

[A] 免疫磁気ビーズ法の検討

1. 目的

環境水に存在するレジオネラの検出では、試料を 100～200 倍濃縮して集菌する必要がある。現在は、メンブランフィルターを用いたろ過法と遠心法によって行われている。両方法では大量の試料を必要とするうえ、ろ過法では夾雑物の多い試料の場合、メンブランフィルターが目詰まりして濃縮時間がかかること、遠心法ではろ過法と比べて夾雑物の影響は受けないものの、回収に個人差が生じることなどの問題がある。そこで、新たな方法として腸管出血性大腸菌や腸炎ビブリオなどで汎用されている免疫磁気ビーズ法の有用性を検討した。

2. 材料

添加回収試験の指標菌には、浴槽水から検出された *L. pneumophila* SG4 を用いた。

方法の比較には、公衆浴場および旅館の浴槽水 20 件(白湯 18 件、温泉水 2 件)を材料とした。

3. 方法

3.1 添加回収試験

添加する指標菌を2濃度に調整し、それぞれ添加回収試験を行った。

リン酸緩衝液(pH7.5)45mL に指標菌(10 または 10^4 cfu/mL)を 450 μ L 添加し、緩衝液 5 mL とビーズ液 150 μ L を加えミキサーで 1 時間反応させた。反応後、DynaMag-50 にセットして 5 分間静かに混和し上清を除去した。沈査に緩衝液 50mL を加え、ミキサーで 5 分間洗浄した。再度、DynaMag-50 にセットして 5 分間静かに混和し上清を除去後、緩衝液 1mL で再懸濁し試料とした。試料 100 μ L を GVPC 培地(日研)2 枚に塗布して培養し、菌

数を測定した。添加回収後の菌数は、培地上に発育した集落の平均値で求めた。

3.2 現法との比較

3.2.1 ろ過法

定法に準じて浴槽水 500mL をフィルター (ISOPORE:ミリポア)でろ過し、滅菌蒸留水 5mL で再懸濁させたものを濃縮試料とした。

3.2.2 免疫磁気ビーズ法

浴槽水 1000mL から 45mL 分取し、緩衝液 5mL とビーズ液 150 μ L を添加してミキサーで 1 時間反応させた後、添加回収試験と同様に操作し再懸濁した 1mL を濃縮試料とした。

3.3 菌数測定

濃縮試料を 50°C、20 分間加熱処理した後、ろ過法は 100 μ L、免疫磁気ビーズ法は 250 μ L を GVPC 培地に塗布して 10 日間培養し、菌数を測定した。

4. 結果

4.1 添加回収試験

指標菌 *L. pneumophila* SG4 の回収率は 51.2%だった(表 1)。

表1 添加回収率

供試菌株	菌の添加量 (cfu/ml)	添加後の菌数 予測値 (cfu/45ml)	回収後の菌数 (cfu/ml)	回収率
<i>L. pneumophila</i> SG4	22000	9900	5065	51.2%
	22	9.9	5.5	55.6%

4.2 現法との比較

ろ過法では 20 件中 5 件(25%)、免疫磁気ビーズ法では 20 件中 4 件(20%)レジオネラが検出された。レジオネラが検出された浴槽水について両方法を比較したところ、両方法とも検出された浴槽水 No.4,5,6 の3件では、検出された菌数は両方法とも同程度の

値であった。No.3 は免疫磁気ビーズ法のみ、No.1,2 はろ過法のみで検出された。

表 2 2方法による検出状況

No	泉質	ろ過法	免疫磁気ビーズ法
		cfu/100mL	cfu/100mL
1	白湯	10	0
2	白湯	10	0
3	白湯	0	27.6
4	白湯	10	9.2
5	ナトリウム-塩化物温泉 等張性弱アルカリ性温泉	590	662
6	ナトリウム-塩化物泉 低張性中性低温泉	380	147

5. 考察

L. pneumophila SG4 の回収率 51.2%は、レジオネラの添加回収試験として報告されている 30 から 70%の範囲であった。現行のろ過法との比較では、両方法とも検出率の差は見られなかったが、ろ過法のみ検出された検体は検出された菌量が 10cfu/100mL

と少なかった。免疫磁気ビーズ法では、ろ過法に比べて検査に使用する試料が10分の1程度であるため、試料の分取時に検体中の菌が採取できなかったことが考えられた。

また、免疫磁気ビーズ法は、使用するミキサーが 8 本、DynaMag-50 が2本までの反応しかできないことから、数多くの検体を処理するには適していないが、遠心機や吸引ポンプなど機器を必要としないこと、手技が容易なことを考慮した実用性は高いと思われた。さらに、濁度が高いサンプルでの検出は不向きとされている免疫磁気ビーズ法で、ナトリウム-塩化物温泉等張性弱アルカリ性温泉などの温泉からの検出可能であったことから、浴槽水でのレジオネラ検出に利用できるものと考えられた。

[B] 免疫磁気ビーズ法の検討結果について

1. 材料および検査法

調査対象は、公衆浴場業または旅館業の許可を受けている営業施設内にある入浴施設とし、5施設から採取した浴槽水および湯口水計10検体を材料とした。

ろ過濃縮法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施し、免疫磁気ビーズ法は

Dynabeads MAX Legionella Kit に添付されたプロトコールに従い実施した。ただし、加熱処理は50℃ 20分とした。

培養は、各々の濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、WYO α 寒天平板(栄研化学)、GVPC寒天平板(日研生物)、MWY寒天平板(自家製)各2枚に、100 μ Lずつコンラージ棒で塗布し、これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36℃で7～10日間培養した。分離平板上に出現した灰白色の*Legionella*様コロニーについて、BCYE α 寒天培地(栄研化学)及びL-システイン不含BCYE培地(自家製)に接種し、36℃ 3～5日間培養観察した。L-システイン不含BCYE培地に発育せず、BCYE α 寒天培地のみに発育した菌についてグラム染色、PCR法で確認検査を行い、*Legionella*属菌と同定した。同定されたコロニー数をもって検水100mlあたりの*Legionella*属菌数に換算した。

LAMPについては、ろ過濃縮法で得られた試料を対象に、Legionella Detection Kit E

(栄研化学)を用い、Loopampリアルタイム濁度測定装置LA320・Cで測定した。

2. 結果および考察

ろ過濃縮法と免疫磁気ビーズ法から得られた結果を表1に示した。

ろ過濃縮法で*Legionella*属菌が検出された検体は4検体(40%)、免疫磁気ビーズ法で*Legionella*属菌が検出された検体は1検体(10%)であった。分離された*Legionella*属菌はいずれも*L. pneumophila*であった。検体番号1は、ろ過濃縮法で*Legionella*属菌が1000cfu/100ml検出されたが、免疫磁気ビーズ法では64cfu/100mlと1/16の菌数であった。ろ過濃縮法で*Legionella*属菌が検出された他の検体について*Legionella*属菌の菌数を見てみると、5cfu～10cfu/100mlといずれの検体も少量菌数であった。このため、ろ過濃縮に検体1000mlを用いるろ過濃縮法に比べ、集菌に検体45mlしか用いない免疫磁気ビーズ法では集菌・分離がされなかった可能性が考えられる。また、処理検体数が多検体の場合、磁石の台数に制限があることから、集菌作業に時間や手間がかかり、かえって作業が煩雑になった。しかし、免疫磁気ビーズ法は、喀痰や配管の拭き取り、ヘアーキャッチャーなどの少量のサンプルからの集菌・分離方法として期待される。

