

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 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、LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法および EMA-qPCR 法（EMA 処理を 1 および 2 回実施）について、浴槽水などの実検体 233 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。また、RT-qPCR 法を用いて、検体中のレジオネラ属菌 RNA 量と平板培養法との菌数を比較し、シャワー水およびカラン水における PALSAR 法の感度低下の原因を調査した。

183 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 81.8%、特異度は 69.8%、一致率は 72.7% であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。EMA-LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 69.1% と LAMP 法より低かったものの、特異度は 85.3%、一致率は 81.0% まで上昇した。温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法は、感度の低下を防ぐために、N = 2 で実施するのが望ましいと考えられた。

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 2 回実施すると、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 回でほとんど結果に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。

92 検体について RT-qPCR 法を実施した結果、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。したがって、PALSAR 法は、現時点ではシャワー水およびカラン水以外を対象として使用するのが望ましいと考えられた。

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てきた。その結果、1) EMA-LAMP法については、EMA処理濃度の再検討が必要であること、2) PALSAR法については、シャワー水およびカラン水を対象としたとき、浴槽水などと比較し、平板培養法に対する感度が低いことが明らかとなった³⁾。一方、EMA-qPCR法において、EMA処理回数と平板培養法に対する相関については、これまで検討されていない。

そこで今回、改良EMA-LAMP法およびEMA-qPCR法(EMA処理を1および2回実施)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。また、実検体から抽出したRNAを用いて定量逆

転写PCR(RT-qPCR)を行い、PALSAR法におけるシャワー水およびカラン水の感度低下の原因を調査した。

B 材料と方法

1 検査材料

全国5か所の地方衛生研究所(機関A~E)において、平成30年度に浴用施設などから233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147検体(63.1%)、シャワー水が29検体(12.4%)、湯口水が23検体(9.9%)、採暖槽水が16検体(6.9%)、カラン水が15検体(6.4%)、冷却塔水が2検体(0.9%)、プール水が1検体(0.4%)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て各機関の方法で実施し、10 CFU/100 ml以上を陽性とした。

3 (EMA-)LAMP法

LAMP法は、Loopampレジオネラ検出試薬キットE(栄研化学)を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。EMA-LAMP法は、図1に従って実施した。いずれの方法においても、遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。また、EMA-LAMP法は、124/205検体(60.5%)はN=2で実施した。

4 (EMA-)qPCR法

qPCR法は、Lysis Buffer for *Legionella*(タカラバイオ)および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)およびLED Crosslinker 12(タカラバイオ)を用いて、EMA処理を1および2回実施した。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。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、取扱説明書および過去の検討結果⁴⁾を参照した。

5 RT-qPCR 法

RT-qPCR 法は、烏谷らの方法に従って実施した⁵⁾。検量線は、*L. pneumophila* 長崎 80-045 株を用いて作製した。菌株を BCYE 寒天培地で 30 4 日間培養後、生理食塩水で調製した McFarland No. 2 濁度の菌液 (約 10^9 CFU/ml) を 10 倍段階希釈し、 10^{-1} ~ 10^{-8} 乗段階の希釈液を用いて RNA を抽出した。

(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

233 検体について検査した結果、63 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 (表 2)。菌数別に見ると、10 ~ 99 CFU/100 ml が 35 検体 (15.0%)、100 ~ 999 CFU/100 ml が 19 検体 (8.2%)、1,000 CFU/100 ml 以上が 9 検体 (3.9%) であった。最も多かった検体では、4,830 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) 4 が 17 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 および SG 6 (各 16 検体)、*L. pneumophila* SG 5 (14 検体)、*L. pneumophila* SG 3 (13 検体) であった。また、*L. pneumophila* 以外の菌種が 14 検体から分離された。

2 LAMP 法による結果

LAMP 法を用いた 183 検体について、平板培養法と比較した (表 4a)。LAMP 法は平板培養法に対して、感度 81.8%、特異度 69.8%、陽性的中率 46.2%、陰性的中率 92.4%、一致率 72.7% であった。

3 EMA-LAMP 法による結果

205 検体について、EMA-LAMP 法を実施した (表 4b および 4c、EMA 未処理は 76 検体について実施)。EMA 未処理の場合、平板培養法に対して、感度 86.7%、特異度 54.1%、陽性的中率 31.7%、

陰性的中率 94.3%、一致率 60.5% であった。EMA 処理を実施することで、感度 69.1%、特異度 85.3%、陽性的中率 63.3%、陰性的中率 88.3%、一致率 81.0% となった。

4 (EMA-) LAMP 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となったが、(EMA-) LAMP 法で陰性となった検体を表 5 に示した。23 検体のうち、12 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml と検出下限値であった。一方、平板培養法での菌数が 50 CFU/100 ml 以上であった 8 検体はすべて温泉であり、このうち 7 検体は EMA-LAMP 法が陰性であった。さらに、6/7 検体は、機関 D で実施した浴槽水および湯口水であった。泉種別に結果を見ると、温泉を対象とした場合、LAMP 法の感度は 91.7% であったのに対し、EMA-LAMP 法の感度は 70.6% であった (表 6)。一方、水道水などを対象とした場合、LAMP 法の感度は 70.0%、EMA-LAMP 法の感度は 66.7% であった。

5 (EMA-) qPCR 法による結果

(EMA-) qPCR 法を用いた 126 検体について、それぞれ平板培養法と比較した (表 7)。qPCR 法は平板培養法に対して、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% であった。EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) は、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% であった。EMA-qPCR 法 (EMA 処理 2 回) は、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% であった。実検体を用いた qPCR 法および EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) と平板培養法との菌数 (定量値) の相関は、 $R^2 = 0.3425$ および $R^2 = 0.4040$ であった (図 2)。

6 RT-qPCR 法による結果

RT-qPCR 法を用いた 92 検体について、平板培養法と定量値および菌数を比較した (図 3)。検体別に見ると、浴槽水 49 検体を対象とした場合、 R^2 値は 0.3842 であった。一方、シャワー水およびカラン水 43 検体を対象とした場合、 R^2 値は

0.1775 であった。

D 考察

今年度は、5 種類の迅速検査法[LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法、EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回)、EMA-qPCR 法 (EMA 処理 2 回)]および RT-qPCR 法について、平板培養法の結果と比較し、評価した。

LAMP 法では、平板培養法に対する感度は 81.8% であり、昨年度の 84.4%³⁾と同等であった。LAMP 法における偽陰性検体の多く (6/8 検体) は、平板培養法での菌数が検出下限値の 10 CFU/100 ml であったことから、各種検査に検体を分取する際のばらつきの影響が考えられた。LAMP 法は、一致率 72.7%、陰性的中率 92.4% であることから、迅速検査法として有用であると考えられた。

EMA-LAMP 法については、昨年度から、EMA 処理濃度などプロトコルの一部を変更して実施した。その結果、感度は 69.1% と LAMP 法より低かったものの、特異度は 85.3%、一致率は 81.0% まで上昇した。EMA-LAMP 法における偽陰性検体の約半数 (8/17 検体) は、平板培養法での菌数が検出下限値の 10 CFU/100 ml であった。それ以外の偽陰性検体の多く (7/9 検体) は、機関 D で温泉検体を対象に検査した結果であった。全体として、温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であった。温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法および平板培養法が陽性となった 38 検体のうち、24 検体は N = 2 で実施したが、このうち 9 検体 (37.5%) は 1 回のみ増幅反応が認められた (データ未掲載)。EMA-LAMP 法の感

度低下を防ぐためには、N = 2 で実施するのが望ましいと考えられた。

qPCR 法は、平板培養法に対する感度は 100% であり、昨年度の結果 (感度 97.0%)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 34.8%、一致率は 52.4% 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 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 回でほとんど結果に差はなかったことから (カイ二乗検定、 $P = 0.48$)、実用上 EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。

PALSAR 法は、昨年度の結果では、浴槽水を対象とした場合、感度は 83.7% (41/49 検体) であったのに対し、シャワー水およびカラン水を対象とした場合は、感度が 37.5% (3/8 検体) と低かった³⁾。今年度実施した RT-qPCR 法の結果から、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。したがって、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 1 CFU あたりの RNA 量は、浴槽水より少ない可能性が考えられた。検査に用いたシャワー水およびカラン水は、80% 以上 (36/43 検体) が混合水栓であり、レジオネラ属菌の増殖に適した温度である 37 付近で滞留している検体が少ないと考えられた。そのため、レジオネラ属菌の遺伝子発現量が低かった可能性が考えられた。PALSAR 法は、現時点では、シャワー水およびカラン水以外を対象として使用するのが望ましい。

LAMP 法、qPCR 法、EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) および EMA-qPCR 法 (EMA 処理 2 回) は、いずれの方法においても陰性的中率が 90% 以上であり、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、EMA-LAMP 法は、LAMP 法と比較し、感度はやや低下するが、特異度および一致率は上昇する方法であった。PALSAR 法については、シャワー水およびカラン水以外を対象として使用することで、平板培養法と相関する方法であることが明らかとなった。

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。

LAMP 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。EMA-LAMP 法は、LAMP 法より平板培養法と相関する方法であったが、感度はやや低下した。

温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法の感度低下を防ぐために、N = 2 で実施するのが望ましいと考えられた。

qPCR 法は、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相関する迅速検査法 (EMA-qPCR 法) となると考えられた。実用上、EMA 処理回数は1回で十分であると考えられた。

PALSAR 法は、シャワー水およびカラン水以外を対象として使用することで、平板培養法と相関する方法であることが明らかとなった。

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 29 年度分担研究報告書、62-70.

4) 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.

5) 烏谷 竜哉 他、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の改良、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、59-69.

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	49	23	12	25	38	147
	湯口水				23		23
	採暖槽水		16				16
	シャワー水	28	1				29
	カラン水	15					15
	冷却塔水		2				2
	プール水		1				1
	計	92	43	12	48	38	233
検査方法	LAMP	92	43		48		183
	EMA-LAMP (EMA未処理)	76					76
	EMA-LAMP (EMA処理)	76	43		48	38	205
	qPCR	76		12		38	126
	EMA-qPCR (EMA処理1回)	76		12		38	126
	EMA-qPCR (EMA処理2回)	76		12		38	126
	RT-qPCR	92					92

図1. EMA-LAMP法プロトコル

100倍濃縮液1.5 ml×2本

遠心(13,000×g, 4、5分)

上清1 ml除去

残った500 μlを用いて懸濁後、1本にまとめる(300倍濃縮液1 ml)

遠心(13,000×g, 4、5分)

上清950 μl除去

2% Yeast Extractを50 μl添加後、ピペティングで懸濁

EMA溶液(302.5 μg/ml)を10 μl添加後、十分に混和(終濃度27.5 μg/ml)
(7回タッピング後、スナップを利かせて1回だけ手で振り落とす)

遮光して室温放置15分
(4分毎に7回タッピングし、スナップを利かせて1回だけ手で振り落とす)

光照射15分(LED Crosslinker 12使用)

遠心(13,000×g, 4、5分)

10 μl程度残して上清除去

10% Chelex溶液を40 μl添加(添加後はピペティング禁止)

ボルテックス後、スピンドウン

加熱(95、10分)

氷上静置2分

ボルテックス後、遠心(13,000×g, 4、10分)

上清25 μl回収

EMA未処理の場合は実施せず

表2. 平板培養法による検出率

菌数 (CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	170	(73.0)
10-99	35	(15.0)
100-999	19	(8.2)
1,000以上	9	(3.9)
計	233	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 4	17
SG 1	16
SG 6	16
SG 5	14
SG 3	13
SG 2	5
SG 7	4
SG 9	4
SG 8	3
SG 13	1
SG 15	1
UT	14
<i>L. micdadei</i>	5
<i>L. dumoffii</i>	1
<i>L. gormanii</i>	1
<i>L. londiniensis</i>	1
<i>Legionella</i> spp.	9

表4. 平板培養法と (EMA-) LAMP法との比較

a. LAMP法

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	36	42	78
陰性	8	97	105
計	44	139	183

