

表4-1 判定結果(ろ過濃縮対応機関) cfu/100ml

施設No.	非濃縮	ろ過濃縮	回収率(%)	施設No.	非濃縮	ろ過濃縮	回収率(%)
15110001001	2900	960	33	15110001021	2600	1400	54
15110001002	1400	65	5	15110001022	3700	1600	43
15110001003	3000	390	13	15110001023	3000	1600	53
15110001004	2900	1100	38	15110001024	1900	1100	58
15110001005	1600	790	49	15110001025	2300	590	26
15110001006	3000	1300	43	15110001026	1100	340	31
15110001008	2500	800	32	15110001027	1900	0	0
15110001009	500	19	4	15110001028	400	400	100
15110001010	100	180	180	15110001029	1600	910	57
15110001011	1700	500	29	15110001030	2300	290	13
15110001013	1800	95	5	15110001031	1700	350	21
15110001014	1800	260	14	15110001032	2100	230	11
15110001016	1000	280	28	15110001033	0	0	-
15110001017	2900	600	21	15110001034	650	180	28
15110001018	1200	160	13	15110001035	2000	190	10
15110001019	600	460	77	15110001036	3100	2200	71
15110001020	1900	640	34	15110001037	1600	900	56

表4-2 判定結果(ろ過濃縮対応機関) cfu/100ml

受付No.	非濃縮	ろ過濃縮	回収率(%)	受付No.	非濃縮	ろ過濃縮	回収率(%)
15110001039	100	240	240	15110001058	370	8	2
15110001040	470	250	53	15110001059	3100	190	6
15110001041	2400	240	10	15110001060	3100	1100	35
15110001043	1900	560	29	15110001061	2000	1500	75
15110001044	2500	1100	44	15110001063	1800	530	29
15110001045	2300	500	22	15110001064	2600	600	23
15110001046	2400	530	22	15110001065	2100	1700	81
15110001047	0	110	-	15110001066	1100	920	84
15110001048	4800	3200	67	15110001067	1400	600	43
15110001049	0	0	-	15110001068	1000	15	15
15110001050	2900	1600	55				
15110001051	3500	1800	51	平均値	1900	650	34
15110001053	100	0	0	最大値	4800	3200	100
15110001054	2000	470	24	最小値	0	0	0
15110001055	2800	670	24	中央値	1900	500	29
15110001056	2100	54	3	対象機関	61	61	56
15110001057	2100	530	25	良好機関	56(92%)	38(62%)	

表5 判定結果(遠心濃縮対応機関) cfu/100ml

施設No.	非濃縮	遠心濃縮	回収率(%)	施設No.	非濃縮	遠心濃縮	回収率(%)
15110001001	2900	940	32	15110001049	0	0	-
15110001007	1100	110	10	15110001052	800	130	16
15110001008	2500	310	12	15110001054	2000	170	9
15110001012	600	270	45	15110001057	2100	260	12
15110001015	2200	890	40	15110001062	1400	60	4
15110001016	1000	630	63	15110001064	2600	140	5
15110001017	2900	610	21	15110001068	1000	80	8
15110001023	3000	420	14				
15110001027	1900	350	18				
15110001031	1700	140	8	平均値	1700	310	21
15110001032	2100	190	9	最大値	3000	940	63
15110001038	680	230	34	最小値	0	0	4
15110001042	700	440	63	中央値	1900	245	12
15110001043	1900	180	9	対象機関	22	22	21
15110001046	2400	270	11	良好機関	21(95%)	8(36%)	

表6 異なる7試料の非濃縮検査結果  
(北海道衛研調べ) cfu/100ml

試料	非濃縮
A	1400
B	1600
C	2700
D	1700
E	1200
F	1500
G	2900

レジオネラ属菌検査実施施設様各位

## 2015年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイのご案内

時下ますますご清祥のこととお慶び申し上げます。日頃は弊社製品をご愛顧賜りまして厚く御礼申し上げます。

さて、この度レジオネラ属菌検査を実施されている施設様を対象に、下記の要領で「2015年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」を実施致します。

日常の検査精度の確認のため、奮ってご参加いただきますようお願い申し上げます。

### ■参加要件

別紙1.「参加要件」を満たし、かつ、別紙2.「2015年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」による検査対応が可能な施設様

### ■実施概要

検査試料	レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料（凍結乾燥品、-18～-33℃保存） 同封書類：①試料送付のご案内、②試料の使用・操作手順、③成績入力方法
実施方法について	本サーベイは「厚生労働省科学研究費補助金（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」（添付資料：平成26年度レジオネラ属菌検査法研究.pdf 参照）で検討され報告された方法に基づいて実施します。検査方法は、別紙2.「2015年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」に従って実施をお願いします。
参加費	1セット 25,000円（消費税別）
参加募集数	500セット（募集数に達し次第、締め切らせていただきますのでご了承ください。）

### ■2015年度実施スケジュール（予定）

9月初旬	参加募集開始 ●弊社コスモ会ホームページ( <a href="https://cosmokai.com">https://cosmokai.com</a> )の2015年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ申込フォームから申込手順に従いお申込ください。 ●1施設様複数名のお申込みも可能です。検査試料はそれぞれの試験実施者様へお送りさせていただきます。
10月末日	参加募集締切
1月中旬	試料発送 ●検査試料到着後は直ちに-18～-33℃で保管願います。
1月中旬ごろ	請求書送付 ●請求書はお申込み者様へ一括でお送りさせていただきます。
1月中旬～下旬	検査実施 ●弊社コスモ会ホームページ( <a href="https://cosmokai.com">https://cosmokai.com</a> )にてIDとパスワードでログイン後、結果を入力していただけます。 ●成績入力方法は検査試料に同封の資料を参照してください。
2月上旬	回答締切
2月下旬	参加費お支払い期限 ●振込用紙をご利用いただくか、弊社指定の口座にお振り込みいただけます。なお、振込手数料は貴施設ご負担をお願い致します。銀行振り込みの控えをもって領収書とさせていただきます。
3月下旬	解析結果返却 ●弊社コスモ会ホームページ( <a href="https://cosmokai.com">https://cosmokai.com</a> )にてIDとパスワードでログイン後、結果を表示・ダウンロードができます。



日水製薬株式会社

### ■お問い合わせ先

日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局  
〒110-8736 東京都台東区上野3丁目23番9号  
TEL : 03-5846-5729 FAX: 03-5846-5679  
E-mail : [legi-srvy@nissui-pharm.jp](mailto:legi-srvy@nissui-pharm.jp)

# 参加要件

2015年9月14日

日水製薬株式会社

レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局

下記の 1. 使用要件、2. 使用承諾、および 3. 注意事項について了承頂けるご施設様に参加をお願いいたします。

## 1. 使用要件

### 1) 病原体のバイオセーフティーレベル(以下 BSL)規定について

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では、病原体を病原性の最も高いものを一種病原体として、四種病原体まで規定しています。

また、病原体の規定とは別に、病原体の取扱者に対しての感染被害などの健康影響に基づき、BSL が規定されています。この BSL にも基づき、最も低リスクの病原体を扱うリスク群を BSL1 として、BSL4 までのリスク群を規定しています。

本菌種は BSL2 に分類されます。BSL2 の微生物に対して設備・技術に対する要件を以下に記載いたします。

### 2) 施設要件

1. 実験室内に、適切に管理された微生物試験を行う管理区域を有すること。管理区域の出入口にはバイオハザードマークを標示すること。
2. 管理区域の出入口及び病原体保管庫は施錠が出来る構造であること。保管設備にはバイオハザードマークを標示すること。
3. 消毒用の薬剤が常備されており、壁・床等の消毒が可能であること。
4. 管理区域内もしくは実験施設内に、高圧蒸気滅菌装置、もしくはそれに準ずる滅菌設備を有すること。
5. 本サーベイでは、検査工程上エアロゾル発生の危険があることから、生物学用安全キャビネットが必要です。

### 3) 作業従事者要件

作業従事者に求められる基本的な要件について以下に記載します。

1. 1年に1回以上、病原体に関するセキュリティ及びセーフティに関して教育を受けていること。
2. 1の要件を満たさない場合には、微生物試験に習熟しており十分な知識・技能を有すること。あるいは微生物試験に習熟した人の指導のもとで試験を行うこと。

## 2. 精度管理サーベイ試料の使用承諾

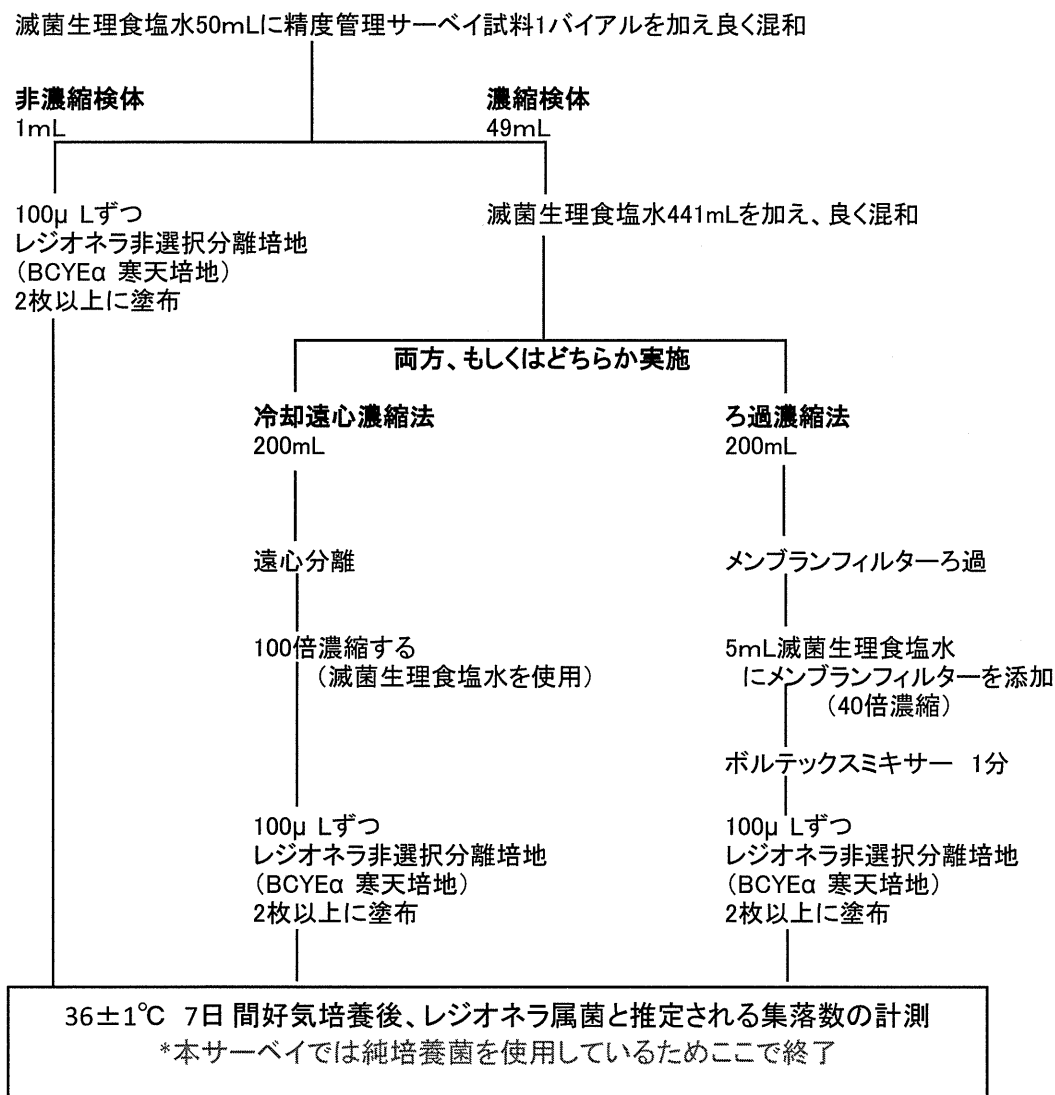
1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

## 3. 注意事項

予告なく実施スケジュールが変更となることがあります。変更後のスケジュールは、メール等にてご連絡いたします。

以上

## 2015年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法



■ 2015年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、「厚生労働省科学研究費補助金(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(添付資料:平成26年度レジオネラ属菌検査法研究.pdf)」で検討され報告された方法に基づき、本サーベイ用に変法したものです。

■ 2015年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイでは、上記研究で使用された試料と同様の試料を用います。本精度管理サーベイ試料は、昨年度の研究において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されています。(平成26年度レジオネラ属菌検査法研究.pdf 表9、表11、及び表12 参照) **2015年度サーベイにおいては、濃縮操作法や培地接種操作などの手技の精度確認に主眼を置くこととし、日常検査において濃縮加熱処理もしくは酸処理を実施している施設におかれましても、上記指定法に従って行った検査法での結果の報告をお願いします。**

■ 本精度管理サーベイ試料は、上記研究において、各濃縮操作や選択培地の選択剤による影響などの要因によっても菌数の減少が認められています。(平成26年度レジオネラ属菌検査法研究.pdf 表7、表8、表9、及び表10 参照)

■ この指定法に指定された方法以外の操作方法(例;遠心加速度、メンブランフィルター材質、レジオネラ非選択分離培地のメーカーなど)は、各施設の日常の操作方法で行ってください。

---

2015 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ 日程のご案内

日水製薬株式会社

---

※本メールは 2015 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイの代表者様および試験実施者様に送付しています。

このたびは 2015 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイに参加のお申し込みをいただきまして誠にありがとうございました。

2015 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイの日程をご連絡いたします。

- 本サーベイに関するご質問： 随時
- ID・PW お知らせハガキ発送： ～1 月 18 日(月)
- 試料発送： 1 月 18 日(月)
- 試料到着： 1 月 19 日(火)～20 日(水)
- 請求書発送： 1 月 18 日(月)
- 回答期限： 2 月 19 日(金)17 時まで
- 参加費振込期限： 2 月 29 日(月)
- 解析結果開示： 3 月 30 日(水)

2016 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイの実施を予定しています。  
詳細は決定し次第、メールおよび弊社ホームページにてお知らせいたします。

ご不明な点がございましたら、下記アドレスまでお気軽にご連絡ください。

\*\*\*\*\*

日水製薬(株) レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局

E-MAIL : [legi-srvy@nissui-pharm.jp](mailto:legi-srvy@nissui-pharm.jp)

\*\*\*\*\*

## 2015年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料送付のご案内

謹啓

日頃は弊社製品をご愛顧賜り厚く御礼申し上げます。

この度は、2015年度レジオネラ属菌細菌検査精度管理サーベイにお申し込み頂きましてありがとうございます。精度管理サーベイ試料を送付させていただきますのでご査収のほど、よろしくお願い申し上げます。

謹白

記

### 1. 送付内容一覧

- ・2015年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料送付のご案内（本案内状）
- ・レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試験項目、試料の使用・操作手順・・・5枚
- ・成績記入用メモ（成績のWeb入力の際にご活用ください）・・・3枚
- ・レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ資料受諾書兼承諾書・・・1枚
- ・精度管理サーベイ試料A（瓶ラベルに、「A」と記載）・・・1本

**\* 到着後直ちにマイナス18℃～マイナス33℃で適切に保管してください。**

**\* 到着後直ちに精度管理サーベイ試料の内容を確認し、書類の不備や精度管理サーベイ試料Aの破損等を認めた場合、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局にご連絡ください。**

### 2. 試験成績入力手順

1) 成績記入は試験成績入力専用URL (<https://cosmokai.com/lsurvey/login>) からIDとPW（別送ハガキ参照）を入力してログインしてください。

2) 登録画面が表示されますので、ご登録内容を確認してください。

3) データ入力画面に進み試験成績を入力して、最後に確認ボタンを押してください。

注意：同じ PC で複数の方が入力・確認を行う際には、ユーザー毎に作業完了後、一度ブラウザを全て閉じ、再度成績入力画面にアクセスし、ログインしてください。

表示されている内容が試験担当者ご本人のものであるかご確認ください。

### 3. 使用上の注意事項およびレジオネラ属菌検査精度管理サーベイのスケジュール

期 日	内 容
1/19(火)～ 20(水)	■ <b>精度管理試料到着</b> 精度管理サーベイ試料が到着します。送付内容を確認してください。
2/19(金)	■ <b>回答期限</b> 検査を実施し、上記試験成績入力手順にそって試験成績の入力をお願いいたします。回答期限を2/19(金) 17時とさせていただきます。
3/30(水)	■ <b>解析結果開示</b> 解析結果はコスモ会ホームページ ( <a href="https://cosmokai.com/">https://cosmokai.com/</a> ) メニューの「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」をクリックし、IDとPWを入力後、試験実施者様の画面にて 解析結果の表示・ダウンロードができます。

### 4. お問い合わせ先

日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局  
TEL : 03-5846-5729 FAX : 03-5846-5679  
E-mail : legi-srvy@nissui-pharm.jp

## レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試験項目、試料の使用方法・操作手順

### 1. レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試験項目

試料名	試験項目
精度管理サーベイ試料A (1本)	レジオネラ属菌

精度管理サーベイ試料は、菌をボール状に凍結乾燥処理しバイアル瓶に封入したもので、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ用に菌数を特別に調整しています。瓶ラベルには「A」と記載されています。

試験成績は、弊社コスモ会ホームページの試験成績入力専用 URL (<https://cosmokai.com/lsurvey/login>) から ID とパスワード(別送ハガキ参照)を入力してログイン後、データ入力画面にて入力してください。

レジオネラ属菌検査精度管理サーベイは、精度管理サーベイ試料Aの使用方法をご確認のうえ、試験を実施してください。

### 2. 精度管理サーベイ試料Aの使用方法・操作手順

非濃縮検体	濃縮検体	
	冷却遠心濃縮法	ろ過濃縮法
実施	両方、もしくはどちらか実施	

精度管理サーベイ試料A は、「レジオネラ属菌」の「非濃縮検体」及び「濃縮検体」の菌数試験に使用します。濃縮検体については、「冷却遠心濃縮法」及び「ろ過濃縮法」の両方、もしくはどちらかを実施してください。

以下の操作手順をよく読み、記載された方法に従って使用してください。

注：本操作手順（2015年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法）は、本精度管理サーベイ用のみの検査方法であり、サンプル量、濃縮倍率などにおいて、実検体の検査方法と異なる部分があります。

#### [1. 操作手順：試料液の調製]

1-1. 検査を開始する 30 分前に保管庫より取り出して室温に戻し、以下の操作を始めてください。

注：精度管理サーベイ試料 A は、到着後から試験開始日までマイナス 18℃～マイナス 33℃で保管してください。

注：室温に戻っていない瓶を開封した場合、瓶内壁の結露水により凍結乾燥処理したボールが瓶から取り出しにくい場合があります。

注：精度管理サーベイ試料は 1 個のみですので取扱いに十分注意のうえ試験を実施してください。



1-2. 500mL以上の滅菌容器に滅菌生理食塩水 50mL を用意し、精度管理サーベイ試料を加え良く混和します。これを試料原液とします。

注：精度管理サーベイ試料の特性上、本サーベイにおいては、すべての溶解液、希釈液は、**滅菌生理食塩水**を使用してください。

注：完全に溶解したことを確認してください。この時、加温はしないでください。

注：溶解後の保存は測定誤差をもたらす原因となりますので、溶解後は直ちに試験を開始し、操作の流れを止めることなく試験を終了させてください。

1-3. 試料原液から 1mL を正確に分取し、2. 非濃縮検体の試験に使用します。

1-4. 残りの試料原液 49mL に、滅菌生理食塩水 441mL を加え良く混和します。これを 3. 濃縮検体、冷却遠心濃縮法、及び 4. 濃縮検体、ろ過濃縮検体の試験に使用します。

注：試料が均一になるよう十分に混和してください。

注：混和後フタを開ける場合には、エアロゾルが発生しているため安全キャビネット内で操作を行ってください。特に転倒混和等を行った場合には、フタの開閉時における試料の飛散には十分注意してください。

## [2. 操作手順：非濃縮検体]

2-1. 1-3 で分取した 1mL の検体を、レジオネラ非選択分離培地 2 枚以上に、100  $\mu$ L ずつ塗布します。

■参考情報 「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」（以下、平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究）表 14 より抜粋

- ・検体の塗布方法は、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。
- ・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」）。

2-2. 36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 7 日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。

注：「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」（以下、平成 26 年度レジオネラ属菌検査法研究）において、GVPC 寒天培地等のレジオネラ選択分離培地へ接種した場合、レジオネラ非選択分離培地へ接種した場合に比べ集落数の減少が認められたため、レジオネラ非選択分離培地（BCYE  $\alpha$  寒天培地）を使用してください。

2-3. 試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

$$\underline{100\text{mL あたりの菌数}} = \text{平均値} \times 1,000 \quad (\text{本サーベイ用計算式})$$

## [3. 操作手順：濃縮検体、冷却遠心濃縮法]

3-1. 1-4 で作製した 490mL の検体から、200mL を分取して、遠心分離を行います。

注：本サーベイにおいては、検査手技以外の要因による結果のばらつきを抑えるため、日常検査

において異なる検水量を遠心分離している施設におかれましても 200mL の検水につき遠心分離を行ってください。

■参考情報 平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 12 より抜粋

- ・遠心加速度と遠心時間は、6000×g 10 分または 3000×g 30 分とする。ISO 11731: 1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 による。
- ・遠心加速度( $g$ )= $1118 \times \text{回転半径 (cm)} \times \text{回転速度}^2 \text{ (rpm)} \times 10^{-8}$  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。
- ・冷却設定温度は、15～25℃とする。

3-2. 3-1 で得られた検体を 100 倍濃縮します。

注：精度管理サーベイ試料の特性上、本サーベイにおいては、すべての溶解液、希釈液は、**滅菌生理食塩水**を使用してください。

■参考情報 平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 12 より抜粋

- ・沈殿物を巻き上げないように注意して上清を滅菌ピペットで慎重に除去し、沈殿物を含めて残りの体積を 2mL にする。
- ・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が考えられる。(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。

3-3. 3-2 で得られた検体を、レジオネラ非選択分離培地 2 枚以上に、100  $\mu$ L ずつ塗布します。

3-4. 36±1℃ 7 日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。

3-5. 試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

$$\underline{100\text{mL あたりの菌数}} = \underline{\text{平均値}} \times 100 \quad (\text{本サーベイ用計算式})$$

#### [4. 操作手順：濃縮検体、ろ過濃縮検体]

4-1. 1-4 で作製した 490mL の検体から、200mL を分取して、メンブランフィルターろ過を行います。

注：本サーベイにおいては、検査手技以外の要因による結果のばらつきを抑えるため、日常検査において異なる検水量をろ過している施設におかれましても 200mL の検水につきろ過を行ってください。

■参考情報 平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 11 より抜粋

- ・ポリカーボネートタイプフィルターは、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。
- ・包装製品ラベル側を補集面にする。(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打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。
- ・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  $\mu$ m 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  $\mu$ m 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。

ISO11731 : 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  $\mu$ m と規定されている。

- 4-2. 吸引後のメンブランフィルターを剥がします。
- 4-3. 50mL の遠沈管等に 5mL の滅菌生理食塩水を用意し、メンブランフィルターを添加します。
- 4-4. ボルテックスミキサーで 1 分間洗浄し、40 倍濃縮液とします。
- 4-5. 4-4 で得られた検体を、レジオネラ非選択分離培地 2 枚以上に、100 $\mu$ L ずつ塗布します。
- 4-6. 36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 7 日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。
- 4-7. 試料原液の 100mL あたりの菌数を算出します。  
$$\underline{100\text{mL あたりの菌数}} = \text{平均値} \times 250 \quad (\text{本サーベイ用計算式})$$

#### [5. 成績記入]

試験成績は、弊社コスモ会ホームページの試験成績入力専用 URL (<https://cosmokai.com/lsurvey/login>) から ID とパスワード(別送ハガキ参照)を入力してログイン後、データ入力画面に進み、試験成績を入力してください。入力後は、「入力内容を確認」をクリックし入力内容を確認した上で、「送信」をクリックして完了させてください。

注：同じ PC で複数の方が入力・確認を行う際には、ユーザー毎に作業完了後、一度ブラウザを全て閉じ、再度成績入力画面にアクセスし、ログインしてください。表示されている内容が試験担当者ご本人のものであるかご確認ください。

試験成績の Web 入力の際には、添付の「試験成績書メモ」をご活用ください。

次頁に「2015 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法 全体フローチャート」があるが、重複するので、この研究報告書では省略

### 試料受領書兼承諾書について

今回使用する菌株は、バイオセーフティーレベル2に該当する菌種ですので、本サーベイ試料受領書兼承諾書を以て、サーベイ試料受領と菌株取扱いに関する承諾の確認とさせていただきます。

サーベイ試料の内容をご確認いただき、下記サーベイ試料受領書兼承諾書に必要事項をご記入のうえ、1月21日(木)までに、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局宛にFAXしてください。

FAX:03-5846-5679

日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局宛  
レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料受領書兼承諾書

受領日： 2016年 1月 日

貴社名：	
ご所属部署：	
ご担当者名： <span style="float: right;">印</span>	
受領数	ID番号 <small>注</small>

注：弊社より、別途送付したはがきに記載したID番号をご記入ください。

本サーベイ試料の取扱いについては、バイオハザード防止のために以下のことを確認、承諾いたします。

1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

以上

# 成績記入用メモ (試験成績の web 入力の際にご活用ください)

貴社名	所属部署
氏名	I D

## ■ 共通設問

日常の検査に関してご回答ください。あてはまるものはすべて選択してください。

(1) 参考としている基準は何ですか。

- IS011731 : 1998       新版レジオネラ症防止指針 1999       第 3 版レジオネラ症防止指針 2009  
 上水試験法 2011       衛生試験法注解 2015       その他 \_\_\_\_\_

(2) 日常の検査法は何を採用していますか。

- 非濃縮       冷却遠心濃縮法       ろ過濃縮法       フィルター貼付法  
 その他 \_\_\_\_\_

(3) 日常検査の前処理は何を採用していますか。

- 処理なし       酸処理       熱処理       その他 \_\_\_\_\_

(4) 冷却遠心濃縮法を採用している方にお聞きします。

- 1) 検水量は何 mL ですか。 \_\_\_\_\_ mL  
2) 遠心加速度は何 g ですか。 \_\_\_\_\_ g  
3) 回転数は何 rpm ですか。 \_\_\_\_\_ rpm  
4) 遠心時間は何分間ですか。 \_\_\_\_\_ 分  
5) 設定温度は何℃ですか。 \_\_\_\_\_ ℃  
6) 冷却遠心機のローターは何ですか。

- 固定角ローター (アングルローター)  
 水平ローター (スウィングローター)  
 その他 \_\_\_\_\_

7) 上清除去の方法は何ですか。

- デカンテーション       ピペット等による吸引  
 その他 \_\_\_\_\_

8) 上清は全量除去しますか。

- 全量除去       一部残す \_\_\_\_\_ mL

9) 全量除去の場合、菌体回収のための溶液は何ですか。

- 滅菌精製水       滅菌生理食塩水  
 滅菌リン酸緩衝液       その他 \_\_\_\_\_

10) 濃縮倍率は何倍ですか。

\_\_\_\_\_ 倍

(5) ろ過濃縮法を採用している方にお聞きします。

1) 検水量は何 mL ですか。 \_\_\_\_\_ mL

2) フィルターから菌体を回収するための溶液は何ですか。

- 滅菌精製水       滅菌生理食塩水  
 滅菌リン酸緩衝液       その他 \_\_\_\_\_

3) フィルターメーカーはどちらですか。

- ミリポア       アドバンテック

その他 \_\_\_\_\_

- 4) フィルター表裏は統一して使用していますか。 している していない
- 5) フィルターの材質は何ですか。 ポリカーボネート ナイロン セルロースアセテート  
セルロース混合エステル その他
- 6) フィルターの直径は何 mm ですか。  mm
- 7) フィルターのポアサイズは何  $\mu\text{m}$  ですか。   $\mu\text{m}$

(6) フィルター貼付法を採用している方にお聞きします。

- 1) 検水量は何 mL ですか。  mL
- 2) フィルターメーカーはどちらですか。 ミリポア アドバンテック  
その他
- 3) フィルター表裏は統一して使用していますか。 している していない
- 4) フィルターの材質は何ですか。 ポリカーボネート ナイロン セルロースアセテート  
セルロース混合エステル その他
- 5) フィルターの直径は何 mm ですか。  mm
- 6) フィルターのポアサイズは何  $\mu\text{m}$  ですか。   $\mu\text{m}$

(7) 酸処理を行っている方にお聞きします。

- 1) 酸処理剤は何を使用していますか。 0.2HCl・KCl 溶液 (pH2.2)  
その他
- 2) 酸処理剤は市販品を使用していますか。自家調製を使用していますか。  
市販品を使用 自家調製品を使用
- 3) 添加量は何 mL ですか。 検体  mL に対し、酸処理剤  mL
- 4) 処理温度は何度ですか。 室温 その他  °C
- 5) 処理時間は何分ですか。  分

(8) 加熱処理を行っている方にお聞きします。

- 1) 検水量は何 mL ですか。  mL
- 2) 加熱には何を使用していますか。 ウォーターバス ヒートブロック  
インキュベータ その他
- 3) 処理温度は何度ですか。  °C
- 4) 処理時間は何分ですか。  分

(9) 使用している培地とメーカーは何ですか。

培地名\メーカー	日水製薬	栄研化学	関東化学 (OXOID)	日本BD	日研生物医学	シマダクス・ビオメディア	極東製薬工業	メルク	その他
BCYE α 寒天培地									
GVPC 寒天培地									
WYO α 寒天培地									
MWY 寒天培地									
その他									
その他									

(10) 培地は市販の生培地を使用していますか？自家調製を使用していますか。

市販の生培地      自家調製

(11) 培地は1検体あたり合計何枚に接種していますか。      枚

(12) 月あたりの検体数はおよそどのくらいですか。

夏期（5～10月）      検体/月

冬期（11～4月）      検体/月

## ■結果回答

### 非濃縮法

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

CFU/100mL

(2) 使用した培地の枚数は何枚ですか。  枚

(3) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	6 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

(4) 使用した培地は何ですか。

BCYE  $\alpha$  寒天培地       その他

(5) 培地メーカーはどちらですか。

日水製薬       栄研化学       関東化学 (OXOID)       日本 BD       日研生物医学  
 シスメックス・バイオメリュー       極東製薬工業       メルク       その他

(6) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販の生培地       自家調製

(7) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

検査当日       前日以前



## 冷却遠心濃縮法

(1) 100mLあたりの菌数をご記入ください。

CFU/100mL

(2) 使用した培地の枚数は何枚ですか。  枚

(3) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	6 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

(4) 遠心加速度は何 g ですか。  g

(5) 回転数は何 rpm ですか。  rpm

(6) 遠心時間は何分間ですか。  分

(7) 設定温度は何°Cですか。  °C

(8) 冷却遠心機のローターは何ですか。  
 固定角ローター (アングルローター)  
 水平ローター (スウィングローター)  
 その他

(9) 上清除去の方法は何ですか。  
 デカンテーション  ピペット等による吸引  
 その他

(10) 上清は全量除去しますか。  全量除去  一部残す  mL

(11) 使用した培地は何ですか。  
 BCYE  $\alpha$  寒天培地  その他

(12) 培地メーカーはどちらですか。  
 日水製薬  栄研化学  関東化学 (OXOID 製品)  日本 BD  日研生物医学  
 シスメックス・バイオメリュー  極東製薬工業  メルク  その他

(13) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。  
 市販の生培地  自家調製

(14) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。  検査当日  前日以前

## ろ過濃縮法

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

	CFU/100mL
--	-----------

(2) 使用した培地の枚数は何枚ですか。 \_\_\_\_\_ 枚

(3) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	6 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)							

(4) フィルターメーカーはどちらですか。  ミリポア  アドバンテック

その他 \_\_\_\_\_

(5) フィルター表裏は、包装製品のラベル側を捕集面にして使用しましたか。

した  しない

(6) フィルターの材質は何ですか。  ポリカーボネート  ナイロン  セルロースアセテート

セルロース混合エステル  その他 \_\_\_\_\_

(7) フィルターの直径は何 mm ですか。 \_\_\_\_\_ mm

(8) フィルターのポアサイズは何  $\mu\text{m}$  ですか。 \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$

(9) 使用した培地は何ですか。

BCYE  $\alpha$  寒天培地  その他 \_\_\_\_\_

(10) 培地メーカーはどちらですか。

日水製薬  栄研化学  関東化学 (OXOID 製品)  日本 BD  日研生物医学

シスメックス・ビオメリユール  極東製薬工業  メルク  その他 \_\_\_\_\_

(11) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販の生培地  自家調製

(12) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

検査当日  前日以前

平成 27 年度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」  
分担研究報告書

「水試料からのレジオネラ属菌検出法のマニュアルの作成」

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	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所微生物部
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
研究分担者	緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター

研究要旨

レジオネラ属菌の培養検査は容易ではない上、水試料におけるレジオネラ属菌の検査は定量検査であるため、検査の操作には細かい配慮が必要である。地方衛生研究所や民間の検査機関を対象にした水試料からのレジオネラ属菌検査法の研修を実施することで、検査法が普及するとともに検査技術が全国的に向上することが期待されることから、今年度は検討グループを構成し、研修で使用するマニュアルの作成を協議した。マニュアルにおける検査法の各項目の構成や注意点等の記載方法等を検討して、使いやすく、わかりやすいマニュアルの作成を試みた。マニュアルが研修において使用され、検査法の普及と検査技術の向上に効果が上がることが期待される。

A. 研究目的

水試料からのレジオネラ属菌の検出は、試料の濃縮、前処理、選択分離培地での分離培養により行うが、これらの操作における手技の良し悪しや手法の選択、培地の選択等が菌の検出に大きく影響する。そのため、検出法の研修の必要性が以前から指摘されていた。

研修の実施には、検査法のマニュアルの

整備が不可欠であることから、研究班では研修実施の検討と並行して、マニュアルの作成を協議することとした。

B. 研究方法

地方衛生研究所や民間検査機関において実施される、水試料からのレジオネラ属菌検出法の普及を目的とした研修会の開催時

に使用するマニュアルの作成を試みた。研究班の構成メンバーの中から、マニュアル作成検討グループを作り、マニュアル作成の協議を行った。

水試料からのレジオネラ属菌検出法は本研究班が推奨する検査法を参照し、これに基づいてマニュアル作成を検討した。

### C. 研究結果及び考察

水試料からのレジオネラ属菌検査法の概要を図1に示した。既存の検査法・試験法の解説書（上水試験法等）を参考にしながら、水試料からのレジオネラ属菌検査法の概要に基づいてマニュアルの構成を形作った。この段階で作成したマニュアルの構成を表1に示した。検査法の各段階を項目として建て、各項目の細項目の構成をできるだけ統一することで、容易に理解できるようにした。これにより検査法実施時に簡単に参照できることが期待される。

レジオネラ属菌の培養検査は必ずしも容易ではないため、検査の各段階における操作において細かい配慮や注意が不可欠である。さらに、水試料からのレジオネラ属菌の検出は、水試料中の菌数を測定する定量試験であるため、試料からの回収率に配慮しながら注意深く検査を進めなければならない。こうした注意点や操作上のアドバイスをマニュアルに明記することで、検査技術の向上の効果が顕れることを期待した。

各操作において、捜査上の注意点は項目内で番号を付し、その内容を実線で囲った枠内に示した（表2）。また、操作を進める上での留意点や検出率を向上させるための

工夫する点等をワンポイントとして、点線の枠で囲って示した。

今年度は研究班の検討グループでマニュアルの構成を検討し、構成の概要を作成した。今後、水試料のレジオネラ属菌検査法の標準的検査法を作成された時点で、これに基づいて研修用のマニュアルを作成することとする。作成したマニュアルを用いて検査法の研修を行い、検査法が普及し、全国的に検査技術が向上することが期待される。

### D. 結論

検査法の研修時に使用することを目的に、検討グループを構成して、使いやすくわかりやすいマニュアルの作成を試みた。検査法の操作段階ごとに項目立てし、各項目の構成を作成した。さらに各項目における注意点やポイントを見やすくするための工夫を施した。水試料からのレジオネラ属菌検査法の標準法が作成された時点で、今回検討した構成に基づいて研修用のマニュアルを作成することとした。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし