

表15 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（回収率:培養3日目）

使用培地		試料作製後の日数(検査開始日)																		平均	最低値(a)	最高値(b)	(b-a) /平均
		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	回収率	100	40	45	41	32	59	39	22	104	13	25	104	26	26	37	34	16	20	44	13	104	2.07
栄研 WYO	回収率	####	32	24	17	5	32	17	72	25	3	4	3	13	4	6	12	3	3	16	3	72	4.31
日研 BCYE α	回収率	8	51	22	44	26	6	26	40	31	23	28	21	37	17	30	28	15	65	29	6	65	2.03
日研 GVPC	回収率	7	41	17	25	17	6	14	6	58	24	3	30	0	6	11	21	6	0	16	0	58	3.63
極東 BCYE α	回収率	10	82	35	20	17	3	21	31	24	6	35	6	2	17	15	19	14	140	28	2	140	4.93
極東 GVPC	回収率	20	50	3	3	7	3	17	7	100	15	17	0	9	9	8	0	12	100	21	0	100	4.76
OXOID BCYE α	回収率	0	45	29	44	33	45	37	38	21	36	19	21	22	28	27	13	14	70	30	0	70	2.33
OXOID GVPC	回収率	200	11	22	36	23	43	19	13	26	8	19	26	15	10	10	13	20	29	30	8	200	6.4
OXOID MWY	回収率	0	39	20	16	15	8	16	10	11	21	13	11	17	8	13	3	12	2	13	0	39	3
OXOID BCYE α 自家調製	回収率	34	77	33	38	46	32	36	36	60	35	27	49	30	23	42	23	27	48	39	23	77	1.38
OXOID MWY 自家調製	回収率	20	20	28	32	12	8	29	24	18	22	18	10	11	8	15	20	17	30	19	8	32	1.26

表16 表15における検査者ごとの結果(回収率: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	13	41	31	0.9	16	32	24	0.67	20	104	65	1.29
栄研 WYO	3	17	12	1.17	3	72	17	4.06	3	32	14	2.07
日研 BCYE α	23	44	31	0.68	15	40	25	1	6	65	31	1.9
日研 GVPC	0	25	17	1.47	3	17	8	1.75	0	58	21	2.76
極東 BCYE α	2	21	13	1.46	14	35	23	0.91	3	140	38	3.61
極東 GVPC	0	17	9	1.89	7	17	10	1	0	100	42	2.38
OXOID BCYE α	13	44	31	1	14	38	27	0.93	21	70	37	1.35
OXOID GVPC	8	36	18	1.56	10	23	17	0.82	10	43	27	1.22
OXOID MWY	3	21	15	1.2	8	15	11	0.64	2	13	9	1.22
OXOID BCYE α 自家調製	23	38	32	0.47	23	46	32	0.75	32	60	46	0.61
OXOID MWY 自家調製	11	32	23	0.91	8	24	16	1	8	30	16	1.38

表17 試料作製14日目(11/9検査開始)の検査結果(集落数)

使用培地	接種試料	洗い出し方法	コンラージタッチ	結果	使用培地	接種試料	洗い出し方法	コンラージタッチ力	結果	使用培地	接種試料	洗い出し方法	コンラージタッチ	結果			
栄研 BCYE α	直接		ソフト	7	極東 BCYE α	直接		ソフト	3	OXOID MWY	直接		ソフト	6			
			ハード	0				ハード	0				ハード	0			
	濃縮		ソフト	0		濃縮		ソフト	0		濃縮		ソフト	0		ソフト	0
		ボルテックス	ソフト	0			ボルテックス	ソフト	0			ボルテックス	ソフト	0			
			ハード	0				ハード	0				ハード	0			
		手振り10分	ソフト	1			手振り10分	ソフト	0			手振り10分	ソフト	0			
	ハード	0		ハード	0		ハード	0									
栄研 WYO	直接		ソフト	6	極東 GVPC	直接		ソフト	0	OXOID BCYE α 自家調製	直接		ソフト	8			
			ハード	0				ハード	0				ハード	4			
	濃縮		ソフト	0		濃縮		ソフト	0		濃縮		ソフト	0		ソフト	0
		ボルテックス	ソフト	0			ボルテックス	ソフト	0			ボルテックス	ソフト	0			
			ハード	0				ハード	0				ハード	0			
		手振り10分	ソフト	0			手振り10分	ソフト	0			手振り10分	ソフト	1			
	ハード	0		ハード	0		ハード	0									
日研 BCYE α	直接		ソフト	4	OXOID BCYE α	直接		ソフト	6	OXOID MWY 自家調製	直接		ソフト	5			
			ハード	0				ハード	0				ハード	0			
	濃縮		ソフト	0		濃縮		ソフト	0		濃縮		ソフト	0		ソフト	0
		ボルテックス	ソフト	0			ボルテックス	ソフト	0			ボルテックス	ソフト	0			
			ハード	0				ハード	0				ハード	0			
		手振り10分	ソフト	0			手振り10分	ソフト	0			手振り10分	ソフト	0			
	ハード	0		ハード	0		ハード	0									
日研 GVPC	直接		ソフト	0	OXOID GVPC	直接		ソフト	1								
			ハード	0				ハード	0								
	濃縮		ソフト	0		濃縮		ソフト	0		濃縮		ソフト	0		ソフト	0
		ボルテックス	ソフト	0			ボルテックス	ソフト	0			ボルテックス	ソフト	0			
			ハード	0				ハード	0				ハード	0			
		手振り10分	ソフト	0			手振り10分	ソフト	0			手振り10分	ソフト	0			
	ハード	0		ハード	0		ハード	0									

表18 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(個、試料作製7日目)

使用培地	培地 作製日	A		B		C	
		ソフト	ハード	ソフト	ハード	ミドル	ハード
栄研 WYO	2012 9.13*	68	3	72	18	38	30
OXOID BCYE α 自家調 製	2012 10.24*	114	NT	102	86	82	55
	2012 5.8	74	67	NT	NT	NT	NT
	2011 10.24	89	44	101	NT	72	NT

* 本年度プレ精度管理で使用

表19 自家製BCYE α 培地に発育した集落数、発育率、回収率の推移

実施年		試料作製後の日数							
		3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	10日目	12日目	14日目
2011	集落数	342	NT	277	NT	287	225	182	116
	発育率	100	NT	81	NT	84	66	53	34
	回収率	82	NT	99	NT	77	68	85	97
2012	集落数	129	135	107	106	108	NT	NT	8
	発育率	100	105	83	82	84	NT	NT	6
	回収率	42	36	31	27	25	NT	NT	0(13)

()内は手振り10分による結果

表20 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		試料作製後の日数(検査開始日)											平均	最低(a)	最高(b)	(b-a) /平均
		4日目以内(10/29:検査者F、10/30:検査者A~E、G~K)														
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K				
栄研 BCYE α	直接	92	123	25	58	65							72.6	25	123	1.35
	非濃縮	0	1	0	1	0							0.4	0	1	2.5
	濃縮	36	27	26	38	9							27.2	9	38	1.07
栄研 WYO	直接	113	86	16		58					12		57	12	113	1.77
	非濃縮	0	0	0		0					0		0	0	0	-
	濃縮	19	62	4		0					1		17.2	0	62	3.6
日研 BCYE α	直接	101	83	49			3	23					51.8	3	101	1.89
	非濃縮	1	1	0			0	0					0.4	0	1	2.5
	濃縮	26	33	15			2	19					19	2	33	1.63
日研 GVPC	直接	63	80	12	41		3						39.8	3	80	1.93
	非濃縮	1	0	0	0		0						0.2	0	1	5
	濃縮	9	5	7	27		1						9.8	1	27	2.65
極東 BCYE α	直接	92	83	29					111			39	70.8	29	111	1.16
	非濃縮	0	0	0					0			1	0.2	0	1	5
	濃縮	19	26	7					23			7	16.4	7	26	1.16
極東 GVPC	直接	83	55	2					91				62.75	2	91	1.42
	非濃縮	0	0	0					0				0	0	0	-
	濃縮	14	4	2					4				6	2	14	2
OXOID BCYE α	直接	111	130	68						7	51		73.4	7	130	1.68
	非濃縮	2	0	0						0	0		0.4	0	2	5
	濃縮	41	50	14						11	7		24.6	7	50	1.75
OXOID GVPC	直接	101	98	46						2		109	71.2	2	109	1.5
	非濃縮	0	0	0						0		0	0	0	0	-
	濃縮	19	13	12						5		27	15.2	5	27	1.45
OXOID MWY	直接	92	94	65				80					82.75	65	94	0.35
	非濃縮	0	0	0				0					0	0	0	-
	濃縮	15	9	7				1					8	1	15	1.75
OXOID BCYE α 自家調製	直接	139	131	104	83	52	120	113	98	93	108	112	104.8	52	139	0.83
	非濃縮	1	1	0	1	0	3	1	1	0	0	1	0.8	0	3	3.75
	濃縮	50	47	62	62	13	14	48	58	11	25	42	39.3	11	62	1.3
OXOID MWY 自家調製	直接	65	93	65	55	32	74	88	82	26	72	116	69.8	26	116	1.29
	非濃縮	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.09	0	1	11.11
	濃縮	19	22	12	38	6	6	0	40	1	4	21	15.4	0	40	2.6

表21 検査者A,Bの発育集落数状況(培養3日目)

使用培地		試料作製後の日数			
		4日目以内			
		最低(a)	最高(b)	平均	(b-a)/平均
栄研 BCYE α	直接	92	123	107.5	0.29
	非濃縮	0	1	0.5	2
	濃縮	27	36	31.5	0.29
栄研 WYO	直接	86	113	99.5	0.27
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	19	62	40.5	1.06
日研 BCYE α	直接	83	101	92	0.2
	非濃縮	1	1	1	0
	濃縮	26	33	29.5	0.24
日研 GVPC	直接	63	80	71.5	0.24
	非濃縮	0	1	0.5	2
	濃縮	5	9	7	0.57
極東 BCYE α	直接	83	92	87.5	0.1
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	19	26	22.5	0.31
極東 GVPC	直接	55	83	69	0.41
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	4	14	9	1.11
OXOID BCYE α	直接	111	130	120.5	0.16
	非濃縮	0	2	1	2
	濃縮	41	50	45.5	0.2
OXOID GVPC	直接	98	101	99.5	0.03
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	13	19	16	0.38
OXOID MWY	直接	92	94	93	0.02
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	9	15	12	0.5
OXOID BCYE α	直接	131	139	135	0.06
	非濃縮	1	1	1	0
	自家調製	47	50	48.5	0.06
OXOID MWY	直接	65	93	79	0.35
	非濃縮	0	0	0	-
	自家調製	19	22	20.5	0.15

表22 検査者C~Kの発育集落数状況(培養3日目)

使用培地		試料作製後の日数			
		4日目以内			
		最低(a)	最高(b)	平均	(b-a)/平均
栄研 BCYE α	直接	25	65	49.3	0.81
	非濃縮	0	1	0.33	3.03
	濃縮	9	38	24.3	1.19
栄研 WYO	直接	12	113	57	1.77
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	0	4	1.67	2.4
日研 BCYE α	直接	3	49	25	1.84
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	2	19	12	1.42
日研 GVPC	直接	3	41	18.7	2.03
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	1	27	11.7	2.22
極東 BCYE α	直接	29	111	59.7	1.37
	非濃縮	0	1	0.33	3.03
	濃縮	7	23	12.3	1.3
極東 GVPC	直接	2	91	46.5	1.91
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	2	4	3	0.67
OXOID BCYE α	直接	7	68	42	1.45
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	7	14	10.7	0.65
OXOID GVPC	直接	2	109	52.3	2.05
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	5	27	14.7	1.5
OXOID MWY	直接	65	80	72.5	0.21
	非濃縮	0	0	0	-
	濃縮	1	7	4	1.5
OXOID BCYE α	直接	52	120	98.1	0.69
	非濃縮	0	3	0.8	3.75
	自家調製	11	62	37.2	1.37
OXOID MWY	直接	26	116	67.8	1.33
	非濃縮	0	1	0.1	10
	自家調製	0	40	14.2	2.82

表23 レジオネラ属菌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(検査開始日)											平均	最低値(a)	最高値(b)	(b-a) /平均
		4日目以内(10/29:検査者F、10/30:検査者A~E、G~K)														
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K				
栄研 BCYE α	回収率	39	22	104	66	14							49	14	104	1.84
栄研 WYO	回収率	17	72	25		0					8		24	0	72	3
日研 BCYE α	回収率	26	40	31			67	83					49	26	83	1.16
日研 GVPC	回収率	14	6	58	66		33						36	6	66	1.67
極東 BCYE α	回収率	21	31	24					21			18	23	18	31	0.57
極東 GVPC	回収率	17	7	100					4				32	4	100	3
OXOID BCYE α	回収率	37	38	21						157	14		53	14	157	2.7
OXOID GVPC	回収率	19	13	26						250		25	67	13	250	3.54
OXOID MWY	回収率	16	10	11				1					9	1	16	1.67
OXOID BCYE α 自家調製	回収率	36	36	60	75	25	12	42	59	12	23	38	38	12	75	1.66
OXOID MWY 自家調製	回収率	29	24	18	69	19	8	0	49	4	6	18	22	0	69	3.14

表24 検査者A、BおよびC～Kの回収率(培養3日目)

使用培地		試料作製後の日数							
		4日目以内							
		検査者A,B				検査者C～K			
		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	回収率	22	39	31	0.55	14	104	61	1.48
栄研 WYO	回収率	17	72	44	1.25	0	25	11	2.27
日研 BCYE α	回収率	26	40	33	0.42	31	83	60	0.87
日研 GVPC	回収率	6	14	10	0.8	33	66	53	0.62
極東 BCYE α	回収率	21	31	26	0.42	18	24	21	0.29
極東 GVPC	回収率	7	17	12	0.83	4	100	52	1.85
OXOID BCYE α	回収率	37	38	38	0.03	14	157	64	2.23
OXOID GVPC	回収率	13	19	16	0.38	25	250	100	2.25
OXOID MWY	回収率	10	16	13	0.46	1	11	6	1.67
OXOID BCYE α 自家調製	回収率	36	36	36	0	12	75	38	1.66
OXOID MWY 自家調製	回収率	24	29	26	0.19	0	69	21	3.29

(別添 1)

感染性物質(カテゴリーB用)包装作業チェックシート(□ゆうパック □日通航空)

包装作業者所属・氏名

包装責任者所属・氏名

検体の種類 菌株・臨床検体()・その他()

病原体名(検体数)

送付先(荷受人と同じ)

施設名

住所

所属・氏名

電話番号

1次容器

- 密封容器の使用、漏れがないか確認
- 内容物を十分量吸収できる吸収材にて包む
- クッションで包む(緩衝材) → 吸収材が代用となる場合も(特にパックタイプ)

2次容器(複数パック様式の場合は、指定されたパック梱包状態を2次容器とする)

- 密封できて漏れのないメーカー規格容器へ梱包した1次容器を入れる
- パックタイプは側面、ボトルタイプは蓋の上と本体側面にドライアイスを入れない表示

3次容器

- 壊れにくいメーカー規格容器へ梱包した2次容器を入れる
- 2次容器との間に「内容物品目一覧」を入れる(パックタイプでは2次容器側面表記で対応する場合も)
- フタを閉じ封印する
- カテゴリーB用の危険物ラベル(UN3373ひし形シール)
- UN3373 カテゴリーB 生物由来物質のラベル
- 朱書きで危険物・感染性物質 および ゆうパックの場合航空輸送禁止ラベル
- 天地無用ラベル 相対する2面
- 荷送人・荷受人・緊急時連絡先の施設名、住所、氏名、電話番号のラベル

4次容器(ゆうパックの場合ジュラルミンケースを使用)

ラベル確認(3次容器と同じラベル+α)

- カテゴリーB用の危険物ラベル(UN3373ひし形シール)
- 左下にオーバーパック(OVERPACK)ラベル、
ただし国連シンボルマーク(UNマーク)は表示しない
- UN3373 カテゴリーB 生物由来物質のラベル
- 朱書きで危険物・感染性物質 および ゆうパックの場合航空輸送禁止ラベル
- 天地無用ラベル 相対する2面
- 荷送人・荷受人・緊急時連絡先の施設名、住所、氏名、電話番号 のラベル
- ラベル確認後の4次容器へ3次容器を入れ固定(ベルトやクッション材で)しフタを閉じロックする

最終確認

- 送り状の依頼主・届け先と荷送人・荷受人ラベルの記載が同じか
- 送り状の品名、摘要欄への記載が適切か
品名: UN3373 カテゴリーB 生物由来物質 臨床検体(または病原体)、危険物
摘要: チルド指定や航空輸送禁止(ゆうパックの場合)など
- 送り状を貼る
- ドライアイスを入れていない
- ダブルチェック済み
- 外装容器の上面へ安全性適正包装確認済みシールを貼る(ゆうパックの場合のみ)

確認年月日

発送年月日

(別添 2-1)

プレ精度管理検査工程

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準備下さいますようお願い致します。

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 5ml 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。

(別添 2-2)

【注意事項】

- ・本プレ精度管理は前処理無しの検査により対応願います。
- ・濃縮条件：ろ過濃縮：非濃縮検体 500ml を 0.2μ ポリカーボネート製フィルター（培地同梱）を使用し、ろ過する。 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、ボルテックスで 1 分間処理。
- ・2 種類の BCYE α 培地に接種（各 3 枚ずつ計 6 枚）及び 2 種類の選択分離培地に接種する（各 3 枚ずつ計 6 枚）。したがって、総計の接種枚数は BCYE α と選択分離培地を合わせ 12 枚となる。
- ・コロニーの確認は基本的に培養 3 日目のみ行う。コロニーが微小だったり密着している可能性が想定されるため、斜光法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 日目にも確認を行う。

なお 10 月 31 日(水)及び 11 月 1 日(木)に実験開始する場合の判定日に関する対応（定義）を以下に示す。

*10 月 31 日(水)実験開始

対応プラン 1：3 日目 11 月 3 日(土)、7 日目 11 月 7 日(水)

対応プラン 2：3 日目 11 月 2 日(金)の帰宅前に平板を $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ に移動させ、
11 月 5 日(月)に確認。

7 日目 11 月 5 日(月)に $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ に移動させ、11 月 9 日(金)
に確認。

*11 月 1 日(木)実験開始

対応プラン 1：3 日目 11 月 4 日(日)、7 日目 11 月 8 日(木)

対応プラン 2：3 日目 11 月 2 日(金)の帰宅前に平板を $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ に移動させ、
11 月 5 日(月)に確認。

7 日目 11 月 5 日(月)に $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ に移動させ、11 月 9 日(金)
に確認。

(別添3)

検査結果 (未処理対応のみ)

- ・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：市販生培地 (コロニー数)

	BCYE α		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：北海道衛研調製培地 (コロニー数)

	BCYE α		MWY	
	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：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	

平成 24 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。

精度管理に関する検討を行った。(森本ワーキンググループ)

遺伝子検査法の実用化に向けた検討を行った。(烏谷ワーキンググループ)

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を目的に従来の培養法との比較検討を行った。

また、迅速に結果が得られることから民間検査機関などで積極的に導入されている

LAMP 法について問題点を検討した。

併せて、精度管理に関する検討(森本ワーキンググループ)、及び、遺伝子検査法の実用化に向けた検討を行った。(烏谷ワーキンググループ)

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 24 年 5 月、6 月、7 月、8 月、11 月に搬入された浴槽水および湯口水 55 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、φ 0.2μm、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 分間洗い出した。ろ過濃縮後、濃縮検体(未加熱と表記)と 50℃ 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。なお、一部浴槽水については、鳥谷らの方法に従い、雑菌処理法として酸処理を行った。加えて、適正な酸処理時間を設定する目的で、従属栄養細菌数とATP測定を実施した。

2. 培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYO α 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 μ 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 α 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. 従属栄養細菌数とATP測定

従属栄養細菌数は、R2A寒天培地(関東化学)を用い、混釈寒天培養法にて、42 $^{\circ}$ C、7日間培養し、菌数測定を行った。

ATPは、濃縮検体についてルシパックワイド(キッコーマンバイオケミファ)を用い、測定した。

4. 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。

5. 精度管理に関する検討

森本研究分担者の報告参照。

6. 遺伝子検査法の実用化に向けた検討

鳥谷研究分担者の報告参照。

C. 研究結果

1. 培養法

培養結果の概要をTable 1に示した。55検体中34検体(62%)からレジオネラ属菌が検出された。内訳は「掛け流し施設」では浴槽水29検体中23検体(79%)、湯口水15検体中7検体(47%)で、「循環式施設」では浴槽水5検体中1検体(20%)、湯口水6検体中3検体(50%)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6施設、浴槽水(-)湯口水(+)となった施設は2施設であった(Table 2)。

レジオネラ属菌が検出された34検体について分離培地の検出感度を比較した結果をTable 3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18検体、WYO α +GVPCからの分離が2検体、GVPC+MWYからの分離、WYO α のみからの分離、GVPCのみからの分離、MWYのみから分離が各々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18検体、WYO α +GVPCからの分離が2検体、WYO α のみからの分離が1検体、GVPCのみからの分離が2検体、MWYのみから分離が5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、斜光法で確認後、培養を継続することにより、検出菌数が増加するという現象が確認されたものの、斜光法でのレジオネラ属菌の見逃しはなかった。

2. 従属栄養細菌数とATP測定

従属栄養細菌数とATP測定値をlog対数で比較した(Fig.1)。併せて、レジオネラ属菌数とATP測定値もlog対数で比較した(Fig.2)。従属栄養細菌数とATP値におい

ては相関が認められた。また 100 倍濃縮液の ATP 値が 50RLU 未満では、レジオネラの検出率は 20% (1/5)であったが、ATP 値がそれ以上では 76.7% (23/30)に上昇した。

3. 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 (一) 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。

D. 考察

レジオネラ属菌が検出された 34 検体について、使用した分離培地 WYO α 、GVPC、MWY の個々で分離状況を見ると、各分離培地でのレジオネラ属菌の分離は 20 検体から 24 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 29 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、効率よくレジオネラ属菌が検出された。加えて、酸処理を施した検体からのみから検出されたものが 2 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にはできないものの、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 6 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、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。

従属栄養細菌数と ATP 値においては、良い相関が認められ、ATP 値を清掃の目安として、現場検査に用いることは、有用な手段と考えられた。上木ら²⁾の報告によると、ATP 値が 25RLU 未満である場合、レジオネラ属菌検出率は 0.3% と非常に低く、ATP 値を 25RLU 未満に維持管理することが推奨されている。しかし、ATP 値測定に 100 倍濃縮試料を用いた今回の結果では、浴槽水原液での測定結果とは異なり、25RLU 未満でもレジオネラ属菌陰性とはならなかった。100 倍濃縮液を ATP 値測定に用いたことにより得られた結果であるか否か、今後の検討を要する。

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 (一) 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) を提示し、②適切な研修の場を提供し、③精度管理用サンプルの安定提供を図

り、③評価機関の確保が近々の課題と考える。

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 「ATP 測定法を用いた公衆浴場等における管理マニュアル」平成 22 年度 地域保健総合推進事業、分担事業者 東京都多摩立川保健所 上木隆人

F. 研究発表等

1. 平成 24 年度環境監視員担当者会議にて研修会を開催した。
 - ①平成 24 年 4 月 20 日「レジオネラ検査の取り組みについて」
 - ②平成 25 年 2 月 8 日「レジオネラ症防止対策に係る最近の知見について」

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Table 1 培養法の結果

採水箇所		検体数	検出数 ^a	検出率
掛け流し式	浴槽水	29	23 ^b	79%
	湯口水	15	7	47%
循環式	浴槽水	5	1	20%
	湯口水	6	3	50%
計		55	34	62%

Table2 浴槽水と湯口水の検出状況(n=18)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	6	2	8
	-	6	4	10
計		12	6	18

10cfu/100m によらない(定性)

Table 3 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=55)

			未加熱	加熱
WYO	GVPC	MWY	18	19
WYO	GVPC		2	2
WYO		MWY		
	GVPC	MWY	1	
WYO			1	1
	GVPC		1	2
		MWY	1	5
	計		24	29

Table 3-1 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=55)

	未加熱	加熱
WYOα(市販品)	21	22
GVPC(市販品)	22	22
MWY(自家製)	20	24

10cfu/100m によらない(定性)

Table 4 LAMP 法と培養法の比較

		LAMP		計
		+	-	
培養法	+	26	8	34
	-	8	13	21
計		34	21	55

10cfu/100m によらない(定性)

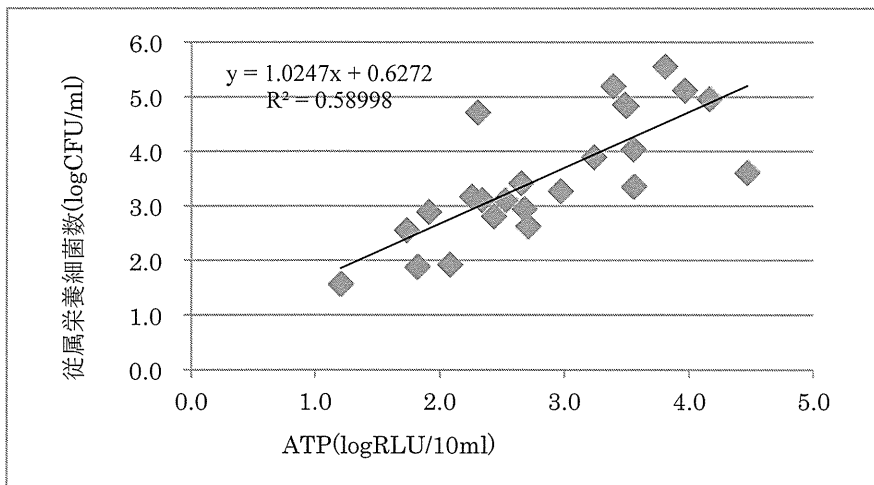
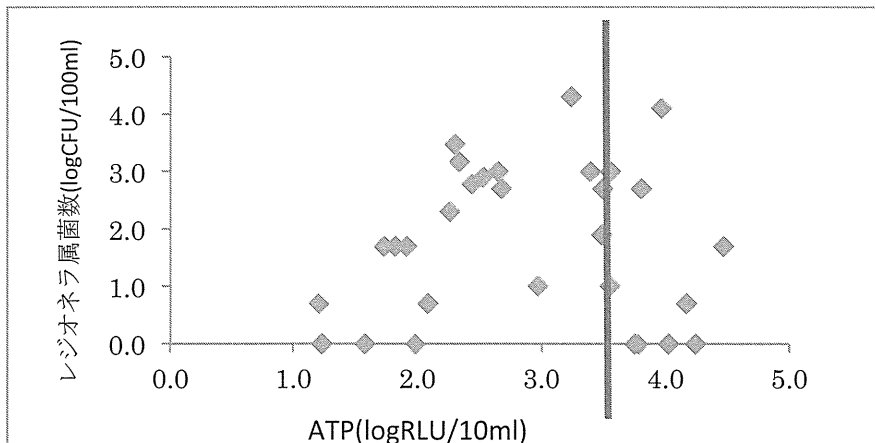


Fig.1 従属栄養細菌数とATP 値



ATP 値 log RLU/10ml の
数値 3.4 (縦線) が
25RLU に換算される。

Fig.2 レジオネラ属菌数とATP 値

平成 24 年度厚生労働科学研究(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

環境水の新規濃縮ろ過法の検討

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所細菌第一部
研究分担者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所微生物部
研究協力者	渡辺祐子	神奈川県衛生研究所微生物部
研究協力者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所企画情報部

研究要旨：水試料からのレジオネラ属菌の検出を目的として現在広く普及している検査法では、試料の濃縮に時間を要し、短時間に多くの試料を処理することを困難にしている。そこで、高い回収率を保ちつつ短時間での濃縮を可能にする検査法の改良を行う検討をした。これまでのろ過濃縮法の検討において、浴槽水試料ではハイドロキシアパタイトをろ材として用いると回収率の上昇がみられたが、基礎的検討として平板培養菌を用い、添加回収実験を行ったところ回収率の改善はみられなかった。そこで本研究では、自然環境に近い状態のアメーバ増殖レジオネラ属菌を用い、①アメーバを用いたレジオネラ増菌の再現性、②ろ過フィルターの種類・孔径による回収率の差、③回収率に対するハイドロキシアパタイトの効果について検討したので報告する。

A. 研究目的

現在広く普及している検査法では、試料の濃縮に時間を要し、短時間に多くの試料を検査することを困難にしている。本研究は、高い回収率を保ちつつ短時間での濃縮を可能にする検査法の改良を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 添加菌数の調整

供試菌株として、当所保存分離株レジオネラ・ニューモフィラ Lp58-3 株(血清群 1)を使用した。培地は、BCYE α 培地(日研生物医学研究所)と GVPC α 培地(日研生物医学研究所)を用いた。培養条件は 30°C、4 日間として平板培地で培養後、550nm で OD 値 0.35 に調整し、10 倍段階希釈を行い希釈系列のうちコロニー数

を 30~300 カウントが可能になるように 3 希釈し培地各 3 枚用いてコロニーカウントを行った。

2. アメーバを用いたレジオネラ増菌

平板培養菌を用いたところ、菌数カウントに大きなばらつきが生じたことから、自然環境に近い状態のレジオネラを用いる過濃縮実験を行った。

アメーバは、*Acanthamoeba*/JACE1 (国立感染症研究所より分与) を 30°C、4 日間 PYGC 液体培地で培養した。この培養液を Phosphate Buffer Powder (PBS) リン酸緩衝剤(組成: Na₂HPO₄ 5.7g, KH₂PO₄ 3.6g、和光純薬工業株式会社)1/15mol/l、pH7.0 を作製後、滅菌蒸留水で 50 倍に希釈したもの(以下×50PBS)に置き換えた。このアメーバ培養液にレジオネラ

Lp58-3 の新鮮培養菌を 10^3 CFU/ml となるように添加して 30°C で培養し、培養 7 日後にアメーバを孔径 $5\mu\text{m}$ の滅菌セルロースアセテートメンブランフィルター (MF) で除去したものについて各 $100\mu\text{l}$ ずつ、3 濃度 3 枚の GVPC α 培地を用いてレジオネラ菌数をカウントし、アメーバにおけるレジオネラ増菌状況を調べた。

3. ろ過フィルターの種類と孔径

アメーバ増菌レジオネラを用い、ろ過濃縮法において、MF の材質と孔径が回収率に及ぼす影響を調べた。フィルターは径 47mm で材質は 3 種類とし、孔径はポリカーボネート $0.2\mu\text{m}$ および $0.4\mu\text{m}$ 、セルロースアセテート $0.2\mu\text{m}$ および $0.45\mu\text{m}$ 、セルロース混合エステル $0.2\mu\text{m}$ および $0.45\mu\text{m}$ 、(いずれも ADVANTEC) を用い、ろ過濃縮実験を行った。

試料作製には、 $\times 50$ PBS 溶液 1000ml に、上記 2. でアメーバ増菌したレジオネラを 10^3 CFU/ml 添加した。これを 500ml ずつ 2 本に分けて吸引ろ過を行い、 50ml 遠沈管に $\times 50$ PBS 5ml とろ過を行ったフィルターを入れ、ボルテックスで 1 分攪拌後、手振りでも再浮遊させた。原液と 10 倍希釈を $100\mu\text{l}$ 、各々 3 枚の GVPC α 培地に接種した。

4. $0.4\mu\text{m}$ あるいは $0.45\mu\text{m}$ MF におけるアメーバ増菌レジオネラ通過実験

メンブランフィルターについて材質と孔径によって回収率に差が生じたため、孔径による回収率低下の理由を確認するための実験を追加した。

1 段目は、 $0.4\mu\text{m}$ あるいは $0.45\mu\text{m}$ MF を用い、試料をろ過した。このろ液を回収し、2 段目に $0.2\mu\text{m}$ ポリカーボネート MF を用いろ過した。2 段目のポリカーボネート MF を GVPC α 培地上に直接置き、

アメーバ増菌レジオネラが孔径 $0.4\mu\text{m}$ あるいは $0.45\mu\text{m}$ MF を通過するかどうか確認した。試料は、上記 3. で調整したものをを用いた。MF とフォルダーとの関連について確認するために、A フォルダー (SARTORIUS、ポリカーボネート)、B フォルダー (ADVANTEC、ポリサルフォン)、C フォルダー (NALGENE、ポリサルフォン) で実施した。

さらに MF をフォルダーに装着する時に生じるズレが漏れの原因かどうか確認するために、アメーバ増菌レジオネラ菌液 (10^7 CFU/ml) $500\mu\text{l}$ をシリンジ (10ml) にて市販のろ過滅菌用一体型フィルター (孔径 $0.45\mu\text{m}$ セルロースアセテート、セルロース混合エステル、ADVANTEC) でろ過を行い、GVPC α 培地に直接適下し、コンラージにて塗布した。

5. ハイドロキシアパタイトを用いた検討

ろ過フィルターの孔径を小さくすると回収率は高くなるが試料の濃縮に時間を要する。そこで、ハイドロキシアパタイト (AP20C) をろ材として、濃縮時間を抑え回収率を向上させる検討を行った。MF は、ポリカーボネート孔径 $0.2\mu\text{m}$ および $0.4\mu\text{m}$ 、セルロースアセテート孔径 $0.2\mu\text{m}$ および $0.45\mu\text{m}$ 、セルロース混合エステル孔径 $0.2\mu\text{m}$ (ADVANTEC) および $0.45\mu\text{m}$ (MILIPORE または ADVANTEC) を用いた。各フィルターにハイドロキシアパタイト (AP20C) を 0.4g 、 0.8g および 1.6g を添加し、レジオネラ添加試料 ($500\text{ml} \times 2$ 本) をろ過濃縮した。

C. 結果と考察

1. 添加菌数の調整

ろ過濃縮法の検討において、添加菌数

の調整が不可欠であるが、レジオネラ属菌の生菌数の測定についてはバラツキが生じることが問題となっている。

そこでレジオネラ属菌について、グラム染色で形態が一様であることが確認できた培養条件である 30°C、4 日間で培養し 550nm で OD 値 0.35 になるように条件をそろえて菌液を調整したところ、同一菌株（レジオネラ・ニューモフィラ 57-3）でも菌数に 4.3×10^7 CFU/ml から 2.1×10^9 CFU/ml と相違が生じた（表 1）。

そこで、添加回収実験の際には、毎回添加菌数を測定することにした。

2. アメーバを用いたレジオネラ増菌

これまでの検討から、アメーバによってレジオネラ属菌の 1000 倍増菌が可能であった。30°C 7 日間培養でアメーバ増菌を行うことにより添加回収試験に必要なオーダーを揃えた菌数調整が可能になった。

しかしながら、アメーバで増菌した場合、菌数を調整する際の OD 値は小さく、0.0014~0.173 とバラツキが生じたため、実施前の OD 値による菌数調整は困難であった（表 2）。

こうした原虫を用いたレジオネラ増菌については既に報告があるが¹⁾、35°C で 7 日間培養し、 10^3 CFU/ml の菌数が 10^6 CFU/ml に増菌しており、また、*Acanthameba* を用いてレジオネラ増菌を行った報告²⁾においても培養条件に相違はあるが、本研究における *Acanthamoeba* を用いた増菌と同様の傾向がみられた。

3. ろ過フィルターの種類と孔径

アメーバで増菌したレジオネラを用い、フィルターの材質と孔径が回収率に及ぼす影響を調べた（表 3）。また、フィルターの材質・孔径別の回収率の結果を図 1 に示した。その結果、孔径 0.2 μm

ポリカーボネート MF の回収率が平均 86.5% で最もよいことが示された。そこで、0.2 μm ポリカーボネートを基準として、他の MF とを比較したが、0.4 μm ポリカーボネート、0.45 μm セルロースアセテート、0.2 μm セルロース混合エステルおよび 0.45 μm セルロース混合エステルにおいては有意差があり、0.2 μm のセルロースアセテートで有意差なしという結果であった。

Smith ら³⁾ の報告によれば、MF の材質と孔径について、材質がポリカーボネートの場合が最もよく孔径 0.4 μm よりも 0.2 μm のほうが高い回収率になるという本研究の結果と一致した。また、枝川ら⁴⁾ は、0.2 μm のメンブランフィルターの材質の違いによる回収率について検討しているが、0.2 μm のポリカーボネートの回収率が最もよいことが示され本研究結果と同じ結果であった。

材質と孔径による差を実際の試料を用い検討した報告がある。小澤ら⁵⁾ は、浴槽水、冷却塔水について孔径 0.2, 0.22 および 0.45 μm のセルロースアセテート、セルロース混合エステルで回収率について調べている。その結果、検出値は 0.2 μm セルロースアセテート > 0.45 μm セルロースアセテート > 0.2 μm セルロース混合エステル > 0.45 μm セルロース混合エステルとなっており、今回の添加回収実験の検討結果と同様の傾向がみられた。この中では、0.45 μm セルロース混合エステル MF でレジオネラ属菌が通過する場合があることが指摘されている。

また、Orrison ら⁶⁾ は、小さいサイズのレジオネラ属菌が孔径 0.65 μm の MF で通過し 0.45 μm で通過していないと報告している。