

# 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 $\alpha$ 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、 $\alpha$ -ケトグルタル酸カリウムを添加したBCYE $\alpha$ 寒天培地が用いられる。市販生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 $\alpha$ 寒天培地、MWY 寒天培地、WY0 $\alpha$ 寒天培地等

選択分離培地は、BCYE $\alpha$ 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 $\mu$ m又は0.22 $\mu$ 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。吸引ピ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ピンで代用することもできる。
- (4) 吸引ポンプ等
- (5) 吸引ピン：マニホールドに繋いで廃液を貯める。
- (6) シリコン栓：吸引ピンに使用する。
- (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ピン、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 $\mu$ mであり、0.40や0.45 $\mu$ 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°C 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、 $50^{\circ}\text{C}$ 、20 分及び  $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $30\pm 2$  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 $\alpha$ 寒天培地、MWY 寒天培地、WY0 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\mu$ L 及び 200 $\mu$ L が量り取れるもの。
- (2) 滅菌チップ：100 $\mu$ L 及び 200 $\mu$ 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 $\mu$ L を、酸処理試料並びに熱及び酸処理試料は 200 $\mu$ 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)  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  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 $\alpha$ 培地
- (2) L-システイン不含 BCYE $\alpha$ 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・寒天培地と BCYE・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 個以下の場合はずべてとし、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・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 $\alpha$ 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 10<sup>4</sup>CFU/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。

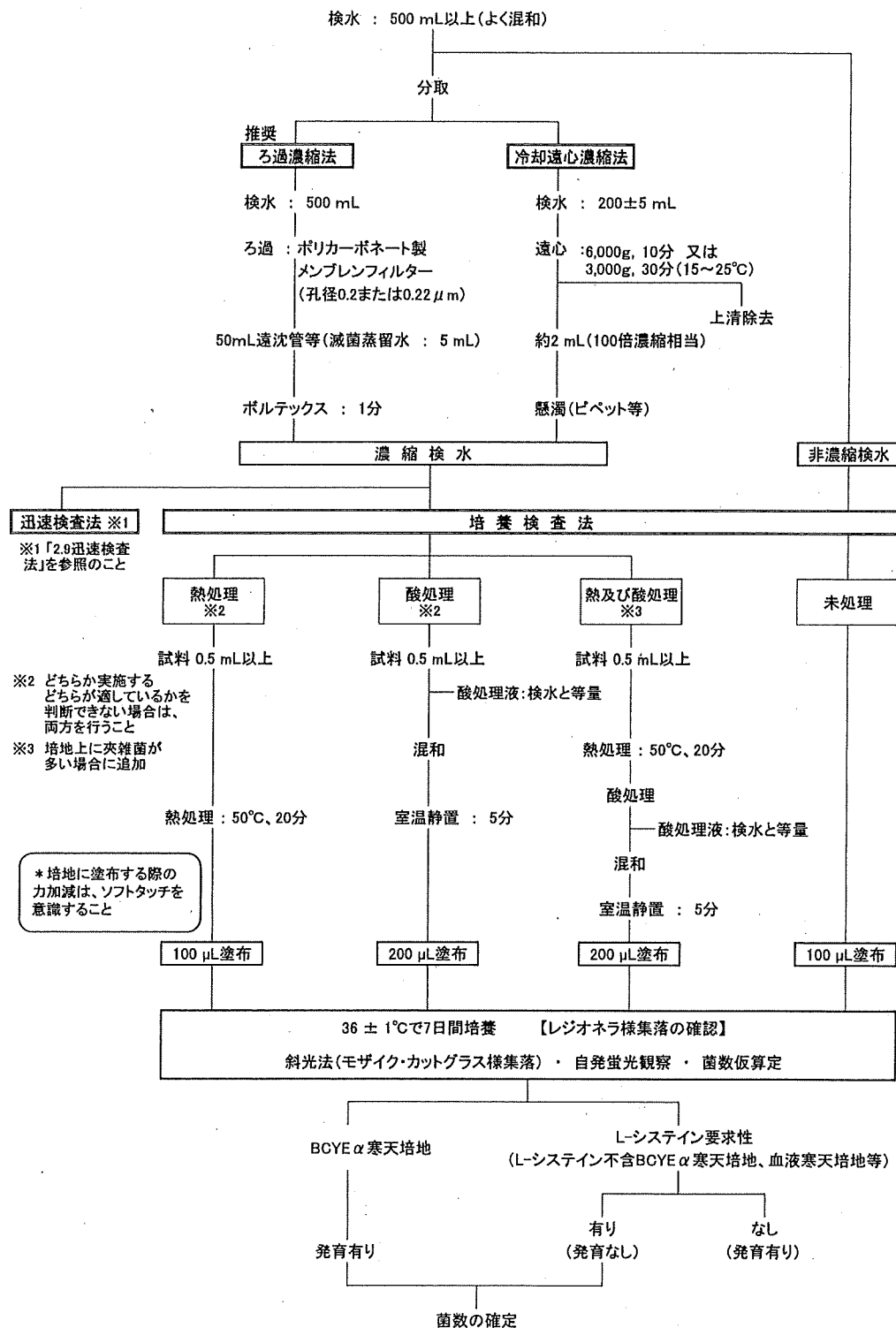


図1 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法

※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。

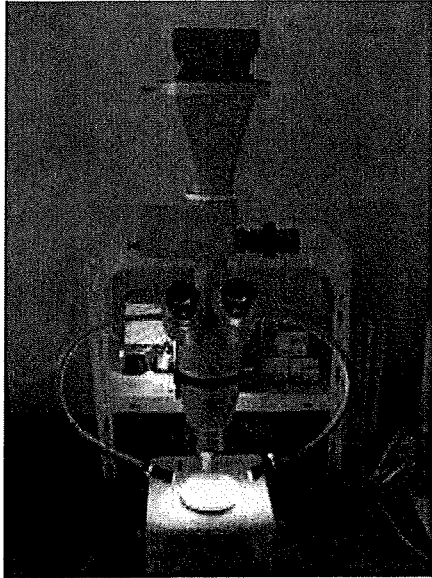


図2 斜光法による分離培地上の  
集落観察

(提供：北海道立衛生研究所 森本 洋氏)

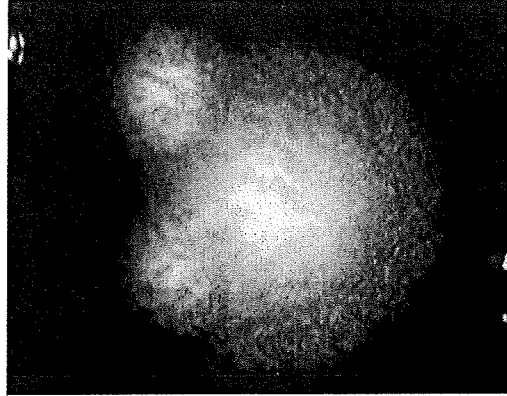


図3 実体顕微鏡で観察される1個の  
大きな *L. pneumophila* 血清群1と  
2個の *L. cherrii* の集落。  
集落周縁部がモザイク・カットグラ  
ス様を呈する。

(提供：北海道立衛生研究所 森本 洋氏)

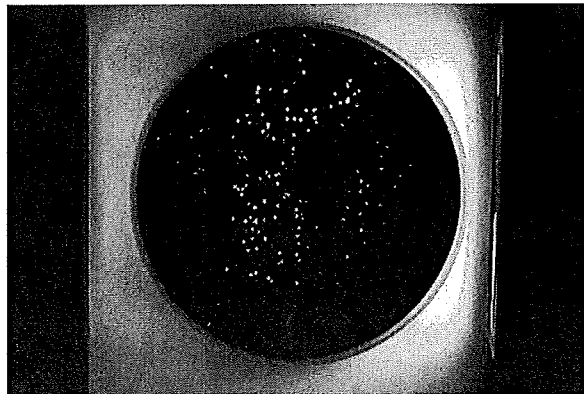


図4 同じ分離培地での可視光(左)と長波長紫外光(右)による観察

(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。