

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）  
公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究

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

レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

#### 研究分担者

○金谷 潤一 富山県衛生研究所

#### 研究協力者

磯部 順子	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	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	塩崎 晋啓	日本板硝子株式会社
水谷 幸仁	日本板硝子株式会社	小澤 賢介	デンカ生研株式会社

#### 研究要旨

本研究では、浴用施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握し、新たな検査法を確立・普及することを目的とし、1. 迅速な検査法の開発、2. 感染源特定のための検査法の確立、3. 公衆浴場における水系の総合的な汚染実態の解明を行った。

149 検体中、34 検体（22.8%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。シャワー・カラン水について見ると、14.3%（5/35 検体）が 1,000 CFU/100 ml 以上の菌数であった。分離菌の血清群別の結果、Lp6 が 20/34 検体（58.8%）から分離され、最も多かった。

LC EMA-qPCR 法では、カラムを使用した新たな簡易抽出法（Lysis Buffer for *Legionella* Type2）を用いた場合においても、平板培養法に対する感度などは、従来の簡易抽出法（Lysis Buffer for *Legionella*）と同等の結果であった。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、浴用水の濃縮液をそのまま qPCR 反応に用いた場合、平板培養法に対する感度は、抽出した DNA を鋳型とした場合よりも優位に低かった（ $P < 0.05$ ）。各抽出法のコピー数を qPCR 法のコピー数と比較した結果においても、濃縮液を qPCR 反応に用いた場合は、全体的に定量値が低かった。

水検体における免疫磁気ビーズ（IMB）を用いた選択的濃縮法の検討では、レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1～3 を対象とした。培養菌株を用いた添加回収実験および実検体を対象とした検討の結果、自家調製した IMB は、デンカ生研で調製した IMB に比べ、濃縮分離の性能はかなり劣ることが判明した。

シャワー・カラン水の約 2 割からレジオネラ属菌が検出されたため、エアロゾルが発生しやすいシャワー水の衛生管理の重要性について、改めて周知していく必要性が示された。

## A 研究目的

国内におけるレジオネラ症の患者報告数は年々増加しており、2019年の全国での届出数は2,314件（暫定値）であった<sup>1)</sup>。レジオネラ症対策として、感染源のおよそ4割を占める浴用施設の衛生管理の向上は重要である。したがって、浴用施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握し、新たな検査法を確立・普及することを目的とし、1. 迅速な検査法の開発、2. 感染源特定のための検査法の確立、3. 公衆浴場における水系の総合的な汚染実態の解明を行う。

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。このような培養法に替わる迅速検査法に対して、監視指導のためにリアルタイムに結果を提供すること、営業再開の時期を早めることなどの理由により、行政・業者双方からの要望があり、必要性は高い。特に、培養法と関連する遺伝子検査法は、浴用水の衛生状態を的確に、かつリアルタイムに把握する点から重要な方法である。現在、死菌由来DNAのPCR増幅を阻害するEthidium monoazide (EMA)と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<sup>2)</sup>、市販されている。本研究では、より簡便な方法として開発された、カラムを使用した抽出法を用いたLC EMA-qPCR法について検討した。また、採水現場で測定可能なモバイル型装置を使用したqPCR法 (モバイルqPCR法)についても検討した。

一方、国内における患者由来株の87%は*Legionella pneumophila*血清群1 (Lp1)であるが、残りの13%は、Lp1以外の19種類の菌種・血清群である<sup>3)</sup>。したがって、感染源特定のために必要となる感染源疑いの環境検体から、患者由来株と同一の菌種・血清群の菌株を効率よく検出するため、Lp1をはじめとする様々な血清群で感作した

免疫磁気ビーズ (Lp-IMB) を用いて、選択的濃縮法によるLpの分離について検討した。

近年、公衆浴場のシャワー水を原因としたレジオネラ症感染事例も報告されているため<sup>4)</sup>、浴槽水だけでなく、シャワー水、カラン水なども調査し、公衆浴場の水系の総合的な汚染実態を明らかにする。

## B 材料と方法

### 1 検査材料

3か所の地方衛生研究所 (機関A~C)において、令和元年度に浴用施設などから149検体の試料を採取した (表1)。検体の内訳は、浴槽水が104検体、シャワー水が19検体、カラン水が16検体、採暖槽水が10検体であった。

### 2 平板培養法

平板培養法は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法 (薬生衛発0919第1号)」に準じて各機関の方法で実施し、10 CFU/100 ml以上を検出とした。

### 3 LAMP法

検水の100倍濃縮液2 mlを使用した。Loopampレジオネラ検出試薬キットE (栄研化学)を用いて、取扱説明書に従いDNAを抽出した。LAMP反応には、LA-320C (栄研化学)を用いた。

### 4 LC EMA-qPCR法

LC EMA-qPCR法は、使用する各種試薬の取扱説明書に従い実施した。すなわち、5分間酸処理した検水の1,000倍濃縮液0.1 mlを、*Legionella* LC Medium base (タカラバイオ)、レジオネラBCYE $\alpha$ 発育サプリメント (関東化学) およびレジオネラMWY選択サプリメント (関東化学)を用いて作製したMWY液体培地を添加後、36°Cで18時間培養した。その増菌液0.1 mlを分取し、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (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回実施した。EMA処理後、1検体につき、3種類の方法でDNAを抽出した。Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ)、NucleoSpin Tissue (タカラバイオ)、Lysis Buffer for *Legionella* Type2 (カラム抽出、タカラバイオ)を用いてそれぞれDNAを抽出後、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を用いてqPCR反応を実施した。機器は、Thermal Cycler Dice Real Time System II (TP900、タカラバイオ)を使用した。反応後、添付の取扱説明書に記載された方法で、16S rRNA 遺伝子のコピー数をCFU相当値に換算し、定量値1 CFU相当/100 ml以上を陽性と判定した。また、平板培養法の菌数との散布図を作成した。ただし、平板培養法における10 CFU/100 ml未満、qPCRにおけるCFU相当値1未満はそれぞれlog値0にプロットした。

## 5 モバイル qPCR 法

1検体につき、2種類の方法でDNAを抽出した。検水の100倍濃縮液1 mlおよび2 mlについて、それぞれLysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ)およびLoopamp レジオネラ検出試薬キットE (栄研化学)に付属のアルカリ熱抽出試薬を用いて、取扱説明書に従いDNAを抽出した。同時に、検水の100倍濃縮液1 mlを15,000 rpmで5分間遠心後、上清を除去し、滅菌水50  $\mu$ lに懸濁したものを鋳型とした。レジオネラ属菌に特異的な16S rRNA 遺伝子配列を標的として、プライマー、プローブおよび内部コントロール用プラスミドを作製し、KAPA3G Plant PCR Kit (KAPA)を用いてqPCR反応を実施した。qPCR反応には、モバイルqPCR装置 Picogene PCR1100 (日本板硝子)を用いた。

比較として、Lysis Buffer for *Legionella* で抽出したDNAについてはqPCR装置 (TP900)、アルカリ熱抽出試薬で抽出したDNAについてはLAMP装置 (LA-320C)を用いて、それぞれ反応を実施した。

また、qPCR法およびモバイルqPCR法における16S rRNA 遺伝子のコピー数から散布図を作成した。ただし、コピー数1未満はlog値0にプロットした。

## 6 Lp-IMB 法

### 1) Lp-IMB 作製方法

今年度は対象をLp1、2、3の3血清群とし、IMBは当所(自家調製IMB)とデンカ生研(D社調製IMB)の2施設で作製した。D社調製IMBは、目的以外の血清群に対する交差反応を吸収後、硫酸分画にて粗精製し、至適感作濃度(ビーズに結合しやすい抗体の濃度)とした抗体を磁気ビーズに感作し、免疫磁気ビーズとした。自家調製IMBでは、市販されているビーズ粒子(Dynabeads™ M-280 Sheep anti-Rabbit IgG)をレジオネラ免疫血清で感作した。方法は国立感染症研究所の病原体検出マニュアルの中の「腸管出血性大腸菌検査検出診断マニュアル」に準拠した<sup>5)</sup>。

### 2) Lp-IMB の回収率の比較

添加回収には当所で凍結保管しているLp1、Lp2、Lp3をBCYE寒天培地(ビオメリュー)に画線塗抹し、30°Cで3日間培養した。その培養菌をMcFarland 2.0となるようPBSに懸濁し、10倍段階希釈して最終的に菌濃度 $1 \times 10^{1-4}$  CFU/mlの菌液を作製した。この菌懸濁液100~1,000  $\mu$ lにLp-IMBを25  $\mu$ l接種し、10分毎に転倒混和しながら30分間ビーズに吸着させた。ただし、菌懸濁液が1,000  $\mu$ lに満たない場合は、ビーズとよく混和するようPBSを加えて1,000  $\mu$ lとした。PBSで2回洗浄したのち、PBSにて100または200  $\mu$ lに懸濁してビーズ濃縮液とした。これら100  $\mu$ lをBCYE寒天培地にコンラージ棒で塗布し、湿潤箱に入れて、35°Cで7日間培養し、3日目以降は斜光法で観察した。レジオネラを疑うコロニーは血液寒天とBCYE寒天培地に再分離し、BCYE寒天培地のみに発育した菌をレジオネラ属菌とし、その数を測定した。

### 3) 実検体からのLp1 選択的濃縮分離

供試検体は、前述の感染源調査で 100 倍濃縮された浴槽水 38 検体、シャワー水 16 検体、カラン水 16 検体、計 70 検体とした。

Lp1-IMB 濃縮法：100 倍濃縮検体を、滅菌 PBS で 2 倍と 5 倍に希釈し、Lp-IMB 濃縮分離検体とした。これらの検体に自家調製（56 検体）または D 社調製（15 検体）Lp1-IMB 25  $\mu$ l を接種し、10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸着させた。ビーズを磁石で集め、滅菌 PBS で洗浄した。この操作（洗浄）を 2 回実施した後、最終的に PBS 200  $\mu$ l に懸濁、ボルテックスでよく混和し、IMB 検体とした。この IMB 検体 100  $\mu$ l を 2 枚の GVPC 寒天培地（日水製薬）にコンラージ棒で塗布し、35°C で 7 日間培養した。

（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

149 検体中、34 検体（22.8%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された（表 2a）。菌数別に見ると、10~99 CFU/100 ml が 19 検体（12.8%）、100~999 CFU/100 ml が 9 検体（6.0%）、1,000 CFU/100 ml 以上が 6 検体（4.0%）であった。最も多い菌数は、4,000 CFU/100 ml であった。分離菌の血清群別の結果、Lp6 が 20/34 検体（58.8%）から分離され、最も多かった（表 3）。次に多かったのは、Lp1（9/34 検体、26.5%）であった。また、Lp 以外の菌種が 3 検体から分離された。

シャワー・カラン水について見ると、全体の 14.3%（5/35 検体）が 1,000 CFU/100 ml 以上の菌数であった（表 2b）。これらの検体からは、Lp1（1 検体）、Lp3（2 検体）、Lp6（5 検体）、Lp12（1 検体）、Lp 以外の菌種（1 検体）が検出された。

### 2 LC EMA-qPCR 法による結果

各抽出法における、平板培養法に対する相関は

表 4 に示した。Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を用いた場合、平板培養法に対する感度（91.2%）・特異度（78.3%）・陽性的中率（55.4%）・陰性的中率（96.8%）・一致率（81.2%）全てにおいて、他の 2 つの方法と比較し最も高かった。とりわけ、感度および陰性的中率は、NucleoSpin Tissue を用いた場合よりも有意に高かった（ $P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるカイ二乗検定）。Lysis Buffer for *Legionella* と Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を用いた場合では、感度などに有意な差はなかった。

各抽出法を用いた LC EMA-qPCR 法の定量値（CFU 相当値）と平板培養法の菌数との相関は、それぞれ  $r = 0.4172$ （Lysis Buffer for *Legionella*）、 $r = 0.522$ （Lysis Buffer for *Legionella* Type2）、 $r = 0.1931$ （NucleoSpin Tissue）であった（図 1）。

### 3 モバイル qPCR 法による結果

24 検体について検討した（表 5）。Lysis Buffer for *Legionella* およびアルカリ熱抽出液を用いて DNA を抽出した場合、平板培養法に対する感度などは、既存の機器を使用した LAMP 法（LA-320C）および qPCR 法（TP900）と同等であった。一方で、浴用水の濃縮液を鋳型としてそのまま qPCR 反応を実施した場合は、平板培養法に対する感度は 33.3%と、Lysis Buffer for *Legionella* およびアルカリ熱抽出液を用いた場合よりも優位に低かった（ $P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるフィッシャーの正確確率検定）。各抽出法のコピー数を qPCR 法のコピー数と比較した結果においても、濃縮液を鋳型として用いた場合は、全体的に定量値が低かった（図 2）。

1 検体については、アルカリ熱抽出した DNA を用いたモバイル qPCR 法で反応阻害が確認され、陰性となった。この DNA を用いた LAMP 法では陽性であった。また、同一検体から Lysis Buffer for *Legionella* で抽出した DNA を用いた qPCR 法およびモバイル qPCR 法も陽性であった。

#### 4 Lp-IMB 法による結果

##### 1) Lp-IMB の回収率の比較

Lp1 の回収率の結果を表 6 に示した。自家調製 IMB による Lp1 の回収率は 0.0~1.5%、平均 0.33% であった。これに対し、D 社調製 IMB を用いた場合の回収率は 50.6~113.3%、平均 80.6%と、自家調製 IMB に比べ高かった。ただし、D 社調製 IMB による添加回収実験では、 $10^3$  CFU/mL 以上を添加した場合、回収された菌が多く、計測不能として平均値には加えなかった。

Lp2、3 の 2 血清群を対象とした添加回収の結果を表 7 に示した。Lp1 と同様に発育菌が多く、菌数測定ができなかった場合、その回収率は解析から外した。自家調製 IMB による回収率は 0.0~0.4%、平均 0.1%であった。これに対し、D 社調製 IMB による回収率は 8.3~100.0%、平均 48.2%と、Lp1 の場合と同様、D 社調製 IMB で高かった。しかしながら、Lp2 の D 社調製 IMB による回収率は、1 回目と 2 回目で大きく異なった。

##### 2) 実検体からの Lp1 選択的濃縮分離

IMB を用いて Lp1 を選択的に検出する方法と平板培養法との比較結果を表 8 に示した。11 検体中 Lp1 が分離されたのが、ビーズ法では 4 検体であったのに対し、平板培養法では 6 検体であった。平板培養法で Lp1 が分離されたにも関わらず、Lp1-IMB 法で Lp1 が分離されなかった検体 (No. 4、5、11) の内、No. 4、5 は菌数が 10 CFU/100ml と多くなかったが、No. 11 では 90 CFU/100ml であった。Lp1-IMB 法で使用したビーズは、検体 No.1~9 では D 社調製 IMB、No. 10、11 では自家調製 IMB であった。

#### D 考 察

LC EMA-qPCR 法における DNA 抽出では、Lysis Buffer for *Legionella* を使用しているが、本試薬は、界面活性剤と PCR 阻害物質を吸着する樹脂からなり、遠心操作後に吸着樹脂の上にゲル層が形成され、上清を回収するプロトコルとなっている。し

かしながら、容量が 50  $\mu$ l と少なく、ピペット操作のミスによりゲルや樹脂を回収してしまうと、その後の qPCR 反応に反応阻害などの影響を与える可能性がある。本研究では、この可能性を防ぐため、ゲルを含まずカラムで樹脂を除去する抽出法による新たな試薬 (Lysis Buffer for *Legionella* Type2) を検討した。平板培養法との比較では、従来の Lysis Buffer for *Legionella* を使用した場合と同等の結果であり、問題なく使用できることを確認できた。一方で、NucleoSpin Tissue を使用した場合は、平板培養法に対する感度 (61.8%) および陰性的中率 (87.1%) は、Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を使用した場合よりも有意に低かった。NucleoSpin Tissue はカラムを使用した DNA 抽出法であるため、純度の高い DNA を得ることができる。したがって、反応阻害物質の存在が予想される検体においては有用となる場合もある。しかしながら、抽出工程が多いため、DNA の収量が低下し、感度や陰性的中率が低下すると考えられた。したがって、LC EMA-qPCR 法における DNA 抽出には、既にプロトコルに記載されている Lysis Buffer for *Legionella*、または新たな試薬である Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を使用するのが望ましい。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、Lysis Buffer for *Legionella* またはアルカリ抽出液で抽出した DNA を用いた場合、平板培養法との相関は既存の機器を使用した LAMP 法 (LA-320C) および qPCR 法 (TP900) と同等の結果であった。qPCR 法との定量値の比較においても、概ね相関していた。ただし、1 検体については、アルカリ熱抽出した DNA を用いたモバイル qPCR 法でのみ反応阻害が確認され、陰性となった。遺伝子検査法においては、反応阻害などにより偽陰性となることを防ぐため、内部コントロールにより反応阻害を確認することは重要である。DNA を抽出せず、濃縮液をそのまま qPCR 反応に使用した検討では、平板培養法に対する感度 (33.3%) は、Lysis Buffer for

