

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）

研究報告書

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

民間検査機関へのレジオネラ属菌検査研修

研究分担者 磯部 順子 富山県衛生研究所

研究協力者 金谷潤一 富山県衛生研究所

研究要旨 浴用水中のレジオネラ属菌の検査を行っている民間検査機関および地域の行政関係者に対し、ろ過濃縮法および斜光法によるレジオネラ属菌同定法について研修会を開催した。参加者は民間機関 9 機関 13 名、行政担当 9 機関 12 名（県外 3 機関 3 名を含む）計 18 機関 25 名であった。

研修は座学と実習の二部構成でおこなった。事前アンケートの結果、遺伝子検査に対する講習希望者が多かったため、EMA-qPCR 法と LAMP 法についても講義の時間を設けた。講義では、総論、浴用水調査の実例、および研究班で推奨する方法の説明などを聞いた。実習は 2 班に分かれ、ろ過濃縮と培養法、および実体顕微鏡を用いたコロニー観察をおこなった。顕微鏡は 4 台準備したが、「時間が足りない」という感想が多く、今後の課題であると思われた。しかしながら、研修に対する参加者の評価はおおむね良好で、定期的な開催を望む意見が多かった。その一方で、この方法で実際の検査をおこなうにはコストがかかりすぎること、また、公定法が決まっていない現時点での検査法の取り入れ方など、検査の現場からの貴重な意見が寄せられた。

研修制度は必要であるが、どの方法で実施するのか、技術レベルをチェックする精度管理調査は誰がおこなうのかなど、制度とともに決めなければいけない課題が多くあることが明らかとなった

A. 研究目的

平成 21 年度生活衛生関係技術担当者研修会（H22.3.9 厚生労働省）の中で、浴用施設で実施するレジオネラ属菌の自主検査で「不検出」となるが、保健所の行政検査では「検出」となるなど、検査結果が官民で不一致となる場合があることが検討課題として指摘された。また、当研究班の精度管理ワーキンググループが実施した、WG 内での精度管理調査において、検査方法、とりわけ「ろ過濃縮法」と「遠心濃縮法」の違いによる結果の相違が明らかと

なっている¹⁾。また、平成 22 年度に当研究班の精度管理ワーキンググループが実施した、全国 77 か所の地方衛生研究所に対する、レジオネラ属菌検査方法の実態調査において、行政機関における検査法が多様であることが明らかとなった²⁾。その結果、WG として、1)標準的な検査法の整理と提示、2)研修システムの構築、3)精度管理の 3 点を柱とし、行政・民間を問わず検査精度の安定に向けた取り組みを進める必要性を報告してきた³⁾。そして、WG が推奨する検査法を広く認識し、導入してもら

うことが必要であるという観点から、研修会の開催が必要であることも示してきた。

そこで、本年度は民間検査機関を対象として、WG が推奨する検査法と斜光法によるレジオネラ属菌の同定について、研修会をおこなった。

B. 研修内容

1. 研修対象

富山県内の水質検査登録機関および厚生センターと富山市保健所の細菌検査担当者を対象とし、案内文を発送した。また、石川県保健環境研究センター、福井県衛生環境研究センター、福井県仁州健康福祉センターから参加希望があった。したがって参加者は、行政担当 9 機関 12 名(県外 3 機関 3 名を含む) と民間機関 9 機関 13 名、計 18 機関 25 名で実施した。

2. 研修内容

研修は座学と実習の二部構成でおこなった。座学は当所の講堂で、また、実習は当所細菌部の検査室でおこなった。

はじめに、講義を聞き、その後実習に入るという流れでスケジュールを組んだ。事前のアンケートで、遺伝子検査法に対する希望が多かったので、座学の中に遺伝子検査法も取り入れた。スケジュールが過密であったため、遺伝子検査法は希望者だけを対象として午前中に行い、タカラバイオの EMA-qPCR 法と栄研化学の LAMP 法について、それぞれ 1 時間ずつの講義形式でおこなった。

午後からの講義は、レジオネラ症総論(感染研 倉 文明講師)、富山県における環境・臨床材料からの分離状況(富山県衛生研究所 金谷 潤一講師)、レジオネラ属菌

検査法(北海道立衛生研究所 森本 洋講師) および大分県における浴用水検査の実際(大分県衛生環境研究センター 緒方 喜久代講師) とし、当所の講堂で開催した。細菌部の検査室は所内規定により、バイオセーフティの講義を受講しなければ入室できないことから、短い時間ではあったが、参加者全員が受講した。

その後、細菌部の実習室に移動し、浴用水のろ過濃縮法と培養法、斜光法の観察の二班に分かれ、それぞれ研修をおこなった。斜光法で観察する培養平板は当所に保管してあるレジオネラ属菌を、研修当日が培養 3 日目、7 日目となるように作製した平板と、北海道立衛生研究所の森本先生が浴用水にレジオネラ属菌を摂取し、作製された模擬平板とした。

最後に講堂に戻り、斜光法の復習として、スライド上でさまざまな菌の形態を確認した。

3. 準備

事前配布資料

一人でも多く参加してもらうため、6 月中に検査機関へ開催案内を発送した。参加希望者へは、開催直前に、研修内容と注意事項を記載した資料を送付した。また、実習時のグループ分けのため、事前アンケートも送付し、参加者の検査経験等の背景等を確認した。

培養平板

斜光法で観察するための菌株は当所に保管してある菌種から選んだ(表 1)。菌の培養平板はさまざまなメーカーの培地を用い、製品による発育菌数やコロニーの大きさの相違、あるいは雑菌の抑制力などを観察できるよう準備した(表 2)。しかしながら、

L. londiniensis は菌の発育が遅く、研修時に観察することができなかった。

当日配布資料の作製

講演依頼者から送付された資料を配布資料として準備した。

実体顕微鏡

研修に 4 台使用した。2 台は当所保有、2 台は県内厚生センター保有のものを借りた。コールドライトは当所保有の 2 台を使用し、残る 2 台での観察にはペン式の LED ライト (LED LENSER) を用いた。

実験器具と予防衣

ろ過法・培養法の実習には、表 3 に示す器具・チューブ・可変式ピペットなどを準備した。すべての器具を人数分準備するのは困難であった。

当所は、所内規定により、検査室で着用した白衣や予防衣などは滅菌しないで室外へ持ち出すことを禁止しているため、グローブ・マスクと同様、ディスポの予防衣を全員分準備した。また、入室時に履き替えが義務つけられているため、履物についても人数分準備した。

4. 講義と実習

遺伝子検査法

受講者は民間検査機関 3 名と行政関係機関 12 名、および当所細菌部員 3 名、計 18 名であった。将来的に遺伝子検査法を取り入れたいという検査機関では、死菌を検出しない EMA を用いた方法に興味があるとのことであった。

バイオセーフティの講義

細菌部検査室に入るため、全員が受講した。

レジオネラに関する講義

4 名の講演は、ほぼ時間通りにおこなわ

れた、講義用の配布資料について、森本先生の斜光法はカラー印刷してほしかったという意見があった。

実習

(ろ過濃縮法)ろ過濃縮法では、浴用水にみため水道水 500ml をフィルターろ過する過程を代表者が実施し、その後フィルターを 15ml、50ml のチューブに入れて振り出し体験をした。また、100ml コルペンの中での振り出し法も見学した。ついで、酸、加熱処理をそれぞれがおこない、その一部の濃縮液を 10 分乾かした培地、30 分乾かした培地の 2 枚にコンラージ棒で広げる方法を実施した。培地の乾燥具合によって、菌液の広がり、吸収具合など異なることを体験した。

(斜光法)顕微鏡 4 台で培養平板のレジオネラ属菌特有といわれる「カットガラス」「モザイク模様」もしくは一部の菌に見られる「蛍光」などを観察した。純培養菌の培養 3 日目と 7 日目の平板上での相違、また、実際の浴用水に菌を接種した模擬平板など、多くの平板を観察した。とりわけ、培養 3 日目でその特徴が顕著であること、レジオネラ属菌以外の菌が大きくなり、レジオネラ属菌が覆い隠される前に同定、釣菌できることから、偽陰性を減らすことができることを確認した。また、メーカーによっても発育状況や色など、多様であることも観察した。

斜光法の補足説明

実習で確認できなかった培養平板について、森本先生から写真による補足説明をしていただいた。

5. 事後アンケート

実習をおえて、意見、質問などをアンケ

ート形式で回収した。結果は表4に示した。

研修制度については賛同が得られ、有意義であったという意見が多かった。ただし、研修時間が短すぎる、顕微鏡の台数が少ないという問題点を指摘する意見が多く、今後の課題が明らかとなった。また、ろ過法も見学ではなく、自らがおこなう形式を望むという意見があった。

C 考察

研修は参加者からはおおむね好評であった。定期的開催してほしいという意見もあり、技術レベルの維持という観点からも、研修制度は必要であると思われる。しかしながら、地衛研などで実施する場合、感染症法に基づく検査室での実習に係る制約が問題となると思われる。また、今回は研究班の推奨法での研修としたが、研修を制度化するには、どの方法で実施するかが問題である。現在の、レジオネラ症防止指針に準拠するのか、ISOに準ずる方法をとりにいれるのかなど、早急に方向性が示されなければならない。さらに、実際に研修制度をスタートさせるとなると、場所や器具の準備なども含め、誰がどこでどのように進めるかなど、研修制度そのものをどのように位置づけるかを明確にする必要があると思われる。加えて、精度管理調査により、各検査機関の技術レベルをチェックすることも重要となるであろう。すなわち、研修制度と精度管理、そして標準検査法(公定法)の確立は同時に推し進めなければいけない課題事項であることが改めて示された。

参考文献

- 1) 渡辺祐子：ゼラチンディスクによる菌数測定の精度管理調査：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21年度総括・分担研究報告 p159-84
- 2) 森本洋：レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み：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23年度総括・分担研究報告 p113-41
- 3) 森本洋：レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み：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24年度総括・分担研究報告 p93-130

表 1 . 斜光法の観察に使用した菌株

菌 種	
1	<i>L. pneumophilla</i> serogroup 1
2	<i>L. anisa</i>
3	<i>L. bozemanii</i>
4	<i>L. dumoffii</i>
5	<i>L. feeleii</i>
6	<i>L. gormanii</i>
7	<i>L. londiniensis</i>
8	<i>L. micdadei</i>
9	<i>L. sainthelensi</i>

表 2 . 斜光法の観察に使用した培地

使用平板	メーカー名
GVPC	栄研化学・関東化学・シスメックスバイオメリユール・日研生物
WYO	栄研化学
MWY	関東化学
BCYE	栄研化学・関東化学・シスメックスバイオメリユール・日研生物

表 3 . 実習に使用した器具

ろ過器一式	実体顕微鏡
フィルター	コールドライト
ミキサー	ペン式コールドライト
15ml、50ml チューブ	ペン式 UV ライト
100ml コルベン	UV ライト
免疫抗血清	10 分・30 分乾燥培地
ラテックス	

表4 . 事後アンケートの結果（複数回答あり）

1 ① 催時期は適当であったか？	2 講義内容		
適当	24	① 他に聞きたい内容は？	
10月か11月での開催を希望する	1	参考になった	2
未回答	1	モノクロラミン消毒法について	2
②開催場所と人数は適当であったか？		公定法はいつ提示されるのか？	1
場所：適当	24	公定法までの推奨法を知りたい	1
：交通不便	1	② ろ過濃縮法	
：狭い	1	適当	4
人数：適当	21	器具など手元が不便であった	5
：半分くらいを希望	2	時間が短い	5
：多すぎる	3	通して実施してみたかった	3
③スケジュールは適当か？		ろ過法を初めて実施した	1
適当	14	③ 斜光法	
タイト	8	人数が多すぎる・顕微鏡が少ない	2
講義の途中で休憩がほしい	3	時間が短い	2
1日での研修にしてほしい	3	とても良かった。	11
		ぜひ取り入れたい	3
3 遺伝子検査法の研修に対する意見	4 その他		
適当	3	定期的開催を望む	3
デモンストレーションしてほしかった	1	コスト高が予想され、実施は困難	1
資料の文字が小さい	1	精度管理調査を希望する	1

研修スケジュール

	項目	講師
9:30	午前受講者受付	
10:00	開会(事務局)	
10:05	EMA-qPCR法	(株)タカラバイオ
11:05	LAMP法	(株) 栄研化学
12:05	昼食・休憩	
	午後受講者受付	
13:00	開会挨拶	研究代表 倉 文明 富山県衛生研究所長 佐多徹太郎
13:10	バイオセーフティ講義	講師 富山県衛生研究所 副主幹研究員 綿引正則
13:20	レジオネラ症総論	講師 国立感染症研究所 倉 文明
13:50	富山県における環境・臨床材料からの分離状況	講師 富山県衛生研究所 金谷 潤一
14:00	レジオネラ属菌検査法 (培養法概論と斜光法について)	講師 北海道立衛生研究所 森本 洋
14:40	大分県における浴用水検査の実際 (培養法と遺伝子検査法)	講師 大分県衛生環境研究センター 緒方 喜久代
15:10	休憩と移動	
15:20	ろ過法・培養法班	森本 洋・緒方喜久代・金谷潤一 磯部順子
15:55	顕微鏡観察班	
16:30	休憩・移動	
16:40	斜光法	講師 北海道立衛生研究所 森本 洋
16:50	質疑応答(アンケート記入)	
17:00	閉会 挨拶	

レジオネラ属菌検査法 (培養法概論と斜光法について)

