

機関ごとに異なる (1~10 CFU/100 ml)。14/82 検体 (17.1%) は、平板培養法による菌数が 1~9 CFU/100 ml であった。したがって残りの検体についても、平板培養法で検出限界以下の低濃度のレジオネラ属菌が存在していた可能性は考えられる。また、温泉成分などによる EMA 効果の阻害や、viable but non-culturable 状態のレジオネラ属菌が存在していた可能性も考えられる。

LAMP 法の平板培養法に対する感度は 81.8%、特異度は 74.9%であり、LC EMA qPCR 法の感度 (89.3%)、特異度 (78.3%) よりもやや低かったものの、全体として平板培養法と関連している方法であると考えられた。LAMP 法で偽陰性となった 22 検体のうち、13 検体は平板培養法の菌数が 10 CFU/100 ml であり、残りの 9 検体も 20~60 CFU/100 ml と低濃度であった。したがって LAMP 法においても、低濃度培養陽性検体においては、感度がやや低下すると考えられた。

PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 47.0%、特異度は 76.8%であり、LC EMA qPCR 法、LAMP 法と比較し、特異度は同等であったが、感度は低かった。PALSAR 法で偽陰性となった 9/44 検体 (20.5%) は、平板培養法での菌数が 100 CFU/100 ml 以上であり、検出された菌種はすべて *L. pneumophila* であった。異なる菌種や血清群 8 株を用いた感度実験に顕著な差はなかったため、実検体で検出された菌種に対する特異性が低かったわけではないと考えられる。この 9 検体のうち 6 検体は、濃縮沈殿検体を冷蔵または -20℃ で保存した。LC EMA qPCR 法、LAMP 法と異なり、PALSAR 法は RNA を標的とする迅速検査法である。RNA は DNA と比較し分解されやすいため、検体の保存によって RNA が分解された可能性も考えられる。濃縮検体の保存が RNA に与える影響については、検討する必要がある。一方で、菌種や血清群による感度を調査した結果では、検出可能な菌数がすべて $10^3 \sim 10^4$ CFU/reaction であった。本実験は BCYE 寒天培地を用いて平板培養した菌株を用いた系ではあるが、実検体を用いた

場合は検水 100 ml/reaction となるため、PALSAR 法の平板培養法に対する感度が不足している可能性は考えられる。検体の濃縮率を上げて 1 反応あたり用いる検水量を多くすることで感度が向上するかについても、検討する必要がある。

本研究から、LC EMA qPCR 法 (カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当) および LAMP 法は、平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。一方で、PALSAR 法は平板培養法に対する感度が低かった。濃縮検体の保存が RNA の検出に影響するかどうかは、確認する必要がある。

E 結 論

各種迅速検査法 (LAMP 法、LC EMA qPCR 法、PALSAR 法) について、浴槽水などの実試料を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

LC EMA qPCR 法について、昨年度の解析と同様に平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った結果、平板培養法に対する感度は 89.3%、特異度は 78.3%、菌数 (定量値) の比較は $R^2 = 0.6672$ と高い相関を示し、全体として平板培養法の菌数を反映していた。

LAMP 法の平板培養法に対する感度は 81.8%、特異度は 74.9%であり、LC EMA qPCR 法の感度 (89.3%)、特異度 (78.3%) よりもやや低かったものの、全体として平板培養法と関連している方法であると考えられた。

PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 47.0%、特異度は 76.8%であり、LC EMA qPCR 法、LAMP 法と比較し、特異度は同等であったが、感度は低かった。

本研究から、LC EMA qPCR 法 (カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当) および LAMP 法は、平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。一方で、PALSAR 法は平板培養法に対する感度が低かった。濃縮検体の保存が RNA の検出に影響するか、検体の濃縮率を上げて 1 反応

あたり用いる検水量を多くすることで感度が向上するかは、確認する必要がある。

参考文献

- 1) 浅野陽子、核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について、生活と環境、2007、52 (1)、89-91.
- 2) 烏谷 竜哉 他、液体培養 (Liquid Culture) EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討、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 24 年度 総括・分担研究報告書、71-84.

F 研究発表

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 平板培養法による検出率

菌数 (CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	452	(73.3)
10-99	107	(17.6)
10-999	27	(4.4)
1,000以上	31	(5.0)
計	617	(100)

表2. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 1	48
SG 6	47
SG 5	40
SG 3	33
SG 9	13
SG 8	9
SG 10	9
SG 15	6
SG 2	5
SG 4	3
SG 7	3
SG 11	3
SG 12	3
UT	39
<i>Legionella</i> spp.	30

表3. 平板培養法とLC EMA qPCR法との比較

a. LC EMA qPCR法のカットオフ値1 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥10	<10	
LC EMA qPCR法	≥1	125	82	207
	<1	15	296	311
計		140	378	518

感度 89.3%、 特異度 78.3%

a. LC EMA qPCR法のカットオフ値5 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥10	<10	
LC EMA qPCR法	≥5	113	51	164
	<5	27	327	354
計		140	378	518

感度 80.7%、 特異度 86.5%

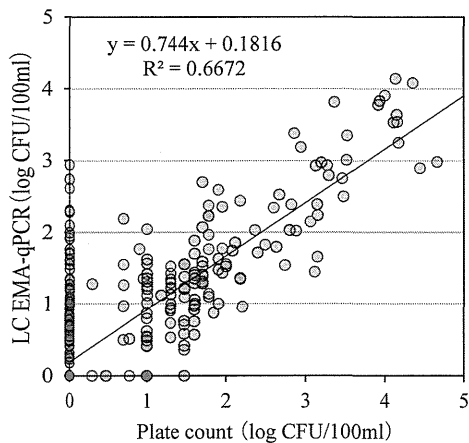


図1. 平板培養法とLC EMA qPCR法との相関

表4. 平板培養法とLAMP法との比較

		平板培養法		
		≥10	<10	計
LAMP法	陽性	99	66	165
	陰性	22	197	219
計		121	263	384

感度 81.8%、 特異度 74.9%

表5. 平板培養法とPALSAR法との比較

		平板培養法		
		≥10	<10	計
PALSAR法	陽性	39	43	82
	陰性	44	142	186
計		83	185	268

感度 47.0%、 特異度 76.8%

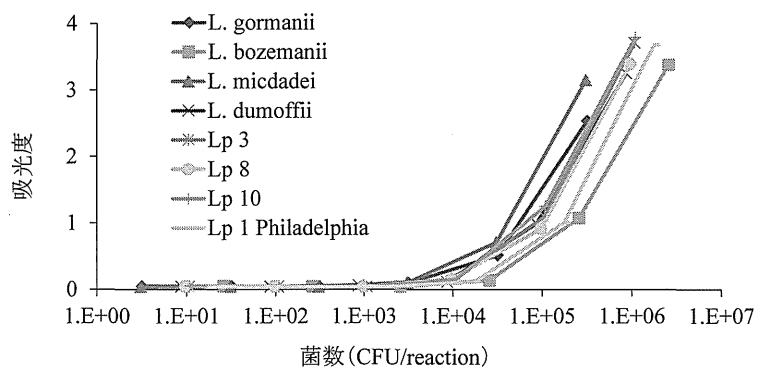


図2. PALSAR法における菌種・血清群ごとの感度

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

平成 25-27 年度総括・分担研究報告書

レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み

研究分担者	○森本 洋	北海道立衛生研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
	佐々木麻里	大分県衛生環境研究センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	前川 純子	国立感染症研究所
研究協力者	浦山みどり	長崎県環境保健研究センター
	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
	緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター
	小川 恵子	北海道立衛生研究所
	金谷 潤一	富山県衛生研究所
	久保田晶子	北海道立衛生研究所
	田中 忍	神戸市環境保健研究所
	千田 恭子	仙台市衛生研究所
	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
	山口 友美	宮城県保健環境センター
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所
	渡辺 祐子	元神奈川県衛生研究所
渡邊 涼太	北海道立衛生研究所	
研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所

研究要旨

レジオネラ属菌検査法の安定化を目的とし、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの3点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下WG)内で検討を行った。

WGでは、これまでの厚労科研究事業において、レジオネラ属菌の特異的な性質から、外部精度管理用の配付試料の作製について、その安定性と再現性及びそれらの妥当性評価について試行錯誤を繰り返してきた¹⁻³⁾。また、病原体の輸送においても日本国内での対応が平成24年6月以降厳しくなり⁴⁾、苦慮していたところである。本研究機関においては、微生物定量試験用標準菌株の販売を行っているシスメックス・ビオメリュー社のBioBall(特注品)を利用し、外部精度管理

を試みた。平成 27 年度はその実施母体を日水製薬(株)とし、公的、民間を問わず全国 192 の検査機関に対し外部精度管理を実施した。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所 68 機関については、WG でも集計・解析を実施した。今後もさらに検討を重ね、適切な研修会までの実施を視野に入れた継続的な外部精度管理を開催できるよう検討が必要と思われる。

A. 研究目的

レジオネラ属菌検査法の安定化を目的とし、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの3点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下 WG)内で検討を行った。

B. 研究方法

1)精度管理

外部精度管理の試行

〈配付試料の作製と輸送について〉

本研究期間内において BioBall を利用した外部精度管理を実施した。平成 25、26 年度は、WG がシスメックス・バイオメュー社へ供試菌株を発注し、地方衛生研究所に対し実施した^{5, 6)}。平成 27 年度は、実施母体を日水製薬株式会社とし、公的、民間を問わず全国の検査機関に案内を発信し外部精度管理を実施した。供試菌株は、過去の販売実績において安定性が確認されている *Legionella pneumophila* ACM5197 を使用した。菌数は、15000cfu/Ball (水 500ml に溶かした場合、3000cfu/100ml) で発注した。この菌数は、一般的な検査手技において、分離平板上のコロニー数が、理論上、非濃縮検体で3コロニー、100 倍濃縮検体で 300 コロニー発育することを意味している。発注の結果、製品保証として、平成 25 年度は、平均値 16916.0cfu/Ball、95%信頼区間 : 下限値 9875.3 cfu/Ball、上限値 23956.7 cfu/Ball の製品(保証期間:2013 年 9 月 18 日~2014

年 9 月 18 日)、平成 26 年度は、平均値

19316.0cfu/Ball、95%信頼区間 : 下限値

15319.7 cfu/Ball、上限値 23312.3 cfu/Ball の製品(保証期間:2014 年 10 月 1 日~2015 年 10 月 1 日)、が納品された。平成 27 年度は、日水製薬がシスメックス・バイオメュー社と契約しているため、ここでは具体的な数値を公表しないこととした。なお納品は、平成 25、26 年度はシスメックス・バイオメュー社から、平成 27 年度は日水製薬から外部精度管理参加機関に直接輸送された。

〈参加要件〉

BioBall 使用要件(国立感染症研究所の「病原体等安全管理規定」を参考としている)に従い、1. 病原体のバイオセーフティレベル(以下 BSL)規定について、2. 施設要件、4. 作業従事者要件を満たし、BioBall 使用承諾書に署名できる機関であることを参加要件とした。

〈参加機関〉

平成 25、26 年度は、WG 構成機関である 10 カ所の地方衛生研究所及び全国地方衛生研究所の 6 ブロックから参加機関を募り、平成 25 年度は 39 機関、平成 26 年度は 41 機関で行った。これらの参加機関に数字をランダムに振り分け結果集計を行った^{5, 6)}。

平成 27 年度は、全国 192 の検査機関に対し、実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所 68 機関が参加した。

〈結果集計と解析〉

全参加機関に対する集計・解析は日水製薬が実施し、地方衛生研究所 68 機関について

は、WGによる集計・解析も実施した。なおWGでは、過去2年の研究報告と同じ換算値として集計することとした^{5, 6)}(500mlの滅菌生理食塩水に配付試料をすべて溶かした場合の100ml当たりの菌数に換算)。また、最終菌数はコロニー数の平均値に換算のための定数を乗じたのち、四捨五入により上から二桁までを有効数字として表示した。本調査での目標値(良好範囲)は、過去2年間と同じく「配付試料について、メーカー保証されている95%信頼区間における菌数をベースに補正した範囲に対し、その下限値の30%および上限値の300%」という考え方を導入することとした。その結果、300~9000cfu/100mlを目標値(良好範囲)と設定した。

<検査方法>

平成25年度は、各参加機関の検査作業書に従って実施依頼した。また、WGを中心に11機関に対しWG推奨法(図1)での検査実施も依頼した⁵⁾。平成26年度は、参加機関すべてに外部精度管理指定法としてWG推奨法での実施を依頼した⁶⁾。平成27年度は、日水製薬の実施要領に従った。

2) 標準的検査法および研修システム

平成24、25年度に「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報告書」内でWG推奨法を報告したところである^{5, 6)}。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した。また、平成26年度には、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修 新興再興感染症技術研修」内で、WG推奨法に沿ったレジオネラ検査研修を行った。本研修会に

は、地方衛生研究所24機関が参加した。

(倫理面への配慮)
特になし。

C. 研究結果及び考察

1) 精度管理

平成25年度では、各機関のSOPによる結果において大きなバラツキが認められたことから、平成26年度では、WG推奨法を指定した。その結果、平成25年度に比べバラツキは解消された。これは非濃縮試料及び、未処理による検査工程を加えたことが良い結果につながったと思われる。一方で、供試菌は、酸処理や熱処理、さらには選択分離培地により発育が強く抑制されることが確認された。特に濃縮試料に対しての影響が大きかった。このような現象は、これまでにも研究班内で作製した自家試料で確認されていたが、特注品BioBallでも確認されたことから、現状では、全国規模の外部精度管理調査で、様々な条件に対応できるだけの配付試料を作製するのは困難と思われた。

外部精度管理においては、検査工程や分離培地の幅が大きいほど、検査結果の幅が大きくなると思われる。例えば、手技に重きを置いた外部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、分離培地の違いや、酸や熱による前処理が、結果に大きく影響してくる可能性が想定される。このような場合、外部精度管理の結果が思わしくなかった参加機関では、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が特定できない場合、どのように改善すれば良いのか分からなくなる可能性がある。これ

らのことを勘案すると、実検体に対する標準的な検査法と外部精度管理のための検査法については、分けて考えるのも選択肢の一つと思われる。選択分離培地の使用や酸処理、熱処理は、実検体中に混在するその他の細菌を抑えるための手法であり、レジオネラの純培養菌を使用した場合の外部精度管理では、それらの工程が不確定な結果につながる可能性が大きいと思われる。

配付試料については、特注品 BioBall の利用により、信頼性においてメーカー保証が得られ、また、メーカーによる商品発送対応であることから、他施設へ安定した輸送が可能となった。この点は、全国的な外部精度管理を実施する上で不可欠な要素である。また、BioBall は、特別注文時に発注者側から菌株指定もできることから、今後、外部精度管理に、より有用な菌株が確認されれば、その菌株で新たな試料を作製することも可能である。

これら平成 25、26 年度の結果^{5, 6)}から、特注品 BioBall を利用した場合、非濃縮試料、未処理試料及び BCYE α を使用した結果においては、外部精度管理として評価できるものと思われた。そこで平成 27 年度は、検査手技の確認に重点を置き、①特注品 BioBall を利用する。②未処理のみで検査をする。③BCYE α 培地のみで検査をする。④非濃縮試料、濃縮試料について検査する(非濃縮試料が適切に混和されているか、適切な濃縮が行われているかを大きな評価点とする)、以上を念頭に、実施母体を日水製薬株式会社とし、公的、民間を問わず全国の検査機関に対し外部精度管理の実施を試みた。本外部精度管理は、全国 192 の検査機関に対し実施された。全国の結果集計・解析は日水製薬で行い、3 月 30 日に日水製薬のホームページ上で公開され

る。

一方、WG が集計した地方衛生研究所 68 機関の結果を表 1 に示した。目標値(良好範囲)を報告した機関は、非濃縮試料では 68 機関中 62 機関(91%)、ろ過濃縮試料では 61 機関中 38 機関(62%)、遠心濃縮試料では 22 機関中 8 機関(36%)であった。非濃縮及び濃縮試料(ろ過および遠心濃縮両方を実施していた場合そのどちらか)ともに目標値(良好範囲)を報告した機関は、68 機関中 42 機関(62%)であった。なお、非濃縮及び 2 種類の濃縮試料すべてに対応していた 15 機関のうち、目標値(良好範囲)を報告した機関は 4 機関(27%)であった。

これまでも報告してきたが、レジオネラ属菌検査においては、コンラージや濃縮時のいくつかの操作等が結果へ影響し、菌数の減少に繋がる傾向にあるので注意が必要である。特に遠心濃縮時にはその影響を受けやすいと思われるのでより慎重な対応が必要となる。また今回非濃縮試料で目標値(良好範囲)を報告できなかった 6 機関は、濃縮試料についても目標値(良好範囲)を報告できていなかった。さらに、このうちの 2 機関(うち 1 機関は日常的に検査を実施していなかった)は、今回の配付試料からレジオネラ属菌を検出できていなかった。これらの機関は、試料の混ぜ方、培地への接種量、コンラージの力加減、濃縮操作等、全検査工程を確認し検証する必要があると思われる。可能であれば、適当な機関での研修を視野に入れた対応が必要と思われた。

2) 標準的検査法および研修システム

標準的検査法については、以下の考え方を柱に検討してきたところである。① ISO 11731:1998(E)に準じた方法。②検査結果のバ

ラツキを無くす方法。③分離培地に発育したレジオネラを見逃さないようにする。つまり、ある精度以上を確保した基準となる方法、基本となる考え方を統一した方法、と定義することができる。今回の外部精度管理結果から、非濃縮試料の検査実施の重要性が改めて示された。WGにおいても非濃縮試料の検査実施を推奨している。しかしながら現行の「公衆浴場における衛生等管理要領」には非濃縮試料の検査実施は記載されていない。このことが検査精度の低下を招いている一因と思われる。濃縮方については、WGでは、検査者間差が少なく、回収率が比較的安定しているろ過濃縮法を推奨してきた。一方で、この方法は、多検体処理や夾雑物の多い検体に対しては課題が多い。このような状況においては、遠心濃縮法での対応が扱いやすい場合がある。レジオネラ症防止指針-第3版-では、培養法の基本をJIS K 0350-50-10:2006に準拠しており、JIS法では回収率を高めた遠心濃縮方法が提示されている。WGでも遠心濃縮を行う場合においては、この方法を推奨している。浴槽水の検査においては、適切な濃縮が行われかつその後の回収方法が、重要なポイントの一つであることから、ろ過濃縮、遠心濃縮を問わず、濃縮工程中の注意点について提示できるよう引き続き検討したいと考える。なお、現在ISOでも本検査法の改訂作業が進められていることを受け、今後はWG推奨法との調整を行い、「公衆浴場における衛生等管理要領」内で提示したいと考える。

研修については、これまで実施した研修会で、いくつかの課題が見つかったが、同時に今後に生かせる知見も集積された。これらをもとに、研修マニュアル作成に向けた検討を行ってきた(黒木分担研究者の報告参照:平成

27年度)。今後は、各検査機関で適切な内部精度管理を行えるよう、より具体的な注意点等を提示した研修会を実施することが重要と思われる。一方で、このような研修会を開催するためには、既存のシステムによるのか、新たなシステムを必要とするかを含め、主催者、場所、条件等の基本的方針を検討しなければならない。講師の養成も不可欠である。上述の研修マニュアル作成に加え、それを生かすための検討が必要である。

D.結論

1)精度管理

外部精度管理調査実施主体を民間会社とし、官民間問わず幅広い調査を試みたことにより、全国規模で外部精度管理調査を実施するための一つのモデルを示すことができた。また、感染症法の改定により、平成28年4月から位置付けられる感染症発生動向調査における外部精度管理調査の一つとして対応可能と考える。今後さらに調査システムの検討を重ね、継続的かつ安定した外部精度管理調査ができるよう引き続き実施主体となる民間会社との協力が必要と思われる。

内部精度管理については、標準的検査法を「公衆浴場における衛生等管理要領」で示し、基本となる検査法が全国的に周知、導入されることが重要であり、その対応を急ぐ必要がある。

2)標準的検査法および研修システム

WG推奨法は精度の高い検査法である。今後は、現在改訂作業中のISO法との調整を行い、「公衆浴場における衛生等管理要領」内で適切に位置付けられることで、全国の検査機

関で導入されることにより、適切な内部精度管理実施にも繋がり、その精度が安定すると思われる。このことが、公衆浴場施設の日常の衛生管理対策に繋がり、レジオネラ症発生予防に寄与すると考える。

研修会については、継続的に開催できるよう、実施母体、講師育成、経費等を含めた検討が引き続き必要と思われる。また、より良い研修マニュアル作成に向け検討を重ねる必要があると思われる。一案としては、外部精度管理実施母体において、定期的に研修会が開催できるようになれば理想的であり、このことについても今後の検討課題にしたいと考える。

E. 参考文献

1) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討-レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループの発足及び地方衛生研究所を対象としたレジオネラ属菌検査法アンケート調査結果-,外部精度管理試料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 22 年度総括・分担研究報告書 pp.101-161.

2) 森本 洋 他: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・分担研究報告書 pp.113-134.

3) 森本 洋 他: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・分担研究報告書 pp.93-130.

4)厚生労働省健康局結核感染症課長通知,健感発 0315 第 1 号 平成 24 年 3 月 15 日,感染症発生動向調査事業等においてゆうパックにより検体を送付する際の留意事項について

5) 森本 洋 他: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)「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」平成 25 年度総括・分担研究報告書 pp.105-132.

6) 森本 洋 他: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)「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」平成 26 年度総括・分担研究報告書 pp.77-101.

F. 研究発表

1.学会発表

1) 森本 洋:培養法の現状と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 , 平成 26 年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2015 年 2 月, 岡山県岡山市

2.研修会

1) 緒方喜久代、森本 洋、磯部淳子、倉 文明:レジオネラ症総論、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、レジオネラ属菌の培養法のコツと注意点:実習 ろ過濃縮・プレート処理、顕微鏡観察、九州地区レジオネラ実技研修会、関東化学主催、2013年8月、福岡県久留米市

2) 磯部順子、金谷潤一、緒方喜久代、森本洋、倉 文明:レジオネラ症総論、富山県における環境・臨床材料からの分離状況、培養法概論と斜光法について、大分県における浴槽水検査の実際:実習 ろ過法・培養法・顕微鏡観察、レジオネラ検査研修会、富山県衛生研究所主催、2013年9月、富山県射水市

3) 森本 洋、倉 文明:レジオネラ症総論、レジオネラ症を予防するために、レジオネラ属菌培養法、斜光法を利用したレジオネラ属菌培養法実習、「レジオネラと環境衛生」研修会、福岡市保健環境研究所主催、2014年3月、福岡県福岡市

4) 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、厚生労働科研「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の構築に関する研究」小班会議、2014年7月、東京都

5) 森本 洋:レジオネラ感染症とその衛生対策について、道南獣医師会公衆衛生講習会、2014年11月、北海道函館市

6) 森本 洋:標準的検査法(培養法)と外部精度管理に向けた検討、平成26年度生活衛生関係技術担当者研修会、2015年2月、東京都

7) 森本 洋:レジオネラ症と衛生対策、平成26年度保健所生活衛生課監視指導班研修会、2015年3月、北海道倶知安町

8) 森本 洋:レジオネラ感染症について、平成27年度道央南ブロック保健所試験検査担当者研修会、2015年10月、北海道室蘭市

9) 森本 洋:環境水のレジオネラ属菌検査について、平成27年度保健所微生物等検査業務担当者研修会、2016年2月、北海道札幌市

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

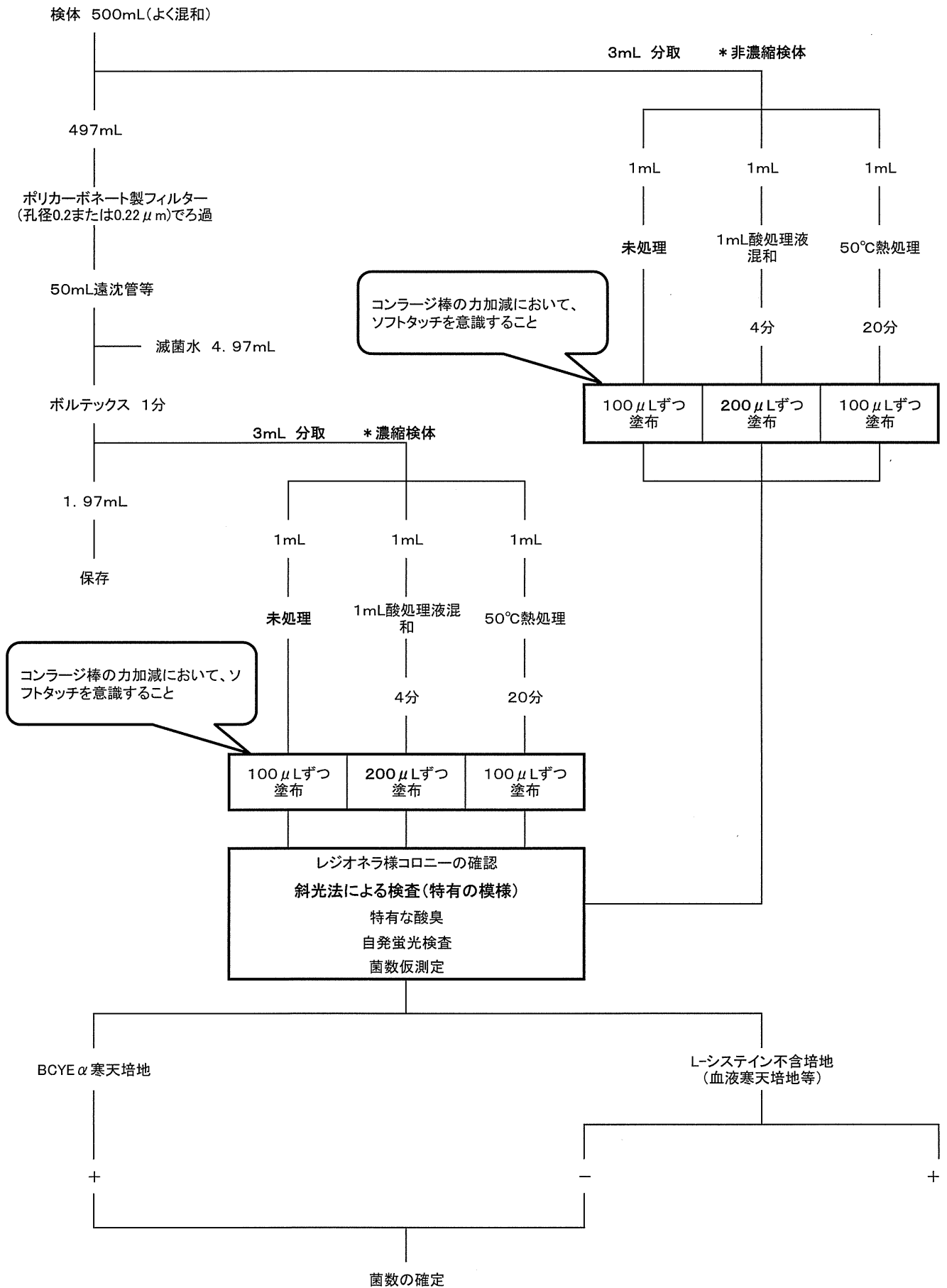


図2 WG推奨法フローチャート

表1-1 判定結果(非濃縮、ろ過濃縮、遠心濃縮) cfu/100ml

施設No.	非濃縮	ろ過濃縮	遠心濃縮	施設No.	非濃縮	ろ過濃縮	遠心濃縮
15110001001	2900	960	940	15110001021	2600	1400	-
15110001002	1400	65	-	15110001022	3700	1600	-
15110001003	3000	390	-	15110001023	3000	1600	420
15110001004	2900	1100	-	15110001024	1900	1100	-
15110001005	1600	790	-	15110001025	2300	590	-
15110001006	3000	1300	-	15110001026	1100	340	-
15110001007	1100	-	110	15110001027	1900	0	350
15110001008	2500	800	310	15110001028	400	400	-
15110001009	500	19	-	15110001029	1600	910	-
15110001010	100	180	-	15110001030	2300	290	-
15110001011	1700	500	-	15110001031	1700	350	140
15110001012	600	-	270	15110001032	2100	230	190
15110001013	1800	95	-	15110001033	0	0	-
15110001014	1800	260	-	15110001034	650	180	-
15110001015	2200	-	890	15110001035	2000	190	-
15110001016	1000	280	630	15110001036	3100	2200	-
15110001017	2900	600	610	15110001037	1600	900	-
15110001018	1200	160	-	15110001038	680	-	230
15110001019	600	460	-	15110001039	100	240	-
15110001020	1900	640	-	15110001040	470	250	-

表1-2 判定結果(非濃縮、ろ過濃縮、遠心濃縮) cfu/100ml

受付No.	非濃縮	ろ過濃縮	遠心濃縮	受付No.	非濃縮	ろ過濃縮	遠心濃縮
15110001041	2400	240	-	15110001061	2000	1500	-
15110001042	700	-	440	15110001062	1400	-	60
15110001043	1900	560	180	15110001063	1800	530	-
15110001044	2500	1100	-	15110001064	2600	600	140
15110001045	2300	500	-	15110001065	2100	1700	-
15110001046	2400	530	270	15110001066	1100	920	-
15110001047	0	110	-	15110001067	1400	600	-
15110001048	4800	3200	-	15110001068	1000	15	80
15110001049	0	0	0				
15110001050	2900	1600	-	平均値	1800	650	310
15110001051	3500	1800	-	最大値	4800	3200	940
15110001052	800	-	130	最小値	0	0	0
15110001053	100	0	-	中央値	1900	500	245
15110001054	2000	470	170	対象機関	68	61	22
15110001055	2800	670	-	良好機関	62(91%)	38(62%)	8(36%)
15110001056	2100	54	-				
15110001057	2100	530	260				
15110001058	370	8	-				
15110001059	3100	190	-				
15110001060	3100	1100	-				

平成 25-27 年度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」
分担研究報告書

「公衆浴場の衛生管理等に関する検討」

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所
○研究分担者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
研究分担者	森本 洋	北海道立衛生研究所
研究分担者	磯部順子	富山県衛生研究所
研究分担者	烏谷竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
研究分担者	緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター

研究要旨

厚生労働省は、入浴施設に関連したレジオネラ属菌感染症を防ぐために、通知等をもって旅館ならびに公衆浴場等における入浴施設の衛生管理の徹底を図っており、これに伴って、入浴施設におけるレジオネラ感染症対策を目的とした研究が厚生労働科学研究費補助金を受けて実施され、衛生管理や消毒法あるいは検査法等について検討を重ね、得られた成果は毎年度に報告書としてまとめられている。本研究班では、平成 25 年度と平成 26 年度に、これまでの研究成果の中から、その活用の提言に向けて、衛生管理のさらなる向上ならびにレジオネラ症予防につながることを期待される成果を整理することを目的に、昨年度にワーキンググループを立ち上げ、これまでに実施された研究の成果等を踏まえ、入浴施設の衛生管理やレジオネラ属菌の培養法等について、活用が期待される研究成果を整理した。検討した内容は、1) 消毒法、2) 検査法（迅速検査法、斜光法、検査法の標準化）、3) 洗浄効果の簡易判定法、4) レジオネラ属菌汚染の指標、5) シャワーでのレジオネラ汚染と衛生管理とした。さらに、平成 27 年度は、水試料からのレジオネラ属菌検査法の普及を目的として実施する研修において使用する検査法のマニュアルの作成を試みた。

A. 研究目的

わが国では入浴施設が最も重要であるとされている。そのため、レジオネラ感染症の発生を予防するためには、入浴施設の衛生管理とレジオネラ対策を適切に実施する

ことが不可欠である。厚生労働省は、関連する通知等をもって、旅館ならびに公衆浴場等の入浴施設におけるレジオネラ症防止対策の徹底を図っている。こうした通知に基づいて公衆浴場等の入浴施設の衛生管理

が実施され、レジオネラ感染症発生の予防が行われている。その一方で、さらなる衛生管理の向上を目指し、厚生労働科学研究費補助金研究事業において、国立研究機関と地方衛生研究所、大学、民間機関等の研究者により、これまでに種々の調査研究が行われてきている。

そこで、本研究班では活動の一環として、厚労科研の過去の研究において公衆浴場等におけるレジオネラ対策に関する研究内容の中から、衛生管理の向上に必要となると期待される成果を整理することを目的としてワーキンググループを立ち上げた。ワーキンググループでは、これまでの研究班の成果を検討し、その中から1) 消毒法、2) 検査法（迅速検査法、斜光法、検査法の標準化）、3) 洗浄効果の簡易判定法、4) レジオネラ属菌の汚染の指標としての浮遊菌の ATP 測定、5) シャワーでのレジオネラ汚染と衛生管理を取り上げ、それらの成果を概説し、公衆浴場等におけるレジオネラ対策における活用の提言を行った。

入浴施設の浴槽等におけるレジオネラ属菌の汚染状況を把握することは、入浴施設の衛生管理状況の評価や、入浴施設における汚染対策を決める上で不可欠である。そのため、水試料からのレジオネラ属菌検出法により正確な結果が得られることが求められる。水試料からのレジオネラ属菌の検出は、試料の濃縮、前処理、選択分離培地での分離培養により行うが、これらの操作における手技の良し悪しや手法の選択、培地の選択等が菌の検出に大きく影響する。そのため、検出法の研修の必要性が以前から指摘されていた。研修の実施には、検査法のマニュアルの整備が不可欠であることから、本研究班ではマニュアルの作成を協議

することとした。

B. 研究方法

平成 16 年度から実施された「循環式浴槽における浴水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」（研究代表者：遠藤卓郎 平成 16～18 年度）から「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」（研究代表者：倉文明 平成 22～24 年度）までの、6 研究課題において得られた研究成果について各研究年度の報告書の内容に基づいて、成果を抽出した。さらに、平成 25 年度と平成 26 年度の研究成果についても検討の対象とした。これらの成果を、厚生労働省の発出した通知等の内容と照らし合わせ、現在の入浴施設等の状況を勘案しながら、衛生管理に有効な内容を取り上げ、活用されることを提案した。

地方衛生研究所や民間検査機関において実施される、水試料からのレジオネラ属菌検出法の普及を目的とした研修会の開催時に使用するマニュアルの作成を試みた。研究班の構成メンバーの中から、マニュアル作成検討グループを作り、マニュアル作成の協議を行った。水試料からのレジオネラ属菌検出法は本研究班が推奨する検査法を参照し、これに基づいてマニュアル作成を検討した。

C. 研究結果及び考察

衛生管理への活用が期待される研究成果として項目：1) 消毒法、2) 検査法（迅速検査法、検査法の標準化、斜光法）、3) 洗浄効果の簡易判定法、4) レジオネラ属

菌の汚染の指標としての浮遊菌の ATP 測定、5) シャワーでのレジオネラ汚染と衛生管理を取り上げた。

それぞれの項目について、以下に概要と提案の内容を示す。

1) 消毒法

遊離残留塩素は、消毒効果は pH の影響を受けやすい、化学的に不安定である、フミン質等により消費されやすい、温泉を利用する浴槽水の泉質を変えてしまう、特有の臭気が発生するといった短所がある。そこで、遊離残留塩素に代わる塩素系消毒剤としてモノクロラミンが取り上げられ、入浴施設における消毒効果等を検討し、その使用を提言した。

2) 検査法

(1) 迅速検査法

培養法によるレジオネラ属菌の検出には通常 7 日間程度の日数を要する。そこで、短時間でレジオネラ属菌の汚染・生息・存在の有無を判定できる迅速検査法（生菌迅速検査法：EMA-qPCR 法）を開発した。

迅速検査法は以下の目的で使用することが想定された。

1. 患者発生時の感染源調査（原因究明）
2. 改善措置後の陰性確認検査（営業再開の目安）
3. 洗浄効果の判定（陰性証明）等

(2) 検査法の標準化

レジオネラ属菌の培養検査の検査レベルの差が生じる原因を追及したところ、検査で使用する選択培地の種類、試料の濃縮法や前処理法、鑑別法等の選択肢があり、それが検査レベルの差と関連している可能性が浮かび上がった。そのため、検査法を標

準化することが必要となった。今後導入することが推奨される検査法として、「検体採取から検査実施」、「ろ過濃縮法」、「冷却遠心法」、「前処理」、「培養」の各工程ごとの標準的方法を提唱した。

(3) 斜光法

レジオネラ属菌の培養検査では、培養時間が長いため、少しでも短い日数で寒天平板上のレジオネラ属菌の集落を形態観察により他の菌種と区別し、迅速かつ容易に鑑別・同定することが可能になることが望まれていた。しかし、通常の観察法により平板培地上の集落を区別することは検査の経験を要する。そこで、寒天平板上の集落の鑑別を容易にするために斜光法を開発した。

3) 洗浄効果の簡易判定法

浴槽におけるレジオネラ属菌の汚染を取り除き、その増殖を抑えるためには、浴槽の洗浄・消毒により浴槽の壁面や床の表面の生物膜を取り除くことが極めて有効である。しかし、洗浄・消毒の適正性は容易に判定することは困難であった。そこで、浴槽の洗浄効果の簡易判定法としての ATP ふき取り検査が提案された。

4) レジオネラ属菌汚染の指標としての浴槽水中の浮遊菌の ATP 測定

日常的にレジオネラ属菌の汚染・増殖の有無を監視することは、入浴施設の衛生管理に HACCP の要素を取り入れるという観点からも優先されるべき事項であり、レジオネラ感染症発生の予防のために重要な課題である。入浴施設の現場において日常的にレジオネラ属菌の汚染・増殖の有無をリアルタイムに判定することができる簡易

検査法として、浴槽におけるレジオネラ属菌の増殖の指標として浮遊菌の ATP 測定を導入が検討された。

5) シャワーでのレジオネラ汚染と衛生管理

本研究班の一環として実施した調査では、入浴施設や家庭で使用されているシャワーから高率にレジオネラ属菌が検出され、汚染されていることが明らかとなった。シャワーヘッドやホースを積極的に洗浄・消毒するなどの衛生管理を行うことが重要である。

D. 結論

厚生労働科学研究費補助金研究事業において、国立研究機関と地方衛生研究所、大学、民間機関等の研究者により実施された、入浴施設におけるレジオネラ感染症発生の予防のための研究の成果を整理し、今後の入浴施設における衛生管理の向上のために活用が期待される研究成果をまとめた。具体的には、1) 消毒法、2) 検査法（迅速検査法、斜光法、検査法の標準化）、3) 洗浄効果の簡易判定法、4) レジオネラ属菌汚染の指標としての浴槽水中の浮遊菌の

ATP 測定、5) シャワーでのレジオネラ汚染と衛生管理とした。これらの成果が入浴施設の衛生管理に活用され、入浴施設関連のレジオネラ感染症の発生が予防されることが期待される。

検査法の研修時に使用することを目的に、検討グループを構成して、使いやすくわかりやすいマニュアルの作成を試みた。検査法の操作段階ごとに項目立てし、各項目の構成を作成した。さらに各項目における注意点やポイントを見やすくするための工夫を施した。水試料からのレジオネラ属菌検査法の標準法が作成された時点で、今回検討した構成に基づいて研修用のマニュアルを作成することとした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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)
分担研究報告書

「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」

レジオネラ属菌の培養検査法と精度管理

研究分担者 佐々木麻里 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 一ノ瀬和也、百武兼道 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 緒方喜久代 公益社団法人大分県薬剤師会検査センター
研究協力者 森中りえか、原口浩幸 株式会社ファスマック

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(LAMP法及び比色系パルサー法)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。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、培養(+)遺伝子検査(-)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。レジオネラ属菌の菌数、検出される菌種や泉質などの要因が考えられた。

また、加熱による雑菌処理時間を研究班推奨の方法 50℃20分間と JIS K 0650-50-10:2006 の 50℃30分間の2法で、浴槽水・湯口水を用いて比較検討を行なった。その結果、50℃20分の方が高い検出率が得られた。

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。また、行政機関を対象に実施する研修(新興再興感染症技術研修会)に協力した。

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)

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。培養法と遺伝子検査法(とくにLAMP法)の不一致検体について、その原因を明らかにするため、栄研化学株式会社と共同で検討を行なっ

た。

さらに、簡易迅速検査法の一つとして、比色系パルサー法 (Fig.1) について検討した。

併せて、精度管理手法に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 25 年 8 月から平成 27 年 10 月の間、県保健所環境衛生監視員が採水した浴槽水および湯口水 160 検体を対象とした。内訳は、平成 25 年度が 54 検体、平成 26 年度が 56 検体、平成 27 年度が 50 検体であった。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、 ϕ 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ビーカー (100ml 容量) に移し、ボルテックスミキサーにて 1 分間洗い出しをした。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; 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 $^{\circ}$ C で培養した。本法における検出感度は 5cfu/100mL である。平成 26 年度の 56 検体については、50 $^{\circ}$ C 30 分加熱後、急冷した濃縮検体についても同様の培養を実施した。

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。

4. 比色系パルサー法

(方法①) 濃縮検体 18 検体について、1ml を 12,000rpm (13,000 \times g) で 5 分遠心後、上清を全て除いたものを冷蔵送付し、2 日後に株式会社ファスマックにおいて溶菌液を調製して測定を実施した。

(方法②) 濃縮検体 32 検体について、次の方法で調製した溶菌液を冷凍送付したものをを用いて、株式会社ファスマックにおいて測定を実施した。溶菌液は、濃縮検体 1ml を 12,000rpm (13,000 \times g) で 10 分遠心後、70 μ l 残して上清を除去し、30 μ l の変性液を加えて、37 $^{\circ}$ C 15 分溶菌し、その後 10 μ l の中和液を加えて調製した。

方法①、方法②とも濃縮検体 1 検体につき 2 回溶菌液を調製して測定を行った (方法①の 1 検体は 1 回のみ)。

5. 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株式会社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製後、直接、久留米大学に輸送されたものを使用した。

6. 精度管理手法に関する検討

森本研究分担者の報告参照。

C. 研究結果

1. 培養法