感度81.8%、特異度69.8%、陽性的中率46.2%、陰性的中率92.4%、一致率72.7%

b. EMA-LAMP法 (EMA未処理)

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	13	28	41
陰性	2	33	35
計	15	61	76

感度86.7%、特異度54.1%、陽性的中率31.7%、陰性的中率94.3%、一致率60.5%

c. EMA-LAMP法 (EMA処理)

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	38	22	60
陰性	17	128	145
計	55	150	205

感度69.1%、特異度85.3%、陽性的中率63.3%、陰性的中率88.3%、一致率81.0%

表5.(EMA-) LAMP法における偽陰性検体

No.	施設	検体	泉質など	湯温 ()	残塩 (mg/l)	pH	ATP (/10 ml)	平板培養法 (CFU/100 ml)	血清型	LAMP法	EMA-LAMP法 (EMA処理)	EMA-LAMP法 (EMA未処理)	qPCR法	EMA-qPCR法 (1回)	EMA-qPCR法 (2回)
1	A	浴槽水	温泉	42	2		12	10	Lp 1	-	-	-	+	+	+
2	B	採暖槽水	水道水	32.5	2	7.98		10	Lp 1	-	-	NT	NT	NT	NT
3	E	浴槽水	白湯	39.3	0.1		9	10	Lp 5	NT	-	NT	+	-	-
4	E	浴槽水	温泉	41.3	0.1		52	10	Lp 1	NT	-	NT	+	+	+
5	A	浴槽水	白湯	39	0.5		11	10	Lp 1	-	NT	NT	NT	NT	NT
6	A	カラシ水	井戸水		0		12	10	Lp 3	-	+	+	+	+	+
7	A	シャワー水	水道水		0.2		20	10	Lp 5	-	+	+	+	+	+
8	A	カラシ水	水道水		0.2		24	10	Lp 5	-	+	+	+	+	+
9	A	シャワー水	井戸水		0.2		8	10	Lp 4	+	-	+	+	+	+
10	B	採暖槽水	水道水	37.4	1	8.12		10	Lp 6	-	-	NT	NT	NT	NT
11	B	浴槽水	水道水	35.9	0.2	7.96		10	Lp 1	+	-	NT	NT	NT	NT
12	D	浴槽水	自家ポンク水					10	Lp 3, Lp 5, Lp 6	+	-	NT	NT	NT	NT
13	A	浴槽水	温泉	40.5	0.4		261	20	Lp 4, Lp 6	+	-	-	+	+	+
14	A	カラシ水	井戸水		0.07		7	30	Lp 5, Lp 6	-	+	+	+	+	+
15	A	カラシ水	井戸水		0.05		17	30	Lp 1	+	-	+	+	+	+
16	D	湯口水	温泉		0			50	Lp 3, Lp 6	+	-	NT	NT	NT	NT
17	D	湯口水	温泉			9		50	Lp 3, Lp 5	+	-	NT	NT	NT	NT
18	D	浴槽水	温泉		0	8.8		55	Lp 4, L. sp	-	+	NT	NT	NT	NT
19	E	浴槽水	温泉	43.7	0.05		980	60	Lp 1, Lp 4, L. mitedadei, L. sp	NT	-	NT	+	+	+
20	D	湯口水	温泉		0	8.8		100	Lp 4, L. sp	+	-	NT	NT	NT	NT
21	D	湯口水	温泉		0.6			100	Lp 3, Lp 4, Lp 6, Lp UT	+	-	NT	NT	NT	NT
22	D	浴槽水	温泉		0	7.2		500	Lp 2, Lp 3, Lp 13, UT	+	-	NT	NT	NT	NT
23	D	湯口水	温泉		0	8.2		500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	+	-	NT	NT	NT	NT

表6. 泉種別における(EMA-) LAMP法の感度、特異度および一致率

検体	由来	方法	n	培養陽性	感度 (%)	特異度 (%)	一致率 (%)
温泉	浴槽水、湯口水	LAMP法	63	24	91.7	66.7	76.2
		EMA-LAMP法(EMA処理)	82	34	70.6	83.3	78.0
その他(水道水、井戸水)	浴槽水、湯口水、シャワー水、カラシ水、採暖槽水、冷却塔水など	LAMP法	120	20	70.0	71.0	70.8
		EMA-LAMP法(EMA処理)	123	21	66.7	86.3	82.9

表7. 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	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%

b. EMA処理(1回)

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
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%

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%

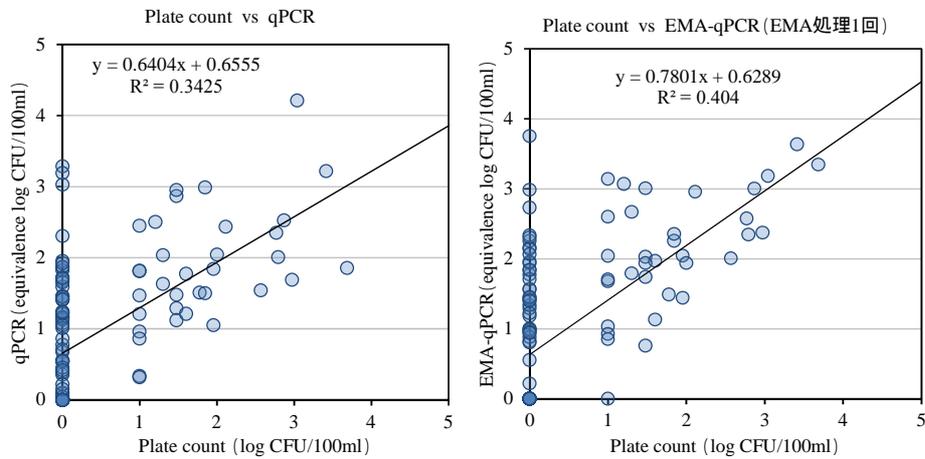


図2. 平板培養法と qPCR 法および EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) との相関

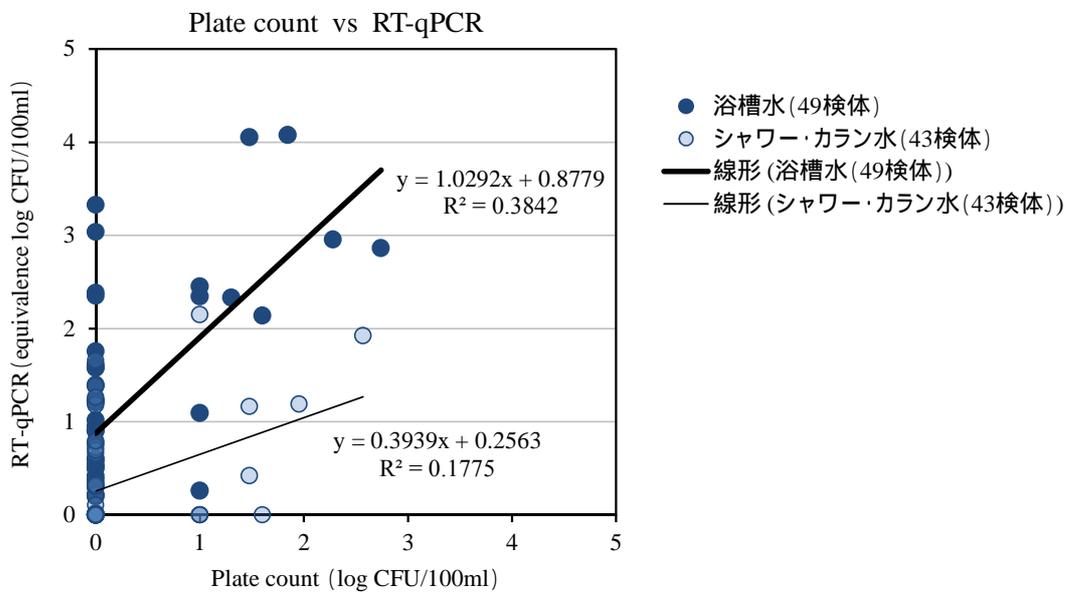


図3. 平板培養法と RT-qPCR 法との相関