

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
研究代表者 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

分担研究報告書
レジオネラ属菌迅速検査法の評価

研究分担者

磯部 順子 富山県衛生研究所 佐々木 麻里 大分県衛生環境研究センター

研究協力者

金谷 潤一 富山県衛生研究所 川野 みどり 長崎県環境保健研究センター

田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター 武藤 千恵子 東京都健康安全研究センター

山口 友美 宮城県保健環境センター 淀谷 雄亮 川崎市健康安全研究所

中筋 愛 タカラパイオ株式会社 吉崎 美和 タカラパイオ株式会社

原口 浩幸 株式会社ファスマック 森中 りえか 株式会社ファスマック

研究要旨

本研究では、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、qPCR法、EMA qPCR法、PALSAR法、LAMP法、LC EMA qPCR法について、浴槽水などの実検体 349 検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

310 検体について qPCR 法および EMA qPCR 法を実施した。平板培養法（10 CFU/100 ml 以上を陽性）に対する感度は、qPCR 法で 96.4%（54/56 検体）、EMA qPCR 法で 92.9%（52/56 検体）、特異度は qPCR 法で 55.5%（141/254 検体）、EMA qPCR 法で 60.6%（154/254 検体）であった。したがって、qPCR 法および EMA qPCR 法では、どちらも平板培養法に対する感度は 90% 以上であり、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のほとんどを検出できる検査法であることが明らかとなった。また、EMA 処理を実施することで特異度は向上するが、検体によってはその効果が見られない場合もあった。リアルタイム機器 TP950 と TP900 を用いた測定値の比較では、実検体を用いた結果（定量値）は概ね相関していたため、TP950（fast mode）を用いることで検査時間（増幅反応時間）を短縮できることが明らかとなった。

183 検体について PALSAR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 60.5%（26/43 検体）、特異度は 65.0%（91/140 検体）であった。PALSAR 法における偽陰性検体の多くはシャワー水検体であり、これらの検体については溶菌できていない可能性が考えられた。溶菌液の濃度、反応時間、温度などを検討し、RNA の抽出条件を改良する必要があると考えられた。

229 検体について LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 65.1%（28/43 検体）、特異度は 91.9%（171/186 検体）であった。LAMP 法における偽陰性検体の多く（13/15 検体）は、平板培養法の菌数が 10～40 CFU/100 ml と低濃度であったため、低濃度培養陽性検体においては、LAMP 法の感度はやや低下すると考えられた。

LC EMA qPCR 法は、今年度は実施検体数が少ないものの（37 検体実施、感度 76.9%、特異度 79.2%）、昨年度の結果（342 検体実施、感度 89.2%、特異度 80.3%）も考慮し、全体として平板培養法の菌数を反映している方法であると考えられた。

A 研究目的

現在、浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに7~10日を要する。一方、濃縮検体から直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法「リアルタイムPCR (qPCR) 法およびLAMP法」は、検査開始から数時間で結果を得られるため、配管洗浄などの効果確認に活用されている¹⁾。これらの遺伝子検出法は簡便で迅速な手法であるが、死菌由来DNAも検出するという課題があった。近年、死菌由来DNAをEthidium monoazide (EMA) で修飾してPCR増幅を阻害するEMA qPCR法が開発され、市販キットとして発売されている。平成25年には、液体培地による前培養を組み合わせた「生菌迅速検査法 (LC EMA qPCR法)」が開発され²⁾、市販されている。また近年、レジオネラ属菌特異的16S rRNAを標的とし、プレート上のDNAプローブに結合させて検出するPALSAR法が開発された。他の迅速検査法と同様に濃縮検体を用いる本検査は、特殊な機器が不要で肉眼による判定が可能であり、当日中に結果が判明する方法である。

これまで、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、qPCR法、LAMP法、LC EMA qPCR法、PALSAR法について評価し、PALSAR法については感度の向上が必要であることが判明した³⁾。今回、主にEMA qPCR法、改良したPALSAR法について、浴槽水などの実検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

B 材料と方法

1 検査材料

全国6か所の地方衛生研究所において、平成28年度に浴用施設などから349検体の試料を採取し、検査法の検討に用いた(表1)。検体の内訳は、浴槽水が259検体(74.2%)、湯口水が15検体(4.3%)、シャワー水が30検体(8.6%)、そ

の他(採暖槽水、プール水など)が45検体(12.9%)であった。浴槽水の泉質は、温泉が115検体(44.4%)、白湯が135検体(52.1%)、薬湯が4検体(1.5%)、不明が5検体(1.9%)であった。

2 ATP値測定

ATP値は、検水100倍濃縮液にルシパックワイドまたはルシパックPen(キッコマン)の専用綿棒を浸して約100 μ lを吸い取り、携帯用簡易測定器を用いて検水10ml当たりのRLU値を測定した。

3 平板培養法

平板培養法は新版レジオネラ症防止指針に準じ、各機関の方法で実施し、10CFU/100ml以上を陽性とした。

4 qPCR法およびEMA qPCR法

qPCR法は、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ)、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ)を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。EMA qPCR法は、qPCR法におけるDNA抽出の前に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0(タカラバイオ)を用いてEMA処理を実施した。

5 EMA qPCR法におけるレジオネラ属菌1CFUあたりの16S rRNA遺伝子コピー数の決定

L. pneumophila 長崎80-045株をBCYE寒天培地で30~4日間培養後、生理食塩水でMcFarland No. 2濁度の菌液(約 10^9 CFU/ml)を調製した。その菌液を10倍段階希釈し、 $-1 \sim -6$ 乗段階の希釈液をEMA処理後、Lysis Buffer for *Legionella*、NucleoSpin Tissue XS(タカラバイオ)でそれぞれDNA抽出し、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kitを用いて $N=3$ で測定した。

機器別の検量線作成には、上述の方法でDNAを抽出後、 $N=2$ で実施し、その平均値を用いて作成した。

6 Thermal Cycler Dice Real Time System III (TP950)を用いた検討

近年発売されたTP950について、Thermal Cycler Dice Real Time System II (TP900)との相関を

見るため、上述した 16S rRNA 遺伝子コピー数決定のための DNA 検体と、平成 27 年度に抽出した LC EMA qPCR 用 DNA 検体、今年度抽出した qPCR、EMA qPCR 用 DNA 検体をそれぞれ 20 検体ランダムに選択し、両方の機器で測定した（TP900 は fast mode、TP950 は normal および fast mode で実施）。なお、TP950 の fast mode では、アニーリング時間を 10 秒から 20 秒に変更して実施した。

7 PALSAR 法

PALSAR 法は、100 倍濃縮検体 4 ml を遠心後、上清を除去し、添付の取扱説明書に従い実施した。当日中に測定しない場合は、RNA 抽出後の検体を -20 で保存した。

8 LAMP 法

LAMP 法は、Loopamp レジオネラ検査キット E（栄研化学）を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。一部の検体は、DNA 抽出に Lysis Buffer for *Legionella* を用いた。

9 LC EMA qPCR 法

LC EMA qPCR 法は、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR（タカラバイオ）、*Legionella* LC Medium base（タカラバイオ）、Lysis Buffer for *Legionella*、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。リアルタイム PCR 実施後、添付の取扱説明書に記載された方法で 16S rRNA 遺伝子領域を組み込んだプラスミド溶液のコピー数から CFU に換算した。

（倫理面への配慮）

本研究は、研究機関内外の倫理委員会等における承認手続きが必要となる研究には該当しない。

C 結果

1 平板培養法による結果

349 検体について検査した結果、69 検体（19.8%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された（表 2）。菌数別に見ると、10～99 CFU/100 ml が 43 検体（12.3%）、100～999 CFU/100 ml が

23 検体（6.6%）、1,000 CFU/100 ml 以上が 3 検体（0.9%）であった。最も多かった検体では、58,000 CFU/100 ml のレジオネラ属菌が検出された。分離菌の血清群別を実施した結果、*L. pneumophila* 血清群（SG）6 が 21 検体から分離され、最も多かった（表 3）。次に多かったのは、*L. pneumophila* SG 1（19 検体）、*L. pneumophila* SG 3（24 検体）、*L. pneumophila* SG 5（18 検体）であった。また、*L. pneumophila* 以外の菌種が 4 検体から分離された。

2 qPCR 法および EMA qPCR 法による結果

（1）平板培養法との比較

qPCR 法および EMA qPCR 法を使用した 310 検体について、平板培養法の結果と比較した（表 4）。qPCR 法および EMA qPCR 法では、遺伝子の増幅が認められた場合に陽性と判定した。平板培養法では 56/310 検体（18.1%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。qPCR 法では、167/310 検体（53.9%）の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。qPCR 法の平板培養法に対する感度は 96.4%（54/56 検体）、特異度は 55.5%（141/254 検体）であった。EMA qPCR 法では、152/310 検体（49.0%）の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 92.9%（52/56 検体）、特異度は 60.6%（154/254 検体）であった。

（2）qPCR 法および EMA qPCR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性（10 CFU/100 ml 以上）となったが qPCR 法および EMA qPCR 法で陰性となった 6 検体のうち、4 検体が平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml であった（表 5）。分離菌の血清群別を実施した結果、すべて *L. pneumophila* であった。

（3）qPCR 法および EMA qPCR 法における偽陽性検体

平板培養法の結果が陰性（10 CFU/100 ml 未満）となったが qPCR 法および EMA qPCR 法で陽性となったのは、qPCR 法で 113/310 検体（36.5%）

EMA qPCR 法で 100/310 検体 (32.3%) であった (表 6)。これらの検体における 16S rRNA 遺伝子コピー数の分布を見ると、qPCR 法と EMA qPCR 法で顕著な差は見られなかった。

(4) 機関別、検体別における結果

5 機関における qPCR 法および EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度・特異度を表 7 に示した。

4 機関においては、EMA 処理をすることで特異度が向上した。検体別の結果では、温泉水、シャワー水については EMA 処理を実施することで特異度が向上したが、白湯、その他の検体については差が見られなかった (表 8)。

(5) EMA qPCR 法におけるレジオネラ属菌 1 CFU あたりの 16S rRNA 遺伝子コピー数の決定

平板培養レジオネラ属菌の 10 倍段階希釈液を EMA 処理して作成した検量線を図 1 に示した。プラスミド DNA と、Lysis Buffer for *Legionella*、NucleoSpin Tissue XS で抽出した DNA の回帰直線を比較すると、傾きはほぼ平行関係にあり、増幅効率に大きな差がないことが確認された。得られた切片の差が Lysis Buffer for *Legionella* で 2.426、NucleoSpin Tissue XS で 1.846 であったことから (プラスミドの切片と抽出 DNA の切片の差) 各キットを用いて 30 培養 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プラスミド 3 コピー ($2^{1.662} = 3.2$ 、Lysis Buffer for *Legionella*) および 4 コピー ($2^{1.846} = 3.6$ 、NucleoSpin Tissue XS) に相当するものと計算された。実検体を用いた EMA qPCR 法と平板培養法との菌数 (定量値) の相関は、 $R^2 = 0.1975$ であった (図 2)。

(6) TP900 と TP950 を用いた測定値の比較

平板培養レジオネラ属菌の 10 倍段階希釈液を用いて作成した検量線を図 3 に示した。機器、測定モード、DNA 抽出法による大きな差は見られなかった。実検体を用いた比較を図 4 に示した。全体としては概ね相関していたが、qPCR 法および EMA qPCR 法では、TP900 よりも TP950 の normal mode および fast mode の方がやや定量値が

高くなった。

3 PALSAR 法による結果

(1) 平板培養法との比較

PALSAR 法を使用した 183 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 9)。平板培養法では 43/183 検体 (23.5%) の検体から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、PALSAR 法では 75/183 検体 (41.0%) の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 60.5% (26/43 検体)、特異度は 65.0% (91/140 検体) であった。検体別に見ると、浴槽水検体のみを対象とした場合、感度 76.2% (16/21 検体)、特異度 65.0% (65/100 検体) であり、その他の検体の場合、感度 45.5% (10/22 検体)、特異度 65.0% (26/40 検体) であった。

(2) PALSAR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性 (10 CFU/100 ml 以上) となったが PALSAR 法で陰性となった 17 検体のうち、10 検体 (58.8%) はシャワー水検体であり、平板培養法での菌数が 30 ~ 540 CFU/100 ml であった (表 10)。残りの 7 検体における平板培養法の菌数は、500 CFU/100 ml の 1 検体を除くと 10 ~ 30 CFU/100 ml であった。

4 LAMP 法による結果

(1) 平板培養法との比較

LAMP 法を使用した 229 検体について、平板培養法の結果と比較した (表 11)。平板培養法 (10 CFU/100 ml 以上を陽性) および LAMP 法では、43/229 検体 (18.8%) の検体が陽性となった。LAMP 法の平板培養法に対する感度は 65.1% (28/43 検体)、特異度は 91.9% (171/186 検体) であった。

EMA qPCR 法および LAMP 法を実施した 190 検体について平板培養法の結果と比較すると、EMA qPCR 法は感度 93.3%、特異度 66.9% であり、LAMP 法は感度 53.3%、特異度 93.1% であった。

(2) LAMP 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性 (10 CFU/100 ml 以上)

となったが LAMP 法で陰性となった 15 検体のうち、13 検体 (86.7%) は平板培養法での菌数が 10 ~ 40 CFU/100 ml であり、残りの 2 検体はそれぞれ 220、500 CFU/100 ml であった。LAMP 法で偽陰性となった 15 検体のうち、8 検体について、DNA 抽出液を 5 倍希釈して再度実施した結果、2/8 検体 (25.0%) が陽性となった。これらの検体は、それぞれ培養法で 20、30 CFU/100 ml であった。

5 LC EMA qPCR 法による結果

(1) 平板培養法との比較

平成 26 年度の検討結果⁴⁾を参考に、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を陽性とするカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った。LC EMA qPCR 法を使用した 37 検体について、平板培養法の結果と比較した(表 12)。平板培養法では 13/37 検体 (35.1%) の検体から 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 15/37 検体 (40.5%) 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 76.9% (10/13 検体)、特異度は 79.2% (19/24 検体) であった。

(2) LC EMA qPCR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性 (10 CFU/100 ml 以上) となったが LC EMA qPCR 法で陰性 (1 CFU/100 ml 相当未満) となった 3 検体のうち、2 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml、1 検体は 30 CFU/100 ml であった。

D 考察

今年度は、5 種類の迅速検査キット (qPCR 法、EMA qPCR 法、PALSAR 法、LAMP 法、LC EMA qPCR 法) について、平板培養法の結果と比較し、評価した。

qPCR 法および EMA qPCR 法では、どちらも平板培養法に対する感度は 90% 以上であり、平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のほとんどを検出できる検査法であることが明らかとなった。

qPCR 法および EMA qPCR 法で検出できなかった平板培養陽性検体についても、多くは菌数が 10 CFU/100 ml であった。一方、特異度は約 50 ~ 60% であり、平板培養陰性検体 (10 CFU/100 ml 未満) の半数近くが qPCR 法および EMA qPCR 法で陽性となった。死菌 DNA の PCR 増幅を阻害する EMA 処理を実施した場合でも、特異度はあまり上がらなかった。反応チューブあたりの 16S rRNA 遺伝子コピー数を qPCR 法と比較しても、顕著な差は見られなかった。しかしながら、機関別、検体別にみると、多くの機関では EMA 処理を実施することで特異度が向上した。また、浴槽水 (温泉、薬湯など) やシャワー水を検体とした場合に、特異度が向上した。浴槽水 (白湯) については、qPCR 法においても特異度が 70% 以上あったため、検体中の死菌が少ないために EMA 処理の効果が見られなかった可能性は考えられた。これらの検体については、現行の平板培養法では検出できない生菌が存在している可能性も考えられた。したがって、EMA 処理を実施することで特異度は向上するが、検体によってはその効果が見られない場合もあると考えられる。

EMA qPCR 法と平板培養法における菌数 (定量値) の比較は $R^2 = 0.1948$ であり、昨年度検討した LC EMA qPCR 法と平板培養法における値 ($R^2 = 0.6874$)⁴⁾ よりも低かったため、平板培養法の菌数を反映する方法としては、LC EMA qPCR 法の方が優れていた。

近年、タカラバイオから新しいリアルタイム装置 (TP950) が発売された。従来の機器 (TP900) では PCR 反応時間に約 1 時間半を要したが、本装置の fast mode では約 1 時間で反応が終了する。実検体を用いた結果では、どちらの機器を用いた場合でも結果は概ね相関していたため、TP950 (fast mode) を用いることで検査時間を短縮することができる。

PALSAR 法に関しては、昨年度の結果⁴⁾ をもとに、感度を向上させるため、検査に用いる検体量を 100 倍濃縮液 1 ml から 4 ml に変更した。また、

当日中に測定しない場合は、濃縮検体の保存によるRNAの分解を防ぐため、RNA抽出まで実施後、-20℃で保存することとした。その結果、平板培養法に対する感度は60.5%となり、昨年度の47.0%から向上した。浴槽水検体のみにについて見ると、感度は76.2%まで上がった。一方、PALSAR法で偽陰性となった検体の多くはシャワー水であった。平板培養で分離された菌はすべて *L. pneumophila* であり、PALSAR法で検出できる菌種であると考えられる。シャワーヘッドを通過することによるレジオネラ属菌の形態への影響は不明であるが、本プロトコルでは、シャワー水検体については溶菌できていない可能性が考えられた。溶菌液の濃度、反応時間、温度などを検討し、RNAの抽出条件を改良する必要があると考えられた。

LAMP法では、平板培養法に対する特異度は91.9%と高かったが、感度は65.1%と低かった。EMA qPCR法およびLAMP法を実施した190検体について比較しても、LAMP法の感度はEMA qPCR法より低かった。LAMP法で偽陰性となった検体の一部は5倍希釈液で陽性となったため、一部の検体においては、反応阻害物質の存在が考えられた。また、多くの偽陰性検体は、平板培養法の菌数が10~40 CFU/100 mlと低濃度であったため、低濃度培養陽性検体においては、LAMP法の感度はやや低下すると考えられた。

LC EMA qPCR法では、今年度は実施検体数が少ないものの、平板培養法に対する感度、特異度はともに約80%に近かった。昨年度の結果(342検体実施、感度89.2%、特異度80.3%、 $R^2 = 0.6874$)⁴⁾からも、全体として平板培養法の菌数を反映している方法であると考えられた。

E 結論

各種迅速検査法(qPCR法、EMA qPCR法、LAMP法、PALSAR法、LC EMA qPCR法)について、浴槽水などの実検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

qPCR法およびEMA qPCR法では、どちらも平板培養法に対する感度は90%以上であり、平板培養陽性検体(10 CFU/100 ml以上)のほとんどを検出できる検査法であることが明らかとなった。また、EMA処理を実施することで特異度は向上するが、検体によってはその効果が見られない場合もあった。これらの検体については、現行の平板培養法では検出できない生菌が存在している可能性も考えられた。

EMA qPCR法と平板培養法における菌数(定量値)の比較値($R^2 = 0.1975$)は、昨年度検討したLC EMA qPCR法と平板培養法における値($R^2 = 0.6874$)よりも低かったため、平板培養法の菌数を反映する方法としては、LC EMA qPCR法の方が優れていた。

TP900とTP950を用いた測定値の比較では、実検体を用いた結果(定量値)は概ね相関していたため、TP950(fast mode)を用いることで検査時間(増幅反応時間)を短縮することができる。

PALSAR法では、平板培養法に対する感度は60.5%(浴槽水検体のみでは76.2%)であったが、特にシャワー水検体について感度が低かったため、溶菌液の濃度、反応時間、温度などを検討し、RNAの抽出条件を改良する必要があると考えられた。

LAMP法では、平板培養法に対する特異度は91.9%と高かったが、感度は65.1%と低く、低濃度の平板培養陽性検体においては、LAMP法の感度はやや低下すると考えられた。

LC EMA qPCR法は、今年度は実施検体数が少ないものの、昨年度の結果も考慮し、全体として平板培養法の菌数を反映している方法であると考えられた。

参考文献

- 1) 浅野陽子、核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について、生活と環境、2007、52(1)、89-91.
- 2) 烏谷 竜哉 他、液体培養(Liquid Culture)

EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討、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、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 平成 24 年度 総括・分担研究報告書、71-84.

3) 磯部 順子 他、レジオネラ属菌迅速検査法の評価、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、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 平成 27 年度 総括・分担研究報告書、61-70.

4) 磯部 順子 他、Liquid Culture EMA qPCR におけるレジオネラ生菌迅速検査法の改良と評価、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、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 平成 26 年度 総括・分担研究報告書、63-76.

F 研究発表

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 検体内訳と検査方法

		機関						計
		A	B	C	D	E	F	
浴槽水	温泉	16		41	15	21	22	115
	白湯	20	12	4	4	16	79	135
	薬湯	4						4
	不明				5			5
湯口水				15				15
シャワー水		29	1					30
その他（採暖槽水、プール水など）			25				20	45
計		69	38	45	39	37	121	349

検査方法

qPCRおよびEMA qPCR
 PALSAR
 LAMP
 LC EMA qPCR

表2. 平板培養法による検出率

菌数 (CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	280	(80.2)
10-99	43	(12.3)
100-999	23	(6.6)
1,000以上	3	(0.9)
計	349	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 6	21
SG 1	19
SG 5	18
SG 3	12
SG 15	11
SG 4	6
SG 2	5
SG 8	5
SG 9	5
SG 7	3
SG 12	1
UT	16
<i>Legionella</i> spp.	4

表4. 平板培養法とEMA qPCR法との比較

a. EMA処理無し

		平板培養法		計
		10	< 10	
qPCR	陽性	54	113	167
	陰性	2	141	143
計		56	254	310

感度 96.4%、 特異度 55.5%

b. EMA処理有り

		平板培養法		計
		10	< 10	
EMA qPCR	陽性	52	100	152
	陰性	4	154	158
計		56	254	310

感度 92.9%、 特異度 60.6%

表5. EMA qPCR法における偽陰性検体

No.	EMA 処理	検体	泉質など	湯温 ()	残塩 (mg/L)	ATP値		平板培養法 (CFU/100 ml)	菌種	血清群	LAMP法	PALSAR法
						pH	(RLU/10 ml)					
1	-	浴槽水	井水	38	1.3	6	6	10	<i>L. pneumophila</i>	4,8	-	-
2	-	浴槽水	白湯	38.6	1	7.67		10	<i>L. pneumophila</i>	6	-	-
3	+	浴槽水	井戸水	41	0	8.04	9	10	<i>L. pneumophila</i>	1.9	+	-
4	+	浴槽水	白湯	38.6	1	7.67		10	<i>L. pneumophila</i>	6	-	-
5	+	採暖槽水		36.7	0.6	7.27		30	<i>L. pneumophila</i>	6	-	-
6	+	シャワー水	水道水			7.5	2	40	<i>L. pneumophila</i>	6	-	-

表6. EMA qPCR法における偽陽性検体のコピー数

Copies of plasmid/5 µl	qPCR		EMA qPCR	
	n	(%)	n	(%)
0-0.9	4	(3.5)	6	(6.0)
1-9	38	(33.6)	38	(38.0)
10-99	39	(34.5)	32	(32.0)
100-999	20	(17.7)	18	(18.0)
>1,000	12	(10.6)	6	(6.0)
	113	(100.0)	100	(100.0)

表7. 各機関における培養法に対するEMA qPCR法の感度・特異度

機関	qPCR			EMA qPCR		
	n	感度(%)	特異度(%)	n	感度(%)	特異度(%)
A	69	100.0	60.8	69	88.9	84.3
B	38	88.9	55.2	38	77.8	72.4
C	45	75.0	22.0	45	100.0	36.6
E	37	100.0	25.0	37	100.0	50.0
F	121	100.0	72.5	121	100.0	57.8
5機関	310	94.6	55.1	310	92.9	60.6

表8. 検体別におけるEMA qPCR法の感度・特異度

	n	qPCR		EMA qPCR	
		感度(%)	特異度(%)	感度(%)	特異度(%)
浴槽水 白湯	131	88.9	74.3	88.9	75.2
浴槽水 その他(温泉、薬湯など)	104	100.0	28.2	100.0	41.2
シャワー水	30	100.0	50.0	90.0	70.0
その他(採暖槽水、プール水など)	45	100.0	63.9	88.9	55.6

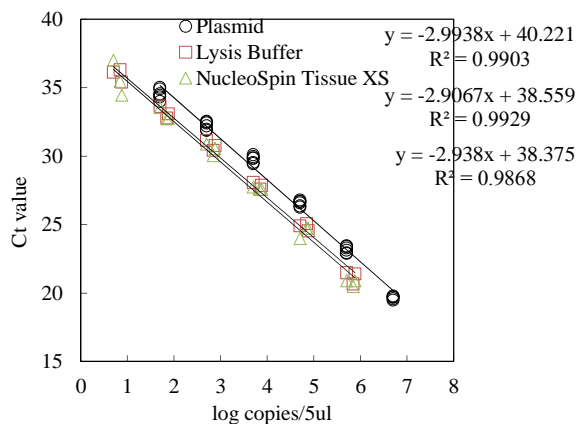


図1 各種キットを用いてEMA処理した菌液から抽出したDNAの検量線

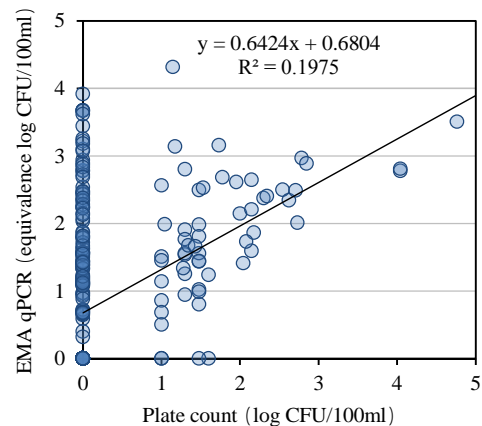


図2 平板培養法とEMA qPCR法との相関

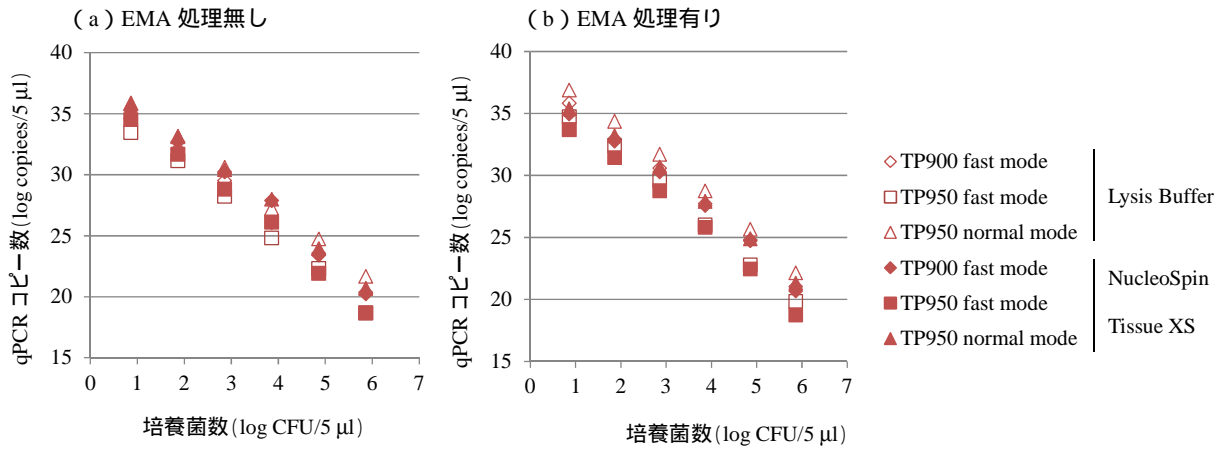


図3 TP950 および TP900 における菌液から抽出した DNA の検量線

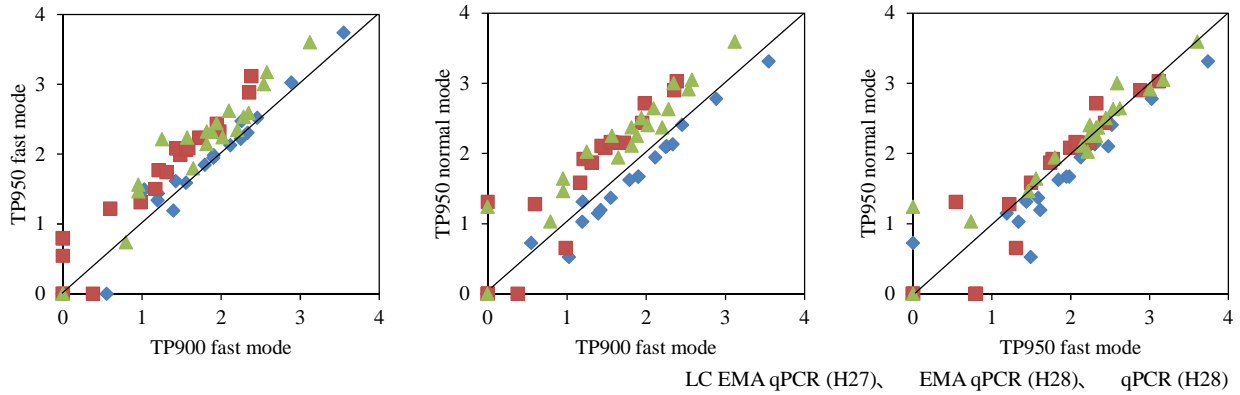


図4 TP950 および TP900 における実検体を用いた定量値 (equivalence log CFU/100 ml) の比較

表9. 平板培養法とPALSAR法との比較

a. 全検体

		平板培養法		計
		10	< 10	
PALSAR法	陽性	26	49	75
	陰性	17	91	108
計		43	140	183

感度 60.5%、 特異度 65.0%

b. 浴槽水検体のみ

		平板培養法		計
		10	< 10	
PALSAR法	陽性	16	35	51
	陰性	5	65	70
計		21	100	121

感度 76.2%、 特異度 65.0%

c. 浴槽水以外の検体

		平板培養法		計
		10	< 10	
PALSAR法	陽性	10	14	24
	陰性	12	26	38
計		22	40	62

感度 45.5%、 特異度 65.0%

表10. PALSAR法における偽陰性検体

No.	検体	泉質など	湯温	残塩	ATP値		平板培養法	菌種	血清群	EMA qPCR法	LAMP法
			()	(mg/L)	pH	(RLU/10 ml)	(CFU/100 ml)				
1	浴槽水	井戸水	41	0.26	8.04	9	10	<i>L. pneumophila</i>	1,9	+	+
2	浴槽水	井水	38	1.3	6	6	10	<i>L. pneumophila</i>	4,8	+	
3	浴槽水	白湯	38.6	1	7.67		10	<i>L. pneumophila</i>	6	+	
4	浴槽水	井戸水	41	0.46	7.88	158	20	<i>L. pneumophila</i>	1	+	-
5	採暖槽水		36.4	2	7.74		20	<i>L. pneumophila</i>	1,5	+	
6	シャワー水	井戸水			7.07	9	30	<i>L. pneumophila</i>	5,UT	+	-
7	シャワー水	井戸水			8.26	8	30	<i>L. pneumophila</i>	15	+	-
8	シャワー水	井戸水			8.27	7	30	<i>L. pneumophila</i>	15	+	-
9	採暖槽水		36.7	0.6	7.27		30	<i>L. pneumophila</i>	6	+	
10	シャワー水	水道水			7.5	2	40	<i>L. pneumophila</i>	6	+	-
11	シャワー水	井戸水			8.28	9	100	<i>L. pneumophila</i>	15	+	+
12	シャワー水	井戸水			8.11	6	110	<i>L. pneumophila</i>	5	+	+
13	シャワー水	井戸水			8.26	9	120	<i>L. pneumophila</i>	5,15	+	+
14	シャワー水	井戸水			7.17	10	140	<i>L. pneumophila</i>	1,6	+	+
15	シャワー水	井戸水			7.18	9	220	<i>L. pneumophila</i>	5	+	-
16	浴槽水	温泉水					500	<i>L. pneumophila</i>	2,3	+	+
17	シャワー水	温泉水			7.55	5	540	<i>L. pneumophila</i>	6	+	+

表11. 平板培養法とLAMP法との比較

		平板培養法		
		10	< 10	計
LAMP法	陽性	28	15	43
	陰性	15	171	186
計		43	186	229

感度 65.1%、 特異度 91.9%

表12. 平板培養法とLC EMA qPCR法との比較

	平板培養法				
	10	< 10	計		
LC EMA qPCR法		1	10	5	15
(カットオフ値1 CFU/100 ml相当)	< 1	3	19	22	
計		13	24	37	

感度 76.9%、 特異度 79.2%