

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
田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター		

研究協力者

金谷 潤一	富山県衛生研究所	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	上野 潤二	栄研化学株式会社
東出 誠司	栄研化学株式会社	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	中筋 愛	タカラバイオ株式会社
吉崎 美和	タカラバイオ株式会社		

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、PALSAR 法、LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法および EMA-qPCR 法について、浴槽水などの実検体 324 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。

216 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 77.2%、特異度は 74.8%、一致率は 75.5%であった。シャワー水・カラン水以外の検体においては感度 83.7%、特異度 68.3%、一致率 72.6%であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。しかしながら、シャワー水・カラン水検体においては感度が 37.5%と低かった。

283 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 84.4%、特異度は 77.7%、一致率は 79.5%であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。このうち 86 検体について EMA-LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 60.0%まで低下したため、EMA 処理濃度を再検討する必要があると考えられた。

168 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 97.0%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迅速検査法であったが、特異度は 37.8%、一致率は 49.4%であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、177 検体について EMA-qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 82.4%、特異度は 61.5%、一致率は 65.5%であり、EMA 処理を実施することで死菌 DNA の増幅を抑制することができ、より平板培養法と相関する方法となった。

各種迅速検査法は、いずれの方法においても陰性的中率が 90%以上（シャワー・カラン水検体における PALSAR 法および EMA-LAMP 法は除く）であり、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であると考えられた。また、適切な濃度で EMA 処理を実施することで死菌 DNA の増幅を抑制することができ、より平板培養法と相関する方法となることも明らかとなった。

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、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上記の迅速検査法について評価し、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⁾。EMA-qPCR法については、昨年度の検討ではqPCR法と比較し特異度があまり向上しなかったため³⁾、引き続き検討が必要であると考えられた。また、これまでLAMP法についてはEMA処理による検討は実施していない。そこで今回、改良したPALSAR法、(EMA-)LAMP法および(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。

B 材料と方法

1 検査材料

全国5か所の地方衛生研究所において、平成29年度に浴用施設などから324検体の試料を採取し、迅速検査法の検討に用いた(表1)。検体の内訳は、浴槽水が210検体(64.8%)、湯口水が24検体(7.4%)、採暖槽水が28検体(8.6%)、シャワー水が32検体(9.9%)、カラン水が15検体(4.6%)、その他(井戸水など)が15検体(4.6%)であった。

2 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。

3 PALSAR法

PALSAR法は、100倍濃縮検体4ml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。目視の発色確認により16S rRNAが検出された場合を陽性と判定した。なお、溶菌条件を昨年度の37/15分から70/5分に変更した。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。一部の検体(29検体)については、100倍濃縮検体4mlを遠心後、上清70μlのみ残したRNA抽出前の時点で-20℃に保存した。

4 LAMP法およびEMA-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。遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。EMA-LAMP法は、1000倍濃縮検体にEMA処理を実施後、Chelex溶液を用いてDNAを抽出し、LAMP法に用いた。

平板培養法で陽性となったがLAMP法で陰性となった検体については、反応阻害物質の確認のため、DNAを5倍および10倍希釈した後、反応に用いた。また、DNA4.5μlに試薬に添付されている陽性コントロールを0.5μl加えた検体についても、反応に用いた。

5 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。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。

(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

324 検体について検査した結果、81 検体(25.0%) 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 39 検体(12.0%)、100~999 CFU/100 ml が 23 検体(7.1%)、1,000 CFU/100 ml 以上が 19 検体(5.9%)であった。最も多かった検体では、23,500 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)1 が 26 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 6 (20 検体)、*L. pneumophila* SG 5 (19 検体)、*L. pneumophila* SG 3 (16 検体)であった。また、*L. pneumophila* 以外の菌種が 16 検体から分離された。

2 PALSAR 法による結果

(1) 平板培養法との比較

PALSAR 法を用いた 216 検体について、平板培養法と比較した(表 4)。平板培養法では 57/216 検体(26.4%)、PALSAR 法では 84/216 検体(38.9%) が陽性となった。PALSAR 法は平板培養法に対して、感度 77.2%、特異度 74.8%、陽性的中率 52.4%、陰性的中率 90.2%、一致率 75.5%であった。

検体別に見ると、シャワー水・カラン水検体のみを対象とした場合、感度 37.5%、特異度 100%、陽性的中率 100%、陰性的中率 86.8%、一致率 87.8%であった。その他の検体を対象とした場合、

