

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）
令和元年度 分担研究報告書

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

研究代表者： 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部

携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化

研究分担者： 田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター
研究分担者： 中西 典子 神戸市環境保健研究所
研究協力者： 倉 文明 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室
研究協力者： 田中 忍 神戸市環境保健研究所
研究協力者： 平塚 貴大 広島県立総合技術研究所保健環境センター
研究協力者： 井上 浩章 アクアス株式会社 つくば総合研究所
研究協力者： 縣 邦雄 アクアス株式会社
研究協力者： 蔡 国喜 長崎県環境保健研究センター
研究協力者： 増輪 文治 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

レジオネラ症対策として開発してきたレジオネラリスクの現地迅速評価法 (RDM) の有効性を全国の検査機関で検証した。精度管理に必要な大腸菌とレジオネラニューモフィラ (LP) の定量管理した模擬試料の作製方法を考案し、回収実験および実試料の検査方法について標準作業書および作業用ワークシートを作成した。これらを用いて、全国の地方衛生研究所や民間研究所に協力を求めて、技術研修とともに実地検証を行った。協力機関の全体の回収率は大腸菌で70%~90%、LPで70%~130%であった。一つの協力機関の現地調査において、浴槽水34試料をRDM法と培養法で処理し、本方法の培養法に対するスクリーニングとしての有効性を検証したところ、RDM法の培養法に対する感度は85.7%、特異度は96.3%を示した。供試試料のLP数の定量性について、RDM法は培養法との間に相関は認められなかったが ($R^2 = 0.0104$)、定性的には妥当な成績を示した。RDM法は、全国の研究機関においても、一定の有効性が認められた。

A. 研究目的

レジオネラニューモフィラ (LP) は、自然環境において、原生動物と共生する他に、生物膜内の他の微生物とともに集塊として定着し、感染を伝播しうることが知られている¹⁾。LPはレジオネラ症の主要な起因菌種であり、我国では特に入浴施設において大きな社会的影響を及ぼしている。LPを含むレジオネラ属菌によるアウトブレイクが全国各地で発生して以降、浴槽水では塩素消毒

による水質管理が普及してきたが、循環ろ過器式入浴施設に代表されるとおり、衛生管理に関わる諸問題のためにレジオネラ属菌汚染が再発を繰り返して深刻な事態を引起している事例が少なくない。

我々は、これまでに浴槽水中レジオネラリスクの迅速評価法 (RDM) を独自に開発してきた²⁻³⁾。この方法により、現地で生死判別を含めたレジオネラ属菌の迅速判定 (約5分間) が可能となり、

血清群1株と非血清群1株に判別しながらレジオネラニューモフィラ数を1~2時間程度で定量することができる³⁾。本研究では、現地における衛生指導者と施設管理者との対話促進とレジオネラ対策技術の管理ツールとしての応用を目指す。

今回、3か所の検査機関により洗浄・消毒効果の迅速評価が行えるRDM法技術の検証を行い、現地調査を実施した結果を報告する。

B. 研究方法

1. 標準作業書及びワークシートの作成

1) レジオネラ属菌株を用いた菌量調整済み模擬試料の作製方法、同模擬試料を用いた添加回収実験、および実試料の検査の標準作業書を作成して、研究協力者に配布した(資料1)。

2) レジオネラ属菌株を用いた菌量調整済み模擬試料の作製方法、同模擬試料を用いた添加回収実験、および実試料の検査のワークシートを作成して、研究協力者に配布した(資料2)。

3) レジオネラリスク評価用フローサイトメーター(miniPOC, シスメックスパルテック社)の取扱説明書を作成して、研究協力者に配布した(資料3)。

4) 菌量調整済み大腸菌模擬試料の作製方法の標準作業書および検査のワークシートを作成して、研究協力者に配布した(資料4)。

2. 模擬試料の作製

1) 大腸菌

大腸菌は、当所で保管している腸管出血性大腸菌株を用いた。RDM法で検出する粒子や細胞は、miniPOCのレーザー波長532nmに合った蛍光色素で標識される必要がある。ここで本装置の仕様がヒト白血球専用で細菌に対応していないために細菌を核酸染色と免疫蛍光染色という異なる手法により細菌染色の有効性を確認する必要がある。確認用の対象微生物として核酸染色色素propidium iodide (PI, Wako chemicals)に染まりやすいために大腸菌を選択した。一方で、免疫蛍

光染色に用いた市販の抗大腸菌抗体は一般的な大腸菌株と反応せず、腸管出血性大腸菌O157H7とのみ反応したために、今回は本菌株を使用した。

供試した腸管出血性大腸菌は上記標準作業書に基づいて菌量を調整した後で、Eugeneらの方法⁴⁾に基づいて不活化処理を行った。即ち、試料はpH7.0リン酸緩衝液で調製し、遊離塩素として2mg/Lになるよう次亜塩素酸ナトリウムを添加した後、室温で10分間反応させた。その後に塩素と等量のチオ硫酸ナトリウムで中和した調整試料1mLを15mL標準寒天培地で混釈して、寒天が固化したのち5mLの同培地を重層して、36°Cで48時間培養して不活化されていることを確認した。元の試料は、終濃度0.05%グルタルアルデヒドおよび終濃度0.1%アジ化ナトリウムを用いて固定し、その後の試験に供した。

大腸菌の模擬試料は最終濃度 10^4 、 10^3 および 10^2 CFU/mL見当となるように調整し、それぞれEC-A、EC-BおよびEC-Cとした。

2) LP血清群1およびLP非血清群1

LP血清群1はATCC33152株、LP非血清群1は循環風呂ろ材由来の当所保存株(LP型別不能)を用いた。資料1のとおりで作製した模擬試料を上記大腸菌と同じように不活化処理後に固定した。なお、遊離塩素処理後に中和した菌液は、その0.1mLをBCYE α 寒天培地に塗抹して36°Cで1週間培養し、不活化処理の有効性を確認した。

LP血清群1の模擬試料は、最終濃度 10^4 、 10^3 および 10^2 CFU/mL見当となるように調整し、それぞれSG1-A、SG1-BおよびSG1-Cとした。

LP非血清群1の模擬試料は、最終濃度 10^4 、 10^3 および 10^2 CFU/mL見当となるように調整し、それぞれUT-A、UT-BおよびUT-Cとした。

3) 模擬試料の菌量検証とその安定性

資料1および資料2に準拠して、SG1-A、SG1-BおよびSG1-C、ならびにUT-A、UT-BおよびUT-Cを作製した。資料4に準拠してEC-A、EC-BおよびEC-Cを作製した。

これらの試料の保存性を検証するために、作製

後に 4℃で保管した試料を当日、23 日目、50 日目および 90 日目で測定し、測定値の推移を確認した。測定は 3 回繰り返した。

3. 各種染色試薬および測定機器

1) 核酸染色試薬

消毒効果判定時に使用する核酸染色では、PI を 0.1%になるように滅菌蒸留水に溶解し、冷蔵保存して使用した。試料 1 mL と 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) を含む希釈液 1 mL を混合し、PI を 10 μL 加えたのち、5 分間静置させ、後述のフローサイトメーターにより計測して得られた数値を細菌数 (Total Bacterial Counts) とした。消毒効果を判定する場合には、田栗らの方法³⁾に準拠して、この値が 1000 cells/mL 未満であった場合に消毒効果有り、1000 cells/mL 以上であった場合に消毒効果なしと判定した。

2) 各種免疫蛍光染色試薬

各種免疫蛍光染色試薬は、市販の抗大腸菌抗体 (V1091, Virostat)、抗 LP 血清群 1 抗体 (V6051, Virostat) および抗 LP 非血清群 1 抗体 (アークリソース) を購入し、田栗らの方法³⁾に準拠して、Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて作製した。抗大腸菌抗体、抗 LP 血清群 1 抗体および抗 LP 非血清群 1 抗体を用いて作製した免疫蛍光染色試薬を、それぞれ FL EC、FL lp SG1 および FL ARK_lp とした。これらの試薬は各抗体約 2 mg/mL を含む。

3) 携帯型フローサイトメーターの使用法

フローサイトメーターは田栗らの方法³⁾に準拠して、miniPOCにより標的細胞数を計測した。

4) 細菌の培養方法

模擬試料調製時における大腸菌の計数は標準寒天培地による混釈平板法を用い、LP の計数はレジオネラワーキンググループの方法⁵⁾に準拠した。実試料については、採取した研究機関の操作手法に準拠することとした。今回施設調査を実施した機関は上記と同じ方法を採用していた。

4. 各種実験の方法

1) 技術研修

資料 1~4 の標準作業書およびワークシート等を用いて、2 施設の地方衛生研究所と 1 施設の民間研究所の 4 名の研究協力者を対象として技術研修を実施した。

2) 添加回収実験

技術研修ののちに、2 施設の研究所に各種模擬試料および試薬等を配布して、各研究所にて資料 1 および資料 2 に則した回収実験を実施した。

なお、別の 1 施設の研究所において、設置機器の調整不良により回収実験が間に合わなかったため本報告書には結果を記載していない。

3) 実試料の調査

1 施設の研究所において、34 検体の循環ろ過式浴槽水を採水し、14 検体は自研究所で処理し、20 検体は冷蔵郵送により長崎県環境保健研究センターに搬入し調査した。輸送後の検体は冷蔵保存して遅くとも 1 週間以内に試験に供した。RDM 法については資料 4 に準拠して、各々の研究所で行ったが、培養検査は採水地の研究所で全検体を処理した。本調査における浴槽水は循環ろ過式で塩素消毒を行っていることを除いて施設ごとの衛生管理状況のデータはない。

C. 結果及び考察

1. 添加回収実験の結果

1) 模擬試料の菌量検証とその安定性

これらの試料の保存性を検証するために、菌量を調整し、殺菌および固定の後に 4℃で保管した試料を作製後 1 日目、23 日目、50 日目および 90 日目で測定し、測定値の推移を確認した (図 1)。

大腸菌模擬試料 EC-A、EC-B および EC-C の生菌数はそれぞれ 5.30×10^4 CFU/mL、 6.05×10^3 CFU/mL および 5.45×10^2 CFU/mL であった。作製後 1 日目の EC-A、EC-B および EC-C のフローサイトメトリー (FCM) による核酸染色の測定値はそれぞれ 4.61×10^4 cell-equivalent

counts/mL (以下 CEC/mL と略す)、 4.87×10^3 CEC/mL および 5.56×10^2 CEC/mL であり、免疫蛍光染色の測定値は 6.07×10^4 CEC/mL、 7.41×10^3 CEC/mL および 8.57×10^2 CEC/mL であった。

LP 血清群 1 模擬試料 SG1-A、SG1-B および SG1-C の生菌数はそれぞれ 6.60×10^4 CFU/mL、 5.25×10^3 CFU/mL および 8.95×10^2 CFU/mL であった。作製後 1 日目の SG1-A、SG1-B および SG1-C の FCM による核酸染色の測定値はそれぞれ 2.57×10^4 CEC/mL、 2.84×10^3 CEC/mL および 7.14×10^2 CEC/mL であり、免疫蛍光染色の測定値は 1.35×10^5 CEC/mL、 1.45×10^4 CEC/mL および 2.06×10^3 CEC/mL であった。

大腸菌模擬試料は核酸染色および免疫蛍光染色ともによく染まり、FCM 測定値は生菌数とほぼ同等の値を示した (図 1)。LP 血清群 1 模擬試料は免疫蛍光染色には染まるものの核酸染色に染まりにくい傾向にあり、核酸染色では測定値のばらつきも顕著であった (変動係数 CV: 5~77%)。EC-A の CV は核酸染色で 1~5%、免疫蛍光染色で 1~3% であり、EC-B の CV は核酸染色で 1~9%、免疫蛍光染色で 3~8% であったが、EC-C の CV は核酸染色で 5~46%、免疫蛍光染色で 9~47% とばらつきが大きかった。LP 血清群 1 模擬試料の免疫蛍光染色による測定値において、SG1-A の CV は 1~6%、SG1-B の CV は 2~9% であったが、SG1-C の CV は 9~21% とばらつきが大きかった。大腸菌模擬試料の核酸染色および免疫蛍光染色、並びに LP 血清群 1 模擬試料の免疫蛍光染色において、試料作製後 1 日目は免疫蛍光染色の測定値が比較的高めに検出される傾向にあったものの 23~50 日は安定的に推移し、90 日後には若干 FCM 測定値が生菌数と比較してやや減少していたもののほぼ同等の値が認められた (図 1)。ただし、これらは静置した冷蔵保存状態の安定性であり、現段階で回収実験等の物理的な負荷がかかるときの安定性を保証するものではない。

2) 研究協力施設における回収実験

施設 A および B において実施した回収実験の結果を表 1 に示した。

施設 A において、LP 血清群 1 模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $0.94 \times 10^3 \sim 1.02 \times 10^5$ CFU/mL であり、回収率は 97.7%~121.0% を示した。LP 非血清群 1 模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $1.01 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5$ CFU/mL であり、回収率は 103.8%~130.8% を示した (表 1)。

施設 B において、大腸菌模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $1.4 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5$ CFU/mL であり、回収率は 76.2%~83.7% を示した。LP 血清群 1 模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $4.0 \times 10^2 \sim 3.1 \times 10^4$ CFU/mL であり、回収率は 70.8%~112.9% を示した。LP 非血清群 1 模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $3.0 \times 10^2 \sim 2.9 \times 10^4$ CFU/mL であり、回収率は 51.2%~76.2% を示した (表 1)。

2. 入浴施設調査の結果

施設 A においては、34 循環ろ過式入浴施設の調査を実施した。図 2 には培養法と RDM 法の相関図、表 2 には培養法と RDM 法との定性結果の比較並びに図 3 には RDM 法の消毒効果閾値、定量値および生菌数結果の相互関係の比較を示した。

本施設調査において、培養法と RDM 法との間に相関は認められなかったが (図 2)、感度と特異度はそれぞれ 85.7% と 96.3% であり (表 2)、概ね消毒効果の閾値を逸脱した検体からのみレジオネラ生菌が分離されていることが確認された (図 3)。

田栗らの報告³⁾と比べると培養法と RDM 法がともに検出限界 (培養法: 10 CFU/100mL, RDM 法: 10 CEC/100mL) を超えた検体が少なく、定量値が低い傾向にあったことから、両者の相関の違いについては未だ確定的なことは言及できない。しかし、消毒効果判定とレジオネラ数生菌値との比較において、他施設でも、消毒効果が認め

られない浴槽水においてレジオネラの生菌が検出されるということが実証された。

E. 結論

協力機関における模擬試料を使った RDM 法の回収率は大腸菌で 70%~90%、LP で 70%~130%を示した。現地調査において、浴槽水 34 試料について、定量的な相関は認められなかったもの、RDM 法の培養法に対する感度は 85.7%、特異度は 96.3%を示し、消毒効果判定能の妥当性ととも定性的には培養法と同等の成績を示した。以上から、RDM 法は全国の研究機関においても一定の有効性が認められたといえる。

F. 参考文献

- 1) Abdel-Nour, M, Duncan, C, Donald, E L and Guyard, C, Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*, *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 21660–21675, 2013.
- 2) Taguri, T, Oda, Y, Sugiyama, K, Nishikawa, T, Endo, T, Izumiyama, S, Yamazaki, M, and Kura, F. A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of *Legionella* in bath water. *Journal of Microbiological Methods*, **86**, 25–32, 2011.
- 3) 田栗 利紹ら, レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発, 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 28~30 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 31–36, 2019.
- 4) Eugene W. R, Robert M C, and Clifford H J, Chlorine Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Emerging Infectious Diseases*, **5**, 461–463, 1999.
- 5) 森本 洋ら, 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, 研究代表者: 倉 文明, 93–130, 2012.

G. 学会発表

- 1) 田栗 利紹, 蔡 国喜, 新道 欣也, 下田 貴宗, 倉 文明, 前川 純子, レジオネラニューモフィラの定量検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の有用性評価, 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会, 2019.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

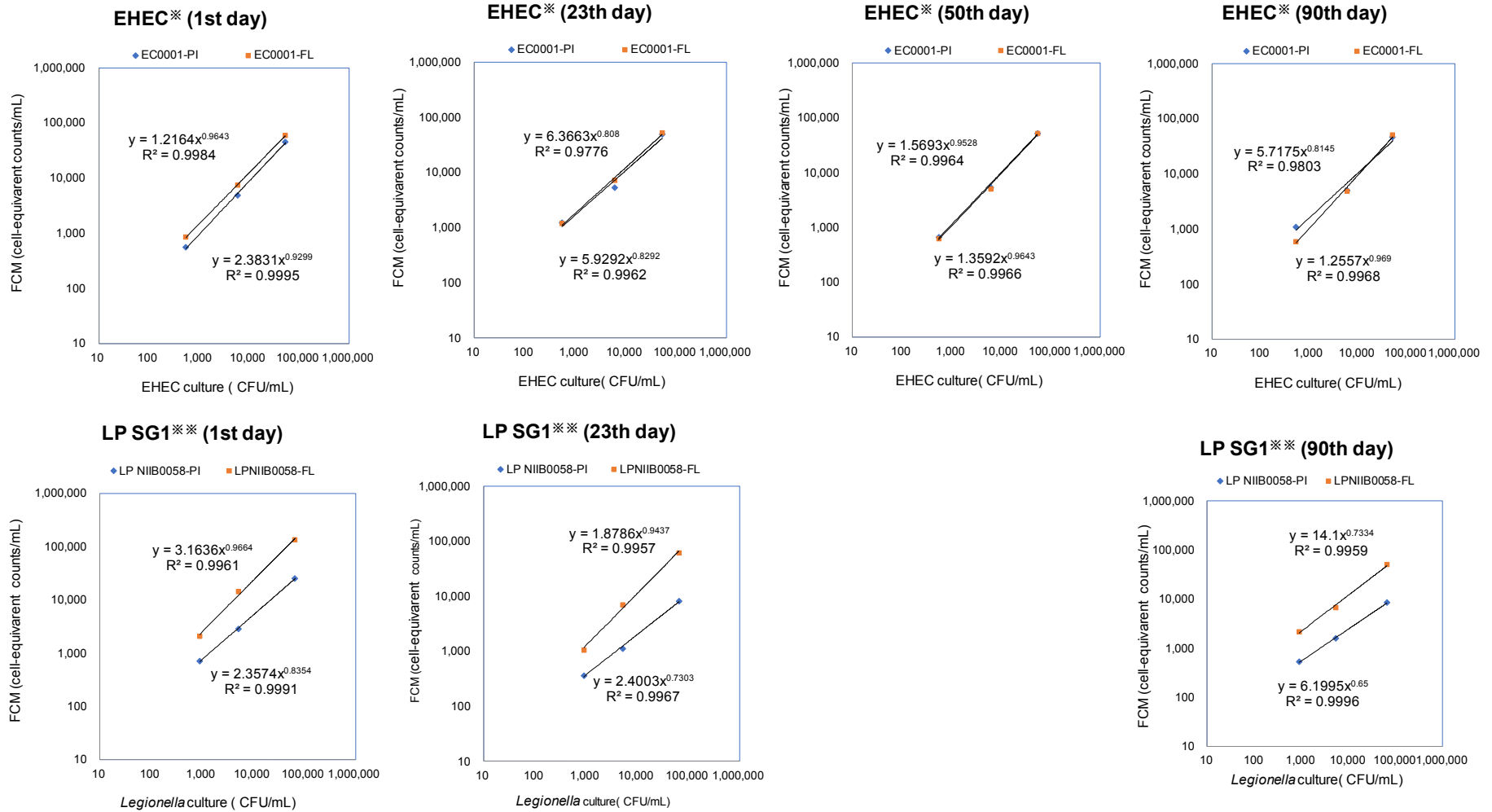


図1. 菌量調整済み模擬試料の安定性

※EHEC: enterohemorrhagic *Escherichia coli*, ※※LP SG1: *Legionella pneumophila* serogroup 1

表 1. 施設ごとの回収実験結果

	施設A		施設B	
	配布時の菌量 (CFU/mL)	回収率	配布時の菌量 (CFU/mL)	回収率
EC-A			1.1×10^5	78.8%
EC-B			1.2×10^4	76.2%
EC-C			1.4×10^3	83.7%
SG1-A	1.02×10^5	97.7%	3.1×10^4	70.8%
SG1-B	0.85×10^4	112.2%	3.1×10^3	112.9%
SG1-C	0.94×10^3	121.0%	4.0×10^2	86.3%
UT-A	1.1×10^5	103.8%	2.9×10^4	73.4%
UT-B	1.16×10^4	130.8%	2.9×10^3	51.2%
UT-C	1.01×10^3	118.8%	3.0×10^2	76.2%

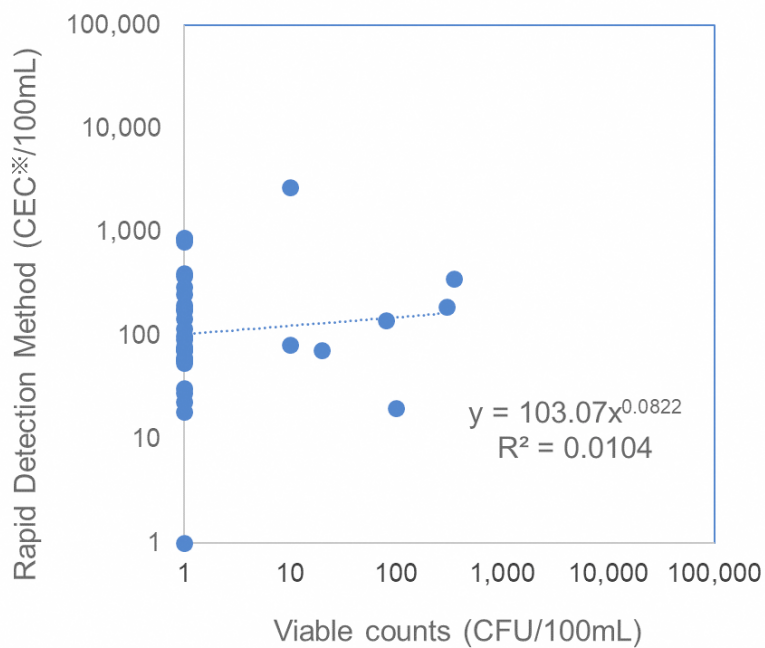
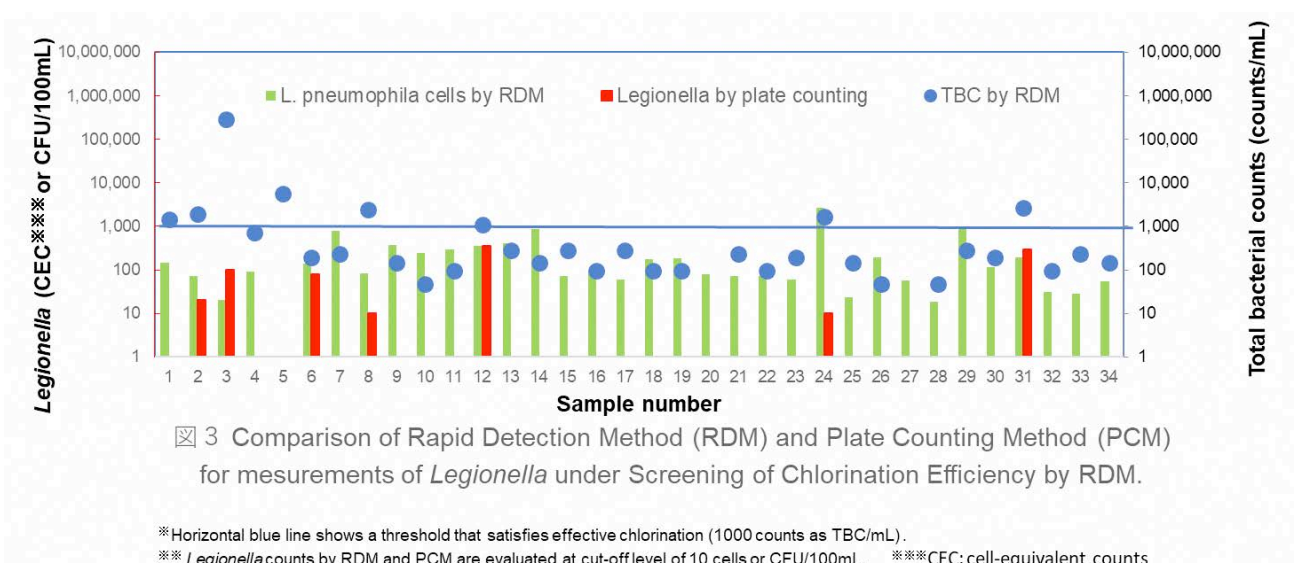


図2. 培養法とRDM法のレジオネラ菌数の相関

CEC: cell-equivalent counts

表 2 培養法とRDM 法との定性結果の比較 (N =34)

		平板培養法 (CFU/100 mL)			
		≥10	<10		
Rapid Detection Method (cell-equivalent counts/100mL)	≥10	6	1	7	
	<10	1	26	27	
		7	27	34	
感度		85.7%		特異度	96.3%



検査実施標準作業書

SOP No.	
作成年月日	令和元年 5 月 8 日
改訂年月日	令和元年 11 月 26 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：レジオネラニューモフィラ定量
2. 試験の種類：レジオネラニューモフィラ標準菌株による模擬試料の作製
3. 検体の採取および試料の調製：-80 保存の *Legionella pneumophila* 標準菌株を BCYE 培地に復元後（接種後 36 ± 1 で 24 時間培養して冷蔵保存、シャーレ周りをパラフィルム等でシールすること）、増菌培地（*Legionella* LC Medium Base (9016, TAKARA), BYE (自家調製) 等）1 mL 入り 1.5 mL マイクロチューブに小コロニー 1 ~ 数個程度を接種して、恒温水槽で 36 ± 1 、18 ~ 24 時間培養した後の懸濁液の上清 0.5 mL を 4.5 mL PBS (pH7.2) に接種して原液とする。この時の原液は、これまでの実績から約 $1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/mL と推定される。予め 9 mL PBS (pH7.2) を入れた中試験管を必要分調製して、4 段階で 10 倍段階希釈列を作製した後、 10^2 および 10^3 cells/mL と予測される試料の 0.1 mL を各 2 枚の BCYE 培地に接種してコンラージ棒で塗抹する。 10^7 (原液)、 10^6 および 10^5 cells/mL オーダーの希釈液のそれぞれ 1 mL を予め 99 mL PBS (pH7.2) を入れた 100 mL 滅菌容器に接種して、 10^5 、 10^4 および 10^3 cells/mL オーダーの希釈液とし、各希釈液の菌数を測定する。適切に希釈して希釈液の濃度が 10^2 および 10^3 cells/mL と予測される試料の 0.1 mL (低菌数が予測される場合は 0.5 mL まで増やしてよい；この時の希釈倍率に要注意) を各 2 枚の BCYE 培地に接種してコンラージ棒で塗抹する。 36 ± 1 、72 ~ 96 時間培養した後、1 平板に 30 ~ 300 の集落がえられたものを生菌数として計測する。
4. 使用する機械器具の選択
 - 高圧蒸気滅菌器
 - 滅菌採取器具 (薬さじ、はさみ、ピンセット等)
 - 滅菌採取ピン
 - 滅菌シャーレ (直径9 ~ 10 cm、深さ2.0 cm)
 - 中試験管
 - 滅菌ピペット (1 mL、10 mL)
 - マイクロピペット (1 mL)
 - マイクロチップ (1 mL)
 - ふ卵器 ($36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)
 - 恒温水槽
 - 電子天秤
 - メスシリンダー
 - 三角フラスコ
 - ストマッカー
 - ステリカップフィルターユニット

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1 L として、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験ではフィルターろ過は2回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

グルタルアルデヒド溶液

グルタルアルデヒドの 50% 溶液、20% 溶液、和光純薬製または同等品を用いる。市販品を適切に希釈して 5% 液を調製、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。最終濃度が 0.05% となるように試験液に注入する。

