

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 神戸市健康科学研究所  
研究分担者： 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部  
研究協力者： 平塚 貴広 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： 蔡 国喜 長崎県環境保健研究センター  
研究協力者： 田中 忍 神戸市環境保健研究所  
研究協力者： 縣 邦雄 アクアス株式会社  
研究協力者： 新道 欣也 株式会社 お風呂のシンドー  
研究協力者： 鳥井 良太 株式会社 お風呂のシンドー  
研究協力者： 齋藤 利明 株式会社ヤマト  
研究協力者： 木村 哲也 株式会社ヤマト  
研究協力者： 小森 正人 株式会社ヤマト  
研究協力者： 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨

循環浴槽で再発を繰り返すレジオネラ汚染の迅速検出法の一つとして、フローサイトメトリー法（FCM法）を開発し、その技術の標準化と普及を目的に共同調査を実施した。地方衛生研究所の3機関と民間企業の1機関が共同調査に参画した。当該技術の開発機関から参加機関に対して技術研修を実施し、*Legionella pneumophila*の模擬試料、試薬、使用するプロトコルおよび装置を配布した。自家調製した模擬試料の添加回収実験は、全参加機関で回収率80~130%と良好な成績を示し、市販の模擬試料でも同等の成績が得られた。営業入浴施設の調査における、レジオネラ培養検査結果に対するFCM法の感度と特異度は、全試料(N=267)で感度83.1%、特異度79.6%を示した。機関ごとでは感度91.7%、特異度95.3%(N=55)から感度55.6%、特異度75.3%(N=90)とばらつきがあり、検体輸送の影響や装置の器差ならびに研修時間の不足が考えられた。レジオネラ定量値と生菌数にはやや相関が認められ( $y = 32.547x^{0.2577}$ 、 $R^2 = 0.2091$ )、培養法の定量下限近くでFCM値が高い値を示す傾向にあった。オゾンで逆洗処理した、循環ろ過器の逆洗液にFCM法を適用したところ、全細菌数が逆洗前後で有意に減少し( $p < 0.01$ )、オゾンを用いた逆洗方法の有効性を確認した。

A. 研究目的

本研究の目的は、Taguri *et al.*の報告<sup>1)</sup>に基

づいてフローサイトメトリー法（FCM法）の

共同比較実験を行って精度と信頼性を証明す

ることにより、レジオネラ汚染の迅速探知を目的とする同法の普及と、公衆浴場におけるレジオネラ汚染対策の向上に資することである。最初に、同法について精度管理に基づく標準作業書を作成するとともに4つの研究機関の協力者向け技術研修を実施した。各機関向けに装置と精度管理用の標準試料を送付して、各機関で添加回収試験の結果を比較した。最終的に各機関において実試料を用いて実施した成績を比較して、FCM法の実用性を評価した。また循環ろ過器にオゾン曝気方式による洗浄処理を実施している施設水の評価にFCM法を適用できるか検討した。

## B. 材料と方法

### 1. 共同比較実験

#### 1.1. 共同比較実験の参加機関

共同研究には、地方衛生研究所3機関(以下A~C研究所という)と民間企業研究所の1機関(以下D研究所という)が参加した。基盤技術の開発機関であるA研究所において、下記のとおり、標準作業書と模擬試料を準備して、B~D研究所協力者の技術研修を行った。予めA研究所で機器の動作確認と模擬試料の作製等を行って、各協力機関に配布した。FCM法については田栗らの報告<sup>2)</sup>に基づいて標準作業書に則って行われたが、培養法については各研究所の方法に準じた。

#### 1.2. 標準作業書とワークシートの作成

本FCM法は、本来、HIV/AIDSの臨床検査用のフローサイトメーターを用いており、細菌に適用するには適切な模擬試料の作製と添加回収実験による技術の検証が必要である。*Legionella pneumophila*(以下LPと略)標準菌株による模擬試料の作製方法、FCM法による模擬試料の添加回収実験の方法およびFCM法による実試料(浴槽水)の検査方法について、標準作業書と作業用ワークシートを作成した(別紙1、2)。

#### 1.3. 模擬試料の作製方法

-80°C保存のLP NIIB0058をBCYE $\alpha$ 培地

に復元後、増菌培地(*Legionella* LC Medium Base, 9016, TAKARA)1mL入り1.5mLマイクロチューブに小コロニー1~数个を接種して、恒温水槽で36 $\pm$ 1°C、18~24時間培養した後の懸濁液の上清0.5mLを4.5mL PBS(pH7.2)に接種して原液とした。この時の原液は、約1.0~2.0 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/mLと推定される。原液、10<sup>6</sup>および10<sup>5</sup> cells/mLオーダーの懸濁液を100倍希釈して、それぞれ10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>および10<sup>3</sup> cells/mLオーダーの模擬試料とした。各試料を適切に希釈してBCYE $\alpha$ 培地に接種し、36 $\pm$ 1°C、72~96時間培養してレジオネラの生菌数を計測した。模擬試料は終濃度0.05%グルタルアルデヒドと0.1%アジ化ナトリウムを加えて固定し、36°Cで3時間保温後に冷蔵保存してFCM法に供した。固定後の模擬試料は死菌であることを確認した。消毒効果判定に用いる全細菌数(Total bacterial counts)の測定には*Escherichia coli*の10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>および10<sup>3</sup> cells/mLオーダーの希釈液を調製した。増菌培地にTSB、平板培地にTSAを用いて平板法培養時間を48時間に短縮する以外は上記と同様に調製した。

#### 1.4. 市販品を用いたレジオネラ検出用模擬試料の作製方法

IDEXX-QC *Legionella pneumophila* (98-0009287-00, IDEXX)を取扱説明書どおりに処理した。即ち、1バイアルを-30°Cの冷凍庫から取出し、室温15分間静置後に、バイアル内のカラーディスクを無菌的に10mL滅菌蒸留水に移し入れて、10~15分間転倒混和して完全にディスクを溶解させた。調製菌液の100 $\mu$ Lを5枚のBCYE $\alpha$ 培地に塗抹して、36 $\pm$ 1°C、72~96時間培養した後の生菌数を計測した。調製済み模擬試料の生菌数はFCM実測値(4,573 $\pm$ 467 CFU/mL)の1/10量程度(390 $\pm$ 102 CFU/mL)であった。残りの調製菌液に終濃度0.05%グルタルアルデヒドと0.1%アジ化ナトリウムを加えて固定し、36°Cで3時間保温後に冷蔵保存して試験に供した。

### 1.5. フローサイトメトリー用染色試薬

全細菌数(Total Bacterial Counts, TBC)の測定に際しては、田栗らの方法<sup>2)</sup>に準拠して、試料 1mL と 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) を含む希釈液 1 mL を混合し、0.1% propidium iodide (PI) を 10  $\mu$ L 加えたのち、5 分間静置させ、フローサイトメーターにより計測した数値を TBC とした。LP 染色用には、レジオネラ特異性が異なる抗 LP 抗体 FL Ip SG1 (V6051, Virostat) と FL ARK\_Ip (ARK resource) を Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) で標識し、等量を混合して FL Ip mix として使用した。試薬は抗体量として約 1 mg/mL の抗 LP 抗体を含む濃度となるように調製した。

### 1.6. フローサイトメトリー

フローサイトメーターは、田栗らの方法<sup>2)</sup>に準拠して miniPOC (シスメックスパルテック社) を使用した。本機はもともと HIV/AIDS 患者の血液細胞モニタリング用に市販されているものであるが、本体重量が 6.5kg、測定時間は約 5 分間と可搬性と利便性に優れているために本研究で採用した。その光学的特長は励起/蛍光波長が 532 nm/570 nm、610 nm の半導体レーザーを搭載することにより、標的細胞へのレーザー照射で得られる側方散乱光と蛍光強度をフォトマルチプライヤー (光電子増幅管) により探知して、内蔵の解析装置で細胞数として数値化する。本装置で自動的に表記される細胞数 (cells/ $\mu$ L) は人白血球用キットに最適化されているために、ここでは細菌用に換算する必要がある。測定に際しては、試料を所定の染色液を注入して反応させたのち、2 mL プラスチックシリンジで吸引後にシリンジごと miniPOC にセットした。この時、あらかじめ染色試薬用の測定最適条件と試薬由来ノイズを検出しない散布図に特定領域を設定して、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 つの指標として特定領域内の細胞を計数した。

### 1.7. 添加回収試験

レジオネラ菌数測定に際して、 $10^3$ 、 $10^4$  および  $10^5$  cells/mL オーダーの LP 模擬試料を使用した。各試料 1 mL に等量の 0.1%BSA 加 PBS を加えたのちに FL Ip mix の 3 mL を追加して、常温で 30 分間、巡回振とうさせ、miniPOC で計測した数値に装置独自の補正值 (2000/42) を掛け合せて添加菌量とした。回収実験では、 $10^3$ 、 $10^4$  および  $10^5$  cells/mL オーダーの LP 模擬試料の各 1 mL を 500 mL PBS に接種して希釈液を作製した。0.2  $\mu$ m 孔フィルターでろ過濃縮したのち、フィルターを 55 mm シャーレに貼付け、0.6 mL PBS と 0.6 mL 0.1%BSA 加 PBS を加えて、10 回以上フィルター表面をピペッティングで洗い出すことにより回収した。同じことを繰り返した 2 回収液を FL Ip mix で染色し、30 分間反応後に miniPOC で測定した値に装置独自の補正值を掛け合せて回収菌量とした。添加菌量と回収菌量により回収率を求めた。市販品を用いたレジオネラ検出用模擬試料でも同様に処理して回収率を比較した。

### 1.8. 実試料の測定

#### 1.8.1. 採水

試料は DPD により塩素濃度を測定したのちに、終濃度 50 mg/L となるようにチオ硫酸ナトリウムを入れた 1 L の滅菌済み PP プラスティック容器に採水した。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した。

#### 1.8.2. 消毒効果判定

最初に miniPOC を用いて非濃縮浴槽水中の塩素消毒効果を判定した。即ち、検体 1 mL と等量の 0.1% MTAB 希釈液 1 mL とを混合し、0.1% PI 10  $\mu$ L を加えた後、miniPOC にセットして TBC を測定した。測定値に装置独自の補正值を掛け合せて細菌数とした。この時、試料中の TBC が判定基準値 1000 counts/mL を越した場合は「非清浄」と判定し、続く LP 定量検査で LP が検出された場合は生菌と判定した。TBC が 1000 counts/mL に満たない試料は「清浄」と判定し、LP が検出された場合

でも死菌と判定した<sup>2)</sup>。

### 1.8.3. LP の特異的定量

浴槽水の LP 定量用蛍光染色試薬は、FL Ip mix を用いた。検水 500 mL を 0.2 μm 孔フィルターで吸引ろ過した後、フィルターを 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、MF 表面をピペティングで洗い出した液を回収した。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 回目の回収液とした。各回収液 1 mL に染色試薬 FL Ip mix 1.5 mL を加えて、30 分間回転振盪させたのち、miniPOC で測定した。この時、装置由来の誤差 (換算比 : 2000/42) と回収時に発生する誤差 (容量比 : 1.1) により補正したのち、予め作成した検量線により濃度換算して LP 数とした<sup>2)</sup>。D 研究所は 250 mL の検水を用いて同様に処理した。

### 1.8.4. 平板培養法

レジオネラ属菌検査は各研究所の方法で実施した。即ち、A~C 研究所では森本らの方法<sup>3)</sup>でろ過濃縮法を行ったが、D 研究所は遠心沈殿法を用いた。培地は GVPCα 培地 (ビオメリュー) を使用し、100 倍ろ過濃縮した検水を塗抹後 36°C で 3~7 日間培養し、システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。

### 1.8.5. 現地調査

主に循環ろ過式浴槽水を対象として調査したが、一部かけ流し式浴槽水、貯湯タンク水および水風呂が含まれていた。A 研究所では遊離塩素管理の 93 検体、B 研究所は遊離塩素管理 29 検体、C 研究所は遊離塩素管理等 (二酸化塩素管理含む) 55 検体、モノクロラミン管理 6 検体、D 研究所では遊離塩素管理の 90 検体を処理した。採水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。

## 2. オゾン逆洗の調査

2021 年 8 月から 2022 年 3 月にかけて、循環ろ過式浴槽のろ過器にオゾンを用いた逆洗消毒の有用性評価研究 (本分担研究とは別途

報告) のサンプルを、FCM 法で評価した。非濃縮逆洗水の全細菌数 (TBC) を、遊離塩素消毒された浴槽水と同様に測定し、1,000 倍濃縮後に抗レジオネラ抗体染色を用いてレジオネラを測定した。並行して、レジオネラ遺伝子検査 (CycleavePCR Legionella Detection Kit, CY240, Takara-bio) 、レジオラート検査、レジオネラ培養検査を実施した。

## C. 結果および考察

### 1. 共同比較実験

#### 1.1. 添加回収実験

表 1 に今回自家調製した模擬試料と市販材料を用いた回収率の比較を示した。回収率が最も低値を示したのは B 研究所の  $10^4$  オーダーの模擬試料で、最も高値を示したのが C 研究所の  $10^3$  オーダーの模擬試料だった。平均回収率は概ね 80%~130%であり、一般生菌数について、Xbar 管理図における管理限界線の指標とされる 30%~300%と比べると良好な成績と考えられた<sup>4)</sup>。今回供試した 3 段階のレジオネラの模擬試料において、研究所間に差は認められなかった。

市販品を用いて作製した模擬試料による添加回収実験の結果は A 研究所で 94.3%、D 研究所で 96.5%であった。市販品をもちいたことから模擬試料作製作業は比較的簡単であり、FCM の回収実験として問題なく適用できると考えられた。

#### 1.2. 施設調査

表 2 に共同調査研究における施設調査のまとめを記載した。施設調査において、培養法と比較した消毒効果判定結果の感度と特異度は研究所間で大きく異なった。最も良好な成績を示したのは C 研究所であった (感度 91.7%、特異度 95.3%)。該研究所は 2 回目の共同調査実施で成績は 1 回目参加時よりも改善しており、スキル向上が考えられた。A 研究所は開発機関であることから高い感度を示したが、特異度が低かった (感度 96.9%、特異度 73.8%)。これは偽陽性が多かったことを示す

が、検体の中にレジオネラ以外の細菌増殖が多いと推察される貯湯タンク水や水風呂が多く含まれていたことが要因と考えられた。これらの検体について並行実施したレジオラートの結果において、平板培養法が陰性であった検体（偽陽性結果：FCM法で汚染判定）が陽性を示していたことからこのことは支持される（データ省略）。B研究所とD研究所において、偽陰性も偽陽性も多く検出された。その理由として、第一に検体の中和や輸送条件、並びに装置の感度が異なっていたために、検体輸送の影響や装置の器差による要因が考えられた。しかし、本技術が一般的に普及していなかったことやこれらの研究所が初めての参加であったこと、さらにはコロナパンデミックによりヒトの往来が制限されたことが要因として挙げられ、より丁寧な技術研修の必要性があったとも考えられた。一部の検体では計測阻害と考えられる現象があり前処理（ビーズによる粉碎と超音波処理）による改善が認められたが、時間と手技の複雑さが障害となるために、低スペックの当該装置にどこまでの精度と正確性を求めるかが争点となる。モノクロラミン管理施設の調査成績も良好であった（表2）。

### 1.3. 施設調査におけるレジオネラの定量性

今回実施した共同調査研究の施設調査のうち、FCMで非清浄と判定されたサンプルのレジオネラ定量値（カットオフ値 10 CEC/100 mL）と生菌数（カットオフ値 10 CFU/100 mL）との相関を見たところ、培養法のカットオフ値近くでFCM値が高い値を示す傾向があったものの、弱い相関が認められた（ $y = 32.547x + 0.2577$ 、 $R^2 = 0.2091$ ）。最大の矛盾が見られたのが、生菌数 10 CFU/100 mL に対して、FCMが 2,712 CEC/100 mL を示した例であった。本検体の遊離塩素濃度は 2.0 mg/L 以上を示しており、高濃度塩素の存在にもかかわらず、微量の生菌と死菌や VBNC 状態のレジオネラが共存した状態と考えられた。TBC は基準値を超えていたものの 1,548

counts/mL と比較的 low 値であり、このようなケースでは、配管やろ過器内に繁茂する生物膜由来の細菌群の影響による塩素の不完全な消毒状態が想像されたため、配管洗浄を必要とするケースと考えられた。実際に、筆者らが経験した塩素濃度が 2.0 mg/L 以上で最少のレジオネラが検出された事例では、浴槽水の TBC は少なかったがろ過器排水から大量の細菌が検出されて、配管洗浄により劇的に消毒環境が改善し、レジオネラも検出されなくなった（データ省略）。

### 2. オゾン逆洗の調査

詳細は別の報告書に譲り、本報告では FCM 法の結果に集中して記載する。オゾン逆洗から回収した逆洗水に FCM 法を適用した（図3）。ろ過器へのオゾン処理の開始直後は、TBC 等にほぼ変化がなかったが、配管洗浄（ハイライト SPA-FC3, 日産化学）を実施し、かつオゾン量を 2 倍にしたところ、TBC が激減した。その後しばらく TBC の変動が認められたが、特に No.23 以降は低く抑えられていた。レジオネラ生菌は培養法でもレジオラートでも、逆洗水から継続して検出されなかった。配管洗浄かつオゾン強化の前後で TBC を比較したところ、処理前の平均値（ $\pm$ 標準偏差、試料数 N）は、446,163（ $\pm 306,659$ 、N=10）counts/mL に対して、処理後が 71,693（ $\pm 137,891$ 、N=16）counts/mL となり、この間に有意差を認めた（t 検定、 $p=0.004$ ）。このことは、ろ過器のオゾン逆洗の有効性を示すと考えられた。なお、閾値（1,000 counts/mL）は浴槽水における判定基準であり、ろ過器逆洗水の判定基準ではないので、閾値の超過はここでは問題ではない。それでも、試験 16 週以降、「清浄」判定された浴槽水が少しずつ認められる傾向にあり、オゾン逆洗によりろ過器は清浄化の方向にあると考えられた。

### D. 結論

共同調査研究において、参画研究所における模擬試料を用いた FCM 法の添加回収実験

は 80~130%と良好な成績を示し、施設調査における感度と特異度を比較したところ、研究所ごとのばらつきが認められたものの、全体で感度 83.1%、特異度 79.6% (N=267) と一定の成果が認められた。

オゾン逆洗の逆洗水に FCM 法を適用した。TBC の減少、すなわちオゾン逆洗の有効性を認めた。FCM 法は、このような各種対策における有効性の検証に貢献できると考えられた。

## References

1. Taguri, T, Oda, Y, Sugiyama, K, Nishikawa, T, et.al., A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of Legionella in bath water. J. Microbiol. Methods, 86, 25–32, 2011.
2. 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.
3. 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.
4. 作者不詳, 外部精度管理調査の概要, 一般財団法人食品薬品安全センターホームページ, 20220311 アクセス  
[http://www.fdsc.or.jp/Food%20hygiene\\_QC/](http://www.fdsc.or.jp/Food%20hygiene_QC/)

表1. 3段階の模擬試料と市販材料を用いた添加回収試験結果

		使用菌株: <i>Legionella pneumophila</i> N IIB0058			ID EXX-QC
	10 <sup>5</sup> (CFU/mL)	10 <sup>4</sup> (CFU/mL)	10 <sup>3</sup> (CFU/mL)	10 <sup>2</sup> (CFU/mL)	
A研究所	99.9%	108.3%	119.6%	94.3%	
B研究所	141.1%	69.1%	82.3%		
C研究所	125.1%	90.3%	252.0%		
D研究所	156.9%	78.8%	90.7%	96.5%	
全体	130.8%	86.6%	136.1%		

CFU: colony forming unit

表2. 共同比較研究における施設調査結果の比較

	遊離塩素消毒				モノクロラミン等消毒			
	感度	特異度	有効性	試験数	感度	特異度	有効性	試験数
A研究所	96.9%	73.8%	81.7%	93				
B研究所	66.7%	81.8%	72.4%	29				
C研究所	91.7%	95.3%	94.5%	55	100.0%	100.0%	100.0%	6
D研究所	55.6%	75.3%	73.3%	90				
全体	83.1%	79.6%	80.5%	267				

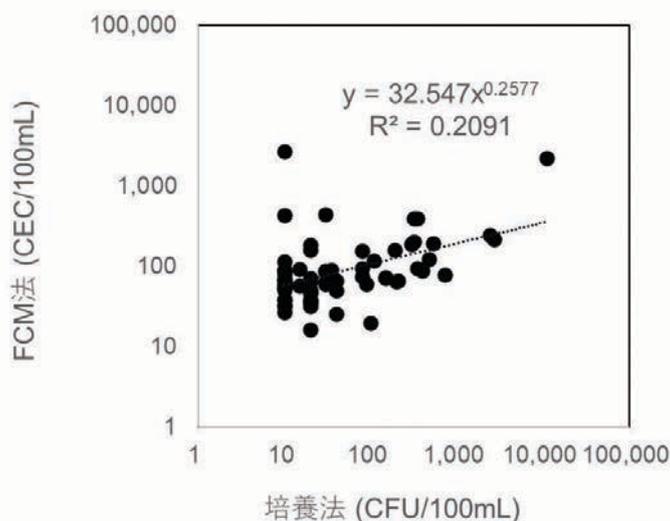


図1. FCM法と培養法のレジオネラ菌数の相関

消毒効果なし、有効数値が検出限界以上のサンプルのみ

FCM: flow cytometry, CEC: cell-equivalent counts, CFU: colony forming units

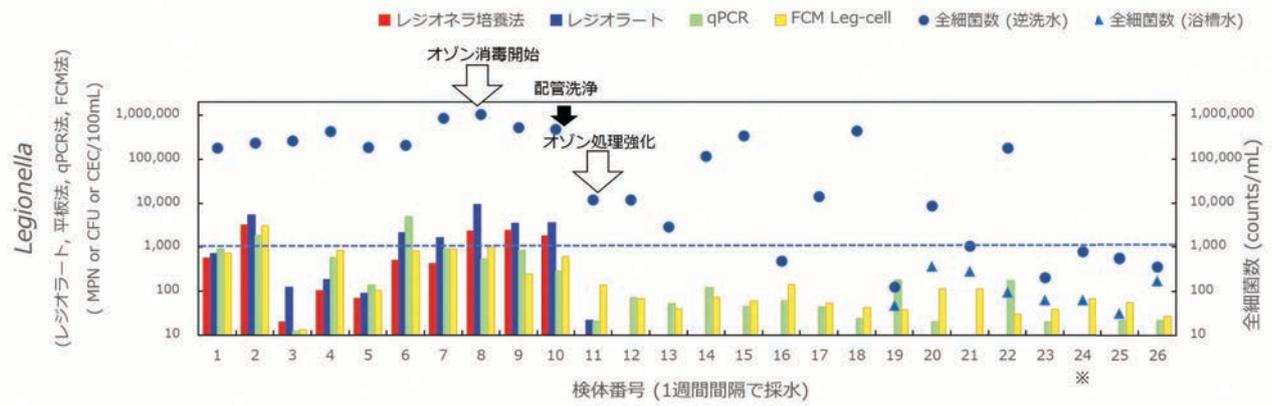


図3. オゾン消毒によるろ過器排水中のレジオネラ数の推移

破線 (1000 counts/mL) はFCM法による浴槽水の消毒効果に対する判定閾値 (逆洗水は対象外) で ▲全細菌数 (浴槽水) に適用する  
 MPN: most probable number, CFU: colony forming unit, CEC: cell-equivalent counts

# 検査実施標準作業書

SOP No.	1-1
作成年月日	令和元年 5月 8日
改訂年月日	令和 3年 12月 10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  $36 \pm 1$  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～数个程度を接種して、恒温水槽で  $36 \pm 1$ 、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。 $36 \pm 1$ 、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 ( $36 \pm 1$  °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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (無水)	6.6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (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

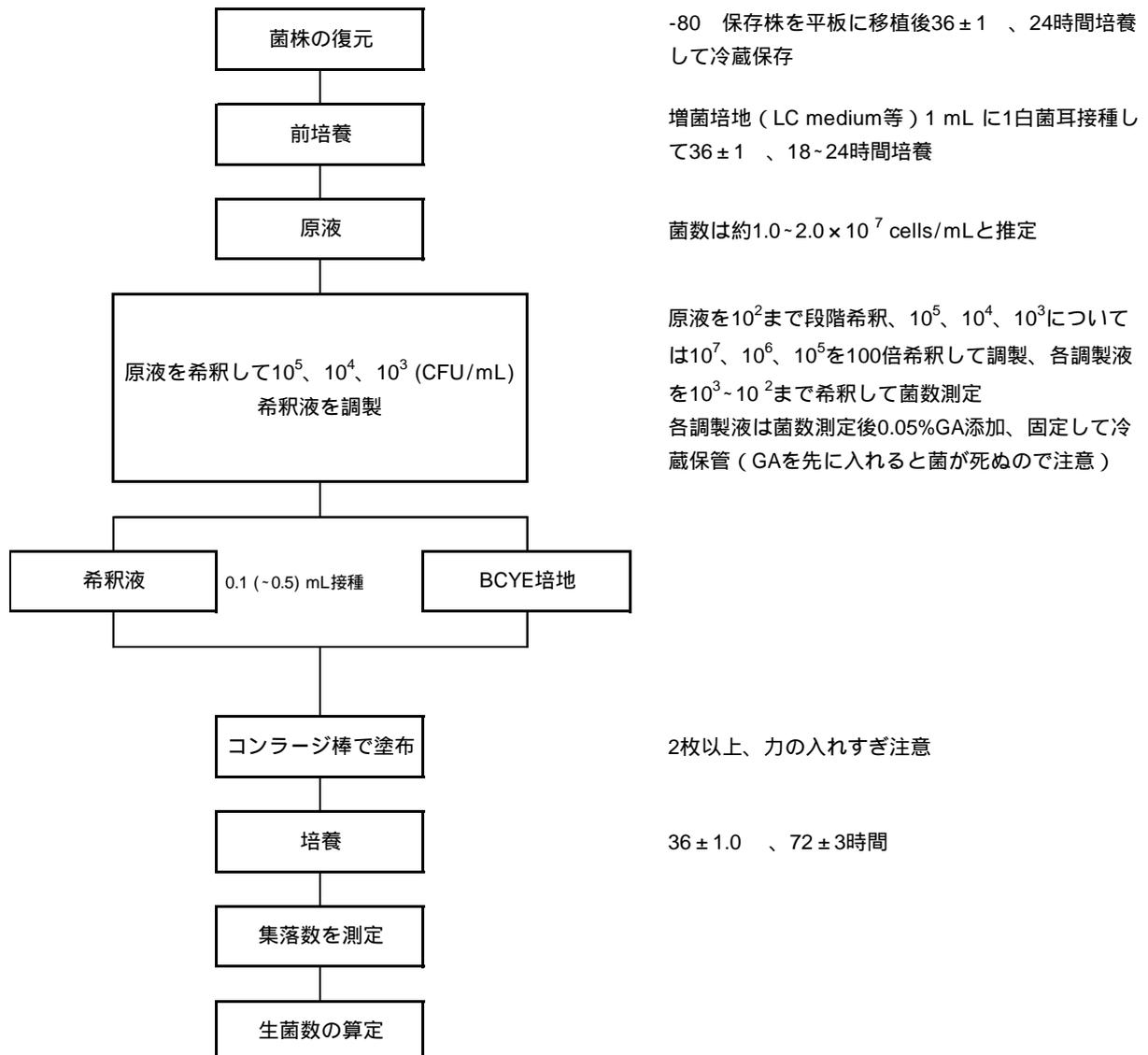
グルタルアルデヒドの 50% 溶液、20% 溶液、和光純薬製または同等品を用いる。市販品を適切に希釈して 5% 液を調製、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。最終濃度が 0.05% となるように試験液に注入する。

### 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

d<sub>1</sub>：希釈が低いほうの希釈倍率

d<sub>2</sub>：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 cm<sup>2</sup> の区画のある密集集落計算版を用いて計測する。

a) 1 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup> 区画の 6 箇所集落数を数えて、1 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup> の平均集落数に 65 を乗じる。

b) 1 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup> 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  $3.1 \times 10^5$  /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.	1-2
作成年月日	令和3年12月10日
改訂年月日	令和 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検出
2. 試験の種類：市販品を用いたレジオネラ検出用模擬試料の作製
3. 検体の採取および試料の調製：IDEXX-QC Legionella pneumophila (98-0009287-00, IDEXX) の1バイアルを取扱説明書どおりに調製する。即ち、バイアルを-30℃の冷凍庫から取出し、室温で15分間静置する。バイアル内のカラーディスクを無菌的に滅菌チューブに準備した10 mL 滅菌蒸留水に移し入れて、10～15分間転倒混和して完全にディスクを溶解させる。調製した10 mL 菌液の0.1 mL を5枚のBCYE 培地に接種してコンラージ棒で塗抹する。残りの菌懸濁液には100 µL の5% を接種して冷蔵保存し、模擬試料として使用する。平板は $36 \pm 1$  ℃、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。

これまでの実績から、この時の原液は生菌として約 $500 \pm 100$  CFU/mLであるが約10倍の菌(約 $5,000 \pm 1,000$  Cell 相当数/mL)が存在することを確認している。

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)
  - 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 ( $36 \pm 1$  ℃)
  - 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (無水)	6.6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (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。

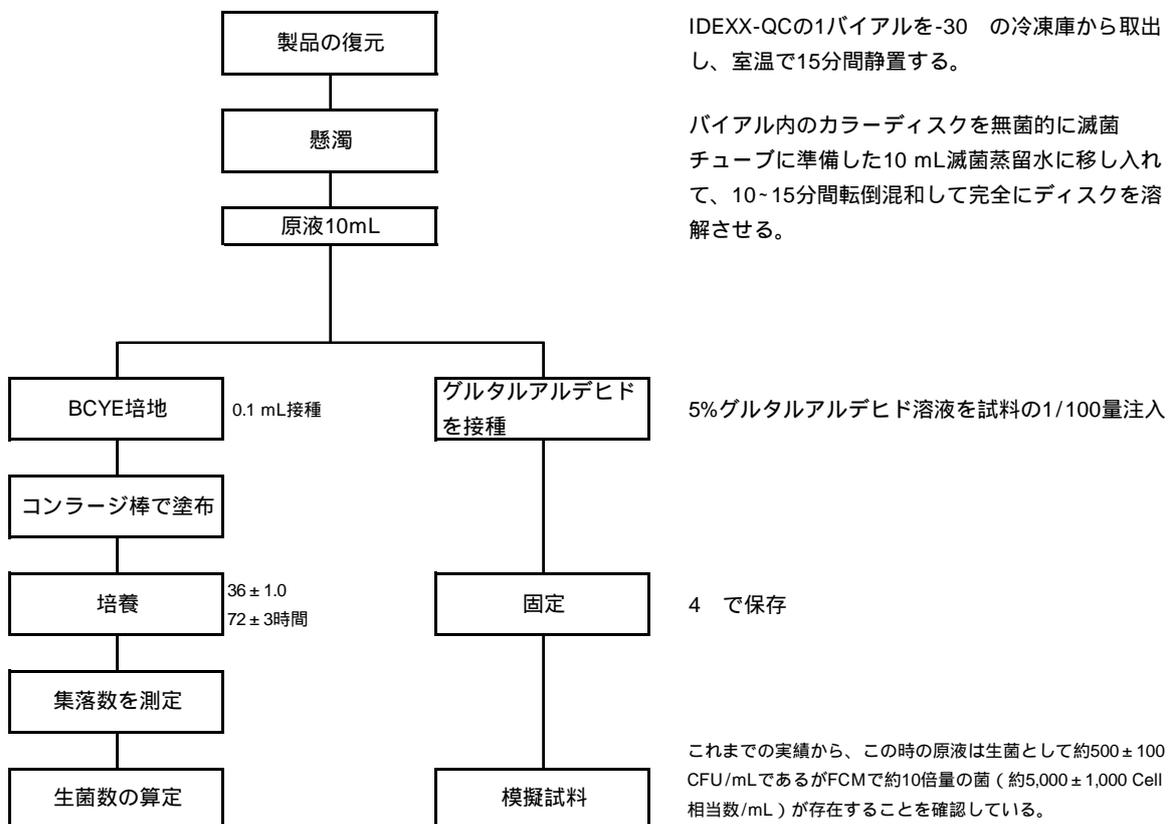
### 2) 培地

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

製品の名称 IDEXX-QC Legionella pneumophila (98-0009287-00, IDEXX)



## 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

d<sub>1</sub>：希釈が低いほうの希釈倍率

d<sub>2</sub>：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 cm<sup>2</sup> の区画のある密集集落計算版を用いて計測する。

a) 1 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup> 区画の 6 箇所集落数を数えて、1 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup> の平均集落数に 65 を乗じる。

b) 1 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup> 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<sup>5</sup>/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.	2-1
作成年月日	令和元年 5月 8日
改訂年月日	令和3年 4月 19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 Propidium Iodide (PI) 10  $\mu$ L を加えた後、5 分間静置し、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非濃縮液試料 1 mL を 5 mL チューブに分取し、等量の 0.1% BSA 入り PBS を加えたのちに FL Lp mix (FL lp SG1 と FL non\_Lp SG1 を等量混合した抗レジオネラニューモフィラ用染色試薬) の 3  $\mu$ L を追加して、常温で 30 分間、巡回振とうする。染色後、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 ( $\mu$ 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 オーダーの非濃縮模擬試料の各 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  $\mu$ 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 表面をピペティングで洗い出すことにより回収する。さらに 1 mL 0.1% BSA 入り PBS 1 mL を加えて同じ操作を繰り返し、1 mL を回収する。回収液 1 mL に FL Lp mix 1.5  $\mu$ L 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 ( $\mu$ 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)

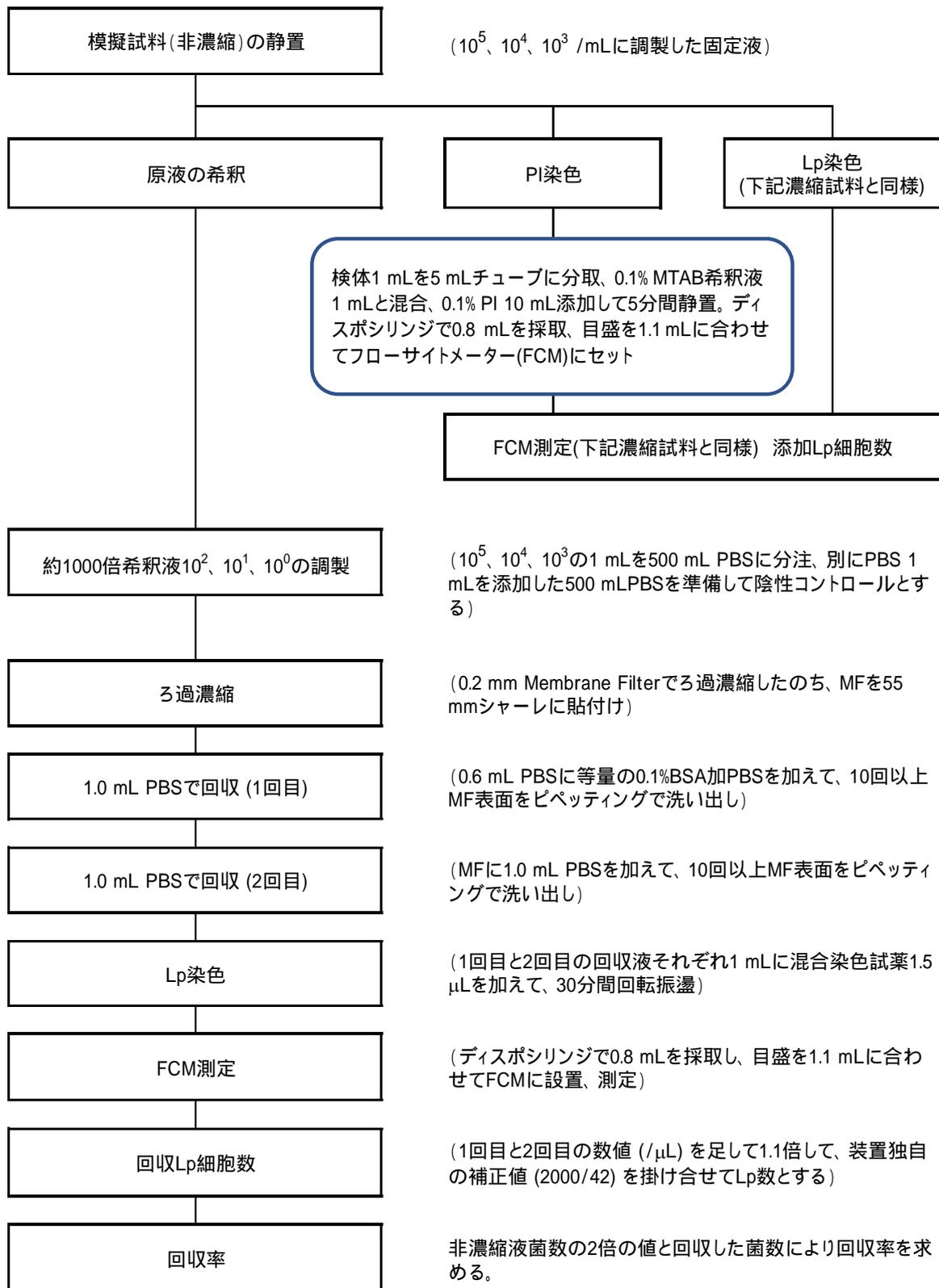
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (無水)	6.6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

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)
- 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する。
- FL Lp SG1 と FL non\_lp SG1 を等量混合して FL Lp mix とし、40 µL ずつ小分けして -30 °C で冷凍保管。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: 100 mL 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.	3-1
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  $\mu$ 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 SG 用染色試薬 (FL Lp mix) を用いる。検水 500 mL を 0.2  $\mu$ m Membrane Filter (MF) で吸引する過した後、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 mix 1.5  $\mu$ L 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全量を採取し、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 ( $\mu$ 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)
- ステリ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)

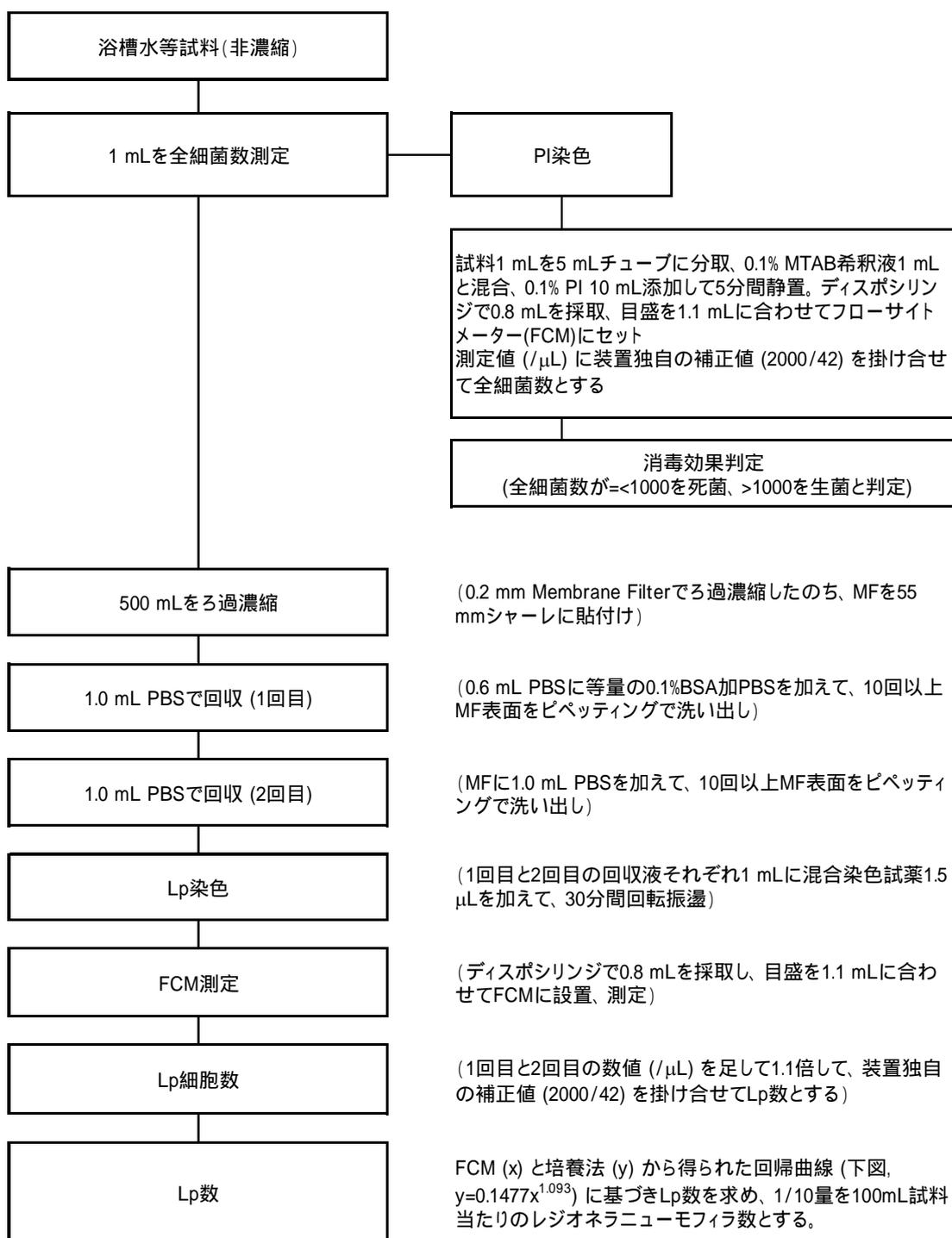
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (無水)	6.6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

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あるのでフィルターろ過は 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。

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)
- 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する。
- FL Lp SG1 と FL non\_lp SG1 を等量混合して FL Lp mix とし、40 µL ずつ小分けして -30 °C で冷凍保管。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 : として作製した 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



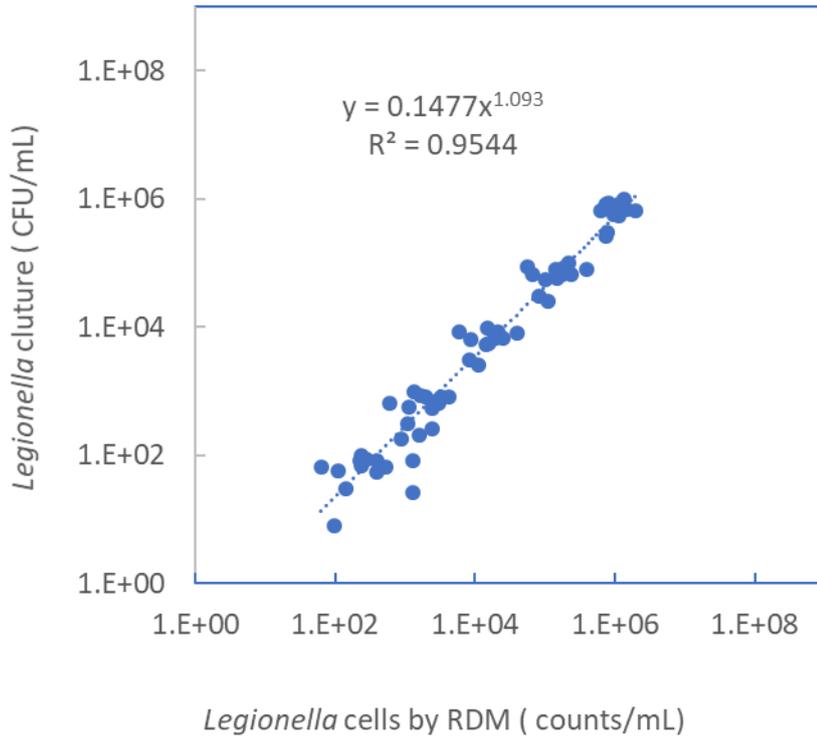


Fig. Correlation between culture method and RDM (11 strains of *Legionella pneumophila*)

# 検査実施標準作業書

SOP No.	3-2
作成年月日	令和3年12月10日
改訂年月日	令和 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冷却塔水（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 プラスティ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  $\mu$ 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 SG 用染色試薬 (FL Lp mix) を用いる。検水 20 mL を 20 mL ディスポシリンジに吸引して、3~5  $\mu$ m Membrane Filter (MF) で粗ろ過後、ろ液を新しいビーカー等に回収する。20 mL ディスポシリンジに再度ろ液を吸引して、0.2  $\mu$ m  $\times$  25 mm MF 入りシリンジフィルターホルダー（スウィネクス 37: SX0002500, メルクミリポア）で吸引し過ぎた後、MF を取り出して 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 mix 1.5  $\mu$ L 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全量を採取し、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 ( $\mu$ 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)
- ディスポシリンジ (3 µm)
- プラスティックシリンジ (20 mL)
- シリンジフィルターホルダー (25 mm)
- メンブレンフィルター (0.2 µm × 25 mm)
- ふ卵器 (36 ± 1 )
- 恒温水槽
- メスシリンダー
- 三角フラスコ
- ビーカー
- 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (無水)	6.6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

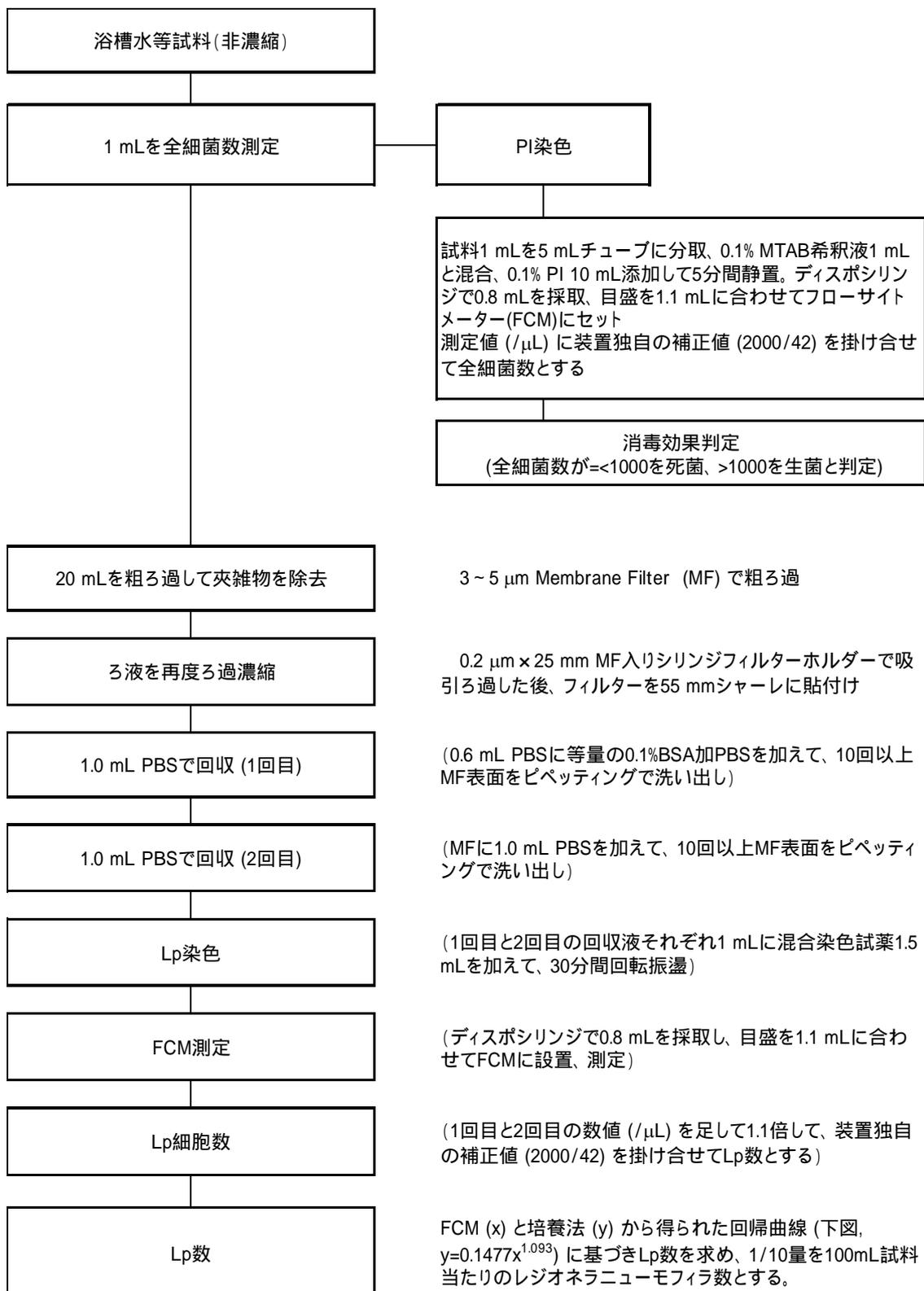
りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、0.2 µm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験であるのでフィルターろ過は 2 回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

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)
- 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する。

- FL Lp SG1とFL non\_lp SG1を等量混合してFL Lp mixとし、40  $\mu$ Lずつ小分けして-30 で冷凍保管。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



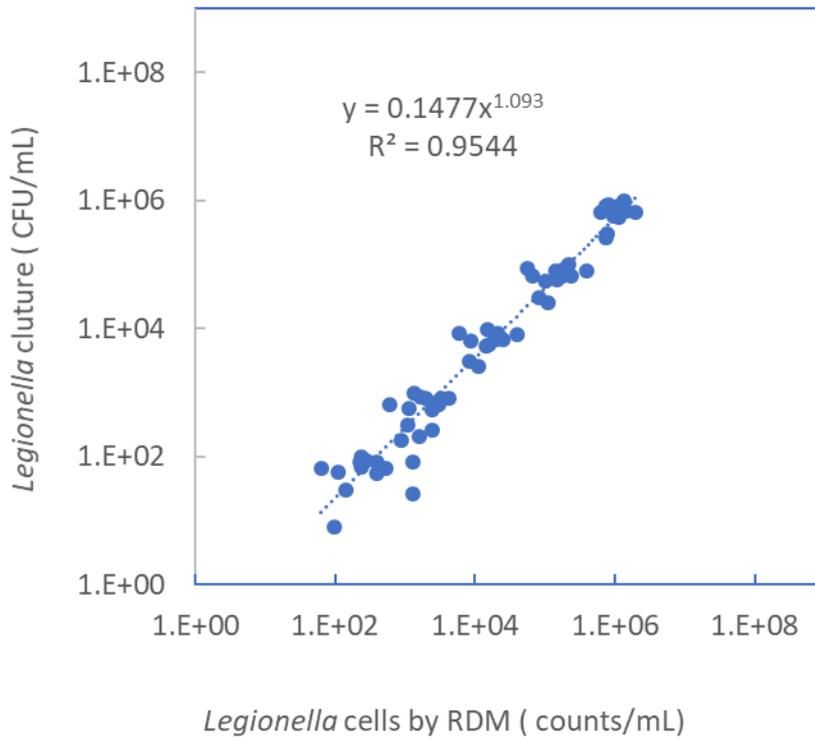


Fig. Correration between culture method and RDM (11 strains of *Legionella pneumophila*)

## 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
2021.4.19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 (  $36 \pm 1$  、 <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  $36 \pm 1$  、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  $36 \pm 1$  、  $72 \pm 3$ 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 <sup>( )</sup>				
原液					
10 <sup>5</sup>					
10 <sup>4</sup>					
10 <sup>3</sup>					

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
2021.12.10作成 田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ検出

2. 製品の種類：市販品を用いたレジオネラ検出用模擬試料の作製

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 8.5 g/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 ( )

(3) 処理月日： 月 日

IDEXX-QC Legionella pneumophila【メーカー：IDEXX , Lot： 】

製品分析証明書の定量値

( ) MPN/100 mL with Quanti-Tray\*/Legiolert\*

Verified by Quanti-Tray/Legiolert with n=25; Acceptable Range =( - )

4. 生菌数の試験

菌株の復元 IDEXX-QCの1バイアルを-30 の冷凍庫から取出し、室温で15分間静置

懸濁 バイアル内のカラーディスクを無菌的に滅菌チューブに準備した10 mL滅菌蒸留水に移し入れて、10~15分間転倒混和して完全にディスクを溶解させる。

原液を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。

(注意) これまでの実績から、この時の原液は生菌として約 $500 \pm 100$  CFU/mLであるが約10倍の菌(約 $5,000 \pm 1,000$  Cell相当数/mL)が存在することを確認している。

フローサイトメトリー Lp特異染色により菌数を計算(SOP 2-1 参照)

以下はあくまで参考で必須でなくてよい

生菌数測定 原液100  $\mu$ L をBCYE培地5枚に接種(500 CFU/mL相当)

培養 BCYE培地を $36 \pm 1$  、 $72 \pm 3$ 時間

生菌数の算定

検体番号	フローサイトメトリー測定値 (μL)				
	1	2	3	4	5
原液					

## 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
2021.04.19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)】

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

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

Lp mix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約0.8 mLを採取、シリンジ目盛を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 PI area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、3 μL FL Lp mix添加

常温で30分間、回転振とう

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

FCMからMethod Leg area 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  $\mu$ m MF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1.5  $\mu$ L FL Lp mix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、シリンジ目盛を1.1 mLに合わせてFCMにセット  
 FCMからMethod Leg areaを呼び込み測定スイッチオン

装置に表示される数値 (/ $\mu$ 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
2021.4.19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 (MF) 【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 (FCM) 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)】

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

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

Lp mix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約0.8 mLを分取、シリンジ目盛を1.1 mLに合わせてFCM にセット  
FCMからMethod Leg area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 MF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1.5 μL FL Lp mix添加  
 常温で30分間、回転振とう  
 ディスポシリンジで約0.8 mLを採取、シリンジ目盛を1.1 mLに合わせてFCMにセット  
 FCMからMethod Leg area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 (/μL) を足し合わせ、1.1倍した後に、装置独自の補  
 正值 (2000/42) を掛け合わせる。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 ( $\times 1.1 \times 2000/42$ )									