

向をより明らかにする必要があると考えられる。

#### E. 結論

日本各地の土壌から分離された *Legionella pneumophila* 48 株について *flaA* 遺伝子の塩基配列の差異に基づく型別を行なった。昨年調べた土壌分離株 33 株の結果に加え、以前調べた給湯・浴槽水分離株、冷却塔水分離株および臨床分離株 *flaA* 遺伝子型別の結果と比較した。土壌株は給湯・浴槽水分離株と共通の *flaA* 型も見られるものの *flaA5* など独自の *flaA* 型も見られることが明らかとなった。

#### F. 参考文献

- 1) 倉 文明、前川純子、遠藤卓郎、常彬、鈴木敦子、市瀬正之. 2007. 浴槽水と冷却塔水に棲息する *Legionella pneumophila* の鞭毛遺伝子型に見られる違いについて. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業 「温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究」平成 18 年度 総括・分担研究報告書 pp37-43.
- 2) 倉 文明、前川純子、遠藤卓郎、常彬、鈴木敦子、市瀬正之、古畑勝則. 2008. : 土壌および給湯水から分離された *Legionella pneumophila* の鞭毛遺伝子型別について -浴槽水、冷却塔水および臨床分離株との比較- 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業 「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」平成 19 年度 総括・分担研究報告書 pp111-115.
- 3) 古畑勝則、岡部弥穂、堂ヶ崎知格、原 元宣、福山正文. 2002. 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴 30:555-561.
- 4) 国立感染症研究所、地方衛生研究所 全国協議会編、病原体検出マニュアル、レジオネラ症 平成 15 年 8 月 29 日改訂版 (<http://www.nih.go.jp/niid/reference/index.html>)
- 5) 倉 文明、前川純子 : *Legionella pneumophila* 臨床分離株の遺伝子型の解析. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業 「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」平成 19 年度 総括・分担研究報告書 pp111-115.

#### G. 研究発表

Amemura-Mackawa J, Kura F, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Endo T, Watanabe H. *flaA* genotypes of *Legionella pneumophila* isolates from bath water and cooling tower water show distinct distributions. Microbiol Immunol 52:460-464 (2008)

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

表1 土壌、浴槽・給湯水および冷却塔水分離株の血清群別にみた *flaA* 遺伝子型別結果

<i>flaA</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	15	16	17	18	21	23	27	計	%
臨床分離株SG1	8	21	4	5		17	1	3	5		4	1							69	80.2
土壌株SG1		13			10	3					8								24	34.8
冷却塔水SG1	64				2	2	1			15			1		1				86	66.7
浴槽・給湯水SG1	5	7	4	2		19	13		2		2								54	30.3
臨床分離株SG2		1	1																2	2.3
臨床分離株SG3		3				1	1												5	5.8
土壌株SG3		6	1								2								9	6.2
冷却塔水SG3							1			1				1					3	2.3
浴槽・給湯水SG3		3	3	1		2			4										13	7.3
臨床分離株SG4							1												1	1.2
浴槽・給湯水SG4						2			1										3	1.7
臨床分離株SG5			2				1		1								3		7	8.1
冷却塔水SG5								2											2	1.6
浴槽・給湯水SG5		7	4			9	9												29	16.3
臨床分離株SG6			1																1	1.2
土壌株SG6						3					3							1	5	11.1
冷却塔水SG6			2																2	1.6
浴槽・給湯水SG6		2	19			7	4				1								33	18.5
冷却塔水SG7	28													1					29	22.5
浴槽・給湯水SG7	1																		1	0.6
土壌株SG8		2			14														16	19.2
冷却塔水SG8	1																		1	0.8
浴槽・給湯水SG8		2																	2	1.1
臨床分離株SG9		1																	1	1.2
土壌株SG9				1		2													3	3.7
浴槽・給湯水SG9									3										3	1.8
土壌株SG10		2																	2	2.3
冷却塔水SG10						1													1	0.8
浴槽・給湯水SG10						2													2	1.1
土壌株SG11																			1	1.2
浴槽・給湯水SG11										1									1	0.6
浴槽・給湯水SG12						1													1	0.6
冷却塔水SG13													1						1	0.8
浴槽・給湯水SG14						1													1	0.6
浴槽・給湯水SG15									1										1	0.6
土壌株UT						1	1						3						5	6.2
冷却塔水UT										4									4	3.1
浴槽・給湯水UT		2	7			17	5		1					2					34	19.1
臨床分離株計	8	26	8	5		18	4	3	6		4	1						3	86	100.0
土壌株計		23	1	1	23	9	1				15		3				2	2	81	100.0
冷却塔水計	93		2		2	3	2	2		20			3	1	1				129	100.0
浴槽・給湯水計	6	23	37	3		60	31		12		4			2					178	100.0
臨床分離株 (%)	9.3	30.2	9.3	5.8		20.9	4.7	3.5	7.0		4.7	1.2						3.3	100.0	
土壌株 (%)		28.4	1.2	1.2	29.6	11.1	1.2				18.5		3.7				1.2	2.7	100.0	
冷却塔水 (%)	72.1		1.6		1.6	2.3	1.6	1.6		15.5			2.3	0.8	0.8				100.0	
浴槽・給湯水 (%)	3.4	12.9	20.8	1.7		33.7	17.4		6.7		2.2			1.1					100.0	
<i>flaA</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	15	16	17	18	21	23	27		

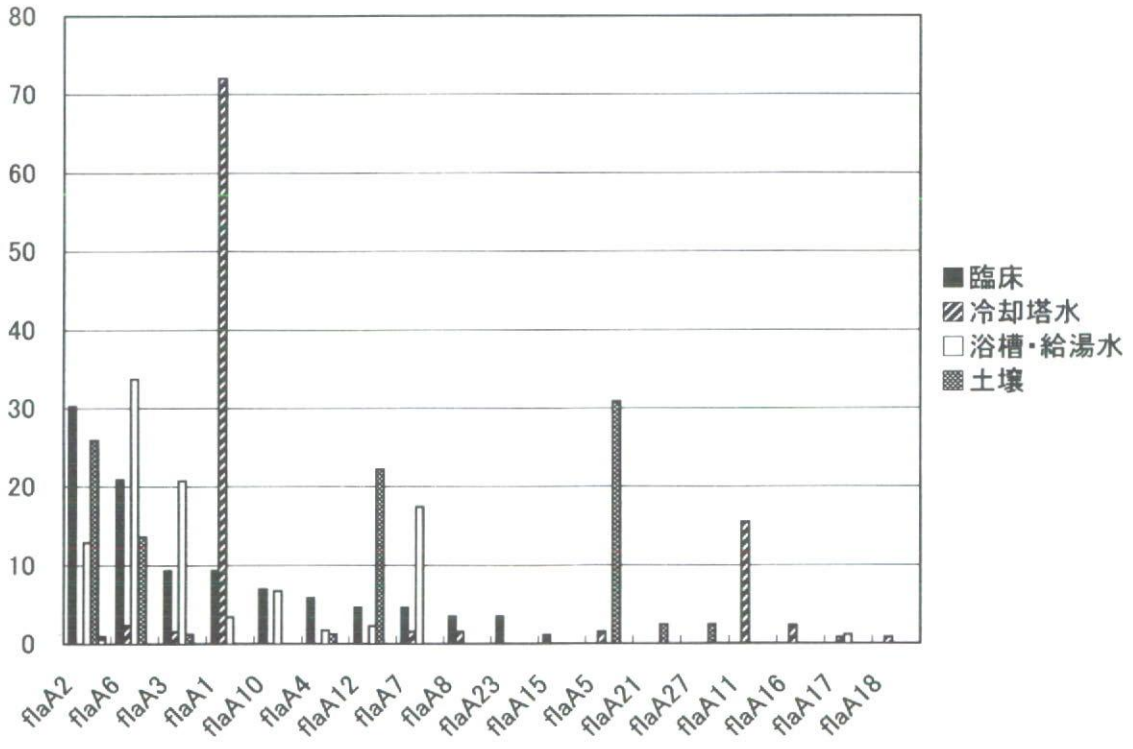
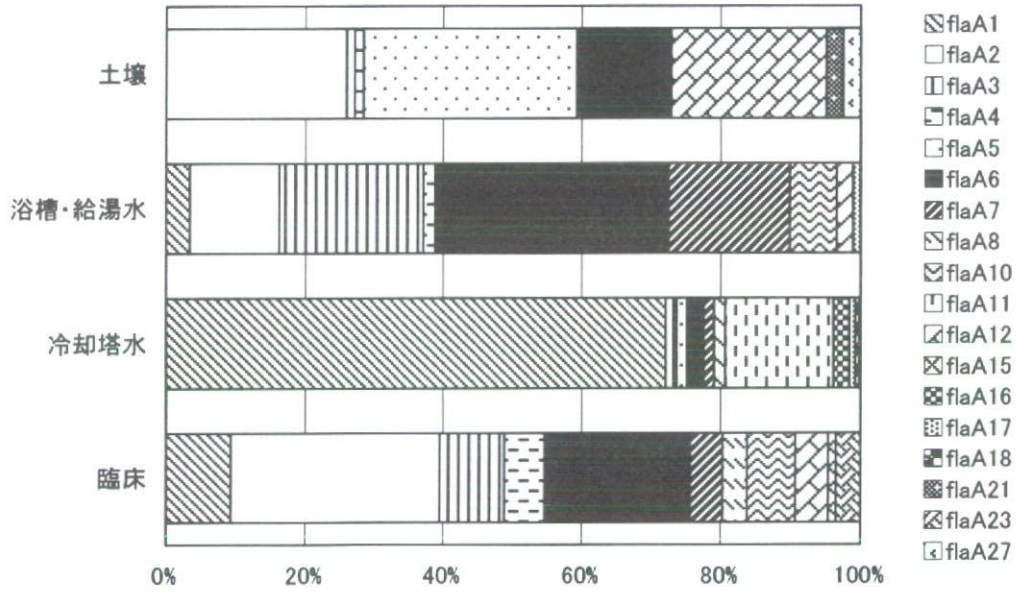


図1 それぞれの由来からの分離株における各 *flaA* 遺伝子型の占める割合。  
 (上) 分離株の由来別に各 *flaA* 遺伝子型の占める割合を示した。  
 (下) 各 *flaA* 型についてそれぞれの由来株における頻度を示した。

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）  
分担研究報告書

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

レジオネラ属菌迅速測定法の有用性の検討

研究分担者：横浜市衛生研究所 荒井桂子

研究協力者：横浜市衛生研究所 吉川循江、田中礼子、堀切佳代、北爪稔、山口正

（研究要旨）

近年、レジオネラ症患者数が全国的な増加傾向にあり、死者も散見される。レジオネラ症を防止するには、浴槽水等のレジオネラ属菌数を迅速に把握し、その結果に基づいて菌数の抑制・制御を行う必要がある。そこで、平成 19 年度の当研究においては、DNA 遺伝子増幅を利用した迅速法 2 法（LAMP 法及び定量リアルタイム PCR 法）の有用性を検討した。しかし、迅速法では生菌数が不明であり、生菌が確保できないなどの問題が生じた。今年度はこの迅速法 2 法を従来の培養法に組み込んだ新たな手法（培養迅速法）を用いて結果判明までの時間短縮を試みた。

その結果、培養迅速法では、培養法に比較して、「レジオネラ属菌の生菌の存在を確認」に 4～7 日、「生菌数、レジオネラ属菌及び *Legionella pneumophila* の確定」に 2～5 日、「*Legionella pneumophila* 以外の菌種及び *Legionella pneumophila* の血清群の確定」に 1～3 日の短縮が可能であった。また、迅速法では不可能であった生菌数の確定や生菌の確保が可能となり、非常に有用と思われた。

A 研究目的

レジオネラ症患者の増加は全国的な問題であり、そのほとんどが重篤な症状をきたすレジオネラ肺炎である。レジオネラ症患者の感染原因として推定されているのが浴場施設である。浴場施設の多くは循環式浴槽を用いており、レジオネラ症防止には浴槽水に増殖するレジオネラ属菌の管理が重要になっている。浴場施設の現状把握や維持管理の確認に、浴槽水中のレジオネラ属菌数を把握する必要がある。しかし、その検査は培養法で行われ、結果判明までに 7～10 日を要するため、リアルタイムに状況を把握することが困難になっている。そこで、著者らはこの結果判明まで

の時間を少しでも短縮し、施設の維持管理の改善に寄与する可能性を求めて、遺伝子増幅を利用した迅速法 2 法（LAMP 法及びリアルタイム PCR 法）の有用性を検討した。その結果、迅速法 2 法は採水後 1～2 日で、試料中のレジオネラ属菌の遺伝子の存在及びその量が判明し、維持管理に非常に有効利用できることが判明した。しかし、迅速法では試料水中のレジオネラ属菌生菌数は把握できず、殺菌による死菌と生菌の判別が付かない問題が生じた。また、レジオネラ症患者の感染原因を特定するために、患者分離菌株と環境分離株との遺伝子解析を行う必要が生じるが、迅速法ではレジオネラ属菌の生菌を得ることができない。

そこで、培養法に迅速法を組み込んだ培養迅速法を行い、レジオネラ属菌の生菌数、生菌分離及び菌種・血清群確定までの時間短縮の検討を行った。

## B 培養法に組み込んだ迅速法

### 1. LAMP法（栄研化学社）

LAMPとはLoop-Mediated Isothermal Amplificationの略であり、栄研化学が開発した遺伝子増幅法。標的遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させることを特徴とする。サンプルとなる遺伝子、プライマー、鎖置換型DNA polymerase、基質等を混合し、一定温度（65℃付近）で保温することによって反応が進み、検出までの工程を1ステップで行うことができる。DNAを15分～1時間で $10^9$ ～ $10^{10}$ 倍に増幅することができ、高い特異性から標的遺伝子配列のみを増幅し、反応時に副産物として生成するピロリン酸マグネシウムの白濁を検出する。