別表 1

番号	泉質	pH	遊離残留 塩素濃度 ppm	ろ過濃縮 法 cfu/100mL	磁気ビーズ 法 cfu/100mL	LAMP 法	備考
1	アルカリ性単純泉	8.0	痕跡	1000	63.8	+	浴槽水
6	アルカリ性単純泉	8.0	0	0	0	+	湯口水
2	酸性・含硫黄・鉄・アルミニウム・カルシウム・硫酸塩泉	2.0	0.3	10	0	-	浴槽水
7	酸性・含硫黄・鉄・アルミニウム・カルシウム・硫酸塩泉	2.0	0	0	0	-	湯口水
3	単純酸性硫黄泉	4.0	0	5	0	+	浴槽水
8	単純酸性硫黄泉	4.0	0	0	0	+	湯口水
4	ナトリウム炭酸水素塩泉	7.5	0	0	0	-	浴槽水
9	ナトリウム炭酸水素塩泉	7.5	0	0	0	-	湯口水
5	単純温泉、硫黄泉 (源泉が2箇所)	5.5	0	0	0	+	浴槽水
10	単純温泉、硫黄泉 (源泉が2箇所)	5.5	0	5	0	+	湯口水

[C] 浴槽水等のレジオネラ属菌検出状況と磁気ビーズによる濃縮処理法の検討

研究要旨

平成 20 年度は浴槽水等 89 検体を採取して、遺伝子検査法(リアルタイム PCR 法、LAMP 法)と培養法により、レジオネラ属菌の検査を行った。一部の検体について磁気ビーズによる濃縮処理を並行して実施した。その結果、培養法で浴槽水 84 検体中 11 検体(13.1%)、足湯 1 検体中 1 検体(100%)からレジオネラ属菌が検出された。検出された菌種は *L. pneumophila* 1 群、3 群、4 群、5 群、6 群、10 群、型別不能、および *L. micdadei* で、浴槽水 5 検体は複数の血清型の菌が検出された。磁気ビーズを用いた濃縮法により、検出率を向上することができた。

A. 研究目的

入浴施設に関連したレジオネラ属菌による集団発生あるいは散发事例が近年問題となっており、入浴施設の衛生管理は感染予防に重要である。このため昨年に引き続いて浴槽水等のレジオネラ属菌検査を行って汚染実態を把握するとともに、従来の培養法と磁気ビーズによる濃縮法の比較をし、その有用性を検討した。

B. 研究方法

(1) 材料

浴槽水 84 検体、湯口水 2 検体、その他(原水 2 検体、足湯 1 検体) 3 検体の計 89 検体について、レジオネラ属菌の検査を実施した。

(2) 方法

検査法は、培養法と遺伝子検査法を併用して実施し、培養法では一部の検体について磁気ビーズによる濃縮を併用して行った。即ち、昨年度の報告書の方法と同様に、検体 500ml をフィルター(PVDF 製)でろ過し、フィルターを滅菌水 5ml で 1 分間ボルテックスして菌を十分洗い出した。培養法はこの溶液 1ml を 50℃、20 分間加熱処理後、10 倍段階希釈し、その 0.1ml

を GVPC 培地(日本ビオメリュー製)にコンラージで塗抹して 37℃、10 日間培養後、コロニーの同定と菌数測定を行った。磁気ビーズは *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. brunensis*, *L. dumoffii*, *L. micdadei*, *L. anisa* の 6 菌種と結合する Dynabeads MAX Legionella Kit ((株)ベリタス)を用いた。濃縮は検体 45ml に磁気ビーズ用 10X バッファー 5ml と磁気ビーズ 150 μ l を加えて 1 時間攪拌し、磁石にセットして洗浄後 1ml に濃縮した。この濃縮液 0.4ml と、残りの液を 50℃、30 分間加熱処理した 0.4ml を各々 GVPC 培地に塗抹して培養後、菌数測定を行った。

C. 研究結果

浴槽水等 89 検体について、検査法別のレジオネラ属菌検査結果を、表 1 に示した。培養法では、浴槽水 84 検体中 11 検体(13.1%)、足湯 1 検体中 1 検体(100%)が陽性となった。遺伝子検査法で検出された検体を含めると、浴槽水 35 検体(41.7%)、湯口水 2 検体中 1 検体(50%)、原水 2 検体中 2 検体(100%)、足湯 1 検体(100%)からレジオネラ属菌が検出された。培養法で分離された菌種とその血清型は、*L. pneumophila* 1 群、3 群、

4群、5群、6群、10群、型別不能、および *L. micdadei* で、浴槽水 5 検体からは複数の血清型の菌が検出された。

磁気ビーズ濃縮の有無によるレジオネラ属菌検出率の比較を、表 2 に示した。

69 検体について、通常の培養法と磁気ビーズによる濃縮を併用した。通常の培養法と磁気ビーズ濃縮両法で陽性となったのは 4 検体 (5.8%) で、磁気ビーズ濃縮はこの 4 検体に加えさらに 4 検体の計 8 検体 (11.6%) が陽性となり、検出率が向上した。しかし、両法陽性の 4 検体のうち 2 検体は通常の培養法でレジオネラ属菌が多数検出されており、磁気ビーズ濃縮では菌数の測定は不可能であった。

D. 考察

浴槽水等のレジオネラ属菌検査結果は、培養法で 13.5%、遺伝子検査法の併用により 43.8% 検出され、それぞれ昨年度の結果 (培養法 10.3%、遺伝子検査法 41.0%) より少し検出率が高かった。

磁気ビーズによる濃縮は、温泉の泉質により含まれているフミン質などの不純物の除去・精製が可能と思われ LAMP 法の反応阻害物質の除去による定量性の向上が期待できる。また、従来の培養法の検体 10ml 相当量に比べ 1.8 倍の 18ml 相当量を分離培地上に塗抹できるため、検出率を上げることができた。今後磁気ビーズによる濃縮を導入してさらに検査法の改良を検討すれば、一層の検出率向上が期待できるものと思われる。磁気ビーズによる濃縮は、夾雑物や雑菌の除去および検出感度の向上に有効と思われるが、レジオネラ属菌の菌数が多い検体や濃縮時に磁気ビーズの洗浄が不十分などときには、分離培地上に多数のレジオネラ属菌や同時に多くの雑菌が発育するため、菌数測定や菌の同定が不可能になる。しかし、レジオネラ属菌の菌数が多い検体では、通常の培養法で十分検出が可能であり、雑菌処理については、磁気ビーズを丁寧に洗浄すれば、十分回避できると思われる。

表1 検体・検査法別レジオネラ属菌検出結果

検体名	検体数	陽性検体数 (%)			計
		培養	qPCR	LAMP	
浴槽水(内湯)	68	6 (8.8)	28 (41.2)	13 (19.1)	28 (41.2)
浴槽水(露天風呂)	16	5 (31.3)	7 (43.8)	3 (18.8)	7 (43.8)
注湯口	2	0 (0)	1 (50.0)	1 (50.0)	1 (50.0)
その他	3	1 (33.3)	3 (100)	1 (33.3)	3 (100)
計	89	12 (13.5)	39 (43.8)	18 (20.2)	39 (43.8)

