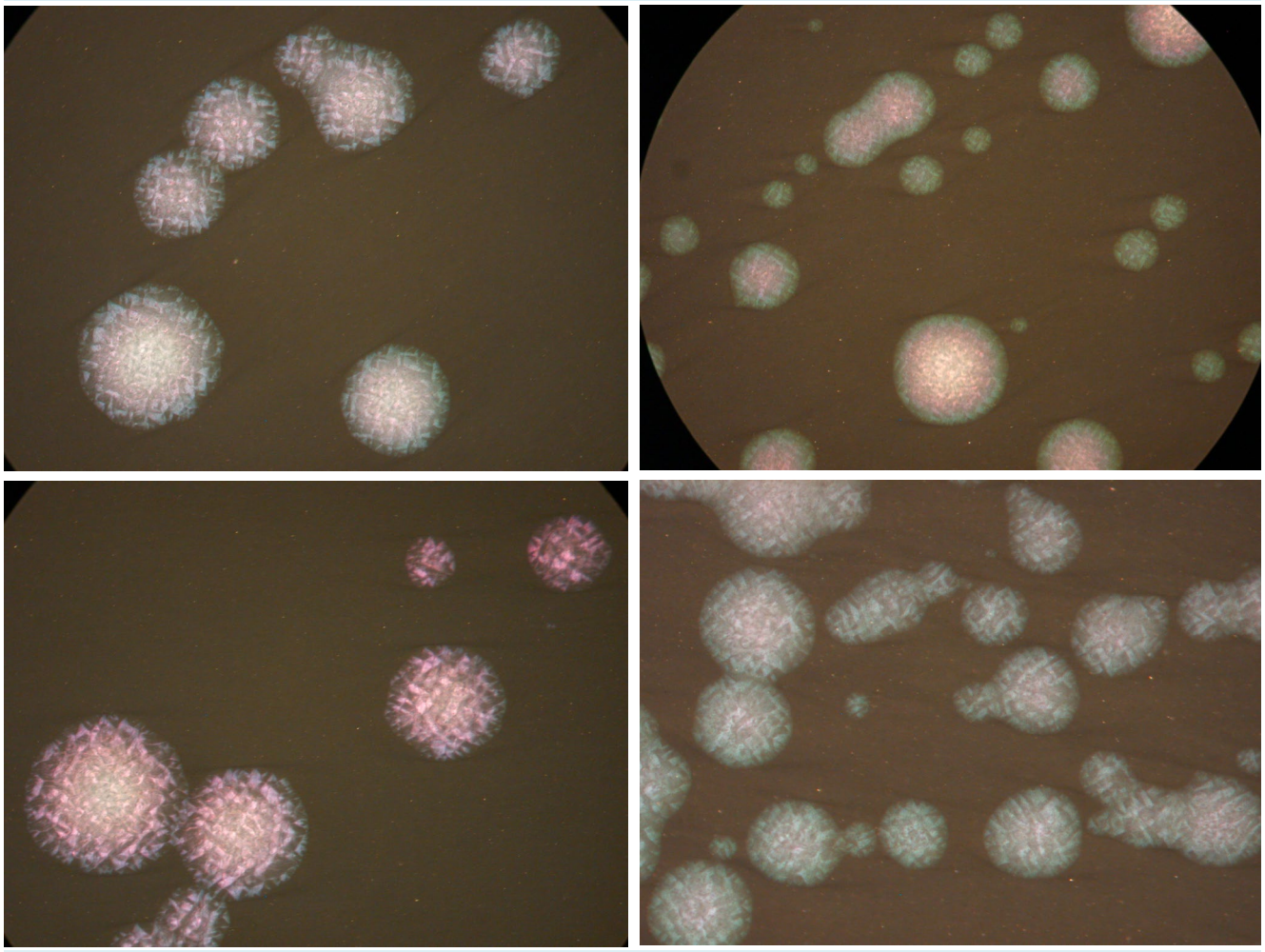
薬生衛発0919第1号対応

レジオネラ検査

Kanto Reagents

レジオネラ症は、1976年に米国フィラデルフィアの在郷軍人会（The Legion）で空調装置を介して発生した集団肺炎によってその存在が知られ、以後、世界各国で発生事例が報告されるようになりました。日本国内では1981年にレジオネラ肺炎の症例報告を皮切りに、多数のレジオネラ感染症例が報告されています。

*Legionella pneumophila*実体顕微鏡観察（斜光法）写真（OXOID社BCYEα寒天培地使用）



ご提供：北海道立衛生研究所 森本 洋氏

【レジオネラ属菌】

①レジオネラ属菌はブドウ糖非発酵の好気性グラム陰性桿菌である。

②レジオネラ属菌は河川、池、沼、温泉、土壌など自然界に広く分布し、アメーバなどの原虫や藻類内で増殖して、共生関係を形成する。

③自然環境では20～41℃で生存するが、特にレジオネラ・ニューモフィラのようなヒトに対する病原性の強い菌種は、35℃前後が至適温度である。

レジオネラ属菌とは

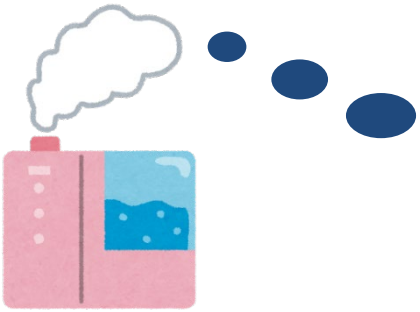
● レジオネラ症の感染源と感染経路

自然界の土壌や淡水に広く生息しているレジオネラ属菌により、エアロゾルを発生しやすい人工環境水等の感染源が作られる。これまでに冷却塔水、温泉、噴水、加湿器、循環式浴槽などを感染源とするレジオネラ症が多数報告されている。

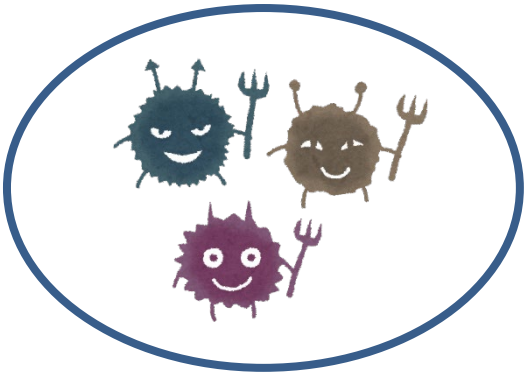
レジオネラ症の感染源となりうる人工環境

- クーリングタワー（冷却塔）
- 循環式浴槽
- 温泉、プールなど
- 加湿器、ネブライザー、クーラーなど
- シャワーヘッド
- 噴水などの水景用水
- 製氷機
- スプリンクラー、水まき器
- 研磨機（歯科・石加工など）
- 自動車洗車機
- ミスト発生機（植物栽培など）
- 腐葉土

温泉



加湿器



● レジオネラ属菌の細菌学的特徴

【1】臨床検体中（喀痰など）においてグラム染色では染色されにくい。

【2】マクロファージや好球中などの貪食細胞の中で殺菌されずに増殖する（細胞内寄生性）。

【3】レジオネラ属菌は通常使用される血液寒天培地などには発育しない。そのため培地には、必須栄養素・増殖促進因子としてL-システイン、ピロリン酸第二鉄、α-ケトグルタル酸などが添加される。

公衆浴場における水質基準等に関する指針：抜粋

（公衆浴場における衛生管理要領等の改正について：健発第0214004号 平成15年2月14日）

第1　この指針は、公衆浴場において使用する水につき、水質の基準及び水質の検査方法を定めることを目的とする。

第3　原湯、原水、上り用湯及び上り用水の水質基準及びその検査方法 は、次の各号に規定するとおりとする。
ただし、温泉水又は井戸水を使用するものであるため、この基準により難しく、かつ、衛生上危害を生じるおそれがないときは、1のアないしエの基準の一部又は全部を適用しないことができる。

1 水質基準（一部抜粋）
カ　レジオネラ属菌は、検出されないこと（10cfu/100mL未満）。

2 検査方法（一部抜粋）
イ　レジオネラ属菌の検査方法は、冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること。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。
ウ　1年に1回以上、水質検査を行い、その結果は検査の日から 3年間保管すること。

第4　浴槽水の水質基準及びその検査方法は次の各号に規定するとおりとする。
（以下、省略）

1 水質基準（一部抜粋）
エ　レジオネラ属菌は、検出されないこと（10cfu/100mL未満）。

2　検査方法（一部抜粋）
ア　濁度、過マンガン酸カリウム消費量及びレジオネラ属菌の検査方法については、第3の検査方法によること。

次のページから令和元年9月19日に発出された「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」を掲載した内容になります。

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：抜粋①

● 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。

～中略～

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。

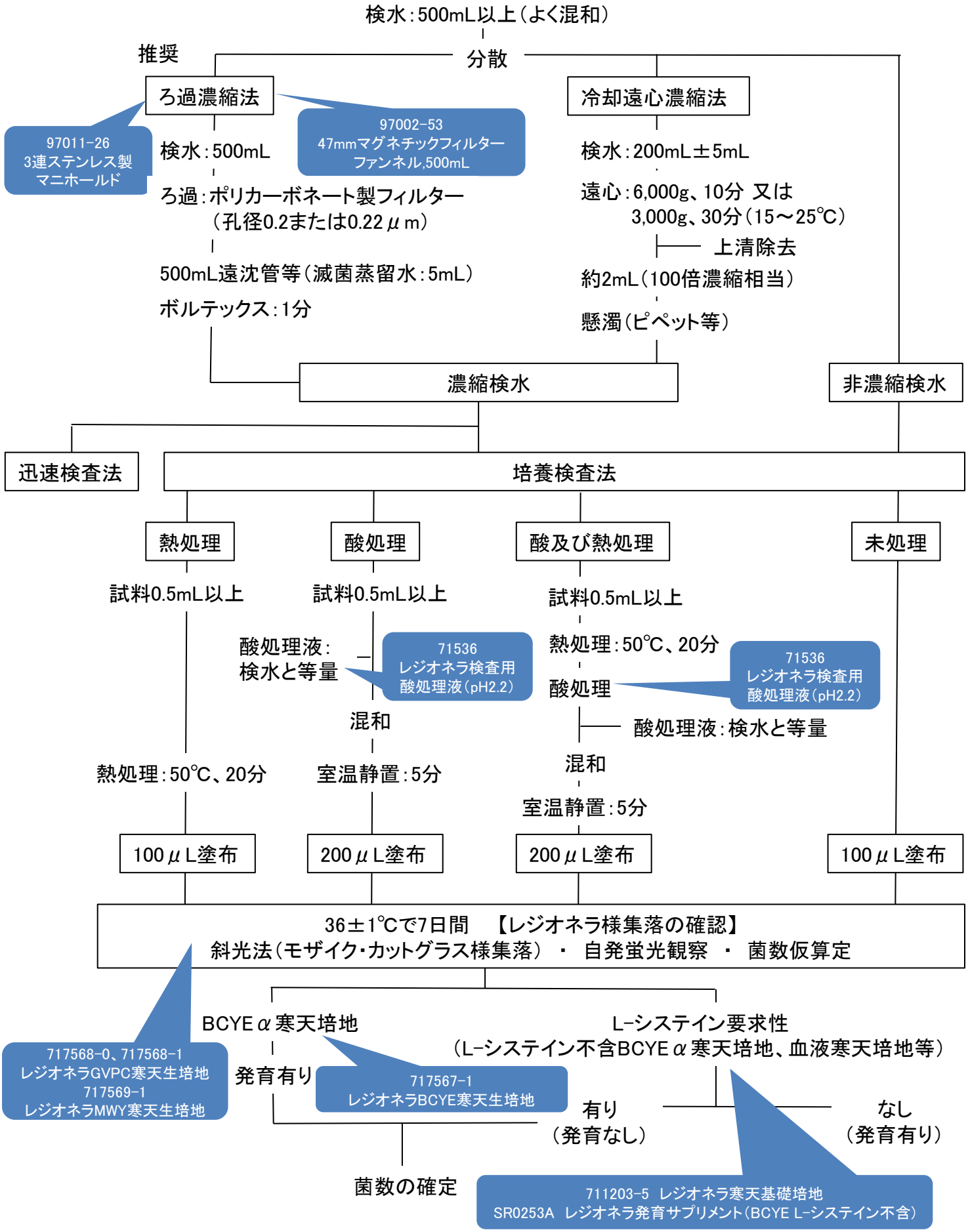
● 検査

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。非濃縮検水は未処理、濃縮検水については熱処理又は酸処理を実施し、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。

※熱処理と酸処理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。

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：図1



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：抜粋②

● レジオネラ用培地

717567-1
レジオネラBCYE寒天生培地

【1】非選択分離培地：BCYEα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BCYEα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。

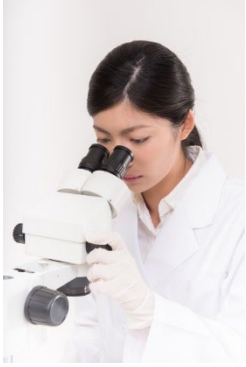
利用法：L-システイン要求性試験、釣菌後の培養、夾雑菌が少ないと推定される検水からの分離培養等。

717568-0、717568-1 レジオネラGVPC寒天生培地
717569-1 レジオネラMWY寒天生培地

【2】選択分離培地：GVPCα寒天培地、MWY寒天培地、WYOα寒天培地等

選択分離培地は、BCYEα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。

利用法：検水からのレジオネラ属菌の分離培養。



● 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10^4CFU/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。

レジオネラ属菌の分離

レジオネラBCYE寒天培地

◎ISO11731の水質に関するレジオネラ属菌の検出で推奨されている非選択分離培地

◎L-システイン要求性試験（鑑別試験）にて使用

◎GVPC寒天培地、MWY寒天培地の基礎培地となる

組成

レジオネラ寒天基礎培地（711203-5）

活性炭	2.0g
酵母エキス	10.5g
寒天	13.5g
α-ケトグルタル酸	0.5g
ACESバッファー	10.0g

レジオネラ発育サプリメント（BCYE）
1バイアルあたり：100mL用

ピロリン酸鉄（Ⅲ）	0.025g
L-システイン塩酸塩	0.04g
α-ケトグルタル酸	0.05g

レジオネラ発育サプリメント
（BCYE L-システイン不含有）
1バイアルあたり：100mL用

ピロリン酸鉄（Ⅲ）	0.025g
α-ケトグルタル酸	0.05g

※BCYEサプリメント2種は、50℃未満の温かい滅菌水で溶解してください。

調製方法

①レジオネラ寒天基礎培地を3.65g秤量し、精製水95mLに溶解する（沸騰するまで加熱する）。
②①に2M KOH溶液1.76mLを加えpHを調整する。
③121℃で15分間高圧蒸気滅菌する。
④約50℃に冷却した後、加温した滅菌精製水5mLで溶解したレジオネラ発育サプリメント（BCYE）1バイアルを無菌的に添加する。
⑤十分に攪拌した後、シャーレに分注する。

※注意

レジオネラ寒天基礎培地は滅菌前にpH調整（2M KOHを加える）が必要となります。

培養条件

湿度65%　35℃　好気培養
培養は最大10日まで

*Legionella*属は栄養的にL-システインを不可欠とする。OXOID社の製品群ではL-システイン添加BCYE寒天培地とL-システイン不含BCYE寒天培地の両方を作製することができる。

レジオネラ属菌の分離

レジオネラGVPC寒天培地

◎ISO11731の水質に関するレジオネラ属菌の検出で推奨されている選択分離培地

◎ほとんどの夾雑細菌の発育を抑制し、真菌の発育も抑制する

◎各種環境水からのレジオネラ属菌検出に適する（例：夾雑細菌が多い浴槽水など）

組成

レジオネラ寒天基礎培地（711203-5）

活性炭	2.0g
酵母エキス	10.0g
寒天	13.0g
α-ケトグルタル酸	0.5g
ACES/水酸化カリウムバッファー	10.0g

レジオネラ発育サプリメント（BCYE）
1バイアルあたり：100mL用

ピロリン酸鉄（Ⅲ）	0.025g
L-システイン塩酸塩	0.04g
α-ケトグルタル酸	0.05g

レジオネラ選択サプリメント（GVPC）
1バイアルあたり：500mL用

グリシン（アンモニア不含）	1.5g
バンコマイシン塩酸塩	0.5mg
硫酸ポリミキシンB	40,000IU
シクロヘキシミド	40.0mg

調製方法

①レジオネラ寒天基礎培地を18.25g秤量し、精製水465mLに溶解する（沸騰するまで加熱する）。
②①に2M KOH溶液8.8mLを加えpHを調整する。
③121℃で15分間高圧蒸気滅菌する。
④約50℃に冷却した後、加温した滅菌精製水5mLで溶解したレジオネラ発育サプリメント（BCYE）5バイアルと滅菌精製水10mLで溶解したレジオネラ選択サプリメント（GVPC）1バイアルを無菌的に添加する。
⑤十分に攪拌した後、シャーレに分注する。

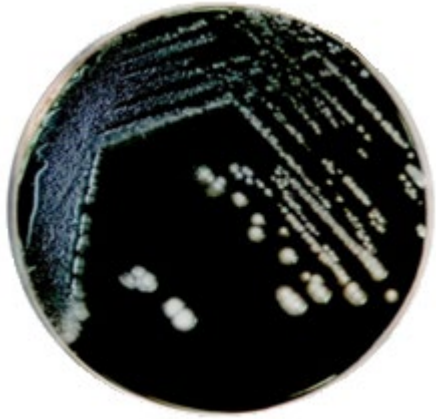
培養条件

湿度65%　35℃　好気培養
培養は最大10日まで

抗生物質のグリシン、バンコマイシン及びポリミキシンがほとんどのグラム陽性菌及びグラム陰性菌の発育を阻害し、シクロヘキシミドは糸状菌の発育を抑制する。

レジオネラ属菌の分離

レジオネラMWY寒天培地



◎飲料水からのレジオネラ・ニューモフィラ分離に最適

◎本培地は臨床検体にも有用

◎コロニーの着色によって、簡易識別が可能

組成

レジオネラ寒天基礎培地（711203-5）

活性炭	2.0g
酵母エキス	10.0g
寒天	13.0g
α-ケトグルタル酸	0.5g
ACES/水酸化カリウムバッファー	10.0g

レジオネラ発育サプリメント（BCYE）
1バイアルあたり：100mL用

ピロリン酸鉄（Ⅲ）	0.025g
L-システイン塩酸塩	0.04g
α-ケトグルタル酸	0.05g

レジオネラ選択サプリメント（MWY）
1バイアルあたり：100mL用

グリシン（アンモニア不含）	0.3g
ポリミキシンB	5,000IU
アニソマイシン	8.0mg
バンコマイシン塩酸塩	0.1mg
ブロムチモールブルー	1.0mg
ブロムクレゾールパープル	1.0mg

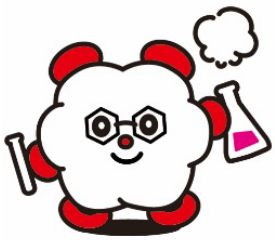
調製方法

①レジオネラ寒天基礎培地を3.65g秤量し、精製水95mLに溶解する（沸騰するまで加熱する）。
②①に2M KOH溶液1.76mLを加えpHを調整する。
③121℃で15分間高圧蒸気滅菌する。
④約50℃に冷却した後、加温した滅菌精製水5mLで溶解したレジオネラ発育サプリメント（BCYE）1バイアルと滅菌精製水2mLで溶解したレジオネラ選択サプリメント（MWY）1バイアルを無菌的に添加する。
⑤十分に攪拌した後、シャーレに分注する。

培養条件

湿度65%　35℃　好気培養
培養は最大10日まで

※MWY寒天培地はコロニーの着色による簡易識別が可能です。
①レジオネラ・ニューモフィラ・・・白～緑色のコロニー
②レジオネラ・ボセマニー・・・淡い緑色のコロニー
③レジオネラ・ミクダディー・・・青みがかった灰色のコロニー



関連製品

	用途	製品番号	製品名	容量
培地	前処理	71536	レジオネラ検査用酸処理液（pH2.2）	50mL×10
	分離培養用	717567-1	レジオネラBCYE寒天生培地	10枚
		717568-0	レジオネラGVPC寒天生培地	10枚×10
		717568-1		10枚
		717569-1	レジオネラMWY寒天生培地	10枚
		711203-5	レジオネラ寒天基礎培地	500g
		713251-1	レジオネラ発育サプリメント（BCYE）	10バイアル
		SR0253A	レジオネラ発育サプリメント （BCYE　L-システイン不含有）※当該品目は非在庫です	10バイアル
		713252-1	レジオネラ選択サプリメント（GVPC）　※劇物	10バイアル
		713255-1	レジオネラ選択サプリメント（MWY）	10バイアル
		713254-1	レジオネラ選択サプリメント（BMPA）	10バイアル
	鑑別試薬	717800-5	レジオネラ ラテックステスト	50回用
機材（Cytiva製品）	ろ過濃縮	97011-26	3連ステンレス製マニホールド構成品 （マニホールドベース、マニホールドバルブ、エンドキャップ、ホースバーブキャップ	1/箱
		97011-30	標準アダプター	3/箱
		97011-09	47mmマグネチック・フィルターファンネル 500mL	1/箱
		97002-39	マイクロファンネル スーポア（ポリエーテルスルホン製） メンブレン 滅菌済 0.2μm 300mL グリッド付 個別包装	20/箱
		97002-20	メンブレンディスクフィルター スーポア（ポリエーテルスルホン製）滅菌済 47mm 0.2μm グリッド付	200/箱
		97012-18	ニュークリポアメンブレン ディスクフィルター ポリカーボネート　未滅菌 47mm 0.2μm	200/箱

関東化学　レジオネラ　検索

参考資料：公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について
（薬生衛発0919第1号）

● 本記載の製品は、試薬 (試験、研究用として用いる化学薬品) としての用途にご利用ください。
● 本記載の製品情報は予告なく変更する場合があります。 最新情報は、弊社ホームページ「Cica-Web」をご確認ください。

関東化学株式会社
試薬事業本部

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町 2 丁目 2 番 1 号
TEL : 03-6214-1090
HP : https://www.kanto.co.jp

FB-014(202507)