

レジオネラ属菌の培養検査法と精度管理 -民間検査機関への導入に向けて-

平成24年2月17日(金)
大分県衛生環境研究センター 緒方喜久代



多種多様な泉質(例示)

浜脇温泉 所 在 : 別府市浜脇 泉 質 : 塩化物泉、単純温泉 交 通 : JR東別府駅下車 宿泊施設 : 約20軒 特 徴 : 別府温泉発祥の地といわれる温泉地	湯平温泉 所 在 : 湯布院湯平町 泉 質 : 塩化物泉 交 通 : JR湯平駅から、バスで約10分 宿泊施設 : 34軒 特 徴 : 石畳の坂道が続くひなびた湯治場
別府温泉 所 在 : 別府市内中心部 泉 質 : 炭酸水素塩泉等多数 交 通 : JR別府駅下車 宿泊施設 : 多数 特 徴 : 現在の別府市の中心部。公衆浴場多数	赤川温泉 所 在 : 久住町赤川 泉 質 : 硫黄泉 交 通 : JR豊後高田駅から、バスで約50分 宿泊施設 : 2軒 特 徴 : 慢性皮膚病、糖尿病等に利く山あいの温泉地
観海寺温泉 所 在 : 別府市観海寺 泉 質 : 塩化物泉、単純温泉 交 通 : JR別府駅から、バスで約15分 宿泊施設 : 数軒 特 徴 : 高台に位置し、景観がすばらしい温泉地	長湯温泉 所 在 : 直入町長湯 泉 質 : 炭酸水素塩泉 交 通 : JR豊後竹田駅から、バスで約40分 宿泊施設 : 21軒 特 徴 : 炭酸泉で有名な温泉地として有名

3

公衆浴場における衛生等管理要領等について

循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルについて
(健衛発第95号 平成13年9月11日)

レジオネラ症患者の発生時等の対応について
(健感発第0903001号 健衛発第0903001号 平成14年9月3日)

公衆浴場法第3条第2項並びに旅館業法第4条第2項及び同法施行令第1条に基づく条例等にレジオネラ症発生防止対策を追加する際の指針について
(健発第1029004号 平成14年10月29日)

公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について
(健発第0214004号 平成15年2月14日)
 •別添1 公衆浴場における水質基準等に関する指針
 •別添2 公衆浴場における衛生等管理要領
 •別添3 旅館業における衛生等管理要領

レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針
(平成15年7月25日)

平成12年12月15日生衛発第1811号厚生省生活衛生局長通知

公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について

公衆浴場及び旅館業におけるレジオネラ症発生の防止対策等、一層の衛生水準の維持、確保を図るため、「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」及び「旅館業における衛生等管理要領」を下記のとおり改正しましたのでお知らせします。

なお、これらは都道府県等における営業者に対する衛生管理の指導に当たっての指針として活用されるものです。

おって、本改正は、「改訂・レジオネラ属菌防除指針—温泉利用入浴施設用—」(平成11年3月、(財)全国環境衛生営業指導センター及び全国旅館環境衛生同業組合連合会発行)及び「新版レジオネラ症防止指針」(平成11年11月、(財)ビル管理教育センター発行)を踏まえ、環境衛生関係営業衛生問題検討会(委員氏名は別紙のとおり)の検討結果に基づき行つたものです。

5

平成15年2月14日健発第0214004号厚生労働省健康局長通知

健発第0214004号
平成15年2月14日
厚生労働省健康局長

公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について

公衆浴場及び旅館業におけるレジオネラ症発生防止対策については、「公衆浴場における衛生等管理要領等について」(平成12年12月15日生衛発第1811号厚生省生活衛生局長通知)に盛り込まれているところであるが、近年、公衆浴場を発生源とするレジオネラ症の集団感染事例が度々起きており、かつ、これら管理要領等の記載ぶりが分りにくいとの指摘もあることから、レジオネラ症発生防止対策の要点を追加するとともに、「公衆浴場法第3条第2項並びに旅館業法第4条第2項及び同法施行令第1条に基づく条例等にレジオネラ症発生防止対策を追加する際の指針について」(平成14年10月29日健発第1029004号同局長通知)との整合性を図りつつ、レジオネラ症発生防止対策について営業者に対する指導の具体的な内容を盛り込む等の改正を、別添1ないし別添3のとおり行ったので、衛生管理の指導に当たっての指針として活用されたい。

なお、本管理要領等は、地方自治法(昭和22年法律第67号)第245条の4第1項にに基づく技術的助言である。

6

平成12年12月15日生衛発第1811号厚生省生活衛生局長通知

イレジオネラ属菌の検査方法は、冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法の
いづれかによること。



平成15年2月14日健発第0214004号厚生労働省健康局長通知

イレジオネラ属菌の検査方法は、冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法の
いづれかによること。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。

7

精度管理ワーキンググループ(平成22年度～)

北海道立衛生研究所 森本 洋
宮城県保健環境センター 矢崎知子
仙台市衛生研究所 渡辺ユウ
富山県衛生研究所 磯部順子
神奈川県衛生研究所 大屋日登美
神戸市環境保健研究所 田中 忍
岡山県環境保健センター 中嶋 洋
宮崎県衛生環境研究所 吉野修司
大分県衛生環境研究センター 緒方喜久代

8

平成22年度:全国77地方衛生研究所を対象に、88項目の設問に対するアンケート調査を行った。

検査方法記入欄

- 本回答は貴自治体行政検査機関が開設する場合についてを想定しており、民間検査機関が独自に行っている検査状況による回答は除くも
- 各設問に対して、(内記入欄)欄およびコメント欄等がある場合は、詳細コメント欄にご記入下さい。
- 各設問に対して複数回答がある場合は、その複数回答したる番号を選択し、その詳細はコメント欄にご記入下さい。
- 行、列でセルの追加による回答は、行わないで下さい。
- 語句説明 「斜光法」 斜板培地上の集落に対し、実体顯微鏡上で斜めから光を当て集落の特徴を観察する方法。

(第3版) レジオネラ症防止指針 p.32-33、日本環境感染学会誌 2010;25(1):8-14)

設問	回答(例)	回答
1. 機関名	北の大地衛生研究所	
2. 担当者名	北海太郎	
3. メールアドレス	hokkaitaro@hph.hokkaido.jp	
4: 貴自治体ではレジオネラ属菌の検査に列記していますか?	選択番	詳細コメント
1. 対応している 2. 対応していない (2.の場合ここで終了)	1	
5: 貴自治体ではレジオネラ属菌検査をどこが行っていますか?		
1. 地衛研 2. 保健所 3. 地衛研および保健所 4. その他(外注検査機関)	3	
6: 5で3.または4.として複数施設で行っていると回答した施設にお尋ねします。(6)		
7: 異なる施設で検査実施可能な場合、その施設間での検査法は同じですか?この設問で2.3.を演算した施設はその内容を簡単に記載下さい。		
1. 同じ 2. 違う 3. その他	2	地衛研の方が検査料金が安いので、保健所より詳細検査が行われている。また使用機器類については予算の都合上統一機器の導入が難しいため、施設間で異なる場合がある。
7. 検査法の導入方法についてお尋ねします。		
1. 研修後導入(研修先施設名) 2. 参考図書等から独自に導入(参考図書名)	1	当所:CGC、保健所:当所

得られた結果について、北海道立衛生研究所の森本氏が取りまとめ、平成22年度「生活衛生関係技術担当者研修会」で発表した。

9

アンケート調査結果より – 九州各県の概略 –

	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	酸処理	WYO α	GVPC	MWY	BCYE
A	×	○	×	×	○	×	○	×	×
B	×	○	×	×	○	×	×	○	×
C	×	○	△	○	○	○	○	×	×
D	×	○	△	○	○	×	×	×	○
E	○	○	×	○	○	×	○	×	×
F	×	×	○	○	×	○	○	×	×
G	○	○	×	○	○	×	×	○	○
H	○	○	△	×	○	×	×	○	×
I	×	○	×	×	○	○	×	×	×
J	×	○	×	○	○	×	○	×	×
K	○	×	○	○	○	○	×	×	×
L	○	○	×	○	×	○	○	○	△ ¹⁰
計	5	10	2	8	10	5	6	4	2

検査法(大分県バージョン 例示)

- 採水 2000ml(採水時 チオ硫酸ナトリウム添加) * 菌数測定
- 検水 1500ml $\phi 0.2 \mu\text{m}$ ADVANTEC社POLYCARBONATEを用い、ろ過濃縮
- 濃縮フィルターを滅菌蒸留水15mlに洗い出す(5分間) (濃縮試料)
- 濃縮試料
 - 未加熱 * 菌数測定 * LAMP法
 - 加熱(50°C 20分) * 菌数測定



菌数測定に用いた平板

:WYO α (栄研化学)、GVPC(日研生物)、MWY(自家製)

* 本法での検出限界値は5cfu/100ml

どれだけのミキサーが壊れたことか…

11

雑菌処理と分離培地の検出感度 N=56検体

			未加熱	加熱
WYO	GVPC	MWY	14	16
WYO	GVPC			2
WYO		MWY	4	4
	GVPC	MWY	1	
WYO			4	2
	GVPC			
		MWY	1	3
計			24	27

29検体から検出されているが… 10cfu/100mlによらない(定性)

12

雑菌処理と分離培地の検出感度 N=56検体

例えば、未加熱・WYOα ⇒ 22/56 39%

例えば、未加熱・平板併用 ⇒ 24/56 43%

例えば、加熱・WYOα ⇒ 24/56 43%

例えば、加熱・平板併用 ⇒ 27/56 48%

未加熱・加熱併用・平板併用 ⇒ 29/56 52%

29検体から検出されているが… 10cfu/100mlによらない(定性)

13

LAMP法と培養法の比較

		LAMP		計
		+	-	
培養法	+	23	3	29
	-	11	16	27

サンプルB

2000cfu/100ml
L.pneumophila
 掛け流し
 浴槽水
 pH 5.8
 含炭酸-ナトリウム・カル
 シウム-炭酸水素塩・
 塩化物泉
 遊離残留塩素 なし

50cfu/100ml
L.pneumophila
 掛け流し
 浴槽水
 pH 7.3
 炭酸水素塩泉

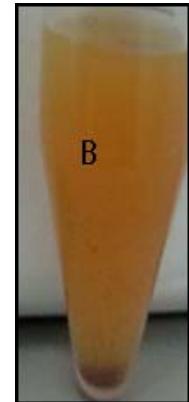
50cfu/100ml
L.longbeachae
 掛け流し
 浴槽水
 pH 5.1
 ナトリウム-塩化物泉

遊離残留塩素 なし 遊離残留塩素 0.05

14

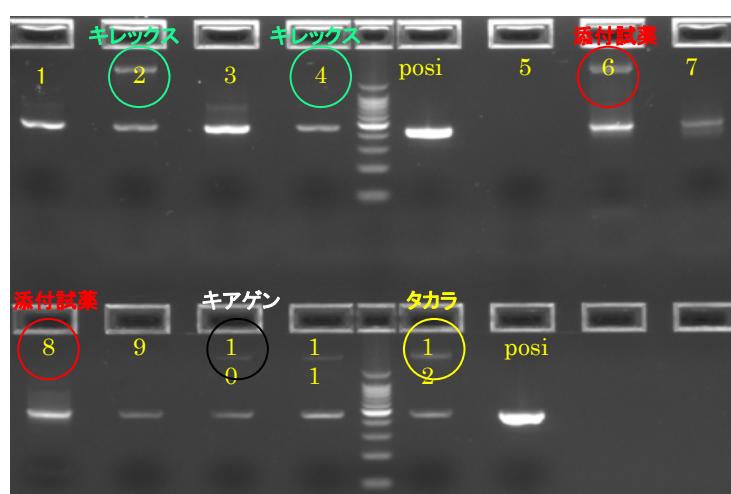
抽出法の検討

サンプルB	LAMP法
LAMP法添付試薬による抽出	1回目 2/3
	2回目 0/3
キレックスによる抽出	1回目 1/3
	2回目 2/3
タカラカラム抽出	1回目 0/3
キアゲンカラム抽出	2回目 0/3



15

レジオネラ16S PCR結果



16

抽出法の検討(まとめ)

サンプルB:レーン	LAMP法	レジオネラ16S PCR
LAMP法添付試薬による抽出	6	2/3
	8	0/3
キレックスによる抽出	2	1/3
	4	2/3
タカラカラム抽出	12	0/3
キアゲンカラム抽出	10	0/3

17

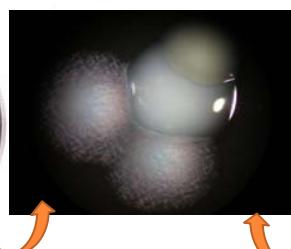
迅速化に向けた解決への第一歩

●LAMP法の導入

➢ 泉質、レジオネラ属菌種によっては反応しない場合がある

●平板培養法への斜光法の導入

➢ 95%~98%の確率でヒット



18

北海道立衛生研究所 森本氏提供

少なくとも…

雑菌多く、「測定不能
≒検出せず」



10CFU/100mlのはずが、5CFU/100ml
もしくは0CFU/100mlになるかも…

北海道立衛生研究所 森本氏提供

19

結語(1)

- 選択分離培地を併用すること、ろ過濃縮後の雑菌処理工程を併用すること、濃縮工程を行わない培養を併用することにより、43%→48%→52%→54%と検出率が上がった。
- 培養法(+)LAMP法(−)の不一致が3検体あった。その原因として、(1)菌数が少ないとみのバラツキ(2)LAMPに反応しない菌種の存在(3)泉質による影響が考えられた。
- 迅速かつ、正確にレジオネラ属菌を検出するための「斜光法」については、その有用性が認められた。

でも…これは、あくまで大分県バージョンであって

患者発生に伴う感染源調査のための検査

通常監視(いわゆるモニタリング)のための検査

LAMP法導入にあたっての注意点

20

信頼できる結果を提供するために、精度管理は必要・不可欠！

水質検査機関12社への アンケート 回答は12社すべてから		1 レジオネラ属菌の依頼検査についてお尋ねします。 1) 依頼検査を実施していますか。 2) 検査する対象はどのような検体ですか。 3) 検査件数(年間)はどのくらいですか。 4) 実施している検査法の出典あるいは根拠とした方法は何ですか。 5) 依頼検査を実施していない理由についてお尋ねします。 6) 今後この検査を導入する予定についてお尋ねします。 2 検体の採水・搬入等についてお尋ねします。 1) 検体はどのように採水・搬入されますか。 2) 採水容器はどのように準備していますか。 3) 採水した検体は残留塩素の不活化を実施していますか。 3 レジオネラ属菌の検査法についてお尋ねします。 1) 検体はどのように濃縮しますか。 2) 雜菌を抑制するための処理を行いますか。 3) 培養法についてお尋ねします。 ア) 使用している培地を下記から選び、1検体あたりに使用する枚数をご記入ください。 (メーカー名・枚数) イ) 培養期間はどのくらいですか。 ウ) 斜光法(実体顕微鏡を用いた観察法)を実施していますか。 エ) レジオネラ属菌の同定はどの方法ですか(複数選択可能)。 4 依頼者への報告内容はどのような内容としていますか。 5 レジオネラの検査法に関する研修会等についてお尋ねします。 1) 研修会が開催される場合受講をしますか。 2) レジオネラ属菌についての精度管理を希望しますか。	
---	--	--	--

21

水質検査機関12社への アンケート 回答の一部抜粋	
3 レジオネラ属菌の検査法についてお尋ねします。(9)	
1) 検体はどのように濃縮しますか。 ろ過法 3 冷却遠心 6 2) 雜菌を抑制するための処理を行いますか。 加熱 1 酸 7 未 1 3) 培養法についてお尋ねします。 ウ) 斜光法(実体顕微鏡を用いた観察法)を 実施していますか。 知っている 4 聞いたこと がある 1 知らない 3 エ) レジオネラ属菌の同定はどの方法ですか (複数選択可能)。 G染色 2 システイン 要求性 7 馬尿酸 1 抗血清 1	
5 レジオネラの検査法に関する研修会等についてお尋ねします。(12)	
1) 研修会が開催される場合受講をしますか。 受講 2 県内 5 北陸 3 しない 1 不必要 1 2) レジオネラ属菌についての精度管理を 希望しますか。 希望 7 しない 1 わからない 4	

22

民間検査機関の実態調査(大分県)

- 平成22年下半期から平成23年上半期
- 18検査機関
- 大分県所在地の検査機関は2施設
処理サンプル数は77%。うち、Y検査センター
が88%の検査実績

レジオネラ検査機関の特徴

- 成り立ち？
- 取り組む経緯？

23

結語(2)

- 民・官の検査結果の不一致
 - 採水時から検査は始まる
 - 精度管理・研修の必要性(要望)
- 精度管理を実現するには…
 - モニタリングに最適な検査法の提示
 - 精度管理用サンプルの安定提供
 - 評価機関
- 少なくとも内部精度管理は…

24

研修の風景



平成22年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ブロック地方衛生研究所地域専門家会議」



平成23年2月21日に
「大分県水分野連絡会」

25

いっぺん、大分県の
温泉に入っち、
みちょくれ！



ご静聴
ありがとうございました。