

は、分離培地の種類、前処理条件に左右されることなく供試菌の発育状況は、 10^3 希釈:+++、 10^4 希釈:++、 10^5 希釈:350 集落前後、 10^6 希釈:30 集落前後であった。保存 4 日目では、未処理と酸処理試料においては、実験開始時と変化はなかったが、熱処理試料において、BCYE α と MWY 寒天培地ともに、 10^3 希釈:++、 10^4 希釈:+、 10^5 希釈:50 集落前後、 10^6 希釈:4 集落と、ほぼ 10 分の一にまで減少が認められた。保存 7 日目では、分離培地の種類には左右されなかったが、未処理、酸処理で、 10^3 希釈:++、 10^4 希釈:+、 10^5 希釈:150 集落前後、 10^6 希釈:15 集落前後と、実験開始時の菌数と比較し、ほぼ半減した。さらに熱処理では、 10^3 希釈:+、 10^4 希釈:50 集落前後、 10^5 希釈:2 集落前後、 10^6 希釈:0 集落と、実験開始時の菌数と比較しほぼ 100 分の一にまで減少が認められた。これらの結果から、本法による模擬試料であれば、作製後 1 週間以内に検査ができるのであれば、未処理、酸処理の場合、非選択培地、選択培地(今回は MWY)に関係なく、オーダーの減少もなく検査結果を求めることができると思われた。熱処理については試料作製 3 日目以内であれば、同じ結果を求めることができると思われた。

これまでのゼラチンディスクによる試料においても、熱処理をすることがその発育に大きく影響を与えることがあり、場合によっては検出されなくなることもあった。酸処理においても熱処理ほどではないが、その発育に影響を与えていた。本法による模擬試料では、保存 7 日目までの確認ではあるが、未処理、酸処理の場合、非選択培地、選択培地(今回は MWY 寒天培地)に関係なく、オーダーの減少もなく検査結果を求めることができた。熱処理においても保存 3 日目以内であれば問題ないが、保

存 4 日目以降から菌数の減少が見られ、保存 7 日目には目立った菌数の減少が認められた。今回の供試菌は、その分離過程から酸にも熱にも強いタイプと思われたが、保存期間が長くなるほど、熱処理による影響が認められたことから、熱処理を想定した模擬試料を作製することは容易な事ではなく、供試菌の選択を含めた十分な検討が必要であると思われる。今後は保存期間の延長や他の選択分離培地の影響等も考慮した検討が必要であると考え。

D. 結論

精度管理試料については、長期間の冷蔵や冷凍保存、酸処理や熱処理、各種選択分離培地の影響を受けないことが理想と考える。しかしながら、そのような試料の作製には膨大な実験による確認作業が必要であり、容易なことではない。そのため、場合によっては精度管理を行うための検査法は別で考え、例えば、前処理は行わず、非選択分離培地のみを利用する方法も視野に入れての総合的な検討が必要であると考え。特に手技に重きを置いた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、施設間での前処理や分離培地の違いが結果に大きく影響する可能性も十分に想定される。昨年度までの報告書においても、前処理や分離培地の違いが検査結果に影響していることを報告している²⁾。これらによる差を回避するためには、1) どのような前処理、選択分離培地においても影響の出ない試料を作製する、2) 前処理法、分離培地を全て統一する、3) 結果に影響を与えやすい、熱や酸による前処理や各種選択分離培地を使用しない、これらのいずれかによる精度管理が必要と思われる。精度管理の結果が思わしくなかった施設において、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を特定できない場合、どのように改善すれば良いのか分からなくなる可能性もあると思われる。そのため、検査のどの部分に重きを置いた精度管理を行うかの定義付けが重要になると思われる。その中で、精度管理試料については、定義目的を達成できるだけの安定した試料を作製する必要があり、加えて複数の担当者間で比較的簡易に調製ができるような、試料作製方法であることが望ましいと思われる。

E. 参考文献

1) 渡辺祐子 他、:ゼラチン・ディスク配布による菌数測定的外部精度管理: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～平成 21 年度総合研究報告書 pp.127-155

2) 森本 洋 他、:検査法の検討: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～平成 21 年度総合研究報告書 pp.88-126

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 液体培地を利用したレジオネラ属菌保存試験による測定集落数

(集落)

使用培地		BCYE α				MWY			
希釈段階		$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6$
0日目	未	+++	++	331	44	+++	++	322	32
	熱	+++	++	335	34	+++	++	340	38
	酸	+++	++	351	43	+++	++	362	35
1日目	未	+++	++	385	32	+++	++	386	35
	熱	+++	++	304	31	+++	++	317	34
	酸	+++	++	370	38	+++	++	349	38
2日目	未	+++	++	376	37	+++	++	327	39
	熱	+++	++	326	30	+++	++	315	32
	酸	+++	++	372	40	+++	++	355	37
3日目	未	+++	++	341	37	+++	++	353	36
	熱	+++	++	332	32	+++	++	324	30
	酸	+++	++	362	41	+++	++	379	35
4日目	未	+++	++	332	37	+++	++	330	33
	熱	++	+	57	4	++	+	44	4
	酸	+++	++	355	32	+++	++	371	38
7日目	未	++	+	158	18	++	+	150	13
	熱	+	58	1	0	+	47	2	0
	酸	++	+	147	14	++	+	159	16

表示日数：保存日数

未：未処理、熱：熱処理、酸：酸処理

+, ++, +++：多数の菌が発育し計測不能

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 年度分担研究報告書

斜光法を取り入れた培養法と研修

研究分担者 緒方喜久代 大分県衛生環境研究センター

研究協力者 若松正人、成松浩志 大分県衛生環境研究センター

研究要旨：昨年度に引き続き、斜光法を取り入れた培養法の迅速化について検討を行った。その結果、より短い期間で正確な培養結果が得られ、高額で特殊な機器も必要としないことから、浴槽水等のレジオネラ属菌の迅速培養に大いに役立つことが示された。数種類の分離培地の併用や雑菌処理工程の併用により、検出率が向上することが確認された。これらの検討を行うことにより、最良の公定法を提示することが可能となる。

民間検査機関に斜光法を普及するために、あらゆる機会を捉え、採水から搬入、分離培養法や LAMP 法の留意点などについて研修を行った。

A. 研究目的

浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として広く用いられている培養法は結果を得るまでに 7 日から 10 日の長い時間を要する。患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時やレジオネラ属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中のレジオネラ属菌の存在あるいは菌数を速やかに把握する必要がある場合は、監視現場からより迅速で、かつ正確な検査が求められている。そこで、様々な泉質を有する温泉水等を対象に、正確・簡便・迅速な培養結果を得る方法としての斜光法(分離培地上の出現コロニーに 2 方向から斜光をあて、実体顕微鏡下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方法:参考文献 1)をレジオネラ属菌検査法に導入すること目的に従来の培養法との比較検討を行った。また、民間検査機関へ斜光法の普及を図るため、あらゆる研修・会議の場を利用し、斜光法の実践研修会を開催した。

一方、迅速検査法として普及してきた LAMP 法について、培養法との比較検討を

行った。

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 22 年 5 月、6 月、9 月、11 月に搬入された浴槽水等 67 検体を対象とした。

検査法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した。すなわち、検水 1500ml をメンブランフィルター(直径 47mm、0.2 μ m、ADVANTEC 社 POLYCARBONATE)で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 15ml 入りの滅菌コニカルビーカー(100ml 容量)に移し、ボルテックスミキサーにて 5 分間激しく振とうした。ろ過濃縮後、濃縮検体(未加熱と表記)と 50 $^{\circ}$ C 20 分加熱後、急冷した濃縮検体(加熱処理と表記)をそれぞれ濃縮試料(100 倍濃縮)とした。

2. 培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYO α 寒天平板(栄研化学)、GVPC 寒天平板(日研生物)、MWY 寒天平板(自家製)を用い、非濃縮処理の検水および各濃縮試料について、

必要に応じて階段希釈し、その 200 μ L を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布し、これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36 $^{\circ}$ C で培養した。

培養 3 日目に、2 方向から光を照射し、実体顕微鏡下で各分離培地を観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYE α 寒天培地(自家製)及び血液寒天培地(ウマ血, 自家製)に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、PCR 法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は 36 $^{\circ}$ C で 10 日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、同様の同定検査を行った。最終的に同定されたコロニー数をもって検水 100ml あたりのレジオネラ属菌数に換算した。分離した菌株は、Legionella Latex Test Kit(OXOID)及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

3. LAMP 法

濃縮検体について、Legionella Detection Kit E(栄研化学)を用い、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行った。

加えて、培養(+)LAMP(-)の濃縮検体について、阻害回避試薬を用いた検討を行った。

4. 斜光法の普及啓発のための研修会

添付資料(PDF)を用いた座学とモデル的に作成したサンプル平板を実体顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

1. 培養法

培養結果の概要を表 1 に示した。67 検体中 36 検体(54%)からレジオネラ属菌が検出された。内訳は浴槽水 34 検体中 21 検体(62%)、湯口水 33 検体中 15 検体(45%)であった。

レジオネラ属菌が検出された 36 検体について分離培地の検出感度を比較した結果を表 2 に示した。濃縮未加熱検体では、使用した 3 種類の分離培地全てから分離されたも

のが 17 検体、WYO α +GVPC からの分離が 1 検体、WYO α +MWY からの分離が 3 検体、GVPC+MWY からの分離が 1 検体、WYO α のみからの分離が 4 検体、GVPCのみからの分離が 4 検体、MWYのみから分離が 1 検体であった。濃縮加熱検体では、3 種類の分離培地全てから分離されたものが 21 検体、WYO α +GVPC からの分離が 1 検体、WYO α +MWY からの分離が 1 検体、GVPC+MWY からの分離が 1 検体、WYO α のみからの分離が 4 検体、GVPCのみからの分離が 4 検体、MWYのみから分離が 1 検体であった。

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ついて確認検査を行った。その結果、レジオネラ属菌が検出された 36 検体のうち 34 検体は斜光法で確認することができたが、2 検体は継続培養後にレジオネラ属菌が確認された(表 3)。継続培養で陽性となった 2 検体から分離されたレジオネラ属菌は、ともに *L. pneumophila* であった。

浴槽水と湯口水ともにレジオネラ属菌が検出された施設は 11 施設であった。浴槽水(+)湯口水(-)となった施設は 9 施設、浴槽水(-)湯口水(+)となった施設は 5 施設であった(表 4)。

分離された *L. pneumophila* の主な血清群は SG1、SG3、SG5、SG6、SG8、SG9、SGUT などであった。

残留塩素濃度と菌数の結果を図 1 に示した。今回、残留塩素濃度が 0.6ppm 以上あれば、レジオネラ属菌は分離されなかった。

LAMP法については、1 検体につき 3 回繰り返し測定を行い、1 回でも陽性となった場合はその結果を採用した(表 5)。培養(+)LAMP法(-)の濃縮検体 10 検体について、阻害回避処理試薬を用いた検討を併せて行った。

D. 考察

レジオネラ属菌が検出された 36 検体について、使用した分離培地 WYO α 、GVPC、MWY の個々の解析をすると、各分離培地でのレジオネラ属菌の分離は 25 検体から 30

検体であり、レジオネラ属菌を感度よく分離するためには、レジオネラ属菌の発育特性に配慮し、選択性の異なる培地を併用することが望ましい。また、未加熱の濃縮検体では31検体から、加熱処理では33検体からレジオネラ属菌が分離され、処理工程を併用することにより36検体からレジオネラ属菌が検出された。各種分離培地の併用や処理工程の併用など培養チャンスを多くすることが検出率アップにつながり、レジオネラ感染症の危険性を回避することに貢献できると考える。

培養7日以降で発育を認める検体もあったため、培養3日目で培養検査を打ち切ることにはできないものの、斜光法は、高価かつ特殊な機器を必要とせず、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。今後は、LAMP法で得られた結果と斜光法の培養結果を合わせて迅速な行政対応を行い、10日間引き続き培養を継続し、最終結果として判断することが可能と考える。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。

浴槽水(+)湯口水(-)となった9施設は、浴槽や床の清掃不足や入浴客の不適切な利用方法などが原因と考えられる。浴槽水(-)湯口水(+)となった5施設のうち、1施設は浴槽水の残留塩素濃度が4.08ppmと高く、他の1施設の浴槽水は雑菌が多く、検出不能という事例であった。

LAMP法において、レジオネラ属菌数が少ない検体の場合等は、検査結果にバラツキが生じやすく、培養法(+)LAMP法(-)の不一致の一因として考えられた。また、泉質によってはLAMP反応阻害が生じる可能性があるため、阻害回避処理試薬を用いた検討を行ったが、今回、その効果は得られなかった。

迅速培養法(斜光法)導入に向けた民間検査機関等への研修は、7月29日に「西日本地区食品衛生検査機関研究協議会」、12月2日、3日に「平成22年度地域保健

総合推進事業に基づく九州支部事業 平成22年度九州ブロック地方衛生研究所地域専門家会議(微生物部門)」、平成23年2月21日に「大分県水分野連絡会」において県内の民間検査機関を対象に実施した。感想はおおむね良好で、多くの施設で従来からのレジオネラ検査に加えて、斜光法の取り組みを実施し、効率的検査に貢献している。

E. まとめ

入浴施設における浴槽等の清掃・消毒効果を確認するための衛生管理手法として、迅速に結果が得られるLAMP法を導入することは効果的ではあるが、菌量が少ない場合は、見逃しの危険性がある。また、「100mlあたり10cfu以下であること」という基準がある限り、培養法の併用は必須である。そこで、培養法における迅速化を図るため、斜光法を取り入れた方法を併用することにより、迅速な行政対応が可能になるものと考え。今後、さらに斜光法の有用性の確認を重ね、斜光法を含めた精度高いレジオネラ属菌検査を普及するための研修システムの強化を図っていきたい。

参考文献

- 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. 環境感染誌, 2010. 25(1):8-14
- 2 「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」厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業、主任研究者 倉 文明、H19年度総括・分担研究報告書
- 3 「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」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、研究代表者 倉 文明、H20年度総括研究報告
- 4 「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」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、

研究代表者 倉 文明、H21 年度総括
研究報告

状況. 大分感染症研究会第48回例会,
大分 (2011.3)

F. 研究発表等

- 1) 緒方喜久代、若松正人、成松浩志：水
環境におけるレジオネラ属菌の生息

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 培養法の結果

採水箇所		検体数	検出数	WYO	GVPC	MWY
掛け流し式	浴槽水	21	10	7	9	8
	湯口水	21	9	8	6	5
循環式	浴槽水	13	11	9	10	8
	湯口水	12	6	6	5	4
計		67	36	30	30	25

10cfu/100m によらない(定性)

表2 雑菌処理と分離培地の検出感度(n=67)

			未加熱	加熱
WYO	GVPC	MWY	17	21
WYO	GVPC		1	1
WYO		MWY	3	1
	GVPC	MWY	1	1
WYO			4	4
	GVPC		4	4
		MWY	1	1
計			31	33

10cfu/100m によらない(定性)

表3 浴槽水と湯口水の検出状況(n=32)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	11	5	16
	-	9	7	16
計		20	12	32

10cfu/100m によらない(定性)

表4 斜光法と従来法の比較

斜光法で検出	従来法のみで検出	合計
34	2	36

10cfu/100m によらない(定性)

図1 残留塩素濃度と菌数

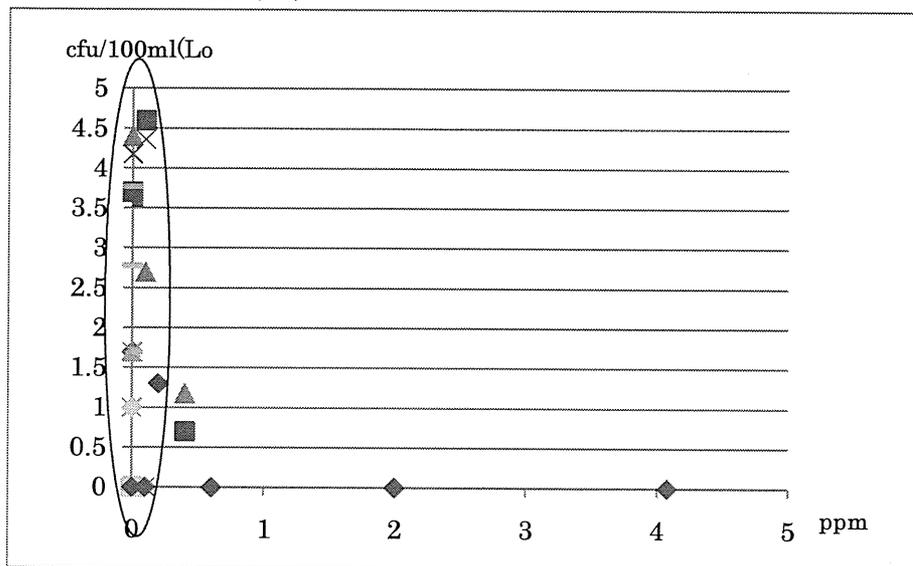


表5 LAMP法と培養法の比較

		LAMP		計
		+	-	
培養法	+	26	10	36
	-	7	24	31
計		33	34	67

10cfu/100m によらない(定性)

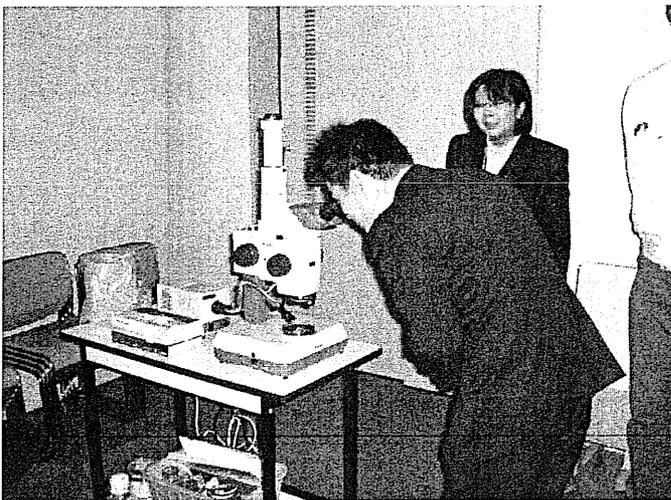
表6 LAMP法(-)培養法(+の不一致検体の詳細

No	菌数 cfu/100ml	菌種	泉質	pH	参考
2010.5.7-1	500	L.p	単純温泉		浴槽水 №1
2010.9.2-10	50	L.p	ナトリウム・マグネシウム・カルシウムー 炭酸水素塩ー硫酸塩泉	6.6	浴槽水 №1-10
2010.9.2-11	50	L.p	ナトリウムー炭酸水素・塩化物泉	8.4	湯口水 №1-1
2010.9.30-9	50	ロンジニ	マグネシウム・ナトリウム炭酸水素塩泉	8.0	浴槽水 №1-9
2010.9.30-10	50	L.p	マグネシウム-ナトリウム炭酸水素塩泉	8.0	浴槽水 №2-10
2010.9.30-16	15	L.p	炭酸水素	7.9	湯口水 №2-6
2010.9.30-17	10	L.p	単純泉	8.2	湯口水 №2-7
2010.11.11-1	600	L.p	炭酸水素塩泉	7.3	浴槽水 №3-1
2010.11.11-11	5	L.p	カルシウム-硫酸塩泉		湯口水 №3-2
2010.11.11-12	5	L.p	水道水/ボーリング水	8.4	湯口水 №3-3

研修風景



12月2日、3日に「平成22年度地域保健総合推進事業に基づく九州支部事業 平成22年度九州ブロック地方衛生研究所地域専門家会議(微生物部門)」



平成23年2月21日に「大分県水分野連絡会」

レジオネラ検査の実際と課題

大分県衛生環境研究センター
微生物担当 緒方喜久代

2011年2月21日

レジオネラ症

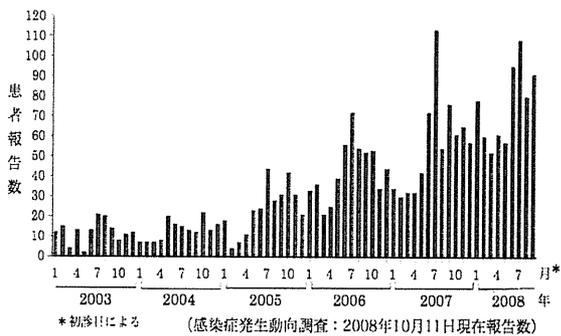
レジオネラ属菌が原因で起こる感染症の総称で、
主な病態には

在郷軍人病 (Legionnaires' disease) : 重症化
傾向の強い肺炎型 pneumonia type

1976年に米国のフィラデルフィアで開催された
在郷軍人会で集団肺炎として発生

ポンティアック熱 (Pontiac fever) : インフルエン
ザ様の熱性型 fever type

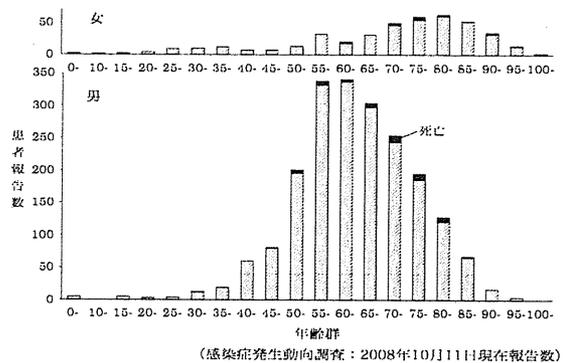
図1. レジオネラ症患者発生状況, 2003年1月~2008年9月



* 初発日による (感染症発生動向調査: 2008年10月11日現在報告数)

感染症情報センター資料

図3. レジオネラ症患者の性別年齢分布, 2003年1月~2008年9月



(感染症発生動向調査: 2008年10月11日現在報告数)

感染症情報センター資料

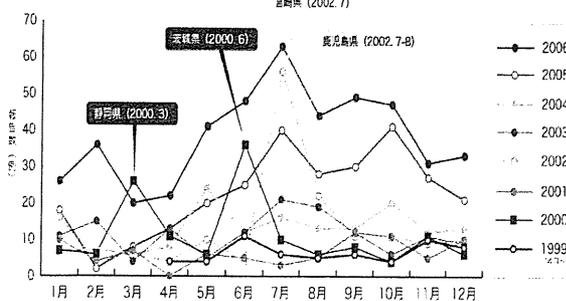


図2. レジオネラ症の発症月別報告数 (1999年4月~2006年)

感染症情報センター資料

イムノクロマトグラフィー法による尿中抗原の検出

L. pneumophila 血清群1を検出

- Binox NOW *Legionella* (第一三共)
- ディップスティック栄研レジオネラ (栄研化学)
- Qライン極東レジオネラ (極東製薬)

15分で判定可能



賠償金は？宮崎の例



- 死亡した被害者一人と示談書が結ばれた。この被害者は肺炎は治ったが、体力が低下したこともあって既往症が再発死亡した。損害賠償額は約2370万円。集団感染では、医療費を含めて1319人に約3億9000万円の損害賠償金が支払われている。示談未成立は7人。

(読売新聞2004年4月18日より)

- 業務上過失致死傷罪に問われた元温泉支配人は、禁固3年、執行猶予5年の判決を言い渡された。

(共同通信2004年10月26日より)

全国レジオネラ対策会議資料

その他 注目すべき感染事例

- (1)自家製腐葉土からの感染 *L. pneumophila* 血清群1
- (2)庭土からの感染? *L. longbeachae*
- (3)ハウス栽培従事者の感染、死亡 *L. longbeachae*
- (4)冷却塔内の清掃で感染 *L. pneumophila* 血清群1
- (5)老人保健施設で感染、死亡 *L. pneumophila* 血清群1
- (6)スポーツ施設のジャグジーで集団感染2例



L. pneumophila 血清群1

レジオネラ属菌の分布

- (1)自然界
河川、池、沼などの淡水や土壌に生息
- (2)人工環境水
冷却塔水、加湿器、循環式浴槽、院内環境水

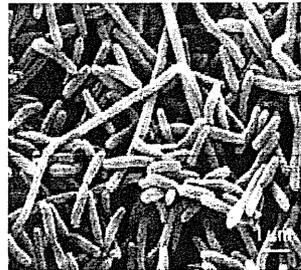
基本的にエアロゾル(aerosol)を発生するすべてが感染源となり得る。

しかし、感染源が不明なことの方が多。



レジオネラ属菌の特徴

- 菌の発育が遅く、培養に1週間程度要する
- 通常の細菌学用培地には発育しない



● 0.3~0.9×2~20μm、好気性のグラム陰性桿菌

● コイル状あるいはラセン状の極鞭毛を有する



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

(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)

平成18年度～

研究代表者: 国立感染症研究所 細菌第1部 倉 文明
 研究分担者: 元国立感染症研究所 寄生動物部 遠藤卓郎
 研究分担者: 国立感染症研究所 細菌第1部 前川純子
 研究分担者: 国立感染症研究所 細菌第1部 常 彬
 研究分担者: 国立感染症研究所 寄生動物部 八木田健司
 研究分担者: 国立感染症研究所 細菌第1部 山崎利雄
 研究分担者: 大分県衛生環境研究センター 精方喜久代
 研究分担者: 神奈川県衛生研究所 黒木俊郎
 研究分担者: 静岡県環境保健科学研究所 杉山寛治
 研究分担者: 長崎県環境保健研究センター 田栗利紹
 研究分担者: 北海道立衛生研究所 森本 洋
 研究分担者: 岡山環境保健センター 中島 洋
 研究分担者: 横浜市衛生研究所 荒井桂子
 他、研究協力者

目的

●浴槽中のレジオネラ属菌を迅速かつ簡便に定量化(培養法: 10CFU/100ml)する方法としてリアルタイムPCRやLAMP法等(遺伝子検査法)に期待。

そこで、培養法と比較し、衛生管理上有用な検査法として用いられ得るかどうかを評価する。

●培養法の迅速化を図る。(斜光法)

●レジオネラ属菌検査における精度管理手法の確立。同時に、検査法の統一に向けた検討。

●効果的消毒方法の検討。

検査機関のSOPの基として使用頻度の高いと思われるもの

- 改訂・レジオネラ属菌防除指針
一温泉利用入浴施設用(1999.3)
(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
- 新版, 第3版 レジオネラ症防止指針(1999.11, 2009.3)
財団法人ビル管理教育センター
- 上水試験方法, 上水試験方法 解説編(2001年版)
日本水道協会
- 衛生試験法・注解(2005)
日本薬学会
- 病原体検出マニュアル(2003.12)
国立感染症研究所

公衆浴場における水質基準等に関する指針

(公衆浴場における衛生等管理要領等について: H12.12.15 生衛発第1811号厚生省生活衛生局長通知)

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 大腸菌群 原水、原湯、上り用湯及び上り用水の水質基準及びその検査方法
50ml中に検出されないこと
「水質基準に関する省令」(H.4厚生省令第69号) 浴槽水の水質基準及びその検査方法
1個/ml以下であること
「下水の水質の検定方法等に関する省令」(S.37.厚生省令・建設省令第1号)別表第1(第6条) | <ul style="list-style-type: none"> レジオネラ属菌 原水～ 浴槽水～
10CFU/100mL 未満であること

冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること |
|---|--|

大きな違い

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 大腸菌群 原水、原湯、上り用湯及び上り用水の検査方法
「水質基準に関する省令」(H.4厚生省令第69号)で定める検査方法によること 浴槽水の検査方法
「下水の水質の検定方法等に関する省令」(S.37厚生省令・建設省令第1号)別表第1(第6条)の大腸菌群数検定方法によること | <ul style="list-style-type: none"> レジオネラ属菌 原水～ 浴槽水～

冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること

↓
具体的方法(公定法)が示されていない |
|--|--|

検査法(大分県バージョン)

採水 2000ml(採水時 チオ硫酸ナトリウム添加)
 検水 1500ml 0.2µm ADVANTEC社POLYCARBONATEで濾過濃縮
 濃縮フィルターを滅菌蒸留水15mlに洗い出す(濃縮試料)
 濃縮試料を2分

未加熱 → 加熱(50°C 20分)

菌数測定
WYOα・GVPC・MWY

菌数測定
LAMP法
qPCR法

- 2000µlを遠心濃縮
- 沈さにキレックス液40µlを添加
- 99°C5分加熱
- キレックス粒子を吸い込まないように注意
- 深く上清を採取
- DICEで測定

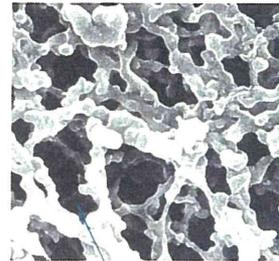
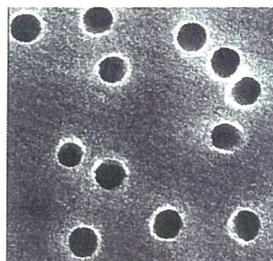
濃縮法の一例:ろ過濃縮法



ろ過膜の相違点

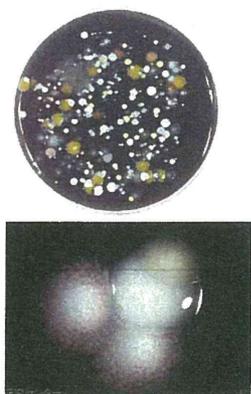
ポリカーボネイト

セルロースアセテート

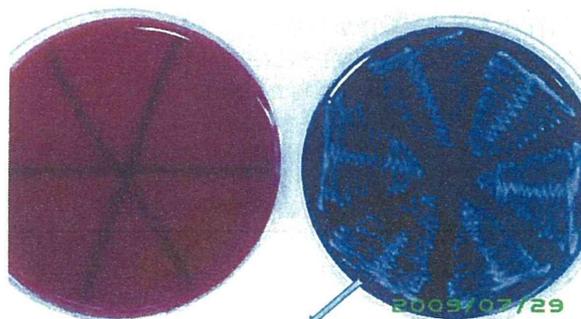


菌が絡まって、ろ過膜からばがれない。

- 初代分離培養では通常培養2~4日目に直径0.5mm以下の微小な集落を生じ、5日目以降には集落性状の判別と釣菌が可能な大きさ(直径1.5~2mm)に発育する。
- 概ね辺縁がやや不正な円形でわずかに隆起し、灰白色半透明、湿潤して光沢がある。



L-システイン要求試験

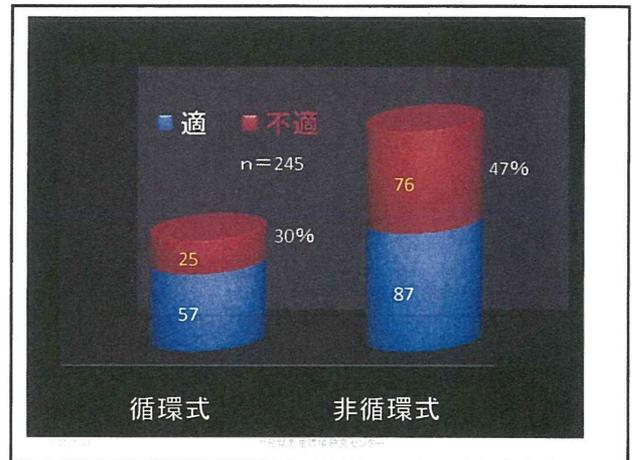
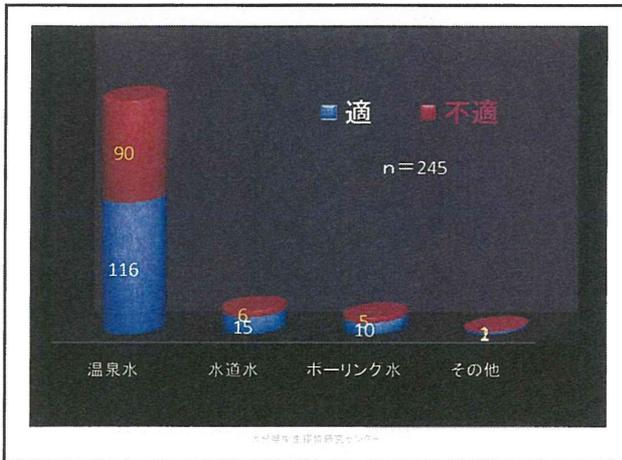
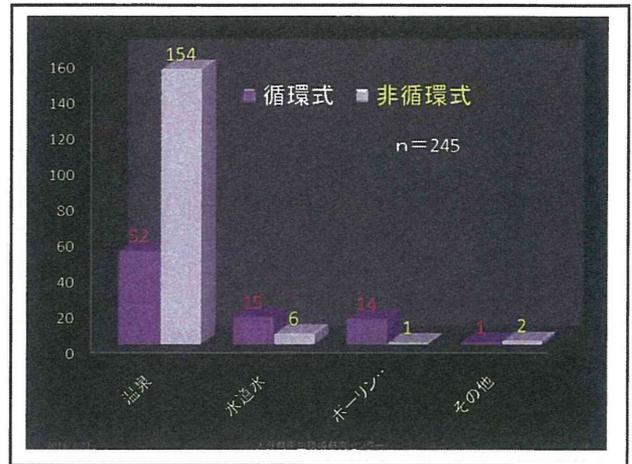
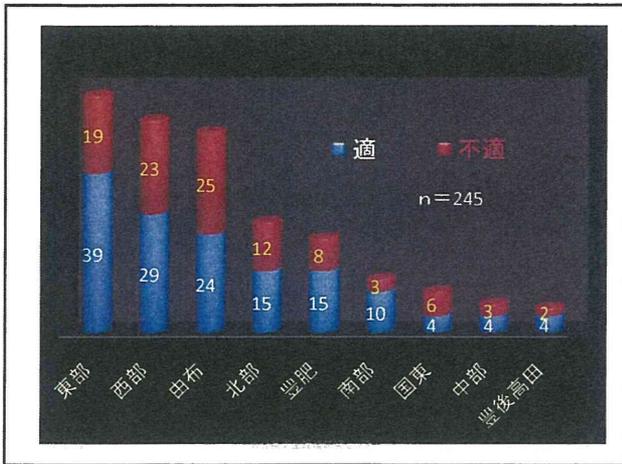


PCR検査(16s, 5s-rRNA, mip)

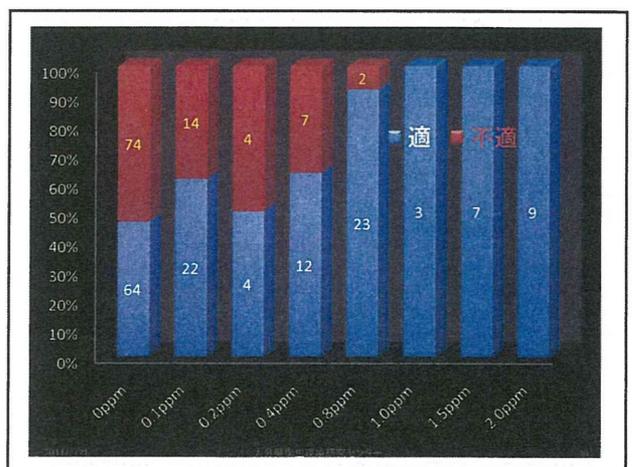
九州各県の実施検査法: アンケート調査からの抜粋

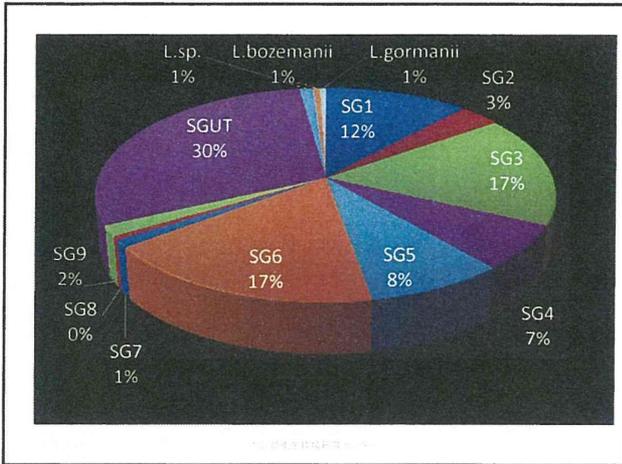
	検査実績	濃縮処理			雑菌処理		使用培地			
		なし(非濃縮)	ろ過法	遠心法	加熱	燻処理	WYOα	GVPc	MWY	BCYE
A	○	×	○	×	×	○	×	○	×	×
B	○	×	○	×	×	○	×	×	○	×
C	○	×	○	△	○	○	○	○	×	×
D	○	×	○	△	○	○	×	×	×	○
E	○	○	○	×	○	○	×	○	×	×
F	○	×	×	○	○	×	○	○	×	×
G	○	○	○	×	○	○	×	×	○	○
H	○	○	○	△	×	○	×	×	○	×
I	○	×	○	×	×	○	○	×	×	×
J	○	×	○	×	○	○	×	○	×	×
K	○	○	×	○	○	○	○	×	×	×
L	○	○	○	×	○	×	○	○	○	△
計	12	5	10	2	8	10	5	6	4	2

過去5年間のまとめ



CFU	0ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.4ppm	0.8ppm	1.0ppm	1.5ppm	2.0ppm
0	64	22	4	12	23	3	7	9
10	30	3	4	5	1			
100	33	9		1	1			
1000	8			1				
10000以上	3	2						





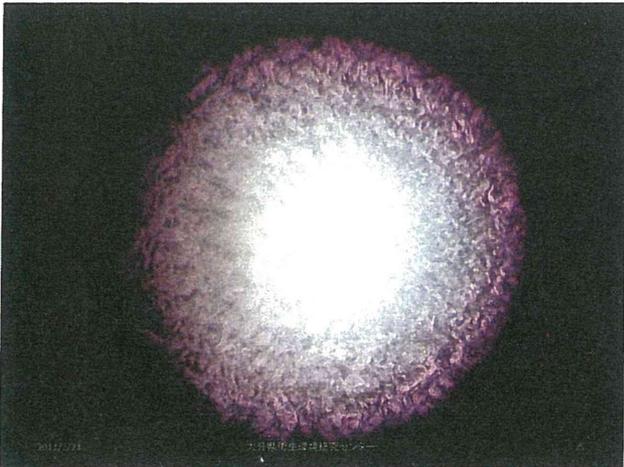
具体的に=平成21年度成果

検査法 (大分県バージョン)

採水 2000ml (採水時 チオ硫酸ナトリウム添加)
 検水 1500ml 0.2μm ADVANTEC社POLYCARBONATEで濾過濃縮
 濃縮フィルターを滅菌蒸留水15mlに洗い出す (濃縮試料)
 濃縮試料を2分

未加熱 → 菌数測定 WYOα-GVPC-MWY
 加熱 (50°C 20分) → 菌数測定 LAMP法, qPCR法

- 2000μlを遠心濃縮
- 沈さにキレックス液 40μlを添加
- 99°C5分加熱
- キレックス粒子を吸い込まないように注意 深く上清を採取
- DICEで測定



検査法(大分県バージョン)

採水 2000ml(採水時 チオ硫酸ナトリウム添加)
 検水 1500ml 0.2μm ADVANTEC社POLYCARBONATEで濾過濃縮
 濃縮フィルターを滅菌蒸留水15mlに洗い出す(濃縮試料)
 濃縮試料を2分

未加熱 → 加熱(50°C 20分)

菌数測定
WYOα・GVPC・MWY

菌数測定
LAMP法
qPCR法

- 2000μlを遠心濃縮
- 沈さにキレックス液40μlを添加
- 99°C5分加熱
- キレックス粒子を吸い込まないように注意
- 深く上清を採取
- DICEで測定

2012.12.13

大分県環境保健研究所センター

分離培地の検出感度

定性結果

n=68

			未加熱	加熱
WYO	GVPC	MWY	22	20
WYO	GVPC			
WYO		MWY	1	1
	GVPC	MWY		2
WYO			2	4
	GVPC			2
		MWY	2	4
計			27	33

2012.12.13

大分県環境保健研究所センター

分離培地の検出感度

定性結果

n=68

				検出数	WYO	GVPC	MWY
WYO	GVPC	MWY	24				
WYO	GVPC						
WYO		MWY					
	GVPC	MWY	1				
WYO			6				
	GVPC						
		MWY	5				
計				36	30	25	30

2012.12.13

大分県環境保健研究所センター

検査法(大分県バージョン)

採水 2000ml(採水時 チオ硫酸ナトリウム添加)
 検水 1500ml 0.2μm ADVANTEC社POLYCARBONATEで濾過濃縮
 濃縮フィルターを滅菌蒸留水15mlに洗い出す(濃縮試料)
 濃縮試料を2分

未加熱 → 加熱(50°C 20分)

菌数測定
WYOα・GVPC・MWY

菌数測定
LAMP法
qPCR法

- 2000μlを遠心濃縮
- 沈さにキレックス液40μlを添加
- 99°C5分加熱
- キレックス粒子を吸い込まないように注意
- 深く上清を採取
- DICEで測定

2012.12.13

大分県環境保健研究所センター

LAMP法と培養法の比較

	LAMP法	培養法		計
		+	-	
	+	33	13	46
	-	3	19	22
	計	36	32	68

5cfuが2検体含まれている

10cfu/100mlによらない(定性)

2012.12.13

大分県環境保健研究所センター

阻害回避処理試薬の効果?

検体No	培養法	LAMP法	
		従来法	阻害回避処理法
10 -7	検出せず	-	+
10 -9	1050 cfu	-	+
10-11	50 cfu	-	+
10-10	1000 cfu	+	+
10-16	5 cfu	-	-
10 -1	10 cfu	+	-
10 -5	50 cfu	+	-
10-17	40 cfu	+	-

2012.12.13

大分県環境保健研究所センター

LAMP法の繰り返し測定検討

検体No.	培養法	LAMP法				
		1	2	3	4	5
10-5	50cfu	+	-	-	-	+
10-11	50cfu	-	-	-	+	-
10-16	5cfu	-	-	-	-	-
10-17	40cfu	+	+	+	+	+

LAMP法と培養法の比較(その2)

		培養法	
		斜光法	従来法 (10日間観察)
LAMP法	+	46	3
	-	22	1
計		32	4

10cfu/100mlによらない(定性)

LAMP法のための判定では、赤字の件数が見逃しとなる。
斜光法のための判定では青字の件数が見逃しとなる。

まとめ

- 10cfu/100mlを考慮した場合、検出率は44% (30検体)で、定性とした場合は53%であった。
- 選択分離培地の併用が効果的であった。
- MWY培地のみでしか発育が認められないレジオネラ属菌の存在
- qPCRのDNA抽出のためのキレックス液量を200μlから40μlに変更したことにより、抽出効率が上がり、安定した結果が得られた。
- 培養(+)LAMP(-)の不一致の要因として、菌数が少ない検体の場合はサンプリングのバラつきや誤差が考えられた。

課題

- 検査法の統一: 採水から検査まで
- 迅速培養法の活用
- 遺伝子検査法の取り扱い
- 精度管理

採水時の注意事項について-1

- (1) 施設につき浴槽水、湯口水の2か所について、それぞれ2Lずつ採水してください。
- (2) 採水時に残留塩素濃度を測定し、塩素残留が確認された場合は、必ずチオ硫酸ナトリウム溶液で中和してください。
- 具体的には、検水500mlにつき、配布されたチオ硫酸ナトリウム溶液1mlを添加してください。なお、チオ硫酸ナトリウムを余分に添加しても測定には影響がありませんので、残留塩素が測定できなかった場合は、念のために添加してもかまいません。

採水のご協力ありがとうございました。
今年度も よろしく願っています。



採水時の注意事項について-2

- (3) 検水は凍結させず、保冷容器に入れて搬送し、できるだけ速やかに検査を実施する。止むを得ぬ時は2日以内とし、5日以上にならないようにする。
- (4) 検水は6℃から18℃の間で保存する。
- (5) 検査が円滑に行われるよう、採水および検水搬入の日時についてあらかじめ検査担当と打ち合わせをしておく。搬入時間や検体数に変更が生じた時は、すみやかに検査担当に連絡をする。

採水のご協力ありがとうございました。
今年度も よろしく願っています。





目に見えなくてもあぶない レジオネラ

- 100mlあたり100億個にならないと肉眼では、濁りとして見えません。
- 100mlあたり1万個の生菌があり、水の飛沫が発生すると「集団発生」がおこりやすくなります。
- 浴槽やお風呂まわりを日頃から清潔に保ち、気持ちよい入浴を提供しましょう。



全国レジオネラ対策会議資料

ご清聴ありがとうございました




平成22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)
分担研究報告書

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

イギリスHPA主催のレジオネラ属菌検査外部精度管理

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 縣 邦雄 アクアスつくば総合研究所

研究要旨：日本では、環境水（浴槽水、冷却水など）のレジオネラ属菌検査方法は、レジオネラ症防止指針(第3版)や、JIS K0350-50-10:2006に記載されているが、外部精度管理のシステムは存在しない。数多くの検査機関がレジオネラ属菌の検査を行っている現状において、レジオネラ属菌の外部精度管理の必要性が高まっている。イギリスでは現在、HPAが主催する外部精度管理システムが存在し、18年間にわたり運用されている。本報告では、イギリスの外部精度管理の概要を報告する。

A. 研究目的

イギリスのHPAが主催し、ヨーロッパを中心に200近くの検査機関が参加しているレジオネラ属菌の外部精度管理システムの概要を報告する。

本外部精度管理に、日本の検査機関が参加する契機となること、及びわが国で検査精度システムを構築する場合の参考とすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 概要

アクアスのつくば総合研究所で実際にHPAの外部精度管理に参加し、運用した。HPAへの申込から、検査のスケジュール、試料の受け取り、検査の指示、報告、まとめのレポート内容の実際を報告する。

2. 試験方法

イギリスHPAに対して、レジオネラ属菌の外部精度管理への参加申し込みを行った。2010年4月から2011年3月までの1年間4回の試料送付に対して、

レジオネラ属菌の検査を行い、HPAに報告した。各試料送付に対して、結果レポートが送付されてくるのでその内容を検討した。

C. 結果と考察

1. 外部精度管理申込

レジオネラ属菌の外部精度管理の申し込み書式を図1.に示す。

LEG1のコースを選択し、必要事項を記入の上HPA(Health Protection Agency)のFEPTU(Food and Environmental Proficiency Testing Unit)にファクスで申し込む。その後、費用が請求されてくるので英国ポンドで支払う。

2010年度は、£672であり、日本円で概算89000円であった。

2. スケジュール

2010年度の試料送付スケジュールを図2.に示す。一年間に4回、一回あたり3試料が送付されてくる。2010年度は3月29日、6月7日、9月20日、

2011年1月17日がHPAからの発送日であり、発送日から18日～25日の期間で検査を行うことが要求される。

3. 試料の受領

HPAからの試料は、航空便で送付されてくるので、必要な資料を通関業者に提出して試料を受領する。

4. 検査の実施

HPAから送付された試料には、3検体の未知サンプルが入っている。サンプルはLENTICULE discといわれる、小さな凸レンズ状のものであり、これを1LのPage's salineに溶解して、通常の浴槽水と同様の方法で検出試験を行う。

試料の梱包状態、LENTICULE discの外観を写真1. 2. 3. に示す。(写真はG58配布の時のものである)

5. 報告

検査の結果、レジオネラ属菌の有無、菌種(血清群別)、菌数を所定の書式に記入して、検査実施後3週間以内にHPAにファクスで報告する。

6. 検査結果レポート

各試料配布における検査結果報告の締切期限後、約1ヶ月で結果報告書

(Summary of Results)が送付される。これは、参加した検査機関約200件のデータを集計し、当検査機関のデータがどこに位置するかを示したものである。Summary of Resultsの表紙を図3. に内容の一部(G71C)を図4. に示す。

G71の配布では、215件の試料配布を行っている。G71Cのサンプルでは、有効な検査結果数は192件であり、期待値は*Legionella pneumophila*のSG2-14、菌数は $1.6 \times 10^3 \sim 4.9 \times 10^4$ CFU/Lである。当検査機関の結果はいずれも期待値内であり、その結果SCOREは12点満点中

12点と計算された。

検出菌数の期待値は、各検査機関の集計による中央値に対して $\pm 0.75 \log_{10}$ で設定されている。

また、Zスコアも記載されており参考にする。(±1.99が望ましい)レジオネラ属菌検査におけるZスコアの算出に用いる $\sigma = 0.55$ である。

Summary of Resultsには、過去4回の配布、12サンプルにおけるスコアの履歴が記されており、合計満点144点に対して過去の成績合計点数で評価される。当検査機関の結果は142点/144点(98.6%)であった。

検査結果レポートは、各配布ごとに作成され、年間4回のレポート(一回あたり8ページ)が作成、送付される。

D. 結論

1. イギリスHPAのFEPTUはレジオネラ属菌検査の外部精度管理を全世界に対して実施しており、日本国内からも参加することが出来る。

2. 約200件の検査機関が参加しており、18年間にわたり継続的に運営されている。

3. 本外部精度管理は、レジオネラ属菌検査機関の検査精度向上への取り組みに有用なシステムと考えられる。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし