

4) ディスク法、MIC 法による VRE の判定

ディスク法

試験培地	抗菌薬 (ディスク濃度)	阻止円直径 (mm)		
		感性	中等度耐性	耐性
ミュラーヒントン寒天培地	バンコマイシン (30 μ g)	≥ 17	15 - 16	≤ 14

*培養：35°C, 24h

精度管理用：*Staphylococcus aureus* ATCC25922

VCM；17 - 21mm

MIC 法

試験培地	抗菌薬	MIC 値 (μ g/ml)		
		感性	中等度耐性	耐性
カチオン調整ミュラーヒントン液体培地	バンコマイシン	≤ 4	8 - 16	≥ 32

*培養：35°C, 24h

精度管理用：*Enterococcus faecalis* ATCC29212

希釈法：VCM；1 - 4 μ g/ml

5) VRE 検出寒天スクリーニング法

滅菌綿棒にて集落をかきとり、MacFarland 0.5 に調整

↓

1 - 10 μ L の菌液をオキサシリン 6 μ g/ml 含有 BHI 寒天培地上にスポット

↓

35°C、24 時間培養

↓

1 コロニー以上生育すれば、VRE を疑う

*試験と同時に、運動性、色素産生性を確かめ、バンコマイシン自然耐性の運動性腸球菌であるかどうかを確認する。

6) MIC 法による ESBL の判定

使用培地：カチオン濃度調整ミュラーヒントン液体培地

使用抗菌薬：セフトチジム、セフォタキシムおよび、それらとクラバン酸の組み合わせ

抗菌薬	MIC 測定抗菌薬濃度範囲	*培養：35°C，24h
CTZ	0.25 - 128 $\mu\text{g/ml}$	精度管理： <i>Klebsiella pneumoniae</i>
CTZ/クラバン酸	0.25/4 - 128/4 $\mu\text{g/ml}$	ATCC700603
CTX	0.25 - 64 $\mu\text{g/ml}$	クラバン酸との併用で3管以上 MIC 値
CTX/クラバン酸	0.25/4 - 64/4 $\mu\text{g/ml}$	が減少する。

判定： β -ラクタマーゼ阻害剤のクラバン酸の併用で MIC 値が減少する

7) ESBL 産生 *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *E.coli* 検出のスクリーニング

滅菌綿棒にて集落をかきとり、MacFarland 0.5 に調整

↓

セフポドキシム、セフトチジム、アズトレオナム、セフォタキシム、セフトリアキソン
1 $\mu\text{g/ml}$ 含有、カチオン濃度調整ミュラーヒントン液体培地に、最終 10^5 CFU/ml となる
ように接種。最低2種以上の抗菌薬を組み合わせる

↓

35°C、16 時間培養

↓

生育が認められれば、ESBL を疑う

*培養：35°C，24h

精度管理用：*Klebsiella pneumoniae* ATCC700603

Cefpodoxime : $\geq 2 \mu\text{g/ml}$

Ceftazidime : $\geq 2 \mu\text{g/ml}$

Aztreonam : $\geq 2 \mu\text{g/ml}$

Cefotaxime : $\geq 2 \mu\text{g/ml}$

Ceftriaxone : $\geq 2 \mu\text{g/ml}$

(実際の実習作業)

1 班 10 名とする。

1. 微量液体希釈法

1) 薬剤希釈

- ① 各班二人一組で、配布したカチオン調整ミュラーヒントン液体培地から、6本の滅菌試験管に 1ml, 3ml, 7ml, 1ml, 3ml, 7ml の順で分注する (各班 5 セットできる)。
- ② 128 μg 力価/ml の 5 種類の薬液配布 (A、B、C、D、E)
- ③ 2 人一組で、128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 2 倍希釈系列を作製する。すなわち 128 μg 力価/ml の原液を、1ml, 3ml, 7ml, 1ml, 3ml, 7ml の各試験管に 1ml ずつ添加する。それによって上記 2 倍希釈系列の抗菌薬希釈液ができる。

2) 菌液希釈

- ① 各班にあらかじめ 8 種類の抗菌薬の希釈系列の入った 96 穴プレートを 5 枚配布
- ② 5 種類のグラム陰性桿菌を培養した平板を配布。各組で接種菌液を調整する。
- ③ 各班各組ごとに、菌接種機器 (マイクロプランター) で菌接種を行う。

3) 結果判定

各班で PRSP、VRE、ESBL の微量液体希釈法の MIC 値を判定し、NCCLS の分類で耐性菌であることを確認する。また MRSA と PRSP の寒天スクリーニング法の結果も供覧する。さらに Etest の方法を供覧し、結果を判定する。

Legionella pneumophila の臨床材料から PCR を用いた検出法 およびパルスフィールドゲル電気泳動法を用いたの型別法

石井良和（東邦大学医学部微生物学教室）

はじめに

レジオネラ感染症は、細胞内寄生性グラム陰性菌である *Legionella* 属細菌によって引き起こされる感染症である。本菌は 1997 年にフィラデルフィアのホテルで行われた在郷軍人会の出席者に発症した重症肺炎の原因菌として分離されたが、その後の調査から水・土壌など自然界に広く存在する最近であることが明らかとなった。レジオネラによる肺炎は、本菌で汚染されたエアゾルを吸入することにより発症することが知られており、欧米では市中肺炎の数パーセントを占める発生頻度の高い肺炎である。ところが本菌は細菌検査に通常使用される培地に発育せず、さらに WYO や BCYE α のような培地を使ったとしても臨床検体からの初代分離がきわめて困難である。また、本菌は細胞内寄生菌であるという性質から細胞内への移行性が良いマクロライド系あるいはニューキノロン系抗菌薬が有効で、 β -ラクタム系抗菌薬は無効である。最近、*Legionella pneumophila* は院内感染例および 24 時間風呂との関連から、日本でも注目されている微生物のひとつである。

今回は *Legionella* を迅速に検出する目的で使われる方法のひとつである PCR 法を行う。さらに *Legionella* が分離された場合、その感染経路を解明するために実施されるパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) に関しても学習する。

1. PCR 法による *Legionella* 遺伝子の検出

1) プライマーの作成

現在までレジオネラの診断に用いることができるプライマーは多数報告されている。表 1 に代表的なプライマーをまとめて示した。

2) 核酸の抽出法

PCR 法に用いる検査材料としては喀痰あるいは気管支洗浄液が一般的に用いられる。喀痰あるいは気管支洗浄液から鋳型となる DNA を抽出しなければならないが、喀痰の粘稠性が極めて高く困難な場合が多い。私たちは核酸の抽出キット (QIAamp Tissue Kit: QIAGEN) を用い比較的容易に鋳型となる DNA 溶液を作成している。

表 1 レジオネラの診断に用いることができる主なプライマー

<i>Legionella pneumophila</i> 染色体 DNA(文献 1)	
LEG-1	5'-GTC ATG AGG AAT CTC GCT-3'
LEG-2	5'-CTG GCT TCT TCC AGC TTC-3'
増幅塩基数 800bp	
<i>mip</i> (macrophage infectivity potentiator)遺伝子 (文献 2)	
LmipL920	5'-GCT ACA GAC AAC CAT AAG TTC-3'
LmipR1548	5'-GTT TTG TAT GAC TTT AAT TCA-3'
増幅塩基数 650bp	
上記のプライマーで PCR を行った後の nested PCR 用プライマー(文献 3)	
LmipL997	5'-TAA TCC GGA AGC AAT GGC T-3'
LmipR1466	5'-GGG CCA ATA GGT CCG CCA AC-3'
増幅塩基数 489bp	
レジオネラ属 5 S rRNA (文献 2)	
L5SL9	5'-ACT ATA GCG ATT TGG AAC CA-3'
L5SR93	5'-GCG ATG ACC TAC TTT CGC AT-3'
増幅塩基数 104bp	
レジオネラ属 16S rRNA (文献 4、5)	
LEG448A	5'-GAG GGT TGA TAG GTT AAG AGC-3'
LEG854B	5'-CGG TCA ACT TAT CGC GTT TGC T-3'
増幅塩基数 400bp	
p1.2	5'-AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC-3'
cp3.2	5'-CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG-3'
増幅塩基数 386bp	

3) 標準的な反応条件

① 反応液組成

鋳型 DNA 溶液	5 μ L
プライマー1	25 pmol
プライマー2	25 pmol
10×反応バッファー	5 μ L
dNTP ミックス	5 μ L
<i>Taq</i> DNA ポリメラーゼ	2.5 unit
滅菌蒸留水	適当量
合計	50 μ L

② 反応サイクル

94°C* 1～5分

94°C* 30秒

55°C** 30秒

72°C*** 30秒

25～30サイクル****

72°C 5～10分

* (変性温度) はターゲットとなるフラグメントの GC 比が高い場合には高くする。ただし、温度が高い場合や変性時間が長すぎる場合には酵素が失活する。

** (アニーリング温度) は作成したプライマーの長さとその GC 比に依存する。一般に $T_m (^{\circ}\text{C}) = 4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})$ より T_m 値を求め、 T_m 値より 5°C 程度低い温度で行う。

*** (伸長反応) *Taq* DNA polymerase の合成速度は通常 35～100 塩基/秒である。

**** 酵素反応回数を増せば PCR 産物は一般に対数的に増加する。しかし、基質の消費具合、試薬の安定性、最終生成物による阻害、目的としない DNA 合成やプライマーダイマー形成による阻害などにより、PCR 反応はプラトーに達する。

4) PCR 産物の確認

一般に PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によって分離したゲルを臭化エチジウム溶液で染色した後、トランスイルミネーターを用いて紫外線を照射してオレンジ色に染まったバンドを確認する。用いるゲルのアガロース濃度は DNA 断片の塩基数によって決まる。一応の目安を表 2 に記載した。

表 2 アガロース濃度と分離できる DNA 断片の長さ

アガロース(%)	DNA 断片の長さ(kb)
0.5	30～1
0.7	12～0.8
1.0	10～0.5
1.2	7～0.4
1.5	3～0.2
2.0	1～0.1

文献

1. Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1257-1261, 1989.

2. Mahbubani MH, Bej AK, Miller R et al. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol Cell Probes* 4: 175-187, 1990.
3. 小出道夫、斎藤 厚、比嘉 太ほか. Two step polymerase chain reaction 法による *Legionella pneumophila* の検出. *感染症学雑誌* 67: 1062-1067, 1993.
4. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T. Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 37: 617-622, 1993.
5. Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S et al. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of Legionellae in bronchoalveolar fluid. *J. Clin Microbiol* 33: 1247-1252, 1995.

2. パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による *Legionella* の型別法

1) 準備する試薬など

プラグモルド (Bio Rad)

InCert アガロース (BMA)

SeaKem Gold アガロース (BMA)

Brij-58 (Sigma)

Sodium Deoxycholate (Sigma)

Sodium Lauroyl Sarcosine (Sigma)

RNase A (Sigma)

Lysozyme (Sigma)

Proteinase K (Sigma)

*Sfi*I (Takara)

Buffer M (Takara)

PIV バッファー: 10 mM Tris (pH 7.6), 1N NaCl (高圧蒸気滅菌後 4°Cにて保存)

Lysis バッファー: 6 mM Tris (pH 7.6), 1N NaCl, 100 mM EDTA (pH7.6), 0.5% Brij-58, 0.2% Sodium Deoxycholate, 0.5% Sodium Lauroyl Sarcosine (フィルター滅菌後 4°Cにて保存)

Lysis 溶液: RNase 20 μ g/ml, Lysozyme 1 mg/ml (Lysis バッファーにて用時溶解)

ES バッファー: 0.5 MEDTA (pH 8.0), 10% Sodium Lauroyl Sarcosine (フィルターろ過後室温保存)

ESP 溶液: Proteinase K 100 μ g/ml (ES バッファーで溶解)

TE バッファー: 10 mM Tris (pH 7.6), 0.12N NaCl (高圧蒸気滅菌後室温保存)

2) アガロースへの包埋

寒天培地上に発育した菌を 1 コロニー採取して適当な液体培地で一夜培養する。培養した菌液は、約 100 μ L エッペンチューブに分取して 15,000 rpm にて 2 分間遠心する。沈殿に 150 μ L の PIV バッファーを加え懸濁して 50°C で保持する。この懸濁液に電子レ

ンジなどで溶解した同量の 1.3% InCert アガロースを加え、よくピペッティングした後、気泡が入らないように注意してプラグモールドに流し込む。20 分ほど室温でアガロースを固める。

3) 溶菌

プラグモールドの中で固まったアガロースプラグを 4 mL のプラスチック試験管に押し出し、Lysis 溶液および Lysis バッファーを添加した後、37°C で攪拌しながら 1 晩、インキュベートする。翌日プラグを TE バッファーで簡単に洗浄後、ESP を加え 50°C で攪拌しながら 1 晩、インキュベートする。

4) 制限酵素処理

溶菌処理したプラグを TE バッファーで 4 回程度、室温で洗浄した後、10 倍希釈した TE バッファーでさらに洗浄する。洗浄が終了後、プラグを 2 mL の Buffer M を入れたエッペンチューブに移し、室温で 30 分程度インキュベートする。Buffer M を除き 300 μ L の Buffer M に 25 unit の *Sfi*I を加えた溶液と交換し、50°C で 1 晩、インキュベートする。

5) 電気泳動の条件

1.0% のアガロースゲルを作成し、コームの穴の中に TE バッファーで一度洗浄したプラグを適当な大きさに切り挿入する。挿入したプラグは低融点アガロースを用いて上部を覆う。泳動用のバッファーは 0.5 \times TBE を用いる。泳動中のバッファーの温度は 14°C を維持する。電気泳動の条件は使用する PFGE の機種によって異なるが、GenePath および CHEF Mapper では 50~700 Kb の DNA を分離するための条件で行う。総泳動時間 19.7 時間、電圧 6.0 V/cm、角度 120°C、イニシャルスイッチタイム 5.3 秒、ファイナルスイッチタイム 49.9 秒、GenePath の Ramp は non-linear、Mapper の Ramp Shapes は 21% に設定する。

6) 泳動結果の確認

電気泳動が終了したら、臭化エチジウム溶液 (0.5 μ g/mL) に 30 分間浸し、脱イオン水で洗浄後、トランスイルミネーターを用いて観察する。

7) キットについて

Bio Rad から PFGE を行うためのキットが 6 種類市販されている。これら 6 種類のキットを用いれば、院内感染の原因菌として問題となる菌種に対して PFGE を行うことが可能である。さらに、全ての試薬が添付されているので簡便に検査を行うことができ便利である。但し、高価であることとキットが輸入品であることから国内在庫がない場合は納入までに時間を要する。また、他の菌種に対して使用する制限酵素および PFGE のパターン解析は文献 2 を参考にさせていただきたい。

文 献

1. Maslow JN, Slutsky Am, Arbeit RD. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications 1993. (Ed. Persing DH, Smith TF, Tenover FC and White TJ) ASM. Washington DC.
2. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33: 2233-2239, 1995.

環境材料からのレジオネラ属菌の検査法

宮崎修一（東邦大学医学部微生物学教室）

レジオネラ属菌によって起こるレジオネラ症は、軽症型のポンティアック熱と重症型のレジオネラ肺炎が主なものであるが、免疫抵抗性の減弱した宿主では蜂窩織炎、心内膜炎、心外膜炎などが報告されている。

1. 細菌学的特徴

レジオネラ属菌は河川、湖沼、土壌などの自然界に広く分布しているブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌である。レジオネラ属菌はアメーバなどの原虫や藻類の中で分裂・増殖することが知られており、現在までに 40 種類以上が見つかっている。この中でヒトに対して最も病原性が強いのは *Legionella pneumophila* であり、レジオネラ感染症の 8 割以上が本菌種によって起こる。レジオネラ属菌は細胞内寄生菌であり、グラム染色において難染色性を示し、ヒメネス染色など特殊染色で染色する。

その他の特徴としては、レジオネラ属菌は通常使用される血液寒天培地などには発育せず、本菌の分離培養には選択分離培地として WYO 培地（または GVPC）培地および非選択分離培地として BCYE- α (buffered charcoal yeast extract medium) と呼ばれる特殊な培地が必要であることがあげられる。

非選択培地作製：BCYE- α 寒天培地

基礎組成：酵母エキス	10.0 g
活性炭末	1.5 g
ACES バッファー	10.0 g
寒天	15.0 g
蒸留水	1000 ml
pH 6.9 \pm 0.05	
添加物：L-システイン-1 塩酸塩	0.4 g
可溶性ピロリン酸鉄	0.25 g
α -ケトグルタル酸-1 カリウム塩	1.0 g

- 1) ACES バッファー 10 g を 500 ml の蒸留水に入れ 40~50°C の温浴で溶かす (1 液)。
(ACES buffer: N-2-acetamide-2-aminoethane-sulfonic acid. PK_a 6.9, 20°C)
- 2) KOH ペレット 2.8 g を 480 ml の滅菌蒸留水に溶かす (2 液)。
- 3) 1 液と 2 液を混合し、これに活性炭末(Norit SG) 1.5 g、酵母エキス 10 g、 α -ケトグルタル酸塩 1g、寒天 15g を加える。

注意事項：1~3 の操作手順を守ることは、酵母エキスの変性をさけるために重要であ

- る。また過度に加熱すると酵母エキスの栄養価が下がるので注意しなければならない)
- 4) 121°C、15 分間、高圧蒸気滅菌し 50°C にさます。
 - 5) 濾過滅菌した 4% L-システイン-1 塩酸塩水溶液 10 ml と 2.5% 可溶性ピロリン酸鉄液 10 ml を加えて混和する。
 - 6) 滅菌した 0.1M KOH または 0.1M H₂SO₄ で最終 pH を pH 6.9±0.05 に調整する。

選択培地：レジオネラ属菌は発育が遅いので、人工環境水や土を培養する時、混合する他の細菌や真菌の発育に覆われたり、それらの微生物が培地中に放出する抗レジオネラ物質の為に発育が抑制されて検出できない。このため上記の BCYE- α 寒天培地に種々の抗菌剤や抗真菌剤を加えた選択培地を用いる。

