

2026.2.6 医療環境委員会主催セミナー
知っておきたい！医療現場のレジオネラ対策

*Legionella*属菌をターゲットとした 環境検体における検査



日本医科大学付属病院

鷺尾 洋平



Legionella属菌対策

水系のLegionella属菌汚染状況を把握すること

リスクの高い設備

- 冷却塔(クーリングタワー)
- 給湯設備(貯湯槽・配管)
- 加湿器
- 循環式浴槽
- 噴水・ミスト設備

予防・管理の基本方針

- 温度管理
 - 給湯: 60°C以上で貯湯
 - 末端: 55°C以上推奨
- 消毒管理
 - 塩素濃度
 - 0.4~1.0ppm(給水)
- 清掃・スケール除去
 - 貯水槽・浴槽・配管洗浄
 - バイオフィルム形成防止
- 水の滞留防止
 - 定期的な放流

レジオネラ症 四類感染症/BSL2

■ 定義; *Legionella*属菌が原因で起こる感染症

レジオネラ肺炎
ポンティアック熱

- 偏性好気性、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌。
- 湿った土壌や水系の環境中(河川、湖、沼など)に生息。
- 空調冷却塔水、循環式浴槽水、給水給湯設備、シャワーなどの人工的水利用設備にも存在。
- バイオフィルムに存在する**自由生活アメーバを宿主として細胞内に寄生**して存在し、20~45℃で増殖する。

Legionella pneumophila

- エアロゾルの吸入 ▶ ヒトの肺胞マクロファージにて増殖。
- **血清型 1** : 臨床的によく分離される。

医療環境におけるサンプル

- 冷却塔水 ▶ 直接落下水を採取するか、受け皿の中央で水の表層分を採取
- 浴槽水 ▶ 中央部で無菌的に採取
- 給湯水 ▶ 水道の蛇口、シャワーヘッドなどは滅菌スワブでよく拭ったもの
PBSや生理食塩水 1~2mLに拭い取ったスワブを入れボルテックスで混和
→懸濁液を検体とすることも可

