

公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌 検査方法(培養法)に関する研究成果について

令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会

令和2年2月4日(火)厚生労働省2階講堂

北海道立衛生研究所 森本 洋

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)

公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

研究代表者 国立感染症研究所 前川純子

研究課題 「レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み」

研究分担者 森本 洋 (北海道)、磯部順子 (富山県)、黒木俊郎 (岡山理科大)、
佐々木真理 (大分県)、田栗利昭 (長崎県)、中西典子 (神戸市)

研究協力者 大屋日登美 (神奈川県)、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)、金谷潤一 (富山県)、倉 文明 (感染研)、
田中 忍 (神戸市)、千田恭子 (仙台市)、平塚貴大 (広島県)、
三津橋和也 (北海道)、武藤千恵子 (東京都)、山口友美 (宮城県)、
吉野修司 (宮崎県)

概要

1. 研究班(過去に実施されたものも含む)で得られたデータ等に基づき、「衛生等管理要領」内の標準的な検査法(培養法)として提案
2. 外部精度管理調査事業安定化に向けたサポート
3. 検査研修会構築に向けた検討

研究成果を参照した入浴施設等の衛生管理に関する研究事業

研究課題名	実施年度	研究代表者
温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究	平成18年度	倉 文明
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19～21年度	倉 文明
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22～24年度	倉 文明
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	倉 文明
公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究	平成28～30年度	前川純子

簡単に言うと

- ワーキンググループによる
推奨検査法(WG推奨法)を提示した。
- WG推奨法と平成29年5月に改訂された
ISO法との調整を行った。
- 令和元年9月発出の通知内推奨法へ。

レジオネラ属菌培養法の背景

食中毒、感染症の発生時および予防対策を考えるにあたり、患者や推定原因食品および環境材料から病原菌を分離培養することが大変重要な課題である。

しかしながら、
分離培養するのが難しい
ものも存在する

レジオネラ属菌

- 一般の細菌検査用培地に発育しない
- Eagle MEMなどの組織培養培地にも発育しない
- 従来 of 細菌検査において偶然検出されることはない
- 増殖速度が遅い
- 表現形質が乏しい

皆様の中にも実感されている方々が
いませんか？

レジオネラ属菌は、

* 分離培養するのが難しい

* 分離培地上で確認するのが難しい

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)

- **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)

- **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

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)

10CFU/100mL未満であること

- 一般的なレジオネラ属菌の培養検査で検出限界未満。
つまり培養法で生菌が検出されないことを意味する。

公衆浴場における衛生等管理要領等の 改正について

(H15.2.14 健発第0214004号厚生労働省健康局長通知)

- レジオネラ属菌の検査法

- ・新たに

”また、その具体的手順は、

「新版レジオネラ症防止指針」の

「＜付録＞1環境水のレジオネラ属菌検査
方法」を参照すること”

という一文が加えられた

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一(1999年3月)
公益財団法人全国生活衛生営業指導センター
全国旅館ホテル生活衛生同業組合連合会
- レジオネラ症防止指針(初版、新版、第3版、第4版)
(1994、1999、2009、2017年)
公益財団法人日本建築衛生管理教育センター
- 上水試験方法,上水試験方法 解説編(2001、2011)
公益財団法人日本水道協会
- 衛生試験法・注解(2005、2010)
公益財団法人日本薬学会
- 病原体検出マニュアル(2003年12月、2011年10月)
国立感染症研究所

疑問点？問題点？妥協点？

- これらに示されている検査法には随所に違いがある
- それぞれにおいて項目ごとに複数の選択肢が認められる場合がある
- 改訂・レジオネラ属菌防除指針
—温泉利用入浴施設用—（1999年3月）
検査方法，検出限界，検査範囲，検査価格は
実施機関によって異なる
⇒依頼時には，価格だけでなく，検査内容の説明をよく聞き判断する必要がある

一般的な施設の自主検査においては

施設の衛生管理



→→→ 衛生管理状態の確認

つまり

「レジ検査による確認」が
重要ポイント

レジオネラ症の予防

地方衛生研究所に対する 検査法の実態調査について

貴自治体で公衆浴場施設における
自主検査の依頼を受けていますか？

	回答数
受けている	21*(約28%)
受けていない	53(約72%)

* 検査体制はあるが実績はほぼ無しと
回答した自治体も

つまり

- 70%以上の自治体では、自主検査対応はしていなかった。
- 自主検査を受け付けている自治体でも、実際には民間検査機関による検査が主流。
- 改めて民間検査機関の重要性と官・民間問わず基本的な培養法による検出精度を安定させる必要性を認識することに。

「過去にはこのような質問が」 平成21年度の本会議において

- 施設の自主検査で「不検出」、保健所の行政検査で「検出」となり、検査結果が不一致となることがある。また、レジオネラ属菌の「ろ過濃縮法」の検査法で、フィルターの孔径により検出菌数に差が出るとの話も聞く。「検査法の確立」と「行政・民間の精度管理のあり方」について御教示願いたい。

目標・目的

- 公衆浴場の水質管理における自主検査のボトムアップに繋がる、出来るだけ分かりやすい検査法を提示すること。

公衆浴場における衛生等管理要領等の 改正について

(H15.2.14 健発第0214004号厚生労働省健康局長通知)

- レジオネラ属菌の検査法

- ・新たに

”また、その具体的手順は、

「新版レジオネラ症防止指針」の

「＜付録＞1環境水のレジオネラ属菌検査
方法」を参照すること”

という一文が加えられた

< 付 録 >

1. 環境水のレジオネラ属菌検査方法

レジオネラ属菌培養法の基本は BCYE α 寒天培地を用い、36℃前後で培養することである。検体の種類・状況、検査施設の規模・設備・人員その他の要因により実施方法の細部が相違する可能性がある。レジオネラ属菌検査は熟練した専門家が行わねばならない。検査実施に際し、操作によってエアロゾルを発生する可能性があるときは、レベル2の安全キャビネット内で作業する。大腸菌を培養したことがあるからといってレジオネラ属菌の検査もできると安易に考えてはならない。

新たにレジオネラ属菌検査に従事しようとする者は、レジオネラ研究施設に少なくとも3ヶ月は研修し、技術、知識、観察力、判定能力、バイオハザードの観念等を身に付けなければならない。検査方法の改変は、細菌学実験法の原則に通じた者がレジオネラ属菌検査の基本に則して行うべきであって、細菌学実験法の基礎知識のない者が勝手に行ってはならない。

レジオネラ属菌検査を外部施設に委託しようとする場合に、委託者は細菌学的知識と技能のある人材を担当者とし、必ず事前にその受託施設での検査・判定・菌数算定方法を熟知した上で契約しなければならない。検査実施後は単にその報告書の数値を見るだけでなく、担当者は必要に応じてこれを批判し、爾後の的確な判断を下さねばならない。

北海道立衛生研究所のこれまで

- 1976年米国フィラデルフィア市で開催された在郷軍人の会合と関連し、多数の死亡者を伴う呼吸器疾患が集団発生
- 北海道衛研では1982年から冷却塔水など、環境水のレジオネラ属菌検査を試験的に開始。
- 1983年、CDCでレジオネラの研修。
- 2006年度から厚生労働科学研究のレジオネラ研究班に参加。
- ～現在に至る。
- * 検査導入から38年目、CDCでの研修から37年目になります。

検査のポイントについて

- これまでの調査研究で分かってきたいくつかのポイントを紹介します。

→ ポイントとは？

- * 検査の考え方
- * 理論と実際

地方衛生研究所に対する 検査法の実態調査について

レジ検査に 不安を感じたことはありますか？

	回答数
ある	47 (約63%)
特にない	28 (約37%)

レジオネラ検査に不安があった施設のコメント レジが強く疑われるが、確定させるのが困難な場合

- 検査結果が陰性の場合
- 前処理してもレジ以外の菌が多数のときの判断
- 遺伝子検査では陽性だが、培養では陰性
- 定量検査の信頼性
- 濃縮、非濃縮の集落数に乖離がみられた場合の定量結果

⇒方法全体、前処理、濃縮工程、
発育集落の見分け方・カウント等々

不安解消のためにも

- 標準的な検査法の整理と提示
- 研修システムの構築
- 精度管理

官・民間問わず検査精度の安定に向けた
取り組みを進めることが必要

ただし

この方法を実施すれば、
100%問題が解決し、不安が全くなくなるんだ！
という方法は残念ながら。。。

バランスが重要!!

- 実際の検体においては、
濃縮工程、各種選択分離培地、各前処理、
夾雑菌の量・種類、浮遊物の量・種類等々が
複合的に影響。

標準的な検査法（培養法）の検討

標準的検査法とは（これまでの方向性）

- ① ISO 11731:1998(E)に基づいた
新版レジ防止指針に沿った方法
 - ② 検査結果のバラツキを減らす
 - 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 → 斜光法の導入
- ⇒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

ワーキンググループ(WG)推奨法

WG推奨法(培養法)

—浴槽水中のレジオネラ属菌検査—

- * 採取された検体の菌数が予測できない場合は、**濃縮検体**と**非濃縮検体**を
並行して検査する。菌数が少ないと予測できる場合は濃縮検体のみ検査。
- * どの前処理が最も有効か分からないので、**未処理**、**熱処理**、**酸処理**を並行して検査する。
- * **斜光法**によりコロニー確認を行う。

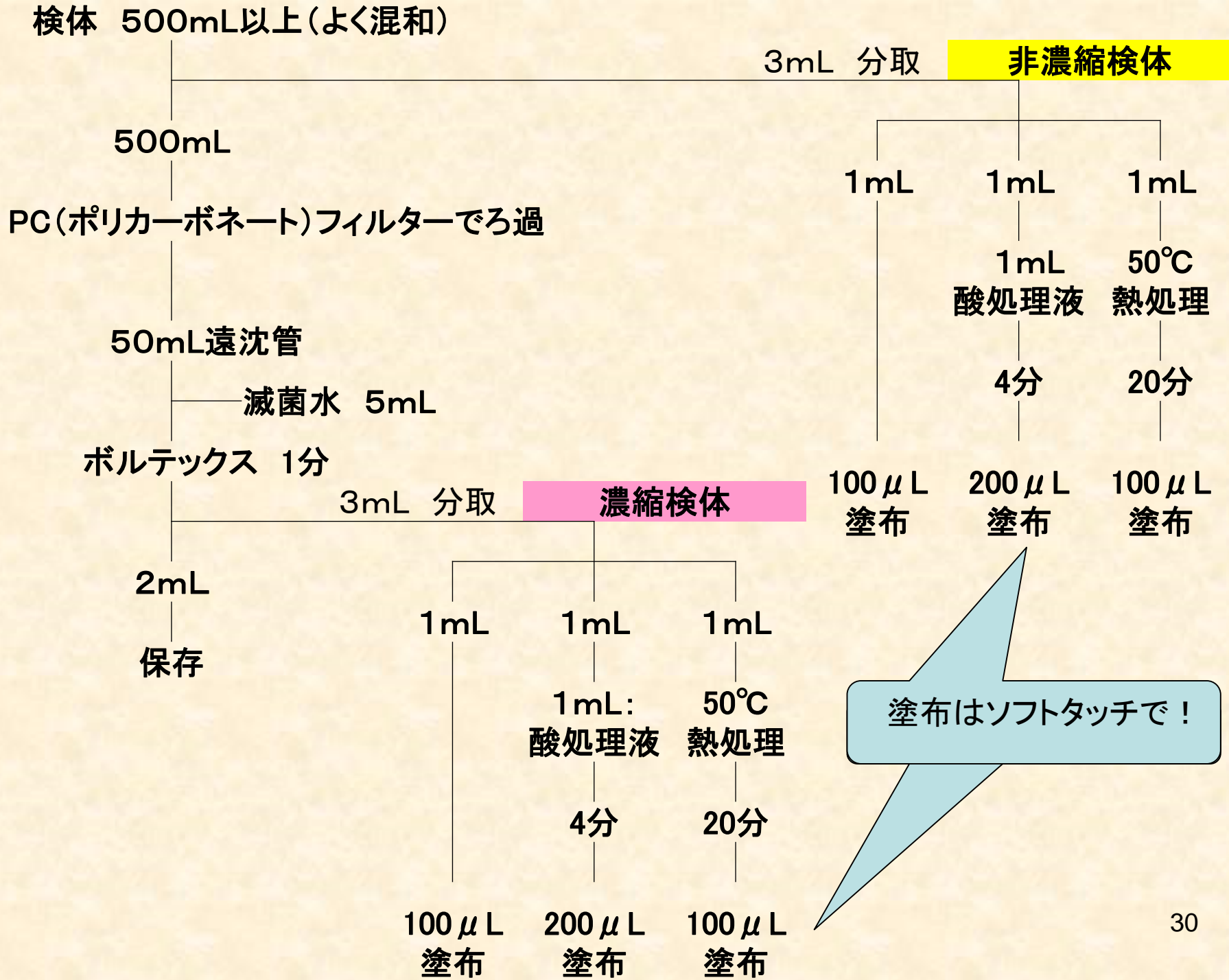
濃縮方法

•ろ過濃縮法

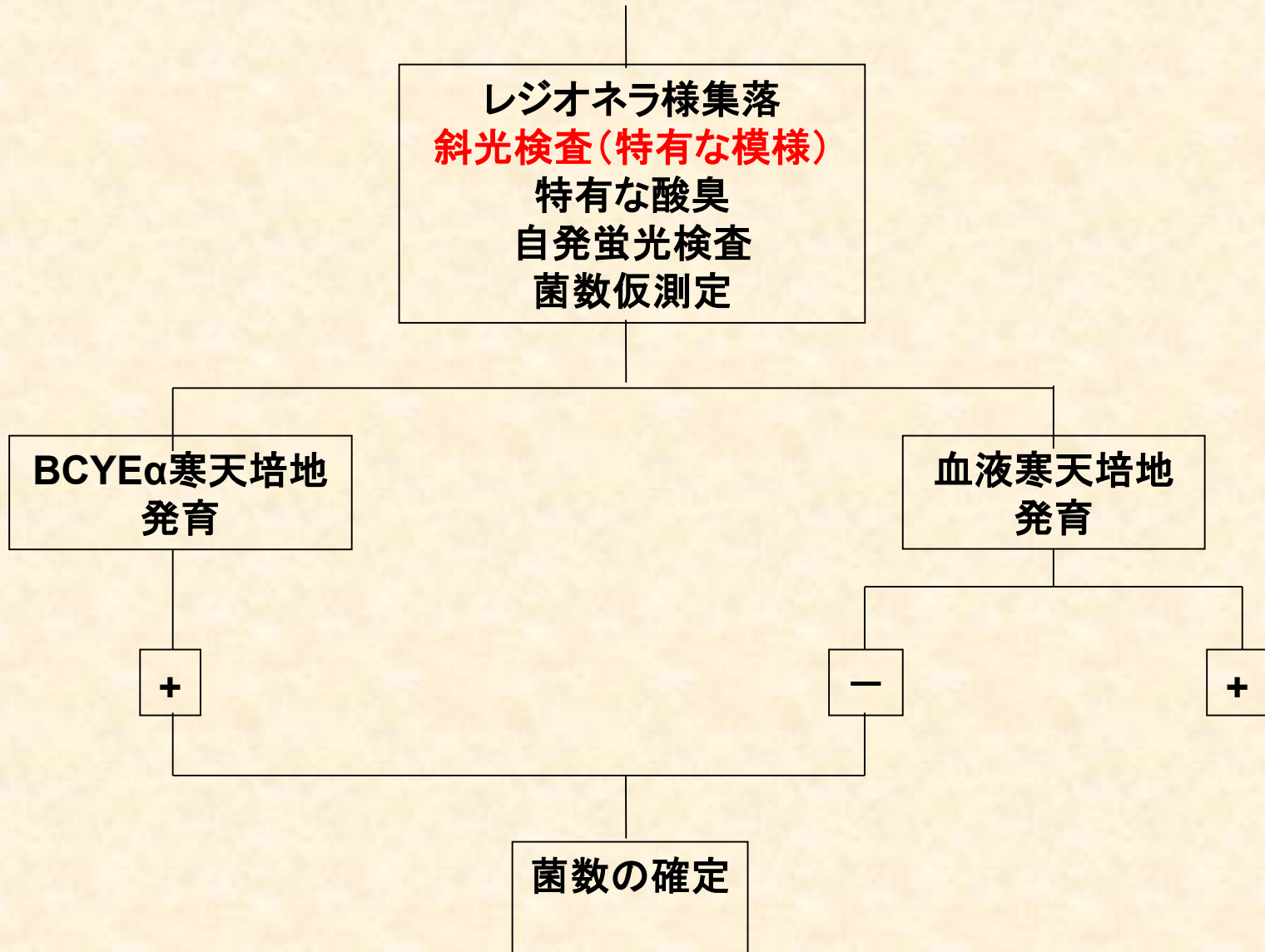
検水500mLを直径47mm、孔径0.2(0.22) μ mの
メンブランフィルター(ポリカーボネートタイプ)を用いて減圧吸引濾過し、
滅菌精製水(100倍濃縮)に浸しボルテックスで1分間振盪する。

•冷却遠心濃縮法

ISOを基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10に従う。



レジオネラ属菌の確認



WG推奨法の詳細は

厚生労働科学研究補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

- 平成24年度

「公衆浴場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25年度

「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」

* 十の点、一の点を含め記載

主な点について紹介します。

- ・ 検体が許容期間を超えて保存された時はこのことを報告書に記載する。
- ・ 同時にこれが検査結果に影響を及ぼしている可能性も付記する。
- ・ 検水の輸送または保存中に生菌数の変化することが知られている。
- ・ 検水を0～6℃の間で保存すると、容器壁に付着したレジオネラ属菌が死滅する可能性が高い。しかし20℃以上では他の細菌が増殖してしま
- ・ 6 ± 2℃での保存が望ましい (ISO 11731: 1998 (E))。

(4)濃縮

レジオネラ属菌数が 10^2 CFU/100ml未満と推定される時は検水を濃縮する。

a. 冷却遠心濃縮法 (図18(1)参照)

出典:新版レジオネラ防止指針(公益財団法人日本建築衛生管理教育センター)

新版レジオネラ症防止指針には

新版レジオネラ症防止指針には

11731: 1998:(E))。

b. 熱処理法

検水 1 ml を $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 30 ± 2 分間加熱する (ISO 11731: 1998(E))。液量は 1 ~ 2 ml とし、温度と時間を正確に管理する。熱処理後の検水濃度 (または濃縮倍数) はもとのままで変化しない。

1. 3 接種

菌数を予測できないので、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査する。

前処理検体 $50 \mu\text{l}$ または $100 \mu\text{l}$ をレジオネラ用選択培地平板に塗布する。

フィルター貼付法の場合は、吸引ろ過後の 47mm フィルターを、ろ過時のフィルター上面を上にしてレジオネラ用選択培地平板上に貼り付ける。

ISO 11731: 1998 (E)

GVPC 培地 3 枚を用い下記のように接種する。

① 未処理 (濃縮または非濃縮) 検水 0.1 ~ 0.5 ml

② 酸処理 (濃縮または非濃縮) 検水 0.1 ~ 0.5 ml

③ 熱処理 (濃縮または非濃縮) 検水 0.1 ~ 0.5 ml

非濃縮について考える

- ある時期の5年間で非濃縮と濃縮(ろ過)の検査を同時に行い、非濃縮検体からレジオネラ属菌が確認された265検体について報告する。
- 菌数の確定：
複数の検査条件のうち最も多くのコロニーが確認された条件の結果を採用。

非濃縮検体からレジが 検出された265検体中

- 濃縮検体測定不能 → 144検体(54%)

* つまり非濃縮のみから検出

非濃縮および濃縮検体から共に確認された
121検体(265-144)について菌数を
比較すると

非濃縮 > 濃縮 : 109検体(41%)

非濃縮 < 濃縮 : 11検体(4%)

非濃縮 = 濃縮 : 1(0.4%)

つまり

- 265検体中、非濃縮検体の検査結果から菌数を確定させたものは、

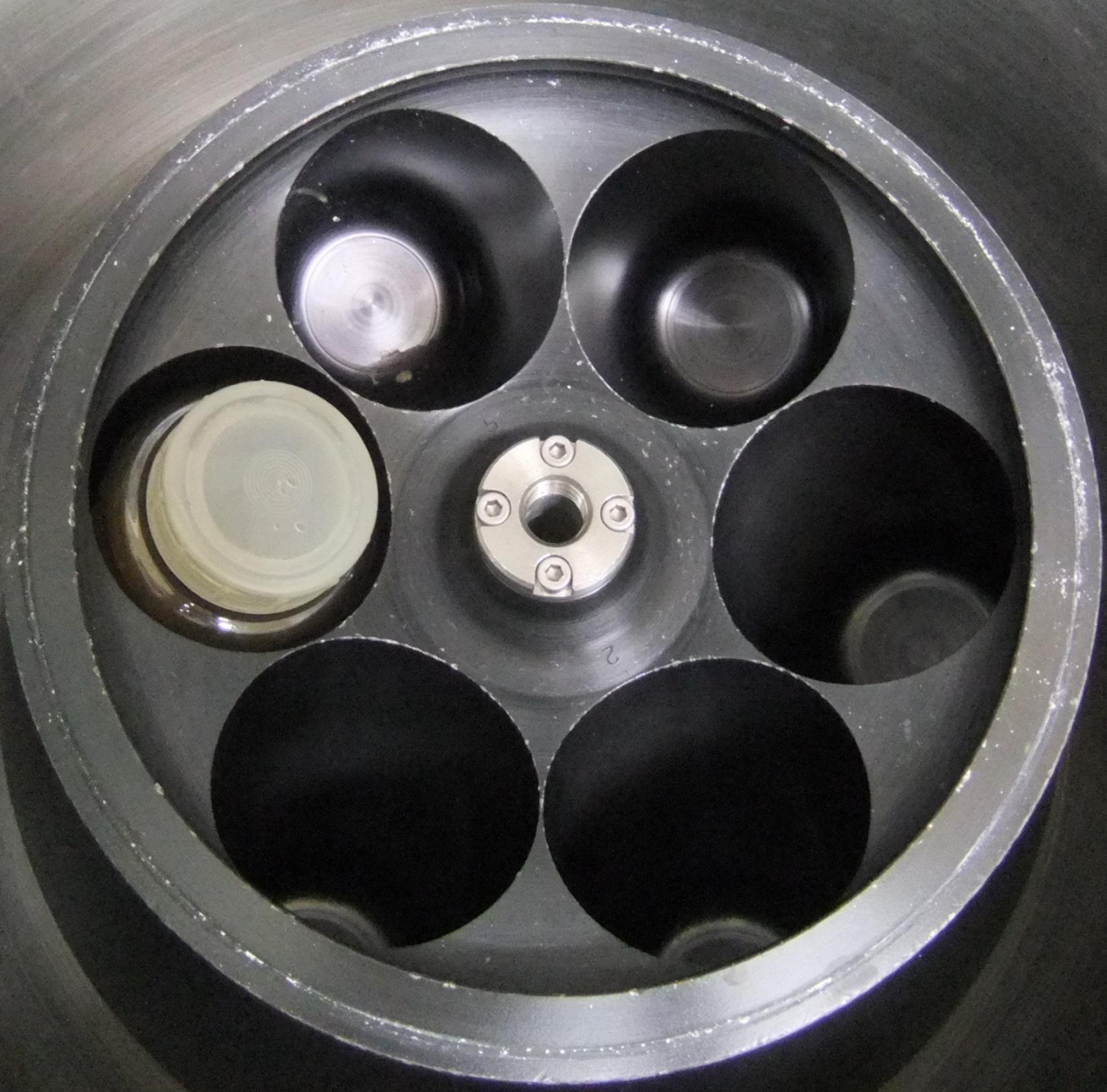
非濃縮 > 濃縮: 109検体 と 非濃縮のみから検出(濃縮で測定不能)の144検体を合わせた 253検体

→ $253 / 265 =$ 全体の約95%であった

非濃縮検査は重要である！

遠心濃縮実施機関で
確認してもらいたいこと
一例











る。

(定義)

第2条 感染性廃棄物とは、(1) 感染症の病原体を含有するものであり、また、若しくは、付着している感染性病原体を含有するもの(以下「感染性廃棄物」という。)及び感染性廃棄物の処理に供するもの(以下「感染性廃棄物の処理」という。)を指す。

第3条 所内で発生する感染性廃棄物を適正に処理する責任を有する者(以下「管理責任者」という。)及び感染性廃棄物の処理に供する者(以下「取扱責任者」という。)を指す。

第4条 所内で発生した感染性廃棄物の処理は、これに該当する担当者が自ら責任において、直ちに、次の方法により迅速適切に処理を行う。ただし、処理のため他部署へ依頼する場合は、取扱責任者の了解を得るものとする。

(1) 実物管理用容器(オートクレーブ)を用いる方法(感染性廃棄物のオートクレーブを使用する場合は、感染性廃棄物の処理に供するもの(以下「感染性廃棄物の処理」という。)を指す。)

(2) 乾熱滅菌法を用いる方法

(3) 消毒及び煮沸(15分以上)による方法

(4) 消毒及び煮沸(15分以上)による方法

2 消毒時は、消毒の回数及び時間により処理するものとする。

3 第1項の2、3及び4により処理した物のうち感染性廃棄物は、同様の処理により再度処理するものとする。

(処理状況の把握)

第5条 取扱責任者は、第4条で処理した結果を、その管理、回収(感染性廃棄物の回収記録簿(以下「記録簿」という。))に記載するものとする。

(報告)

第6条 取扱責任者は、毎月月初めに前月の記録簿を当該部署(以下「報告し、確認を受けるとする。)

2 取扱責任者は、前年度分の記録簿を管理責任者へ報告しなければならない。(毎年4月上旬までに施設管理課へ提出すること。)

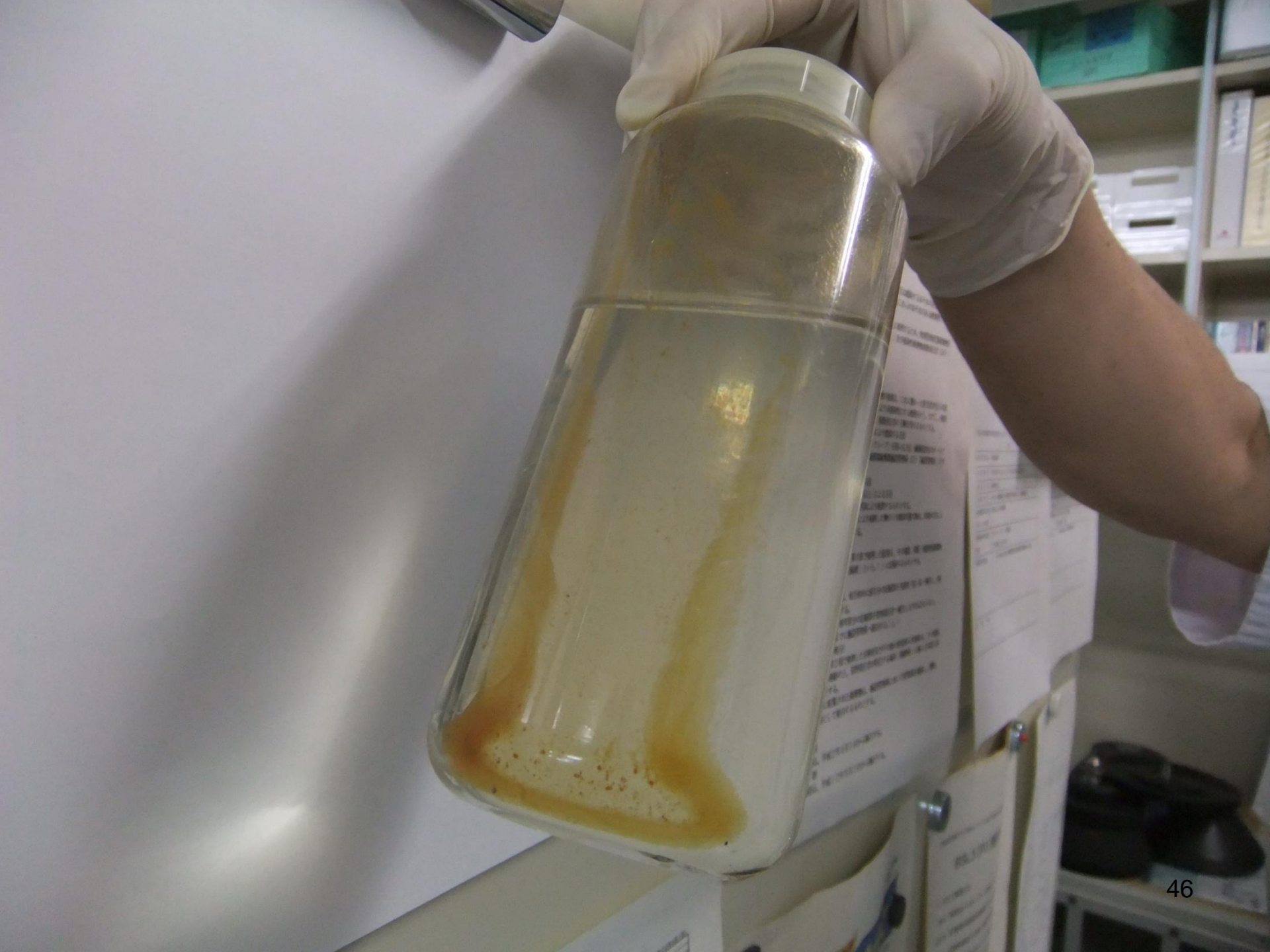
(分別、保管及び処分)

第7条 第4条第2項で処理した片断物及びその他の感染性廃棄物は、その管理、施設管理課へ連絡の上、管理責任者が指定する場所(感染性)に搬入し保管するものとする。

2 保管場所に着量された感染性廃棄物は、施設管理課において管理責任者(以下「管理責任者」という。)の指示に従って処分するものとする。

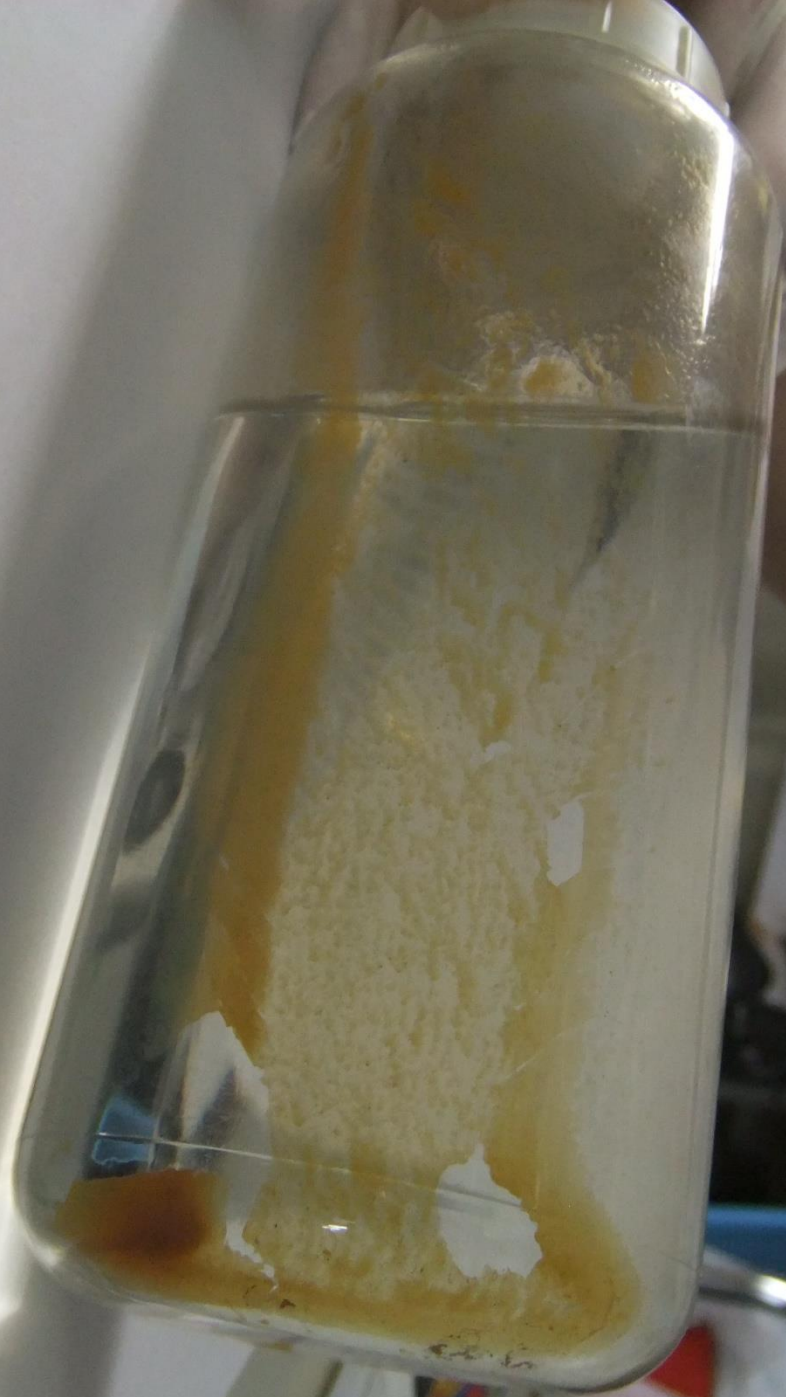
附 則
この規程は、平成2年4月1日から施行する。

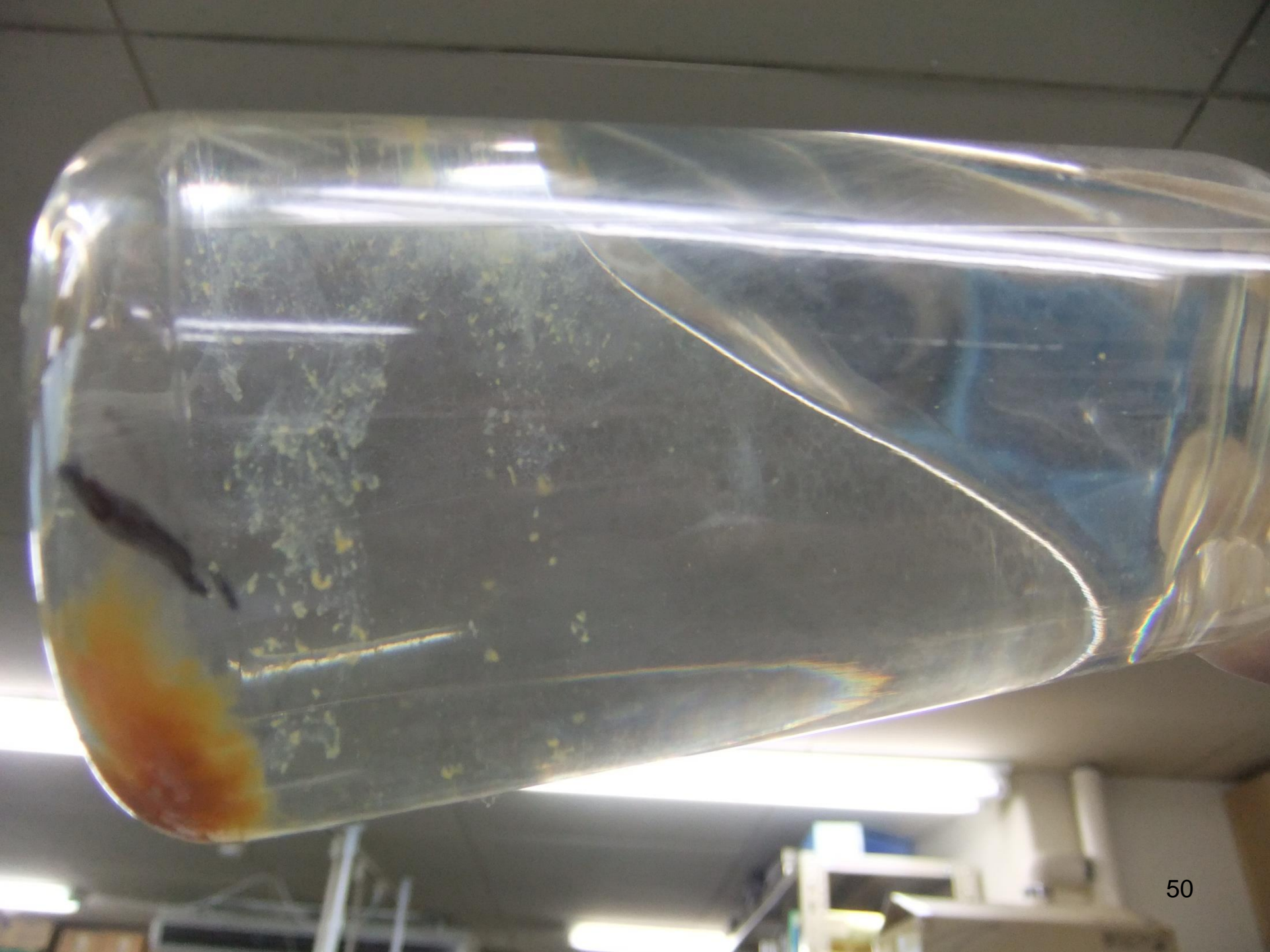
附 則
この規程は、平成17年9月1日から施行する。

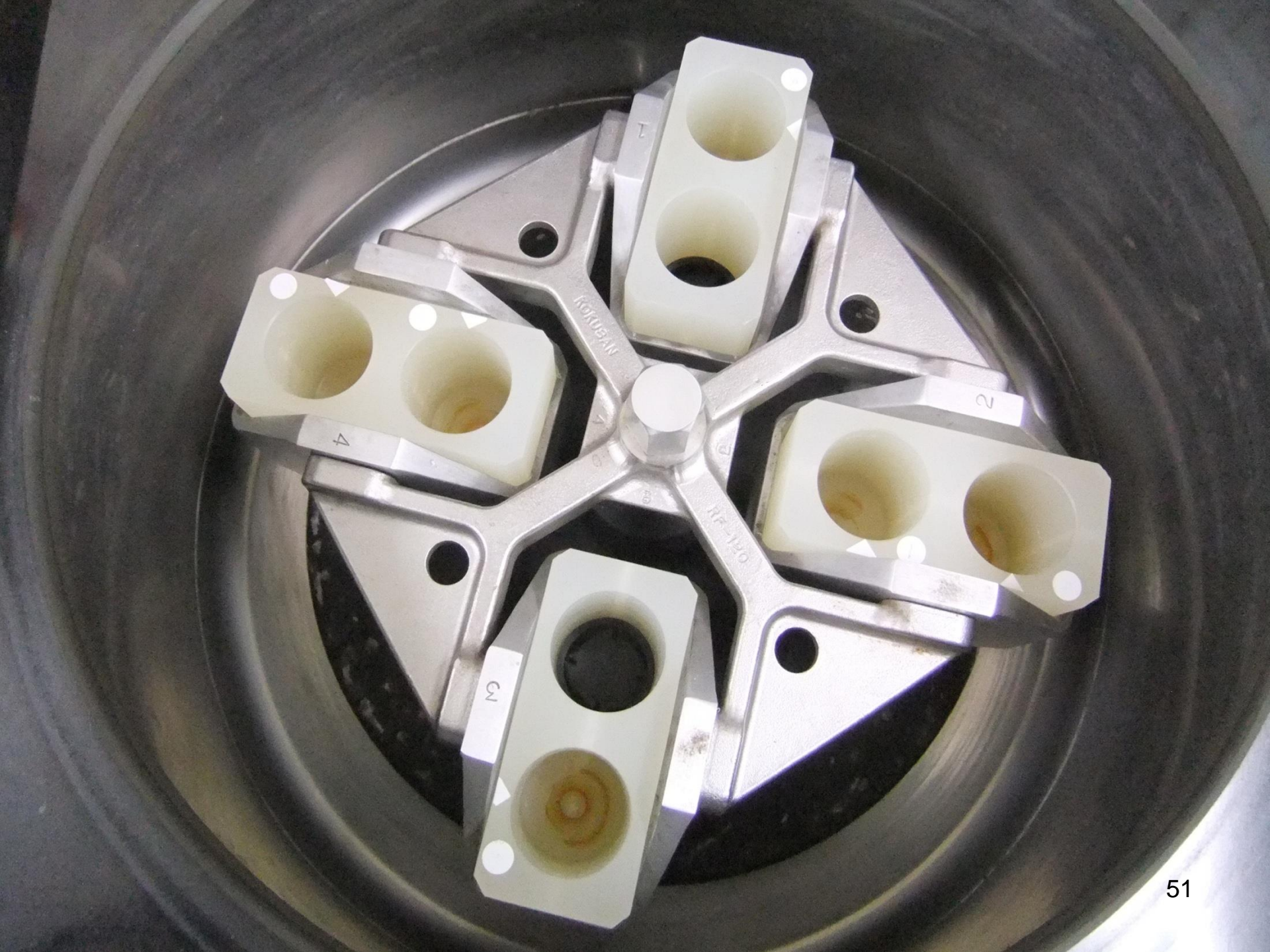


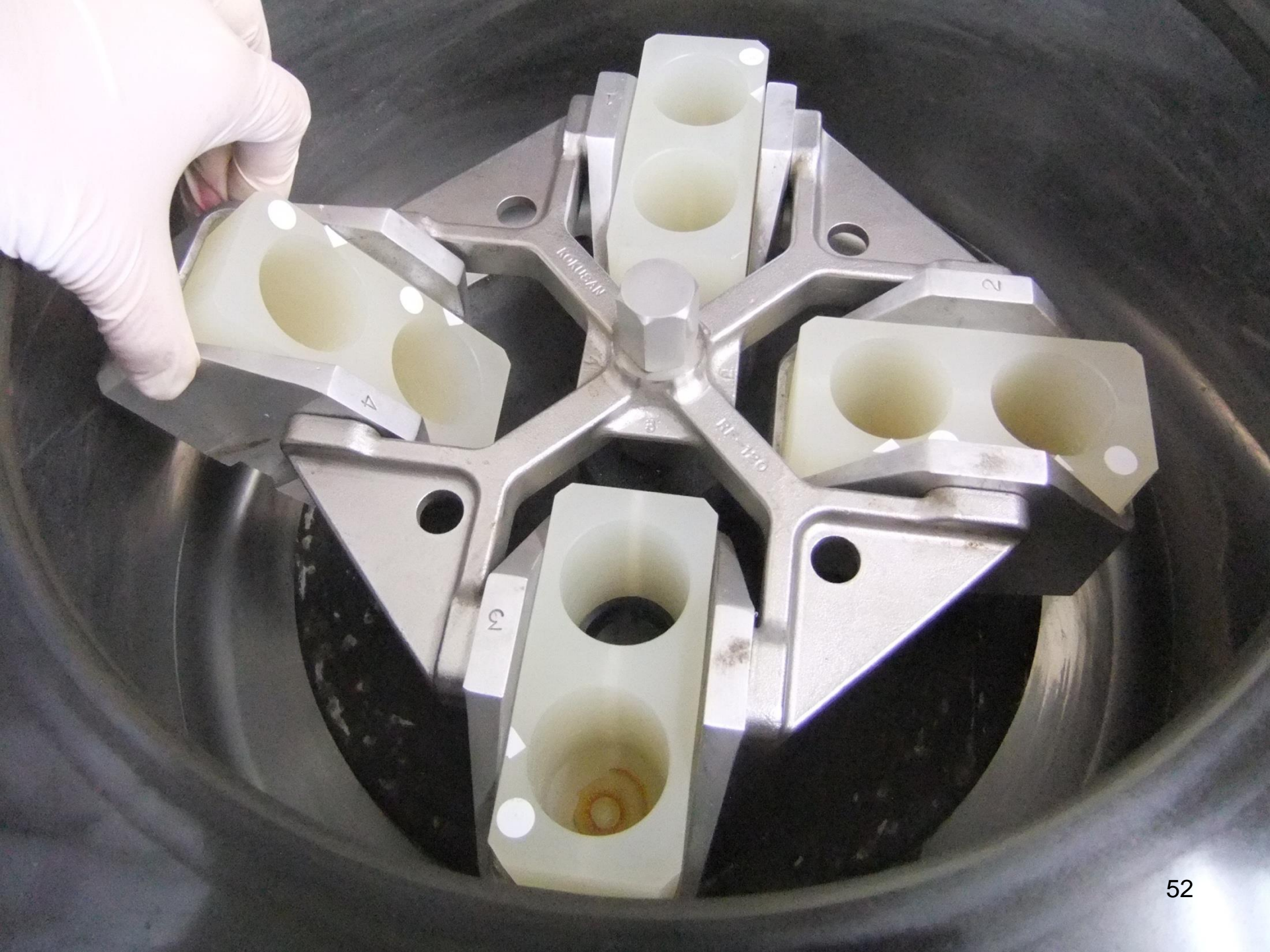


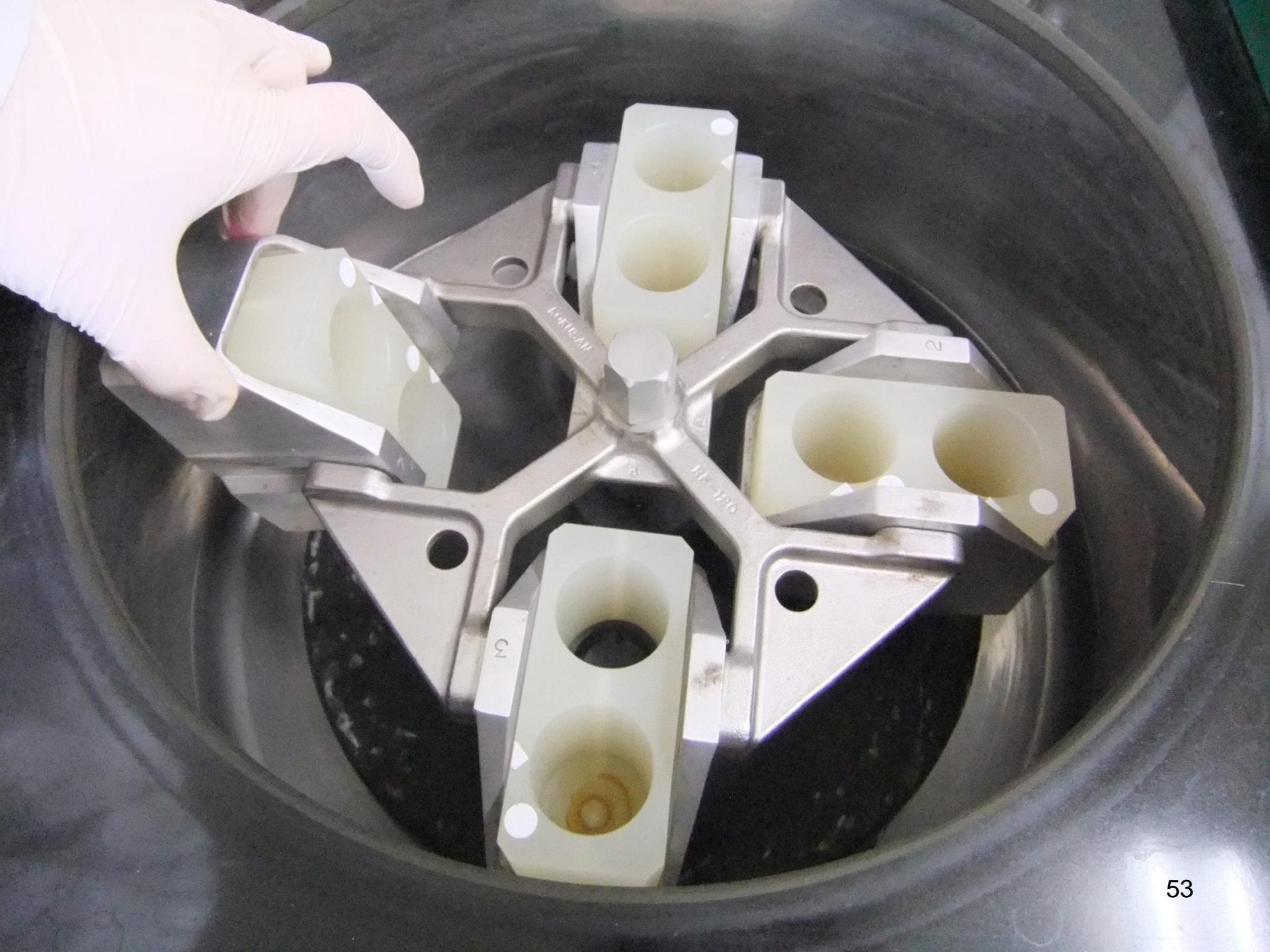


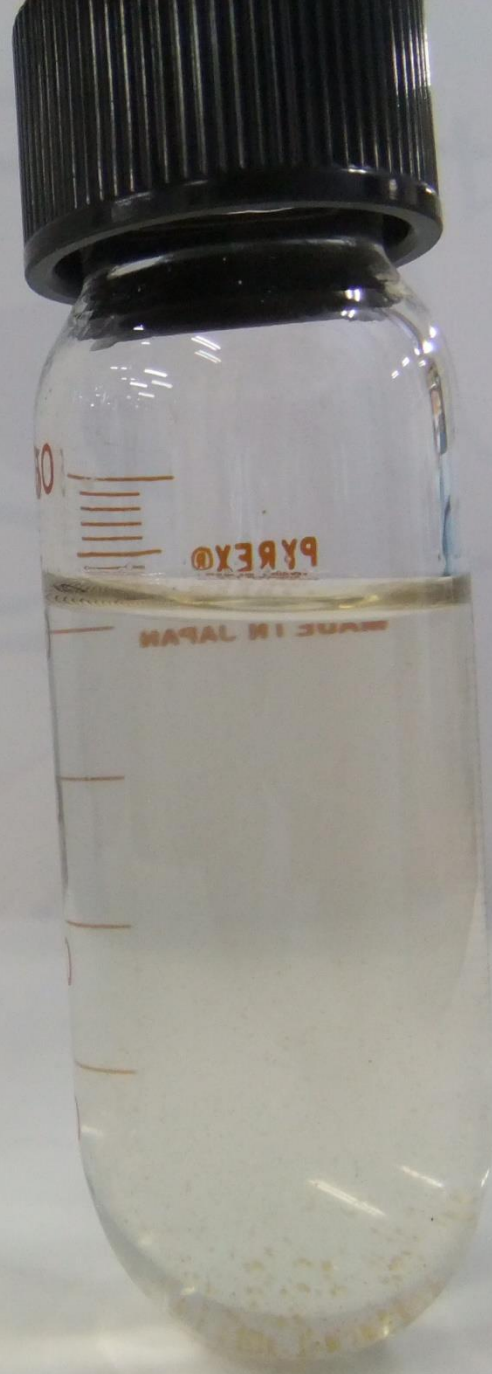
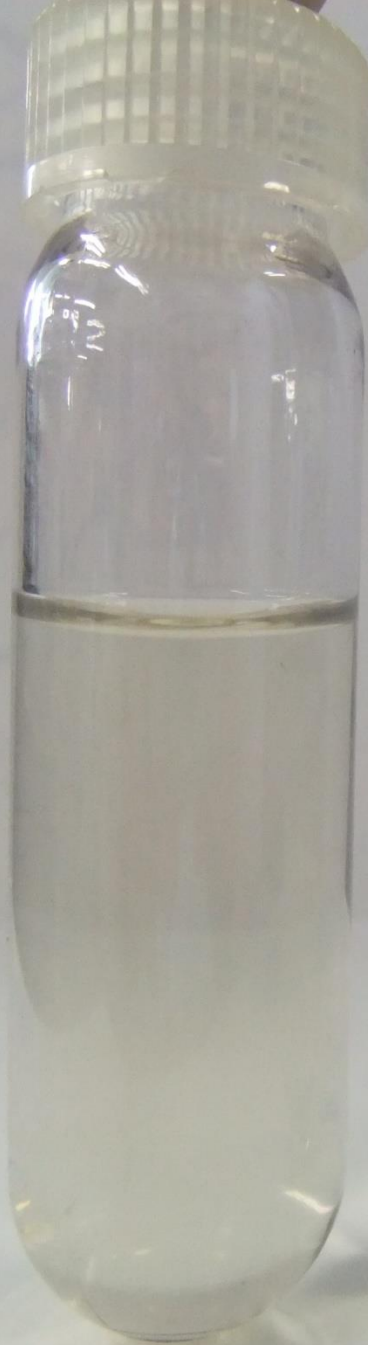






















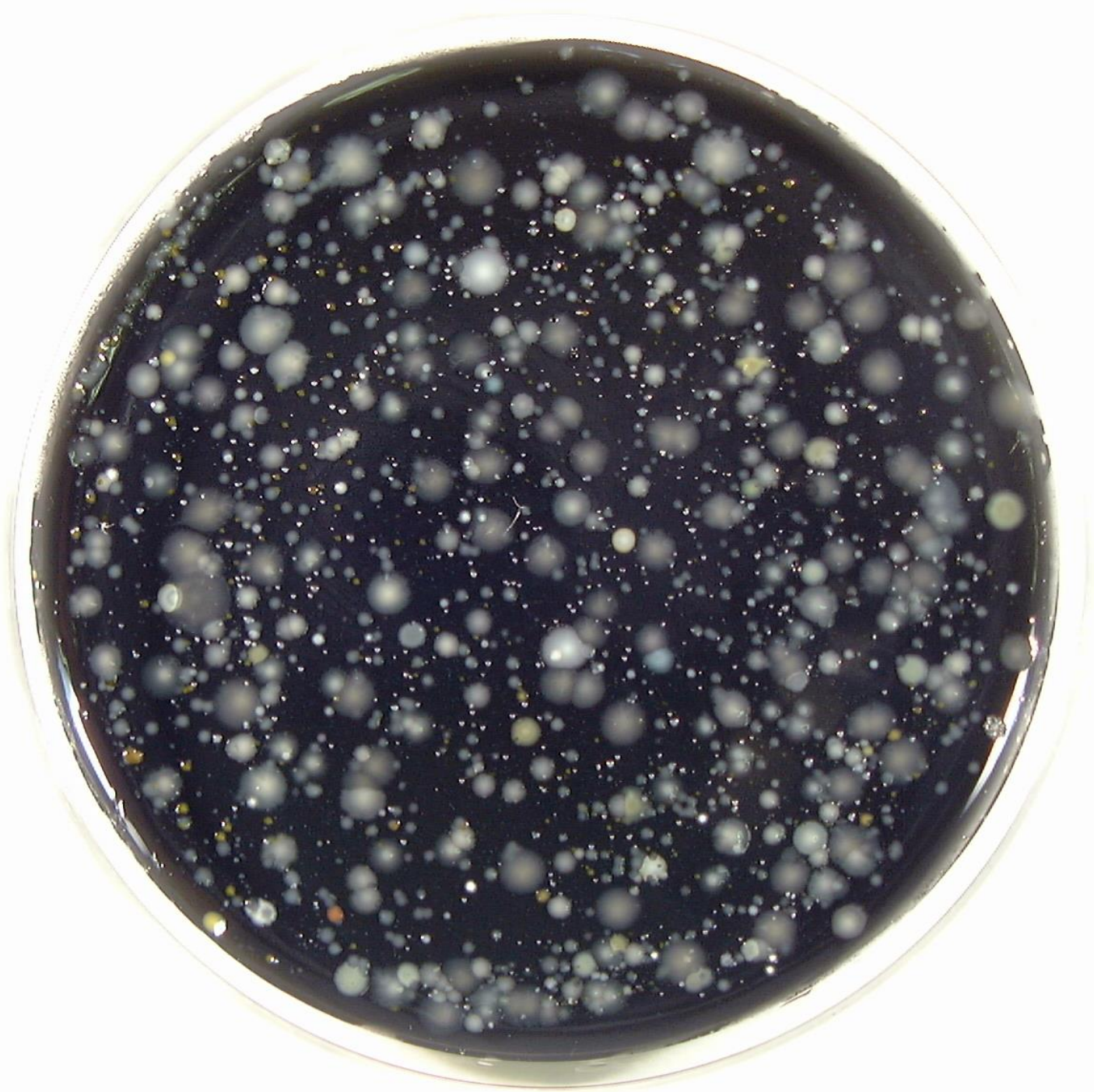
斜光法

- * 分離集落の特徴を利用した
レジオネラ属菌分別法
- * レジ同定検査を強く
サポートする方法

コロニー形態として

大小不同の灰白色湿潤集落
淡い酸臭有り

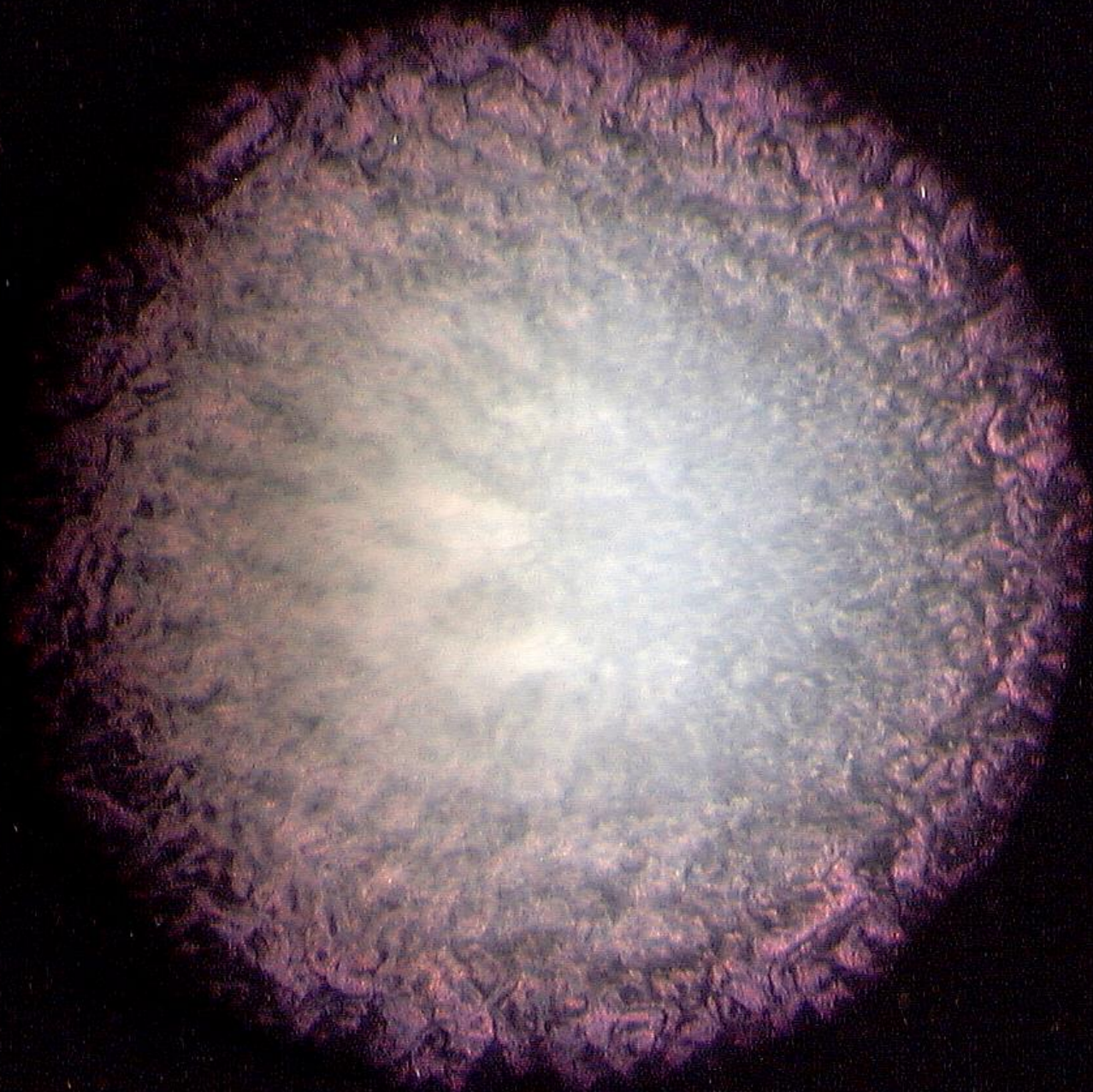




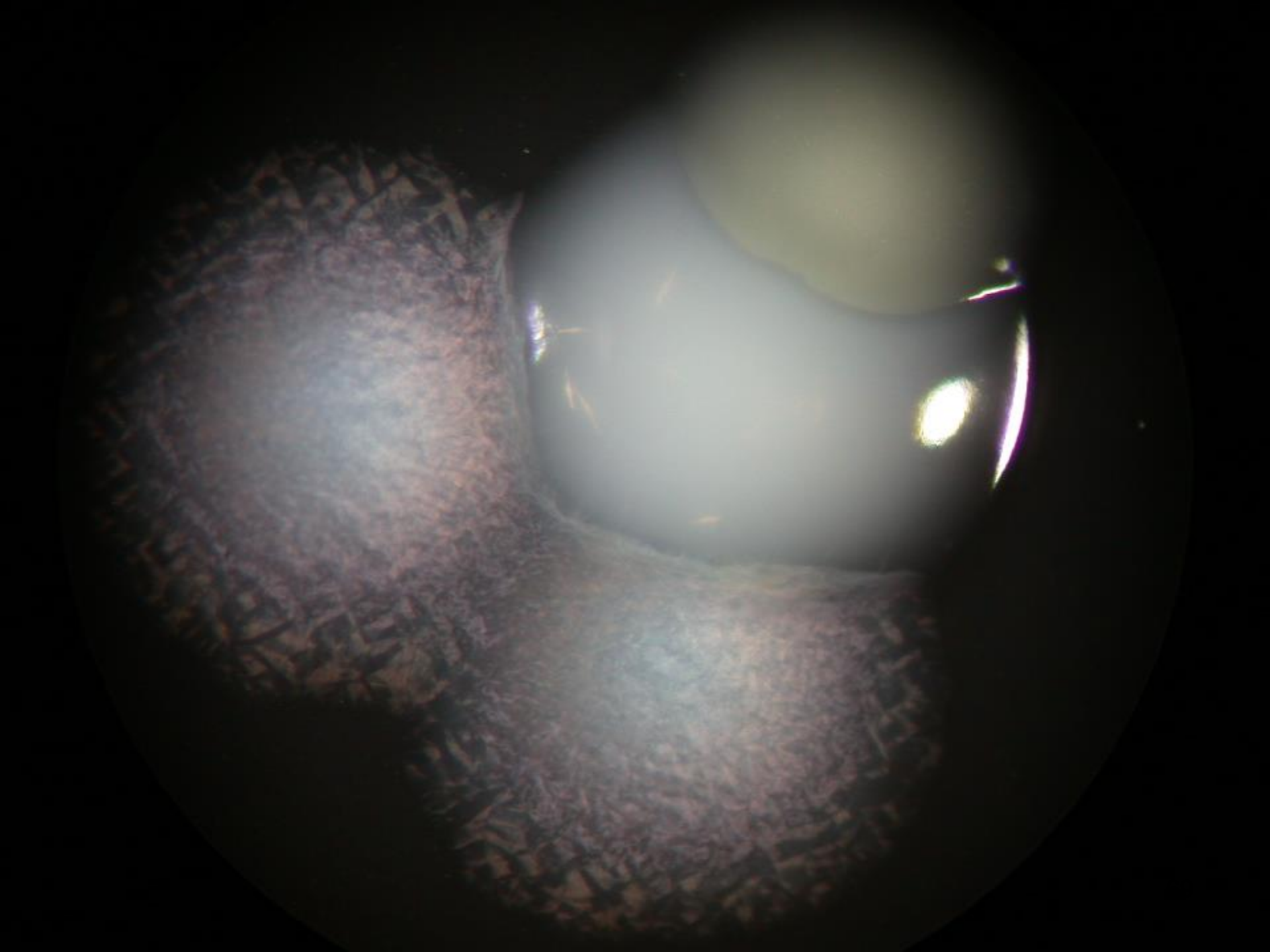
分離培地上に発育した
レジオネラ属菌を見逃さないために
ある方法を提案！

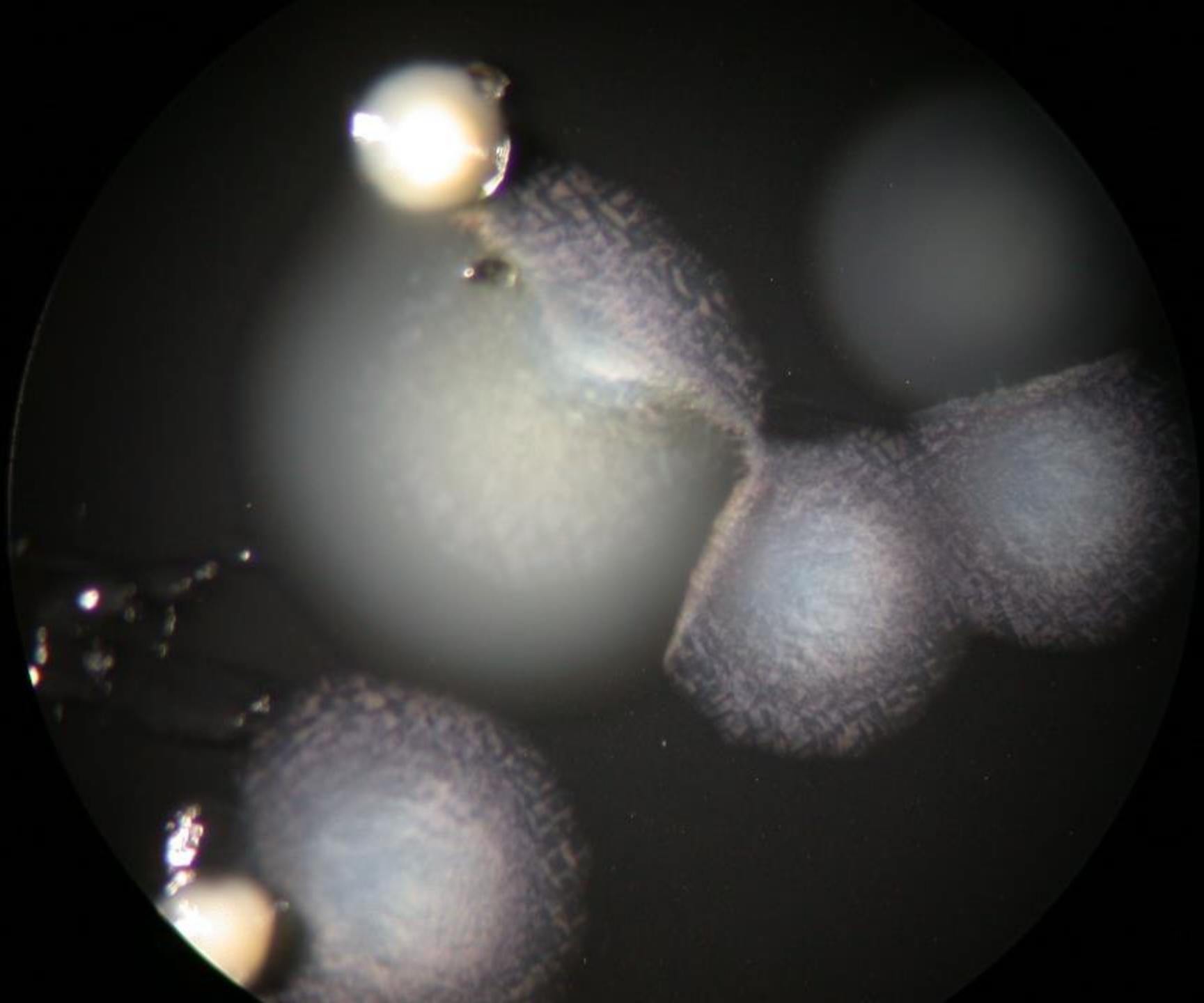


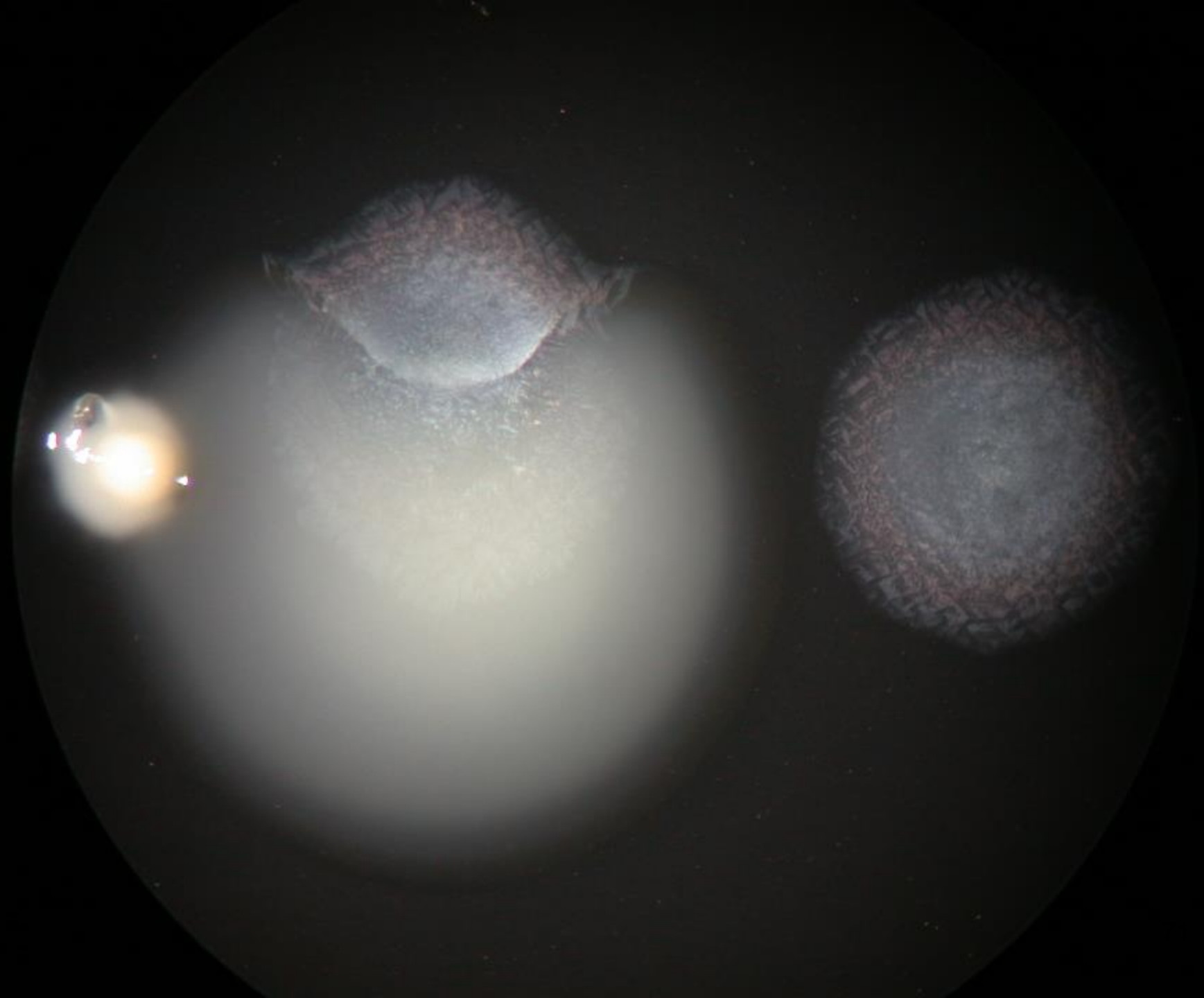












複数種類のレジオネラ属菌が混在していた
培養4日目の温泉水(MWY)

矢印ピンク: *L.p.SG4*, 赤: *L.p.SG1*,

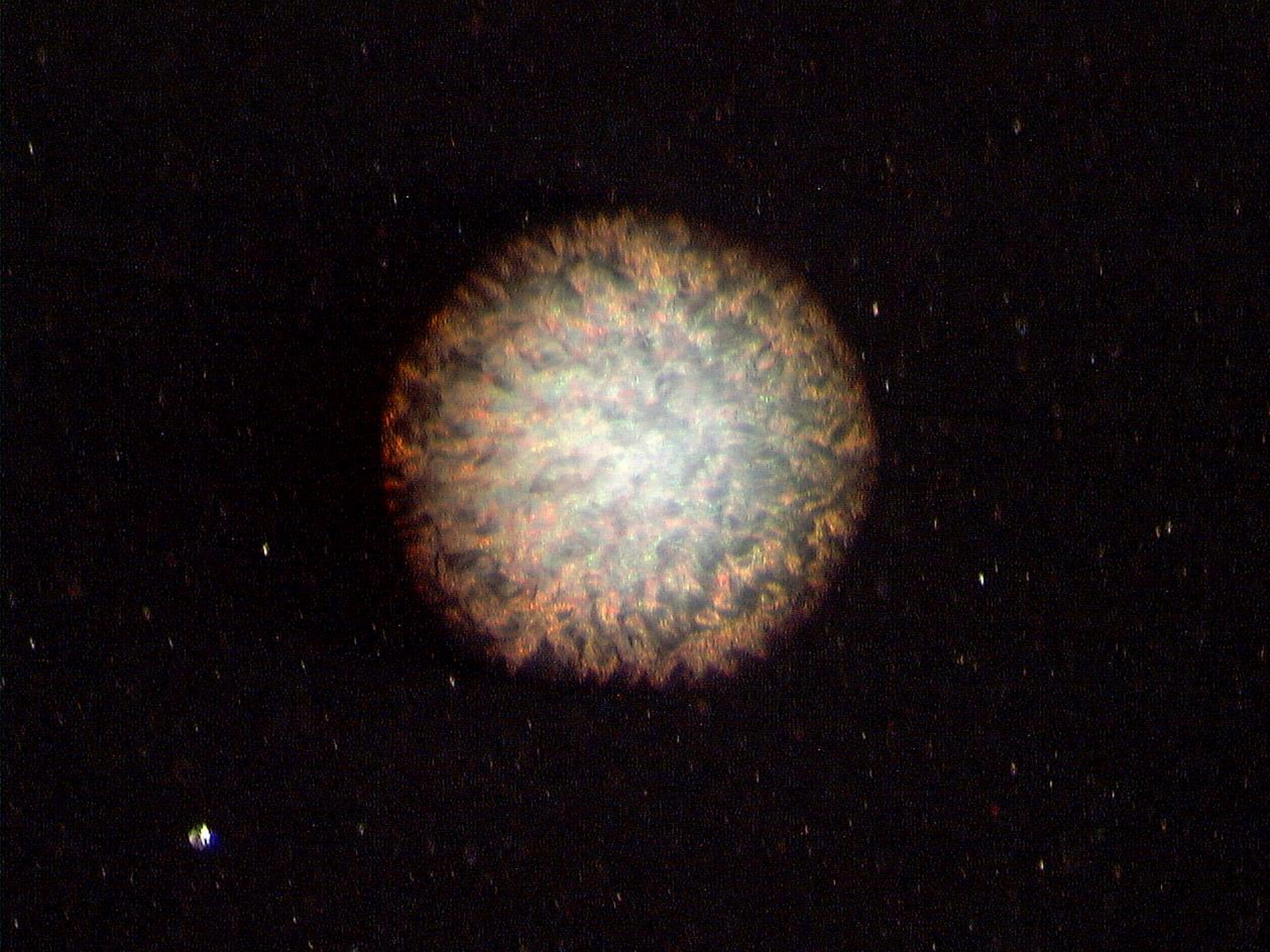
水色: *L.p.SG5*, 白: *L.p.SG*不明,

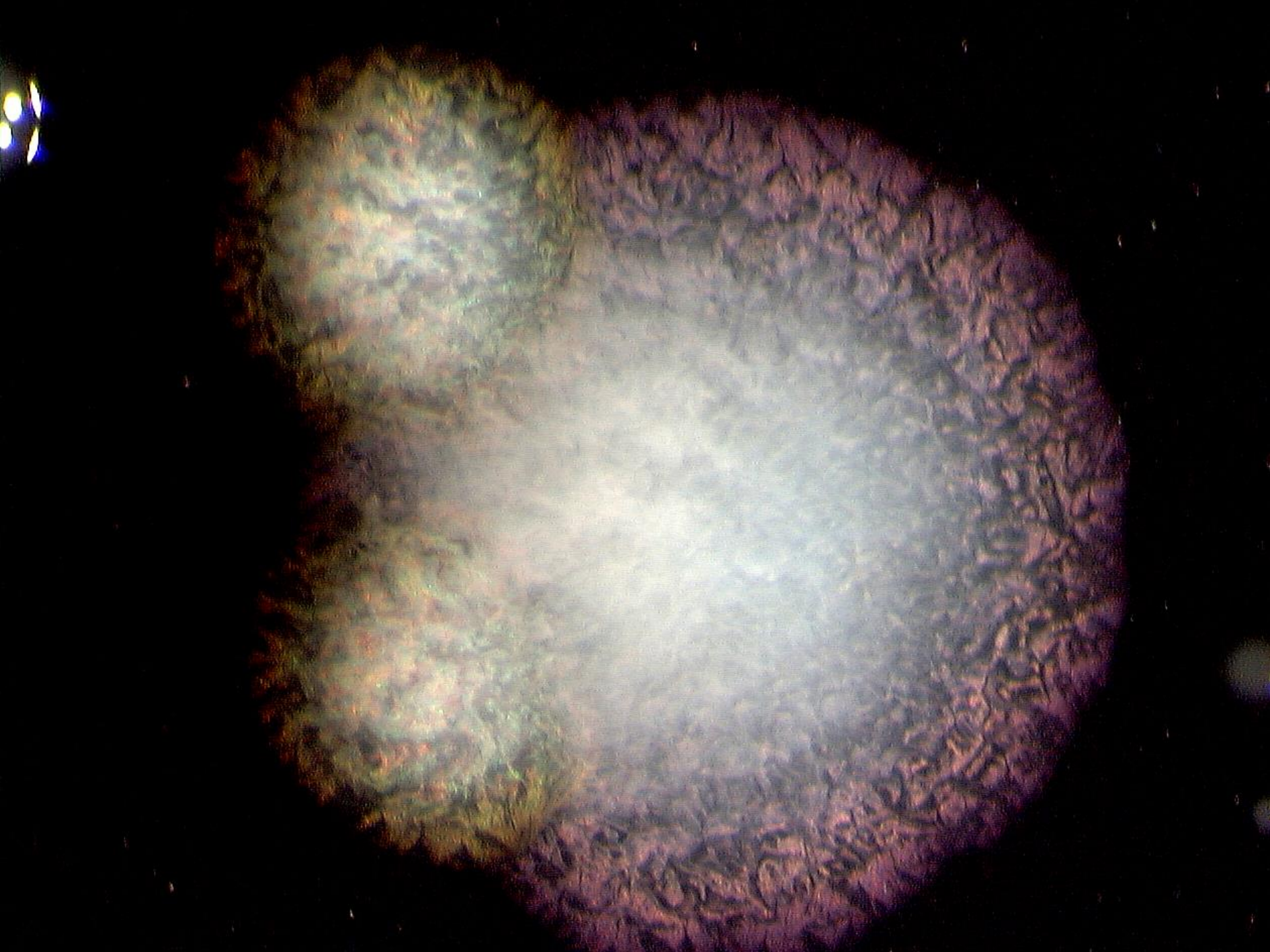
黄緑: *L.rubrilucens*,

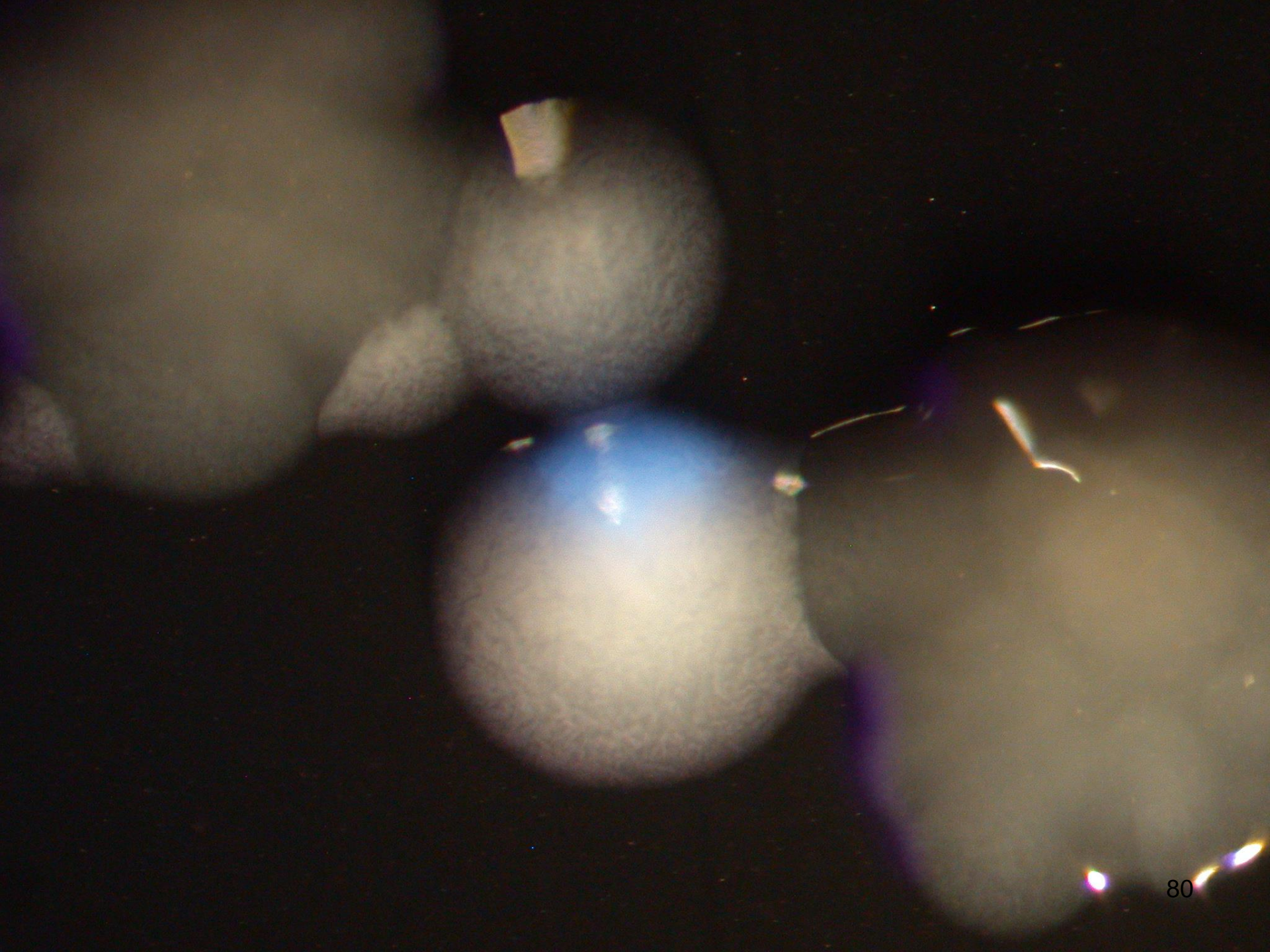
黄色: *L.feeleii*



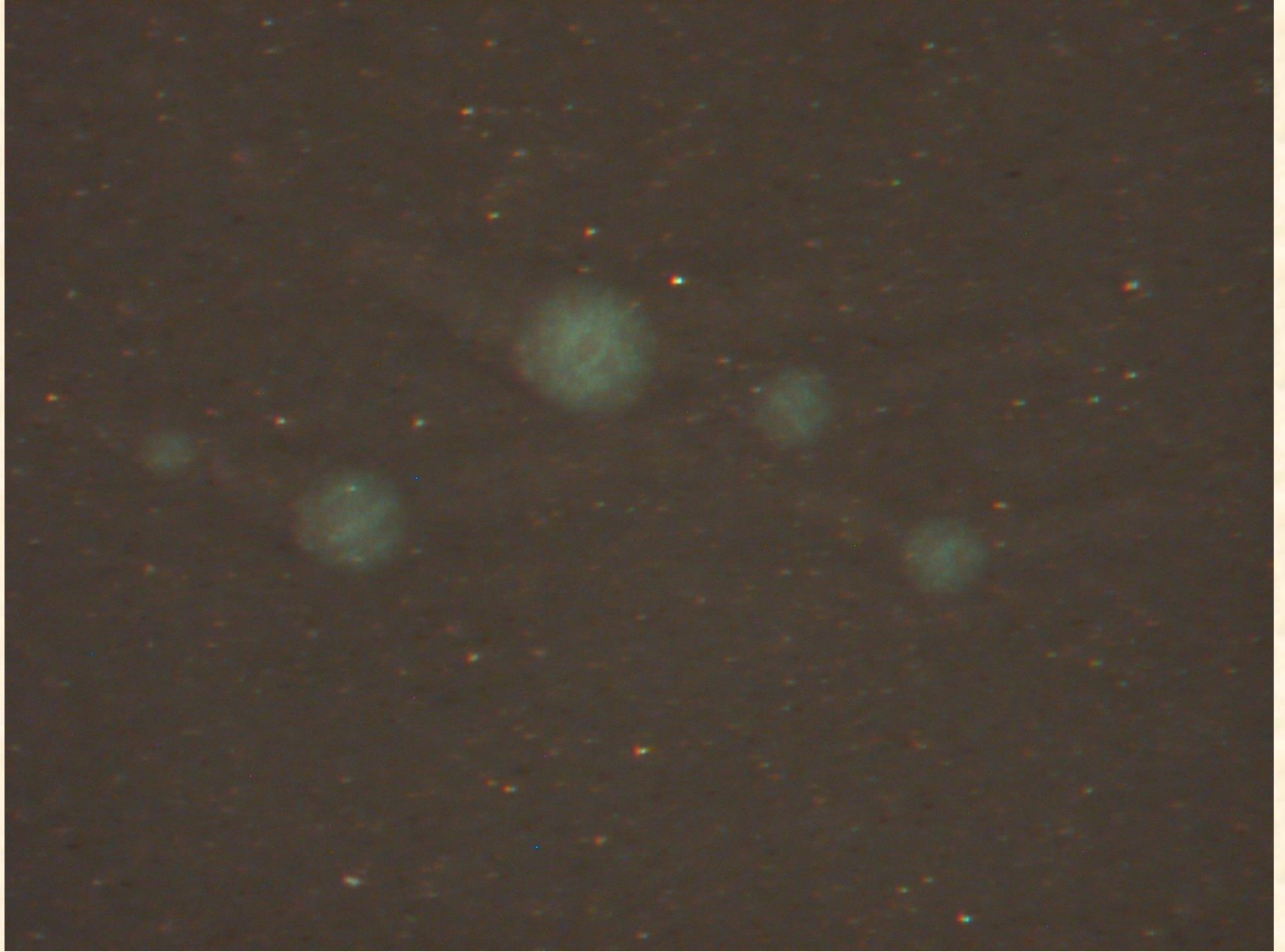




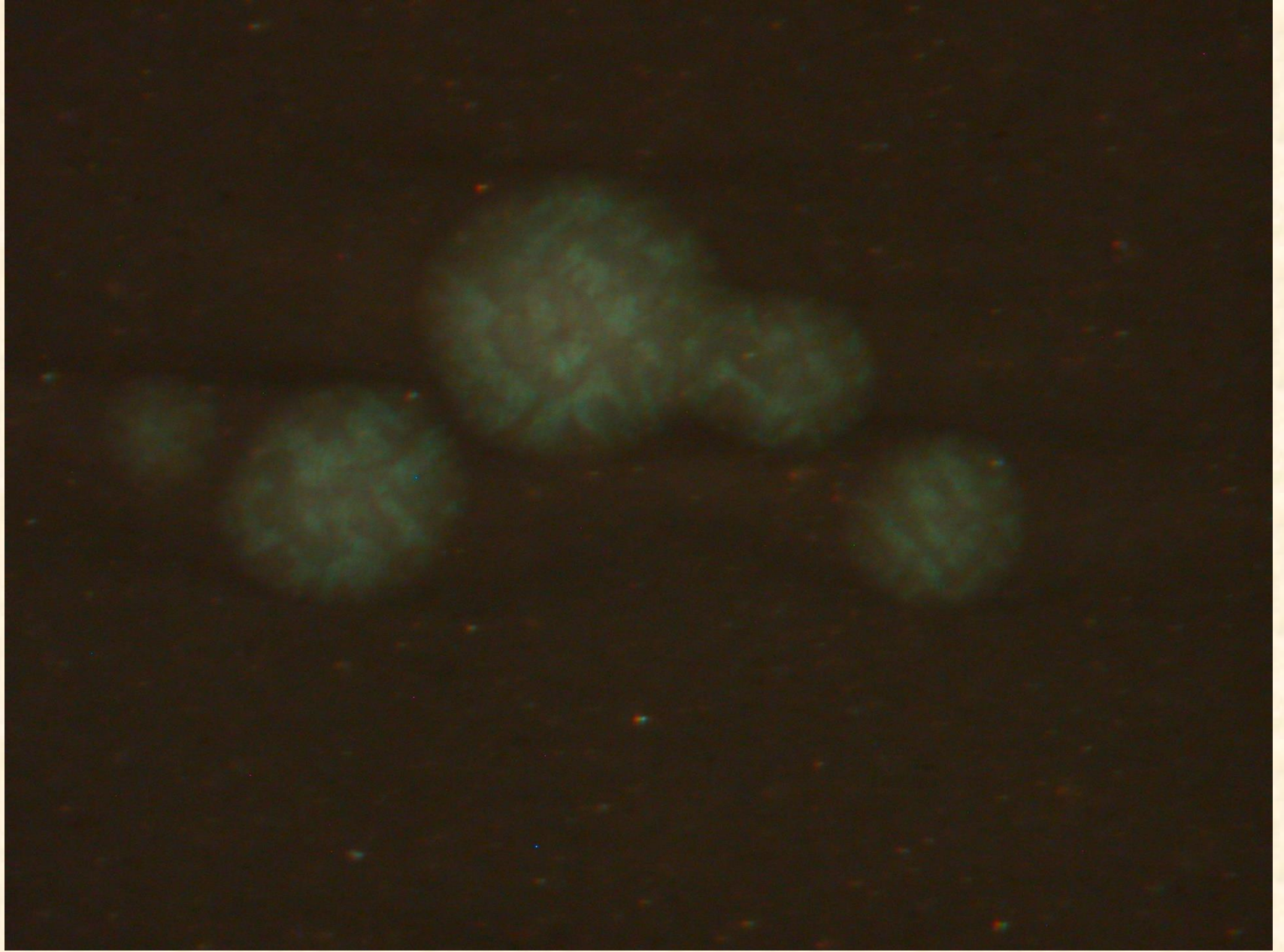




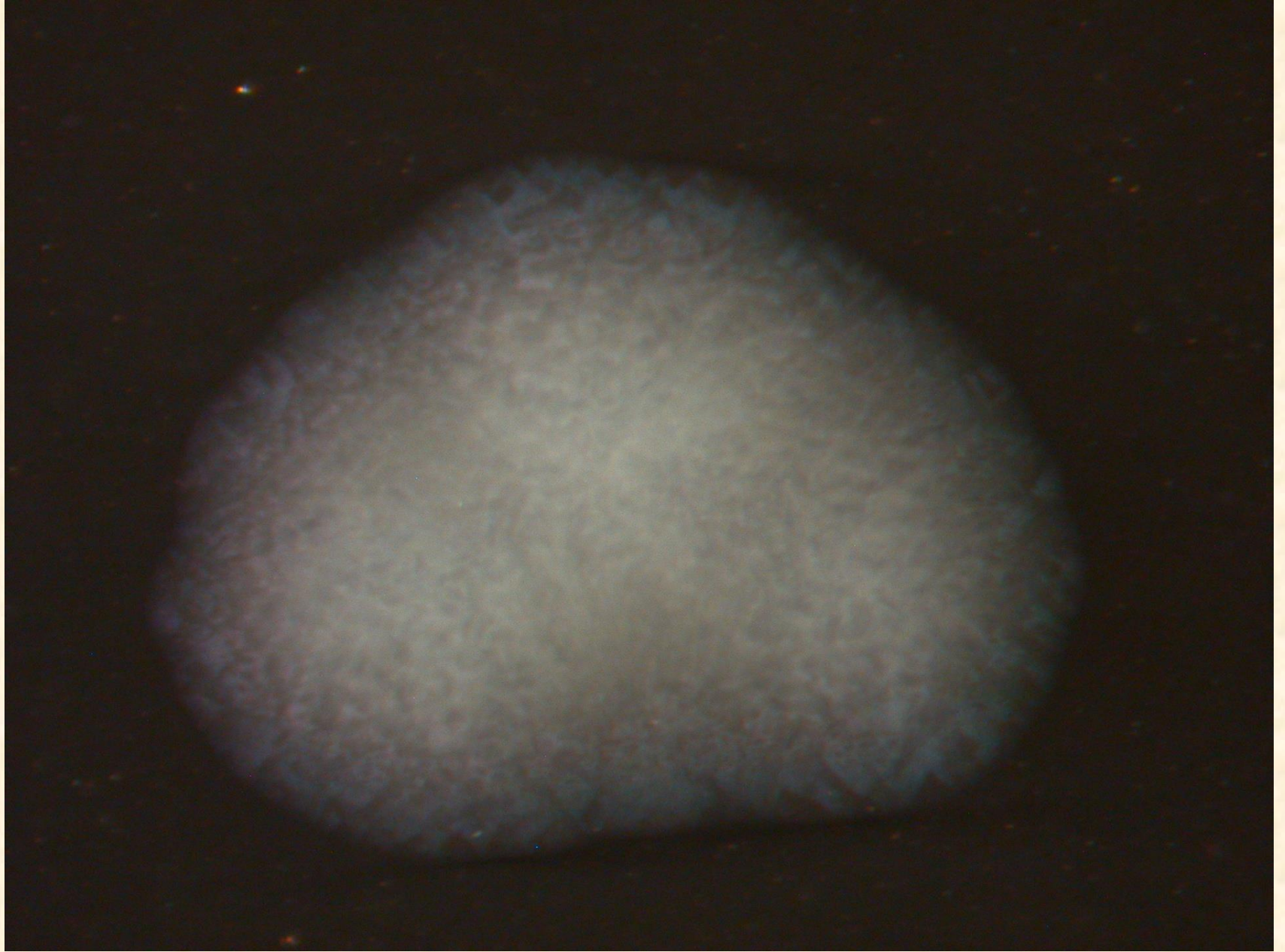
分離培地上に発育した
レジオネラ属菌を見逃さない！



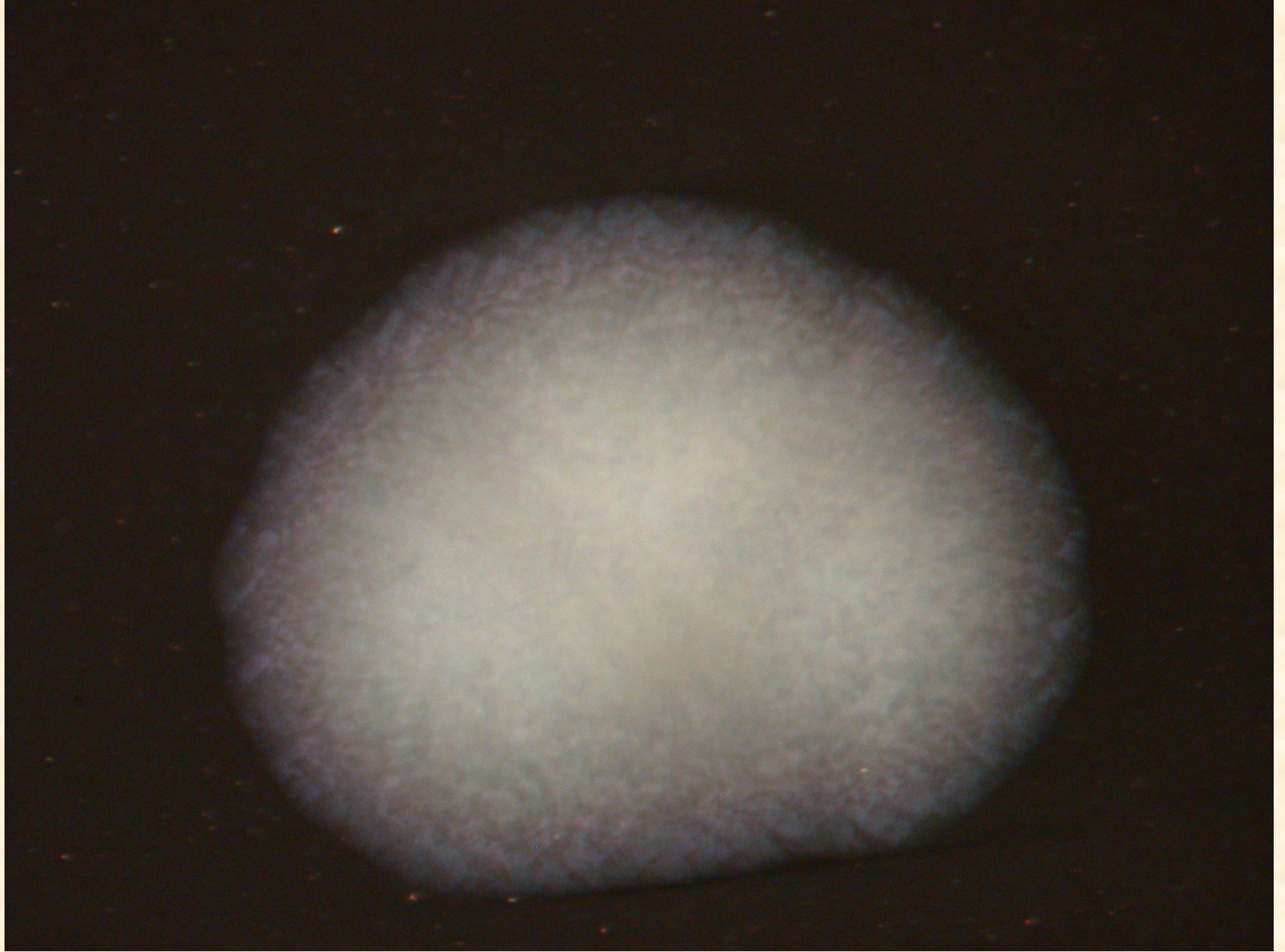
温泉水培養35時間目 *L.p.SG6* 82



温泉水培養42時間目 *L.p.*SG6 ⁸³



温泉水培養55時間目 *L.p.*SG6 84



温泉水培養64時間目 *L.p.*SG6 85

効率の良い集落観察法

- 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

選択分離培地はどれでも同じ？

表24 繁用されているレジオネラ属菌用選択培地の種類と組成

成分	GVP ¹⁴⁸⁾	MWY ¹⁴⁹⁾ (Oxoid)	GVPC ¹⁵⁰⁾ (Merk)	WYO ¹⁵¹⁾ (栄研化学)
基礎培地	BCYE α 1000 ml	BCYE α 1000 ml	BCYE α 1000 ml	BCYE α 1000 ml
Glycine	3g	3g	3g	3g
Vancomycin	5g	1mg	5mg	5mg
Polymyxin B	100,000IU	50,000IU	79,200IU	100,000IU
Cycloheximid	—	—	80mg	—
Anisomycin	—	80mg	—	—
Amphotericin B	—	—	—	80mg
Bromtyhymol blue	—	10mg	—	—
Bromcresol purple	—	10mg	—	—

Bromtyhymol blue	—	10mg	—
Bromcresol purple	—	10mg	—

表25 選択培地上でのレジオネラ属7菌種13株の発育状況〔奥田ら1984より改変〕

培地	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. bozemanii</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. gorm,anii</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. jordanis</i>
	9134 ^{**}	9136	9137	9246	9139	9138	9140	9141	9142	9244	9247	2945	3193
BCYE	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MWY	82	88	84	56	64	79	59	73	<1	28	98	57	6
GVP added with [*]													
Anisomycin	86	84	72	8	68	74	41	62	<1	2	90	47	2
Cycloheximid	74	91	73	13	68	76	41	73	<1	2	92	47	2
Amphotericin B	83	88	76	14	78	72	43	65	<1	2	95	50	2

表中の数字は BCYE 寒天平板上での出現集落数を100としたときの比率(%) * g/1000ml BCYE ** GIFU strain number

出典:新版レジオネラ防止指針(公益財団法人日本建築衛生管理教育センター)

表26 フィルター法と平板法での *L. pneumophila* 6 血清群パイロット株の出現集落数の比較*

レジオネラ症防止指針第3版、4版

- 第4章 レジオネラ属菌検査の原則

同一検体であっても、培養法・分離法の違いにより異なるレジオネラ属菌が分離されてくる可能性があることに注意しなければならない。

レジオネラ症防止指針第3版、4版

- 第5章 レジオネラ属菌の検査法

異なるメーカーの酵母エキスや活性炭末によってレジオネラ属菌集落形成に有意差が認められており、同一組成の市販生培地であってもメーカーによってレジオネラ属菌の発育指示能が異なることに注意する必要がある。

(齋藤ら.2007)

一例

- 本データは、ある浴槽水のみにおける結果であり、各培地の優劣を付けるデータではありません。
- 実際の環境水で、同様のことが起こっている可能性を伝えるためのものです。
- 選択分離培地だけではなく、前処理とのバランスもご確認下さい。
- ここで示す以外のパターンも、もちろん存在しています。

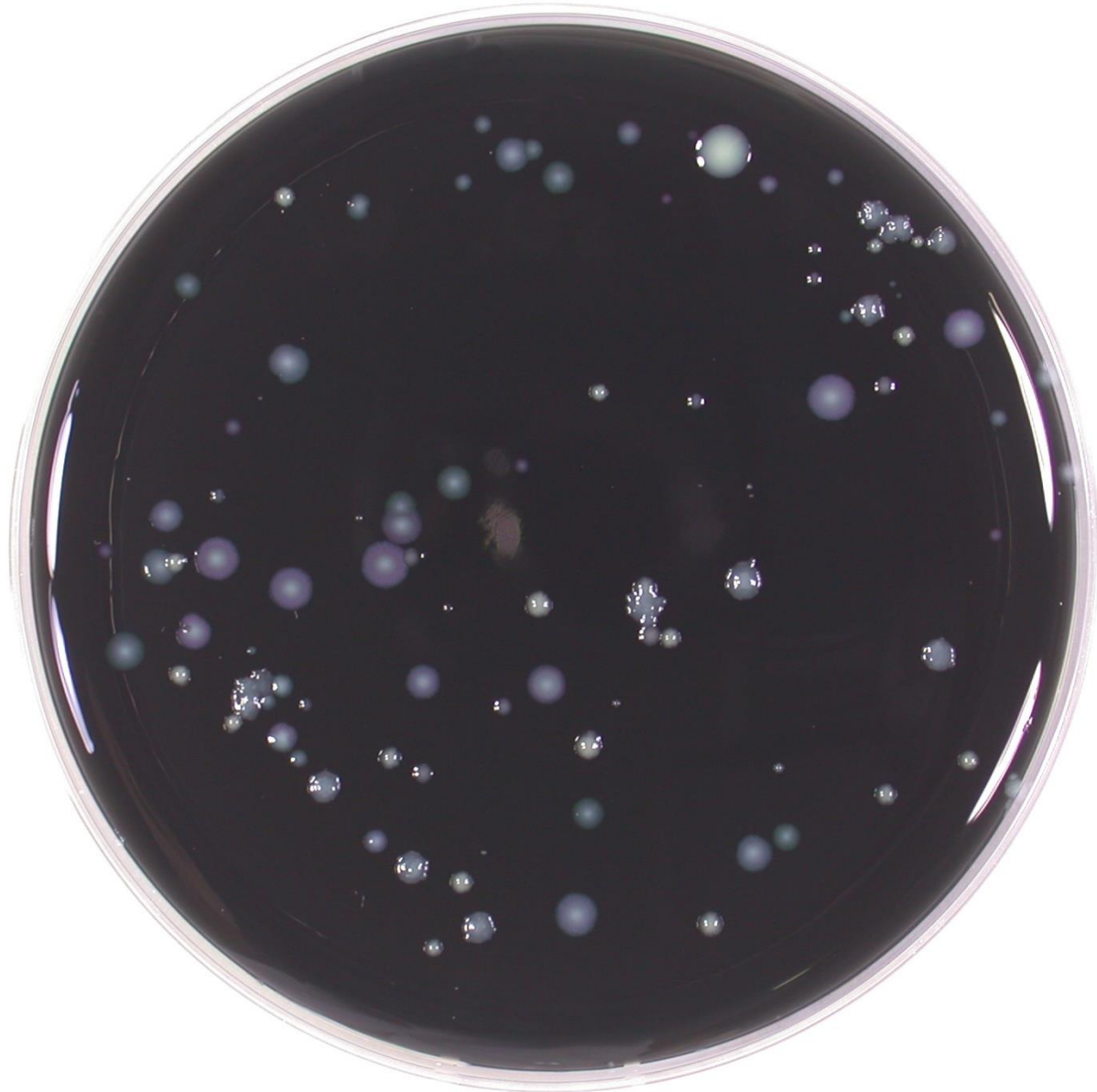
汎用されている市販選択分離生培地の の一つGVPC寒天生培地

- GVPC寒天生培地 : A社
B社
C社
D社
E社

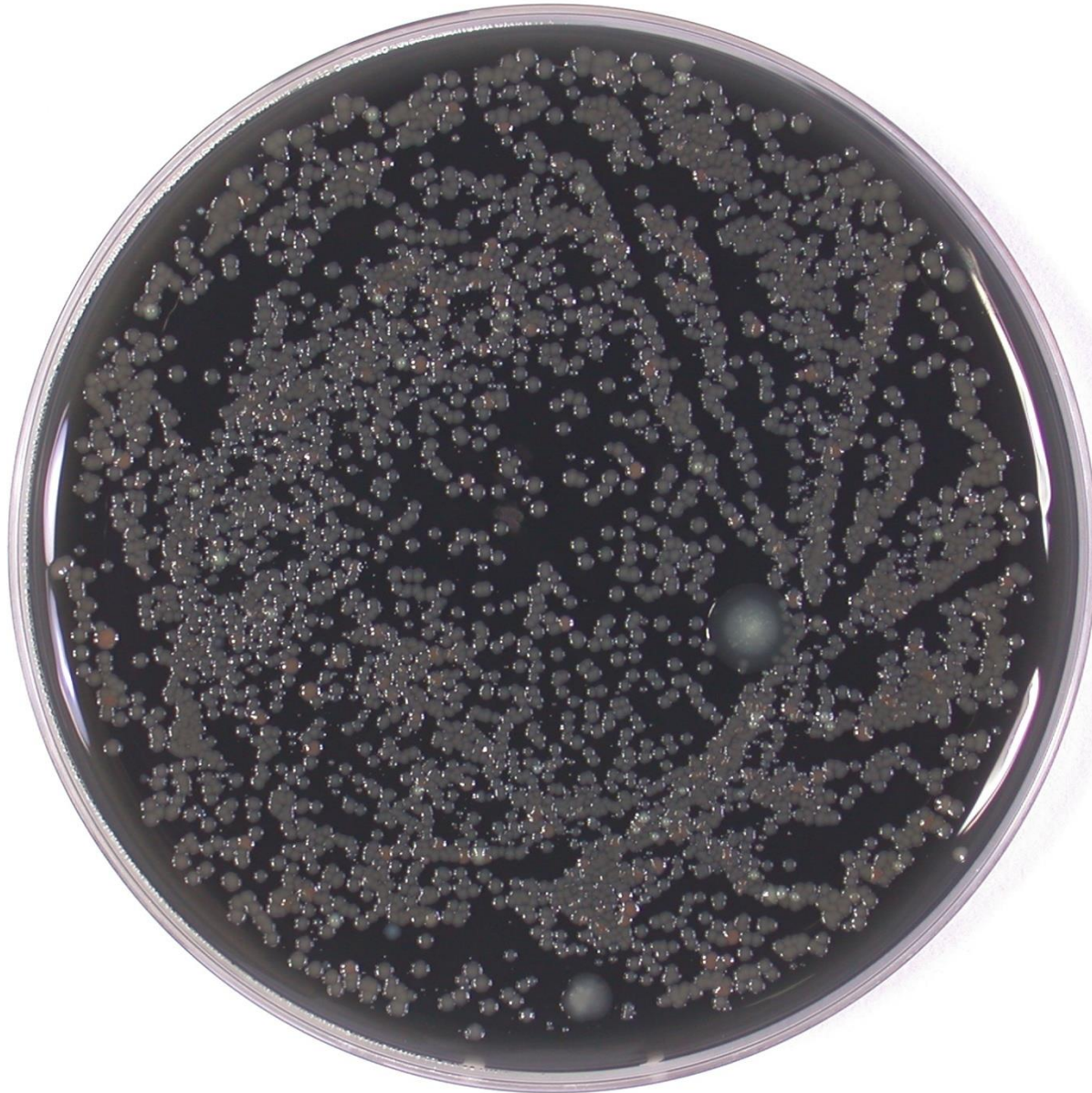
A社-GVPC-培養3日目



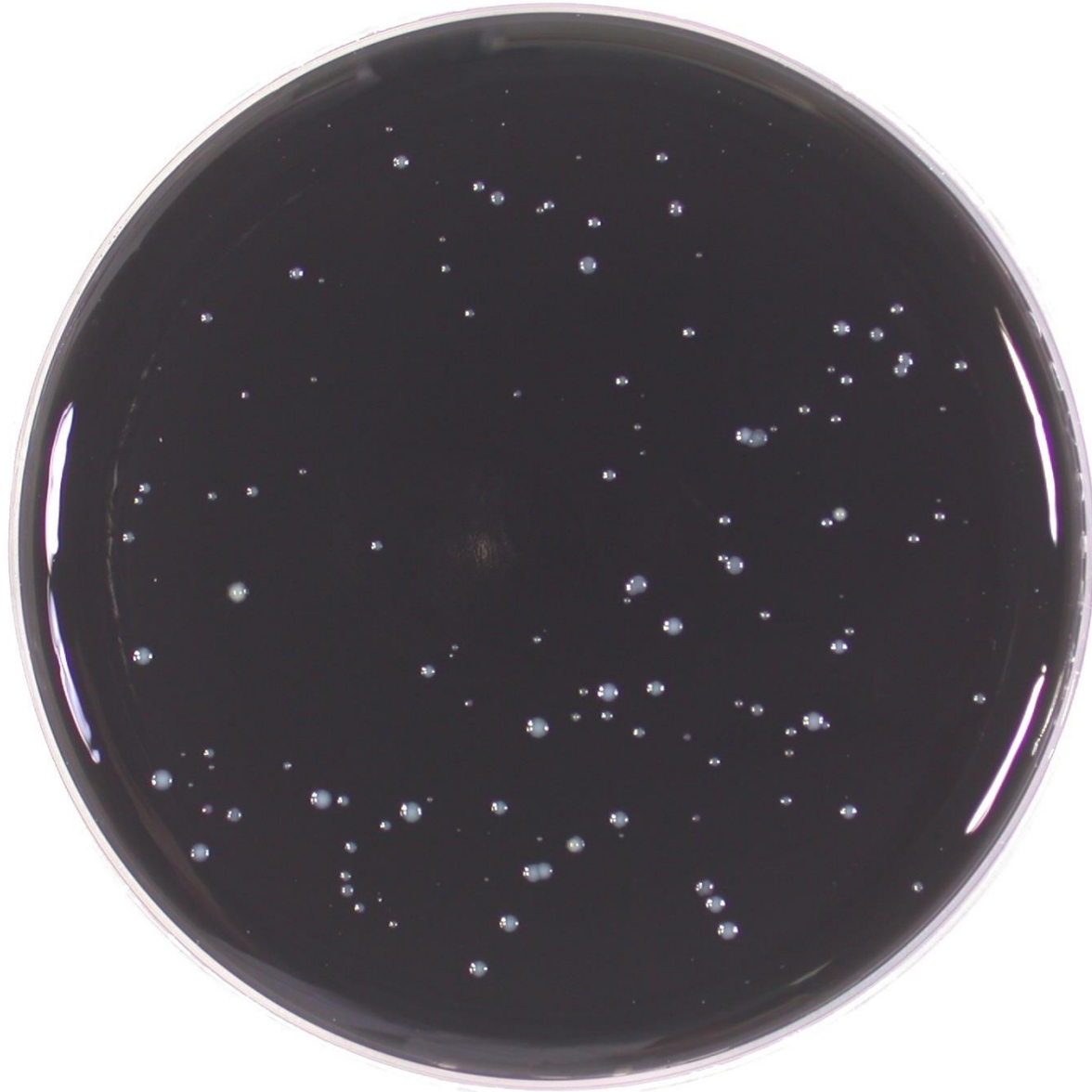
B社-GVPC-培養3日目



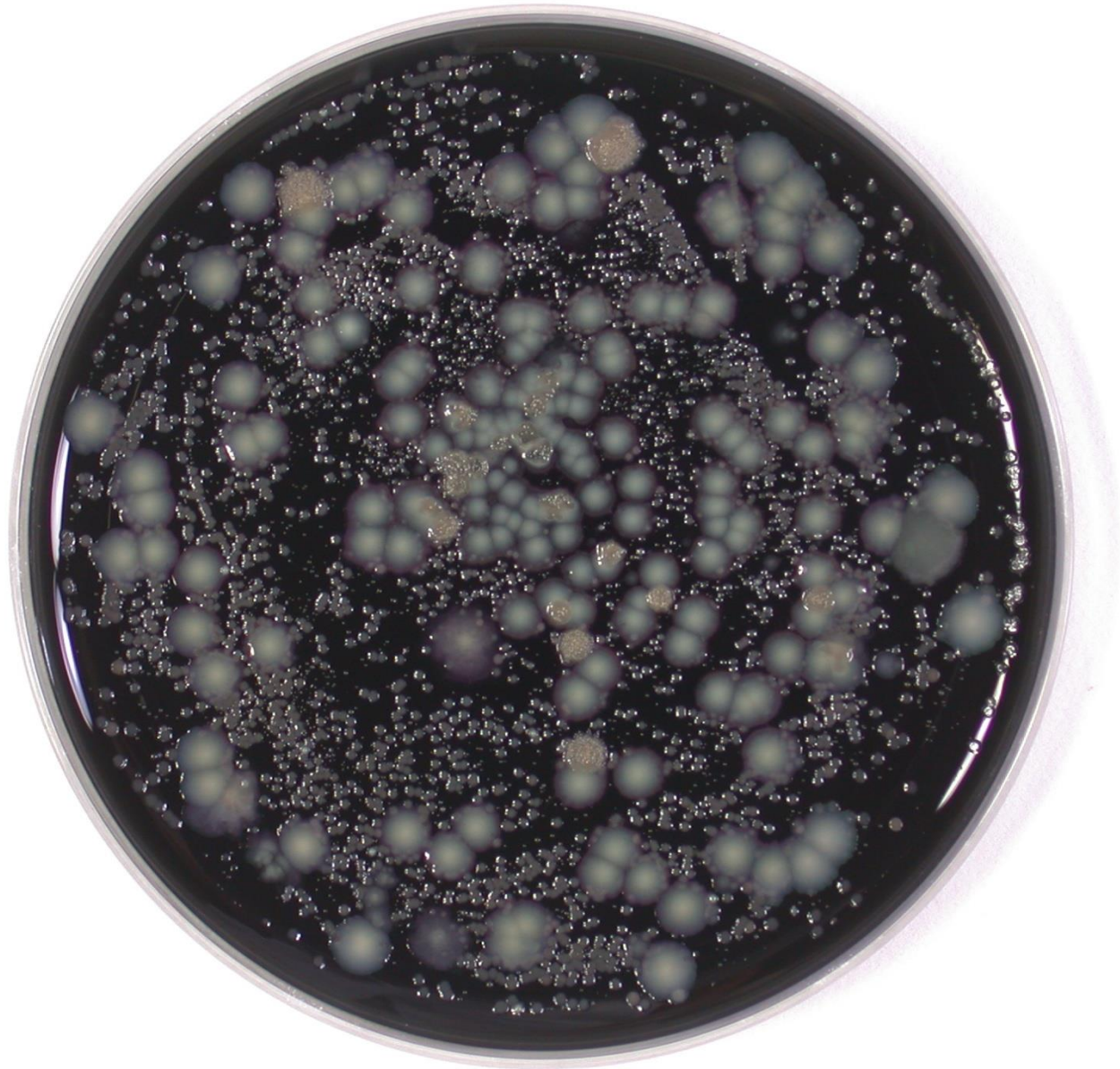
C社-GVPC-培養3日目



D社-GVPC-培養3日目



E社-GVPC-培養3日目

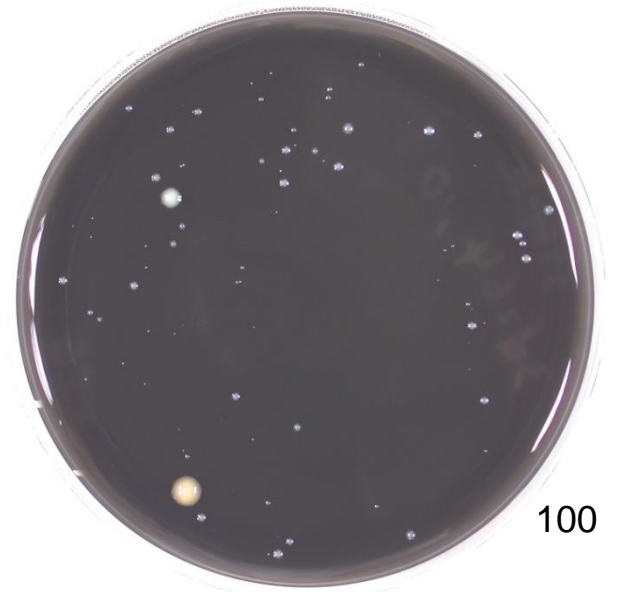


A社-GV

a

-

h

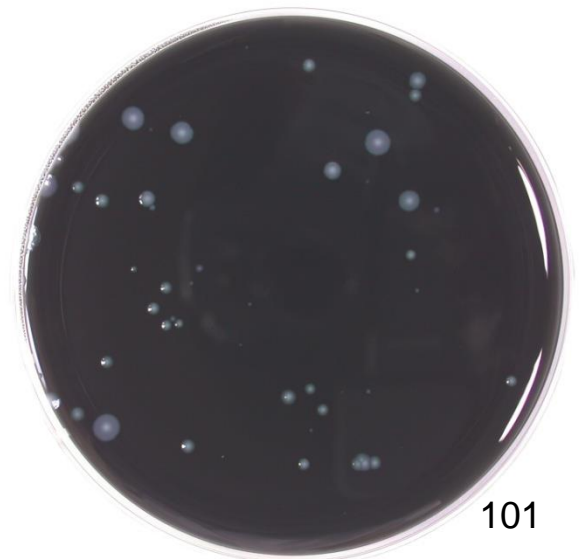
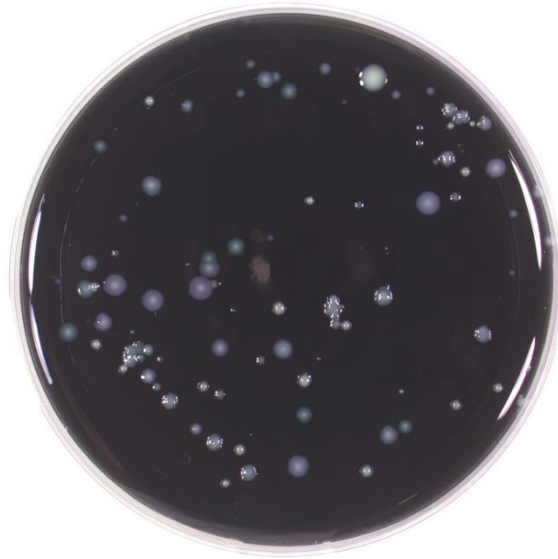


B社-GV

a

-

h

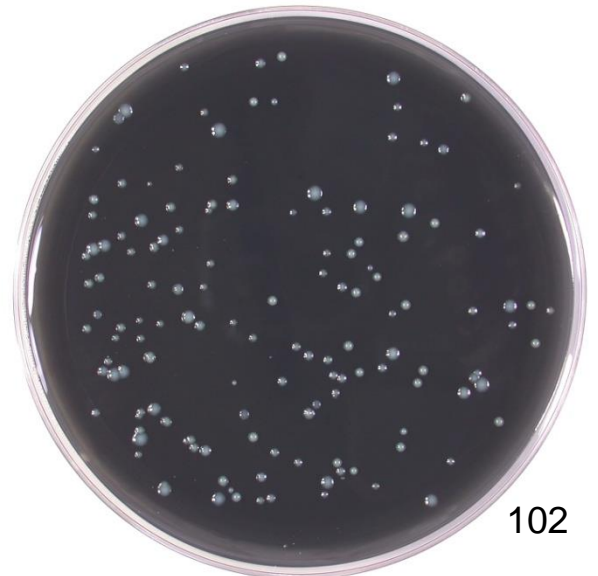


C社-GV

a

-

h

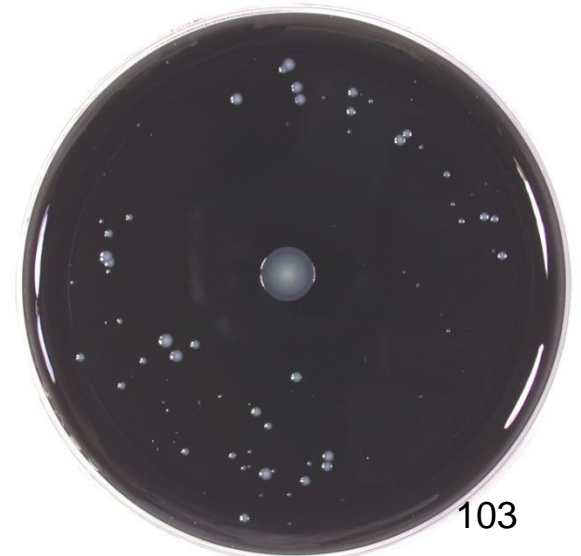


D社-GV

a

-

h

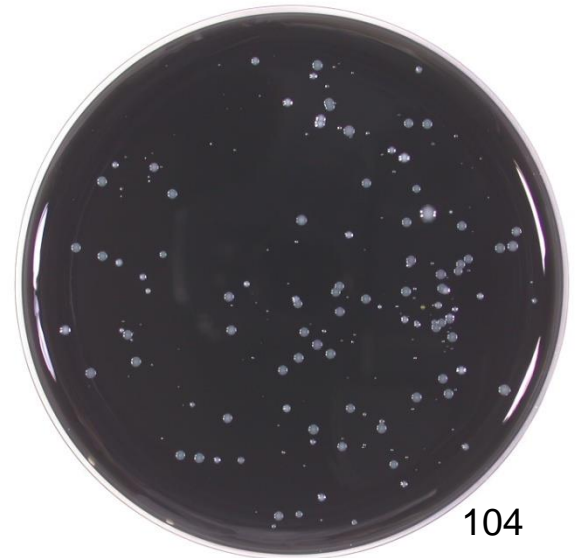
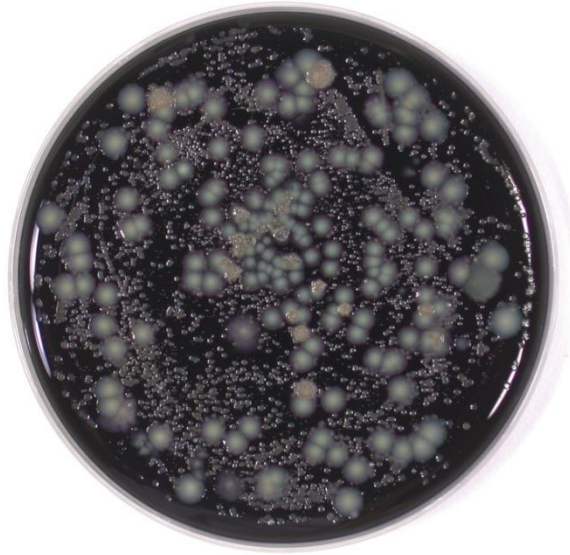


E社-GV

a

-

h



この浴槽水に関しては

GVPC	未処理	酸処理	熱処理
A社	確認できず	確認できず	○
B社	○	○	○
C社	確認できず	確認できず	○
D社	○	○	○
E社	確認できず	確認できず	○

* B社、D社の前処理ごとの菌数比較

未処理 > 熱処理 > 酸処理

* 全社の熱処理での菌数比較

C社 > E社 > A社 ≒ B社 ≒ D社

*** 選択分離培地の違いは、例え同じ名称の培地でも、メーカーによりレジオネラの検出に大きな違いが認められる場合がある。**

さらに

- 検体によって、前処理の違いが検出に大きく影響する場合がありますので注意が必要。
- 分離培地と前処理の組合せにより、本来生菌として存在しているレジオネラが発育しない場合がありますので注意が必要。

つまり普段の検査において

- 使用培地や前処理の違い、組合せにより、検出率、検出数、検出種類に影響している可能性がある。

このような検証結果を含め

- WG推奨法と改訂ISO法（平成29年5月）との調整を行い、令和元年9月発出の通知内推奨法へ繋げていった。
- 研究班としての本提示は、公衆浴場施設が日常の衛生管理を確認するために必要な基本となる検査法。
- レジオネラ症患者発生時の感染源調査での検査においては、これに縛られるものではない。

外部精度管理

検査方法の検討 どの部分に重点を置くか？

- ・ 現状では、検査工程や選択分離培地の幅が大きいほど、検査結果への幅も大きくなる可能性がある。

- ・ 手技に重点を置いた外部精度管理の場合、手技が適切でも施設間での前処理や分離培地の違いが結果に大きな影響を与える可能性がある。

検討の結果

- 最も基本となる手技に重点を置く。
- 前処理や選択分離培地の影響を受けないよう、「未処理、BCYE α 培地」で実施。
- 実施母体を民間に
 - 日水製薬株式会社
- 参加機関の対象を幅広く行政機関・民間検査機関に拡大
- 2015年度から実施

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

- レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み -

ワーキンググループ内で、外部精度管理の検討・実施

2015年度 その他行政/民間に対象拡大

今までの検討結果に基づいて実施

2018年度 継続実施 (第4回)

- 「参加要件 (施設要件, 作業従事者要件, 等)」を満たすこと
- 「2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ 指定法」での検査が可能であること

別紙1. 参加要件

2018年7月吉日
日水製薬株式会社
レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局

下記の1. 使用要件、2. 使用承諾、および3. 注意事項について了承頂けるご施設様に参加をお願いいたします。

1. 使用要件

1) 病原体のバイオセーフティーレベル(以下BSL)規定について
「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では、病原体を病原性の最も高いものを一種病原体として、四種病原体まで規定しています。
また、病原体の規定とは別に、病原体の取扱者に対しての感染被害などの健康影響に基づき、BSLが規定されています。このBSLにも基づき、最も低リスクの病原体を低リスク群をBSL1として、BSL4までのリスク群を規定しています。
本菌種はBSL2に分類されます。BSL2の微生物に対して設備・技術に対する要件を以下に記載いたします。

2) 施設要件

1. 実験室内に、適切に管理された微生物試験を行う管理区域を有すること。管理区域の出入口にはバイオハザードマークを標示すること。
2. 管理区域の出入口及び病原体保管庫は施設が出来る構造であること。保管設備にはバイオハザードマークを標示すること。
3. 消毒用の薬剤が常備されており、壁・床等の消毒が可能であること。
4. 管理区域内もしくは実験施設内に、高圧蒸気滅菌装置、もしくはそれに準ずる滅菌設備を有すること。
5. 本サーベイでは、検査工程上エアロソル発生危険があることから、生物学安全キャビネットが必要です。

3) 作業従事者要件

作業従事者に求められる基本的な要件について以下に記載します。

1. 1年に1回以上、病原体に関するセキュリティ及びセーフティに関して教育を受けていること。
2. 1の要件を満たさない場合には、微生物試験に習熟しており十分な知識・技能を有すること、あるいは微生物試験に習熟した人の指導のもとで試験を行うこと。

2. 精度管理サーベイ試料の使用承諾

1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分ち・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づき過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を遵守する責任を負うことに同意します。

3. 注意事項

予告なく実施スケジュールが変更となることがあります。変更後のスケジュールは、メール等にてご連絡をいたします。

以上

別紙2. 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

(参考) 厚生労働省レジオネラ属菌検査精度管理 / ISO11731:1998 / ISO11731:2017

500mL以上の容器に入れた滅菌生理食塩水50mLに、精度管理サーベイ試料1mLを加入し(菌数)

菌数検体1 1mL分取

40mL

滅菌生理食塩水44mLを加え、良く混和

菌数検体2 100μLを5回分取

濃縮検体用原液 490mL

濃縮検体用原液の菌数確認に使用した検体試料量 405.5mL

冷知遠心濃縮法

どちらか一方を選択して実施

従来の操作方法に従って遠心分離 (試料消費は注意)

試験液全量をメンブランフィルターを通

100倍濃縮する
検体試料は滅菌生理食塩水を使用

4.9mL滅菌生理食塩水にメンブランフィルターを通し100倍濃縮

ポルテックスE2キネター

300μLずつ
レジオネラ菌選択分離増培地
60℃滅菌増培地
5瓶に配布

100μLずつ
レジオネラ菌選択分離増培地
60℃滅菌増培地
5瓶に配布

300μLずつ
レジオネラ菌選択分離増培地
60℃滅菌増培地
5瓶に配布

500μLずつ
レジオネラ菌選択分離増培地
60℃滅菌増培地
5瓶に配布

濃縮液100μLずつ ⑤1、レジオネラ菌選択分離増培地 (GVPC滅菌増培地など) 2瓶以上に濃縮し配布

36±1℃ 7日 暗所無揺動後、レジオネラ菌と検定される菌落数の計測
*本サーベイでは経時養菌を使用しているためここで終了

■ 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、「ISO 11731:1998」の考え方を基本として平成23年度より検討されている「厚生労働省科学研究所研究奨励金 感染症・危機管理対策研究事業」(以下、レジオネラ研究事業)において報告された方法に基づき、また「ISO 11731:2017」を参考に、本精度管理サーベイ用に改良したものです。

■ 本精度管理サーベイ試料は、平成28年度のレジオネラ研究事業において、加熱滅菌方式は菌数によるダメージにより菌数が検出に減少することが報告されています。2017年度サーベイにおいては、濃縮操作法や検体凍結操作などの手段の精度確認に引き続きこのこと、自家検査において濃縮加熱処理も(1)菌数増進を抑制している菌種におかれましても、上記指定法に従って行った検査での結果の報告をお願いします。

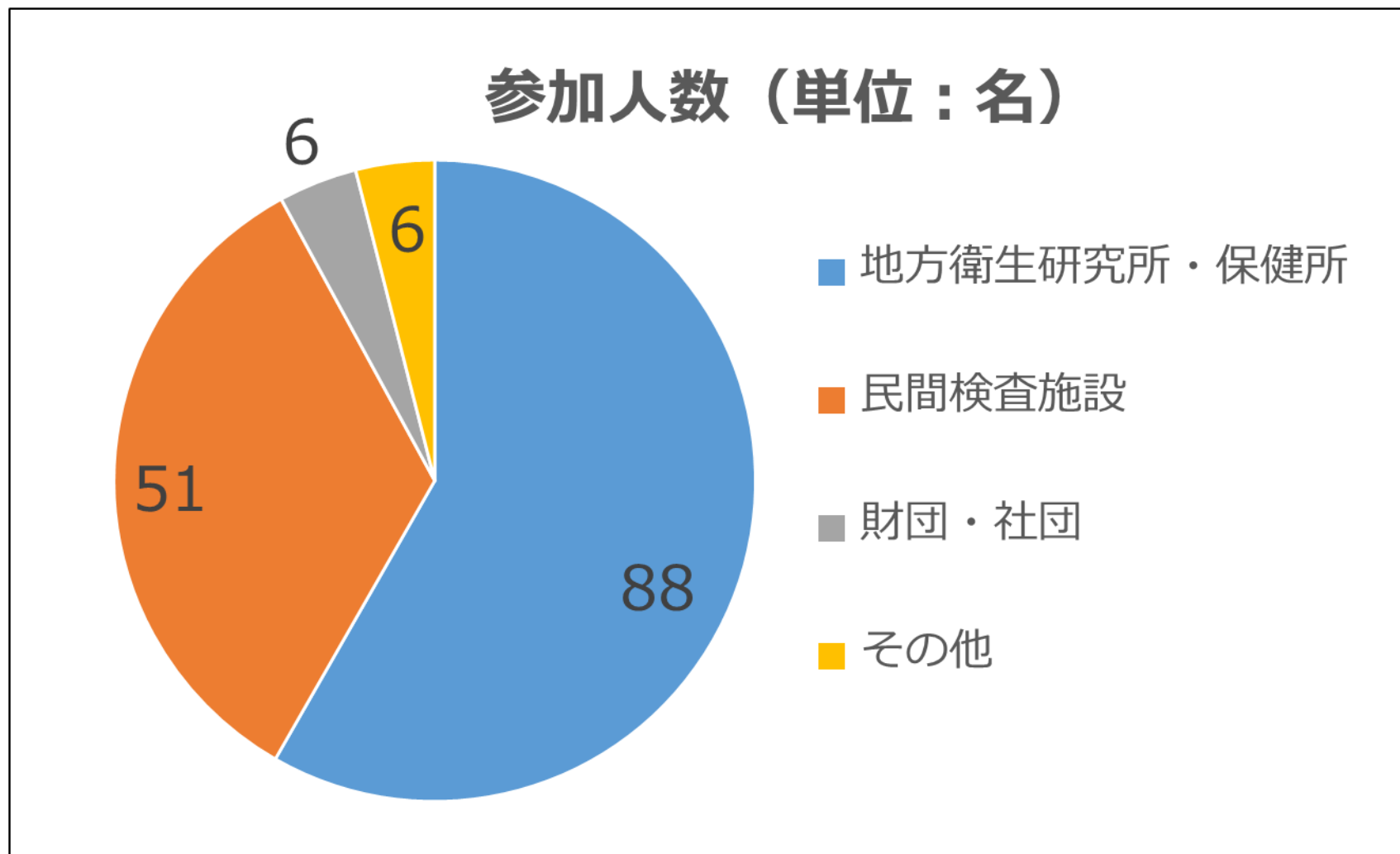
■ 指定法に記載されていない単位、使用器材(例:冷知遠心濃縮装置、メンブランフィルター材質、増培地メーカー)、レジオネラ菌選択分離増培地の種類、などは、各施設の操作方法で行ってください。

■ 各国におけるレジオネラ菌菌数は、レジオネラ菌選択分離増培地GVPC滅菌増培地から得られた菌落数から算出し、報告してください。

⑤1、従来の試験にレジオネラ菌選択分離増培地を使用している施設においては、参考値として、菌種別における菌落数も計測してください。なお、レジオネラ研究事業において、レジオネラ菌選択分離増培地における菌落数は、経時中の選択期による影響等により、レジオネラ菌選択分離増培地における菌落数に比べ減少することが報告されています。

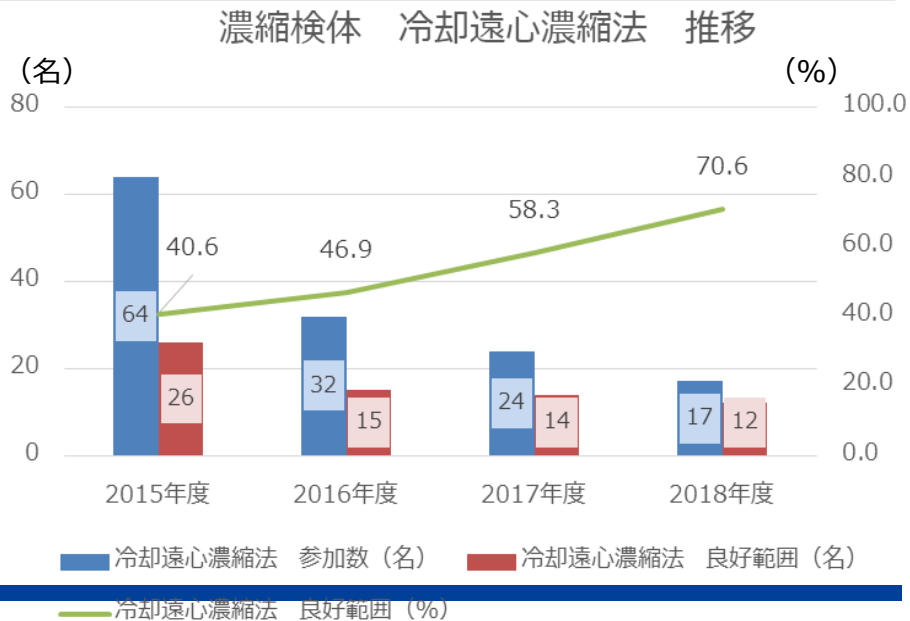
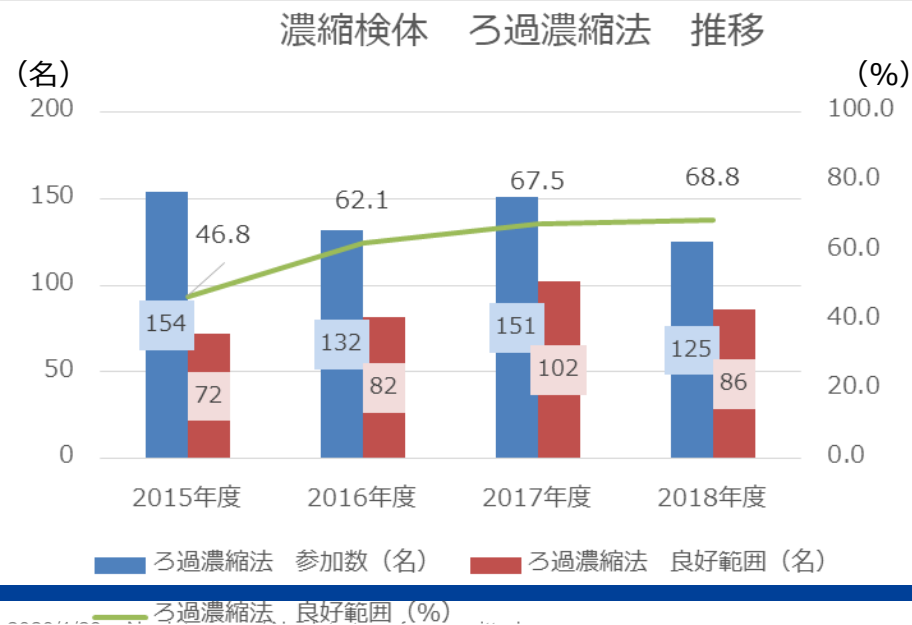
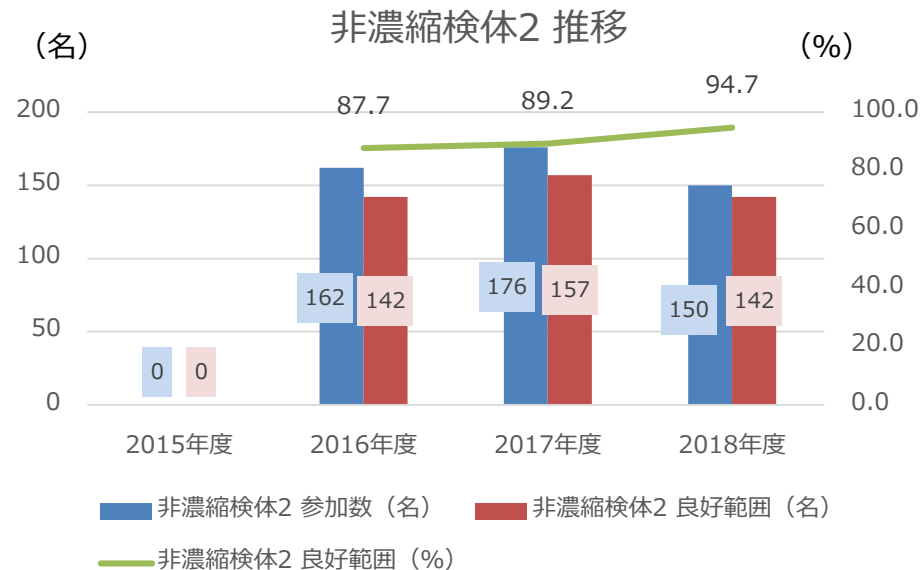
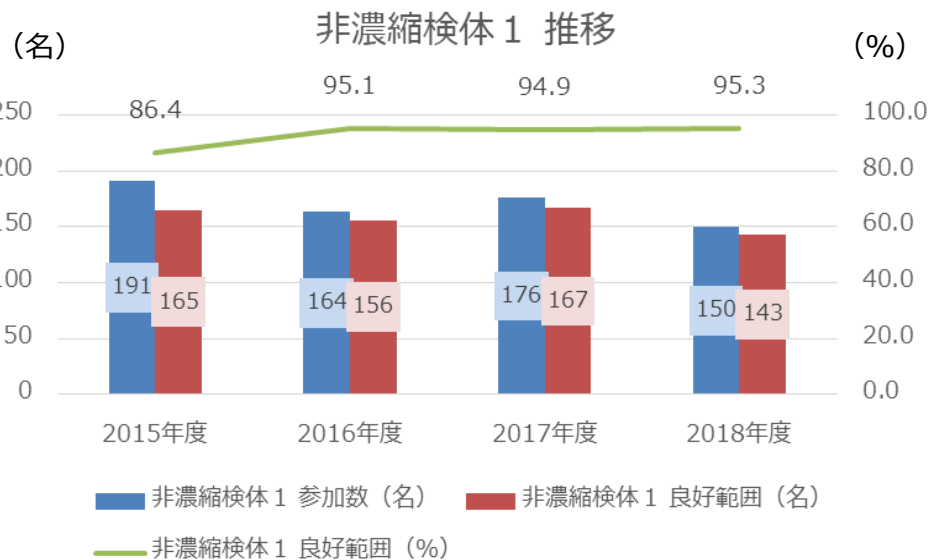
ご案内時に配布 (左) 別紙1. 参加要件 (右) 別紙2. 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

■参加人数 148施設, 151名



参加施設 良好範囲者数の推移

日水製薬(株)2018年度
レジオネラ属菌検査セミナーより



外部精度管理で検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことが可能と考える。

適切な検査精度保持のために

ぜひ外部精度管理への参加を
ご検討下さい！

研修会

- 標準的な検査法の提示後、それに基づいた研修会を開催する。
- 研修実施母体機関の設置と講師の養成が必要。
- 行政・民間検査機関すべてに対する実技を伴った研修システムが必要。

→ 現在検討中！

これまで(行政機関)

主催：国立保健医療科学院

短期研修 新興再興感染症技術研修

場所：国立感染症研究所村山庁舎

講師：研究班メンバー

検査法：WG推奨法

開催年：2014、16年、18年 今後は未定

研修期間：5日(実質研修は4日)

参加施設：24施設24名(各年)