

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)
レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究

平成 25 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
	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
	金谷 潤一	富山県衛生研究所
	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
	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
	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
	渡辺 祐子	神奈川県衛生研究所
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
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所

研究要旨

レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループでは、これまでの厚労科研研究事業において、レジオネラ属菌検査に係る外部精度管理について検討してきたところであるが¹⁻³⁾、レジオネラ属菌の特異的な性質から、配付試料の作製について、その安定性と再現性及びそれらの妥当性評価において試行錯誤を繰り返してきた。精度管理を継続的に実施するためには、目的に合った配付試料を適切に作製する必要性が不可欠であることから、昨年度の「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報告書」内では、『配付試料について、民間企業との協力も視野に入れ検討する必要がある』と報告していた³⁾。また、病原体の輸送においても日本国内での対応が平成 24 年 6 月以降厳しくなり⁴⁾、苦慮していたところである。

そこで本年度は、微生物定量試験用標準菌株の販売を行っているシスメックス・ピオメリー社の BioBall を利用し、全国 39 の地方衛生研究所を対象に外部精度管理を試みた。その結果、配付試料の信頼性においてメーカー保証が得られ、また、メーカーによる商品発送対応であることから、多施設へ安定した輸送が可能となった。一方、外部精度管理報告結果では、検

査機関ごとで大きなバラツキが認められた。しかしながら、ワーキンググループが推奨する標準的な検査法³⁾で対応した場合には、適切な結果が得られた。このことから、各検査機関での検査方法の違いが結果に大きく影響していることが示唆され、普段の検査結果においても同様に影響していることが懸念された。今後は、公衆浴場の衛生管理要領で標準的な検査方法を提示し、全国共通の検査工程による体制作りが必要と考えられた。

A. 研究目的

レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組みとして、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの3点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下WG)内で検討を行った。特に本年度は、外部精度管理について新たな試みを実施し、その中でWGが推奨する標準的な検査方法(以下WG推奨法)についての精度確認も行ったので報告する。

B. 研究方法

1)精度管理

外部精度管理の試行

<配付試料の作製と輸送について>

昨年度の「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報告書」³⁾において、外部精度管理配付試料について次の提案を行っていた。『配付試料は、安定性、再現性、妥当性等のバリデーションを確保し、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から、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BioBall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。』この報告後、微生物定量試験用標準菌株として過去レジオネラ属菌の販売実績があるシスメックス・バイオメリュー社とBioBall作製に係る協議を行った。その結果、別添1の流れに従い作製可能との連絡を受けた。WG内での協議の結果、本年度はBioBallを利用した外部精度管理を試行することとなった。供試菌株は、過去の販売実績において安定性が確認されている *Legionella pneumophila* ACM5197 を使用した。菌数は、15000cfu/Ball(水500mlに溶かした場合、3000cfu/100ml)で発注した。この菌数は、一般的な検査手技において、分離平板上のコロニー数が、理論上、非濃縮検体で3コロニー、100倍濃縮検体で300コロニー発育することを意味している。発注の結果、製品保証(別添2)として、平均値16916.0cfu/Ball、95%信頼区間：下限値9875.3cfu/Ball、上限値23956.7cfu/Ballの製品(保証期間:2013年9月18日~2014年9月18日)が納品(図1)された。なお納品は、メーカーから外部精度管理参加機関に直接輸送された。

<参加要件>

シスメックス・バイオメリュー社が求めるBioBall使用要件(国立感染症研究所の「病原体等安全管理規定」を参考としている)1.病原体のバイオセーフティレベル(以下BSL)規定について、2.施設要件、4.作業従事者要件を満たし、BioBall使用承諾書に署名できる機関であることとした。

<参加機関>

WG 構成機関である 10 カ所の地方衛生研究所及び全国地方衛生研究所の 6 ブロックから参加機関を募り計 39 カ所で外部精度管理を行った。これらの参加機関に 1～39 までの数字をランダムに振り分け結果集計を行った。WG のみで行った結果集計においては、A～J までのアルファベットをランダムに振り分けた。

<実施概要>

平成 25 年 6 月：製品の発注、 7 月：全国地方衛生研究所衛生微生物技術協議会レファレンス会議で実施のお知らせ、レジオネラレファレンスセンター担当者を通じ参加依頼文の送付(別添 3)、 8 月：参加希望機関から BioBall 使用承諾書の提出を求める、 10 月：レジオネラレファレンスセンター担当者を通じ実施要領(別添 4)及び結果記入ファイル(別添 5)の送付、製品の発送、 11 月：結果締め切り。

<実施日時>

試料発送：平成 25 年 10 月 21 日(月曜日)
メーカーから直送

試料到着：平成 25 年 10 月 22 日(火曜日)
又は 23 日(水曜日)

締め切り：平成 25 年 11 月 25 日(月曜日)

*当初は 9 月 30 日発送、10 月 30 日締め切りとしていたが(別添 3)、BioBall 作製上の都合により、上記の実施となった。

<検査方法>

各参加機関の検査作業書に従って実施依頼した。また、WG メンバーを中心に 11 機関に対し WG 推奨法での検査実施も依頼した。

<外部精度管理結果良好範囲目標値>

メーカー保証による 95%信頼区間(下限値 9875.3 cfu/Ball, 上限値 23956.7 cfu/Ball)については、前述したところであるが、この値をレジオネラ属菌検査で使用される、検体 100ml

中の cfu(colony forming unit)に換算すると、下限値 1975.06、中央値 3383.2、上限値 4791.34cfu/100ml となる。例えば、非濃縮検体においては、分離平板上の 1 集落を 1000cfu/100ml と換算することから、結果は 1000cfu の整数倍となる。このことを勘案し、前述の 100ml 中の cfu を補正すると、1000～5000cfu/100ml となる。さらにこの範囲に対し、国内における食品衛生外部精度管理で実績・評価の高い、一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所が統計処理で行っている「Xbar 管理図における管理線を理化学調査では添加量の 70%および 120%、微生物学調査では全体の平均値の 30%および 300%」という考え方を参考に、本外部精度管理では、「メーカー保証されている菌数をベースに補正した範囲に対し、その下限値の 30%および上限値の 300%」という考え方を導入することとした。その結果、本外部精度管理においては、良好範囲目標値を 300～15000cfu/100ml として設定することとした。

2) 標準的検査法

昨年度の「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報告書」内で WG 推奨法を報告した。今年度は、1)外部精度管理において、WG メンバーが自施設の標準作業書及び WG 推奨法で検査を行い、それらを比較することで WG 推奨法の精度確認を行った。

3) 研修システム

本研究班研究分担者で WG メンバーである、大分県衛生環境研究センター 緒方喜久代氏、富山県衛生研究所 磯部順子氏が中心となり、それぞれが特色ある研修会を開催し、今後必

要となる知見の集積を行った。詳細については、本報告書内で各研究分担者により報告されている。

C. 研究結果及び考察

1) 精度管理

全39機関のべ42試料に対する各参加機関の検査作業書による判定結果を表1-1、1-2に示した。表中では、各参加機関が採用した濃縮処理、前処理、使用培地に 印を付け、最終判定結果に採用した条件を 印で示した。本集計では、平均値約 533cfu/100ml、最大値 5000cfu/100ml、最小値 10cfu/100ml、中央値 115cfu/100ml となった。今回の外部精度管理での配付試料は、メーカー保証による95%信頼区間では、下限値 1975.06、中央値 3383.2、上限値 4791.34cfu/100ml であり、外部精度管理としての良好範囲目標値を 300 ~ 15000cfu/100ml と設定している。平均値だけを見ると目標範囲内のため、一見良好な結果に見えるが、機関数別で見ると目標範囲内に入ったのは、39 機関中 14 機関(約 36%)しかなかった(表2)。また、39 機関中 19 機関(約 49%)とほぼ半数が 100cfu/100ml 未満と報告していた。一方、各参加機関が採用した濃縮処理、前処理、使用培地において、自機関の検査作業書以外の条件で結果を記載している場合が 29 機関であった。それらの条件における結果の最大値を見ると、29 機関すべてで通常の検査作業書より多い菌数結果を報告していた。29 機関中 16 機関は、もともと目標範囲外の結果を報告していたが、別条件による検査の結果、16 機関中 11 機関で目標範囲内となる結果を示していた。これら 11 機関の共通条件は、非濃縮検体の検査を実施したことであった。現在発出されている「公衆浴場にお

る水質基準等に関する指針」では、その検査法において『冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること。』と濃縮検体での検査を指定しているが、「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」には、「1.3 接種」の項目で、『菌数を予測できないので、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査する』と記載されている。今回非濃縮検体検査により結果が好転した 11 機関中7機関は、もともと 100cfu/100ml 未満と報告していたことから、非濃縮検体の検査実施の重要性が示唆された。この結果、各機関の報告数の最大値で集計すると、39 機関中 25 機関(約 64%)が目標範囲内となった。

前述の結果を含め、どのような検査条件下でバラツキが発生しやすくなるのかを具体的に検証すること、またWG推奨法の精度の検証を確認するために、WG 推奨法での検査対応をした 11 機関の結果を表3~表9に示した。WG 推奨法の特徴は、大きく次の5点である。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。採取された検体に対し、どの前処理が最も有効か分からないので、未処理、酸処理、熱処理を並行して検査する。濃縮はろ過濃縮(孔径 0.2 または 0.22 μm 、ポリカーボネート製のメンブランフィルター使用)を推奨する。培地への塗布は、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。発育コロニーは斜光法⁵⁾により確認する。表3に、各検査機関の全検査条件中報告された最大値となる結果を示した。本集計では、平均値 3395cfu/100ml、最大値 10000cfu/100ml、最小値 210cfu/100ml、中央値 2500cfu/100ml となった。機関別で見ると全 11 機関(100%)が目標範囲内の報告を行い、また試料別に見て

も19試料中18試料(約95%)が目標範囲となった。さらに、平均値がメーカー保証の中央値とほぼ同数であったことから、非常に良い結果が得られたと判断でき、加えてメーカー保証を裏付ける結果にもなった。また、この条件下で目標範囲内の報告をした結果(18試料)は、すべて非濃縮検体検査結果であり、うち17試料(約94%)は未処理検体であった。非選択分離培地であるBCYE培地を使用した場合(15試料)では、13試料(87%)で最大値を示す結果となり、他の選択分離培地より発育が良かったことを示している。

さて、これまでも検査条件を絞り込むことで、検査結果に影響が出ることは報告してきたところである¹⁻³⁾が、表3の検査条件から少しずつ条件を絞り込んだ場合の結果を以下に示していく。一般的な公衆浴場等の自主検査においては、非選択分離培地であるBCYE培地を使用することがほぼ無いことから、表4に、選択分離培地のみを使用した場合の最大値となる結果を示した。本集計では、平均値1664cfu/100ml、最大値4000cfu/100ml、最小値210cfu/100ml、中央値1500cfu/100mlとなった。機関別で見ると全11機関(100%)が目標範囲内の報告を行い、また試料別に見ても19試料中17試料(約89%)が目標範囲となり引き続き良好な結果が得られた。しかしながら、平均値が非選択分離培地使用時のほぼ半分となり、中央値も1000cfu/100ml下がっていた。これは培地の選択成分により、レジオネラ属菌の発育が抑制されたためと思われる。この条件下で目標範囲内の報告をした結果(17試料)は、表3の結果と同じくすべて非濃縮検体検査結果であり、うち16試料(約94%)は未処理検体であった。培地別では、全19試料でGVPC培地が使用されており、うち18試料(約95%)

で最大値を示す結果となった。また、MWY培地では7試料中5試料(約71%)で、WYO培地では10試料中3試料(30%)で最大値が報告されていた。

次に、現在発出されている「公衆浴場における水質基準等に関する指針」では、その検査法において『冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること。』と指定しているため、非濃縮検体検査を実施していない検査機関が多いことから、表5に、ろ過濃縮及び選択分離培地使用条件により最大値となった結果を示した。本集計では、平均値447cfu/100ml、最大値920cfu/100ml、最小値150cfu/100ml、中央値300cfu/100mlとなった。機関別で見ると目標範囲内の結果を報告したのは全11機関中9機関(約82%)となった。この9機関のうち3機関は複数試料について検査を実施していたが、うち2機関では目標範囲外となる結果も報告していた。これらの結果、試料別では、目標範囲内の報告となったのは19試料中11試料(約58%)にとどまった。このことは平均値にも大きく影響し、目標範囲内ではあったが、表3の条件時に比べ約8分の1まで減少し、非濃縮検体の検査を行わなかった場合、40%以上の試料で目標範囲を下回り、一気に平均値が下がる結果となった。ここで改めて非濃縮検体検査の重要性が示唆された。培地別では、全19試料でGVPC培地が使用されており、うち15試料(約79%)で最大値を示す結果となった。また、MWY培地では7試料中4試料(約57%)で、WYO培地では10試料中1試料(10%)で最大値が報告されていた。

次に、検体の前処理について検討する。一般的な公衆浴場の自主検査では、検体の前処理を行わない、いわゆる未処理についてほぼ実施していないと思われる。そこで表6に、

ろ過濃縮後、酸処理、熱処理をそれぞれ行い、選択分離培地使用を条件とし、最大値となった結果を示した。本集計では、平均値 231cfu/100ml、最大値 595cfu/100ml、最小値 30cfu/100ml、中央値 170cfu/100ml となった。機関別で見ると目標範囲内の結果を報告したのは全 11 機関中 5 機関(約 45%)となり、初めて半数以下となった。この 5 機関のうち 2 機関は複数試料について検査を実施していたが、うち 1 機関では目標範囲外となる結果も報告していた。これらの結果、試料別では、目標範囲内の報告となったのは 19 試料中 6 試料(約 32%)となり 70%近くが目標範囲を下回った。また、平均値も初めて目標範囲を下回り、表 3 の条件時に比べ約 15 分の 1 まで大きく減少した。先の全 39 機関の結果報告において、非濃縮検体の重要性を説明するに当たり、「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: 1.3 接種」の項目に触れたが、ここには未処理についての接種が酸処理、熱処理の接種と並列で記載されている。WG においても適切な検査結果を得るために、同じ前処理工程を推奨しているが、本結果からも未処理の重要性が示唆された。培地別では、全 19 試料で GVPC 培地が使用されており、うち 10 試料(約 53%)で最大値を示す結果となった。また、MWY 培地では 7 試料中 5 試料(約 71%)で、WYO 培地では 10 試料中 4 試料(40%)で最大値が報告されていた。

次に、表 6 の条件に対し、前処理を酸処理のみした場合の最大値となった結果を表 7 に示した。本集計では、平均値 219cfu/100ml、最大値 595cfu/100ml、最小値 30cfu/100ml、中央値 160cfu/100ml となった。機関別、試料別では、目標範囲内の結果を報告したのは表

6 の条件時と同じであった。平均値は表 6 の条件時に比べわずかに減少し、表 3 の条件時に比べ約 16 分の 1 となった。培地別では、全 19 試料で GVPC 培地が使用されており、うち 12 試料(約 63%)で最大値を示す結果となった。また、MWY 培地では 7 試料中 4 試料(約 57%)で、WYO 培地では 10 試料中 3 試料(30%)で最大値が報告されていた。

次に、表 6 の条件に対し、前処理を熱処理のみした場合の最大値となった結果を表 8 に示した。本集計では、平均値 139cfu/100ml、最大値 440cfu/100ml、最小値 <10cfu/100ml、中央値 90cfu/100ml となり、初めて検出限界未満(<10cfu/100ml)の報告があった。また中央値も初めて 100cfu/100ml 未満となった。機関別で見ると目標範囲内の結果を報告したのは全 11 機関中 2 機関(約 18%)となり、80%以上の機関で目標範囲を下回る結果となった。試料別では、目標範囲内の報告となったのは 19 試料中 2 試料(約 11%)となりほぼ 90%が目標範囲を下回った。この結果、平均値もこれまでの検査条件下で最も低い数値となり、表 3 の条件時に比べ約 24 分の 1 まで大きく減少した。培地別では、全 19 試料で GVPC 培地が使用されており、うち 10 試料(約 53%)で最大値を示す結果となった。また、MWY 培地では 7 試料中 4 試料(約 57%)で、WYO 培地では 10 試料中 2 試料(20%)で最大値が報告されていた。

ここまで各検査機関の作業書に基づいた集計結果、WG 推奨法に基づいた集計結果、WG 推奨法から検査条件を絞り込んでいった集計結果を示してきた。各検査機関の作業書に基づいた集計結果では、最大値 5000cfu/100ml、最小値では現行検出限界である 10cfu/100ml との報告となり、非常に大き

なバラツキとなって現れた。なぜ、一定菌数範囲の試料配付にもかかわらず、このような結果となったのか。一つ目の理由として非選択分離培地の BCYE 培地を分離培養に使用するかどうかが挙げられる。表4で示したが、今回の結果では、選択分離培地のみで検査を行うことで検出菌数が平均値で50%低くなったことになる。二つ目の理由として非濃縮検体検査を実施しているかどうかである。本検査の重要性は先にも示した通りである。今回シスメックス・バイオメリュー社に発注し配付した試料の菌数は、一般的な検査手技において分離平板上のコロニー数が、理論上、非濃縮検体で3コロニー、100倍濃縮検体で300コロニー発育することを意味している。それでは、このような菌濃度の検体に対し、非濃縮検体の検査を実施せず、適切な定量結果を得ることができるか。これは、非常に難しいと思われる。なぜなら検体濃縮時には、ろ過、遠心を問わず、一連の工程が菌体の回収に影響を与えているからである。このことは、これまでも課題として取り上げ検討してきたところである。今回、WG 内で濃縮工程における菌体の損失をできるだけ減らす方法を検討し、11 機関同じ条件下で検査を実施したが、表5に示した通り、平均値が表4に比べ約73%低くなった。このことから、検体濃縮工程が、検査結果に大きく影響を与えていることがうかがえる。使用器材や条件が異なると、さらにバラツキが大きくなる可能性があると思われる。三つ目の理由として前処理の選択が挙げられる。現状、日本国内の一般的な検査において、前処理とは、酸処理や熱処理を示すと考えられている場合が多い。しかしながら、検体の前処理を行わない、いわゆる未処理という条件も前処理の一条件と定義できる。このことは、前述の結果内でも紹介したところ

である。この未処理検体を検査しなかった場合、表6に示した通り、平均値が表5に比べ約48%低くなったことになる。さらに酸処理のみで対応した場合、表7に示した通り、約51%、熱処理のみで対応した場合、表8に示した通り、約69%、表5に比べ平均値が低くなっている。これらの要因が重なり、本精度管理では、95%信頼区間として下限値1975.06、中央値3383.2、上限値4791.34cfu/100mlの試料に対し、各参加機関の検査作業書による判定結果において、39機関中19機関(約49%)とほぼ半数が100cfu/100ml未満と報告し、また、39機関中25機関(約64%)が目標範囲を下回る結果となったと思われる。

現状では、検査工程や分離培地の幅が大きいくらい、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、非濃縮検体の扱い、前処理や分離培地の違いが結果に大きく影響すると考えられる。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がある。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。これらのことから、次年度の外部精度管理においては、参加機関へ検査法を指定し、同じ方法で検査結果の比較を行い、バラツキ幅が改善されるかどうかを検討したいと考える。

2) 標準的検査法

それでは、バラツキの主たる要因となった非選択分離培地を分離培養に使用するかどうか、非濃縮検体検査を実施するかどうか、

前処理の選択、について、これらをどのように実検体への検査の中に位置付けていくか。まず非選択分離培地を分離培養に使用するかどうかについてであるが、現実問題として、浴槽水中にはレジオネラ属菌以外の細菌が種類、数ともに多数存在している場合が多い。非選択分離培地では、それら細菌が旺盛に発育しレジオネラ属菌の発育を抑制する事が考えられる。また、必ず選択分離培地と併用することになり、費用、検査時間等に影響し、検査機関によっては厳しい対応となる。そこで、分離培地の選択剤による影響は予想されるが、選択分離培地による検査を基本とすることとした。ただし、清掃消毒後の検体、プール水、ミネラルウォーター等、その他細菌の影響を受けにくい検体については、非選択分離培地の併用を考慮する必要があると思われる。また各機関の作業書において、現時点で非選択分離培地を組み込んでいる場合には、それを支持し、引き続きの対応を希望する。

次に非濃縮検体検査を実施するかどうか、

前処理の選択、であるが、これらについての重要性は先に述べた通りであり、詳細は昨年度報告書の「レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み」の『標準的な検査法の整理と提示』³⁾で報告している。この中では、非濃縮検体検査の実施とすべての前処理(未、熱、酸)の実施を推奨している。また濃縮方法はろ過濃縮を推奨している。表9にWG推奨法による前述すべての条件別最大値を示した。ここまでの考察から、実検体の検査においては、表中のと の条件による検査を標準的な検査法として推奨することとした。ただし の条件にお

いては、19試料中8試料で目標値を下回る結果となっている。このことから、今後も検体濃縮工程における工夫が必要と思われる。

我々は、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、昨年度、標準的な検査方法を提示するに至った。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。この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。このことは、今回の外部精度管理結果において、WG推奨法による結果が適切であったことから改めて証明されたと思われる。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推奨法導入により検査工程ごとに大きなズレを生じる可能性がある。そのため、いくつかの問題発生が予想される。このことについては、昨年度報告書³⁾を参照されたい。

さて、検査検体の保存期間については、検体ごとに特徴があり、一概にいつまで適切に保存できているかは言うことができない。特にレジオネラ属菌の生菌数の安定性については、検体ごとに異なると考えるのが適当と思われる。WG推奨法では14日間まで保存としているが、今回、北海道衛研で外部精度管理の濃縮4

検体について保存 14 日後検査した結果、生菌を確認することができなかった。この結果だけで実検体での状況を述べることは出来ないが、保存検体について再検査を行う場合には、実状を反映していない可能性があり注意が必要である。

D. 結論

1) 精度管理

これまでも報告してきたが、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。外部精度管理用菌株の検討、配付試料安定化に向けた検討、外部精度管理参加条件の設定、配付方法の検討、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)、ブレ外部精度管理の実施、評価と解析方法の検討、外部精度管理実施機関の設置(公益法人との協力等)、内部精度管理の必要性、その他。

さて、外部精度管理配付試料については、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ず調査期間中安定している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菌株の選定を含め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。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。このことを踏まえ、今年度は微生物定量試験用標準菌株として、過去レジオネラ属菌の

販売実績があるシスメックス・バイオメリー社の BioBall を特別注文し配付試料とした。その結果、前述 ~ までの検討事項が解決された。

配付試料の安定と送付方法の解決に加え、シスメックス・バイオメリー社が求める BioBall 使用要件が適切であり、参加条件の設定が解決されたことも大きな評価点と思われる。さらに、今後の重要な課題である外部精度管理実施機関選定の条件においても、BioBall の利用により、レジオネラ属菌及び検査法の知識を有している必要はあるが、検体調製ノウハウを有する必要は無くなった。また、本来は配付製品確認のための検査設備を有している必要があるが、今後本検査の研修を受け入れる機関が確定した場合には、その機関と提携することで、検査設備の保有を選定条件から外すことも可能であると思われる。つまり、レジオネラ属菌を直接扱える機関ではなくても、外部精度管理実施機関として選定することも可能と考える。これらのことは、外部精度管理事業に向け総合的に大きく前進したと思われる。一方で菌株の酸処理や熱処理、各種選択分離培地の影響については課題として残っているが、BioBall 特別注文時に発注者側から菌株指定もできることから、今後精度管理に、より有用な菌株が確認されれば、その菌株で新たな試料を作製することもできる。別の課題としては、外注製品であるため、価格とのバランスについても検討していく必要がある。このことは、外部精度管理実施規模、内容にも影響されることから、状況に応じメーカー側との協議が必要と思われる。今後適切な外部精度管理を行うためには、厚生労働省と研究班が協力し、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、

依頼または公募するなどの対応が必要と思われる。

本年度の外部精度管理調査においては、一定菌数範囲の試料配付にもかかわらず、各検査機関の作業書に基づいた集計結果で、最大値 5000cfu/100ml、最小値では現行検出限界である 10cfu/100ml との報告となり、非常に大きなバラツキとなって現れた。主たる要因は、非選択分離培地を分離培養に使用するかどうか、非濃縮検体検査を実施するかどうか、前処理の選択であった。これらについては先の考察で述べた通りであり、現状では手技による問題よりも検査条件の違いによる影響が大きいと思われる。次年度の外部精度管理においては、参加機関へ検査法を指定し、同じ方法で検査結果の比較を行い、バラツキ幅が改善されるかどうかを検討したいと考える。

2) 標準的検査法

しかしながら、このような検査条件による結果への影響は、実検体においても同じ事が起こっている可能性が高いと思われる。つまり、これまで検出限界ギリギリの菌数と考えられていた検体中に、 10^3 cfu/100ml 以上のレジオネラ属菌が存在していた可能性も考えられる。WG 推奨法においては、今回の外部精度管理調査で良好な結果を得ることができたこと、また昨年度までの報告により、実検体での効果が検証されていることから、バラツキ幅を抑え、適切な結果を反映させる検査法であると思われる。本来、現在の 10cfu/100ml 未満（検出されないこと）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する必要があると思われる。現在、レジオネラ症予防のための衛生対策については、複数の死亡者を伴う集団患者発生事例が確認

された 10 数年前とは異なり、公衆浴場施設等事業者側、行政指導側双方の意識が高まり、日常的に対応されていると思われるが、一方で、レジオネラ症の患者報告数は増加傾向にある。このことについては、複数の要因が考えられ、今後詳細検討が必要なことではある。そのような中、公衆浴場を原因としたレジオネラ症予防における衛生管理状況の確認や患者発生時の適切な疫学調査等のためにも、これまでの研究報告が生かされ、WG 推奨法が標準的な検査方法として位置付けられれば幸いである。

本報告書において、改めて WG 推奨法を紹介する。「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」で検査法について、その具体的手順は「新版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、これを比較対象とし、平成 22 年度厚労科研「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」で行った地方衛生研究所に向けたアンケート調査結果と併せ、表 10～15 に示した。また、簡単なフローチャートを図 2 に示した。

3) 研修システム

本年度は、研究分担者の緒方喜久代氏、磯部順子氏が中心となり、それぞれが特色ある研修会を開催し、今後必要となる知見の集積を行った。詳細については、本報告書内で各研究分担者により報告されている。研修システムの構築については、まず柱となる標準的な検査法が提示されていなければ、適切な研修を行うことが出来ない。先にも述べた

が、現在の 10cfu/100ml 未満(検出されないこと) という基準設定を導くための標準的な検査方法が必要であり、その検査手技取得のための研修会を開催すべきである。

研修システム構築のための手順案については、昨年度報告書³⁾に記載したので、本報告書では簡単な概要案だけを以下に示す。厚生労働省とWGで現状と今後についての協議を行い、既存のシステムによるのか、新たなシステムを必要とするかを含め、主催者、場所、条件等の基本的方針を検討する。講師の養成も不可欠である。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。また、これまでも「具体的手順は新版レジオネラ症防止指針を参照すること」としていたが、実際には様々な方法で検査が行われており、そのことが検査結果バラツキの一因であったと思われる。そのため、標準的な検査法の通知後、できるだけ早い段階で研修会を開催できるよう進める必要があると思われる。

謝辞

稿を終えるに当たり、外部精度管理において、WG 外で推奨法での確認検査を行って頂いた岩手県環境保健研究センターの岩渕香織氏に深謝致します。

E. 参考文献

1) 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-, -外部精度管理試料安定化に向けた取り組み-: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.101-161.

2) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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 23 年度総括・分担研究報告書 pp.113-134.

3) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 24 年度総括・分担研究報告書 pp.93-130.

4)厚生労働省健康局結核感染症課長通知,健感発 0315 第 1 号 平成 24 年 3 月 15 日,感染症発生動向調査事業等においてゆうパックにより検体を送付する際の留意事項について

5)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.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし