

注意が必要である。

昨年度報告書にも記載したが、今後は、斜光法を広く普及するための研修システム等の構築が望まれる。なお、北海道内では、北海道立衛生研究所をはじめ、レジオネラ属菌検査機能を有する道立10カ所のセンター保健所、ならびに函館市衛生試験所、旭川市保健所等の行政機関において、すでに斜光法を正式に導入し、環境、臨床試料を問わず、効果を上げていることを申し添える。

2) 分離培地の保存に関する検討

保存期間中、結露や乾燥等のトラブルなく保存することができれば、少なくとも多くのメーカーで市販分離生培地の有効消費期限として設定されている製造後3ヶ月間は、レジオネラ属菌の発育性能については保持されていると思われた。しかしながら、どの程度の結露や乾燥までが、その発育性能を保持できているかは判断が非常に難しい。ただしレジオネラ属菌の培地上での発育至適pHは 6.9 ± 0.1 とされている⁷⁾など、その発育には適切な環境が必要であると思われる。検査者は、使用前に保存分離培地の状態を十分に確認し、検査に使用できるかどうかを判断する必要があると思われる。

E. 参考文献

- 1) 森本 洋、宮坂次郎、中村昭子:検査法の検討1 効率の良いコロニー観察法、生培地の比較検討:厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)「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」平成19年度総括・分担研究報告書 pp.123-137
- 2) 改訂・レジオネラ属菌防除指針-温泉

利用入浴施設用一、(財)全国環境衛生営業指導センター 全国旅館環境衛生同業組合連合会、東京、1999、pp.15-27

- 3) 厚生省生活衛生局企画課監修:新版レジオネラ症防止指針、財団法人ビル管理教育センター、東京、1999、pp.85-94
- 4) 社団法人日本水道協会編:上水試験方法2001年版、社団法人日本水道協会、東京、2001、pp.654-658
- 5) 社団法人日本水道協会編:上水試験方法解説編2001年版、社団法人日本水道協会、東京、2001、pp.886-888
- 6) 日本薬学会編:衛生試験法・注解2005、金原出版、東京、2005、pp.103-105
- 7) 厚生省生活衛生局企画課監修:新版レジオネラ症防止指針、財団法人ビル管理教育センター、東京、1999、p.9

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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、日本環境感染学会誌2010;25(1):8-14.

2. 学会発表

- 1) 森本 洋、清水俊一、池田徹也、山口敬治:レジオネラ属菌培養法の検討-分離培地と集落について-、第77回日本細菌学会北海道支部学術総会、札幌、2009年9月
- 2) 森本 洋、清水俊一、池田徹也、山口敬治:レジオネラ属菌検査法の検討-非選択分離培地の活用法と濃縮法の違いによる検査結果への影響-、第61回北海道公衆衛生学会、札幌、2009年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

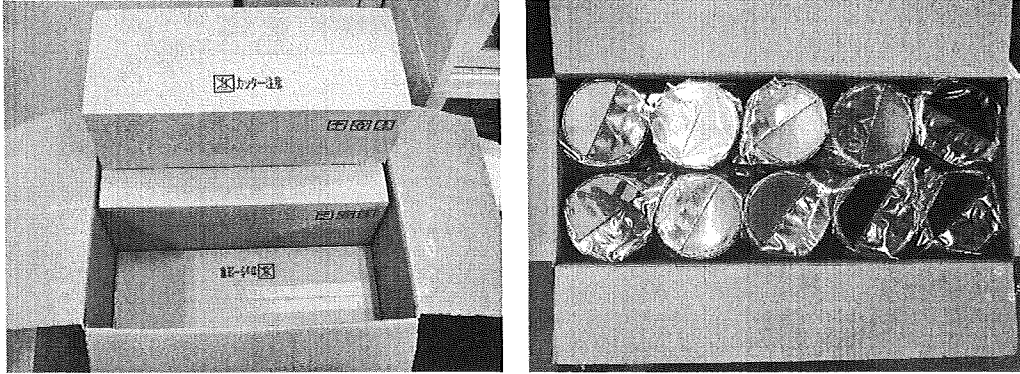


図1 GVPC 培地保存形態

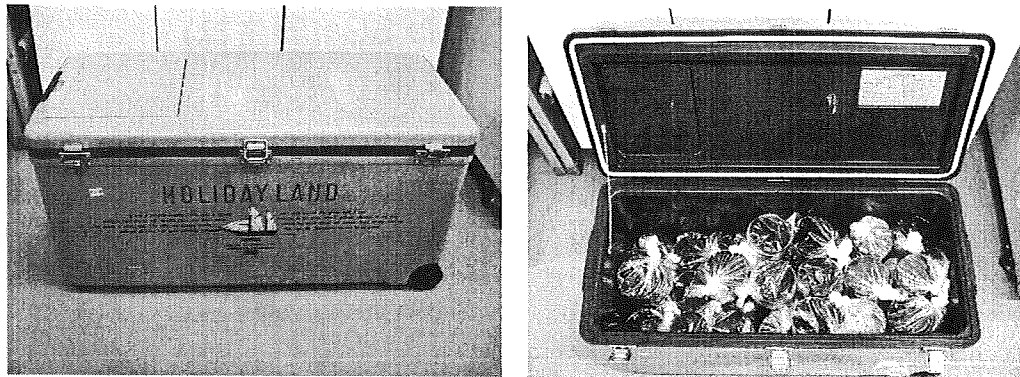


図2 BCYE α およびMWY 培地保存形態

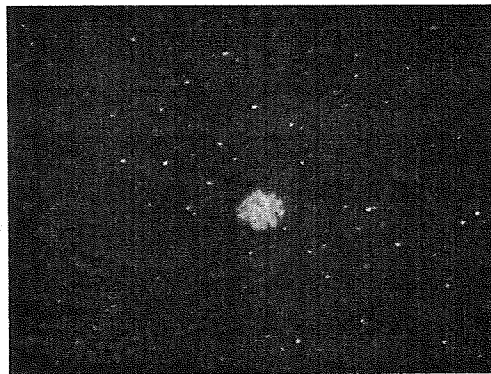
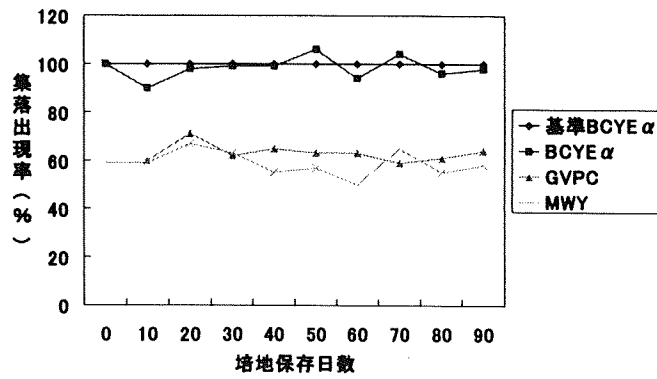
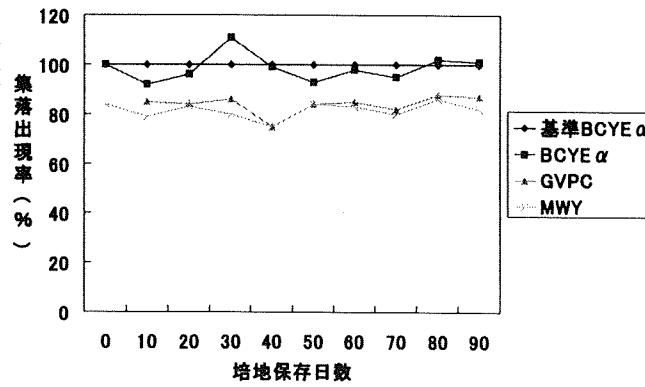


図3 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落
 培養30～35時間目の浴槽水で確認された *L.pneumophila* SG6
 (自家調製MWY培地: Oxoid、撮影倍率 $\times 204$)

Legionella GTC296 出現率の変化



Legionella pneumophila SG1(野生株) 出現率の変化



Legionella micdadei (野生株) 出現率の変化

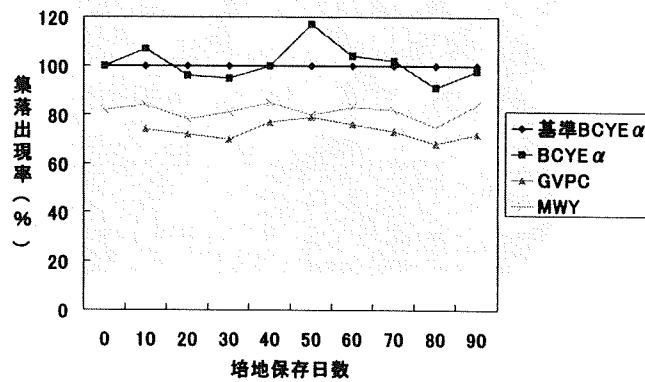


図4 各培地保存段階における供試菌株の出現率の変化

表1 各培地保存段階における 供試菌株の出現率の変化(%)

Legionella GTC296 出現率の変化(%)

	実験初日 ¹⁾	90日目 ²⁾	序盤	中盤	終盤	全体
BCYE α	100	98	97	100	99	98
MWY	59	58	62	54	59	59
GVPC	60	64	64	64	61	63

- 1) BCYE α 、MWYは保存0日目の値
GVPCは保存10日目の値
2) 保存90日目の値
序盤: 序盤1ヶ月間の平均値
中盤: 中盤1ヶ月間の平均値
終盤: 終盤1ヶ月間の平均値
全体: 90日間の平均値

Legionella pneumophila SG1(野生株) 出現率の変化(%)

	実験初日 ¹⁾	90日目 ²⁾	序盤	中盤	終盤	全体
BCYE α	100	101	100	97	100	99
MWY	84	82	82	81	83	82
GVPC	85	87	85	81	86	84

- 1) BCYE α 、MWYは保存0日目の値
GVPCは保存10日目の値
2) 保存90日目の値
序盤: 序盤1ヶ月間の平均値
中盤: 中盤1ヶ月間の平均値
終盤: 終盤1ヶ月間の平均値
全体: 90日間の平均値

Legionella micdadei (野生株) 出現率の変化(%)

	実験初日 ¹⁾	90日目 ²⁾	序盤	中盤	終盤	全体
BCYE α	100	98	100	107	97	101
MWY	82	84	81	83	80	81
GVPC	74	72	72	77	71	73

- 1) BCYE α 、MWYは保存0日目の値
GVPCは保存10日目の値
2) 保存90日目の値
序盤: 序盤1ヶ月間の平均値
中盤: 中盤1ヶ月間の平均値
終盤: 終盤1ヶ月間の平均値
全体: 90日間の平均値

【資料】

- 1) 斜光法およびコロニー PCR との組み合わせによる培養法の短縮に向けた検討
- 2) 斜光法を導入した培養法の検査マニュアル作成に向けた検討

研修報告書

富山県衛生研究所細菌部 磯部順子

1. はじめに

レジオネラの検査は、遺伝子検査での定量法が検討されているが、現時点では未だ培養法による定量値が基準となっている。遺伝子検査法においては、死菌の問題が挙げられるが、培養法においては時間がかかることが問題であると思われる。したがって、効率よく、さらに精度の高い方法として、実体顕微鏡を用いた、斜光法による培養法の確立が検討されている。昨年と今年の2年間にわたり、この研修に参加し、従来法との比較を行った。

2. 方法

平成21年9月～11月に搬入された浴用水41検体について検討した。搬入された検体は1000mlを吸引ろ過し、濃縮したのち、酸・加熱処理後の検体を100 μ l, GVPC培地(日研)およびMWY培地(OXOID)に塗抹し、それぞれ7日間培養した。ただし、培養3日目にはコールドランプにより2方向から平板に光を当て、レジオネラ特有のモザイク模様、カットガラス様に見えるコロニーについて、その時点で血液寒天とBCYE培地へ接種、もしくはLAMP法によりレジオネラであることを確認した。斜光法による釣菌は色/形状がことなる代表株を選択した。また、濃縮検体について、

LAMP法による遺伝子検査も行った。

3. 結果

培養法で10cfu/100ml以上のレジオネラ属菌数となった検体は17/41件(41.5%)であった。検体搬入当日に遺伝子検査を実施し、結果が出た時点でメールにて結果を連絡した。

3日目には斜光法でコロニー観察し、生きているレジオネラ属菌が存在する可能性が極めて高いことを連絡した。ただし、菌数は、発育の遅い菌もあることから7日後まで保留とした。しかし、5検体については、業務の関係で2日目に判定することがあったが、2日目でかなり大きく成長しているコロニーはすべてレジオネラではなかった。また、斜光法検査ができなかった5検体は結果の報告が10日目と、斜光法を用いたときに比べ、遅くなった。

斜光法でレジオネラであると判定したコロニーについて、今年度はそのほとんどがレジオネラ属菌であった。加えて、コロニーを以前より注意深く観察することにより、より多くの血清型を釣菌することが可能であった。

事例1. カビが発育し、通常の7日培養後には釣菌できなかったが、3日目に斜光法で再分離していたため、レジオネラ属菌を見逃すことなく判定できた。

事例2. 培養2日目に平板に大きく成長したコロニーを斜光法で観察したところ、モザイク様ではなかった。念のため、血液寒天に接種したところ、翌日発育し、レジオネラは否定された。

事例3. 平板上で観察する限り、レジオネラとは考えられないコロニーの斜光法でのモザイク形態により、同定したところ、

L.pneumophila SG5 であった。斜光法を用いなければおそらく見逃したと思われる。

4. 考察

斜光法を用いることで、レジオネラが生育していると判定するまでの時間を短縮できた。とりわけ、PCR や LAMP 等の遺伝子検査を組み合わせることでその効果は大きかった。また、その形態・色の多様性から釣菌の目安となり、異なる血清型を集めることが可能である。ただし、この方法を用いても発育の遅い菌に対しては、迅速判断しようがなく、最終判断が 10cfu/100m l であるという基準がある限り、この有効な

検査法による結果も途中経過でしかない。基準が定性であれば、この方法はさらに効果を発揮することが考えられる。

培養法の欠点は時間がかかりすぎることである。この斜光法とコロニー PCR 等を組み合わせれば、早ければ 2 日目には生菌がいることが確認できる。陰性という判定をするためにはやはり 7 日が必要であるが、少なくともリスク回避のための「生菌陽性」という情報を早期に提供できるはずである。この方法を公定法に追加し、浴用水の基準が定量ではなく定性となることを強く要望する。

「斜光法およびコロニーPCRとの組み合わせによる培養法の判定短縮に向けた検討、斜光法を導入した培養法の検査マニュアル作成に向けた検討」

岩手県環境保健研究センター 岩渕香織

I はじめに

感染症発生動向調査において、レジオネラ症は平成 17 年以降顕著に報告数が増加しているが、患者の確定診断に用いられる検査法は大部分が迅速診断法の尿中抗原検出法であり、分離培養検査法はほとんど行なわれていない。レジオネラ症のサーベイランスおよび感染源解明のために、臨床検体からのレジオネラの分離が望まれているが、分離検査に特殊な培地と長い培養日数を要することなどから、医療機関では分離培養検査はほとんど行なわれていない。

そこで、医療機関の検査担当者を対象に、レジオネラのコロニー確認に斜光法を用いたレジオネラ分離培養研修会を開催したので報告する。

II 研修会の開催

- 1) 目的 : 臨床現場から求められている同定までの時間を短縮できる「斜光法」によるコロニー観察を取り入れたレジオネラ分離培養法の実習を行い、臨床検体から分離培養を実施できるよう人員を育成する。また、同時に、臨床検体からの検出に適した前処理法および培地について検討する。
- 2) 期間 : 平成 21 年 12 月 26~27 日
- 3) 研修会参加者 : 医療機関の検査担当者 2 名
- 4) 使用した材料等

①使用菌 : *Legionella pneumophila* SG1、*L.pneumophila* SG2、*L.pneumophila* SG6、*L.bozemanii*、*L.micdadei*、*L.cherrii*、*L.gormanii*

②試料 : 喀痰中に *L.pneumophila* SG1 菌数が $3 \times 10^3/\text{m}\ell$ (McFarland 1 の菌液を菌量 $3 \times 10^8/\text{m}\ell$ として希釈) となるように調整

③使用分離培地 : BCYE- α 寒天培地、GVPC 寒天培地、MWY 寒天培地 (レジオネラ CYE 寒天基礎培地 (OXOID) に必要なサプリメント (OXOID) を添加し調整) および WYO α 寒天培地 (栄研化学) の 4 種類

5) 前処理法 : 喀痰溶解酵素処理したもの (以後、未処理という)、酵素処理後 50°C 20 分間加熱したもの (以後、熱処理という)、熱処理後酸処理したもの (以後、熱酸処理という) の 3 方法

6) 事前準備 : 研修当日に分離培養 1~5 日目のコロニーを観察できるように準備を行なった。喀痰に *L.pneumophila* SG1 を混和した試料を 3 種類の前処理法により処理しそれぞれを 4 種類の培地に接種し培養した。接種量は $100 \mu\ell$ (熱酸処理は $200 \mu\ell$) で、コンラージ棒を用いて塗抹した。また、臨床検体からは *L.pneumophila* SG1 が分離されることが多いが、他菌種についても分離の可能性があるので 7 菌種を 4 培地に純培養した。純培養については斜光法で一番観察しやすいと考えられている 2 日から 3 日目が研修日になるよう培養した。

7) 研修内容 : 実習では模擬検体を、染色および前処理、分離培地の目視および斜光法による観察、同定を行なった。同定では血液寒天培地と BCYE- α を使用した L. システイン要求性を試験、血清型別および PCR

検査を行った。なお、斜光法とは、暗室で、培地上のコロニーに直接コールドライトを当てて実体顕微鏡で特徴的なモザイク様の形態を観察して判別する合理的な方法である。

Ⅲ 研修結果

- ① 研修生は、培養後6日目のBCYE α 上のコロニーを見逃した以外は、分離培地上コロニーを確認でき、斜光法によるコロニー確認法をマスターしたと思われる。また、染色、分離培養、同定検査は、PCR検査以外は細菌検査に従事していれば十分作業できると思われた。
- ② 分離培地上のコロニーの発育状況は、未処理においては、3日目で4種類全ての分離培地ともコロニーが確認可能となった。ただし、BCYE α およびGVPCは雑菌も多く発育していた。また、熱処理および熱酸処理においては4日目で全ての分離培地でコロニーが確認可能となった。
- ③ MWYおよびWYO α では熱処理、熱酸処理はもちろん、未処理においてもほとんど雑菌は発育しなかった。さらにWYO α ではコロニーの発育がよく同じ培養時間では他の培地に比べて大きいコロニーを作った。
- ④ 熱処理と熱酸処理ではコロニー数にほとんど差は認められなかった。
- ⑤ 分離培地に純培養させたコロニーを斜光法で観察したが、モザイク部分の色調による菌種の区別はできなかった。

Ⅳ まとめ

浴槽水同様、臨床検体についても、レジオネラ以外の雑菌が発育した場合、目視による従来法では観察に時間と労力がかかり、斜光法が有効であった。

通常レジオネラの培養時間は7~10日とされているが、今回の研修では斜光法による観察により、3~4日でコロニーの発育を確認できた。

また、斜光法に慣れてくると2日目でも小さなコロニーを確認できた。培養時間が長いと、コロニー中心が盛り上がり特徴的なモザイク模様が判別しづらくなり、初心者には見逃しの原因になると思われた。長時間培養したコロニーは判定しにくいとの研修生の感想もあり、斜光法のみではなく、目視による観察も必要と思われた。

今回の研修の実施結果から、レジオネラについては、スプタザイム処理し、MWYもしくはWYO α で分離培養する方法が最良と思われた。ただし、レジオネラが弱っていると推察される場合や雑菌が多い場合が考えられるので、BCYE α で培養する方法および熱処理しMWYもしくはWYO α で培養する方法を追加し、検出感度をあげることが必要と思われる。

Ⅴ 終わりに

臨床現場ではレジオネラの分離培養検査は実施されていない状況であるが、実体顕微鏡の整備と培地が準備できれば、レジオネラ培養法と斜光法が普及していく可能性があると思われた。

A. 研究目的

レジオネラ属菌の発育コロニーの特徴として、「大小不同、灰白色湿潤コロニーで特有の淡い酸臭がある」とされているが、実際には他の細菌との区別が困難な場合が少なくない。また、LAMP法などの遺伝子検査法に比べ、従来の培養法は判定までに長時間を要することから、行政処分など正確な検査結果が要求される場合には迅速さに欠ける。

そこで、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「斜光法」を正確・簡便・迅速な培養法として、日常のレジオネラ属菌検査に導入する目的で従来培養法との比較検討を行った。

B. 研究方法

平成21年6月、7月、10月、12月に搬入された浴槽水等68検体を対象に検査を実施した。

搬入された検体は、ろ過濃縮法で濃縮後、濃縮検体(未処理と表記)100 μ lと50 $^{\circ}$ C 20分加熱処理した濃縮検体(加熱処理と表記)100 μ lをWYO α 培地(栄研)、GVPC培地(日研)、MWY培地(自家製:OXOID)にそれぞれ塗抹し、36 $^{\circ}$ Cで10日間培養した。各培地に発育したコロニーを従来法では目視で、斜光法では2方向から照射し、実体顕微鏡下で観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、釣菌し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、PCR法での同定検査を並行して行った。

C. 研究結果および考察

搬入された浴槽水等68検体中36検体(53%)からレジオネラ属菌が検出された。

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加えて、モザイク状疑いのコロニーについても確認検査を行った。その結果、釣菌した474コロニー中レジオネラ属菌と確認されたものは389コロニーで82%のヒット率であった。しかし、斜光法で「疑わしいけど念のため」と釣菌したコロニーはすべてレジオネラ属菌が否定され、見逃し率は0%であった。ヒット率が82%にとどまったのは、経験不足から紛らわしいコロニーも釣菌したためであり、経験を積むことによりヒット率は上昇するものと考えられる。

一方、培養3日目では発育コロニーが観察されず、培養10日目でレジオネラ属菌の発育が確認された検体が2検体あった。これら2検体から分離されたレジオネラ属菌はいずれも*L.pneumophila*ではなかった。(菌種については同定中)

斜光法は検査検体数が多いと観察に長時間を要し、10日間培養を続ける間に何回も観察しなければならないとなると、心が折れそうになることもあるが、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ことには変わりない。

そこで、大分県としては、遺伝子検査法(主にLAMP法)の結果と培養3日目で観察・同定する斜光法の結果を合わせて迅速結果として行政対応し、念のため、10日間引き続き培養を継続し、最終結果として対応することで行政側との調整を図っている。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。

斜光法及びコロニー PCR を組み合わせた培養法によるレジオネラ属菌同定短縮に向けた検討

山形県衛生研究所 瀬戸順次

1 はじめに

レジオネラ属菌は発育速度が遅いため、従来の培養法では検査結果を出すまでに1週間程度を要する。迅速検査法としては、リアルタイム PCR 法や Lamp 法が考案されているものの、検査可能な施設が限られるうえ、生菌を検出する培養法と検査結果が一致しないケースがあり万全とはいえない。このような中、今回斜光法及びコロニー PCR を組み合わせることにより、培養法の同定短縮が可能となるかについて検討した。

2 材料及び方法

(1) 模擬検体を用いた事前検討

Legionella pneumophila 血清群 1 (以下 Lp1)、*L. dumoffii* (以下、Ld)、雑菌 2 種類 (臨床検体由来、菌種不明) を蒸留水中に混合した模擬検体を調製し、WYO- α (栄研化学社) に塗布後、35°C で 7 日目まで培養した。斜光法でレジオネラに特徴的なカットグラス様の光沢を確認したコロニー (直径約 1mm) について、滅菌つまようじで釣菌し 20 μ l の蒸留水中に懸濁した。L-システイン要求性確認のため懸濁液を羊血液寒天培地 (ベクトンディッキンソン社) 及び BCYE- α (栄研化学社) に画線塗抹し、35°C で 2 日間培養した。残りの懸濁液を 100°C 10 分加熱、12,000rpm 5 分間遠心し、上清を PCR 用の鋳型とした。PCR の反応系はレジオネラ症マニュアル (国立感染症

研究所、平成 15 年 8 月 29 日改訂) に従い、レジオネラ属特異的プライマーとして LEG、レジオネラニューモフィラ特異的プライマーとして Lmip を用いたが、鋳型量については 25 μ l の系で 5 μ l とした。

(2) 純培養菌による検討

山形県内 3 保健所検査課職員の協力を得て検討を行った。各保健所に保存されていた *L. pneumophila* (野外株、血清群不定、以下 Lp) について WYO- α で純培養を行い、コロニーの直径が 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0mm に達したのものについて、模擬検体と同様の方法により検出を試みた。

(3) 臨床検体による検討

当所に検査依頼のあった、レジオネラ肺炎疑い患者の喀痰を用いた。喀痰に等量のスプタザイムを加えた後、未処理検体 500 μ l、50°C 20 分加熱処理検体 500 μ l (熱処理検体)、50°C 20 分加熱処理検体 250 μ l に等量の 0.2M HCl · KCl 溶液を加え室温で 4 分間静置したもの (熱酸処理検体) について、それぞれ WYO- α に塗布し、35°C で培養した。発育のみられたコロニーについて、模擬検体と同様の方法によりレジオネラ属菌の検出を試みた。

3 結果

(1) 模擬検体を用いた事前検討

Lp1 は培養 3 日目、Ld は 2 日目以降斜光法によりカットグラス様コロニーが観察され、雑菌とは区別された。なお、コロニーに短波長 UV を照射した際に蛍光を発しないものを Lp1、青白色の蛍光を

発したものを Ld と判断した。Lp1、Ld それぞれの直径 1mm 前後のコロニーについて検討したところ、培養はすべて羊血液寒天培地-、BCYE+となったが、PCR では Lp1 コロニーにおける LEG または Lmip プライマー、Ld コロニーにおける LEG プライマーの一部で検出されず、偽陰性となった。特に、Lp1 コロニーにおける Lmip プライマーで偽陰性になるものが多かった。

(2) 純培養菌による検討

(1) の結果を踏まえ、コロニーの直径を測定したうえで培養及びコロニー PCR をおこなった。3 保健所で各 3 コロニー（一部 2 または 4 コロニー）について検討した結果を表 1 にまとめた。L-システイン要求性については全て正しく判定された。コロニー PCR では、直径 1.5mm 以上のコロニーについては全て陽性となったが、直径 0.2~1.0mm のコロニーについては一部陰性となった。特に、直径 0.2mm では LEG プライマーの約半数、Lmip プライマーに至ってはほとんどが検出できなかった。

(3) 臨床検体による検討

2 検体中 1 検体から *L.pneumophila* 血清群 1 が分離された。当該検体は、培養 3 日目以降、熱処理、熱酸処理検体を塗布した WYO- α から直径 1mm 程度のカットグラス様コロニーが確認され、5 コロニーについて培養及びコロニー PCR をしたところ、PCR は全て LEG+、Lmip+ となったものの、培養では全て羊血液寒天培地+、BCYE- α +となった。羊血液寒天培地に発育したコロニーがグラム陽性

短桿菌であったため、カットグラス様コロニーを再分離したところ、全て LEG+、Lmip+、羊血液寒天培地-、BCYE- α + となった。

4 考察

今回、レジオネラ属菌の早期同定を目的として培養法に斜光法、コロニー PCR を組み合わせた形での検討をおこなった。

L-システイン要求性については、模擬検体及び純培養菌を用いた検討では良好な結果が得られたものの、臨床検体では雑菌のコンタミにより最終的な判定に時間を要する形となった。種々の雑菌を含む環境水または臨床検体では、培養早期には目視で確認できないほどの微細な雑菌のコロニーが存在する可能性を考慮する必要があると思われる。

コロニー PCR では、純培養菌を用いた検討においてコロニーの直径が大きくなるにつれ安定した結果が得られた。小さなコロニーで検出率が悪かった点については、懸濁液作成時に PCR 阻害の原因となる培地成分が混入しないよう細心の注意を払っていたこと等から、単純に鋳型量の不足によるものと考えられた。今回、特に Lmip プライマーでの増幅が悪かったが、同プライマーによる PCR はレジオネラ感染症の原因の多くを占めるレジオネラニューモフィラの同定をおこなうために重要であり、偽陰性の判定を出さないように十分発育したコロニーを用いて鋳型を調製する必要があると思われる。また、純培養菌での検討をおこなった職員からは、再検査の可能性等を考慮するとコロニーを懸濁する蒸留水は 20 μ l では足りないという意見が聞かれた。

総合すると、50 μ l 程度の蒸留水に直径約 1.5mm のコロニーを懸濁して検査を実施すれば、確実な検査結果が出せるのではないかと考えられた。

培養日数の短縮について、今回の検討では培養 3~4 日で確実な結果を出せると思われるコロニー直径 1.5mm に達しており、従来の培養法に比べ数日間の短縮が可能であると示唆された。今後経験を積んでいけば、さらに小さいサイズのコロニーについても確実な検査が可能となり、より早期に

結果を出せるかもしれない。

今回検討した斜光法、コロニー PCR を組み合わせた培養法は、ルーチンで行っている環境水検査等の急を要しない検査に用いた場合、経費的な面を考え合わせても非効率な側面が考えられるが、レジオネラ症集団発生時の原因施設調査等迅速性を求められる場面において、定性的な検査という位置付けでおこなうには非常に有用な方法であると考えられた。

表 1 Lp コロニー直径別斜光法、L-システイン要求性、コロニー PCR の結果

		Lp コロニーの直径				
		0.2mm	0.5mm	1.0mm	1.5mm	2.0mm
培養日数		2~3 日	2~3 日	3 日	3~4 日	4 日
斜光法	コロニー色	白、灰白	白、灰白	白、灰白	白、灰白	白、灰白
	カットガラス模様	-~±	+	+	+	+
コロニー PCR	LEG 陽性数 (%)	5/9(55.6)	10/10	10/10	10/10	10/10
	Lmip 陽性数 (%)	1/9(11.1)	9/10(90)	9/10(90)	10/10	10/10

※ 羊血液寒天培地は全て発育-、BCYE- α は全て発育+

はじめに

昨年度に引き続き、効率の良いコロニー観察法（以下「斜光法」）に関する研修に参加する機会を得た。斜光法を通常の検査に取り入れ、その有用性について検討を行った。また、斜光法で *Legionella* 属菌を観察した際の、集落の色合いについて傾向を探った。

材 料

浴槽水 120 検体

検討方法

浴槽水を前処理後 WYO α 培地（栄研化学）に塗布し、36°Cで培養した。それらを、実態顕微鏡（Nikon）及び光源（OLYMPUS TGHM）を用いて、斜光法で観察した。観察は、3日目以降に発育した集落について行った。斜光法で特徴的外観構造（集落の辺縁部のモザイク様・中心部の綿様）が見られた集落、並びに培地上に発育した灰白色の疑わしい集落は、レジオネラ血清群別試験（デンカ生研）を行った。また、血清群が判定された集落について「病原体検出マニュアル」（国立感染症研究所）に記載されているプライマーを使用し、PCR試験にて確定試験を行った。

検討結果及び考察

浴槽水 120 件の培養培地から、斜光法で特徴的外観構造が見られた集落を 134 株、特徴的外観構造はないが灰白色の疑わしい集落を 2 株釣菌した。斜光法で特徴的外観構造が見られた集落の中で、PCR試験が陰

性となった集落は 14 株であった。灰白色の疑わしい集落 2 株は PCR 試験で陽性となった。特徴的外観構造が見られた集落 134 株中 120 株で PCR 陽性の成績を得られており、釣菌した集落の 89.5%と高い確率でレジオネラ属菌の集落を選択できた。

斜光法を行うことにより、レジオネラ属菌の推測をつけて確定試験を行うことができた。また、その時点で色合いやモザイク様構造の異なる集落が存在していれば、複数種の血清群が存在していると予測することもできた。その他、培地上から集落を確認しながら釣菌することができる、集落から直接 PCR 試験ができる、などの有用な点があった。しかし、斜光法は集落発生初期で特徴的外観構造や色を観察できても、日を迫うごとにそれらがわかりづらくなった。スクリーニング的に斜光法を取り入れるのであれば、集落発生から決まった日数で観察することが重要であると考えられた。

次に、*Legionella* 属菌を斜光法で観察すると、集落に色がついて見えるため、色と菌種や血清群との関係について検討した。釣菌した 136 個の集落からは *Legionella pneumophila* が群別で 18 種類、その他 *Legionella* sp. が 2 種類検出された。菌・群によって集落の色に特徴的な傾向は示さなかった。菌・群を判別する際には、色に関わらずより多くの集落を釣菌することが望ましいと思われた。

まとめ

斜光法は、確定試験を行う前の推定試験として、有用性が高かった。

斜光法で観察した際、菌・群による色合いの傾向は見られなかった。

1. はじめに

レジオネラ属菌の検査では、選択培地に発育した灰白色湿潤コロニーを釣菌して検査を行う。しかし、培地上には同様の形態を示す雑菌も多く発育するため、雑多なコロニーの中からレジオネラ属菌を選択し、定量するのは容易ではない。また、菌の発育が遅いために、行政指導の上からも検査の迅速性が望まれている。そこで、本年度、コロニーに斜光を当て、特有の表面構造(モザイク様模様)を実体顕微鏡で観察することによりレジオネラ属菌を早期に効率良く検出する「斜光法」の研修を受ける機会を得たことから、従来法との比較検討を行ったので報告する。

2. 方法

平成 21 年度に行政検査として搬入された浴槽水を対象に検査を実施した。冷却遠心法あるいは濾過法で濃縮した検水は、酸処理または熱処理を行い、GVPC 培地、MWY 培地 (以上 OXOID)、WYO α 培地 (栄研化学) 等に塗抹し 35°C で培養し 10 日間観察した。レジオネラ属菌の確定は PCR (primer LEG) あるいはレジオネララテックステスト (OXOID) で行い、市販免疫血清にて血清型を決定した。斜光法には実体顕微鏡 (OLYMPUS SZH-ILLD) を使用し、照明を落とした実験室で光源用ランプ (OLYMPUS LGPS) による二方向からの斜光を照射してコロニーの観察を行った。

2.1 スクリーニングとしての斜光法と従来法の比較

浴槽水 86 件について、コロニーを斜光法

で観察し、PCR 等での従来のレジオネラ属菌の判定結果と比較した。

2.2 斜光法での経時的観察

浴槽水 52 件について、培養翌日から斜光法での観察を経時的に行い、レジオネラ様コロニー確認・釣菌までの日数を調べた。斜光法では、低倍率で培地全面をスクリーニングしながら、必要に応じて倍率をあげてコロニー観察を行った。モザイク様模様のコロニーを確認した場合はコロニーから直接 PCR を行った (以下コロニー PCR)。釣菌したコロニーは 20 μ l の DW に浮遊させて PCR の鑄型にすると同時に、血液寒天培地と BCYE α 培地 (BD) に塗抹しシス테인要求性を確認した。

3. 結果

3.1 スクリーニングとしての斜光法と従来法の比較

浴槽水 86 件から釣菌した 200 コロニー (レジオネラ属菌陽性 153 株、陰性 47 株) について比較した結果、斜光法でのレジオネラ属菌コロニー検出率は 93% (142/153) であった。斜光法で判定困難であったコロニーは 15% (29/200) であり、これらを除いて斜光法からみた両者の一致率は、陽性で 97% (142/146)、陰性で 76% (19/25) であった (表 1)。斜光法で確認したレジオネラ属菌は、*L.pneumophila* SG1、SG3、SG4、SG5、SG6、SG8、および *L.micdadei* であった。

表 1. 斜光法によるスクリーニングと従来法の比較

		従来法 (PCR 等) による レジオネラ属菌の判定		
		陽性	陰性	合計
斜光法による スクリーニング	陽性	142	4	146
	陰性	6	19	25
	判定困難	5	24	29
	計	153	47	200

3.2 斜光法での経時的観察

経時的に斜光法で観察を行った 52 検体 116 コロニーについて、釣菌までの日数とコロニー PCR の陽性数を記録した (表 2)。釣菌数のピークは 3 日目 (75 コロニー) であり、コロニー PCR の陽性率は 92% であった。しかし、レジオネラ属菌でありながらコロニー微小のため PCR 陰性であったものが 4 株存在した。

表2. 斜光法での釣菌までの日数とコロニーPCR陽性数

釣菌までの日数	釣菌数	コロニーPCR陽性数	PCR陽性率 (%)
2日	18	5	28
3日	75	69※	92
4日	11	9	82
5日	0	-	-
6日	7	6	86
7日	5	5	100
合計	116	94	

※後に更に4株PCR陽性を確認

4. 考察

3.1 の結果より、斜光法でモザイク様模様を確認できたコロニーは 97% がレジオネラ属菌であり、斜光法の特異度の高さを確認できた。一方、この特徴的なモザイク様模様は、培養日数の経過により判別が困難になるとの報告がある。今回の検討で、斜光法でレジオネラ属菌をスクリーニングできなかったコロニーは、培養後日数の経過した比較的大きく発育したものに多く、上記の理由による偽陰性と考えられた。

斜光法とコロニー PCR の組み合わせでは、多くは培養後 3 日目でレジオネラを確定出来ることが分かった。従来法では、通常 4 日間を要するため、この方法を用いることによりレジオネラ属菌の確定が 1 日以上短縮可能と思われた。

また、従来法では培養 2 日目までに発育した菌を雑菌としているが、今回の検討では斜光法でモザイク様模様が疑われた場合には 2 日目で釣菌を実施した。その結果、培養 2 日目の時点で増殖の早い (1mm 以上) コロニーはレジオネラ属菌陰性であり、陽性のコロニーは微小で斜光法でなければ検出できなかった。実際には、翌日でないと釣菌不可能なコロニーも存在したが、培養 2 日目でレジオネラ属菌を確定できた例もあった。また、培養 6 日目以降に出現する遅発育のレジオネラ属菌にも斜光法は効果的で、雑菌の中から効率的に分別を行うことが可能であった。

5. 終わりに

コロニーに斜光を当て表面構造を実体顕微鏡で観察する斜光法では、熟練を要する従来法に比較してレジオネラ属菌を効率良く検出できる。また、発育初期の微小なコロニーも確認できるため、コロニー PCR との組み合わせによりレジオネラ属菌確定までの日数の短縮が可能であった。

一方、今回の検討から、斜光法では培養後の経過日数を加味して観察すること、判定困難な場合も釣菌し確認することが不可欠と思われた。特に不慣れなうちは、常に陽性コントロールと見比べ、モザイク様模様が明瞭となるよう斜光の角度、部屋の暗さを調整し、必ず倍率を上げて観察することが重要と思われた。

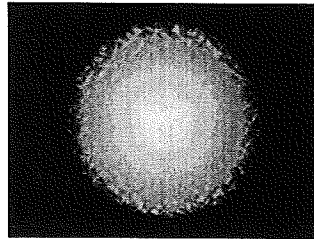
今回は検討を行なわなかったが、研修で学んだ、菌種や培地による斜光法での形態の違いについても、今後の課題として取り組んでいきたい。

斜光法でレジオネラ属菌の集落を見つける

同じ浴槽水から複数種のレジオネラ属菌をひろえました。

雑菌が増えて培地が混雑した状態でも、レジオネラ属菌の確認検査できました。

遺伝子検査(PCR)と組み合わせると集落がレジオネラ属菌かどうか、集落の検査日にわかりました。



モザイク様の模様

2日目に同定できたこともあります。

レジオネラ属菌検査法（培養法）

統一に向けた検討課題

1) 検査法の統一について

- * 培地接種検体：「非濃縮検体」、「濃縮検体」
- * 濃縮法：「ろ過濃縮法」、「冷却遠心濃縮法」
- * 前処理：「未処理」、「熱処理」、「酸処理」
- * 分離培地：「非選択培地」、「選択分離培地」
- * 斜光法について

2) 検査法の研修について

3) 精度管理について

レジオネラ属菌検査法（培養法）の統一に向けた検討課題

北海道立衛生研究所 森本 洋

【現状】

「公衆浴場における衛生等管理要領等について」（平成12年12月15日付生衛発第1811号厚生省生活衛生局長通知）の中で、初めてレジオネラ属菌の基準（10CFU/100mL未満）及び検査法（冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること）が示された。さらに、その検査法については、「公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について」（平成15年2月14日付建発第0214004号厚生労働省健康局長通知）で新たに“また、その具体的手順は「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」を参照すること”という一文が加えられた。しかしながら、大腸菌群の基準及び検査法のように省令で明確に示されていないため、実際には各検査機関で異なった検査マニュアルが利用されるなど検査方法が多様化し、検査結果に影響している可能性があると思われる。最近では、温泉利用施設が民間検査機関を通じ行った自主検査結果と、保健所等行政検査機関が行った検査結果において、定性結果が異なるとの報告が散見されている。そこで検査法の統一を図り、その方法により基準が設定され、適切な最終結果が反映される必要があると思われる。

【課題】

大きく3つの課題があると思われる。1) 検査法の統一、2) 研修、3) 精度管理である。

1) 検査法の統一：本科研内で培養法を検討した結果、試料の非濃縮、濃縮、濃縮方法（ろ過・冷却遠心）、前処理（未・熱・酸）、使用分離培地（非選択分離培地・各種選択分離培地）、またそれらの組み合わせによる条件の違いにより、レジオネラ属菌の検出数、種類に違いが認められる場合があり、検査結果に大きな影響を与えていることが示唆された。このことは、同じ検体に対し異なった手法で検査をすると検査結果に影響し、場合によっては定性結果にまで影響することも考えられる。よって、大腸菌群同様に統一した検査法の提示が必要であると思われる。

2) 研修：レジオネラ属菌検査については、新版、第3版の防止指針にも示されている通り、適切な機関で適切な研修を受け、手技を習得する必要があるとされている。検査実施機関により、検査結果が異なるとの報告があることなどからも、適切な研修システムが必要であると思われる。

3) 精度管理：定期的な精度管理を行うことで、検査機関の人的状況等の諸事情にかかわらず、検査精度を安定させる必要があると思われる。

【今後】

1) 検査法の統一：一提案を以下に。温泉水等の環境水中では、一般的にレジオネラ属菌数を予測することが困難であること。そのため、非濃縮検体からの培養が適切な結果を反映する場合があること。濃縮工程を含め、検査工程が増えると実験ロスが生じる場合があること。濃縮法別で回収率が異なる場合があること。前処理法別で、検査結果が異なる場合があること。各種選択分離培地別で、検査結果が異なる場合があること。さらには、状況により、未処理や非選択分離培地での結果が適切な結果を反映する場合があること。その他、検査結果に影響すると思われる手技等を理解し、まずは日常の適切な衛生管理安定に直結する自主検査に対する検査法を検討する必要があると思われる。この方法を基本とし、各検査工程における注意点、事件対応等で詳細な検査が必要とされる場合の検査法を追補として提示するなど一つの考え方であると思われる。斜光法等の新たな検査法を積極的に提示することも効果的であると思われる。

2) 研修：一提案を以下に。地域ごとに研修機関を指定し、個別に研修日程を組んで対応するか、年2回程度の研修日程を組み、研修参加希望機関を募集し集中研修期間を設定する。

3) 精度管理：一提案を以下に。基本となる検査法の統一後、内部精度管理および外部精度管理を実施する。精度管理検討委員会等を設け、その方法を十分に検討し、予備調査を行った後に精度管理を実施する。

【例】

北海道立衛生研究所では、以下の方法で検査を行っている。非濃縮、濃縮検体に対し検査を行う。濃縮はろ過濃縮法で行う。前処理は未処理、熱処理、酸処理を行う。分離培地は、非選択分離培地であるBCYE α および選択分離培地としてMWY培地（共にOxoid:自家調製）を使用。すべての分離培地に対し、斜光法で集落観察を行う。最もレジオネラ集落数の多かった条件から結果を判定する。新版レジオネラ症防止指針には、「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。また、未処理、酸処理、熱処理への接種も記載されている。

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）
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
衛生管理手法の開発に関する研究

ゼラチン・ディスク配付による菌数測定的外部精度管理、
関東甲信静地研、民間検査機関の参加

研究分担者	渡辺祐子	神奈川県衛生研究所
研究分担者	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
研究分担者	杉山寛治	静岡県環境衛生科学研究所
研究分担者	田栗利紹	長崎県環境保健研究センター
研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究分担者	森本 洋	北海道立衛生研究所
研究協力者	磯部順子	富山県衛生研究所
研究協力者	猪又明子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	烏谷竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	矢崎知子	宮城県保健環境センター
研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所

【要旨】

19年度から20年度に、試料の配付方法として採用したゼラチン・ディスク法を評価するとともに、試料の処理法間の回収率の相違を検討した。その結果、ゼラチン・ディスク法の実用性については回収率に有意の差がなく、ディスクの使用についても問題は認められなかった。次いで、神奈川県衛研を含む8機関で濃縮法と酸・加熱処理法の各検査工程を検討したところ、ろ過法と酸処理法が高い回収率を示した。さらに今年度は、民間検査機関7機関を含む30機関を対象を広げ、濃度の異なる試料2種類を配付し、外部精度管理の試行を行ったところ、回答率は100%となり、複数回答があったため延べ53の測定結果が得られた。測定結果の集計に当たっては、英国のHealth Protection Agencyに準じて中央値と6%~94%範囲を良好範囲として評価したところ、試料1では15(11機関)、試料2では8(5機関)が範囲外となった。また、ろ過法と冷却遠心法の比較では回収率に大きな差は認められなかったが、加熱処理法に比べ酸処理法は高い回収率を示した。

A. 研究目的

平成19年度から20年度に、環境水を対象にレジオネラ属菌検査を行う際の精度管理手法を確立するため、外部精度管理の試行を行ってきた。その中で、*L. pneumophila*の保存株を用いて作製した

ゼラチン・ディスクを精度管理用標準試料（以下、「試料」）として外部精度管理の試行（以下、「試行」）を行ったが、予想外に回収率が低かったことから、まずゼラチン・ディスク法（以下、「ディスク法」）を試料の配付方法として採用す

ることの有効性を評価した。次いで、濃縮法と酸・加熱処理法の各検査工程における回収率低下の原因を探り、試料から作製する検水量の統一をはじめ、共通の培地を用いることや、濃縮法または酸処理方法等の一部分を指定するなど、検査方法を改善することで回収率の向上が期待できることがわかった。

そこで、今年度は、最終年度として外部精度管理システムの構築のため、民間検査機関を含む30機関に2種類の濃度の試料を配付し、試行を行った。さらに測定結果の集計方法についても検討を加えた。

B. 研究方法

1. ディスクの作製

1) ディスクの作製

試料として、2種類の濃度の試料をディスク法により作製した。試料1は *L. pneumophila* 1群とし 10^4 CFU/ディスク、試料2は *L. pneumophila* 5群と 10^5 CFU/ディスクとして今回の試行に用いることとした。

ディスク作製は、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル平成15年12月9日、P581-584（感染研ホームページ）を基に作製した。①ディスク溶液の作製：A液グルコース5%、スキムミルク3%混合液、B液0.5%アスコルビン酸Na、C液20%ゼラチンを作製しておき、ディスク作製時、このA、B、C溶液を1:0.5:1に混合して使用した。②対数増殖期の培養菌をそれぞれ目的の菌数になるようディスク作製溶液にとり濃厚菌液を作製した。③この菌液50 μ lをクッキングペーパー上に滴下し、これを減圧デシケーターで一晩乾燥後、保存用のビンに移し40 $^{\circ}$ Cで保存した。

2) ディスク菌数の確認

作製した試料1及び2をそれぞれ10mlの1/50に希釈したPBS（以下1/50PBS）に入れ溶解するまでふ卵器で加温した。ボルテックスにかけ完全に溶解を確認した後、試料1は原液と10倍希釈液をそれぞれ0.1ml、GVPC α 寒天培地に塗布し、菌数を測定した。試料2は、10倍希釈液と100倍希釈液について同様に菌液を測定した。（n=5）

試料1、2のディスク各5枚を感染症研究所へ「ゆうパックチルド」で発送し、同様に菌数を測定した。

2. 試行調査

1) 協力機関への依頼

a. 民間検査機関

神奈川県内民間検査機関の協会である「神奈川県環境計量協議会」の会長に依頼して県内の検査機関に精度管理への参加協力の呼びかけをお願いし、協力していただける意向がある機関を対象に当所にて試行の概要説明会を行った。この際、精度管理に参加の条件としてP2施設が必要なことを説明し、後日、メールにて参加の諾否の回答をいただくこととした。

b. 地研協議会関東甲信静ブロック内地方衛生研究所（以下、「地研」）

当研究代表者から各地研の所長に対し試行への参加の協力依頼をメールにて行った。

c. 研究班地研

研究協力者に対してはメールにて協力依頼を行った。

2) 民間検査機関の設備確認

当所では、微生物環境安全管理規定でレジオネラ属菌を分与する際の付帯条件としてP2実験室の保有を定めているこ

とから、当所から精度管理試料を民間検査機関に発送することはレジオネラ属菌の分与に当たる。このため、協力民間検査機関に対して P2 施設の設置の有無について書面にて提出を求めた。

3) 精度管理実施方法の作成

民間検査機関に対しては検査の負担を軽減するため、ディスク溶解液を滅菌蒸留水とし、検水作製後レジオネラ属菌の菌数測定のみを必須事項として協力をお願いした。なお、地研に対しては、ディスク溶解液、希釈液に滅菌希釈 PBS を用い、ディスク溶解時の菌数と検水作製後レジオネラ属菌の菌数の測定をお願いした。このため民間協力機関と協力地研に対して別々に「ディスクを用いたレジオネラ精度管理の菌数測定方法および回答方法」(別添 1 民間用、地研用)(以下「検水作製方法」)、回答様式(別添 2 民間用、地研用)を作成した。

4) 試料受け取りに関する周知

各協力機関に対しては、事前にメールにて、試料の発送日、検水作製方法、回答方法(別添 1、2)、試料の到着予定日を通知し、各機関において培地等の機材の準備と円滑な受け取りを依頼した。

5) 試料の発送

各ディスク 2 枚をセラムチューブに入れ、試料 1、2 として国立感染症研究所の菌株輸送法に基づいて病原体運搬用容器(カテゴリー A)に入れた上で、「ゆうパックチルド」にて各機関あてに発送した。なお、地研に対しては希釈用 PBS buffer も同封した。また、当所に対してもディスク菌数確認のため、同様に各ディスク 5 枚を発送し、2 日後に到着するよう到着日を指定した。

6) 各協力機関における菌数測定

各機関ではディスク 1 枚を 1/50PBS(民間検査機関では滅菌蒸留水) 10ml に加え 36°C で完全に溶解して原液とし、「検水作製方法」(別添 1)に従って、菌数測定を行い(民間検査機関では、可能であれば測定とした)次に、原液 1ml を 1/50PBS 500ml に加えた検水を作製し、各機関の検査方法で菌数の測定を行うよう求めた。回答期間は 1 ヶ月とし、さらに原液菌数と作製検水菌数から回収率を求め回答様式に記載し、具体的な検査方法の内容についても詳細に記載(別添 2)することを依頼した。

C. 研究結果

1. ディスクの作製

1) 配付試料の菌数

試料には菌数の異なる 2 種類のディスクを用いたが、作製したディスクの菌数を感染研と当所で測定したところ、平均菌数は、試料 1 が 5.29×10^3 CFU/ml (n=10)、試料 2 が 5.41×10^4 CFU/ml (n=10) となり、CV%は 19.6%と 16.3%となった(表 1)。

2) 配付後のディスク菌数

各機関に送付した試料の菌数測定結果を表 2 に示した。(n=30 機関) 試料菌数は試料 1 が 30CFU/ml~7300 CFU/ml、試料 2 が 670CFU/ml~57000 CFU/ml と 2 オーダー以上の差があった。

試料 1、2 の測定菌数を相関図に示したところ(図 1)、試料 1、2 は概ね相関を示し、輸送、保管、培養と一連の工程の影響を受けたことが示唆された。

発送前に確認した菌数と比較したところ、試料 1、2 とも、平均菌数が 50%程度まで減少していた。また、CV%を比較すると、2 倍以上、上昇していた。菌数確