アジ化ナトリウム溶液

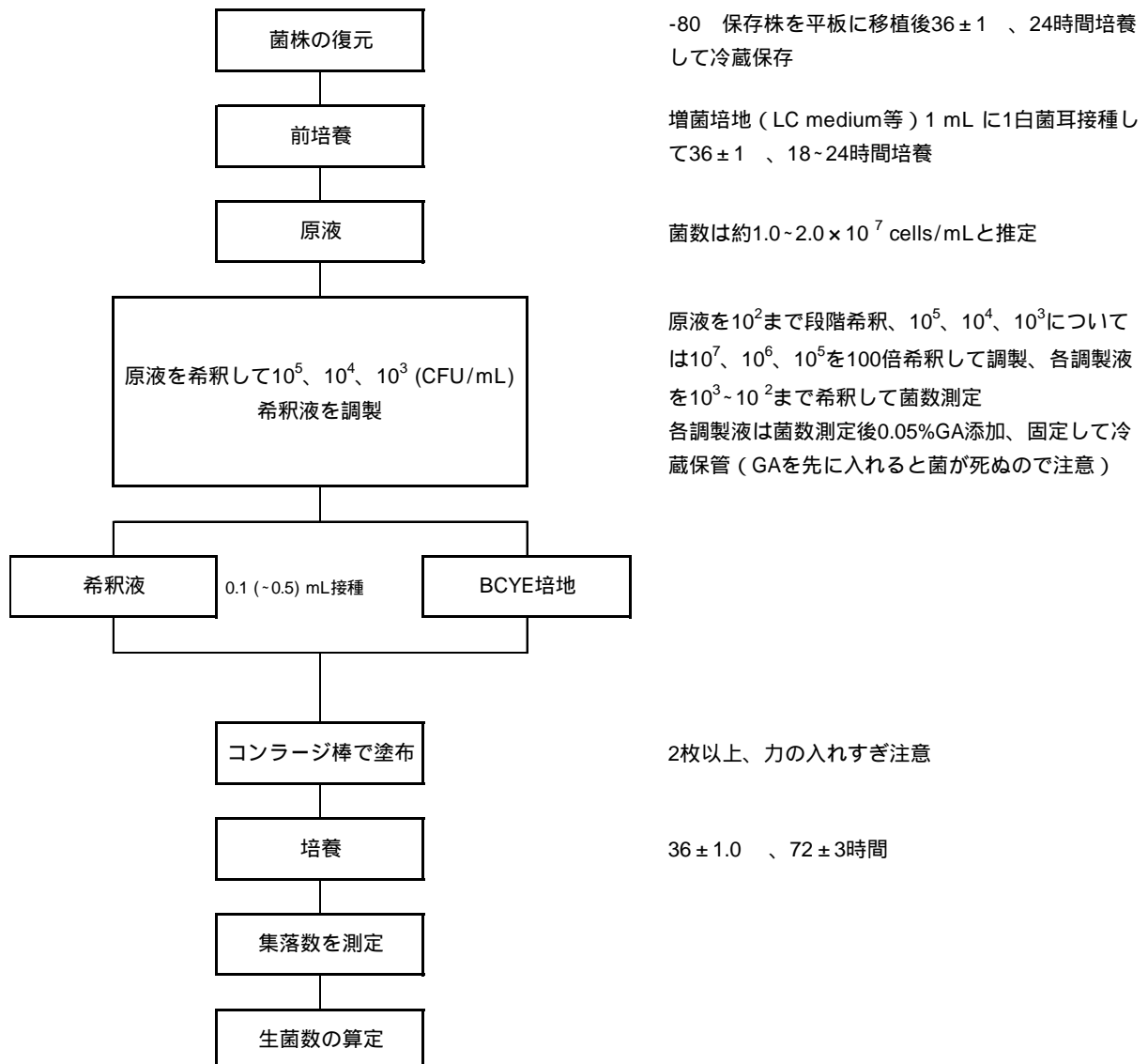
アジ化ナトリウムの和光純薬製または同等品を用いる。市販品を適切に希釈して 10% 液を調製、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。最終濃度が 0.1% となるように試験液に注入する。

2) 培地

BCYE 培地 (市販の生培地; ビオメリューなど)

使用前に常温に戻して試験に供す。ふらん器での乾燥は行わない。

6. 製品検査の方法



7. 製品検査にあたっての注意事項

- 1) 試料の滅菌シャーレへの分注から冷却凝固までの操作は、20分以内に完了する。
- 2) 対照として、検体の希釈に用いた滅菌生理食塩水 1 mL に、試料に用いた同一同量の培地を混合し培養したものをを用いて、生理食塩水および培地が無菌であったこと並びに操作が完全であったことを確認する。

8. 製品検査の結果の処理

1) 集落数の算定

1 平板に 30～300 個の集落数がある場合

- a) 1 段階の希釈にのみ 30～300 個の集落数が得られた場合：2 枚の平板の集落数の算術平均を求める。
- b) 連続した 2 段階の希釈に 30～300 個の集落数が得られた場合：希釈ごとに 2 枚の平板の算術平均を算定し、両者の比を求める。
 - 両者の比が 2 倍未満のときは、以下の計算式により連続する 2 段階の希釈平板の集落数から菌数を算定する。

$$N = \{ (A+B) / 2d_1 + (C+D) / 2d_2 \} / 2$$

A, B：低希釈の集落数

C, D：高希釈の集落数

d₁：希釈が低いほうの希釈倍率

d₂：希釈が高いほうの希釈倍率

- 両者の比が 2 倍を超えたときは希釈段階の低いほうの集落数の算術平均を求める。

全平板が 300 個を超えた集落数である場合

最も希釈倍率の高いものについて、正確に 1 cm² の区画のある密集集落計算版を用いて計測する。

a) 1 cm² の区画に 10 個以下の集落数の場合：中心を通過し直行する 2 直径を作り、その中心より区分された 1 cm² 区画の 6 箇所を集落数を数えて、1 cm² 区画の平均集落数を求め、これに滅菌シャーレの面積を乗じて 1 平板あたりの集落数を算出する。直径 9 cm の滅菌シャーレでは、得られた 1 cm² の平均集落数に 65 を乗じる。

b) 1 cm² の区画に 10 個以上の集落数の場合：前記と同様にして 4 区画の集落数から 1 cm² 区画の平均集落数を求め、滅菌シャーレの面積を乗じて 1 平板あたりの集落数を算出する。

全平板が 30 個未満の場合

最も低い希釈倍数に 30 を乗じる。試料液は 10 倍希釈であるので 300 以下として記載する。

拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分を計測する

- a) 他の集落がよく分散していて、拡散集落があっても計測に支障のないもの。
- b) 拡散集落の部分が平板の 1/2 以下の場合。

2) 菌数の記載

算定対象とした平板の集落数に希釈倍数を乗じ、さらに得られた数字の上位 3 桁目を四捨五入して、上位 2 桁を有効数字として表示し、1 mL 当たりの菌数とする。例えば、算定された菌数値を 30500/mL または 3.1×10^5 /mL と記載し、試料液は 10 倍希釈されているので、算定された菌数値を 10 倍した値が 1 mL 当たりの菌数となる。試料液はなお、最低希釈平板の集落発生数が 30 未満の場合も、必要があれば測定値をそのまま記載しておく。

検査実施標準作業書

SOP No.	
作成年月日	令和元年 5 月 8 日
改訂年月日	令和元年 12 月 16 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：レジオネラニューモフィラ定量
2. 試験の種類：フローサイトメトリーによる模擬試料の添加回収実験
3. 検体の採取および試料の調製：予め 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mL オーダーの生菌数測定済み模擬試料を調製して冷蔵保存したものを常温に 15 分以上放置する。まず、各非濃縮模擬試料についてそれぞれの菌数を測定する。全菌数測定に際しては、検体 1 mL を 5 mL チューブに分取し、0.1% MTAB 希釈液 1 mL と混合し、0.1%の蛍光色素 PI 10 μ L を加えた後、5 分間静置し、携帯型フローサイトメーター (FCM) にセットして測定する。予め測定ノイズを除いた特定エリアを設定し、細菌細胞から得られる側方散乱光強度と蛍光強度を 2 つの指標としてエリア内の細胞を計数する。レジオネラ菌数測定に際しては各試料 1 mL を 5 mL チューブに分取し、等量の 0.1%BSA 入り PBS および 1.5 μ L の抗レジオネラ属菌用染色試薬 FL Lp SG1 を加えて常温で 30 分間、旋回振とうしたものを FCM にセットして特定エリア内の粒子数を算出する。PI 染色で得られた数値とレジオネラニューモフィラ (Lp) 特異染色で得られた数値 (μ L: 装置に表示される) に装置独自の補正值 (2000/42) を掛け合せて、それぞれ細菌数および Lp 数とする。 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mL オーダーの生菌数測定済み模擬試料の各 1 mL を 500 mL PBS に挿入して 10^0 、 10^1 および 10^2 cells/mL オーダーの模擬試料を作製する。0.2 μ m Membrane Filter でろ過濃縮したのち、MF を 55 mm シャーレに貼付け、0.6 mL PBS に等量の 0.1%BSA 加 PBS を加えて、10 回以上 MF 表面をピペッティングで洗い出すことにより回収する。回収液 1 mL に染色試薬 FL Lp SG1 0.75 μ L と FL non_Lp SG1 0.75 μ L (あらかじめ等量を混合しておき 1.5 μ L を加えてもよい) を加えて、30 分間回転振盪したのち、ディスポシリンジで 0.8 mL を採取し、目盛を 1.1 mL に合わせて FCM に設置、測定する。Lp 特異染色で得られた数値 (μ L: 装置に表示される) に装置独自の補正值 (2000/42) を掛け合せて、回収後の Lp 数とする。予め求めた非濃縮液菌数の 2 倍の値と回収した菌数により回収率を求める。
4. 使用する機械器具の選択
 - 高圧蒸気滅菌器
 - 滅菌採取器具 (葉さじ、はさみ、ピンセット等)
 - 電子天秤
 - りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2, Wako chemicals)
 - ポリカーボネート製ポリ瓶 (1 L、12本、洗浄後からの状態で予め滅菌しておく)
 - スTERILカップフィルターユニット (1 L用)
 - フローサイトメーター (miniPOC; Sysmex)
 - 染色試薬 (0.1% propidium Iodide (PI)、2 mg/L LP血清群I用染色試薬 (FL Lp SG1)、2 mg/L Lp非血清群I染色試薬 (FL non-Lp SG1))
 - 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) (核酸染色用緩衝液)

- 0.1% BSA入りPBS (特異抗体染色用緩衝液)
- 小形滅菌シャーレ (直径60 mm、深さ10 mm)
- 中試験管またはディスポポリチューブ
- 滅菌ピペット (1 mL、10 mL)
- マイクロピペット (1 mL)
- マイクロチップ (1 mL用、10 µL用)
- マイクロチューブ (5 mL)
- オールプラスチックシリンジ (2 mL)
- ふ卵器 (36 ± 1)
- 恒温水槽
- メスシリンダー
- 三角フラスコ
- ストマッカー

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

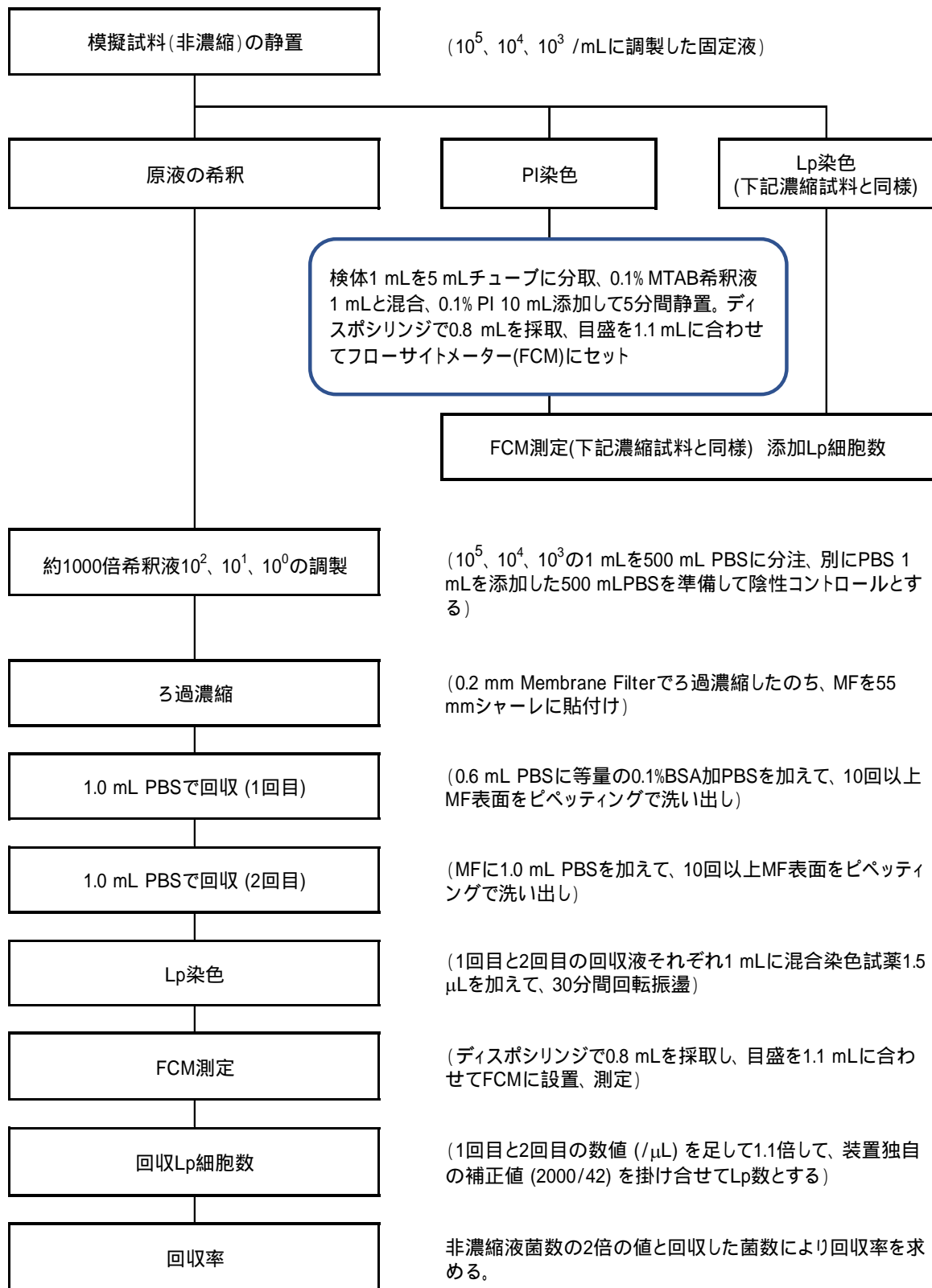
Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

リン酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2)を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、0.2 µm ボトルトップフィルターでフィルターする。フローサイトメトリー用実験であるのでフィルターする時は 2 回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

フローサイトメトリー用染色試薬

- 0.1% propidium iodide (全菌数測定用)
- 2 mg/L Lp 血清群 1 用染色試薬 (FL Lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (V6051, virostat 社) の 2 mg/L × 0.5 mL をキット取説に沿って標識し、40 µL ずつ小分けして冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 2 mg/L Lp 非血清群 1 染色試薬 (FL non_lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (アークリソース社) の 2 mg/L × 0.5 mL をキット取説に沿って標識し、50 µL ずつ小分けして冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)
- 0.1% BSA 入り PBS: で作製した PBS500 mL ~ 100mL に 0.1% となるように 10%BSA (ミリテニーバイオテク社) を加えて調製する。

6. 製品検査の方法



検査実施標準作業書

SOP No.	
作成年月日	令和元年 11月 28日
改訂年月日	令和元年 月 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：レジオネラニューモフィラ定量
2. 試験の種類：フローサイトメトリーによる実試料の検査

3. 検体の採取および試料の調製：

(消毒効果判定) 試料は終濃度 500 mg/L (望ましくは 50 mg/L) となるようにチオ硫酸ナトリウムを入れた 500 mL あるいは 1 L の滅菌済み PP プラスチック容器に採水する。採水後の試料は冷蔵保存して遅くとも 1 週間以内に試験に供する。最初にフローサイトメーター (FCM) を用いて非濃縮浴槽水中の塩素消毒効果を判定する。即ち、検体 1 mL を 5 mL チューブに分取し、0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) を含む希釈液 1 mL と混合し、0.1% の蛍光色素 propidium iodide (PI) 10 μ L を加えた後、FCM にセットして全細菌数 (TBC) を測定する。予め測定ノイズを除いた特定エリアを設定し、細菌細胞から得られる側方散乱光強度 (SSC) と蛍光強度 (FL) を 2 つの指標としてエリア内の細胞を計数し、装置独自の補正値を掛け合せて細菌数とする。この時、試料中の TBC が判定基準値 1000 counts/mL を越した場合は「消毒効果なし」と判定して、続くレジオネラニューモフィラ (Lp) 特異検査で Lp が検出された場合は生菌と判断する。一方で、1000 counts/mL に満たない試料は「消毒効果有り」と判定し、Lp が検出された場合でも死菌と判定する。

(Lp の特異的定量) 施設調査における Lp 定量は、Lp SG1 用染色試薬 (FL Lp SG1) と Lp 非 SG1 染色試薬 (FL ARK_Lp) を用いる。検水 500 mL を吸引する過した後、0.2 μ m Membrane Filter (MF) を 55 mm シャーレに貼付け、0.6 mL PBS に等量の 0.1% BSA 加 PBS を加えて、10 回以上 MF 表面をピペティングで洗い出すことにより回収する。次いで、回収後のシャーレに 1 mL 0.1% BSA 加 PBS を加えて前述と同じ操作を繰り返し 2 回目の回収液とする。各回収液 1 mL に染色試薬 FL Lp SG1 0.75 μ L と FL non-Lp SG1 0.75 μ L (あらかじめ等量を混合しておき 1.5 μ L を加えてもよい) を加えて、30 分間回転振盪させたのち、ディスポシリンジで約 0.8 mL を採取し、目盛を 1.1 mL に合わせて FCM に設置して測定する。この時、Lp 特異染色試薬由来の測定ノイズを除くように予め設定した特定エリア内の細菌数 (μ L: 装置に表示される) を計数し、装置由来の誤差 (2000/42) と回収時に発生する誤差 (容量比: 1.1) を補正したのち、予め作成した検量線により濃度換算して Lp 数とする。

4. 使用する機械器具の選択

- 高圧蒸気滅菌器
- 滅菌採取器具 (薬さじ、ピンセット等)
- 電子天秤
- りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2, Wako chemicals)
- ポリカーボネート製ポリ瓶 (1 L、12本、洗浄後からの状態で予め滅菌しておく)
- スTERILカップフィルターユニット (1 L用)

- フローサイトメーター (miniPOC; Sysmex)
- 染色試薬 (0.1% propidium Iodide (PI)、2 mg/L LP血清群1用染色試薬 (FL Lp SG1)、2 mg/L LP非血清群1染色試薬 (FL non_Lp SG1))
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) (核酸染色用緩衝液)
- 0.1% BSA入りPBS (特異抗体染色用緩衝液)
- 小形滅菌シャーレ (直径60 mm、深さ10 mm)
- 中試験管またはディスポリチューブ
- 滅菌ピペット (1 mL、10 mL)
- マイクロピペット (1 mL)
- マイクロチップ (1 mL用、10 µL用)
- マイクロチューブ (5 mL)
- オールプラスチックシリンジ (2 mL)
- ふ卵器 (36 ± 1)
- 恒温水槽
- メスシリンダー
- 三角フラスコ
- ストマッカー

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

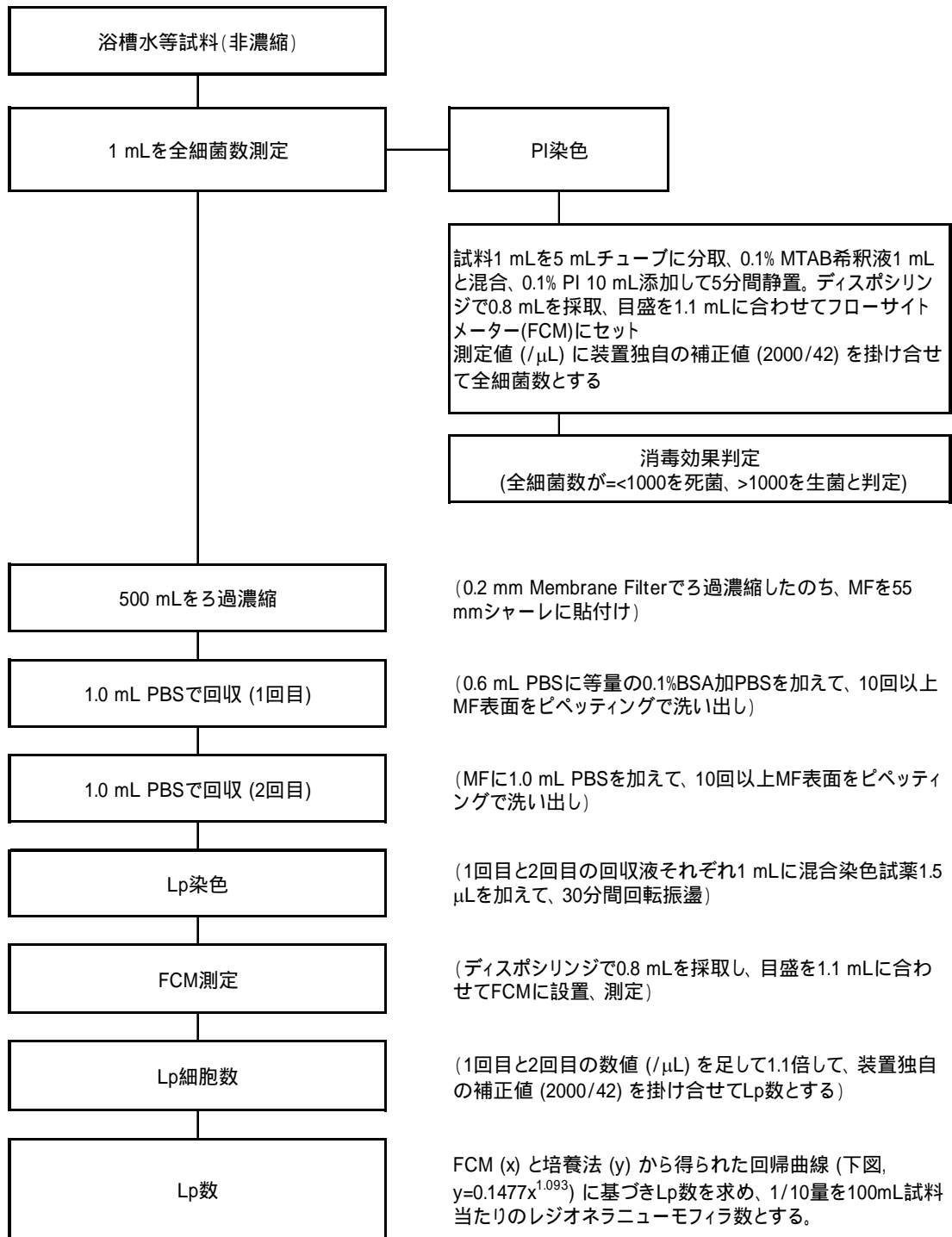
Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、0.2 µm ボトルトップフィルターでフィルターを過す。フローサイトメトリー用実験であるのでフィルターを過すは 2 回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

フローサイトメトリー用染色試薬

- 0.1% propidium iodide (全菌数測定用)
- 2 mg/L LP血清群 1 用染色試薬 (FL Lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (V6051, virostat 社) の 2 mg/L×0.5 mL をキット取説に沿って標識し、40 µL ずつ小分けして冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 2 mg/L LP 非血清群 1 染色試薬(FL non-Lp SG1): Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher)を用いて抗 Lp 抗体 (アークリソース社) の 2 mg/L×0.5 mL をキット取説に沿って標識し、50 µL ずつ小分けして冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)
- 0.1% BSA 入り PBS : で作製した PBS500 mL ~ 100 mL に 0.1% となるように 10%BSA (ミルテニーバイオテク社) を加えて調製する。

6. 製品検査の方法



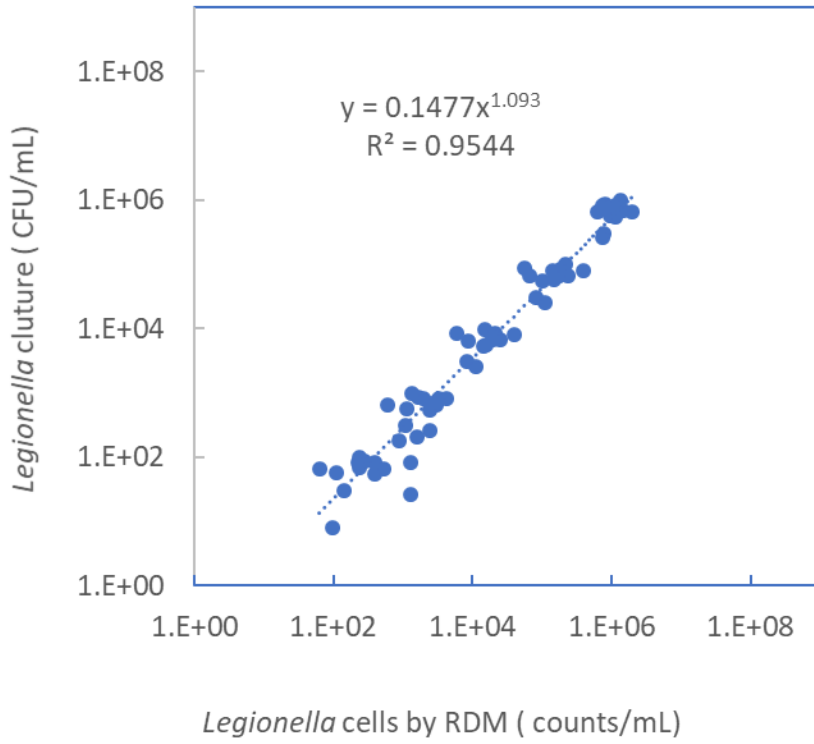


Fig. Correration between culture method and RDM (11 strains of *Legionella pneumophila*)

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日 ~ 年 月 日

[検体数：]

担当者
2019.11.27作成 田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ数
2. 製品の種類：標準菌株を用いた模擬試料作製方法

3. 培地の作製

(1) 作製月日： 月 日

滅菌リン酸緩衝水

(PBS (pH7.2) 1包/ L、NaCl 8.5g / L、121 , 15分間高圧滅菌処理)

99 ml (本)、9 ml (本) 作製

(2) 処理月日： 月 日

BCYE 培地【メーカー： , Lot： 】

購入日 ()

4. 生菌数の試験

菌株の復元 -80保存株 (No.) を平板に移植培養 (36 ± 1 、 <18h)、冷蔵保存

前培養 増菌培地 (LC medium等) 1 mL に1白菌耳接種して恒温水槽 36 ± 1 、18時間培養

原液作製 4.5 mL PBSに前培養液上清0.5 mLを滅菌スポイトで接種 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/mL相当)

原液の希釈 原液を 10^2 まで段階希釈、 10^3 と 10^2 の0.1 mL分注 (原液用2枚以上)

段階試料液の調製 10^5 、 10^4 、 10^3 については 10^7 、 10^6 、 10^5 の1 mLを99 mL PBSに分注して100倍希釈

段階試料液の希釈 10^5 、 10^4 、 10^3 を、 $10^3 \sim 10^2$ まで希釈 (菌数測定後に固定)

各希釈液の分注 滅菌シャーレに0.1 mL分注 (各希釈段階で2枚以上)

培養 36 ± 1 、 72 ± 3 時間

集落数の測定

グルタルアルデヒドで固定 (終濃度0.05%) ・冷蔵保管して、1か月以内に使用する。

検体番号	各希釈段階における集落数				
	10 ^()	10 ^()	10 ^()	10 ^()	10 ^()
原液					
10 ⁵					
10 ⁴					
10 ³					

生菌数の算定

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日～ 年 月 日

[検体数：]

担当者
2019.1126改版
田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ (Lp) 定量
2. 製品の種類：フローサイトメトリーによる模擬試料の添加回収実験
3. 器具・試薬の作製

(1) 処理月日： 月 日

滅菌ろ過器 (115 , 15分間高圧滅菌処理) () mL (本) 作製

0.2 μm Membrane Filter 【メーカー： , Lot： 】

滅菌PPポリ容器 (121 , 15分間高圧滅菌処理)

() mL (本) 作製

(2) 作製月日： 月 日

滅菌リン酸緩衝水

(PBS(pH7.2)1包/ L、NaCl 8.5g / L、0.2 μm steri-cup filter unit る過 () 回)

() mL (本) 作製

(3) フローサイトメーター関連試薬

0.1%propidium Iodide (PI) 【試薬作製日 (年 月 日)、保管状態 (冷蔵、冷凍)】

2 mg/L LpSG1用染色試薬【試薬作製日 (年 月 日)、保管状態 (冷蔵、冷凍)】

2 mg/L Lp non-SG1用染色試薬【試薬作製日 (年 月 日)、保管状態 (冷蔵、冷凍)】

2 mg/L Lp用染色試薬【試薬作製日 (年 月 日)、保管状態 (冷蔵、冷凍)】

0.1% MTAB 【試薬作製日 (年 月 日)、保管状態 (冷蔵、冷凍)】

0.1% BSA入りPBS 【試薬作製日 (年 月 日)、保管状態 (冷蔵、冷凍)】

4. フローサイトメトリー

模擬試料の静置 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mLオーダーの固定Lp懸濁液を常温に静置1時間

非濃縮液の細菌数計測

検体1 mLを5 mLチューブに分取、0.1% MTAB希釈液1 mLと混合、0.1% PI 10 μL添加して5分間静置。ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてフローサイトメーター (FCM) にセット

FCMからMethod Leg area 04を呼び込み測定スイッチオン (連続して2回以上測定する)

非濃縮液のLp数計測

検体1 mLを5 mLチューブに分取、等量の0.1%BSAと混合、1.5 μL FL Lp SG1添加

常温で30分間、回転振とう

ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてFCMにセット

FCMからMethod Leg area 04を呼び込み測定スイッチオン（連続して2回以上測定する）

希釈液作製 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mLオーダーの固定Lp懸濁液1 mLを予めろ過滅菌済み500 mL PBSに添加して約 10^0 、 10^1 および 10^2 cells/mLオーダーの希釈試料とする。別に、PBS 1 mLを添加した500 mL PBSを準備して陰性コントロールとする。

ろ過濃縮 0.2 μ m Membrane Filterで定法によりろ過濃縮したのち、MFを55 mmシャーレに貼付け

回収 0.6 mL PBSに0.6 mLの0.1%BSA加PBSをシャーレに貼り付けたMF表面に加えて、10回以上MF表面をピペティングで洗い出し、1 mLを1回目回収試料とする。

回収後、1.0 mLの0.1%BSA加PBSをシャーレに貼り付けたMF表面に加えて、10回以上MF表面をピペティングで洗い出し、1 mLを2回目回収試料とする。

上記1回目および2回目回収試料1 mLに0.75 μ L FL Lp SG1添加
 常温で30分間、回転振とう
 ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてフローサイトメーター(FCM)にセット
 FCMからMethod Leg area04を呼び込み測定スイッチオン

装置に表示される数値(/ μ L)を1.2倍して、装置独自の補正值(2000/42)を掛け合せてLp数とする
 注) 洗い出しがうまくいけば上記2回目が1回目の1/5 ~ 1/10量程度となる。

検体番号	添加液						回収液		
	全菌数			Lp数			Lp数（1回目）	Lp数（2回目）	備考
A-1									
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)									
A-2									
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)									
A-3									
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)									
D									
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)									

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日～ 年 月 日

[検体数：]

担当者
2019.12.16版
田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ (Lp) 定量
2. 製品の種類：フローサイトメトリーによる実試料の検査
3. 器具・試薬の作製

(1) 処理月日： 月 日

滅菌ろ過器 (115 , 15分間高圧滅菌処理) () mL () 本) 作製

0.2 μm Membrane Filter 【メーカー： , Lot： 】

滅菌PPポリ容器 (121 , 15分間高圧滅菌処理)

() mL () 本) 作製

(2) 作製月日： 月 日

滅菌リン酸緩衝水

(PBS (pH7.2) 1包/ L、NaCl 8.5g / L、0.2 μm steri-cup filter unit ろ過 () 回)

() mL () 本) 作製

(3) フローサイトメーター関連試薬

0.1%propidium Iodide (PI) 【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

2 mg/L LpSG1用染色試薬【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

2 mg/L Lp non-SG1用染色試薬【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

2 mg/L Lp用染色試薬【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

0.1% MTAB 【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

0.1% BSA入りPBS 【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

4. フローサイトメトリー

非濃縮液の細菌数計測

検体1 mLを5 mLチューブに分取、0.1% MTAB希釈液1 mLと混合、0.1% PI 10 μL添加して5分間静置。ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてフローサイトメーター (FCM) にセット

FCMからMethod Leg area 04を呼び込み測定スイッチオン (連続して2回以上測定する)

ろ過濃縮 0.2 μm Membrane Filterで定法によりろ過濃縮したのち、MFを55 mmシャーレに貼付け

回収 0.6 mL PBSに0.6 mLの0.1%BSA加PBSをシャーレに貼り付けたMF表面に加えて、10回以上MF表面をピペティングで洗い出し、1 mLを1回目測定試料とする。

回収後、1.0 mLの0.1%BSA加PBSをシャーレに貼り付けたMF表面に加えて、10回以上MF表面をピペ

ッティングで洗い出し、1 mLを2回目測定試料とする。

上記1回目および2回目測定試料1 mLに0.75 μ L FL Lp SG1と0.75 μ L Lp non-SG1添加
 常温で30分間、回転振とう
 ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてフローサイトメーター(FCM)にセット
 FCMからMethod Leg area04を呼び込み測定スイッチオン

1回目および2回目測定で装置に表示される数値(/ μ L)を足し合わせ、1.1倍した後に、装置独自の補正
 値(2000/42)を掛け合せる。値を $y=0.1477x^{1.093}$ に代入して得られた数値をLp数とする

検体番号	消毒効果			レジオネラニューモフィラ (Lp) 数定量			
	全菌数	平均	判定	Lp数 (1回目)	Lp数 (2回目)	和	Lp数 ($y=0.1477x^{1.093}$)
1							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
2							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
3							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
4							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
5							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
6							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							

■立ち上げ

1. 廃液容器が満杯でないか確認する。 空気が少なければ廃棄する。
2. シース液容器の残量を確認する。 残量が少なければ追加する。
3. 電源を入れる。 電源ボタンは装置左側にあります。
4. クリーニングシーケンスを呼び出す。

Settings – Load Script – “Cleaning.scr” – Select

5. シリンジにクリーニング液または生理食塩水などを 1mL 吸引し、ホルダーセットし、Start ボタンを押す。

■測定

1. 前回の測定結果あるいは測定用スクリプトを呼び出す。

Work – Reload Data – “データ” – Select

Settings – Load Script – “測定用スクリプト” – Select

2. シリンジに測定試料を 1mL 吸引し、ホルダーにセットし、Start ボタンを押す。
3. 測定結果を保存・印字する。

保存 : 画面左下アイコン (ファイル画) を押し、名前を付けて保存

印刷 : 画面左下アイコン (プリント画) を押して印刷

■スクリプトの作成

エリアや電圧を変更した場合はスクリプトを保存します。

Settings – Store Script – 名前を付けて保存

前回の測定結果を利用する場合はスクリプトとして保存していなくても構いません。

■機器の管理

1. 光軸調整用データを呼び出す

Work – Reload Data – QC Files – “ccb OA” – Select

2. Count Check Beads green あるいは Green beads 調製液をシリンジに吸引する。
3. 装置にセットして測定する。
4. 呼び出した測定結果と同様に細い粒度分布で濃度が適切なら OK。

FL2 の CV 値_4%未満 濃度_20000~30000/mL

幅が広い場合や濃度が低い場合は、気泡抜き手順を実施してから再度測定する。

■気泡抜き

1. シース液容器を外して、右下奥に治具 (消しゴム) を置く。
2. 空のシリンジに置き換える。
3. Start ボタンを押す。
4. 5 秒ほど経過したら Cancel ボタンを押す。
5. 右下奥の治具 (消しゴム) を取り除き、シース液容器をセットする。

検査実施標準作業書

SOP No.	
作成年月日	平成 31 年 4 月 22 日
改訂年月日	年 月 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：細菌数（生菌数）
2. 試験の種類：標準菌株の定量試験（大腸菌の場合）
3. 検体の採取および試料の調製：-80 保存株を *Escherichia coli* は TSA 培地（ほかに普通寒天培地、ミューラーヒントン寒天培地等）に復元後（接種後 18 時間培養して冷蔵保存）増菌培地（mEC 培地、TSB 培地、ミューラーヒントン液体培地等）10mL に小コロニー1 個程度を接種して 36 ± 1 で 3～4 時間培養した後の懸濁液 2 mL を 9 mL PBS (pH7.2)に接種して原液とする。この時の原液は混釈したときにブイヨン中の菌が目視で薄く確認できる状態であり、これまでの実績から約 $1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/mL と推定される。予め 9 mL PBS (pH7.2)を入れた中試験管を必要分調製して、4 段階で 10 倍段階希釈列を作製した後、 10^2 および 10^3 cells/mL と予測される試料の 1mL を各 2 枚の深型滅菌シャーレに分注する。希釈列のうち 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mL オーダーの希釈液についてそれぞれの菌数を測定する。適切に希釈して希釈液の濃度が 10^2 および 10^3 cells/mL と予測される試料の 1mL を各 2 枚の深型滅菌シャーレに分注する。定法により、標準寒天培地を約 800 mL を滅菌後に 55 程度で保存した培地を準備しておき、それぞれのシャーレに分注して常温で固める。 36 ± 1 、24～48 時間培養した後、1 平板に 30～300 の集落がえられたものを生菌数として計測する。
4. 使用する機械器具の選択
 - 高圧蒸気滅菌器
 - 滅菌採取器具（薬さじ、はさみ、ピンセット等）
 - 滅菌採取ピン
 - 滅菌シャーレ（直径9～10 cm、深さ2.0 cm）
 - 中試験管
 - 滅菌ピペット（1 mL、10 mL）
 - マイクロピペット（1 mL）
 - マイクロチップ（1 mL）
 - ふ卵器（ 36 ± 1 ）
 - 恒温水槽
 - 電子天秤
 - メスシリンダー
 - 三角フラスコ
 - ストマッカー
 - ステリカップフィルターユニット

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2)を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験ではフィルターろ過は 2 回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

グルタルアルデヒド溶液

50%液、20%液 和光純薬製または同等品を用いる。

市販品を適切に希釈して最終濃度が 0.5%となるように試験液に注入し調製する。

2) 培地

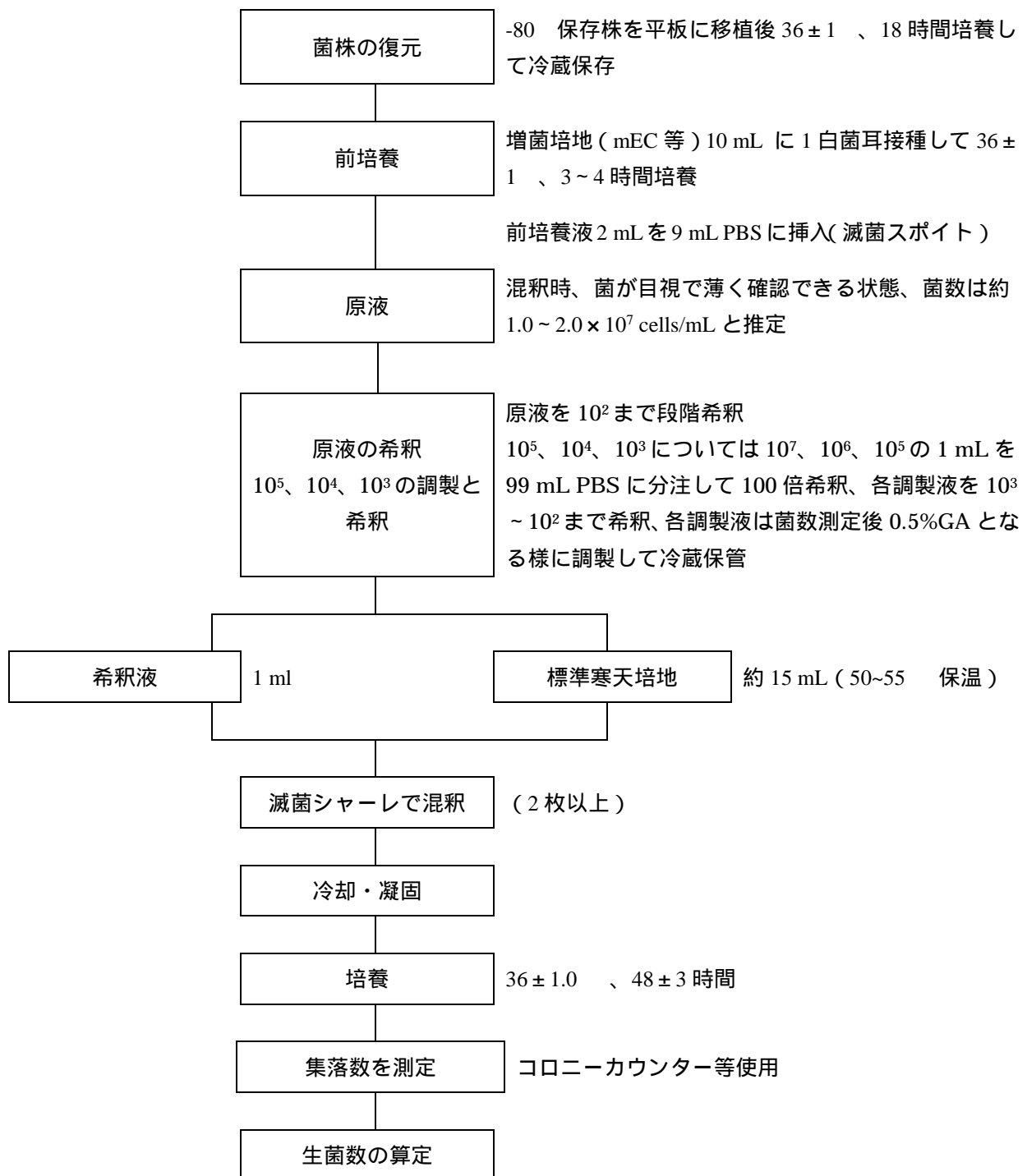
標準寒天培地

ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.5 g
ブドウ糖	1.0 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

加温溶解し、121 °C、15 分間高圧滅菌処理する。最終 pH は 7.0~7.2 とする。

市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

6. 製品検査の方法



7. 製品検査にあたっての注意事項

- 1) 試料の滅菌シャーレへの分注から冷却凝固までの操作は、20分以内に完了する。
- 2) 対照として、検体の希釈に用いた滅菌生理食塩水 1 mL に、試料に用いた同一同量の培地を混合し培養したものをを用いて、生理食塩水および培地が無菌であったこと並びに操作が完全であったことを確認する。

8. 製品検査の結果の処理

1) 集落数の算定

1 平板に 30～300 個の集落数がある場合

a) 1 段階の希釈にのみ 30～300 個の集落数が得られた場合：2 枚の平板の集落数の算術平均を求める。

b) 連続した 2 段階の希釈に 30～300 個の集落数が得られた場合：希釈ごとに 2 枚の平板の算術平均を算定し、両者の比を求める。

- 両者の比が 2 倍未満のときは、以下の計算式により連続する 2 段階の希釈平板の集落数から菌数を算定する。

$$N = \{ (A+B) / 2d_1 + (C+D) / 2d_2 \} / 2$$

A, B：低希釈の集落数

C, D：高希釈の集落数

d₁：希釈が低いほうの希釈倍率

d₂：希釈が高いほうの希釈倍率

- 両者の比が 2 倍を超えたときは希釈段階の低いほうの集落数の算術平均を求める。

全平板が 300 個を超えた集落数である場合

最も希釈倍率の高いものについて、正確に 1 cm² の区画のある密集集落計算版を用いて計測する。

a) 1 cm² の区画に 10 個以下の集落数の場合：中心を通過し直行する 2 直径を作り、その中心より区分された 1 cm² 区画の 6 箇所集落数を数えて、1 cm² 区画の平均集落数を求め、これに滅菌シャーレの面積を乗じて 1 平板あたりの集落数を算出する。直径 9 cm の滅菌シャーレでは、得られた 1 cm² の平均集落数に 65 を乗じる。

b) 1 cm² の区画に 10 個以上の集落数の場合：前記と同様にして 4 区画の集落数から 1 cm² 区画の平均集落数を求め、滅菌シャーレの面積を乗じて 1 平板あたりの集落数を算出する。

全平板が 30 個未満の場合

最も低い希釈倍数に 30 を乗じる。試料液は 10 倍希釈であるので 300 以下として記載する。

拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分を計測する

a) 他の集落がよく分散していて、拡散集落があっても計測に支障のないもの。

b) 拡散集落の部分が平板の 1/2 以下の場合。

2) 菌数の記載

算定対象とした平板の集落数に希釈倍数を乗じ、さらに得られた数字の上位 3 桁目を四捨五入して、上位 2 桁を有効数字として表示し、1 mL 当たりの菌数とする。例えば、算定された菌数値を 30500 /mL または 3.1×10^5 /mL と記載し、試料液は 10 倍希釈されているので、算定された菌数値を 10 倍した値が 1 mL 当たりの菌数となる。試料液はなお、最低希釈平板の集落発生数が 30 未満の場合も、必要があれば測定値をそのまま記載しておく。

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日 ~ 年 月 日

[検体数：]

担当者
田栗

1. 試験項目：生菌数

2. 製品の種類：標準菌株の定量試験

3. 培地の作製

(1) 作製月日： 月 日

滅菌リン酸緩衝水

(PBS(pH7.2)1包/L、NaCl 8.5g / L、121 , 15分間高压滅菌処理)

99 ml (本)、9 ml (本) 作製

(2) 作製月日： 月 日

標準寒天培地【メーカー： , Lot： 】

(121 , 15分間高压滅菌処理, 1検体につき5本) (mL) 作製

4. 生菌数の試験

菌株の復元 -80保存株 (No.) を平板に移植培養 (36 ± 1 、 <18h)、冷蔵保存

前培養 増菌培地 (mEC等) 10 mL に1白菌耳接種して 36 ± 1 、3~4時間培養

原液作製 9 mL PBSに前培養液2 mLを滅菌スポイトで接種 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/mL相当)

原液の希釈 原液を 10^2 まで段階希釈、 10^3 と 10^2 の1 mL分注 (原液用2枚以上)

段階試料液の調製 10^5 、 10^4 、 10^3 については 10^7 、 10^6 、 10^5 の1 mLを99mLPBSに分注して100倍希釈

段階試料液の希釈 10^5 、 10^4 、 10^3 を、 $10^3 \sim 10^2$ まで希釈 (菌数測定後に固定)

各希釈液の分注 滅菌シャーレに1 mL分注 (各希釈段階で2枚以上)

標準寒天培地の分注混釈・冷却・凝固 約15 mL (50~55 保温)

培養 35 ± 1 、 48 ± 3 時間

集落数の測定

検体番号	各希釈段階における集落数				
	10 ^()	10 ^()	10 ^()	10 ^()	10 ^()
原液					
10 ⁵					
10 ⁴					
10 ³					

生菌数の算定