

表3 検査工程別回収率 (21年度)

		未処理	酸処理	熱処理
遠心法	試料 1	59.2(n=1)	20.9(n=6)	2.0 (n=4)
	CV%		76.1	130.7
	試料 2	44.5(n=1)	19.7(n=6)	6.0 (n=4)
	CV%		72.5	43.6
ろ過法	試料 1	55.0(n=8)	19.0(n=19)	8.0 (n=15)
	CV%	61.8	100.3	236.7
	試料 2	51.0(n=8)	21.0 (n=19)	6.9 (n=15)
	CV%	62.2	78.5	148.1

表4 2回の精度管理による回収率の比較

地研	濃縮法	処理法	試料 1 (10 ³ CFU/sample)				試料 2			
			19年度		20年度		19年度 (10 ⁵ CFU/sample)		20年度 (10 ⁴ CFU/sample)	
			回収率	CV%	回収率	CV%	回収率	CV%	回収率	CV%
1	遠心	加熱	0	—	2.6	96.7	11.1	61	19.4	34.8
2	ろ過	加熱	0	—	41.8	18.0	14.9	33.1	33.8	22.1
3	ろ過	加熱	0	—	5.2	73.8	6.4	15.7	2.0	25.6
4	遠心	酸	0	—	2.4	105	16.2	25	3.4	76.6
5	ろ過	加熱	0	—	33.8	34.5	21.8	40.3	40.1	21.0
平均			0		17.16	65.6	14.08	35.0	19.7	36.0

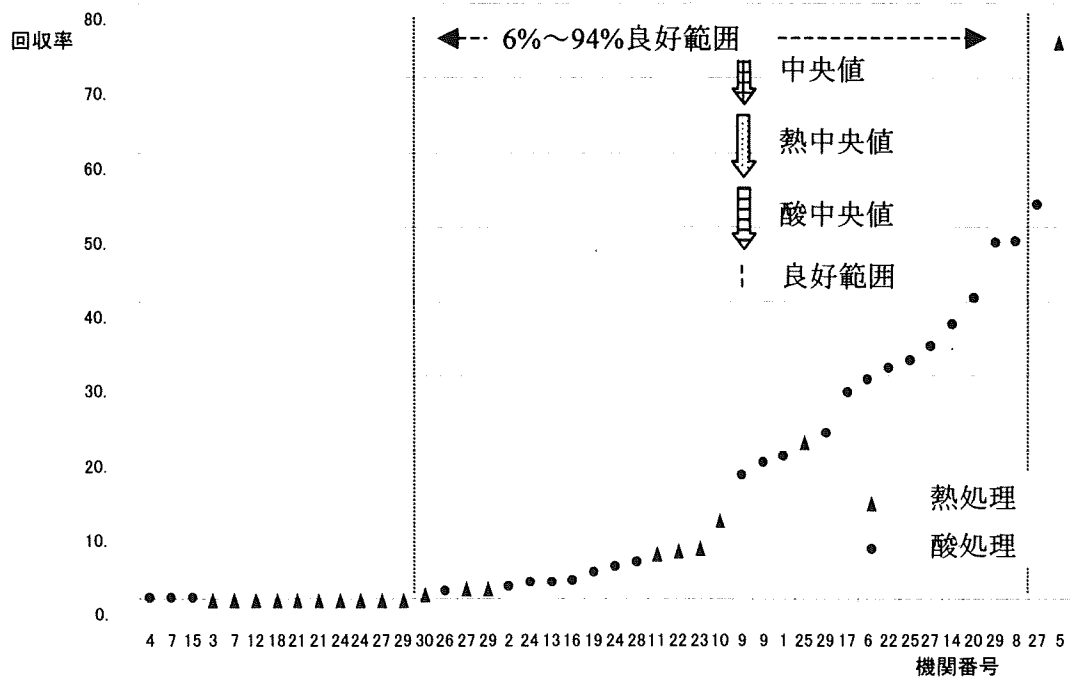


図 4-1 試料 1 の回収率の分布

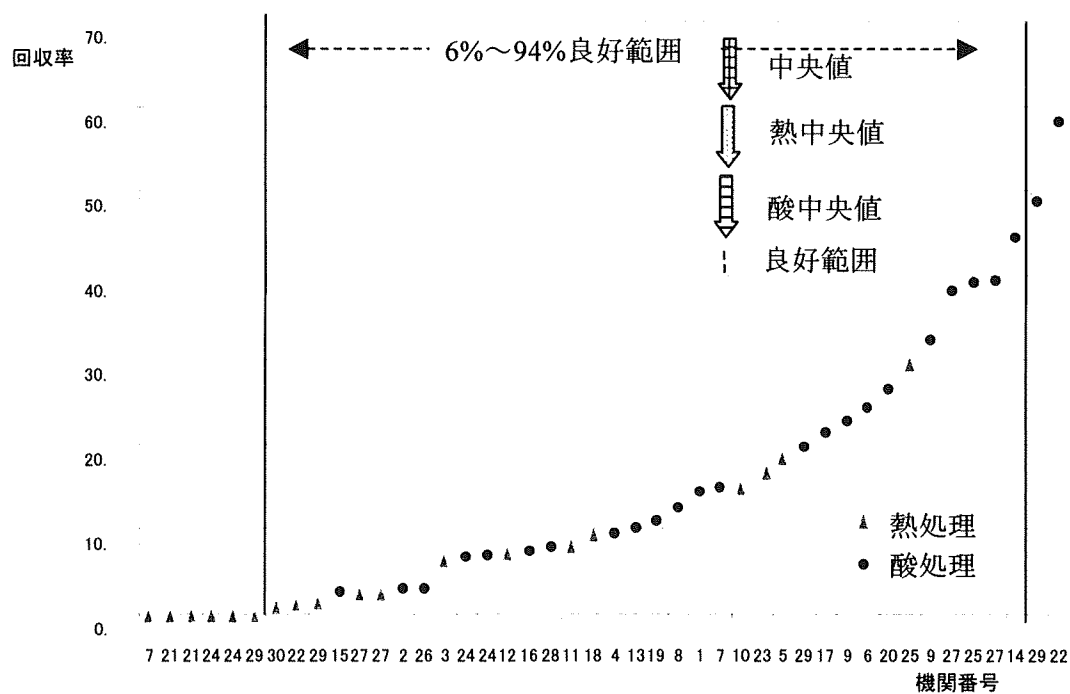


図 4-2 試料 2 の回収率の分布

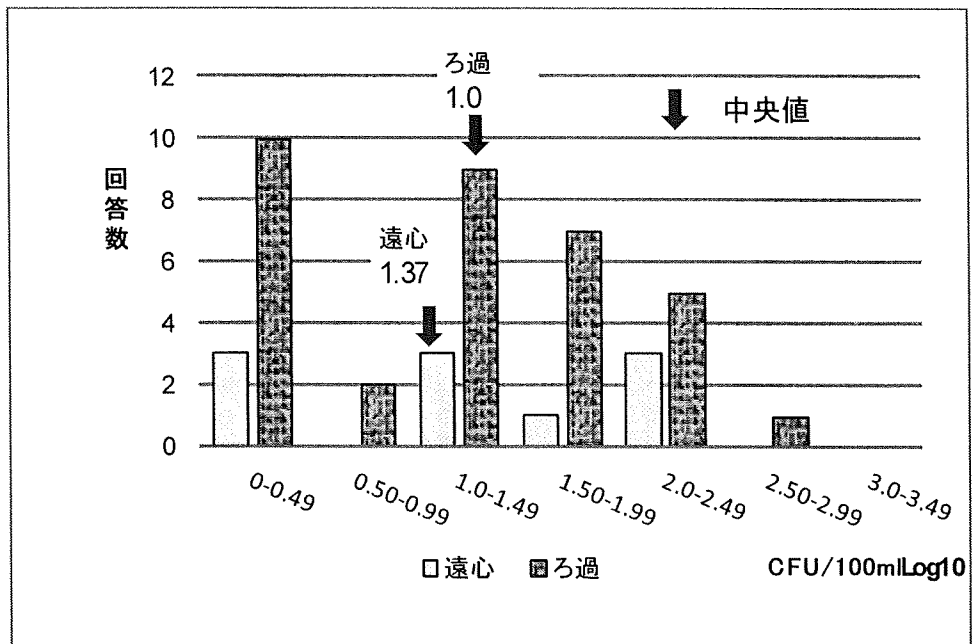


図5-1 試料1に対する濃縮法による分布

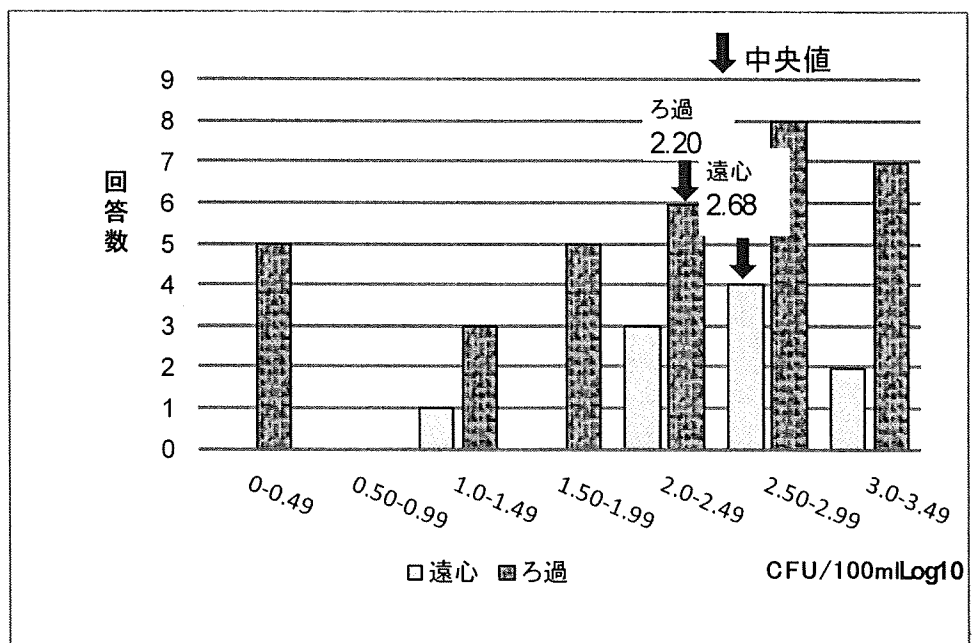


図5-2 試料2に対する濃縮法による分布

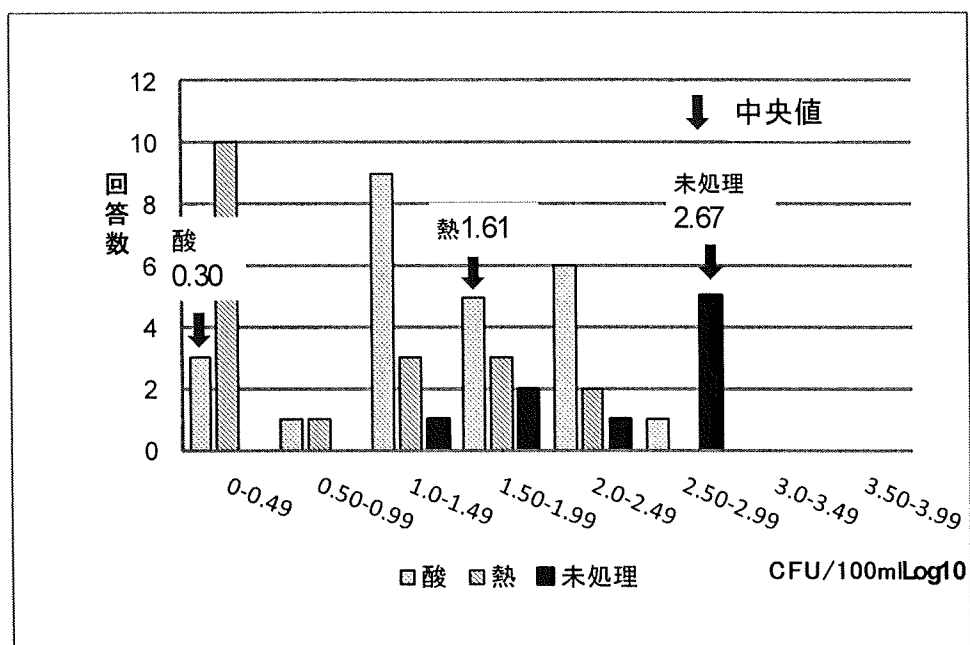


図 6 - 1 試料 1 に対する処理法による分布

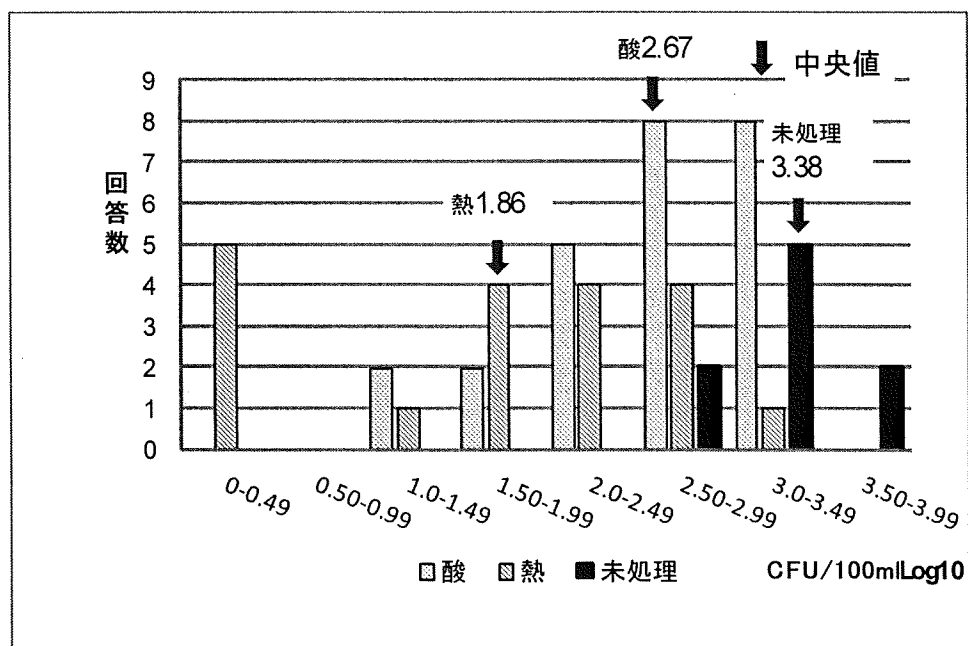


図 6 - 2 試料 2 に対する処理法による分布

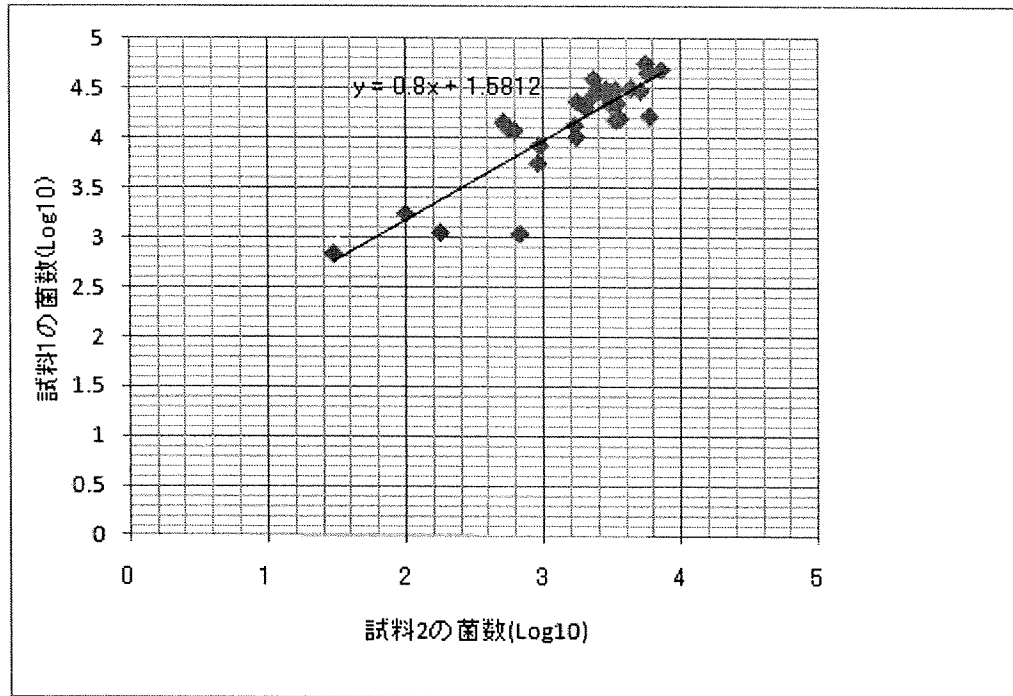


図7 試料1、2の菌数相関図

表2-1 菌数測定結果(19年度)

