

及び検査時間増加への対応が求められるのも事実である。それにより、検査対応できる施設の減少や1検査機関で対応できる検査件数の減少、また検査依頼者側への料金負担が大きくなる可能性も考えられる。厚生労働省では、これら注意点を十分に検討し、新たな検査法と遵守義務について慎重に提示する必要があると思われる。WG提示方法は最終案ではなく、いくつかの想定される留意点を考慮し、段階的に検討、修正するためのたたき台の案として提示するものである。最終的には、現在の10CFU/100mL未満という基準設定は、どの方法によって導かれるものなのかを明確にし、それを標準的な検査方法として位置付けることが望ましい。なお、参考として表7～12に新版、第3版、WG提示案を併記した。

2) 研修システムの構築

平成22年度に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³⁾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。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。新版レジオネラ症防止指針には「レジオネラ属菌検査は熟練した専門家が行わねばならない。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。大腸菌を培養したことがあるからといってレジオネラ属菌の検査もできると安易に考えてはならない。新たにレジオネラ属菌検査に従事しようとする者は、レジオネラ研究施設に少なくとも3ヶ月は研修し、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付けなければならない。検査方法の改変は、細菌学実験法の原則に通じた者がレジオネラ属菌検査の基本に則して行うべきであって、細菌学実験法の基礎知識のない者が勝手に行ってはならない」と記載されている。これまで日本国内においては、この定義に基づいた研修システムがなく、また、曖昧な状況下での検査導入が行われてきたと思われる。今後は、まず標準的な検査法を確定させ、その手技取得のための研修システムを構築する必要があると思われる。そのためには、主催者、場所、条件等の基本設定を明確にさせなければならない。最終的には行政・民間検査機関すべてに対する実技を伴った研修システムを構築することが望ましい。

研修システム構築のための手順概要一案を次に示す。

(1) 厚労省へ基本となる標準的検査法を提示し、確認、検討、決定。

(2)行政機関を対象とした実技を伴った研修会開催に向けたシステムの構築。そのためには、研修受け入れ機関の設置と核となる講師や指導員の養成が必要。既存する研修システムを応用する場合、例えば国立保健医療科学院の研修コースへの組み込み。あるいは、地方衛生研究所協議会の各ブロック研修会で対応。講師はレジオネラ研究班員内で養成し派遣する(厚生省や地研協議会からの依頼)。

(3)保健所への研修:各地研が対応。

(4)民間検査機関への研修:各地研もしくは保健所が対応(業務としての位置付け、予算付けを明確にする)。この方法が困難な場合には、厚生労働省が民間に対する研修受け入れ機関を設置し講師養成を行う(栄研化学スクールなど民間が行っている研修事業を含めリサーチし、協力を依頼することも視野に入れ検討してはどうか)。

(5)行政機関に対しても、(2)、(3)による研修が困難な場合においては、厚生労働省が研修受け入れ機関を設置し講師養成を行う(栄研化学スクールなど民間が行っている研修事業を含めリサーチし、協力を依頼することも視野に入れ検討してはどうか)。

以上一案を示したが、どのような研修システムにしても、研修受け入れ機関を設置し講師の養成が必要である。もし地方衛生研究所を研修対応機関として機能させるのであれば、業務としての位置付けと予算化が重要であり、厚生労働省と各自治体及び全国地方衛生研究所協議会との連携が肝要である。

3)精度管理

昨年度の精度管理において、北海道衛研で行った検査結果で次の事象が発生した。

①同じ検査工程だったにもかかわらず、市販

生培地全てで検査者A、B間で発育菌数に大きなバラツキが認められた。②しかしながら北海道衛研で自家調製した培地では、非選択、選択培地にかかわらず、検査者間でのバラツキは認められなかった。③検査者A、Bにかかわらず、また試料作製後の日数にかかわらず、自家調製培地での発育が顕著であった。回収率においても自家調製培地が、最も安定した高い値を示した。④上記①～③において、明確な理由説明ができなかった。そこで、これらの事象を解明する一助として、本年度は市販生培地以外に、道衛研自家調製培地も全員に送付し精度管理検査を実施した。

表 13 に北海道衛研で行った全結果(集落数)を示した。昨年度と同じ方法で配付試料を作製したが、初期の発育集落数が昨年度に比べ約2/5になっていた。試料作製0日目での検査において、同じ検査工程だったにもかかわらず、昨年度同様、市販生培地全てで検査者A、B、C間で大きなバラツキが認められた。検査者によっては、発育が認められない場合があった。一方、自家調製した培地では、BCYE α 培地は検査者間のバラツキは小さく許容範囲であった。自家調製 MWY 培地では、他の市販生培地に比べるとバラツキは小さかったが、BCYE α 培地にはおよばなかった。これら事象を検証した結果、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ことが示唆された(大きく分けると検査者Aがハードタッチ、Bがソフトタッチ、Cがミドルタッチによる塗布)。試料作製3日目から、コンラージ棒のタッチ力を意識し、検査者Aではソフトタッチに、B、Cは引き続き同じタッチ力で塗布した結果、検査者Aの集落発育状況が大きく改善され、検査者Bとのバラツキが解消された。検査者Cではバラツキ

の解消がなされず、培地の種類にもよるが、低い発育集落数となる傾向にあった。しかしながら、自家調製 BCYE α 培地では、予想通り検査者間差が少なく、かなり安定した結果を示した。表 14 に検査者ごとの結果(試料作製 0 日目を除く)を示した。平均値の比較においても、検査者 A、B 間ではバラツキが少なく、検査者 C ではどの培地でも低い数値となっている。一方で、どの検査者においても自家調製 BCYE α 培地の平均値が最も高かった。これらのことから、昨年度発生した北海道衛研での検査者間差、および本年度試料作製 0 日目の検体に対し発生した顕著な検査者間差、引き続き試料作製 3 日目以降にも発生している検査者間差は、塗布時におけるコンラージ棒のタッチ力(力の入れ具合)が集落発育へ大きく影響していると思われた。一方で、今年度も自家調製 BCYE α 培地ではバラツキが少なく安定性があった。表 15 に北海道衛研での全体の回収率を、表 16 に検査者ごと回収率を示した。発育集落が少ない状況での回収率は、不安定要素が大きいため意味づけが難しいが、発育菌数が安定していた自家調製 BCYE α 培地での結果においても、全体平均で 39%と低い値を示した(昨年度 85%)。その他の培地もすべて、昨年度と比較し回収率が低かった。表 17 に試料作製 14 日目の検査結果(集落数)を示した。今回のプレ精度管理では、試料作製 7 日目以内の結果しか求めていないが、配付試料中のコロニー発育度合いを、フィルターの洗い出し方法やコンラージ棒のタッチ力とも比較し検証を試みたものである。「直接」を見ると、昨年度以上に集落の発育度合いが顕著に低下していたが、どの培地メーカーの BCYE α 培地でも発育が認められ、どのメーカーでも選択分離培地より BCYE α 培地で発育数が多かつ