WYO (Wadowsky-Yee-Okuda, glycine-vancomycin-polymyxin B-amphotericin B) 培地 (栄研化学) が選択培地として用いられる。この培地のアムフォテリシン B をサイクロヘキシミドに置き換えた GVPC (glycine-vancomycin-polymyxin B-cycloheximide) 培地も推奨されている。

- 1) グリシン：アンモニア不含グリシン 3 g を滅菌前の BCYE- α 寒天 1000ml に加える。
- 2) ポリミキシン B：ポリミキシン B を蒸留水に溶かして 20,000 IU/ml の水溶液とし濾過滅菌する。5 ml ずつ滅菌容器に分注し-20°C で保存する。滅菌した基礎培地 1000 ml に 1 容量 (5 ml) 加えると、最終濃度は 100 IU/ml になる。
- 3) バンコマイシン：バンコマイシン塩酸塩 100 mg を 20 ml の蒸留水に溶解して濾過滅菌し、滅菌容器に 1 ml ずつ分注し、-20°C で保存する。滅菌した基礎培地 100 ml に 1 容量 (1 ml) 加えると、最終濃度は 5 μ g/ml になる。
- 4) アムフォテリシン B：0.1M KOH で 16mg/ml 溶液を作り、最終濃度が 80 μ g/ml になるよう、その 5 ml を滅菌した基礎培地 1000 ml に加える。この溶液でのアムフォテリシン B は不安定なので、使用時に調製し、1 時間以内に使用する。
- 5) サイクロヘキシミド：2% 水溶液を作って濾過滅菌し、4 ml ずつ分注して-20°C に保存する。滅菌した基礎培地 1000 ml に 1 容量 (4 ml) 加えると最終濃度は 80 μ g/ml になる。サイクロヘキシミドは毒性が強いので、取り扱いには充分注意する。

2. 感染経路

感染の多くはレジオネラ属菌で汚染された水系からエアゾルが発生し、これを感受性のある宿主が吸引して起こる。レジオネラ属菌発見の発端となった 1976 年の米国フィラデルフィアのホテルでのレジオネラ肺炎の集団発生はホテル屋上に設置されたクーリングタワーの水の汚染が原因であった。すなわち、レジオネラ属菌に汚染された水がクーリングタワーから霧状に散布され、それを吸入した通行人、宿泊客に肺炎が発症した。また、近年では温泉水の誤嚥、循環器式浴槽が原因となったレジオネラ肺炎の発症例も報告されている。これらの感染経路のほかに病院内では人工呼吸器、加湿器ネブライザー、シャワー、水道水などの汚染による感染例もある。一般に水道水では老朽化した給水施設においては一部で水のたまりが生じ、塩素濃度が低下して感染源となる。

3. 検査方法

1) 検水の採取

- ・ 高圧蒸気滅菌したねじ栓付き容器（容量 500 ml）に採取する。
- ・ 検水は、冷却塔の受け皿の中央で、水の表層部から採取する。落下水の方が沈殿物の混入がなくて均一であるが、冷却塔の構造によっては落下水を採取できないものもある。
- ・ 採水時に検水の温度を現場で測定する。また同時に pH と電気伝導率を測定することが望ましい。
- ・ 検水容器には検水の種類、採取場所、採取年月日、採取時刻、採取者氏名を明記する。
- ・ 検水は保冷容器に入れて搬送し、出きるだけ速やかに検査を実施する。すぐに検査が行えない場合は凍結保存が望ましい。
- ・ 検査が円滑に行われるよう、採水および検水送付の日取りについて、あらかじめ検査施設と打ち合わせておく。

2) 検水の前処理

選択培地での培養前に、200 倍濃縮検水を酸処理または熱処理して 100 倍濃縮しておく。

酸処理：0.2M HCl 3.9 ml と 0.2M KCl 25ml を混合し 1M KOH で pH を 2.2 に合わせる。200 倍濃縮した検水 1 ml と酸処理用バッファー 1 ml とを混合して 25℃ に 20 分～40 分間置く。

熱処理：100 倍濃縮検水 1 ml を 50℃ の温水または加熱装置に 30 分～40 分間置く。この時、管壁に付着している一般細菌を処理するため、試験管の上部まで充分過熱されるように注意する。

