

(a) レジオネラ用 Lysis buffer の検量線 (b) プラスミドとの比較

図3 レジオネラ用 Lysis buffer を用いて菌液から抽出した DNA の検量線

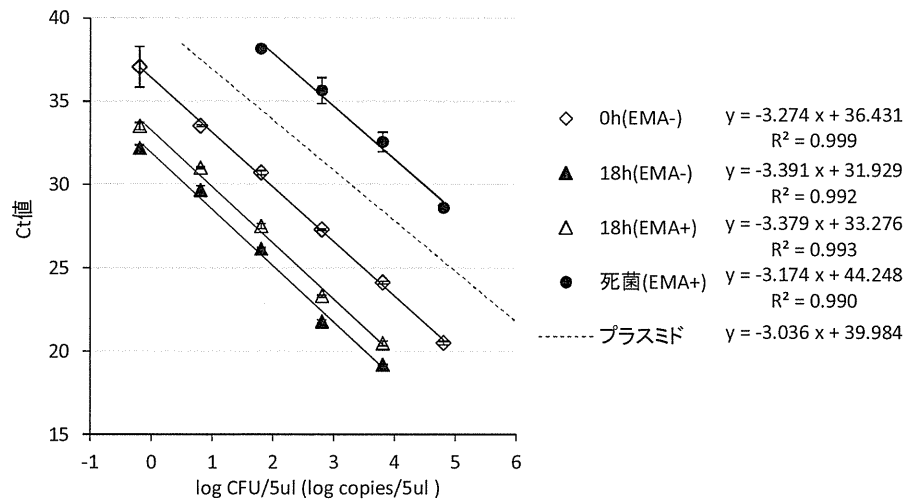


図4 アメーバ培養レジオネラを用いた LC EMA-qPCR の検量線

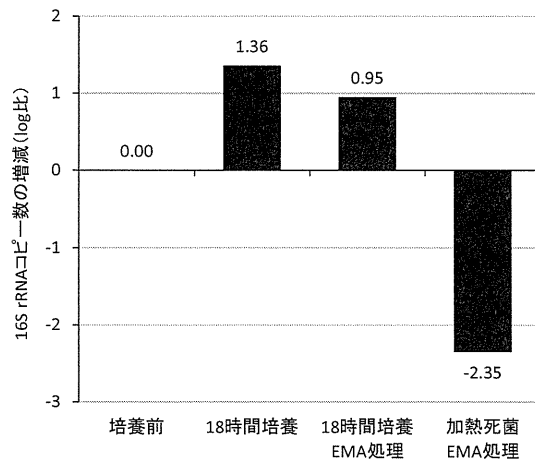


図5 LC EMA 処理に伴う 16S rRNA 遺伝子コピー数の増減 (アメーバ培養レジオネラ)

表1 *Legionella* (16S rRNA 遺伝子) 検出キットの特異性 (1)

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	CY240での検出
1	NIIB0145	<i>L. adelaidensis</i>		E	1762-AUS-E	49625	++
2	NIIB0040	<i>L. anisa</i>		E	WA-316-C3	35292	++
3	NIIB0405	<i>L. beliardensis</i>		E	Montbe'liard A1	700512	++
4	NIIB0057	<i>L. birminghamensis</i>		C	1407-AL-H	43702	++
5	NIIB0009	<i>L. bozemanii</i>	1	C	WIGA	33217	++
6	NIIB0687	<i>L. bozemanii</i>	2	C	Tronto-3	35545	++
7	NIIB0114	<i>L. brunensis</i>		E	441-1	43878	++
8	NIIB1254	<i>L. busanensis</i>		E	KCTC 12084, K9951	700510	+
9	NIIB0047	<i>L. cherrii</i>		E	ORW	35252	(+)
10	NIIB0113	<i>L. cincinnatiensis</i>		C	72-OH-H	43753	++
11	NIIB0417	<i>L. donaldsonii</i>		C	MDA 2706	BAA-693	++
12	NIIB0406	<i>L. drozanskii</i>		E	LLAP-1	700990	+
13	NIIB0078	<i>L. dumoffii</i>		E	NY 23	33279	++
14	NIIB0234	<i>L. gormanii</i>		E	LS-13	33297	++
15	NIIB0049	<i>L. erythra</i>	1	E	SE-32A-C8	35303	++
16	NIIB0146	<i>L. fairfieldensis</i>		E	1725-AUS-E	49588	+
17	NIIB0408	<i>L. fallonii</i>		E	LLAP-10	700992	++
18	NIIB0688	<i>L. feeleii</i>	1	E	WO-44C	35072	+
19	NIIB0689	<i>L. feeleii</i>	2	C	691-WI-H	35849	+
20	NIIB0193	<i>L. geestiana</i>		E	1308	49504	+
21	NIIB0147	<i>L. gratiana</i>		E	Lyon 8420412	49413	++
22	NIIB0404	<i>L. gresilensis</i>		E	Gre'oux 11D13	700509	+
23	NIIB0690	<i>L. hackeliae</i>	1	C	Lansing 2	35250	++
24	NIIB0691	<i>L. hackeliae</i>	2	C	798-PA-H	35999	+
25	NIIB0053	<i>L. israelensis</i>		E	Bercovier 4	43119	+
26	NIIB0046	<i>L. jamestowniensis</i>		E	JA-26-G1-E2	35298	++
27	NIIB0014	<i>L. jordanis</i>		E	BL-540	33623	++
28	NIIB0148	<i>L. lansingensis</i>		C	1677-MI-H	49751	+
29	NIIB0194	<i>L. londiniensis</i>	1	E	1477	49505	+
30	NIIB1255	<i>L. londiniensis</i>	2	E	Mulhouse B26	BAA-518	+
31	NIIB0692	<i>L. longbeachae</i>	1	C	Long Beach 4	33462	++
32	NIIB0693	<i>L. longbeachae</i>	2	C	Tucker 1	33484	++
33	NIIB0045	<i>L. maceachernii</i>		E	PX-1-G2-E2	35300	++
34	NIIB0008	<i>L. micdadei</i>		C	TATLOCK	33218	++
35	NIIB0116	<i>L. moravica</i>		E	316-36	43877	++
36	NIIB0195	<i>L. nautarum</i>		E	1224	49506	+
37	NIIB0036	<i>L. oakridgensis</i>		E	OR-10	33761	(+)
38	NIIB0042	<i>L. parisiensis</i>		E	PF-209C-C2	35299	++
39	NIIB0001	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1	C	Philadelphia-1	33152	++
40	NIIB0002	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	2	C	Togus-1	33154	++
41	NIIB0003	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	3	E	Bloomington-2	33155	++
42	NIIB0004	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	4	C	Los Angeles-1	33156	++
43	NIIB0005	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	5	E	Dallas 1E	33216	++
44	NIIB0150	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	5	E	U8W	33737	++
45	NIIB0006	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	6	C	Chicago 2	33215	++
46	NIIB0033	<i>L. pneumophila</i>	7	E	Chicago 8	33823	++
47	NIIB0034	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	8	C	Concord 3	35096	++
48	NIIB0304	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	9	E	IN-23-G1-C2	35289	++
49	NIIB0050	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	10	C	Leiden 1	43283	++
50	NIIB0051	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	11	C	797-PA-H	43130	++
51	NIIB0060	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	12	C	570-CO-H	43290	++
52	NIIB0061	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	13	C	82A3105	43736	++
53	NIIB0062	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	14	C	1169-MN-H	43703	++
54	NIIB0063	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	15	C	Lansing 3	35251	++
55	NIIB0451	<i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-192		++
56	NIIB0453	<i>L. pneumophila</i>	10	E	H13-206		++
57	NIIB0462	<i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-239		++

表1 *Legionella* (16S rRNA 遺伝子) 検出キットの特異性 (2)

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	CY240での検出
58	NIIB0196	<i>L. quateirensis</i>		E	1335	49507	++
59	NIIB0260	<i>L. quinlivanii</i>	2	E	LC870	BAA-538	+
60	NIIB0407	<i>L. rowbothamii</i>		E	LLAP-6	700991	++
61	NIIB0048	<i>L. rubrilucens</i>		E	WA-270A-C2	35304	++
62	NIIB0039	<i>L. sainthelensi</i>	1	E	Mt St Helens 4	35248	++
63	NIIB0207	<i>L. sainthelensi</i>	2	C	Ly176.97	700517	++
64	NIIB0409	<i>L. santicrucis</i>		E	SC-63-C7	35301	++
65	NIIB0149	<i>L. shakespearei</i>		E	214	49655	++
66	NIIB0043	<i>L. spiritensis</i>	1	E	Mt St Helens 9	35249	++
67	NIIB0261	<i>L. spiritensis</i>	2	E	ML76	BAA-537	++
68	NIIB0041	<i>L. steigerwaltii</i>		E	SC-18-C9	35302	+
69	NIIB0262	<i>L. taurinensis</i>		E	Turin I no 1	700508	++
70	NIIB0117	<i>L. tucsonensis</i>		C	1087-AZ-H	49180	++
71	NIIB0032	<i>L. wadsworthii</i>		C	81-716A	33877	++
72	NIIB0206	<i>L. waltersii</i>		E	2074-AUS-E	51914	++
73	NIIB0197	<i>L. worsteiensis</i>		E	1347	49508	++
74	NIIB0305	<i>Legionella genomospecies 1</i>		E	2055-AUS-E	51913	+

++ : *L. pneumophila* とほぼ同等の検出効率 (*L. pneumophila* を 100 とした場合の定量値が 50 以上)

+ : *L. pneumophila* よりやや検出効率が低い (*L. pneumophila* を 100 とした場合の定量値が 20 以上)

(+) : 検出されにくい (*L. pneumophila* を 100 とした場合の定量値が 1 未満)

本検出系で増幅しないことを確認した菌種は次のとおり。

Shigella sonnei

Escherichia coli VT1/VT2

Escherichia coli VT2

Escherichia coli LT (LTEC)

Escherichia coli ST (ETEC)

Vibrio parahaemolyticus

Campylobacter jejuni

Salmonella enterica

Clostridium perfringens

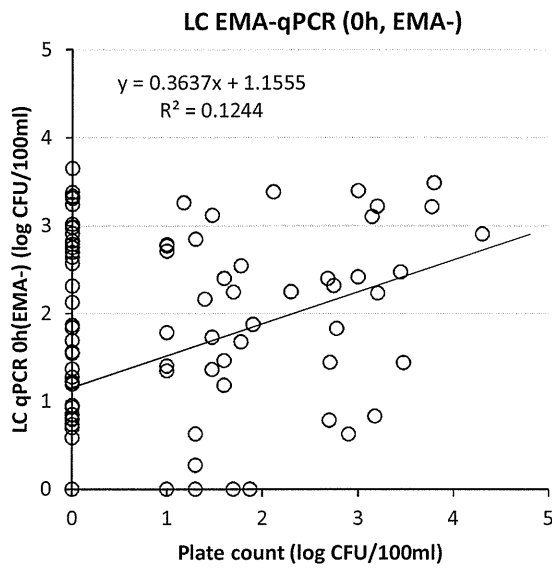
Staphylococcus aureus

Yersinia enterocolitica

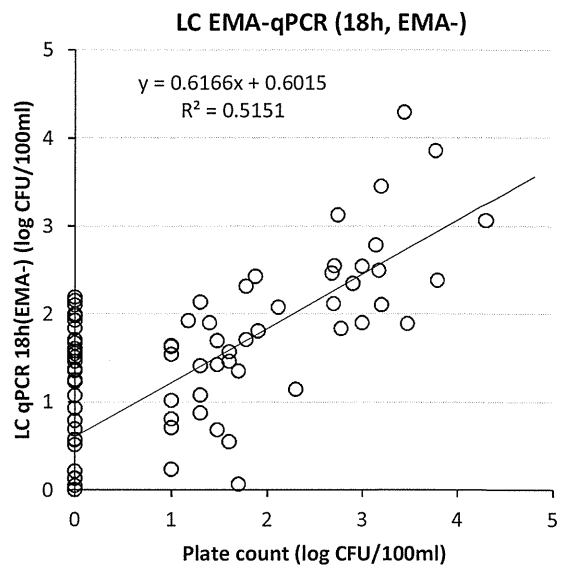
Clostridium botulinum

Listeria monocytogenes

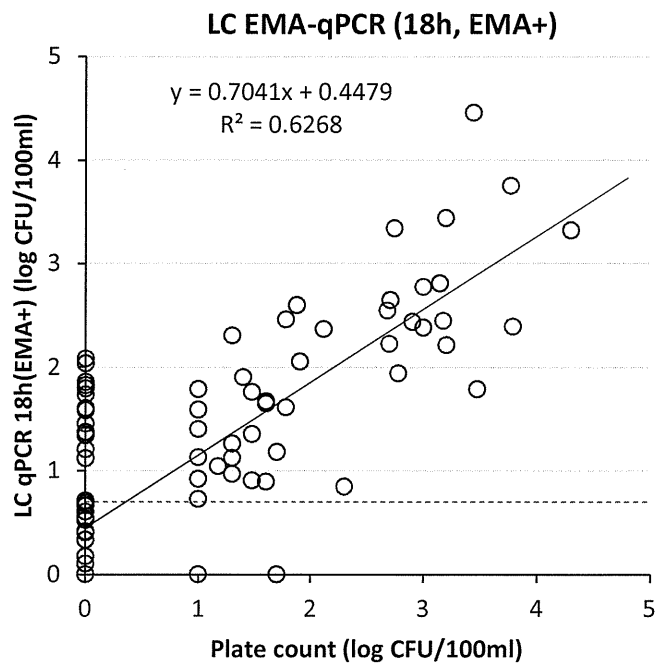
Bacillus cereus



(1) LC EMA-qPCR における 0h LC (-)



(2) LC EMA-qPCR における 18h LC (-)



(3) LC EMA-qPCR における 18h LC (+)

破線は LC EMA-qPCR 法における 0.7 log CFU/100ml (5 CFU/100ml) の値を示す。

図 6 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較 (n=113)

表 2 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較 (n=113)

(1) LC EMA-qPCR における 0h LC (EMA-)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
EMA-qPCR	≥ 1	40	39	79
0h LC(-)	< 1	4	30	34
計		44	69	113

感度 90.9% 特異度 43.5%

(2) LC EMA-qPCR における 18h LC (EMA-)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
EMA-qPCR	≥ 1	44	34	78
18 LC(-)	< 1	0	35	35
計		44	69	113

感度 100% 特異度 50.7%

(3) LC EMA-qPCR における 18h LC (EMA+)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
EMA-qPCR	≥ 1	42	30	72
18h LC(+)	< 1	2	39	41
計		44	69	113

感度 95.5% 特異度 56.5%

(4) LC EMA-qPCR における 18h LC (EMA+)

カットオフ値を 5 CFU/100ml に変更

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
EMA-qPCR	≥ 5	42	17	59
18h LC(+)	< 5	2	52	54
計		44	69	113

感度 95.5% 特異度 75.4%

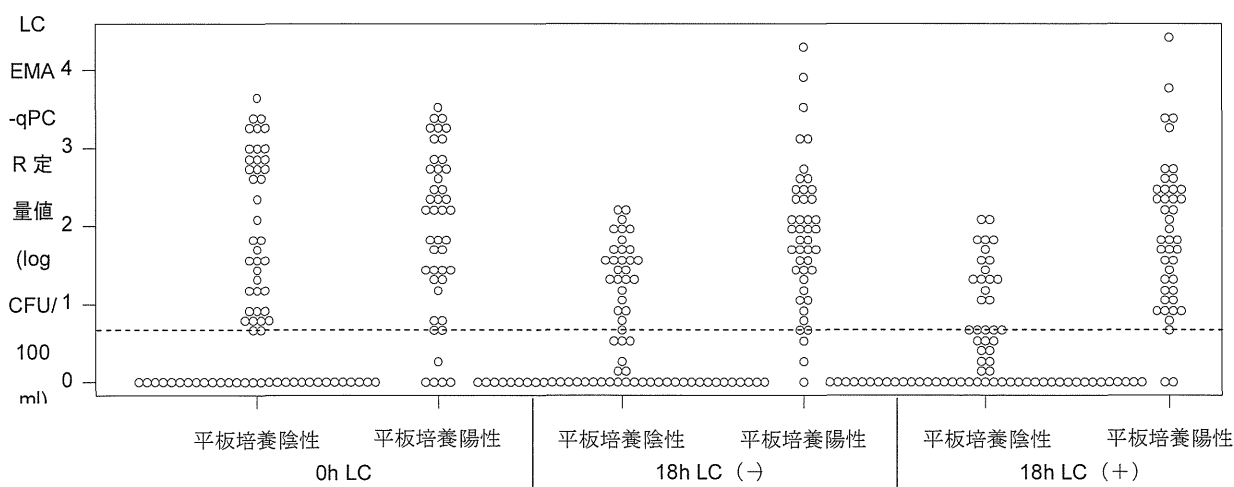


図 7 LC EMA-qPCR 定量値の分布

破線は 0.7 log CFU/100ml (5 CFU/100ml) を示す。

表 3-1 平板培養法と LC EMA-qPCR 法の不一致例の内訳 (偽陰性検体、n=2)

No.	分類	水質		レジオネラ属菌 (CFU/100ml)	微生物汚染		LC EMA-qPCR						備考
		湯温 (°C)	残塩 (mg/L)		ATP (/10ml)	HPC (CFU/ml)	Ct値			CFU/100ml			
							0h	18h(-)	18h(+)	0h	18h(-)	18h(+)	
1	浴槽水	41.3	0.0	50	54	360	42.37	36.98	42.52	< 1	1	< 5	フィルターに黒褐色
2	浴槽水	48.0	0.0	10	937	1,900	-	39.76	-	< 1	< 1	< 5	

表 3-2 平板培養法と LC EMA-qPCR 法の 2×2 分割表不一致例の内訳 (偽陽性検体、n=17)

No.	分類	水質		レジオネラ属菌 (CFU/100ml)	微生物汚染		LC EMA-qPCR						備考
		湯温 (°C)	残塩 (mg/L)		ATP (/10ml)	HPC (CFU/ml)	Ct値			CFU/100ml			
							0h	18h(-)	18h(+)	0h	18h(-)	18h(+)	
1	原水	12.6	0.0	< 10	256	< 30	31.50	31.78	33.83	4,400	160	72	強酸泉
2	浴槽水	41.0	0.1	< 10	11,829	NT	32.58	32.25	33.76	1,700	100	67	
3	浴槽水	42.7		< 10	10,590	15,000	34.78	34.52	36.53	960	51	38	
4	浴槽水	42.1	0.2	< 10	16	1,600	32.36	32.47	35.05	2,400	95	24	
5	原水	32.0	1.0	< 10	95	< 30	33.12	33.23	34.84	940	38	23	
6	浴槽水	42.0	2.4	< 10	80	NT	32.26	31.99	35.03	2,200	130	22	
7	原水	60.0	NT	< 10	9,930	900	33.47	33.76	35.42	670	23	13	
8	原水	16.0	0.0	< 10	10	< 30	33.85	33.80	35.40	500	23	13	
9	浴槽水	42.0	0.3	< 10	187	NT	33.98	33.80	37.00	610	32	5	
10	浴槽水	40.2	2.0	< 10	327	NT	37.36	32.59	33.39	23	85	110	薬湯
11	浴槽水	42.0	0.8	< 10	158	NT	38.06	34.32	35.39	36	35	40	
12	浴槽水	42.0	0.3	< 10	38	NT	-	34.86	35.78	< 1	23	29	
13	原水	NT	NT	< 10	9	< 30	32.48	33.11	33.26	2,000	51	120	
14	浴槽水	37.5	> 2.0	< 10	11	NT	-	38.51	33.81	< 1	< 1	63	
15	浴槽水	43.6	0.0	< 10	869	NT	34.44	34.70	35.56	1,000	38	55	
16	浴槽水	38.0	0.1	< 10	37	NT	33.21	34.13	34.89	810	18	24	
17	原水	12.5	0.0	< 10	87	< 30	35.53	35.13	35.49	130	9	16	

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

液体培地による前培養を組み合わせた EMA-PCR 法（LC EMA-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

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)

レジオネラの生菌を迅速に検出し、菌数を確定する手法として、Ethidium monoazide (EMA) 処理と液体培地による前培養を組み合わせた EMA-PCR 法（LC EMA-PCR 法）を検討した。検討に用いた試料は公衆浴場の浴槽水 100 試料（白湯 50 試料、温泉 40 試料、薬湯 10 試料）とした。

浴槽水 100 試料を対象とすると、LC EMA-PCR 法と培養法の相関は認められなかった ($R^2 = 0.0828$)。温泉 4 試料は培養法で $10^2 \sim 10^3$ cfu/100ml 検出されたにもかかわらず、LC EMA-PCR 法では不検出であった。これは多量に含まれるフミン質と従属栄養細菌によって阻害を受けたのではないかと考えられた。また、薬湯 4 試料では培養法の検出値よりも LC EMA-PCR 法の検出値が 1Log 高くなっており、原因を究明する必要があると考えられた。

一方、白湯 50 試料を対象を絞ると、LC EMA-PCR 法と培養法は高い相関を示した ($R^2 = 0.9974$)。このことから、白湯試料に対しては、レジオネラの生菌を迅速に検出する手法として、利用の可能性が考えられた。しかし、温泉および薬湯に関しては複雑な阻害物質との関係がうかがわれたため、今後、多様な試料で、試料数を増やして検討を行う必要がある。

A. 研究目的

レジオネラの生菌を検出して菌数を確定する手法は、現在、培養法のみ確立されている。このため、浴槽水などの基準値は培養法の検出値で設定されている。培養法は検出値が判明するまで 10 日程度を要するため、緊急を要するレジオネラ症の拡大防止や感染源の究明などには不向きである。そのため、培養法に代わる迅速にレジオネラの生菌を検出し、菌数を確定できる検査方法が求められている。

そこで、液体培地による前培養を組み合わせた RT-PCR 法（LC RT-PCR 法）を検討した¹⁾

ところ、標準菌液による検量線は良好な直線性を示し ($R^2 = 1$)、再現性にも問題がなかった。また、浴場施設から採取した浴場水に対して LC RT-PCR 法と培養法を行ったところ、2 法の相関は $R^2 = 0.6877$ であった。しかも、培養法で検出されながら LC RT-PCR 法で不検出であった 2 試料を除くと、その相関は非常に高い値 ($R^2 = 0.9730$) が得られた。LC RT-PCR 法の反応を阻害する物質を調査したところ、高濃度の従属栄養細菌とフミン質であることが考えられた。

また、LC RT-PCR 法を簡略化し、より使い

やすい手法とした²⁾。

今回は、より確実にレジオネラの生菌を検出する手法として、Ethidium monoazide (EMA) 処理と液体培地による前培養を組み合わせた EMA-PCR 法 (LC EMA-PCR 法) を検討し、LC RT-PCR 法との比較も行ったので併せて報告する。また、培養法で検出される生菌の他に死菌や VBNC などのレジオネラの遺伝子の総量を検出するため、RT-PCR 法も行った。

Ethidium monoazide (EMA) : 特異的に死菌の損傷した細胞膜を透過し、その菌の染色体 DNA に結合し、照射によって DNA を切断する DNA インターカレート剤。

B. 研究方法および材料

1. レジオネラ検査

(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) 培養法

22 年度報告書のとおり。

(3) LC EMA-PCR 法

鳥谷の方法に準じる。検出限界値は 20cfu/100ml。

(4) LC RT-PCR 法

鳥谷の方法に準じ、1STEP 法 (簡便法) で RT-PCR 法を行った。検出限界値は 20cfu/100ml。

2. 検量線用標準菌液

22 年度報告書のとおり。

3. レジオネラ以外の検査

従属栄養細菌 (HPC)、遊離残留塩素、過マンガン酸カリウム (KMnO₄) 消費量、濁度 : 水道法告示法に準じた。

フミン質 (腐植質) : 衛生試験法³⁾ に準じた。

4. 試料

(1) LC EMA-PCR 法

浴場施設から採取した浴場水 100 試料 (白湯 50 試料、温泉 40 試料、薬湯 10 試料)。

(2) LC RT-PCR 法

浴場施設から採取した浴場水 100 試料 (白湯 50 試料、温泉 40 試料、薬湯 10 試料)。

C. 結果と考察

1. 検量線

結果を図 1 に示した。LC EMA-PCR 法の検量線は、20~10⁶cfu/100ml の範囲で良好な直線性を示した (R²=0.999)。検量線作製は異なった検査日で 3 回測定し、ほぼ同一の検量線が得られたことから、再現性にも問題がないと考えられた。

2. 培養法

結果を表 1、表 2 に示した。浴槽水 100 試料のうち、培養法でレジオネラが検出されたのは、白湯 12 試料、温泉 13 試料、薬湯 4 試料であった。

レジオネラが検出された白湯 12 試料のうち、原水が水道水であったのは 2 試料、他の 10 試料は地下水であった。水道水を原水とする 2 試料から検出された菌数は 2 試料とも 10¹cfu/100ml で、遊離残留塩素が検出されていなかった。一方、地下水を原水とする 10 試料から検出された菌数は 10¹~10²cfu/100ml で、遊離残留塩素が 0.1mg/l あるいは検出されていなかった。

白湯は水道水を原水とする場合は、一度塩素処理が施されているため、残留塩素のコントロールが比較的たやすいが、地下水を原水とする場合は、含有成分によっては不連続点処理をする必要があることから、残留塩素のコントロールが難しい。試料 No. 47~50 はアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素が多く含まれていたため、塩素を添加しても遊離残留塩素が検出できない状態であった。地下水を原水とする場合は、残留塩素濃度を確保するためには、塩素を消費する成分をあらかじめ分析

して把握しておく必要がある。

レジオネラが検出された温泉 13 試料から検出された菌数は $10^1 \sim 10^3$ cfu/100ml で、遊離残留塩素は検出されていなかった。

13 試料の温泉のうち、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素を 0.5~30mg/l 含有する温泉が 5 試料あり、試料 No. 87~90 は $10^1 \sim 10^2$ mg/l のフミン質を含み、コーヒーに近い黒色を呈し、比色による残留塩素測定は不可能であった。

温泉を原水とする場合は、地下水と同様に塩素を消費する成分が大量に含まれている場合があり、あらかじめ分析して把握しておく必要がある。

レジオネラが検出された薬湯 4 試料から検出された菌数は $10^1 \sim 10^2$ cfu/100ml で、遊離残留塩素は検出されていなかった。

3. LC EMA-PCR 法

LC EMA-PCR 法で検出された試料は、白湯 9 試料、温泉 10 試料、薬湯 6 試料であった。検出された菌数は $10^1 \sim 10^3$ cfu/100ml であった。

培養法と比較すると、培養法 (+)、LC EMA-PCR 法 (-) であったのは、白湯 3 試料、温泉 4 試料であった。逆に培養法 (-)、LC EMA-PCR 法 (+) であったのは、温泉 1 試料、薬湯 2 試料であった。

培養法 (+)、LC EMA-PCR 法 (-) であった白湯 3 試料 (試料 No. 41~43) は、培養法の検出値が 10 および 20 cfu/100ml であったことから、検出限界値の差と考えられた。一方、温泉 4 試料 (試料 No. 87~90) は培養法の検出値が $10^2 \sim 10^3$ cfu/100ml であり、検出限界値以外の問題が考えられた。この 4 試料は従属栄養細菌が $10^3 \sim 10^5$ cfu/ml 存在し、 $10^1 \sim 10^2$ mg/l のフミン質を含んでいた。LC RT-PCR 法では従属栄養細菌とフミン質による阻害が起こることが確認されている¹⁾ことから、LC EMA-PCR 法も同様の阻害を受けている可能性が考えられた。

培養法 (-)、LC EMA-PCR 法 (+) であった温

泉 1 試料、薬湯 2 試料は、LC EMA-PCR 法の値が 10^1 cfu/100ml であったことから、試料の分取時に存在する誤差と考えられた。

培養法と LC EMA-PCR 法で検出された菌数を図 2 に示した。2 法の相関をみると、

$$y = 0.2386x + 49.133, R^2 = 0.0828$$

で相関は認められなかった。しかし、図中の円で囲んだ 8 点を除くと (図 3)、

$$y = 1.0229x - 0.3536, R^2 = 0.9892$$

で相関が認められた。

除外した 8 点のうち 4 点は前述した試料 No. 87~90、残りの 4 点は試料 No. 97~100 であった。試料 No. 97~100 は培養法よりも LC EMA-PCR 法の値が 1Log 高かった。この 4 試料は薬湯で、従属栄養細菌が $10^3 \sim 10^5$ cfu/ml、濁度 9.5 ~ 120 度、RT-PCR 法の値は 10^3 cfu/100ml であった。高濃度の従属栄養細菌は試料 No. 87~90 では阻害を与える要因として考えられたが、試料 No. 97~100 では検出値が高く出る作用を与える要因として考えられた。

4. LC RT-PCR 法

LC RT-PCR 法で検出された試料は、白湯 10 試料、温泉 9 試料、薬湯 0 試料であった。検出された菌数は $10^1 \sim 10^3$ cfu/100ml であった。

培養法と比較すると、培養法 (+)、LC RT-PCR 法 (-) であったのは、白湯 2 試料、温泉 4 試料、薬湯 4 試料であった。逆に培養法 (-)、LC RT-PCR 法 (+) を示した試料はなかった。

培養法 (+)、LC RT-PCR 法 (-) を示した白湯 2 試料は LC EMA-PCR 法と同様に検出限界値の差と考えられた。温泉 4 試料は従属栄養細菌とフミン質による阻害、薬湯 4 試料は従属栄養細菌による阻害と考えられた。

培養法と LC RT-PCR 法で検出された菌数を図 4 に示した。2 法の相関をみると、

$$y = 0.7713x + 42.259, R^2 = 0.1047$$

で相関は認められなかった。しかし、培養法 (+)、LC RT-PCR 法 (-) であった 10 試料を除くと (図 5)、

$$y = 0.9586x - 0.0558, R^2 = 0.9983$$

で相関が認められた。

5. LC EMA-PCR 法と LC RT-PCR 法

LC EMA-PCR 法と LC RT-PCR 法を培養法の検出状況と比較すると、白湯 50 試料では同様の挙動を示しており、培養法との相関は

LC EMA-PCR 法と培養法

$$y = 1.0175x + 0.9429, R^2 = 0.9974$$

LC RT-PCR 法と培養法

$$y = 0.9735x - 0.4404, R^2 = 0.999$$

と、非常に高い値を示した。問題は検出限界値で、検査法の手法の改良で、培養法の 10cfu/100ml に近づける必要があると思われた。LC EMA-PCR 法と LC RT-PCR 法は白湯に限り、培養法の代替法として活用できると考えられた。

一方、温泉 40 試料は培養法で高濃度に検出されたレジオネラが検出できない点で同様の挙動を示していた。阻害物質としてフミン質と従属栄養細菌が考えられるが、全ての温泉に含まれていないため、レジオネラ検査前に把握することは難しい。しかし、遊離残留塩素が検出された試料は白湯と同様に相関が高かったため、遊離残留塩素が検出された温泉には、LC EMA-PCR 法と LC RT-PCR 法が、培養法の代替法として活用できる可能性があると考えられた。

薬湯に関しては、LC EMA-PCR 法と LC RT-PCR 法は異なる挙動を示した。LC EMA-PCR 法は 6 試料が培養法よりも高い値を示し、LC RT-PCR 法は培養法で検出された試料も全て不検出であった。使用されていた薬湯の薬剤はそれぞれ異なり、顆粒状剤、錠剤、布袋に入れる生薬であった。挙動が異なった原因が生薬成分に由来するものか、遊離残留塩素が不検出であることによる高濃度の従属栄養細菌などによるものかは不明であった。

D. まとめ

LC EMA-PCR 法は低フミン質、低細菌（従属栄養細菌）の試料（白湯）では、LC RT-PCR 法と同様に培養法と高い相関を示したことから、レジオネラの生菌を捕捉する迅速検査法として白湯への利用の可能性が考えられた。しかし、温泉水および薬湯においては、培養法と相関が低く、阻害物質の特定とその除去方法を検討する必要があると思われた。

LC EMA-PCR 法は培養法の代替手法として有望で、今後、多様な試料で、試料数を増やして検討を行う必要がある。

参考文献

- 1 「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、研究代表者 倉文明、平成 22 年度総括・分担研究報告書
- 2 「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、研究代表者 倉文明、平成 23 年度総括・分担研究報告書
- 3 「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

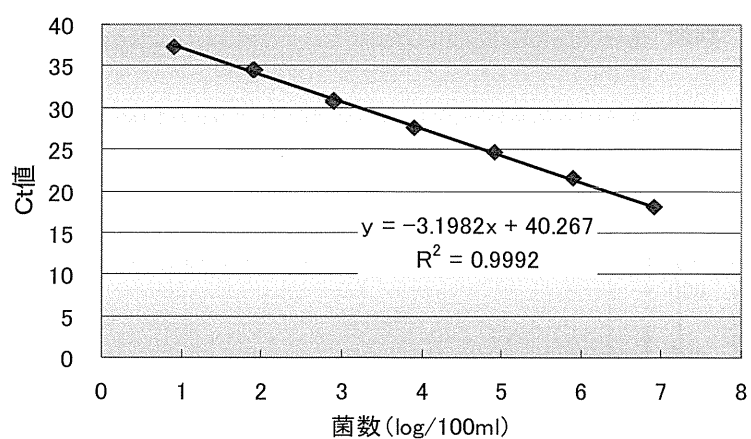


図1 LC EMA-PCR 法による検量線

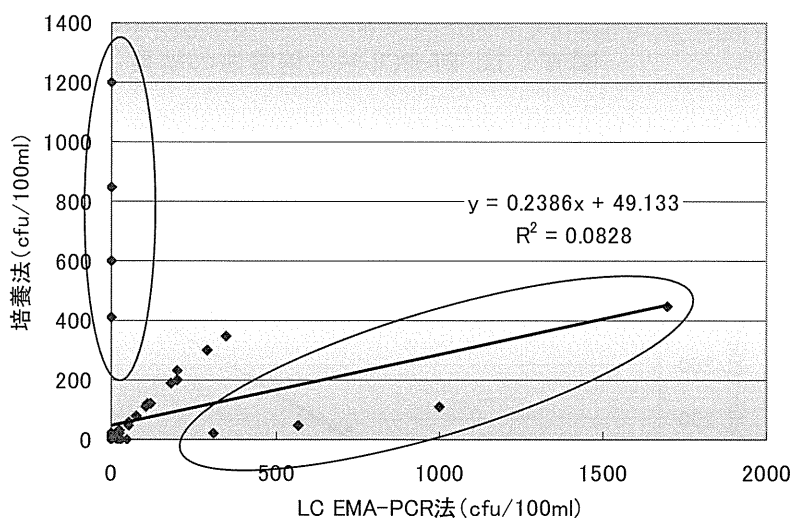


図2 LC EMA-PCR 法と培養法の結果

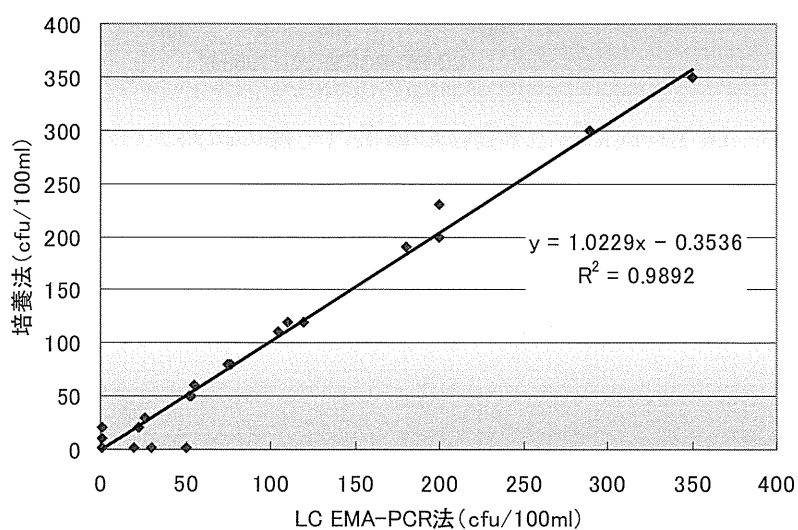


図3 LC EMA-PCR 法と培養法の結果 (一部の試料データを除いた結果)

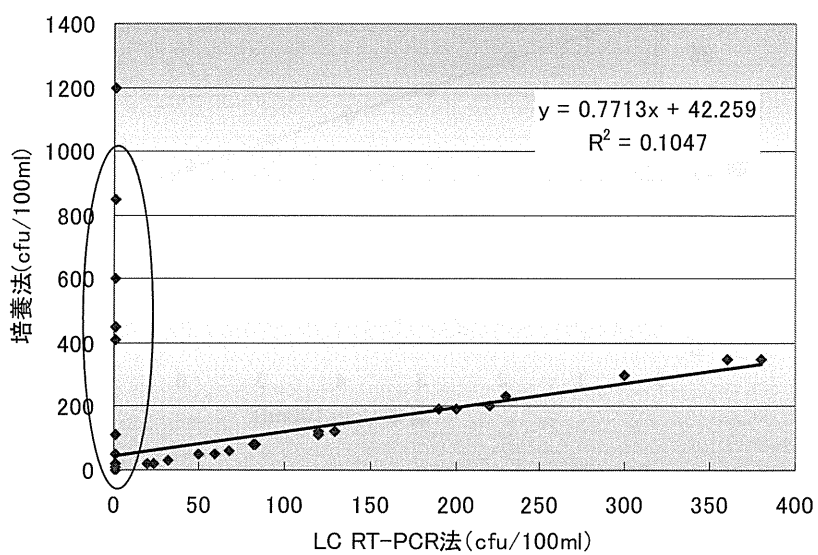


図4 LC RT-PCR法と培養法の結果

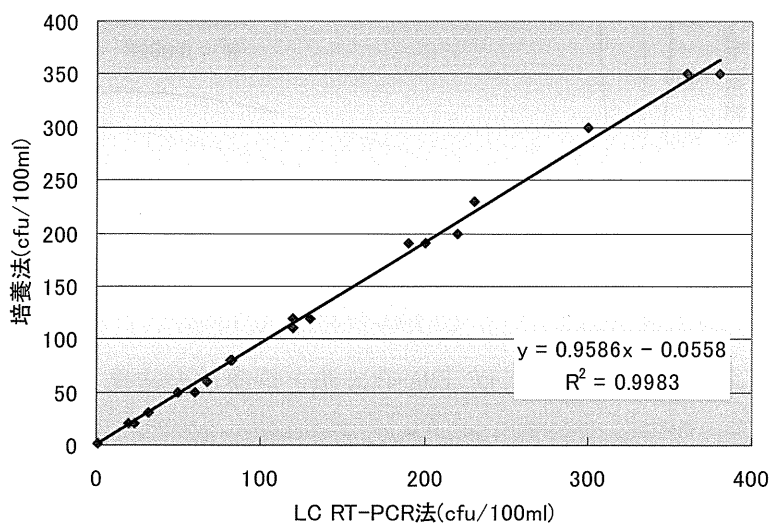


図5 LC RT-PCR法と培養法の結果 (一部の試料データを除いた結果)

表1 検査結果一覧（白湯）

試料No	遊離残留塩素 (mg/l)	培養法 (cfu/100ml)	LC EMA-PCR (cfu/100ml)	LC RT-PCR (cfu/100ml)	RT-PCR (cfu/100ml)	HPC (cfu/ml)	KMnO4 (mg/l)	濁度 (度)	備考	
									浴槽水	原水
1	0.2	<10	<20	<20	<20	13	1.9	<0.1	白湯	水道水
2	0.2	<10	<20	<20	<20	20	2.1	<0.1	白湯	水道水
3	0.2	<10	<20	<20	<20	60	2.3	<0.1	白湯	水道水
4	0.2	<10	<20	<20	<20	61	3.6	<0.1	白湯	水道水
5	0.2	<10	<20	<20	<20	88	3.2	<0.1	白湯	水道水
6	0.2	<10	<20	<20	30	160	3.3	<0.1	白湯	水道水
7	0.3	<10	<20	<20	<20	23	5.8	<0.1	白湯	水道水
8	0.3	<10	<20	<20	<20	48	4.4	<0.1	白湯	水道水
9	0.3	<10	<20	<20	100	95	2.5	<0.1	白湯	水道水
10	0.4	<10	<20	<20	<20	15	2.4	<0.1	白湯	水道水
11	0.4	<10	<20	<20	<20	24	1.8	<0.1	白湯	水道水
12	0.5	<10	<20	<20	<20	16	2.2	<0.1	白湯	水道水
13	0.5	<10	<20	<20	<20	33	2.7	<0.1	白湯	水道水
14	0.6	<10	<20	<20	<20	9	2.5	<0.1	白湯	水道水
15	0.7	<10	<20	<20	<20	0	4.1	<0.1	白湯	水道水
16	0.7	<10	<20	<20	<20	0	3.6	<0.1	白湯	水道水
17	0.7	<10	<20	<20	<20	0	2.8	<0.1	白湯	水道水
18	0.7	<10	<20	<20	<20	15	2.2	<0.1	白湯	水道水
19	0.8	<10	<20	<20	<20	0	2.7	<0.1	白湯	水道水
20	0.8	<10	<20	<20	<20	0	2.5	<0.1	白湯	水道水
21	0.8	<10	<20	<20	<20	0	3.3	<0.1	白湯	水道水
22	0.8	<10	<20	<20	<20	0	1.7	<0.1	白湯	水道水
23	0.8	<10	<20	<20	<20	0	2.5	<0.1	白湯	水道水
24	1.0	<10	<20	<20	<20	2	2.6	<0.1	白湯	水道水
25	1.0	<10	<20	<20	<20	0	3.4	<0.1	白湯	水道水
26	1.5	<10	<20	<20	28	0	3.3	<0.1	白湯	水道水
27	1.5	<10	<20	<20	200	0	2.1	<0.1	白湯	水道水
28	2.0	<10	<20	<20	650	0	3.4	<0.1	白湯	水道水
29	<0.1	20	22	20	360	50	3.2	<0.1	白湯	水道水
30	<0.1	50	53	60	350	62	2.8	<0.1	白湯	水道水
31	0.2	<10	<20	<20	<20	100	2.7	<0.1	白湯	地下水
32	0.2	<10	<20	<20	<20	95	2.6	<0.1	白湯	地下水
33	0.3	<10	<20	<20	80	44	3.1	<0.1	白湯	地下水
34	0.3	<10	<20	<20	<20	52	3.2	<0.1	白湯	地下水
35	0.5	<10	<20	<20	<20	13	3.0	<0.1	白湯	地下水
36	0.5	<10	<20	<20	<20	22	2.8	<0.1	白湯	地下水
37	0.5	<10	<20	<20	<20	23	3.6	<0.1	白湯	地下水
38	0.5	<10	<20	<20	<20	0	2.7	<0.1	白湯	地下水
39	0.7	<10	<20	<20	<20	0	2.1	<0.1	白湯	地下水
40	0.8	<10	<20	<20	<20	0	3.3	<0.1	白湯	地下水
41	0.1	10	<20	<20	60	60	3.6	<0.1	白湯	地下水
42	0.1	10	<20	<20	150	110	3.8	<0.1	白湯	地下水
43	0.1	20	<20	24	200	150	4.2	0.1	白湯	地下水
44	<0.1	60	55	68	220	190	4.4	0.1	白湯	地下水
45	<0.1	80	77	83	290	200	2.9	<0.1	白湯	地下水
46	<0.1	80	76	82	320	210	2.5	0.2	白湯	地下水
47	<0.1	110	105	120	820	220	3.6	0.3	白湯	地下水
48	<0.1	190	180	200	560	250	3.8	0.3	白湯	地下水
49	<0.1	300	290	300	2300	450	2.7	0.5	白湯	地下水
50	<0.1	350	350	360	1500	900	4.2	0.5	白湯	地下水

表2 検査結果一覧 (温泉、薬湯)

試料No	遊離残留 塩素 (mg/l)	培養法 (cfu/100ml)	LC EMA- PCR (cfu/100ml)	LC RT- PCR (cfu/100ml)	RT-PCR (cfu/100ml)	HPC (cfu/ml)	KMnO4 (mg/l)	濁度 (度)	備考	
									浴槽水	原水
51	<0.1	<10	<20	<20	<20	120	18.5	<0.1	温泉	塩化物泉
52	<0.1	<10	<20	<20	<20	65	19.6	<0.1	温泉	塩化物泉
53	<0.1	<10	<20	<20	<20	110	20.4	<0.1	温泉	塩化物泉
54	<0.1	<10	<20	<20	<20	98	21.1	<0.1	温泉	炭酸水素塩泉
55	<0.1	<10	<20	<20	<20	76	23.7	<0.1	温泉	炭酸水素塩泉
56	<0.1	<10	<20	<20	<20	150	<25	0.1	温泉	塩化物泉
57	<0.1	<10	<20	<20	<20	180	<25	0.1	温泉	塩化物泉
58	<0.1	<10	<20	<20	<20	270	<25	0.1	温泉	塩化物泉
59	0.1	<10	<20	<20	220	260	<25	0.1	温泉	塩化物泉
60	0.1	<10	<20	<20	<20	110	<25	0.1	温泉	炭酸水素塩泉
61	0.1	<10	<20	<20	<20	150	<25	0.1	温泉	炭酸水素塩泉
62	0.1	<10	<20	<20	<20	160	<25	0.1	温泉	塩化物泉
63	0.1	<10	<20	<20	<20	79	<25	0.2	温泉	炭酸水素塩泉
64	0.1	<10	<20	<20	<20	82	<25	0.2	温泉	炭酸水素塩泉
65	0.1	<10	<20	<20	<20	95	<25	0.2	温泉	塩化物泉
66	0.1	<10	<20	<20	<20	95	<25	0.2	温泉	塩化物泉
67	0.1	<10	<20	<20	<20	120	<25	0.2	温泉	塩化物泉
68	0.1	<10	<20	<20	<20	110	<25	0.3	温泉	塩化物泉
69	0.1	<10	<20	<20	<20	160	<25	0.3	温泉	塩化物泉
70	0.2	<10	<20	<20	<20	130	<25	0.3	温泉	塩化物泉
71	0.2	<10	<20	<20	<20	150	<25	0.4	温泉	炭酸水素塩泉
72	0.3	<10	<20	<20	<20	100	<25	0.4	温泉	炭酸水素塩泉
73	0.3	<10	<20	<20	40	76	<25	0.4	温泉	塩化物泉
74	0.3	<10	<20	<20	50	42	<25	0.4	温泉	塩化物泉
75	0.4	<10	<20	<20	30	26	<25	0.5	温泉	塩化物泉
76	0.8	<10	<20	<20	150	19	<25	0.6	温泉	炭酸水素塩泉
77	0.8	<10	20	<20	9900	7400	<25	1.2	温泉	炭酸水素塩泉
78	<0.1	30	26	32	120	200	<25	0.9	温泉	炭酸水素塩泉
79	<0.1	50	52	50	90	460	<25	1.1	温泉	塩化物泉
80	<0.1	80	75	83	120	350	<25	1.1	温泉	炭酸水素塩泉
81	<0.1	120	110	120	260	320	<25	1.2	温泉	塩化物泉
82	<0.1	120	120	130	440	620	<25	1.2	温泉	塩化物泉
83	<0.1	190	180	190	230	770	<25	1.5	温泉	塩化物泉
84	<0.1	200	200	220	590	780	<25	1.9	温泉	塩化物泉
85	<0.1	230	200	230	400	640	<25	2.1	温泉	炭酸水素塩泉
86	<0.1	350	350	380	650	980	<25	2.2	温泉	炭酸水素塩泉
87	<0.1	410	<20	<20	890	3200	<25	2.6	温泉	塩化物泉
88	<0.1	600	<20	<20	1100	5500	<25	3.2	温泉	塩化物泉
89	<0.1	850	<20	<20	1200	6500	<25	5.5	温泉	塩化物泉
90	<0.1	1200	<20	<20	5500	120000	<25	6.1	温泉	炭酸水素塩泉
91	0.1	<10	<20	<20	<20	50	<25	2.1	薬湯	
92	0.1	<10	<20	<20	30	66	<25	2.3	薬湯	
93	0.1	<10	<20	<20	110	120	<25	3.1	薬湯	
94	<0.1	<10	<20	<20	20	350	<25	3.5	薬湯	
95	<0.1	<10	30	<20	1300	4900	<25	9.5	薬湯	
96	<0.1	<10	50	<20	1800	7900	<25	13.2	薬湯	
97	<0.1	20	310	<20	1200	85000	<25	15.1	薬湯	
98	<0.1	50	570	<20	2600	99000	<25	26.2	薬湯	
99	<0.1	110	1000	<20	2100	470000	<25	38.9	薬湯	
100	<0.1	450	1700	<20	7200	860000	<25	120.0	薬湯	

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 24 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
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	小川 恵子	北海道立衛生研究所
	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	宮城県東部下水道事務所
	山口 友美	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

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、昨年度に引き続き 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・民間の検査機関を問わず検査精度の安定に向けた取り組みを検討した。その結果、1)については、検査定義をより明確にし、行政・民間の検査機関を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まとめた。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、行政・民間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、本年度も WG 内(9 か所の地方衛生研究所)でプレ精度管理を行い昨年度の問題解決に努めた。その結果、塗布時におけるコンラージ棒のタッチ力(力の入れ具合)が集落発育へ影響している可能性がある、また、北海道衛研の自家調製 BCYE α 培地では、安定した結果が得られやすい、などが示唆された。今後も配付試料や検査法、培地等を検討し、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。

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、昨年度に引き続き 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、WG内で検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 標準的な検査法の整理と提示

公衆浴場における衛生等管理要領について(厚労省通知)及びレジオネラ症防止指針の再確認、また実験による検査法の検証等から、標準的な検査法の整理と提示を行った。

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両面の基本的な考え方について検討した。

3) 精度管理

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、3名の検査者で対応した。これらの参加機関にA~K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、Cと表示した。

〈実施日時〉

試料発送:平成24年10月26日(金曜日)

試料到着:平成24年10月29日(月曜日)

検査日:平成24年10月29日(月曜日)から11月2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 容器及び参加地研から事前に回収したジュラルミンケースをオーバーパックとして使用(図1、2)。

包装作業: 北海道立衛生研究所感染性物質包装作業チェックシート(別添1)に従い、包装業者及び包装責任者のダブルチェックのもと行った。

〈供試菌の選択〉

一昨年度、昨年度に安定性が確認された菌株を使用した。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)タイプのものが理想である。そこで、過去の浴槽水検査において、未処理、熱処理:50℃ 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 α :Oxoid)、選択分離培地(MWY:Oxoid、GVPC:Merck)上で有意に発育し、かつ10⁴CFU/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。さらに昨年度同様、供試菌の強化を目的とし、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使用した。

〈使用平板培地〉

BCYE α 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 Oxoid の LEGIONELLA CYE AGAR BASE に必要なサプリメントを指示通り溶解、添加し調製したものを使用した。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 α 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 Oxoid の LEGIONELLA CYE AGAR BASE に必要なサプリメントを指示通り溶解、添加し調製したものを使用した。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 α 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)を配布した。さらに北海道立衛生研究所で自家調製した BCYE α、MWY 寒天培地も配付した。配付方法は、培地の劣化を防ぐため、密封できる嫌気培養ジャーに無包装シャーレ状態の培地を入れ、冷蔵で配付した。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(供試菌添加 1.5%ゼラチン加レジオネラ培地)の調製>

昨年度に引き続き、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を使用した。基本組成は Oxoid の BCYE α 寒天培地をベースに、寒天と Activated Charcoal を除きゼラチンを加えたものである。培地だけを調製する場合は、精製水 90mL に対し、Yeast extract (Oxoid) 1g、BACTO GELATIN (DIFCO) 1.5g を加え、滅菌後、Legionella BCYE Growth Supplement (SR0110A:Oxoid) 1 バイアルを指示通り溶解、

添加し調製することができる。本培地は、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はならない。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。

本精度管理では、供試菌を加えた配付試料を培地総量として 600mL 作製した。作製方法は以下の通りである。精製水 240mL に対し、Yeast extract (Oxoid) 5g を加え(スターラーマグネット入り)滅菌後、十分混和し、35°C のウォーターバス内で安定させた。同時に、精製水 300mL に BACTO GELATIN (DIFCO) 9g を加え滅菌後、十分混和し 35°C のウォーターバス内で安定させた。前者の温度が十分安定後、Legionella BCYE Growth Supplement (SR0110A:Oxoid) 6 バイアルを指示通り溶解、添加し十分混和した。次に 50°C、30 分間加熱処理を行い MWY 寒天培地(自家調製)で 40 時間培養した供試菌を約 3×10^3 /mL に調製し、この菌液を 6mL 添加し十分混和した。これに、35°C に安定した滅菌ゼラチン溶液を加え、十分混和し 35°C 設定のホットスターラーで攪拌し続け、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、30 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 3)。なお、Growth Supplement の調製、添加、菌液の調製、添加、滅菌ゼラチ

ン溶液の添加については、すべて安全キャビネット内で行った。

〈確認検査〉

検査については、供試菌添加 1.5%ゼラチン加レジオネラ培地溶解後検体(配布試料を 36℃±1℃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もの(溶解後は室温で安定))、仮想非濃縮検体(溶解した検体 5ml を滅菌精製水 495ml に加え十分に混和したもの)、100 倍濃縮検体(ろ過濃縮を指定:仮想非濃縮検体 500ml を 0.2 μm ポリカーボネート製フィルター(ADVANTEC:事前配付)でろ過し、そのフィルターを滅菌精製水 5ml と合わせ、1 分間ボルテックスしたもの)について行った。なお、フィルターのトラップ面は光沢面を指定した。本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、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:別添 2、3)、〈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。北海道立衛生研究所では、配布試料作製 0、3、4、5、6、7 日目に確認検査を行った。また、途中の検査結果状況に応じ、追加検査も行った。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、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 α 寒天培地(Oxoid)に試料作製 0 日目から 1 週間(7 日目)まで検査を行い、3 人の検査者の結果において、0 日目と比較し 80%以上の菌数を保持し、かつその菌数が概ね 100 以上保持できることを目標とした。

〈回収率の目標値〉

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

詳細な検査方法については、昨年度、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。本年度は、公衆浴場等の自主検査で行われる一般的な検査方法についてその詳細を検討した。レジオネラ属菌の検査方法については、現状いくつかの検査マニュアルが存在しており、それらマニュアルごとにいくつかの検査工程の違いが存在している。そのため、地方衛生研究所に向けた検査法のアンケート調査においても、項目工程ごとに複数の回答が得られていた。それらが検査精度のバラツキ要因の一つであったと考えられる。そこで現行の公衆浴場における衛生対策の通知(公衆浴場における水質基準等に関する指針(公衆浴場における衛生等管理要領等について(H12.12.15 生衛発第 1811 号厚生省生活衛生局長通知)及び公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について(H15.2.14 健発第 0214004 号厚生労働省健康

局長通知))内容を再確認し、それを踏まえWG内で詳細を検討した。その結果、問題解消に向けた標準的な検査法がほぼ提示できるまでに至った。WGでは、本培養法におけるレジオネラ属菌を「分離培地上の集落において、斜光法により特徴的な集落を呈しL-システムの要求性が確認されたもの」と定義した。また、現行の公衆浴場における衛生対策の通知には、検査法について、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」を参照することと記載されていることから、WG提示方法の比較対象とする検査法については、新版レジオネラ症防止指針¹⁾を採用した。これらに基づいたWG提示方法を表1～6に示した。今回提示する検査方法を十分に理解し導入することで、行政、民間の検査機関にかかわらず検査精度が向上し結果のバラツキを抑えることが可能と思われる。新たに「斜光法」²⁾を導入することが大きなポイントと考える。一方で、現在様々な方法論で行われている国内の検査状況の中においては、提示法導入により検査工程ごとに大きなズレを生じる可能性がある。そのため、いくつかの問題発生が予想される。以下にその注意事項を示す。

1. 検体採取から検査まで

慎重な採水、予備検水の確保、残留塩素存在時の中和処理を適切に求めることで、これまでと採水方法が異なってくる検査機関が出てくると思われる。採水容器の変更や改めて中和剤対応が必要となる検査機関では、コストの増加が予想される。特に検査依頼者に採水を求めている検査機関では、採水方法の注意点等のマニュアルをより適切に作成する必要がある。また、予備検水保存用冷蔵庫が必要となる。

現行の通知では、検査方法の項目で「冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること」と記載されており濃縮法のみでの対応となっているが、今回、新版レジオネラ症防止指針通り、清掃消毒直後の検体等、レジオネラ属菌数が少ないと推定される検体以外では、非濃縮検体の検査対応を求めた。このため使用培地量の増加により、これまでよりコスト、検査時間が増加する。

レジオネラ症はレジオネラ属菌を含んだエアロゾルを介して感染する機会が多い。そのため、新版レジオネラ症防止指針にも「操作によってエアロゾルが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」と記載されている。地衛研への実態調査の結果から推察すると、官・民にかかわらず安全キャビネットを利用しないで検査を行っている検査機関が相当数あると考えられる。安全キャビネットを有していない検査機関でレジオネラ属菌検査を実施することは適切ではないため、その設置状況により、本検査ができなくなる、あるいは設備投資が必要になる検査機関があると思われる。

2. ろ過濃縮法

フィルターの材質をポリカーボネートタイプに統一したことで、他の材質を利用していた検査機関ではフィルターの変更が必要になる。ポリカーボネートタイプフィルターは回収率が高い反面、ろ過に時間を要する場合がある。また検査機関で滅菌する必要がある。

ポアサイズを 0.2μ と 0.22μ に指定したことで、これまで 0.40μ や 0.45μ を使用していた検査機関ではよりろ過時間が長くなることが予想される。

3. 冷却遠心濃縮法

WG ではろ過濃縮法を推奨している。検査環境の設備条件により冷却遠心濃縮法を行う場合は、検水量をできるだけろ過濃縮法と同量にするなど工夫することが望ましいが、一度の遠心で対応出来る大型の遠心機を有している検査機関は少なく、1 検水につき遠心する本数を増やす事になる。また、遠心上清除去についても慎重かつ適切さを求めた。これらの詳細方法論は JIS K 0350-50-10 に記載されているが、これまでよりも手技が多くピペットなどの器材も増えるため、コスト、検査時間が増加する。

遠心条件を回転数ではなく加速度に設定した。そのため加速度設定が無い遠心機を有している検査機関では、計算式により加速度を求める必要がある。

4. 前処理

新版レジオネラ症防止指針の記載通り、酸、熱による前処理に加え未処理を求めた。多くの検査機関では酸、熱のどちらかの前処理だけでの対応と思われる。このため、前処理および使用培地量の増加により、これまでよりコスト、検査時間が増加する。

5. 培養-1

前述「1. 検体採取から検査まで」の項でも述べたが、新版レジオネラ症防止指針の記載通り、清掃消毒直後の検体等、レジオネラ属菌数が少ないと推定される検体以外では、非濃縮検体の検査対応を求めた。このため使用培地量の増加により、これまでよりコスト、検査時間が増加する。

新版レジオネラ症防止指針の記載通り、非濃縮検体、濃縮検体の検査対応および3通りの前処理を求めたことにより、1 検水につき、これまで分離培地 1 枚だけで対応していた検査

機関では、最大 6 枚の分離培地が必要となり、コスト、検査時間が増加する。また培地の増加により培養器中の占有容積も増加する。

6. 培養-2

集落観察(推定特徴)において「斜光法」を導入した。導入にあたっては、実体顕微鏡とコールドライト等の光源が必要となり、常備していない検査機関では初期投資が必要となる。一方で本法の導入により、定法と比較し、1)レジオネラ属菌とその他の菌を効率良く分別・釣菌が可能に(見逃しも解消され定性性が向上)、2)菌数測定が簡便になり極めて正確に(定量性の向上)、3)経験年数を問わず確認作業が可能に、以上のような利点がある。このように集落確認作業での検査精度の向上が認められたため、グラム染色を検査必須項目から外した。

以上、WG で検討した検査方法を仮に標準的な検査方法として位置付け、遵守した場合における注意事項を示した。本来レジオネラ属菌検査は、通知にある新版レジオネラ症防止指針を注意深く読み込むことで、他の細菌検査に比べ煩雑な検査のもと結果が導き出されるものと理解することができる。上記の注意事項のいくつかは、新版レジオネラ症防止指針を遵守することで発生するものである。検査機関ごとの精度に大きな差が生じる理由として、新版レジオネラ症防止指針にも記載されている「適切な研修」を受けずに検査を導入してきたことや、他にもいくつかの検査マニュアルが存在していることが背景にあると思われる。今回 WG で検討した検査方法を提示し、それに基づいた研修会を実施することで、各検査機関における検査精度が向上し結果のバラツキが改善されると思われる。しかしながら、コスト