た。また発育が認められた BCYE α 培地でも、コンラージ棒のタッチ力がハードタッチの場合、自家調製培地でしか発育が認められなかった。「回収」については、発育集落がより少なくなり意味づけが難しい状況であるが、結果として「直接」での発育が 7 集落以上あった栄研と自家調製の BCYE α 培地でのみ発育が認められた。またその条件は、共に手振り 10 分による洗い出しで、コンラージ棒のタッチ力がソフトタッチの場合のみであった。これらのことから、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と思われ、特に生菌数が少ない場合における影響力が大きくなる可能性が示唆された。また、ここでの結果からも自家調製の BCYE α 培地では、コンラージ棒のタッチ力による影響が緩和される傾向にあった。表 18 にコンラージ棒のタッチ力及び培地作製日の違いによる集落発育状況(試料作製 7 日目検体)を示した。検査者にかかわらず、ハードタッチでは発育菌数が減少した。ただしハードタッチにも個人差があり、その発育菌数にはバラツキが認められた。自家調製の BCYE α 培地では、発育力、安定性が良く、コンラージ棒のタッチ力による大きな差が認められなかったことから、培地作製日から検査までの期間が短く、より新鮮な状況が良い結果に繋がっている可能性があると思定された。そのことを確認するために、プレ精度管理で使用した培地より、約半年古いものと 1 年古いものとの比較を行った。これらの古い培地は、これまでに科研内で報告している密閉容器で適切に保存してきた培地である。比較した結果、古い培地でも検査者にかかわらず発育力、安定性が共に高かった。このことから自家製の BCYE α 培地においては、適切な状況下で保存すれば長期間、少なくとも培地作製後 1 年

間は、その性能が保持される可能性が示唆され、その発育力と安定性は新鮮さとは別の点にある可能性が高いと思われた。選択分離培地も同様に長期保存で性能が安定し続けるかについては、選択剤の力価についての検証を確認する必要がある。表 19 に昨年度、本年度の配付試料状況確認のため、最も安定している自家調製の BCYE α 培地における、保存日数ごとの直接の集落数、発育率(試料作製 3 日目の直接で発育した集落数を発育率 100% として計算)と回収率の推移を示した。先にも示したが、本年度の配付試料では、昨年度と同じ方法で作製したにもかかわらず、初期の発育集落数が約 2/5 になっていた。その後の発育率の推移を見ると、試料作製 7 日目まで優位な差は認められなかった。しかしながら 14 日目では昨年度の約 1/6 になっていた。回収率については、昨年度は洗い出し方法が手振り 10 分、本年度はボルテックス 1 分だったため単純に比較することはできない。しかしながら、昨年度の回収率が試料作製 14 日目まで高回収率のまま推移したのに対し、本年度は、作製 3 日目で昨年度の約 1/2、その後は 7 日目まで約 1/3 程度で推移し、14 日目では発育集落数自体が激減し、ボルテックス 1 分では回収されなかった(手振り 10 分では約 1/7)。このように、本年度の配付試料では、作製初期からの発育集落数の減少および回収率の顕著な低下、作製 7 日目以降の発育率の顕著な低下が認められたことから、供試菌株がなんらかの損傷を受けていた、または損傷を受けやすい状況になっていたため、集落の発育に影響した可能性があると思われる。これら北海道衛研の結果を踏まえ、プレ精度管理参加者全員の結果(集落数)を表 20 に、検査者 A、B の発育集落数状況を表 21 に、検査者 C~K の発育

集落数状況を表 22 に示した。北海道衛研以外の検査者では、検査者 F が試料作製 3 日目、その他の検査者は全員 4 日目の検体に対し検査を行っていた。そこで、北海道衛研検査者 3 人分の試料作製 4 日目の検査結果を追加し、全体として試料作製 4 日目以内の結果としてまとめた。偶然ではあるが、検査日の違いによる影響をほぼ考えなくて良いものとなった。「直接」の集落数で見ると、全ての培地でコンラージ棒操作のソフトタッチを意識した検査者 A、B の結果が高い数値で比較的安定性が認められたのに対し、ミドルタッチを意識した検査者 C を含め、他の検査者では低い数値やバラツキが目立つ結果となった。検査者 A、B と大きく異なる数値が認められた場合は、表 1 に示したミドルタッチを意識した検査者 C の全体的な結果や試料作製 0 日目のハードタッチを行った検査者 A の結果と同様の傾向であったと思われる。検査者全員のコンラージ棒のタッチ力(力の入れ具合)を確認しなければ結論づけるのは難しいが、このことが影響している可能性を否定できないと思われる。その様な中、検査者 H の結果においては、検査者 A、B 以上の結果を示した。検査者 H に確認したところ、日頃からコンラージ棒操作については十分意識しながら検査を行っているとのことであった。検査者 G、K においても使用した 4 種類の培地中 3 種類で高い数値であったが、1 種類では低い数値だった。自家調製 BCYE α 培地では、11 検査者中 10 人で高い数値を示し、安定性があったと思われる。検査者 A、B の自家調製 BCYE α 培地に発育した菌数の平均値(135)を基準値とし、仮にその 50~120%の発育数をベストな発育数とするならば、表 20 中の太字で示した値がそれに当たり、これまでの安定性に対する説明とほぼ合致する。「非濃縮」につ

いては、配付試料自体が検出限界ギリギリの試料であったため厳しい状況であったと思われるが、自家調製 BCYE α 培地での確認が最も多く、11 検査者中 7 人で確認されていた。また、全体としてどのメーカーにおいても選択分離培地に比べ BCYE α 培地で確認される場合が多い傾向にあった。「濃縮」については、全体的に発育集落数が低い傾向にあった。各検査者における集落数の最大値を示した培地は、11 検査者中 10 人が自家調製 BCYE α 培地であった。表 23 に検査者全体回収率を、表 24 に検査者 A、B 及び C~K の回収率を示した。発育集落が少ない状況での回収率は、不安定要素が大きいため意味づけが難しい。全体として回収率は低く、各検査者、培地ごとでもバラツキが目立ち安定性がなかった。先に示した、「直接」でベストな発育数を示した場合の回収率(太字)においても、低い傾向にありバラツキが目立ち安定性がなかった。

以上のことから今回の精度管理では、次のことが示唆された。①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。②供試菌株がなんらかの損傷を受けていた、または損傷を受けやすい状況になっていたため、集落の発育に影響した可能性がある。③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。これらのことは、昨年度にも発生していたと思われるが、今年度は特に目立つ結果になった。①については、個人差が大きいため、結果にバラツキが現れやすいと思われる。また、培地表面の乾燥状態や、それにより左右されがちなコンラージ棒での塗り込み方法等(コンラージ棒を動かす回数やスピード等)の要素が複合的に影響していることも考えられる。実際ソフトタッチを意識した検査者 A、

B でも全ての培地でベストな発育菌数となっていない。また、発育率の高かった検査者 G、K においても 1 種類では低い数値であった。いくつかの要因が発育菌数に影響していると思われるが、検査者 H の結果からも、可能な限り検出率を高め、培地間や検査者間のバラツキ幅を抑えるためには、検査者がソフトタッチを常に意識することが必要だと思われる。一方で今回①の影響が顕著に出たこと、また全体的に低回収率だった背景には②が影響していた可能性も否定できない。仮にそうだとすると、実際の検体においても、環境水採取後、検査開始までの一時保存時間が長引けば同様の事象が発生しやすくなる可能性も考えられる。以上についての注意喚起は、標準的な検査法にも加える必要があると思われる。今後の精度管理については、もし②の発生を考慮すると、精度管理配付試料の作製がより困難になると思われる。今後は民間等の技術を導入することを念頭に進めるべきと考える。③については、昨年度、本年度の結果からほぼ明らかと思われるが、その理由については、新鮮さでは無く別の要因と考えられた。もし②が発生していた場合においても、①に大きく影響されることなく安定した結果が得られやすいことから、理由が解明されれば生菌の確認に大きく役立つと思われる。しかしながら、OXOID の市販 BCYE α 生培地では同じ結果が得られないことから、今後の検討課題である。

今回のプレ精度管理ではいくつかの問題点が考えられ、精度管理として評価をすることが難しい結果となった。特に配付試料については、これまでも作製の困難さが指摘されていた。今後は民間等の既に確立された技術を導入することを念頭に進めるべきと考える。一方で、検査手技については、検査結果をより安

定させるための操作の必要性が示唆され、標準的な検査法へ組み込む方向で検討したい。また、培地についても検討の余地があると思われる、今後の課題としたい。

D. 結論

標準的な検査法の整理と提示:検査精度の向上と結果のバラツキ幅抑制に向け、検討した結果、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。新たに「斜光法」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、コスト及び検査時間の増加、それによる検査対応できる施設の減少や1検査機関で対応できる検査件数の減少、また検査依頼者側への料金負担が大きくなる可能性も考えられる。本法を提示するにあたっては、これら注意点を十分に検討した慎重な対応が必要であると考え。今回のWG提示方法は最終案ではなく、いくつかの想定される留意点を考慮し、段階的に検討、修正するためのたたき台の案として提示するものである。最終的には、現在の10CFU/100mL未満という基準設定は、どの方法によって導かれるものなのかを明確にし、それを標準的な検査方法として位置付けることが望ましい。

研修システムの構築について:標準的な検査法の通知へ向けた流れと並行し、厚労省とWGで現状と今後についての協議を行い、主催者、場所、条件等の基本的方針を決定する。それが既存のシステムによるものか、新たなシステムを必要とするかを含め検討し、早々に研修受け入れ機関の設置と講師の養成を行う。可能であれば、標準的な検査法

の通知と同時に、研修会開催案内を出せるよう十分な検討を行う。

精度管理について:外部精度管理の目的は「自施設の測定に関する問題点を見つけ、測定方法や測定手技を改善するために、相対的評価を行う」、内部精度管理の目的は「日常測定において測定値の正確性を保証し、施設内の測定誤差を管理する」と一般的には位置付けられている。これら精度管理を行うためには、次のことを検討する必要がある。①外部精度管理用菌株の検討、②配付試料安定化に向けた検討、③外部精度管理参加条件の設定、④配付方法の検討、⑤外部精度管理用検査方法の検討(定義:検査のどの部分に重きを置くのか)、⑥プレ外部精度管理の実施、⑦評価と解析方法の検討、⑧外部精度管理実施機関の設置(公益法人との協力等)、⑨内部精度管理の必要性、⑩その他。さて、これまでのプレ外部精度管理において、培地と塗布の仕方の違いにより集落発育状況にバラツキが出る可能性が示唆された。このため標準的な検査方法内で培地への検体塗布についても提示することとした。外部精度管理配布試料については、これまでも報告書に示したが、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くほど、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。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外部精度管理のための検査法については、基本的な流れは同じとするが、外部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。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外部精度管理を行うかの定義付けが重要になると思われる。その中で、外部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、外部精度管理用配布試料について、ゼラチンディスク、液体培地、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。このことについては、シスメックスバイオメリュー社のバイオボールの活用を検討することが最も実現性が高いと思われる。

また、今回配付試料輸送に際し、ジュラルミンケースをオーバーパックとしたゆうパックによる輸送を行ったが、規模の大きい外部精度管理を行う場合、この輸送方法では問題が多く現実的ではない。今後はスムーズな輸送方法の検討も必要と思われる。外部精度管理参加条件については、安全キャビネットを有している検査機関であること等、ある程度の定義付けが必要になると思われる。場合によっては、認定制度など踏み込んだ議論も視野に入れる必要があると思われる。現時点においては、前記①～⑩までを総合的に実施することが出来る公益法人等はない。従って、今後適切な外部精度管理を行うためには、厚生労働省が中心となり研究班と協力し、外部精度管理システムの構築後、本事業を行える機関の設立または現公益法人等から対応可能な機関をリサーチし依頼をするなどの対応が必要である。

E. 参考文献

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) 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」

F. 研究発表

- 1) Furuhata K, Edagawa A, Miyamoto H, Morimoto Y, Fukuyama M. Identification of *Legionella rubrilucens* isolated from a hot spring for foot-soaking in Niigata,

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

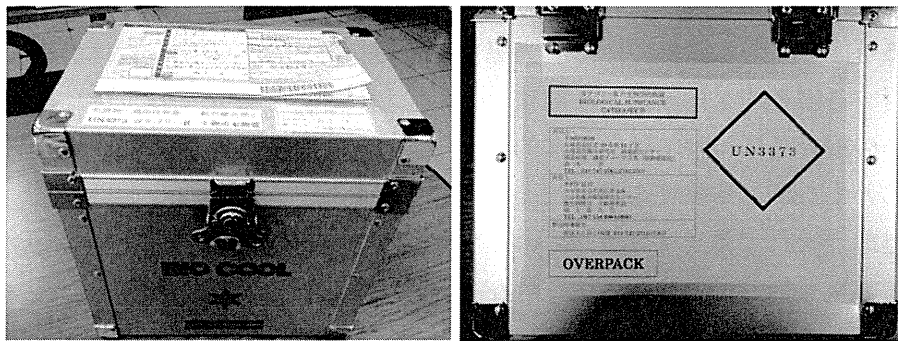


図1 試料輸送形態1

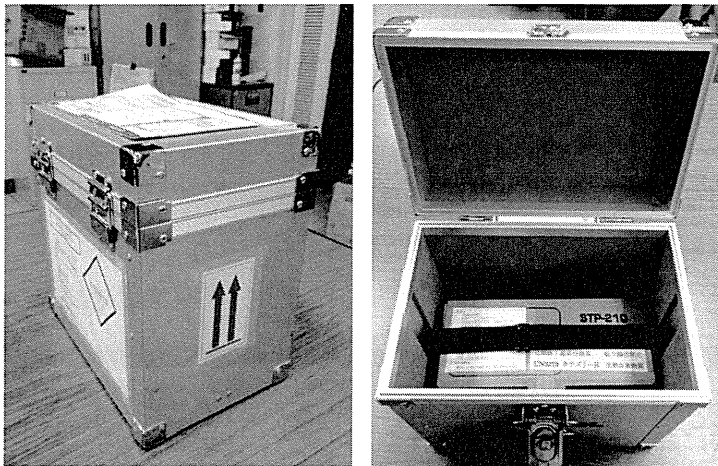


図2 試料輸送形態2

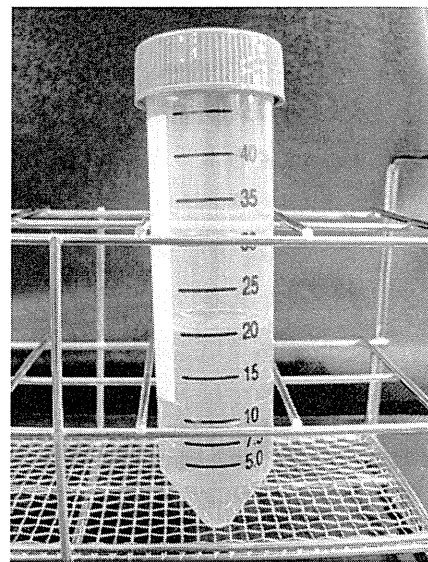


図3 配付試料

表1 検体採取から検査まで

項目	地研実態調査での 一致/多い回答(%)	新版レジ防止指針 (ISO 法ベース)	WG 提案方法
採水方法	容器入水、柄杓等使用	—	柄杓等使用が望ましい ¹⁾
採水量	約 1000mL (約 61)	500mL?	1000mL ²⁾
容器への採取量	—	満杯にせず上部に空間を残す	満杯にせず上部に空間を残す
採水容器の材質	ポリプロピレン(約 85)	ガラス製またはポリエチレン製など	滅菌済み容器 ³⁾
チオ硫酸ナトリウム添加	行っている(92)	行う	行う
搬送温度	冷蔵(68)	6~18℃	6~18℃ ⁴⁾
検査開始まで	決めている・ ある程度決めている (約 45)	採取後 2~5 日以内 が望ましい。濃縮検 体の保存は 14 日を超 えてはならない。	採取後 2~5 日以内 が望ましいとされてい るが、可能な限り速や かに行う。濃縮検体 の保存は 14 日を超え てはならない。
搬入後保存温度	冷蔵(10℃未満)(約 91)	6±2℃が望ましい	6±2℃が望ましい
非濃縮検体での検査	21/75 施設(28%)	行う	行う ⁵⁾
安全キャビネット	利用 49%、未利用 51%	必要	必要

- 1) 容器入水の場合、容器表面にレジオネラ属菌の付着が考えられ、場合によっては検査室内での相互汚染が懸念されるため。状況により、搬入後、容器周辺を消毒してから検査を行う。
- 2) 予備の検水確保のため。ろ過濃縮を推奨するため、基本ろ過量の倍量である 1000mL とした。もし遠心濃縮を行う場合は、基本遠心量の倍量を確保すること。
- 3) ポリプロピレンやポリエチレン製またはガラス製など。
- 4) 宅配便等の冷蔵システム利用の場合はそれに従う。検査室への速やかな搬入が可能な場合は常温も可。
- 5) 採取された検体の菌数を予測できないので、非濃縮検体と濃縮検体を並行して検査する
((財)ビル管理教育センター: <付録>1 環境水のレジオネラ属菌検査方法. 新版レジオネラ症防止指針, 91, 1999)
森本 洋ほか: レジオネラ選択分離生培地の比較検討, 北海道衛研所報, 58, 51-54, 2008 (厚労科研費「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」データより)
森本 洋ほか: 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. 北海道衛研所報, 61, 21-23, 2011 (厚労科研費「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」データより)
ただし、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場合においては、濃縮検体のみでの検査対応も可とする。

表2 ろ過濃縮法

項目	一致/多い回答(%)	新版レジ防止指針	提案方法
検水量	500mL(約 73)	500mL	500mL
フィルター材質	ポリカーボネート(約 61)	—	ポリカーボネートタイプ ⁶⁾
フィルターメーカー	アドバンテック(約 55)	—	適宜
フィルター表裏統一	している(約 67)	—	する ⁷⁾
ポアサイズ	0.20 μm(約 41、 0.22 μmを含めると 約 59)	0.22 μm または 0.45 μm(本文 p.89) ⁸⁾ 0.22 μm(図 18(1))	0.20 μm または 0.22 μm ⁹⁾
フォルダー材質	ガラス(約 45)	—	適宜
ろ過後のフォルダー洗浄	行っていない(約 59)	—	適宜
フィルター洗い出し用の液	滅菌蒸留水(約 77)	滅菌蒸留水	滅菌蒸留水
フィルター洗い出し方法	ボルテックス(約 67)	ボルテックス	ボルテックス
洗い出し時間	1 分間(約 59)	1 分間(ISO:2 分以内)	1 分間

6) ろ過後の水の検査ではなく、フィルターに捕集されたレジオネラ属菌を回収することを目的としている。ポリカーボネートタイプフィルターは、均一な表示径の円筒状孔を持ち、その孔径分布が一定のため、サイズによる正確な分離が可能となる。他の材質のフィルターでは、膜の内部に菌が入り込んで回収されにくくなる場合がある。

一般的な検査室では、オートクレーブ滅菌可能な製品が使用しやすい。

7) 包装製品のラベル側を捕集面にする。(光沢度が高い側)。

ポリカーボネートタイプフィルターは、その構造上表裏対象面となっているが、製法として電子銃で打ち抜き後片面をアルカリ処理することで作製されている。そのためアルカリ処理面の平滑性が若干低下している可能性がある。なお、セルロースアセテートやセルロース混合エステルタイプの表面が指定されている製品でも、包装製品のラベル側が表面となっている。

また、ミリポア HP には以下の Q&A が記載されている。

Q. メンブレンフィルターを使用する場合、光った面とそうでない面のどちらを表にすればよいのでしょうか？

A. フィルターは、ほんの少し異方性があり、光っている面の方が“細かく”なっています。特殊な応用例においては方向性を選んだ方が良い場合があります。

8) 参考: フィルター貼付法では 0.45 μm

9) ポリカーボネートタイプフィルターの対応孔径を記載した(メーカーにより異なる)。

新版レジオネラ症防止指針には、レジオネラ属菌体サイズを 0.3~0.9×2~20 μm と記載されている。レジオネラ属菌がフィルターを縦に通過しようとした場合、状況によっては 0.40 や 0.45 μm のポアサイズであればトラップされず、そのまま通過してしまう可能性がある。

ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 では孔径 0.2 μm と規定されている。

表3 冷却遠心濃縮法¹⁰⁾

項目	一致/多い回答(%)	新版レジ防止指針	提案方法
検水量	200mL(約 79)	100mL または 200mL (本文 p.88) 200mL (図 18(1))	100mL または 200mL ¹¹⁾
遠心加速度(g)と 遠心時間(分)	6000g 以上(約 67) 30 分(約 85)	遠心加速度の記載無 し。 30 分	遠心加速度(g) ¹²⁾ = 1118×回転半径(cm) ×回転速度 ² (rpm)× 10 ⁻⁸ 6000g 10 分 又は 3000g 30 分 ¹³⁾
冷却設定温度	0～10℃未満(約 52)	15～25℃	15～25℃
上清の除去	デカンテーション(約 70) 全量捨てる(約 79)	上清除去の記載無し 全量捨てる	滅菌ピペットで慎重に 除去し 100 倍希釈の 液量を残す ¹⁴⁾
沈渣の懸濁溶液	滅菌蒸留水(約 78)	滅菌蒸留水	遠心上清

10) ろ過濃縮を推奨する(森本 洋ほか: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.北海道衛研所報,59,73-74,2009(厚労科研費「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」データより))が、ろ過濃縮が困難(検体の質、検査設備等)な場合に行う。またその手順は、ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 に従う。

11) ろ過濃縮では 500mL を濃縮することから、可能な限り 500mL に近い検水量が望ましい。

12) 本来遠心加速度の統一が必要であって、回転数を統一しても使用機種により遠心加速度は異なる。遠心加速度が設定できない場合は、機種ごとに計算する必要がある。

13) ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 による。

14) 沈渣は大変浮遊しやすく、上清のデカンテーションによる除去や全量除去では、実験ロスにより回収率に大きく影響する場合は考えられる(森本 洋ほか: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.北海道衛研所報,59,73-74,2009(厚労科研費「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」データより))。これらの実験ロスによる影響を防止するために、その手順は、ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 に従う。

表 4 前処理

項目	一致/多い回答(%)	新版レジ防止指針	提案方法
濃縮倍率	100 倍(約 73)	100 倍	100 倍
前処理の種類	酸処理単独(約 47) 加熱処理単独(12) その他(複数処理: 約 41)	未処理、熱処理、 酸処理すべて行う(本 文 p.91) 酸処理または熱処理 (図 18(1)) 酸処理、熱処理(図 18(2))	未処理、熱処理、 酸処理すべて行う ¹⁵⁾
酸処理液の種類	0.2MHCl・KCl 液 pH2.2(100)	0.2M HCl・KCl 液 pH2.2±0.2(本文 p.91) 0.2M HCl・KCl 液 pH2.2(図 18(1~3))	0.2M HCl・KCl 液 pH2.2±0.2
酸処理液	自家製(約 53)	—	適宜 ¹⁶⁾
酸処理時間	4 分(約 39)	5~20 分(本文 p.91) 4 分(図 18(1,2)) 20 分(本文 p.89,図 18(3)) ¹⁷⁾	4 分 ¹⁸⁾
酸処理温度	室温(約 87)	25℃(実際には室温) (5℃±0.5℃:ISO)	25℃(実際には室温)
加熱温度	50℃(100)	50±1℃(本文 p.91) 50℃(図 18(1,2))	50±1℃
加熱時間	20 分(約 59)	30±2 分間(本文 p.91) 20 分(図 18(1,2))	20 分 ¹⁹⁾

15) 検水中のレジオネラ属菌及び雑菌は、各前処理と使用選択分離培地の種類との組合せにより出現数や種類が異なるため(森本 洋ほか:レジオネラ選択分離生培地の比較検討,北海道衛研所報,58,51-54,2008(厚労科研費「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」データより))。

16) 自家製を使用する場合は調製に十分注意し、品質確保に努めること。

17) 参考:フィルター貼付法の場合酸処理時間 20 分。

18) 平成 18 年度~24 年度までのレジオネラ属菌に関する厚生労働科学研究において、4 分間の酸処理時間で検出率に大きな影響を与えている結果が得られていないため、図 18(1,2)の 4 分を採用。

19) 平成 18 年度~24 年度までのレジオネラ属菌に関する厚生労働科学研究において、20 分の加熱時間で検出率に大きな影響を与えている結果が得られていないため、図 18(1,2)の 20 分を採用。

表 5 培養-1

項目	一致/多い回答(%)	新版レジ防止指針	提案方法
分離培地の種類等	その他(複数種類: 約 43)	指定しない(本文 p.86) ISO:GVPC 推奨(本 文 p.91) WYO α またはその他 の選択培地(図 18(1 ~3))	GVPC α 、WYO α 、 MWY 等の適切な分 離培地を使用するこ と。また、成分表に準 じて培地を独自に作 製した場合は、十分 な分離性能の検証 (雑菌の抑制を含む) と検証データを保管 すること ²⁰⁾
接種	濃縮検体と濃縮後希釈 検体(60)	濃縮検体と非濃縮検 体	濃縮検体と非濃縮検 体
検体塗布方法	設問が無く回答無し	記載無し	コンラージ棒の力加 減において、ソフトタ ッチを意識すること ²¹⁾
非、濃、濃縮後希釈検体 の同時接種について	同時に接種(約 77)	非濃縮検体と濃縮検 体を同時接種	非濃縮検体と濃縮検 体を同時接種
非濃縮、濃縮検体の保存	保存している(約 90)	濃縮検体の保存は 14 日を超えてはならな い。	14 日間まで保存
保存温度	冷蔵(約 98)	6 \pm 2 $^{\circ}$ C	6 \pm 2 $^{\circ}$ C
接種量	100 μ L(約 76)	前処理検体 50 μ L または 100 μ L	100 μ L(未・熱処理) 200 μ L(酸処理) ²²⁾
培地枚数	1 検体につき 2~5 枚 (約 63)	1 検体につき 6 枚	1 検体につき 6 枚
培養設定温度	37 $^{\circ}$ C(約 41)	36 \pm 1 $^{\circ}$ C(本文 p.91) 37 $^{\circ}$ C(図 18(1~3))	36 \pm 1 $^{\circ}$ C
炭酸ガス培養	行っていない(約 99)	BCYE α 使用の時、 不必要	適宜

20) 分離培地の種類により検出への影響は考えられるが、前処理にバリエーションを持たせることである程度の改善が認められると思われる(森本 洋ほか:レジオネラ選択分離生培地の比較検討,北海道衛研所報,58,51-54,2008(厚労科研費「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」データより))

また、市販生培地や市販基礎培地に市販サプリメントを定法通り添加した培地の使用が一般的であるが、成分表に準じて培地を作製する場合には調製に十分注意し、品質確保に努める必要がある。新版レジ防止指針には市販品と同性能のものが得られるかどうかの問題であると記載されている。

21) コンラージ棒の力加減が発育集落数に影響する可能性が示唆されたため(平成 24 年度厚労科研費「公衆浴場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」データより)。

22) 酸処理試料を分離培地 1 枚で対応

表6 培養-2

項目	一致/多い回答(%)	新版レジ防止指針	提案方法
培養日数	7日間(約64)	10日間(本文 p.91) 5-7日間(図18(1~3))	7日間 ²³⁾
集落観察(推定特徴)	灰白色湿潤集落(68)	レジオネラ属菌と思われる集落(本文 p.92) 灰白色湿潤集落で特有の淡い酸臭あり(図18(1~3))	斜光法:発育集落に斜光を当て実体顕微鏡でモザイク・カットグラス様集落の確認と測定 ²⁴⁾
集落観察(培養日数)	その他(56)	培養5日目にカウント	培養3日目~ ²⁵⁾
分離培地の観察	毎日(52)	少なくとも2~4日の間隔で3回観察。	適宜 ²⁶⁾
総釣菌数(1検体当たり)	1~10個(56)	平板上の出現集落が10個以下の場合全てそれ以上の場合、平板1枚当たり10個まで釣菌	平板上の出現集落が10個以下の場合全てそれ以上の場合、平板1枚当たり10個まで釣菌
自発蛍光検査	行っていない(約71)	菌種同定の一環	行うことが望ましい ²⁷⁾
釣菌日	その他(約89)	培養5日目?	適宜 ²⁸⁾
L-システインの要求性	行っている(約97)	行う	必須 ²⁹⁾
菌数測定		レジオネラ様菌集落を測定後、釣菌後確認により、最初の菌数算定値を修正する。	各分離培地に対し斜光法による菌数測定後、釣菌後確認で調整し、各分離培地中の最大値数を報告する ³⁰⁾
グラム染色	行っていない(約51)	行う	適宜 ³¹⁾
馬尿酸水解試験	行っていない(約72)	菌種同定の一環	適宜 ³²⁾
抗血清によるスライド凝集	行っている(約97)	菌種同定の一環	適宜 ³³⁾
DDH	行っている(52)	菌種同定の一環	適宜 ³⁴⁾

- 23) 通常、培養3~5日で確認される集落が多い。また、発育が遅いタイプに対しても、培養日数にかかわらず斜光法で発育初期に確認できる可能性が高いことから、7日間を採用。
- 24) レジオネラ属菌とその他の菌を効率良く分別、釣菌することができ、菌数測定も簡便に極めて正確に行うことができる。なお、集落出現後、3日目以降は、培養時間の経過とともに本特徴の確認が困難になる場合があるので注意すること(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 25(1),8-14,2010(厚労科研費「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」データより))。
- 25) 斜光法により培養30~35時間でレジオネラ様集落が確認できることもあるが、培養3日目が確認しやすい。
- 26) 発育が遅いレジオネラ属菌もあるので、培養3日目以降斜光法で毎日観察すると見落としが減少する。
- 27) 分離平板上の集落に対し本検査を行うことで自発蛍光を有する菌種群選定に役立つ。
また本タイプのみが発育していた場合の見落としが減少する。
- 28) レジオネラ属菌集落の発育に応じて釣菌(培養3日目以降斜光法による確認後適宜)。
- 29) 斜光法で特徴的な集落が確認され、L-システインの要求性を有していたものをレジオネラ属菌とする。
- 30) 分離平板ごとに条件が異なるため、最も多く確認された分離平板からの測定値を報告する。
ISO 11731:1998(E)では、レジオネラ集落数(CFU)の推定は3枚(未・熱・酸処理)の平板(非濃縮を行った場合は6枚)から集落を同定した最大値数とする、としている。
- 31)~34) 必要に応じ

表7 検体採取から検査まで

項目	新版レジ防止指針 (ISO 法ベース)	第3版レジ防止指針 (JIS 法ベース)	WG 提案方法
採水方法	—	—	柄杓等使用が望ましい
採水量	500mL?	200mL 以上または 500mL 以上 (濃縮方法 により異なる)	1000mL
容器への採取量	満杯にせず上部に空 間を残す	満杯にせず上部に空 間を残す	満杯にせず上部に空 間を残す
採水容器の材質	ガラス製またはポリエチ レン製など	ガラス製またはポリエチ レン製など	滅菌済み容器
チオ硫酸ナトリウム添加	行う	行う	行う
搬送温度	6~18℃	6~18℃	6~18℃
検査開始まで	採取後 2~5 日以内が 望ましい。濃縮検体の 保存は 14 日を超えて はならない。	できるだけ早く検査。 濃縮検体の保存は 3 ヶ 月間保存することが望 ましい。	採取後 2~5 日以内が 望ましいとされている が、可能な限り速やか に行う。濃縮検体の保 存は 14 日を超えてはな らない。
搬入後保存温度	6±2℃が望ましい	4~8℃	6±2℃が望ましい
非濃縮検体での検査	行う	—	行う
安全キャビネット	必要	必要	必要

表8 ろ過濃縮法

項目	新版レジ防止指針	第3版レジ防止指針	提案方法
検水量	500mL	500mL	500mL
フィルター材質	—	—	ポリカーボネートタイプ
フィルターメーカー	—	—	適宜
フィルター表裏統一	—	—	する
ポアサイズ	0.22 μm または 0.45 μm (本文 p.89) 0.22 μm (図 18(1))	0.22 μm または 0.45 μ m (本文及び図)	0.20 μm または 0.22 μ m
フォルダー材質	—	—	適宜
ろ過後のフォルダー洗浄	—	—	適宜
フィルター洗い出し用の液	滅菌蒸留水	滅菌蒸留水	滅菌蒸留水
フィルター洗い出し方法	ボルテックス	試験管ミキサー	ボルテックス
洗い出し時間	1 分間 (ISO:2 分以内)	1 分間	1 分間

表9 冷却遠心濃縮法

項目	新版レジ防止指針	第3版レジ防止指針	提案方法
検水量	100mL または 200mL (本文 p.88) 200mL (図 18(1))	200mL	100mL または 200mL
遠心加速度(g)と 遠心時間(分)	遠心加速度の記載無 し。 30分	3,000g 30分	遠心加速度(g) = 1118 × 回転半径(cm) × 回 転速度 ² (rpm) × 10 ⁻⁸ 6000g 10分 又は 3000g 30分
冷却設定温度	15~25℃	15~25℃	15~25℃
上清の除去	上清除去の記載無し 全量捨てる	上清除去の記載無し 全量捨てる	滅菌ピペットで慎重に 除去し 100 倍希釈の液 量を残す
沈渣の懸濁溶液	滅菌蒸留水	滅菌蒸留水	遠心上清

表10 前処理

項目	新版レジ防止指針	第3版レジ防止指針	提案方法
濃縮倍率	100 倍	培地接種時に 100 倍と なるよう対応	100 倍
前処理の種類	未処理、熱処理、 酸処理すべて行う(本 文 p.91) 酸処理または熱処理 (図 18(1)) 酸処理、熱処理(図 18(2))	熱処理または酸処理	未処理、熱処理、 酸処理すべて行う
酸処理液の種類	0.2M HCl・KCl 液 pH2.2±0.2(本文 p.91) 0.2M HCl・KCl 液 pH2.2(図 18(1~3))	0.2M HCl・KCl 液 pH2.2±0.2(本文 p.32) 0.2M HCl・KCl 液 pH2.2(図 2.5.1~2)	0.2M HCl・KCl 液 pH2.2±0.2
酸処理液	—	—	適宜
酸処理時間	5~20分(本文 p.91): レジ以外の共存微生物 量により異なる 4分(図 18(1,2)) 20分(本文 p.89,図 18(3))	5分 レジ以外の共存微生物 量が多いと予想される 場合には 20分まで延 長可	4分
酸処理温度	25℃(実際には室温) (5℃±0.5℃:ISO)	25℃(実際には室温)	25℃(実際には室温)
加熱温度	50±1℃(本文 p.91) 50℃(図 18(1,2))	50℃	50±1℃
加熱時間	30±2分間(本文 p.91) 20分(図 18(1,2))	30分	20分

表 11 培養-1

項目	新版レジ防止指針	第3版レジ防止指針	提案方法
分離培地の種類等	指定しない(本文 p.86) ISO:GVPC 推奨(本文 p.91) WYO α またはその他の選択培地(図 18(1~3))	GVPC α 、WYO α 、GVPN α を取り上げている(本文 p.29) GVPC α 、WYO α 等(図 2.5.1~2)	指定しない
接種	濃縮検体と非濃縮検体	濃縮検体	濃縮検体と非濃縮検体
検体塗布方法	記載無し	記載無し	コンラージ棒の力加減において、ソフトタッチを意識すること
非、濃、濃縮後希釈検体の同時接種について	非濃縮検体と濃縮検体を同時接種	濃縮検体だけの接種	非濃縮検体と濃縮検体を同時接種
非濃縮、濃縮検体の保存	濃縮検体の保存は 14 日を超えてはならない	培養後の残余濃縮検体は 3 か月間保存することが望ましい	14 日間まで保存
保存温度	6 \pm 2 $^{\circ}$ C	4~8 $^{\circ}$ C	6 \pm 2 $^{\circ}$ C
接種量	前処理検体 50 μ L または 100 μ L	濃縮・前処理済み検体 100 μ L 濃縮・酸処理の場合は、100 μ L ずつ 2 枚へ	100 μ L (未・熱処理) 200 μ L (酸処理)
培地枚数	1 検体につき 6 枚	1 検体につき 1 枚	1 検体につき 6 枚
培養設定温度	36 \pm 1 $^{\circ}$ C (本文 p.91) 37 $^{\circ}$ C (図 18(1~3))	36 \pm 1 $^{\circ}$ C	36 \pm 1 $^{\circ}$ C
炭酸ガス培養	BCYE α 使用の時、不必要	記載無し	適宜

表 12 培養-2

項目	新版レジ防止指針	第3版レジ防止指針	提案方法
培養日数	10日間(本文 p.91) 5-7日間(図 18(1~3))	最長7日間	7日間
集落観察(推定特徴)	レジオネラ属菌と思われる集落(本文 p.92) 灰白色湿潤集落で特有の淡い酸臭あり(図 18(1~3))	レジオネラ属菌と推定される集落、斜光法により区別しやすい(本文 p.32) 灰白色湿潤集落で特有の淡い酸臭あり(図 2.5.1~2)	斜光法:発育集落に斜光を当て実体顕微鏡でモザイク・カットグラス様集落の確認と測定
集落観察(培養日数)	培養5日目にカウント	培養後、2日目から1日おきに平板を観察	培養3日目~
分離培地の観察	少なくとも2~4日の間隔で3回観察。	培養後、2日目から1日おきに平板を観察	適宜
総釣菌数(1検体当たり)	平板上の出現集落が10個以下の場合全て、それ以上の場合、平板1枚当たり10個まで釣菌	平板上の出現集落が10個以下の場合全て、それ以上の場合、平板1枚当たり10個まで釣菌	平板上の出現集落が10個以下の場合全て、それ以上の場合、平板1枚当たり10個まで釣菌
自発蛍光検査	菌種同定の一環	菌種同定の一環	行うことが望ましい
釣菌日	培養5日目?	記載無し	適宜
L-システインの要求性	行う	行う	必須
菌数測定	レジオネラ様菌集落を測定後、釣菌後確認により、最初の菌数算定値を修正する。	塗抹された平板当り10~200のコロニーがみられる場合に正確な菌数を算出できる。複数の平板のコロニー数の合計が10以上なら概算数として記載できる。同一の処理で得られた結果で希釈のみが異なる場合は、コロニー数を加重平均し(コロニー数の合計を、それが得られた検水の濃縮前の元の容積の合計で割る)、結果は有効数字2桁に丸める。熱処理や酸処理等の異なる処理方法の場合には、いずれか最大のコロニー数となった処理法のコロニー数を採用する。	各分離培地に対し斜光法による菌数測定後、釣菌後確認で調整し、各分離培地中の最大値数を報告する
グラム染色	行う	行う	適宜
馬尿酸水解試験	菌種同定の一環	記載無し	適宜
抗血清によるスライド凝集	菌種同定の一環	菌種同定の一環	適宜
DDH	菌種同定の一環	菌種同定の一環	適宜
その他		ラテックス凝集反応、免疫クロマトグラフィー、PCR、塩基配列の決定等の記載有り	

表13 北海道立衛生研究所におけるレジオネラ属菌プレ精度管理検査結果（集落数:培養3日目）

使用培地	接種試料	試料作製後の日数(検査開始日)																	
		0日目(10/26)			3日目(10/29)			4日目(10/30)			5日目(10/31)			6日目(11/1)			7日目(11/2)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
栄研 BCYE α	直接	1	158	69	131	121	39	92	123	25	82	111	25	99	88	38	59	82	44
	非濃縮	0	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	濃縮	1	63	31	54	39	23	36	27	26	11	28	26	26	23	14	20	13	9
栄研 WYO	直接	0	103	37	109	109	25	113	86	16	64	80	39	71	85	51	68	72	38
	非濃縮	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	濃縮	0	33	9	19	5	8	19	62	4	2	3	1	9	3	3	8	2	1
日研 BCYE α	直接	39	152	106	145	85	94	101	83	49	80	102	33	82	87	79	64	86	40
	非濃縮	0	0	0	2	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	1	2	0
	濃縮	3	78	23	64	22	6	26	33	15	18	29	7	30	15	24	18	13	26
日研 GVPC	直接	14	34	30	92	46	53	63	80	12	51	60	10	42	53	19	43	51	28
	非濃縮	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	濃縮	1	14	5	23	8	3	9	5	7	12	2	3	0	3	2	9	3	0
極東 BCYE α	直接	10	39	34	46	64	65	92	83	29	66	63	17	61	86	33	47	74	10
	非濃縮	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	濃縮	1	32	12	9	11	2	19	26	7	4	22	1	1	15	5	9	10	14
極東 GVPC	直接	5	20	34	74	29	35	83	55	2	26	46	2	43	46	12	24	41	1
	非濃縮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	濃縮	1	10	1	2	2	1	14	4	2	4	8	0	4	4	1	0	5	1
OXOID BCYE α	直接	1	110	94	93	129	66	111	130	68	88	88	66	90	88	79	84	80	37
	非濃縮	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	濃縮	0	50	27	41	43	30	41	50	14	32	17	14	20	25	21	11	11	26
OXOID GVPC	直接	1	110	51	102	111	28	101	98	46	48	53	23	72	62	40	45	51	21
	非濃縮	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	濃縮	2	12	11	37	26	12	19	13	12	4	10	6	11	6	4	6	10	6
OXOID MWY	直接	2	82	51	93	74	90	92	94	65	66	77	56	72	80	61	62	69	82
	非濃縮	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	濃縮	0	32	10	15	11	7	15	9	7	14	10	6	12	6	8	2	8	2
OXOID BCYE α 自家調製	直接	118	131	168	133	125	146	139	131	104	111	103	76	115	97	89	114	102	82
	非濃縮	0	0	0	2	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
	濃縮	40	101	56	50	58	46	50	47	62	39	28	37	34	22	37	26	28	39
OXOID MWY 自家調製	直接	55	102	80	100	92	90	65	93	65	74	83	42	84	104	54	71	70	44
	非濃縮	0	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
	濃縮	11	20	22	32	11	7	19	22	12	16	15	4	9	8	8	14	12	13

表14 表13における検査者ごとの結果(集落数:試料作製後3~7日目)

	A				B				C			
	最低(a)	最高(b)	平均	(b-a)/平均	最低(a)	最高(b)	平均	(b-a)/平均	最低(a)	最高(b)	平均	(b-a)/平均
栄研 BCYE α	59	131	92.6	0.78	82	123	105	0.39	25	44	35.7	0.53
	0	0	0	0	0	1	0.3	3.33	0	1	0.3	3.33
	11	54	29.4	1.46	13	39	22.8	1.14	9	26	16.3	1.04
栄研 WYO	64	113	85	0.58	72	109	80.8	0.46	16	51	42.7	0.82
	0	1	0.2	5	0	0	0	-	0	1	0.3	3.33
	2	19	11.4	1.49	2	62	17.5	3.43	1	8	1.7	4.12
日研 BCYE α	64	145	94.4	0.86	83	102	89.5	0.21	33	94	50.7	1.2
	0	2	0.8	2.5	0	2	1.3	1.54	0	0	0	-
	18	64	31.2	1.47	13	33	22.5	0.89	6	26	19	1.05
日研 GVPC	42	92	58.2	0.86	46	80	61	0.56	10	53	19	2.26
	0	1	0.2	5	0	0	0	-	0	0	0	-
	0	23	10.6	2.17	2	8	3.3	1.82	0	7	1.7	4.12
極東 BCYE α	46	92	62.4	0.74	63	86	76.5	0.3	10	65	20	2.75
	0	1	0.2	5	0	0	0	-	0	0	0	-
	1	19	8.4	2.14	10	26	18.3	1.42	1	14	6.7	1.94
極東 GVPC	24	83	50	1.18	29	55	47	0.55	1	35	5	6.8
	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	0	14	4.8	2.92	2	8	5.3	1.13	0	2	0.7	2.86
OXOID BCYE α	84	111	93.2	0.29	80	130	96.5	0.52	37	79	60.7	0.69
	0	2	0.4	5	0	1	0.2	5	0	0	0	-
	11	41	29	1.03	11	50	25.8	1.51	14	30	20.3	0.79
OXOID GVPC	45	102	73.6	0.77	51	111	66	0.91	21	46	28	0.89
	0	0	0	-	0	1	0.3	3.33	0	1	0.2	5
	4	37	15.4	2.14	6	26	9.8	2.04	4	12	5.3	1.51
OXOID MWY	62	93	77	0.4	69	94	80	0.31	56	90	66.3	0.51
	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	2	15	11.6	1.12	6	11	8.3	0.6	2	8	5.3	1.13
OXOID BCYE α 自家調製	111	139	122.4	0.23	97	131	108.3	0.31	76	146	82.3	0.85
	0	2	1	5	0	1	0.3	3.33	0	1	0.7	1.43
	26	50	39.8	0.6	22	58	31.3	1.15	37	62	37.7	0.66
OXOID MWY 自家調製	65	100	78.8	0.44	70	104	87.5	0.35	42	90	46.7	1.03
	0	1	0.2	5	0	1	0.3	3.33	0	1	0.3	3.33
	9	32	18	1.28	8	22	14.3	0.98	4	13	8.3	1.08