検出下限を10 CFU/100mLにするために
200mL以上または500mL以上とする。

滅菌したポリエチレンビン等に**500mL**採取する。

※塩素を含む場合、25%チオ硫酸ナトリウムを1/500 量加えて中和。



「濃縮検体」「非濃縮検体」を並行して検査する

Legionella属菌培養のための環境サンプル採取

主な採取箇所と採取検体

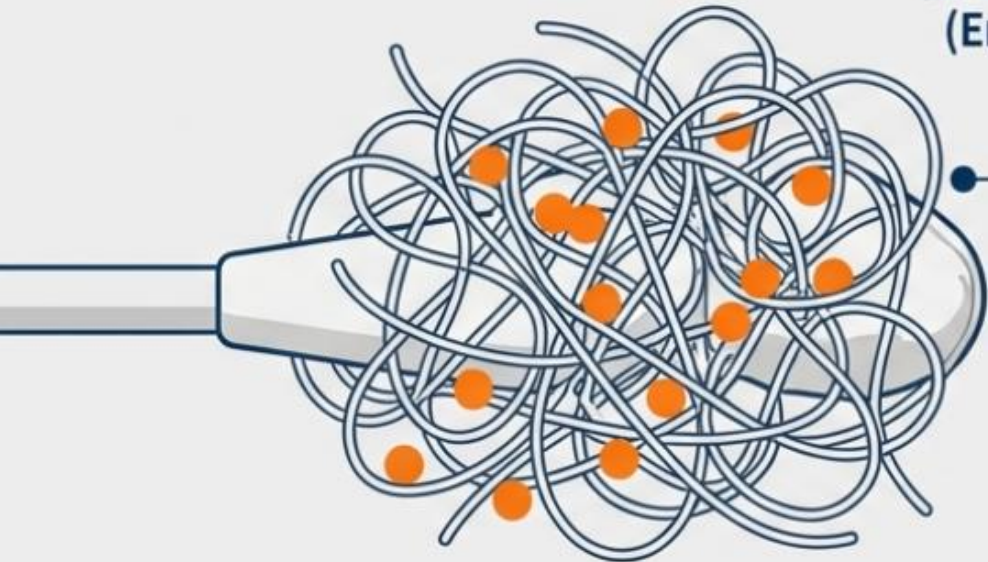
| カテゴリ | 採取箇所 | 採取するサンプル |
|-----------|------------|--------------------|
| 給水・給湯(末端) | 蛇口 | 水(約1L)、バイオフィルム(綿棒) |
| | シャワー | 水(約1L)、バイオフィルム(綿棒) |
| | シャワーヘッド内部 | バイオフィルム(綿棒) |
| | エアレーター内部 | バイオフィルム(綿棒) |
| 配管・タンク | 給湯配管(中間点) | 水(約1L) |
| | 貯湯槽(給湯タンク) | 水(約1L) |
| | 受水槽・高置水槽 | 水(約1L) |
| 冷却塔 | 冷却塔水 | 水(約1L) |
| | 集水槽・内壁 | バイオフィルム／沈殿物 |
| 浴槽・温浴設備 | 浴槽水 | 水(約1L) |
| | 噴出口・循環ノズル | バイオフィルム(綿棒) |
| | ろ過装置・ろ材 | ろ材／沈殿物 |
| 医療・ケア機器 | ネブライザー | 使用水 |
| | 加湿器 | 使用水、内部バイオフィルム |
| 装飾水・その他 | 噴水・水盤 | 水(約1L)、沈殿物(あれば) |

採取スワブにおける注意点

OLD

Rayon/Cotton

繊維の絡み合い
(Entangled)



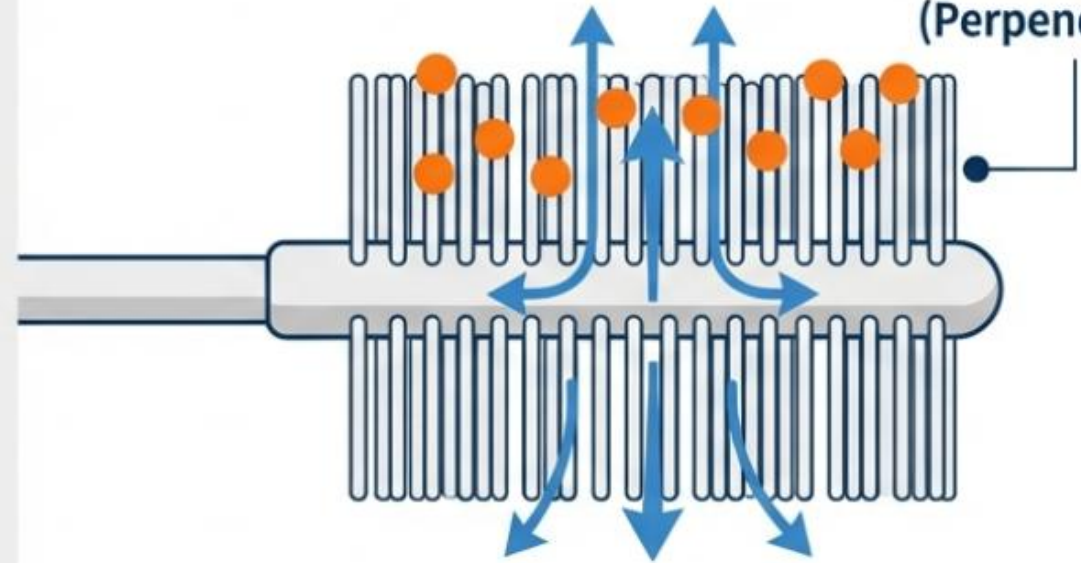
レーヨンスワブでは採取
検体が繊維内に浸み込んで
放出しにくい

↓
捕捉 (Trapped)

