

処理では試料作製 3 日目から他の処理と比較しコロニー数の減少率が高い傾向にあった。試料作製日数からみると、コロニー数の減少率が低い未処理と酸処理においても、直接のコロニー数が 100 以上保持できたのは、試料作製 7 日目までと推察される。これらのことから、「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」という当初目標を達成できたのは、未処理、酸処理の試料作製 7 日目までだったと判断した。次に回収率を表 2、図 5 に示した。回収率は、全検査工程を通じて比較的高い傾向にあった。試料作製 14 日目までの全平均値でみると、どの検査工程でもほぼ 90%以上の回収率があった。回収率の最高値と最低値の差が最も小さかったのは、未処理検体を BCYE  $\alpha$  培地に接種した検査であり、長期保存した試料に対して最も安定した結果を示した。このことは、酸処理や熱処理、選択分離培地が供試菌に対して何らかのダメージを与えていることが推察される。確認コロニー数から、精度管理試料として安定した結果を示した試料作製 7 日目までの回収率を表 3、図 6 に示した。未処理と酸処理では、平均値はどの結果も 90%以上と非常に高く、最高値と最低値の差もどれも小さかった。ここでは、酸処理の MWY 培地の結果が最も良かった。また、熱処理については、他の処理に比べバラつきが大きく、コロニー数の結果同様、安定させることが難しいと思われた。

これらの結果から、本供試菌を使用した場合、北海道立衛生研究所の使用する培地と濃縮工程と検査手技から、確認コロニー数、回収率、今後目標とする試料の安定性延長の観点

を総合的に判断し、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くこととした。また、回収率では、予備実験では非常に高い数値を示したが、プレ精度管理では、複数メーカー、複数種類の培地を使用すること、検査機関ごとの濃縮方法や工程が異なること、検査開始を試料作製 2 週間以内と幅を持たせたことを考慮し、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。

## 2. プレ精度管理の試行

### <配布試料の安定性>

プレ精度管理では、さらに試料の安定性を図るため、供試菌の強化を検討し試行した。本供試菌については、昨年度の実験結果<sup>12)</sup>及び予備実験の結果から、酸処理には強いタイプであることが確認できていたので、予備実験使用菌に対し、50℃、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プレ精度管理に供試することとした。光電比色計の透過率は 88.4%だった。試料の安定性を示す結果を表 4 に示した。「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」という当初目標に対し、プレ精度管理配布試料においては、保存 3 日目試料でコロニー数約 300 前後を確認し、その後も検査者 A、B 間で確認コロニー数に有意な差が認められず、またその数も保存 14 日目試料まで 100 以上を保持し続けた。予備実験

では、その安定性が7日間であったことから、供試菌の強化が有意に働いた可能性が示唆された。この結果、回答を求めた検査開始期間中、配布試料は安定しており、精度管理試料として使用可能であると判断した。予備実験、プレ精度管理の光電比色計による透過率から推察し、透過率90.0%前後であれば、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前後で調製できると考えられた。次に回収率を表5に示した。予備実験に比べると回収率は低かったが、BCYE $\alpha$ 、MWY両寒天培地共に検査期間中の回収率は50%以上を保持し、平均回収率も両培地で84%と高い数値を示した。最大値と最低値の幅も小さかったことから、検査工程、手技についても妥当性があると考えられた。この結果については、「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」という目標を達成した。

#### <全参加施設の結果による検討>

まず北海道立衛生研究所の検査者A、Bによる確認コロニー数の結果を表6に、回収率の結果を表7に示す。前述<配布試料の安定性>の項目で述べた通り、自家調製した培地では、検査者間においても有意な差は認められず、直接検査のコロニー数、濃縮検体の回収率ともにほぼ安定しており、配布試料の安定性、検査工程、手技の妥当性を示す結果であった。しかしながら、その他の市販生培地の多くでは、各検査者の結果、検査者間での結果で安定しない状況が示された。全体として、コロニー数、回収率ともに検査者Aで高い傾向がみられた。コロニー数において検査者間差が少なかった市販生培地は、極東のBCYE $\alpha$ 寒天培地だけであった。またこの培地では、両検査者で保存

12日目試料までコロニー数が100以上を保持していた。OxoidのBCYE $\alpha$ 寒天培地では、検査者間差は認められたものの、極東のBCYE $\alpha$ 寒天培地と同じく両検査者で保存12日目試料までコロニー数が100以上を保持していた。また、同じく検査者間差は認められたが、日研のBCYE $\alpha$ 寒天培地、OxoidのMWY寒天培地で保存7日目試料までコロニー数が100以上を保持していた。栄研のBCYE $\alpha$ 寒天培地においても、総合的に見ると保存7日目試料までコロニー数が100以上を保持できる可能性が示唆された。回収率については、どの市販生培地においても安定した結果を示すことができなかった。

今回のプレ精度管理においては、検査者A、Bでは、使用している水、容器、濃縮方法等全て共通しており、検査者間での大きな差が生じないことを想定していた。実際試料の安定性を確認する目的にも使用した自家調製培地では、予備実験、プレ精度管理で、それを実証する結果が得られている。一方で、プレ精度管理の14日間の検査期間中、コロニー数においては、極東のBCYE $\alpha$ 寒天培地を除き他の市販生培地では、検査者間差が大きく不安定な結果を示した。また、回収率では、どの市販生培地でも不安定な結果を示した。このことは自家調製培地と同じOxoidのBCYE $\alpha$ やMWY寒天生培地を使用しても同等の安定性を得ることができなかった。つまり、今回のプレ精度管理においては、生菌数として、実際には自家調製した培地で発育した生菌が確認されているのにもかかわらず、全く同じ操作を行っても他の培地ではコロニー数及び回収率が大きく異なってくる現象が起こったということである。検査者A、Bでは、自家調製した培地を使用している場合には、試料作製から14日間いつ検

査を行っても適切なデータ回答を行うことができたが、その他の市販生培地を使用した場合においては、非常に少ないコロニー数や低い回収率を回答する場合があります、検査者間差が大きかったことから、実際の検査検体に対しても同様の結果をまねく可能性が否定できない。今回なぜこのような事象が起こったのか、現時点では適切な理由説明をすることができず、今後の検証が必要である。しかしながら、全く同じ検査工程を行っても培地間による差が大きい場合があったこと、また、全く同じ検査工程を行い、同一ロットの同一培地を使用しても、検査者間で大きな差が認められる場合があったことから、現状では精度管理を行った場合、回答されたデータにおいて施設間にバラツキが認められたとしても、検査施設の濃縮法等の検査工程に問題があるという評価を下すことができる定義が定まらず、検査工程の見直しや改善を行うための精度管理を実施することが非常に難しいことを意味している。いずれにしても、精度管理を行う場合には、検査工程や使用培地の幅があるほど、結果回答での幅も広がる可能性があり、その時の配布試料に対し、どこまでの結果回答幅が適切であると定義できるのかを十分に検討する必要があると思われる。

次に他 8 カ所の地衛研のデータを加えた結果を表 8、9、図 7 に示す。例えば、試料作製 5 日目に検査を行った A、B、G では、栄研の WYO  $\alpha$  寒天培地で比較すると、ゼラチン試料溶解後のコロニー数は B、G は全く同じであり、A では 1.5 倍の数を回答している。しかしながら、回収率では A、G では 100% を超える非常に高い値を示し、B では約 30% と低い値を示している。では、B の濃縮方法に問題があったかということ、自家調製培地では B においても高

い回収率が示されている。また確認されたコロニー数においても安定した高い数が回答されている。同じく試料作製 5 日目に検査を行った A、B、F、G では、Oxoid の BCYE  $\alpha$  寒天生培地で比較すると、ゼラチン試料溶解後のコロニー数は B、F、G ではほぼ同じであり、A では約 1.7 倍の数を回答している。しかしながら、回収率では B、F では低く、A では 50% 強、G では 100% を超える非常に高い値を回答した。同じく試料作製 5 日目に検査を行った A、B、F では、Oxoid の GVPC 寒天生培地で比較すると、ゼラチン試料溶解後のコロニー数は 196、38、97 とバラツキが認められる。しかしながら、回収率で見ると高い回収率ではないが、40~50% 前後の範囲で回答されている。このような状況は、試料作製後のどの日数の試料で検査しても同様の結果が認められている。これらのことから、参加した施設から回答されたコロニー数、回収率は、どの結果も十分起こる可能性があり、精度管理上適切な評価を行うことが難しいと思われる。このことは、検査工程の違いや培地の違いだけでは単純に説明できない事象が起こっている可能性もあり、原因を十分検討しなければならないと考える。また、今回のプレ精度管理では、仮想非濃縮検体を配布試料から各施設が作製している。この作業が適切に行われなければ、回収率の結果にも大きく影響してることが想定される。このため、各施設には事前に操作工程を説明し、複数の検査者によるチェックも必要と思われる。

#### D. 結論

標準的な検査法については、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。

研修システムの構築については、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。今後は、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。

精度管理については、北海道立衛生研究所の二人の検査者においては、北海道立衛生研究所が行う通常の検査法で、予備実験で24回、プレ精度管理で12回、計36回同時に検査を行っている。その結果、検査者間で確認されたコロニー数、回収率がほぼ安定していた。このことから、再現性の確認、検査工程の妥当性、検査者間での手技の安定性及び自家調製培地の性能については大きな問題がなかったと思われる。一方で、少なくとも使用培地によっては、同じ操作で検体を接種してもコロニー数に大きな差が認められたり、同じ濃縮工程を行っていたとしても回収率が大きく異なる場合があったことから、精度管理上各施設での検査結果を適切に評価することが難しいと思われた。今回の結果においては、今後も検証を重ねる必要があり、培地の違い以外の要因も視野に入れ検討する必要がある。北海道立衛生研究所においては、外部精度管理とは別に、内部精度管理を行ったと仮定すると、適切な結果が得られたと考えることができる。精度管理は、本来内部精度管理と外部精度管理を行うことでより安定した精度を確保することができる。検査施設では、複数の検査者が共通の認識を持って内部精度管理を行える体制を整えることも必要と思われる。次年度は、北海道立衛生研究所で自家調製した培地と市販生

培地を配付し外部精度管理を行い、結果を比較検討する予定である。

精度管理配布試料については、昨年度報告書にも記載したが、長期間の冷蔵や冷凍保存、酸処理や熱処理、各種選択分離培地の影響を受けないことが理想と考える。しかしながら、そのような試料の作製には膨大な実験による確認作業が必要であり、容易なことではない。現状では、検査工程や選択分離培地の幅が大きいほど、検査結果の幅も大きくなる可能性がある。特に手技に重きを置いた精度管理を行うとした場合、その手技が適切にもかかわらず、施設間での前処理や分離培地の違いが結果に大きく影響する可能性も十分に想定される。我々は、これまでも、前処理や分離培地の違いが検査結果に影響していることを報告してきた<sup>4, 6, 9)</sup>。精度管理の結果が思わしくなかった施設において、改善を必要とする部分が手技的なことなのか、前処理や分離培地によるのか、それらが複合的に影響したのか、評価側もそのポイントを特定できない場合、どのように改善すれば良いのか分からなくなる可能性もある。そのため、実際の検体に対する標準的な検査法と精度管理のための検査法については、同じ方法で対応することが困難な場合が想定される。例えば、精度管理については、前処理は行わず非選択分離培地のみを利用する方法も視野に入れての総合的な検討が必要であると考ええる。実際、今回試行したメーカーにおける非選択分離培地(BCYE  $\alpha$  寒天培地)では、試料作製7日目以内に検査を行えば、比較的安定したコロニー数を確認することが可能であった。今後の検討課題としては、検査のどの部分に重きを置いた精度管理を行うかの定義付けが重要になるとと思われる。その中で、精度管理配布試料については、

定義目的を達成できるだけの安定した試料を作製する必要があり、加えて複数の担当者間で比較的簡易に調製ができるような、作製方法であることが望ましいと思われる。これまで、当研究班では、精度管理用配布試料について、ゼラチンディスク<sup>14)</sup>、液体培地<sup>12)</sup>、1.5%ゼラチン加レジオネラ培地を試行し検討してきた。これらについては、今後も検討を重ねていく予定であるが、安定性、再現性、妥当性等のバリデーションを確保し、またそれらを多数作製した場合の品質管理も必要になることを勘案すると、今後は、そのような試料作製ノウハウを持った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る。

#### E. 参考文献

- 1) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討-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-: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 総括・分担研究報告書 pp.101-155.
- 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, pp.26-36
- 4) 森本 洋 他:検査法の検討 1 効率のよいコロニー観察法、生培地の検討: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 年度総括・分担研究報告書 pp.123-137

- 5) 森本 洋 他:検査法の検討 2 効率の良いコロニー観察法の普及:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 20 年度総括・分担研究報告書 pp.133-145

- 6) 森本 洋:検査法の検討 3 濃縮についての検討、分離培地としての BCYE $\alpha$  培地活用に関する検討:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 20 年度総括・分担研究報告書 pp.147-155

- 7) 森本 洋 他:検査法の検討 4 効率の良い集落観察法の普及と検討、分離培地の保存に関する検討:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 20 年度総括・分担研究報告書 pp.137-158

- 8) 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.

- 9) 森本 洋、宮坂次郎:レジオネラ選択分離培地の比較検討. 北海道立衛生研究所所報 2008;58:51-54.

- 10) 森本 洋、池田徹也、清水俊一、山口敬治:濃縮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所報 2009;59:73-74.

- 11) 森本 洋、池田徹也、清水俊一、山口敬治:浴槽水中のレジオネラ属菌検査における非濃縮検体の重要性. 北海道立衛生研究所

所報 2011;61:21-23.

12) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討-外部精度管理試料安定化に向けた取り組み-: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 年度総括・分担研究報告書 pp.157-161.

13) 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

14) 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

14) 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

#### F. 研究発表

1) 森本 洋, 池田徹也, 清水俊一, 山口敬治: 浴槽水中のレジオネラ属菌検査における非濃縮検体の重要性. 北海道立衛生研究所所報, 61, 印刷中, 2011.

2) 病原微生物検出マニュアル「レジオネラ症」分担執筆

3) 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, 第 85 回日本細菌学会総会技術講習会「話題微生物の分離・同定法と最新事情」, 平成 24 年 3 月 27 日長

崎新聞文化ホール

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## プレ精度管理検査工程

### 【送付内容】

検体数：1本（1.5%ゼラチン加レジオネラ培地 20ml 入り/50ml 容器）

供試菌種：*Legionella pneumophila* SG3

保存：検査開始まで冷蔵（5℃前後）保存

なお、濃縮工程器材、滅菌精製水 495ml 等につきましては、お手数ですが事前に御準備下さいますようよろしくお願い致します。

### 【検査工程】

1. 検体を 36℃±1℃孵卵器内で 30 分間静置。
2. その後、ボルテックスで 1 分間、均一に混和。
3. ゼラチンの溶け残りがいないか確認（溶解した検体は室温で安定です）。
4. 溶解した検体 100 μl を BCYE α 及び選択分離培地、各 1 枚に接種。
5. 溶解した検体 5 ml を滅菌精製水 495ml に加え十分に混和。  
これを非濃縮検体と仮定する。
6. 非濃縮検体 100 μl を BCYE α 及び選択分離培地、各 1 枚に接種。
7. ろ過法 または 遠心法により 100 倍濃縮。
8. 100 倍濃縮検体 100 μl を BCYE α 及び選択分離培地、各 1 枚に接種。
9. なお、4, 6, 8 の培地への接種のタイミングは参考であり、検査者の判断により行っても良い。
10. 検体接種後の平板培地は、36±1℃で培養。
11. 培養 3 日目にコロニーをカウントする。→ 全検体
12. 培養 7 日目にコロニーをカウントする。→ 非濃縮検体のみ
13. 4. ゼラチン溶解後検体、6. 非濃縮検体、8. 濃縮検体について、カウントされたコロニー数を結果ファイルに記入し、森本までメール報告願います。
14. また【注意事項】に従い濃縮条件等につきましても、該当条件を結果ファイルに記入願います。

### 【注意事項】

・基本的には前処理無しの検査を確実に行ってください。余力のある場合は、酸処理や熱処理も同時に行って頂けるとデータ取りに助かります。

処理条件：熱処理 検体 1ml を 50°C 30 分加熱後、急冷（例：氷中で 5 分、この時ゼラチンを溶解した検体も固まりません。）し培地へ 100  $\mu$ l 接種。

酸処理 0.2 M HCl・KCl buffer pH2.2 1ml と検体 1ml を等量混和後、室温に 4～5 分置き、培地へ 200ml 接種。

・濃縮条件：ろ過濃縮：非濃縮検体 500ml を 0.2  $\mu$  ポリカーボネート製フィルターを使用しろ過する。フィルターのトラップ面は光沢面で行うこと。ろ過後、フィルターと滅菌精製水 5ml を合わせ、5 分間手振り対応またはボルテックスで 1 分間処理。

ボルテックスの場合は、結果ファイルに、次のことを記載願います。  
フィルターを折り曲げて容器に入れたか。

折り曲げた場合は、トラップ面を内側にしたか外側にしたか。

トラップ面が内側になった場合、水中でフィルターが開いた状態でボルテックスしたか、密着し閉じた状態でボルテックスしたか。

遠心濃縮：次のことを結果ファイルに記載してください。

遠心量、G・回転数、遠心時間、上清液除去方法（デカンテーション、ピペッティング、アスピレーター使用など）、上清液完全除去後滅菌水を入れ濃縮液としたか、上清液を一部残し濃縮液としたか。

・基本検査だけを行う場合は、BCYE  $\alpha$  3 枚、選択分離培地 3 枚の計 6 枚への接種となります。前処理をフルに行うと、BCYE  $\alpha$  9 枚、選択分離培地 9 枚の計 18 枚への接種となります。

・コロニーの確認は基本的に培養 3 日目のみ行う。

コロニーの密着や微少コロニーの発育が想定されるため、実体顕微鏡等で正確にカウントする。

非濃縮検体については、培養 3 日目に確認後、培養 7 日目に最終確認を行う。

・実験開始日による、コロニー確認日の対応について

例えば到着日の 10 月 31 日に実験を開始するとコロニー確認日は 11 月 3 日（木）の祝日となります。この場合は、11 月 2 日（水）の帰宅前に平板を 30°C に移動させ、11 月 4 日（金）に確認して下さい。

11 月 2 日（水）に実験を開始し、培養 3 日目が 11 月 5 日（土）になる場合は、11 月 4 日（金）の帰宅前に平板を 25°C に移動させ、11 月 7 日（月）に確認して下さい。



検査結果

- ・検査開始日：
- ・培養 3 日目確認日：
- ・培養 7 日目確認日：

検査結果記入表：未処理（コロニー数）

	BCYE $\alpha$		選択培地	
	培養 3 日目	培養 7 日目	培養 3 日目	培養 7 日目
ゼラチン溶解後 検体				
非濃縮検体				
濃縮検体				

検査結果記入表：酸処理（コロニー数）

	BCYE $\alpha$		選択培地	
	培養 3 日目	培養 7 日目	培養 3 日目	培養 7 日目
ゼラチン溶解後 検体				
非濃縮検体				
濃縮検体				

検査結果記入表：熱処理（コロニー数）

	BCYE $\alpha$		選択培地	
	培養 3 日目	培養 7 日目	培養 3 日目	培養 7 日目
ゼラチン溶解後 検体				
非濃縮検体				
濃縮検体				

ろ過濃縮：フィルターからの菌体の剥がし方（○印記入）

5分間手振り	
ボルテックス1分間	

ろ過濃縮：ボルテックス1分間におけるフィルター状態

	回 答
フィルターを折り曲げて容器に入れたか	
折り曲げた場合 トラップ面を内側にしたか外側にしたか	
トラップ面が内側の場合 滅菌水中でフィルターが開いていたか、 密着していたか	

遠心濃縮条件

	回 答
遠心した検体量 (ml)	
G	
回転数	
遠心時間	
設定温度	
上清液除去方法	
①上清液完全除去後、滅菌水を添加し濃縮 ②上清液を一部残し濃縮	

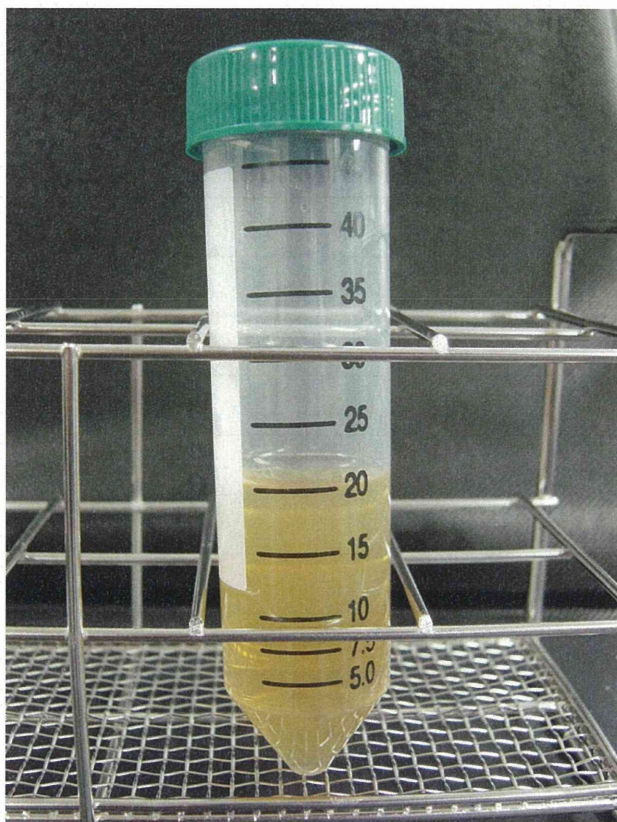


図1 配付試料

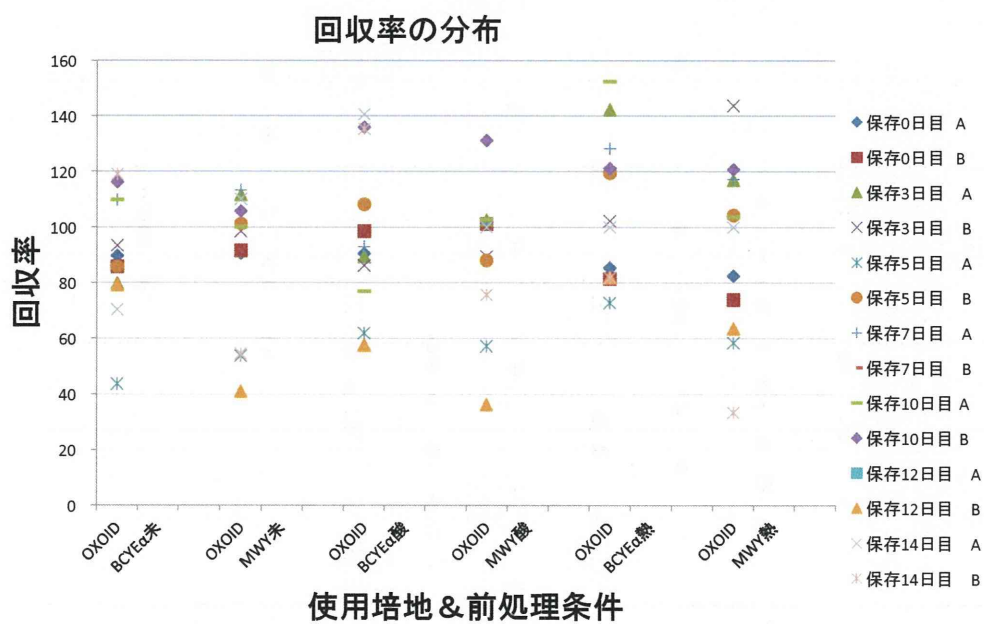


図5 予備実験回収率の分布(保存0~14日目試料)

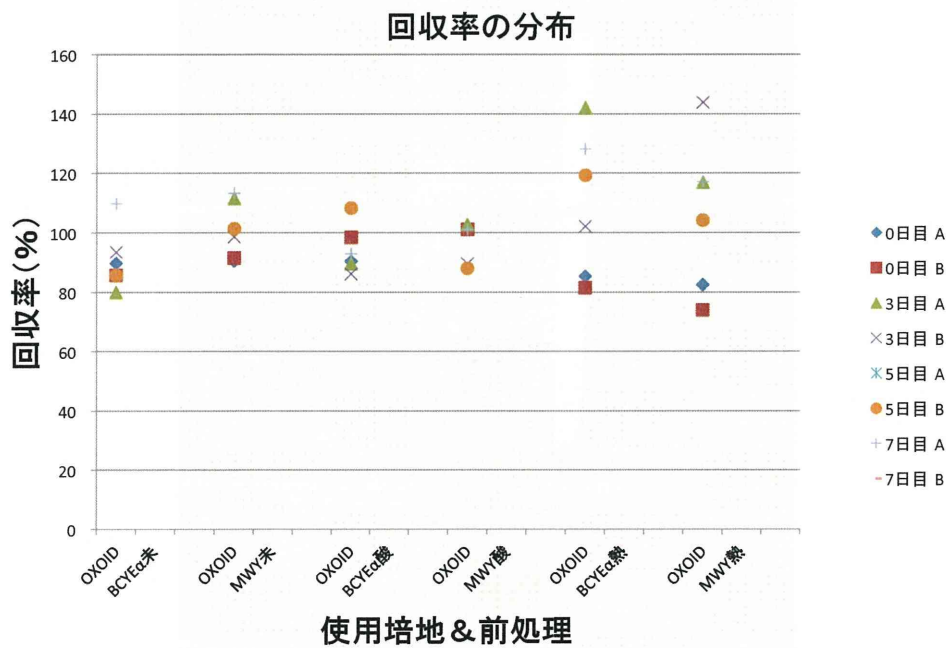


図6 予備実験回収率の分布(保存0~7日目試料)

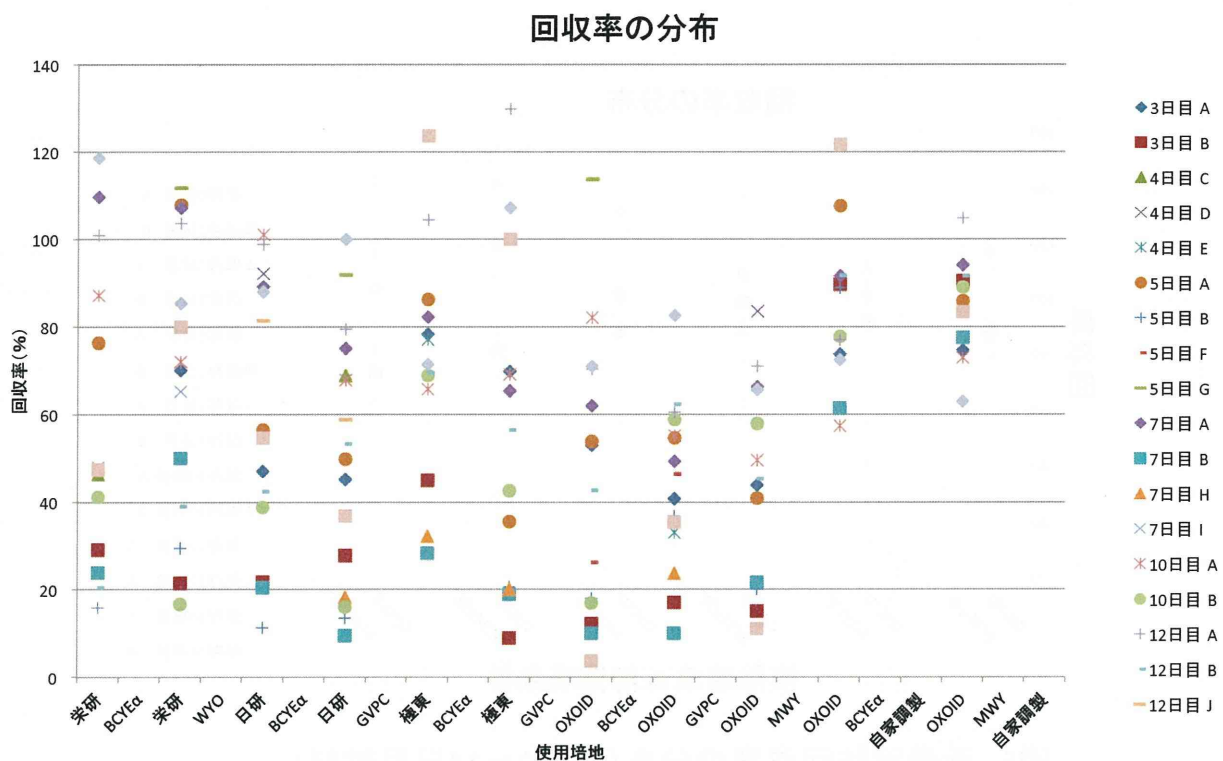


図7 プレ精度管理回収率の分布(保存0~14日目試料)

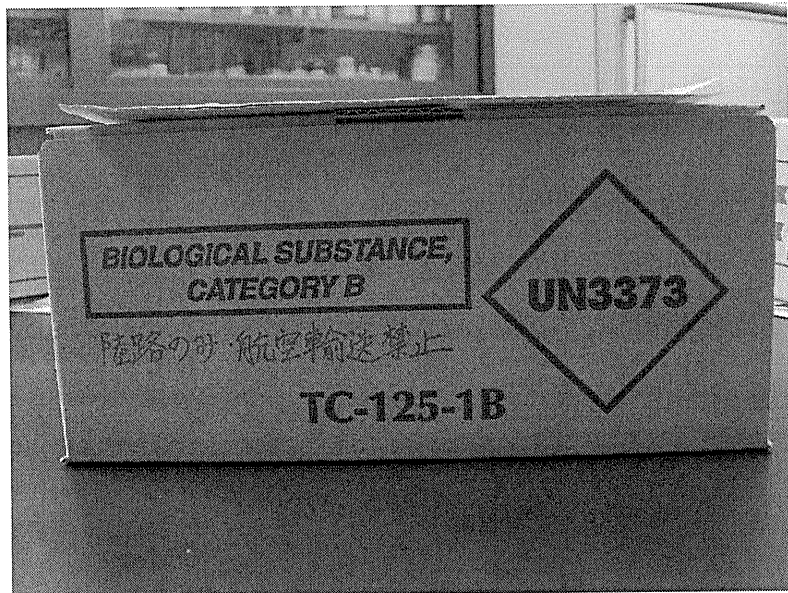


図2 搬送容器(1)

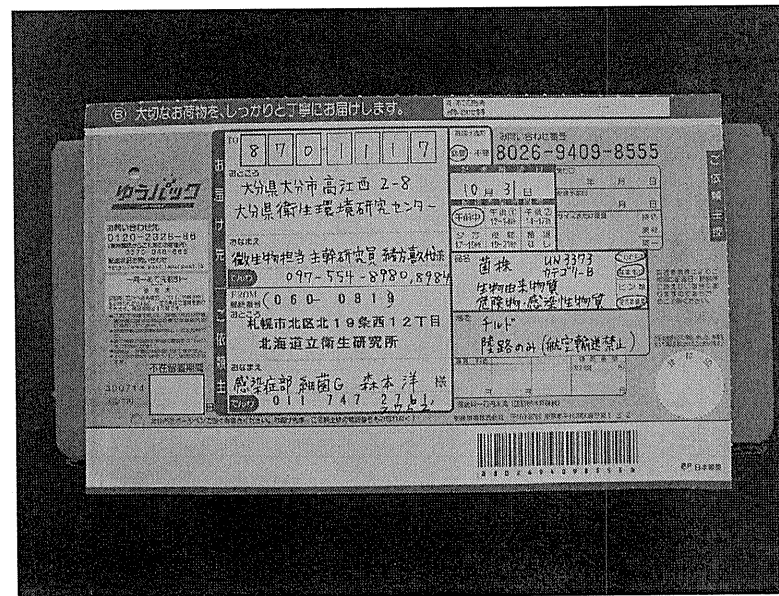


図3 搬送容器(2)

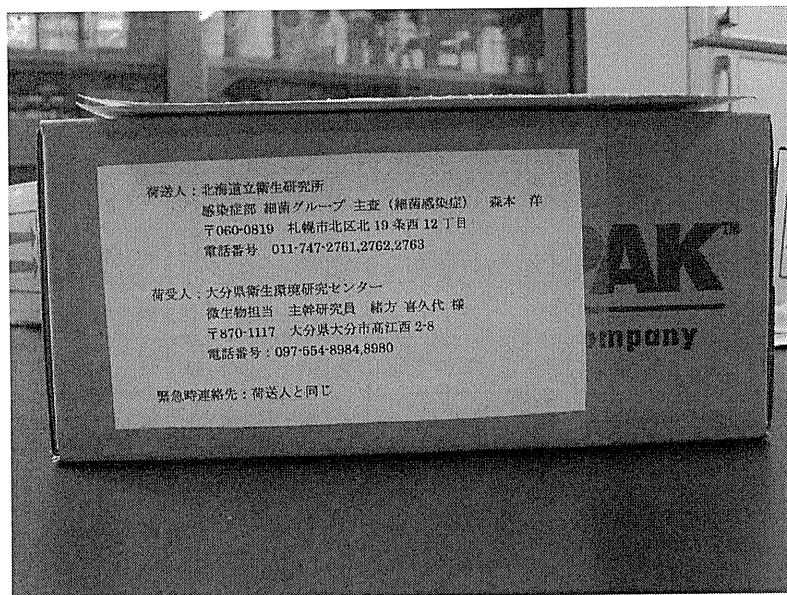


図4 搬送容器(3)

表1 予備実験検査結果(培養3日目のコロニー数、非濃縮:培養3日目(7日目))

使用場地 (前処理)	検査 状況	試料作製後の日数													
		0日目		3日目		5日目		7日目		10日目		12日目		14日目	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B		
BCYE α	直接	360	418	332	375	312	309	205		92	118		43	37	42
	非濃縮	7(7)	3(3)	2(2)	5(5)	5(5)	5(5)	2(3)		0(0)	2(2)		1(1)	1(1)	0(0)
MWY	濃縮	323	358	265	350	《136》	265	225		101	137		34	26	50
	直接	346	317	274	276	238	239	172		84	105		39	20	33
BCYE α	非濃縮	2(2)	3(3)	1(1)	2(2)	3(3)	2(2)	2(3)		1(1)	0(0)		0(0)	0(0)	0(0)
	濃縮	313	290	306	272	《128》	242	195		84	111		16	22	18
MWY	直接	385	375	392	381	299	279	210		104	106		66	32	34
	非濃縮	4(4)	1(1)	8(6)	3(3)	3(4)	2(2)	2(2)		3(3)	2(2)		1(1)	1(1)	0(0)
BCYE α	濃縮	348	369	351	328	《185》	302	195		80	144		38	45	46
	直接	332	267	259	333	231	252	187		72	74		36	23	33
MWY	非濃縮	0(0)	3(3)	4(4)	3(3)	2(3)	2(2)	3(3)		0(0)	1(1)		0(1)	0(0)	0(0)
	濃縮	292	270	266	298	《132》	222	189		74	97		13	23	25
BCYE α	直接	355	362	211	272	169	155	85		21	38		11	8	11
	非濃縮	4(4)	5(5)	5(6)	2(2)	0(0)	2(2)	0(0)		0(0)	0(0)		0(1)	0(0)	0(0)
MWY	濃縮	303	295	300	278	《123》	185	109		32	46		9	8	9
	直接	343	260	194	153	156	140	70		27	29		11	3	9
BCYE α	非濃縮	5(5)	4(4)	3(3)	1(1)	3(4)	1(1)	1(1)		0(0)	0(0)		0(0)	0(0)	0(0)
	濃縮	283	192	227	220	《91》	146	82		28	35		7	3	3

\*《》は濃縮中にろ紙が破損したため参考値として扱う  
\*A, B: 検査者を表す

表2 予備実験回収率(培養3日目、試料作製14日目)

使用培地 (前処理)		試料作製後の日数												平均	最低 値(a)	最高 値(b)	b-a		
		0日目		3日目		5日目		7日目		10日目		14日目							
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B						
BCYE α (未処理)	回収率	90	86	80	93		86	110		110	116		79	70	119	90	70	119	49
MWY (未処理)	回収率	90	91	112	99		101	113		100	106		41	110	55	89	41	113	72
BCYE α (酸処理)	回収率	90	98	90	86		108	93		77	136		58	141	135	98	58	141	83
MWY (酸処理)	回収率	88	101	103	89		88	101		103	131		36	100	76	89	36	131	95
BCYE α (熱処理)	回収率	85	81	142	102		119	128		152	121		82	100	82	106	81	152	71
MWY (熱処理)	回収率	83	74	117	144		104	117		104	121		64	100	33	93	33	144	111

\*A、B: 検査者を表す

表3 予備実験回収率(培養3日目、試料作製7日目)

使用培地 (前処理)		試料作製後の日数								平均	最低 値(a)	最高 値(b)	b-a
		0日目		3日目		5日目		7日目					
		A	B	A	B	A	B	A	B				
BCYE α (未処理)	回収率	90	86	80	93		86	110		91	80	110	30
MWY (未処理)	回収率	90	91	112	99		101	113		101	90	113	59
BCYE α (酸処理)	回収率	90	98	90	86		108	93		94	86	108	22
MWY (酸処理)	回収率	88	101	103	89		88	101		95	88	103	15
BCYE α (熱処理)	回収率	85	81	142	102		119	128		110	81	142	61
MWY (熱処理)	回収率	83	74	117	144		104	117		106	74	144	86

\*A、B: 検査者を表す

表4 試料の安定性(コロニー数: 直接)

使用培地	検査 状況	試料作製後の日数											
		3日目		5日目		7日目		10日目		12日目		14日目	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
BCYE	直接	342	308	277	324	287	287	225	234	182	181	116	115
	非濃縮	1	4	2	5	5	1	2	1	1	4	3	0
	濃縮	252	276	298	288	263	176	129	182	140	166	84	140
MWY	直接	279	302	283	340	237	226	192	200	147	142	116	126
	非濃縮	2	3	3	1	2	5	0	0	0	1	0	1
	濃縮	208	273	243	263	223	175	140	178	154	130	73	105

表5 試料の安定性(回収率)

使用培地		試料作製後の日数												平均	最低 値(a)	最高 値(b)	b とa の差
		3日目		5日目		7日目		10日目		12日目		14日目					
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B				
BCYE	回収率	74	90	108	89	92	61	57	78	77	92	72	122	84	57	122	65
MWY	回収率	75	90	86	77	94	77	73	89	105	92	63	83	84	63	105	42



表6 北海道立衛生研究所によるプレ精度管理検査結果（コロニー数：培養3日目）

使用培地	検査検体	試料作製後の日数											
		3日目		5日目		7日目		10日目		12日目		14日目	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
栄研 BCYE α	直接	289	55	257	139	176	130	124	85	110	49	54	38
	非濃縮	5	0	4	0	2	0	0	0	2	0	0	0
	濃縮	135	16	196	22	193	31	108	35	111	10	64	18
栄研 WYO	直接	120	42	103	68	111	50	75	30	55	41	34	10
	非濃縮	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0
	濃縮	84	9	111	20	119	25	54	5	57	16	29	8
日研 BCYE α	直接	245	189	266	159	211	200	103	80	81	66	50	55
	非濃縮	2	0	1	2	2	2	2	5	0	0	0	0
	濃縮	115	41	150	18	188	41	104	31	80	28	44	30
日研 GVPC	直接	164	72	215	59	160	105	56	25	34	15	13	19
	非濃縮	2	0	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0
	濃縮	74	20	107	8	120	10	38	4	27	8	13	7
極東 BCYE α	直接	318	287	305	284	308	269	230	221	136	154	101	93
	非濃縮	3	3	6	2	4	0	1	2	2	4	1	2
	濃縮	249	129	263	196	253	76	151	152	142	107	72	115
極東 GVPC	直接	241	135	231	78	179	74	123	40	47	39	28	16
	非濃縮	2	0	2	0	3	0	2	0	0	0	0	0
	濃縮	168	12	82	16	117	14	85	17	61	22	30	16
Oxoid BCYE α	直接	255	115	266	150	270	190	134	171	138	117	93	108
	非濃縮	2	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
	濃縮	135	14	143	27	167	19	110	29	97	50	66	4
Oxoid GVPC	直接	241	47	196	38	246	80	136	63	91	61	46	34
	非濃縮	4	0	1	1	1	0	3	0	0	1	1	0
	濃縮	98	8	107	14	121	8	75	37	55	38	38	12
Oxoid MWY	直接	294	173	289	110	207	153	204	83	131	106	116	82
	非濃縮	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0
	濃縮	129	26	118	22	137	33	101	48	93	48	76	9
Oxoid BCYE α 自家調製	直接	342	308	277	324	287	287	225	234	182	181	116	115
	非濃縮	1	4	2	5	5	1	2	1	1	4	3	0
	濃縮	252	276	298	288	263	176	129	182	140	166	84	140
Oxoid MWY 自家調製	直接	279	302	283	340	237	226	192	200	147	142	116	126
	非濃縮	2	3	3	1	2	5	0	0	0	1	0	1
	濃縮	208	273	243	263	223	175	140	178	154	130	73	105

表7 北海道立衛生研究所によるプレ精度管理検査結果（回収率：培養3日目）

使用培地		試料作製後の日数												平均	最低値 (a)	最高値 (b)	b-a
		3日目		5日目		7日目		10日目		12日目		14日目					
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B				
栄研 BCYE α	回収率	47	29	76	16	110	24	87	41	101	20	119	47	60	16	119	103
栄研 WYO	回収率	70	21	108	29	107	50	72	17	104	39	85	80	65	17	108	91
日研 BCYE α	回収率	47	22	56	11	89	21	101	39	99	42	88	55	56	11	101	90
日研 GVPC	回収率	45	28	50	14	75	10	68	16	79	53	100	37	48	10	100	90
極東 BCYE α	回収率	78	45	86	69	82	28	66	69	104	69	71	124	74	28	124	96
極東 GVPC	回収率	70	9	35	21	65	19	69	43	130	56	107	100	60	9	130	121
Oxoid BCYE α	回収率	53	12	54	18	62	10	82	17	70	43	71	4	41	4	82	78
Oxoid GVPC	回収率	41	17	55	37	49	10	55	59	60	62	83	35	47	10	83	73
Oxoid MWY	回収率	44	15	41	20	66	22	50	58	71	45	66	11	42	11	71	60
Oxoid BCYE α 自家調製	回収率	74	90	108	89	92	61	57	78	77	92	72	122	84	57	122	65
Oxoid MWY 自家調製	回収率	75	90	86	77	94	77	73	89	105	92	63	83	84	63	105	42

表8 全参加施設によるプレ精度管理検査結果（コロニー数:培養3日目）

使用 培地	検査 検体	試料作製後の日数																				
		3日目		4日目			5日目				7日目				10日目			12日目			14日目	
		A	B	C	D	E	A	B	F	G	A	B	H	I	A	B	J	A	B	A	B	
栄研 BCYEα	直接	289	55	108			257	139			176	130		192	124	85	110	49		54	38	
	非濃縮	5	0	0			4	0			2	0		2	0	0	2	0		0	0	
	濃縮	135	16	50			196	22			193	31		92	108	35	111	10		64	18	
栄研 WYO	直接	120	42				103	68		68	111	50		152	75	30	55	41		34	10	
	非濃縮	1	0				1	0		0	2	0		1	1	0	0	0		1	0	
	濃縮	84	9				111	20		76	119	25		99	54	5	57	16		29	8	
日研 BCYEα	直接	245	189		242		266	159			211	200			103	80	81	66	43	50	55	
	非濃縮	2	0		2		1	2			2	2			2	5	0	0	1	0	0	
	濃縮	115	41		223		150	18			188	41			104	31	80	28	35	44	30	
日研 GVPC	直接	164	72	93			215	59		<99>	160	105	<143>		56	25	34	15	17	13	19	
	非濃縮	2	0	2			2	1		<1>	1	0(0)	<1>		0	1	0	0	0	0	0	
	濃縮	74	20	64			107	8		<91>	120	10	<26>		38	4	27	8	10	13	7	
極東 BCYEα	直接	318	287			257	305	284			308	269	264		230	221	136	154		101	93	
	非濃縮	3	3			1	6	2			4	0	1		1	2	2	4		1	2	
	濃縮	249	129			198	263	196			253	76	85		151	152	142	107		72	115	
極東 GVPC	直接	241	135				231	78			179	74	230		123	40	47	39		28	16	
	非濃縮	2	0				2	0			3	0	0		2	0	0	0		0	0	
	濃縮	168	12				82	16			117	14	46		85	17	61	22		30	16	
Oxoid BCYEα	直接	255	115				266	150	145	160	270	190			134	171	138	117		93	108	
	非濃縮	2	0				1	1	1	3	1	1			1	0	0	0		1	0	
	濃縮	135	14				143	27	38	182	167	19			110	29	97	50		66	4	
Oxoid GVPC	直接	241	47			279	196	38	97		246	80	<240>		136	63	91	61		46	34	
	非濃縮	4	0			0	1	1	0		1	0	<3>		3	0	0	1		1	0	
	濃縮	98	8			92	107	14	45		121	8	<57>		75	37	55	38		38	12	
Oxoid MWY	直接	294	173		267		289	110			207	153			204	83	131	106		116	82	
	非濃縮	2	1		3		2	0			0	0			1	0	0	0		1	0	
	濃縮	129	26		223		118	22			137	33			101	48	93	48		76	9	
Oxoid BCYEα	直接	342	308				277	324			287	287			225	234	182	181		116	115	
	非濃縮	1	4				2	5			5	1			2	1	1	4		3	0	
	濃縮	252	276				298	288			263	176			129	182	140	166		84	140	
Oxoid MWY	直接	279	302				283	340		<115>	237	226			192	200	147	142		116	126	
	非濃縮	2	3				3	1		<2>	2	5			0	0	0	1		0	1	
	濃縮	208	273				243	263		<89>	223	175			140	178	154	130		73	105	

◇は参加施設独自のデータであるため参考値として扱う

表9 全参加施設によるプレ精度管理検査結果（回収率:培養3日目）

使用 培地		試料作製後の日数																		平均	最低 値(a)	最高 値(b)	b-a		
		3日目		4日目			5日目				7日目				10日目			12日目						14日目	
		A	B	C	D	E	A	B	F	G	A	B	H	I	A	B	J	A	B					A	B
栄研 BCYE	回収率	47	29	46			76	16			110	24		48	87	41	101	20		119	47	58	16	119	103
栄研 WYO	回収率	70	21				108	29		112	107	50		65	72	17	104	39		85	80	69	17	112	95
日研 BCYE	回収率	47	22		92		56	11			89	21			101	39	99	42	81	88	55	60	11	101	90
日研 GVPC	回収率	45	28	69			50	14		<92>	75	10	<18>		68	16	79	53	59	100	37	50	10	100	90
極東 BCYE	回収率	78	45			77	86	69			82	28	32		66	69	104	69		71	124	72	28	124	96
極東 GVPC	回収率	70	9				35	21			65	19	20		69	43	130	56		107	100	57	9	130	121
Oxoid BCYE	回収率	53	12				54	18	26	114	62	10			82	17	70	43		71	4	45	4	114	110
Oxoid GVPC	回収率	41	17			33	55	37	46		49	10	<24>		55	59	60	62		83	35	46	10	83	73
Oxoid MWY	回収率	44	15		84		41	20			66	22			50	58	71	45		66	11	45	11	84	73
Oxoid BCYE 自家調製	回収率	74	90				108	89			92	61			57	78	77	92		72	122	84	57	122	65
Oxoid MWY 自家調製	回収率	75	90				86	77		<77>	94	77			73	89	105	92		63	83	84	63	105	42

◇は参加施設独自のデータであるため参考値として扱う



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

レジオネラ属菌の培養検査法と精度管理

研究分担者 緒方喜久代 大分県衛生環境研究センター  
研究協力者 佐々木麻里、成松浩志 大分県衛生環境研究センター

研究要旨：昨年度に引き続き、斜光法を取り入れた培養法の正確かつ迅速化について検討を行った。その結果、より短い期間で正確な培養結果が得られ、高額で特殊な機器も必要としないことから、浴槽水等のレジオネラ属菌の迅速培養に大いに役立つことが示された。数種類の分離培地の併用や雑菌処理工程の併用により、検出率が向上することが確認された。これらの検討を行うことにより、最良の公定法を提示することが可能となる。また、様々な泉質を有する浴槽水における LAMP 法の留意点などについて検討を行った。

併せて、民間検査機関への精度管理・研修導入に向け、実態把握のためのモデル的にアンケート調査、実態調査を行った。

#### A. 研究目的

浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として広く用いられている培養法は結果を得るまでに 7 日から 10 日の長い時間を要する。患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時やレジオネラ属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中のレジオネラ属菌の存在あるいは菌数を速やかに把握する必要がある場合は、監視現場からより迅速で、かつ正確な検査が求められている。そこで、様々な泉質を有する温泉水等を対象に、正確・簡便・迅速な培養結果を得る方法としての斜光法(分離培地上の出現コロニーに 2 方向から斜光をあて、実体顕微鏡下で観察をするとレジオネラ属菌は特徴的なモザイク状の形態を示すことを利用した方法:参考文献 1)をレジオネラ属菌検査の標準法に導入すること目的に従来の培養法との比較検討を行った。

また、遺伝子検査法として普及してきた LAMP 法について、培養法(+)LAMP 法

(-)の不一致となる原因に関する検討を行った。

併せて、民間検査機関への精度管理・研修を導入するにあたり、民間検査機関の検査実態や要求を把握するために、試験的にアンケート調査を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料および検査法

平成 23 年 8 月、9 月、10 月に搬入された浴槽水および湯口水 56 検体を対象とした。

検査法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した。すなわち、検水 1200ml をメンブランフィルター(直径 47mm、 $\phi$  0.2 $\mu$ m、ADVANTEC 社 POLYCARBONATE)で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 12ml 入りの滅菌コニカルビーカー(100ml 容量)に移し、ボルテックスミキサーにて 5 分間激しく振とうした。ろ過濃縮後、濃縮検体(未加熱と表記)と 50 $^{\circ}$ C 20 分加熱後、急冷した濃縮検体(加熱処理と表記)をそれぞれ濃

縮試料(100倍濃縮)とした。

## 2. 培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYO $\alpha$  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;Oxoid)を用い、非濃縮処理の検水および各濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、その200 $\mu$ Lを各分離平板1枚に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 $^{\circ}$ Cで培養した。

培養3日目に、2方向から光を照射し、実体顕微鏡下で各分離培地を観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYE $\alpha$  寒天培地(自家製)及び血液寒天培地(ウマ血, 自家製)に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、PCR法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は36 $^{\circ}$ Cで10日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、同様の同定検査を行った。最終的に同定されたコロニー数をもって検水100mlあたりのレジオネラ属菌数に換算した。分離した菌株は、Legionella Latex Test Kit(OXOID)及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

## 3. LAMP法

濃縮検体について、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1検体につき3回繰り返し測定を行った。

加えて、培養(+)LAMP(-)の濃縮検体について、阻害回避試薬を用いた検討およびDNA抽出法の検討を行った。

## 4. アンケート調査

同研究班の研究分担者(T県)に協力を得て、T県内の水質検査機関12施設にアンケート調査(Fig.1)を行った。

保健所の協力を得て、大分県内の民間検査機関の実態調査を行った。

## C. 研究結果

### 1. 培養法

培養結果の概要をTable 1に示した。56

検体中29検体(52%)からレジオネラ属菌が検出された。内訳は浴槽水29検体中18検体(62%)、湯口水27検体中11検体(41%)であった。

レジオネラ属菌が検出された29検体について分離培地の検出感度を比較した結果をTable 2に示した。濃縮未加熱検体では、使用した3種類の分離培地全てから分離されたものが15検体、WYO $\alpha$ +MWYからの分離が2検体、GVPC+MWYからの分離が2検体、WYO $\alpha$ のみからの分離が4検体、MWYのみから分離が1検体であった。濃縮加熱検体では、3種類の分離培地全てから分離されたものが16検体、WYO $\alpha$ +GVPCからの分離が2検体、WYO $\alpha$ +MWYからの分離が3検体、GVPC+MWYからの分離が1検体、WYO $\alpha$ のみからの分離が2検体、MWYのみから分離が3検体であった。

斜光法は培養3日目を判定日とし、特徴あるモザイク状のコロニーについて確認検査を行った。その結果、レジオネラ属菌が検出された29検体のうち27検体は斜光法で確認することができたが、2検体は継続培養後にレジオネラ属菌が確認された。継続培養で陽性となった2検体から分離されたレジオネラ属菌は、1検体は*L. pneumophila*、1検体は*L. anisa*であった。

浴槽水と湯口水ともにレジオネラ属菌が検出された施設は6施設であった。浴槽水(+)湯口水(-)となった施設は10施設、浴槽水(-)湯口水(+)となった施設は1施設であった(Table 3)。

### 2. LAMP法

濃縮検体1検体につき3回繰り返し測定を行い、1回でも陽性となった場合は、その結果を採用した(Table 4)。培養(+)LAMP法(-)の濃縮検体について、阻害回避処理試薬を用い、再度測定を行ったが、得られた結果は同じであった。

レジオネラ属菌数が2000cfu/100ml検出されたにもかかわらず、LAMP法(-)となったサンプルBについて、DNA抽出法の検討を行った(Table 5)。レジオネラ属菌16sPCR法により、いずれの抽出方法においても、DNAが抽出されていることは確認できた。し

かし、カラム抽出法では、3 回繰り返し測定の結果、一回も LAMP 法陽性の結果は得られなかった。また、3 回連続測定で陽性結果が得られたものの安定した結果とはならなかった添付試薬による抽出とキレックス抽出については、さらに 3 回繰り返し測定を行った。しかし、添付試薬による抽出は、3 回とも陰性結果となり、比較的安定した結果が得られたのは、キレックス抽出法であった。

### 3. アンケート調査

調査対象の 12 検査施設のすべてから回答が得られた。12 検査施設のうち、実際に検査を実施している機関は 9 施設であった。研修については、12 検査施設中 10 施設が、精度管理については、7 施設が積極的に希望する結果となった(Fig.2)。

一方、保健所の協力を得て実施した平成 22 年度下半期から平成 23 年度上半期の一年間、大分県内の公衆浴場施設を対象にレジオネラ属菌の検査を実施した民間検査機関を集計した結果、その数は 18 機関となった。そのうち、所在地が大分県内にあるものは 2 機関のみであった。鹿児島県や関東に所在する検査機関も参入していた。

### D. 考察

レジオネラ属菌が検出された 29 検体について、使用した分離培地 WYO $\alpha$ 、GVPC、MWY の個々の解析をすると、各分離培地でのレジオネラ属菌の分離は 17 検体から 23 検体であり、レジオネラ属菌を感度よく分離するためには、レジオネラ属菌の発育特性に配慮し、選択性の異なる培地を併用することが望ましい。また、未加熱の濃縮検体では 24 検体から、加熱処理では 27 検体からレジオネラ属菌が分離され、処理工程を併用することにより 28 検体からレジオネラ属菌が検出された。加えて、非濃縮検体のみから検出されたものが 1 検体あり、各種分離培地の併用や処理工程の併用など培養チャンスを多くすることが検出率アップにつながり、レジオネラ感染症の危険性を回避することに貢献できると考える。

培養 7 日以降で発育を認める検体もあったため、培養 3 日目で培養検査を打ち切る

ことはできないものの、斜光法は、高価かつ特殊な機器を必要とせず、簡便で迅速な結果が得られる培養法として、非常に有用な方法である。今後は、LAMP 法で得られた結果と斜光法の培養結果を合わせて迅速な行政対応を行い、10 日間引き続き培養を継続し、最終結果として判断することが可能と考える。3 日目観察・同定後、最終判定日の 10 日目まで作業を中断することができることから、負担軽減にも功を奏し、また、検査を集中することにより検出確率が上昇する利点も考えられた。

浴槽水(+)湯口水(-)となった 10 施設は、浴槽や床の清掃不足や入浴客の不適切な利用方法などが原因と考えられ、衛生管理指導の強化が望まれる。また、今回測定した施設の中には、レジオネラ属菌数が 200,000cfu/100ml に上るものもあったため、感染者発生を未然に防ぐために、当該保健所の環境衛生監視員による施設管理状況の把握、清掃・消毒の管理指導の徹底が図られた。

LAMP 法において、レジオネラ属菌数が少ない検体の場合等は、検査結果にバラツキが生じやすく、培養法(+)LAMP 法(-)の不一致の一因として考えられた。さらに、温泉検体では、「菌数」だけではなく、検出される「菌種」や泉質などの様々な要因により、LAMP 法で安定した結果が得られない場合が考えられ、測定時には注意を要する。

レジオネラ属菌の検査を実施している民間検査機関は、従来、環境検査を主とした中に、レジオネラ属菌の検査を取り入れたところも多く、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは取り組む経緯や成り立ちが異なる場合も多い。そのような場合、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは異なり、微生物検査の技術を習得し、熟練した検査員が存在しない場合もある。民間検査機関への精度管理・研修の導入にあたっては、まず、レジオネラ属菌の検査実施機関の実態把握を行い、特徴・特性を熟知する必要がある。

その上で、民間検査機関を含めたレジオネラ属菌検査にかかわる全ての検査機関の質の良い検査精度確保のため、精度管理は

重要な課題である。その実現のため、①モニタリングに最適な検査法(採水時から検査結果まで)の提示、②精度管理用サンプルの安定提供、③評価機関の確保が肝要と考える。

#### E. まとめ

入浴施設における浴槽等の清掃・消毒効果を確認するための衛生管理手法として、迅速に結果が得られる LAMP 法を導入することは効果的ではあるが、菌量が少ない場合、多種多様な泉質を有する温泉水の場合は、見逃しの危険性がある。また、「100ml あたり 10cfu 以下であること」という基準がある限り、培養法の併用は必須である。そこで、培養法における正確・迅速化を図るため、斜光法を取り入れた方法を併用することにより、迅速な行政対応が可能になるものとする。今後、さらに斜光法の有用性の確認を重ね、斜光法を含めた精度高いレジオネラ属菌検査を普及するための研修システムを強化し、標準的検査法への反映、民間検査機関への精度管理導入に向け、今後の検討を図っていきたい。

#### 参考文献

- 1 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. 環境感染誌, 2010. 25(1):8-14
- 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地域健康危機管理研究事業、主任研究者 倉 文明、H19 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、研究代表者 倉 文明、H20 年度総括研究報告
- 4 「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、研究代表者 倉 文明、H21 年度総括研究報告
- 5 「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、研究代表者 倉 文明、H22 年度総括研究報告

#### F. 研究発表等

1. 平成 23 年度生活衛生関係技術担当者研修会にて発表

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Tabel 1 培養法の結果

採水箇所		検体数	検出数 <sup>a</sup>	WYO	GVPC	MWY
掛け流し式	浴槽水	21	14	12	12	13
	湯口水	20	8	6	4	6
循環式	浴槽水	8	4 <sup>b</sup>	4	4	3
	湯口水	7	3	2	1	2
計		56	29	24	22	24

<sup>a</sup> 10cfu/100m によらない(定性)

<sup>b</sup> 1検体は非濃縮検体のみから 10cfu/100m 以上検出