

表 10 検体採取から検査まで

項目	地研実態調査での 一致/多い回答 (%)	新版レジ防止指針 (ISO 法ベース)	WG 推奨法
採水方法	容器入水、柄杓等使用	-	柄杓等使用が望ましい <sup>1)</sup>
採水量	約 1000mL (約 61)	500mL?	1000mL <sup>2)</sup>
容器への採取量	-	満杯にせず上部に空間を残す	満杯にせず上部に空間を残す
採水容器の材質	ポリプロピレン (約 85)	ガラス製またはポリエチレン製など	滅菌済み容器 <sup>3)</sup>
チオ硫酸ナトリウム添加	行っている (92)	行う	行う
搬送温度	冷蔵 (68)	6 ~ 18	6 ~ 18 <sup>4)</sup>
検査開始まで	決めている・ ある程度決めている (約 45)	採取後 2 ~ 5 日以内 が望ましい。濃縮検 体の保存は 14 日を 超えてはならない。	採取後 2 ~ 5 日以内 が望ましいとされてい るが、可能な限り速や かに行う。濃縮検体 の保存は 14 日を 超えてはならない。
搬入後保存温度	冷蔵 (10 未満) (約 91)	6 ± 2 が望ましい	6 ± 2 が望ましい
非濃縮検体での検査	21/75 施設 (28%)	行う	行う <sup>5)</sup>
安全キャビネット	利用 49%、未利用 51%	必要	必要

- 1) 容器入水の場合、容器表面にレジオネラ属菌の付着が考えられ、場合によっては検査室内での相互汚染が懸念されるため、状況により、搬入後、容器周辺を消毒してから検査を行う。
- 2) 予備の検水確保のため、ろ過濃縮を推奨するため、基本ろ過量の倍量である 1000mL とした。もし遠心濃縮を行う場合は、基本遠心量の倍量を確保すること。
- 3) ポリプロピレンやポリエチレン製またはガラス製など。
- 4) 宅配便等の冷蔵システム利用の場合はそれに従う。検査室への速やかな搬入が可能な場合は常温も可。
- 5) 採取された検体の菌数を予測できないので、非濃縮検体と濃縮検体を並行して検査する  
( (財)ビル管理教育センター：<付録>1 環境水のレジオネラ属菌検査方法、新版レジオネラ症防止指針,91,1999)  
森本 洋ほか：レジオネラ選択分離生培地の比較検討,北海道衛研所報,58,51-54,2008(厚労科研費「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」データより)  
森本 洋ほか：浴槽水中のレジオネラ属菌検査における非濃縮検体の重要性,北海道衛研所報,61,21-23,2011(厚労科研費「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」データより)  
ただし、清掃消毒直後の検体等、レジオネラ属菌数が少ないと推定される場合においては、濃縮検体のみでの検査対応も可とする。

表 11 ろ過濃縮法

項目	一致/多い回答 (%)	新版レジ防止指針	WG 推奨法
検水量	500mL (約 73)	500mL	500mL
フィルター材質	ポリカーボネート (約 61)	-	ポリカーボネートタイプ <sup>6)</sup>
フィルターメーカー	アドバンテック (約 55)	-	適宜
フィルター表裏統一	している (約 67)	-	する <sup>7)</sup>
ポアサイズ	0.20 μm (約 41、0.22 μm を含めると約 59)	0.22 μm または 0.45 μm (本文 p.89) <sup>8)</sup> 0.22 μm (図 18(1))	0.20 μm または 0.22 μm <sup>9)</sup>
フォルダー材質	ガラス (約 45)	-	適宜
ろ過後のフォルダー洗浄	行っていない (約 59)	-	適宜
フィルター洗い出し用の液	滅菌蒸留水 (約 77)	滅菌蒸留水	滅菌蒸留水
フィルター洗い出し方法	ボルテックス (約 67)	ボルテックス	ボルテックス
洗い出し時間	1 分間 (約 59)	1 分間 (ISO:2 分以内)	1 分間

6) ろ過後の水の検査ではなく、フィルターに捕集されたレジオネラ属菌を回収することを目的としている。ポリカーボネートタイプフィルターは、均一な表示径の円筒状孔を持ち、その孔径分布が一定のため、サイズによる正確な分離が可能となる。他の材質のフィルターでは、膜の内部に菌が入り込んで回収されにくくなる場合がある。

一般的な検査室では、オートクレーブ滅菌可能な製品が使用しやすい。

7) 包装製品のラベル側を捕集面にする。(光沢度が高い側)。

ポリカーボネートタイプフィルターは、その構造上表裏対象面となっているが、製法として電子銃で撃ち抜き後片面をアルカリ処理することで作製されている。そのためアルカリ処理面の平滑性が若干低下している可能性がある。なお、セルロースアセテートやセルロース混合エステルタイプの表面が指定されている製品でも、包装製品のラベル側が表面となっている。

また、ミリポア HP には以下の Q&A が記載されている。

Q.メンブレンフィルターを使用する場合、光った面とそうでない面のどちらを表にすればよいのでしょうか？

A.フィルターは、ほんの少し異方性があり、光っている面の方が“細かく”なっています。特殊な応用例においては方向性を選んだ方が良い場合があります。

8) 参考: フィルター貼付法では 0.45 μm

9) ポリカーボネートタイプフィルターの対応孔径を記載した(メーカーにより異なる)。

新版レジオネラ症防止指針には、レジオネラ属菌体サイズを 0.3 ~ 0.9 × 2 ~ 20 μm と記載されている。レジオネラ属菌がフィルターを縦に通過しようとした場合、状況によっては 0.40 や 0.45 μm のポアサイズであればトラップされず、そのまま通過してしまう可能性がある。

ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 では孔径 0.2 μm と規定されている。

表 12 冷却遠心濃縮法<sup>10)</sup>

項目	一致/多い回答 (%)	新版レジ防止指針	WG 推奨法
検水量	200mL (約 79)	100mL または 200mL (本文 p.88) 200mL (図 18(1))	100mL または 200mL <sup>11)</sup>
遠心加速度(g)と 遠心時間(分)	6000g 以上(約 67) 30 分(約 85)	遠心加速度の記載無 し。 30 分	遠心加速度(g) <sup>12)</sup> = 1118 × 回転半径(cm) × 回転速度 <sup>2</sup> (rpm) × 10 <sup>-8</sup> 6000g 10 分 又は 3000g 30 分 <sup>13)</sup>
冷却設定温度	0 ~ 10 未満(約 52)	15 ~ 25	15 ~ 25
上清の除去	デカンテーション(約 70) 全量捨てる(約 79)	上清除去の記載無し 全量捨てる	滅菌ピペットで慎重に 除去し 100 倍希釈の 液量を残す <sup>14)</sup>
沈渣の懸濁溶液	滅菌蒸留水(約 78)	滅菌蒸留水	遠心上清

10) ろ過濃縮を推奨する(森本 洋ほか:濃縮法の違いによる温泉水中のレジオネラ属菌検出結果の比較.北海道衛研所報,59,73-74,2009(厚労科研費「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」データより))が、ろ過濃縮が困難(検体の質、検査設備等)な場合に行う。またその手順は、ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 に従う。

11) ろ過濃縮では 500mL を濃縮することから、可能な限り 500mL に近い検水量が望ましい。

12) 本来遠心加速度の統一が必要であって、回転数を統一しても使用機種により遠心加速度は異なる。遠心加速度が設定できない場合は、機種ごとに計算する必要がある。

13) ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 による。

14) 沈渣は大変浮遊しやすく、上清のデカンテーションによる除去や全量除去では、実験ロスにより回収率に大きく影響する場合は考えられる(森本 洋ほか:濃縮法の違いによる温泉水中のレジオネラ属菌検出結果の比較.北海道衛研所報,59,73-74,2009(厚労科研費「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」データより))。これらの実験ロスによる影響を防止するために、その手順は、ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 に従う。

表 13 前処理

項目	一致/多い回答 (%)	新版レジ防止指針	WG 推奨法
濃縮倍率	100 倍 (約 73)	100 倍	100 倍
前処理の種類	酸処理単独 (約 47) 加熱処理単独 (12) その他 (複数処理: 約 41)	未処理、熱処理、 酸処理すべて行う (本 文 p.91) 酸処理または熱処理 (図 18(1)) 酸処理、熱処理 (図 18(2))	未処理、熱処理、 酸処理すべて行う <sup>15)</sup>
酸処理液の種類	0.2MHCl・KCl 液 pH2.2(100)	0.2M HCl・KCl 液 pH2.2 ± 0.2(本文 p.91) 0.2M HCl・KCl 液 pH2.2(図 18(1~3))	0.2M HCl・KCl 液 pH2.2 ± 0.2
酸処理液	自家製 (約 53)	-	適宜 <sup>16)</sup>
酸処理時間	4 分 (約 39)	5 ~ 20 分 (本文 p.91) 4 分 (図 18(1,2)) 20 分 (本文 p.89, 図 18(3)) <sup>17)</sup>	4 分 <sup>18)</sup>
酸処理温度	室温 (約 87)	25 (実際には室温) (5 ± 0.5 : ISO)	25 (実際には室温)
加熱温度	50 (100)	50 ± 1 (本文 p.91) 50 (図 18(1,2))	50 ± 1
加熱時間	20 分 (約 59)	30 ± 2 分間(本文 p.91) 20 分 (図 18(1,2))	20 分 <sup>19)</sup>

15) 検水中のレジオネラ属菌及び雑菌は、各前処理と使用選択分離培地の種類との組合せにより出現数や種類が異なるため(森本 洋ほか:レジオネラ選択分離生培地の比較検討,北海道衛研所報,58,51-54,2008(厚生労働省「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」データより))。

16) 自家製を使用する場合は調製に十分注意し、品質確保に努めること。

17) 参考:フィルター貼付法の場合酸処理時間 20 分。

18) 平成 18 年度 ~ 24 年度までのレジオネラ属菌に関する厚生労働科学研究において、4 分間の酸処理時間で検出率に大きな影響を与えている結果が得られていないため、図 18(1,2)の 4 分を採用。

19) 平成 18 年度 ~ 24 年度までのレジオネラ属菌に関する厚生労働科学研究において、20 分の加熱時間で検出率に大きな影響を与えている結果が得られていないため、図 18(1,2)の 20 分を採用。

表 14 培養 - 1

項目	一致/多い回答 (%)	新版レジ防止指針	WG 推奨法
分離培地の種類等	その他(複数種類: 約 43)	指定しない(本文 p.86) ISO:GVPC 推奨(本 文 p.91) WYO またはその他 の選択培地(図 18(1 ~3))	GVPC、WYO、 MWY 等の適切な分 離培地を使用するこ と。また、成分表に準 じて培地を独自に作 製した場合は、十分 な分離性能の検証 (雑菌の抑制を含む) と検証データを保管 すること <sup>20)</sup>
接種	濃縮検体と濃縮後希釈 検体(60)	濃縮検体と非濃縮検 体	濃縮検体と非濃縮検 体
検体塗布方法	設問が無く回答無し	記載無し	コンラージ棒の力加 減において、ソフトタ ッチを意識すること <sup>21)</sup>
非、濃、濃縮後希釈検体 の同時接種について	同時に接種(約 77)	非濃縮検体と濃縮検 体を同時接種	非濃縮検体と濃縮検 体を同時接種
非濃縮、濃縮検体の保存	保存している(約 90)	濃縮検体の保存は 14 日を超えてはならな い	14 日間まで保存(再 検査には注意が必要)
保存温度	冷蔵(約 98)	6±2	6±2
接種量	100 μL(約 76)	前処理検体 50 μL または 100 μL	100 μL(未・熱処理) 200 μL(酸処理) <sup>22)</sup>
培地枚数	1 検体につき 2~5 枚 (約 63)	1 検体につき 6 枚	1 検体につき 6 枚
培養設定温度	37 (約 41)	36±1 (本文 p.91) 37 (図 18(1~3))	36±1
炭酸ガス培養	行っていない(約 99)	BCYE 使用の時、 不必要	適宜

20) 分離培地の種類により検出への影響は考えられるが、前処理にバリエーションを持たせること  
である程度の改善が認められると思われる(森本 洋ほか:レジオネラ選択分離生培地の比較  
検討,北海道衛研所報,58,51-54,2008(厚労科研費「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に  
係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」データより))

また、市販生培地や市販基礎培地に市販サプリメントを定法通り添加した培地の使用が一般的  
であるが、成分表に準じて培地を作製する場合には調製に十分注意し、品質確保に努める必  
要がある。新版レジ防止指針には市販品と同性能のものが得られるかどうかの問題であると記  
載されている。

21) コンラージ棒の力加減が発育集落数に影響する可能性が示唆されたため(平成 24 年度厚労  
科研費「公衆浴場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」  
データより)。

22) 酸処理試料を分離培地 1 枚で対応

表 15 培養 - 2

項目	一致/多い回答 (%)	新版レジ防止指針	WG 推奨法
培養日数	7日間(約 64)	10日間(本文 p.91) 5-7日間(図 18(1~3))	7日間 <sup>23)</sup>
集落観察(推定特徴)	灰白色湿潤集落(68)	レジオネラ属菌と思われる集落(本文 p.92) 灰白色湿潤集落で特有の淡い酸臭あり(図 18(1~3))	斜光法: 発育集落に斜光を当て実体顕微鏡でモザイク・カットグラス様集落の確認と測定 <sup>24)</sup>
集落観察(培養日数)	その他(56)	培養5日目にカウント	培養3日目~ <sup>25)</sup>
分離培地の観察	毎日(52)	少なくとも2~4日の間隔で3回観察。	適宜 <sup>26)</sup>
総釣菌数(1検体当たり)	1~10個(56)	平板上の出現集落が10個以下の場合全てそれ以上の場合、平板1枚当たり10個まで釣菌	平板上の出現集落が10個以下の場合全てそれ以上の場合、平板1枚当たり10個まで釣菌
自発蛍光検査	行っていない(約 71)	菌種同定の一環	行うことが望ましい <sup>27)</sup>
釣菌日	その他(約 89)	培養5日目?	適宜 <sup>28)</sup>
L-システインの要求性	行っている(約 97)	行う	必須 <sup>29)</sup>
菌数測定		レジオネラ様菌集落を測定後、釣菌後確認により、最初の菌数算定値を修正する。	各分離培地に対し斜光法による菌数測定後、釣菌後確認で調整し、各分離培地中の最大値数を報告する <sup>30)</sup>
グラム染色	行っていない(約 51)	行う	適宜 <sup>31)</sup>
馬尿酸水解試験	行っていない(約 72)	菌種同定の一環	適宜 <sup>32)</sup>
抗血清によるスライド凝集	行っている(約 97)	菌種同定の一環	適宜 <sup>33)</sup>
DDH	行っている(52)	菌種同定の一環	適宜 <sup>34)</sup>

- 23) 通常、培養3~5日で確認される集落が多い。また、発育が遅いタイプに対しても、培養日数にかかわらず斜光法で発育初期に確認できる可能性が高いことから、7日間を採用。
- 24) レジオネラ属菌とその他の菌を効率良く分別、釣菌することができ、菌数測定も簡便に極めて正確に行うことができる。なお、集落出現後、3日目以降は、培養時間の経過とともに本特徴の確認が困難になる場合があるので注意すること(森本 洋:分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性,日本環境感染学会誌 25(1),8-14,2010(厚労科研費「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」データより))。
- 25) 斜光法により培養30~35時間でレジオネラ様集落が確認できることもあるが、培養3日目が確認しやすい。
- 26) 発育が遅いレジオネラ属菌もあるので、培養3日目以降斜光法で毎日観察すると見落としが減少する。
- 27) 分離平板上の集落に対し本検査を行うことで自発蛍光を有する菌種群選定に役立つ。  
また本タイプのみが発育していた場合の見落としが減少する。
- 28) レジオネラ属菌集落の発育に応じて釣菌(培養3日目以降斜光法による確認後適宜)。
- 29) 斜光法で特徴的な集落が確認され、L-システインの要求性を有していたものをレジオネラ属菌とする。
- 30) 分離平板ごとに条件が異なるため、最も多く確認された分離平板からの測定値を報告する。  
ISO 11731:1998(E)では、レジオネラ集落数(CFU)の推定は3枚(未・熱・酸処理)の平板(非濃縮を行った場合は6枚)から集落を同定した最大値数とする、としている。

31)~34) 必要に応じ

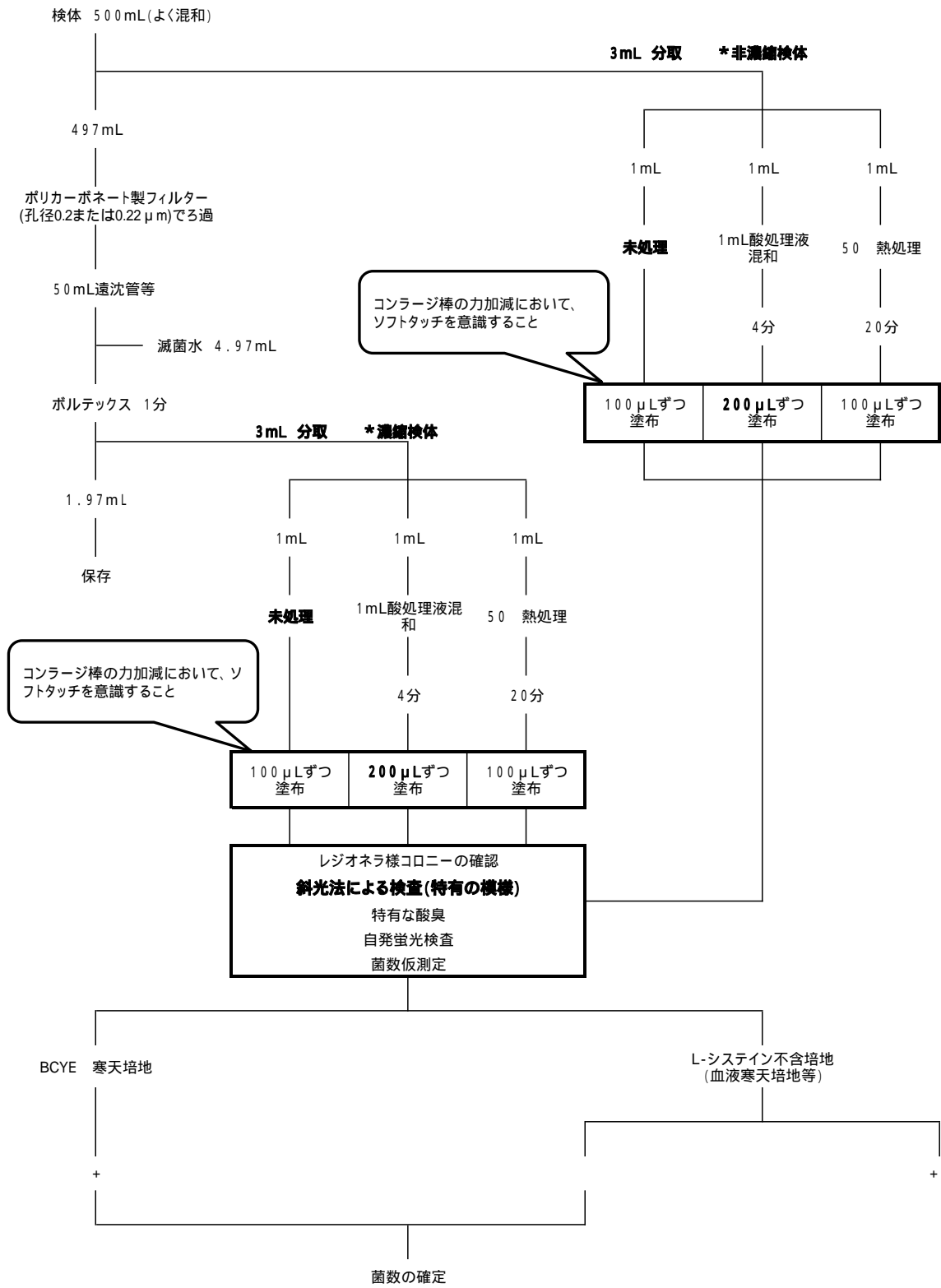


図2 WG推奨法フローチャート