

表 18. 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 19. 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 20. 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 21. 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 22. 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	濃縮検体のみの接種	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 23. 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	

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

イギリスHPA主催のレジオネラ属菌検査外部精度管理

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	縣 邦雄	アクアスつくば総合研究所

研究要旨：日本では環境水（浴槽水，冷却水など）のレジオネラ属菌検査方法は，レジオネラ症防止指針（第3版）や JIS K0350-50-10:2006 に記載されているが，外部精度管理のシステムは存在しない．数多くの検査機関がレジオネラ属菌の検査を行っている現状において，レジオネラ属菌の外部精度管理の必要性が高まっている．イギリスでは現在，HPA が主催する外部精度管理システムが存在し，2013年3月末で，20年間にわたり運用されている．本報告では，イギリスの外部精度管理の概要を報告する．

A. 研究目的

イギリスの HPA (Health Protection Agency) が主催し，ヨーロッパを中心に 200 近くの検査機関が参加しているレジオネラ属菌の外部精度管理システム (EQA: External Quality Assessment of Legionella Scheme) の概要を報告する．本外部精度管理に，日本の検査機関が参加する契機となること，及びわが国で検査精度システムを構築する場合の参考とすることを目的とする．

B. 研究方法

1. 概要

アクアスつくば総合研究所で実際に HPA の外部精度管理に参加し，運用した．HPA への申込から，検査のスケジュール，試料の受け取り，検査の指示，報告，まとめのレポート内容の実際を報告する．

2. 試験方法

イギリス HPA に対して，レジオネラ属菌の外部精度管理への参加申し込み

を行った．2010年4月から2011年3月までの1年間4回の試料送付に対して，レジオネラ属菌の検査を行い，HPA に報告した．各試料送付に対して，結果レポートが送付されてくるのでその内容を検討した．

C. 結果と考察

1. 外部精度管理申込

レジオネラ属菌の外部精度管理の申し込み書式を入手し LEG 1 のコースを選択し，必要事項を記入の上 HPA の FEPTU (Food and Environmental Proficiency Testing Unit) にファクスで申し込む．その後，費用が請求されてくるので英国ポンドで支払う．2010年度は，£ 672 であり，日本円で概算 89,000 円 (当時) であった．

2. スケジュール

一年間に4回，一回あたり3試料が送付されてくる．（注：2012年4月からは1年に6回，1回あたり2試料と

なっている) 2010年度は配布番号 G69 から G72 の 4 回あり, 各 3 月 29 日, 6 月 7 日, 9 月 20 日, 2011 年 1 月 17 日 が HPA からの発送日である。発送日から 18 日~25 日の期間で検査を行うことが要求される。

3. 試料の受領

HPA からの試料は, 航空便で送付されてくるので, 必要な資料を通関業者に提出して試料を受領する。

4. 検査の実施

HPA から送付された試料には, 3 検体の未知サンプルが入っている。サンプルは LENTICULE disc といわれる, 小さな凸レンズ状のものであり, これを 1 L の Page' s saline に溶解して, 通常の浴槽水と同様の方法で検出試験を行う。

試料の梱包状態, LENTICULE disc の外観を写真 1. 2. 3. に示す。(写真は配布番号 G58 の時のものである)

5. 報告

検査の結果, レジオネラ属菌の有無, 菌種(血清群別), 菌数等を所定の書式に記入して, 検査実施後 3 週間以内に HPA にファクスで報告する。(注: 2012 年から HPA の WEB SITE 内にログインして書き込む方法である)

6. 検査結果レポート

各試料配布における検査結果報告の締切期限後, 約 1 ヶ月で結果報告書

(Summary of Results) が送付される。これは, 参加した検査機関約 200 件のデータを集計し当検査機関のデータの位置を示したものである。

G71 の配布では, 215 件の試料配布を行っている。G71C のサンプルでは, 有効な検査結果数は 192 件であり, 期待値は *Legionella pneumophila* の SG2-14, 菌数は $1.6 \times 10^3 \sim 4.9 \times 10^4$ CFU/L である。当検査機関の結果はいずれも期

待値内であり, その結果 SCORE は 12 点満点中 12 点と計算された。

検出菌数の期待値は, 各検査機関の集計による中央値に対して $\pm 0.75 \log_{10}$ で設定されている。

また, Z-スコアも記載されており参考にする。(±1.99 が望ましい) レジオネラ属菌検査における Z-スコアの算出に用いる $\sigma = 0.55$ である。