感度 83.7%、特異度 68.3%、陽性的中率 50.6%、陰性的中率 91.5%、一致率 72.6%であった。RNA 抽出前に凍結保存した 29 検体のみに見ると、感度 90.9%、特異度 77.8%、陽性的中率 71.4%、陰性的中率 93.3%、一致率 82.8%であった。

(2) PALSAR 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となったが PALSAR 法で陰性となった検体を表 5 に示した。シャワー水・カラン水以外の 8 検体のうち、6 検体は平板培養法での菌数が 10~20 CFU/100 ml と低かった。残りの 2 検体は LAMP 法も陰性であり、反応阻害物質など遺伝子検査を阻害する要因の存在が示唆された。シャワー水・カラン水検体については、平板培養法の菌数が 100 CFU/100 ml 以下の 5 検体全てで PALSAR 法が陰性となった。

3 LAMP 法による結果

(1) 平板培養法との比較

LAMP 法を用いた 283 検体について、平板培養法と比較した(表 6)。平板培養法では 77/283 検体(27.2%)、LAMP 法では 111/283 検体(39.2%) が陽性となった。LAMP 法は平板培養法に対して、感度 84.4%、特異度 77.7%、陽性的中率 58.6%、陰性的中率 93.0%、一致率 79.5%であった。

(2) LAMP 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となったが LAMP 法で陰性となった検体を表 7 に示した。10 検体は、平板培養法での菌数が 10~50 CFU/100 ml であった。No. 12 については、陽性コントロールを添加した場合においても LAMP 法が陰性となったため、反応阻害物質の存在が考えられた。また No. 11 についても、陽性コントロールを添加した場合 Tt 値が 1~2 分遅れ(n=3 で実施)、スムーズな増幅曲線を描かなかつたため、ある程度反応阻害があると考えられた。

4 EMA-LAMP 法による結果

86 検体について EMA-LAMP 法を実施した(表 8)。EMA 未処理の場合、平板培養法に対して感度 85.0%、特異度 80.3%、陽性的中率 56.7%、陰性的中率 100%、一致率 81.4%であった。EMA 処

理を実施することで、感度 60.0%、特異度 100%、陽性的中率 100%、陰性的中率 89.2%、一致率 90.7%となった。平板培養陽性検体のうち、EMA 未処理で陽性となったが、EMA 処理を実施することで陰性となった検体は 5 検体であった。各検体の平板培養法の菌数は、10、10、10、100、120 CFU/100 ml であった。

5 qPCR 法および EMA-qPCR 法による結果

(1) 平板培養法との比較

qPCR 法を用いた 168 検体および EMA-qPCR 法を用いた 177 検体について、それぞれ平板培養法と比較した(表 9)。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。qPCR 法は平板培養法に対して、感度 97.0%、特異度 37.8%、陽性的中率 27.6%、陰性的中率 98.1%、一致率 49.4%であった。EMA-qPCR 法は、感度 82.4%、特異度 61.5%、陽性的中率 33.7%、陰性的中率 93.6%、一致率 65.5%であった。実検体を用いた qPCR 法および EMA-qPCR 法と平板培養法との菌数(定量値)の相関は、 $R^2 = 0.2216$ および $R^2 = 0.2279$ であった(図)。なお、レジオネラ属菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、取り扱い説明書および昨年³⁾の検討結果を参照した。

(2) qPCR 法および EMA-qPCR 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となったが qPCR 法および EMA-qPCR 法で陰性となった 7 検体は、平板培養法での菌数が 10~20 CFU/100 ml と低かった(表 10)。

D 考察

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

PALSAR 法では、昨年度の結果³⁾をもとに、感度を向上させるため溶菌条件を 37 15 分から 70 5 分に変更した。その結果、平板培養法に対

する感度は 77.2%となり、昨年度の 60.5%から向上した。とりわけシャワー水・カラン水以外の検体においては、感度は 83.7%まで上がり、検体数は異なるものの LAMP 法および EMA-qPCR 法と同等であった。特異度においても、PALSAR 法は LAMP 法および EMA-qPCR 法と同等であり、平板培養法との一致率も 7 割以上であったため、シャワー水・カラン水以外の検体においては、PALSAR 法は平板培養法と相関する迅速検査法であると考えられた。

一方、シャワー水・カラン水については感度が 37.5%(3/8 検体)と低かった。昨年度の検討においてもシャワー水検体の感度は 0%(平板培養法陽性 10 検体のうち、PALSAR 法陽性 0 検体)であった。今年度は溶菌条件を変更することで感度が多少向上したが、平板培養法での菌数が 100 CFU/100 ml 以下の 5 検体全てで PALSAR 法が陰性となった。これらの結果から、シャワー水・カラン水中のレジオネラ属菌 1 CFU あたりの RNA 量が少ない可能性が考えられた。あるいは、シャワー水・カラン水中のレジオネラ属菌の形態は不明であるが、本プロトコルでは溶菌できない可能性も考えられた。各種検体中の RNA の定量、RNA 抽出条件の改良などを実施する必要があると考えられた。

PALSAR 法は、現行のプロトコルでは当日中に測定しない場合は RNA 抽出後の検体を凍結保存することとなっているが、本検討では、RNA 抽出前の状態で凍結保存しても平板培養法に対する感度などは低下しなかったため、検査に用いても問題ないことが明らかとなった。

LAMP 法では、平板培養法に対する感度は 84.4%であり、昨年度の 65.1%より高かった。理由として、昨年度は一部の検体を添付の取扱説明書とは異なる方法で DNA を抽出していた点が考えられた。また、昨年度は 10~40 CFU/100 ml の低濃度培養陽性検体数が今年度の 15.4%(50/324 検体)より多かった(22.6%、79/349 検体)点も理由の一つとして考えられた。LAMP 法は平板培

養法との一致率が約 8 割であったことから、添付の取扱説明書に従い実施することで平板培養法と関連する迅速検査法であると考えられた。

EMA-LAMP 法では、EMA 未処理の場合と比較し、特異度は 80.3% から 100% に向上したが、感度は 85.0% から 60.0% に低下した。とりわけ、低濃度培養陽性検体 (10 CFU/100 ml) において EMA-LAMP 法が陰性となった。EMA は無傷な細胞膜を保持した生菌に対してもある程度透過し、核酸増幅を抑制するため、EMA 処理濃度を再検討する必要があると考えられた。

qPCR 法は、平板培養法に対する感度は 97.0% であり、昨年度の結果 (感度 96.4%)³⁾と同様に平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のほとんどを検出できる迅速検査法であった。しかしながら特異度は 37.8%、一致率は 49.4% であり、死菌 DNA を検出していると考えられる検体が多かった。

一方 EMA-qPCR 法では、平板培養法に対する感度は 82.4% であり qPCR 法と比較しやや低下したが、昨年度の検討では感度 92.9% であり、問題ないと考えられた。また、qPCR 法と比較し、特異度は 61.5%、一致率は 65.5% まで向上したため、EMA 処理を実施することで死菌 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関連する迅速検査法となったと考えられた。

qPCR 法および EMA qPCR 法と平板培養法における菌数 (定量値) の比較は $R^2 = 0.2216$ および $R^2 = 0.2279$ であり、過去に検討した 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。

各種迅速検査法は、いずれの方法においても陰性的中率が 90% 以上 (シャワー・カラン水検体における PALSAR 法および EMA-LAMP 法は除く) であり、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であると考えられた。また、適切な濃度で EMA 処理を実施することで死菌

DNA の増幅を抑制することができ、より平板培養法と関連する方法となることも明らかとなった。

E 結論

各種迅速検査法について、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。

PALSAR 法は、シャワー水・カラン水以外の検体においては平板培養法と関連する迅速検査法であったが、シャワー水・カラン水における感度低下の原因究明のため、各種検体中の RNA の定量、RNA 抽出条件の改良などを実施する必要があると考えられた。

LAMP 法は、添付の取扱説明書に従い実施することで平板培養法と関連する迅速検査法であると考えられた。EMA-LAMP 法では、EMA 処理濃度を再検討する必要があると考えられた。

qPCR 法は平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のほとんどを検出できる迅速検査法であったが、死菌 DNA を検出している検体が多かった。しかしながら EMA 処理を実施することで、全体として平板培養法とより関連する迅速検査法 (EMA-qPCR 法) となると考えられた。

各種迅速検査法は、いずれの方法においても陰性的中率が 90% 以上 (シャワー・カラン水検体における PALSAR 法、EMA-LAMP 法は除く) であり、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であると考えられた。また、適切な濃度で EMA 処理を実施することで死菌 DNA の増幅を抑制することができ、より平板培養法と関連する方法となることも明らかとなった。

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、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、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 28 年度分担研究報告書、51-61.

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	
検体内訳	浴槽水	39	21	27	25	98	210
	湯口水				24		24
	採暖槽水		28				28
	シャワー水	32					32
	カラン水	15					15
	その他(井戸水、源泉など)		1	14			15
	計	86	50	41	49	98	324
検査方法	PALSAR	76	50		49	85	260
	LAMP	86	50		49	98	283
	EMA-LAMP	86					86
	qPCR	86	50	32			168
	EMA-qPCR	86	50	41			177

表2. 平板培養法による検出率

菌数 (CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	243	(75.0)
10-99	39	(12.0)
100-999	23	(7.1)
1,000以上	19	(5.9)
計	324	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 1	26
SG 6	20
SG 5	19
SG 3	16
SG 9	10
SG 4	9
SG 8	7
SG 15	6
SG 13	4
SG 10	2
SG 2	1
SG 7	1
SG 12	1
UT	34
<i>Legionella</i> spp.	16

表4. 平板培養法とPALSAR法との比較

a. 全検体

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
PALSAR法	陽性	44	40	84
	陰性	13	119	132
計		57	159	216

感度77.2%、特異度74.8%、陽性的中率52.4%、陰性的中率90.2%、一致率75.5%

b. シャワー水・カラン水

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
PALSAR法	陽性	3	0	3
	陰性	5	33	38
計		8	33	41

感度37.5%、特異度100%、陽性的中率100%、陰性的中率86.8%、一致率87.8%

c. シャワー水・カラン水以外

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
PALSAR法	陽性	41	40	81
	陰性	8	86	94
計		49	126	175

感度83.7%、特異度68.3%、陽性的中率50.6%、陰性的中率91.5%、一致率72.6%

表5. PALSAR法における偽陰性検体

a. シャワー・カラン水以外 (偽陰性検体のみ)

No.	検体	湯温 (°C)	残塩 (mg/L)	pH	平板培養法 (CFU/100 ml)	血清群	PALSAR法	EMA-qPCR法	LAMP法
1	浴槽水	白湯	41	0.6	7.43 10	Lp1	-	+	+
2	浴槽水	温泉	40	<0.05	7.19 10	Lp5	-	-	-
3	浴槽水	温泉	41	0.6	10	Lp9	-	NT	+
4	採暖槽水	白湯	38	1.3	8.3 10	Lp3	-	-	+
5	採暖槽水	白湯	36.8	0.8	8.27 10	Lp1	-	-	-
6	浴槽水	井戸水	42	0.4	20	Lp5	-	NT	+
7	湯口水	単純泉	39.7	0.5	50	Lp1, Lp8, Lp12, LpUT	-	NT	-
8	湯口水	温泉	0	1500	1500	Lp3, Lp13, LpUT, <i>L. londiniensis</i>	-	NT	-

b. シャワー・カラン水 (平板培養陽性検体すべて記載)

No.	検体	湯温 (°C)	残塩 (mg/L)	pH	平板培養法 (CFU/100 ml)	血清群	PALSAR法	EMA-qPCR法	LAMP法
1	カラン水	井戸水	0.1	7.41	20	Lp5	-	+	-
2	シャワー水	井戸水	0.3	8.19	30	LpUT	-	+	+
3	シャワー水	井戸水	0.3	8.22	30	LpUT	-	-	-
4	カラン水	井戸水	0.3	8.17	30	Lp5, LpUT	-	+	+
5	カラン水	井戸水	0.3	8.27	50	LpUT	-	+	+
6	シャワー水	井戸水	0	7.21	100	Lp3	+	+	+
7	シャワー水	井戸水	0	7.26	120	Lp3, Lp6	+	+	+
8	シャワー水	井戸水	0.08	7.59	680	Lp5	+	+	+

表6. 平板培養法とLAMP法との比較

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
LAMP法	陽性	65	46	111
	陰性	12	160	172
計		77	206	283

感度84.4%、特異度77.7%、陽性的中率58.6%、陰性的中率93.0%、一致率79.5%

表7. LAMP法における偽陰性検体

No.	検体	湯温 (°C)	残塩 (mg/L)	pH	平板培養法 (CFU/100 ml)	血清群	EMA-qPCR法	PALSAR法	LAMP 検討		
									×5希釈	×10希釈	PC添加
1	浴槽水	温泉	40	<0.05	7.19 10	Lp5	-	-	-	-	+
2	採暖槽水	白湯	36.8	0.8	8.27 10	Lp1	-	-	-	-	+
3	シャワー水	水道水	0.1	7.58	10	LpUT	+	NT	-	-	+
4	採暖槽水	白湯	35.8	0	7.79 10	Lp1	-	+	-	-	+
5	浴槽水	温泉	45.3	<0.1	10	LpUT	NT	NT	-	-	+
6	カラン水	井戸水	0.1	7.41	20	Lp5	+	-	-	-	+
7	シャワー水	井戸水	0.3	8.22	30	LpUT	-	-	-	-	+
8	湯口水	温泉	39.7	0.5	50	Lp1, Lp8, Lp12, LpUT	NT	-	-	-	+
9	浴槽水	水道水	40.4	0.8	50	Lp3	NT	+	-	-	+
10	浴槽水	水道水	44	0.3	50	Lp6, LpUT	NT	+	-	-	+
11	湯口水	温泉	0	1500	1500	Lp3, Lp13, LpUT, <i>L. londiniensis</i>	NT	-	-	-	+
12	浴槽水	温泉	39.5	0.5	7.09 7520	Lp1, <i>L. micdadei</i>	+	+	-	-	-

表8. 平板培養法とEMA-LAMP法との比較

a. EMA未処理

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	17	13	30
陰性	3	53	56
計	20	66	86

感度85.0%、特異度80.3%、陽性的中率56.7%、陰性的中率100%、一致率81.4%

b. EMA処理

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	12	0	12
陰性	8	66	74
計	20	66	86

感度60.0%、特異度100%、陽性的中率100%、陰性的中率89.2%、一致率90.7%

表9. 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)		計
	10	< 10	
qPCR	陽性	32	84
	陰性	1	51
計	33	135	168

感度97.0%、特異度37.8%、陽性的中率27.6%、陰性的中率98.1%、一致率49.4%

b. EMA処理

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
EMA-qPCR	陽性	28	55
	陰性	6	88
計	34	143	177

感度82.4%、特異度61.5%、陽性的中率33.7%、陰性的中率93.6%、一致率65.5%

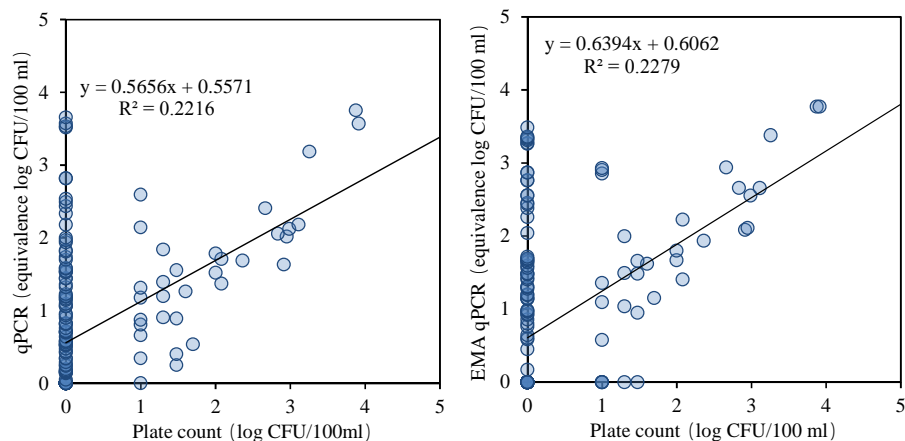


図 平板培養法と qPCR 法および EMA-qPCR 法との相関

表10. (EMA-) qPCR法における偽陰性検体

No.	EMA処理	検体	湯温	残塩	pH	平板培養法				
						泉質など ()	(mg/L)	(CFU/100 ml)	血清群	LAMP法
1	-	採暖槽水	白湯	35.8	0	7.79	10	Lp1	-	+
2	+	浴槽水	温泉	40	<0.05	7.19	10	Lp5	-	-
3	+	採暖槽水	白湯	38	1.3	8.3	10	Lp3	+	-
4	+	採暖槽水	白湯	35.8	0	7.79	10	Lp1	-	+
5	+	採暖槽水	白湯	36.8	0.8	8.27	10	Lp1	-	-
6	+	浴槽水		40.5	0.1	8	20	Lp6	-	NT
7	+	シャワー水	井戸水		0.3	8.22	30	LpUT	-	-