レジオネラ属菌の検出には、レジオネラ属菌の保持する16S rRNAをコードする遺伝子領域内にLAMP法用のプライマーを設計し開発した専用の試薬キットを使用する必要がある。

使用試薬：Loopamp レジオネラ検出試薬キットE

使用機器：Loopamp リアルタイム濁度測定装置

### 2. リアルタイムPCR法（タカラバイオ社）

従来のPCR法は、サーマルサイクラーという機器でPCRを行い、目的DNAを増幅した後、増幅産物を電気泳動で解析するという手順で行うが、リアルタイムPCR法では、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した機器を用いて、PCRでの増幅産物の生成過程をリアルタイムで検出し、解析する手法である。増幅産物の生成の過程を連続して行うことができるため、より正確な定量が可能となり、

電気泳動を行う必要がないため、解析時間の大幅な短縮が可能となる。

リアルタイムPCRは高価な装置や高額な試薬が多種あるが、使用機器が比較的安価で、レジオネラ属菌専用の試薬キットがあるタカラバイオ社を採用した。

使用試薬：CycleavePCR<sup>®</sup> *Legionella* Detection Kit

使用機器：リアルタイムPCR装置(Smart Cycler<sup>®</sup> II)

試薬キットは、レジオネラ属菌を網羅的に検出する5S rRNA遺伝子、及び*Legionella pneumophila*のmip (macrophage infectivity potentiator protein) 遺伝子特定配列をリアルタイム核酸増幅装置を用いて検出するリアルタイムPCR用キットで、検出には特異性の高いサイクリングプローブ法を採用している。本キットにはmip遺伝子検出用FAM標識プローブ、5S rRNA遺伝子検出用ROX標識プローブ、インターナルコントロールとインターナルコントロール検出用TET標識プローブを含んでいる。Smart Cycler<sup>®</sup>で三波長同時にモニタリングすることで、1本のチューブでmip遺伝子と5S rRNA遺伝子の検出が可能であり、インターナルコントロールによる偽陰性の判別も可能。電気泳動が不要なため、迅速に結果が得られる。

以下、本報告における「リアルタイムPCR法」はタカラバイオ社の試薬及び機器を用いた方法をさす。

## C 培養迅速法による検査効率向上の検討

### 1. 培養法及び培養迅速法の検査手順

#### (1) 培養法

培養法は表1及び図1に示した方法で行った。

#### (2) 培養迅速法

培養迅速法は表2及び図1に示した方法で行った。

表1 培養法の検査手順

操作名	操作内容
濃縮	試料 500mL をポアサイズ 0.22 $\mu$ m のメンブランでろ過し、このフィルターを滅菌水 5mL が入った 100mL 三角フラスコに入れ、1 分間ボルテックスで振盪する。
雑菌処理	濃縮試料を 50℃20 分間加熱処理する。
培養	GVPC 培地に濃縮試料 0.01、0.1、0.1mL ずつ塗抹し、37℃で 5 日間培養する。
純培養	培養中にレジオネラ属菌様コロニーを確認したら、釣菌して BCYE $\alpha$ 寒天培地に移植して純培養する。
菌数の計数	培養 5 日後に培地上の青みを帯びた灰白色の湿潤コロニー（レジオネラ属菌様コロニー）を計数する。
レジオネラ属菌の確認	純培養して得られた菌株を使用してグラム染色を行い、グラム陰性桿菌を確認する。同じ菌株を BCYE $\alpha$ 寒天培地及び L-システイン不含の BCYE 寒天培地に移植して 37℃で培養する。BCYE 寒天培地にのみ発育した L-システイン要求菌をレジオネラ属菌とする。
菌の同定	免疫血清によるスライド凝集試験、DNA-DNA ハイブリダイゼーション等によって菌種等を同定する。

表2 培養迅速法の検査手順

操作名	操作内容
濃縮	試料 500mL をポアサイズ 0.22 $\mu$ m のメンブランでろ過し、このフィルターを滅菌水 5mL が入った 100mL 三角フラスコに入れ、1 分間ボルテックスで振盪する。
雑菌処理	濃縮試料を 50℃20 分間加熱処理する。
培養	GVPC 培地に 0.01、0.1、0.1mL ずつ塗抹し、37℃で 5 日間培養する。
純培養	培養中にレジオネラ属菌様コロニーを確認したら、釣菌して BCYE $\alpha$ 寒天培地に移植して純培養する。
レジオネラ属菌の確認	純培養を行うときに、同時にそのコロニーを用いて遺伝子抽出を行い、LAMP 法及びリアルタイム PCR 法を用いてレジオネラ属菌及び <i>Legionella pneumophila</i> を確定する。
菌数の計数	培養 5 日後に培地上の青みを帯びた灰白色の湿潤コロニー（レジオネラ属菌様コロニー）を計数する。
菌の同定	純培養して得られた菌株を使用して、免疫血清によるスライド凝集試験、DNA-DNA ハイブリダイゼーション等によって <i>Legionella pneumophila</i> の血清群や <i>Legionella pneumophila</i> 以外の菌種等を同定する。

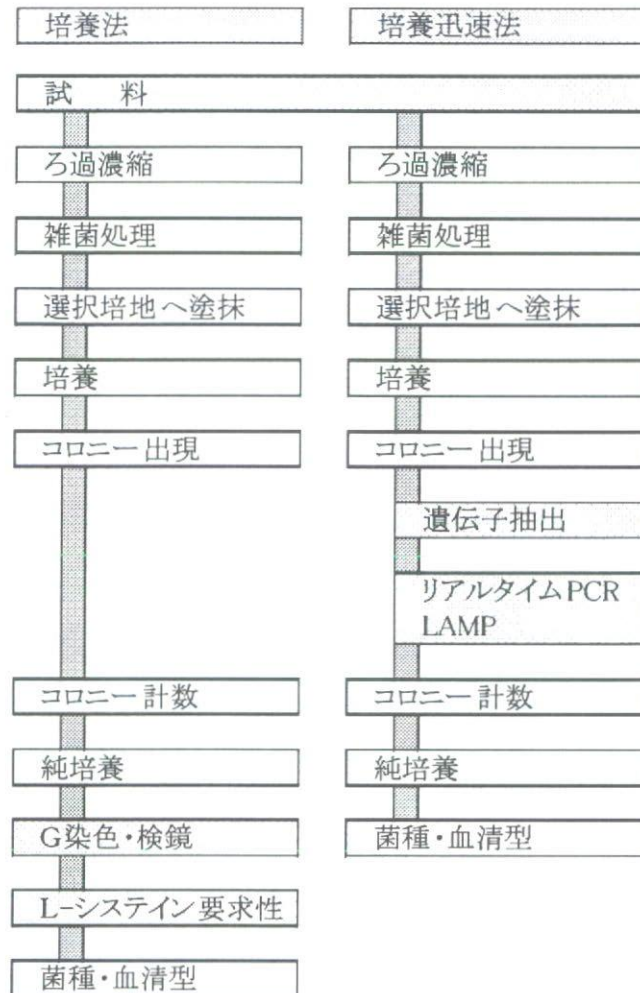


図1 培養法及び培養迅速法の検査手順

## 2. 培養迅速方法の遺伝子検出法

### (1) DNA 抽出（中性域での酵素溶菌法）

純培養のために GVPC 培地上に出現したレジオネラ様コロニーを釣菌し、BCYE $\alpha$  に画線した白金耳を、100 $\mu$ L の滅菌水中でボルテックスし、これを DNA 抽出の試料とした。この試料を Lysozyme 及び Proteinase K 処理後、GL カラムで DNA 抽出を行った。

