

3. レジオネラ属菌検査

3.1 レジオネラ属菌検査方法に関する文献調査

レジオネラ属菌の検査に関わる手持ちの文献を整理し、別表（表 3）の通り、検査方法一般、培地・前処理、迅速検査方法、空気検査方法の各項目別にまとめた。

現状の培養法については、培地の性能比較を行った文献や前処理の方法を検討した文献があり、レジオネラ属菌の検査方法を再検討する場合の資料になるものと考えられた。また、近年急速に普及しつつある遺伝子検査に関する文献もあり、PCR 法、LAMP 法、リアルタイム PCR 法など原理の異なる方法を培養法との比較において、その有用性を記述している文献が多くあった。今後、レジオネラ属菌の検査においても遺伝子検査をどのような位置づけで利用するかを議論するための基礎資料として役立つものとする。さらに、空気からの検査法についても調査したが、詳細に検討されたものはほとんどなく、今後の検討課題であると考えられた。

まとめにかえて

III レジオネラ属菌検査の原則（原案）

1. レジオネラ属菌検査作業の安全基準

冷却水等のレジオネラ属菌検査用試料を採取する場合には、作業員はマスクや手袋等を着用することが望ましい。

レジオネラ属の全菌種は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程（平成 11 年 4 月 1 日、一部改正）における病原体のレベル分類によってレベル 2 に位置付けられている。したがって、レジオネラ属菌の取り扱い、レベル 2 に相当する実験室で行わなければならない。また、取扱者は、レジオネラ属菌の細菌学的特性、人体に対する病原性、作業中に起こりうるバイオハザードの範囲と安全な取り扱い方法、ならびに指定実験室の機構、使用方法および事故発生時の緊急処置等について十分な知識を有し、かつ技術的修練を経なければならぬ。また、エアロゾル発生のおそれがある作業は、生物学的安全キャビネット内で行う必要があり、生菌を用いた開放系での殺菌実験や回収実験は行ってはならない。

2. レジオネラ属菌検査の実際

レジオネラ属菌は、一般の細菌検査用培地をはじめ、Eagle MEM などの組織培養用培地にもまったく発育しない。したがって、レジオネラ属菌は従来の細菌検査において偶然検出されることはあり得ない。レジオネラ属菌を検出するためには本菌の検出を目的とした検査が必要である。そして意義のある検査結果を得るためには、採水と検査手技が正しく行われなければならない。

レジオネラ属菌検査は、「環境水のレジオネラ属菌検査方法」に示す方法、またはこれと同等の結果が得られる培養法による定量的方法により生菌数を測定する。

一般的な手順は、試料の採取、試料の濃縮、前処理、選択培地への塗抹、培養、集落の計数、分離株の性状確認、分離株の同定である。

3. 迅速検査法の位置付け

微生物検査では試験時間が長時間を有する最大の欠点がしばしば指摘されてきた。レジオネラ属菌の検査においても同様であり、本菌の増殖速度が著しく遅いことから一週間以内に試験成績を出すことは困難であるため、特に迅速試験法が切望されてきた。

近年、臨床微生物や食品微生物検査を中心に、特定微生物の遺伝子学的検査法が普及しつつある。レジオネラ属菌についても PCR 法、リアルタイム PCR 法、LAMP 法などの方法が検討されている。これらの遺伝子学的検査の特性は、生菌、死菌を問わず、該当する DNA を直ちに検出するため、陽性結果が必ずしも感染の危険性を示しているとは限らないことである。一方、これまでの培養法では、増殖可能な感染能力を有する生菌だけを検査対象としているため、陽性結果は直ちに感染の可能性を示している。こうした両試験方法の根本的な原理の相違から、これらで得られた成績が完全に一致することは期待できず、遺伝子学的検査での陽性率が高い傾向にある。

こうした両試験方法の特性を十分に考慮すれば、遺伝子学的検査法の迅速性は非常に有用である。しかしながら、現時点では遺伝子学的検査は培養法による検査を補助する検査法として利用することが妥当であり、今後、さらに遺伝子学的検査が普及し、種々のデータが十分に蓄積できた時点では、培養法と並行して行える可能性を視点に置きながら検討を継続する必要がある。

表 3 レジオネラ属菌検査に関わる文献

検査方法一般

No.	著者	タイトル	著書	ページ	年
1	Winn,W.C.	<i>Legionella</i>	Manual of clinical microbiology 7th ed.	572-585	1999
2	Health protection agency	Detection and enumeration of <i>Legionella</i> species by filtration and centrifugation.	National Standard Method W12	1-17	2004
3	Health protection agency	Detection and enumeration of <i>Legionella</i> species by centrifugation.	National Standard Method W13	1-15	2004
4	JIS	工業用水・工場排水中のレジオネラ試験方法	JIS K0350-50-10	1-28	2006

培地、前処理

No.	著者	タイトル	雑誌	巻 号	ページ	年	
1	Edelstein,P.H.	Natamycin as a selective antifungal agent in media for growth of <i>Legionella</i> spp.	J.Clin.Microbiol.	34	1	185-187	1996
2	古畑勝則	WYO α 寒天培地とGVPC α 寒天培地におけるレジオネラ属菌の発育比較	環境管理技術	17		238-243	1999
3	春日 修	環境水由来レジオネラ属菌の分離方法に関する検討	感染症誌	73	1	25-34	1999
4	Lin,A.	Improved <i>Legionella</i> selective media by the addition of fluconazole : results of in vitro testing and clinical evaluation.	Diagn. Microbiol. Infect.Dis.	34		173-175	1999
5	春日 修	環境水由来レジオネラ属菌の選択培地による効率的検出法の検討	感染症誌	76	1	41-50	2002
6	春日 修	環境水由来レジオネラ属菌の検出における有機酸緩衝液前処理の検討	感染症誌	76	12	1010-1015	2002
7	Inoue,H.	Improved acid pretreatment for the detection of <i>Legionella</i> species from environmental water samples using the plate culture method.	Biocontrol Sci.	9	3	43-50	2004
8	佐藤 薫	レジオネラ属菌検査におけるフィルター貼付法の準用について	全国水質検査研究発表会資料			47-51	2004
9	斎藤優子	安全性を配慮したレジオネラ属菌検査用GVPN培地の性能	用水と廃水	47	8	716-720	2005
10	沼田 昇	環境水中のレジオネラ属菌検査法の検討ーろ過濃縮法における使用フィルターと選択培地の比較	仙台市衛生研究所報	33		56-60	2005
11	妹尾正登	<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1のAcanthamoeba castellanii 内増殖を用いた高感度検出	広島県保健環境センター研究報告	13		27-30	2005
12	Inoue,H.	Enhanced antifungal effect of the selective medium for the detection of <i>Legionella</i> species by a combination of cycloheximide, amphotericin B and thiabendazole.	Biocontrol Sci.	11	2	69-74	2006
13	齊藤敬子	<i>Legionella pneumophila</i> の集落形成に及ぼす各種酵母エキスと活性炭末の影響	環境管理技術	25		18-22	2007

迅速検査方法

No.	著者	タイトル	雑誌	巻	号	ページ	年
1	Villari,P.	Comparison of conventinal culture and PCR methods for the detection of <i>Legionella pneumophila</i> in water.	Lett.Appl.Microbiol.	27	2	106-110	1998
2	Furuhata,K.	Colony hybridization method for rapid detection of <i>Legionella</i> spp.	Biocontrol Sci.	4	2	87-90	1999
3	蒔苗靖子	コロニーハイブリダイゼーション法による <i>Legionella pneumophila</i> の定量に関する研究	水環境学会誌	23	12	771-777	2000
4	小川恵美香	コロニーハイブリダイゼーション法による <i>Legionella pneumophila</i> の検出	防菌防霉	28	2	73-80	2000
5	寺尾通徳	PCR法によるレジオネラ迅速分離同定法の検討	新潟県保健環境科学研究所年報	15		65-72	2000
6	Satoh,W.	Enumeration of <i>Legionella</i> CFU by colony hybridization using specific DNA probes.	Appl.Environ. Microbiol.	68	12	6466-6470	2002
7	Declerck,P.	PCR as a test for the presence or absence of <i>Legionella</i> in (cooling)	Water Sci.Technol.	47	3	103-107	2003
8	安中敏光	Loop-mediated Isothermal amplification (LAMP法)による <i>Legionella</i> 属菌の検出	日本臨床微生物学雑誌	13	1	19-25	2003
9	安中敏光	LAMP法による環境水からの <i>Legionella</i> 属菌の検出	防菌防霉	32	4	195-201	2004
10	井上浩章	LAMP法、PCR法を用いた浴槽水レジオネラ属菌の迅速検査に関する調査研究	防菌防霉	32	10	481-487	2004
11	Furuhata,K.	Comparison of Loop-mediated isothermal ampification (LAMP) and conventional culture for the detection of <i>Legionella</i> species in hot spring water samples in Japan.	Biocontrol Sci.	10	3	117-120	2005
12	佐藤 卓	リアルタイム-PCRを利用したレジオネラ属菌の迅速検査法の開発	岩手県環境保健研究センター年報	3		83-86	2005
13	佐藤 卓	リアルタイム-PCRを利用したレジオネラ属菌の迅速検査法の開発 (第2報)	岩手県環境保健研究センター年報	4		66-69	2005

空気検査方法

No.	著者	タイトル	雑誌	巻	号	ページ	年
1	荒井桂子	空調設備周辺のレジオネラ属菌の分布状況	日本防菌防霉学会 年次大会要旨集			141	2000
2	Ishimatsu,S.	Sampling and detection of <i>Legionella pneumophila</i> aerosols generated from an industrial cooling tower.	Ann.Occup.Hyg.	45	6	421-427	2001
3	奥田舜治	浴槽からのレジオネラ飛散	生物試料分析	26	2	187-190	2003
4	伊藤良香	浮遊レジオネラ属菌の捕集方法	建築物環境衛生管理 全国大会抄録集			38-39	2005

3.2 *Legionella pneumophila* の集落形成に及ぼす各種酵母エキスと活性炭末の影響

3.2.1 はじめに

L.pneumophila 用の非選択培地として BCYE α 寒天培地が広く使用されている¹⁾。現在、この培地は自家調製されることはほとんどなく、複数のメーカーから提供されている市販品(生培地を含む)を利用する場合が多い。ところが以前から、異なるメーカーの培地を使用すると *L.pneumophila* の発育に著しい差異がみられると言われていた。各メーカーではほとんど統一した組成により BCYE α 寒天培地が調製されているが、その素材に関してはそれぞれにノウハウがあり、各社で異なるのが実状である。BCYE α 寒天培地の組成に注目すると、*L.pneumophila* の発育に影響を及ぼす組成として酵母エキスと活性炭が考えられた。そこで、これら 2 組成について、入手可能な素材の組み合わせにより BCYE α 寒天培地を作成し、これらの培地における *L.pneumophila* の発育を比較検討した。

3.2.2 材料および方法

(1) 供試菌株

温泉水由来 *L.pneumophila* 血清群 1 群 9 株、3 群から 15 群(うち 9 群と 14 群を除く)各 1 株、および臨床由来 IID5232 株(血清群 1 群)1 株の計 21 株を用いた。

(2) 供試培地

新版レジオネラ症防止指針 1) に記載された組成により BCYE α 寒天培地を作成した。ただし、酵母エキス 5 種類(A; 日本ベクトン・ディッキンソン(株)212750、B; メルク(株)1.11926.1000、C; ナカライテスク(株)15838-45、D; 関東化学(株)712021-5、E; 極東製薬工業(株)01310)と粉末活性炭 4 種類(1; 和光純薬工業(株)037-02115、2; ナカライテスク(株)079-40EP、3; 関東化学(株)01085-02、4; シグマアルドリッチジャパン(株)24,227-6)の組み合わせで 20 種類の BCYE α 寒天培地を作成した(表 3.2.1)。なお、ACES 緩衝剤は(株)同仁化学研究所、寒天は伊那食品工業(株)、その他の組成はいずれも和光純薬工業(株)製を使用した。

(3) 培養

供試菌株を BCYE α 寒天培地((株)日研生物医学研究所)に画線塗抹して 35℃, 5 日間培養した。出現集落を集菌して滅菌生理食塩水に浮遊させ、およそ 10^8 CFU/ml の菌液を調製した。これを適宜希釈して $10^1 \sim 10^2$ CFU/0.1ml となるように各供試培地に 0.1ml ずつ接種した。菌液を培地表面に塗抹してから 35℃, 7 日間培養し、集落形態を観察しながら集落数を計数した。

