

令和4年度富山県病原体等検査の精度管理調査(2022年度) －浴槽水を想定した試料水におけるレジオネラ属菌検査－

磯部 順子 金谷 潤一 前西 絵美 綿引 正則
小坂 真紀 木全 恵子 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Pathogen in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2022 – Test of *Legionella* spp. in Sample Water Assuming Bath Water –

Junko ISOBE, Jun-ichi KANATANI, Emi MAENISHI, Masanori WATAHIKI,
Maki KOSAKA, Keiko KIMATA, and Kazunori OISHI

目的：本県では、富山県病原体等検査業務管理要綱に基づき、県内の病原体等検査施設に対する検査水準の維持、向上を目的として精度管理調査を平成28年度より実施している。令和4年度の調査は、四類感染症（全数報告疾患）に位置づけられているレジオネラ症について、積極的疫学調査として実施される浴槽水のレジオネラ属菌検査とした。検査手順だけでなく、報告（数値）に対する考え方について協議することも目的とした。

材料と方法：対象の施設は新川厚生センター、中部厚生センター、高岡厚生センター、砺波厚生センターおよび衛生研究所の5機関である。検査試料は衛生研究所で作製し、令和5年1月24日に概要説明の後、担当者に配布した。結果は2月24日までの報告とし、各々の報告書・検査記録などから集計・解析した。

試料は、当所保管株（表1）を30℃3日間平板培養し、異なる濃度となるよう2本の生理食塩水に接種し、検体A、検体Bとして配布した。検査は各機関の検査方法で行う。ただし、本調査においては、日常的に使用する選択分離培地（選択培地）の他に非選択分離培地（非選択培地）の菌数も測定することとした。結果は、通常の浴用水検査と同様、100 µl中のレジオネラ属菌の菌数を測定し、100 ml中の菌数に換算して報告する。結果の解析は、各機関の検査記録に基づきまとめた。加えて、非選択培地における発育菌数に対して、選択培地での発育菌数から、その選択培地におけるレジオネラ属菌発育抑制率を求めた。

表1. 配布試料と接種菌名

試料名	接種菌名(選択培地による推定値)
検体A	<i>Legionella pneumophila</i> 血清群1 (795cfu/100ml) *
検体B	<i>Legionella pneumophila</i> 血清群1 (1,490cfu/100ml)

*添加菌を選択分離培地2枚で測定した平均値から推定される菌数

結果：

(1) 結果の良好範囲

良好範囲は、レジオネラ属菌検査の外部精度管理調査（日水製薬株式会社）で参考としている一般財団法人食品薬品安全センターの考え方「全体の平均値の30％、300％」を採用し、非濃縮の場合は下限値、上限値を全機関の結果の平均値の30％、300％とした（表2：a）。また、濃縮法で得られた菌数の平均値（b）、および推定値（c）から求めた良好範囲も示した。濃縮操作による回収率は、非選択培地、選択培地別にそれぞれ濃縮後の菌数を濃縮前（非濃縮）の菌数と比較して求めた。回収率の良好範囲は前述の外部精度管理に倣い、20～100％とした。

(2) 結果

各機関の記録から得られた測定値を解析に用いた。すべての結果を表3に示す。機関Eを除き、各培地1枚を使用していた。

① 非濃縮法による結果

はじめに選択培地での結果について述べる。機関Eは3枚の培地で測定した結果の平均値である。検体A：1機関（機関D）でコロニーを認めなかった（0 cfu/100 ml）と回答した。その他の機関は1,000～2,000 cfu/100 mlと回答し、平均値は

1,340 cfu/100 mlであった。機関Dを除き、良好範囲（402～4,020 cfu/100 ml）であった。

検体B：菌数は2,000～4,000 cfu/100 ml、平均2,940 cfu/100 mlで、いずれも良好範囲内であった。

次に非選択培地の結果について述べる。

検体A：1機関（機関B）がコロニーを認めなかった（0 cfu/100 ml）と回答した。3機関は2,000 cfu/100 ml、1機関は4,000 cfu/100 mlと回答した。機関Bを除き、菌数は良好範囲内であった。

検体B：菌数は1,000～6,000 cfu/100 ml、平均は3,340 cfu/100 mlであった。すべての機関の菌数が良好範囲内であった。

選択培地のレジオネラ属菌発育抑制率は、3機関では0～15%と大きく抑制されることなく菌が発育したが、1機関では選択培地で菌の発育が認められなかった。逆に、非選択培地で菌の発育が認められなかったが、選択培地に菌を認めた機関もあった。

② 濃縮法による結果の解析

全ての機関がろ過法によって濃縮操作を実施していた。機関Eは5枚の培地で測定した結果の平均値である。はじめに選択培地での結果について述べる。

検体A：菌数は24～320 cfu/100 ml、平均98.8 cfu/100 mlで、機関Eが下限値30 cfu/100 mlからわずかに外れ、機関Dは上限値297 cfu/100 mlを外れた。

検体B：菌数は42～1,090 cfu/100 mlで、平均452 cfu/100 ml、機関Eは下限値（136 cfu/100 ml）を外れた。次に非選択培地について述べる。
検体A：菌数は70～510 cfu/100 ml、平均218 cfu/100 mlで、すべてが良好範囲内であった。

検体B：菌数は270～1,560 cfu/100 ml、平均774 cfu/100 mlで、すべてが良好範囲内であった。

選択培地におけるレジオネラ属菌発育抑制率は、

検体Aで平均54.7%、検体Bで41.6%とおおよそ5割が発育抑制されていた。

③ 回収率

選択培地における回収率は、検体Aで1.4～3.5%（平均2.6%）、検体Bで1.6～27.3%（平均15.4%）、非選択培地では検体Aで3.5～12.8%（平均9.5%）、検体Bで7.9～78.0%（平均23.2%）で、全体的に低かった。検体Aでは培地の選択性に関わらずすべての機関が良好範囲を外れ、検体Bでは選択培地で機関A、Dが、非選択培地では機関A、C、Dの3機関が良好範囲内の回収率であった。

④ 夾雑菌抑制処理によるレジオネラ属菌数の変動

表3(b)に夾雑菌の発育を抑制するための酸処理、加熱処理、加熱後酸処理を実施した後の菌数を示した。酸処理では、検体Aで2機関が、検体Bでは4機関がレジオネラ属菌を検出した。機関Aの菌数は未処理濃縮検体と比べて、選択培地でおおよそ70%、非選択培地でおおよそ40%と、酸処理後にも発育した菌が多かった。機関Aでは使用した酸処理液が他の機関と異なるメーカーであった点が要因の一つとして考えられるが、明らかではない。加熱処理については、非選択培地で3機関、選択培地で1機関のみ、菌の発育を確認したが、その菌数（10～30 cfu/100 ml）は少なかった。

⑤ 最終報告数

各機関の最終報告数を表4に示す。ろ過濃縮法の結果を報告した機関は少なく、検体Aでは機関A（70 cfu/100 ml）とD（320 cfu/100 ml）、検体Bでは機関A（610 cfu/100 ml）のみであった。その他の機関は非濃縮法の結果を報告し、それらのレジオネラ属菌数は、検体Aで1,000～2,000 cfu/100 ml、検体Bで2,000～4,000 cfu/100 mlであった。ろ過濃縮法に比べ非濃縮法で菌数が多く、

表2. 本調査におけるレジオネラ属菌数の良好範囲

(a) 非濃縮検体

選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml		非選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml	
A	1,340	下限値	402	2,000		下限値	600
		上限値	4,020			上限値	6,000
B	2,940	下限値	882	3,340		下限値	1,002
		上限値	8,820			上限値	10,020

(b) 濃縮検体

選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml	非選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml
A	99	下限値 29.7	218	下限値	65.4
		上限値 297			654
B	452	下限値 136	774	下限値	232
		上限値 1,357			2,320

(c) 推定値を基本とした良好範囲

選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml	非選択培地 平均値		レジオネラ属菌数 cfu/100ml
A	794	下限値 239	975	下限値	293
		上限値 2,385			2,930
B	1,490	下限値 447	2,190	下限値	657
		上限値 4,470			6,570

表 3. 機関別の報告数

(a) 機関別レジオネラ属菌報告数

検体名	機関名	レジオネラ属菌数(非濃縮法) cfu/100ml		レジオネラ属菌 発育抑制率(%)*	レジオネラ属菌数(濃縮法) cfu/100ml		レジオネラ属菌 発育抑制率(%)*	回収率***(%)	
		選択培地	非選択培地		選択培地	非選択培地		選択培地	非選択培地
A	A	2,000	2,000	0.0	70**	250	72.0	3.5	12.5
	B	1,000	0		30	80	62.5	3	UT
	C	2,000	2,000	0.0	50	70	28.6	2.5	3.5
	D	0	4,000	100.0	320	510	37.3	UT	12.8
	E	1,700	2,000	15.0	24	180	86.7	1.4	9.0
平均		1,340	2,000	33.0	98.8	218	54.7	2.6	10.9
推定値		795	975						
B	A	3,000	6,000	50	610	1,220	50.0	20.3	20.3
	B	2,000	3,000	33.3	150	270	44.4	7.5	9.0
	C	3,000	1,000	-200	370	450	17.8	12.3	45.0
	D	4,000	2,000	-100	1,090	1,560	30.1	27.3	78.0
	E	2,700	4,700	42.6	42	370	88.6	1.6	7.9
平均		2,940	3,340	12.0	452.4	774	41.6	15.4	23.2
推定値		1,490	2,190						

*コロニー抑制率：(非選択培地菌数－選択培地菌数) / 非選択分離培地 × 100

**太字：最終報告数とした菌数

***回収率：濃縮法菌数/非濃縮菌数 × 10

(b) 機関別夾雑菌処理後のレジオネラ属菌報告数

検体名	機関名	未処理濃縮検体		酸処理		加熱処理		加熱後酸処理	
		選択培地	非選択培地	選択培地	非選択培地	選択培地	非選択培地	選択培地	非選択培地
A	A	70	250	50	80	0	0	0	10
	B	30	80	10	10	0	0	NT	NT
	C	50	70	0	0	0	0	NT	NT
	D	320	510	0	0	0	30	NT	NT
	E	24	180	0	0	0	0	NT	NT
B	A	610	1220	400	440	0	0	0	0
	B	150	270	30	30	0	0	NT	NT
	C	370	450	0	10	0	0	NT	NT
	D	1090	1560	10	10	10	20	NT	NT
	E	42	370	0	0	0	10	NT	NT

例えば、検体 A では、機関 C (2,000 cfu/100 ml) の菌数が機関 A の菌数 (70 cfu/100 ml) のおよそ 30 倍の結果となっている。全体的に非濃縮法による結果は推定値よりも多い傾向を示した。機関 E は 5 枚の培地の平均値の結果である。

考察：富山県におけるレジオネラ症患者報告数は令和元年に 54 名で、その後、コロナ禍で令和 2 年に 36 名に減少したものの、その後 41 名、44 名と再び増加傾向を示している。令和 4 年の人口 10 万人当たりの患者数（罹患率 4.25）は全国でもっとも高い状況が続いている。このような背景の中、富山県において、患者発生時に感染源調査の一環として浴用水検査がしばしば求められる。この検査については、いわゆる公定法はなく、検査機関がそれぞれ自施設の標準作業書に従って実施するのが現状である。浴用水中のレジオネラ属菌は、公衆浴場における衛生等管理要領 [1] の水質基準の中で検出されてはならないとされ、具体的には 10 cfu/100 ml 未満となっている。これは、レジオネラ属菌の増菌（液体）培地がないため、浴用水を 100 倍濃縮して、その 100 μ l 中のレジオネラ属菌を数え、100 ml 中の菌数で表示する方法の

検出限界の数値とされている。検出限界が平板上の 1 コロニー、すなわち 100 ml 中に 10 コロニーと換算される数値が示されているが、あくまで検出されてはならないというのが本来の考え方である。

令和元年にレジオネラ属菌検査手順について、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（令和元年 9 月 19 日薬生衛発 0919 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）を参照することという通知が発出され、推奨される標準検査法が示された。これは ISO11731 の改訂を踏まえ、その基本的な考え方を取り入れた方法となっている。この中では濃縮法、非濃縮法の両方について検査するよう推奨しているが、消毒後の陰性化確認のための検査など、レジオネラ属菌が極めて少ないことが予想される検体については非濃縮検査を省略してもよいと示されている。今回の調査で、機関 A は日常の検査では ATP の数値により非濃縮検査を省略すると言及しているが、これは標準検査法の考え方と合致しており、有用な選択であると思われる。この場合、基準となる ATP の数値について根拠となるデータがあることが望ましい。

表 4. 機関別の最終報告数

検体名	機関名	レジオネラ 属菌数 cfu/100ml		検体名	機関名	レジオネラ 属菌数 cfu/100ml	
	A	70	濃縮検体		A	610	濃縮検体
	B	1,000	非濃縮検体		B	2,000	非濃縮検体
A	C	2,000	非濃縮検体	B	C	3,000	非濃縮検体
	D	320	濃縮検体		D	4,000	非濃縮検体
	E	1,700	非濃縮検体		E	2,700	非濃縮検体

一方、報告する結果は、濃縮、非濃縮、培地の種類、夾雑菌の処理方法にかかわらず、100 ml あたりでもっとも多い菌数とすることになっている。ただし、前述の標準検査法には使用する培地の種類や枚数までには言及されていないため、それぞれの機関でそれらを定めた標準作業書を作成する必要がある。本調査では、非濃縮法と濃縮法の菌数が大きく違っていたが、いずれも10 cfu/100 ml という基準値を大きく超えていたため、浴用水の衛生管理の監視指導の根拠となるデータを示すことができる結果であった。しかしながら、回収率という点で見ると、本調査では良好範囲以下の結果が多く、今後の検討課題であることが明確になった。とりわけレジオネラ菌数の少ない検体の場合、ろ過濃縮法で確実にレジオネラ属菌が検出できるか、内部精度管理などで確認、検証すべきである。レジオネラ属菌の濃縮法による回収率については、前述の外部精度管理の報告書において、0.0～183.3%と幅広く、中央値は45%程度と報告されている。また、「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におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」の報告書においても、施設における内部精度管理として実施した添加回収試験の回収率は3.1～97.0%、平均52.3%と報告され、多くの機関が半数程度の回収率となっており、レジオネラ属菌検査の難しさを示している。レジオネラ属菌の検査は、培地にコンラージ棒で広く塗抹する方法であるが、レジオネラ属菌は乾燥にきわめて弱く、塗抹時にも細心の注意が必要であることが報告され、培養そ

のものが難しいことは周知されている。今回の結果では非選択培地でレジオネラ属菌が良好に発育しているので、コンラージ棒による塗抹操作に問題はないものと思われるが、ろ過濃縮することで大幅に発育菌数が減少するのは、ろ過作業の中でフィルター孔にトラップされるだけでなく、陰圧がかかることやボルテックス操作により、菌がダメージを受けることも要因の一つかもしれない。今回の調査の中で、夾雑菌の抑制処理法により、レジオネラ属菌数もかなり減少することが明らかとなった。実際の検体では夾雑菌が発育抑制されるので、これらの処理法によりレジオネラ属菌が選択的に発育する場合もあるが、一部のレジオネラ属菌は発育を抑制されているものと考えべきである。この発育抑制は保存株を使用した添加回収試験の時にとりわけ顕著に見られる。添加回収試験を行う場合の菌株の選択、培養法など、精度管理の方法における検討課題も明らかとなった。

レジオネラ属菌検査は、菌の培養そのものに特徴があり、困難さも伴う。これを踏まえ、それぞれの過程について、できる限り検証し、改善していく努力が必要である。加えて、厚労科研の内部精度管理に関する報告書を参考に、内部精度管理を実施することが望ましい。

文 献

1. 平成12年12月15日 生衛発第1,811号各都道府県知事・各政令市市長・各特別区区长宛 厚生省生活衛生局長通知 別添1 公衆浴場における水質基準等に関する指針