

入から最短 21 時間程度で生菌の有無と汚染レベルが判明することに加え、死菌量から潜在的な汚染リスクが評価可能であり、施設の衛生管理及び指導に十分活用可能と考えられた。

参考文献

- 1) Chang B et al., Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jan; 75(1): 147-53.
- 2) Chang B et al., Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Mar; 63(2): 119-23.
- 3) Delgado-Viscogliosi P et al., Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jun; 75(11): 3502-12.
- 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、平成 20 年度総括・分担研究報告書
- 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、平成 21 年度総括・分担研究報告書
- 6) 「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
- 7) 「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

8) Diederer BM et al., Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *J Med Microbiol.* 2007 Jan; 56(1): 94-101

F 論文発表

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

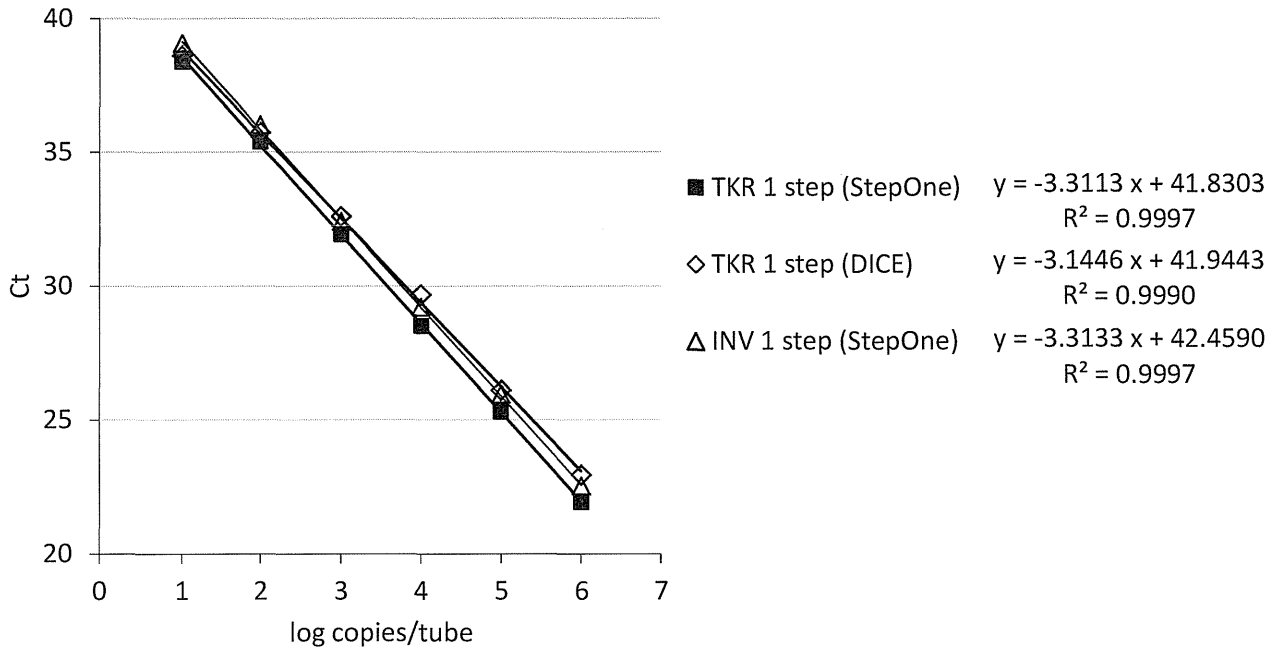


図1 RT-qPCR の検量線

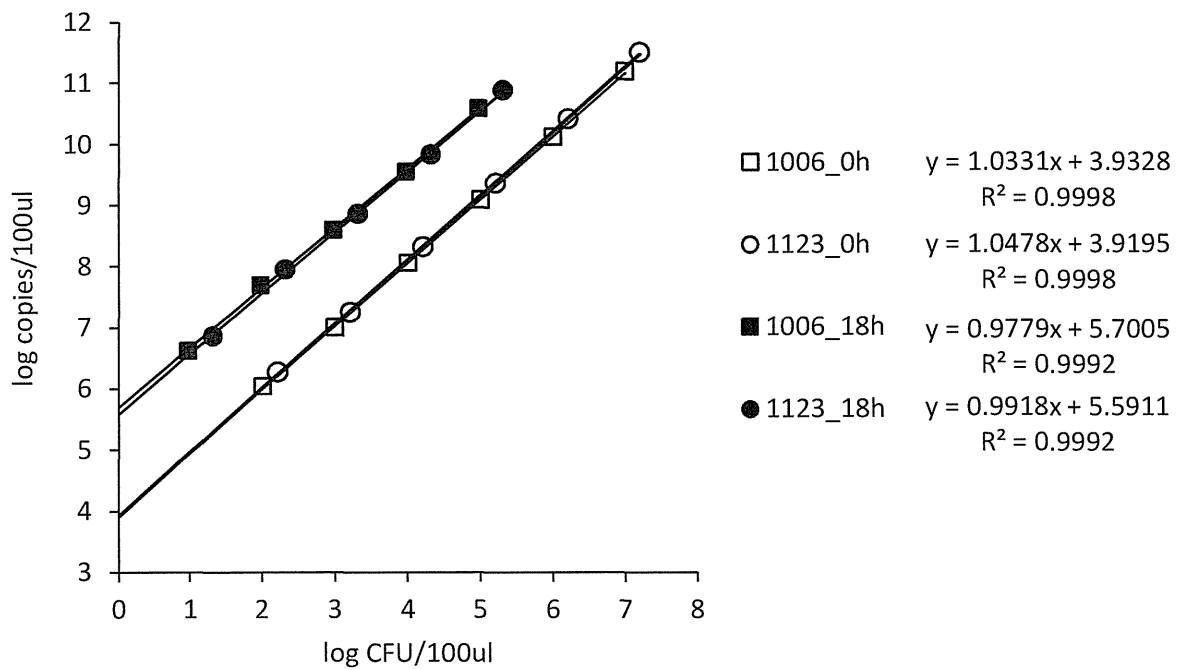
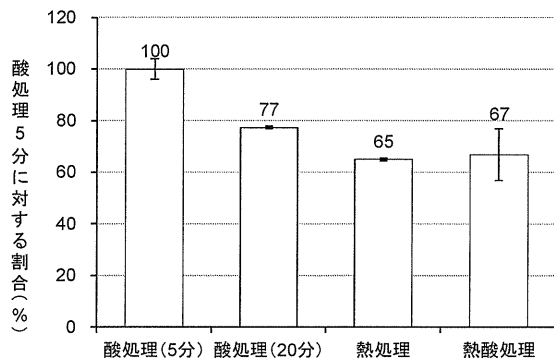
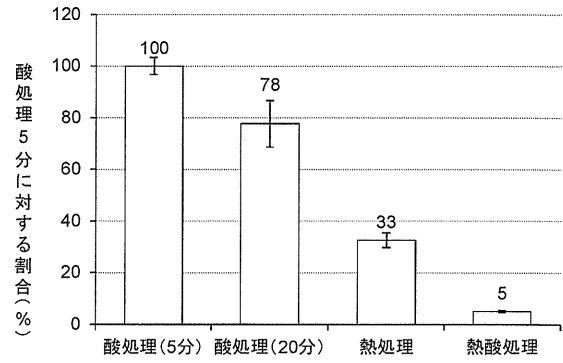


図2 アメーバ培養レジオネラにおける 5S rRNA コピー数



(1) 前処理直後の菌数低下

アメーバ培養菌液・酸処理 5 分後の菌数 (130 CFU/100 μ l) を 100%とし、各処理直後の菌数を平板培養法で比較

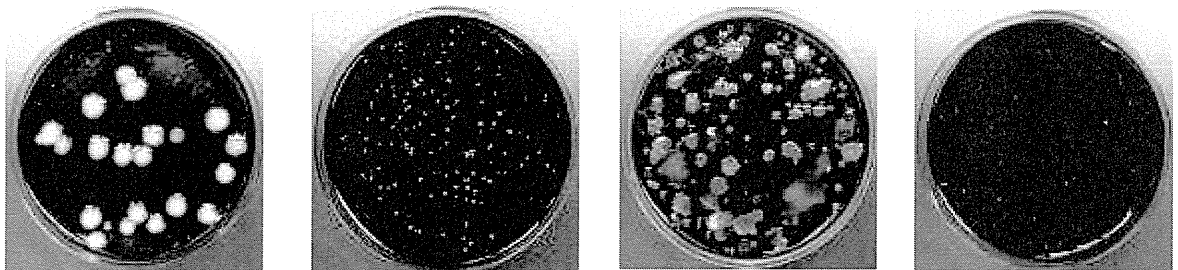


(2) 18 時間液体培養後のコピー数

アメーバ培養菌液・酸処理 5 分→18 時間液体培養後の rRNA 量 (10^6 コピー/PCR tube) を 100%とし、各処理後のコピー数を RT-qPCR 法で比較

図 3 液体培養でのレジオネラ増殖に与える前処理の影響

(a) 平板培養法における前処理の効果



前処理	雑菌	レジオネラ
酸処理 (5分)	雑菌多	レジオネラ不検出
酸処理 (20分)	雑菌なし	レジオネラ発育良好 3,100 CFU/100ml
熱処理	雑菌多	レジオネラ不検出
熱酸処理	雑菌なし	レジオネラ発育遅い

(b) LC RT-qPCR 法における前処理の効果

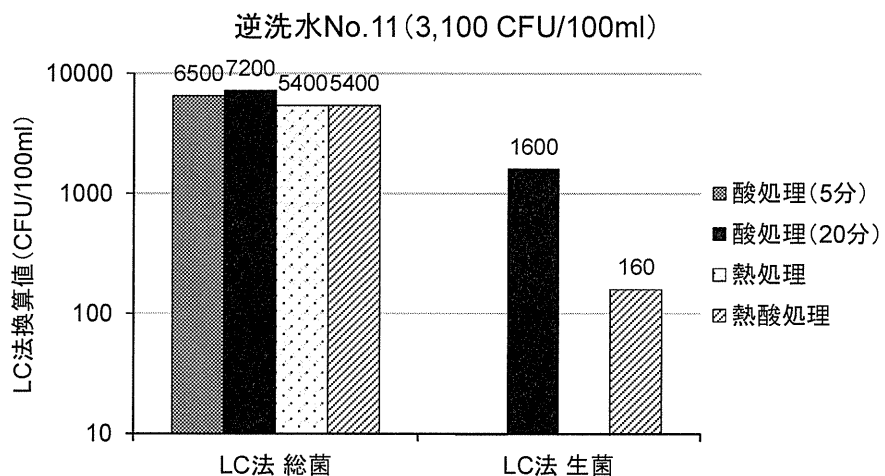


図 4 微生物汚染検体における LC RT-qPCR 法前処理の効果

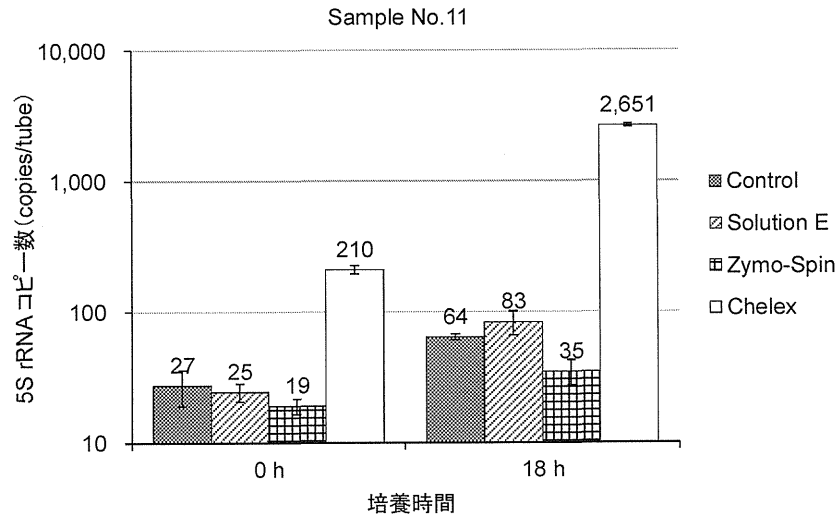


図5 微生物汚染検体における LC RT-qPCR 反応の阻害回避効果

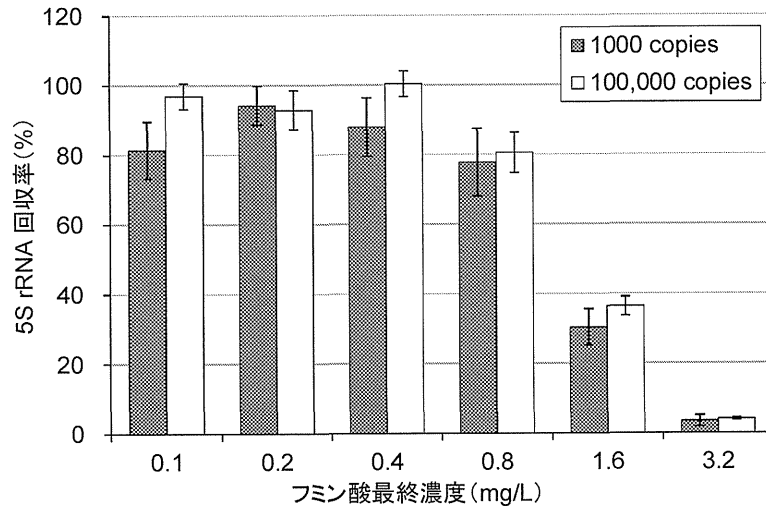


図6 RT-qPCR キット (TAKARA、RR064) におけるフミン酸の MIC 値

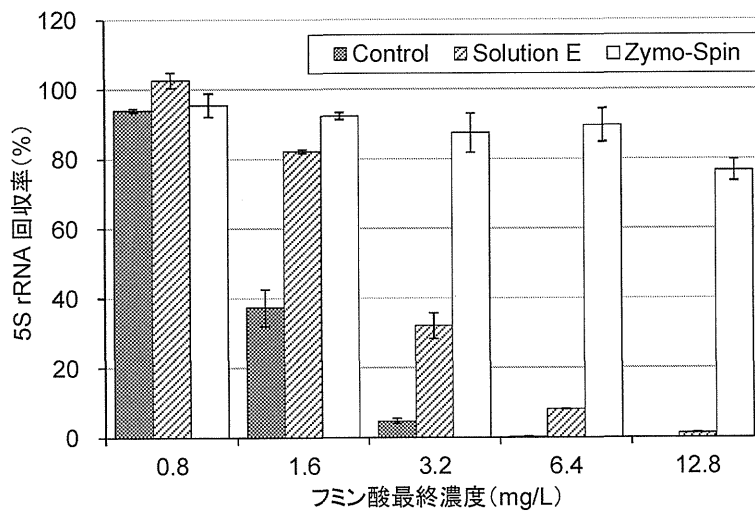
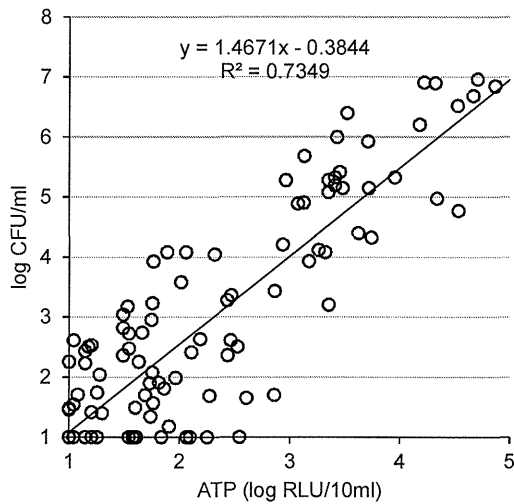
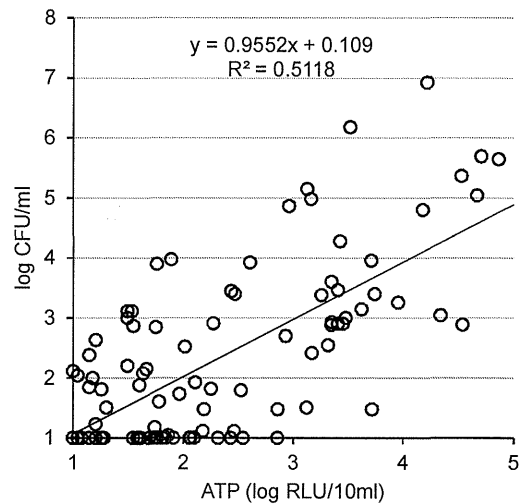


図7 RT-qPCR 阻害回避試薬の効果

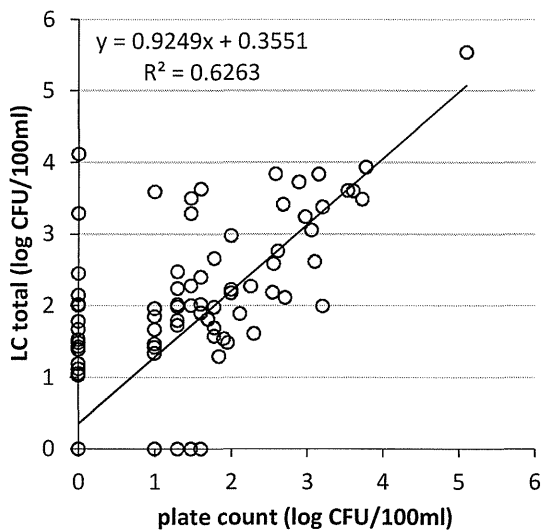


(1) 従属栄養細菌数

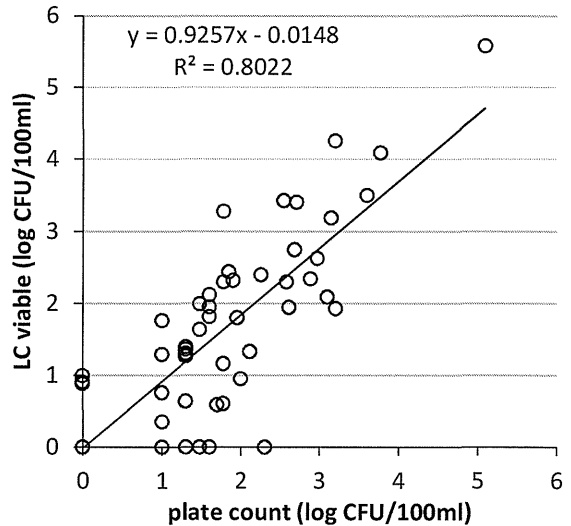


(2) 一般細菌数

図8 ATP量と微生物汚染指標菌数との相関 (n=106)



(1) LC法 Total Legionella (n=154)



(2) LC法 Viable Legionella (n=136)

判定保留の18件を除く

図9 平板培養法とLC RT-qPCR法との比較

表1 平板培養法とLC RT-qPCR法との比較

(1) Total Legionella (総菌)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
LC法 Total Legionella	≥ 10	54	17	71
	< 10	6	77	83
計		60	94	154

感度 90.0% 特異度 81.9%

(2) Viable Legionella (生菌)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
LC法 Viable Legionella	≥ 2	40	3	43
	< 2	8	85	93
計		48	88	136

感度 83.3% 特異度 96.6%

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

H22～24 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)を発足した。まず全国77か所の地方衛生研究所に対し、レジオネラ属菌検査方法のアンケート方式による実態調査を行った。その結果、1)標準的な検査法の整理と提示、2)研修システムの構築、3)精度管理の3点を柱とし、行政・民間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進める必要があるとの認識に至った。これらをWGで検討した結果、1)まず改訂版病原体検出マニュアルに反映させ、次に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、WG内(9か所の地方衛生研究所)でブレ精度管理を行った。その結果、配付試料や検査法、培地等について改善を行い、適切な評価システムを構築する必要があると思われた。配付試料については、民間企業との協力も視野に入れ検討する必要があると思われた。また、外部精度管理に加え内部精度管理の必要性を指摘した。

A. 研究目的

検査機関ごとのレジオネラ属菌検査結果に対するバラツキを改善するために、検査法安定化に向けた取り組みを行った。

B. 研究方法

レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(WG)を発足させ以下の事を行った。

- 1)レジオネラ属菌検査方法の現状を把握するために、全国の地方衛生研究所に対し、アンケート方式による実態調査を行った。
- 2)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。
- 3)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。
- 4)配付試料を検討し、WG内でプレ精度管理を行い、今後の精度管理に向けた検討を行った。

C. 研究結果及び考察

1)地方衛生研究所に対するレジオネラ属菌検査法のアンケート方式による実態調査

検査法は、これまでもSOPの基となる文献が多数あること、各文献で記載されている内容が異なる場合があること、また、検査工程については検査者自身によって選択の幅があることが指摘されていた。全体として、本実態調査結果においても同様の傾向が見られ、検査工程のバラつきが認められた。これは、未研修で検査を導入している施設が多数あったこと、標準とする検査法が示されていないことが理由と思われるが、このことが施設間での検査精度に影響を与えている可能性も考えられた。また、検査工程のバラつきは、精度管理を実施

する上で影響を及ぼす可能性も考えられる。民間検査施設に対しても同様の傾向が言えると思われ、これまでに研修システムを確立していないまま、行政・民間を問わず長年に渡り検査の普及が行われてきた現状がうかがえる。よって、標準的な検査法の整理と提示、研修システムの構築、精度管理の3点を柱とし、行政・民間を問わず検査精度の安定に向けた取り組みを進める必要があると思われた(これらに関する実態調査結果を表1~11に示した)。

2)標準的な検査法の整理と提示

まず詳細な検査方法については、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。次に、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は、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))の内容及びこれまでのレジオネラ症防止指針を再確認し、それらを踏まえ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-システイン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12～17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、WG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、これら留意点を十分に検討した慎重な対応が必要であると考え。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18～23に新版、第3版、WG提示案を併記した。

3) 研修システムの構築について

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(厚労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。

4)精度管理

平成23年度のプレ外部精度管理において、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、平成24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。平成24年度では次のことが示唆された。a) 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。b) 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。c) 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。a) については、個人差が大きいいため、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。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 a)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 b)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 b)の発生を考慮すると、精度管理模擬試料の作製がより困難になるとと思われる。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。c)については、昨年度、本年度の結果からほぼ間違い無いことだと思われるが、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 b)が発生していた場合においても、a)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。

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、条件等の基本の方針を決定する。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る、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」平成 22 年度総括・分担研究報告書 pp.101-155.

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 2011;61:,21-23
- 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

表1 研修システムは必要だと思いますか？

	回答数(%)
必要	71(約95)
不必要	0(0)
その他	4(約 5)

表2 研修システムについてのコメント1

- レジ防止指針にもあるように根拠が必要:4施設
- 行政処分や訴訟問題等にかかわるため、判定基準の統一のための研修が必要:同様含め2施設
- 検査機関間の精度の統一を図るため、研修システム、検査方法の統一、精度管理が必要。
:同様含め3施設
- 精度管理を行うには正しい手法の検査ができていないと精度管理そのものできない。そのため検査法の研修は必要である。また、研修を行えば、その手法が公定法的に広まって行くため。
- 生育が遅く、生化学的に特定困難で夾雑菌も多い。文献だけでは技術習得は難しい。経験者の指導と自分の体験が役立った。

表3 研修システムについてのコメント2

- 1地研が経験する検査数は限りがあり、新しい知見や例外的な症例、検体の扱いなどの情報を定期的に取り入れていくシステムが必要と考える。
- 本物のレジオネラのコロニーを見て覚えることは、経験の少ない者には必要。
- ある程度の技術レベルが必要な検査なので。
- 出来る範囲内で必要。
- 県では内部精度管理を検討している。
- 一般的に、検査技術の研修システムは存在した法が良い。

表4 研修システムについてのコメント3

- 初めて検査を行う場合は、実際の手技を見た方がいいと思う。
- 機関間の精度上の標準化は必要。
- 不明
当施設の検査担当者に対する研修ということであれば必要。
- あった方がよい。

表5 検査法の統一は必要だと思いますか？

	回答数(%)
必要	68(約91)
不必要	3(4)
その他	4(約 5)

表6 検査法の統一についてのコメント1

- 基本となる部分と濃縮法ごとの統一が必要では:6施設
- 検査法により結果に差が出ることがないように検査法の統一が必要。
- 統一しないと、結果がばらばらになるのでは。
- 特に濃縮法は統一が必要だと思われる。
- 濃縮法と分離培地の統一。
- 検査施設間で、検査方法の統一性を持った方が良いのでは。
- 基本となる部分は必要では。
- 基本部分を統一し、数種類の選択肢がある場合は優先順位と理由を示して欲しい。

表7 検査法の統一についてのコメント2

- 公定法・通知法などにより標準的な検査法を示すことは必須。
- 各施設(民間検査所も含む)で検査法が異なり検査精度が違っていると行政指導がやりにくくなるから。
- ある程度信頼できる方法の提示は必要。
- 基準値(10CFU/100ml)の信頼性のためにも基本の部分では統一方法を示すべきだ。ただし、手技や観察が重視される検査なのでマニュアルだけでは精度は高まらない。
- 検査法により検出率が異なっているため。
- 酸処理と熱処理 フィルター濾過と遠心法 等による検出値の相違について。
- 出来る範囲内で必要。

表8 検査法の統一についてのコメント3

- 同一日に自主検査と行政検査が行われ、自主検査:陰性、行政検査:陽性の場合が多すぎるので、自主検査(民間検査機関)での検査方法に疑問を感じている。
- 民間機関と同じ検体を検査しても結果が違うから。

表9 検査法の統一についてのコメント4

- 不必要
 - ・自主検査に限っているのであれば、厳しく統一する必要は無いと考える。
- その他
 - ・指針で二法の濃縮法が示されているので、どちらかで実施することでよいと思う。
 - ・機関間の精度上の標準化は必要。
 - ・施設の都合もあるので、統一が困難なことがあると思う。

表10 精度管理は必要だと思いますか？

	回答数(%)
必要	71(約96)
不必要	2(約 3)
その他	1(約 1)

表11 精度管理についてのコメント

- 必要だが、実施に当たっては種々の困難が予想される。
- レジオネラに限らず、検査(特に依頼検査)を行う場合は精度管理が必要と思う。
- 標準サンプル調製方法の工夫が必要、経験則だがポリカーボネートろ過法を導入して以降、環境検体を用いて定法による阻害を感じたことはないが、人工培地で調製した菌による添加回収実験(精度管理検査)をやると総じて回収率が低くなるように感じている。

表 12 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 13 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撃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 14 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 15 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 16 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 17 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日目の確認しやすい。

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