### (2) LAMP 法

サンプル溶液、陽性コントロール、陰性コントロール各 5 $\mu$ L に試薬を 20 $\mu$ L 添加し、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で測定を行った。

### (3) リアルタイムPCR法

サンプル溶液、陽性コントロール、陰性コントロールに試薬を添加し、Smart Cycler<sup>®</sup> II

で測定を行った。

## 3. 試料

浴槽水（水道水・白湯）をポアサイズ 0.22 $\mu$ m のメンブランでろ過した水 500mL に、浴槽水から分離した従属栄養細菌（R2A 培地 20 $^{\circ}$ C 7 日間培養）を 10,000cfu/mL になるように添加した「高濃度群」と添加しない「無添加群」を作製した。この 2 群に浴槽水から分離したレジオネラ属菌 5 種 (*Legionella pneumophila* SG I、SG III、SG V、*Legionella gormanii*、*Legionella micdadei*) をそれぞれ 100cfu/100mL になるように接種し、試料 A~E とした。また、レジオネラ属菌 5 種（各 100cfu/100mL）をすべて接種した試料を F とした（表 3）。レジオネラ属菌及び従属栄養細

菌を接種していない試料を BL-A、従属栄養細菌のみを 10,000cfu/mL になるように添加した試料を BL-B とした。

表3 作成した試料と添加菌

	レジオネラ属菌	従属栄養細菌
無添加群	A <i>L. pneumophila</i> SG I	0 cfu/mL
	B <i>L. pneumophila</i> SG III	0 cfu/mL
	C <i>L. pneumophila</i> SG V	0 cfu/mL
	D <i>L. gormanii</i>	0 cfu/mL
	E <i>L. micdadei</i>	0 cfu/mL
	F 上記の5種すべて	0 cfu/mL
高濃度群	A <i>L. pneumophila</i> SG I	10,000 cfu/mL
	B <i>L. pneumophila</i> SG III	10,000 cfu/mL
	C <i>L. pneumophila</i> SG V	10,000 cfu/mL
	D <i>L. gormanii</i>	10,000 cfu/mL
	E <i>L. micdadei</i>	10,000 cfu/mL
	F 上記の5種すべて	10,000 cfu/mL
BL-A	無添加	0 cfu/mL
BL-B	無添加	10,000 cfu/mL

#### 4. 実験方法

C-3に示した試料を用いて、C-1の手法を用いて実験を行い、「レジオネラ属菌の生菌の存在を確認」、「生菌数の確定」、「レジオネラ属菌の菌種及び血清群の確定」の結果判明に要する日数を計測した。各試料は5回実験を行い、平均値をとった。

#### 5. 結果

結果を表4に示した。なお、BL-Bの試料で選択培地上に生育したコロニーに対して迅速法を行った結果、すべて陰性を示した。

##### (1) レジオネラ属菌の生菌の存在を確認

要する日数は、培養法で7~10日であったのに対し、迅速培養法は3~5日であった。短縮された日数は4~7日であった。培養法は選択培地に増殖したコロニーを純培養してレジオネラ様コロニーを単離させねばならず、このプロセスに時間がかかった。特に高濃度群では加熱処理を行っても、従属栄養細菌がすべて殺滅できず、コロニーの単離に時間がかかった。一方、迅速培養法では、選択培地上

にレジオネラ様コロニーの出現が確認できた時点で、迅速法によってレジオネラ属菌の確認が可能であった。この時、レジオネラ様コロニーにレジオネラ属菌以外の菌や培地成分が混入しても、LAMP法及び定量リアルタイムPCR法に障害はかからなかった。

##### (2) 生菌数の確定

要する日数は、培養法で7~10日であったのに対し、迅速培養法は5日であった。短縮された日数は2~5日であった。C-5-(1)と同様に、培養法は純培養によるレジオネラ様コロニーの単離に時間がかかった。一方、迅速培養法は選択培地の培養時間に縛られ、5日より短縮することはできなかった。しかし、迅速培養法では純培養、グラム染色及びL-システイン要求性の確認のプロセスが不要であった。

##### (3) レジオネラ属菌の菌種及び血清群の確定

要する日数は、培養法で8~10日であったのに対し、迅速培養法は7日であった。短縮された日数は1~3日であった。*Legionella*



*pneumophila* 以外の菌種や *Legionella pneumophila* の血清群を確定するには、純培養した生菌が必要となり、培養法と迅速培養法はほぼ同じ日数を要した。しかし、迅速培

養法ではレジオネラ属菌及び *Legionella pneumophila* であるか否かは迅速法により判明しているため、培養法より判明日数が短縮された。

表 4 迅速培養法及び培養法による結果判明に要する日数

		レジオネラ属菌の生菌の存在を確認		生菌数の確定		レジオネラ属菌の菌種及び血清群の確定	
		迅速培養法	培養法	迅速培養法	培養法	迅速培養法	培養法
無添加群	A	3	7	5	7	7	8
	B	3	7	5	7	7	8
	C	3	7	5	7	7	8
	D	3	7	5	8	7	8
	E	3	7	5	7	7	8
	F	3	7	5	8	7	8
高濃度群	A	3	8	5	9	7	9
	B	3	8	5	10	7	9
	C	3	9	5	10	7	9
	D	4	9	5	9	7	10
	E	5	9	5	10	7	10
	F	3	10	5	10	7	10
<b>短縮された日数</b>		4~7		2~5		1~3	

## 6. 考察

「レジオネラ属菌の生菌の存在を確認」に要する日数は、迅速培養法では培養法より 4~7 日短縮が可能であった。これは純培養によるコロニーの単離が必要となるか否かであり、浴槽水等の実試料は「高濃度群」に近い性質を持っている。加熱処理等の前処理を行っても、選択培地上には他の細菌や真菌が混生してくる。他の菌の濃度が高ければ高いほど、純培養に時間がかかり、レジオネラ様コロニーがレジオネラ属菌であるか否かの判定に時間がかかってしまう。今回の実験では培養法による最長時間が 10 日であったが、実試料では 14 日を要したケースもあった。それに比べて迅速培養法は選択培地上にレジオネラ様コロニーが確認された時点で、迅速法を用いてそのコロニーがレジオネラ属菌か否かを判別できるため（今回用いたタカラバイオ社の試薬ではレジオネラ属菌と同時に *Legionella pneumophila* も判別が可能）、7 日

間もの時間短縮ができた。より早く、より正確にレジオネラ属菌の検出が可能になることは、レジオネラ症防止の観点から、非常に望ましいことと考える。特に、浴槽水等のレジオネラ属菌が「検出してはならない」とされる試料に対しては、「レジオネラ属菌の生菌の存在を確認」した時点で清掃・殺菌等の管理指導を行う等の迅速な対応が可能になると考えられた。

迅速培養法は「生菌数の確定」が可能であることが、迅速法との最大の相違である。現在の水質基準はすべて培養法の菌数で定められている。そのため、迅速法がいかにも速報性にすぐれていても、参考値の扱いにしかならない。迅速法による検査の結果、レジオネラ属菌の遺伝子が大量に検出されれば、維持管理に問題があることが判明するが、法的な裏付けのない速報値では、有効利用はされにくい。しかし、迅速培養法を用いれば、まず、「レジオネラ属菌の生菌の存在を確認」した

時点で清掃・殺菌等の管理指導を行うことが可能なうえ、検査開始 5 日後には生菌数が確定できる。このため、指導現場の保健所や施設の管理者への報告を「生菌の有無」と「菌数」の 2 段階に行えば、培養法に比較して速報性に富み、法的な根拠も得られる。

「レジオネラ属菌の菌種及び血清群の確定」には生菌が必要となるため、結果判明までの日数は培養法と迅速培養法でほぼ同じ日数を要した。しかし、速報性が求められるのは、第一に生きたレジオネラ属菌が存在するかであり、第二にその菌数である。菌種や血清群はレジオネラ症患者から菌が分離された後に重要視されてくるので、その判明までの日数には猶予があると思われる。

迅速培養法は「レジオネラ属菌の生菌の存在を確認」、「生菌数の確定」、「レジオネラ属

菌の菌種及び血清群の確定」の判明に時間差が生じる。この時間差を有効に利用するには、検査機関と指導現場の保健所や施設の管理者の密接な連絡体制が重要になってくる。特に、同一保健所管轄内で同時に複数の施設に対してレジオネラ属菌検査を行う場合、情報の整理を厳密にする必要が生じるとされる。

#### D 結論

迅速法は結果判明までの時間が 1～2 日と非常に早いですが、生菌を選別できない点が指摘されてきた。今回、その迅速法を培養法のプロセスを短縮する手法として取り入れた結果、非常に良好な結果を得た。迅速培養法は迅速法と培養法の利点を活かし、問題点をカバーした有用な検査方法であると考えられる。

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)  
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

平成 20 年度分担研究報告

検査法の検討 2 効率の良いコロニー観察法の普及

研究分担者	森本 洋	北海道立衛生研究所
研究協力者	岩淵 香織	岩手県環境保健センター
	佐々木美江	宮城県保健環境センター
	瀬戸 順次	山形県衛生研究所
	星 俊信	仙台市衛生研究所
	柳沼 幸	福島県衛生研究所
	山本 一成	新潟市衛生環境研究所
	和栗 敦	青森県環境保健センター
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	宮坂 次郎	熊本県食肉衛生検査所

研究要旨

昨年度報告書において、培養法の効率化を図るために、レジオネラ属菌のコロニー観察法を提案した<sup>1)</sup>。この方法は、分離培地上の出現コロニーに斜光をあて、実体顕微鏡で観察する手法を用い、特徴的な形態(外観構造)を示すレジオネラ属菌を確認する方法である。これにより他の細菌との見極めが簡易になり、培地上の正確なレジオネラコロニーのカウント、場合によっては、複数種類のレジオネラの釣菌を効率的に行える可能性が示唆された。本年度は、このコロニー観察法を普及する一環として、10カ所の地方衛生研究所等の協力のもと、研修会及び各地研で実際の検体について本観察法を組み込んだ検査の結果をもとに、その長所、短所、改良点、活用方法の検討を行った。その結果、各協力機関においても、本観察法が有効に活用できる検査法であることが認識され、実際の浴槽水やヒト臨床検体でもその効果が確認された事例報告がなされた。

A. 研究目的

昨年度、本研究事業報告書において、新たなレジオネラ属菌コロニー観察法を提案した。報告概要を以下に示す。多くのレジオネラ属菌検査マニュアル<sup>2)6)</sup>には、コロニーの特徴として“大小不同、灰白色湿潤コロニー

で特有の淡い酸臭がある”(以下、従来法)と記載されている場合が多い。しかしながら、実際の検査においては、他の細菌との区別が困難な場合が少なくない。そこで、より正確で簡便な方法を提案した。分離培地上の出現コロニーに斜光をあて、実体顕微鏡で

観察すると、レジオネラ属菌は特徴的な形態(外観構造)を示す。この方法を用いると、他の雑菌等が多数認められた分離平板上からでも、レジオネラ属菌の存否を高い確率で確認することができ、さらに釣菌も効率良く行うことができた。現在報告されているすべてのレジオネラ属菌を確認していないこと、また環境試料中には様々な細菌が存在しており、本特徴に類似の形態を示すコロニーが発育することもある。しかし、今回の検査結果では、環境試料から12種類の *L. pneumophila* 血清群およびその他15種類以上のレジオネラ属菌が効率良く検出され、さらにレジオネラ肺炎の患者から最も高率に検出されている *L. pneumophila* 血清群1において、この形態的特徴が観察されたことから、通常の検査業務に十分対応できる方法であり、感染源や汚染源を調査する際の有効な検査法の一つであると報告した。

本年度は、このコロニー観察法(以下、斜光法)普及の一環として、地方衛生研究所全国協議会 北海道・東北・新潟支部を中心とした10ヵ所の地方衛生研究所等の協力のもと、斜光法研修会を開催した。この研修会報告、さらに、斜光法を実際の検体で実施した研究協力機関からの結果報告をもとに、斜光法の長所、短所やその改良点および今後の活用方法等の検討を行うこととした。

## B. 研究方法

### 1) 斜光法研修会

#### 1. 研究協力者の招集

地方衛生研究所全国協議会 北海道・東北・新潟支部レジオネラレファレンスセンターである山形県衛生研究所から、支部内レジオネラ検査担当者へ、研修会及び研究協

力案内概要を通知してもらい、研究協力者を募った。さらに富山県、大分県、昨年度協力研究者である熊本県に協力要請を行い、計10ヵ所の地方衛生研究所等の参集のもと研修会を開催した。

#### 2. 研修会概要

開催日:平成20年9月4日~5日

場所:北海道立衛生研究所微生物部

内容:レジオネラ属菌の培養には、選択分離培地(生培地)としてWYO $\alpha$ 寒天培地(栄研化学)、MWY寒天培地(Oxoid)、GVPC寒天培地(Merck、Biomérieux、Oxoid、日研生物医学研究所、極東製薬工業)を使用した。また、非選択分離培地としてBCYE $\alpha$ (Oxoid:レジオネラCYE寒天基礎培地にサプリメントを指示通り溶解、添加し調製)を使用した。これらの培地で、実際の温泉水及び北海道内の浴槽水を由来とする9種類のレジオネラ属菌野生株(*L. pneumophila* SG 1、SG 5、SG 6、*L. maceachernii*、*L. feeleii*、*L. micdadei*、*L. rubrilucens*、*L. cherii*、*L. londiniensis*)を培養し、発育したコロニーを観察した。

観察は暗室で行い、コールドライト、実体顕微鏡を使用した。発育コロニーの形態的特徴により、レジオネラ属菌と雑菌との判別が可能か、種類の異なるレジオネラ属菌の判別が可能か、発育したレジオネラ属菌の正確なカウントを行う事が可能か等を検討した。さらに、分離培地上でのコロニー形態の経日的(1~7日間)変化も観察した。

#### 2) 実際の検査対応

実際の検査対応が可能であった研究協力機関には、レジオネラ属菌検査を行う際、各施設の標準作業書工程中に斜光法

を加えた検査も実施してもらい、実際の検査における有効性の検討を依頼した。

### C. 研究結果及び考察

研究協力機関から研修会参加報告及び実際の検査対応として、各施設に応じ、保存菌株、浴槽水等の環境試料、ヒト臨床検体について、斜光法を利用した結果報告(資料添付)がなされた。

概要を以下にまとめる。

1. レジオネラ属菌の発育コロニーは特徴的な形態(外観構造:モザイク様)を有し、他の発育菌との判別が容易であった。大分県の事例では、温泉水の検査において、斜光法でレジオネラ属菌と仮判定した87株のうち、その後の検査で非レジオネラと判定されたのは1株であり、斜光法によるレジオネラ判定率は99.3%であった。
2. 他の菌の発育の多少にかかわらず、釣菌対象となるコロニー(微少なレジオネラ属菌様コロニーであっても)が限定され、効率良くレジオネラ属菌を確認することができると思われた。
3. 菌数測定が正確に行うことができると思われた。
4. 発育早期から確認が可能となる(培養2日目からの確認が可能であった報告が複数有り)。これにより、定性的な判定日数を短縮できる可能性が示唆された。岩手県では、尿中抗原検査(Binax社)陰性であったが、強くレジオネラ症を疑う重症肺炎患者の喀痰から *L. pneumophila* SG2 を分離した事例で、その存在が培養2日目から確認された。また、分離培地にカビが発育した場合には、培養日数の経過とともにカビが旺盛に発育し、検査に大きく影響を与えることがあるが、

発育早期に確認可能な本法は、カビの影響を回避できる場合があり、この点からも、有用な方法であると報告された(富山県)。

5. 培養日数の経過により、コロニーの特徴が判別しづらくなる場合があることから、早い時期からの観察が良いと思われる。
6. 培養日数が経過しても、コロニーが大きくなりづらい場合に対応可能であった。
7. 一つの分離培地上に数種類のレジオネラ属菌が発育した場合、種類を特定することは難しいが、コロニーの発育時期、模様、色等、特徴の違いから、異なる種類を効率的に釣菌できる場合があった。
8. 従来法では、経験や個人の熟練度による差が大きかったが、斜光法ではこの点がかかり解消され、レジオネラ検査経験の浅い検査員でも、判定がしやすくなると思われる。
9. 一方で、斜光法においても、コロニーの特徴が不確かで、判定に苦慮する場合もあり、疑わしい場合は釣菌して確認する必要がある。
10. 鏡検と判定に慣れる必要がある。
11. 特に分離培地(メーカー、種類)の違いにより、特徴が異なる場合がみられたことから、自施設で使用する分離培地を用いて、十分に検討する必要がある。
12. たくさんの検体を処理する場合は、分離培地の観察枚数が多くなることから、適切に検査を行うための工夫が必要である。
13. 鏡検時に観察しやすい事からシャーレの蓋を開けるが、この時にコンタミネーションを起こすことがあるので、工夫が必要である。
14. 簡便な観察法ではあるが、単独での判断は、誤判定につながる可能性があるため、他の検査法(PCR法等)を組み合わせること

により、迅速な確定につながると思われる。

以上のことから、特に定性検査においては、これまでの培養法に斜光法を組み込むことで迅速化が可能となり、患者由来検体からの迅速診断に有用であると考えます。また、環境水等の検査では、定性的な考えと定量的な菌数測定の結果の位置付けを明確にすることにより、迅速、正確な行政対応へ結びつけることができると思われました。

斜光法には実体顕微鏡は必須であるが、光源について、固定式のクールライト以外での検討を行った結果、安価でスポットライトのように使用できるペン型の高光度LEDライト(口径7~10mm 白色)でも、簡易的に確認することができた。

明所、暗所の別によってコロニーの観察に支障がなかったとの報告もあった(新潟市)。今後、観察場所、明所、暗所、使用培地、実体顕微鏡、斜光ライトについて、自施設の状況を把握した上で斜光法を取り入れることにより、効率的に結果を得られると考える。

#### D. 結論

すでに斜光法を検査に取り入れ活用している熊本県からの報告を引用して結びとする。

斜光法によるレジオネラ属菌の観察は、使用する分離培地の種類により培養時間経過とともにその形態に若干の違いが見られる。そのため分離培地に観察者の目を慣らすことも重要である。特に常時、観察を継続できる検査機関を除き、年間数回程度の観察機会しかない場合は、メーカーや分離培地の種類は、2種類程度が形態観察の正確性を鍛錬するにはいいのではないかとと思われる。

当方では、ここ5~6年はOXOIDの基礎培地とサプリメントを使用し、MWY寒天培地及びBCYE $\alpha$ 寒天培地を基本に、臨床検体の場合は栄研化学のWYO $\alpha$ 寒天培地(生培地)を追加して分離を行ってきた。

斜光法の最大の利点は、従来法の肉眼での釣菌と比較して、はるかに短い培養時間(当方の例では浴槽検体で、培養後30~48時間で定性可能であった例が多数を占める)でコロニーPCRができることである。それは、従来法よりも早い時点で、判定しやすいコロニー形態を観察できることにより、検体中のレジオネラ属菌の存在を効率良く確認出来るからである。

短所としては、初期投資が必要なことが挙げられる。斜光法を実施するにあたり、実体顕微鏡と光源を用意しなければならない。しかし、この2つの器具は他の微生物を検査するに当たっても、相当な利用価値があり充分活用できると考える。実際、当方では、他の細菌検査でも分離培地からの釣菌は実体顕微鏡下で実施している。レジオネラ属菌の観察研修会で見たとおり、目的とするコロニーに非目的コロニーが付着または入り込んでいる例はたびたび観察される。多くの雑菌の中から弱小の目的の菌を見つける時や純培養を確認する時には、大変信用のおける器具である。また、様々な菌の各種分離培地上の菌を斜光法で観察すると実に特徴的な形態を発見できることもある。一例を示すと、当方では *Vibrio vulnificus* のクロモアガー・ビブリオ寒天培地上の釣菌では、斜光法による観察で類似するその他の菌との鑑別に大きな力となっている。

なお、北海道内ではレジオネラ属菌検査

機能を有する道立 10 ヶ所のセンター保健所、  
ならびに函館市衛生試験所、旭川市保健所  
等の行政機関において、すでに斜光法を正  
式に導入し、効果を上げていることを申し添  
える。

#### 謝辞

今回研究協力者招集にあたり、多大なるご  
協力を頂いた、地方衛生研究所全国協議  
会 北海道・東北・新潟支部レジオネラレフ  
レンスセンターである山形県衛生研究所の  
金子紀子先生に深謝いたします。

#### E. 参考文献

- 1) 森本 洋、宮坂次郎、中村昭子：検査法  
の検討1 効率の良いコロニー観察法、生培  
地の比較検討：厚生労働科学研究費補助  
金(地域健康危機管理研究事業)「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」平  
成 19 年度総括・分担研究報告書  
pp.123-137
- 2) 改訂・レジオネラ属菌防除指針－温泉  
利用入浴施設用－,(財)全国環境衛生営業

指導センター 全国旅館環境衛生同業組合  
連合会,東京,1999, pp.15-27

- 3) 厚生省生活衛生局企画課監修：新版  
レジオネラ症防止指針,財団法人ビル管理  
教育センター,東京,1999, pp.85-94
- 4) 社団法人日本水道協会編：上水試験方  
法 2001 年版,社団法人日本水道協会,東  
京,2001, pp.654-658
- 5) 社団法人日本水道協会編：上水試験方  
法解説編 2001 年版,社団法人日本水道協  
会,東京,2001, pp.886-888
- 6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2005,  
金原出版,東京,2005, pp.103-105

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## (資料1) 調査概要報告書

岩手県環境保健研究センター 岩渕香織

### はじめに

研修課題の「効率のよいコロニー観察法」は、発育した集落に暗室で直接斜光をあて実体顕微鏡で観察する検査法で「斜光法」という。レジオネラ属菌は特徴的なモザイク模様を示すので斜光法を用いることにより他の細菌と判別が容易であり、合理的な方法と考える。

特別な装置を使わず、発育集落を観察してレジオネラ属菌の確認をする方法であることから、北海道立衛生研究所の資料に基づく「斜光法」で検査を行った事例を報告する。

### 斜光法を用いて検査を行った事例について 事例1

尿中抗原検査(Binax 社)では陰性であったが、強くレジオネラ症を疑う重症肺炎患者の喀痰から *L. pneumophila* SG2 を分離した事例である。患者喀痰はスプタザイム処理後、熱・酸処理した試料(以下処理試料)と未処理試料を、BCYE- $\alpha$ 、GVPC、MWY 寒天培地の計 6 枚に各 100  $\mu$ l を塗抹し 37°C で培養した。培養 2 日目に処理試料及び未処理試料を塗抹した MWY 寒天培地上に実体顕微鏡の強拡大による斜光法で微小なモザイク模様のコロニーを確認した。2 日目のコロニーはあまりに微小であるため、釣菌は行わず、培養 3 日目にやや発育したそれらのコロニーを BCYE- $\alpha$  培地と血液寒天培地に画線培養し同定検査を行った。その結果、未処理試料塗抹の MWY 寒天培地上のコロ

ニーが *L. pneumophila* SG2 と同定された。

その後も 10 日目まで斜光法による観察を続けたが、検出されたのは未処理試料塗抹の MWY 寒天培地のみで、BCYE- $\alpha$ 、GVPC、及び処理試料を塗抹した MWY 寒天培地上に *L. pneumophila* SG2 は発育しなかった。また、*L. pneumophila* SG2 と同定したコロニーは培養4日目以降も目に見えるコロニーに発育しなかった。抗生物質(エリスロマイシン)治療中の喀痰採取だったので、*L. pneumophila* SG2 は損傷を受けていたのではないかと思われる。

目視では超微小なコロニーであったので「斜光法」で観察していなければ、レジオネラ属菌を検出できなかったのではないかと思われる。検出率の低い臨床検体からの分離にも「斜光法」は有用であると推察された。

### 事例2

さらにこの患者と関連する公衆浴場の調査では、18ヶ所中7ヶ所からレジオネラ属菌が検出された。1検体に9枚の分離培地を使用し計 162 枚についてレジオネラ属菌の確認を「斜光法」で行った。レジオネラ属菌の同定のため、コロニーの観察を通常の日視で行った場合、分離培地上からの灰白色湿潤集落の釣菌数はかなりの数となる。「斜光法」で観察して釣菌したコロニーは 48 菌株で、同定されたレジオネラ属菌は 31 菌株であった。

同一培地上に *L. pneumophila* の血清群の異なる 2 種類が発育したが、モザイク模様の色や特徴が異なっていたかの確認をしていなかった。今回の研修では、モザイク模様の色などの特徴により種類の異なるレジオネラ属菌の判別が可能であった。モザイク模様だけを確認するのではなく、今後モザイク模



様の特徴についても確認が必要と思われた。

### 事例3

喀痰から *L. pneumophila* SG1 が検出された事例である。1 晩で喀痰を 4 件採取したもので、事例 1 と同様の分離操作を行い、斜光法で確認を行った。4 件全ての喀痰から *L. pneumophila* SG1 が検出されたが、菌数は喀痰によってばらついていて、培地上で多いものでは 157CFU、少ないもので 1CFU 発育した。発育数の多い分離培地ではレジオネラ属菌に特徴的なモザイク模様を示したコロニーを計測した。菌種が複数ということも考えられるので、その後目視でコロニーの性状を見ながら釣菌し同定を行った。

BCYE- $\alpha$  寒天培地には発育が認められなかったが、GVPC 及び MWY 寒天培地上では未処理、処理によってコロニー数に大きなばらつきは見られなかった。しかし、事例1では *L. pneumophila* SG2 は未処理試料を塗抹した MWY 寒天培地からのみ検出され、他の処理方法や分離培地には発育しないことから、菌種や培養条件により発育状況に差が出ると推察される。

「斜光法」は菌数が多く発育した分離培地を観察する場合においても効率よくレジオネラ属菌を計測できる方法である。

### 斜光法のまとめ

「斜光法」は下記の事項により有効な検査法と思われた。

1. レジオネラ属菌の発育コロニーは特徴的なモザイク模様により他の菌と判別が容易であり、釣菌の対象とするコロニーを限定し効率よくレジオネラ属菌を確認する。  
ただし、不確かなコロニーもあるので、正確な菌数を測定し偽陰性を防ぐためには、①陽性対照で確認する②写真等の画像をみて確認する③型別不能なコロニーについては釣菌して同定することが必要である。
2. 発育早期から観察が可能である。
3. 弱っているレジオネラ属菌でも観察可能である。
4. 発育菌数が多くても効率よく同定作業ができる。
5. ひとつの分離培地に数種類のレジオネラ属菌が発育した場合、菌の種類を特定はできないがコロニーのモザイク模様の特徴や色、紫外線照射などにより、そのレジオネラ属菌の特徴を示す。

### 終わりに

レジオネラ属菌の確認は分離培地上に多数のコロニーが発育すれば同定が煩雑となる。「斜光法」により効果的に他の菌との判別の作業を行なうことができることから、レジオネラ属菌検査を行う検査施設への普及が望まれる。

## 1. はじめに

レジオネラの検査は、WYO $\alpha$ 培地等の選択培地上で灰白色の集落をレジオネラ疑いとして同定するようレジオネラ症防止指針に記されている。しかし、これらの選択培地に発育する雑菌は灰白色のものが多く、またレジオネラは菌種、選択培地の種類によって培地上の集落の色調が異なる。そのため、同定には多数の集落を釣菌して菌種を同定しなければならない。

レジオネラを効率的に分離できる手法の開発が望まれるなか、今回、北海道衛生研究所で斜光法の研修を受ける機会を得たので従来法と比較検討した。

## 2. 方法

平成20年10月に搬入された浴槽水42件を対象に検査を実施した。

搬入された検体は、冷却遠心法で濃縮後、酸処理した濃縮検体100 $\mu$ lをWYO $\alpha$ 培地(栄研)、MWY培地(自家製:OXOID)、GVPC培地(日研)にそれぞれ塗抹し、10日間培養した。各培地に発育した集落を、従来法では目視で、斜光法では透過光を2方向から照射し顕微鏡で観察した。レジオネラが疑われた集落は、釣菌し、血液寒天培地で発育の有無を確認後、PCRまたはレジオネララテックス(OXOID)で菌種を同定し、市販免疫血清で血清型を決定した。

## 3. 結果

従来法、斜光法のどちらの方法においても浴槽水42件のうち13件(31.0%)からレジオネラが検出され、*L. pneumophila*

SG1,5,6,7,12, *Legionella* sp.が分離された。

集落の算定も同様の結果であった。

## 3.2 斜光法の利点

### 3.2.1 検査時間の短縮

培養2日目にWYO $\alpha$ 培地で微小な集落が発育した。従来法では集落の形状を確認できなかったため、培養3日以降に検査を開始した。斜光法では、レジオネラ特有のモザイク状構造の集落が観察されたため、培養2日目から検査を進めることができた。斜光法は、従来法と比較して結果を早く得ることが可能であった。

### 3.2.2 効率的な分離

培養2日目からWYO $\alpha$ 培地、MWY培地、GVPC培地上で多くの雑菌が発育し、従来法ではこの平板からレジオネラを分離できなかった。斜光法では、この平板から培養5日目にモザイク状の集落を釣菌し、分離した菌は*L. pneumophila* SG6であった。斜光法は雑菌の多い培地上でもレジオネラの集落を効率的に分離することが可能であった。

一方、培養7日以降に発育したレジオネラ疑いの集落を、斜光法で観察し形状からレジオネラが否定された。生化学的性状を確認したところ、血液寒天培地に発育しレジオネラ以外の菌であった。

## 4. 考察

浴槽水などの環境水には様々な菌が存在している。レジオネラの検査では、これらの菌の発育を抑制するために酸処理や加熱処理などの検体処理を行い、抗生剤を数種類含有した選択培地を使用しているが、選択培地上に多数の雑菌が発育することは少なくない。従来法では、培養2日目まで発育した菌を雑菌として印をつけ、この雑菌以外

の集落をレジオネラ疑いとして培養3日目から釣菌し、同定している。しかし、培養3日目で降でもレジオネラと類似した雑菌が発育することもあり、レジオネラの集落のみを効率的に釣菌することは検査に熟練した者でも難しいと思われる。

今回検討した斜光法では、培養2日目からの釣菌可能であること、雑菌が多数発育した培地からでも高い確率でレジオネラが釣菌可能であること、レジオネラ疑いの集落を即判定できることが確認された。

このことからレジオネラを効率的に分離できる方法であると思われた。

また、培地上の集落に斜めに照射し目視で観察してもレジオネラは白く発光しているように見えるため、ある程度発育した集落であればこの方法でも確認できるのではないかと思われた。

研修中には、様々な菌種を効率的に分離できることも示唆されたので、今度、検査標準作業書(SOP)への導入も視野にいれ、さらに効率的にレジオネラを分離できるように検討したいと思う。

## 1 はじめに

レジオネラ検査に係る斜光法によるコロニー観察については、これまで当所で行っていなかった方法であったため、当所既存の実体顕微鏡およびコールドライトを暗室に配備する等の環境整備を行った。当所では環境水のレジオネラ検査を行っていないため、レジオネラ属菌保存菌株、温泉水模擬検体、ヒト臨床検体について、斜光法による鏡検を行った。また、環境水のレジオネラ検査を担当している山形県内4保健所検査課を対象とした当所主催の研修会において、斜光法の利用に関する研修を行った。

## 2 材料と方法

レジオネラ属菌保存菌株は、*Legionella pneumophila* 血清群(SG)1および3、*L. dumoffii*、*L. micdadei*、*L. londiniensis*の5株をBCYE $\alpha$ およびWYO $\alpha$ に塗抹した。温泉水模擬検体は、県内某温泉水貯湯槽から汲んだ温泉水を「新版レジオネラ症防止指針」における冷却遠心濃縮法による濃縮後、酸処理を施した検体に、*L. pneumophila* 血清群1及び*L. dumoffii*をそれぞれ適量混ぜ、WYO $\alpha$ に塗布した。ヒト臨床検体については、レジオネラ肺炎疑いで当所に搬入される検体を、スプタザイム処理後直接あるいは熱処理、熱・酸処理を施しWYO $\alpha$ に塗布した。以上の平板について、経時的に斜光法による鏡検を行った。

県内4保健所検査課を対象とした研修については、保存菌株5株、温泉水模擬検体について、実際に斜光法により鏡検してもらい、各課において今後利用が可能か否かに

ついて検討した。

## 3 結果および考察

### (1) レジオネラ属菌保存菌株

5株すべてにおいて、いわゆる「モザイク模様」を確認でき、菌種によって色味やモザイク模様の密度が異なることが確認できた。一概に、特定の菌種が特定のモザイク模様を示すとは言えないと思われるが、表1に示すような印象を受けた。ただし、*L. micdadei*は非常に緻密な柄であり、ある程度倍率を上げて鏡検しないと判断に迷う場面があり、*L. londiniensis*については全体的にピントが合いづらい像であった。

### (2) 温泉水模擬検体

温泉水由来の雑菌に比して添加菌の量が多すぎたため、容易にレジオネラを判別できてしまったが、雑菌とレジオネラのコロニーが被っている場所において、斜光法により立体的にそれぞれの境界を判別できたため、コロニーをカウントする際には非常に有用であると考えられた。

### (3) ヒト臨床検体

臨床検体について随時斜光法により鏡検を行ったところ、1検体についてモザイク様模様を示したコロニーを観察し、最終的にレジオネラと同定された。鏡検は簡便に行えるため頻繁に観察することができ、雑菌の多い臨床検体からレジオネラを見つけ出すのに役立った。鏡検に熟練すれば、培養日数が経過しなくてもレジオネラを見つけ出すことが可能になると思われ、最終診断までの日数が短縮できる可能性が示唆された。

### (4) 県内4保健所検査課を対象とした研修