

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)

「レジオネラ検査の標準化及び消毒に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」

平成 25 年度分担研究報告書

レジオネラ属菌の培養検査法と精度管理

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 佐々木麻里、成松浩志 大分県衛生環境研究センター

研究要旨: 標準的な検査法を提示する一助として、迅速培養法(斜光法を取り入れた培養法)と従来法、遺伝子検査法(主に LAMP 法)について検討を行った。培養検査に斜光法を取り入れることにより、より短い期間で正確な培養結果が得られた。また従来法との比較においては同等の結果が得られたが、遺伝子検査法の比較においては、5 検体について培養(+) LAMP(-)の不一致が認められ、検査法として導入するにあたり、その原因を明らかにする必要がある。

精度管理事業の導入を目指し、標準的検査法の普及を図るための研修手法について検討を行った。具体的には、九州地区の民間検査機関を対象に関東化学の協力のもと、民間企業主導で実施することを想定したモデル的研修を実施した。

精度管理手法に関する検討を行った。(森本ワーキンググループ)

遺伝子検査法の実用化に向けた検討を行った。(烏谷ワーキンググループ)

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の標準法に導入することを目的に従来の培養法との比

較検討を行った。一方、迅速に結果が得られることから LAMP 法の活用に期待が寄せられているが、様々な泉質を有する温泉水等を利用した公衆浴場においては、培養(+) LAMP(-)の不一致の結果が得られることが多々あり、その原因の解決が課題となっている。

標準的検査法の普及を図り、精度管理事業を導入し、検査機関間の格差を是正し、統一的な検査結果が得られることが求められている。そこで、研修手法についての検討を行った。具体的には、九州地区の民間検査機関を対象に関東化学株式会社の協力のもと、民間企業主導で実施することを想定したモデル的研修を実施した。

併せて、精度管理手法に関する検討(森本ワーキンググループ)、及び、遺伝子検査

法の実用化に向けた検討を行った。(烏谷ワーキンググループ)

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 25 年 8 月、9 月、11 月に搬入された浴槽水および湯口水、29 施設 54 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 1200ml 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 12ml 入りの滅菌コニカルピーカー(100ml 容量)に移し、ボルテックスミキサーにて 5 分間洗い出した。ろ過濃縮後、濃縮検体(未加熱と表記)と 50 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;Oxoid)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 で培養した。本法における検出感度は 5cfu/100mL である。

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 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および DNA 抽出法の検討を行った。

4. 研修に関する検討

研修のあり方について、民間企業主導で実施する場合と行政主導で実施する場合、それぞれについてモデル的研修を行い、検討をした。(別紙 1 参照)

研修に必要な機材は、大分県衛生環境研究センターと関東化学の事前打ち合わせを密に行い、両者による持ち寄りとなり、機材の搬送は関東化学が行った。おな、斜光法に用いた研修サンプル(平板)は、北海道立衛生研究所の森本先生が調整後、直接、久留米大学に輸送されたものを使用した。

5. 精度管理手法に関する検討

森本研究分担者の報告参照。

6. 遺伝子検査法の実用化に向けた検討

烏谷研究分担者の報告参照。

C. 研究結果

1. 培養法

培養結果の概要を Table 1 に示した。54 検体中 30 検体(56%)からレジオネラ属菌が検出された。内訳は「掛け流し施設」では浴槽水 19 検体中 14 検体(74%)、湯口水 17 検体中 7 検体(41%)で、「循環式施設」では浴槽水 10 検体中 4 検体(40%)、湯口水 8 検体中 5 検体(62%)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 8 施設であった。浴槽水(+)湯口水(-)となった施設は 5 施設、浴槽水(-)湯口水(+)となった施設は 3 施設であった(Table 2)。

レジオネラ属菌が検出された 30 検体について分離培地の検出感度を比較した結果を Table 3 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 16 検体、WYO α + GVPC からの分

離が3検体、WYO α のみからの分離、GVPCのみからの分離が各々1検体、MWYのみから分離が3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 +MWYからの分離、GVPC+MWYからの分離が各々1検体、WYO α のみからの分離、GVPCのみからの分離が各々2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、斜光法で確認後、培養を継続することにより、検出菌数が増加するという現象が確認されたものの、斜光法でのレジオネラ属菌の見逃しはなかった。

2. LAMP法

濃縮検体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(Table 4)。6検体が培養(+)LAMP(-)の不一致の結果となった。6検体のうち4検体は、培養菌数が5cfu/100mLで10cfu/100mL未満であった。残り2検体からは500cfu/100mL、50cfu/100mLのレジオネラ属菌が検出され、検出菌種は、いずれも*L.pneumophilla*であった。不一致検体について、阻害回避処理試薬を用い、再度測定を行ったが、得られた結果は同じであった。

一方、烏谷班(遺伝子検査法の実用化に向けた検討)において、Cycleave PCR *Legionella*(16S rRNA)Detection Kit (TaKaRa)を用い検討した結果、インターナルコントロールが正常に検出されたことから、PCR反応阻害はないことが確認できた。

3. 研修に関する検討(資料偏参照)

民間企業主導の研修については、関東化学株式会社の協力を得て、平成25年8月23日(金)久留米大学医学部実習室にて、九州地区の民間検査機関を対象に実施した。参加機関は15施設、参加人数は22名であった。関東化学による事前アンケートでは、レジオネラ検査経験年数は十数年から数ヶ月と幅が大きく、比較的経験年数が少ない傾向があった。研修終了後のアンケート結果では、研修日程、開催場所、内容についての評価は高かった。しかし、斜光

法に用いる実体顕微鏡が1台しか用意できなかったため、観察時間に制約が生じ、やや消化不足であったというような感想も寄せられた。

行政主導の研修については、富山県衛生研究所が実施主体となり、平成25年9月27日(金)富山県衛生研究所において実施した。

D. 考察

浴槽水(+)湯口水(-)となった5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、当該保健所の環境衛生監視員による施設管理状況の把握、清掃・消毒の管理指導の徹底が図られた。

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。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はいないものの、培養にかかる日数の短縮、検査精度向上の観点からも導入に向けた研修を行うことは意義がある。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。

レジオネラ属菌が検出された30検体について、使用した分離培地WYO α 、GVPC、MWYの個々で分離状況をみると、各分離培地でのレジオネラ属菌の分離は20検体から24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24検体から、加熱処理では28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、効率よくレジオネラ属菌が検出された。各種分離培地の併用や雑菌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。

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。さらに、温泉検体では、「菌数」だけではなく、検出される「菌種」や泉質などの様々な要因により、LAMP 法で安定した結果が得られない場合が考えられ、早期に、課題解決に向けた取り組みが望まれる。

レジオネラ属菌の検査を実施している民間検査機関は、従来、環境検査を主とした中に、レジオネラ属菌の検査を取り入れたところも多く、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは取り組む経緯や成り立ちが異なる場合も多い。そのような場合、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは異なり、微生物検査の技術を習得し、熟練した検査員が存在しない場合もある。民間検査機関への精度管理・研修の導入にあたっては、まず、レジオネラ属菌の検査実施機関の実態把握を行い、特徴・特性を熟知することが大切である。その上で、民間検査機関を含めたレジオネラ属菌検査にかかわる全ての検査機関の質の良い検査精度確保のため、精度管理事業の導入は重要な課題である。その実現のため、早期に標準的検査法：モニタリングに最適な検査法(採水時から検査結果まで)を提示し、適切な研修の場を提供し、精度管理用サンプルの安定提供および評価機関の確保を図る必要がある。

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、多種多様な泉質を有する温泉水の場合は、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、培養法における正確・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する。今後、斜光法を含めた標準的検査法を提示し、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を確立し、民間検査機関への精度管理導入に向け、今後の検討を図っていきたい。

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

F. 研究発表等

1. 平成 25 年度環境監視員担当者会議にて研修会を開催した。

平成 25 年 4 月 「レジオネラ検査の取り組みについて」

平成 26 年 2 月 「レジオネラ症防止対策に係る最近の知見について」

2. 平成 25 年 8 月、菌株確保を目的に大分県臨床検査技師会研修会の場を利用し、講演を行った。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 培養法の結果

採水箇所		検体数	検出数 ^a	検出率
掛け流し式	浴槽水	19	14	74%
	湯口水	17	7	41%
循環式	浴槽水	10	4	40%
	湯口水	8	5	62%
計		54	30	56%

^a 10cfu/100m によらない(定性)

Table2 浴槽水と湯口水の検出状況 (n=23)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	8	3	11
	-	5	7	12
計		13	10	23

10cfu/100m によらない(定性)

Table 3 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=54)

		未加熱	加熱	
WYO	GVPC	MWY	16	21
WYO	GVPC		3	0
WYO		MWY	0	1
	GVPC	MWY	0	1
WYO			1	2
	GVPC		1	2
		MWY	3	1
計			24	28

10cfu/100m によらない(定性)

Table 3-1 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=54)

	未加熱	加熱
WYOα(市販品)	20	24
GVPC(市販品)	20	24
MWY(自家製)	19	23

10cfu/100m によらない(定性)

Table 4 LAMP 法と培養法の比較 (n=54)

		LAMP		計
		+	-	
培養法	+	24	6	30
	-	11	13	24
計		35	19	54

10cfu/100m によらない(定性)

様

平成25年6月吉日

関東化学株式会社
福岡支店

レジオネラ実技研修会のご案内

拝啓 貴社ますますご清栄のこととお慶び申し上げます。
平素は格別のお引き立てを賜り、厚く御礼申し上げます。

厚生労働科学研究費補助金による「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班」様と久留米大学病院様に御協力をいただき、レジオネラ検査における培養時間の短縮、検査精度の向上を目指し、斜光法の普及を目的とした民間検査企業様向けの研修会を企画致しました。

検査を行っている方で、上記「レジオネラ研究班」が推奨している培養検査法(斜光法)を学習してみたいという方を対象に、検査の流れを体験していただけます。皆様の御参加を心よりお待ちしております。

敬具

記

日時 平成25年8月23日(金) 13:00~17:00

場所 久留米大学病院(医学部基礎1号館4F実習室)

福岡県久留米市旭町67番地(JR久留米駅より徒歩10分)

※駐車場はありますが、有料となりますのでご了承ください。

スケジュール 詳細は後日ご案内致します。

- 内容 講義① レジオネラ症総論 国立感染症研究所 倉 文明先生
講義② 環境・臨床材料からのレジオネラ属菌の分離培養法について 富山県衛生研究所 磯部順子先生
講義③ 斜光法を用いたレジオネラ属菌培養法のコツと注意点 北海道立衛生研究所 森本 洋先生
実習 前処理、培養、斜光法での観察等 大分県衛生環境研究センター 緒方喜久代先生

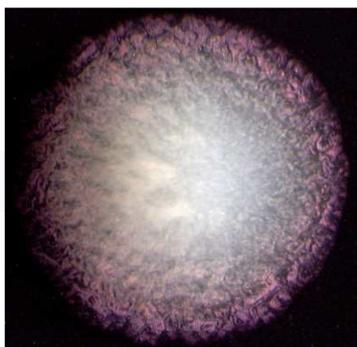
参加費 無料

お申込み方法

別紙の申し込み用紙に必要事項を明記の上、7月5日(金)までにFAXにてご返送ください。

参加人数は20名程度を予定しており、定員になり次第、締め切りと致しますのでご了承ください。

又、多数の参加ご希望が予想されますので、原則として各社1名のご参加とさせていただきます。



レジオネラ・ニューモフィラのコロニー形態(斜光法)
北海道立衛生研究所 森本 洋先生 提供



準備するもの

✓	関東化学	✓	大分県衛生環境研究センター	備考
	配布資料(テキスト)50部		アルコール綿	白衣は各自持参
	使用平板(4枚×20=80枚)		消毒用アルコール	
	コンラージ棒(4本×20=80本)		実体顕微鏡	
	滅菌パック(6)		コールドライト	
	デスポ手袋(L,M,S,XS)		ミキサー(1台)	
	マスク		恒温水槽(1台)	
	ピペットマン(200, 1000)		スポンジ	
	専用滅菌チップ(200, 1000)		模擬サンプル500ml(6本)	
	ピペットエイド		滅菌水300ml(1本)	
	デスポ滅菌ピペット(5, 10)		滅菌コニカル(6個)	
	滅菌1.5mlチューブ(ロック付)		滅菌50mlチューブ(6本)	
	フィルター(0.22または0.2)		ピンセット(2本)	
	ろ過器		手拭きペーパー	
	ろ過装置			
	パソコン			
	スクリーン			
	プロジェクター			

斜光法用観察プレートは、森本さんに用意していただき、8月22日(木)に久留米大学に着。翌日まで、冷蔵保管していただく。
 (久留米大学保管責任者名および連絡先:)
 22日の午後3時から事前準備。

【前日】

15時00分から会場設営(関東化学+研究班員)

【当日】

12時30分 受付け開始

13時00分 初めの挨拶(関東化学)、講師の先生方の紹介

13時05分 講演開始

倉先生 35分

磯部先生 30分

休憩 20分

森本先生 60分

15時30分 実習(2班に分かれて、「A」ろ過濃縮・プレート処理班と「B」顕微鏡観察班)

ろ過濃縮の実習時は、さらに3班に分かれ、ろ過・雑菌処理(酸&熱)・平板塗沫(コンラージ)の実習を行う。

16時40分 関東化学説明(10分間)

16時50分 質疑応答(10分間)

17時00分 終了

レジオネラ実技研修会事前アンケート

研修会を有意義なものにするために、事前アンケートをお願いいたします。
日頃のお悩み、質問、ご意見などございましたら遠慮なくご記入ください。
研修会質疑応答時間に講師の先生よりアドバイス、回答をいただきます。

ご施設名 _____ TEL _____
ご担当者名 _____ FAX _____
レジオネラ検査経験年数 _____

8月9日（金）までにご返信お願いいたします。
FAX 092-414-9356 関東化学株式会社 福岡支店行き

レジオネラ実技研修会 事後アンケート

この度は研修会にご参加いただき、ありがとうございます。
お手数ですが、下記アンケートにご記入いただき、ご提出をお願い致します。

ご施設名	
ご氏名	
TEL	FAX

Q1.研修会のスケジュール・日程(開催日時等)はいかがでしたか？

Q2.今回は久留米で開催しましたが、場所のご希望はありますか。

Q3.講義および実技研修の内容はいかがでしたか。

Q4.パンフレット、資料、サンプル等のご希望ございましたら、ご記入ください。

Q5.その他、ご質問・ご要望ございましたら、お願いいたします。

9月6日（金）までにご返信をお願いいたします。

関東化学株式会社 福岡支店 行き FAX 092-414-9356