

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
 平成 30 (2018) 年度分担研究報告書

レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

研究分担者	○森本 洋	北海道立衛生研究所	
	磯部 順子	富山県衛生研究所	
	黒木 俊郎	岡山理科大学	
	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	
	中西 典子	神戸市環境保健研究所	
	研究協力者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
		緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター
		小川 恵子	北海道立衛生研究所
		金谷 潤一	富山県衛生研究所
倉 文明		国立感染症研究所	
田中 忍		神戸市環境保健研究所	
千田 恭子		仙台市衛生研究所	
平塚 貴大		広島県立総合技術研究所	
三津橋和也		北海道立衛生研究所	
武藤千恵子		東京都健康安全研究センター	
研究代表者	山口 友美	宮城県保健環境センター	
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所	
	前川 純子	国立感染症研究所	

研究要旨

レジオネラ属菌検査法の標準化を目的とし、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの3点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下、WG)内で検討を行った。

外部精度管理はWGサポートのもと、平成27年度以降、実施母体を日水製薬株式会社とし、平成30年度は公的、民間を問わず全国148の検査機関(延べ151試料配付)に対し行われた。配付試料については、信頼性においてメーカーにより品質と多施設への発送が保証されることから、バイオメリュ社(BioBall(特注品))を使用した。検査法については、配付試料がより安定した性能を維持できる範囲内で、検査工程のどの部分に重きを置くかの定義付けを行い、一部指定した。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所等70機関については、WGにおいても独自に集計・解析を実施し、過去3年間の結果とも比較した。今年度の濃縮検査結果については、回収

率で判定した。4年連続参加した機関は52機関あった。解析の結果、これまで同様特定のいくつかの機関に検査手技の再確認が必要と判定される傾向が認められた。以上のことから、本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことができる方法であり、今後さらに調査システムの検討を重ね、継続的かつ安定した外部精度管理調査ができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要と思われた。標準的検査法については、これまでWGが推奨している方法と改訂されたISO法との調整を行い、「公衆浴場における衛生等管理要領」内の推奨検査法「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」として提示した。

A. 研究目的

レジオネラ属菌検査法の標準化を目的とし、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの3点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下、WG)内で検討を行った。

B. 研究方法

1)精度管理

外部精度管理の実施

<実施概要>

平成27年度以降、実施母体を日水製薬株式会社(以下、日水製薬)とし、公的、民間を問わず全国の検査機関に案内を発信し外部精度管理が実施された。

まず平成30年7月下旬に日水製薬より「参加募集案内文、参加要件、指定法」(別紙参照)が示され参加募集が行われ、9月20日(木)に締め切られた。その後、10月15日(月)に試料、試料送付案内、試験概要、結果記入メモ及び試料受領書兼承諾書(別紙参照)が参加者に向け発送された。回答期限は11月16日(金)17時に指定された。解析結果は、平成31年1月31日(木)より、検査実施者が専用ホームページから個別のIDとパスワード(以下PW)によりログインし閲覧可能となることが案内で示

された。

<参加機関>

全国148の検査機関(延べ151試料配付)に対し実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所等70機関が参加した。

<配付試料>

信頼性においてメーカーにより品質と多施設への発送が保証されることから、例年通りビオメリュー社のBioBall(特注品)を使用した。

<検査法>

配付試料がより安定した性能を維持できる範囲内で、検査工程のどの部分に重きを置くかの定義付けを行い、一部指定した(別紙サーベイ指定法参照)。

<結果集計と解析>

全参加機関に対する集計・解析は日水製薬が実施した。地方衛生研究所等70機関については、WGにおいても独自に集計・解析を実施し、過去3年間の結果とも比較した。なお報告値について、WGでは平成25年度から実施している研究報告と同じ換算値として集計することとした¹⁻⁴⁾。また、各機関の最終菌数は、コロニー数の平均値に換算のための定数(非濃縮検体①は×100、非濃縮検体②は×1000)を乗じたのち、小数第一位を四捨五入した数値を表示した。

本調査での非濃縮検体の目標良好範囲は、以下のように設定した。メーカー保証による95%信頼区間（下限値 18802.8cfu/Ball、上限値 27668.3 cfu/Ball）をレジオネラ属菌検査で使用される、検体 100ml 中の cfu (colony forming unit) に換算すると、下限値 3760.56、上限値 5533.66 cfu/100ml となる。例えば、非濃縮検体においては、分離平板上の1集落を1000cfu/100ml と換算することから、結果は1000cfu の整数倍となる。このことを勘案し、前述の100ml 中の cfu を下限値については100の位を切り捨て、上限値については切り上げ3000 ~ 6000cfu/100ml と補正した。さらにこの範囲に対し、国内における食品衛生外部精度管理で実績のある一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が統計処理で行っている「Xbar 管理図における管理線を理化学調査では添加量の70%および120%、微生物学調査では全体の平均値の30%および300%」という考え方を参考に、本外部精度管理では、「メーカー保証されている菌数をベースに補正した範囲に対し、その下限値の30%および上限値の300%」という考え方を導入することとした。その結果、本外部精度管理においては、目標良好範囲を900~18000cfu/100ml として設定することとした。

本年度から、濃縮検体については、回収率により判定を行った。目標とした回収率は、一昨年度の外部精度管理で報告を求めたすべての検体（非濃縮①、②、濃縮）において目標良好範囲を報告し、かつ非濃縮の菌数が濃縮の菌数以上を報告した機関のうち、80%以上の機関がクリアしていた20%を下限とし、上限を100%未満とした。この回収率については、昨年度参考値として解析した判定値と同じであり、評価基準として妥当と判断した。

日水製薬で行った全国の結果集計・解析は、平成31年1月31日（木）、検査実施者が専用ホームページから個別のIDとPWによりログインし、解析結果をダウンロードすることが可能となった。

2) 標準的検査法および研修システム

これまでWGが推奨している方法^{1, 5)}と平成29年5月に改訂されたISO法との調整を行った。一部の検査工程（ろ過濃縮におけるろ過フィルターの洗浄時間）について、改訂ISO法との比較が必要であったことから、外部精度管理用の配付試料であるBioBallを利用して検証を行った。検証方法を以下に示す。滅菌生理食塩水1LにBioBall 2個を入れ、十分混和後、外部精度管理の手法に従い非濃縮②による菌数を測定した。均質化された試料各500mLをポリカーボネート製フィルターで同時にろ過後、それぞれのろ過フィルターをボルテックス1分、2分により洗浄し菌数測定を行い、回収率の比較を行った。これらの比較を10試料について行った。培地はOXOIDのアガーベースとサプリメントにより調製したBCYE α 培地を使用した。本検証後、「公衆浴場における衛生等管理要領」内の推奨検査法「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」についてWG内で検討した。なお、本検査方法は、公衆浴場施設が日常の衛生管理を確認するために必要な基本となる検査法を提示するものであり、レジオネラ症患者発生時の感染源調査での検査においては、これに縛られるものではない。外部精度管理に参加した施設を対象に日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナー（別紙参照）において、適切な検査法の普及に努めた。研修システムについては、WG内でこれまでの課題につい

て改めて検討した。

C. 研究結果及び考察

1) 精度管理

WG が集計した地方衛生研究所等 70 機関の報告菌数を表 1 に示した。非濃縮検体において目標良好範囲を報告した機関は、非濃縮検体①、②ともに回答のあった 70 機関中 68 機関(約 97%)であった。平均値、中央値においては、若干非濃縮検体②で低い値だったが、有意な差は認められなかった。一方、濃縮検体では、これまで同様非濃縮検体と比べ報告菌数の減少が認められた。ろ過濃縮では、回収率算出の分母となる非濃縮検体②の結果と比較すると、報告菌数が平均値、中央値ともに約 63%低い報告値となっていた。またレジオネラ属菌を検出できなかった機関も 1 機関あった。遠心濃縮では、実施機関が少なかったが、非濃縮検体②の結果と比較すると、報告菌数が平均値では約 60%、中央値では 49%低い報告値となっていた。参考値として報告を求めた選択分離培地による結果では、検査を実施した 68 機関中 63 機関(約 93%)が目標良好範囲を報告していた。しかしながら、非選択分離培地である BCYE α 培地の結果と比較すると、報告菌数が平均値、中央値ともに約 14%低い報告値となっていた。減少率には違いがあるが、毎年同様の傾向が認められ、選択分離培地による供試菌に対する発育抑制があったと考えられた。このことは、過去にも WG で報告している^{1, 5-7)}。

表 2 に回収率を示した。日水製薬による外部精度管理では、非濃縮検体②が 100 倍濃縮のスタート検体だったことから、非濃縮②の結果を分母として回収率を算出し判定の基準

としたが、本報告では、参考値として非濃縮①を分母とした場合も算出した。目標回収率 20%以上 100%未満をクリアしたのは、非濃縮②を分母とした場合、70 機関中 52 機関(約 74%:昨年度 非回答及び非濃縮②で非検出だった計 4 機関を除く 67 機関中 37 機関 約 55%)であった。非濃縮①を分母とした場合、70 機関中 55 機関(約 79%:昨年度 非回答だった 1 機関を除く 70 機関中 45 機関 約 64%)であった。また、どちらの試料を分母にしても目標回収率をクリアしていたのは、70 機関中 51 機関(約 73%:昨年度 非回答及び非濃縮②で非検出だった計 4 機関を除く 67 機関中 34 機関 約 51 %)であった。本年度の回収率は、前述のどの分母を基準にしても昨年度を大きく上回る結果が報告されていた。WG では、これまでも試料を濃縮した際のレジオネラ属菌の効率的な回収について報告してきたところである^{1, 5)}が、本年度の結果から、各検査機関での濃縮検査に対する意識が高まってきている結果と思われる。一方で、この回収率については検査機関ごとで差がある、あるいは同一の検査機関であっても安定しない場合がある、など今後も検討が必要な事項である。その不安定となる要因は、各検査機関で異なると考えられ、内部精度管理により自施設の実態把握に努めることが肝要である。今回目標として設定した回収率 20%は、数値だけでみると低い回収率に思われるが、レジオネラ属菌の検査においては、前述のとおり各項目において 2~3 割の機関がクリアできていない数値であること、また計算上では 50CFU/100mL のレジオネラ属菌数の試料まで定性的に確認できる数値であることから、目標としては適当な回収率であると思われる。引き続き WG 内でも回収率の向上と安定に向け検討したいと考える。

表3に平成27～30年度の結果判定一覧を示した。ここでは、過去4年間の比較をしやすくするために、昨年度までの報告菌数から見た判定による結果も記載した。参加機関は、平成27年度67機関、平成28、29年度71機関、平成30年度70機関、4年連続で参加した機関は55機関であった。回収率による判定では、今年度目標良好範囲外を報告したのは18機関あった。このうち14機関は参考的に回収率による判定を取り入れた昨年度も参加していたが、うち9機関は2年連続で良好範囲外を報告していた。一方、昨年度までの報告菌数から見た判定を当てはめた場合、目標良好範囲外の結果を報告したのは28機関あり、うち4年連続が2機関、3年連続が2機関、2年連続が7機関、同様の結果を報告していた。これらの機関を含め4回の外部精度管理中複数回目標良好範囲外を報告していたのは28機関あった。総合的に見ると、検査結果が安定する方向に向かっている機関もあるが、特定のいくつかの機関については、特に検査手技の再確認が必要と思われる。外部精度管理の結果は、検査機関の良し悪しを判断するためのものではなく、その時の結果を次に生かすためのものである。目標良好範囲を報告した機関は、安定した検査環境を継続すること、目標良好範囲外の結果を報告した機関は検査法の再確認を行うこと、それぞれの立場に立った認識と対応が必要である。特に複数年連続して目標良好範囲外の結果を報告している機関は、改めて検査手技を再確認する必要があると思われる。

以上のことから、本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ手技の検証を促すことができる方法であることが確認された。

ここまでの結果を解析した結果、以下の項目に該当する検査機関は、報告状況に応じた検査手技を再確認する必要があると思われる。

- ・非濃縮試料①で目標良好範囲外を報告。
- ・非濃縮試料②で目標良好範囲外を報告。
- ・ろ過濃縮(回収率)で目標良好範囲外を報告(特にレジオネラ属菌非検出だった機関)。
- ・遠心濃縮(回収率)で目標良好範囲外を報告。
- ・非濃縮及び濃縮試料(回収率)で目標良好範囲外を報告。
- ・2年連続濃縮試料(回収率)で目標良好範囲外を報告。
- ・回収率の良し悪しにかかわらず、複数年連続で濃縮試料(報告菌数)が、目標良好範囲外を報告。
- ・本年度濃縮試料(報告菌数)で目標良好範囲外を報告し、4回の外部精度管理中複数回目標良好範囲外を報告。
- ・非濃縮①と②で報告菌数が大きく異なっていた。

これまでも報告してきたが、レジオネラ属菌検査においては、コンラージや濃縮時のいくつかの検査工程等が結果へ影響し、菌数減少の原因となるので丁寧な検査対応が必要である。また複数年連続で良好範囲外の結果を報告していた機関は、試料の混ぜ方、培地の状態、5枚の培地への各接種量が安定していたか、コンラージの力加減、濃縮操作等、改めて検査工程を見直し検証する必要があると思われる。

2) 標準的検査法および研修システム

改訂ISO法では、ろ過攪拌時間を少なくとも2分としているが、WG推奨法では、これまで新

版レジオネラ症防止指針に従い1分としてきた。今回ポリカーボネート製フィルターを対象に洗浄時間を1分及び2分で比較した。結果を表4に示した。洗浄時間1分の平均値と洗浄時間2分の平均値の差の有意性を確かめるために、有意水準5%で両側検定の t 検定を行ったところ、 $t(9)=0.95$ 、 $p=0.37$ ($p>0.05$)であり、洗浄時間の違いによる平均値の差に有意差は見られなかった。そのため、WGでは、ポリカーボネート製フィルターを使用した場合、その洗浄時間を1分間とした。この結果を考慮したWG推奨法と平成29年5月に改訂されたISO 11731で示された方法との調整を改めて行い、公衆浴場の水質基準を担保するため、国から自治体に技術的助言として示すための検査法として「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示した。本報告書では、検査法作成過程についても示す意義があると考え、本法の叩き台となった検査法案と、それをもとにWG内で検討した検査法最終提示案を収載することとした。

研修については、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修 新興再興感染症技術研修」内で、WG推奨法に沿った実習を伴ったレジオネラ検査研修会を行った。本研修会は、平成26、28年度に続いて3度目であった。対象は、地方衛生研究所等の公的機関である。内容的には、充実したものであったが、その反面、準備、調整には大きな労力と時間を要した。一方、座学による研修会として、日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナーに4年連続参加し、WG推奨法の普及に努めた。しかしながら、座学のみであることから、毎年実習を伴った研修会についての要望を耳にしている。これまでも、公的、民間等対象となる検査機

関を区別することなく、実習を伴った研修会を開催するための検討がWG内でなされているが、主催者、場所、条件、予算、講師の養成等クリアすべき課題が多く、目立った進展が見られていない。このことについては、本研究班において解決策を見出すのは困難と思われ、研究班内外からの幅広い意見を求め方策を検討していかなければならないと考える。

D. 結論

1) 精度管理

平成27年度以降、外部精度管理調査実施主体を民間会社とし、官民間わず幅広い調査を試みた。これにより、感染症法の検査対象となる病原体を用いた、全国規模での外部精度管理調査(積極的疫学調査における環境調査)の一モデルを示すことができたと思われる。また4年連続して参加した検査機関のデータ解析から、本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことができる方法であることが確認された。このことから、今後さらに調査システムの検討を重ね、継続的かつ安定した外部精度管理調査ができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要と思われる。

内部精度管理については、2)に記載する。

2) 標準的検査法および研修システム

公衆浴場の水質を担保するため、国から自治体に技術的助言として示すための検査法として「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示した。なお、本検査方法は、公衆浴場施設が日常の衛生管理を確認するために必要な基本となる検査法を提示するものであり、レジオネラ症患者発生時の感染

源調査での検査においては、これに縛られるものではない。今後は、本検査法を適切に全国へ普及・周知させるとともに、本法に沿った内部精度管理が各検査機関で実施できるよう、その対応方法を検討する必要がある。

研修会については、実施母体、講師養成、経費等を含めクリアすべき課題が多く、本研究班において解決策を見出すのは困難と思われ、研究班内外からの幅広い意見を求め方策を検討していかなければならないと考える。

E. 参考文献

- 1) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み: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)「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」平成 25 年度総括・分担研究報告書 pp.105-132.
- 2) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み: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)「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」平成 26 年度総括・分担研究報告書 pp.77-101.
- 3) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み: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)「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」平成 27 年度総括・分担研究報告書 pp.71-95.
- 4) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み: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」平成 28 年度総括・分担研究報告書 pp.85-104.

5) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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」平成 24 年度総括・分担研究報告書 pp.93-130.

6) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討-レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループの発足及び地方衛生研究所を対象としたレジオネラ属菌検査法アンケート調査結果-,外部精度管理試料安定化に向けた取り組み-: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」平成 22 年度総括・分担研究報告書 pp.101-161.

7) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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」平成 23 年度総括・分担研究報告書 pp.113-134.

F. 研究発表

研修会

- 1) 森本 洋:レジオネラ培養法概論ほか、平成 30 年度 短期研修 新興再興感染症技術研修、2018 年 10 月、東京

2) 森本 洋:レジオネラ属菌培養検査について、2018 年度レジオネラ属菌検査セミナー、2019 年 3 月、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 全参加機関報告菌数 cfu/100ml

施設No.	非濃縮①	非濃縮①*	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮	施設No.	非濃縮①	非濃縮①*	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮
1	6660	5860	6200	3346		41	3640	3200	3400	784	
2	2940	2200	2200	1126		42	3160		4000	1194	
3	3320	2000	1400	1114		43	3040	3200	2400	840	
4	3080	2500	3600	0		44	3840	3375	2800	1762	
5	760	933	400		570	45	3160	3600	3000	1740	
6	2240	1525	2600	120		46	4720	3600	2800	1344	
7	4700	4900	6000	440		47	4400	3500	2200	2568	
8	2300	1500	2000	710		48	5040	5060	3200	228	
9	4300	4400	4600	2800		49	4100	3800	3600	1300	
10	1600	2100	1000	500		50	4900	3700	6000		1490
11	1000	250	1400		310	51	3300	3000	4000	740	
12	3560	2900	5200		1808	52	4100	3900	4200	1590	
13	4000	3450	2200	394		53	2920	2050	3600		1672
14	5300	4900	4000	1290		54	4700	4600	4000	760	
15	3580	2625	3200	910		55	1740	600	1200	518	
16	3640	2830	6200		1764	56	2300	1380	2800	1200	
17	2620	1800	1600	1132		57	1980	1000	1800	1212	
18	5380	4750	6800	2900		58	3400	2800	4000	1250	
19	5160	5900	3000	1346		59	3980	4000	3400	1430	
20	4500	3600	3600	680		60	2300	2000	2000	1490	
21	3600	4000	3800	2300		61	900	950	1400	188	
22	3120	3550	4200	1584		62	4300	3000	3400	1960	
23	1180	1400	1400	506		63	4580	3575	6400	602	
24	3640	3150	4600	618		64	2080		2800	1368	
25	2100	1900	2000	1600		65	7160	5425	7200	1478	
26	3400	3300	2400	2098		66	840	850	200	872	
27	3500	4100	4200	2100		67	2600	1500	2000	590	
28	3600	2200	5000	510		68	2650	2675	2000	1850	
29	2340	2350	2000	682		69	2180	2120	1800	320	
30	2380	2000	2200	1698		70	3160	2430	4400	888	
31	2000	650	2600	1058							
32	2560	1075	1600	378							
33	3500	2700	4000	1172		平均値	3314	2851	3206	1186	1269
34	3740	4000	2600	1830		最大値	7160	5900	7200	3346	1808
35	3900	2700	4400	670		最小値	760	250	200	0	310
36	3000	2900	2000	1890		中央値	3360	2900	3100	1152	1581
37	1300	550	1400	640		対象機関	70	68	70	64	6
38	4440	3350	3200	1216		良好機関	68(97%)	63(93%)	68(97%)		
39	3000	3150	3600	2138							
40	3880	3050	4000	325							

* 選択分離培地による結果

表2 全施設の回収率 (%)

施設No.	分母* 非濃縮①	分母* 非濃縮②	施設No.	分母* 非濃縮①	分母* 非濃縮②	施設No.	分母* 非濃縮①	分母* 非濃縮②
1	50.2	54	27	60	50	53	57.3	46.4
2	38.3	51.2	28	14.2	10.2	54	16.2	19
3	33.6	79.6	29	29.1	34.1	55	29.8	43.2
4	0	0	30	71.3	77.2	56	52.2	42.9
5	75	142.5	31	52.9	40.7	57	61.2	67.3
6	5.4	4.6	32	14.8	23.6	58	36.8	31.2
7	9.4	7.3	33	33.5	29.3	59	35.9	42.1
8	30.9	35.5	34	48.9	70.4	60	64.8	74.5
9	65.1	60.9	35	17.2	15.2	61	20.9	13.4
10	31.3	50	36	63	94.5	62	45.6	57.6
11	31	22.1	37	49.2	45.7	63	13.1	9.4
12	50.8	34.8	38	27.4	38	64	65.8	48.9
13	9.9	17.9	39	71.3	59.4	65	20.6	20.5
14	24.3	32.3	40	8.4	8.1	66	103.8	436
15	25.4	28.4	41	21.5	23.1	67	22.7	29.5
16	48.5	28.5	42	37.8	29.9	68	69.8	92.5
17	43.2	70.8	43	27.6	35	69	14.7	17.8
18	53.9	42.6	44	45.9	62.9	70	28.1	20.2
19	26.1	44.9	45	55.1	58			
20	15.1	18.9	46	28.5	48	平均値	38.6	47.8
21	63.9	60.5	47	58.4	116.7	最大値	103.8	436
22	50.8	37.7	48	4.5	7.1	最小値	0	0
23	42.9	36.1	49	31.7	36.1	中央値	34.8	37.8
24	17	13.4	50	30.4	24.8	対象機関	70	70
25	76.2	80	51	22.4	18.5	良好機関	55(79%)	52(74%)
26	61.7	87.4	52	38.8	37.9			

*参考

表3 2015~2018年度結果一覧(2015/2016/2017/2018、良好範囲(菌数○、回収率(分母非濃縮②)2017/2018)黒字)、範囲外(菌数*、回収率(2017/2018)赤字、検査項目外又は不参加)

No.	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮	No.	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮
1	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○		37	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/*/*	
2	-/-/○/○	-/-/*/○	-/-*/○		38	○/○/○/○	-/○/○/○	*/*/○/○	
3	-/-/-/○	-/-/-/○	-/-/-/○		39	○/○/○/○	-/○/○/○	*/○/○/○	
4	-/○/○/○	-/○/○/○	-/-/*/*	-/*/-/-	40	○/○/○/○	-/○/○/○	*/○/○/*	
5	-/○/○/*	-/○/○/*		-/*/○/*	41	-/-/-/○	-/-/-/○	-/-/-/*	
6	○/○/-/○	-/○/-/○	*/*/-/*		42	*/○/○/○	-/○/○/○	*/○/*/○	
7	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/*/*		43	○/○/○/○	-/○/○/○	-/-/○/*	*/*/-/-
8	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/*		44	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○	
9	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○		45	*/*/○/○	-/○/○/○	*/*/*/○	
10	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/*		46	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○	
11	○/○/○/○	-/○/○/○		*/○/*/*	47	○/-/○/○	-/-/○/○	○/-/○/○	
12	○/○/○/○	-/○/○/○	○-/-/-	○/○/○/○	48	○/○/○/○	-/○/○/○	*/○/*/*	
13	○/○/○/○	-/○/○/○	*/*/*/*		49	○/○/○/○	-/○/○/○	*/○/○/○	
14	*/○/○/○	-/*/○/○	*/*/*/○		50	-/-/○/○	-/-/○/○		-/-/○/○
15	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/*/○		51	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/*	
16	○/○/○/○	-/○/○/○	-/-/○/-	*/○/-/○	52	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○	
17	○/○/○/○	-/○/○/○	*/*/○/○		53	-/○/○/○	-/○/*/○		-/*/○/○
18	-/-/○/○	-/-/○/○	-/-/○/○		54	○/○/-/○	-/○/-/○	○/○/-/*	
19	○/○/○/○	-/○/○/○	*/○/○/○		55	○/○/○/○	-/○/*/○	*/*/*/*	
20	○/○/○/○	-/○/○/○	*/○/○/*		56	*/○/○/○	-/○/*/○	*/○/*/○	
21	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/*/○		57	-/-/○/○	-/-/○/○	-/-/○/○	
22	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○		58	○/○/○/○	-/○/○/○	○/*/○/○	
23	-/-/*/○	-/-/*/○	-/-/*/*		59	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○	
24	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/*/*		60	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○	
25	-/○/○/○	-/○/○/○	-/○/○/○		61	○/○/○/○	-/○/○/○	*/○/*/*	
26	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○		62	○/○/○/○	-/○/○/○	*/○/○/○	
27	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○		63	○/○/○/○	-/○/○/○	*/○/○/*	
28	-/-/-/○	-/-/-/○	-/-/-/*		64	○/-/○/○	-/-/○/○	-/-/○/○	
29	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/*		65	○/○/○/○	-/○/○/○	-/*/○/○	*/-/-/-
30	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○		66	○/○/○/*	-/○/○/*	○/*/○/*	
31	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○		67	○/○/○/○	-/○/○/○	-/○/○/*	*/-/-/-
32	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/*		68	○/○/○/○	-/○/○/○	-/○/○/○	
33	○/*/-/○	-/*/-/○	*/*/-/○	○/-/-/-	69	○/-/-/○	-/-/-/○	○/-/-/*	
34	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/○/○		70	○/○/○/○	-/○/○/○	○/*/○/*	
35	○/○/○/○	-/*/○/○	*/*/○/*						
36	○/○/○/○	-/*/○/○	○/*/○/○						

表4 ポリカーボネート製フィルターを使用した洗浄時間の違いによる回収率の比較

条件		実験①	実験②	実験③	実験④	実験⑤	実験⑥	実験⑦	実験⑧	実験⑨	実験⑩	平均
非濃縮	菌数	3000	2600	3400	3000	5600	3600	4200	2400	3800	4600	3620
ろ過濃縮 洗浄1分	菌数	1964	1808	1670	1336	1934	1438	2142	1158	1546	1936	1693
	回収率	65.5	69.5	49.1	44.5	34.5	39.9	51	48.3	40.7	42.1	48.5
ろ過濃縮 洗浄2分	菌数	1450	1998	1452	1292	1766	1508	1702	1352	1350	2062	1593
	回収率	48.3	76.8	42.7	43.1	31.5	41.9	40.5	56.3	35.5	44.8	46.1

レジオネラ属菌検査実施施設様各位

2018年度 **レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ** のご案内

日頃は弊社製品のご愛顧を賜り厚く御礼申し上げます。

さて、この度レジオネラ属菌検査を実施されている施設様を対象に、下記の要領で「2018年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」を実施致します。

日常の検査精度の確認のため、奮ってご参加いただきますようお願い申し上げます。

■参加要件

別紙1.「参加要件」を満たし、かつ、別紙2.「2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」（参考：厚生労働省レジオネラ属菌検査推奨法 / ISO11731:1998 / ISO 11731:2017）による検査対応が可能なお施設様

■実施概要

検査試料	レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料（凍結乾燥品、-18~-33℃保存） 同封書類：①試料送付のご案内、②試料の使用方法・操作手順、③結果記入用メモ、④試料受領書兼承諾書
実施方法について	「2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」に従って実施お願いします（参照：別紙2）。 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、「ISO 11731:1998」の考え方を基本として平成23年度より検討されている「厚生労働省科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業」（以下、レジオネラ研究事業）において報告された方法に基づき、また「ISO11731:2017」を参考に、本精度管理サーベイ用に変法したものです。
参加費	1 セット 35,000 円（消費税別） ※原材料の値上げにより昨年度の価格から変更となっております。
参加募集数	150セット（募集数に達し次第、締め切らせていただきますのでご了承ください。）

■実施スケジュール（予定）

7月 下旬	参加募集開始 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)の2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ申込フォームから申込手順に従いお申込ください。 ● 1施設複数名のお申込みも可能です。検査試料はそれぞれの試験実施者様へお送りさせていただきます。
9月20日（木）	参加募集締切
10月15日（月）	試料発送 ● 検査試料到着後は直ちに-18~-33℃で保管願います。
10月31日（水）	請求書送付 ● 請求書はお申込み者様へ一括でお送りさせていただきます。
10月16日（火）～ 11月16日（金）	検査実施 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)にてIDとパスワードでログイン後、結果を入力いただけます。 ● 成績入力方法は検査試料に同封の資料を参照してください。
11月16日（金）17時	回答締切
12月21日（金）	参加費お支払い期限 ● 振込用紙をご利用いただくか、弊社指定の口座にお振り込みいただきます。なお、振込手数料は貴施設ご負担をお願い致します。銀行振り込みの控えをもって領収書とさせていただきます。
1月31日（木）	解析結果返却 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)にてID 番号とパスワードでログイン後、結果を表示・ダウンロードができます。

■問い合わせ先

日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局

〒110-8736 東京都台東区上野3丁目24番6号

TEL : 03-5846-5729 FAX:03-5846-5629

E-mail: legi-srvy@nissui-pharm.jp



日水製薬株式会社

参加要件

2018年7月吉日

日水製薬株式会社

レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局

下記の 1. 使用要件、2. 使用承諾、および 3. 注意事項について承頂けご施設様に参加をお願いいたします。

1. 使用要件

1) 病原体のバイオセーフティーレベル(以下 BSL)規定について

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では、病原体を病原性の最も高いものを一種病原体として、四種病原体まで規定しています。

また、病原体の規定とは別に、病原体の取扱者に対しての感染被害などの健康影響に基づき、BSL が規定されています。この BSL にも基づき、最も低リスクの病原体を扱うリスク群を BSL1 として、BSL4 までのリスク群を規定しています。

本菌種は BSL2 に分類されます。BSL2 の微生物に対して設備・技術に対する要件を以下に記載いたします。

2) 施設要件

1. 実験室内に、適切に管理された微生物試験を行う管理区域を有すること。管理区域の出入口にはバイオハザードマークを標示すること。
2. 管理区域の出入口及び病原体保管庫は施錠が出来る構造であること。保管設備にはバイオハザードマークを標示すること。
3. 消毒用の薬剤が常備されており、壁・床等の消毒が可能であること。
4. 管理区域内もしくは実験施設内に、高圧蒸気滅菌装置、もしくはそれに準ずる滅菌設備を有すること。
5. 本サーベイでは、検査工程上エアロゾル発生危険があることから、生物学用安全キャビネットが必要です。

3) 作業従事者要件

作業従事者に求められる基本的な要件について以下に記載します。

1. 1年に1回以上、病原体に関するセキュリティ及びセーフティに関して教育を受けていること。
2. 1の要件を満たさない場合には、微生物試験に習熟しており十分な知識・技能を有すること。あるいは微生物試験に習熟した人の指導のもとで試験を行うこと。

2. 精度管理サーベイ試料の使用承諾

1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

3. 注意事項

予告なく実施スケジュールが変更となることがあります。変更後のスケジュールは、メール等にてご連絡をいたします。

以上

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

(参考：厚生労働省研究費レジオネラ属菌検査推奨法 / ISO11731:1998 / ISO 11731:2017)

500mL以上の容器に入れた滅菌生理食塩水50mLに、精度管理サーベイ試料1バイアルを加え良く混和

非濃縮検体 1

1mL分取

100μLずつ
レジオネラ非選択分離培地
BCYEα寒天培地
5枚に塗布残液を100μLずつ ※1.
レジオネラ選択分離培地
(GVPC寒天培地など)
2枚以上に同時に塗布

非濃縮検体 2

100μL x 5回分取

100μLずつ
レジオネラ非選択分離培地
BCYEα寒天培地
5枚に塗布

濃縮検体用原液 490mL

滅菌生理食塩水441mLを加え、良く混和

濃縮検体用原液の菌数確認に使用した残試料液 489.5mL

冷却遠心濃縮法

日常の操作方法に従って遠心分離
(試料液量は任意)100倍濃縮する
希釈液は滅菌生理食塩水を使用100μLずつ
レジオネラ非選択分離培地
BCYEα寒天培地
5枚に塗布

ろ過濃縮法

試料液全量をメンブランフィルターろ過

4.9mL滅菌生理食塩水
にメンブランフィルターを添加
100倍濃縮

ボルテックスミキサー

100μLずつ
レジオネラ非選択分離培地
BCYEα寒天培地
5枚に塗布

どちらか一法を選択して実施

36±1°C 7日間好気培養後、レジオネラ属菌と推定される集落数の計測

* 本サーベイでは純培養菌を使用しているためここで終了

■ 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、“ISO 11731:1998”の考え方を基本として平成23年度より検討されている「厚生労働省科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業」(以下、レジオネラ研究事業)において報告された方法に基づき、また“ISO 11731:2017”を参考に、本精度管理サーベイ用に変法したものです。

■ 本精度管理サーベイ試料は、平成26年度のレジオネラ研究事業において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されています。2017年度サーベイにおいては、濃縮操作法や培地接種操作などの手技の精度確認に主眼を置くこととし、日常検査において濃縮加熱処理もしくは酸処理を実施している施設におかれましても、上記指定法に従って行った検査法での結果の報告をお願いします。

■ 指定法に記載されていない手技、使用器材(例：冷却遠心濃縮液量、メンブランフィルター材質、培地メーカー、レジオネラ選択分離培地の種類、など)は、各施設の操作方法で行ってください。

■ 各法におけるレジオネラ属菌数は、レジオネラ非選択分離培地BCYEα寒天培地から得られた集落数から算出し、報告してください。

※1. 日常の試験にレジオネラ選択分離培地を使用している施設におきましては、参考値として、同培地における集落数も計測してください。なお、レジオネラ研究事業において、レジオネラ選択分離培地における集落数は、組成中の選択剤による影響等により、レジオネラ非選択分離培地における集落数に比べ減少することが報告されています。

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試料送付のご案内

謹啓 日頃は弊社製品をご愛顧賜り厚く御礼申しあげます。

この度は、2018年度レジオネラ属菌細菌検査精度管理サーベイにお申し込み頂きましてありがとうございます。精度管理サーベイ試料を送付させていただきますのでご査収のほど、よろしくお願ひ申しあげます。

謹白

記

1. 送付内容一覧

- ・ 試料送付のご案内（本案内状）
- ・ 試験概要・・ 6枚
- ・ 結果記入用メモ（Web入力する際にご活用ください）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4枚
- ・ 試料受諾書兼承諾書・・ 1枚
- ・ 精度管理サーベイ試料A（瓶ラベルに「A」と記載）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1本

*** 到着後直ちにマイナス18℃～マイナス33℃で適切に保管してください。**
*** 到着後直ちに内容を確認し、書類の不備や精度管理サーベイ試料Aの破損等を認めた場合、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局にご連絡ください。**

2. 結果入力手順

- 1) 結果の記入は、コスモ会HP (<https://cosmokai.com/>) より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPW（別送ハガキ参照）を入力してログインしてください。
 - 2) 登録画面が表示されますので、ご登録内容をご確認ください。ご確認後は、ページの下にあります【変更なし データ入力画面へ進む】をクリックしてください。
 - 3) データ入力画面に進み結果の入力が完了したら、ページの下にあります【入力内容を確認】をクリックし入力内容を確認してください。入力に間違いがなければ、ページの下にあります【送信】をクリックしてください。
- 注意：同じ PC で複数の方が入力・確認を行う際には、ユーザー毎に作業完了後、一度ブラウザを全て閉じ、再度結果入力画面にアクセスし、ログインしてください。
表示されている内容が試験担当者ご本人のものであるかご確認ください。

3. スケジュール

期 日	内 容
10/16(火)～17(水)	■ 精度管理試料到着 精度管理サーベイ試料が到着します。送付内容を確認してください。
11/16(金) 17時	■ 回答締切 検査を実施し、上記結果入力手順にそって結果の入力をお願いいたします。 回答期限を11/16 (金) 17時とさせていただきます。
1/31(木)	■ 解析結果開示 解析結果はコスモ会HP (https://cosmokai.com/) より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPWを入力後、試験実施者様の画面にて解析結果の閲覧・印刷ができます。

4. お問い合わせ先

日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局
TEL : 03-5846-5707 FAX : 03-5846-5629 E-mail : legi-srvy@nissui-pharm.jp

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試験概要

1. レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試験項目

試料名	試験項目
精度管理サーベイ試料A (1本)	レジオネラ属菌

精度管理サーベイ試料は、菌をボール状に凍結乾燥処理しバイアル瓶に封入したもので、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ用に菌数を特別に調整しています。瓶ラベルには「A」と記載されています。

精度管理サーベイ試料Aの使用法・操作手順および結果入力をご確認のうえ、試験を実施してください。

2. 精度管理サーベイ試料Aの使用法・操作手順

非濃縮検体 1		非濃縮検体 2	冷却遠心濃縮法	ろ過濃縮法
非選択分離培地 (5枚)	選択分離培地 (2枚以上)	非選択分離培地 (5枚)	濃縮検体	
実施	実施 (参考値)	実施	冷却遠心濃縮法、ろ過濃縮法 どちらか一方を実施	

精度管理サーベイ試料Aは、「レジオネラ属菌」の【非濃縮検体】および【濃縮検体】の菌数試験に使用します。濃縮検体については、【冷却遠心濃縮法】または【ろ過濃縮法】のどちらか一方を実施してください。

以下の操作手順をよく読み、記載された方法に従って使用してください。

注1：本操作手順（2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法）は、本精度管理サーベイ用のみの検査方法であり、サンプル量、濃縮倍率などにおいて、実検体の検査方法と異なる部分があります。

■ 試料液の調製

① 検査を開始する30分前に保管庫より取り出して室温に戻し、以下の操作を始めてください。

注2：精度管理サーベイ試料Aは、到着後から試験開始日までマイナス18℃～マイナス33℃で保管してください。

注3：室温に戻っていない瓶を開封した場合、瓶内壁の結露水により凍結乾燥処理したボールが瓶から取り出しにくい場合があります。

注4：精度管理サーベイ試料は1個のみですので、取扱いに十分注意のうえ試験を実施してください。

- ② 500mL以上の滅菌容器に滅菌生理食塩水 50mLを用意し、精度管理サーベイ試料を加え良く混和します。これを試料原液とします。

注 5：精度管理サーベイ試料の特性上、本サーベイにおいては、すべての溶解液、希釈液は、**滅菌生理食塩水**を使用してください。

注 6：完全に溶解したことを確認してください。この時、加温はしないでください。

注 7：溶解後の保存は測定誤差をもたらす原因となりますので、溶解後は直ちに試験を開始し、操作の流れを止めることなく試験を終了させてください。

- ③ 試料原液から 1mL を正確に分取してください。【非濃縮検体 1】の試験に使用します。

- ④ 残りの試料原液 49mL に、滅菌生理食塩水 441mL を加え良く混和します。これを【非濃縮検体 2】、【濃縮検体 冷却遠心濃縮法】、または【濃縮検体 ろ過濃縮法】の試験に使用します。

注 8：試料が均一になるよう十分に混和してください。

注 9：混和後フタを開ける場合には、エアロゾルが発生しているため安全キャビネット内で操作を行ってください。特に、転倒混和等を行った場合には、フタの開閉時における試料の飛散には十分注意してください。

□非濃縮検体1

※非選択分離培地と選択分離培地に塗布します。

■非選択分離培地

- (1) 試料液の調整③で分取した 1mL の検体より、レジオネラ非選択分離培地 5 枚に、100 μ L ずつ塗布します。

■参考情報 「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）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 平成 25 年度分担研究報告書 レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み」（以下、平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究）表 14 より抜粋

- ・検体の塗布方法は、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。
- ・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」）。

- (2) 36 \pm 1 $^{\circ}$ C 7 日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。

注 10：「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）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 平成 26 年度分担研究報告書 レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み」（以下、平成 26 年度レジオネラ属菌検査法研究）において、GVPC 寒天培地等のレジオネラ選択分離培地へ接種した場合、レジオネラ非選択分離培地へ接種した場合に比べ集落数の減少が認められたため、レジオネラ非選択分離培地（BCYE α 寒天培地）を使用してください。

■参考情報 ISO11731：2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*

・雑菌が少ない場合の検体では、BCYE α 寒天培地の使用が必須となっています。

- (3) 試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式 : 100mL あたりの菌数 = 平均値 \times 1000

■選択分離培地(参考値)

※日常の試験にレジオネラ選択分離培地を使用している施設におきましては、参考値として、同培地における集落数も計測してください。

- (1) 【非濃縮検体 1 非選択分離培地】(1)の残液を、レジオネラ選択分離培地 2 枚以上に、 $100\mu\text{L}$ ずつ塗布します。
- (2) $36\pm 1^\circ\text{C}$ 7日間 好気培養後、レジオネラ選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。培地から得た集落数の平均値を算出します。
- (3) 試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式 : 100mL あたりの菌数 = 平均値 \times 1000

■非濃縮検体2

- (1) 試料液の調整④の検体 490mL より、 $500\mu\text{L}$ を分取して、非選択分離培地に $100\mu\text{L}$ ずつ 5 枚に塗布します。
- (2) 試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式 : 100mL あたりの菌数 = 平均値 \times 10000

□濃縮検体

※【冷却遠心濃縮法】、または【ろ過濃縮法】どちらか一方を実施してください。

■冷却遠心濃縮法

- (1) 試料液の調整④で作製した検体 490mL より、日常の検査工程に従って、冷却遠心分離を行います。試料液量は任意で実施してください。

■参考情報 平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 12 より抜粋

- ・遠心加速度と遠心時間は、 $6000\text{g}\times 10$ 分または $3000\text{g}\times 30$ 分とする。ISO 11731: 1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 による。
- ・遠心加速度(g)= $1118\times$ 回転半径 (cm) \times 回転速度² (rpm) $\times 10^{-8}$ 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。
- ・冷却設定温度は、 $15\sim 25^\circ\text{C}$ とする。

- (2) 【冷却遠心濃縮法】(1)で得られた検体を、希釈液に滅菌生理食塩水を用いて 100 倍濃縮します。

注 11 : 精度管理サーベイ試料の特性上、本サーベイにおいては、すべての溶解液、希釈液は、**滅菌生理食塩水**を使用

してください。

注 12：精度管理サーベイ試料は、平成 26 年度のレジオネラ研究事業において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されているため、本サーベイにおいては、加熱処理および酸処理を行わないでください。

■参考情報 平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 12 より抜粋

- ・沈殿物を巻き上げないように注意して上清を滅菌ピペットで慎重に除去し、沈殿物を含めて残りの体積を 2mL にする。
- ・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が考えられる。(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。

- (3) 得られた検体を、レジオネラ非選択分離培地 5 枚に、100 μ L ずつ塗布します。
- (4) 36 \pm 1 $^{\circ}$ C 7日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。
- (5) 試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式 : 100mL あたりの菌数 = 平均値 \times 100

■ろ過濃縮法

- (1) 試料液の調整④で作製した検体 490mL より、【非濃縮検体 2】で非濃縮検体用に 500 μ L 分取した残液 489.5mL を、メンブランフィルターにてろ過を行います。

注 13：本サーベイにおいては、日常検査において異なる検水量をろ過している施設におかれましても 489.5mL の検水にて、ろ過を行ってください。

■参考情報 平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 11 より抜粋

- ・ポリカーボネートタイプフィルターは、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。
 - ・包装製品ラベル側を補集面にする。(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打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。
 - ・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 \sim 0.9 \times 2 \sim 20 μ m 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 μ m 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。
- ISO11731 : 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 μ m と規定されている。

■参考情報 ISO11731 : 2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*

・フィルターの種類は、ポリカーボネートもしくは、ポリエーテルスルホンを、ポアサイズは $0.2\mu\text{m}$ を使用する旨が記載されている。

- (2) 50mL の遠沈管等に 4.9mL の滅菌生理食塩水を用意します。
- (3) 吸引後のメンブランフィルターを剥がし、(2)で用意した遠沈管中の滅菌生理食塩水にメンブランフィルターを入れます。
- (4) ボルテックスミキサーで洗浄し、100 倍濃縮液とします。

注 14：精度管理サーベイ試料は、平成 26 年度のレジオネラ研究事業において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されているため、本サーベイにおいては、加熱処理および酸処理を行わないでください。

- (5) 得られた検体を、レジオネラ非選択分離培地 5 枚に、 $100\mu\text{L}$ ずつ塗布します。
- (6) $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 7日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。
- (5) 試料原液の 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式 : 100mL あたりの菌数 = 平均値 \times 100

3. 結果入力方法

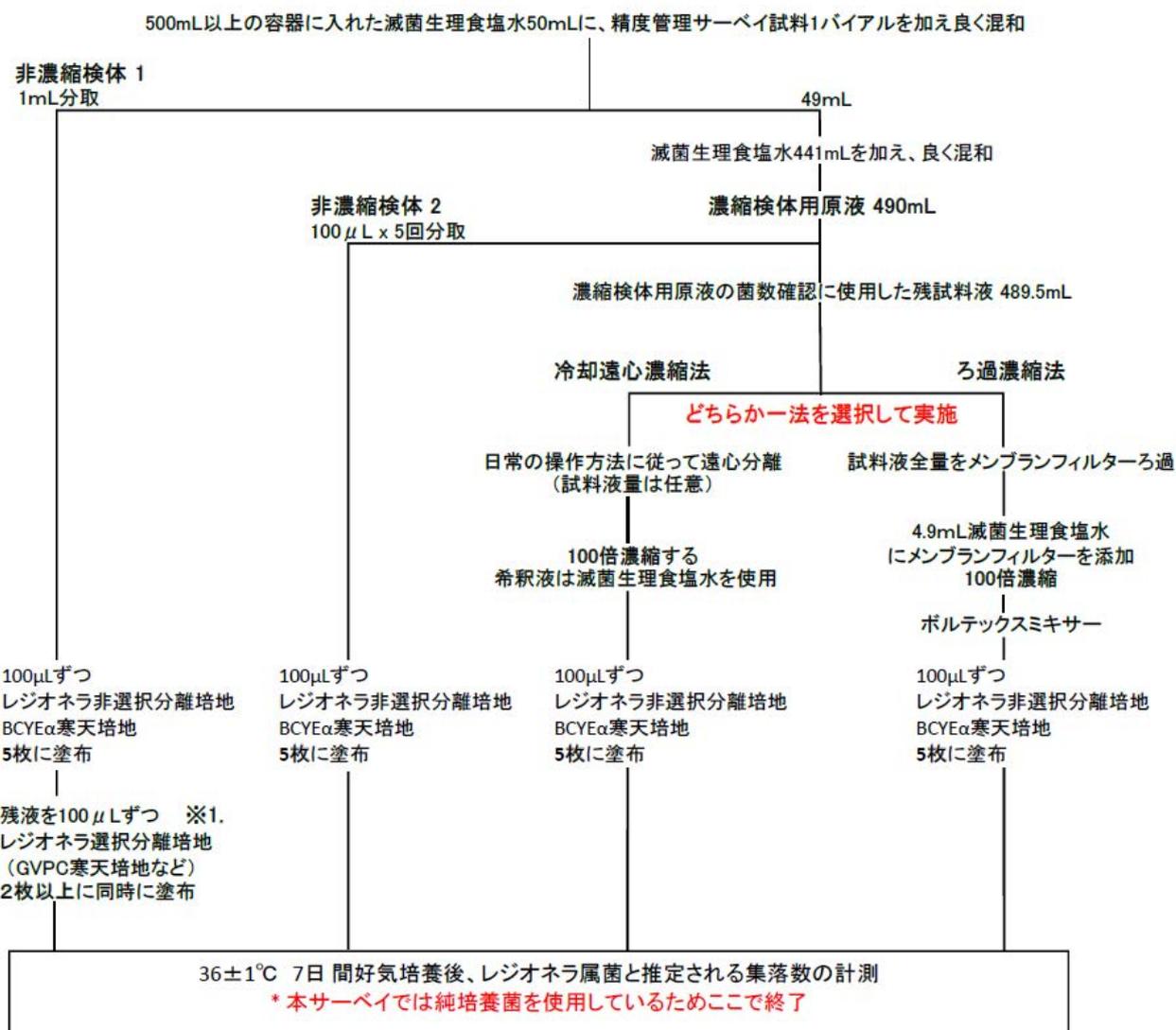
- (1) 結果の記入は、コスモ会HP (<https://cosmokai.com/>) より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPW（別送ハガキ参照）を入力してログインしてください。
- (2) 登録画面が表示されますので、ご登録内容をご確認ください。ご確認後は、ページの下にあります【変更なし データ入力画面へ進む】をクリックしてください。
- (3) データ入力画面に進み結果の入力が完了したら、ページの下にあります【入力内容を確認】をクリックし入力内容を確認してください。入力に間違いがなければ、ページの下にあります【送信】をクリックしてください。

注 15：同じ PC で複数の方が入力・確認を行う際には、ユーザー毎に作業完了後、一度ブラウザを全て閉じ、再度結果入力画面にアクセスし、ログインしてください。表示されている内容が試験担当者ご本人のものであるかご確認ください。



2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

(参考：厚生科研費レジオネラ属菌検査推奨法 / IS011731:1998 / IS011731:2017)



■ 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、“ISO 11731:1998”の考え方を基本として平成23年度より検討されている「厚生労働省科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業」(以下、レジオネラ研究事業)において報告された方法に基づき、また“ISO 11731:2017”を参考に、本精度管理サーベイ用に変法したものです。

■ 本精度管理サーベイ試料は、平成26年度のレジオネラ研究事業において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されています。2018年度サーベイにおいては、濃縮操作法や培地接種操作などの手技の精度確認に主眼を置くこととし、日常検査において濃縮加熱処理もしくは酸処理を実施している施設におかれましても、上記指定法に従って行った検査法での結果の報告をお願いします。

■ 指定法に記載されていない手技、使用器材(例：冷却遠心濃縮液量、メンブランフィルター材質、培地メーカー、レジオネラ選択分離培地の種類、など)は、各施設の操作方法で行ってください。

■ 各法におけるレジオネラ属菌数は、レジオネラ非選択分離培地BCYE α寒天培地から得られた集落数から算出し、報告してください。

※1. 日常の試験にレジオネラ選択分離培地を使用している施設におきましては、参考値として、同培地における集落数も計測してください。なお、レジオネラ研究事業において、レジオネラ選択分離培地における集落数は、組成中の選択剤による影響等により、レジオネラ非選択分離培地における集落数に比べ減少することが報告されています。

結果記入用メモ (Web 入力する際にご活用ください)

貴施設名	所属部署
氏 名	I D

■ 共通設問

貴施設で行っている日常の検査方法に関してご回答ください。あてはまるものはすべて選択してください。

※半角英数（整数）で入力してください。指数表記および数式での入力は認識出来ません。

(1) 参考としている基準は何ですか。

- IS011731 : 2017 IS011731 : 1998 新版レジオネラ症防止指針 1999
 第 3 版レジオネラ症防止指針 2009 上水試験法 2011 衛生試験法注解 2015
 病原体検出マニュアル 2011（国立感染症研究所） 厚労科研レジオネラ研究班 WG 推奨法
 その他

(2) 日常の検査法は何を採用していますか。

- 非濃縮 冷却遠心濃縮法 ろ過濃縮法
 その他

(3) 日常検査の前処理は何を採用していますか。

- 処理なし 酸処理 熱処理 酸処理と熱処理 その他

(4) 冷却遠心濃縮法を採用している方にお聞きします。

1) 検水量は何 mL ですか。 mL

2) 遠心加速度は何 g ですか。 g

3) 回転数は何 rpm ですか。 rpm

4) 遠心時間は何分間ですか。 分

5) 設定温度は何℃ですか。 ℃

6) 冷却遠心機のローターは何ですか。

- 固定角ローター（アングルローター）
 水平ローター（スウィングローター）
 その他

7) 上清除去の方法は何ですか。

- デカンテーション ピペット等による吸引
 その他

8) 上清は全量除去しますか。

- 全量除去 一部残す mL

9) 全量除去の場合、菌体回収のための溶液は何ですか。

滅菌精製水 滅菌生理食塩水

滅菌リン酸緩衝液 その他

10) 濃縮倍率は何倍ですか。

倍

(5) ろ過濃縮法を採用している方にお聞きします。

1) 検水量は何mLですか。

mL

2) フィルターから菌体を回収するための溶液は何ですか。

滅菌精製水 滅菌生理食塩水

滅菌リン酸緩衝液 その他

3) フィルターメーカーはどちらですか。

ミリポア アドバンテック

その他

4) フィルター表裏は統一して使用していますか。

している していない

5) フィルターの材質は何ですか。

ポリカーボネート ナイロン セルロースアセテート

セルロース混合エステル ポリエーテルスルホン

その他

6) フィルターの直径は何mmですか。

mm

7) フィルターのポアサイズは何 μ mですか。

μ m

8) ボルテックスミキサーは何分かけていますか。

分

(6) 酸処理を行っている方にお聞きします。

1) 酸処理剤は何を使用していますか。

0.2M・HCl KCl (pH2.2)

その他

2) 酸処理する量は何mLですか。

mL

3) 酸処理剤は市販品を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販品を使用 自家調製品を使用

4) 添加量は検体に対し何%ですか。

%

5) 処理温度は何度ですか。

室温 その他 °C

6) 処理時間は何分ですか。

分

(7) 加熱処理を行っている方にお聞きします。

1) 加熱処理には何を使用していますか。

ウォーターバス ヒートブロック

インキュベータ その他

2) 加熱処理する量は何 mL ですか。 mL

3) 処理温度は何度ですか。 °C

4) 処理時間は何分ですか。 分

(8) 使用している培地とメーカーは何ですか。

培地名 \ メーカー	日水製薬	栄研化学	関東化学 (OXOID)	日本 BD	日研生物医学	ビオメリュー・シバハーン	極東製薬工業	メルク	(その他)
BCYE α 寒天培地									
GVPC 寒天培地									
WYO α 寒天培地									
MWY 寒天培地									
その他 <input type="text"/>									
その他 <input type="text"/>									

(9) 培地は市販の生培地を使用していますか。 自家調製を使用していますか。

市販の生培地 自家調製

(10) 培地は 1 検体あたり合計何枚に接種していますか。 枚

(11) 月あたりの検体数はおよそどのくらいですか。 夏期 (5~10 月) 検体/月
冬期 (11~4 月) 検体/月

■2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ結果回答

※試験を実際されていない場合は、空欄でお願いいたします。

※半角英数（整数）で入力してください。指数表記および数式での入力は認識出来ません。

□非濃縮検体 1

※非選択分離培地と選択分離培地に塗布します。

■非選択分離培地

(1) 100mLあたりの菌数をご記入ください。

CFU/100mL (本サーベイ用計算式 = $\frac{\text{平均値}}{100} \times 1000$)

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。

BCYE α 寒天培地

その他

(4) 培地メーカーはどちらですか。

日水製薬

栄研化学

関東化学 (OXOID)

日本 BD

日研生物医学

ビオメリュー・ジャパン

極東製薬工業

メルク

その他

(5) どのような方法で試料を混和しましたか。

手

ミキサー

その他

(6) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販の生培地

自家調製

(7) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

検査当日

前日以前

■選択分離培地（参考値）

(1) 100mLあたりの菌数をご記入ください。

CFU/100mL （本サーベイ用計算式 = 平均値 × 1000）

(2) 使用した培地の枚数は何枚ですか。 枚

(3) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)	<input style="width: 100%;" type="text"/>					

(4) 使用した培地は何ですか。

- GVPC 寒天培地
 WYO α 寒天培地
 MWY 寒天培地
 CCVC 寒天培地
 PAC (BMPA α) 寒天培地
PAV 寒天培地
 その他

(5) 培地メーカーはどちらですか。

- 日水製薬
 栄研化学
 関東化学 (OXOID)
 日本 BD
 日研生物医学
バイオメリュー・ジャパン
極東製薬工業
メルク
その他

(6) どのような方法で試料を混和しましたか。

- 手
ミキサー
その他

(7) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

- 市販の生培地
自家調製

(8) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

- 検査当日
前日以前

■非濃縮検体 2

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

--

CFU/100mL (本サーベイ用計算式 = $\frac{\text{平均値}}{10000}$)

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。

BCYE α 寒天培地

その他

--

(4) 培地メーカーはどちらですか。

日水製薬

栄研化学

関東化学 (OXOID)

日本 BD

日研生物医学

ビオメリュー・ジャパン

極東製薬工業

メルク

その他

--

(5) どのような方法で試料を混和しましたか。

手

ミキサー

その他

--

(6) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販の生培地

自家調製

(7) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

検査当日

前日以前

□濃縮検体

【冷却遠心濃縮法】、もしくは【ろ過濃縮法】どちらか一方を実施してください。

■冷却遠心濃縮法

(1) 100mLあたりの菌数をご記入ください。

[Blank box for CFU/100mL]

CFU/100mL (本サーベイ用計算式 = 平均値 × 100)

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。 □BCYE α 寒天培地 □その他 [Blank box]

(4) 培地メーカーはどちらですか。
 日水製薬 栄研化学 関東化学 (OXOID 製品) 日本 BD 日研生物医学
 ビオメリュー・ジャパン 極東製薬工業 メルク その他 [Blank box]

(5) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。
 市販の生培地 自家調製

(6) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。 □検査当日 □前日以前

(7) どのような方法で試料を混和しましたか。
 手 ミキサー その他 [Blank box]

(8) 遠心加速度は何 g ですか。 [Blank box] g

(9) 回転数は何 rpm ですか。 [Blank box] rpm

(10) 遠心時間は何分間ですか。 [Blank box] 分

(11) ブレーキをかけていますか。 □かけている □かけていない

(12) 設定温度は何℃ですか。 [Blank box] °C

(13) 冷却遠心機のローターは何ですか。
 固定角ローター (アングルローター)
 水平ローター (スウィングローター)
 その他 [Blank box]

(14) 上清除去の方法は何ですか。
 デカンテーション ピペット等による吸引
 その他 [Blank box]

(15) 上清は全量除去しますか。 □全量除去 □一部残す [Blank box] mL

■ろ過濃縮法

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

CFU/100mL (本サーベイ用計算式 = $\frac{\text{平均値}}{100} \times 100$)

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。

BCYE α 寒天培地

その他

(4) 培地メーカーはどちらですか。

日水製薬

栄研化学

関東化学 (OXOID 製品)

日本 BD

日研生物医学

ビオメリュー・ジャパン

極東製薬工業

メルク

その他

(5) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販の生培地

自家調製

(6) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

検査当日

前日以前

(7) フィルターメーカーはどちらですか。

ミリポア

アドバンテック

その他

(8) フィルター表裏は、包装製品のラベル側を捕集面にして使用しましたか。

した

しない

(9) フィルターの材質は何ですか。

ポリカーボネート

ナイロン

セルロースアセテート

セルロース混合エステル

ポリエーテルスルホン

その他

(10) フィルターの直径は何 mm ですか。

 mm

(11) フィルターのポアサイズは何 μm ですか。

 μm

(12) ボルテックスミキサーは何分かけていますか。

 分

以上

2018年10月15日

日水製薬株式会社

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試料受領書兼承諾書

今回使用する菌株は、バイオセーフティーレベル 2 に該当する菌種ですので、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料受領書兼承諾書を以て、サーベイ試料受領と菌株取扱いに関する承諾の確認とさせていただきます。

精度管理サーベイ試料の内容をご確認いただき、下記サーベイ試料受領書兼承諾書に必要事項をご記入のうえ、10月18日(木)までに、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局宛に FAX してください。

FAX:03-5846-5629

日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局 宛

レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料受領書兼承諾書

受領日： 2018年 10月 日

貴施設名
ご所属部署
ご担当者名 ⑩
ID 番号 <small>注</small>

注:弊社より、別途送付したはがきに記載した ID 番号をご記入ください。

本サーベイ試料の取扱いについては、バイオハザード防止のために以下のことを確認、承諾いたします。

1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

以上

2018年度 レジオネラ属菌検査セミナー 開催のご案内

主催：日水製薬株式会社

平素は格別なるお引き立てを賜り、厚く御礼申し上げます。
この度、弊社では下記の内容にてレジオネラ属菌検査に関するセミナーを開催致します。
ご多用中とは存じますが、是非ご参加頂きますようご案内申し上げます。

記

- 開催日時 **2019年3月12日(火) 13:30～17:00** (受付け開始 13:00)
- 開催場所 **文京シビックホール スカイホール (26階)**
〒112-0003 東京都文京区春日1-16-21
※東京メトロ後楽園駅徒歩1分、都営地下鉄春日駅徒歩1分、JR総武線水道橋駅徒歩9分
- 定員 **96名**
※会場の都合により、定員に達し次第受講をお断りさせていただきますのでご了承くださいようお願いいたします。なお、お申込みは1施設あたり2名様までとさせていただきます。
- 内容
 - 13:00～ 受付開始
 - 13:30～14:30 講演 1. 「レジオネラ検査法の現状と今後の展望」
国立感染症研究所 細菌第一部 前川純子先生
 - 14:30～15:00 報告 「2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ結果報告」
日水製薬株式会社
 - 15:00～15:15 休憩
 - 15:15～16:25 講演 2. 「レジオネラ属菌培養検査について」
北海道立衛生研究所 感染症センター 感染症部 細菌グループ 森本洋先生
 - 16:25～17:00 事前質問回答・質疑応答
- 参加費 **無料**
- 申込方法 **E-mailにてお願いします。**
下記内容を【E-mail：legi-srvy@nissui-pharm.jp】までお送りください。

《参加申込》

お名前：
貴社名：
ご所属：
ご住所： 〒
TEL：
E-mail：
ご質問事項：

※受付返信につきましては受付1週間を目安に受付番号と共にメールにてご連絡させていただきます。

- 締切り **2019年2月28日(木)**
※2019年2月15日(金)までに受付た質問につきましては、セミナー当日に分野別に分類して回答させていただきます。

以上

お問合せ先 日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局
TEL 03-5846-5729 E-mail：legi-srvy@nissui-pharm.jp

(案)

別添 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法

概 要

環境水中のレジオネラを計数する方法を記載した ISO11731:1998 Water quality - Enumeration of *Legionella* が 2017 年 5 月に改訂され（以下「改訂 ISO 法」という。）、環境水の状況に応じて、使用培地や前処理法を選択するような記載となった。

現在、国内における公衆浴場の浴槽水等の検査においては、培地上でレジオネラ属菌の発育を阻害する夾雑菌の存在を前提とした検査対応が一般的となっている。本検査方法においても選択分離培地を使用し、熱や酸による前処理を行うことを基本とした。また、濃縮検水に加え非濃縮検水の検査方法についても記載した。改訂 ISO 法ではろ過濃縮法を推奨していることから、本検査方法においても検水の濃縮についてはろ過濃縮法を推奨した。なお、検査工程ごとで必要となる基本的な注意事項のほかに、検査結果に影響する可能性のあるポイントも示した。本検査方法は、公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検出のための基本となる検査方法について技術的助言として示しているものである。レジオネラ症患者発生時の感染源特定のための検査については、この限りではない。

分離培地上の発育集落に斜光を当て実体顕微鏡で観察すると、レジオネラ属菌は特徴的な外観構造（モザイク・カットグラス様）を呈する。効率よく集落を選定でき、より正確な定量結果の報告が可能となることから、この集落観察法（斜光法）の実施を推奨する。

さらに、近年普及してきた核酸を検出する迅速検査法についても記載した。また、精度管理の必要性についても言及した。

1 検水の採取

1) 試薬

25%チオ硫酸ナトリウム水溶液（121℃15 分間オートクレーブ滅菌又はろ過滅菌）：
塩素を含んでいる検水を採取する場合に塩素中和剤として用いる。

2) 器具及び器材

- (1) 採水容器：ポリプロピレン及びポリエチレン製並びにガラス製等の密栓ができる容器で、滅菌済みのもの。
- (2) 柄杓：採水に用いる。滅菌したプラスチック容器を用いることもできる。

3) 採水手技

採水にあたっては、滅菌又は消毒した柄杓等を使用する。複数の検水を採取する場合

は必要数の滅菌した柄杓を準備するか、採水するたびに消毒用アルコールで柄杓を消毒して使用する。なお、採水時は手袋とマスクを装着することが望ましい。

採水量は、一検体あたり 500mL 以上とする。検水で容器を満杯にせず、上部に空間を残すように採水する（注 1）。

採水後、容器の周囲をアルコール綿等で消毒する。塩素を含んでいる検水を採取する場合は、採水容器に 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を 1/500 量になるように加える。又は、あらかじめチオ硫酸ナトリウムを検水 100mL につき 0.02~0.05g の割合で採水容器に入れ滅菌したものを使用する（注 2）。ねじ栓を固く締め検水が漏れないようにする。パラフィルム等で固定するとなおよい（注 3）。

注 1 開栓時にこぼさないようにし、採水容器内に空気を残すため。

注 2 市販のチオ硫酸ナトリウムの入った容器の使用も可能。

注 3 温かい検水を採取した時は、温度が下がると合成樹脂容器が収縮して栓がゆるみ、検水が漏れることがあるので注意する。

4) 検水の搬送と保存

検水は、6~18℃で搬送し、検査室に搬入後速やかに検査に供する。ただちに検査が実施できない場合は、6±2℃で冷蔵保存し、採水後 2 日以内に検査を実施することが望ましい。再検査を含め 5 日以内に検査を実施する。採水から検査までに要した時間を記録する（注 4）。

注 4 検水の輸送又は保存中に生菌数が変化する可能性を考慮して、温度の記録も残すことが望ましい。

2 検査

2.1 はじめに

検査にあたってはあらかじめ標準作業手順書を作成しておく。また、検水中にはレジオネラ属菌が存在していると想定し、BSL2 実験室内でその取り扱い基準に従い実施する。エアロゾルを発生する操作（注 5）は、クラス 2 の安全キャビネット内で作業する。

検査工程を図 1 に示す。原則として非濃縮検水と濃縮検水の両方を検査する（注 6）。非濃縮検水は未処理（注 7）、濃縮検水については熱処理又は酸処理を実施し（注 8）、原則として選択分離培地で培養する。濃縮法はろ過濃縮法を推奨する。

注 5 培地への接種、濃縮工程、ピペットからの吹き出し、洗い出し時等における強い振と

うや攪拌、混合等。

注6 清掃消毒直後の検水等、レジオネラ属菌数が少ないことが推定される場合においては、濃縮検水のみでもよい。

注7 未処理とは、検水の夾雑菌が少ないと想定される場合に熱や酸による前処理を行わないこと。未処理の非濃縮検水で夾雑菌が抑制できなかった場合は、熱処理や酸処理を行う。

注8 熱処理と酸処理のどちらが適しているかを判断できない場合は、両方を行う。

2.2 レジオネラ用培地

1) 非選択分離培地：BCYE α 寒天培地

レジオネラ属菌は、一般的な細菌培養に用いる培地には発育することができない。そのため、レジオネラ属菌の培養には、発育に必須である鉄、L-システイン及び発育阻害物質を吸着するための活性炭末を加えたCYE (Charcoal yeast extract) 寒天に、培地の緩衝性を高め発育時間を短縮するACES Buffer、 α -ケトグルタル酸カリウムを添加したBCYE α 寒天培地が用いられる。市販培地や市販基礎培地に市販サプリメントを添加した培地が利用できる。

利用法：L-システイン要求性試験（2.8 菌の鑑別・同定と計数参照）、釣菌後の培養、夾雑菌が少ないと推定される検水からの分離培養等。

2) 選択分離培地：GVPC α 寒天培地、MWY 寒天培地、WY0 α 寒天培地等

選択分離培地は、BCYE α 寒天培地に各種抗菌剤を加えて作られている。「新版レジオネラ症防止指針」（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター発行）にも記載されているとおり、3種の選択分離培地の発育支持力に大差は認められなかった。実際の検査においては、検水中に混在する夾雑菌の抑制に有用な選択剤が特定できないことから、特に培地の種類は指定しない（注9）。

利用法：検水からのレジオネラ属菌の分離培養。

注9 培地の種類や製造業者の違いにより、形成集落の大きさ等に違いが見られる。検査者は、事前に自施設で使用している培地上でのレジオネラ属菌集落を経日的に観察し、集落の性状等を確認しておく。

3) 培地の保存

培地は製造業者の推奨温度で冷蔵保存する。自家調製した培地は、 $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ で保存し、できるだけ新鮮なものを使用する（注10）。

注10 嫌気ジャーやクーラーボックスに入れ密封し冷蔵保存することで、乾燥、結露をか

なり防ぐことが出来る。自家調製した培地は、適切な保存により3か月間のレジオネラ属菌発育性能を保持できる。

2.3 検水の濃縮

1) メンブレンフィルターろ過濃縮法

1) -1 試薬

- (1) 滅菌蒸留水：ろ過後のフィルターから菌を再浮遊させるのに用いる。また、採水容器やフィルターホルダーに残る検水を洗い流す場合に用いる。
- (2) 消毒用エタノール：アルコール綿の作製に用いる。

1) -2 器具及び器材

- (1) メンブレンフィルター：ポリカーボネート製で、ポアサイズ 0.20 μ m 又は 0.22 μ m（製造業者により異なる）（注 11、12）。
- (2) 滅菌したフィルターホルダー：ガラス製又はポリスルホン製（注 13）を推奨。吸引ビンと一体化している製品もあり、個別対応する時に便利である。
- (3) マニホールド：多連のマニホールドが便利である。検水数が少なければ吸引ビンで代用することもできる。
- (4) 吸引ポンプ等
- (5) 吸引ビン：マニホールドに繋いで廃液を貯める。
- (6) シリコン栓：吸引ビンに使用する。
- (7) ガラス管：シリコン栓に刺して用いる。チューブの太さに合わせる。
- (8) チューブ：マニホールドと吸引ビン、吸引ポンプ等を繋ぐ。
- (9) ピンセット：メンブレンフィルターの操作に用いる。
- (10) スクリューキャップタイプの滅菌 50mL 遠沈管：ろ過後のフィルターから菌を再浮遊させる時に用いる（注 14）。
- (11) 攪拌機：ボルテックス又は同等品を用いる。
- (12) アルコール綿：ピンセットの消毒に用いる。

注 11 ポリカーボネート製メンブレンフィルターは、均一な表示径の円筒状孔を持つため、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率が下がる場合がある。

注 12 新版レジオネラ症防止指針（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター発行）によると、レジオネラ属菌の菌体サイズは 0.3~0.9 \times 2~20 μ m であり、0.40 や 0.45 μ m のポアサイズのフィルターではトラップされずに通過してしまう場合がある。

注 13 使用後の洗浄時にブラシ等で傷がつかないように注意する。

注 14 他の容器で代用可能であるが、フィルターからの洗い出しはエアロゾルが最も発生

しやすい工程のため、密封できる容器を使用すること。

1) -3 操作

- (1) 安全キャビネット内で操作し、検水量は 500mL とする。
- (2) マニホールドにフィルターホルダーをセットし、チューブでマニホールドと吸引ビン、吸引ポンプ等を繋ぐ。
- (3) フィルターホルダーにメンブレンフィルターを滅菌又はアルコール綿で消毒したピンセットを用いてセットする。
- (4) 検水を注ぐ前に適量の滅菌蒸留水をフィルターホルダーのファネルに注ぎ、ホルダーが適切にセットされているか確認する。
- (5) 採水容器の外側をアルコール綿で消毒後、十分転倒混和し、採水容器から検水をファネルに注ぎ、吸引を開始する（注 15）。
- (6) 検水の全量を注ぎ終わったら、適量の滅菌蒸留水で容器を洗い、その洗浄液もろ過する。ろ過が終了したら、ファネルの内側も同様に洗い、その洗浄液もろ過する。
- (7) 滅菌又はアルコール綿で消毒したピンセットでフィルターを取り出し、5mL の滅菌蒸留水が入った滅菌 50mL 遠沈管等に入れて栓をする。
- (8) 振とうを最大にした攪拌機で遠沈管を 1 分間攪拌する（注 16）。

注 15 検水に強い混濁がある場合には、大孔径のフィルター（材質は指定しない）で前ろ過を行い、そのろ液をろ過濃縮する。

注 16 ISO11731 では改訂前を含め、攪拌時間 2 分以内としているが、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（以下、「厚労科研」という。）「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」平成 30 年度総括研究報告書 p103 において 1 分及び 2 分で比較した結果、ポリカーボネート製メンブレンフィルターでは明確な差は認められなかったため、1 分間とした。

2) 冷却遠心濃縮法

ろ過濃縮が困難（検水の質、検査設備等）と判断された場合に行う。また、その基本操作手順は、ISO 11731:1998 を基礎として検討された JIS K 0350-50-10:2006 を参照すること。

2) -1 器具及び器材

- (1) 冷却遠心機：スイング式ローターは沈殿物がチューブの底に集積し、上清が除去しやすい。アングル式ローターは強い遠心力がかけられる。
- (2) 滅菌したスクリュウキャップタイプ遠沈管（注 17）
- (3) アスピレーター又は滅菌ピペット

注 17 破損のないことを確認し、劣化したものは使わない。

2) -2 操作

- (1) 安全キャビネット内で、検水を十分転倒混和した後、遠沈管に 200±5 mL の検水を注ぐ。遠心加速度 6,000g で 10 分又は 3,000g で 30 分、15～25℃で遠心する(注 18)。遠心はブレーキ設定せず、自然に停止するのを待つ(注 19)。
- (2) 遠沈管を取り出し、安全キャビネット内において、滅菌ピペットもしくはアスピレーター等で液量が 100 倍濃縮となるまで慎重に上清を除去する。滅菌ピペット等で残した液を用いて管壁に付着したレジオネラ属菌を勢いよく洗って剥がし、沈渣とよく混和する。

注 18 使用機器で遠心加速度設定が出来ない場合は、以下の計算式で計算する。

$$\text{遠心加速度 (g)} = 1,118 \times \text{回転半径 (cm)} \times \text{回転速度}^2 \text{ (rpm)} \times 10^{-8}$$

注 19 ブレーキをかける場合は、諸条件を検討し、ブレーキによる影響が出ないことを確認すること。

2.4 前処理

レジオネラ属菌の検出を阻む夾雑菌を抑制するため、培地に接種する前に検水の前処理を行う。方法には、熱処理、酸処理、熱及び酸処理があり、方法により夾雑菌の抑制状況に違いが認められる。レジオネラ属菌の発育を抑制する場合があるので、処理時間には注意を要する。清掃直後等で検水の夾雑菌が少ないと想定される場合は、熱や酸による前処理を行わないこと(未処理)もある。

1) 未処理

本検査方法では、非濃縮検水の検査を実施する場合、原則として未処理とする。

2) 熱処理

2) -1 器具及び器材

- (1) キャップ付き滅菌試験管等：熱処理を行う時に使用する(注 20)。
- (2) 滅菌ピペット等：試料を滅菌試験管に移す時に使用する。
- (3) タイマー：処理時間の計測に使用する。
- (4) ウォーターバス等：熱処理を行う時に使用する。

注 20 熱処理中、試験管内の空気の膨張によりキャップが緩んだり開いたりするのを防ぐため、スクリューキャップタイプを推奨する。

2) -2 操作

試料 0.5mL 以上を滅菌試験管に取り、 $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ に設定したウォーターバス等に 20 分間静置後、速やかに接種する。速やかに接種できない場合は水冷する（注 21、22）。

注 21 新版レジオネラ症防止指針（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター発行）には、 50°C 、20 分及び $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 30 ± 2 分間の 2 通りの記載がある。厚労科研「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」平成 26 年度総括研究報告書 p111 において、 $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、20 分の加熱時間の方がより有効だという検査結果が得られている。

注 22 加熱処理試料は $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ で、再検査まで保存できる。

3) 酸処理

3) -1 試薬

酸処理液：0.2M HCl・KCl 液 pH2.2 \pm 0.2（注 23）

注 23 市販されている。自家調製した場合は、pH を測定し、品質の確保に努めること。

3) -2 器具及び器材

- (1) キャップ付き滅菌試験管等：酸処理を行う時に使用する。
- (2) 滅菌ピペット等：試料及び酸処理液を滅菌試験管に移す時に使用する。
- (3) タイマー：処理時間の計測に使用する。

3) -3 操作

安全キャビネットの中で、試料 0.5mL 以上を滅菌試験管に取り、等量の酸処理液を加え混和し室温で 5 分間静置する（注 24）。

注 24 夾雑菌が多いと予想される場合は、20 分まで処理時間を延長してもよい。酸処理後の検水は保存には適さない。

4) 熱及び酸処理

検水中に夾雑菌が非常に多く、熱処理又は酸処理だけではそれらを抑制できなかった、もしくは抑制できないと予想される場合に実施する。

4) -1 試薬

酸処理液：0.2M HCl・KCl 液 pH2.2 \pm 0.2

4) -2 試料

2.4 前処理 2) 熱処理の工程で作製した試料。

4) -3 器具及び器材

2.4 前処理 3) -2 器具及び器材に準ずる。

4) -4 操作

2.4 前処理 3) -3 操作に準ずる。

2.5 接種

非濃縮検水、前項までに準備した濃縮検水を接種する。

1) 試薬

分離培地：GVPC α 寒天培地、MWY 寒天培地、WY0 α 寒天培地等の選択分離培地（注 25）。

注 25 夾雑菌が少ないと推定される検水からの分離培養には、非選択分離培地である BCYE α 寒天培地で良い結果が得られる場合がある。改訂 ISO 法では清浄度の高い検水の培養には BCYE α 寒天培地の使用を求めている。

2) 器具及び器材

(1) マイクロピペット：100 μ L 及び 200 μ L が量り取れるもの。

(2) 滅菌チップ：100 μ L 及び 200 μ L の試料を培地に接種する。

(3) 滅菌コンラージ棒：試料の培地への塗布に使用する。

3) 操作

(1) インキュベーター（孵卵器）又は安全キャビネット内で、分離培地表面の水滴を取り除く程度まで乾燥させる（注 26）。非濃縮検水及び熱処理試料は 100 μ L を、酸処理試料並びに熱及び酸処理試料は 200 μ L を培地に接種する（注 27）。

(2) 試料を接種後、直ちにコンラージ棒で均等に広げ、試料が吸収されるまで静置する（注 28）。

注 26 乾燥し過ぎるとレジオネラ属菌の検出率が低下する。

注 27 検水中に多数のレジオネラ属菌又は夾雑菌が存在し、菌数を定量的に算出することが困難であると予想される場合は、試料を滅菌リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）等で希釈することで良い結果が得られる場合がある。

注 28 試料が培地に完全に吸収されるまでコンラージ棒で塗布し続けてはいけない。厚労

科研「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」平成 24 年度総括研究報告書 p122 により、コンラージ棒の力加減が出現集落数に影響する可能性が示唆されている。

2.6 培養

1) 器具及び器材

- (1) インキュベーター：培養に使用する。
- (2) 湿潤箱等

2) 操作

- (1) 試料を接種した分離培地を裏返し、培養中の乾燥を防ぐため湿潤箱等に入れる（注 29）。
- (2) 36±1℃に設定したインキュベーターに入れて培養する。
- (3) 培養期間は 7 日間とする（注 30）。

注 29 培養日数が長いことから、培地の乾燥に注意する。蓋付きの水切りバットの外側に純水等を入れて使用する。あるいは、透明ビニール袋に分離培地と湿らせ丸めたペーパータオル等を入れてもよい。

注 30 まれに 7 日目以降にレジオネラ属菌の発育が認められる場合もあるので、7 日目に実体顕微鏡観察で疑わしいコロニーがあれば、培養を 10 日まで続ける。

2.7 分離培地上の集落の観察

1) 器具及び器材

- (1) 実体顕微鏡：分離培地上の集落の観察に用いる。
- (2) 実体顕微鏡用照明装置：光量調節可能で、斜光角度が自由に変えられるフレキシブルアームの装置が望ましい。
- (3) 長波 UV ランプ：集落の自発蛍光の有無の観察に用いる。

2) 操作

- (1) 分離培地を培養開始翌日から 7 日目まで毎日観察する。夾雑菌が少ない場合は、観察日を減らしても良い。レジオネラ属菌は 3 日目から観察されることが多いが、出現が遅い菌もある。レジオネラ属菌は灰白色湿潤集落として観察される。
- (2) 実体顕微鏡下で発育集落に斜光を当て（図 2）、培地上の集落を観察し、モザイク・カットグラス様が確認できた集落（図 3）を、レジオネラ属菌と推定する（注 31、32、33）。斜光法は集落の特徴が確認しやすい暗所で行うことを推奨する。
- (3) 暗所で長波 UV ランプを照射し、集落の自発蛍光の有無を観察することで、自発蛍光

を有する菌種群が選定できる（図 4、表 1）。

- 注 31 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別方法の有用性. 環境感染学会誌, 25:8-13, 2010.
- 注 32 肉眼観察で翌日から確認できる集落はレジオネラ属菌ではない可能性が高い。実体顕微鏡を用いると、培養 2 日目（30～35 時間程度）からレジオネラ様集落を確認できる場合がある。
- 注 33 実体顕微鏡の観察では、エアロゾルは発生しないため、安全キャビネットを必要としないが、培地の取り扱いに十分注意すること。また、分離培地のフタを開けて集落の確認を行う時は、空中落下細菌による汚染に注意する。

2.8 菌の鑑別・同定と計数

本検査方法では、斜光法でレジオネラ属菌と推定された灰白色湿潤集落のうち、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。

1) 試薬

- (1) BCYE α 培地
- (2) L-システイン不含 BCYE α 寒天培地（血液寒天培地、トリプトソイ寒天培地、普通寒天培地でも可）

2) 器具及び器材

白金耳又は白金線

3) 操作

- (1) 斜光法により集落を観察し、レジオネラ属菌と推定される集落を全て数える（注 34）。
- (2) 観察期間中にレジオネラ様集落を適宜釣菌し、L-システイン不含 BCYE α 寒天培地と BCYE α 寒天培地の順に画線培養し、L-システイン要求性の確認を行う（注 35）。釣菌する集落数は、集落数が 10 個以下の場合はすべてとし、それ以上の場合もできる限り釣菌する。
- (3) L-システイン不含寒天培地には発育が認められず、BCYE α 寒天培地に発育した菌をレジオネラ属菌とする（注 36）。

注 34 菌数が極めて多い場合は、分離培地を 4 分割して 1 区画分を計測する。

注 35 釣菌した集落を滅菌生理食塩水に懸濁後、それぞれの分離培地に画線してもよい。夾雑菌と少しでも接触している場合は、BCYE α 培地で分離培養し単一菌としてから、L-システイン要求性試験を実施する。

注 36 釣菌後の培養は 48 時間程度で十分な発育が確認される場合が多い。

4) 菌の算定

- (1) 分離培地ごとにレジオネラ属菌と確定した集落数を算出する。非濃縮検水では、集落 1 個が検水 100mL 中 1,000CFU、100 倍濃縮検水では 10CFU に相当する。レジオネラ様集落の全てを釣菌しない場合、釣菌した集落のうち、レジオネラ属菌と確定された集落数の割合を基に、分離培地全体のレジオネラ属菌集落数を算出する（注 37）。
- (2) 前処理法が異なる場合や、異なる種類の培地に接種した場合、菌数は多い方の値を採用する（注 38）。
- (3) 本検査方法での濃縮検水における不検出は 10CFU/100mL 未満となる。報告に際しては検出下限値を明示する。夾雑菌が多く観察不能のときは「検出不能」とし、レジオネラ属菌「不検出」としてはいけない。

注 37 例えば、濃縮検水を塗布した分離培地の 1/4 区画に発育しているレジオネラ様集落数が 50 個で、25 集落を釣菌し、性状の確認を行い、20 個がレジオネラ属菌であると確認された場合、計算は次のようになる。

$$20 (\text{レジオネラ属菌確定数}) / 25 (\text{釣菌数}) \times 50 (\text{レジオネラ様菌発育数}) \times 4 (\text{分画数}) \times 10 (\text{濃縮係数}) = 1600\text{CFU}/100\text{mL}$$

注 38 夾雑菌等の影響で、濃縮検体からは検出されず、非濃縮検体からは検出されることもある。

2.9 迅速検査法

検水中のレジオネラ属菌由来の核酸（DNA、RNA）を直接検出する方法（迅速検査法）としては、リアルタイム PCR（qPCR）法、LAMP（Loop-mediated isothermal amplification）法、PALSAR（Probe Alternation Link Self-Assembly Reaction）法等を利用した検出試薬キットが市販されている。これらは、レジオネラ属菌の 16S rRNA 等の配列特異性が高く、多コピー存在する核酸を標的としている。

一般的に、迅速検査法は生菌のみならず死菌 DNA や VNC（viable but non-culturable）状態の菌も検出する。すなわち、迅速検査により陽性となった検水にその時点で必ず生菌が存在するわけではない。しかしながら、その結果はレジオネラ属菌の存在履歴を示すことから、衛生管理上の注意が促される。この特性を有効活用する場としては、清掃・消毒管理された検水におけるレジオネラ属菌の陰性確認や、培養法と併用したスクリーニング検査としての利用が挙げられる。迅速検査法のうち、リアルタイム PCR 法は検出試薬キットに添付されている試薬を用いて検量線を作成することにより、遺伝子の定量的な検出が可能である。

迅速検査法で生菌のみを検出するには、DNA 増幅反応前に EMA（ethidium monoazide）処

理をおこなうことで、死菌由来 DNA、膜損傷菌由来 DNA の増幅を抑制し、生菌由来 DNA を選択的に増幅させる（注 39）。EMA 処理前に液体培養を加えてリアルタイム PCR 法を行うと、より平板培養法と高い相関を示す生菌検出方法となる（LC EMA-qPCR 法）。培養法との整合性の観点から、迅速検査法のみで水質基準に適合しているか否かを判断する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法（LC EMA-qPCR 法）を用いる。

迅速検査法は反応系によりそれぞれ特性があるので、検出試薬キットの説明書をよく読み理解して用いる。特に注意を要するのは、検水に含まれる物質により反応が阻害され、偽陰性となることである。したがって、インターナルコントロールを用いるなど、偽陰性確認が可能な検出試薬キットの使用が望ましい。各迅速検査法における結果の判定は、取扱説明書に従う。

注 39 VNC 菌を検出する場合もある。

1) 試薬

市販のレジオネラ属菌検出試薬キットを用いる（注 40）。

注 40 論文等に記載のプライマー、プローブの自家調製も可能であるが、その場合は検出感度や検出精度を把握するための予備実験が不可欠である。

2) 器具及び器材

検出試薬キットの説明書に従って準備する。器具類はすべてディスポーザブル又は滅菌済みのものを使用する。コンタミネーション防止のために、ピペットチップはフィルター付きの製品を使用する。

3) 操作(注 41)

- (1) 100 倍濃縮検水 1~4mL を検出試薬キットの説明書に従って再濃縮する（注 42）。
- (2) 検出試薬キットの説明書に従って DNA 又は RNA を抽出し、増幅反応を行う。常に陽性対照と陰性対照を用意し、反応が正常に進行していることを確認する。

注 41 コンタミネーション防止のために、1. 反応試薬の調製、分注を行うエリア（検水及び核酸を持ち込まない）、2. 検水の濃縮、核酸調製を行うエリア（検水を扱うため安全キャビネットが設置されていなければならない）、3. 陽性対照の調製、添加を行うエリア、の 3 つに作業環境を分けることが望ましい。ピペット等もエリアごとに別のものを使う。

注 42 培養検査と共通の濃縮検水を用いることができる。

3 精度管理

昨今のさまざまな試験検査においては、「信頼性確保のため、精度管理を実施すること」が求められている。レジオネラ属菌検査においても例外ではなく、精度管理は必須と言える。精度管理には、検査施設内で行う内部精度管理と別の機関が実施主体となる外部精度管理に分けられる。各検査施設が外部精度管理に参加したり、内部精度管理を実施したりすることで、信頼性の高い検査結果の保証に繋がる。

内部精度管理で確認する点として、検水の濃縮手順、培地への接種方法、斜光法の手順、レジオネラ属菌の確定方法、算定方法等がある。一例として回収率の確認方法を次に示す。すなわち、保管しているレジオネラ属菌を 30℃で 3 日間培養後、レジオネラ属菌懸濁液を作製し、McFarland 標準液や濁度計等を用いて濁度を測定する。それを適宜希釈し、培地に塗布してあらかじめ濁度と菌数の相関を確認しておく。濁度によりおよその菌数が算出できるレジオネラ属菌懸濁液を希釈したもの（例えば 10⁴CFU/mL 見当）を滅菌生理食塩水等 500mL に適量添加する。それを検水として、自施設の標準手順作業書に従い、検水中のレジオネラ属菌数を算定し、元のレジオネラ属菌懸濁液を培地に塗布した場合と比較して回収率を求める。迅速検査法についても同様に検水を作製し実施する。

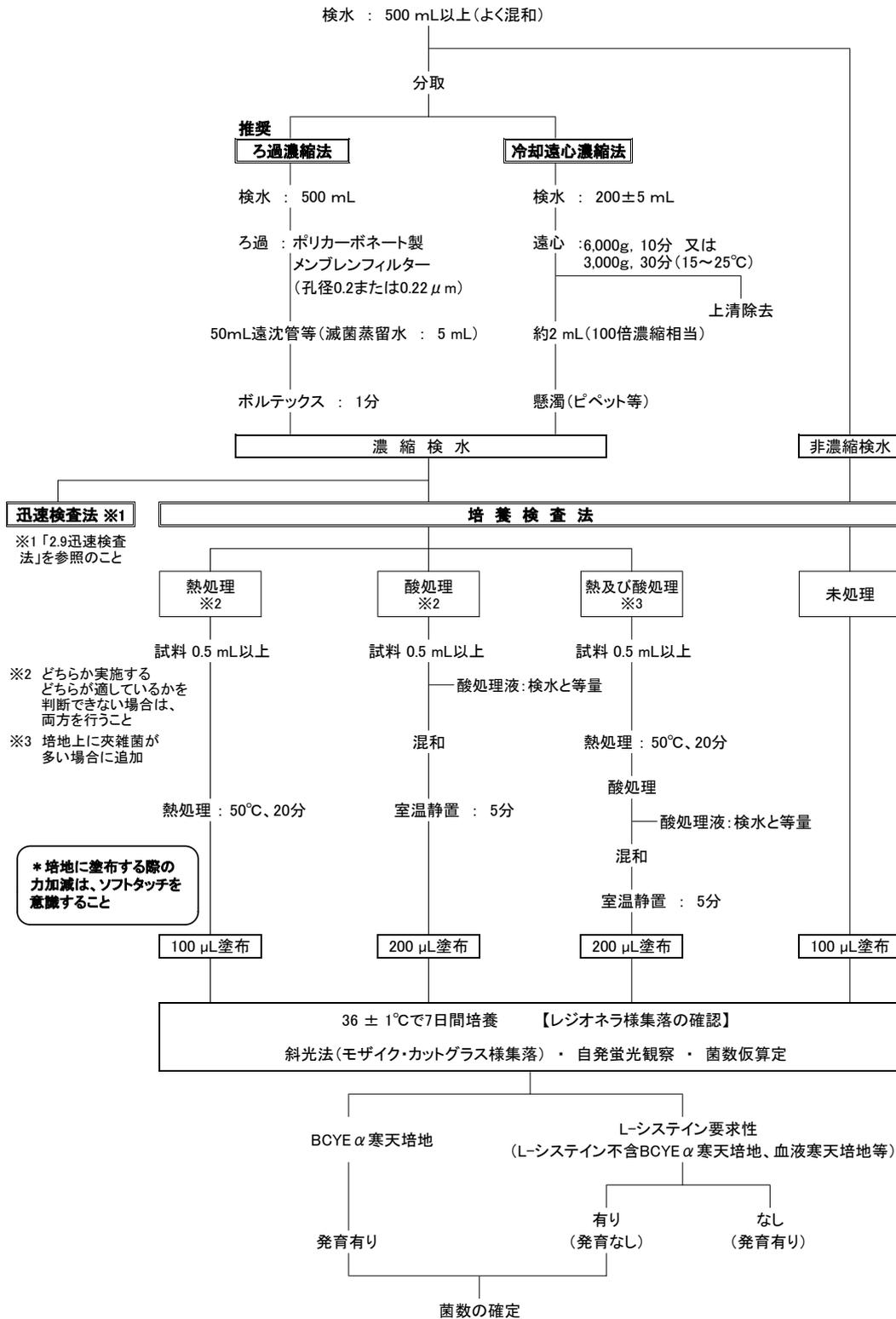


図1 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法

※レジオネラ症患者の発生時の感染源の特定のための検査については、この限りではない。



図2 斜光法による分離培地上の
集落観察

(提供：北海道立衛生研究所 森本 洋氏)

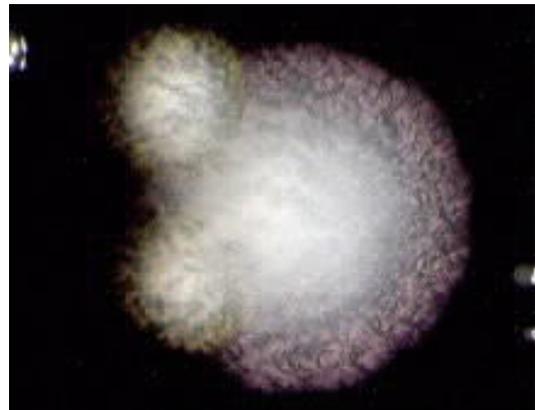


図3 実体顕微鏡で観察される1個の
大きな *L. pneumophila* 血清群1と
2個の *L. cherrii* の集落。
集落周縁部がモザイク・カットグラ
ス様を呈する。

(提供：北海道立衛生研究所 森本 洋氏)

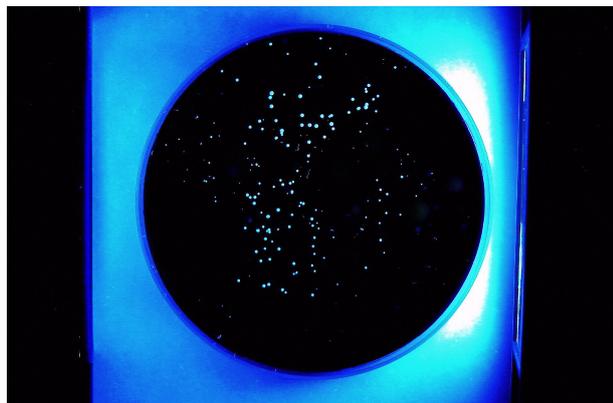


図4 同じ分離培地での可視光（左）と長波長紫外光（右）による観察

(提供：北海道立衛生研究所 森本 洋氏)

表1 長波 UV ランプ照射時のレジオネラ属菌 61 種の自発蛍光の有無

	自発蛍光		自発蛍光		自発蛍光
<i>L. anisa</i>	+青白	<i>L. adelaidensis</i>	-	<i>L. longbeachae</i>	-
<i>L. bozemanae</i>	+青白	<i>L. beliardensis</i>	-	<i>L. maceachernii</i>	-
<i>L. cherrii</i>	+青白	<i>L. birminghamensis</i>	-	<i>L. massiliensis</i>	-
<i>L. dumoffii</i>	+青白	<i>L. brunensis</i>	-	<i>L. micdadei</i>	-
<i>L. gormanii</i>	+青白	<i>L. busanensis</i>	-	<i>L. moravica</i>	-
<i>L. lytica</i>	+青白 V	<i>L. cardiaca</i>	-	<i>L. nagasakiensis</i>	-
<i>L. parisiensis</i>	+青白	<i>L. cincinatiensis</i>	-	<i>L. nautarum</i>	-
<i>L. qingyii</i>	+青白	<i>L. drancourtii</i>	-	<i>L. norrlandica</i>	-
<i>L. rowbothamii</i>	+青白	<i>L. drozanskii</i>	-	<i>L. oakridgensis</i>	-
<i>L. saoudiensis</i>	+青白	<i>L. fairfieldensis</i>	-	<i>L. pneumophila</i>	-
<i>L. steelei</i>	+青白 V	<i>L. fallonii</i>	-	<i>L. quateirensis</i>	-
<i>L. steigerwaltii</i>	+青白	<i>L. feeleii</i>	-	<i>L. quinlivanii</i>	-
<i>L. tucsonensis</i>	+青白	<i>L. geestiana</i>	-	<i>L. sainthelensi</i>	-
<i>L. dresdenensis</i>	+暗赤	<i>L. gratiana</i>	-	<i>L. santicrucis</i>	-
<i>L. erythra</i>	+暗赤	<i>L. gresilensis</i>	-	<i>L. shakespearei</i>	-
<i>L. rubrilucens</i>	+暗赤	<i>L. hackeliae</i>	-	<i>L. spiritensis</i>	-
<i>L. taurinensis</i>	+暗赤 V	<i>L. impletisoli</i>	-	<i>L. thermalis</i>	-
		<i>L. israelensis</i>	-	<i>L. tunisiensis</i>	-
		<i>L. jamestowniensis</i>	-	<i>L. wadsworthii</i>	-
		<i>L. jordanis</i>	-	<i>L. waltersii</i>	-
		<i>L. lansingensis</i>	-	<i>L. worsleiensis</i>	-
		<i>L. londiniensis</i>	-	<i>L. yabuuchiae</i>	-

V : 株により異なる。

叩き台

別添 浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法（案）

概 要

公衆浴場におけるレジオネラ属菌検査については、平成12年12月15日付け 公衆浴場における衛生等管理要領等について（生衛発第1811号厚生省生活衛生局長通知）で初めて「公衆浴場における水質基準等に関する指針」に盛り込まれた。その後、平成15年2月14日付け 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について（健発第0214004号厚生労働省健康局長通知）において、また、その具体的手順は「新版レジオネラ症防止指針」の「＜付録＞1 環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること、という一文が加えられ現在に至っている。レジオネラ属菌検査法については、平成21年度の生活衛生関係技術担当者研修会で検査施設間差が指摘され、「検査法の確立」と「行政・民間の精度管理のあり方」について質疑応答がなされ、その後、厚生労働科学研究内で検討されてきたが、この度、前述「新版レジオネラ症防止指針」記載検査法の根拠となっているISO法の改定が行われたことなどから、これまでの「新版レジオネラ症防止指針」をベースに、厚生労働科学研究の成果及びレジオネラ症（国立感染症研究所病原体検出マニュアル）と合わせ検討し、新たにレジオネラ属菌標準的検査法を作成することとなった。なお、ここで示す標準的検査法は、一般的な浴槽水の自主検査等に必要と考えられる基本的な検査工程に加え、レジオネラ感染症発生時の感染源調査等において、より詳細な検査が必要となった場合にも対応できるような記載にした。また、厚生労働科学研究内で、検査法と合わせて検討を重ねてきた精度管理についても、その必要性について記載した。

留意事項

レジオネラ属菌培養法の基本は、BCYE α 寒天培地（非選択分離培地）を用い、36°C前後で培養することである。改訂されたISO11731:2017 Water quality - Enumeration of Legionella（以下改訂ISO法）では、検体となる環境水の状況に応じ使用培地や前処理法を選択するよう記載されており、清浄度が高いと考えられる検体については、BCYE α 寒天培地の使用や前処理をしないなどの検査対応も含まれている。一方で、清浄度が中等度から低いと考えられる検体については、非濃縮検体の検査、選択分離培地の使用、熱や酸による前処理の実施について記載されている。現在、国内における浴槽水の検査においては、混在する細菌・真菌叢の状況を予測することが困難なため、培地上でレジオネラ属菌の発育を阻害する様々な細菌・真菌が検体中に存在していることを前提とした検査対応をすることが一般的となっている。そのため、本法においても、選択分離培地の使用及び熱や酸

による前処理を行うことを基本とした。ただし、レジオネラ感染症発生時等においては、その感染源調査において、より詳細な検査が求められる可能性もあることから、検体の状況に合わせた検査法についても記載した。

本来検体を濃縮する工程は、レジオネラ属菌数が少ないと想定される場合に有用となるが、前述の通り、国内においては、浴槽水に混在する細菌・真菌同様、レジオネラ属菌についてもその菌数を予測することが困難な検体についての検査が一般的であるため、濃縮検体に加え非濃縮検体の検査実施についても記載した。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根拠立てて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した。

濃縮法については、ろ過濃縮法と冷却遠心濃縮法が利用されているが、これまでの厚生労働科学研究において、これら2つの濃縮方法を同一検体に対し比較した報告によると、ろ過濃縮法の方が冷却遠心濃縮法よりも検出菌数が多く、また菌数が少ない場合、ろ過濃縮法でしかレジオネラ属菌が検出されなかった場合があった。また同様に、改訂されたISO法でもろ過濃縮法を強く推奨している。これらのことから、本法においても、ろ過濃縮法を推奨した。

なお、これまでの厚生労働科学研究において、使用培地・前処理方法・培地への塗布方法・非濃縮検査の有無・濃縮方法・その他濃縮工程等の違いが、単独または複数組み合わせることで、検査結果に影響する可能性を報告してきた。ここでは、検査工程ごとで必要となる基本的な注意事項のほかに、検査結果に影響する可能性のあるポイントも示した。より詳細な検査を必要とする場合には参考にしていきたい。

分離培地上のレジオネラ集落は、一般的に灰白色湿潤集落を形成するが、実際の検査現場においては、分離培地上に雑菌が多数発育している場合や種々の灰白色湿潤集落が発育している場合が多く、その集落の選定においては、検査者を悩ませることがしばしばある。この様なとき、分離培地上の発育集落に斜光を当て、実体顕微鏡で観察すると、レジオネラ属菌は、特徴的な外観構造（カットグラス様、モザイク様）を呈する（**2.7 培地上の集落の観察参照**）。この集落観察法を利用することで、効率よく集落を選定でき、より正確な定量結果を報告することが可能となることから、本法での推奨法とした。

昨今のさまざまな試験検査においては、信頼性確保のための精度管理を実施することが求められている。このことは、レジオネラ属菌の検査についても同様である。精度管理には、検査施設内で完結させる内部精度管理と共通の試料を用いることによって他施設との比較が可能な外部精度管理に分けられる。各検査施設がこれら精度管理を実施することで、より適切な検査結果の保証に繋がることから、検査施設には積極的な対応が望まれ、検査依頼者もその依頼にあたっては、依頼施設が適切に精度管理を行っているかを確認することが望ましい。

1 試料の採取

1) 試薬

(1) チオ硫酸ナトリウム：25%の溶液を作製する。

2) 器具及び器材

(1) 採水容器：容量が 500mL あるいは 1000mL のポリプロピレンやポリエチレン製またはガラス製などの密栓ができる容器で、滅菌してあるもの。

(2) 柄杓：採水に用いる。滅菌したプラスチック容器を用いることもできる。

(3) 保冷箱：採水した検体の搬送に用いる。

(4) 保冷剤：採水した検体の保冷に用いる。

3) 採取手技

容器入水による採水方法の場合、浴槽水中にレジオネラ属菌が存在していると、容器表面へレジオネラ属菌が付着することが考えられる。このような検水が検査室に持ち込まれると、場合によっては検査室内での相互汚染が懸念される。そのため、採水には消毒した柄杓等を使用し、採水容器表面を検水で濡らさないように採水すること。採水者は、容器表面が検水で濡れた場合、十分に水分を拭き取りアルコール綿等で消毒すること。複数の検体を採取する場合は必要数の滅菌した柄杓を準備するか、採取するたびにアルコールで柄杓を消毒して使用する。 **注1** 検水で容器を満杯にせず、上部に空間を残すように採水すること。 **注2** 採水後はねじ栓を固く締め、パラフィルム等で固定するのが望ましい。 **注3**

水道水や浴槽水のように塩素を含んでいる水試料を採取する場合には、採水容器にあらかじめ 25%チオ硫酸ナトリウム溶液を 1/500 量を加えて滅菌しておく。または、採水後、無菌的に 25%チオ硫酸ナトリウム溶液を 1/500 量添加する。

注1 容器入水による採水を行った場合、及び容器表面が検水で濡れた場合には、そのことを検査者に伝えること。検査者は、状況により、搬入後、容器周囲を消毒してから検査を行うこと。

注2 開栓時にこぼさないようにするためと、採水容器内に酸素を残すためとされている。

注3 浴槽水など温かい検水を採取した時は、温度が下がると合成樹脂容器が収縮して栓がゆるみ検水が漏れることがあるので注意する。

4) 採水量

採水量については、検査精度を 10CFU/100ml にするため、最低 100ml 以上を必要とする

が、ここでは、500ml のろ過濃縮法を推奨している（**2.3 試料の濃縮**参照）。このことから、一般的な浴槽水の自主検査においては 500ml 以上、レジオネラ感染症発生時の感染源調査では、予備の検水確保のため、ろ過量の倍量である 1000ml 以上を採水すること。なお、冷却遠心濃縮法で対応する場合には、JIS K 0350-50-10:2006 を参照し、自施設の機材に合わせ対応すること。ただし、ろ過濃縮では 500ml が検査に供試されることから、可能な限り 500ml に近い検水量が望ましい。また、レジオネラ感染症発生時の感染源調査では、基本遠心量の倍量以上を確保すること。

5) 試料の搬送と保存

検水採水後の採水容器は、直射日光を避けるため保冷箱等に入れ、保冷剤で 6～18℃に保って搬送する。 **注4**

検査は、検査室に搬入後ただちに実施することが推奨される。ただちに実施できない場合は、6±2℃で冷蔵保存し、採水後 2～5 日以内に実施することが望ましい。予備検体及び濃縮検体の保存は 14 日を超えてはならない。 **注5、6、7、8**

注4 自主的に搬送する場合、温度を一定に保つことは難しいが、レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバによる影響押さえ、検水中の微生物層を可能な限り安定させることが必要となる。そのため 6～18℃で搬送すること。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とする。

注5 集団事例発生時には、培養後の予備検体及び残余濃縮検体を 3 カ月まで保存すること。

注6 検水の輸送又は保存中に生菌数が変化する可能性も念頭に置くこと。

注7 検体の採取から検査までに要した時間を報告書に記載すること。

注8 検査に供するまでの保存期間、保存温度等が検査結果に影響を及ぼしている可能性がある場合は、そのことを報告書に付記すること。

2 検査

2.1 はじめに

検査は、検体中にレジオネラ属菌が存在している可能性を常に意識し、P2 実験室内で BSL2 の取り扱い基準に従い実施すること。操作によってエアロゾルを発生する可能性が有るとき（**注9**）は、レベル2の安全キャビネット内で作業すること。このことは検査者の感染防護、検査施設内汚染等を考える上で重要である。

検査工程を図 1 に示す。非濃縮検水と濃縮検水を同時に検査することを基本とし、一般的な検水についての必須検査として、非濃縮検体に未処理、濃縮検体について熱処理及び酸処理を実施し培養する（**2.5 接種**参照）。なお、濃縮法はろ過濃縮法を推奨する（**2.**

3 試料の濃縮参照)。

発育集落の観察には斜光法を推奨する (2. 7 培地上の集落の観察参照)。

注9 培地への接種、濃縮工程、ピペットからの吹き出し、遠心、攪拌、強い振とうや混合、超音波破碎、等。

2.2 レジオネラ用培地

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。成分表に準じて培地を自家調製した場合は、レジオネラ属菌の分離性能の検証(雑菌の抑制を含む)を行い、そのデータを保管する。

1) 非選択分離培地：BCYE α 寒天培地

レジオネラ属菌は、酵母エキスやペプトン等を含む一般的に利用される細菌培養用の培地には発育することができない。そのため、Feeley らにより鉄成分と特にその発育に必須となる L-システイン、及び発育阻害物質を吸着するための活性炭末を加えた CYE (Charcoal yeast extract) 寒天培地が考案された。その後、Pasculle らによって培地の緩衝性を高め発育時間を短縮するため ACES Buffer を加えた BCYE (Buffered charcoal yeast extract) 寒天培地が考案され、さらに Edelstein らにより α -ケトグルタル酸カリウムの添加により本菌の発育が促進されると報告されたことにより、現在の BCYE α 寒天培地となった。本培地は、国内でレジオネラ属菌の培地を扱うすべてのメーカーから入手することが可能である。 注10

利用法：L-システイン要求性試験 (2. 8 菌の鑑別・同定と計数参照)、釣菌後の一般的な培養、混在する雑菌が少ないと推定される検水への分離培養など。

注10 メーカーによって成分組成が若干異なっていたり、同じ組成であったとしても異なるメーカーの寒天、酵母エキス、活性炭末等によって、形成集落の大きさ等に違いが見られることがある。検査者は、事前に自施設で使用している培地上でのレジオネラ属菌集落を経日的に観察し確認しておく必要がある。

2) 選択分離培地：GVPC α 寒天培地、MWY 寒天培地、WY0 α 寒天培地等

現在国内で市販され普及している主なものを示した。いずれの培地も、BCYE α 寒天培地を基礎培地として考案された選択分離培地である Wadowsky and Yee の GVP 寒天培地を改良して作られた培地である。改訂 ISO 法では、選択分離培地として GVPC α 寒天培地を推奨しているが、新版レジオネラ症防止指針にも記載されていたとおり、レジオネラ純培養菌の浮遊液を用いて BCYE α 寒天培地と比較した実験では、これら3種の選択分離培地の発育支持力に大差はなく、検水中に混在する細菌・真菌叢の抑制にどの選択剤が有

用かにかかっていることから、ここでは特に培地の種類を指定しない。 注 11、12

利用法：一般的な検水からのレジオネラ属菌の分離培養。

注 11 使用されている選択剤は、レジオネラ属菌の発育にも影響を与えている場合があるので注意すること。また、基礎培地である BCYE α 寒天培地のメーカー間差に加え、添加されている選択剤の影響により、異なる種類の培地はもとより、同じ名称の培地であっても、少なからずメーカー間差があることに注意すること。

注 12 各種選択分離培地に同一のレジオネラ菌株が発育していたとしても、その集落形状に違いが認められる場合があることから、検査者は、事前に自施設で使用している培地上でのレジオネラ属菌集落を経日的に観察し、確認しておくこと。

3) 培地の保存

市販の生培地には、それぞれ使用期限が示されている。メーカーによって使用期限が異なる培地があるので、よく確認すること。粉末基礎培地と添加物を用いて最終自作した培地では、発育支持力や選択能力の経時的変化があることを考慮し、できるだけ新鮮なものを使用すること。保存温度は 4°C が一般的ではある。 注 13、14

注 13 保存中の乾燥や結露、カビの発生には十分注意し、実験前に使用に適当な状況であるか判断する。生培地が消費期限内であっても、使用前に十分確認すること。

注 14 少量であれば嫌気ジャーで、大量であればクーラーボックスに入れ密封し冷蔵保存することで乾燥と結露をかなり防ぐことが出来る。自家調製培地においても、適切な保存により、3 カ月間のレジオネラ属菌発育性能を保持することが可能である。

2.3 試料の濃縮

ここでは、ろ過による濃縮を推奨する。

本操作は、安全キャビネット内で実施する。

1) メンブレンフィルターろ過濃縮法

1) - 1 試薬

(1) 滅菌蒸留水：ろ過後のフィルターから菌を再浮遊させるのに用いる。また、採水容器やフィルターホルダーに残る検水を洗い流す場合に用いる。

(2) 消毒用エタノール：アルコール綿の作製に用いる。

1) - 2 器具及び器材

(1) ポリカーボネート製メンブレンフィルター：ポアサイズ 0.20 μm または 0.22 μm が推奨される。メーカーの違いは特に問わない。 注 15、注 16

(2) フィルターホルダー：ガラス製でもポリカーボネート製でも構わない。ポリカー

ボネート製では使用後の洗浄時にブラシなどで傷がつかないように注意する。 注 17

- (3) マニホールド：多数の検体を処理するには多連のマニホールドが便利であるが、検体数が少なければ吸引ビンで代用することもできる。
- (4) 吸引ポンプ：特に指定しない。
- (5) 吸引ビン：マニホールドに繋いで廃液を貯めるのに用いる。検体数に応じて容量を決める。
- (6) シリコン栓：吸引ビンに使用する。
- (7) ガラス管：シリコン栓に刺して用いる。チューブの太さに合わせる。
- (8) チューブ：マニホールドと吸引ビン、吸引ポンプを繋ぐ。
- (9) ピンセット：メンブレンフィルターの操作に用いる。
- (10) スクリューキャップタイプの滅菌 50mL 遠沈管：ろ過後のフィルターから菌を再浮遊させる時に用いる。 注 18
- (11) 攪拌機：ボルテックスあるいは同等品を用いる。
- (12) アルコール綿：ピンセットの消毒に用いる。(検体数に応じ、事前に滅菌ピンセットを準備することで、検体ごとに交換する対応方法も)
- (13) 安全キャビネット：レジオネラ属菌は BSL2 に属する病原体であり、検体の操作時の感染を予防するために、安全キャビネット内での操作が推奨される。

注 15 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。改訂 ISO 法においても、ポリカーボネートタイプフィルターが推奨されている(他にポリエーテルスルホンフィルターが推奨されている)。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。

注 16 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は $0.3\sim 0.9\times 2\sim 20\mu\text{m}$ 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、 0.40 や $0.45\mu\text{m}$ 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 $0.2\mu\text{m}$ と規定されている。

注 17 吸引ビンと一体化している製品もあり、個別対応する時に便利である。

注 18 他の容器で代用可能であるが、フィルターからの洗い出しはエアロゾルが最も発生しやすい工程のため、密封出来るタイプの容器を使用すること。

1) - 3 操作

- (1) ろ過濃縮する場合の検水量は 500mL とする。
- (2) マニホールドにフィルターホルダーをセットし、チューブでマニホールドと吸引ビン、吸引ポンプを繋ぐ。
- (3) フィルターホルダーにメンブランフィルターを滅菌またはアルコール綿で十分に消毒したピンセットを用いてセットする。この時にフィルターの表裏に注意する。
注 19、20
- (4) 採水容器から検水をフィルターホルダーに注ぎ、吸引を開始する。 **注 21、22**
- (5) 検水の全量を注ぎ終わったら、適量の滅菌蒸留水で容器を洗い、洗浄液もろ過する。
- (6) 全量をろ過し終わったら、適量の滅菌蒸留水でフィルターホルダーの内側を洗浄し、その洗浄液もろ過することを推奨する。
- (7) ろ過が終了したら滅菌またはアルコール綿で十分に消毒したピンセットでフィルターを取り出し、5mL の滅菌蒸留水が入った滅菌 50mL 遠沈管などに入れて栓をする。 **注 23**
- (8) 遠沈管を攪拌機で振盪を最大にして 1 分間攪拌する。 **注 24**

注 19 包装製品のラベル側を捕集面。(光沢度が高い側) にすることを推奨する。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。

注 20 フィルターホルダーと吸引ビンが一体化している製品などでは、検体数に応じ、フィルターセット後個別滅菌しておく対応方法も。

注 21 検水を注ぐ前に一度滅菌水を注ぎ、ホルダーが適切にセットされているか確認する。

注 22 検体に混濁があり、ろ過時間がかかることが予想される場合は、プレフィルター(大孔径のフィルター、材質は指定しない)でろ過後、孔径 0.2~0.22 μm のポリカーボネートメンブランフィルターで再ろ過を行うことで対応。

注 23 ろ過フィルターは、滅菌蒸留水にひたすとしているが、塩分が含まれる温泉水等を検査する時などは、滅菌生理食塩水の利用で良い結果が得られる場合がある。また、検体ごとにろ過後の水が貯留されている場合は、そのろ過水を利用することで良い結果が得られる場合がある。

注 24 ISO 法では改訂前を含め、洗浄時間 2 分以内と記載されているが、厚生労働科学研究において 1 分及び 2 分で比較した結果、明確な差は認められなかったため、これまで通り 1 分とした。

2) 冷却遠心濃縮法

ろ過濃縮が困難（検体の質、検査設備等）と判断された場合に行う。またその基本操作手順は、ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10:2006（以下 JIS 法）を参照すること。

操作概略 注 25、26、27、28、29（以上改訂 ISO 法）、注 30

(1) 遠心条件

遠心加速度 6000g で 10 分又は 3000g で 30 分、15～25℃で遠心する。 **注 31**

使用機器で遠心加速度設定が出来ない場合は、以下の計算式で機種ごとに計算する必要がある。

$$\text{遠心加速度 (g)} = 1118 \times \text{回転半径 (cm)} \times \text{回転速度}^2 \text{ (rpm)} \times 10^{-8}$$

(2) 上清除去

デカンテーションによる上清除去の場合、沈渣も同時に除去されやすいことから、滅菌ピペットもしくはアスピレーター等で慎重に除去することを推奨する。この場合、上清を全量除去せず、100 倍希釈となる液量を残すように除去する。 **注 32**

注 25 検体中の沈殿物がハイレベルであり、ろ過濃縮が困難な場合において遠心濃縮を行う。

注 26 ローターは、沈殿物がチューブの底に集約し安定しており、上清が除去しやすいことから、スイングローターが最も良い。アングルローターでは、沈殿物が不安定であり、このドキュメントにある他のどの方法よりも回収率が低い。

注 27 検体をよく混ぜた後、300～500ml の滅菌したスクリーキャップタイプの遠心管に 200±5ml 検体を注ぎ、遠心加速度 6000g で 10 分又は 3000g で 30 分、15～25℃で遠心する。（操作についての説明であり、総検体量を 200±5ml とすること、との記載ではない。）

注 28 遠心中にボトルが破損した場合のエアロゾルによる曝露を防ぐため、開封前のローターごと安全キャビネットに入れる。

注 29 上清は、沈殿物のロスを避けるために、デカンテーションよりもバキュームによる除去を推奨する。再懸濁のための希釈量を調整しながら除去する。

注 30 総遠心量はろ過濃縮法同様 500mL にする。

注 31 遠心終了時のブレーキは設定せずに自然に停止するのを待つ。

注 32 遠心管の内側表面にレジオネラ属菌が付着しているため、菌をはがすために懸濁溶液を用いてピペットで表面を勢いよく洗う。この洗浄操作は回収率に影響する。必ず安全キャビネット内で行うこと。

2.4 検水の前処理

前処理には、未処理、熱処理、酸処理、熱+酸処理がある。熱処理、酸処理、熱+酸処理は、検水中に混在する細菌・真菌叢が、選択分離培地だけでは上手く抑制することができないことを想定し実施する工程であるが、これら前処理は、同じ処理能力を有しているわけではなく、検水ごとに前処理状況に応じレジオネラの検出率に違いが認められる場合がある。なお、選択分離培地同様、熱処理、酸処理、熱+酸処理がレジオネラ属菌自体にも影響をあたえている場合があるので注意する。

1) 未処理 注 33

検水に対し、前処理を行わないこと。本法では、非濃縮検体の検査を実施する場合、必須とする。

注 33 検体の清浄度が高いと想定される場合に実施する(改訂 ISO 法でも同様の記載あり)と、良い結果が得られやすい。

2) 酸処理

2) - 1 試薬

(1) 酸処理液 : 0.2M HCl・KCl 液 pH2.2±0.2 注 34

注 34 市販の酸処理液を使用する場合は、保管温度、使用期限を遵守すること。自家調製した酸処理液を使用する場合は、必要に応じ pH を測定し、品質の確保に努めること。特に長期間使用していなかった場合は、使用前に確認すること。

2) - 2 器具及び器材

- (1) キャップ付き滅菌試験管等 : 酸処理を行うのに使用する。
- (2) 滅菌ピペット等 : 試料及び酸処理液を滅菌試験管に移すのに使用する。
- (3) 時計またはストップウォッチ : 処理時間の計測に使用する。

2) - 3 操作

非濃縮の検水、ろ過あるいは遠心により 100 倍に濃縮された試料それぞれ 0.5mL を滅菌試験管に取り、等量の酸処理液を加え混和し 25°C 程度の室温で 4 分間静置する。

注 35、36、37、38

注 35 検水を各試験管に移したり、酸処理を行う工程は安全キャビネット内で実施すること。

注 36 参考文献によって、反応時間が異なっている場合があるが、その手技上では、反応時間後の接種、塗布の間も反応しており時間差が生まれている。これらを含め 5 分前後の反応時間においては、レジオネラ属菌の検出に大きく影響を与えることはな

い。

注 37 参考文献によっては、共存するレジオネラ属菌以外の微生物の量が多いと予想される場合には、20 分まで処理時間を延長しても良いとされている。しかしながら、検体に含まれるその他微生物の状況により結果は異なり、すべての場合に対応できるというわけではない。また、反応時間の延長は、検体中のレジオネラ属菌自体にも影響を与えている可能性があるので、注意すること。

注 38 前処理後の検体を保存するのには適していない。

3) 熱処理

3) - 1 試薬

(1) 特になし。

3) - 2 器具及び器材

(1) キャップ付き滅菌試験管等：熱処理を行うのに使用する。 **注 39**

(2) 滅菌ピペット等：試料を滅菌試験管に移すのに使用する。

(3) 時計またはストップウォッチ：処理時間の計測に使用する。

(4) ウォーターバス：熱処理を行うのに使用する。 **注 40**

注 39 熱処理中、試験管内の空気の膨張によりキャップが緩んだり開いたりするのを防止すること（スクリューキャップタイプを推奨）。

注 40 機器の表示温度だけではなく実際の温度を処理前に確認すること。代替としてヒートブロックを使用する場合は、特に注意すること。

3) - 3 操作

非濃縮の検水、ろ過あるいは遠心により 100 倍に濃縮された試料それぞれ 1mL を滅菌試験管に取り、 $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ に設定したウォーターバスに 20 分間静置し試料とする。速やかに培地に接種出来ない場合は、反応時間後の余熱による影響を考慮し水冷する。

注 41、42、43、44

注 41 新版レジオネラ症防止指針には、 50°C 、20 分及び $50^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 30 ± 2 分間の 2 通りの記載がある。厚生労働科学研究において、 $50^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、20 分の加熱時間で十分な検査結果が得られていることから、本法ではこちらを採用した。

注 42 検体を 60°C 、4 分以上処理すると、検出率はきわめて低率となるので注意温度管理には十分注意をすること。

注 43 水冷は避けること。

注 44 前処理後の検体を保存 ($6\pm 2^{\circ}\text{C}$) する場合に適した方法である。

4) 熱+酸処理

検体中に混在する細菌・真菌叢が非常に多く、前述の熱処理又は酸処理だけではそれら雑菌を抑制できなかった、もしくは抑制できないと予想される場合に実施する。

4) - 1 試薬

(1) 酸処理液：0.2M HCl・KCl 液 pH2.2±0.2

4) - 2 試料

(1) 熱処理液：3) 熱処理で作製したものを使用する。

4) - 3 器具及び器材

(1) キャップ付き滅菌試験管等：酸処理を行うのに使用する。

(2) 滅菌ピペット等：試料及び酸処理液を滅菌試験管に移すのに使用する。

(3) 時計またはストップウォッチ：処理時間の計測に使用する。

4) - 4 操作

熱処理した試料又は熱処理後保存していた試料の適量を滅菌試験管に取り、等量の酸処理液を加え混和し25℃程度の室温で4分間静置する。 注45、46

注45 2) 酸処理の注意事項に準じる。

注46 検体により結果は異なり、すべての場合に対応できるというわけではない。

2.5 接種

これまでの参照検査法である新版レジオネラ症防止指針同様に、検水中のレジオネラ属菌数を予測できないので、非濃縮検水と濃縮検水を同時に検査する。なお、本法では、一般的な検水について、非濃縮検水に未処理、濃縮検水について熱処理及び酸処理を実施した試料を選択分離培地で培養することを必須検査とする。ただし、レジオネラ属菌数が少ないと根拠立てて推定される場合は、濃縮検水のみでの検査対応も可とする。 注47、48

注47 これまで参照検査法となっていた新版レジオネラ症防止指針には、菌数を予測できないので、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査する、またそれぞれの検体に対し、未処理、酸処理、熱処理した検水を接種する、と記載されている(6つの異なる条件を選択分離培地各1枚、計6枚)。厚生労働科学研究において、本条件を検証した結果、様々な状況の検体に対し幅広く対応できる方法であることが確認された。患者発生事例等、より詳細な結果が求められる場合の検査条件として推奨する。

注48 必要に応じ熱+酸処理試料を接種する。

1) - 1 試薬

- (1) 分離培地：GVPC α 寒天培地、MWY 寒天培地、WY0 α 寒天培地等の適切な選択分離培地。 注 49
- (2) 滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4)

注 49：清浄度が高く混在する雑菌が少ないと推定される検水への分離培養には、非選択分離培地である BCYE α 寒天培地の使用で良い結果が得られる場合がある。改訂 ISO 法では清浄度の高い検体への BCYE α 寒天培地の使用を求めている。

1) - 2 器具及び器材

- (1) 滅菌試験管：試料の希釈に使用する。
- (2) 滅菌 1mL ピペット：試料の希釈に使用する。
- (3) 滅菌 5mL または 10mL ピペット：リン酸緩衝生理食塩水の滅菌試験管への分注に使用する。
- (4) マイクロピペット：100 μ L 及び 200 μ L の試料を培地に接種する。
- (5) 滅菌コンラージ棒：試料の平板培地への塗布に使用する。

1) - 3 操作

- (1) 使用する分離培地 1 枚につき、酸処理（熱+酸処理）後では 200 μ L を、加熱処理後及び未処理では 100 μ L を接種する。 注 50、51、52
- (2) コンラージ棒で培地に接種した試料を培地表面に均等に塗布する。コンラージ棒の力加減は、ソフトタッチを意識する。 注 53

注 50 試料を接種する前に分離用培地の表面を乾燥させる必要が往々にしてあるが、表面にしわがよるほど乾燥させるとレジオネラ属菌の検出率が低下するので、乾燥しすぎないように注意する。ただし、培地メーカーでは、市販生培地表面の乾燥を必要としないと回答する場合がある。検査者は、実験前に使用に適当な状況であるか確認し判断すること。保存中の結露等により、培地表面に水滴がみられる場合には、乾燥の前に滅菌ピペット等で取り除く。

注 51 検水中に多数のレジオネラ属菌あるいは雑菌が存在し、菌数を定量的に算出することが困難であると予想される場合は、未処理試料と酸処理及び熱処理試料を 10 倍段階希釈することで良い結果が得られる場合がある。

注 52 酸処理試料は培地 2 枚に各 100 μ L ずつ接種する方法で対応しても良いが、培地 1 枚に 200 μ L 接種で十分対応できることが確認されている。もし培地を増やすことが可能である場合は、注 47 に記載した別の接種条件を増やすことを推奨する。

注 53 厚生労働科学研究により、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。接種した試料が培地表面に均等に広がるよう、コンラージ棒の重さだけを利用し塗布し、強く塗り込むことを避ける。特に酸処理試料では接種量が多いため、培地に吸収されるまでに時間を要することがある。試料が培地に完全に吸収されるまでコンラージ棒で塗布する必要はない。試料が培地表面にほぼ均等に塗布された時点で塗布をやめ、試料が吸収されるまで静置する。

2.6 培養

1) - 1 試薬

(1) 特になし。

1) - 2 器具及び器材

(1) インキュベーター (孵卵器) : 分離培地の培養に使用する。

(2) 湿潤箱等 : 培養中の分離培地乾燥防止のために使用する。 注 54

1) - 3 操作

(1) 試料を接種した分離培地を裏返し、培養中の乾燥を防ぐため湿潤箱等に入れる。

(2) 36±1℃に設定したインキュベーターに入れて培養する。

(3) 培養期間は7日間とする。 注 55

注 54 本菌の培養日数が長いことから、培地の乾燥に注意をしなければならない。蓋付きの水切りバットの外側に純水を入れ、内側に分離培地を入れてインキュベーターに入れると良い。検水ごとに、透明なビニル袋に分離培地と湿らせ丸めたペーパータオル等を入れ、口を結び（状況によって輪ゴムを利用）インキュベーターに入れると場所をとらない。

注 55 まれに7日目以降にレジオネラ属菌が発育してくる場合もあるので注意が必要であるが、発育集落の観察に斜光法（2.7 培地上の集落の観察参照）を利用することで、7日目以降の見逃しを軽減させることができる。

2.7 分離培地上の集落の観察

本法では、一般的な検水について、非濃縮検水に未処理、濃縮検水について熱処理及び酸処理した試料を選択分離培地で培養することを必須検査としたが、この検査条件で雑菌数が多く培養初期から観察が困難と判断された場合は、注 45 に記載した異なる別の条件及び熱+酸処理をする条件を増やすなどで可能な限り再検査を実施する。 注 56

注 56 最終的に夾雑菌が多く観察不能のときは「不能」とし、レジオネラ属菌「不検出」としてはいけない。

1) - 1 斜光法

分離培地上の発育集落に斜光を当て、実体顕微鏡で観察（図 2）すると、レジオネラ属菌は、特徴的な外観構造（カットグラス様、モザイク様：図 3）を呈する。従来法では、肉眼で観察し、灰白色湿潤集落をレジオネラ様集落と推定し、菌数測定や釣菌を行ってきた。しかしながら、この方法では、他の発育菌との分別が困難であり、不確かな菌数測定や非効率的な釣菌作業を行わなければならないことが多い。斜光法を利用することで、多数の灰白色湿潤集落を含む集落が分離培地上に発育していたとしても、レジオネラ属菌の存否を高い確率で確認することができる。この結果、他の菌の発育の多少にかかわらず、釣菌対象となる集落が限定され、その後の確認検査を効率良く行うことができ、菌数測定も極めて正確に行うことができる。また、実体顕微鏡を利用することから、培養 2 日目（30～35 時間程度）から特徴的な微小集落を確認できる場合がある。発育早期から高い確率でレジオネラ属菌の存在が確認できることは、定性的な判定日数を短縮できる可能性がある。特に行政検査で早期対応が必要な場合、斜光法とコロニー PCR の組み合わせによる対応が便利である。培養 2 日目以降、しばしば分離培地を観察することで、より正確に定性、定量結果を求めることができる。 **注 57、58**

注 57 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別方法の有用性. 環境感染学会誌, 25:8-13, 2010.

注 58 実体顕微鏡での観察は、エアロゾルは発生しないため、安全キャビネットを必要としない。しかしながら、分離培地のフタを開けて集落の確認を行う場合には、空中落下細菌による汚染を十分に注意すること。また、顕微鏡を覗きながら分離培地を観やすい位置に動かす場合には、取り扱いに十分注意すること。

1) - 2 器具及び器材

- (1) **実体顕微鏡**：分離培地上の集落の観察に用いる。
- (2) **照明装置**：斜光法に用いる。 **注 59**
- (3) **長波 UV ランプ**：集落の自発蛍光の有無の観察に用いる。

注 59 実体顕微鏡での様々な観察に使用されている、観察対象に集光できるライトを使用する。ファイバーアームの照明であれば、斜光角度を自由に変更できるので便利である。また、光量調節が可能であれば、各検査者の見やすさに合わせて調節できるので便利である。

1) - 3 操作

- (1) 見落としを防ぐために、分離培地を培養開始 3 日目から 7 日目まで毎日観察する

ことを推奨するが、培地上の他の雑菌等の発育状況に合わせ、検査者が見落としなく適切に観察できると判断可能であった場合には、適宜観察日程を調整する。平板上のレジオネラ属菌は 3 日目から観察しやすくなることが多いが、出現が遅い菌もあるので注意が必要である。 注 60

(2) 培地上の集落の観察には斜光法を用いて、レジオネラ属菌の推定を行う。レジオネラ属菌を推定するには、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を行い、その集落数を測定する。なお、斜光法は暗所で行うことを推奨する。 注 61

(3) 暗所で UV ランプを用いて集落の自発蛍光の有無の観察を行う (図 4)。 注 62

注 60 肉眼的には通常、培養 3~5 日で確認される集落が多い。肉眼的に 2 日目から観察できる集落はレジオネラ属菌ではない可能性が高い。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。また、発育が遅いレジオネラ属菌に対しても、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く、見落としが減少する。

注 61 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。斜光法は暗所で行うことで、集落の特徴が確認しやすい。

注 62 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。

2.8 菌の鑑別・同定と計数 表 1

本法では、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。

1) - 1 試薬

(1) BCYE α 培地

(2) L-システイン不含 BCYE α 寒天培地(血液寒天培地、トリプトソイ寒天培地でも可)

(3) 市販抗血清・市販型別用ラテックス凝集試薬

1) - 2 器具及び器材

(1) 白金耳または白金線

(2) スライドグラス

1) - 3 操作

(1) 集落の観察とともに釣菌を行う。釣菌する集落数の目安は、培地上の集落数が 10 個以下の場合はすべてとし、それ以上の場合は培地 1 枚につき 10 個までとする。周

囲の夾雑菌と少しでも接触している可能性がある場合は、再分離し、純培養であることを確認してから、次の検査を実施する。

- (2) 釣菌した菌は、L-システイン不含 BCYE α 寒天培地(血液寒天培地、トリプトソイ寒天培地でも可)と BCYE α 寒天培地の双方に画線培養し、L-システイン要求性の確認を行う。 注 63、64、65、66
- (3) BCYE α 寒天培地に画線培養した菌は菌苔が観察されるまで培養し、鑑別・同定を行う。一般的には、培養 48 時間程度で十分な発育が確認される場合が多い。この時、L-システイン不含寒天培地には発育が認められず、BCYE α 寒天培地のみに発育した菌をレジオネラ属菌とする。ただし、斜光法で観察を行っていない集落については、推定とする。 注 67、68
- (4) 市販の抗血清を用いてスライド凝集を行い、レジオネラ属菌の種の鑑別と血清群の決定を行う。 注 69、70、71
- (5) 各培地ごとにレジオネラ属菌と確定した集落に基づいてレジオネラ属菌集落数を決定し、各培地の中で最大集落数から菌数を算出し、報告する。 注 72

注 63 釣菌するタイミングは、培養 3 日目以降に毎日斜光法で集落の観察を行い、レジオネラ属菌と推定される集落や周辺の雑菌や真菌の発育に応じて適宜決める。

注 64 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して釣菌することで見落としが減少する。

注 65 釣菌した菌には検水ごとに適宜番号を振り、釣菌日、前処理法、分離した培地の種類、希釈した場合は希釈倍数、自発蛍光の有無等を記録する。

注 66 釣菌後の画線培養は、元々の分離培地由来の L-システインの持ち込みを防ぐため、まず、L-システイン不含寒天培地に、次いで BCYE α 寒天培地に画線する。可能であれば、釣菌した集落を滅菌生理食塩水に懸濁後それぞれの平板培地に画線すると便利である。

注 67 レジオネラ属菌は、検水からの初期分離時は、肉眼的な確認まで往々に 3 日以上を有するが、釣菌後の培養は 2 日程度で十分な発育が確認されることが多い。

注 68 馬尿酸水解試験が鑑別法として実施される場合があるが、本法では必須検査としない。グラム染色については適宜対応する。

注 69 患者発生時の検査では必須検査とするが、一般的な浴槽水の自主検査においては、必須検査としない。

注 70 市販抗血清やラテックス凝集試薬は、限られた血清群にしか対応することができないため、本検査が陰性だったことをもってレジオネラ属菌を否定してはならない。また、不明瞭な凝集を示した場合には安易な判定をしないこと。

注 71 レジオネラ属菌鑑別用と *Legionella pneumophila* 鑑別用の PCR システムを用いることもできる。なお、PCR システムについては、国立感染症研究所発行の病原体検

出マニュアルを参照すること。

注 72 分離平板培地ごとに条件が異なるため、最も多く確認された条件の分離平板培地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。

2.9 迅速検査法

検体中のレジオネラ属菌由来の核酸 (DNA、RNA) を定性的あるいは定量的に直接検出する迅速検査法は、培養法に比べ、検査に要する時間が大幅に短縮される。

リアルタイム PCR 法、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法、PALSAR (Probe Alternation Link Self-Assembly Reaction) 法等を利用した検出試薬キットが市販されている。それらは、レジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子あるいは 16S rRNA 等の配列特異性が高く多コピー存在する核酸を標的としている。これら迅速検査法の特性は、生菌のみならず死菌であっても、該当するレジオネラ核酸を直ちに検出することである。

注 73 このため、一般的には核酸検出法における陽性率の方が培養法より高い傾向にある。したがって、陽性結果のすべてが感染の危険性を示しているわけではない。ただし、水系にレジオネラ属菌核酸が存在することは、レジオネラ属菌を供給するバイオフィルムの存在を示唆しており、衛生管理上の注意が必要となる。

各反応系はそれぞれ特性があり、検出しない菌種や検出感度の低い菌種が存在することを理解した上で使用する。

1) - 1 試薬

市販のレジオネラ属菌検出試薬キットを用いる。 **注 74**

1) - 2 器具及び器材

キットの説明書にしたがって準備する。器具類はすべてディスポーザブルあるいは滅菌済みのものを使用する。コンタミネーション防止のために、ピペットチップはフィルター付きの製品を使用する。

1) - 3 操作 **注 75**

(1) 100 倍濃縮試料 1~4mL を検出試薬キットの説明書に従って再濃縮する。 **注 76**

(2) 検出試薬キットの説明書に従って DNA あるいは RNA を抽出し、増幅反応を行う。常に陽性対照と陰性対照を用意し、反応が正常に進行していることを確認する。

注 77

注 73 生菌を特異的に検出する方法もある。

注 74 論文等に記載のプライマー、プローブの自家調製も可能であるが、その場合検出感

度や検出精度を把握するための予備実験が不可欠である。

注 75 コンタミネーション防止のために、1. 反応試薬の調製、分注を行うエリア（検体および核酸を持ち込まない）、2. 検体の濃縮、核酸調製を行うエリア（検体を扱うため安全キャビネットが設置されていなければならない）、3. 陽性対照の調製、添加を行うエリアの3つに作業環境を分けることが望ましい。ピペット等もエリアごとに用意する。

注 76 試料の濃縮は培養試験法と共通化できる。

注 77 浴槽水には様々な泉質の湯水が用いられており、泉質によっては増幅反応阻害物質が含まれている場合がある。

3 精度管理

昨今のさまざまな試験検査においては、信頼性確保のための精度管理を実施することが求められている。このことは、レジオネラ属菌の検査についても同様である。精度管理には、検査施設内で完結させる内部精度管理と共通の試料を用いることによって他施設との比較が可能な外部精度管理に分けられる。各検査施設がこれら精度管理を実施することで、より適切な検査結果の保証に繋がることから、検査施設には積極的な対応が望まれ、検査依頼者もその依頼にあたっては、依頼施設が適切に精度管理を行っているかを確認することが望ましい。



図2 分離培地上の集落観察
(北海道立衛生研究所 森本 洋氏・提供)



図3 1個の大きな *L. pneumophila*
血清群1と2個の *L. cherrii*
(北海道立衛生研究所 森本 洋氏・提供)



図4 同じ分離培地での可視光と長波長紫外光による観察
(北海道立衛生研究所 森本 洋氏・提供)

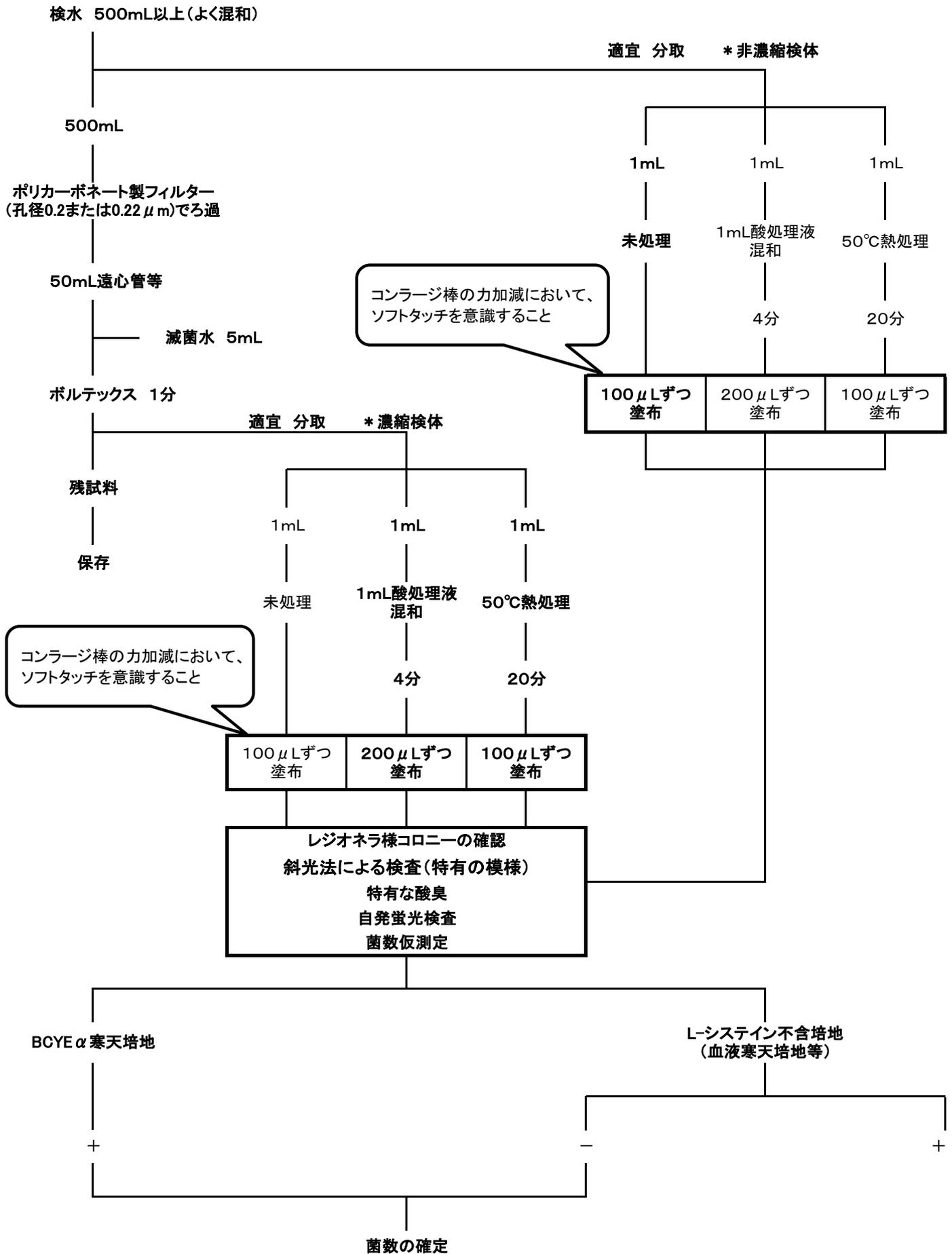


図1 検査フローチャート