

## 2025年度レジオネラ属菌実技講習会

(旧：レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ)

### 試験概要

#### 1. レジオネラ属菌実技講習会試験項目

| 試料名           | 試験項目    |
|---------------|---------|
| 実技講習会試料A (1本) | レジオネラ属菌 |

本実技講習会試料は、菌をボール状にして凍結乾燥処理しバイアル瓶に封入したもので、レジオネラ属菌実技講習会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。

実技講習会試料Aの使用方法・操作手順および結果入力方法をご確認のうえ、試験を実施してください。

#### 2. 実技講習会試料Aの使用方法・操作手順

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

実技講習会試料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、【ろ過濃縮法】または、【冷却遠心濃縮法】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（2025年度レジオネラ属菌実技講習会手順）は、本講習会用のみの検査方法であり、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：実技講習会試料Aは、到着後から試験開始日まで-18℃～-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：実技講習会試料は 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、実技講習会試料を加えよく混和します。これを試料原液とします。

注 5：実試料の特性上、本実技講習会においては、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 を加えよく混和します。これを【非濃縮検体 2】、【濃縮検体 ろ過濃縮法】または【濃縮検体 冷却遠心濃縮法】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  $\mu$ 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  $\alpha$  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  $\alpha$  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。

本実技講習会用計算式 :  $100\text{mL あたりの菌数} = \text{平均値} \times 100$

### ■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。

本実技講習会用計算式 :  $100\text{mL あたりの菌数} = \text{平均値} \times 100$

### ■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。

本実技講習会用計算式 :  $100\text{mL あたりの菌数} = \text{平均値} \times 1000$

### □濃縮検体

※【ろ過濃縮法】または【冷却遠心濃縮法】どちらか一方を実施してください。

### ■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  $500\mu\text{L}$  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 11 : 本講習会においては、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  $0.3\sim0.9\times2\sim20\mu\text{m}$  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、状況によっては  $0.40$  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。

ISO11731 : 1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 では孔径  $0.2\mu\text{m}$  と規定されている。

■参考情報 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法(薬生衛発 0919 第 1 号 令和元年 9 月 19 日 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)より抜粋

- ・メンブランフィルター：ポリカーボネート製で、ポアサイズ  $0.20\mu\text{m}$  又は  $0.22\mu\text{m}$  と記載されている

■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) 各施設の方法で洗浄・混和し、100 倍濃縮液とします。

注 12 : 実技講習会試料は、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、本実技講習会においては、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)  $36\pm1^{\circ}\text{C}$  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。

本実技講習会用計算式 :  $100\text{mL あたりの菌数} = \text{平均値} \times 10$

## ■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 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法(薬生衛発 0919 第 1 号 令和元年 9 月 19 日 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)より抜粋

- ・遠心加速度  $6,000\text{g}$  で 10 分又は  $3,000\text{g}$  で 30 分、 $15\sim25^{\circ}\text{C}$  で遠心する。遠心はブレーキ設定せず、自然に停止するのを待つ。

- ・使用機器で遠心加速度設定ができない場合は、以下の式で計算する。

遠心加速度( $\text{g}$ )= $1,118\times\text{回転半径}(\text{cm})\times\text{回転速度}^2(\text{rpm})\times10^{-8}$

(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 13：実技講習会試料の特性上、本実技講習会においては、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 14：実技講習会試料は、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、本実技講習会においては、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  $\mu$  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。

本実技講習会用計算式 : 100mL あたりの菌数 = 平均値  $\times$  10

### 3. 結果入力方法

- 1) 結果の記入は、「<https://www.niqcs-survey.jp/niqcs/legionella/member/login/index>」の専用サイトより ID と PW を入力してログインしてください。
- 2) 「結果入力」より 2025 年度を選択すると、登録画面が表示しますので、入力後にページの下にある「登録」ボタンをクリックしてください。
- 3) 画面に「登録が完了しました」と表示したことをご確認ください。

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。ログイン後の右上に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。