NEW

Flocked Nylon

垂直なナイロン繊維
(Perpendicular)

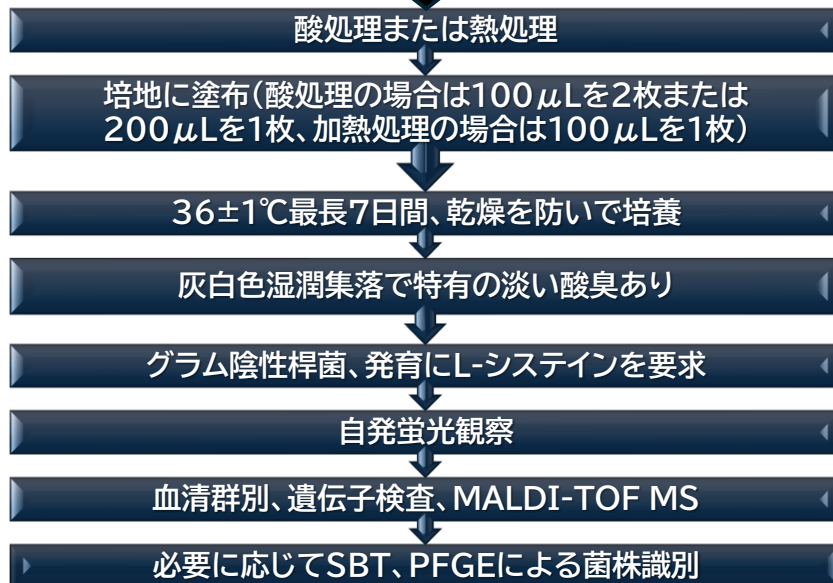


表層植毛部に保持し
80%以上を回収できると
される。

↓
放出 (Release)

- ✓ 木軸は微生物に有害に作用する可能性があるため注意が必要

濃縮方法により検出菌数が異なる



集落1個
= 10 CFU/100mL に相当

| 検体番号 | ろ過濃縮法 | 冷却遠心濃縮法 |
|------|-------|---------|
| 1 | 80 | 20 |
| 2 | 90 | 20 |
| 3 | 340 | 100 |
| 4 | 620 | 130 |
| 5 | 280 | 60 |
| 6 | 420 | 90 |
| 7 | 900 | 430 |
| 8 | 720 | 420 |
| 9 | 20 | 360 |
| 10 | 10 | 300 |
| 11 | 130 | 20 |
| 12 | 310 | 270 |
| 13 | 2000 | 470 |
| 14 | 20 | <10 |
| 15 | 290 | <10 |
| 16 | 110 | 160 |
| 17 | 190 | 130 |
| 18 | 100 | 10 |
| 19 | 150 | 40 |
| 20 | 10 | <10 |
| 21 | 20 | <10 |
| 22 | 400 | 40 |
| 23 | 350 | 80 |
| 24 | 860 | 180 |
| 25 | 330 | 380 |

<10: 非検出 (検出限界未満)

| 確認菌数の状況 | 検体数 | (%) |
|---------|-----|-------|
| ろ過 > 遠心 | 21 | (84) |
| ろ過 < 遠心 | 4 | (16) |
| 計 | 25 | (100) |

ろ過: ろ過濃縮法
遠心: 冷却遠心濃縮法
不等号は確認菌数の状況を示す

検体の前処理

目的; 選択分離培地を用いても発育を抑制できない夾雑菌に対処するため

熱処理

50°C、20分(状況に応じて30分)加熱

※検体を60°C、4分以上処理すると、検出率が極めて低くなるため注意が必要

酸処理

処理液(0.2M HCL・KCL buffer pH2.2±0.2)を検体に等量加え、
25°C(室温)で5分反応させる

熱処理後酸処理

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

Legionella属菌用の培地

微生物検査で一般的に用いられる血液寒天培地やチョコレート寒天培地には発育しない

非選択分離培地

□ BCYE α 寒天培地

必須栄養源; L-システイン、可溶性ピロリン酸鉄
発育促進剤; α -ケトグルタル酸

選択分離培地

| 培地 \ 選択剤(目的) | バンコマイシン (Gram陽性菌) | ポリミキシンB (グラム陰性菌) | シクロヘキシミド (真菌) | アムホテリシンB (真菌) | グリシン (一部夾雑菌) | その他 |
|-------------------|----------------------|---------------------|------------------|------------------|-----------------|---------------|
| WYO α 寒天培地 | ○ | ○ | — | ○ | ○ | |
| GVPC寒天培地 | ○ | ○ | ○ | — | ○ | |
| MWY寒天培地 | ○ | ○ | ○ | — | ○ | アニソマイシン 色素 |

培地への接種方法

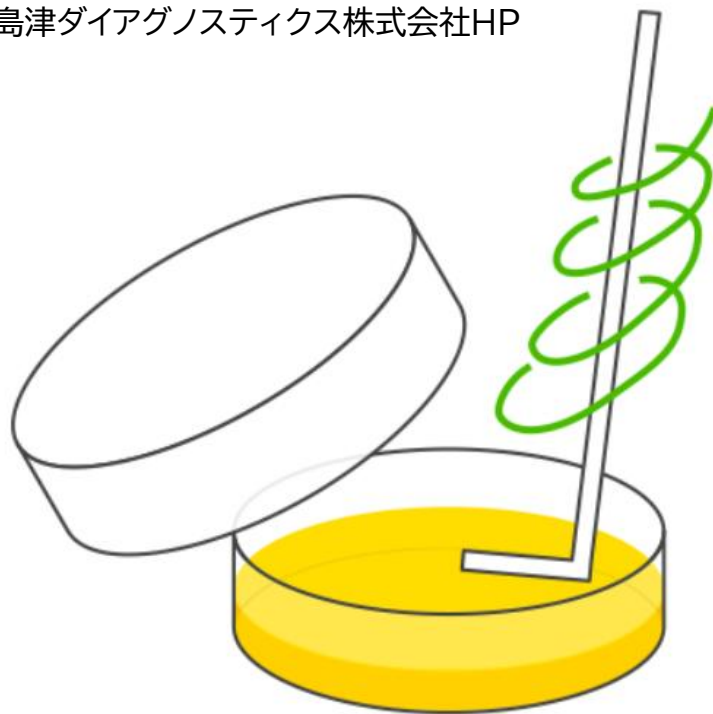
クラス2安全キャビセット内で操作を行う

マイクロピペットで 寒天培地に接種



液体検体を寒天培地に接種

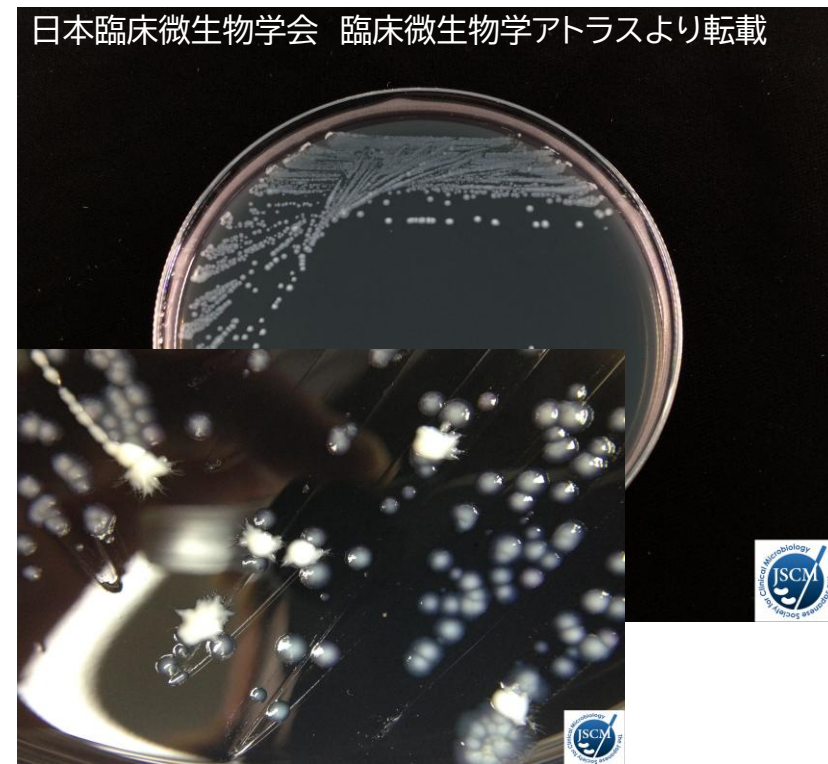
島津ダイアグノスティクス株式会社HP



- 100 μ Lまたは200 μ Lを滴下
- 試料が培地に完全に吸収されるまで待つ。
- 培地表面に均等に広がるよう、コンラージ棒の重さだけを利用し塗布

WYO α 寒天培地

日本臨床微生物学会 臨床微生物学アトラスより転載



- 3~10日間ほど湿潤環境で好気培養

指針では培地の種類は指定されていないが、

市販培地7種類の選択分離培地を使用した検出能の比較

培地種類

| | WYO α | GVPC (Biomérieux) | GVPC (Oxoid) | GVPC (日研) | GVPC (Merck) | GVPC (極東) | MWY (Oxoid) |
|---|--------------|----------------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|----------------|
| A | ○ | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| C | ○ | ○ | | ○ | ○ | | ○ |
| D | ○ | ○ | | | ○ | ○ | ○ |
| E | ○ | ○ | | | | ○ | ○ |
| F | ○ | | ○ | | | | ○ |
| G | ○ | ○ | ○ | | ○ | | |
| H | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| I | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | ○ |

検出能ランキング

1位: **WYO α** (栄研) - 8/9検体

2位: **GVPC(Biomérieux, Oxoid)**
- 7/9検体

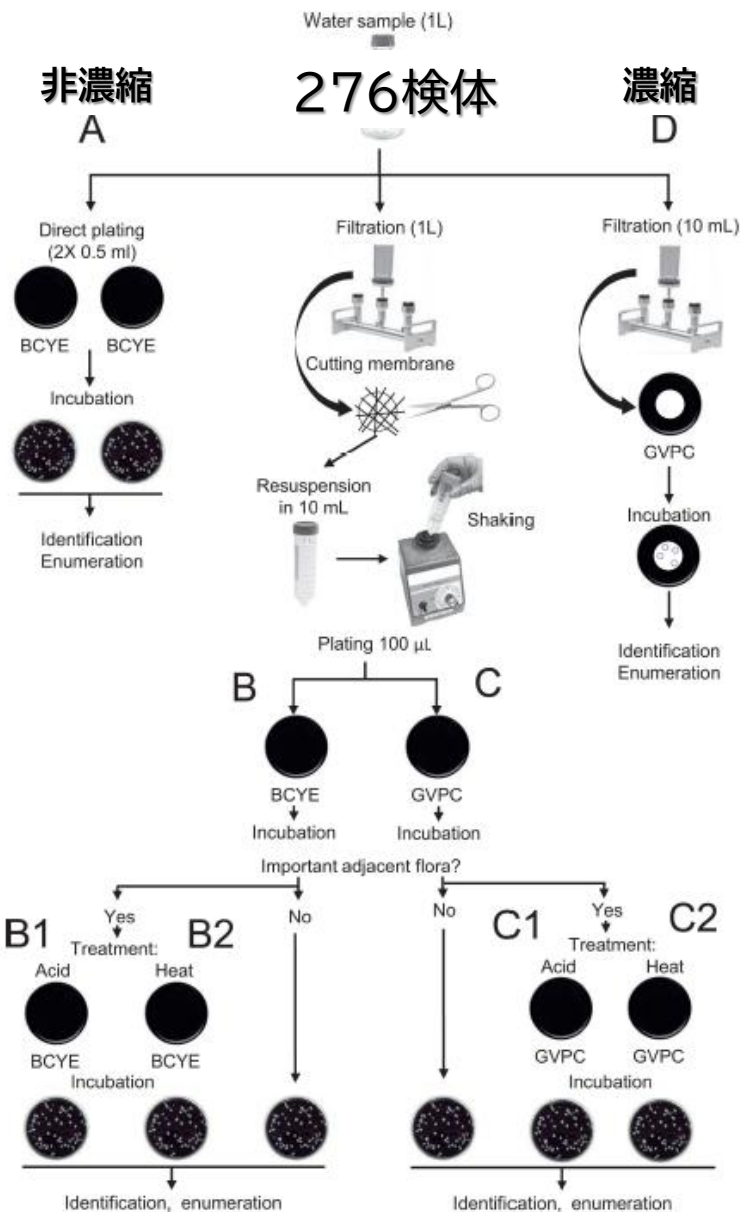
⋮

最下位: **GVPC(極東)** - 3/9検体

9検体すべてから検出できた培地は
0(ゼロ)

検体(サンプル)

ISO 11731:2017に準拠 各方法における*Legionella*属菌の回収率を評価・比較



| Combination | Negative | No [10 ² -10 ³] | No [10 ³ -10 ⁴] | No ≥10 ⁴ | Sensitivity 1 | | Sensitivity 2 | | |
|---------------------------|----------|--|--|---------------------|---------------|------------|---|------------|-------------|
| | | | | | POS | (0 vs pos) | (<10 ³ vs ≥10 ³) | IC95% | |
| A + B1 + B2 + C1 + C2 + D | 0 | 56 | 51 | 14 | 120 | 100% | [1-1] | 100% | [1-1] |
| A + B1 + B2 + C2 + D | 0 | 58 | 48 | 14 | 120 | 100% | [1-1] | 97% | [0.95-0.98] |
| B2 + C2 + D | 2 | 76 | 31 | 11 | 118 | 98% | [0.97-0.99] | 66% | [0.61-0.69] |
| B1 + C2 + D | 3 | 69 | 37 | 11 | 117 | 98% | [0.96-0.98] | 75% | [0.71-0.78] |
| A + C2 + D | 8 | 54 | 44 | 14 | 112 | 93% | [0.91-0.95] | 91% | [0.87-0.93] |
| C2 + D | 11 | 67 | 31 | 11 | 109 | 91% | [0.88-0.93] | 66% | [0.61-0.69] |
| B2 + C2 | 12 | 71 | 29 | 8 | 108 | 90% | [0.87-0.92] | 58% | [0.53-0.62] |
| A + B1 + C1 | 19 | 41 | 47 | 12 | 101 | 84% | [0.80-0.87] | 94% | [0.91-0.95] |
| A + C2 | 23 | 44 | 41 | 12 | 97 | 81% | [0.77-0.84] | 83% | [0.79-0.86] |
| C2 | 28 | 58 | 26 | 8 | 92 | 77% | [0.72-0.80] | 53% | [0.48-0.57] |
| A + C1 | 34 | 32 | 42 | 12 | 86 | 72% | [0.67-0.75] | 84% | [0.81-0.87] |
| C1 | 40 | 46 | 25 | 9 | 80 | 67% | [0.62-0.70] | 53% | [0.48-0.57] |
| B2 | 42 | 52 | 22 | 4 | 78 | 65% | [0.60-0.69] | 41% | [0.36-0.45] |
| B1 | 47 | 42 | 26 | 5 | 73 | 61% | [0.56-0.65] | 48% | [0.43-0.52] |
| D | 53 | 43 | 18 | 6 | 67 | 56% | [0.51-0.60] | 38% | [0.33-0.41] |
| A | 79 | 0 | 32 | 9 | 41 | 34% | [0.29-0.38] | 64% | [0.59-0.68] |

回収率が最も高い

濃縮法、前処理有、GVPC培地

Limitation

- 資源の制約によりISO規格で規定されている代替手法の全てを検証できていない
- D法において10mLしか濾過できていない(他施設では100mLを使用)

10³ CFU/L以上を検出する感度

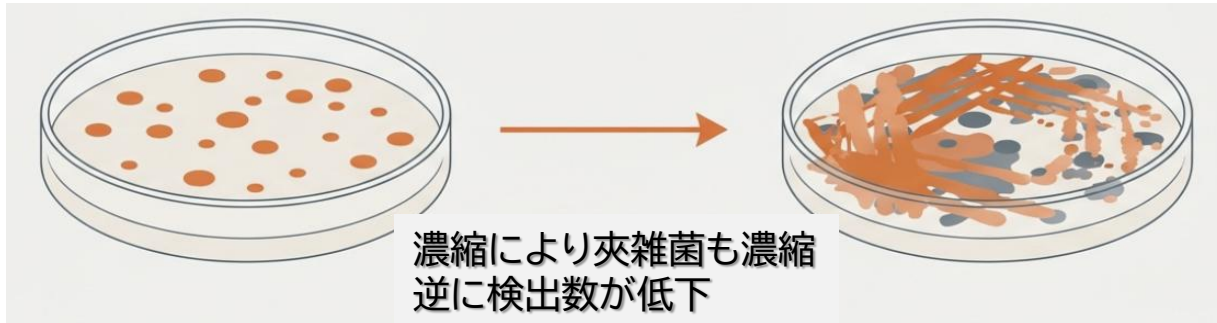
非濃縮、濃縮、酸処理、培地は両方可

組合せ(併用)がやはり重要

濃縮による逆の影響

非濃縮
~1000-2000
CFU/100mL

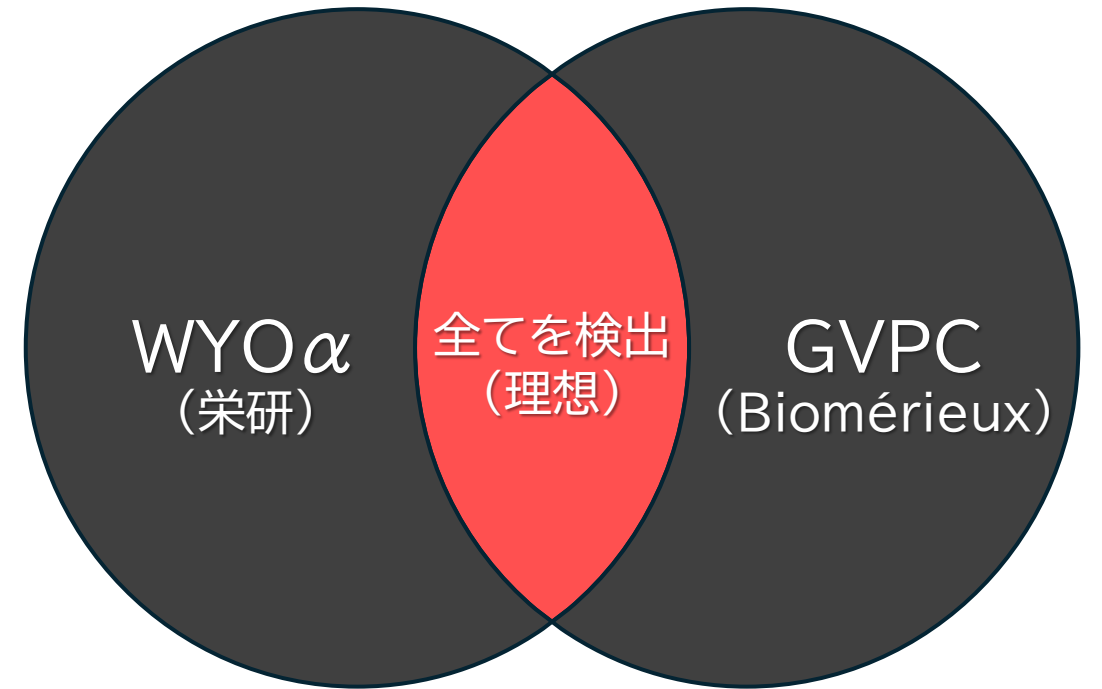
濃縮
~180-390
CFU/100mL



処理による影響

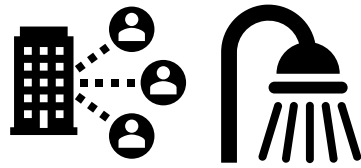
前処理なし

酸/熱処理



完璧な正解はないが補完し合うことで精度は向上する

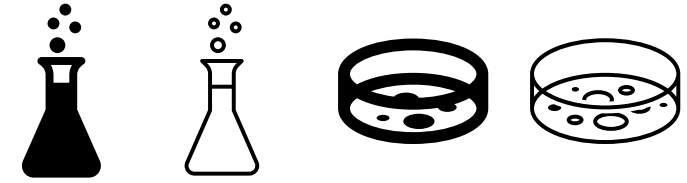
規制基準は明確、しかし「検出ツール」には幅がある



公衆浴場、旅館等における基準値

10 CFU/100mL未満

検査法;ろ過濃縮法または冷却遠心濾過法



「レジオネラ症防止指針 第5版」における
選択分離培地

B-CYE α 寒天培地

WYO α 寒天培地

GVPC寒天培地

MWY寒天培地

「培地の指定はない」

どの培地を使っても結果は同じにならない
選択分離培地は種類やメーカーによって結果が異なる場合もある

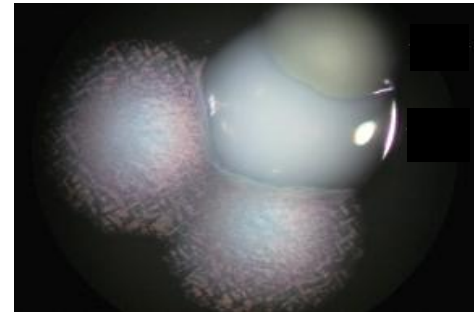
Legionella属菌の観察

■ 判定; *Legionella*属菌と推定されるコロニーを計数(7日目まで)



コロニー数を合計し、検水濃縮量と接種液量から試料100mあたりの *Legionella*属菌数(CFU/100mL)を算出

推定に役立つ方法



環境感染誌.2010;25(1):8-14.

□ 実体顕微鏡を用いた斜光法によるモザイク・カットガラス様構造の観察

□ L-システイン要求性試験の実施

L-システイン不含寒天培地には発育が認められず、BCYE α 寒天培地に発育した菌を *Legionella*属菌とする。

*Legionella*属菌の同定

集団発生(アウトブレイク)/散発患者が発生

地方衛生研究所等の協力を得て菌種と血清群を同定

1. 自発蛍光(360nm)
2. ラテックス凝集反応
3. 抗血清によるスライド凝集反応
4. 遺伝子検査
5. MALDI-TOF MS

まとめ

- *Legionella*属菌は「検査手法」によって検出率が大きく変わる。
- スワブ材質は検出感度に影響するかもしれない。
- 濃縮・非濃縮・前処理は「長所と短所」がある。
- 培地はメーカー・種類で検出能が異なるので複数併用が理想。

実務上の最適解は「併用戦略」