その他: 原水2検体、足湯1検体

表2 培養法における磁気ビーズ濃縮の有無によるレジオネラ属菌検出率の比較(検体数: 69)

磁気ビーズ処理	加熱処理	陽性検体数	検出率 (%)
なし	50℃、20分間	4	5.8
	なし	6*	8.7
あり	50℃、30分間	8*	11.6
	ビーズ法計	8*	11.6

*: 磁気ビーズ処理した検体のうち2検体は菌数が多かったため、菌数測定不能であった

[D] 浴用水 *Legionella* 属菌検査における免疫磁気ビーズの有用性に関する検討

A 研究目的

浴用水中のレジオネラ属菌を効率的に分離するために、レジオネラ属菌の抗体をコーティングした免疫磁気ビーズ(IMS)の有用性を検討した。

B 研究方法

富山県内の温泉および銭湯等から採取した浴用水 33 検体について IMS を用いて、レジオネラ属菌の分離を試みた。従来法としてろ過濃縮法によるレジオネラ属菌数との比較を行った。

① IMS による検水の濃縮

IMS によるレジオネラ属菌の濃縮法は、研究班に示されたプロトコールに従っておこなった。ただし、最終的に 1×Buffer を取り除き、新たに 1×Buffer にビーズを再懸濁する前にチューブを軽く遠心し、管壁に残るビーズを底に集めた。その後 1×Buffer を 1ml 添加し、その 0.5ml はそのまま、また、0.5ml は 50℃20 分間の加熱処理した後、GVPC 培地(ビオメリュー)2 枚に 0.25ml ずつコンラージ棒で広げてから 35℃で 7 日間培養した。

② ろ過濃縮法

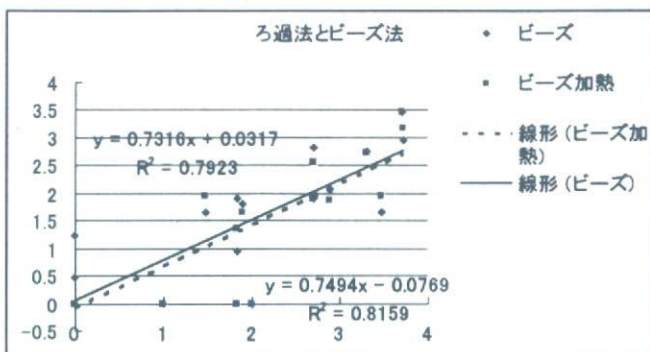
方法は、「迅速検査の有用性に関する検討」で述べている方法にて実施した。

C 結果

IMS 法でレジオネラ属菌が分離された浴用水は非加熱検体で 13/33 件(39.4%)、加熱検体で 10/33 件(30.3%)で、ろ過濃縮法(加熱処理)の 14/33 件(42.4%)と比較すると検出率は若干低かった。ろ過濃縮法で分離され、IMS 法で分離されなかった検水

が非加熱 3 件、加熱 4 件、逆に IMS で分離され、ろ過濃縮法で分離されなかった検水は非加熱 2 件であった。また、それぞれの定量値について log 対数で比較した結果を図 1 に示した。R² は加熱で 0.82、非加熱で 0.79 であった。全体的にはろ過濃縮法の定量値が高く、とりわけ 10³cfu/100ml を超える場合に、IMS 法との差が顕著であった。

図 1. ろ過濃縮法と IMS 法によるレジオネラ属菌の定量値の比較



D 考察

IMS 法はその検出率においては、ろ過濃縮法と比べ、若干低い結果となった。ただし、これは検査に用いた浴用水量が 45ml であり、ろ過濃縮法の 1/10 でしかないことも原因のひとつである。逆にこの方法では検水量を増やせないということがひとつの難点と言える。さらに検査に手間がかかりすぎて、検体数が多い場合にはこの方法で実施するのは現実的では無いと思われた。ただし、雑菌が多い等の事前の情報がある場合にはそれらを排除する方法としてこの方法は有用であると考えられる。一方、浴用水によっては Buffer と反応し析出する成分がみられたことから、Buffer 成分を検討する必要があると思われた。

[E] 磁気ビーズを利用したレジオネラ属菌の検査について

【目的】

微生物分離濃縮用免疫磁気ビーズは、Dynabeads anti-E.coli O157 で代表されるように、検査の現場で広く普及し活用されている。今回、レジオネラ属菌に対する磁気ビーズを用い検査をする機会を得た。そこで、同一検体に対し、当所で行っている培養法（以下当所法）と磁気ビーズによる方法で検査を行い、その結果を比較検討したので報告する。

【方法】

1) 供試検体

5カ所の浴槽水（温泉水）を供試した。

2) 当所検査法

非濃縮検体と濃縮検体を使用した。濃縮法は、ろ過濃縮法で行った。分離培地はGVPC培地（日研生物医学研究所）を使用した。培地へは、未処理、熱処理（50℃、20分加熱）は100 μ l、酸処理（0.2M HCl・KCl buffer、pH2.2と検体を等量混合し、室温で4分静置）は200 μ lを接種、塗布した。これらを、36℃で10日間培養し、発育コロニーを同定した。最終結果は、最も算定菌数の多かった結果を採用した。

3) 磁気ビーズによる検査法

Dynabeads MAX Legionella Kit 日本語マニュアル 2008年10月に従った。

【結果および考察】

3カ所の浴槽水でレジオネラ属菌が検出された。検査結果を表1に示す。確認されたレジオネラ属菌数は、いずれも当所法で多い値を示した。当所法の検体番号2と5

の結果は、非濃縮検体の結果を示している。これらの濃縮検体での結果は、検体番号2：980cfu/100mL（熱処理結果、未・酸処理では雑菌が多く確認不能）、検体番号5：

900cfu/100mL（熱処理結果、未処理：590cfu/100mL、酸処理：570cfu/100mL）であった。非濃縮検体と比べ、確認菌数が少ない値となったが、それでも磁気ビーズ法よりは多い値であった。今回の実験では、検体番号1（濃縮熱処理結果、未・酸処理では雑菌が多く確認不能）および5の濃縮未・酸処理の菌数が、比較的磁気ビーズ法の値に近い結果であった。当所法と磁気ビーズ法で、確認されたレジオネラ属菌種に違いが認められた。当所法で確認され、磁気ビーズ法で確認されなかった場合が多かった。検体番号5では、緩衝液を添加した直後、沈殿物が生じた。磁気ビーズを添加すると、ビーズと沈殿物が混合し沈降した。これら混合物は、磁気板側に一度は付着するものの、上清除去と同時に剥がれ落ち、その後の操作および結果に影響を与えたものと思われる。沈殿の原因は不明であるが、検体に豊富に含まれるカルシウム分

（4250mg/kg）が影響している可能性も示唆された。磁気ビーズで検出された雑菌の検出状況について表2に示した。培地全面で雑菌が旺盛に発育した場合（未処理3/5、熱処理1/5）があった。未処理検体でその傾向が高かったが、未処理検体の方で、確認された菌数が多かった場合もあり（検体番号5）、やはり、両処理は必要であると思われる。

以上をまとめると、

1)日本では温泉水が検体となる場合が往々にしてあるが、様々な温泉成分や浮遊物が

磁気ビーズ本体や緩衝液に影響を与えることが懸念された。

2)温泉水の種類ごとによる確認実験が必要ではないか？

3)それにより、最適な緩衝液の選択、もしくは泉質によっては検査に影響を与えることがある等の表示、さらには磁気ビーズ濃度の検証等につながると思われた。

4)浮遊物に付着した雑菌が、磁気ビーズに付着し、培地上で旺盛に発育し検査に影響を与えている可能性が示唆され、洗浄回数を増やすなどの工夫が必要であると思われた。

5)当所法と磁気ビーズ法では確認された種類が異なる場合があり、一概に最終菌数だけで比較することは出来ないと思われた。

6)磁気ビーズとレジオネラ属菌の特異性と感度を、種類を増やし検証する必要があると思われた。

7)磁気ビーズ法で培地に接種、塗布した場合、コンラージ棒に磁気ビーズが付着しやすく、従来法より実験ロスが大きい可能性が懸念された。

8)Dynabeads anti-E.coli O157等では、通常増菌培養液に使用することが多く、定性的な意味が大きいと思われる。今回のレジオネラ属菌に関しては、定量的な使用方法である。そのため、状況によって様々な実験ロスが生じる可能性を考慮し、検証する必要があると思われる。

9)これらのことから、現時点では、従来法の方が検査精度が高いと思われた。しかしながら、従来法でも検査法の違いが結果の比較に影響すると思われる。今後、複数の施設が、統一した検査方法で磁気ビーズ法と比較する必要があると思われた。

表1 レジオネラ属菌検出状況

	検体番号				
	1	2	3	4	5
ビーズ(未)					
(cfu/plate)	0	0	0	0	28 ³⁾
ビーズ(熱)					
(cfu/plate)	20 ¹⁾	44 ³⁾	0	0	11 ³⁾
ビーズ					
(cfu/100mL)	116	255.2	—	—	406
当所法	180 ²⁾	3000 ⁴⁾	10>	10>	5000 ⁵⁾

未：未処理 熱：熱処理

1)*L.pneumophila* SG6(1cfu/plate), *L.sp.*(19cfu/plate)

2)*L.pneumophila* SG6

3)*L.pneumophila* SG UT

4)*L.pneumophila* SG 15,UT, *L.rubrilucens*

5)*L.pneumophila* SG UT, *L.micdadei*

表2 雑菌検出状況

	検体番号				
	1	2	3	4	5
ビーズ(未)					
(cfu/plate)	+++	+++	+++	62	100
ビーズ(熱)					
(cfu/plate)	1	168	+++	43	0

+++：培地全面に発育

[F] 免疫磁気ビーズ法を利用したレジオネラ属菌の検査結果

- 1 目的 レジオネラ属菌検査における免疫磁気ビーズ法の利用可能性を検討する。
- 2 対象 塩素消毒を行っていない温泉水 23 検体（源泉かけ流しの単純アルカリ泉、pH8.0～8.9）
- 3 方法 ビーズ法は説明書に従って 1ml に濃縮し、その 0.5ml を培地（GVPC α 寒天培地、日研生物）2 枚に接種した。残りの 0.5ml について 50°C30 分間加熱処理を行った後、0.5ml を培地 2 枚に接種し、菌数の合計の大きい方の値を 4.6 倍して 100ml 当たりの菌数とした。比較対照とした培養検査は検水 1000ml を使用し、ろ過濃縮後（0.2 μ ポリカーボネートフィルター、ミリポア）に酸処理を 4 分間行い培養した。
- 4 結果と考察 結果を図に示す。温泉水

23 検体中レジオネラ属菌が検出されたのはビーズ法が 11 検体、培養法が 17 検体となり、培養法に対して大きな回収率となったものは 1 検体のみで、これを含めてもビーズ法の検出率は全体で 65% となった。特に培養法の検出限界付近（20CFU/ml 以下）では 5 検体中 1 検体のみでの検出で 20% の検出率と低調であった。また、培養法と同時に検出された菌数も、全般的に低目となったことから、低濃度域での検出感度と回収率に問題があると考えられた。なおビーズ法で不検出となった 4 検体中 3 検体からは *L.pneumophila* が、残り 1 検体からは *Legionella* 属菌との混合であった。また、加熱処理の影響により回収率が低目となっていた。

免疫磁気ビーズ法集計表

検体番号	通常法	磁気ビーズ法	磁気ビーズ法	磁気ビーズ法
	ろ過、酸 cfu/100mL	未処理 cfu/plate	熱処理 cfu/plate	cfu/100mL
1	35	1	1	4.6
2	<10	0	0	<10
3	80	10	12	55.2
4	10	0	1	4.6
5	60	4	3	18.4
6	20	0	0	<10
7	70	29	8	133.4
8	<10	0	0	<10
9	10	0	0	<10
10	150	2	1	9.2
11	20	0	0	<10
12	8	0	0	<10
13	100	3	0	13.8
14	<10	0	0	<10
15	1720	142	88	653.2
16	<10	0	0	<10
17	<10	0	0	<10
18	110	7	4	32.2
19	10	0	0	<10
20	35	1	1	4.6
21	<10	0	0	<10
22	35	2	3	13.8
23	90	0	0	<10

[G] 磁気ビーズ法の結果

1 検査方法

通常法：試料500mLをポアサイズ0.22 μ 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。濃縮試料を50 $^{\circ}$ C20分間加熱処理する。GVPC培地に濃縮試料0.01、0.1、0.1mLずつ塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで5日間培養する。菌の同定はPCR、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る。

磁気ビーズ法：45mLの浴槽水に指定の緩衝液5mLとビーズ液150 μ を添加する。ミキサーで攪拌後に磁石で1mLに濃縮して、0.4mLをプレート1枚に接種。0.5mLは加熱処理50 $^{\circ}$ C30分を行って0.4mLをプレート1枚に接種。培養条件及び菌の同定法は培養法と同じ。菌数は加熱処理・非処理のうち高い方の価をとり5.8倍し、cfu/100mLを算出する。

2 試料

営業中の公衆浴場水32試料（市水白湯14試料、市水薬湯4試料、温泉10試料、温泉4薬湯）

3 結果及び考察

結果は表1に示した。磁気ビーズ法は23 cfu/100mLまで検出が可能で、検出限界値はほぼ通常法と同様であった。磁気ビーズ法の無熱処理と熱処理の比較を図1に示した。その結果、無熱処理と熱処理では非常に相関が高く、磁気ビーズ法であれば、加熱処理を省略しても、結果に影響しないことが判明した。

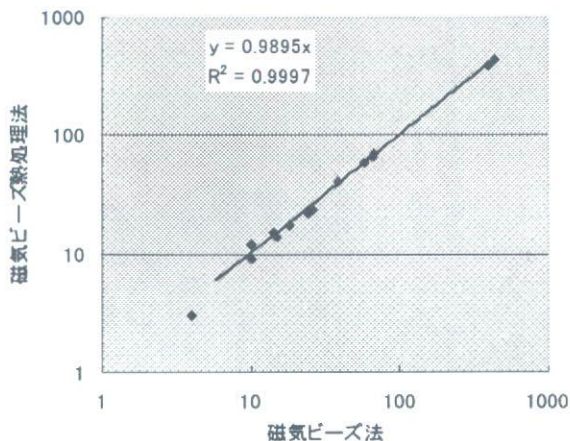


図1 磁気ビーズ法の無熱処理と熱処理の比較

通常法と磁気ビーズ法の相関を図2に示した。2法を比較すると、非常に相関が高く、良好な結果を示した。磁気ビーズ法は通常法と同様な精度でレジオネラ属菌を検出することが可能であった。また、雑菌が多い試料では、通常法の加熱処理ではGVPC培地上にレジオネラ属菌と共に雑菌のコロニーが出現し、その選別に熟練が必要であるが、磁気ビーズ法では磁気ビーズにレジオネラ属菌だけを捕らえ、雑菌は洗浄の過程で取り除かれていくため、GVPC培地上出現する雑菌のコロニーが非常に少なくなった（100の雑菌コロニーが5程度に減少）。これは、レジオネラ属菌のコロニーが雑菌のコロニーに埋没して検出が不可能になることを避けることができ、純培養の時間短縮にも繋がると思われる。また、初心者でも、比較的容易にレジオネラ属菌のコロニーを判別できるようになり、利点の多い手法と考えられた。

磁気ビーズ法は磁気ビーズとレジオネラ属菌をいかに効率良く、確実に反応させるかによって、レジオネラ属菌の集菌能力に差が生じる。そこで、磁気ビーズを試料に加えた後、ミキサーで1時間混合する過程が問題になる。貸与されたミキサーは50mLチューブが傾斜したまま回転するため、転倒混和が可能である。試料にビーズを入れて回転させるとき、ビーズが均一に混和されるスピードに調節することが大事である。また、ミキサーにセットする前とミキサーから外した後に各1分程度転倒混和を行ったことで、十分な混和が行われたと考えられた。

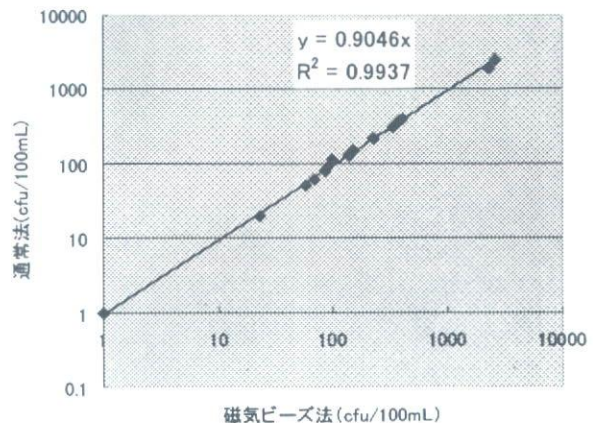


図2 通常法と磁気ビーズ法の相関

表1 通常法と磁気ビーズ法によるレジオネラ属菌検出結果

検体 番号	浴槽水泉質	pH	遊離残留 塩素濃度	通常法		磁気ビー ズ法熱処 理		磁気ビー ズ法	コメント
				cfu/100mL	cfu/plate	cfu/plate	cfu/100mL		
			ppm						
1	市水白湯	7.4	0.7	<10	0	0	<6		
2	市水白湯	7.4	0.3	20	4	3	23		
3	市水薬湯	7.2	<0.1	150	26	23	150		プレート上の雑菌が除かれた
4	市水白湯	7.1	0.7	<10	0	0	<6		
5	市水白湯	7.4	0.6	<10	0	0	<6		
6	市水白湯	7.4	0.2	80	15	14	87		プレート上の雑菌が除かれた
7	市水薬湯	7.2	<0.1	110	18	17	100		プレート上の雑菌が除かれた
8	市水白湯	7.0	0.7	<10	0	0	<6		
9	市水白湯	7.6	0.6	<10	0	0	<6		
10	市水白湯	7.5	0.4	<10	0	0	<6		
11	市水薬湯	6.9	0.1	130	24	22	140		プレート上の雑菌が除かれた
12	市水白湯	7.3	0.8	<10	0	0	<6		
13	市水白湯	7.5	0.9	<10	0	0	<6		
14	市水白湯	7.5	0.7	<10	0	0	<6		
15	市水薬湯	7.0	0.2	90	14	15	90		プレート上の雑菌が除かれた
16	市水白湯	7.3	0.6	<10	0	0	<6		
17	温泉(炭酸水素塩泉)	8.2	<0.1	50	10	9	58		プレート上の雑菌が除かれた
18	温泉	8.3	<0.1	370	65	66	380		プレート上の雑菌が除かれた
19	温泉薬湯	8.7	<0.1	400	68	70	410		プレート上の雑菌が除かれた
20	市水白湯	7.2	0.7	<10	0	0	<6		
21	温泉	8.3	<0.1	310	58	58	340		プレート上の雑菌が除かれた
22	温泉	8.2	<0.1	1900	400	390	2300		プレート上の雑菌数が通常法に比較して遥かに少なくなった
23	温泉薬湯	8.7	<0.1	220	38	40	230		
24	市水白湯	7.3	<0.1	<10	0	0	<6		
25	温泉(ナトリウム塩化物泉)	8.4	0.4	<10	0	0	<6		
26	温泉	8.4	0.4	<10	0	0	<6		
27	温泉薬湯	8.8	<0.1	60	10	12	70		プレート上の雑菌が除かれた
28	温泉	8.2	<0.1	2500	440	440	2600		プレート上の雑菌数が通常法に比較して遥かに少なくなった
29	温泉	8.3	0.5	<10	0	0	<6		
30	温泉	8.3	0.4	<10	0	0	<6		
31	温泉薬湯	8.6	0.1	<10	0	0	<6		
32	温泉	8.3	<0.1	<10	0	0	<6		

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
衛生管理手法の開発に関する研究

標準試料配付による精度管理の改良

研究分担者 渡辺祐子 神奈川県衛生研究所微生物部
研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所細菌第一部

【要旨】

昨年度、レジオネラ属菌の検査の精度管理のために7機関で標準試料を用いて菌数測定を行ったところ回収率が低かったため、今年度は試料の配付方法としてのゼラチン・ディスク法を評価するとともに、試料の処理法間の回収率の相違を検討した。その結果、まず、ゼラチン・ディスク法の実用性について検討したところ、最終的な回収率に有意の差がなく、ディスクの使用についても問題は認められなかった。次いで、神奈川衛研を含む8機関で濃縮法と酸・加熱処理法の各検査工程を検討したところ、ろ過法と酸処理法が高い回収率を示した。今後は回収率のバラツキを改善するために検査法の個々の工程について検討を行い、統一された検査法として確立していくとともに、回収率のみで評価している外部精度管理の方法自体についても検討を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

昨年度、レジオネラ属菌の環境水からの検査における精度管理手法の確立に向け、外部精度管理の試行として、7機関を対象として*L. pneumophila*の保存株を精度管理用標準試料（以下、「試料」）に用いて、各機関の方法に従って菌数測定を行った。しかし、回収率が低かったことから、今年度は精度管理手法の確立を目的として再度外部精度管理を実施する中で、試料の配付方法としてゼラチン・ディスク法（以下、「ディスク法」）を採用し、その有用性を評価するとともに、濃縮法と酸・加熱処理法の各検査工程における回収率低下の原因を探った。

なお、新版レジオネラ症検査指針（以下、「レジオネラ検査法」）などのレジオネラ属菌検査指針には各検査機関の裁量に委ねる部分が多く、昨年度の調査から各検査機関の検査方法にはかなりの違いがあることが明らかになった。そこで、

今回はその影響を避けるため、試料から作製する検水量の統一をはじめ、共通の培地を用いることや、濃縮法または酸処理方法等の一部分を指定することにより、検査工程の各処理法による回収率への影響をできるだけ把握できるよう考慮した。

B. 研究方法

1. ディスク法の検討

1) ディスクの作製

活性炭末を除いた透明ゼラチン・ディスク（以下、「ディスク」）を作製した。

国立感染症研究所の病原体検出マニュアル平成15年12月9日、P581-584（感染研ホームページ）の作製法に従って、培養菌を 10^5 CFU/mlになるようにディスク作製溶液にとり濃厚菌液を作製する。この菌液50 μ lをクッキングペーパー上に滴下し、これを減圧デシケーターで一晩乾燥後、保存用のビンに移し-40度で保存した。ディスク作製溶液：A液グル

コース 5%、スキムミルク 3% 混合液、B 液 0.5% アスコルビン酸 Na、C 液 20% ゼラチン。ディスク作製時、この A、B、C 溶液を 1 : 0.5 : 1 に混合して使用

(1) ディスク及び培養菌から作製した検体による回収率の比較

10ml に溶解した場合に 10^4 CFU/ml となるように作製したディスク 2 枚を、1/50 に希釈した PBS (以下 1/50PBS) 20ml に溶解し、0.1ml を段階希釈して菌数を確認するとともに、1ml を 1/50PBS 500ml に添加した検水を 5 本作製した。各検水をポアサイズ $0.2\mu\text{m}$ 直径 47mm のポリカーボネート製メンブレンフィルター (ミリポア) (以下、「フィルター」) を使用し、レジオネラ検査法に準拠して濃縮液を酸処理した試料と無処理の試料の菌数を測定し、処理法別に平均回収率を求めた。

一方、ディスク法による回収率と比較するため、ディスク作製に使用した菌株を BCYE α 寒天培地で培養後、1/50PBS で 10^4 CFU/ml の濃度の菌液を作製し、この 1ml を 1/50PBS 500ml に添加した検水 5 本作製し、回収率を求めた。

(2) ディスク成分が回収率に及ぼす影響

BCYE α 寒天培地に発育した菌株を 1/50PBS に 10^4 CFU/ml になるように浮遊させ、これを原液として、1/50PBS で 500 倍に希釈した検水 10 本作製し、そのうち 5 本をレジオネラ検査法に従い菌数を測定した。残りの 5 本にはレジオネラ属菌を含有しないディスク 1 枚を加え、 36°C に加温して完全にディスクが溶解したことを確認した後、前述と同様にレジオネラ検査法に従い菌数を測定し、ディスク成分が回収率へ与える影響を調べた。

2. 精度管理の再試行調査

(1) 試料の作製

精度管理用の配付試料は菌数の異なる 2 試料とし、1 つは *L. pneumophila* 1 群が 10^4 CFU/ディスク (試料 1)、もう 1 つは *L. pneumophila* 5 群が 10^5 ディスク (試料 2) となるように微生物検査マニュアルの作製法を応用して作製した。

昨年度の配付試料との相違はゼラチン・ディスク作製試薬中活性炭末を除いたものとした。なお、作製後に国立感染症研究所と当所で菌数測定を行った。

(2) 精度管理の協力機関

精度管理調査に協力いただいたのは北海道立衛生研究所、宮城県保健環境センター、静岡県環境衛生科学研究所、富山県衛生研究所、岡山県環境保健センター、長崎県環境保健研究センターおよび大分県衛生環境保健センターで、これに当所を含めた 8 機関で調査を行った。

(3) 実施に当たっての事前連絡周知

各協力機関に対しては、事前にメールにて、精度管理用試料の発送日、「ディスクを用いたレジオネラ精度管理の菌数測定方法および回答方法」(別添 1) (以下「精度管理方法」)、回答様式 (別添 2)、精度管理用検体の到着予定日を通知し、各機関において受け取りの準備を依頼した。培地は購入した GVPC α 寒天培地 (日生研) をメーカーから協力機関に直送した。

(4) 試料の発送

各ディスク 5 枚をセラムチューブに入れ、病原体運搬用容器 (カテゴリー A) に入れた上で、「ゆうパックチルド」にて各機関あてに発送した。なお、フィルター及び希釈用 PBS buffer も同封した。

(5) 各協力機関における菌数測定

各機関ではディスク 1 枚を 1/50PBS 10ml に加え 36°C で完全に溶解して原

液とし、「精度管理方法」に従って、菌数測定を行った。次に、原液 1ml を 1/50PBS 500ml に加えた検水を 5 本作製し、「精度管理方法」に従って検査を行った。なお、今回の「精度管理方法」では、ろ過濃縮法に、送付したフィルターを使用することやフォルダーのとも洗いを行うこと、また、遠心後の菌液の回収の際に遠心管のとも洗いをを行うことを規定した。また、濃縮処理後と酸処理あるいは加熱処理後においても菌数を測定するとともに具体的な検査方法の内容についても詳細に記載（別添 3）することを依頼した。

C. 研究結果

1. ディスク法の検討

(1) ディスクまたは培養菌から作製した検水による回収率の比較

ディスク法の濃縮後の回収率と対照とした培養菌液の回収率を表 1 に示した。ディスク法の濃縮後の平均回収率は 61.4% となり、培養菌の 50.7% と有意の差が認められたが、酸処理後の平均回収率はディスク法では 50.9%、対照の培養菌液は 58.7% となり有意差は認められなかった。検水の平均回収率もディスク法では 31.2%、培養菌でも 29.8% と、回収率自体は低いものの両方法に有意の差は認められなかった。

(2) ディスク成分が回収率に及ぼす影響

ディスク成分が菌株と混合して機材やフィルターに付着することで、回収率の低下原因となっているかを調べた。ディスク成分を添加した場合の平均回収率は 77.9% で、一方、ディスク成分が無添加の場合は 63.8% となり、ディスク成分の添加による影響は認められなかった。(表 2)

2. 精度管理の再試行調査

(1) 配付した標準試料の菌数

試料には菌数の異なる 2 種類のディスクを用いたが、作製したディスクの菌数を感染研と当所で測定したところ、平均菌数は、試料 1 が 5.4×10^4 CFU/ml (n=9)、試料 2 が 2.8×10^5 CFU/ml (n=9) となり、CV% は 25.5% と 12.4% となった。

(2) 全体の回収率

8 機関の検査結果をとりまとめ、表 3 に示した。なお、機関によっては複数の検査法による回答があったため、表中にはそれぞれを別々に記載した。なお、濃縮後、酸、加熱処理後といった検査工程ごとの回収率の算出方法の例を図 2 に示した。全体の回収率をみると、試料 1 は検水中に 10^3 CFU/ml の菌数が確認されているが、各検査機関における最終的な平均回収率は 0 から 77.4% と著しい差が認められた。また、試料 2 は検水中に 10^4 CFU/ml と 1 桁大きな菌数が確認されているが、こちらも各検査機関における最終的な平均回収率は 0 から 78.7% と著しい差が認められた。

(3) 濃縮法における回収率

試料 1 は、ろ過法が 54.9% (n=40)、遠心法が 21.9% (n=15) となった。また、試料 2 は、ろ過法が 65.4% (n=40)、遠心法が 22.9% (n=15) となり、いずれの試料についてもろ過法が 2 倍以上の高い回収率となった。(表 4)

(4) 酸処理または加熱処理における回収率

試料 1 の酸処理の回収率は 64.0% (n=20)、加熱処理の回収率は、28.4% (n=45) となった。また、試料 2 の酸処理の回収率は 66.0% (n=20)、加熱処理の回収率は 33.6% (n=45) となり、いずれの試料についても酸処理の方が 2 倍程

度高い回収率となった。(表5)

(5) 配付したディスクの菌数

各機関において、送付された試料の菌数を測定し、発送前に確認した菌数と比較したところ、試料1では、平均菌数が半分程度まで減少していた。また、CV%を比較すると、2倍程度に上昇していた。試料2については、菌数はほとんど変化が認められないが発送後のCV%は2倍程度になった。(表6)

D. 考察

1. ディスク法の実用性の検討

今回、ディスク法と培養菌液を使用して回収率に差が生じるかをみたところ、有意の差が認められたものの、ディスク法の回収率が培養法に比べ高く、ディスク作製が回収率を低下させる要因とはいえないという結果が得られた。

また、ディスクの成分が加わることによる回収率への影響を確認したところ、ディスク成分を添加しなかった検査件数が不足したものの、ディスク成分が回収率に悪影響を及ぼすという結果ではなかった。

以上から、ディスク法の使用についても、問題がないという結果が得られた。

なお、前回の調査の配付ディスクは作製時に炭末を添加したためろ過工程で時間がかかったとの問題が発生したため、今回は炭末なしの透明ディスクを使用したところ、特に問題はなかった。

2. 協力機関による精度管理調査結果

(1) 配付した標準試料の菌数

今回作製した試料用ディスクのCV%は12.4%から25.4%の範囲でEWGLI(The European Working Group For Legionella Infection)で使用されている精度管理用LENTICULEディスクの精度のよいパッ

チはCVが25%以内とされていることから、今回作製した試料については、実用性において問題のない範囲内であると考えられた。

(2) 全体の回収率

検水中の菌数の違いがあるものの、各機関における最終的な平均回収率は0から77.4%(試料1)と78.7%(試料2)となり、著しい差異が認められた。しかし、前回の試行においての回収率が最もよかった機関でも21.8%にとどまるなど、極めて低調であったことに比較すれば、今回は回収法の具体的手技を詳細に示したこともあり一部の検査機関ではあるが、回収率にかなりの改善が認められた。

(3) 濃縮法、酸・加熱処理法の回収率への影響

今回の検査工程の検討において、濃縮法ではろ過法、また酸・加熱処理法では酸処理法が高い回収率を示した。高い回収率となった機関では、いずれもろ過法と酸処理法を採用しており、回収率の平均は試料1で69.9%、試料2で67.0%と良好な値となっていた。(表7)その反面、回収率が0またはほとんど0となった3つの検査機関では、ろ過法と加熱処理法を採用しており、遠心法を採用していた検査機関では回収率が低く、バラツキが大きかった。

しかし、ろ過法と酸処理法を採用した検査機関の全てが安定して良好な回収率を示したわけではなく、CV%は試料1で31.4%、試料2で22.2%とバラツキを示しているため、回収率やその安定性に影響を及ぼす検査要因等の存在が予想された。

また、全体として平均回収率の向上については、今後詳細な調査が必要であるが、ろ過法へのとも洗いの導入等や担当者の検査方法への習熟度等も改善の要因となっているのではないかと推察された。

以上の試行結果から、回収率向上と安定した回収率を確保するためには、ろ過法と酸処理法を中心に検査工程のさらに詳細な確認を行い、検査法ごとの工程や選択肢ごとの回収率を向上させ、統一された検査法として確立することや技術力の確保の方策を確立していく必要があると考えられた。

あわせて、現在行われている検査法の回収率についてはどのレベルを確保することが必要であるか、目標値の設定についても検討を行っていくことが重要であると考えられた。さらに、現在、実施した精度管理の結果は回収率に着目して比較評価しているが、外部精度管理を実施していく際には、この評価方法自体についても検討を行う必要が考えられた。

E. 結論

今年度は、ディスク法の実用性を評価することと、濃縮法と酸・加熱処理法の各検査工程における回収率低下の原因を調査するため、外部精度管理の再試行を行った。ディスク法で保存された菌株の生存性は十分に保持され、ディスクの成

分が回収率へ影響することがないことが明らかになり、精度管理試料の配付に有用な方法であることが示された。ろ過法と酸処理法の回収率が高い結果を示し、前年度の調査と比較して回収率も向上したが、施設間のバラツキも大きかった。今後、回収率向上と安定した回収率を確保するため、ろ過法と酸処理法を中心とした検査工程の詳細な検討を行うとともに回収率の目標レベルの設定が必要と考えられた。また、今回の調査では回収率を評価対象としたが、外部精度管理の包括的な評価方法についても検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

渡辺祐子，高橋智恵子，大屋日登美，岡崎則男：VNTR 法を利用した *Legionella pneumophila* の遺伝子型別. 第 82 回日本感染症学会総会（島根），2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1 ディスクまたは培養菌から作製した検水による回収率の比較

		n=5	
		ディスク	培養菌
		t検定	
検水菌数*		12000	28900
濃縮後	菌数*	7364	14655
	CV%	13.2	10.9
	回収率	61.4	50.7 p=0.02
酸処理	菌数*	3748	8618
	CV%	44.1	12.8
	回収率	50.9	58.7 p=0.18
検水回収率		31.2	29.8 p=0.46

*: CFU/ml

表2 ディスク成分が回収率に及ぼす影響

		n=4	
		ディスク成分添加	ディスク成分無添加
		t検定	
検水菌数*		9740	
ろ過後菌数*		7590	6210
回収率		77.9	63.8 p=0.19
CV%		39.8	31.9

*: CFU/ml

表3-1濃縮後回収率

試料1

機関番号 検査法	ディスク菌数 (菌数/5ml)	濃縮後の 菌数	濃縮後回 収率	平均回収 率
1 遠心法	1210	390	32.2	CV% 23.2 33.9
		315	26.0	
		160	13.2	
		335	27.7	
		205	16.9	
1 ろ過法	1210	545	45.0	CV% 50.7 7.2
		600	49.6	
		660	54.5	
		625	51.7	
		640	52.9	
2 ろ過法	328	210	64.0	CV% 68.6 20.7
		235	71.6	
		245	74.7	
		155	47.3	
		280	85.4	
3 ろ過法	428 370 344 262 502	170	39.7	CV% 59.6 26.7
		235	63.5	
		160	46.5	
		200	76.3	
		360	71.7	
4 ろ過法	343	70	20.4	CV% 27.4 15.2
		95	27.7	
		105	30.6	
		95	27.7	
		105	30.6	
5 ろ過法	381	190	49.9	CV% 44.4 14.4
		150	39.4	
		165	43.3	
		140	36.7	
		195	51.2	
5 遠心法	762	30	3.9	CV% 8.4 78.8
		120	15.7	
		20	2.6	
		115	15.1	
		35	4.6	
6 ろ過法	795	665	83.6	CV% 95.7 13.4
		935	117.6	
		745	93.7	
		725	91.2	
		735	92.5	
6 遠心法 参考値	795	250	31.4	CV% 34.2 41.5
		455	57.2	
		200	25.2	
		290	36.5	
		165	20.8	
7 ろ過法	560	110	19.6	CV% 9.5 108.3
		120	21.4	
		25	4.5	
		0	0.0	
		10	1.8	
8 ろ過法	416	340	81.7	CV% 83.7 11.4
		380	91.3	
		390	93.8	
		340	81.7	
		290	69.7	

試料2

機関番号 検査法	ディスク菌数 (菌数/5ml)	濃縮後の 菌数	濃縮後回 収率	平均回収 率
1 遠心法	4720	1385	29.3	CV% 39.3 18.4
		2010	42.6	
		2310	48.9	
		1855	39.3	
		1725	36.5	
1 ろ過法	4720	2550	54.0	CV% 55.7 7.5
		2635	55.8	
		2360	50.0	
		2715	57.5	
		2890	61.2	
2 ろ過法	2640	2430	92.0	CV% 88.1 14.9
		2530	95.8	
		2510	95.1	
		1710	64.8	
		2455	93.0	
3 ろ過法	3,510 2,810 2,620 2,690 4,790	2,075	59.1	CV% 55.4 24.6
		2,010	71.5	
		905	34.5	
		1,390	51.7	
		2,640	55.1	
4 ろ過法	2330	1205	51.7	CV% 53.8 3.6
		1215	52.1	
		1285	55.2	
		1255	53.9	
		1310	56.2	
5 ろ過法	4560	2420	53.1	CV% 73.4 24.2
		2925	64.1	
		4500	98.7	
		3100	68.0	
		3800	83.3	
5 遠心法	9120	370	4.1	CV% 9.5 49.8
		480	5.3	
		940	10.3	
		1155	12.7	
		1370	15.0	
6 ろ過法	3850	3150	81.8	CV% 101.6 13.7
		4400	114.3	
		4450	115.6	
		3750	97.4	
		3800	98.7	
6 遠心法 参考値	3850	415	10.8	CV% 19.8 42.5
		1225	31.8	
		495	12.9	
		805	20.9	
		875	22.7	
7 ろ過法	4200	1165	27.7	CV% 13.0 83.7
		160	3.8	
		885	21.1	
		355	8.5	
		160	3.8	
8 ろ過法	5040	4700	93.3	CV% 82.9 8.5
		3900	77.4	
		3800	75.4	
		4300	85.3	
		4200	83.3	

表3-2 酸または加熱処理後回収率

試料1

機関番号 検査法	濃縮後の 菌数	処理後 の菌数	処理後回 収率	平均回収 率
1 遠心法	390	85	21.8	10.0
	315	30	9.5	
	160	10	6.3	
	335	25	7.5	
	205	10	4.9	
1 ろ過法	545	150	27.5	32.0
	600	215	35.8	
	660	195	29.5	
	625	240	38.4	
	640	185	28.9	
2 ろ過法	210	135	64.3	63.0
	235	180	76.6	
	245	120	49.0	
	155	125	80.6	
	280	125	44.6	
2 ろ過法	160	90	56.3	64.9
	135	115	85.2	
	180	115	63.9	
	280	140	50.0	
	245	170	69.4	
4 ろ過法	70	0	0.0	0
	95	0	0	
	105	0	0	
	95	0	0	
	105	0	0	
5 ろ過法	190	0	0	0
	150	0	0	
	165	0	0	
	140	0	0	
	195	0	0	
5 遠心法	30	15	50	26.9
	120	15	12.5	
	20	0	0	
	115	50	43.5	
	35	10	28.6	
6 ろ過法	665	270	40.6	34.9
	935	425	45.5	
	745	250	33.6	
	725	190	26.2	
	735	210	28.6	
6 遠心法	250	100	40.0	49.5
	455	180	39.6	
	200	135	67.5	
	290	80	27.6	
	165	120	72.7	
6 ろ過法	665	580	87.2	81.6
	935	640	68.4	
	745	655	87.9	
	725	575	79.3	
	735	625	85.0	
6 遠心法	250	150	60.0	73.3
	455	305	67.0	
	200	210	105.0	
	290	205	70.7	
	165	105	63.6	
7 ろ過法	110	0	0.0	0.8
	120	5	4.2	
	25	0	0.0	
	0	0	0.0	
	10	0	0.0	
8 ろ過法	340	280	82.4	74.4
	380	360	94.7	
	390	140	35.9	
	340	400	117.6	
	290	120	41.4	

試料2

機関番号 検査法	濃縮後の 菌数	処理後 の菌数	処理後回 収率	平均回収 率
1 遠心法	1385	365	26.4	48.7
	2010	960	47.8	
	2310	1015	43.9	
	1855	1055	56.9	
	1725	1185	68.7	
1 ろ過法	2550	1255	49.2	46.0
	2635	1385	52.8	
	2360	1225	51.9	
	2715	830	30.6	
	2890	1325	45.8	
2 ろ過法	2430	1020	42.0	38.2
	2530	905	35.8	
	2510	795	31.7	
	1710	615	36.0	
	2455	1120	45.6	
2 ろ過法	1855	720	38.8	57.2
	1525	740	48.5	
	2115	1220	57.7	
	2100	1220	58.1	
	1565	1300	83.1	
4 ろ過法	1205	20	1.7	2.8
	1215	35	2.9	
	1285	25	1.9	
	1255	40	3.2	
	1310	55	4.2	
5 ろ過法	2420	415	17.1	15.3
	2925	265	9.1	
	4500	595	13.2	
	3100	655	21.1	
	3800	15.8		
5 遠心法	370	50	13.5	30.9
	480	125	26.0	
	940	310	33.0	
	1155	405	35.1	
	1370	640	46.7	
6 ろ過法	3150	1335	42.4	39.4
	4400	2005	45.6	
	4450	1770	39.8	
	3750	1290	34.4	
	3800	1325	34.9	
6 遠心法	415	210	50.6	53.4
	1225	435	35.5	
	495	300	60.6	
	805	465	57.8	
	875	545	62.3	
6 ろ過法	3150	3670	116.5	79.3
	4400	3250	73.9	
	4450	2950	66.3	
	3750	2545	67.9	
	3800	2740	72.1	
6 遠心法	415	355	85.5	86.7
	1225	930	75.9	
	495	335	67.7	
	805	785	97.5	
	875	935	106.9	
7 ろ過法	1,165	0	0.0	1.8
	160	5	3.1	
	885	25	2.8	
	355	100	0.0	
	160	5	3.1	
8 ろ過法	4700	2780	59.1	67.1
	3900	2860	73.3	
	3800	2900	76.3	
	4300	3020	70.2	
	4200	2380	56.7	