北海道立衛生研究所

森本 洋

分離培地上に発育した
レジオネラ属菌を見逃さない
ためには！

レジオネラ属菌同定検査を強くサポートするため
ある方法を提案！

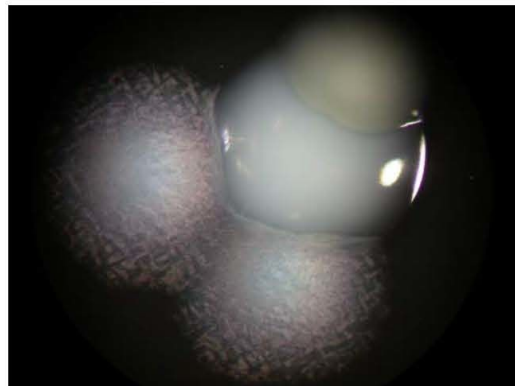
1) 効率の良い集落観察法の検討

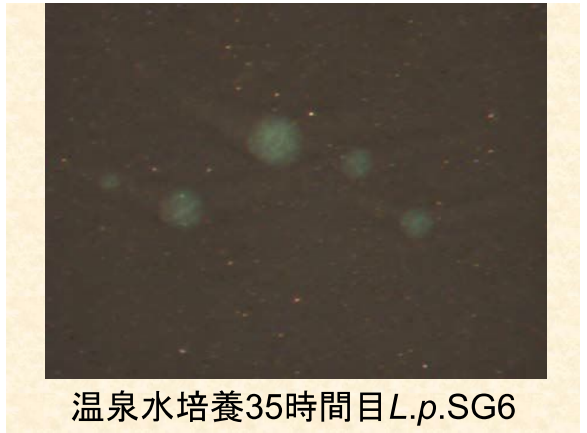
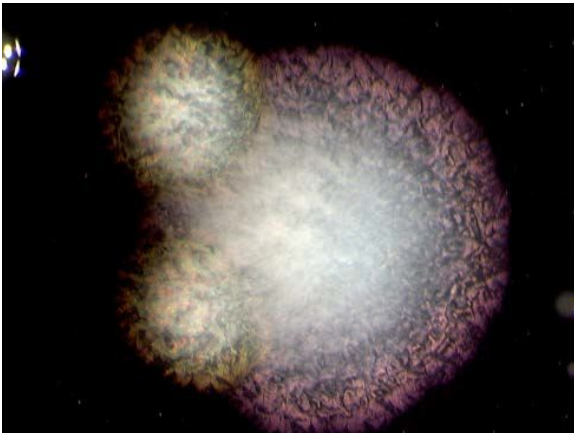
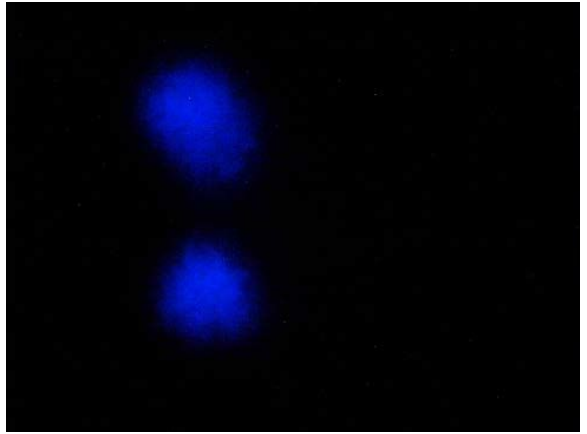
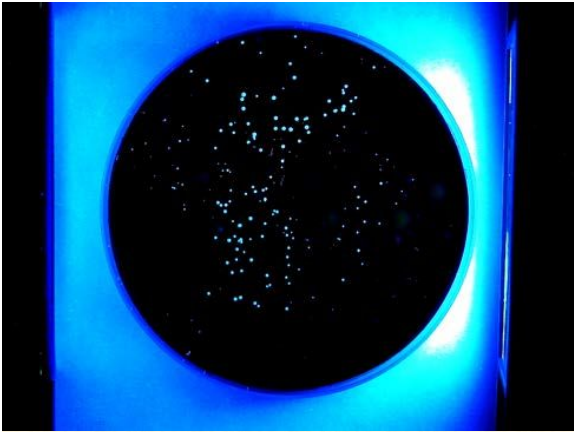
- 分離培地上の出現集落に斜光を当て、実体顕微鏡で観察する(斜光法)と、レジオネラ属菌は特徴的な形態(外観構造)を示す。
- この方法を培養法に組み込むことで、レジオネラ属菌と他の細菌との見極めが簡易になり、レジオネラ集落の確認、カウント、釣菌などが効率良く行えるようになった。
- その結果、定性までの時間短縮、より正確な定量結果を報告することが可能となった。また、斜光法にコロニーPCRを併用することで、さらに正確で迅速な結果判定が可能となる場合があった。

斜光法については

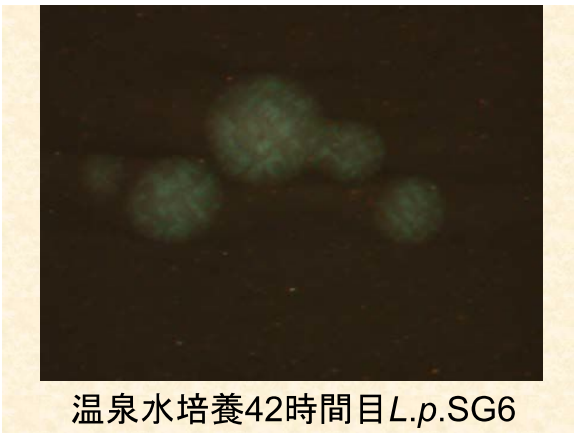
- 分離集落の特徴を利用した
レジオネラ属菌分別法の有用性
日本環境感染学会誌 2010;25 (1),8-14



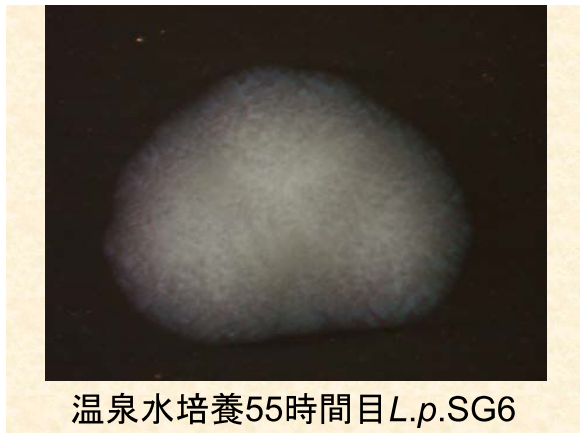




温泉水培養35時間目*L.p.SG6*



温泉水培養42時間目*L.p.SG6*



温泉水培養55時間目*L.p.SG6*