(4) 統計学的処理

各供試培地ごとに計数した集落数(CFU/0.1ml)を基に、危険率 1%で平均値の差の検定(両側検定)を行い、培地間の有意差を検討した。

表3.2.1 活性炭を替えたBCYE α 培地における出現集落数

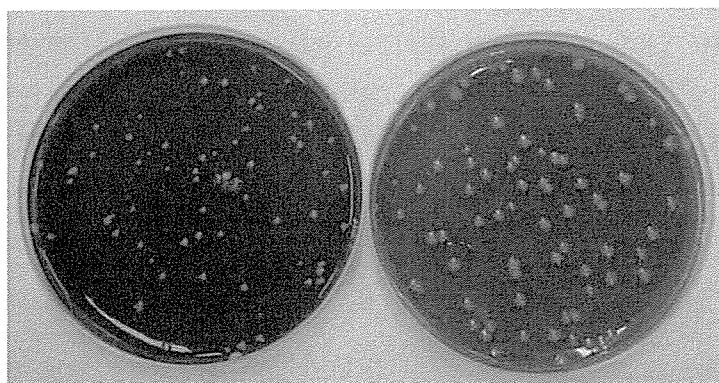
回数	培地No.	酵母エキス	活性炭	平均	標準偏差
第1回	A-1	BD	和光純薬	116.0	68.2
	A-2	BD	ナカライ	106.5	60.4
	A-3	BD	関東化学	113.7	62.0
	A-4	BD	Sigma	114.0	67.0
第2回	B-1	Merck	和光純薬	26.1	20.6
	B-2	Merck	ナカライ	27.1	19.7
	B-3	Merck	関東化学	43.4	29.0
	B-4	Merck	Sigma	41.4	23.7
第3回	C-1	ナカライ	和光純薬	65.5	57.8
	C-2	ナカライ	ナカライ	56.6	46.1
	C-3	ナカライ	関東化学	56.4	47.5
	C-4	ナカライ	Sigma	58.2	46.3
第4回	D-1	関東化学	和光純薬	45.4	42.3
	D-2	関東化学	ナカライ	35.4	37.8
	D-3	関東化学	関東化学	41.5	39.3
	D-4	関東化学	Sigma	45.0	46.7
第5回	E-1	極東製薬	和光純薬	111.7	102.6
	E-2	極東製薬	ナカライ	120.5	99.3
	E-3	極東製薬	関東化学	128.0	101.0
	E-4	極東製薬	Sigma	120.3	97.7

(CFU/0.1ml)

3.2.3 結果および考察

(1) 集落形態の比較

各供試培地に形成された *L.pneumophila* の集落を観察し、培地ごとに比較を行った。図 4.2.1 には B-1 培地(酵母エキス；メルク、活性炭末；和光)と B-4 培地(酵母エキス；メルク、活性炭末；シグマ)の培養所見を示した。B-1 培地では直径 1mm 前後の集落が多かったが、B-4 培地では直径 2～3mm の集落も存在し、明らかに B-4 培地での集落が大きく、計数も容易であった。菌液の塗抹時、B-1 培地では菌液のしみ込みが悪く、疎水的な現象が見られたのに対し、B-4 培地ではスムーズにしみ込み、親水的であった。こうした培地表面の相違が集落形成に影響している可能性も考えられたが、このことが活性炭のメーカーによる違いかどうかは明らかではなかった。



B-1培地

B-4培地

図3.2.1 培地による集落形態の比較 (35℃, 7日間培養)

(2) 集落数の比較

表 3.2.1 には、各回ごとに酵母エキスを一定にして活性炭末を組合わせた BCYE α 寒天培地での集落数の平均値と標準偏差を列記した。

第 1 回目は、ベクトン・ディッキンソンの酵母エキスをを用い、4 種類の活性炭末を組合わせた培地であった。最も集落数の平均値が高かった培地は和光の活性炭末(A-1 培地)で、116.0CFU であった。次にシグマの活性炭末(A-4 培地)で、114.0CFU、関東の活性炭末(A-3 培地)で、113.7CFU であり、両者は同程度であった。最も集落数の平均値が低かった培地はナカライの活性炭末(A-2 培地)で、106.5CFU であった。

第 2 回目は、メルクの酵母エキスをを用い、4 種類の活性炭末を組合わせた培地であった。最も集落数の平均値が高かったのは、関東(B-3 培地)の 43.4CFU であり、続いてシグマ(B-4 培地)の 41.4CFU とはほとんど差がなかった。ところが、ナカライの B-2 培地では 27.1CFU と約 3 分の 2 に減少し、最も集落数の平均値が低かった和光の B-1 培地も 26.1CFU であった。

第 3 回目は、ナカライの酵母エキスをを用い、4 種類の活性炭末を組合わせた培地であった。最も集落数の平均値が高かったのは和光(C-1 培地)で、65.5CFU であった。次にシグマ(C-4 培地)の 58.2CFU、ナカライ(C-2 培地)の 56.6CFU、関東(C-3 培地)の 56.4CFU と大差なく続いた。

第 4 回目は、関東の酵母エキスをを用い、4 種類の活性炭末を組合わせた培地であった。最も集落数の平均値が高かった培地は和光の D-1 培地(45.4CFU)であったが、続くシグマの D-4 培地(45.0CFU)もほとんど差はなく、関東の D-3 培地も 41.5CFU であり、いずれも同程度であった。最も集落数の平均値が低かったのはナカライの D-2 培地(35.4CFU)であった。

第 5 回目は、極東の酵母エキスをを用い、4 種類の活性炭末を組合わせた培地であった。最も集落数の平均値が高かった培地は関東(E-1 培地)の 128.0CFU であった。次にナカライ(E-2 培地)とシグマ(E-4 培地)は、それぞれ 120.5CFU、120.3CFU であり、ほとんど同じであった。最も集落数の平均値が低かったのは和光(E-1 培地)の 111.7CFU であった。

これらの集落数を基に、危険率 1%で平均値の差の検定を行って培地間の有意差を検討した結果、有意差が認められたものを表 2 に示した。すなわち、酵母エキスとしてベクトン・ディッキンソン(A 群)、ナカライ(C 群)および極東(E 群)を用いた各群では、活性炭末のメーカーを替えた培地での出現集落数に有意差は認められなかった。一方、酵母エキスをメルクにした場合(B 群)は、集落数の平均値が 1 位の関東(B-3 培地)と 2 位のシグマ(B-4 培地)は、3 位のナカライ(B-2 培地)および 4 位の和光(B-1 培地)に対してそれぞれ有意差が認められた(表 3.2.2 上段)。また、酵母エキスを関東にした場合(D 群)は、集落数の平均値が 1 位の和光(D-1 培地)と 2 位のシグマ(D-4 培地)は、それぞれ 4 位のナカライ(D-2 培地)に対して有意差が認められた(表 3.2.2 下段)。

表3.2.2. 出現集落数に有意差が認められた培地

集落数順位	培地No.	培地No.			
		B-3	B-4	B-2	B-1
1	B-3		-	**	**
2	B-4	-		**	**
3	B-2	**	**		-
4	B-1	**	**	-	
		D-1	D-4	D-3	D-2
1	D-1		-	-	**
2	D-4	-		-	**
3	D-3	-	-		-
4	D-2	**	**	-	

**: $P \leq 0.01$

以上のように、酵母エキスがメルクで、活性炭末が和光あるいはナカライの培地、また、酵母エキスが関東で、活性炭末がナカライの培地では、他の組み合わせの培地より、出現集落数が有意に少なかった。このことは各メーカーの素材の成分が *L.pneumophila* の発育に影響しているものと考えられたが、各素材の製法等は企業秘密の部分が大きく、明らかにされていないため、詳細は不明であった。

追加的に、比較的出現集落数が安定していた関東とシグマの活性炭末をそれぞれ一定にして、酵母エキスの種類を替えた培地において同様の比較を行い、*L.pneumophila* の集落形成における酵母エキスの影響を検討した。結果は表 3.2.3 に示したとおりである。上段は関東の活性炭末を用い、5 種類の酵母エキスを組み合わせた培地であった。これらのうち、最も集落数の平均値が高かったのは極東の酵母エキスをを用いた 3-E 培地であり、その集落数は 239.2CFU であった。次にナカライの 3-C 培地が 238.2CFU であり、ほとんど差はなかった。続いてベクトン・ディッキンソンの 3-A 培地で、224.5CFU、関東の 3-D 培地で、205.9CFU であった。最も集落数の平均値が低かった培地はメルクの 3-B 培地で、188.6CFU であった。下段はシグマの活性炭末を用い、5 種類の酵母エキスを組み合わせた培地であった。最も集落数の平均値が高かったのは上段と同様、極東の酵母エキスをを用いた 4-E 培地であり、集落数は 164.1CFU であった。次に関東の 4-D 培地が 159.0CFU、続いてナカライの 4-C 培地が 152.7CFU、ベクトン・ディッキンソンの 4-A 培地が 148.0CFU であった。最も集落数の平均値が低かった培地は上段と同様、メルクの 4-B 培地であり、その集落数は 136.2CFU であった。

これらの集落数を基に、上述のごとく危険率 1% で平均値の差の検定を行って培地間の有意差を検討した。その結果、シグマの活性炭末を用いた 4 群では酵母エキスを替えても集落数に有意差は認められなかった。ところが、関東の活性炭末を用いた 3 群では、表 3.2.4 に示したとおり、集落数の平均値が 1 位の極東(3-E 培地)と 2 位のナカライ(3-C 培地)および 3 位のベクトン・ディッキンソン(3-A 培地)は、5 位のメルク(3-B 培地)に対してそれぞれ有意差が認められた。このように、関東の活性炭末を用い、酵母エキスとしてメルクを使用した培地では、他の

組み合わせの培地より出現集落数が有意に少なかった。

表3.2.3 酵母エキスを替えたBCYE α 培地における出現集落数

培地No.	活性炭	酵母エキス	平均	標準偏差
3-A	関東化学	BD	224.5	152.0
3-B	関東化学	Merck	188.6	127.0
3-C	関東化学	ナカライ	238.2	169.2
3-D	関東化学	関東化学	205.9	140.7
3-E	関東化学	極東製薬	239.2	172.8
4-A	Sigma	BD	148.0	145.8
4-B	Sigma	Merck	136.2	129.5
4-C	Sigma	ナカライ	152.7	160.7
4-D	Sigma	関東化学	159.0	168.9
4-E	Sigma	極東製薬	164.1	144.3

(CFU/0.1ml)

表3.2.4 出現集落数に有意差が認められた培地

集落数順位	培地No.	培地No.				
		3-E	3-C	3-A	3-D	3-B
1	3-E		-	-	-	**
2	3-C	-		-	-	**
3	3-A	-	-		-	**
4	3-D	-	-	-		-
5	3-B	**	**	**	-	

**： $P \leq 0.01$

3. 2. 4 おわりに

L.pneumophila の発育に影響を及ぼすと考えられる酵母エキスと活性炭末の組み合わせによる各 BCYE α 寒天培地において、*L.pneumophila* の集落形成を比較検討した。集落形態の比較では、メルクの酵母エキスを使用し、和光の活性炭末で作成した培地では、他社の活性炭末で作成した培地より集落が小さい傾向が認められた。また、集落数の比較では、メルクの酵母エキスを使用した場合、ナカライと和光の活性炭末を用いた培地では、集落数の平均値に有意差が認められた。さらに、酵母エキスを関東にした場合でも、ナカライの活性炭末を用いた培地に対して有意差が認められた。一方、関東とシグマの活性炭末を使用した場合では、いずれもメルクの酵母エキスで作成した培地において集落数が少ない傾向があり、前者では有意差が認められた。

以上のように、異なる酵母エキスや活性炭末を用いた BCYE α 寒天培地では、*L.pneumophila* の集落形成に明らかな相違が認められたことから、各培地作成メーカーは、*L.pneumophila* に対する種々素材の発育能を十分に配慮して BCYE α 寒天培地を作成していただきたい。

参考文献

- 1) (財)ビル管理教育センター，厚生省生活衛生局 企画課監修(1999)新版レジオネラ症防止指針. (財)ビル管理教育センター，東京.

3.3 冷却塔から採取したバイオフィルムの構成菌とその特性

3.3.1 バイオフィルムとは

近年、環境衛生や食品などの製造分野において「バイオフィルム」という単語を見聞きする機会が多くなった。一方、医療や医学の分野では古くからバイオフィルム感染症として知られていたが、易感染者の増大により難治感染症としてクローズアップされている。また、バイオフィルムは、衛生工学や製紙工業などの特定の分野ではスライムと称され、さらに一般にはヌメリ、ヌルヌルなどと言われている。

バイオフィルムは、細菌をはじめ、真菌、藻類、原生動物などの多くの微生物から構成される粘液状物質であることが知られている。これまでも水道管や貯水槽の内壁あるいは工業用水の冷却系統などに多く発生している。通常は内壁に付着しているが、しばしば水流によって剥離され、給水栓から出現する例もある。微生物の増殖が著しいときには流水量を低下させたり、ときには閉塞を起こすこともある。場合によっては、管材の腐食原因となったり、水に着色や異臭味をきたして水質の悪化を招いたり、消毒効果や熱伝導効果を低下させるなど様々な障害を引き起こしている。

一般の住環境においても特に湿度が高い浴室や洗面所、台所等の水周りでは淡紅色を呈するヌルヌルしたバイオフィルムが方々で問題視されている。人々の生活水準の向上にともない、アメニティー、すなわち「快適性」という概念が広まり、限られた居住空間でできるだけ気持ちよく、清潔に生活したいとの意識が高まってきた。こうした居住者の意識変化を反映して、居住環境で発生したバイオフィルムの外観や感触から不快感を生じ、建築、施工者を相手に訴訟問題まで発展した事例もある。

これまでバイオフィルムは一つの現象としてとらえられており¹⁻⁴⁾、構成微生物に関する詳細な検討は、まだ始まったばかりと言っても過言ではなく、今後解明されるべき課題は山積みである。ここでは、冷却塔に発生したバイオフィルムを材料にこれまでとは違った微生物生態学的視点からバイオフィルム構成菌の解析を行った一部を紹介する。

3.3.2 バイオフィルムの微視的構造

都内の冷却塔に発生したバイオフィルムをミクロスパーテルでかき取り、冷却水に入れて搬入した。これを肉眼的に観察した後、滅菌生理食塩水で軽く遠心して(1,000rpm, 3分間)バイオフィルムを洗浄し、試料とした。光学顕微鏡(1,000倍)で観察した結果では、バイオフィルムは $2.6 \times 0.9 \mu\text{m} \sim 8.3 \times 2.2 \mu\text{m}$ の大小様々な桿菌様微生物が集合したものであり、細菌以外の微生物では藻類も観察された。

これまでの検討結果から、バイオフィルムは予想に反し、決して均一な膜状物質でないことが確認されている。かつてバイオフィルムの構造を知るために、実験的に $9 \times 9 \text{mm}$ のFRP板上にバイオフィルムを形成させ、これを走査型電子顕微鏡で観察した結果では、バイオフィルムは細菌と思われる桿菌様の微生物が階層状に集合しており、凹凸の激しい構造をしていた(図 3.3.1⁵⁾)。

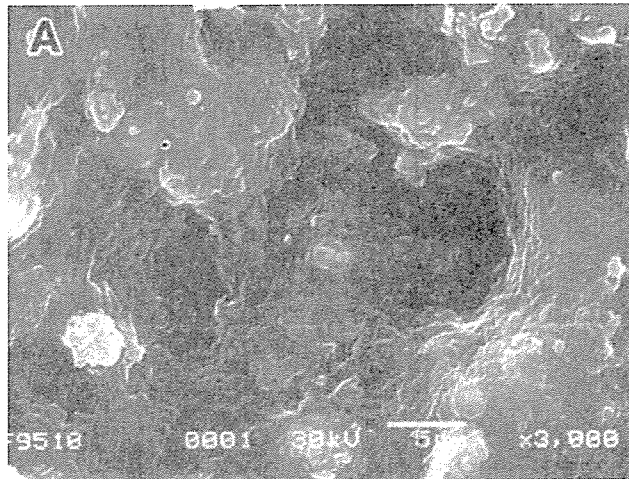


図3.3.1 バイオフィルムの走査電子顕微鏡所見

現在ではレーザー顕微鏡を用いた観察により「付着基質上に細胞外多糖類から成るマトリックスに閉じ込められた細菌のマイクロコロニーが点在し，これらのマイクロコロニー間を密度の低いポリマーが埋めており，そこは水が比較的自由に動ける water channels となっている⁶⁾」という三次元像が明らかにされており，バイオフィルム構造の認識が大きく変わっている。

3.3.3 バイオフィルムの形成過程

バイオフィルムの発生は特殊な現象のように考えられるが，それは我々人間の視点であり，この現象を微生物生態学的に微生物の視点でとらえると，ごく自然な現象であって，バイオフィルムは微生物の棲みかといえる。

身近な住環境におけるバイオフィルムの形成は，ある種の細菌が床やシンクなどの担体に付着することから始まり，付着した細菌は汚れや洗剤などを栄養源に高温，多湿の条件下で短時間に増殖し，粘液物質を産生しつつさらに成熟していくものと推察される。微生物の側に視点を変えてみれば，「付着」は微生物の生活様式の一つであり，担体への付着に続くバイオフィルムの形成は微生物の諸活動，すなわち彼らの生き残りにとって重要な意味を持っている。

芝崎の解説⁷⁾では，一般的なバイオフィルムの形成プロセスとして次の10項目があげられている。

- ①界面への水系中の溶存態化合物の吸着
- ②界面への細菌の接触
- ③細菌の可逆的付着
- ④細菌の不可逆的付着
- ⑤細菌の界面上での増殖
- ⑥界面への懸濁態有機物の吸着

- ⑦界面への各種微細動植物の接触及び付着
- ⑧界面上での各種微細動植物の増殖
- ⑨付着生物由来の分泌物の蓄積
- ⑩付着生物の移動，脱離

このような過程によってバイオフィームが形成されていくものと考えられているが、最初に細菌が付着するための因子については必ずしも十分に解明されておらず、詳細な検討が続けられている⁸⁾。

3.3.4 バイオフィームの菌数

これまでバイオフィームは貧栄養環境であり、そこに生息する微生物は貧栄養細菌が中心であると考えられていた。したがって、バイオフィーム構成菌数を測定する場合には、PYG 培地や R2A 培地などの貧栄養培地を用いて 20～30℃で 5～7 日間の培養が行われてきた。ところが、先の日本微生物生態学会バイオフィーム研究部会において立教大学のグループから「バイオフィームの内部環境は比較的富栄養であり、pH が安定した環境であり、さらに静電氣的相互作用が支配的なスローテンポな世界である」という科学的データに基づいた推測が報告された。こうした考えは、これまでの常識を覆すような画期的なものであった。

そこで、今回の検討では培地の栄養分と培養日数を考慮して構成菌数の測定を行った。まず、採取したバイオフィームをボルテックスミキサーで激しく振とうし、可能な限り分散させて均一化した後、測定材料とした。用いた培地は、BHI 寒天培地 (DB) と、これを 1/10, 1/100, 1/1,000 に希釈した培地、さらに R2A 培地 (極東製薬工業) の計 5 種類であった。10 倍段階で希釈した供試試料を各培地に 0.1ml ずつ塗抹し、25℃で培養しながら経日的に出現集落を計数した。

結果は表 3.3.1 に示したとおりである。

表3.3.1 各種培地による経日的出現集落数
Aバイオフィーム

培養時間 (日)	培地				
	BHI	1/10BHI	1/100BHI	1/1,000BHI	R2A
2	6.4×10^3 *	6.7×10^3	—	—	3.0×10^3
5	1.3×10^6	8.0×10^6	1.6×10^7	1.2×10^6	1.7×10^6
7	1.5×10^6	1.3×10^7	1.7×10^7	2.9×10^6	2.9×10^6
10	1.8×10^6	1.7×10^7	1.8×10^7	6.3×10^6	3.9×10^6
14	1.9×10^6	1.9×10^7	2.5×10^7	8.0×10^6	5.0×10^6

Bバイオフィーム

培養時間 (日)	培地				
	BHI	1/10BHI	1/100BHI	1/1,000BHI	R2A
2	6.0×10^4 *	3.4×10^5	2.4×10^5	—	1.8×10^5
5	6.0×10^4	3.8×10^5	3.0×10^5	3.0×10^5	2.8×10^5
7	6.0×10^4	4.2×10^5	7.2×10^5	4.4×10^5	3.6×10^5
10	6.0×10^4	4.4×10^5	7.2×10^5	4.4×10^5	3.6×10^5
14	6.0×10^4	4.4×10^5	7.2×10^5	4.4×10^5	3.6×10^5

* : CFU/0.1ml

—: 計数不能

上段の A バイオフィルムについてみると、培養 2 日目で BHI 寒天培地において 10^3 CFU の集落が出現した。また、1/10 培地、R2A 培地でも同等の菌数であった。しかし、1/100 培地と 1/1,000 培地では集落の形成は認められなかった。5 日目になると、1/100 培地で 10^7 CFU、1/1,000 培地で 10^6 CFU の集落が形成され、他の培地ではいずれも 10^6 CFU の集落が認められた。7 日目では 1/10 培地で菌数が 10^7 CFU に増加したが、その他の培地では顕著な増加は認められなかった。その後 10 日目、14 日目でも菌数の増加はほとんどなく、7 日目の菌数と大差なかった。

また、下段に示した B バイオフィルムでは、培養 2 日目で 1/1,000 培地を除くすべての培地で集落形成がみられ、その菌数は BHI 寒天培地では 10^4 CFU、1/10 培地、1/100 培地および R2A 培地では 10^5 CFU であった。5 日目になると、1/1,000 培地でも 10^5 CFU の集落が形成され、その他の培地では菌数の大きな増加はなかった。その後、7 日、10 日、14 日を経過してもすべての培地において菌数の増加はみられなかった。

今回の検討により、BHI 寒天培地のような栄養価の高い培地でも 2 日後に集落を形成できるような増殖速度の速い菌種がバイオフィルム構成菌として生息していることが初めて明らかになった。従来、バイオフィルム構成菌の測定方法として用いられてきた貧栄養細菌の測定方法では、試料の希釈や長時間の培養などにより、上記の A バイオフィルムのような場合では、これらの増殖速度の速い菌種は測定対象から除外されていたものと考えられた。

3.3.5 バイオフィルムの構成菌種

前項目で記述したように、バイオフィルムの構成菌種としてこれまで調べられていなかった増殖速度の速い菌種が存在することが明らかになった。そこで、新たにバイオフィルムの菌種構成を明らかにするため、従来の生化学的性状試験ではなく、16S rDNA の部分塩基配列を基に分離株の菌種同定を行った。

その結果を表 3.3.2 に示した。上段の A バイオフィルムについてみると、培養 2 日目で BHI 寒天培地、1/10 培地および R2A 培地により分離された菌種はいずれも *Pseudomonas mosselii* であった。また、7 日目に集落を形成した貧栄養細菌では、*Microbacterium* sp. や *Erythromicrobium* sp. が共通して分離された。なかでも、1/10 培地での分離菌種数が最も多く、*Microbacterium* sp. の他に、*Microcella putealis*, *Porphyrobacter donghaensis* および *Micrococcus luteus* が同定された。次に 1/100 培地において 3 菌種が分離されており、*Erythromicrobium* sp. の他に *Sandaracinobacter sibiricus* と *Terrimonas* sp. であった。14 日目の分離菌種では、BHI 寒天培地において *Yonghaparkia alkaliphila* が同定された。また、1/10 培地では *Staphylococcus capitis*, 1/100 培地では *Microcella* sp., 1/1,000 培地では *Sandaracinobacter sibiricus* と *Roseomonas* sp., R2A 培地では *Microcella* sp. と *Microbacterium* sp. がそれぞれ分離された。

また、下段に示した B バイオフィルムでは、培養 2 日目に 1/1,000 培地を除く各培地で分離された菌種は、*Pseudomonas alkaligenes* と *Pseudomonas alcaliphila* が共通していた。さらに、1/10 培地では *Acidovorax temperans* と *Sphingomonas* sp., また R2A 培地では *Acidovorax temperans* と *Pseudoxanthomonas japonensis* が同定

された。7日目に集落を形成した貧栄養細菌では、*Sphingomonas* sp. と *Methylophilus methylotrophus* が共通していた。このほか、1/10 培地では *Herbaspirillum* sp. , 1/100 培地では *Sphingopyxis witflariensis*, R2A 培地では *Methyloversatilis* sp. と *Mycobacterium chubuense* がそれぞれ分離同定された。

以上のように、今回分離同定された貧栄養細菌は、これまでバイオフィーム構成菌としては、ほとんど報告されていない菌種であった。このことは、今回の同定は 16S rDNA の部分塩基配列を基に行ったためと考えられた。これら分離株のうち、種まで同定困難な株や塩基配列の相同性から新種と思われる菌株が多くあり、今後の分類に関する情報の蓄積が不可欠であると考えられた。

今回の検討結果から、富栄養培地で2日目に集落を形成できるような増殖速度の早い構成菌は、*P. mosselii* (A バイオフィーム)や *P. alkaligenes* と *P. alcaliphila* (B バイオフィーム)であることが明らかになり、いずれも *Pseudomonas* 属であったことに注目したい。

3.3.6 構成菌のバイオフィーム形成能

分離株のバイオフィーム形成能を検討するために、96 穴平底マイクロプレートに R2A ブロス(極東製薬工業)を 0.2ml ずつ分注し、菌株を接種した。これを 25℃で 7 日間静置培養し、ウェル内にバイオフィームを形成させた。このバイオフィームを 0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色後、95%エタノールで抽出し、溶出した色素の吸光度を波長 570nm で測定し、その強弱からバイオフィーム形成能を比較した。

結果は培養日数と分離培地とともに表 3 に示した。まず、A バイオフィームでは、*Microbacterium* sp. (A-11 株, A-23 株)の 0.44~*Sandaracinobacter sibiricus* (A-8 株)の 4.99 の範囲で、平均 1.28 であり、いずれの分離株でもバイオフィーム形成が認められた。これを培養日数ごとの平均値でみると、2 日目の分離株では 1.06, 7 日目の分離株では 1.60, 14 日目の分離株では 0.70 であり、やや 7 日目の分離株で形成能が高かった。また、分離培地ごとの平均値でみると、BHI, 1/10, 1/100, 1/1,000, R2A では、それぞれ 0.94, 1.78, 1.81, 0.86, 0.85 であり、1/100 培地での分離株のバイオフィーム形成能がやや高かった。

一方、B バイオフィームでは、*Pseudomonas alkaligenes* (B-3 株)の 0.55~*Sphingomonas aromaticivorans/subterranea* (B-12 株)の 10.10 の範囲で、平均 2.73 であり、B バイオフィーム構成菌のバイオフィーム形成能は A バイオフィーム構成菌よりも 2 倍以上高かった。これを培養日数ごとの平均値でみると、2 日目の分離株では 2.09, 7 日目の分離株では 3.44 であり、増殖速度の遅い分離株の方がバイオフィーム形成能は高かった。また、分離培地ごとの平均値でみると、BHI, 1/10, 1/100, 1/1,000, R2A では、それぞれ 3.36, 2.86, 4.13, 2.31, 1.72 であり、1/100 培地での分離株のバイオフィーム形成能が最も高く、この傾向は A バイオフィームの場合と同様であった。

このように、バイオフィーム形成能は菌株によって異なり、菌種による強弱の傾向はみられなかった。

表3.3.2 各培養時間ごとの培地別分離菌種

Aバイオフィルム					
培養時間		培地			
(日)	BHI	1/10BHI	1/100BHI	1/1,000BHI	R2A
2	<i>Pseudomonas mosselii</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>	-	-	<i>Pseudomonas mosselii</i>
7	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Erythromicrobium</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp.
		<i>Microcella putealis</i>	<i>Sandaracinobacter sibiricus</i>	<i>Erythromicrobium</i> sp.	<i>Erythromicrobium</i> sp.
		<i>Porphyrobacter donghaensis</i>	<i>Terrimonas</i> sp.		
		<i>Micrococcus luteus</i>			
14	<i>Yonghaparkia alkaliphila</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Microcella</i> sp.	<i>Sandaracinobacter sibiricus</i>	<i>Microcella</i> sp.
				<i>Roseomonas</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp.
Bバイオフィルム					
培養時間		培地			
(日)	BHI	1/10BHI	1/100BHI	1/1,000BHI	R2A
2	<i>Pseudomonas alkaligenes</i>	<i>Pseudomonas alkaligenes</i>	<i>Pseudomonas alkaligenes</i>	-	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>
	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	<i>Acidovorax temperans</i>	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>		<i>Acidovorax temperans</i>
		<i>Sphingomonas</i> sp.			<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>
7	-	<i>Herbaspirillum</i> sp.	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Methylophilus methylotrophus</i>
			<i>Sphingopyxis wittflariensis</i>	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	<i>Methyloversatilis</i> sp.
					<i>Mycobacterium chubuense</i>

-: 非分離

3.3.7 構成菌の病原性

かつて病原菌とは、コッホの原則に該当する微生物と考えられていた。すなわち、一定の病気の病変部位からは、つねに一定の微生物が検出されなければならないこと、病変部から検出されたその微生物は、その病気だけに認められるものでなければならないこと、その微生物を感受性のある動物に接種した場合、本来のものと同一病気を起こさなければならない、さらに、感染動物からふたたび同じ微生物が分離されなければならない、の4条件であった⁹⁾。

ところが、近年、病原菌の概念が大きく変わりつつある。それは、何等かの原因で感染に対する宿主の抵抗力が低下したときに、通常为非病原菌の感染によって発症する可能性があり、日和見感染といわれる。例えば、乳幼児や高齢者、あるいは免疫機能が低下して抵抗力のないヒトなど、いわゆる易感染者が、自然環境に常に生息している

Pseudomonas aeruginosa や *Methylobacterium mesophilicum* などの特定の菌種に感染すると、基礎疾患が悪化したり、これに付随する様々な疾病が生じたりすることもある。

バイオフィルム構成菌は、いずれも空気環境や水環境をはじめ自然環境に広く分布しており、健康なヒトに対して強い病原性を示すような菌種ではなく、通常は平素無害菌と称される細菌群である。しかしながら、これらの細菌は日和見病原体と呼ばれ、疾病が起こるかどうか、またどのような病状がでるかは感受性体、つまりヒトの免疫能力次第であり、どのような状態のヒトが感染したかによって異なるのである。バイオフィルム構成菌が原因で発症することは稀であろうが、絶対にないとは言い切れない。

3.3.8 結語

住環境の水周りに発生するバイオフィルムは、いわゆる水垢であり、細菌の増殖により自然に発生するものである。何気なく見過ごしてしまえば気にならないものであるが、最近、度々話題になるのは建築様式の近代化により住環境に変化が生じたためバイオフィルムが多発するようになったのか、あるいは、日々の生活を快適な住環境の中で過ごすという意識が高まり、そのため今まで以上に注意深く観察するようになったためであろうか。いずれにしろ、バイオフィルムに対して関心が高まってきているのは事実である。今後は何らかの対応策を講ずる必要があるが、相手が微生物の集合体であるだけに容易に制御することは困難であり、大きな課題である。

今回の検討によりバイオフィルムには富栄養培地で比較的短時間に集落を形成する菌種が構成菌種の一員であることが初めて明らかになった。しかし、これら分離株のバイオフィルム形成とその維持における役割や他の菌株との相互作用などはまったく未知の状態である。今後、こうしたことが明らかになればバイオフィルム形成抑制においても得策が見つかるかもしれない。そうした日が来ることを切に願いたい。

参考文献

- 1) 古畑勝則, 小池和子(1990)浴室床面の淡紅色スライムに関する細菌学的検討, 防菌防黴, 18, 407-410.

- 2) 古畑勝則, 松本淳彦(1992)都民からの苦情で持ち込まれた浴室, 洗面台等に発生するスライムの細菌学的検討, 東京衛研年報, 43, 197-204.
- 3) 古畑勝則(1996)浴室・トイレ・洗面台などに発生するピンク色付着物, 空気調和・衛生工学, 70, 53-57.
- 4) 古畑勝則(1996)浴室などの住環境に発生するスライム, 防菌防黴, 24, 723-728.
- 5) 芝崎 勲監修(2000)有害微生物管理技術第Ⅱ巻, pp871-879, (株)フジ・テクノシステム, 東京.
- 6) 日本微生物生態学会バイオフィーム研究部会編著(2005)バイオフィーム入門, 日科技連, 東京.
- 7) 芝崎 勲(1996)微生物制御に関連する資料(その1), 防菌防黴, 24, 477-488.
- 8) 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治編(1998)バイオフィーム, (株)サイエンスフォーラム, 東京.
- 9) 岡田 淳, 設楽政次, 伊藤 武, 他著(2004)微生物／臨床微生物, pp3, 医歯薬出版(株), 東京.

4. レジオネラ属菌数の監視と対策

4.1 日本の基準と各国のガイドライン

レジオネラ属菌数の監視と対策を検討するにあたり、日本の基準及び諸外国のガイドラインを参照することは有意義である。

日本の基準は、平成 11 年 11 月初版発行の、「新版レジオネラ症防止指針」厚生省生活衛生局企画課監修、財団法人ビル管理教育センター発行を採用する。

諸外国のガイドラインは、過去に委員が個別に収集したものに加えて、インターネットを通じて収集した。収集したガイドラインのリストを表に示す。

表 4.1 収集した諸外国のガイドラインリスト

発行組織	タイトル
HSC (Health & Safety Commission UK ; イギリス)	APPROVED CODE OF PRACTICE & GUIDANCE 2000 The control of legionella bacteria in water systems
CIBSE (The Chartered Institution of Building Services Engineers : イギリス)	CIBSE TM13:2000 Minimizing the risk of Legionnaires' disease
EWGLI(European Working Group for Legionella Infections : ヨーロッパ)	European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease January 2005
CTI (Cooling Technology Institute : アメリカ)	Legionellosis Guideline: Best Practices for Control of Legionella July 2006
OSHA(U.S. Department of Labor: Occupational Safety & Health Administration : アメリカ)	OSHA TECHNICAL MANUAL (OTM) Legionnaires' Disease January 1999
AWT (Association of Water Technologies : アメリカ)	LEGIONELLA 2003 An Updated and Statement by the Association of Water Technologies
ASHRAE : (American society of Heating, Refrigerating and Air-conditioning engineers, Inc. : アメリカ)	GUIDELINE 12-2000 Minimizing the Risk of Legionellosis associated with Building Water Systems
WHO(World Health Organization)	Guidelines for safe recreational water environments Volume2 Swimming Pools and Similar Environment 2006
Department of human Services Public Health Division オーストラリア	Managing the Risk of Legionnaires' Disease Supplementary Notes for Hospitals November 2001

4.2 日本における監視と対応

日本におけるレジオネラ属菌の監視と対応は、「新版レジオネラ症防止指針」平成 11 年発行のIV章に示されている。

まずは、感染の危険因子を点数化し、細菌学検査(レジオネラ属菌の検出試験)の頻度を設定している。感染の危険因子は、①エアロゾルの要因(1~3点) ②環境の要因(1~4点) ③宿主側の要因(1~4点)があり、それぞれについて点数付けを行い、その合計点(スコア)で対応を以下の通りとする。

スコア	対 応
3 以下	常に設備の維持管理に心がけ、必要に応じて（設備に関連したと考えられる発熱患者や肺炎患者の発生が疑われた場合など）細菌検査を実施する
4 ～ 5	1 年以内に 1 回以上、設備の稼働初期に細菌検査を定期的実施する
6 ～ 7	1 年以内に 2 回以上、設備の稼働初期及び稼働期間中に細菌検査を定期的実施する
8 以上	1 年以内に 3 回以上、設備の稼働初期及び稼働期間中に細菌検査を定期的実施する

この検査の結果、レジオネラ属菌が検出された場合は、以下の対応とする。

1) 人がエアロゾルを直接吸引する可能性が低い人工環境水	10 ² CFU/100mL 以上のレジオネラ属菌が検出された場合には、直ちに菌数を減少させるため、清掃、消毒等の対策を講じる。また、対策実施後は菌数が検出限界以下(10 CFU/100mL 未満)であることを確認する。
2) 浴槽水、シャワー水等、人が直接エアロゾルを吸引する恐れのあるもの	レジオネラ属菌の目標値を 10 CFU/100mL 未満とする。レジオネラ属菌が検出された場合には、直ちに清掃、消毒等の対策を講じる。また、対策実施後は菌数が検出限界以下(10 CFU/100mL 未満)であることを確認する。

詳細については、「新版レジオネラ症防止指針」P26～28 参照。

4.3 諸外国のガイドライン

諸外国のガイドラインにおける、各種環境水に対するレジオネラ属菌の監視(菌数測定)と監視結果に基づく対応に関する記述を抜粋して以下に紹介する。

4.3.1 HSC (Health & Safety Commission : イギリス)

APPROVED CODE OF PRACTICE & GUIDANCE 2000

The control of legionella bacteria in water systems

(1)冷却水系のモニタリング

レジオネラ属菌の検査は、最低年に 4 回行う。

より高頻度で行うこともあり、処理方法の確立・保証を行うときは、毎月行う。

レジオネラ属菌数の検査は、HPA の EQA に参加している機関に依頼する。

ディップスライド法による好気性細菌の検査を毎週行う。

検出した菌数と対応は、以下のとおり。

Table2. 冷却塔の微生物モニタリングに基づく行動段階

好気性細菌数（30℃、48 時間）（CFU/mL）	レジオネラ属菌数（CFU/L）	必要な行動
10,000 以下	100 以下	コントロールされている
10,000～100,000 以下	100～1,000 以下	運転計画の見直し 改善策を確立するために、処理法の見直し、と危険性評価を行う。また、再検査により菌数を確認する。
100,000 を超える	1,000 を超える	矯正作業の実施 早急な再検査。予防処置として適切なバイオサイドの衝撃添加。矯正活動を確立するために危険性評価と処理法を見直す。

(2) 給水・給湯系のモニタリング

レジオネラ属菌の検査は、湯の温度が規定値以下の場合は、毎月検査する。

処理法の有効性を確立中の場合や、見直しを行うときは毎週検査する。

集団発生が起きたときは検査する。

レジオネラ属菌数の検査は、HPA の EQA に参加している機関に依頼する。

Table4. 給水・給湯水のレジオネラ属菌モニタリングに基づく行動段階

レジオネラ属菌（CFU/L）	必要な行動
100～1,000 以下	(a)または(b)を行う (a)1 または 2 個の試料が陽性の場合、再検査を行う。同様の菌数が出た場合、改善策を確立するために、処理法の見直し、と危険性評価を行う。 (b)大部分の試料が陽性の場合、たとえ低い菌数レベルでも、システムにはレジオネラの巣が出来ている。システムの消毒を考える、とともに、その他の必要な改善策を確立するために、早急に処理法の見直し、と危険性評価を行う。
1,000 を超える	早急な再検査を行い、矯正活動を確立するために危険性評価と処理法（可能な殺菌処理法を含む）を見直す。

4.3.2 CIBSE (The Chartered Institution of Building Services Engineers : イギリス)

CIBSE TM13:2000 Minimizing the risk of Legionnaires' disease

4. 5. 2 レジオネラ属菌の監視 (Monitoring for *Legionella*)

レジオネラ属菌の検査を定期的に行う、レジオネラ症の発生源の特定など特に緊急の必要が無い場合は、少なくとも 4 回／年の検査を行う。処理法の確立や性能保証の場合は、毎月行うべきである。定期検査でレジオネラ属菌が検出された場合は、制御さ

れた状態を確立するまでの間、より頻繁に検査を行う。

検査は、HPA のレジオネラ検査精度プログラム (EQA) に参加しているラボで行う。
冷却水の検査結果と、要求される行動は以下のとおり。

レジオネラ属菌数 (CFU/L)	要求される行動
100～1,000 以下	(a)または(b)を行う (a)1 または 2 個の試料が陽性の場合、再検査を行う。同様の菌数が出た場合、改善策を確立するために、処理法の見直し、と危険性評価を行う。 (b)大部分の試料が陽性の場合、たとえ低い菌数レベルでも、システムにはレジオネラの巣が出来ている。システムの消毒を考える、とともに、その他の必要な改善策を確立するために、早急に処理法の見直し、と危険性評価を行う。
1,000 を超える	再検査を行い、早急に矯正活動を確立するための危険性評価と処理法（可能な殺菌処理法を含む）の見直しを行う。

4.3.3 EWGLI(European Working Group for Legionella Infections : ヨーロッパ) European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease

(1) 給水・給湯系のレジオネラ属菌の監視

- 温度が低く、バイサイドを使用している場合、最初の 12 ヶ月は毎月検査する、良い結果が得られたら、年間 4 回にする。
- 処理方式の制御レベル(温度やバイオサイド添加量)が確立していない、システムや処理方式の全体的見直しの時は、頻繁に検査する、例えばシステムが制御された状態になるまでは毎週検査する。
- 集団発生が疑われたとき又は確認されたとき。

Table2. 給水・給湯水のレジオネラ属菌検査に基づく行動段階

レジオネラ属菌数 (CFU/L)	要求される行動
1000～10,000 以下	以下のいずれかを行う (i) 1 または 2 個の試料が陽性の場合、再検査を行う。同様の菌数が出た場合、改善策を確立するために、処理法の見直し、と危険性評価を行う。 (ii) 大部分の試料が陽性の場合、たとえ低い菌数レベルでも、システムにはレジオネラの巣が出来ている。システムの消毒を考える、とともに、その他の必要な改善策を確立するために、早急に処理法の見直し、と危険性評価を行う。
10,000 を超える	再検査を行い、早急に矯正活動を確立するための危険性評価と処理法（可能な殺菌処理法を含む）の見直しを行う。