

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/100ml 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 岩淵香織

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た。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。

大分県衛生環境研究センター
緒方喜久代

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、検査可能な施設に限られるうえ、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 日目で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
	カットグラス模様	—~±	+	+	+	+
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℃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、日を追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℃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 の鋳型にすると同時に、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。

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

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：

レジオネラ属菌の検査における精度管理方法を確立するため、平成 19 年度から 21 年度の 3 年間にわたり、19 年度は地研 5 機関、20 年度は同様に 8 機関、21 年度は地研に民間検査機関を加えた 30 機関の協力のもと、ゼラチン・ディスク法による試料の配付方法を評価するとともに、濃度の異なる 2 種類の試料を用い、外部精度管理の試行を行った。

その結果、回収率等の調査結果からは、ゼラチン・ディスク法の実用性についての問題は認められなかった。また、濃縮法と酸・加熱処理法の各検査工程の比較検討結果によれば、濃縮法についてはろ過法と冷却遠心法で、回収率に大きな差は認められなかったが、処理工程については加熱処理法に比べ酸処理法が高い回収率を示した。

なお、測定結果の集計に当たっては、HPA に準じて中央値と 6%～94% の範囲を良好範囲として評価したところ、2 種類の濃度のうち、低い濃度の場合 65.9%、高い濃度の場合 81.8%の測定結果が良好範囲となった。

A. 目的

レジオネラ防止指針等のレジオネラ属菌の環境水からの培養検査法は、濃縮方法においてはろ過法や冷却遠心法など、また、雑菌処理方法においても酸処理や加熱処理

など、検査担当者により工程の一部を選択できる方法となっているため、検査結果にバラツキが生じる可能性が考えられる。

一方、レジオネラ属菌の検査結果は、行政処分等を行う根拠として用いる場合や、公衆浴場等ではレジオネラ属菌の培養検査が義務づけられていることから、適切な精度管理を行う必要があると考えられる。

そこで、*L.pneumophila* の分離株を用い、ゼラチン・ディスク法(以下、「ディスク法」)を用いて標準試料を作製し、各機関に送付後、協力機関で実施している方法に従ってレジオネラ属菌の検出を行い、結果を評価するという精度管理の試行(以下、「試行」)を通じ、実用性や課題点を明らかにするとともに、的確な精度管理システムの確立を目指す。

B. 方法

1 精度管理用の標準試料の作製

ゼラチン・ディスクの作製

精度管理用の標準試料(以下、「試料」)として、ディスク法により2種類の濃度の試料を作製した。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)に基づいた。

- 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について

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、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枚を国立感染症研究所(以下感染研)の菌株輸送法に基づいて病原体輸送用容器(カテゴリーA)に入れた上で「ゆうパックチルド」にて感染研に送付(図1)し、同様に菌数を測定した。

各検査機関へも試料1、2のディスクを同様に「ゆうパックチルド」にて送付した。

3 各機関への配付と菌数測定

19年度は、各機関でディスクに1mlのPBSを加え37℃で溶解後、(図2)各0.1mlをとり培地2枚に塗布し、菌数を測定した。さらに0.1mlをとり10倍希釈を行い、その菌数を測定した。残りのディスク溶解液を各機関でレジオネラ属菌検査に使用している検水量に希釈し、検査検水とする。これを各機関で行っているレジオネラ属菌の検査方法に従って菌数を測定して、回収率を求め、その結果を回答票に記入した。これをディスク5枚について行うよう依頼した。

20年度は、各機関ではディスク1枚を1/50PBS 10mlに加え36℃で完全に溶解して原液とし、「精度管理実施方法」(図3)に従って、菌数測定を行った。次に、原液1mlを1/50PBS 500mlに加えた検水を5本作製し、検査を行った。ろ過濃縮法に、送付したフィルターを使用することやホルダーのとも洗いをを行うこと、また、遠心後の菌液の回収の際に遠心管のとも洗いをを行うことを規定した。また、濃縮処理後と酸処理あるいは加熱処理後においても菌数を測定することとした。

21年度は、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℃で完全に溶解して原液とし、「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)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）、次に、原液1mlを1/50PBS 500mlに加えた検水を作製し、各機関で通常行っている検査方法によって菌数の測定を行っていただいた。

これらの各機関からの検査結果の回答期間は約1ヶ月後として、19-21年度とも回答様式に原液菌数と作製検水菌数から求めた回収率を記載し、あわせて具体的な検査方法の内容の詳細についても記載していただいた(別添2)。なお、20-21年度は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2日後の到着日指定で発送し、各機関と同様に検査を行った。

4 測定結果の集計と回収率の評価

20年度は工程ごとの回収率を求めるため、濃縮法と処理法それぞれの段階ごとに回収率を求めた。21年度は、HPA（Health Protection Agency）に準じて回答のあった回収率のうち未処理を除いて集計し（n=44）、中央値、「良好範囲」（回答のあった回収率数の6%から94%の範囲）を示した。

5 精度管理の試行への協力機関

(1) 平成19年度

静岡県環境衛生科学研究所、富山県衛生研究所、宮城県保健環境センター、長崎県環境保健研究センターおよび大分県衛生環境保健センターに御協力いただき5機関で調査を行った。

(2) 平成 20 年度

北海道立衛生研究所、宮城県保健環境センター、静岡県環境衛生科学研究所、富山県衛生研究所、岡山県環境保健センター、長崎県環境保健研究センターおよび大分県衛生環境保健センターに御協力いただき、これに当所を含めた 8 機関で調査を行った。

(3) 平成 21 年度

民間検査機関の7機関を含め、次の30機関によって調査を行った。

- ・ 関東甲信静ブロック内の参加希望地研 ……15機関
- ・ 研究班協力地研 …………… 8機関
- ・ 民間検査機関(神奈川県環境計量協議会の一部会員) …… 7機関
(P2 施設の保有機関)

C. 結果

1 試料の菌数

試料には濃度の異なる 2 種類のディスクを用いたが(19 年度は活性炭入りのため除く)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、平均菌数をみると、20 年度については試料 1 が 5.4×10^3 CFU/ml (n=9)、試料 2 が 2.7×10^4 CFU/ml (n=9)、CV% は 25.4%と 12.4%であった。また 21 年度については試料 1 が 5.29×10^3 CFU/ml (n=10)、試料 2 が 5.41×10^4 CFU/ml (n=10)、CV%は 19.6%と 16.3%であった。(表 1)

2 各機関へ発送後のディスク菌数

各機関へ到着した試料を培養法で測定した結果を(表 1)に示した。20 年度と 21 年度をみると、20 年度においては試料 1 が平均 2.20×10^3 CFU/ml (1640~6050CFU/ml、n=13)、CV%は 42.9%であり、試料 2 が平均 2.00×10^4 CFU/ml (11650~23600 CFU/ml、n=13)、CV%は 23.4%であった。また 21 年度においては試料 1 が平均 2.64×10^3 CFU/ml (30~7300CFU/ml、n=30)、CV%は 75.5%であり、試料 2 が平均 2.14×10^4 CFU/ml (670~57000 CFU/ml、n=30)、CV%は 67.5%であった。

以上のように各機関の検査結果をみると、20 年度においてはオーダーの違いはなかったが、21 年度においては 2 オーダー以上の差があり、これを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、CV%を比較すると 1.7 倍から 3 倍以上に拡大していた。

なお、菌数確認のため当所から当所あてに発送したディスク (n=5) について確認したところ、菌数が半減していたものの CV%はほとんど変化が認められなかった。

3 各機関における菌数測定をもとにした回収率

19年度から21年度までの参加機関43機関（19年度5機関、20年度8機関、21年度30機関）の検査結果を取りまとめ、表2-1～2-3に示した。

19年度の試料2はディスク菌数が 10^5 CFU/ディスクと高くなっている。なお、各年度とも一部の機関においては異なった検査法や繰り返し測定を行い複数の結果を出していたため、参加機関数の43機関より測定結果の回答件数が133件と多数になったが（19年度n=25、20年度n=60、21年度n=53）、そのまますべて表中に記載した。

全体の回収率をみると、試料1は1/50PBS500ml中に 10^3 CFU/mlの菌数を加えて検水としたが、各検査機関における回収率（未処理は除く）は0%から最大96.2%というように著しい差が認められた（19年度は0%、20年度は0～96.2%、21年度は0～75.0%）。

また、試料2も1/50PBS500ml中に 10^4 CFU/ml（19年度のみディスク菌数が 10^5 CFU/ディスク）の菌数を加えは検水中にと試料1より1桁大きな菌数を加えた濃度としているが、同様に0%から最大95.3%というように著しい差が認められた（19年度は2.9～34.9%、20年度0～95.3%、21年度は0～58.1%）。

4 HPAの方法による集計結果の評価

なお、配付試料が同一で、もっとも参加機関数が多かった21年度の検査結果（30機関）の回収率について、未処理を除き、HPA（Health Protection Agency）の評価方法に準じて集計し、中央値、「良好範囲」（n=44 6%から94%の範囲）で示した。（図4-1、4-2）良好範囲外は、回収率が0%のものが多かった試料1がn=44中15（34.1%）、試料2がn=44中8（18.2%）であった。また、検査工程別測定菌数の分布と中央値を示した。（図5-1、5-2、図6-1、6-2）

5 検査工程別回収率の特徴

21年度における濃縮法、未処理、酸、加熱処理といった検査工程別回収率を示した（表3）。回収率は、全体としては遠心法とろ過法は同程度であったが、酸・加熱処理を行うことで回収率は低下し、バラツキが拡大した。

処理を行った場合、加熱処理より酸処理の方が2.3～10倍と明らかに高い回収率を示した。

各機関で行っている詳細な検査方法等の条件が回収率へ影響を与えたことも考えられたので、調査票への記載を求めたが、試料の輸送日数、保存期間、保存温度などの条件における回収率への影響は認められなかった。

ただしその中で、 $0.2\mu\text{m}$ フィルターを使用し酸処理を行った場合の回収率の比較では、試料1についてはポリカーボネート製が38.6%（n=5）、ニトロセルロース製が8.9%（n=8）、また試料2についてはポリカーボネート製が39.3%（n=5）、ニトロセルロース製が14.0%（n=8）と、ポリカーボネート製が良好という結果となった。

6 検査の経験による影響

試行経験回数による影響を見るため、この精度管理システムの経験機関と初回参加機関の回収率を比較したところ、20年度は影響が認められ、19年度試料1の回収率0%が14.1%に向上した(表4)ものの、21年度においては差異が認められなかった。

7 21年度精度管理参加協力機関への結果報告

各機関に機関番号を付し匿名とし回答を集計した。集計結果を各機関へメールにて報告した。(別添3)

D. 考察

1 検査機関

(1) 民間検査機関

今回初めて民間検査機関に対して精度管理への参加協力を求めたが、当所から民間検査機関へレジオネラ属菌を発送することは精度管理検体であっても当所で定めている微生物環境安全管理要領に抵触することがわかったためP2設備の設置確認を書面で求めた。このためP2施設を持たない機関では協力希望があるにもかかわらず、今回は参加していただけなかった。

(2) 関東甲信静ブロック地研

ブロック内21機関に協力依頼を送ったところ、15機関(70%)の参加が得られた。なお、その中からは「行政処分や訴訟等を伴う事例もあるので、地方衛生研究所における精度管理の必要性を強く感じます。」との意見があったことから、精度管理のシステムの確立は行政的な面からも重要であると考えられた。

2 配付した試料の菌数

今回作製した試料用ディスクのCV%(n=10)は、試料1が19.6%、試料2が16.3%であったが、これは、イギリスHPAにおいては使用されている精度管理用LENTICULEディスクのCV%が25%以内であればレジオネラの精度管理試料として使用できると定めていることから、今回作製した試料用ディスクについては、実用性において問題のない範囲内であると考えられた。

3 配付後のディスク菌数

21年度における試料1、2の測定菌数を相関図に示したところ(図7)となり、ディスクの菌数はバラツキがあったものの、試料1、2は概ね相関を示した。このことから、発送から測定結果を得るまでの工程で何らかの影響を受けた可能性があると考えられる。しかし、詳細な菌数測定方法(別添2)の記載からは輸送期間、試料到着後の保存

温度、検査開始までの日数といった条件において差異が認められず、各機関の培養等検査工程による影響については確認することはできなかった。

4 ディスクの送付方法

現在、精度管理の発送は「ゆうパック」に依存しているが、試料の発送に採用している「ゆうパック」事業が21年10月に廃止されるとか、今後菌株はチルドで発送できなくなるとの情報もあり、精度管理を実施していく上では、改めて適切な輸送法の確保が不可欠と考えられた。

5 各機関における試料測定結果

19～21年度の検査結果は、回収率を見ると、試料1では、19年度は0%、20年度は0～96.2%、21年度は0～75.0%、試料2では19年度は2.9～34.9%、20年度は0～95.3%、21年度は0～58.1%となり、著しい差異が認められた。

検査工程別回収率を見ると、今回の結果では、酸処理法に比べ、加熱処理を行うことによる低下が著しかった。なお、HPAでは、ディスクから作製した検水は、酸処理に比較して熱処理の回収率が低下すること報告している。したがって、ディスク法では、加熱法の回収率を正確に評価できない可能性もあるので、低下要因の究明や見直し検討が必要と考えられた。このため、ディスク法に代わる新たな標準試料作製や疑似検体作製の検討など、両方からアプローチしていく必要があると考えられた。

また、検査の習熟度による影響は明確な結果が得られなかったものの、一部の検査工程の統一化により回収率が向上したことから、それとあわせて担当者の研修等により回収率向上を図っていくことが必要と考えられた。

6 各機関の測定結果の評価方法

レジオネラ属菌の検査方法は、濃縮法や、酸・加熱処理法など検査条件が機関ごとに異なり評価が複雑になるため、HPAに準じ全て回答を集計した。中央値と6%から94%の範囲の「良好範囲」として示した。良好範囲外の回収率は、試料1が15、試料2が8とかなりの割合を占める結果となった。20年度にろ過法と酸処理法を採用した機関の回収率の平均を見ると、試料1で69.9% (n=10)、試料2で67.0% (n=10)であった。比較すると、今回「良好範囲」の高い回収率の側を見ると、試料1では回収率52.9%以上、試料2でも回収率48.6%以上のものが外れることとなり、結果として今回のように全体的に低い回収率となった場合、「良好範囲外」と評価されてしまうことから、この集計方法をそのまま採用してよいものか、再考が必要と考えられた。

E まとめ

1 ゼラチン・ディスク法の実用化について

HPA の評価方法からは配付方法としては実用性が認められるものの、酸処理に比較して熱処理の回収率が低下するとの報告もあることから、回収率低下要因の究明を行うとともに、ディスク法に代わる新たな標準試料作製や疑似検体作製の検討など、両方からアプローチしていく必要があると考えられた。

2 各機関における検査精度の向上について

回収率のバラツキの大きさが課題であるため、検査方法の詳細検討により回収率悪化の主原因を究明するとともに、各機関における検査工程の統一や検査担当者の研修制度等により回収率と検査精度の向上を図っていくことが重要である。

そのためには、HPA の評価方法に準じて集計し、その結果を各機関へお知らせし、「良好範囲」から外れた回収率となった機関においては一層の回収率向上に努めていただく仕組みとすることが効果的と考えられた。

3 精度管理システムの確立に向けて

関東甲信静ブロックからの意見にもあるとおり、行政処分や訴訟等を伴う事例も想定されることから、今後とも検査工程の精査検討による回収率の向上とともに、各機関における的確な検査の実施の基礎となる外部精度管理システムを早急に確立していく必要があると考える。

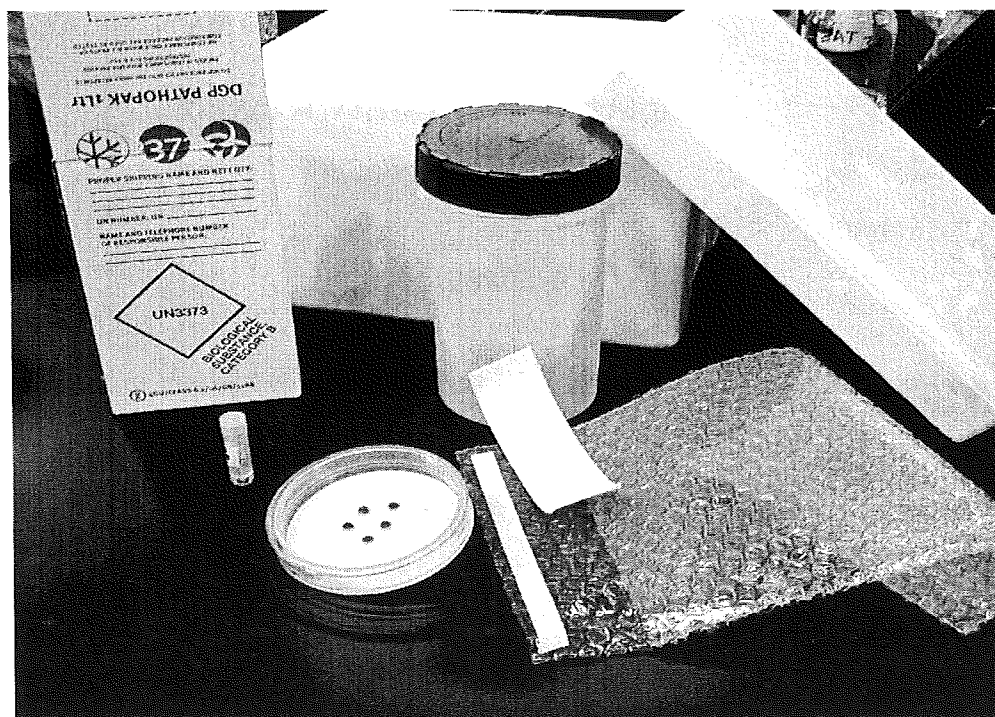


図1 試料の発送

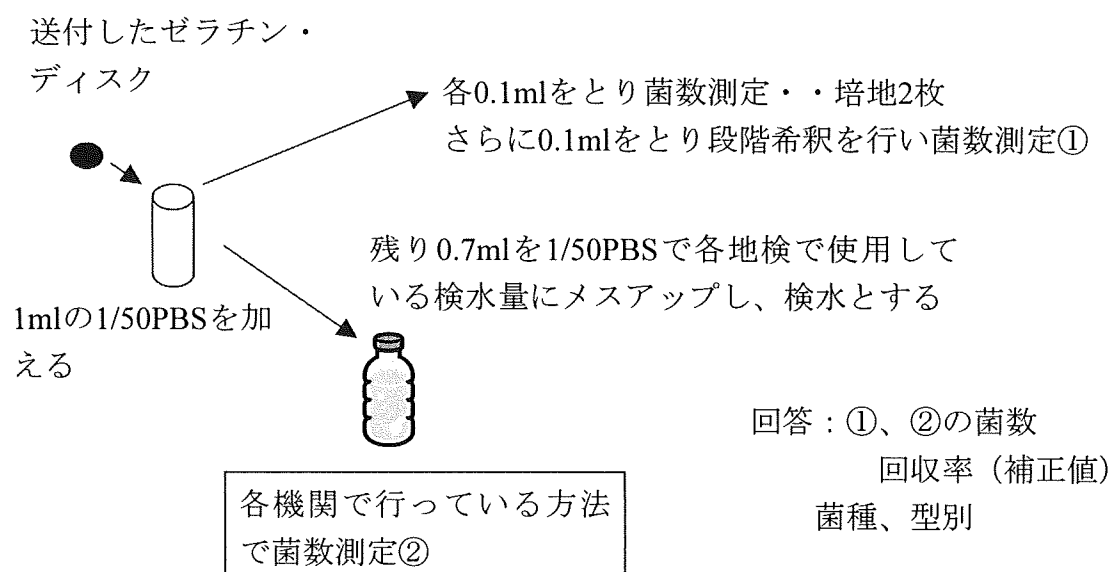


図2 19年度精度管理実施方法

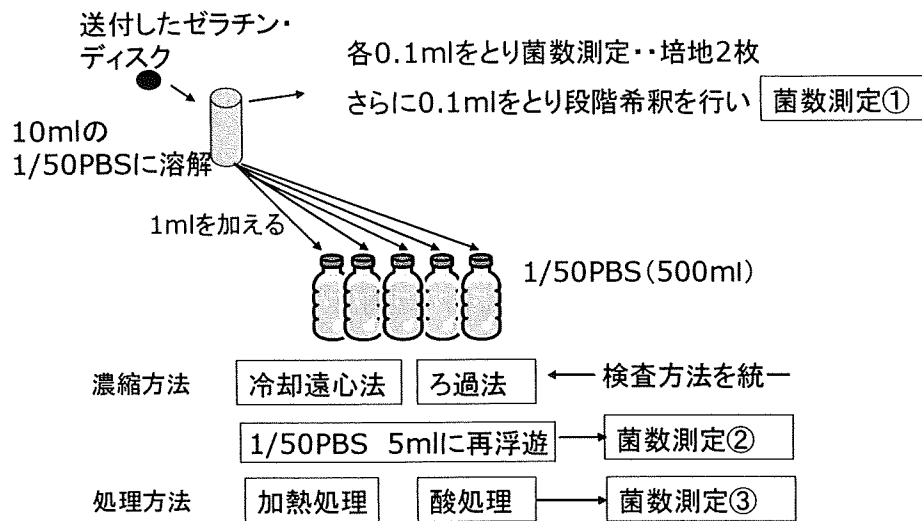


図3 20年度精度管理実施方法

表1 試料菌数 (CFU/ml)

試料番号	発送前		発送後*		参考値**	
	菌数 (n=10)	CV%	菌数 (n=30)	CV%	菌数 (n=5)	CV%
21年度						
試料1	5.29×10^3	19.6	2.64×10^3	75.5	2.99×10^3	28.5
試料2	5.41×10^4	16.3	2.14×10^4	67.5	2.57×10^4	15.1
20年度						
試料1	5.4×10^3	25.5	2.2×10^3	42.9	CFU/ml	
試料2	2.7×10^4	12.4	2.0×10^4	23.4		

*: 協力機関の集計 **:-40°C 20日後測定値