*Legionella* またはアルカリ抽出液で抽出した DNA を用いた場合よりも、有意に低かった。採水現場で測定することを想定した場合、検査機器、工程はできる限り簡略化することが求められるため、DNA 抽出工程の省略を検討したが、感度は低かった。今後は、DNA 抽出法だけでなく、ろ過濃縮工程についても、採水現場での実施に適したプロトコルを検討する必要がある。

感染源を特定するために、患者検体から分離されたレジオネラ属菌と同じクローンのレジオネラ属菌を分離することが重要となるが、感染源となるような浴用水からは、多くのレジオネラ属菌が分離される場合が多い<sup>6)</sup>。現在、レジオネラ属菌を血清群、あるいは菌種により鑑別する培地などはないため、目的とするレジオネラ属菌を IMB により選択的に濃縮分離することを検討した。これまで D 社調製 IMB を使用して検討してきたが<sup>7)</sup>、今年度は自家調製 IMB を用いた検討を行った。なぜなら、新しい検査試薬が保険適用となったことにより、Lp1 以外の Lp を原因とするレジオネラ症患者が増加することが予想されるため、それに対応するため、様々な血清群の IMB を自家調製し、対応するためである。しかしながら、検討結果は、自家調製 IMB は、D 社調製 IMB に比べ、濃縮分離の性能はかなり劣ることが判明した。原因のひとつとして、自家調製した場合、ビーズ粒子が塊を形成する状況がしばしば認められ、これにより、レジオネラ属菌のビーズへの吸着が阻害されたこと、培地上で十分に広がらなかったことが考えられた。前年度までの検討<sup>7)</sup> から、IMB を併用することに意義が認められることから、自家調製する場合の回収率の向上に向けて、さらに改良、検討が必要である。

シャワー水はエアロゾルが発生しやすく、リスクの高い環境水であることから、重点的な監視が必要である。カラン水は、シャワー水と同じ水を使用するため、同様に定期的な監視および清掃・消毒による衛生管理が必要である。今年度も、例

年の調査と同様に、シャワー・カラン水の約 2 割からレジオネラ属菌が検出され、改めて衛生管理の徹底を周知していく必要性が示された。

## E 結 論

LC EMA-qPCR 法の検討の結果、DNA 抽出には既にプロトコルに記載されている Lysis Buffer for *Legionella*、または新たな試薬である Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を使用するのが望ましい。モバイル qPCR 法の検討では、現プロトコルでは、濃縮液をそのまま qPCR 反応に使用せず、DNA を抽出する必要があることが明らかとなった。また、内部コントロールにより反応阻害を確認することも重要である。患者検体から分離されたレジオネラ属菌と同じクローンのレジオネラ属菌を分離するために IMB を併用することは、意義が認められることから、IMB を自家調製する場合の回収率の向上に向けて、さらに改良、検討が必要である。シャワー・カラン水の約 2 割からレジオネラ属菌が検出され、改めて衛生管理の徹底を周知していく必要性が示された。

## 参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ 2019 年第 52 週。  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/9289-idwr-sokuho-data-j-1952.html>
- 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) Amemura-Maekawa J et al. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84 (18), pii: e00721-18.
- 4) 石山 康史 他. シャワー水を感染源としたレ

ジオネラ症例について．病原微生物検出情報 (IASR). 2010, 31, 331-332.

5) 腸管出血性大腸菌感染症 2019 年 9 月版．病原体検出マニュアル．

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20190920.pdf>

6) 平塚貴大．2017 年に広島県で発生したレジオネラ症集団感染事例案について．平成 29 年度生活衛生関係技術担当者研修会資料，厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課．

7) 磯部 順子 他．感染源解明のための環境調査．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 30 年度分担研究報告書，47-57．

#### 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	
検体内訳	浴槽水	38	32	34	104
	採暖槽水		10		10
	シャワー水	17	2		19
	カラン水	16			16
	計	71	44	34	149
検査方法	LC EMA-qPCR	71	44	34	149
	モバイルqPCR	24			24
	LAMP	24			24
	qPCR	24			24

表2. 平板培養法による検出率

## a. 全検体

菌数(CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	115	(77.2)
10-99	19	(12.8)
100-999	9	(6.0)
1,000以上	6	(4.0)
計	149	(100)

## b. シャワー・カラン水のみ

菌数(CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	27	(77.1)
10-99	1	(2.9)
100-999	2	(5.7)
1,000以上	5	(14.3)
計	35	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数 (%)
<i>L. pneumophila</i>	
SG 6	20 (58.8)
SG 1	9 (26.5)
SG 3	3 (8.8)
SG 4	3 (8.8)
SG 5	3 (8.8)
SG 8	3 (8.8)
SG 9	3 (8.8)
others	2 (5.9)
UT	4 (11.8)
<i>Legionella</i> spp.	3 (8.8)

表4. LC EMA-qPCR法における平板培養法との相関(149検体、平板培養陽性34検体)

DNA抽出法	培養法に対する(%)				
	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率	一致率
Lysis Buffer for <i>Legionella</i>	85.3%	73.9%	49.2%	94.4%	76.5%
Lysis Buffer for <i>Legionella</i> Type2	91.2%*	78.3%	55.4%	96.8%*	81.2%
NucleoSpin Tissue	61.8%*	76.5%	43.8%	87.1%*	73.2%

\* $P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるカイ二乗検定

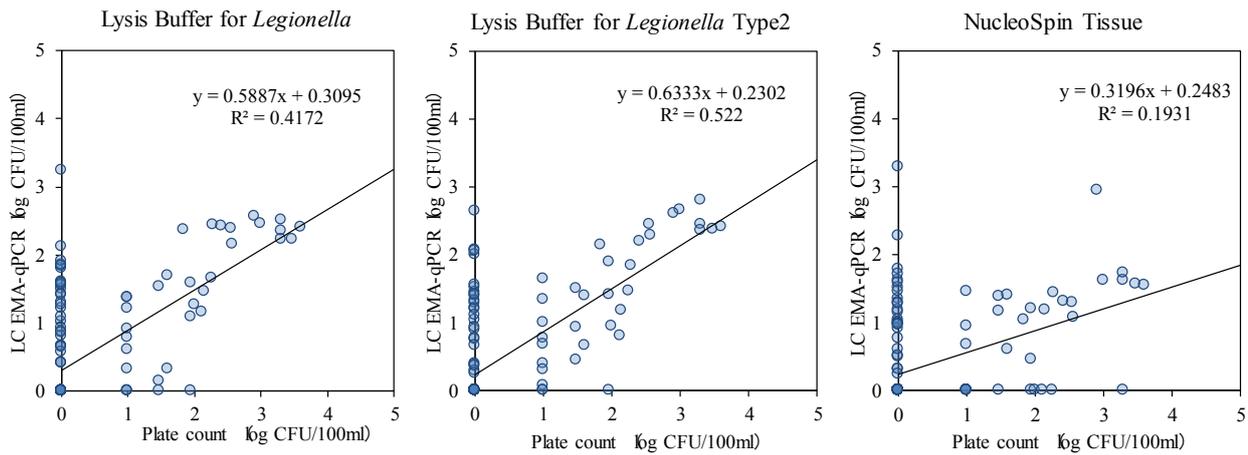


図1 LC EMA-qPCR 法と平板培養法との定量値の相関

表5. モバイル型装置を用いたqPCR法における平板培養法との相関(24検体、平板培養陽性15検体)

迅速検査法(DNA抽出法)	培養法に対する(%) :				
	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率	一致率
モバイルqPCR (Lysis Buffer for <i>Legionella</i> )	93.3%A	66.7%	82.4%	85.7%	83.3%
モバイルqPCR (アルカリ熱抽出)	86.7%A	66.7%	81.3%	75.0%	79.2%
モバイルqPCR (未抽出、濃縮液を鋳型)	33.3%B	77.8%	71.4%	41.2%	50.0%
qPCR (Lysis Buffer for <i>Legionella</i> )	93.3%	66.7%	82.4%	85.7%	83.3%
LAMP (アルカリ熱抽出)	100.0%	66.7%	83.3%	100.0%	87.5%

AとBは有意差あり( $P < 0.05$ )、ボンフェローニ補正によるフィッシャーの正確確率検定

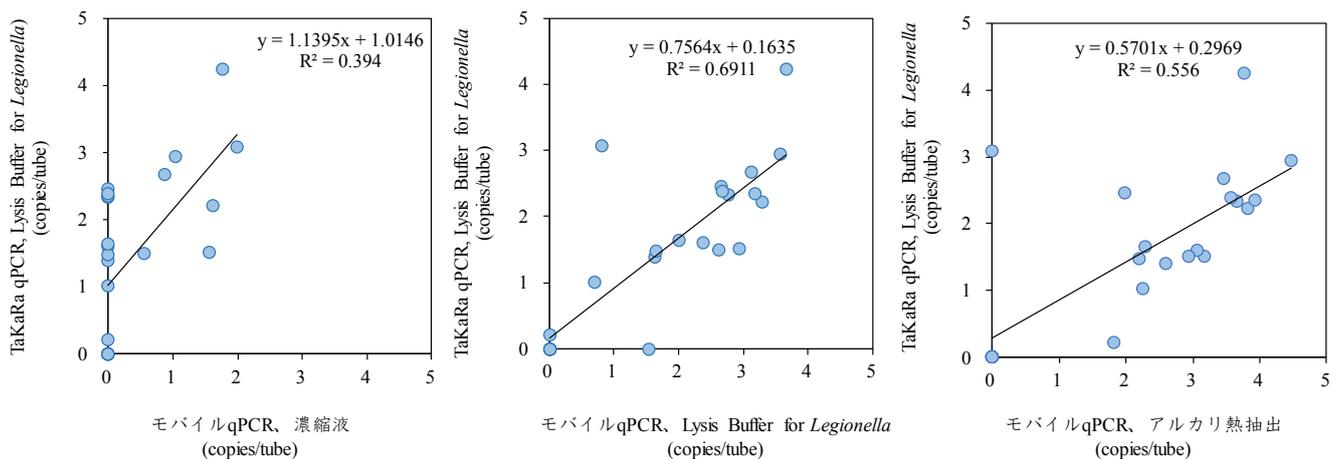


図2 qPCR 法とモバイル qPCR 法との定量値の相関

表6 Lp1-IMBによる添加回収の結果

	理論値 CFU/1,000 ml	自家調製IMB		D社調製IMB	
		測定値	回収率 (%)	測定値	回収率 (%)
1	30,000	119	0.40	>1,000	UC*
	3,000	5	0.17	>1,000	UC
	300	0	0.00	237	79.0
	30	0	0.00	34	113.3
2	53,000	146	0.28	>1,000	UC
	5,300	12	0.23	>1,000	UC
	530	0	0.00	374	70.6
	53	0	0.00	42	79.2
3	67,000	282	0.42	>1,000	UC
	6,700	33	0.49	>1,000	UC
	670	3	0.45	339	50.6
	67	1	1.5	61	91.0
平均			0.33		80.6

\*UC: Un calculable

表7 Lp2、Lp3-IMBによる添加回収の結果

	理論値 CFU/1,000 ml	自家調製MB		D社調製IMB	
		測定値	回収率 (%)	測定値	回収率 (%)
Lp2	14000	2	0.0	>1,000	UC*
	1400	1	0.1	>1,000	UC
	140	0	0.0	126	90.0
	14	0	0.0	14	100.0
	27000	44	0.2	>1,000	UC
	2700	12	0.4	>1,000	UC
	270	1	0.4	162	60.0
	27	0	0.0	13	48.1
Lp3	24000	11	0.05	>1,000	UC
	2400	1	0.04	497	20.7
	240	0	0.0	24	10.0
	24	0	0.0	2	8.3
平均			0.1		48.2

\*UC: Un calculable

表8 Lp1-IMBによる浴用水からのLp1の分離

検体No.	検体名*	分離されたレジオネラ属菌および血清群			
		ビーズ法		平板培養法	
		血清群	使用したIMB	血清群	CFU/100 ml
1	B7	Lp6	D社	Lp6	10
2	B15	Lp1	D社		<10
3	B17	Lp1	D社	Lp1	370
4	B21		D社	Lp1	10
5	B25		D社	Lp1、5、6	10
6	C10	Lp1	D社	Lp1,9	360
7	C11	Lp1、9	D社	Lp1,6	1,000
8	S4	Lp6	D社	Lp6	2,000
9	S5	Lp6	D社	Lp6	2,000
10	B34		自家	Lp4、6	90
11	B36		自家	Lp1	90

\*B: 浴用水、C: カラン水、S: シャワー水