

りの試料を 37°C で 18 時間培養後、100 μ L を新しい 1.5mL 滅菌済みチューブに分取して（増菌後試料 Ct(18h)）、解凍した Ct(0h)とともに RNA 抽出に供した。各試料 100 μ L に RNA 抽出液 400 μ L（5 M NaCl 10 μ L、10 % Triton X-100 25 μ L、100 mM DTT 25 μ L、20 mg/mL Proteinase K 2.5 μ L、および TE buffer 337.5 μ L）を添加した後、55°C \times 60 分間反応させた。95°C \times 10 分間の加熱で Proteinase K を不活化させた後、15,000rpm \times 5 分間遠心分離した上清 50 μ L を、あらかじめ 200 μ L の TE 緩衝液を分注したマイクロチューブに加えて RT 反応用の RNA 希釈液とした。

逆転写反応は PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa Code RR037A) を使用した。氷上で RT Master Mix 5 μ L（6 μ M Reverse Primer 2.5 μ L、5 \times PrimeScript Buffer 2.0 μ L、RT Enzyme Mix I 0.5 μ L）と RNA 希釈液 5.0 μ L を混合し、42°C \times 15 分間反応させた。85°C \times 5 秒間で逆転写酵素を失活させた後、15 μ L easy dilution (TAKARA kit に添付) を加えた混合液の 5 μ L を qPCR 反応の鋳型 DNA とした。

qPCR 反応はレジオネラ属菌測定用リアルタイム PCR キット (Cycleave PCR Legionella Detection Kit (5S), タカラバイオ, CY210) を用いた。マスターミックスを調製し (2 \times Cycleave Reaction Mixture 12.5 μ L、5S Primer/Probe Mix 5 μ L、dH₂O 2.5 μ L)、分注した反応チューブに抽出 DNA 試料 5 μ L を加えて、リアルタイム PCR 測定装置 Thermal Cycler Dice® Real Time System TP900 で測定した。PCR 条件は 95°C \times 10 秒間の前反応ののち、95°C \times 5 秒間、55°C \times 10 秒間、72°C \times 20 秒間を 1 サイクルとして 45 サイクル反応させ

た。

- 4) 検量線の作成とレジオネラ生菌の定量：
Legionella pneumophila SG1 長崎 80-045 株を BCYE α 寒天培地で 30°C 4 日間培養後、生理食塩水を用いて約 McFarland 1 程度 (3.0×10^8 cfu/mL) に懸濁した菌液を 7 段階 10 倍希釈して 5 段階目 (約 3.0×10^2 cfu/mL) と 6 段階目 (約 3.0×10 cfu/mL) の希釈菌液を得た。各希釈液 100 μ L をそのまま (未処理)、及び酸処理後に BCYE α 寒天培地に接種して、それぞれ未処理 (Ct(0h)用) および酸処理 (Ct(18h)用) の生菌数として計数した。前述した 1~7 段階の希釈液各 100 μ L を 5) の酸処理以降と同様に処理して、Ct(0h)と Ct(18h)を測定した。Ct(0h)と未処理生菌数、Ct(18h)値と酸処理生菌数により検量線を作成し、試料の Ct 値をもとに $\Delta CT = Ct(18h) - Ct(0h) \geq 1.0$ を超える試料を生菌と判定して、得られた値をレジオネラ生菌定量値とした。
- 5) 検量線の比較：RNA 用検量線は 2 度作成して繰り返し再現性を検証した。比較対象として、検出キット添付の DNA プラスミドを用いて添付説明書どおりに DNA 用検量線を作成すると共に、H21 年度に作成したカラム抽出 DNA を用いて作成した検量線を引用した。
- 6) フィールド調査：長崎県内 8 施設の 34 浴槽水 (塩化物泉 14、炭酸水素塩泉 7、白湯 (水道水、井水) 13) を対象として、レジオネラ属菌培養法と LC qRT-PCR 法の結果を比較した。対象施設の衛生管理方法は 28 浴槽水が循環ろ過式で塩素消毒がなされており、塩化物泉のうち 6 浴槽水が掛け流し式で消毒はなされていなかった。

C. 研究結果及び考察

- 1) 検量線について

1 回目、2 回目共に Ct(0h)と Ct(18h)およびそれぞれの未処理(0h)と酸処理後(18h)の生菌数から得られた検量線 (No1_CT(0h)、No1_CT(18h)、No2_CT(0h)、No2_CT(18h)という)はそれぞれ高い直線性を示し(図 1 a)、未処理と酸処理の Δ Ct 間に 1.5 程度の幅が認められ(図 1 a)、昨年度¹⁾の報告とほぼ同じ結果であった。しかし、2 回作成した RNA 用検量線は一定ではなかった(図 1 a)。一方で、並行して作成した検出キット添付の DNA プラスミドを用いた DNA 用検量線、および H21 年度のカラム抽出 DNA で作成した検量線は、ほぼ一致していた(図 1 b)。これらのことから、RNA 用検量線は DNA 用検量線と比べてバラツキが大きいことが示され、RNA 用検量線の作成方法に課題が残った。

2) フィールド調査成績

LC-qRT-PCR の培養法定性結果に対する感度と特異度はそれぞれ 85.71%と 92.59%で昨年度報告¹⁾と同等の成績であり、想定していた生菌検出を実践できていたと考えられた(表 1)。しかし、定量値は培養検査より低い傾向にあった(表 2, 図 2)。両者の直線性が高く、定性的な結果が優れていたことから判断すると、菌の液体培養や抽出方法に大きな問題があったとは考えづらい。前述のとおり、RNA 用検量線の不安定さから定量に系統誤差が生じたか、あるいは、浴槽水の多くは塩素消毒がなされていたことから損傷菌の回復に時間を要して培養後の定量値が低くなった可能性が考えられた。

LC-qRT-PCR 法の、定性結果が培地法結果とほぼ一致し、定量性に課題があったことは、昨年度検討した細胞膜透過性を指標とする EMA-qPCR の成績²⁾と類似していた。細胞膜透過性であれ、増菌能であれ、生菌を標的にすることで培養検査を反映する結果が得られたことは遺伝子検査の実用性向上にとって好ましいと言える。一方でその定量値の低さは、培養法

と完全な相関が得られない問題を残すと考えられたが、LC-qRT-PCR 法の培養検査に対する寄与率の高さや(図 2)、定性結果に問題が少ないことから、LC qRT-PCR 法が培養より迅速な試験法として使用可能と期待している。

供試試料数が少ないことから、培養法と LC 法の相関を明らかにするには、今後の測定値の蓄積が必要と考えられた。

D. まとめ

- ・レジオネラ生菌を標的とした定量 PCR 法はレジオネラの培養検査と定性的に高い相関があり、実地検査における有用性は高い。
- ・RNA 用検量線の作成方法に課題があり、定量値に系統誤差の生じる恐れが考えられた。

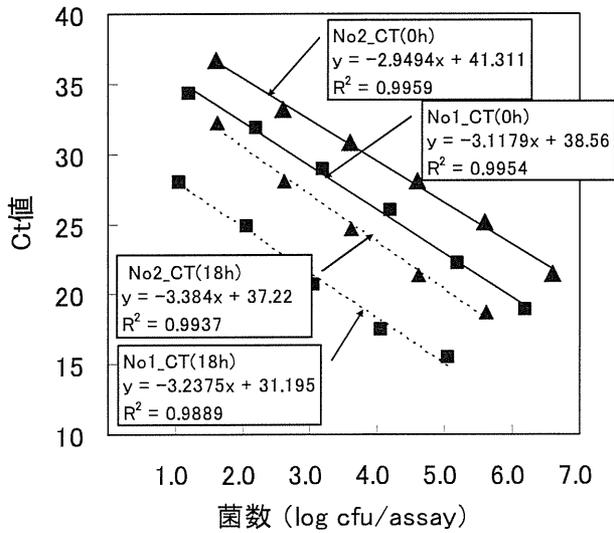
E. 参考文献

- 1) 遠藤卓郎, 鳥谷竜哉, 泉山信司, 浅野由紀子; 液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR を用いたレジオネラ属菌迅速検出法の検討, 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 21 年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 倉 文明, p.23-32(2010)
- 2) 遠藤卓郎, 田栗利紹, 泉山信司; 浴槽水を対象にした各種遺伝子検査法成績の比較, 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 21 年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 倉 文明, p.49-55(2010)