3) 培養

- ・ 前処理した 100 倍濃縮検水 100 μ L 選択培地平板にコンラージ棒で塗布する。
- ・ 37℃ で 5～7 日間（10 日まで）培養する。培養期間が長いので、平板を密封できる容器に収納して乾燥を防ぐ。
- ・ 培養 2 日後までに出現した集落はレジオネラ属菌ではない。レジオネラ属菌の独立集落は培養 4～5 日目から出現しはじめ、6～7 日程で集落性状が判定できるまでに生育する。培養後早期からレジオネラ属菌によく似た集落が出現することがあるので、培養後の観察は毎日おこなう。
- ・ 灰白色、僅かに透明感があり湿潤した大小不同の集落で、特有の酸臭があればレジオネラ属菌を疑う。
- ・ 独立集落数個をそれぞれ BCYE α -Cys（または 5% 血液寒天）と BCYE- α 寒天平板に植継ぐと共にグラム染色を行なう。集落を植継ぐときは必ず L-システイン不含培地に先に接種し、BCYE- α 寒天は後にする。これは微量の BCYE- α 寒天が白金耳に着いて持ち込まれると、レジオネラ属菌が L-システイン不含培地でも発育し判定を誤らせるからである。
- ・ BCYE- α 寒天に発育して BCYE-Cys（または血液寒天）に発育しないグラム陰性桿菌についてさらに同定作業を進める。

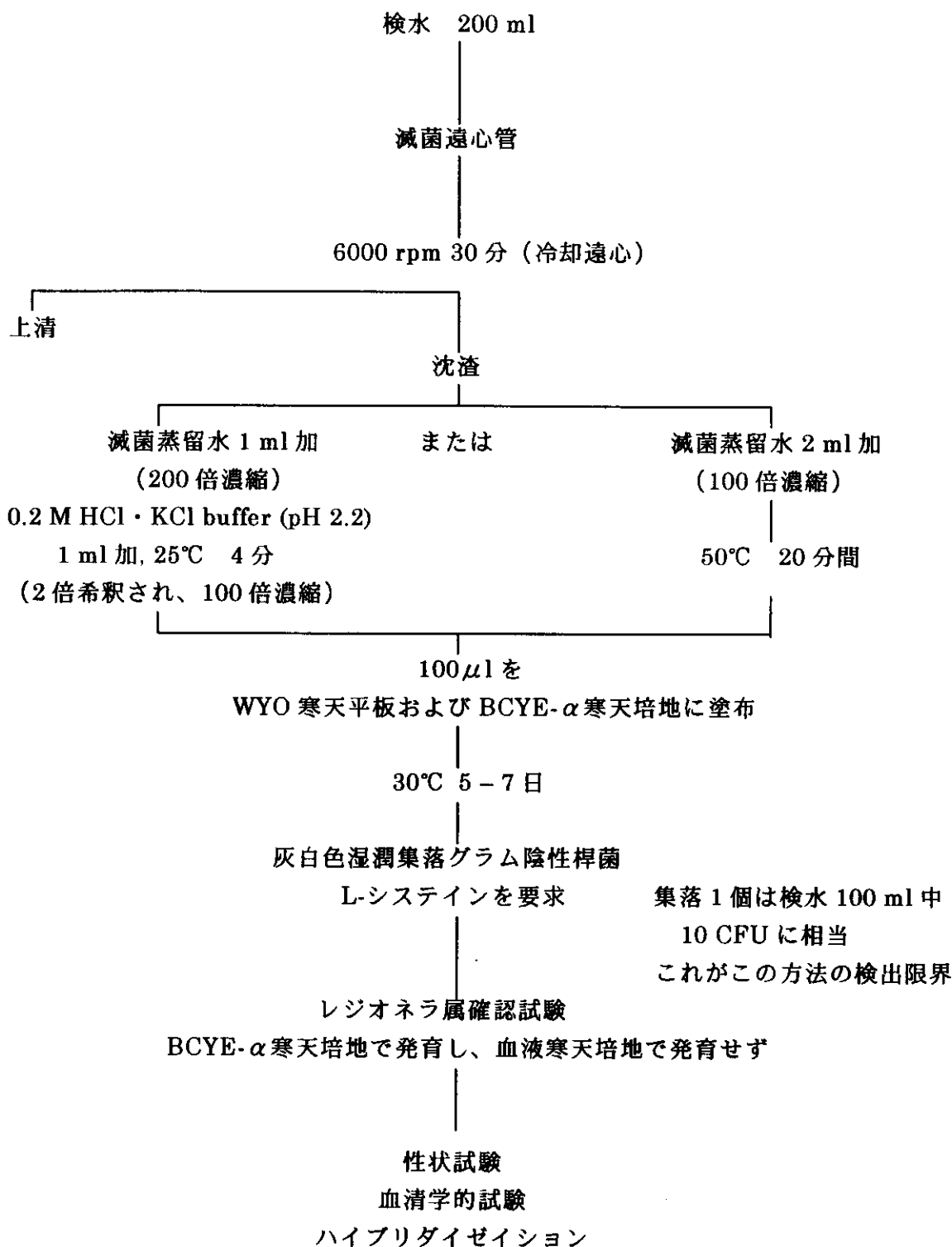


図 培養による環境水中レジオネラ属菌の検出法

4. 判定、鑑別、同定

100倍濃縮検水 100 μ l を平板培地に塗布しレジオネラ属菌の集落が1個出現したとき、もとの水 100 ml 当たりのレジオネラ属菌の生菌数は 10 CFU で、これがこの方法での検出限界である。このように、最初の検水量、濃縮度、接種液量を一定にしておけば検水の単位量当たりの菌数を算出できる。

これまでは菌種間の鑑別・同定に役立つ表現形質が少なかった。その中で自発蛍光の有無と種類および馬尿酸水解試験がやや鑑別に役立つ。即ち 7 菌種の集落は 365 nm の長波紫外線下で明るい青白色蛍光を発生し、2 菌種は暗赤色の蛍光を示す。馬尿酸水解試験が陽性であれば *L. pneumophila* と考える。

馬尿酸水解試験には馬尿酸ナトリウムを 1% になるよう滅菌蒸留水に溶かし、ねじ栓付き試験管に 0.4 ml ずつ分注し、 -20°C に保存する。ニンヒドリンを 3.5% になるようアセトン・ブタノール 1:1 に溶解し室温暗所におく。BCYE- α 寒天培地 24~96 時間培養菌 1 白金耳を融解した馬尿酸塩溶液に濃厚に接種し、ねじ栓を締めて 35°C に 18~20 時間置いた後、ニンヒドリン液 0.2 ml を加え再びねじ栓を締めてふらん器に戻し、10 分後に判定する。程度の差はあっても紫色が出ていれば陽性と判断する。

種の同定および *L. pneumophila* の血清群別 (SG1~6) のためのスライド凝集反应用抗血清 (デンカ生研) が市販されている。これらの抗血清を使って関節蛍光抗体染色を行なうこともできる。しかし、菌種間および SG 間に交差があり、入手可能な抗血清の種類も限られている。

5. 核酸を用いた同定法

表現形質での同定が困難なため、マイクロプレートを用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーション法のキットが市販され成果を挙げている。

迅速診断のために polymerase chain reaction (PCR) 法が試みられている。特性の異なる数種のプライマーが開発され一部は既に市販されている。

6. 尿中特異抗原の検出

レジオネラ属菌による肺炎患者では発病初期より尿中に特異抗原が排泄されることがわかっている。そこで、レジオネラ属菌を対象とした酵素抗体法 (ELISA) を用いたキットがある。また *L. pneumophila* SG 1 に対しては、イムノクロマトグラフィー法を用いた迅速キットもある。

7. 抗レジオネラ用空調水処理剤の効果検定法

レジオネラ属菌に対する水処理剤の有効性を確認するために、以下の方法を採用することが望ましい。

冷却塔での実地試験に先立って、試験管内での有効性を確認しなければならない。最初に被検菌の蒸留水懸濁液と被検薬剤の蒸留水溶液を用いた実験で有効性が認められたならば、次に実際の冷却塔に被検菌を懸濁し、冷却塔水で調製した被検薬剤の濃度系列で実験する。冷却塔水を用いた試験管内実験で、レジオネラ属菌との接触 24~48 時間で生菌を検出不能にした薬剤を対象にして冷却塔での実地試験を行なう。

1) 試験管内実験

1-1. 蒸留水を用いた実験

- ① *L. pneumophila* の参考菌株を BCYE- α 寒天培地で 35°C 3 日間培養したものを滅菌蒸留水に懸濁し、MacFarland No.1 の濁度（生菌数は約 10^8 CFU/ml）に合わせる。
- ② 蒸留水を使って被検薬剤の 10 倍希釈系列を作る。この時、予想される有効濃度を中心として少なくとも上下 2 段階ずつ調製する。
- ③ 菌懸濁液を薬剤液の 1/100 量加え、30°C に保温して 1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h 後に生菌数を算定する。薬液の代わりに蒸留水を用いたものを対照として菌数を測定する。

1-2. 冷却塔水を用いた実験

- ① レジオネラ属菌が生息していないことを確かめた冷却塔水を滅菌容器に採取する。すぐに使用しない時は、水中の菌相などが変化しないよう 5~10°C に保つ。
- ② 冷却塔水で *L. pneumophila* の懸濁液（MacFarland No.1）を調製する。冷却塔水が混濁していて菌の濃度を調整し難い時は滅菌蒸留水で菌液を作る。
- ③ 蒸留水試験の結果を勘案し、冷却塔水を用いて薬剤濃度を 3 段階に設定する（例えば 1 mg, 5 mg, 10 mg/l, または 10 mg, 50 mg, 100 mg/l）。
- ④ 薬液の 1/100 量の菌懸濁液を加え、30°C に保温して 6h, 24h, 72h および 168h まで集落算定により生菌数を測定する。

2) 冷却塔での実地試験

- ① 冷房開始直後の冷却塔で、冷却水中にレジオネラ属菌が生息しているものを選び、その生菌数を確認しておく。しかし、冷却塔の稼動開始直後にはレジオネラ属菌数が低く、検出不能のことが多いので、前年度にレジオネラ属菌の生息が確認されている冷却塔でも試験対象となる。
- ② 過酸化水素、グルタールアルデヒドまたはその他の消毒剤を併用して被検冷却塔を洗浄する。
- ③ 翌日採水してレジオネラ属菌が不検出であることを確認する。
- ④ 被検薬剤の所定量を持続的または定期的に循環水系に注入する。
- ⑤ 洗浄および薬注開始後、2 週間ごとに採水しレジオネラ属菌数の消長を調べる。
- ⑥ 菌数測定は冷房停止まで継続する。
- ⑦ 洗浄後の不検出状態または 10^2 CFU/100 ml 未満が維持されれば、その薬剤は有効と判定されるが、レジオネラ属菌数が回復するようであれば効果がないと判定する。

平成 12 年度 院内感染対策講習会
—臨床検査技師対象—

平成 12 年 10 月 26 日発行

発行責任者 平成 12 年度院内感染対策講習会
カリキュラム作成委員会

事務局 東邦大学医学部微生物学教室
東京都大田区大森西 5-21-16
電話 03 (3762) 4151

許可無く転載および複製はご遠慮下さい。

厚生省・(社)日本感染症学会

平成11年度院内感染対策講習会
薬剤師対象

記録集
(質疑応答を含む)

日時：平成11年9月9日(木)～10日(金)

場所：科学技術館サイエンスホール・東京

目 次

1. 病院感染に注意すべき微生物	1
東邦大学医療短大教授	辻 明良
2. 院内感染対策のシステム化	10
山形大学医学部附属病院副薬剤部長	白石 正
3. MRSA感染症と薬物投与設計	19
武庫川女子大学教授	松山 賢治
4. 血液媒介感染	31
NTT西日本東海病院外科部長	大久保 憲
5. 病院感染関係法令	42
厚生省医薬安全局安全対策課	福田 祐典
6. 消毒剤の使用上の留意点	48
山口大学医学部附属病院薬剤部主査	尾家 重治
7. 感染症と薬物療法	57
東北大学加齢研究所助教授	渡辺 彰
8. パネルディスカッション	68
司会 山形大学医学部附属病院教授・薬剤部長	仲川 義人
東北大学大学院病態制御講座分子診断学教授	賀来 満夫

平成11年度院内感染対策講習会日程

日 時: 平成11年9月9日(木) 9時50分～17時10分

10日(金) 9時30分～16時00分

場 所: 科学技術館サイエンスホール(東京都千代田区北の丸2-1) ☎03-3212-8448(主催者受付).

総合司会 仲川義人
賀来満夫

受付開始 9時20分

9:50	10:00	11:10	11:20	12:30	13:30	14:50	15:00	16:20	17:10
9月9日 (木)	開講式	病院感染に注意すべき微生物	休憩	院内感染対策のシステム化	昼食	MRSA感染症と薬物投与計画	休憩	血液媒介感染	病院感染関係法令
		東邦大学 医療短大教授 辻 明良		山形大学(医)病院 副薬剤部長 白石 正		武庫川女子大学教授 松山賢治		NTT東海総合病院外科部長 東京大学感染制御学講師 大久保 憲	厚生省

1hr 10'

1hr 10'

1hr 20'

1hr 20'

50'

受付開始 9時10分

9:30	11:00	11:10	12:30	13:30	15:50	16:00
9月10日 (金)	消毒剤の使用上の留意点	休憩	感染症と薬物療法	昼食	パネルディスカッション	閉講式
	山口大学(医)病院 薬剤部主査 尾家重治		東北大学 加齢研究所助教授 渡辺 彰		山形大学医学部附属病院 教授・薬剤部長 仲川義人 東北大学大学院病態制御講座分子診断学教授 賀来満夫	日本感染症学会 理事長

1hr 30'

1hr 20'

2hr 20'

病院感染に関連する注意すべき微生物

東邦大学医療短期大学

辻 明 良