

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 26 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
	久保田晶子	北海道立衛生研究所
	佐々木麻里	大分県衛生環境研究センター
	田中 忍	神戸市環境保健研究所
	千田 恭子	仙台市衛生研究所
	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 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、レジオネラ属菌の特異的な性質から、外部精度管理用の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ついて試行錯誤を繰り返してきた¹⁻³⁾。昨年度は、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・ビオメリュー社の BioBall(特注品)を利用し、外部精度管理を試みた⁴⁾。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。

そこで本年度においても、BioBall(特注品)を利用し、全国 41 の地方衛生研究所を対象に外部精度管理を試みた。外部精度管理実施方法は、昨年度、各機関の SOP による結果において大きなバラツキが認められたことから、レジオネラ外部精度管理ワーキンググループ推奨法^{3, 4)}を指定した。その結果、昨年度に比べバラツキは解消された。これは非濃縮試料及び、未処理による検

査工程を加えたことが良い結果につながったと思われる。一方で、今回の供試菌は、酸処理や熱処理、さらには選択分離培地により発育が強く抑制されることが確認された。このような現象は、これまでに研究班内でも確認されており、現状では、様々な条件に対応できるだけの配付試料を製作するのは困難と思われた。今後の外部精度管理においては、配付試料がより安定した性能を発揮できる範囲内で、検査工程のどの部分に重きを置くかの定義付けを適切に行い実施する予定である。一方で、実検体検査に対する注意点等については研修会で対応し、各検査機関が適切な内部精度管理を行えるような環境を整えることが重要と思われた。

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。本年度は、昨年度に引き続き、シスメックス・ビオメリュー社のBioBall(特注品)を利用した外部精度管理を実施し、今後の外部精度管理のあり方、内部精度管理の必要性、研修会の位置付け等について検討したので報告する。

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〉

昨年度同様に、別添1の流れに従いBioBallを利用した外部精度管理を実施した。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19316.0cfu/Ball、95%信頼区間：下限値

15319.7 cfu/Ball、上限値23312.3 cfu/Ballの製品(保証期間:2014年10月1日～2015年10月1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・ビ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を参加要件とした。

〈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41カ所で外部精度管理を行った。これらの参加機関に1～41までの数字をランダムに振り分け結果集計を行った。

〈実施概要〉

①平成26年6月:製品の発注、②7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)、③8月:参加希望機関からBioBall使用承諾書の提出を求める、④10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4-1、4-2)及び結果記入ファイ

ル(別添 5-1、5-2)の送付、製品の発送、⑤11月:結果締め切り。

〈実施日時〉

試料発送:平成 26 年 11 月 4 日(火曜日)

メーカーから直送

試料到着:平成 26 年 11 月 5 日(水曜日)

又は 6 日(木曜日)

締め切り:平成 26 年 11 月 28 日(金曜日)

*当初は 9 月 29 日発送、10 月 31 日締め切りとしていたが(別添 3)、メーカー側の BioBall 作製上の都合により、上記の実施となった。

〈検査方法〉

外部精度管理指定法(WG 推奨法:実施要領参照)に従って実施依頼した。

〈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 15319.7 cfu/Ball、上限値 23312.3 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 3063.94、中央値 3863.2、上限値 4662.46 cfu/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、3000 ~ 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 900 ~ 15000cfu/100ml として設定することとした。

2)標準的検査法および研修システム

一昨年度、昨年度に「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 推奨法を報告したところである。本年度は、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修 新興再興感染症技術研修」内で、WG 推奨法に沿ったレジオネラ検査研修を行った。本件集会には、地方衛生研究所 24 機関が参加した。

C. 研究結果及び考察

1)精度管理

全 41 機関のべ 46 試料に対する各参加機関の判定結果(全条件中最大値)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 5950cfu/100ml、最大値 16000cfu/100ml、最小値 10cfu/100ml、中央値 5000cfu/100ml となった。今回の外部精度管理配付試料では、メーカー保証による 95%信頼区間が、下限値 3063.94、中央値 3863.2、上限値 4662.46 cfu/100ml であったことから、外部精度管理としての良好範囲目標値を 900 ~ 15000cfu/100ml と設定している。今回、全 41 機関中 37 機関(約 90%)が目標範囲に入り、良好な結果が得られた。また試料数で見ても 46 試料中 41 試料(約 89%)が目標範囲に入り、良好な結果が得られた。これら表 1 において良好な回答があった 37 機関では、全て非濃縮検体からの結果であった。前処理別で見ると、未処理から最大値を回答したの

が 34 機関、未処理と酸処理からが 1 機関、未処理と熱処理からが 1 機関、酸処理からが 1 機関であった。使用培地別で見ると、BCYE α 培地を使用していた 20 機関では、全て本培地から最大値を回答(2 機関では選択分離培地からも同じ回答があった)しており、うち 19 機関から良好な回答(95%)があった。選択分離培地のみを使用していた 21 機関では、18 機関から良好な回答(約 86%)があった。目標範囲に入らなかった4機関のうち、非濃縮検体でコロニーが確認されなかったのが3機関(選択分離培地のみ使用)、非濃縮検体でコロニーが確認されたが目標上限を超えたのが 1 機関(BCYE α の結果)であった。

次に、昨年度(平成 25 年度)と本年度(平成 26 年度)の比較を行った。昨年度は 39 機関、本年度は 41 機関が参加した。両年度に参加した機関は 32 機関あり、延べ 48 機関の参加があった。配付試料である特注品 BioBall について表 2 に示した。両年度とも菌数 15000cfu/Ball(水 500ml に溶かした場合、3000cfu/100ml)で発注しているが、完成品には差があり、昨年度は前述の定義に基づき、良好範囲目標値を 300 ~15000cfu/100ml、本年度は 900 ~15000cfu/100ml と設定している。また、昨年度の BioBall CV(%)は約 17.5、本年度は約 8.7 であり、共に CV(%)20 を下回っていることから、安定性の高い試料となっている。検査法については、昨年度が各検査機関の検査法、本年度は WG 推奨法を指定し実施している。このような条件の下、判定結果の比較を表 3 に示した。昨年度目標範囲に入ったのは、39 機関中 14 機関(36%)だったのに対し、本年度は、41 機関中 37 機関(約 90%)と大きく改善された。また、両年度に参加した 32 機関のうち、昨年度目標範囲外だったのが

19 機関あったが、そのうち 17 機関が本年度は目標範囲内に入った。また、2 年連続で目標範囲に入ったのが 13 機関あった。一方、2 年連続で目標範囲の下限値未満を回答したのが 1 機関、昨年度は下限値未満、本年度は上限値を超えたのが 1 機関あった。

さて、本外部精度管理については、現在試行的に行っているものであり、将来的にどのような方法での実施が適切であるかを検討中である。これまでの厚労科研究事業においても、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ついて試行錯誤を繰り返してきた。実検体に対する標準的検査法を提示するにあたって、選択分離培地や酸や熱による前処理の影響についても検討してきたところである。そのような中、特に本年度の結果から見えてきた、今後の外部精度管理実施に関する課題についてを以下で検討する。

表 4 に選択分離培地による判定結果(複数種類併用の場合最大値)を示した。選択分離培地を使用していたのは、参加 41 機関中 40 機関であった。40 機関中 36 機関(約 90%)が目標範囲に入り、これは、前述した全条件中最大値と同じ結果であったが、全試料中で約 2%、平均値で約 2721 cfu/100ml、最大値で 6000 cfu/100ml、中央値で 2500 cfu/100ml 低い数値となった。このことは、全条件中最大値の結果において、非選択分離培地である BCYE α 培地を使用していた 20 機関では、全て本培地から最大値を回答していたことから、選択分離培地による供試菌に対する発育抑制があったと考えられる。

次に、非濃縮検体:未処理・選択分離培地の判定結果(複数種類併用の場合最大値)を

表5に示した(ここでは便宜上濃縮検体結果を除外しているため、検出機関数として記載した)。40機関中35機関(約88%)、全試料中では45試料中38試料(約84%)で検出されていた。表4と見方がほぼ同じのため、選択分離培地による影響は認められるが、その他の要因が検出や菌数に有意に働いた影響は認められなかった。

次に、非濃縮検体:未処理・選択分離培地の判定結果(複数種類併用の場合最小値)を表6に示した。40機関中29機関(約73%)、全試料中では45試料中31試料(約69%)で検出されていた。表5と比較し、検出機関、全試料中結果共に約15%、平均値で867cfu/100ml、最大値で1000cfu/100ml低い数値となった。レジオネラ検査で使用されている選択分離培地は、複数種類有り、さらにGVPC培地では複数メーカーから市販されている。今回の参加機関においても複数の培地が使用されており、また多数の機関がそれらを併用していた。特定種類の培地が影響しているとは考えられなかったが、複数種類の培地を併用した機関では、培地間差があった可能性がある。非選択分離培地であるBCYE α 培地を使用していた20機関では、全て本培地から最大値を回答し、安定した結果が得られていたことから、選択分離培地間差の可能性は否定できないと思われる。

次に、非濃縮検体:酸処理による判定結果(全分離培地による最大値)を表7に示した。41機関中9機関(約22%)、全試料中では46試料中10試料(約22%)で検出されていた。表5と比較し、検出機関で66%、全試料中で62%、平均値で2994cfu/100ml、最大値で9000cfu/100ml低い数値となった。今回の供試菌は、酸処理により発育が抑制され、結果に

大きく影響したと考えられた。また、このことは、BCYE α 培地、選択分離培地を問わず影響していた。

次に、非濃縮検体:熱処理による判定結果(全分離培地による最大値)を表8に示した。41機関中6機関(約15%)、全試料中では46試料中7試料(約15%)で検出されていた。表5と比較し、検出機関で73%、全試料中で69%、平均値で2809cfu/100ml低い数値となった。今回の供試菌は、酸処理同様、熱処理でも発育が抑制され、結果に大きく影響したと考えられた。また、こちらもBCYE α 培地、選択分離培地を問わず影響していた。なお、1機関で11000cfu/100mlを報告していた。このことは、結果全体を勘案すると非特異的な結果となっているが、原因は不明である。

次に、濃縮試料での結果について記載する。非濃縮試料において、酸処理及び熱処理をすることで検出コロニーが著しく減少する結果だったことから、良好な結果が得られていた未処理による濃縮試料での判定結果(全分離培地による最大値)を表9に示した。本集計では、平均値約939cfu/100ml、最大値3430cfu/100ml、最小値10cfu/100ml、中央値645cfu/100mlとなった。本条件で目標範囲に入ったのは、41機関中18機関(約44%)、全試料中では46機関中19機関(約41%)であった。表1の結果と比較すると、平均値で約1/6、中央値で約1/8近く低い数値となった。目標範囲に入った機関数、試料数も共に半数未満となっている。これまでも、試料を濃縮することで検出菌数が減少することが言われている。本調査においても、大きく菌数の減少が認められる結果となった。しかしながら、この表ではBCYE α 培地と選択分離培地が混在している結果であることから、それらを分けて比較し

たものを表 10 に示した。母数は異なるが、BCYE α 培地で目標範囲に入ったのは、20 機関中 13 機関(約 65%)と過半数を超えていたのに対し、選択分離培地では、40 機関中7機関(約 18%)と大きく数値が低くなっている。表 4の説明で触れたが、非濃縮試料から最大値が認められた場合、選択分離培地の使用で検出菌数等は減少したが、そのことが目標範囲に入っているかどうかという判定結果にまでは影響していなかった。しかしながら、濃縮試料では、BCYE α 培地と選択分離培地の間で結果に大きな差が認められた。今回は濃縮条件を指定し、ほぼ統一された状況ではあったが、検査機関差も認められた。このことは、濃縮工程上で検査結果に影響を与える何らかのポイントがあるのと同時に、分離培地による影響も大きいと思われる、今後の外部精度管理調査における重要な検討課題と考える。

次に、表 11 に濃縮検体:酸処理による判定結果を、表 12 に濃縮検体:熱処理による判定結果を示した(全分離培地による最大値)。本条件で目標範囲に入った機関は無かった。表 7、8の説明でも触れたが、今回の供試菌は、酸処理、熱処理で発育が大きく抑制される傾向があった。濃縮試料においても、著しく影響を受けており、適切な調査結果が得られなかった。また、このことは濃縮試料でも BCYE α 培地、選択分離培地を問わずに影響していた。これら酸や熱による前処理についても今後の外部精度管理調査における重要な検討課題と考える。

2) 標準的検査法および研修システム

国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修 新興再興感染症技術研修」内で、WG 推奨法に沿

ったレジオネラ検査研修を行った。講師及び研修スケジュールを別添 6-1、6-2 に示した。本研修会は、呼吸器系細菌に関連する研修であり、座学において他の呼吸器系感染症の講義も実施されたが、実習についてはレジオネラ属菌検査に特化した形式で実施された。本実習では、外部精度管理調査と同じ、特注品 BioBall により作製した模擬検体を使用した。培養法は、WG 推奨法に沿って実施した。斜光法⁵⁾については、模擬試料培養平板以外にも、他の細菌が混在している平板を準備し、非濃縮・濃縮、未・酸・熱の前処理、BCYE α 、MWY、GVPC(以上 OXOID)別での観察を行った。さらに、迅速検査診断法実習(LC EMA-qPCR法)や臨床検体からの検査診断法実習(LAMP法)等も行った。このような規模の大きいレジオネラ検査研修は初めての試みだったため、研修が進む中、さらに準備や調整の必要性を実感する場面があるなど、いくつかの課題も見つかった。これら課題については、今後の取り組みに生かしたいと考える。

D. 結論

本年度の外部精度管理調査では、昨年度、各機関の SOP による結果において大きなバラツキが認められたことから、WG 推奨法を指定した。その結果、昨年度に比べバラツキは解消された。これは非濃縮試料及び、未処理による検査工程を加えたことが良い結果につながったと思われる。一方で、今回の供試菌は、酸処理や熱処理、さらには選択分離培地により発育が強く抑制されることが確認された。特に濃縮試料に対しての影響が大きかった。このような現象は、これまでも研究班内で作製した自家試料で確認されていたが、特注品 BioBall でも確認されたことから、現状では、全

国規模の外部精度管理調査で、様々な条件に対応できるだけの配付試料を作製するのは困難と思われた。

外部精度管理においては、検査工程や分離培地の幅が大きいほど、検査結果の幅が大きくなると思われる。例えば、手技に重きを置いた外部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、分離培地の違いや、酸や熱による前処理が、結果に大きく影響してくる可能性が十分に想定される。このような場合、外部精度管理の結果が思わしくなかった参加機関では、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が特定できない場合、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。これらのことを勘案すると、実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、分けて考えるのも選択肢の一つと思われる。選択分離培地の使用や酸処理、熱処理は、実検体中に混在するその他の細菌を抑えるための手法であり、レジオネラの純培養菌を使用した場合の外部精度管理では、それらの工程が不確定な結果につながる可能性が大きいと思われる。

配付試料については、特注品 BioBall の利用により、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、他施設へ安定した輸送が可能となった。この点は、全国的な外部精度管理を実施する上で不可欠な要素である。また、BioBall は、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、外部精度管理に、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可能である。なお、本品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が、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。

本年度の結果から、非濃縮試料、未処理試料及び BCYE α を使用した結果においては、十分に外部精度管理として評価できるものと思われた。これらのことから、次年度の外部精度管理では、検査手技の確認に重点を置き、①特注品 BioBall を利用する。②未処理のみで検査をする。③BCYE α 培地のみで検査をする。④非濃縮試料、濃縮試料について検査する(非濃縮試料が適切に混和されているか、適切な濃縮が行われているかを大きな評価点とする)。これらの条件の下、供試菌数及び評価方法等を改めて WG 内で協議したいと考える。また、これらのシステムで外部精度管理を実施することが可能と示唆された場合、本調査事業を委託できるよう外部機関を選定し、協力体制の下、試行的に外部精度管理調査を実施したいと考える。

2) 標準的検査法および研修システム

標準的検査法については、以下の考え方を柱に検討してきたところである。① ISO 11731:1998(E)に準じた方法。②検査結果のバラツキを無くす方法。③分離培地に発育したレジオネラを見逃さないようにする。つまり、ある精度以上を確保した基準となる方法、基本となる考え方を統一した方法、と定義することができる。この中で、現時点においては、濃縮法について、検査者間差が少なく、回収率が比較的安定しているろ過濃縮法を推奨してきた。一方で、この方法は、多検体処理や夾雑物の多い検体に対しては課題が多い。レジオネラ症防止指針-第3版-では、培養法の基本を JIS K

0350-50-10:2006 に準拠しており、この JIS 法では回収率を高めた方法が提示されていることから、WG でも遠心濃縮を行う場合においては、この方法を推奨している。このような中、遠心濃縮法についても WG 内で検討をしてみてもどうかという意見が有り、このことについては今後の検討課題となっている。環境水の検査においては、適切な濃縮が行われているかが、重要なポイントの一つであることから、ろ過濃縮、遠心濃縮を問わず、濃縮工程中の注意点について提示できるよう検討したいと考える。

研修については、本年度実施した研修会で、いくつかの課題が見つかったが、同時に今後に生かせる知見も集積された。これらに加え、これまでに本研究班が協力し実施してきたいくつかの研修会での知見を合わせ、研修マニュアル作成に向けた検討をする予定である。また、今後開催される研修会では、実検体検査に対する注意点等について適切に対応できるよう検討し、各検査機関が適切な内部精度管理を行えるような環境を整えることが重要と思われた。一方で、このような研修会を開催するためには、これまでの報告書にも記載してきたが、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しなければならない。講師の養成も不可欠である。上述の研修マニュアル作成に加え、それを生かすための検討が必要である。外部精度管理を外部機関に委託できた場合、この外部機関において定期的に研修会が開催できるようになれば理想的であり、このことについても今後の検討課題にしたいと考える。

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) 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)「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 年度総括・分担研究報告書 pp.105-132.

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

- 1) 森本 洋:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み, 厚生労働科研「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の構築に関する研究」小班会議, 2014年7月, 東京
- 2) 森本 洋:レジオネラ感染症とその衛生対策について, 道南獣医師会公衆衛生講習会, 2014年11月, 北海道函館市
- 3) 森本 洋:標準的検査法(培養法)と外部精度管理に向けた検討, 平成26年度生活衛生関係技術担当者研修会, 2015年2月, 東京
- 4) 森本 洋:培養法の現状と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, 平成26年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2015年2月, 岡山
- 5) 森本 洋:レジオネラ症と衛生対策, 平成26年度保健所生活衛生課監視指導班研修会, 2015年3月, 北海道倶知安町

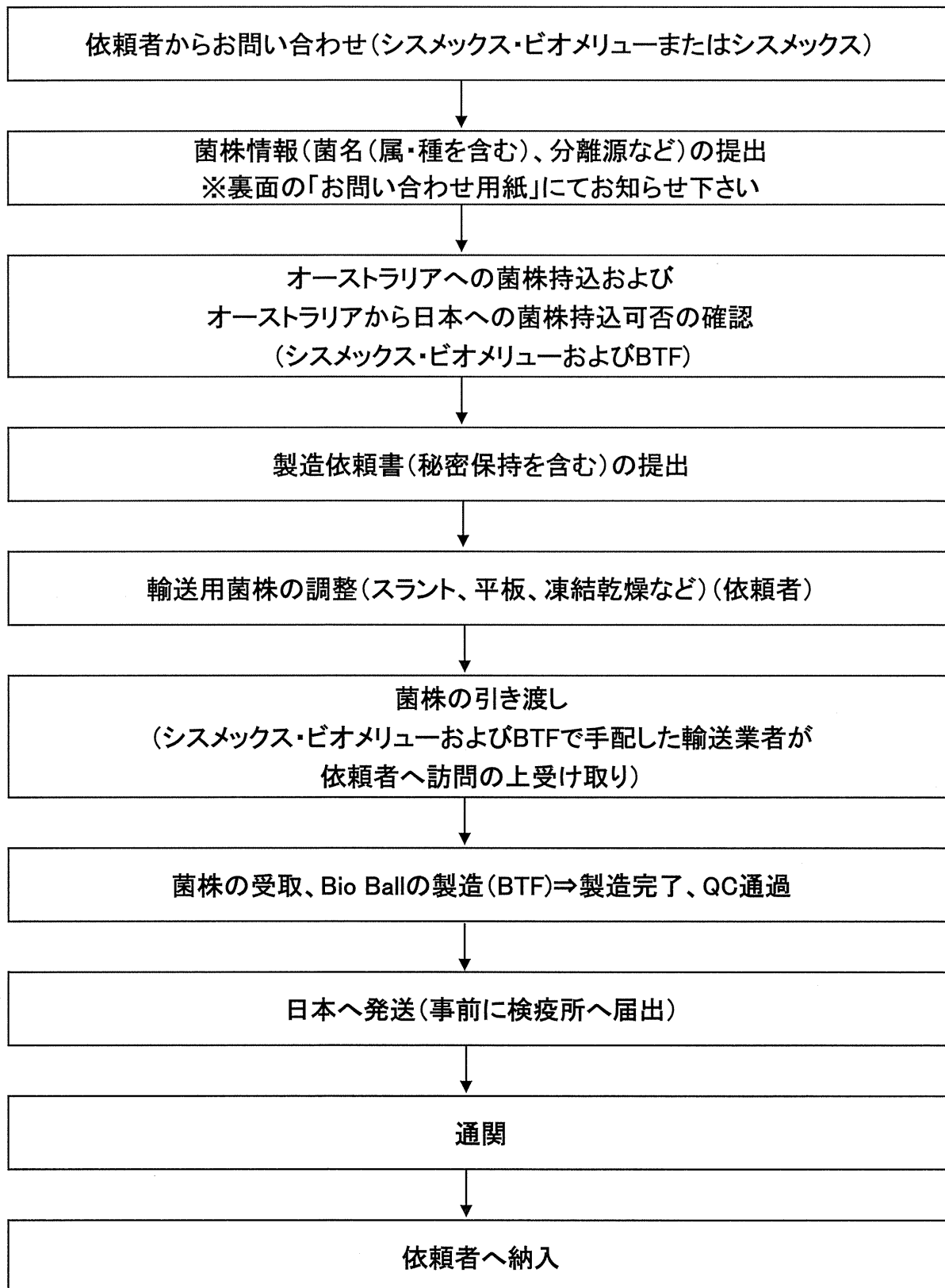
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(別添1)

Bio Ball® Plant Isolate

お問い合わせから納品までの流れ



(別添 2)

BioBall
Select

Certificate of Analysis

Lot Number: B2903

Reference Material Data

Organism: *Legionella pneumophila*
Designation: ACM 5197
Reference: 416473
BTF Internal Reference: B-CUST-0054-20
Date of Manufacture: 1 October 2014
Expiry Date: 1 October 2015
Extended Expiry Date: N/A

Quantification Data

Method Ref: BB-029

cfu Count per BioBall®

Mean cfu	SD
19316.0	1684.5

95% Prediction Interval	
Lower Limit	Upper Limit
15319.7	23312.3

For an explanation of the Prediction Interval see the BioBall Instructions For Use on the BioBall website - www.bioball.com

Culture Information

No. of Passages: 4
QC Media: CYE agar
Plate Incubation Time (hrs): 64-72
Plate Incubation Temp °C: 37 Aerobic

Note: Number of passages are indicated from the original strain assuming original strain is zero

Strain Confirmation

Bacteria strains are confirmed by genetic typing. Yeast and Mould strains are confirmed by Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO).

Quality Officer:

Strain sourced from ACM (Australian Collection of Microorganisms)


.....
Linh Le
21 October 2014

Manufactured by:
BTF - A bioMérieux Company
Sydney Australia
Tel: 61 (0) 2 8877 9150
Fax: 61 (0) 2 8877 9101
www.btfbio.com

BTF
A BIOMÉRIEUX COMPANY

Sales and General enquiries:
bioMérieux S.A.
69280 Marcy l'Etoile - France
Tel: 33 (0) 4 78 87 20 00
Fax: 33 (0) 4 78 87 20 90
www.biomerieux-industry.com


BIOMÉRIEUX
INDUSTRY

Issue: 13 - August 2012

(別添3)
衛生研究所長 殿
レジオネラ検査担当者 殿

平成 26 年 7 月 吉 日

平成 26 年度厚生労働科学研究補助金
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」

研究代表者 国立感染症研究所
細菌第一部 倉 文明

「レジオネラ属菌検査外部精度管理調査」への参加協力依頼について

盛夏の候、皆様方におかれましては、ますますご清祥のこととお慶び申し上げます。
日ごろから厚生労働科学研究補助金事業の推進につきましては、格別のご協力を頂き厚
くお礼申しあげます。

さて、このたび平成 26 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）「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」の一
環で、レジオネラ属菌検査の外部精度管理調査を試行することとなりました。

つきましては公務ご多忙中のところ誠に恐縮に存じますが、下記参加要件等を御一読頂き、
参加協力頂きますようよろしくお願い申し上げます。

記

- | | | |
|---|-----------|---|
| 1 | ブロック内受付数 | レファレンス機関を除く 5 機関 |
| 2 | 受付締め切り | 8 月 31 日までに各レファレンス担当者へ連絡
なお、参加申込順による受付のため、5 機関決定次第、締め切
りとなる場合があります |
| 3 | 参加要件 | <u>BioBall® (バイオボール)</u> 使用要件 1、2、4 を満たし、
<u>BioBall® (バイオボール)</u> 使用承諾書にご署名頂ける機関
外部精度管理調査実施概要(別紙)による検査対応が可能な
機関 |
| 4 | 参加費 | 無料 (検査器材は各機関対応) |
| 5 | 実施時期 (予定) | 9 月 29 日 (月) 試料発送、到着次第 10 月 24 日 (金) までに
検査開始、10 月 31 日 (金) 結果回答締め切り |
| 6 | 回答提出先 | 各ブロックレジオネラレファレンス担当者 |
| 7 | 調査結果の報告 | 年度内 (厚労科研報告書に合わせ報告) |

問い合わせ連絡先 (取りまとめ担当者)
北海道立衛生研究所
感染症センター感染症部細菌グループ
森本 洋
TEL:011-747-2762, 2761
FAX:011-747-2757
e-m: morimoto@iph.pref.hokkaido.jp

(別添4-1) 平成26年度レジオネラ属菌検査外部精度管理調査実施要領

このたび平成26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)「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」の一環で、レジオネラ属菌検査の外部精度管理調査を試行することとなりました。

つきましては公務ご多忙中のところ誠に恐縮に存じますが、下記実施概要を御一読頂き、参加協力頂きますようよろしくお願い申し上げます。

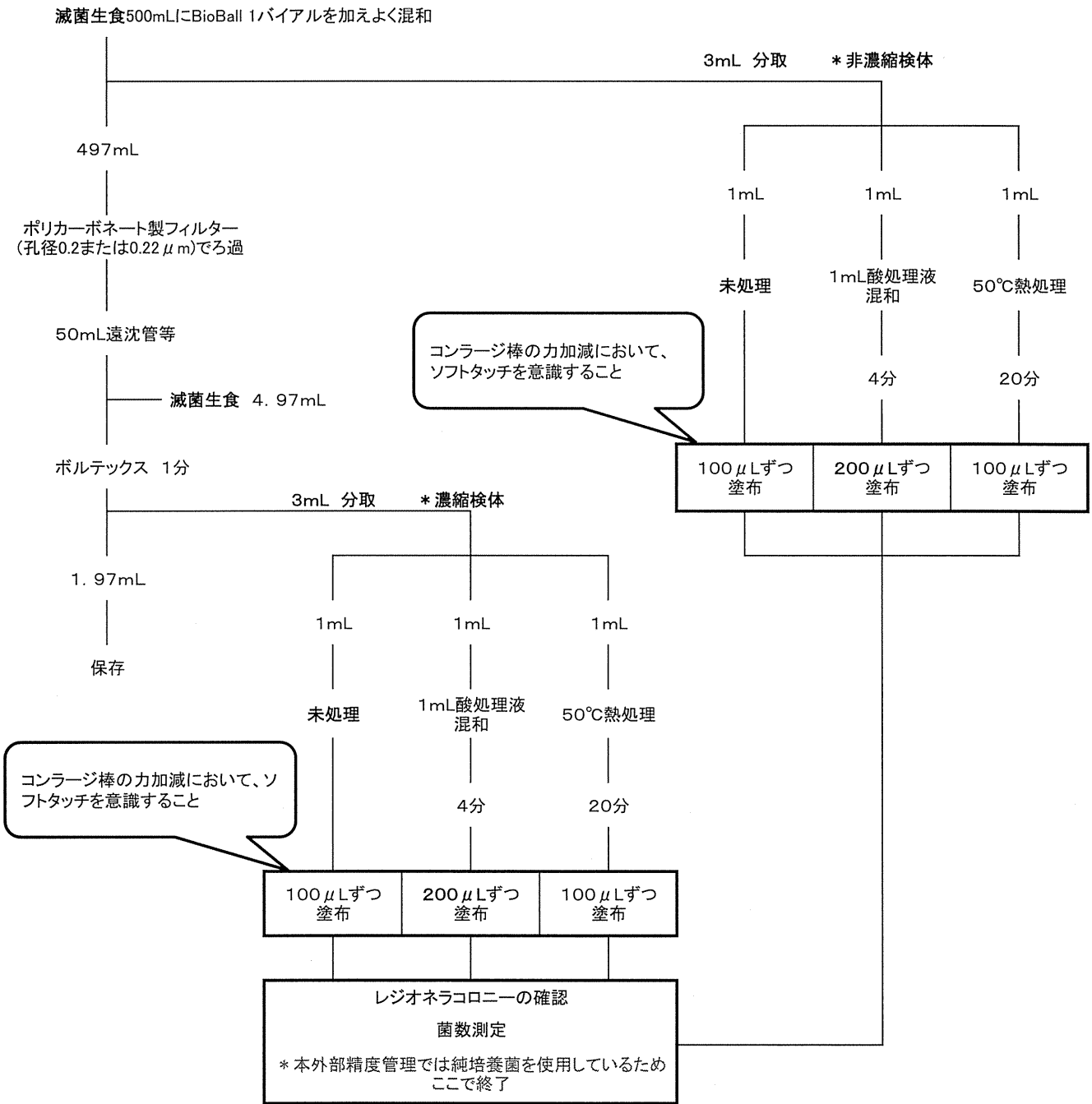
記

- 1 試料の発送 11月4日(火)
- 2 試料発送元 シスメックス・ビオメリュー
- 3 試料の到着 場所により異なる場合がありますが、5日(水)～6日(木)到着予定(11月7日(金)までに届かない場合はご連絡下さい。)
- 4 試料内容 BioBall 1 バイアル/本×2/箱の計2バイアル
(うち1バイアル/本は予備、有効期限2015年10月末日予定)
- 5 試料受領について 試料の箱に貼付されている送り状をコピーし、そのコピーした用紙に、「本製品を受け取りました」と記載、受取日・施設名記載、受取者(送り先宛名と同じ方)サイン、押印、をして貴ブロックレファレンス担当者まで送付願います。
- 6 検査方法について 試料到着後、検査開始日までマイナス18℃～マイナス30℃で適切に保管し、検査開始日に500mlの滅菌生理食塩水にBioBall 1 バイアルを溶かし、よく混和したものを模擬試料とし、外部精度管理指定法(別添)により検査を進めて下さい。大きくは次の流れによります。1)非濃縮検査、濃縮検査を行う。2)濃縮法はろ過濃縮(ろ過膜材質指定)を基本としますが、冷却遠心濃縮の場合は、JIS K 0350-50-10(<http://kikakurui.com/k0/K0350-50-10-2006-01.html>の6.5.1 b)遠心分離による濃縮)に従って行って下さい。
なお、フィルター洗い出しや遠心沈渣懸濁液について、本検査では滅菌生理食塩水をご使用下さい。貴機関の検査方法でも実施した場合は外部精度管理指定法結果と併せて報告して下さい。
- 7 検査結果について 検査結果記入ファイル(参加機関へ後日発送)に記入し、レファレンス担当者までメール添付して下さい。(本調査では、発育コロニー数、換算菌数を求めており、菌種名は求めていません)
- 8 締め切り日 11月28日(金)

以上

問い合わせ連絡先(取りまとめ担当者)
北海道立衛生研究所
感染症センター感染症部細菌グループ
森本 洋
TEL:011-747-2762, 2761
FAX:011-747-2757
e-m: morimoto@iph.pref.hokkaido.jp

(別添4-2)



H26 外部精度管理指定法フローチャート(濃縮法:ろ過濃縮)

(別添5-1)

検査結果記入ファイル

検査機関名:

担当者名:

検査開始日:2014年 月 日、結果判定日:2014年 月 日

- ・別添の実施概要および外部精度管理指定法に従い検査を実施し、結果を記入願います。
- ・複数種類の培地を使用している場合は、培地の種類ごとに記入願います。
- ・各培地におけるコロニー数とCFU/100mLに換算した値で記入願います。
- ・換算方式は、非濃縮は1コロニー×1000、濃縮は1コロニー×10で行って下さい。
- ・貴機関の検査方法でも実施した場合は本記入ファイルをコピーして記入し、指定法結果と併せて報告して下さい。その場合、貴機関の検査方法を別の濃縮条件欄に記入願います。

検査結果記入:未処理

使用分離培地名 (メーカー名)	
非濃縮検体結果	
濃縮検体結果	

検査結果記入:酸処理

使用分離培地名 (メーカー名)	
非濃縮検体結果	
濃縮検体結果	

検査結果記入:熱処理

使用分離培地名 (メーカー名)	
非濃縮検体結果	
濃縮検体結果	

(別添5-2)

***濃縮条件**

【現在貴機関が採用しているろ過濃縮条件】

- ①ろ過に供した量: mL
- ②フィルターメーカー:
- ③フィルター種類:
- ④フィルターポアサイズ:
- ⑤フィルターの洗い出し方法
 - a) 手振り(分)
 - b) ボルテックス(分)
 - c) その他:

【現在貴機関が採用している遠心濃縮条件】

- ①遠心に供した量: mL
- ②G(遠心加速度):
- ③回転数:
- ④遠心時間:
- ⑤設定温度:
- ⑥上清除去について
方法
 - a) デカンテーション
 - b) ピペット等による吸引
 - c) その他:

次のうち採用した条件を選んでください。

- a) 上清液完全除去後、滅菌水等を添加し濃縮検体とした。
- b) 上清液を一部残し濃縮検体とした。
- c) その他:

*備考・その他(お気づきの点等ご自由に記入下さい)

ご協力ありがとうございました。

(別添6-1)

平成26年度 短期研修 新興再興感染症技術研修講師名簿

(順不同)

講師名	所属・職
石岡 大成	国立感染症研究所感染症疫学センター 第五室長 (国立保健医療科学院併任 短期研修 新興再興感染症技術研修主任)
木村 博一	国立感染症研究所感染症疫学センター 第六室長 (国立保健医療科学院併任 短期研修 新興再興感染症技術研修副主任)
大石 和徳	国立感染症研究所感染症疫学センター センター長 (国立保健医療科学院併任 短期研修 新興再興感染症技術研修副主任)
野田 雅博	国立感染症研究所感染症疫学センター 主任研究官
高橋 真希	国立感染症研究所感染症疫学センター 技術補助員
山田裕加里	国立感染症研究所感染症疫学センター 協力研究員
柴山 恵吾	国立感染症研究所細菌第二部 部長
黒田 誠	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター センター長
棚林 清	国立感染症研究所バイオセーフティー管理室 室長
倉 文明	国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官
前川 純子	国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官
森田 幸雄	東京家政大学家政学部栄養学科 教授
森本 洋	北海道立衛生研究所 主査(細菌感染症)
磯部 順子	富山県衛生研究所 副主幹研究員
金谷 潤一	富山県衛生研究所 主任研究員
緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター 専門研究員(総括)
藤田 雅弘	群馬県食肉衛生検査所 技師長(細菌検査係長)
中臣 昌広	文京区文京保健所生活衛生課 主査

(別添6-2)

平成26年度 短期研修 新興再興感染症技術研修スケジュール

		10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00
11月10日	月	開講式 オリエンテーション (大石、木村、石岡)	バイオセーフティ概論 (棚林)		レジオネラ検査診断 実習概要 (倉、石岡)	培養検査法概論 (森本)	迅速診断検査法 概論 (金谷)	レジオネラ属菌培養法実習 (森本、緒方、磯部、金谷、藤田、前川、倉、木村、石岡)	
11月11日	火	迅速検査診断法実習 (LC EMA-qPCR法) (金谷、磯部、緒方、森本、森田、藤田、 前川、倉、木村、石岡)				迅速検査診断法実習 (LC EMA-qPCR法) (金谷、磯部、緒方、森本、森田、藤田、 前川、倉、木村、石岡)		レジオネラ 感染源調査 (PFGE解析 による実例) (磯部)	斜光法によるレジオネラ属菌検査診断実習 (森本、金谷、磯部、緒方、森田、藤田、 前川、倉、木村、石岡)
11月12日	水	臨床検体からの検査診断法実習(LAMP法) (磯部、金谷、緒方、森本、森田、藤田、 前川、倉、木村、石岡)				臨床検体からの検査診断法実習(LAMP法) (磯部、金谷、緒方、森本、森田、藤田、 前川、倉、木村、石岡)		浴用水からの レジオネラ属菌 遺伝子検査 (LAMP法、PCR法など) (緒方)	斜光法によるレジオネラ属菌検査診断実習 (森本、金谷、磯部、緒方、森田、藤田、 前川、倉、木村、石岡)
11月13日	木	レジオネラ感染症概論 (倉)	Sequence-Based Typing (SBT)法概論 (前川)		斜光法によるレジオネラ属菌 検査診断実習 (森本、金谷、磯部、緒方、森田、 藤田、前川、倉、木村、石岡)	斜光法概論 (森本)	斜光法によるレジオネラ属菌検査診断実習 (森本、金谷、磯部、緒方、森田、藤田、 前川、倉、木村、石岡)		ラボ カンファレンス
11月14日	金	不明疾患病原体 網羅解析法 (黒田)	施設のレジオネラ感染対策 (中臣)		細菌性呼吸器感染症概論 (柴山)	閉講式 (大石・石岡・木村)		まとめ (大石・石岡・木村)	

94

実施場所: 国立感染症研究所村山庁舎6号棟6階 講義室・実習室

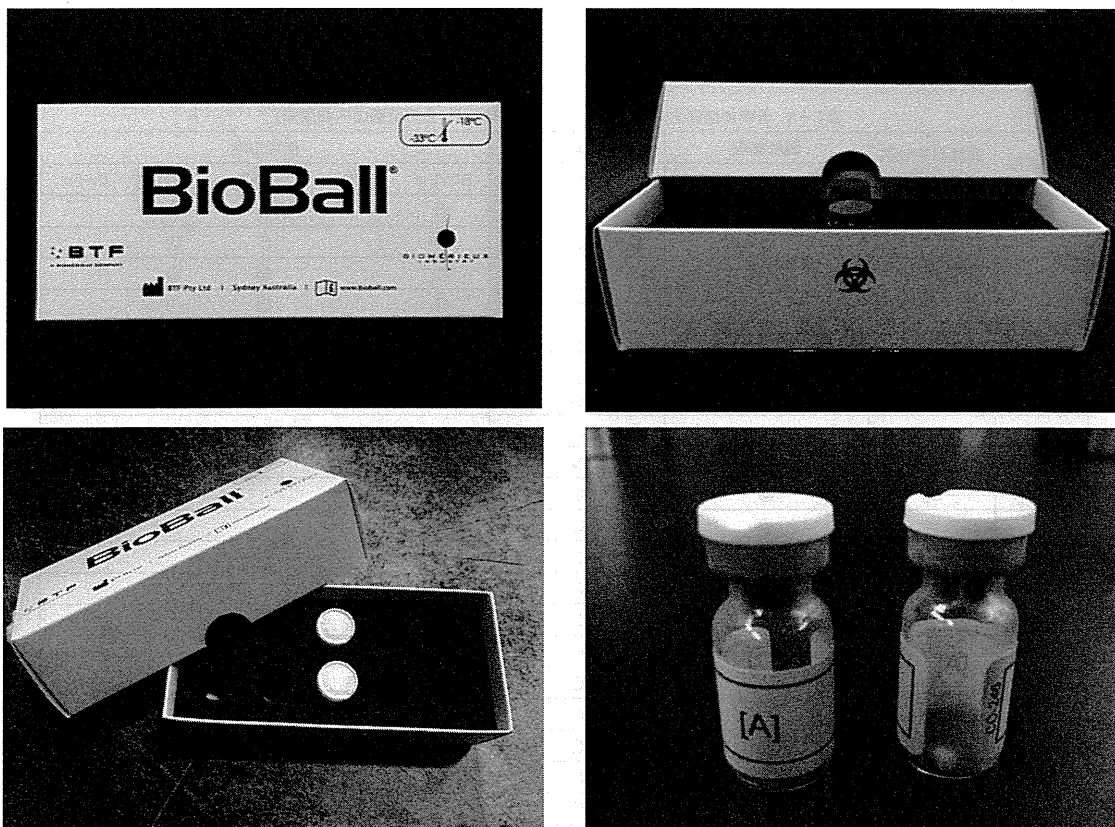


図1 外部精度管理配付試料

表2 特注品BioBallと外部精度管理目標値

	平成25年度	平成26年度
供試菌	<i>Legionella pneumophila</i> ACM5197	<i>Legionella pneumophila</i> ACM5197
発注菌数(CV(%)<20)	15000cfu/Ball(3000cfu/ 100ml)	15000cfu/Ball(3000cfu/ 100ml)
完成品(製品保証) : 平均値	16916cfu/Ball	19316cfu/Ball
: 95%信頼区間	下限値 9875.3 上限値 23956.7	下限値 15319.7 上限値 23312.3
: CV(%)	17.5	8.72
外部精度管理目標値	300~15000cfu/100ml	900~15000cfu/100ml

表1-1 各参加機関全条件中最大値による判定結果(全41機関のべ46試料)

参加機関	最終判定結果 cfu/100ml	濃縮処理			前処理			使用培地						
		非濃縮	ろ過法	遠心法	未	酸	熱	BCYE α	WYO α	GVPC	MWY	CAT α		
1	3000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○			
	2000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○			
2	2000	◎	○		◎	○	○	◎		◎	◎			
3	12000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○			
4	3000	◎	○		◎	○	○	◎		○				
5	15000	◎	○		◎	○	○	◎						
6	6000	◎	○		◎	○	○			◎				
7	10	○		◎	◎	○	○			◎				
8	1000	◎	○		○	◎	○						◎	
9	20	○	◎		◎	○	○						◎	
	20	○	◎		◎	○	○						◎	
10	9000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○				
	8000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○				
11	7000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○				
12	8000	◎	○		◎	○	○			◎				
13	8000	◎	○		◎	○	○			◎				
14	3000	◎	○		◎	○	○			◎				
	3000	◎	○		◎	○	○			◎				
15	4000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○				
16	3000	◎	○		◎	○	○			◎				
17	7000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○	○		○
18	9000	◎	○		◎	○	○	◎		○				
19	12000	◎	○		◎	○	○	◎	○			○		
20	140	○	◎		◎	○	○			◎				
21	8000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○				

表1-2 各参加機関全条件中最大値による判定結果(全41機関のべ46試料)

参加機関	最終判定結果 cfu/100ml	濃縮処理			前処理			使用培地						
		非濃縮	ろ過法	遠心法	未	酸	熱	BCYE α	WYO α	GVPC	MWY	BMPA α		
22	2500	◎	○		◎	○	○			◎				
23	6000	◎	○		◎	○	◎		◎(未)	◎(熱)				
24	14000	◎	○		◎	○	○	◎		○				
25	6000	◎		○	◎	○	○			◎				
26	4000	◎	○		◎	○	○			◎				
27	2000	◎	○		◎	○	○			◎				
28	2000	◎	○		◎	○	○		◎	○	○			
29	11500	◎	○		◎	○	○	◎		○				
	13500	◎	○		◎	○	○	◎		○				
30	3000	◎	○		◎	○	○			◎				
31	10000	◎	○		◎	○	○			◎				
32	6000	◎	○		◎	○	○	◎	○	◎				○
33	1000	◎	○		◎	◎	○		○			◎		
34	16000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○				
35	4000	◎	○		◎	○	○		◎	◎				
36	4000	◎	○		◎	○	○			◎				
37	14000	◎	○		◎	○	○	◎	○					
38	11000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○			
39	2000	◎	○		◎	○	○					◎		
40	6000	◎	○		◎	○	○	◎		○				
41	2000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○				

平均値 5949.782609
 最大値 16000
 最小値 10
 中央値 5000