

参考文献

- 1 「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」厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業、主任研究員 倉文明、平成 19 年度総括・分担研究報告書
- 2 「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」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、主任研究員 倉文明、平成 20 年度総括・分担研究報告書
- 3 「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」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、主任研究員 倉文明、平成 21 年度総括・分担研究報告書
- 4 「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」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、主任研究員 倉文明、平成 22 年度総括・分担研究報告書

4 「第 3 版レジオネラ症防止指針」ビル管理教育センター、2009

5 「衛生試験法・注解 2000」日本薬学会編、鉍物試験法、腐植質 p.906-907.

F. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 詳細な水質検査結果

検査項目	単位	A 試料	B 試料
一般細菌数	(cfu/ml)	6200	1400
従属栄養細菌数	(cfu/ml)	120000	550000
A T P (3M 社)	(RLU)	862	1458
KMnO <sub>4</sub> 消費量	(mg/l)	54	160
T O C (湿式)	(mg/l)	18	26
色度	(度)	>100	>100
濁度	(度)	2.0	2.9
アンモニア性窒素	(mg/l)	<0.1	1.4
亜硝酸性窒素	(mg/l)	<0.1	0.2
硝酸性窒素	(mg/l)	<0.1	0.15
Fe	(mg/l)	0.049	0.083
Mn	(mg/l)	0.003	0.021
Zn	(mg/l)	0.012	<0.01
Cu	(mg/l)	0.022	0.014
Pb	(mg/l)	<0.0001	<0.0001
Al	(mg/l)	<0.002	<0.002
Cd	(mg/l)	<0.0001	<0.0001
Hg	(mg/l)	<0.00005	<0.00005
Se	(mg/l)	<0.0001	<0.0001
As	(mg/l)	<0.0001	<0.0001
Cr	(mg/l)	<0.0005	<0.0005
pH		7.9	8.2
遊離残留塩素	(mg/l)	0.4	<0.05
結合残留塩素	(mg/l)	0.8	0.4

表2 阻害物質によるレジオネラの検出状況

試料No	調製試料水	添加物質	レジオネラ 培養法 CFU/100ml	LC-RT-PCR cfu/100ml	
				総菌 生菌+死菌	生菌
1	温泉水	レジ10	10	< 10	3
2	温泉水	レジ10	10	< 10	5
3	温泉水	レジ1000	1000	477	441
4	温泉水	レジ1000	1000	470	450
5	温泉水	レジ10・細菌	10	< 10	0
6	温泉水	レジ10・細菌	10	< 10	0
7	温泉水	レジ1000・細菌	1000	< 10	0
8	温泉水	レジ1000・細菌	1000	< 10	0
9	温泉水	レジ10・濁質	10	< 10	2
10	温泉水	レジ10・濁質	10	< 10	2
11	温泉水	レジ1000・濁質	1000	507	287
12	温泉水	レジ1000・濁質	1000	498	286
21	水道水	レジ10	10	16	11
22	水道水	レジ10	10	16	10
23	水道水	レジ1000	1000	1019	998
24	水道水	レジ1000	1000	1015	1018
25	水道水	レジ10・細菌	10	< 10	1
26	水道水	レジ10・細菌	10	< 10	4
27	水道水	レジ1000・細菌	1000	17	10
28	水道水	レジ1000・細菌	1000	36	23
29	水道水	レジ10・濁質	10	16	11
30	水道水	レジ10・濁質	10	17	11
31	水道水	レジ1000・濁質	1000	1055	988
32	水道水	レジ1000・濁質	1000	1008	1021

表3 LC RT-PCR法の2STEP法(従来法)及び1STEP法(簡便法)の比較

試料 No	採取地点名	検体分類	環境 湯温 ℃	pH	残塩 mg/L	レジオネラ	微生物汚染状況			LC cfu/100ml	総菌生菌+死菌	生菌
						CFU/100ml	ATP /10ml	SPC cfu/ml	HPC cfu/ml			
1	市水白湯1	添加0	39.5	8.1	0.8	<10	40	0	6	1step法	<10	0
2	市水白湯2	添加0	40.2	7.8	0.1	20	334	62	320	1step法	114.9	24.2
3	市水白湯3	添加0	40.5	8	0.6	<10	55	15	22	1step法	<10	0
4	市水白湯4	添加0	39.8	8.1	2.5	<10	350	2	3	1step法	688.6	2.6
5	市水白湯5	添加0	39.2	7.7	0.4	<10	58	9	37	1step法	<10	0
6	市水白湯6	添加0	40	7.9	0.5	<10	73	11	65	1step法	<10	0
7	市水白湯7	添加0	40.1	8.4	0.8	<10	81	2	15	1step法	<10	0
8	市水白湯8	添加0	39.8	7.8	0.4	480	290	13	410	1step法	1196.0	527.4
9	市水白湯9	添加0	39.9	7.7	0.1	<10	128	84	260	1step法	<10	0
10	市水白湯10	添加0	40.3	7.9	0.2	<10	92	54	97	1step法	<10	1.6
11	市水白湯1	添加10	39.5	8.1	0.8	10	40	0	6	1step法	19.8	17.3
12	市水白湯2	添加10	40.2	7.8	0.1	30	334	62	320	1step法	127.4	42.4
13	市水白湯3	添加10	40.5	8	0.6	10	55	15	22	1step法	25.3	7.1
14	市水白湯4	添加10	39.8	8.1	2.5	10	350	2	3	1step法	753.1	20.8
15	市水白湯5	添加10	39.2	7.7	0.4	10	58	9	37	1step法	17.1	17.5
16	市水白湯6	添加10	40	7.9	0.5	10	73	11	65	1step法	20.5	6.4
17	市水白湯7	添加10	40.1	8.4	0.8	10	81	2	15	1step法	15.2	12.1
18	市水白湯8	添加10	39.8	7.8	0.4	490	290	13	410	1step法	1276.5	501.0
19	市水白湯9	添加10	39.9	7.7	0.1	10	128	84	260	1step法	20.4	20.7
20	市水白湯10	添加10	40.3	7.9	0.2	10	92	54	97	1step法	16.2	17.8
21	市水白湯1	添加100	39.5	8.1	0.8	100	40	0	6	1step法	128.8	113.6
22	市水白湯2	添加100	40.2	7.8	0.1	120	334	62	320	1step法	247.1	133.3
23	市水白湯3	添加100	40.5	8	0.6	100	55	15	22	1step法	115.1	95.6
24	市水白湯4	添加100	39.8	8.1	2.5	100	350	2	3	1step法	894.7	106.3
25	市水白湯5	添加100	39.2	7.7	0.4	100	58	9	37	1step法	110.2	104.4
26	市水白湯6	添加100	40	7.9	0.5	100	73	11	65	1step法	115.6	112.9
27	市水白湯7	添加100	40.1	8.4	0.8	100	81	2	15	1step法	126.3	114.1
28	市水白湯8	添加100	39.8	7.8	0.4	580	290	13	410	1step法	1355.0	614.0
29	市水白湯9	添加100	39.9	7.7	0.1	100	128	84	260	1step法	117.8	132.7
30	市水白湯10	添加100	40.3	7.9	0.2	100	92	54	97	1step法	127.2	123.6
31	市水白湯1	添加0	39.5	8.1	0.8	<10	40	0	6	2step法	<10	0
32	市水白湯2	添加0	40.2	7.8	0.1	20	334	62	320	2step法	119.9	21.6
33	市水白湯3	添加0	40.5	8	0.6	<10	55	15	22	2step法	<10	0
34	市水白湯4	添加0	39.8	8.1	2.5	<10	350	2	3	2step法	692.3	1.6
35	市水白湯5	添加0	39.2	7.7	0.4	<10	58	9	37	2step法	<10	0
36	市水白湯6	添加0	40	7.9	0.5	<10	73	11	65	2step法	<10	0
37	市水白湯7	添加0	40.1	8.4	0.8	<10	81	2	15	2step法	<10	0
38	市水白湯8	添加0	39.8	7.8	0.4	480	290	13	410	2step法	1208.7	492.5
39	市水白湯9	添加0	39.9	7.7	0.1	<10	128	84	260	2step法	<10	0
40	市水白湯10	添加0	40.3	7.9	0.2	<10	92	54	97	2step法	<10	1.7
41	市水白湯1	添加10	39.5	8.1	0.8	10	40	0	6	2step法	14.1	14.8
42	市水白湯2	添加10	40.2	7.8	0.1	30	334	62	320	2step法	123.9	31.2
43	市水白湯3	添加10	40.5	8	0.6	10	55	15	22	2step法	15.5	10.8
44	市水白湯4	添加10	39.8	8.1	2.5	10	350	2	3	2step法	719.8	3.2
45	市水白湯5	添加10	39.2	7.7	0.4	10	58	9	37	2step法	15.2	13.1
46	市水白湯6	添加10	40	7.9	0.5	10	73	11	65	2step法	16.7	12.6
47	市水白湯7	添加10	40.1	8.4	0.8	10	81	2	15	2step法	16.3	13.9
48	市水白湯8	添加10	39.8	7.8	0.4	490	290	13	410	2step法	1215.2	490.0
49	市水白湯9	添加10	39.9	7.7	0.1	10	128	84	260	2step法	14.0	15.1
50	市水白湯10	添加10	40.3	7.9	0.2	10	92	54	97	2step法	14.4	14.8
51	市水白湯1	添加100	39.5	8.1	0.8	100	40	0	6	2step法	103.0	94.9
52	市水白湯2	添加100	40.2	7.8	0.1	120	334	62	320	2step法	230.9	127.3
53	市水白湯3	添加100	40.5	8	0.6	100	55	15	22	2step法	105.0	106.0
54	市水白湯4	添加100	39.8	8.1	2.5	100	350	2	3	2step法	104.5	101.9
55	市水白湯5	添加100	39.2	7.7	0.4	100	58	9	37	2step法	105.0	101.2
56	市水白湯6	添加100	40	7.9	0.5	100	73	11	65	2step法	103.1	101.0
57	市水白湯7	添加100	40.1	8.4	0.8	100	81	2	15	2step法	122.2	92.4
58	市水白湯8	添加100	39.8	7.8	0.4	580	290	13	410	2step法	600.4	572.4
59	市水白湯9	添加100	39.9	7.7	0.1	100	128	84	260	2step法	104.0	101.0
60	市水白湯10	添加100	40.3	7.9	0.2	100	92	54	97	2step法	122.2	97.5

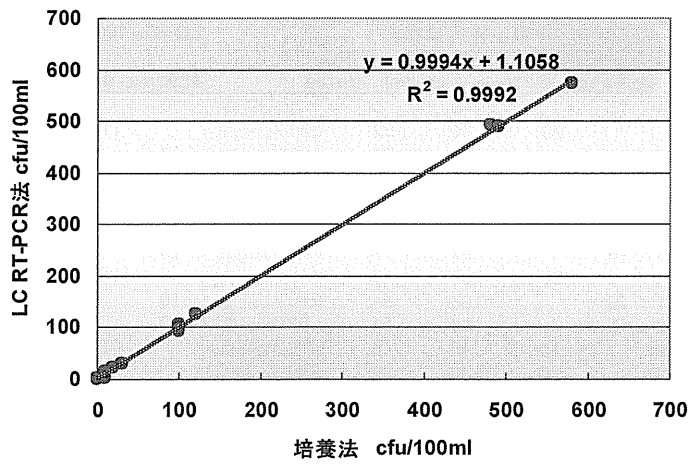


図1 2-STEP法（簡便法）と培養法の相関

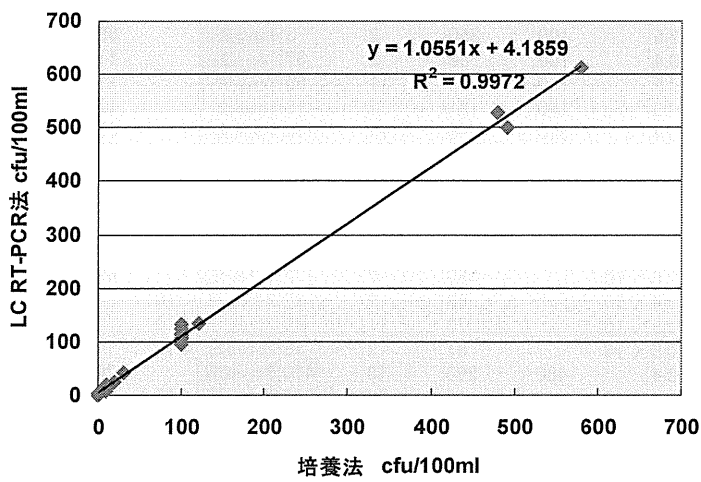


図2 1-STEP法（簡便法）と培養法の相関

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

LC qRT-PCR による浴槽水中レジオネラ属菌の定量（長崎県の実施例）

研究分担者： ○田栗利紹 長崎県環境保健研究センター

研究分担者： 烏谷竜哉 愛媛県立衛生環境研究所

（研究要旨）昨年度に引き続き、液体培養定量 RT-PCR 法（Liquid Culture Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, LC qRT-PCR）によるレジオネラ属菌検査方法の有効性を検証した。37 浴槽水等を対象としてレジオネラ属菌培養法に対する LC qRT-PCR の有効性を評価したところ、検量線と偽陽性判定は改善されたが、偽陰性判定が増加した。温泉由来検体処理の困難さを再認識するとともに、細菌汚染等の RT-PCR 阻害作用が予想され、これらの影響を考慮した検討が望まれた。

#### A. 研究目的

入浴施設のレジオネラ属菌を監視する技術としてレジオネラ遺伝子定量方法は有効であるが、死菌検出により偽陽性が多く認められるために、実用上不利である。レジオネラの液体培地内での増菌能を判別するレジオネラ遺伝子の定量方法（LC-qRT-PCR 法）であれば、生菌の検出が可能と期待されている<sup>1)</sup>。昨年度に引き続き、同方法を長崎県内入浴施設のレジオネラ汚染調査に適用して培養検査と比較することで、その効果を検証した。昨年度との違いは RT-PCR にワンステップ法を適用し、検量線を合成 RNA により作成したことにある。

#### B. 研究方法

##### 1. 採水方法とレジオネラ属菌検査法

1) 検水 500 mL を 2.5%チオ硫酸ナトリウム 1 mL 入り滅菌済みポリプロピレン採水容器に採取し、冷蔵輸送した。レジオネラ属菌培養検査は、国立感染症研究所病原体検出マニュアルに準拠した。最初に、各検水を直径 47 mm、孔径 0.4 μm のポリカーボネート製メンブランフィルター（ミリポア、Isopore-HHTP 04700）で

吸引ろ過した。次に、フィルターを滅菌蒸留水（大塚製薬、20 mL 注射用蒸留水）5 mL に挿入し、1 分間攪拌した懸濁水を 50°C、20 分間加温処理してから再度 1 分間攪拌した後に、その 0.1 mL を、GVPC $\alpha$  培地（ビオメリューシスメックス）に接種した。35°C で 10 日間培養して、システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。

##### 2. 液体培養定量 RT-PCR

###### 1) 試料の濃縮と前処理

昨年度報告書に準拠するが<sup>1)</sup>、定量 RT-PCR のステップで新たに 1 ステップ法を適用して実施した。レジオネラ属菌培養検査で得られた試料の 100 倍濃縮液 2 mL を微量高速遠心機にて 4°C で 15,000 rpm×5 分間処理した後、上清を除去して 100 μL の再濃縮試料とした。引き続き、等量の酸処理液（0.2M HCl-KCl buffer, pH2.2）200 μL を、MWY 液体培地（自家調製した BCYE $\alpha$  液体培地にオキシド MWY 選択サプリメントを添加して作成）900 μL に加えて 100 μL を新しい 1.5 mL 滅菌済みチューブに分取して（増菌前試料 Ct(0h)）-30°C で冷凍保存した。残りの試料を 37°C で 18 時間培養後、100 μL を

新しい1.5 mL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。

## 2) RNA抽出

各試料 100  $\mu$ LにRNA抽出液 400  $\mu$ L (5 M NaCL 10  $\mu$ L、10 % Triton X-100 25  $\mu$ L、100 mM DTT 25  $\mu$ L、20 mg/mL Proteinase K 2.5  $\mu$ L、および TE buffer 337.5  $\mu$ L)を添加した後、55°C×60分間反応させた。95°C×10分間の加熱で Proteinase K を不活化させた後、15,000rpm×5分間遠心分離した上清 50  $\mu$ Lを、あらかじめ 200  $\mu$ 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。

## 3) One step RT-qPCR法

キットは One Step PrimeScript RT-PCR Kit (TAKARA, RR064A)を使用した。Primer/Probe Mixは Diederens *et al*<sup>2)</sup>に準拠して、forward primer (5'-ACTATAGCGATTTGGAACCA-3')、reverse primer (5'-GCGATGACCTACTTTTCGCAT-3')、及び probe (5'-FAM-CCGCGCCAATGATAGTGTGAGG C-TAMRA-3')を用いて、それぞれ 4  $\mu$ M、4  $\mu$ M および 2.5  $\mu$ M になるように調製した。

氷上で RT Master Mix 23.0  $\mu$ L (RNase free d H<sub>2</sub>O 7.0  $\mu$ L、2×One step RT PCR Buffer III 12.5  $\mu$ L、Primer/Probe Mix 2.5  $\mu$ L、TAKARA EX Taq HS 0.5  $\mu$ L、PrimeScript RT enzyme Mix II 0.5  $\mu$ L)を調製して、RNA 希釈液 2.0  $\mu$ Lを加えて qPCR に供した。

## 4) qPCR 反応

qPCR 反応は、リアルタイム PCR 測定装置 Thermal Cycler Dice® Real Time System TP900 (TAKARA)で実施した。RT-PCR 条件は 42°C×5分、95°C×10秒間の前反応ののち、95°C×5秒間、60°C×30秒間を1サイクルとして45サイクル反応させた。RNA 希釈液、陽性コントロール(合成 RNA 希釈系列)、陰性コン

トロール(RNase free dH<sub>2</sub>O)を 2  $\mu$ L ずつ加え、RT-qPCR 反応を行った。

## 3. 検量線の作成とレジオネラ生菌の定量

### 1) 合成 RNA を用いた検量線の作成

5.0×10<sup>6</sup> コピー/ $\mu$ L の合成 RNA を-80°Cで保管し、これを RNA 原液として、検査の都度、RNA 原液から希釈系列を作成した。RNA 原液 5  $\mu$ L に 45  $\mu$ L の Easy Dilution (TAKARA)を加え、5.0×10<sup>5</sup> / $\mu$ L とし、以下同様に 5.0×10<sup>4</sup> / $\mu$ L まで段階希釈を行った。検量線には、これら 6 点を使用し、2 連で反応を行った。PCR チューブ当たりの最終コピー数は 1.0×10<sup>7</sup>、1.0×10<sup>6</sup>、1.0×10<sup>5</sup>、1.0×10<sup>4</sup>、1.0×10<sup>3</sup>、1.0×10<sup>2</sup> として計算された。

陽性コントロール(合成 RNA 希釈系列)の検量線から、PCR チューブ当たりのコピー数を求めた。培養前後で増加したコピー数、希釈率(11,000 倍)及び 18 時間培養後の 1 菌体当たりのコピー数(暫定値: 400,000 コピー)から、検水 100 ml 中のレジオネラ生菌数を算出した(式 A)。

レジオネラ生菌数 (cfu/100mL) = (18 時間培養後のコピー数 - 培養前のコピー数) × 11,000 ÷ 400,000 . . . . . (A)

## C. 研究結果及び考察

### 1. 検量線について

二回作成した検量線の結果にほとんど差は認められなかった (Fig. 1)。

### 2. フィールド調査成績

今年度は温泉水を中心として調査を実施した (Table 1)。LC-qRT-PCR の培養法定性結果に対する特異度は 100%であったが、感度が 35%と低い値を示した (Table 2)。レジオネラ属菌は 3 施設の 14 検体から検出され、9 検体が偽陰性を示した。このうちの 3 検体は 0.1~0.25 mg/L の低い遊離塩素を検出した施設からのサンプルで、死菌を含めた細菌数と関連が深いと

される ATP 量<sup>3)</sup>が比較的高い値を示しており(データ未掲載)、細菌汚染の影響が考えられた。別の3検体はいわゆる掛け流し式温泉に該当する施設で全7検体を検査した結果であった。これらも偽陰性を示したサンプルは 5.72~6.09 log cfu/mL もの細菌を検出していた。これらから、以上のサンプルでは大量の細菌由来 RNA の混入が予想され、RT-PCR に影響した可能性が考えられた。残りの3検体は 0.39~0.85 mg/L の遊離塩素を検出しており、LC-RTqPCR によるレジオネラの総菌数(死菌と生菌を合わせた数)は 512~757 cfu/100mL であった。一方で、総菌数 126 であった同一施設のサンプルは正しく判定できていた。本検査方法は、死菌が 500 CFU/100ml 以上検出されると計算上有効な生菌数に反映されないことが報告されている(鳥谷ら、本研究報告書)。これらから、本施設の偽陰性判定は死菌遺伝子の RT-PCR 阻害作用による影響と考えられた。

### 3. LC-RTqPCR の定量性

LC-RTqPCR 法と培養法の相関を Fig. 2a,b に示した。定性的に偽陰性を示した 9 検体を含めて、LC-RTqPCR 法の総菌数よりも生菌数のほうがきれいな直線を示した。検量線は再現性良い直線が得られて(Fig. 1)、偽陰性サンプルの 6 検体が LC 法で 1~10 cfu/100mL の値を示していたことから、定性評価のカットオフ値(現在 10 cfu/100mL)の問題が考えられた。

供試試料数が少ないことから、偽陰性の問題を明らかにするには、さらなる検討が必要と考えられた。

### D. まとめ

・昨年度の懸案事項であった検量線は直線性再

現性ともに大幅に改良された。

・昨年度と比べ偽陽性はまったく認められなくなったが、反対に偽陰性が増加した。温泉由来検体処理の困難さを再認識するとともに、細菌汚染等の RT-PCR 阻害作用が予想され、これらの影響を考慮した検討が望まれた。

### E. 参考文献

- 1) 鳥谷竜哉ら；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)「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 年度総括・分担研究報告書 研究代表者：倉 文明，p.59-68 (2011)
- 2) Diederer *et al*, Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 94-101 (2007)
- 3) 上木隆人ら；平成 22 年度 地域保健総合推進事業「保健所のレジオネラ対策における簡易迅速な検査法の実用化と自己管理の推進に関する研究」報告書 分担事業者：上木隆人，p.11-12 (2011)

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



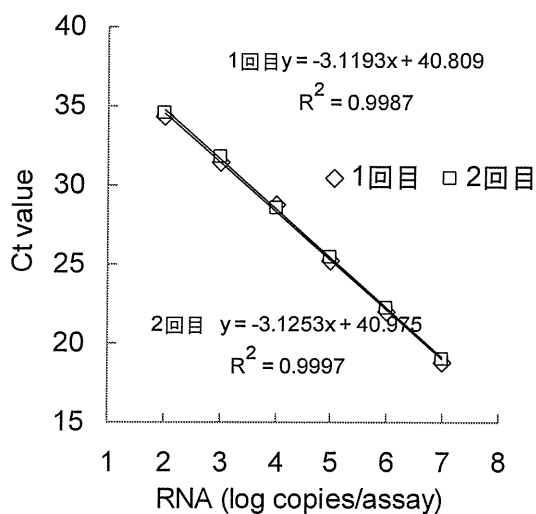


Fig.1 RNA検量線

Table 1 温泉の種類

	試料数	施設数
Na・Mg-炭酸水素塩泉	15	4
Na-塩化物塩泉	13	2
炭酸水素塩・塩化物塩泉	9	1
	37	7

Table 2 LC\_RTqPCRと培養法の比較

N=37	培養法	
	陽性	陰性*
LC-qRT-PCR	14	23
≥10cfu/100mL	5	0
<10cfu/100mL	9	23

LC-qRT-PCRの感度35%, 特異度100%

\*培養法の陰性は<10cfu/100mL

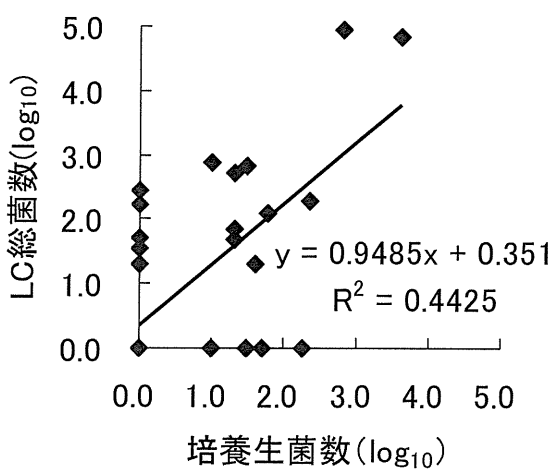


Fig.2a LC法(総菌数)の定量性

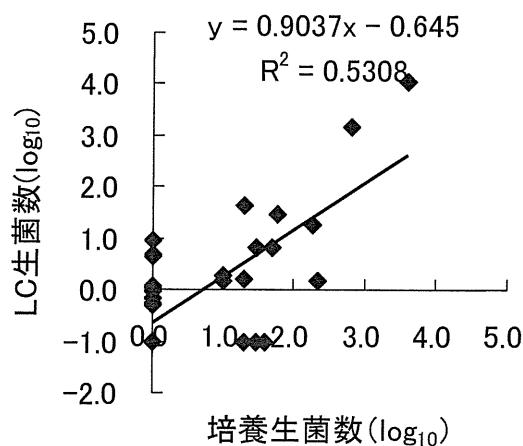


Fig.2b LC法(生菌数)の定量性

LC法で0.5~0.9logの値を有効にするために不検出のサンプルを便宜上-1.0logで表記した

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

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

リアルタイム RT-PCR 法を用いたレジオネラ迅速検査法の検討

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、坂井清、前沢仁、森本敏昭、刈込高子

(研究要旨)

生菌を迅速に検出することを目的に、RNA をターゲットとした RT-PCR 法によるレジオネラ生菌の検出法の検討を行った。浴槽水由来の *Legionella pneumophila* SG1 を用いて菌液を作成し、1.0mg/l の塩素剤に 10 分間接触させ、直後に RNA を抽出して測定を行ったところ、培養法ではレジオネラが検出されなかったが、RT-PCR 法では菌が検出された。本研究の検査方法では、塩素剤接触直後の試料から RNA が検出されることが再確認された。

次に、1.0mg/l の塩素剤に 10 分間接触後に経時的に RNA の検出を試みたところ、塩素剤接触 6 時間後までは  $1 \times 10^3$ cfu/100ml の菌数を示し、24 時間後には  $8.5 \times 10^2$ cfu/100ml、48 時間後には  $2.5 \times 10^2$ cfu/100ml、72、96 時間後には不検出 (10cfu/100ml 未満) となり、この検査法ではレジオネラの RNA は塩素処理後も長時間検出されることが推察された。

浴場施設の殺菌洗浄後の試料で検査を行ったところ、殺菌洗浄後 3 日程度経過していれば、この研究の検査方法で死菌の RNA が検出されなくなると推察された。

培養法の 7~10 日に比較すると、結果判明までの時間短縮の可能性が考えられた。

A. 研究目的

培養法によるレジオネラの菌分離は遺伝子解析を行ううえで非常に重要であるが、結果が判明するまでに約 10 日を要する。レジオネラ症患者が発生した場合、患者が利用した感染源の可能性が考えられる施設に対し、根拠を示すことなく清掃殺菌の指示や営業自粛の要請はできない。そこで利用したのが、遺伝子検査法 (DNA をターゲットとするリアルタイム PCR 法、以下 PCR 法) である。PCR 法は浴槽水等の環境試料中から前処理も含めて 1~2 日でレジオネラの遺伝子を検出することができる。この利点を利用し、レジオネラ症の拡大防止を目的として PCR 法の結果をもって、清掃殺菌の指示等を行っている。しかし、PCR

法は阻害物質の除去等の前処理が煩雑であることから、DNA に比較して多く存在する RNA をターゲットとした RT-PCR 法 (RT-PCR 法) で検証を行ったところ、前処理が簡便で PCR 法の値と相関が高かったことから、有用であることが判明した。

RNA は死菌では速やかに分解されるとされ、RT-PCR 法では生菌のみを選別して検出できると考えたが、烏谷らの報告では DNA と同じ挙動を示していたため、生菌の選別には応用できない可能性が示唆された。

しかし、実験手法や対象の変化により結果の変動が考えられる。そこで、RT-PCR 法によるレジオネラ生菌の検出法の検討を行ったので報告する。

## B. 研究方法および材料

### 1. レジオネラ検査

レジオネラ検査は平板培養法、PCR 法、RT-PCR 法の 3 種類の検査法を行い、比較検討を行った。

#### (1) 試料の濃縮

「液体培地による前培養を組み合わせた RT-PCR 法 (LC RT-PCR 法) を用いたレジオネラ生菌を迅速に検出する検査法の検討 (以下 22 年度報告書)」のとおり。

#### (2) 雑菌処理

22 年度報告書のとおり。

#### (3) 平板培養法

22 年度報告書のとおり。

#### (4) PCR 法

##### (7) DNA 抽出

DNA 抽出は本研究班の方法に従った。

##### (4) PCR 測定

22 年度報告書のとおり。

#### (5) RT-PCR 法

##### (7) RNA 抽出

RNA 抽出は本研究班の方法に従った。

##### (4) RT-PCR 測定

22 年度報告書のとおり。

### 2. 検量線用標準菌液

*Legionella pneumophila* SG1 長崎 80-045 株を BCYE  $\alpha$  で 30 度 4 日培養後、生理食塩水に懸濁し、McFarland 1 程度に調整し、10 倍希釈系列を作製した。培養法により各希釈段階の生菌数を測定し、100  $\mu$  l ずつ DNA 及び RNA 抽出に分取した。

### 3. 実験 1

#### (1) 試料

浴槽水由来の *Legionella pneumophila* SG1 を滅菌生理食塩水に添加し、3 段階の濃度 (  $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ cfu/100ml ) に調製した試料を作製した。培養後の実濃度はそれぞれ 10、110、1100cfu/100ml であった。

#### (2) 方法

試料を二分し、一方を無処理のまま培養法、PCR 法、RT-PCR 法で測定し、もう一方を 1.0 mg/

1 の塩素剤に 10 分間接触させた後、同様に測定を行った。接触停止はチオ硫酸ナトリウムを添加した。

### 4. 実験 2

#### (1) 試料

浴槽水由来の *Legionella pneumophila* SG1 を滅菌生理食塩水に添加し、 $1 \times 10^3$ cfu/100ml の濃度に調製した試料を作製した。培養後の実濃度は 2100cfu/100ml であった。

#### (2) 方法

試料を 1.0mg/1 の塩素剤に 10 分間接触させ、0、1、3、6、24、48、72、96 時間後に RT-PCR 法で測定した。接触停止はチオ硫酸ナトリウムを添加した。菌液は遠心管内に密栓して保存し 40°C、暗所のインキュベータ内に静置した。

### 5. 実験 3 (実試料による検証)

#### (1) 試料

1 回目に採水した試料を検査した結果、PCR 法でレジオネラが検出された A 及び B の 2 つの浴場施設の各 2 浴槽 (a 浴槽、b 浴槽) の浴槽水を試料とした。PCR 法でレジオネラ属菌が検出された 2 施設は殺菌洗浄を行ったが、1 回目の洗浄ではレジオネラ属菌が PCR 法及び RT-PCR 法で不検出とならなかったため、2 回目の洗浄を行った。A 施設の 1, 2 回目及び B 施設の 1 回目の殺菌洗浄は高濃度塩素 (5~10mg/l) によった。また、B 施設の 2 回目の殺菌洗浄は高濃度塩素のほか過酸化水素 (3%) による洗浄を併用した。試料は殺菌洗浄後に新たな浴槽水を満たし、循環させた後に採取した。2 施設の殺菌洗浄と採水試料の関係は図のとおり。

#### (2) 方法

2 回目及び 3 回目の試料に対し、PCR 法、RT-PCR 法及び培養法を行った。

## C. 研究結果

### 1. 実験 1

結果を図 1、2 に示した。無処理の試料は 3 段階の濃度とも培養法、PCR 法、RT-PCR 法でほぼ同等の値を示した。塩素処理後は培養法

で3段階の試料とも不検出(10cfu/100ml未満)を示したが、PCR法、RT-PCR法では無処理と同等の値を示した。

## 2. 実験2

結果を図3に示した。塩素剤接触6時間後までは $1 \times 10^3$ cfu/100mlの菌数を示し、24時間後には $8.5 \times 10^2$ cfu/100ml、48時間後には $2.5 \times 10^2$ cfu/100ml、72、96時間後には不検出(10cfu/100ml未満)となった。

## 3. 実験3

結果を表に示した。2回目に採水した試料のRT-PCR法はPCR法と同等の値を示した。また、B施設のb浴槽のRT-PCR法を除くと、1回目に採水した試料よりも高い値を示していた。一方、3回目に採水した試料では、PCR法で菌が検出されているA施設a浴槽の試料でも、RT-PCR法は不検出であった。

## D. 考察

### 1. 実験1

塩素処理後、培養法で殺菌効果が確認できたにも関わらず、RT-PCR法で数値に変動が見られなかったことから、塩素処理直後ではまだ死菌のRNAが残存していると考えられた。

### 2. 実験2

この検査法ではレジオネラのRNAは塩素処理後も長時間検出されることが推察された。

### 3. 実験3

RT-PCR法によって2回目に採水した4試料すべてからレジオネラが検出されたことから、この検査方法によると、塩素殺菌後1日経過ではレジオネラのRNAが検出されることが確認された。また、1回目と2回目の採水試料のPCR法の結果を比較すると、2回目の試料の結果が高い値を示していた。これは、殺菌洗浄によって配管等から剥離したレジオネラが、換水されずに残存していたことが考えられた。

一方、3回目に採水したA施設a浴槽の試

料はPCR法で菌が検出されていたが、RT-PCR法は不検出であったことから、殺菌洗浄後3日程度経過していれば、この研究の検査方法で死菌のRNAが検出されなくなると推察された。

## E. まとめ

レジオネラのRNAはこの研究の検査方法では塩素処理後も長時間検出されることが判明した。しかし、殺菌後3日程度で死菌のRNAがRT-PCR法で検出されなくなることから、培養法の7~10日に比較すると、結果判明までの時間短縮の可能性が考えられた。

## 参考文献

- 1 「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」厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業、主任研究員 倉文明、平成20年度総括・分担研究報告書
- 2 「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」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、主任研究員 倉文明、平成21年度総括・分担研究報告書
- 3 「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」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、主任研究員 倉文明、平成22年度総括・分担研究報告書
- 4 「第3版レジオネラ症防止指針」ビル管理教育センター、2009

## F. 論文発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

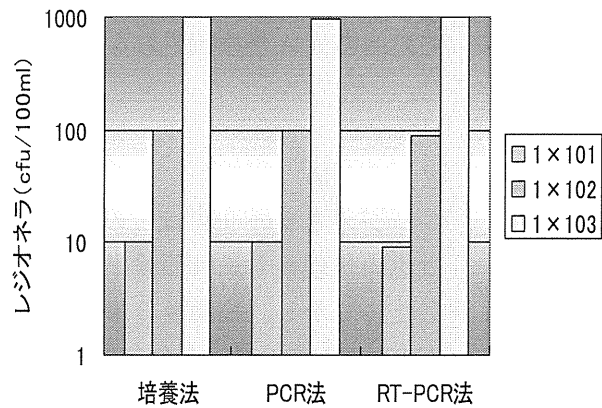


図1 無処理の試料からのレジオネラ検出状況

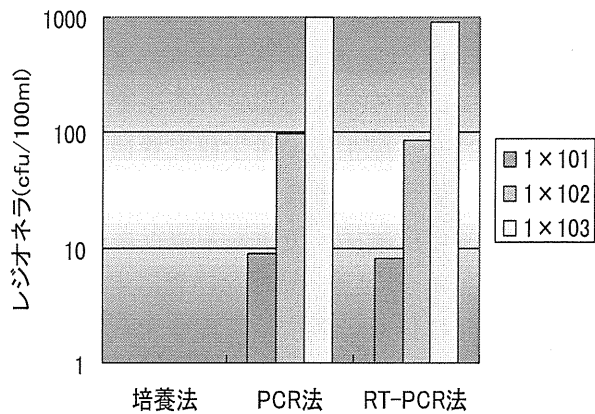


図2 塩素処理後（1.0mg/l の塩素剤に10分間接触）の試料からのレジオネラ検出状況

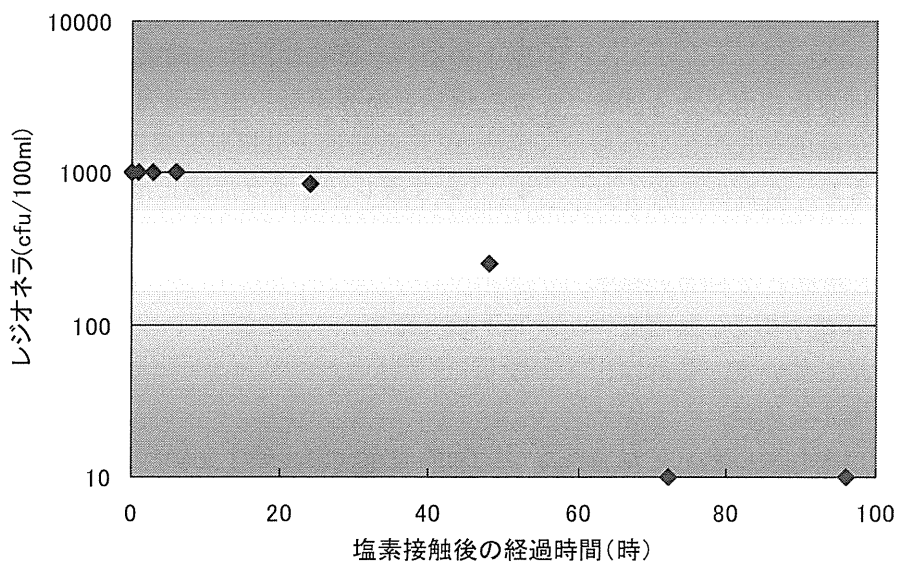


図3 1.0mg/l の塩素剤に10分間接触後の経過時間とレジオネラ検出状況

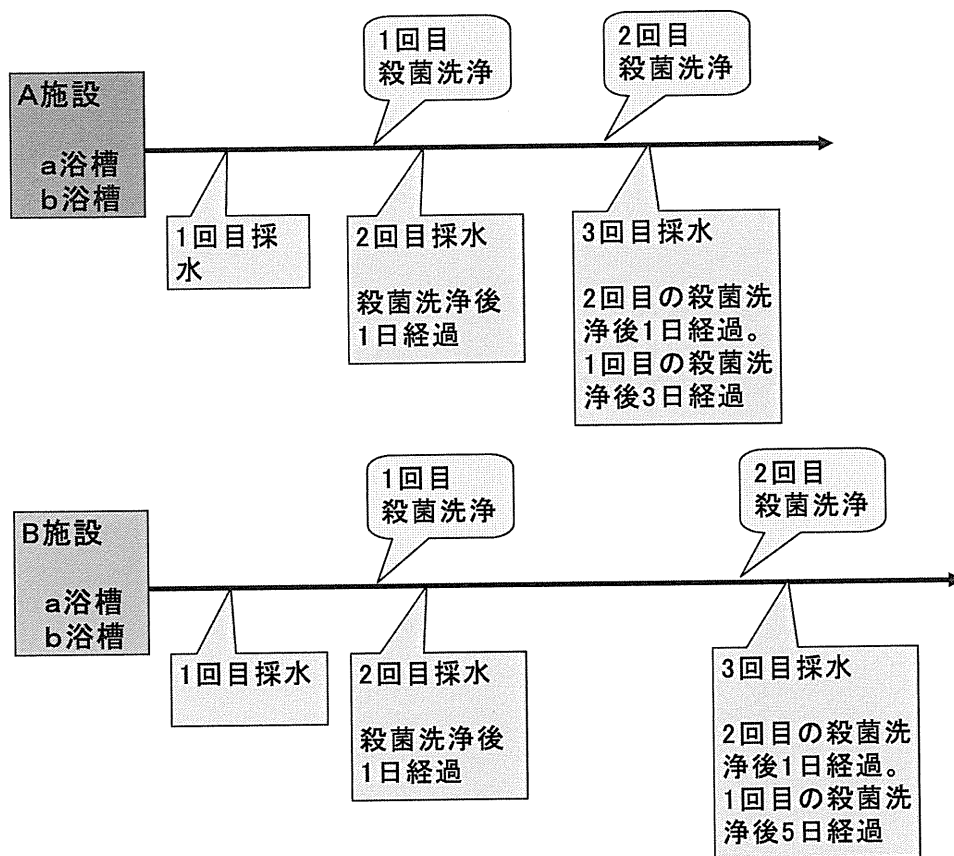


図4 各施設の殺菌洗浄と採水試料の関係

表 殺菌洗浄後のレジオネラ検出状況

施設	浴槽	1回目		2回目				3回目			
		残塩	PCR	残塩	培養	PCR	RT-PCR	残塩	培養	PCR	RT-PCR
A	a	<0.1	280	0.4	<10	1500	1400	0.3	<10	20	<10
	b	0.1	60	0.4	<10	160	140	0.3	<10	<10	<10
B	a	0.1	110	0.3	<10	200	200	0.2	<10	<10	<10
	b	<0.1	30	0.3	<10	50	10	0.3	<10	<10	<10

残塩：遊離残留塩素 (mg/l)、

培養：培養法 (cfu/100ml)、PCR：PCR法 (cfu/100ml)、RT-PCR：RT-PCR法 (cfu/100ml)

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 23 年度分担研究報告書

レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み

研究分担者	○森本 洋	北海道立衛生研究所
研究分担者	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	田中 忍	神戸市環境保健研究所
	長瀬 敏之	北海道立衛生研究所
	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
	渡辺 ユウ	仙台市衛生研究所
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

昨年度は、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。その結果、1)標準的な検査法の整理と提示、2)研修システムの構築、3)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の認識に至った。そこで本年度は、これら 3 つの課題について、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(以下 WG)内で検討した。1)については、改訂版病原体検出マニュアルに反映させたが、次年度は検査定義をより明確にし、官民間問わず浴槽水等の自主検査に適切に対応した検査方法を提示することとした。2)については、標準的な検査方法提示後、それに基づいた研修会を開催するのが妥当と思われるが、参集範囲を考慮し、厚労省や地方衛生研究所協議会等に働きかけ、官民に対する研修会システムを構築する必要があるとの認識に至った。3)については、WG 内(9 か所の地方衛生研究所)でプレ精度管理を行った。その結果、配付試料や検査法、培地等についてより改善を行い、適切な評価システムを構築する必要があると思われた。配付試料については、民間企業との協力も視野に入れ検討する必要があると思われた。また、外部精度管理に加え内部精度管理の必要性を指摘した。

## A. 研究目的

レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組みとして、昨年度は、検査現場での実状を把握するために、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、全国の地方衛生研究所に対する検査法の実態調査を行った。この実態調査結果を踏まえ WG 内で検討した結果、1) 標準的な検査法の整理と提示、2) 研修システムの構築、3) 精度管理の 3 点を柱とし、行政・民間検査機関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判断した。本年度は、これら 3 つのテーマに対し、WG 内で検討を行ったことについて報告する。

## B. 研究方法

### 1) 標準的な検査法の整理と提示

昨年度実施した地方衛生研究所に対する検査法の実態調査結果<sup>1)</sup>、レジオネラ症防止指針(新版<sup>2)</sup>、第 3 版<sup>3)</sup>)、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 年度)<sup>4-7)</sup>、またそれら成果をまとめた論文等<sup>8-11)</sup>を参考に、本年度は行政検査を中心とした検査法の検討を行い、国立感染症研究所が発信する病原体検出マニュアルに反映させた。

### 2) 研修システムの構築

WG 内で、今後必要となる研修システムのハードとソフトの基本的な考え方について検討した。

### 3) 精度管理

#### 1. 予備実験

昨年度本研究内で報告した外部精度管理試料安定化に向けた取り組みを参考に、新たな試料を作成し、配付試料安定性の確認を行

った。

#### <供試菌の選択>

昨年度安定性が確認された菌株を使用した。すなわち、外部精度管理のための供試菌は、培養検査工程において、レジオネラ属菌として典型的な性状を有し、酸処理、熱処理、各種選択分離培地により大きな影響を受けにくく、さらには、ヒトに対しての感染性が低い(無い)タイプのものである。そこで、過去の浴槽水検査において、未処理、熱処理:50°C 20 分、酸処理:0.2M HCl・KCl buffer pH2.2 を等量加え室温で 4 分間放置、熱処理後酸処理、これら全てから、非選択分離培地(BCYE  $\alpha$ : Oxoid)、選択分離培地(MWY:Oxoid、GVPC: Merck)上で有意に発育し、かつ 10<sup>4</sup> CFU/100mL 以上検出されたにもかかわらず、施設利用者から感染者の報告がない、*L.pneumophila* SG3 野生株を供試することとした。

#### <使用平板培地>

Oxoid の LEGIONELLA CYE AGAR BASE に必要なサプリメントを指示通り溶解、添加し調製した BCYE  $\alpha$ 、MWY 寒天培地を使用した。

#### <模擬配付試料の調製>

昨年度は、液体培地による試料の安定性について報告した<sup>12)</sup>が、本年度は輸送中の衝撃を液体時より軽くすること、また、安全性を考慮し、もし輸送中の破損等があった場合、被害を最小限に抑えることを目的とし、1.5%ゼラチン加レジオネラ培地について検討した。まずは本培地の基礎となる液体培地を作製した。これは昨年度の報告と同じく以下の手順に従った。Oxoid の BCYE  $\alpha$  寒天培地をベースに、寒天と Activated Charcoal を除いたものとした。すなわち、精製水 90mL に対し、Yeast extract



(Oxoid) 1g を加え、滅菌後、Legionella BCYE Growth Supplement (SR0110A:Oxoid) 1 バイアルを指示通り溶解、添加し調製したものである。本液体培地は、供試菌を増殖させる目的として利用するのではなく、添加した供試菌数を一定期間安定させることを目的としている。また検査工程や供試菌調製の妨げにならない。本実験での Activated Charcoal については、ろ過濃縮の際フィルター目詰まりの原因となること、供試菌調製の際濁度調整の妨げとなること、加えて環境水中のようにレジオネラ属菌の発育阻害となる物質もなく、レジオネラ属菌増殖の際に発生する代謝産物の影響も無いことから、添加しないこととした。この組成を基礎とした供試菌添加 1.5%ゼラチン加レジオネラ培地作製手順を以下に示す。予備実験用では、総量として 400mL 作製した。まず精製水 160mL に対し、Yeast extract (Oxoid) 4g を加え、滅菌後、ウォーターバス内で 50°C に安定させ Legionella BCYE Growth Supplement (SR0110A:Oxoid) 4 バイアルを指示通り溶解、添加し調製した。一方で精製水 200mL に 6g のゼラチン(Difco)を加え、滅菌後、ウォーターバス内で 50°C に安定させた。これらを安全キャビネット内で混和し、BCYE  $\alpha$  寒天培地で 40 時間培養した供試菌を添加し、McFarland Standard (bioMerieux) を利用し、昨年度の模擬試料実績を踏まえマクファーランド No.1 に調整した。この時、菌濃度の再現性を可能な限り確保するために、光電比色計 MODEL AC-114 (OPTIMA) を利用して透過率を測定した。この供試菌添加 1.5%ゼラチン加レジオネラ培地を 36°C に設定したホットスターラーで攪拌し、常時均一性を保持させた状態で、ポリプロピレン製の 50mL 滅菌済み遠沈管 (BioLab) に 20mL ずつ分注し、20 試料を作製した。これ

を 5°C (病原体輸送の観点から郵パックのチルドを想定) で冷蔵し固化させたものを模擬配布試料とした (図 1)。

#### 〈確認検査〉

模擬配布試料を 36°C  $\pm$  1°C 孵卵器内で 30 分間静置しゼラチンを溶解後、ボルテックスで 1 分間、均一に混和し、ゼラチンの溶け残りがいないか十分に確認した (溶解後は室温で安定)。溶解した検体 5ml を滅菌精製水 495ml に加え十分に混和した。これを非濃縮検体と仮定した。次にこの仮想非濃縮検体をろ過法により 100 倍濃縮した。ろ過濃縮検体は、仮想非濃縮検体 500ml を 0.2  $\mu$ m ポリカーボネート製フィルター (ADVANTEC) でろ過し、そのフィルターを滅菌精製水 5ml と合わせ、5 分間手振りすることで作製した。なお、フィルターのトラップ面は光沢面で行った。これらゼラチン溶解後の検体、仮想非濃縮検体、濃縮検体に対し、それぞれ前処理 (未処理、熱処理: 50°C 20 分、酸処理: 0.2M HCl-KCl buffer pH2.2 を等量加え室温で 4 分間放置) を行い、BCYE  $\alpha$  と M WY 寒天培地各 2 枚に 100  $\mu$  L ずつ接種 (酸処理は 200  $\mu$  l) し、36°C で 7 日間培養した。菌数測定は培養 3 及び 7 日目に行い、それぞれで平均値を求めた。この操作を模擬配布試料作製 0、3、5、7、10、12、14 日目に行った。また、一度溶解した模擬配布試料は再使用せず、常に新しい試料で試験を行った。これにより、模擬配布試料の均一性と安定性の確認を行った。なお、濃縮検体の回収率については、模擬配布試料ゼラチン溶解後の検査結果 (コロニー数) を分母とし、その試料を基に 100 倍希釈した試料を各検査施設で作製 (非濃縮試料と仮定) し、それを 100 倍濃縮したものの検査結果 (コロニー数) を分子として回収率を算定することとした。

#### <試料安定性の定義付け(目標値)>

ゼラチン試料溶解後の検査結果において、北海道立衛生研究所で自家調製した BCYE  $\alpha$  寒天培地(Oxoid)に試料作製 0 日目から 2 週間(14 日目)まで検査を行い、2 人の検査者の検査結果において、試料作製 3 日目(試料到着日)の直接検査のコロニー数を約 300 前後とし、その後のコロニー数の減少を考慮し、コロニー数が 100 以上保持できた保存日数までを精度管理試料として使用可能と判断することとした。

#### <回収率について>

予備実験の検査結果からプレ精度管理での目標とする回収率(目標値)を検討することとし、予備実験では、目標値を定めなかった。

#### 2. プレ精度管理の試行

##### <参加機関>

WG 構成機関である 9 か所の地方衛生研究所でプレ精度管理を行った。参加機関は以下の通りである。北海道立衛生研究所、宮城県保健環境センター、仙台市衛生研究所、神奈川県衛生研究所、富山県衛生研究所、神戸市環境保健研究所、岡山県環境保健センター、大分県衛生環境研究センター、宮崎県衛生環境研究所。なお、北海道立衛生研究所では、2 名の検査者で対応した。これらの参加機関に A~J までのアルファベットをランダムに振り分けた。なお、試料安定性の評価結果等、その他比較基準となる北海道立衛生研究所の検査者結果については A、B と表示した。

##### <実施日時>

試料発送:平成 23 年 10 月 28 日(金曜日)

試料到着:平成 23 年 10 月 31 日(月曜日)

検査日:平成 23 年 10 月 31 日(月曜日)

から 11 月 11 日(金曜日)までに、検査の開始を指定。

#### <試料発送方法>

宅 配:郵パック

適 用:チルド、陸路のみと指定

搬送容器:カテゴリーB 容器使用(図 2~4)

#### <供試菌の選択>

予備実験の結果から、供試菌の強化を検討し、予備実験使用菌に対し 50°C、30 分間加熱処理を行い、選択分離培地である MWY 寒天培地に発育したものを使用した。

#### <使用平板培地>

BCYE  $\alpha$  寒天培地は、栄研化学、日研生物医学研究所、極東、Oxoid の市販生培地同一ロット品、及び予備実験に従った自家調製培地を使用した。選択分離培地として、GVPC 寒天培地は、日研生物医学研究所、極東、Oxoid、WYO  $\alpha$  寒天培地は栄研化学の市販生培地同一ロット品を、MWY 寒天培地は、Oxoid の市販生培地同一ロット品、及び予備実験に従った自家調製培地を使用した。

なお、市販生培地は北海道立衛生研究所で一括購入し、参加機関ごとに使用する BCYE  $\alpha$  寒天生培地(1 メーカー分)、選択分離生培地(1 メーカー1 種分)を事前配布した。北海道立衛生研究所では、使用した全メーカー、全種類の寒天培地について検査対応した。

#### <配付試料の調製>

培地総量として 500mL 作製した。すなわち精製水 200mL に対し、Yeast extract(Oxoid) 5g を加え、滅菌後、ウォーターバス内で 50°C に安定させ Legionella BCYE Growth Supplement(SR0110A:Oxoid) 5 バイアルを指示通り溶解、添加し調製した。一方で精製水 250mL に 8g のゼラチン(DIFCO)を加え、滅菌後、ウォーターバス内で 50°C に安定させた。これらを安全キャビネット内で混和し培地を作製した。その他の調製条件は予備実験に従い、

最終的に 25 試料を冷蔵固化し配布試料とした。

#### 〈確認検査〉

検査については、予備実験同様供試菌添加 1.5%ゼラチン加レジオネラ培地溶解後検体、仮想非濃縮検体、100 倍濃縮検体について行った。ただしプレ精度管理においては、酸処理や熱処理による、発育コロニー数や回収率への影響を避けるため、未処理による実験を基本とし、濃縮工程や使用培地等の違いによる結果を確認することに重点を置いた。また、参加機関には、検査工程と注意事項、結果記入票を事前に配布し(メール施行:別途添付)、〈実施日時〉に記載した検査日の範囲内で検査開始を指示した。濃縮方法は指定せず、各参加機関の方法で行ってもらい、その方法の回答も求めた。北海道立衛生研究所では、配布試料作製 3、5、7、10、12、14 日目に確認検査を行った。予備実験同様、一度溶解した配布試料は再使用せず、常に新しい試料で検査を行った。これにより、配布試料の均一性と安定性の確認を行った。なお、濃縮検体の回収率は、予備実験と同じく、配布試料ゼラチン溶解後の検査結果(コロニー数)を分母とし、その試料を基に 100 倍希釈した試料を各検査施設で作製(非濃縮試料と仮定)し、それを 100 倍濃縮したものの検査結果(コロニー数)を分子として回収率を算定することとした。

#### 〈試料安定性の定義付け(目標値)〉

予備実験と同じ定義(目標値)とした。

#### 〈回収率の定義付け(目標値)〉

今回の調査では、検査期間中の回収率の最低値が 50%を超えること、最大値が 100%を大きく超えないこと、最大値と最小値の幅が小さいこと、かつ平均値が高いことを目標とした。

## C. 研究結果及び考察

### 1) 標準的な検査法の整理と提示

検査法は、これまでに 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。昨年度実施した地方衛生研究所に対する検査法の実態調査結果<sup>1)</sup>においても同様の傾向が見られた。例えば、これまでの当研究班での成果報告等<sup>4-11)</sup>を参考に、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、酸処理の前処理を全て行う。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  $\mu$ 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。より精度を上げる場合には複数種類の選択分離培地を併用する。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-システイン要求性試験を必須とし、状況に応じ詳細な同定検査を行う』という工程になる。この工程による検査法については、レジオネラによる感染事例が発生し、各自治体が行う疫学調査のための行政検査に導入することで、より詳細なデータ提供が可能となることから、国立感染症研究所が発信する、「改訂版病原体検出マニュアル」に反映させた。しかしながら、特に民間の検査機関においては、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、幅広く対応するための標準的な検査法については、

多方面からアプローチする必要がある。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。「検体採取から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適切な分別とカウント」、「コロニー釣菌から確定まで」、である。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。また、非濃縮検体の取り扱いについては新版レジ防止指針<sup>2)</sup>にも記載されているが、厚労省からの通知文<sup>13, 14)</sup>には、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。そのため非濃縮検体の取り扱いに問題が生じ、条例上濃縮検体しか検査することができない検査施設もある。上記の方法を行うためには、厚労省からの通知文の変更が必要と考える。

次年度は、公衆浴場施設等の日常的な衛生管理に対応するための検査定義をより明確にし、官民間問わず浴槽水を含む環境水の自主検査に対応した検査方法を提示したいと考える。

## 2) 研修システムの構築

昨年度実施した地方衛生研究所に対する検査法の実態調査結果<sup>1)</sup>において「a. 研修システム、b. 検査法の統一、c. 精度管理を仮に必要とするならば、その優先順位は？」という問いに対し、回答75施設中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。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研修システムと回答した施設が併せて59施設(約79%)あった。「改訂版病原体検出マニュアル」作成に当たり、レジオネラ属菌検査の特異性が明確になり、標準的な検査方法については、現在慎重に検討しているところである。このように実態調査の結果から、標準的な検査方法提示後、それに基づいた研修会を開催するのが妥当と思われるが、研修会を開催するためには、現実的なシステムの構築、それに基づいた予算や場所の確保、講師の育成、参集範囲の設定などが必要である。例えば、研修機関は行政機関にするのか、民間に委託するのか。研修場所を全国で一か所に設定し、定期的に研修会を開催するのか。全国を数か所にエリア分けし、エリアごとに研修会を開催するのか。これに基づいた開催予算や場所をどのように確保するのか。次年度は、できるだけ具体的な計画を検討し、それを、例えば厚生労働省や地方衛生研究所協議会等に働きかけ、官民に対する研修会システムを構築する必要があると考える。

## 3) 精度管理

### 1. 予備実験

光電比色計による透過率は93.0%だった。検出コロニー数を表1に示した。検査者A、Bで同時に検査を行った結果から、試料作製14日目まで検査者間で確認コロニー数に有意な差が認められなかったと推察された。使用した培地間では、BCYE $\alpha$ 培地(非選択分離培地)の方でコロニー数が多く確認される傾向にあった。また、前処理の違いでみると、未処理と酸処理では有意な差は認められなかったが、熱