Summary of Results には, 過去 4 回の配布, 12 サンプルにおけるスコアの履歴が記されており, 合計満点 144 点に対して過去の成績合計点数で評価される。当検査機関の結果は 142 点/144 点 (98.6%) であった。

検査結果レポートは, 各配布ごとに作成され, 年間 4 回のレポート(一回あたり 8 ページ)が作成, 送付される。

D. 結論

1. イギリス HPA の FEPTU はレジオネラ属菌検査の外部精度管理を全世界に対して実施しており, 日本国内からも参加することが出来る。

2. 約 200 件の検査機関が参加しており, 20 年間にわたり継続的に運営されている。

3. 本外部精度管理は, レジオネラ属菌検査機関の検査精度向上への取り組みに有用なシステムと考えられる。

4. 関連ホームページは以下である。

<http://www.hpa.org.uk/eqa/legionella>

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし



写真 1 .
試料の梱包の状態

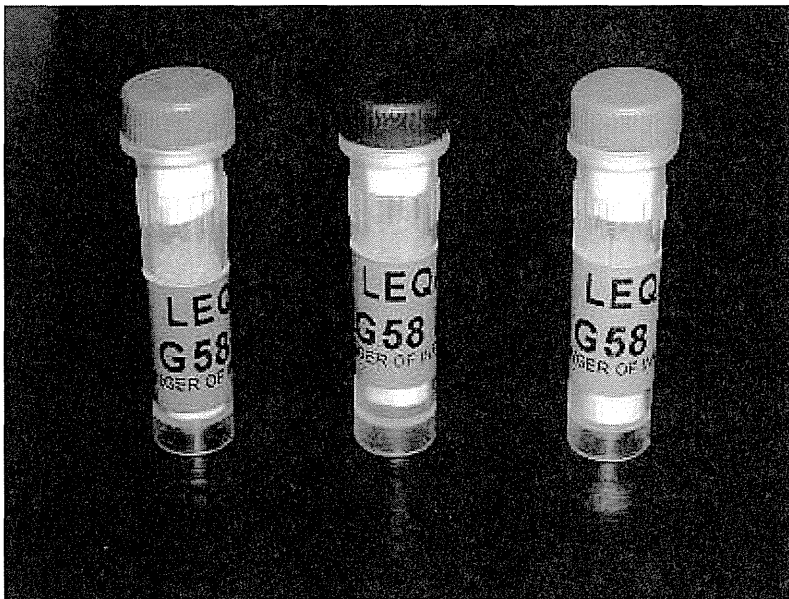


写真 2 .
サンプル容器の外観
(高さ約 4 c m)
G58 の A, B, C である

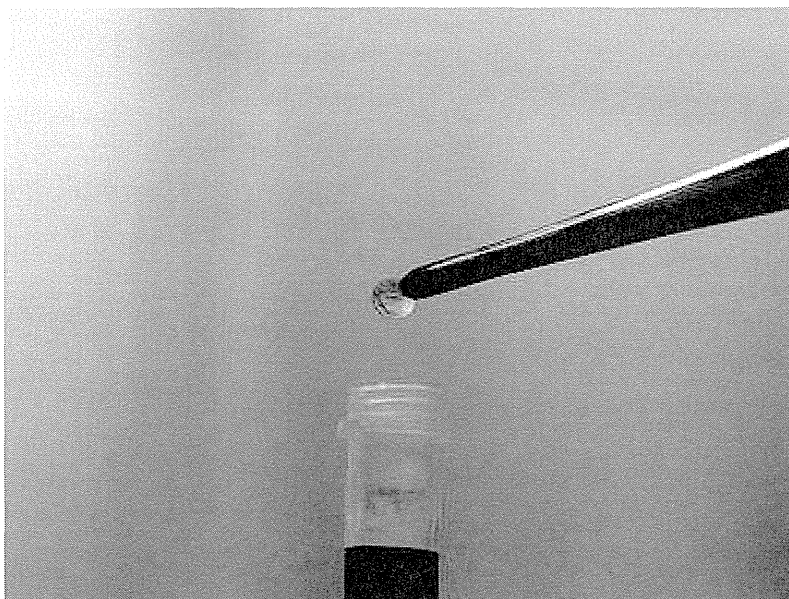


写真 3 .
LENTICULE disc
これにレジオネラ属菌
他の細菌類が含まれる

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： 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。

民間検査機関に対し、あらゆる機会を捉え、採水から搬入、分離培養、遺伝子検査法の留意点などに関する研修を行った。

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。(鳥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、民間検査機関へ斜光法の普及を図るため、あらゆる研修・会議の場を利用し、斜光法の実践研修会を開催

した。

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。(鳥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 22 年 5 月から 24 年 11 月の間、県保健所環境監視員が採水し、搬入した浴槽水および湯口水 178 検体を調査対象とした。内訳は、平成 22 年度が 67 検体、平成 23 年度が 56 検体、平成 24 年度が 55 検体であった。

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 0.2 μ m、

ADVANTEC 社 POLYCARBONATE)で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 12ml 入りの滅菌コニカルビーカー(100ml 容量)に移し、ボルテックスミキサーにて 5 分間攪拌してフィルター捕捉物を再懸濁させた。ろ過濃縮後、濃縮検体(未加熱と表記)と 50°C 20 分加熱後、急冷した濃縮検体(加熱処理と表記)をそれぞれ濃縮試料(100 倍濃縮)とした(Fig 1)。

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°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°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°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. 斜光法の普及啓発のための研修会及びアンケート調査

平成 22 年度は、資料を用いた座学とモデル的に作成したサンプル平板を実体顕微鏡下で観察した。

平成 23 年度は、同研究班の分担研究者(T 県)の協力を得て、T 県内の水質検査機関 12 施設にアンケート調査を実施した。また、県保健所の協力のもと、大分県内の民間検査機関の実態調査を行った。

6. 精度管理に関する検討

森本研究分担者の報告参照。

7. 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。178 検体中 99 検体(55.6%)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 71 検体中 47 検体(66.2%)、湯口水 56 検体中 24 検体(42.9%)で、「循環式施設」では浴槽水 26 検体中 16 検体(61.5%)、湯口水 25 検体中 12 検体(48%)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 23 施設であった。浴槽水(+)湯口水(-)となった施設は 25 施設、浴槽水(-)湯口水(+)となった施設は 8 施設であった(Table 2)。

レジオネラ属菌が検出された 99 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 50 検体、WYO α +GVPC からの分離が 3 検体、WYO α +MWY からの分離が 5

検体、GVPC+MWY からの分離が 4 検体、WYO α のみからの分離が 9 検体、GVPC のみからの分離が 5 検体、MWY のみから分離が 3 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 56 検体、WYO α +GVPC からの分離が 5 検体、WYO α +MWY からの分離が 4 検体、GVPC+MWY からの分離が 2 検体、WYO α のみからの分離が 7 検体、GVPC のみからの分離が 6 検体、MWY のみから分離が 9 検体であった。

斜光法は培養 3 日目を判定日とし、特徴あるモザイク状のコロニーについて確認検査を行った。その結果、レジオネラ属菌が検出された 99 検体のうち 95 検体は斜光法で確認することができたが、4 検体は継続培養後にレジオネラ属菌が確認された。継続培養で陽性となった 4 検体から分離されたレジオネラ属菌は、3 検体は *L. pneumophila*、1 検体は *L. anisa* であった。

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.2)。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.3)。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 (-) 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。

4. 斜光法の普及啓発のための研修会及びアンケート調査

調査対象の 12 検査施設のすべてから回答が得られた。12 検査施設のうち、実際に検査を実施している機関は 9 施設であった。研修については、12 検査施設中 10 施設が、精度管理については、7 施設が積極的に希望する結果となった (Fig.4)。

一方、保健所の協力を得て実施した平成

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

D. 考察

レジオネラ属菌が検出された 99 検体について、使用した分離培地の WYO α 、GVPC、MWY 各培地別に分離状況を見ると、各分離培地でのレジオネラ属菌の分離は 62 検体から 72 検体となり、いずれの分離培地においても、単独使用では 99 検体陽性という結果は得られない。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 79 検体から、加熱処理では 89 検体からレジオネラ属菌が分離されたが、この場合においても、99 検体陽性という結果は得られないことから、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はできないものの、斜光法は、高価かつ特殊な機器を必要とせず、簡便で迅速な結果が得られる培養法として、非常に有用な方法である。今後は、LAMP 法で得られた結果と斜光法の培養結果を合わせて迅速な行政対応を行い、10 日間引き続き培養を継続し、最終結果として判断することが可能と考える。3 日目観察・同定後、最終判定日の 10 日目まで作業を中断することができることから、負担軽減にも功を奏し、また、検査を集中することにより検出確率が上昇する利点も考えられた。

浴槽水 (+) 湯口水 (-) となった施設は、

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

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(-)の不一致の一因として考えられた。さらに、温泉検体では、「菌数」だけではなく、検出される「菌種」や泉質などの様々な要因により、LAMP法で安定した結果が得られない場合が考えられ、測定時には注意を要する。

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

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

重要な課題である。その実現のため、①モニタリングに最適な検査法(採水時から検査結果まで)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22年度環境監視員担当者会議にて研修会を開催
2. 水分野連絡協議会にて研修会を開催
3. 大分県感染症研究会にて発表
4. 平成23年度生活衛生関係技術担当者研修会にて発表
5. 平成24年度環境監視員担当者会議にて研修会を開催

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」

G. 知的財産権の出願・登録状況

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」

なし

- 採水 2000ml(採水時 手洗剤添加) * 菌数測定
- 検水 1200ml φ0.1μm ADVANTEC社POLYCARBONATEを用い、ろ過濃縮
- 濃縮フィルターを滅菌蒸留水12mlに洗い出す(5分間) (濃縮試料)
- 濃縮試料

未加熱 * 菌数測定
加熱(50°C 20分) * 菌数測定
LAMP法



菌数測定に用いた平板

: WYOα(榮研化学)、GVPC(日研生物)、MWY(自家製)

* 本表での検出限界値は5cfu/100ml

Fig.1 検査法プロトコール

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	71	47 ^b	66.2%
	湯口水	56	24	42.9%
循環式	浴槽水	26	16 ^c	61.5%
	湯口水	25	12	48%
計		178	99	55.6%

a 10cfu/100ml によらない(定性)

b 酸処理検体からのみ検出

c 非濃縮検体のみから10cfu/100ml 以上検出

Table2 浴槽水と湯口水の検出状況(n=77)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	23	8	31
	-	25	21	46
計		48	29	77

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=178)

			未加熱	加熱
WYO	GVPC	MWY	50	56
WYO	GVPC		3	5
WYO		MWY	5	4
	GVPC	MWY	4	2
WYO			9	7
	GVPC		5	6
		MWY	3	9
計			79	89

	未加熱	加熱
WYOα(市販品)	67	72
GVPC(市販品)	62	69
MWY(自家製)	62	71

10cfu/100m によらない(定性)

Table 4 LAMP 法と培養法の比較(n=178)

	LAMP		計	
	+	-		
培養法	+	75	24	99
	-	26	53	79
計		101	77	178

10cfu/100m によらない(定性)

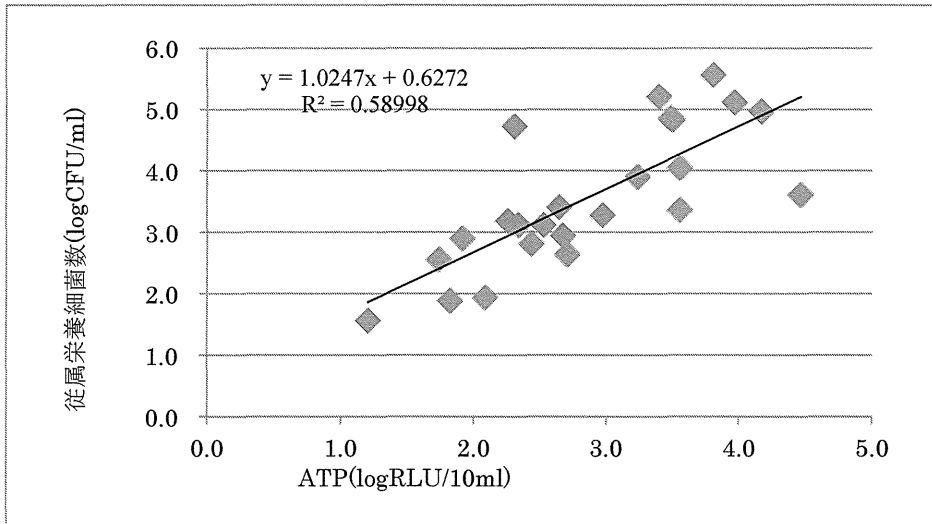


Fig.2 従属栄養細菌数と ATP 値

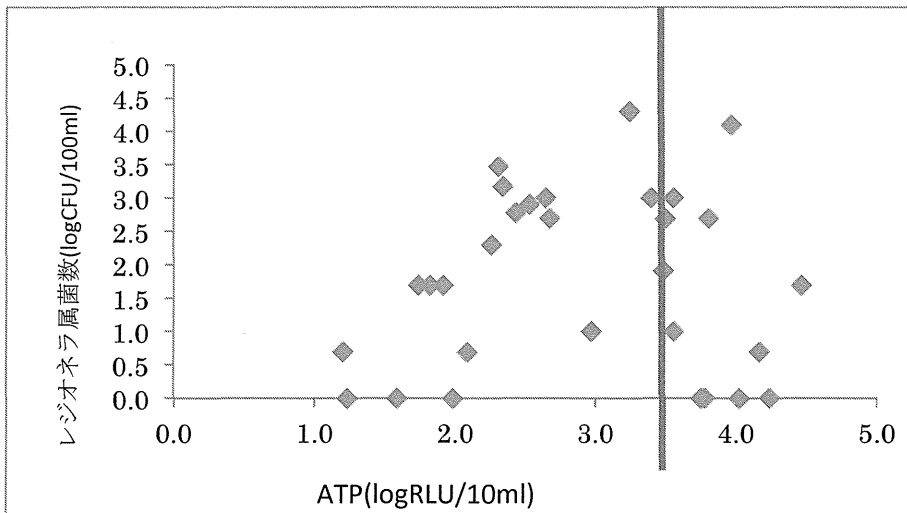


Fig.3 レジオネラ属菌数と ATP 値
(ATP 値 log RLU/10ml の数値 3.4(縦線)が 25RLU に換算される)

3 レジオネラ属菌の検査法についてお尋ねします。(9)					
1) 検体はどのように濃縮しますか。	ろ過法 3	冷却遠心 6			
2) 雑菌を抑制するための処理を行いますか。	加熱 1	酸 7	未 1		
3) 培養法についてお尋ねします。					
ウ) 斜光法(実体顕微鏡を用いた観察法)を実施していますか。	知っている 4	聞いたことがある 1	知らない 3		
エ) レジオネラ属菌の同定はどの方法ですか(複数選択可能)。	G 染色 2	システイン要求性 7	馬尿酸 1	抗血清 1	
5 レジオネラの検査法に関する研修会等についてお尋ねします。(12)					
1) 研修会が開催される場合受講をしますか。	受講 2	県内 5	北陸 3	しない 1	不必要 1
2) レジオネラ属菌についての精度管理を希望しますか。	希望 7	希望しない 1	わからない 4		

Fig.4 アンケート結果(抜粋)

平成22-24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. 生菌数の測定方法

供試菌株は、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)、GVPC α 培地(日研生物医学研究所)を用いた。培養条件は 37°C1 日間、37°C4 日間および 30°C4 日間として平板培地に培養後、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が 30~300 カウント可能になるように 2 希釈に培地各 3 枚用いてコロニーカウントを行った。

2. 平板培養菌を用いたハイドロキシアパタイト (AP12C) 添加効果の検討

孔径が大きい MF にハイドロキシアパタイト : AP12C (積水化成工業 (株)) および珪藻土をろ材として添加し、濃縮時間を短縮することを試みた。フィルターは、ポリカーボネートメンブランフィルター (MF) 孔径 0.2 μ m、セルロースアセテート MF 孔径 0.2 μ m、セルロースアセテート MF 孔径 0.45 μ m (ADVANTEC) を用いた。セルロースアセテート孔径 0.45 μ m にハイドロキシアパタイトを 0、0.2、0.4、0.8、1.6 g 添加し、ろ過濃縮を行った。

実験では、Phosphate Buffer Powder リン酸緩衝剤(組成: Na_2HPO_4 5.7g, KH_2PO_4 3.6g、和光純薬工業株式会社)1/15mol/l、pH7.0を用い、1/15mol/l PBS を作製後、滅菌蒸留水で50倍に希釈したもの(以下×50PBS)を試料作製に用いた。

溶液 1000ml には、30℃、4日間平板培養した Lp58-3 を 550nm で OD 値 0.35 になるように調整した。これを 500ml×2本にして、ろ過を行い、50ml 遠沈管に×50PBS 5ml とろ過を行った MF 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 μ l、各々3枚の GVPC α 培地に接種した。

3. 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再度ろ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℃4日間 PYGC 液体培地で培養した。この培養液を PBS に置き換え、ろ過濃縮実験に用いるレジオネラを 10³CFU/mol となるよう添加した。この培養液中のレジオネラの菌数を培養0日、3日、4日、5日、7日後にアメーバを 5 μ m フィルターで除去したものと除去しないものについて各 100 μ l ずつ、3濃度3枚の GVPC-培地を用いてカウントし、アメーバにおけるレジオネラ増菌状況を調べた。

4. ろ過フィルターの種類と孔径

ろ過濃縮法において、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。平板培養レジオネラを用い径 47mm、3種類の MF (0.2 μ m ポリカーボネート MF、0.2 μ m および 0.45 μ m セルロースアセテート MF、ADVANTEC)、アメーバ増

菌レジオネラは、1回目5種類(0.2 μ m および 0.4 μ m ポリカーボネート MF、0.2 μ m セルロース混合エステル MF、0.2 μ m および 0.45 μ m セルロースアセテート MF)、2回目6種類(上記フィルターおよび 0.45 μ m セルロース混合エステル MF、MILIPORE) を用い上記2と同様にろ過濃縮実験を実施した。

アメーバ増菌レジオネラを用いる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、6種類(0.2 μ m および 0.4 μ m ポリカーボネート MF、0.2 μ m および 0.45 μ m セルロースアセテート MF、0.2 μ m および 0.45 μ m セルロース混合エステル MF、ADVANTEC) を用い、ろ過濃縮実験を行った。

溶液(×50PBS) 1000ml に、上記2.でアメーバ増菌したレジオネラを 10³CFU/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×50PBS 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 μ l、各々3枚の GVPC α 培地に接種した。

5. 0.4 μ m あるいは 0.45 μ 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、孔径 0.4 μ m あるいは 0.45 μ 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 μ m ポリカーボネート MF を用いるろ過した。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 μ m あるいは 0.45 μ m MF を通過するかど

うか確認した。試料(菌数 340~590 CFU/100ml)は、上記 4. と同様に調整した。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 (10 ml) 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。

6. アメーバ培養菌を用いたろ材の添加効果の検討

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、珪藻土、捕捉ビーズ(オンサイトレジオネラキット、ジェネティン(株))およびハイドロキシアパタイト: AP20C(積水化成成品工業(株))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。

捕捉ビーズについては、0.2、0.4、0.8 g を添加した。なお、捕捉ビーズについては $0.45 \mu\text{m}$ セルロースアセテート MF を用いて径 25mm および 47mm で比較した。

珪藻土については、 $0.45 \mu\text{m}$ セルロースアセテート MF を用い 0.4g を添加し、レジオネラ添加試料(500ml、2本)をろ過濃縮した。

ハイドロキシアパタイト (AP20C) については、ポリカーボネート MF 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 MF 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 MF 孔径 $0.2 \mu\text{m}$

(ADVANTEC) および $0.45 \mu\text{m}$ (MILIPORE または ADVANTEC) を用い、各 MF に 0.4 g、0.8 g および 1.6 g を添加した。

C. 結果と考察

1. 生菌数の測定方法

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。

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、菌株間(レジオネラ・ニューモフィラ)であるいは菌種間で菌数に 10^8 CFU/ml から 10^7 CFU/ml と相違が生じた。また、同一菌株(レジオネラ・ニューモフィラ 58-3)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. ハイドロキシアパタイトを用いた検討

孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のろ過フィルターにろ材としてハイドロキシアパタイトを添加することにより、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のろ過フィルターに比べろ過速度を上げつつ、回収率を上げることが期待されたが、平板菌を用いた回収実験では、ろ材添加によって回収率が下がることが示された(表 2)。

珪藻土をハイドロキシアパタイトの代わりに添加したところ、ハイドロキシアパタイトより回収率が高くなったが、ろ材を添加しない場合よりも回収率が低下した(表 3)。

そこで浴槽水試料中のレジオネラに近い状態のレジオネラ（アメーバ増菌培養菌）を用いることによって回収率の低下の要因を確認することにした。

3. アメーバを用いたレジオネラ増菌

アメーバに対して 2.3×10^3 CFU/ml になるようにレジオネラを接種して増菌したところ 7.0×10^6 CFU/ml となり 1000 倍の増菌が可能であった。また、アメーバ増菌後 7 日でレジオネラの菌数が $6.1 \sim 7.0 \times 10^6$ CFU/ml になることが確認された（図 1）。

このことから、 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は、菌数を調整する際の OD 値は、 $0.0014 \sim 0.173$ と小さく、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 4）。

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、*Acanthamoeba* 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。

4. ろ過フィルターの種類と孔径

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ところ、平板培養菌もアメーバ増菌培養菌も $0.2 \mu\text{m}$ ポリカーボネート MF が最も回収率が高く、次いで $0.2 \mu\text{m}$ セルロースアセテート MF であった（表 5）。特に菌数カウントが安定していたアメーバ増菌培養菌について接種菌数が多いものと少ないもので比較してみても $0.2 \mu\text{m}$ ポリカーボネ

ート MF が最も回収率が高く、次いで $0.2 \mu\text{m}$ セルロースアセテート MF で、他に比べセルロース混合エステル MF の回収率は低かった（表 6）。

そこで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 7, 8）。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 $0.2 \mu\text{m}$ 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、 $0.2 \mu\text{m}$ ポリカーボネート MF を基準として、他の MF とを比較したが、 $0.4 \mu\text{m}$ ポリカーボネート MF、 $0.45 \mu\text{m}$ セルロースアセテート MF、 $0.22 \mu\text{m}$ セルロース混合エステル MF および $0.45 \mu\text{m}$ セルロース混合エステル MF においては有意差があり、 $0.2 \mu\text{m}$ のセルロースアセテート MF で有意差なしという結果になった。

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 MF の場合が最もよく孔径 $0.4 \mu\text{m}$ よりも $0.2 \mu\text{m}$ 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、 $0.2 \mu\text{m}$ 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、 $0.2 \mu\text{m}$ のポリカーボネート MF 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 $0.45 \mu\text{m}$ のセルロースアセテート MF、セルロース混合エステル MF で回収率について調べている。その結果、検出値は $0.2 \mu\text{m}$ セルロースアセテート MF > $0.45 \mu\text{m}$ セルロースアセテート MF > $0.2 \mu\text{m}$ セルロース混合エステル MF > $0.45 \mu\text{m}$ セルロース混合エステル MF 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。そこで、アメーバ増菌レジオネラが0.4 μm あるいは0.45 μm のMFを通過するかについて検討を行い、孔径によって回収率に差が生じた原因について確認することにした。

5. 0.4 μm あるいは 0.45 μm MF におけるアメーバ増菌レジオネラ通過実験

フォルダーの種類によって0.4 μm のポリカーボネートMFと0.45 μm セルロースアセテートMFでは、通過する場合があった(表9)。しかし、0.45 μm セルロース混合アセテートMFでは通過しなかった(表10)。さらにMFの装着による漏れかどうか確認するために、市販の滅菌ろ過用一体型のフィルターで濃厚菌液(10⁷CFU/ml)500 μl を用いてシリンジでろ過を行うとセルロースアセテート0.45 μm で通過するが、セルロース混合エステル0.45 μm では、通過しないことが確認された(表11,12)。レジオネラ症防止指針第3版にレジオネラ属菌の大きさは、幅0.3~0.9、長さ2~20 μm ⁷⁾と記載されており、0.4あるいは0.45 μm のMFの場合は、レジオネラ属菌が通過する可能性が示唆された。今回、MFとフォルダーとの関連性については、さらに検証が必要であると考える。

6. アメーバ培養菌を用いたろ材の添加効果の検討

濃縮時間が短時間でも回収率を上げ

ることを目的として、孔径0.4 μm ポリカーボネートMF、0.45 μm セルロースアセテートMFまたはセルロース混合エステルMFの回収率をろ材を用い0.2 μm ポリカーボネートMFの回収率と同程度に上げることが可能であるか否かを検討した。

孔径0.4 μm あるいは0.45 μm のろ過フィルターにろ材としてハイドロキシアパタイトを添加することにより、孔径0.2 μm のMFに比べろ過速度を上げつつ、回収率を上げることが期待されたが、これまでの検討ではろ材添加によって回収率の改善はみられなかった。

そこで、珪藻土と捕捉ビーズをハイドロキシアパタイトの代わりに添加したところ、ハイドロキシアパタイト

(AP12C)より回収率が高くなったが、ろ材を添加しない場合よりも回収率が低下した(表13)。また、MFの径を小さくすることにより、回収率の改善を試みた。径が47mmより25mmのメンブランフィルターでやや回収率が改善されたが、捕捉ビーズを添加することによる効果は得られなかった(表14)。

ハイドロキシアパタイトAP12Cに替えてさらに粒子の小さいハイドロキシアパタイトAP20Cと孔径0.4 μm ポリカーボネートMF、孔径0.45 μm セルロースアセテートMFおよびセルロース混合エステルMFと同様に検討した(表15-1,2,3)。

その結果、ポリカーボネートMFにAP20Cを0.8g添加した時に、孔径0.4 μm のMFフィルターで孔径0.2 μm ポリカーボネートMFよりも高い回収率となった。また、セルロースアセテートMFにハイドロキシアパタイトAP20Cを0.4g添加した時にも同様の効果が得られた。効果が得られた際のろ過時間は、いずれも0.2 μm ポリカーボネートMFより

も早く効率がよいことが確認された。セルロース混合エステルについては、今回の条件では効果が得られなかった。ここで、複数回実施した検討では回収率にバラツキがみられ、再現性が課題であった。

ハイドロキシアパタイトの効果について、泉山ら⁸⁾がクリプトスポリジウムの捕捉において、15%の粒子を用いることによって9割あるいはそれ以上の捕捉率を得ている。この結果を参考にして適したハイドロキシアパタイトの粒径を考えると、レジオネラ属菌の大きさは、幅0.3~0.9、長さ2~20 μm とされ⁷⁾、これを捕捉するには2.0~6.0 \times 13.3~133.3 μm のハイドロキシアパタイトが適する可能性がある。今回使用したAP20Cの粒径は、2.00~64.0 μm (平均19.26 μm)であり、その有用性についてはさらに検討する必要がある。

D. 結論

1. MFを用いたろ過濃縮法においては、回収率のバラツキの要因のひとつとしてMFの材質・孔径が関与していることが示された。
2. 今回、アメーバ増菌レジオネラを用いたろ過濃縮法による回収率は、0.2 μm ポリカーボネートMFが最もよいことが示された。
3. ポリカーボネート0.4 μm 、セルロースアセテート0.45 μm のMFでは少量のレジオネラが通過するが、混合エステル0.45 μm では通過しないことが示された。
4. ろ材(ハイドロキシアパタイト)の効果は、粒子を小さくすることにより効果が得られることがあるが、再現性についてさらに検討が必要である。

E. 参考文献

- 1) Fields BS, Shotts EB Jr, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT., Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Appl Environ Microbiol. 1984;47(3):467-71.
- 2) Holden EP, Winkler HH, Wood DO, Leinbach ED. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. Infect Immun. 1984;45(1):18-24.
- 3) Smith L, Carroll K, Mottice S. Comparison of membrane filters for recovery of Legionellae from water samples. Appl Environ Microbiol. 1993;59(1):344-6.
- 4) 枝川亜希子、木村明生、三輪由佳、田中榮次、足立伸一、宮本比呂志、レジオネラ検査ろ過濃縮法におけるメンブランフィルター材質の回収率比較、日本防菌防黴学雑誌、Vol.41.No.2. 63-66 (2013)
- 5) 小澤克行、岩瀬尚子、日野隆信、山崎雅之、濱田孝敏、今関久和、レジオネラ属菌の試験結果に及ぼすろ過濃縮法のメンブランフィルターの影響について、日本防菌防黴学会抄録、43、東京(2010)
- 6) Orrison LH, Cherry WB, Milan D. Isolation of *Legionella pneumophila* from cooling tower water by filtration. Appl Environ Microbiol. 1981;41(5):1202-5.
- 7) レジオネラ症防止指針第3版、財団法人ビル管理教育センター、pp47(2009)
- 8) 泉山信司、遠藤卓郎、粉体ろ過によるクリプトスポリジウム濃縮保存法の開発、水道協会雑誌、第81巻、第9号(第939号)、14-22(2012)

F. 研究発表

なし