機関番号	濃縮法	処理法	試料1				試料2			
			⑤ゼラチン・ディスク溶解時の菌数 CFU/ml	⑧作製検水の菌数 CFU/100 ml *	⑦検水の菌数 CFU/100 ml	回収率 ⑦/⑧× 100	⑤ゼラチン・ディスク溶解時の菌数 CFU/ml	⑧作製検水の菌数 CFU/100 ml *	⑦検水の菌数 CFU/100 ml	回収率 ⑦/⑧× 100
1	遠心	熱	2430	486	0	0.0	283600	56720	22357	7.9
1	遠心	熱	2755	551	0	0.0	226800	45360	13179	5.8
1	遠心	熱	1700	340	0	0.0	284000	4720	16786	5.9
1	遠心	熱	2520	504	0	0.0	188800	4720	12250	6.5
1	遠心	熱	2685	537	0	0.0	193200	4720	10179	5.3
2	ろ過	熱	18200	3640	0	0.0	235000	4720	22917	9.8
2	ろ過	熱	6750	1350	0	0.0	446000	4720	74583	16.7
2	ろ過	熱	15000	3000	0	0.0	460000	4720	97917	21.3
2	ろ過	熱	11800	2360	0.5	0.0	590000	4720	58333	9.9
2	ろ過	熱	5500	1100	0	0.0	322000	4720	51250	15.9
3	ろ過	熱	5550	1110	0	0.0	510000	2640	66429	13.0
3	ろ過	熱	4950	990	0	0.0	660000	2640	36214	5.5
3	ろ過	熱	4250	850	0	0.0	390000	2640	11143	2.9
3	ろ過	熱	690	138	0	0.0	650000	2640	130714	20.1
3	ろ過	熱	2450	490	0	0.0	520000	2640	57857	11.1
4	遠心	酸	125	25	0	0.0	291000	2330	63189	21.7
4	遠心	酸	135	27	1	0.0	282000	2330	41529	14.7
4	遠心	酸	115	23	0	0.0	289000	2330	35043	12.1
4	遠心	酸	65	13	0	0.0	85000	2330	17200	20.2
4	遠心	酸	65	13	0	0.0	307500	2330	45986	15.0
5	ろ過	熱	9900	1980	1	0.1	328500	4560	114643	34.9
5	ろ過	熱	4850	970	0	0.0	366500	4560	45714	12.5
5	ろ過	熱	7750	1550	0	0.0	418000	4560	65714	15.7
5	ろ過	熱	5750	1150	0	0.0	530000	4560	135714	25.6
5	ろ過	熱	3500	700	0	0.0	409000	4560	86429	21.1

表 2-2 菌数測定結果 (20 年度)

機関 番号	濃縮法	処理法	試料1				試料2			
			⑤ゼラチ ン・ディス ク溶解時 の菌数 CFU/ml	⑧作製検 水の菌数 CFU/100 ml *	⑦検水の 菌数 CFU/100 ml	回収率 ⑦/⑧× 100	⑤ゼラチ ン・ディス ク溶解時 の菌数 CFU/ml	⑧作製検 水の菌数 CFU/100 ml *	⑦検水の 菌数 CFU/100 ml	回収率 ⑦/⑧× 100
1	遠心	熱	6050	1210	85	7.0	23600	4720	365	7.7
1	遠心	熱	6050	1210	30	2.5	23600	4720	960	20.3
1	遠心	熱	6050	1210	10	0.8	23600	4720	1015	21.5
1	遠心	熱	6050	1210	25	2.1	23600	4720	1055	22.4
1	遠心	熱	6050	1210	10	0.8	23600	4720	1185	25.1
1	ろ過	熱	6050	1210	150	12.4	23600	4720	1255	26.6
1	ろ過	熱	6050	1210	215	17.8	23600	4720	1385	29.3
1	ろ過	熱	6050	1210	195	16.1	23600	4720	1225	26.0
1	ろ過	熱	6050	1210	240	19.8	23600	4720	830	17.6
1	ろ過	熱	6050	1210	185	15.3	23600	4720	1325	28.1
2	ろ過	熱	1640	328	135	41.2	13200	2640	1020	38.6
2	ろ過	熱	1640	328	180	54.9	13200	2640	905	34.3
2	ろ過	熱	1640	328	120	36.6	13200	2640	795	30.1
2	ろ過	熱	1640	328	125	38.1	13200	2640	615	23.3
2	ろ過	熱	1640	328	125	38.1	13200	2640	1120	42.4
4	ろ過	熱	1715	343	0	0.0	11650	2330	20	0.9
4	ろ過	熱	1715	343	0	0.0	11650	2330	35	1.5
4	ろ過	熱	1715	343	0	0.0	11650	2330	25	1.1
4	ろ過	熱	1715	343	0	0.0	11650	2330	40	1.7
4	ろ過	熱	1715	343	0	0.0	11650	2330	55	2.4
5	ろ過	熱	1590	381	0	0.0	22800	4560	415	9.1
5	ろ過	熱	1590	381	0	0.0	22800	4560	265	5.8
5	ろ過	熱	1590	381	0	0.0	22800	4560	595	13.0
5	ろ過	熱	1590	381	0	0.0	22800	4560	655	14.4
5	ろ過	熱	1590	381	0	0.0	22800	4560		13.2
5	遠心	酸	3910	762	15	2.0	45600	9120	50	0.5
5	遠心	酸	3910	762	15	2.0	45600	9120	125	1.4
5	遠心	酸	3910	762	0	0.0	45600	9120	310	3.4
5	遠心	酸	3910	762	50	6.6	45600	9120	405	4.4
5	遠心	酸	3910	762	10	1.3	45600	9120	640	7.0
6	ろ過	熱	3975	795	270	34.0	19250	3850	1335	34.7
6	ろ過	熱	3975	795	425	53.5	19250	3850	2005	52.1
6	ろ過	熱	3975	795	250	31.4	19250	3850	1770	46.0
6	ろ過	熱	3975	795	190	23.9	19250	3850	1290	33.5
6	ろ過	熱	3975	795	210	26.4	19250	3850	1325	34.4
6	遠心	熱	3975	795	100	12.6	19250	3850	210	5.5
6	遠心	熱	3975	795	180	22.6	19250	3850	435	11.3
6	遠心	熱	3975	795	135	17.0	19250	3850	300	7.8
6	遠心	熱	3975	795	80	10.1	19250	3850	465	12.1
6	遠心	熱	3975	795	120	15.1	19250	3850	545	14.2
6	ろ過	酸	3975	795	580	73.0	19250	3850	3670	95.3
6	ろ過	酸	3975	795	640	80.5	19250	3850	3250	84.4
6	ろ過	酸	3975	795	655	82.4	19250	3850	2950	76.6
6	ろ過	酸	3975	795	575	72.3	19250	3850	2545	66.1
6	ろ過	酸	3975	795	625	78.6	19250	3850	2740	71.2
6	遠心	酸	3975	795	150	18.9	19250	3850	355	9.2
6	遠心	酸	3975	795	305	38.4	19250	3850	930	24.2
6	遠心	酸	3975	795	210	26.4	19250	3850	335	8.7
6	遠心	酸	3975	795	205	25.8	19250	3850	785	20.4
6	遠心	酸	3975	795	105	13.2	19250	3850	935	24.3
7	ろ過	熱	2800	560	0	0.0	21000	4200	0	0.0
7	ろ過	熱	2800	560	5	0.9	21000	4200	5	0.1
7	ろ過	熱	2800	560	0	0.0	21000	4200	25	0.6
7	ろ過	熱	2800	560	0	0.0	21000	4200	100	2.4
7	ろ過	熱	2800	560	0	0.0	21000	4200	5	0.1
8	ろ過	酸	2080	416	280	67.3	25200	5040	2780	55.2
8	ろ過	酸	2080	416	360	86.5	25200	5040	2860	56.7
8	ろ過	酸	2080	416	140	33.7	25200	5040	2900	57.5
8	ろ過	酸	2080	416	400	96.2	25200	5040	3020	59.9
8	ろ過	酸	2080	416	120	28.8	25200	5040	2380	47.2

表2-3 菌数測定結果 (21年度)

機関 番号	濃縮法	処理法	試料1				試料2			
			⑤ゼラチン・ディスク溶解時の菌数 CFU/ml	⑧作製検水の菌数 CFU/100 ml *	⑦検水の菌数 CFU/100 ml	回収率 ⑦/⑧× 100	⑤ゼラチン・ディスク溶解時の菌数 CFU/ml	⑧作製検水の菌数 CFU/100 ml *	⑦検水の菌数 CFU/100 ml	回収率 ⑦/⑧× 100
1	遠心	酸	7300	1460	280	19.2	49000	9800	2800	28.6
2	ろ過	酸	3100	620	10	1.6	29000	5800	170	2.9
3	ろ過	熱	950	190	0	0.0	8400	1680	110	6.5
4	ろ過	酸	680	136	0	0.0	1070	214	20	9.3
5	ろ過	熱	100	20	15	75.0	1700	340	63	18.5
6	ろ過	酸	560	112	33	29.5	12600	2520	610	24.2
7	ろ過	酸	30	6	0	0	670	134	20	14.9
7	ろ過	熱	30	6	0	0	670	134	<10	0
8	ろ過	酸	520	104	50	48	14400	2880	360	12.5
9	ろ過	酸	2050	410	75	18.3	20136	4027	1302	32.3
9	ろ過	酸	2250	450	75	16.7	19454	3891	881	22.6
10	ろ過	熱	5150	1030	110	10.7	30000	6000	900	15
11	遠心	熱	4400	880	55	6.3	32000	6400	525	8.2
12	遠心	熱	3400	680	0	0	15125	3000	220	7.3
13	ろ過	酸	5800	1160	25	2.2	45500	9100	915	10.1
14	遠心	酸	1760	352	130	36.9	10250	2050	910	44.4
15	ろ過	酸	1780	360	0	0	23250	4650	120	2.58
16	ろ過	酸	2232	440	10	2.3	25000	5000	370	7.4
17	ろ過	酸	180	36	10	28	1100	220	47	21
18	遠心	熱	2550	520	0	0	30400	6080	500	8.3
19	ろ過	酸	1710	342	12	3.5	13400	2680	292	10.9
20	遠心	酸	3470	694	280	40.3	22600	4520	1200	26.5
21	ろ過	熱	2900	580	0	0	31000	6200	0	0
21	ろ過	未処理	2900	580	45	7.8	31000	6200	690	11.1
21	ろ過	熱	3700	740	0	0	22000	4400	0	0
22	ろ過	未処理	2990	598	422	70.6	25700	2984	3277	63.8
22	ろ過	酸	2990	598	186	31.1	25700	2984	2984	58.1
22	ろ過	熱	2990	598	40	6.7	25700	2984	72	1.4
23	ろ過	熱	6000	1200	85	7.1	16600	3320	505	15.2
23	ろ過	未処理	6000	1200	590	49.2	16600	3320	2225	67
24	遠心	酸	2300	460	20	4.35	17850	3570	240	6.72
24	ろ過	熱	2300	460	0	0	17850	3570	0	0
24	ろ過	熱	3650	730	0	0	15800	3160	0	0
24	遠心	酸	3650	730	15	2.05	15800	3160	215	6.8
25	ろ過	未処理	2350	470	330	70.2	39500	7900	4850	61.4
25	ろ過	酸	2350	470	150	31.9	39500	7900	3090	39.1
25	ろ過	熱	2350	470	100	21.3	39500	7900	2343	29.7
26	ろ過	酸	5600	1120	10	0.89	57000	11400	340	2.98
26	ろ過	未処理	5600	1120	30	2.67	57000	11400	315	2.76
27	ろ過	未処理	3400	680	0	8.97	30900	6180	281	4.5
27	ろ過	未処理	2950	590	33	5.6	23200	4640	245	5.3
27	ろ過	酸	3400	680	36	5.3	30900	6180	226	3.7
27	ろ過	酸	2950	590	20	3.4	23200	4640	177	3.8
27	ろ過	熱	3400	680	1	0.1	30900	6180	15	0.2
27	ろ過	熱	2950	590	0	0	23200	4640	12	0.3
28	ろ過	酸	925	185	9	48.6	5550	11100	88	79.3
29	ろ過	未処理	627	125	114	90.3	11790	2358	2419	105
29	ろ過	酸	627	125	60	47.8	11790	2358	1146	48.6
29	ろ過	熱	627	125	0	0	11790	2358	0	0
29	遠心	未処理	627	125	74	59.2	11790	2358	1050	44.5
29	遠心	酸	627	125	28	22.4	11790	2358	464	19.7
29	遠心	熱	627	125	2	1.6	11790	2358	38	1.6
30	ろ過	熱	3100	620	5	0.8	22000	4400	45	1

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

1 送付したもの

- セラムチューブ 2本 (試料1、試料2:ゼラチン・ディスク各2枚、各1枚は予備のため使用しません)

注意:到着後、すぐに菌数検査を行わない場合には、試料を凍結保存(できれば、 -35°C 以下)してください。

- PBS 試薬 (1袋)

2 方法

準備するもの

希釈 PBS 溶液: 当所から送付した PBS 試薬の全量を蒸留水 1,000ml に溶解し、原液とする (保存の場合は滅菌)。蒸留水で 50 倍希釈し、滅菌後検水や希釈液に使用する。

検水用ボトル: 希釈 PBS500ml 入り滅菌ボトル 2 本。

培地: 通常検査に使用しているレジオネラ属菌検査用培地。

その他貴所で菌数測定やレジオネラ属菌検査に使用している器材。

検査方法

- ① 滅菌試験管に希釈 PBS 溶液を 10ml 分注し、ふ卵器等でレジオネラの培養温度に保温しておく。
- ② 当所から送付したディスク各 1 枚をピンセット等を使用して①の希釈 PBS 溶液に入れる。(試験管の壁に付くことがあるので希釈 PBS 溶液中に完全に入ったことを確認する。)
- ③ ふ卵器等でレジオネラの培養温度に 10 分程度保温し、ディスクを溶解させる。
- ④ ふ卵器から出して 10 秒程度ボルテックス等で、ディスクが完全に溶解するまで攪拌する。(ディスクが透明のため見にくいので完全に溶解していることを確認してください。)
- ⑤ 試料 1 は、その溶液を平板 2 枚に各 0.1ml 接種し、さらに 1 段階 (10^{-1})、試料 2 は 2 段階 ($10^{-1\sim 2}$) まで希釈を行い菌数を測定する。→菌数測定

⑥ 用意しておいた希釈 PBS 溶液 500ml 入りボトル 2 本にそれぞれ④のディスク溶解液を 1ml 接種し、よく攪拌したものを検水とする。(試料 1、2 各 1 本の検水を作製)

⑦ 貴所で通常行っているレジオネラ検査の方法で検水の菌数を測定する→**菌数測定**

⑧ 回答用紙に⑤⑦の菌数測定結果を記入する。記入用紙の枠がありますが貴所での検査結果記載に合わない場合は修正してください。また検査方法やご意見等についても記入をお願いします。

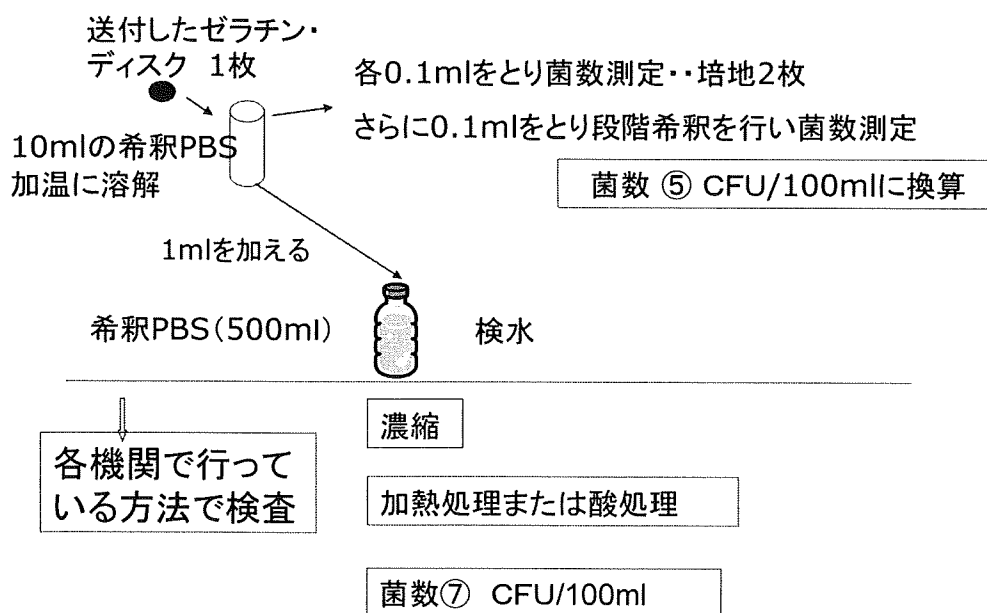
3 注意事項

- (1) ⑤⑦の菌数測定を行う際には、同じ種類の培地を使用してください。
- (2) ディスクは、溶解の際、均一に溶解するため必ず加温してください。
- (3) ディスク溶解後は、速やかに検査を行ってください。

4 検査結果の送付

検査結果はメールにて 10月30日(金)までに送付をお願いします。

菌数測定法



菌数測定結果記入用紙（地研用）

検査機関名 _____

○ 黄色欄以外は適宜修正して記入してください。

濃縮法: _____

酸・加熱処理法: _____

試料1

‡ Dゼラチン・ディスク溶解時の菌数

希釈倍率	試料 1	
原液		
10 ⁻¹		
平均		
菌数 CFU/100ml		

‡ F検水の菌数

希釈倍率	試料 1	
平均		
菌数 CFU/100ml		

‡ G作製検水の菌数

菌数 CFU /100ml	
回収率	
‡ F‡ G1000	
	%

試料2

‡ Dゼラチン・ディスク溶解時の菌数

希釈倍率	試料 2	
10 ⁻¹		
10 ⁻²		
平均		
菌数 CFU/100ml		

‡ F検水の菌数

希釈倍率	試料 2	
平均		
菌数 CFU/100ml		

‡ G作製検水の菌数

菌数 CFU /100ml	
回収率	
‡ F‡ G1000	
	%

○ 備考

菌数測定方法記入票

検査方法等について	回答(例)	回答
1:検査機関名	神奈川県衛生研究所	
2:担当者名	渡辺祐子	
3:メールアドレス		
4:ディスクの到着日時	2009/2/15	
5:検査開始までの保存方法	冷凍庫保存(-40℃)	
6:検査日	2009/2/25	
7:検水量(ml)	500ml	
8:検水作製容器材質	ガラス	
9:濃縮法 a:ろ過法 b:冷却遠心法	a	
a:ろ過法		
素材 1.ポリカーボネート 2.ニトロセルロース 3.その他()	1	
ポアサイズ 1.0.2μm 2.0.4μm 3.その他(μm)	1	
ホルダーの材質	ガラス	
b:冷却遠心法		
回転数	6000rpm 4000g	r pm g
遠心時間	20分	分
上槽の除去方法 1.デカンテーション 2.ピペッティング 3.その他()	1	
C:回収方法を具体的に記載してください	遠心後希釈PB S5 mlを加えピペッティング5回後デカンテーション	
10:濃縮倍率	100倍	倍
再浮遊量	5mL	mL
11:雑菌処理法 a:加熱処理 b:酸処理 c:加熱、酸処理併用 d:その他	c	
a:加熱処理		
加熱時間	分	分
加熱温度	℃	℃
b:酸処理		
酸処理時間	分	分
酸処理液 自家製 市販品(メーカー)	日生研	
c:加熱後酸処理		
加熱処理温度	50℃	℃
加熱処理時間	20分	分
酸処理時間	4分	分
d:その他の処理方法		
12:使用培地		
培地名	WYO	
培地メーカー	栄研化学	
13:特記事項、ご意見等(裏面もご利用ください)		

別添3

平成22年2月26日

衛生研究所長 殿
レジオネラ検査担当者 殿

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」
研究代表者 国立感染症研究所
細菌第一部 倉 文明

レジオネラ属菌外部精度管理試行の結果について

初春の候、皆様方におかれましては、ますますご清祥のこととお慶び申し上げます。
日ごろから精度管理試行に御協力いただきありがとうございます。また、外部精度管理の試行への参加をはじめ、質問メール等に対して御丁寧なお答えをいただき、心から感謝しております。

皆様からお送りいただいた検査結果を集計いたしました。これらの結果を基に今後とも外部精度管理システムの構築に向けて検討を重ねていきたいと考えておりますので、引き続き御協力をお願いいたします。

つきましては、今後の外部精度管理の構築の資料にさせていただきたいと思っておりますので、御提案や御助言等がございましたら、お忙しいところ恐縮ですが下記へ御連絡いただきますよう、お願いいたします。

問い合わせ、連絡先
神奈川県衛生研究所 微生物部
渡辺祐子
電話 0467-83-4400 内 7017
watanabe.nfa0@pref.kanagawa.jp

【1】参加機関

ディスク配付機関 30カ所 (民間検査機関7カ所、衛生研究所23カ所)
 回答機関 30カ所 (回答率100%)
 回答数 53 (複数回を含む)

【2】配付ディスク菌数

「発送前」菌数は、精度管理試料として発送する前に感染研 (感染研へは「ゆうパック」チルドで輸送) と神奈川衛研で測定を行いました。「発送後」菌数は、各機関でディスクを溶解後測定した結果を集計しました。「参考値」は、各機関への発送と同時にゆうパックで神奈川衛研宛発送し、到着日時を2日後に指定し、到着後-40℃に20日間保存後菌数測定をしました。

「発送後」は、「発送前」と比較して40~50%程度菌数が減少し、ばらつきが認められました。

配付ディスク菌数 CFU/ml

試料番号	発送前		発送後*		参考値**	
	菌数(n=10)	CV%	菌数(n=30)	CV%	菌数(n=5)	CV%
試料1	5.29 × 10 ³	19.6	2.64 × 10 ³	75.5	2.99 × 10 ³	28.5
試料2	5.41 × 10 ⁴	16.3	2.14 × 10 ⁴	67.5	2.57 × 10 ⁴	15.1

* : 参加機関の集計 ** : -40℃20日後測定値

【3】作製検水からのレジオネラ検出数と回収率

各機関で作製した検水からの検出数と回収率のうち濃縮後未処理の菌数と回収率を除いた結果です。(n=44)

作製検水からのレジオネラ検出数と回収率

	試料1		試料2	
	菌数CFU/100ml	回収率(%)	菌数CFU/100ml	回収率(%)
平均値	55.9	13.8	609.2	14.6
中央値	13.5	3.9	266.0	8.8
範囲	0~360	0~75	0~3090	0~58.1

【4】検査工程による回収率(%)の違い

検査工程のステップごとに回収率を見ると、全体としては遠心法とろ過法は同程度であり、酸・加熱処理を行うことで回収率は低下し、ばらつきが大きくなっています。また、処理を行っ

た場合は加熱処理より酸処理の方が明らかに回収率が高くなりました。しかし、ディスクから作製した検水は、酸処理に比較して熱処理の回収率が低下することが HPA（Health Protection Agency）から報告されていること、また、今回作製していただいた検水での検査は雑菌の影響を受けないことから、今回の結果を直ちに実際の検体に適用することはできません。酸処理法と熱処理法のどちらを採用するかは、試料の種類や雑菌の汚染状況等により異なります。そのため、今回の精度管理調査で熱処理法を実施して回収率が悪かったことのみを理由に処理方法を変更することは避けてください。今回の結果は、採用している検査法での回収率を向上させるための基礎データとして考えてください。

濃縮法、処理法ごとの回収率

濃縮法		未処理(%)	酸処理(%)	熱処理(%)
遠心法	試料 1	59.2(n=1)	20.9(n=6)	2.0 (n=4)
	CV%		76.1	130.7
	試料 2	44.5(n=1)	19.7(n=6)	6.0 (n=4)
	CV%		72.5	43.6
ろ過法	試料 1	55.0 (n=8)	19.0(n=19)	3.0 (n=14)
	CV%	61.8	100.3	180.8
	試料 2	51.0(n=8)	21.0 (n=19)	6.9 (n=15)
	CV%	62.2	78.5	148.1

【5】 回収率の分布

今回の検査結果の集計は、レジオネラ属菌の濃縮法や、酸・加熱処理法など検査条件が機関ごとに異なり評価が複雑になるため、回答のあった測定値をすべて集計し、HPA に準じて中央値、機関の測定値の 6% から 94% の範囲を「良好範囲」として示しました。

濃縮後未処理の回収率を除いた試料 1、2 の回収率を低い順に示すとともに、今回処理法により回収率に大きな差が認められたため、全体の中央値以外に熱・酸処理法別の中央値もあわせて示しました。

回答数は、複数の処理法を実施した機関があるため n=44 となりました。良好範囲外は、試料 1 が 15（11 機関）、試料 2 が 8（5 機関）でした。

【6】検査方法の集計

- 1 ゆうパックの到着までの期間 (n=30 機関)
 - 1 日後 (翌日) 2 7 機関
 - 2 日後 3 機関
- 2 ディスク到着後保存温度 (n=30 機関)
 - 80℃ 1 2 機関
 - 40℃ 7 機関
 - その他 1 9 機関
- 3 ディスク到着日から検査開始までの保存期間 (n=30 機関)
 - 1 日 (翌日) 7 機関
 - 1 9 日間 4 機関
 - 5 日、6 日間 各 3 機関
 - その他 (最長 2 4 日間) 1 3 機関
- 4 検水量 (n=30 機関)
 - 500ml 2 2 機関
 - 200ml 4 機関
 - 1000ml 2 機関
 - その他 2 機関
- 5 検水作製容器 (n=30 機関)
 - ガラス 1 5 機関
 - ポリプロピレン 8 機関
 - ポリプロピレン以外のプラスチック 7 機関
- 6 フィルター材質 (n=25 機関)
 - ポリカーボネート 1 1 機関
 - ニトロセルロース 1 0 機関
 - その他 4 機関
- 7 ホルダー素材 (n=26 機関)
 - ガラス 1 2 機関
 - ポリサルフォン 6 機関
 - その他のプラスチック 5 機関
 - ステンレス+ガラス 1 機関
- 8 フィルター ポアサイズ (n=24 機関)
 - 0.2 μ m フィルター 1 7 機関
 - 0.4 μ m フィルター 7 機関
- 9 フィルターからの回収方法 (n=10 機関)
 - フィルターを再浮遊液に入れボルテックスで 1 分間 剥離洗浄 7 機関

- フィルターを再浮遊液に入れ手振り 10 分 1 機関
 フィルターを再浮遊液に入れストマッカー処理 2 機関
- 1 0 冷却遠心法 (回転数・時間) (n=7 機関)
- 4350rpm (3000g)・30 分 1 機関
 - 6000rpm (3000g、6100g、6693g)・30 分 3 機関
 - 6000rpm (5403g)・20 分 1 機関
 - 7000rpm・30 分 1 機関
 - 10000rpm・30 分 1 機関
- 1 1 冷却遠心後の上清の除去方法 (n=6 機関)
- デカンテーション 6 機関
- 1 2 沈差の回収方法
- 遠心後再浮遊液を加えピペッティング 5 回、デカンテーション 1 機関
 - 遠心後再浮遊液を加えボルテックス 5 機関
- 1 3 濃縮倍率 (n=30 機関)
- 100 倍 2 5 機関
 - 50 倍 3 機関
 - 200 倍 2 機関
- 1 4 再浮遊量 (n=30 機関)
- 5 ml 1 9 機関
 - 2 ml 4 機関
 - 1 0 ml 4 機関
 - 1 ml、4 ml、1 5 ml 各 1 機関
- 1 5 加熱処理 (n=7 機関)
- 加熱時間 20 分 6 機関、30 分 1 機関
 - 加熱温度 50°C 7 機関
- 1 6 酸処理 (n=17 機関)
- 4 分、5 分 各 5 機関
 - 1 5 分、2 0 分 各 2 機関
 - 3 ~ 5 分、7 分、1 4 分 各 1 機関
 - 処理液 自家製 9 機関、購入品 8 機関
- 1 7 培地
- WYO α 1 0 機関
 - GVPC 1 0 機関
 - MWY 3 機関
 - BCYE α GVPC 2 機関
 - BCYE α MWY 1 機関

【7】まとめ

- 今回のレジオネラ属菌検査結果の集計は、HPAの方法を参考に、検査結果の中央値と6から94%の範囲を「良好範囲」として示しました。
- 加熱処理をした場合、回収率が低く出る傾向が認められた影響もあり、全体的に回収率は低い結果となりましたが、昨年度の回収率は、良好なものはろ過法・酸処理で69.9% (n=10)、最も悪かった遠心法・加熱で9.1% (n=10)でした。(試料濃度は、今回と同様の 10^4 CFU/デリス)
- 回収率は、試料の保存期間や保存温度等による影響は認められませんでした。
- 全体としては遠心法とろ過法の回収率は同程度であり、加熱処理より酸処理の方が高い回収率を示しましたが、酸処理方法が実際の検体でも高い回収率を示すかについては検討が必要と考えられます。
- 19年度から20年度にかけて、一部の検査工程を指定して5機関で2回の外部精度管理を行ったところ回収率が試料1では0%から17.7%へ、試料2では、14.1%から19.7%に改善が認められたので、その濃縮方法を次に示します。この他にも工程の改善により回収率の向上が期待できると考えています。
- また、外部精度管理システムの構築に向けて改善を進め、実用化の方向性を探っていきたいと思います。

回収率を改善するためのポイント（濃縮法）の例をあげました。

培養検査のポイントは、濃縮後、菌の再回収を効率よく行うことにかかっています。

ろ過法

- ろ過ホルダーにフィルターが適切にセットできますか。
できればフィルターは、ポリカーボネート製でポアサイズ $0.2\mu\text{m}$ を使用してください。
回収率がニトロセルロース製フィルターの3倍位高くなるとの報告があります。
今回の結果でも回収率は $0.2\mu\text{m}$ フィルターを使用した酸処理と比較すると、
試料1 ポリカーボネート製 38.6% (n=5)、ニトロセルロース製 8.9% (n=8)
試料2 ポリカーボネート製 39.3% (n=5)、ニトロセルロース製 14.0% (n=8)
となっています。
- 検水ろ過後、検水容器に滅菌蒸留水などを入れて、キャップを堅く閉めた後、よく振り容器の内壁を洗い、洗浄液もろ過する。この操作を2回繰り返す。
- ろ過ホルダーにはピペットで勢いよく滅菌蒸留水をかけて洗い、一緒にろ過する。
- フィルターのろ過部分に触れないようピンセットで注意深くフィルターを外し、5mlの滅菌蒸留水に浸し、1分間ボルテックスをかけ再浮遊させる。
今回の回答の中には、1分間ボルテックスをかけ再浮遊させる代わりにストマッカーを利用している機関も2カ所ありました。

遠心法

- 冷却遠心機の点検を行っていますか。
- 遠心終了直後に静かに遠心管を取り出し、ピペットで静かに上清を取り除く。
- 遠心管に滅菌蒸留水を 1ml 加え、ピペッティングを繰り返し、管壁をよく洗う。
さらに 1ml を加え、さらに管壁をピペッティング操作で 50 回以上繰り返し洗い、沈渣を別の容器に移す。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表