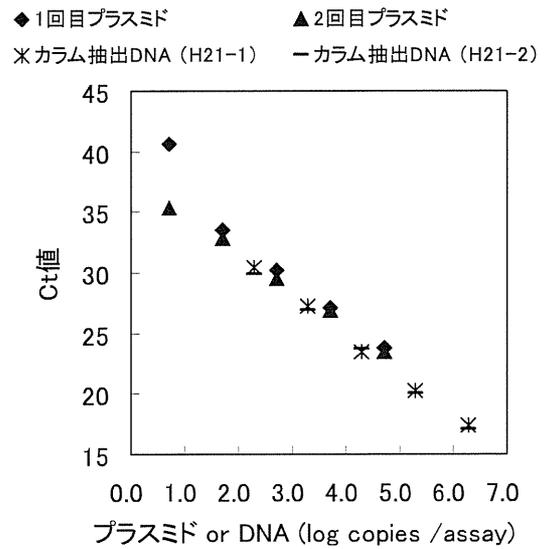
F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的所有権の取得状況 なし



(a) qRT-PCR(標的=RNA)



(b) qPCR(標的=DNA)

図1 検量線の比較

表1 定性結果の比較

N=34	培養法	
	陽性	陰性 [※]
LC-qRT-PCR	7	27
≥ 10cfu/100mL	8	6
< 10cfu/100mL	26	1

LC-qRT-PCRの培養法に対する感度85.71%, 特異度92.59%

※培養法の陰性は<10cfu/100mL

表2 陽性検体定量値の比較

	培養法	LCqRT-PCR
レジオネラ属菌陽性数	7	8
最大値(logcfu/100mL)	3.58	2.34
幾何平均(logcfu/100mL)	1.94	1.53

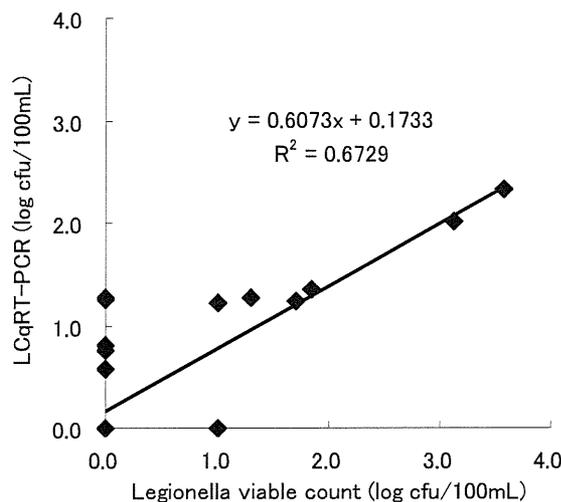


図2 培養検査と液体培養定量RT-PCRの
相関

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)
公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究

平成 22 年度分担研究報告書

レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討
ーレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループの発足
及び地方衛生研究所を対象としたレジオネラ属菌検査法アンケート調査結果ー

研究分担者	○森本 洋	北海道立衛生研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	中島 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	金子 紀子	山形県衛生研究所
	矢崎 知子	宮城県保健環境センター
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所
研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所
研究分担者	前川 純子	国立感染症研究所

研究要旨

レジオネラ属菌検査については、行政検査機関と民間検査機関によって、その結果が大きく異なるとの指摘がなされていた。これに伴い、平成 21 年度生活衛生関係技術担当者研修会においても「検査法の確立」と「行政・民間の精度管理のあり方」についての質問がなされ、厚労省は、「今後の厚生労働科学研究において研究していきたいと考えている。」と回答した。これらを受け、本年度からの調査研究を開始した。

まず地方衛生研究所のレジオネラレファレンスセンターを中心メンバーとしたレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(WG)を発足し、これまでの精度管理の検証を含めた今後の方向性(考え方、検査法、評価法等)の検討を3回にわたって行った。今年度の中心的事業として、精度管理および標準的な検査法等の方向性を適切に判断するための一助として、本WG内で作成したアンケートを基に、全国 77 か所の地方衛生研究所に対しレジオネラ属菌検査方法の実態調査による行政機関の検査状況把握を行った。検査法は、これまでも SOP の基となる文献が多数あること、各文献で記載されている内容が異なる場合があること、また、検査工程については検査者自身によって選択の幅があることが指摘されていた。全体として、本実態調査結果においても同様の傾向が見られ、検査工程のバラつきが認められた。これは、未研修で検査を導入している施設が多数あったこと、標準とする検査法が示されていないことが理由と思われるが、このことが施設間での検査精度に影響を与えている可能性も考えられた。また、検査工程のバラつきは、精度管理を実

施する上で影響を及ぼす可能性も考えられる。民間検査施設に対しても同様の傾向が言えると思われる、これまでに研修システムを確立していないまま、官民間問わず検査できる施設が長年に渡り広く普及してしまっている現状がうかがえる。よって、標準的な検査法の整理と提示、研修システムの構築、精度管理の 3 点を柱とし、行政・民間を問わず検査精度の安定に向けた取り組みを進める必要があると思われる。

A. 研究目的

レジオネラ属菌検査については、行政検査機関と民間検査機関によって、その結果が大きく異なるとの指摘がなされていたが、平成 21 年度生活衛生関係技術担当者研修会においても『施設の自主検査で「不検出」、保健所の行政検査で「検出」となり、検査結果が不一致となることがある。また、レジオネラ属菌の「ろ過濃縮法」の検査法で、フィルター孔径により検出菌数に差が出るとの話も聞く。「検査法の確立」と「行政・民間の精度管理のあり方」について御教示願いたい』との質問が出された。この質問に対し、厚労省は、『検査法や精度管理のあり方について、今後の厚生労働科学研究において研究していきたいと考えている。』と回答した。これらを受け、本年度からの調査研究を開始した。

B. 研究方法

1)レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下 WG)の発足:厚労科研内で行っていた昨年度までの精度管理事業の成果を踏まえ、これまでの精度管理の検証を含めた今後の方向性(考え方、検査法、評価法等)の検討を広く行うため、地方衛生研究所のレジオネラレファレンスセンターを中心メンバーとした WG を発足した。

<WG 会議概要>

第 1 回 WG 会議

開催日時:平成 22 年 8 月 26 日(木曜日)
9 時~12 時

場 所:国立感染症研究所

内 容:以下の課題についての認識・整理・提示。1. 精度管理の検討(①過去の精度管理の検証、②実施方法の検討(試料作製方法、輸送方法、検査法など)、③評価方法の検討)、2. アンケート実施の検討(内容及び調査方法)、3. 検査法の標準化に向けた検討(斜光法の普及を含む)、4. 今後の展開(方向性、研修事業についてなど)。

第 2 回 WG 会議

開催日時:平成 22 年 10 月 28 日(木)9 時~29 日(金)18 時

場 所:北海道立衛生研究所

内 容:これまでの精度管理についての検証及びレジオネラ検査法の実態調査結果に基づいた今後の精度管理等方針の検討(実際の実験室内での操作法の検証を含む)

第 3 回 WG 会議

開催日時:平成 23 年 1 月 18 日(火曜日)
10 時~12 時

場 所:国立感染症研究所

内 容:実態調査結果から判明した検査導入に係る問題点から見えた研修制度の重要性について。標準的検査法について。今後の精度管理等方針の検討。

2)地方衛生研究所に対するレジオネラ属菌検査の実態調査:精度管理および標準的な検査法等の方向性を適切に判断するための資料作成の一助として、レジオネラ属菌検査に関する実態調査(WG 作成によるアンケート形

式・設問 88:別途添付)を全国 6 ブロックのレジオネラレファレンスセンター協力のもと、全地方衛生研究所(77 か所)に対し行った。

<実施方法>

①第 1 回 WG 終了後、アンケート調査票の作成開始。②平成 22 年 9 月 29 日、全国 6 か所のレジオネラレファレンス担当者へアンケート調査協力依頼。(メール施行:レファレンス担当者、各地衛研検査担当者宛協力依頼文及びアンケート調査票添付)。③レジオネラレファレンス担当者から各ブロック内レジオネラ検査担当者宛の協力依頼文及びアンケート調査票の送付(メール施行)。④検査担当者がアンケート回答を各レファレンス担当者へ返信(締め切り日:平成 22 年 10 月 14 日)。⑤レファレンス担当者が各ブロック内アンケート回収後、北海道立衛生研究所まで送信(締切日:平成 22 年 10 月 15 日)

C. 研究結果及び考察

1)平成 19 年度から 21 年度に行われ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)「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」で検討された精度管理において、その考察とまとめの中でいくつかの課題点が報告されている¹⁾。

1. 民間検査機関に対して精度管理への参加協力を求めたが、P2 施設を持たない機関については、病原体であるレジオネラ属菌を発送することは、精度管理実施機関の微生物環境安全管理要領に抵触するため協力希望があったとしても、参加できなかった。

2. 試料用ディスク配布後の菌数にバラつきがあったことから、発送から測定結果を得るまでの工程で何らかの影響を受けた可能性が示唆

された。

3. 試料測定結果を見ると、その回収率に著しい差異が認められた。特に酸処理法に比べ、加熱処理を行うことによる低下が著しかった。回収率低下要因の究明を行うとともに、ディスク法に代わる新たな標準試料作製や疑似検体作成の検討など、両方からアプローチしていく必要があると考えられた。

4. 結果については、HPA(Health Protection Agency)の評価方法に準じて集計し、中央値、「良好範囲」(n=44 6%から 94%の範囲)としたが、回収率が 0%のものが多かった試料 1 では n=44 中 15(34.1%)、試料 2 では n=44 中 8(18.2%)が良好範囲外となり、かなりの割合を占めた。また、今回のように全体的に低い回収率となった場合、試料 1 では回収率 52.9%以上が、試料 2 でも回収率 48.6%以上が「良好範囲外」として評価されてしまうなど、高い回収率だと「良好範囲外」とされることから、この集計方法をそのまま採用して良いものか、再考が必要と考えられた。

5. 回収率のバラつきの大きさが課題であるため、検査方法の詳細検討により回収率悪化の主原因を究明するとともに、各機関における検査工程の統一や検査担当者の研修制度等により回収率と検査精度の向上を図っていくことが重要である。

6. 今後とも検査工程の精査検討による回収率の向上とともに、各機関における的確な検査の実施の基礎となる外部精度管理システムを早急に確立していく必要があると考える。

これらのことを十分に考慮し、WG 内で検討した結果、行政・民間を問わずレジオネラ属菌検査精度の安定を図るためには、検査機関の施設整備状況と検査に対する認識について(バイオハザード、バイオセーフティー対応を

含む)、標準的な検査法について(現状検査法の再確認を含む)、研修制度について、精度管理について(配布試料、精度確認のための検査法、評価法の検討など)、以上のことを適宜確認、検討、実行していく必要があるとの認識に至った。そこで、これらを推進するための方向性を適切に判断する一助として、全国の地方衛生研究所に対するレジオネラ属菌検査実態調査を行った。

2)レジオネラ属菌実態調査結果を以下に示す。アンケートは全国 77 の地衛研に配布し、74 か所から回収された。ある地衛研では、密な連携のもと検査を行っている保健所分の結果も示したことから、のべ回答としては 75 となった。10 月 15 日の締め切り日時点では、64 か所からの回答であったことから、10 月 28、29 日に行った、第 2 回 WG 会議では 64 か所の回答を参考にした。残る 11 か所の回答については、11 月 15 日に回収された。全アンケート結果を設問ごとに表(一部コメントを含む)にし、別途添付した。基本的にはアンケートへの記載表現に準じて対応した。設問への認識の違いから、解釈が難しい回答もあったが、可能な限りそのまま記載した。しかしながら、回答(例)、回答、コメントの総合的な判断により、一部集計上の調整(例:記載コメントが回答例と全く同じだったが、選択番号が異なっていた場合は回答例に従うなど)を行った。なお、設問 1~3(回答機関名、担当者名、メールアドレス)については、集計から除外した。

1. 設問 4~7

回答のあった 74 自治体すべてがレジオネラ属菌検査対応可能と報告していた。しかしながら、冷却塔水や噴水のみに対応とした施設や、過去 3 年以上検査実績がなく、検査法について詳細記載ができないとした施設もあり、

その検査体制には施設ごとに温度差があることがうかがわれた。自治体によっては検査を地衛研単独、保健所単独、外注検査機関へ依頼、またこれら複数施設で検査体制を整備し、状況により適宜対応している所もあった。複数施設で検査体制を整備している自治体では、施設間での検査法を同じとした所と、違うとした所に同程度に分かれた。委託検査機関に対し、地衛研の検査フローに従い検査することを契約条件としている自治体もあった。しかしながら、検査法が違うとした施設も半数近くあったことから、このことが検査結果に影響する可能性も示唆された。回答のあった 71 施設中 55 施設(約 77%)が、未研修でレジオネラ属菌検査を導入と回答していた。新版、第 3 版レジオネラ症防止指針には、『新たにレジオネラの検査を導入する場合にはレジオネラ研究施設に少なくとも 3 か月は研修し、技術、知識、観察力、判定能力、バイオハザードの観念等を身につけなければならない』^{2, 3)}と記載されている。しかしながら、約 77%の施設が未研修で検査を導入していることが分かった。このことは、自施設の検査導入根拠に防止指針を掲げている場合、その根拠が揺らぐこととなるばかりでなく、行政機関として、民間に対する指導的な立場を考慮すると厳しい状況に成り得る可能性があると思われる。参考図書から独自に導入した施設では、レジオネラ症防止指針(旧・新・第 3 版)が最も多かった。次いで、病原体検査マニュアル(感染研)が多かった。

2. 設問 8~16

公衆浴場施設からの自主検査依頼(依頼検査)に対応している自治体は、74 自治体中 21 自治体(約 28%)であり、7 割以上の自治体では、自主検査に対応していない状況であった。今回のアンケートでは、レジオネラ症感染源と

して最も報告数の多い公衆浴場に絞り込んでの回答を求め、地衛研からのアンケート回答を参考に、最終的には行政・民間を問わず、安定した検査精度が図れるようにするための標準的な検査法や精度管理法を模索するために、自主検査依頼に対応していない施設に対しても、それと想定しての回答を求めた。しかしながら、施設によっては想定による回答は難しいとのコメントもあり、結果、全体として行政検査対応にかなり近い回答として集計された感がある。

採水については、検査依頼元に行ってもらう自治体が多かったが、その際、採水ボトルは自治体で準備し、注意事項の説明を踏まえ、依頼元へ送付又は手渡ししている場合が多かった。残留塩素の中和対応を行っている施設も75施設中69施設(92%)と多かったが、行政・依頼検査、依頼元・検査機関による採水に関係なく、滅菌採水ボトルの準備、中和処理やボトル満杯まで採水しないなどの注意事項に留意した適切な状況下で採水が行われる必要がある。一方で、採水量にはいくつかの回答があったことから、検査に供する量の違いや予備用の保存に対する認識の違いが影響していると思われる。採水日から検査開始までの時間については、搬送時間にも左右されるので確定できない場合もあると思われるが、施設ごとに可能な限り迅速に対応していると思われる。しかしながら搬送温度について、75施設中20施設(約27%)が室温と回答していた。新版、第3版レジオネラ症防止指針では、6～18℃と記載されている^{2,3)}。室温は季節によって大きく左右されることから、特に採水から検査開始までの時間等の状況によって注意が必要と思われる。採水日から検査開始までの時間について行政検査では、特に迅速性が求め

られることから祝・休日での対応も一般的に行われることがあると思われるが、自主検査等の依頼検査においては、依頼元との事前の日程調整により、適宜対応する必要があると思われる。検体搬入後の保存温度については、低温下(新版防止指針では0～6℃²⁾、第3版では4℃未満(保存が4～8℃と記載されている³⁾ことから))での保存は、容器壁に付着したレジオネラ属菌が培養不能になったり死滅する可能性が高いと記載されている。また、20℃以上では他の細菌が増殖する^{2,3)}との記載があることから、検体搬入後から検査開始までの時間を十分に考慮し注意する必要がある。

3. 設問 17

濃縮法については、75施設中基本的にろ過法が49施設(約65%)、冷却遠心法が26施設(約35%)と約3分の2の施設がろ過法と回答していた。

4. 設問 18～27:ろ過法と回答した49施設

検水量は36施設(約73%)が500mL、10施設(約20%)が1000mLと回答した。300mL、400mLと回答した施設も各1施設あった。フィルターの素材については、ポリカーボネート製が30施設(約61%)とセルロース系フィルターとした19施設(約39%)より多かった。同じポアサイズだと、浮遊物が多い場合フィルターの構造上セルロース系フィルターの方がろ過速度が速いことが多い。しかしながら昨年度までの厚労科研報告書¹⁾において、ポリカーボネート製フィルターの方がニトロセルロース製フィルターよりも回収率が高いとの報告がなされている。ポリカーボネート製フィルターは、均一な表示径の円筒状直孔を持つスクリーンタイプのフィルターであり、低吸着性であるため、セルロース系フィルターに比べ捕集した物質が剥がれやすいためと考えられる。このフ

フィルター素材の違いが検査結果に影響を与えている一つと考えられる。フィルターのメーカーはアドバンテック社とミリポア社が大半を占めた。ポリカーボネート製フィルターを観察すると光沢がある平滑な面と光沢がない面があるのが分かる。セルロース系統では表・裏が指定されている。今回のアンケートでは、フィルターの表・裏を統一していない施設が15施設(約31%)あったが、このことは検討する余地があると思われる。ポアサイズについては、新版、第3版レジオネラ症防止指針には $0.22\mu\text{m}$ または $0.45\mu\text{m}$ と記載されている^{2,3)}。このようにポアサイズに倍の違いがあると、検査現場ではその選択に困ることが多い。今回のアンケートでは、基本的に $0.2\sim 0.22\mu\text{m}$ を使用しているのが30施設(約61%)、 $0.4\sim 0.45\mu\text{m}$ が19施設(約39%)だった。 $0.45\mu\text{m}$ 使用による捕集ロス进行想定し、 $0.22\mu\text{m}$ を選択する施設が多かったと思われる。これらポアサイズの違いがどこまでレジオネラ属菌の検出率に影響を与えているのかの検証が必要と思われる。検査現場では、限られた時間内で浮遊物の多い少ないにかかわらず多数の検体を処理しなければならない場合もある。浮遊物が多い場合やろ過時間を考慮した場合、 $0.4\sim 0.45\mu\text{m}$ を選択した方が検体処理効率が良い。検体の種類や状況に応じ、検出率とのバランスを考慮する必要があると思われる。今後に向け十分な検討を要するポイントであると思われる。検体ろ過後のフォルダーの洗浄回収作業については、行っていない施設(29施設:約59%)が行っている施設(20施設:約41%)を上回った。洗浄方法についてはいくつかの報告があったが、より検出率を上げるためには必要な作業工程であると思われる。特に事例対応における行政検査では効果的な作業工程である。しかし

ながら、自主検査等の依頼検査において、多数の検体処理を進めていく場合では、作業工程が増えるため処理に時間を要し、作業が煩雑になることも想定される。状況に応じて検査の組み立てが必要と思われる。フィルター洗浄については、方法、洗浄時間等、各施設で検出率を上げるための工夫が認められた。これまでも、フィルターに捕集されたレジオネラ属菌を効率的に回収する方法が検討されてきた。このことは検体の状況(浮遊物の多少等)やフィルターの材質を含めた総合的な検討が必要と思われる。標準となる方法とさらに回収率を上げるための方法の検討と提示が必要であると思われる。

5. 設問 28~33: 基本的に冷却遠心法を利用している26施設と状況に応じ利用している7施設の計33施設

検水量は26施設(約79%)が200mL、5施設(約15%)が400mL、2施設(約6%)が100mLと回答した。遠心加速度は6000g以上と回答した施設数(22施設:約67%)が3000~6000g未満とした施設数(11施設:約33%)を上回った。第3版の防止指針には3000g(通常5000~7000rpm)と記載されている³⁾。3000~6000g未満とした11施設でも3000gとコメントしたのは3施設(約9%)だけであった。冷却遠心器は機種によって加速度、回転数どちらでも設定できるものと、回転数のみ設定できるものがある。一般的に前者の方が高価であるため、後者を導入している施設も多数あると思われる。実際レジオネラ属菌の検査に限れば、新版の防止指針には、遠心加速度の指定がなく回転数(5000~7000rpm)²⁾しか指定されていないため後者の機種で6000rpmでの設定使用も多いと思われる。第3版でも3000gは通常5000~7000rpmと記載されているため、

引き続き回転数での設定使用が一般的であったと思われる。今回、6000rpm で使用している遠心加速度を見ると、4800g～約 6762g と記載されており、3000g が通常 5000～7000rpm とされる記載と大きなズレがあった。これは使用機種、ロータの違いで想像以上に回転数設定値から導かれる加速度に幅があった結果だと思われる。7000rpm で約 4820g、約 6000g、9000rpm で約 3380g との記載もあったことから同じことがうかがえる。また、10000rpm で 15660g、約 15876g、約 19000g で使用しているとの回答もあった。本アンケートでは遠心加速度 3000g～19000g までその使用状況に大きな幅があったが、今後 3000g を推奨するのであれば、施設ごとに設定の調整が必要である。しかしながら、この遠心加速度の違いがどこまで検査結果に影響しているかは検証する必要がある項目かもしれない。浮遊物や汚れの影響、菌体への影響を考慮し、設定値に幅を持たせる事も視野に入れながらの検討が必要と思われる。その場合、遠心時間も併せて考慮する必要があると思われる。冷却設定温度は、新版、第 3 版の防止指針で 15～25℃^{2, 3)} と記載されている。本アンケートではコメント内容を含めると少なくとも 19 施設(約 58%)は 10℃以下で使用していると回答し、19 施設中 11 施設は 4℃と回答した。しかしながら、この設定温度の違いがどこまで検査結果に影響しているかは不明な点が多いと思われる。標準的な方法を提示する場合においては、防止指針に従うか、設定幅を広げるかの検討が必要と思われる。上清の除去方法については、デカンテーションと回答した施設(23 施設:約 70%)が最も多かった。残る 10 施設(約 30%)はピペッティングやアスピレーションによるものであった。この上清除去は検査結果に影響を与えている工

程の一つだと思われる。沈渣をロスなく残し上清を除去することは大変難しい作業と思われる。特にデカンテーションでは難しい作業であり、ピペッティングやアスピレーションでもロスなく上清を全て除去することは、同様に難しい作業であると思われる。本工程においては工夫とより慎重な手技が必要と思われる。上清除去後の洗浄回収作業については、コメントに記載した施設ごとに工夫した報告がなされていた。重要な作業工程の一つであることから、標準的な方法を示す場合においては、十分な検討の上、提示する必要があると思われる。

4. 及び 5. で濃縮法についてのアンケート結果を示した。我々は、以前、濃縮法の違いが検出菌数及び陽性検出率に大きな影響を及ぼす可能性を報告している⁵⁾。冷却遠心濃縮法の場合、遠心時間が一定であり、多数の検体処理に適している。しかしながら、遠心終了時及び終了後の遠心管移動における振動による沈渣の再浮遊や、沈渣とならなかったレジオネラ属菌の付着した浮遊物の存在、さらにはデカンテーションやピペッティング操作などの上清除去時に沈渣を損失する可能性があるなど、一連の濃縮工程で菌体の回収に大きな影響があるものと思われる。一方、ろ過濃縮法では、検体によりろ過時間が予測しづらいことやろ過に長時間を要することがあり、多数の検体を同時に、迅速に処理できない場合がある。また、ろ過フィルターの種類や菌体を回収するためのろ過フィルターの洗浄方法に注意を要する。しかしながら、菌体を捕集することにより効率的な濃縮が可能であると思われる。このように両濃縮法の特徴が、レジオネラ属菌の検出菌数や陽性検出率に影響しているものと思われる。どちらの濃縮法を選択するかは、検査機関の器材、検査件数などの要因に影響され

と思われるが、どちらの濃縮法でもレジオネラ属菌の検出精度に違いが生じないように手法を工夫する必要があると思われる。

6. 設問 34～41

濃縮倍率は、100 倍とした施設が回答のあった 74 施設中 54 施設(約 73%)と最も多かった。50 倍とした施設も 10 施設(約 14%)あった。「濃縮」については、非濃縮を含め別で記載する。前処理方法は、その他と回答した施設のコメント内容を加味した結果、酸処理を第一前処理法として選択している施設が回答のあった 74 施設中 40 施設(約 54%)あり、加熱処理を第一前処理法と選択した 10 施設(約 14%)より多かった。また複数の処理を常時行っていると報告した施設が 23 ヶ所(約 31%)あった。酸や加熱を第一前処理法と回答した施設でも、夾雑菌等の状況に応じ、別の処理を加えている施設が複数あった。常時複数の処理を回答した施設では、どの前処理条件が適当か予測できないため、各単独で未・熱・酸処理を実施とした施設が 8 ヶ所あった。同じ理由で酸・熱処理を実施とした施設が 10 ヶ所あった。「前処理」は酸や加熱処理が一般的であるが、まったく処理をしない未処理(無処理)という考え方があり。未処理の有効性については、昨年度までの厚労科研報告書⁴⁾において報告した。酸や熱処理は、試料中に混在する夾雑菌を抑制するために必要な処理である。しかしながら、それら前処理によりレジオネラ属菌がダメージを受け、検出されにくくなる場合も考えられる。例えば、湯口より上流部の温泉水や清掃消毒後の浴槽水等、比較的夾雑菌の混在が少なくまたレジオネラ属菌数も少ない可能性がある場合の試料に対しては、未処理を併用することが特に有効であると思われる。試料中にレジオネラ属菌が存在していても、すべての前処

理(未・酸・熱)条件から同等にレジオネラ属菌が検出されるわけではない。精度の高い検査を行うためには、すべての前処理を行うことが望ましいと思われる。新版の防止指針「1. 3 接種」の項目にもこれら 3 種の前処理による培地への接種が記載されている²⁾。標準的な方法を提示する場合には、依頼検査対応を考慮し、これら前処理についても十分に検討した記載表現が必要と思われる。加熱処理を常時または必要に応じ行っている施設は回答のあった 74 施設中 39 施設(約 53%)あり、その全てが 50℃で処理をしていると回答した。加熱時間については、20 分 23 施設、25 分 1 施設、30 分 15 施設だった。この時間の違いがどこまで検出結果に影響を与えているかは不明であるが、新版の防止指針の図では 20 分、文章上では 30±2 分²⁾、第 3 版の防止指針では 30 分³⁾とあり記載にバラつきがある。標準的な方法を提示する場合には注意が必要と思われる。酸処理を常時または必要に応じ行っている施設は回答のあった 74 施設中 66 施設(約 89%)あり、その全てが 0.2M HCl・KCl 液 pH2.2 で処理をしていると回答した。その酸処理液は、大きく自家製、市販品使用に分かれた。酸処理時間は 4 分(26 施設)、5 分(22 施設)とした回答が多かったが、幅を持たせている施設もあった。本アンケートでの最短は 3 分、最長は夾雑菌が多い場合での 40 分だった。新版の防止指針の図では 4 分、文章上では 5～20 分、処理時間は共存するレジオネラ属菌以外の微生物の量により異なる²⁾、第 3 版の防止指針では図では 5 分、文章上では共存するレジオネラ属菌以外の微生物の量が多いと予想される場合には 20 分まで処理時間を延長してもよいと記載³⁾されている。しかしながら、自主検査依頼に対応する時、例えば複数の異なった施設

から多数の検査依頼を受けた場合、共存するレジオネラ属菌以外の微生物の量を予想することは難しく、また検体ごとに処理時間を変えることは作業工程が煩雑になり対応が困難な場合が往々にしてあると思われる。標準的な方法を提示する場合には、依頼検査対応を考慮した記載表現が必要と思われる。酸処理温度は一般的な室温付近(25℃前後)がほとんどであったが、2施設が35℃と回答していた。35℃とした理由は記載されていなかった。

7. 設問 42～43

検体を接種する分離培地の種類で単独での使用が最も多かったのは、回答のあった74施設中GVPCの20施設(約27%)、次いでWYO α の16施設(約22%)、MWYの6施設(約8%)だった。しかしながら、複数の分離培地を利用している場合が最も多く28施設(約38%)あった。その組合せで最も多かったのはWYO α とGVPCで13施設あった。次いでMWYとBCYE α の6施設だった。分離培地を3種類利用しているとした施設も4カ所あり検出率を上げる工夫がなされていた。選択分離培地については、新版、第3版の防止指針にも記載されている^{2, 3)}が、それぞれの培地に特徴があり、試料からの分離に対し優劣をつけることはできない。このことについては、昨年度までの厚労科研報告書⁴⁾においても報告した。実際の浴槽水を使用し同条件で検出結果を比較したが、レジオネラ属菌の陽性率、検出菌数、検出種類についてはそれぞれ特徴があり、精度の高い結果を得るには、1種類の選択分離培地では対応することができず、複数の選択分離培地を組み合わせることが必要であった。混在する夾雑菌への対応を考慮すると、酸や熱による前処理同様、選択分離培地の使用は必須であるが、培地中の選択剤がレジオネラ

属菌にも影響を与えていることが新版の防止指針にも記載²⁾されている。そこで昨年度までの報告書の中では、非選択培地であるBCYE α の分離培地としての活用法を検討し、選択分離培地とBCYE α の併用が効果的であると報告した⁴⁾。分離培地の使い方が、レジオネラ属菌の検出結果に影響を与えている場合があると思われるが、標準的な方法においては、自主検査等の依頼検査対応に必要な精度を十分検討し、慎重に提示する必要があると思われる。使用培地は試薬を調合し全て自家製で対応している施設はなく、市販生培地か、市販基礎培地にサプリメントを加えての対応であった。

8. 設問 44～47

検体接種については、濃縮検体のみを扱っている施設は9施設(12%)と最も少なく、非濃縮と濃縮検体の接種が21施設(28%)、濃縮検体と濃縮後希釈検体の接種が45施設(60%)あった。検査検体については、平成12年、当時の厚生省からの通知文⁶⁾に、「ろ過濃縮か遠心濃縮法で行うこと」とあり、濃縮検体のみを検査に供するようにも読み取れる記載となっている。その後、平成15年に公衆浴場における衛生等管理要領等の改正があり、検査法については、『また、その具体的手順は、「新版レジオネラ症防止指針」の「<付録>1環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること』⁷⁾という一文が加えられた。しかしながら、新版レジオネラ症防止指針には、「1.2 検水採取とその処理(4)濃縮」で「レジオネラ属菌数が 10^2 CFU/100ml未満と推定される時は検水を濃縮する。」、「1.3 接種」で、「菌数を予測できないので、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査する。」²⁾と記載されている。このことは病原体検出マニュアル⁸⁾の「1. 分離 4) 環境水から

のレジオネラの検出法」にも記載されている。また、昨年度までの報告書⁴⁾においても非濃縮検体の重要性を報告している。非濃縮検体を扱っていない施設においては、厚生省からの通知文が影響している可能性も示唆され、実際通知文に基づいた条例が作成されているため、濃縮検体しか検査することができず、手技の工夫措置として、濃縮検体を希釈し接種している施設もある。しかしながら、希釈検体の扱いは、処理工程が増えることによる検出ロスにも繋がる可能性があり、また非濃縮検体と同じところまで希釈するなど矛盾が生じている場合もある。今後は、幅広く検査を行うことができるような表現が、厚労省からの通知文に記載されることが望まれる。この非濃縮検体や濃縮後希釈検体の接種時期について、濃縮検体と同時としたところが66施設中51施設(約77%)、濃縮検体での培養状況に応じてとの回答が15施設(約23%)あった。再検査を想定しての各種検体の保存を行っている所は、回答73施設中66施設(約90%)と、保存していないとした7施設(約10%)を大きく上回った。保存しているとした66施設中65施設(約98%)は冷蔵保存、1施設(約2%)は冷凍保存であった。前述「2. 設問 8～16」でも触れたているが、検体搬入後の保存温度については、低温下(新版防止指針では0～6℃、第3版では4℃未満(保存が4～8℃と記載されていることから))での保存は、容器壁に付着したレジオネラ属菌が培養不能になったり死滅する可能性が高いと記載されている。保存温度の管理には十分注意し、再検査による結果については、これらの影響も考慮する必要があると思われる。特に、濃縮検体での培養状況に応じて非濃縮検体や濃縮後希釈検体を接種するとした16施設においては、保存による検体への影響も十分考

慮する必要があると思われる。前述しているが、新版レジオネラ症防止指針、病原体検出マニュアルにも、非濃縮検体と濃縮検体を同時に(並行して)検査すると記載されている。特に、事件対応時の行政検査や事前に検体状況が適切に把握しにくい検体に対しては、同時接種が望ましいと考える。

9. 設問 48～49

分離培地への1枚の接種量は、100 μ Lが最も多く57施設(76%)、次いでその他が17施設(約23%)、50 μ Lが1施設(約1%)だった。しかしながら、それぞれの記載コメントから見ると、前処理や使用培地数などの状況に応じて接種量に違いが認められ、10 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L、250 μ L、300 μ Lとの回答があった。1検体につき使用している分離培地数については、2～5枚が最も多く47施設(約63%)、次いで6～10枚が17施設(約23%)だった。1枚とした施設は3施設(4%)と少なく、結果72施設(96%)は複数枚の分離培地を使用していた。それぞれの記載コメントから見ると、非濃縮、濃縮、濃縮後希釈検体、前処理、分離培地の種類などの使い分けが施設ごとに異なっており、最終的な分離培地枚数に違いが認められ、1枚、2枚、3枚、4枚、5枚、6枚、7枚、8枚、12枚、21枚、24枚との回答があった。詳細記載のあった68施設中最も回答が多かったのは2枚(22施設:約32%)、次いで4枚(15施設:約22%)、6枚(7施設:約10%)だった。これら培地への接種量と使用分離培地数の状況からも、各施設での検査法に大きな違いがあることが示唆された。

10. 設問 50～52

培養設定温度については、37℃が最も多く31施設(約41%)、次いで36℃が28施設(約37%)、35℃が14施設(約19%)であった。培養

日数は7日間が最も多く48施設(64%)、次いで10日間が22施設(約29%)、5日間が2施設(約3%)であった。新版レジオネラ症防止指針の濃縮法説明フローチャートには37°C 5~7日間、「1.4 培養」には36°C±1°Cで10日目まで²⁾、第3版には36°C±1°C 最長7日目まで³⁾と記載されている。標準的な方法を検討する場合には、設定温度と集落観察方法に留意し、培養日数を設定する必要があると思われる。炭酸ガス培養を行っているとの回答は1施設(約1%)だけであった。

11. 設問 53~58

分離培地の観察については、毎日との回答が39施設(52%)、1日おきが3施設(4%)、その他が33施設(44%)だった。培養日数から見た集落の観察方法については、培養1日目以内の集落はレジオネラを否定との回答が11施設(約15%)、培養2日目以内の集落はレジオネラを否定が22施設(約29%)、その他が42施設(56%)だった。推定特徴から見た集落の観察方法については、灰白色湿潤集落との回答が51施設(68%)、斜光法が11施設(約15%)、経験則が2施設(約3%)、その他が11施設(約15%)だった。灰白色湿潤集落が多数発育している場合の1検体での総釣菌数については、1~10個との回答が42施設(56%)、11~20個が5施設(約7%)、その他が28施設(約37%)だった。分離培地の観察は、レジオネラ属菌検査の中でも極めて重要な検査工程の一つと思われる。一般的にレジオネラ属菌集落の特徴は、灰白色湿潤集落で特異的な酸臭がすると言われている。しかしながら、様々な夾雑菌が多数発育する場合も多く、中には似たような集落もよく観察される場合がある。そのような分離培地からレジオネラ属菌を効率良く釣菌、カウントすることが求められる場合も多い。また、

発育速度が遅く、種類によってもその速度に差があることから、観察する培養日数によって発育したレジオネラ属菌数、種類が随時変化する場合もあるなど、観察するたびに十分注意する必要がある。そのような中、推定特徴の選択肢にも加えた「斜光法」^{4, 9)}は、分離培地上からレジオネラ属菌と夾雑菌を分別するのに非常に有効な観察法であり、効率よく釣菌、カウントも行えることから、定量結果の算出、説明も容易になると思われる。標準的な方法を検討する場合には、本法の積極的な活用が望まれる。自発蛍光の検査を行っている施設は22施設(約29%)と少なかった。レジオネラ属菌は、生化学的活性が低く、種の同定に役立つ表現形質に乏しいことから、分離培地上で自発蛍光の検査を行うことは有効な手段の一つと思われる。ニューモフィラと自発蛍光を有する種類が100:1程度の割合で混在している検体もこれまでに何度か経験している。分離培地上で本検査を行うことで、自発蛍光を有する種類を見逃しにくくなる。北海道では、本検査を常時行うことで、比較的高頻度で自発蛍光を有するレジオネラ属菌を確認している。積極的な本検査の活用が望まれる。釣菌日については、選択回答と記載されていたコメント内容から、特に決めずに随時釣菌しているとの回答が最も多く44施設(約59%)あった。培養2、3、4日目以降随時釣菌とした施設や、4日目、5日目、6日目、7日目のみ、と釣菌日を確定している施設もあった。これまでに各施設で経験している検体状況に基づいての設定、検査に対する認識の違いなど、いくつかの状況により施設間差があることが示唆された。

12. 設問 59~66

グラム染色を行っている施設は、回答のあった74施設中36施設(約49%)あり、常時行って

いるのは 21 施設(約 28%)だけであった。L-システムでの要求性確認を行っているのは、回答のあった 74 施設中 72 施設(約 97%)あり、常時行っているのは 64 施設(約 86%)あった。L-システム要求性確認を行っている 72 施設に対し、その時の培地の組合せを質問したところ、BCYE α と血液寒天が 55 施設(約 76%)、選択分離培地と血液寒天が 4 施設(約 6%)、その他が 13 施設(約 18%)であった。レジオネラ属菌は、生化学的活性が低く、種の同定に役立つ表現形質に乏しい実状の中、この L-システム要求性確認検査は非常に重要な検査と思われる。分離培地上から疑いの強い集落釣菌後は、本検査を積極的に行うことが望まれる。馬尿酸水解試験を行っているとの回答は 21 施設(28%)と少なく、さらに常時行っているとの回答は 12 施設(16%)だけであった。レジオネラ テックステスト(Oxoid)を行っているのは 30 施設(40%)あり、常時行っているのは 19 施設(約 25%)だった。抗血清(生研)によるスライド凝集反応を行っているのは 73 施設(約 97%)あり、常時行っているのは 56 施設(約 75%)あった。このスライド凝集反応を行っている 73 施設のうち、免疫血清セットのみの使用が 21 施設(約 29%)、セットに加え L.P.7~15 群の使用が 50 施設(約 68%)であった。DDH レジオネラ(極東)による検査を行っているのは 39 施設(52%)であった。ラテックステスト、抗血清によるスライド凝集反応、DDH レジオネラによる検査は、種の決定もさることながら、検査者がその他の検査で推定としていた菌株に対し、確定判断するための重要な検査にもなっていると思われる。しかしながら、対応している種類が限られていることや、ニューモフィラでも検出菌株によってはスライド凝集に反応しない場合もあることから、注意が必要である。

13. 設問 67~69

遺伝子学的検査を行っているのは 66 施設(88%)あり、常時行っているとの回答は 17 施設(約 23%)あった。また、他の検査(抗血清やラテックスなど)で確定できない時(もう一押し状況証拠が欲しい場合など)との回答が 27 施設(36%)あった。遺伝子学的検査を行っている 66 施設へ、その時の方法を質問したところ、一般的な PCR 法との回答が 47 施設(約 71%)、LAMP 法が 10 施設(約 15%)、その他が 9 施設(約 14%)であった。リアルタイム PCR 法との回答はなかった。詳細コメントを見ると、複数方法を利用している施設があり、その他の回答では、LAMP 法との併用が多かった。中にはリアルタイム PCR 法と併用しているとの回答もあった。また、どのような検体に本検査を行っているかについては、分離菌株が 41 施設(約 62%)、濃縮検体が 6 施設(約 9%)、分離集落直接が 3 施設(約 5%)、その他が 16 施設(約 24%)であった。その他のコメントでは、複数の検体に対して対応している状況がうかがえた。各施設が、これまでの経験を考慮して工夫しているものと思われる。遺伝子学的検査方法は便利な方法であり、有効な検査手段と思われる。行政検査機関においては、各種遺伝子学的検査方法がかなり普及しているものと思われる。今後は、民間検査機関での依頼検査(自主検査など)においては、どこまで対応可能かを視野に入れた検討が必要と思われる。今回の回答にあった、標的とする遺伝子、使用プライマー、使用キット名等は一覧に示した。

14. 設問 70~74

定量検査を行っているとの回答は 73 施設(約 97%)あった。常時行っているとの回答は 60 施設(80%)であった。定量検査を行っている 73 施設に対し、集落数のカウント初日について

質問したところ、回答のあった72施設中最も多かったのが培養3日目(36施設:50%)、次いで5日目(18施設:25%)、7日目(6施設:約8%)であった。1日目や10日目との回答もあった。また、カウント初日以降の確認については、毎日との回答が最も多く57施設(約79%)、次いで、一日おき、原則カウント初日のみ(その他回答から)との回答がそれぞれ3施設(約4%)あった。定量値の確定については、回答のあった71施設中最も多かったのが培養7日目(42施設:約59%)、次いで10日目(21施設:約30%)、5日目(3施設:約4%)であった。その他のコメントもあったが、各施設が、これまでの経験や検査体制事情を考慮してカウント初日やその後の観察日、確定日を設定している場合、また検査に対する認識の違いなどによってバラつきがあったと思われる。夾雑菌が多数混在する場合なども想定し、状況に応じた対応が必要であると思われる。灰白色湿潤集落が多数あった場合、レジオネラとその他の菌をどのように区別しカウントしているかの質問をした。本質問は定量検査を行っている施設に対して行っていたが、全75施設から回答が得られていた。記載コメントの中で質問に対する認識の違いが示唆される状況ではあったが、すべてレジオネラとしてカウントとの回答が17施設(約23%)、斜光法が11施設(約15%)、経験則が9施設(12%)、その他が38施設(約51%)であった。その他と回答した施設のコメントを見ると、各施設で様々な工夫がなされていた。このことから「11. 設問 53～58」でも記載したが、分離培地の観察は、レジオネラ属菌検査の中でも極めて重要な検査工程の一つと思われる。前述した「斜光法」は、分離培地上からレジオネラ属菌と夾雑菌を分別するのに非常に有効な観察法であり、効率よく釣菌、カウントも

行えることから、定量結果の算出、説明も容易になると思われる。本法の積極的な活用が望まれる。

15. 設問 75～76

レジオネラ属菌の検査実施に際し、操作によってエアロゾルを発生する可能性があるときは、レベル2の安全キャビネット内で作業すると防止指針^{2, 3)}、病原体検出マニュアル⁸⁾には記載されている。安全キャビネットを利用しているかについて質問したところ、回答のあった74施設中36施設(約49%)は利用していたが、機器として本来使用形態の異なるクリーンベンチを利用していると回答した1施設を含め、過半数を超える38施設(約51%)が安全キャビネットを利用していなかった。また、安全キャビネット利用施設においても、どの検査工程で利用しているかに関しては施設間で異なっていた。これらのことは、他検体へのクロスコンタミや実験室内汚染・感染の危険性も考えられ、バイオハザード、バイオセーフティーに対する意識において施設間での違いが認められた。共通認識による検査実施が望まれる。

16. 設問 77～78

分離培地上で一面にレジオネラ様集落が発育した場合、夾雑菌が多数発育している場合のレジオネラ集落の確認、灰白色湿潤集落が多数発育している状況での夾雑菌との区別の仕方などを確認するために、「設問 44 で培地への接種を濃縮検体のみと回答した施設の、レジオネラ様集落が多数発育した場合の定量値の求め方」と「設問 55, 74 でレジオネラ様集落の確認やカウント法を経験則とした施設へその方法」について記載を求めた。コメント内容を一覧に示した。

17. 設問 79

どの時点でレジオネラ属菌と確定させ成績

書に反映させていますか、との質問に対するコメント一覧を表に示した。分離平板上での確認・釣菌から、レジオネラ属菌と確定させるまでの各施設が採用している検査方法から総合的に判断し、75施設で53通りの回答があり、その対応が次の4つに大別されると思われた。①レジオネラ属菌に対して広く対応、②レジオネラ属菌に対して対応、③レジオネラニューモフィラを中心に特定の数種類だけに対応、④不明(記載内容から判断が難しかった)。このことから、レジオネラ属菌の定義が施設間で異なっている場合があると思われ、その種類によっては見逃してしまう施設があるということが示唆された。例えば、TakaraのリアルタイムPCR法、栄研化学のLAMP法のレジオネラ検出キットでは、それぞれで特異性や感度が異なる。極東のDDHや生研の抗血清、Oxoidのラテックステストでも対応している種類が異なる。L-システイン要求性などと併せ、いくつかの方法の組合せにより判定している施設が多かったが、共通認識による検査実施が望まれる。

18. 設問 80～81

依頼施設に対し中間報告等を行っているかの質問に対し、回答のあった74施設中29施設(約39%)が行っているとしていた。回答一覧を表に示したので参考にされたい。異動、退職時により検査対象者が交代する場合、検査手技の引き継ぎを行っているかの質問に対し、回答のあった74施設中63施設(約85%)が行っていた。注意点の多い検査であるため、全ての施設で適切な引き継ぎが行われることが望まれる。

19. 設問 82

現在貴施設で行っているレジオネラ検査に不安を感じたことはありますかとの質問に対し、47施設(約63%)が不安があると回答していた。

一覧を表に記載した。不安とされた内容は、検査全般に及んでいた。特に「レジオネラが強く疑われるが、確定させるのが困難な場合」、「検査結果が陰性の場合、本当に陰性なのか濃縮操作後の回収がうまくできているのか」といった内容が目立った。「濃縮、非濃縮の集落数に乖離がみられた場合の定量結果」との回答もあった。このことについては、昨年度までの報告書においても、非濃縮・濃縮検体でレジオネラ属菌が検出された121検体中109検体(約90%)において非濃縮検体から算定された菌数が多かったと報告している⁴⁾。また、「経験者が少なく、手順全般に不安」、「実際にレジオネラ検査を行ったことがない」といった回答もあり、大きな不安を抱えている施設もあった。今後WG内で検査全般を再検討するにあたり、参考にしたいと考える。

20. 設問 83～84

貴施設でレジオネラ属菌検査研修を受け入れていますかとの質問に対し、回答のあった74施設中20施設(約27%)が研修を受け入れていると回答していた。しかしながら、この20施設の中にも未研修で検査を導入している施設があること、また、標準となる検査法が示されていないため、研修を受けても研修先機関によってその内容が異なる場合も想定され、いくつかの問題点があると考えられる。研修システムは必要だと思いますかとの質問に対し、71施設(約95%)が必要と回答した。不必要とした施設はなく、その他と回答した4施設においても、研修システムを肯定する内容をコメントしていたことから、ほぼ全施設が研修システムは必要と考えていると思われた。一例を挙げると、「レジオネラ防止指針にもあるように根拠が必要」、「行政処分や訴訟問題等にかかわるため、定基準の統一のための研修が必要」、「精度

管理を行うには正しい手法の検査ができていないと精度管理そのものができない。そのため検査法の研修は必要である。また、研修を行えば、その手法が公定法的に広まって行くため、「生育が遅く、生化学的に特定困難で夾雑菌も多い。文献だけでは技術習得は難しい」などのコメントがあった。コメントの一覧は表に記載した。

21. 設問 85

検査法の統一は必要だと思いますかとの質問に対し、68 施設(約 91%)が必要と回答し、不必要とした 3 施設(4%)を大きく上回った。方法論については熟考を重ねなければならぬ点が多々あるが、ほとんどの施設において、基本となる部分の統一が必要との認識があると思われた。一例を挙げると、「基本となる部分と濃縮法ごとの統一が必要では」、「基本部分を統一し、数種類の選択肢がある場合は優先順位と理由を示して欲しい」、「公定法・通知法などにより標準的な検査法を示すことは必須」、「各施設(民間検査所も含む)で検査法が異なり検査精度が違ふと行政指導がやりにくなる」、「基準(10CFU/100ml 未満)の信頼性のためにも基本の部分では統一方法を示すべきだ」などのコメントがあった。不必要とした 3 施設、その他とした 4 施設においても、より詳細な検査法、設備等を考慮した上で、その困難さがうかがえた事からのコメントが多かった。検査に不安があるとした施設も約 63%あったことから、妥当性と根拠説明ができる標準的検査法を検討し提示していく必要があると考える。コメントの一覧は表に記載した。

22. 設問86

精度管理は必要だと思いますかとの質問に対し、回答のあった 74 施設中 71 施設(約 96%)が必要と回答し、不必要とした 2 施設(約

3%)を大きく上回った。ある施設から、「必要だが実施に当たっては種々の困難が予想される」とのコメントがあった。検査を熟知している担当者からのコメントと思われるが、実際精度管理を行うためには、①精度管理用菌株の選択、②配布試料の安定化、③精度管理参加条件(検査施設条件など)の設定、④配布方法、⑤精度管理用の検査方法、⑥評価と解析方法などを十分に検討した上で行う必要があると思われる。コメントの一覧は表に記載した。

23. 設問87

a.研修システム、b.検査法の統一、c.精度管理について、仮に必要とするならば、その優先順位を記載下さいとの質問に対し、最も多かった回答が b.a.c.の 48 施設(64%)、次いで b.c.a.の 11 施設(約 15%)であった。前者のコメントで共通していたことは、まず基本となる検査法の整理と提示、これに基づいた知識・手技取得のための研修システムの構築、それら共通の知識・手技による認識のもと精度管理を行う、という考えである。これは、客観的に見て最も理解しやすい流れであり、ここまで述べた検査に係る問題点を解決する一手段であると考えられる。一方、後者においてもコメント内容はほぼ同じであったが、精度管理の結果に基づき研修を行うという点に違いがあった。他の優先順位を回答した施設も含め、現状検査に対する認識の温度差によるものが影響していると思われるが、基本検査法の整理と提示後の精度管理と回答した施設が併せて 59 施設(約 79%)であったこと、また関連しているので同時に進めていくことが望ましいとのコメントもヒントにしながら、そのバランスを今後 WG 内で十分に検討していきたいと考える。

24. 設問 88

各施設が、これまでに様々な行政検査対応

をしていることがうかがえた。一覧を示したので、今後の事例対応における感染源調査等で参考にされたい。

25. 特記事項

特殊な検査ケース、本アンケートに対する御意見、その他コメントが寄せられた。貴重な内容であり、表中に全て記載した。一部は今後の課題として検討の必要性が示唆された。

D. 結論

検査法は、これまでも SOP の基となる文献が多数あること、各文献で記載されている内容が異なる場合があること、また、検査工程については、検査者自身によって選択の幅があることが指摘されている。全体として、本アンケート調査結果においても同様の傾向が見られた。未研修で検査を導入している施設が多数あったこと、標準とする検査法が示されていないことが影響していると思われるが、このことが精度管理を実施する上で影響を及ぼす可能性も考えられる。しかし、75 の回答施設すべてがレジオネラ属菌検査に対応可能であるという結果が得られたことは大きい。

検査法については、例えば、「厚生労働科学研究 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 19～21)」の結果から、検査精度が問題ない範囲まで安定するだろうという方法を仮に示すと、『1)非濃縮、濃縮検体、両方を検査する。2)未処理、熱処理、酸処理の前処理を行う。3)濃縮はろ過濃縮を推奨するが、ろ過・冷却遠心濃縮ともに検出精度を上げるための注意点を記載する。4)接種は基本的に選択分離培地を利用し、もし酸処理検体を 200 μ L 接種で対応すると、非濃縮検体に 3 枚、濃縮検体に 3 枚となり、1 検体につき計 6 枚の

培地を利用する。汚染度が低いと考えられる検体については、非選択分離培地の利用法も記載する。5)斜光法を積極的に導入しコロニー分別とカウントを行う。6)釣菌後、L-システム要求性試験を必ず行う』という流れになる。しかしながら、標準的検査法については、各検査機関で、費用、設備等を考慮した検査体制が既に整備されている現状もあり、多方面からアプローチする必要がある。例えば、事件対応における行政検査でより高い検出精度が求められる場合と、公衆浴場施設の自主検査のような日常の衛生管理を確認しレジオネラ症予防に努める場合では、必要とされる各検査工程での検査手技の設定を変えることも視野に入れ検討する必要があると思われる。培養検査については大きく 3 つの流れがあると思われる。「検体を分離培地に接種するまで」、「分離培地上でのレジオネラ様コロニーの分別とカウント」、「コロニー釣菌から確定まで」、である。アンケート結果から、約 91%の施設が検査法の統一が必要との回答を示したことから、これらに対し、妥当性と根拠説明ができる標準的検査法を WG 内で十分検討し、提示していくことが必要であると考えられる。

以上ここまで述べた実態においては、民間検査施設に対しても同様のことが言えると思われる。これまでに研修システムを確立していないまま、官民間問わず検査できる施設が長年に渡り広く普及してしまっている現状がうかがえる。よって、標準的な検査法の整理と提示、研修システムの構築、精度管理の 3 点を柱とし、官民間問わず検査精度の安定に向けた取り組みを進める必要があると思われる。

謝辞

本実態調査を行うにあたり、アンケートの配

布、回収にご協力頂いたレジオネラレファレンスセンター担当者の皆様、および御多忙にもかかわらずアンケートに御回答頂いた、全国の地方衛生研究所の担当者の皆様に深謝致します。

E. 参考文献

- 1) 渡辺祐子 他、:ゼラチン・ディスク配布による菌数測定的外部精度管理: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～平成 21 年度総合研究報告書 pp.127-155
- 2) 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
- 3)レジオネラ症防止指針 第 3 版,財団法人ビル管理教育センター,東京, 2009, p.26-36
- 4) 森本 洋 他、:検査法の検討: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～平成 21 年度総合研究報告書 pp.88-126
- 5) 森本 洋 他、:濃縮方法の違いによる温泉水中のレジオネラ属菌検出結果の比較. 北海道立衛生研究所報 2009;54:73-74.
- 6) 公衆浴場における衛生等管理要領等について:公衆浴場における水質基準等に関する指針,H12.12.15 生衛発第 1811 号厚生省生活衛生局長通知
- 7) 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について:公衆浴場における水質基準等に関する指針,H15.2.14 健発第 0214004 号厚生労働省健康局長通知

8) 国立感染症研究所: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

9) 森本 洋:分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 日本環境感染学会誌 2010;25 (1):8-14.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし