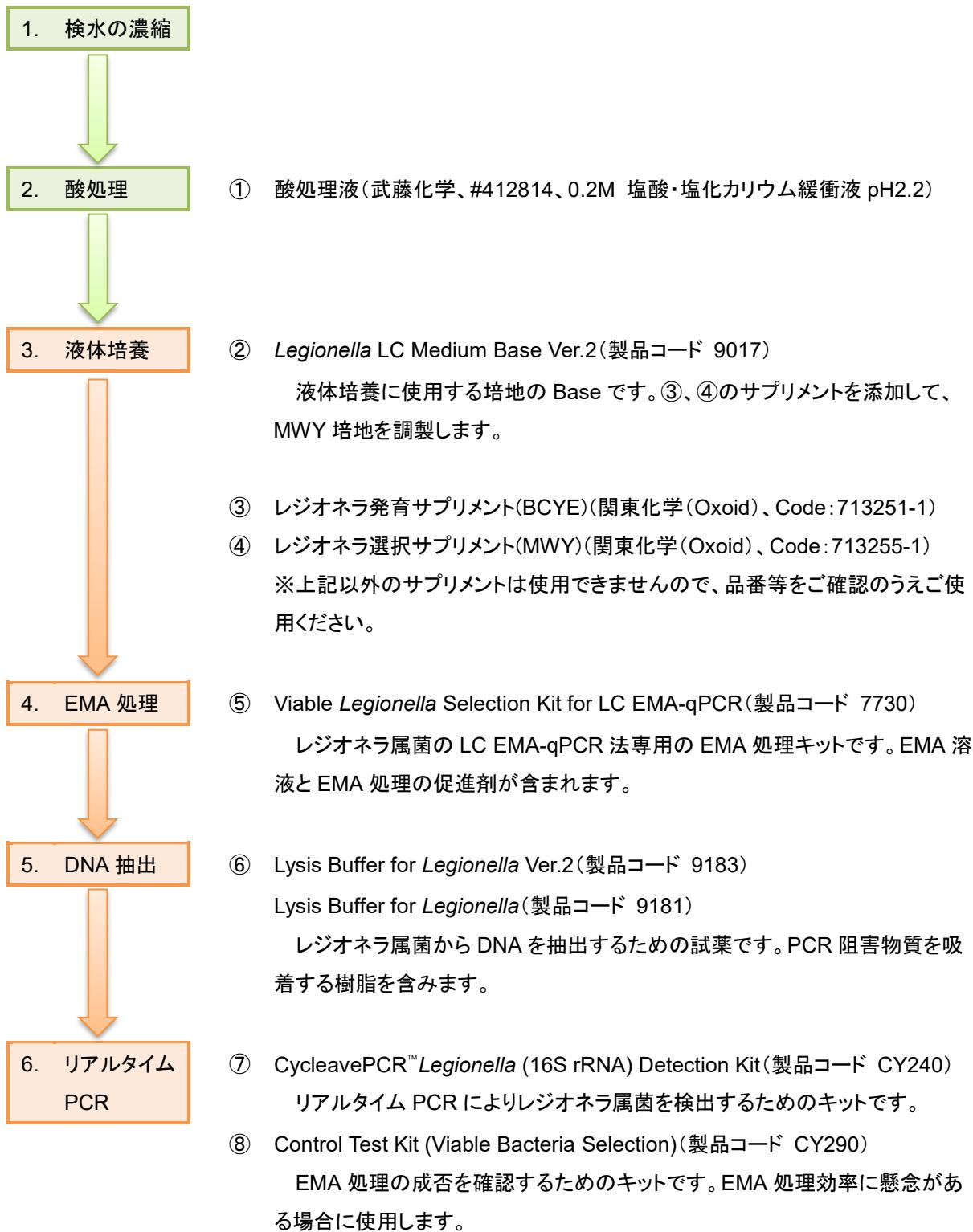
1. 分離されたレジオネラ属菌の取り扱いは、レベル2の実験室で行う。
2. レジオネラ属菌の検査は、第4版レジオネラ症防止指針の「第5章レジオネラ属菌の検査法」を参考に実施する。
3. 培養法における陽性結果は、感染能力を有する生菌の存在を示している。
4. 遺伝子検査法は、死菌の存在により陽性となることに注意しなければならない。
5. 遺伝子検査は、その特徴を十分に理解して利用することが必要である。
6. 同一検体であっても、培養法・分離法の違いにより異なるレジオネラ属菌が分離されてくる可能性があることに注意しなければならない。
7. 我が国におけるレジオネラ属菌検査の精度管理システムの構築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

-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-



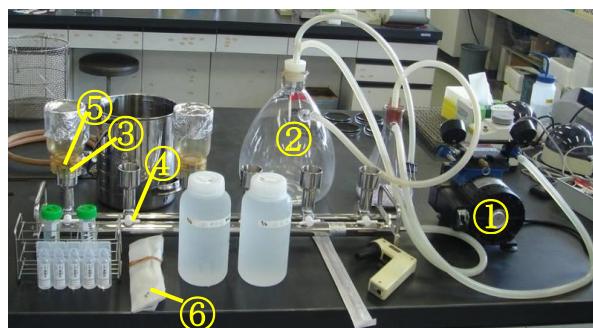
2. 準備

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

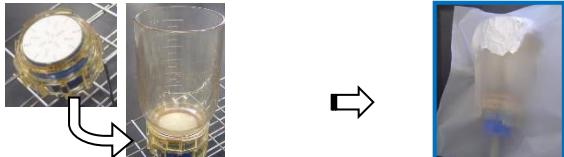
洗剤でしっかり洗浄



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holder	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、専用パ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holder マニホールド	フィルターholder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holder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。
鑄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)
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。
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ダ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。
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°C)等に使用します。
インキュベーター	液体培養(36°C)等に使用します。
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 处理】

器具名称	用途・詳細
光照射装置	<p>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。</p> <p>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。</p> <div style="text-align: center;">  <p>LED Crosslinker 30 (製品コードEM300)</p> </div>

【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	<p>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。</p> <div style="text-align: center;">  <p>Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC(製品コード TP1010 等)</p> </div>
リアルタイムPCR用反応チューブ	<p>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。</p> <div style="text-align: center;">  <p>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</p> </div>



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

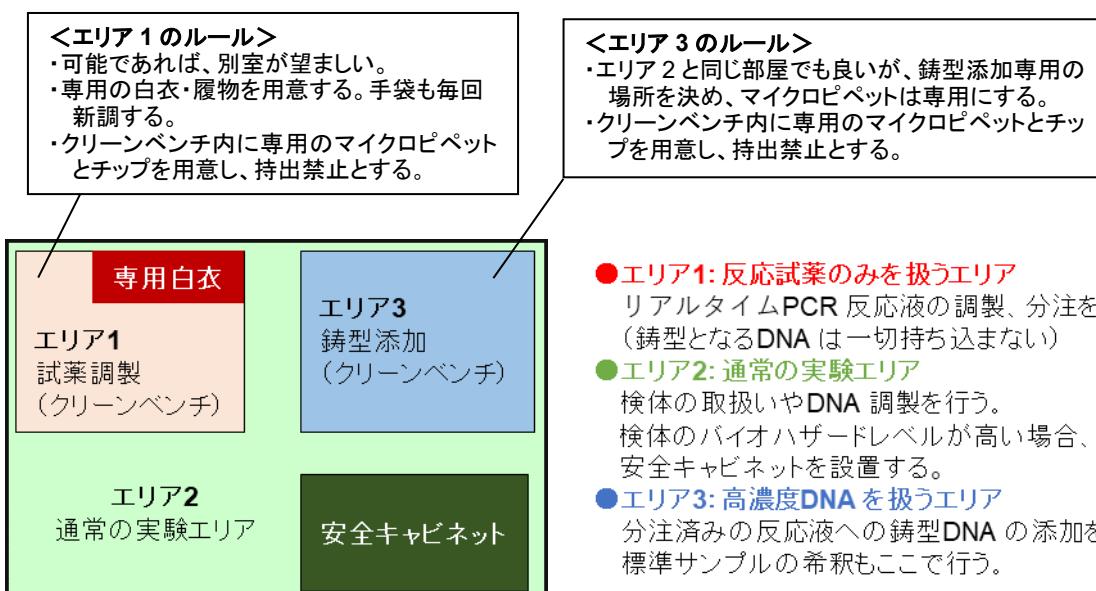
クロスコンタミを防止するには、DNA が付着している部分を想像してみます。チューブのフタから手袋へ…、チップの先の気泡がはじけてエアロゾルが発生…など。DNAが空中に舞っている可能性も想定して、フタを開ける時間は最小限にしましょう。

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。



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、100倍濃縮液と1,000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 μm)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×2回)



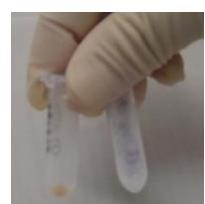
3. 50 ml滅菌ファルコンチューブに、注射用蒸留水5 mlを入れて準備しておく。



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. 15,000 rpm、4°Cで5分遠心分離後、上清900 μlをピペットでおだやかに吸い取って除去し、1,000倍濃縮液100 μlとする。

*残りの100倍濃縮液は、必要に応じて4°Cで保存してください。



2) 液体培養

微生物汚染が激しい検水では、液体培養による増殖率が低くなる可能性があるため、微生物汚染の指標として ATP 値を測定します。その後、1,000 倍濃縮液(または 100 倍濃縮液)の酸処理を行い、18 時間の液体培養を行います。

【必要な試薬類】

- ① 酸処理液(武藤化学、#412814、0.2M 塩酸・塩化カリウム緩衝液 pH2.2)
- ② *Legionella* LC Medium Base Ver.2(製品コード 9017)



液体培養に使用する培地の Base です。③と④のサプリメントを添加して、MWY 培地を調製します。

製品内容(100 検体分)

Legionella LC Medium Base Ver.2 93.52 ml × 1

- ③ レジオネラ発育サプリメント(BCYE)(関東化学(Oxoid)、Code:713251-1)
- ④ レジオネラ選択サプリメント(MWY)(関東化学(Oxoid)、Code:713255-1)

※上記以外のサプリメントは使用できませんので、品番等ご確認のうえご使用ください。

【準備】

Legionella LC Medium Base Ver.2(製品コード 9017)の説明書に従い、MWY 培地を調製する。

1. *Legionella* LC Medium Base Ver.2 を室温で溶解する。
2. レジオネラ発育サプリメントを滅菌精製水(温水:50°C未満)5 ml で溶解し、5 ml 全量を 1. に添加する。
3. レジオネラ選択サプリメントを滅菌精製水 2 ml で溶解し、2 ml 全量を 2. に添加する。
4. スターラーで攪拌しながらマイクロチューブに 1 ml ずつ分注し、-20°Cで保存する。

※活性炭によるチップの目詰まりに注意してください。

【操作】

1. ATP 測定(可能な場合)

1.1 100 倍濃縮液の ATP 値を測定する。

(例)ルミテスター(キッコーマン)を用いる場合

- ・綿棒を 100 倍濃縮液に浸し、直ちに測定(検水 10 ml 相当)
- ・5,000 RLU 以上の検体は、1,000 倍濃縮液と 100 倍濃縮液の両方で以下の操作を行うとともに、2.2 の酸処理時間を 20 分に延長する。

2. 酸処理

2.1 1,000 倍濃縮液(および 100 倍濃縮液)100 µl に酸処理液 100 µl を添加する。

2.2 室温で 5 分(または 20 分)静置する。

3. 液体培養(Liquid Culture)

3.1 MWY 液体培地 900 µl を添加し、ボルテックスで軽く混合する。

3.2 3.1 の濃縮試料液加 MWY 液体培地を 36°C、18 時間静置培養する。

培養後、ボルテックスで混合した後、500 ×g で 15 秒間遠心し、上清 100 µl をマイクロチューブに分取する。

※培養後、すぐに EMA 処理を行わない場合は、4°Cで保存してください。

※残りの濃縮試料液加 MWY 液体培地は、必要に応じて 4°Cで保管してください。



3) EMA 処理

液体培養後の検体につき、EMA 処理を行います。

【必要な試薬類】

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

レジオネラ属菌の LC 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 (LC)^{*1} 625 µl × 2

Solution B-leg (LC)^{*2} 200 µl × 4



^{*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°C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、できるだけ光に当たらないよう注意してください。

【操作】

1. 分取したサンプル 100 µl に Solution A-leg (LC)を 25 µl 添加する。

※Solution A-leg (LC)は粘性が高いので、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。

2. Solution B-leg (LC)を 12.5 µl 添加する。

●検体数が多い場合は、予め必要量 + α の Solution A-leg (LC)&Solution B-leg (LC)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、溶液の粘性が高いので、よく混合し、分注操作にも留意してください。

3. ボルテックスで混合した後、手で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ない程度に)。あるいは、ピッティングにより混合する。

※混合後、遠心機等を使用したスピンドウンは行わないでください。遠心操作により、活性炭と共にレジオネラ菌が沈殿すると、光照射が十分に行われない可能性があります。

4. チューブを LED Crosslinker にセットし蓋を閉じる。

5. 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。(OFF Time 15:00 の間に活性炭が沈降し、レジオネラ菌は浮遊した状態となります。)



4) DNA 抽出

EMA 処理後の検体から DNA を抽出します。

【必要な試薬類】

Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2(製品コード 9183)

または

Lysis Buffer for *Legionella*(製品コード 9181)



レジオネラ属菌から DNA を抽出するための試薬です。Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 では夾雑物を Filter Column で除去できるため、DNA 溶液をより簡便に回収できます。

製品内容(50 検体分)

Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 500 µl × 5

Lysis Buffer for *Legionella* 500 µl × 5

【操作】

Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2(製品コード 9183) を用いた場合

1. 3)-5 で EMA 処理を行ったサンプルを 12,000～15,000 rpm(最高速度)、4°Cで 5 分遠心し残液が 25 µl となるように上清を除去する。
 - ・1.の操作後、サンプルは -20°C 保存が可能です。
2. 1.の残液 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、スピンドダウンする。
 - ・Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 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トイングで混合し、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、チップの先端を切斷してご使用ください。
3. 95°Cで 10 分インキュベートする。
4. 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。
5. 11,000 × g で 1 分間遠心する。
6. 溶出液(約 50 µl)を DNA 溶液として回収する。
7. 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) を用いた場合

1. 3)-5.で EMA 処理を行ったサンプルを 12,000~15,000 rpm(最高速度)、4°Cで 5 分遠心し、上清を除去する。
 - ・上清を除去した状態で -20°C 保存が可能です。
2. 1 の沈殿物に Lysis Buffer for *Legionella* を 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トで混合し、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。
3. 95°Cで 10 分インキュベートする。
4. 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。
5. 氷上で 5 分間静置する。
6. 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。



5)リアルタイム PCR

DNA 溶液 5 µl を錆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 µl × 1
16S Primer/Probe Mix(FAM, ROX) *1	250 µl × 1
Solution E *2	125 µl × 1
16S Positive Control(1×10 ⁶ copies/µl) *3	100 µl × 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、ご注意下さい。

*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 µl × 1
Primer/Probe Mix *5	250 µl × 1
dH ₂ O	1 ml × 1
Positive Control *6	125 µl × 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、ご注意下さい。



【操作】

レジオネラ 16S rRNA 検出

操作法の詳細は、CycleasePCR™ *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× Cyclease 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 System 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 处理の成否の確認

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× Cyclease 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

【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】

-「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-

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。

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

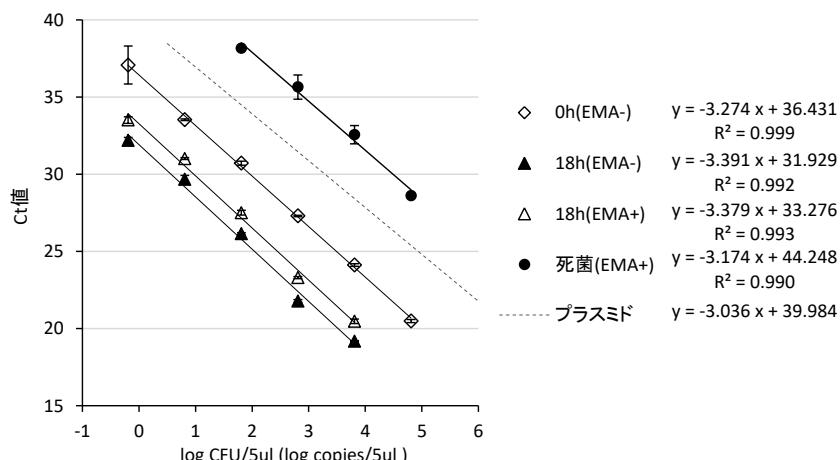


図 1 アメーバ培養 *L. pneumophila* を用いた LC EMA-qPCR の検量線

※上記の試験では、DNA 抽出に Lysis Buffer for *Legionella* が使用されました。Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 を用いた場合も、コピー数から CFU への換算値は上記と同じ値を使用してください。

【LC EMA-qPCR 法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)」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 年度～平成 27 年度分担研究報告書」より引用-

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 1CFU/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。(表 1)

表 1. 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較

		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) 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。

1. 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

2. 「1)検出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。

100 コピー ≈ 1 CFU とすると、1.の値を 100 で割る。

3. 2.の菌数を 100 mlあたりの菌数に換算する。

1,000 倍濃縮液を使用した場合は、2.の値を 110 倍する。

(100 倍濃縮液を使用した場合は、2.の値を 1,100 倍する。)

4. 「1)検出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。

1 CFU/100 ml 以上を陽性とする。

手順1	手順2	手順3	手順4
Qty(CP)	1反応当りの菌数 「1」÷ 100	100 ml当りの菌数 「2」× 110	判定 陽性:「3」≥1
3.2	0.03	3.5	陽性
1.2	0.01	1.3	陽性
ND	--	--	陰性
ND	--	--	陰性
7.1	0.07	7.8	陽性
65.1	0.65	71.6	陽性
0.4	0.00	0.4	陰性

ND: Not detected(不検出)



5. 関連製品一覧

製品名	概要	容量	製品コード	価格
液体培養試薬				
Legionella LC Medium Base Ver.2	液体培養に使用する培地のBase	93.52 ml	9017	¥24,000
EMA 处理試薬				
Viable Legionella Selection Kit for LC EMA-qPCR	レジオネラ属菌の LC EMA-qPCR 法専用の EMA 处理試薬キット	25 回	7730S	¥22,000
		50 回	7730	¥44,000
DNA 抽出試薬				
Lysis buffer for Legionella 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 Legionella	レジオネラ属菌からの DNA 抽出試薬	50 回	9181	¥17,000
リアルタイム PCR 試薬				
CycleavePCR™ Legionella (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 处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	1.5ml チューブ 30 本を一度に処理可能な EMA 处理専用装置	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 ウエルのリアルタイム 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_8-1.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。
- 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をご確認ください。

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