

# 標準的検査法(培養法)と 外部精度管理に向けた検討

北海道立衛生研究所 森本 洋

現状の確認  
— 培養法について —

# 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

## < 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  $\alpha$  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。

# SOPの基となっている主な検査マニュアル

- 改訂・レジオネラ属菌防除指針  
—温泉利用入浴施設用—(1999.3)  
(財)全国環境衛生営業指導センター  
全国旅館環境衛生同業組合連合会
- レジオネラ症防止指針(1994.3,1999.11,2009.3)  
財団法人ビル管理教育センター
- 上水試験方法,上水試験方法 解説編(2001,2011)  
日本水道協会
- 衛生試験法・注解(2005,2010)  
日本薬学会
- 病原体検出マニュアル(2003.12,2011.10)  
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

# このような状況下、検査結果は

- 行政面では
  - 行政処分等を行う根拠として
  - 訴訟等を伴う事例への対応 など
- 公衆浴場では
  - ⇒ \* 施設の衛生管理に大きく影響
  - \* レジオネラ症予防効果へつながる

非常に重要な役割を担っている

このためにも

自施設で行っている検査法の根拠・妥当性も重要

# そこで

- レジオネラ属菌検査精度管理

ワーキンググループを発足（H22年度）

北海道が中心となり、宮城県、**仙台市**、**神奈川県**、**富山県**、**神戸市**、**岡山県**、**大分県**、**宮崎県**

まずは、地方衛生研究所に対する

レジオネラ属菌検査実態調査



# 地方衛生研究所に対する 検査法の実態調査について

- レファレンス担当地研を通じ、全国77地研への  
実態調査(アンケート形式:設問88)を実施。
- 74か所+密に連携している保健所1か所から回収。  
⇒ 74自治体の計75か所から回答。
- 貴自治体ではレジ検査に対応しているか？  
⇒74自治体すべてが検査対応可能。

## 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

# ということとは

- 70%以上の自治体では、行政検査対応のみ
- 依頼検査を受けている自治体でも、民間検査機関による自主検査対応が多い。
- 改めて民間検査機関の重要性と官・民間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。
- 本実態調査は行政検査対応を中心とした検査状況が集計された感がある。

# 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%)

## 不安ありとしたコメント

\* 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

## さらに

- 異動等に伴い検査担当が交代する時
- 経験者が少なく、手順全般に不安
- 検査経験が全くなく、新しく担当になり、初めて検査したとき。
- 実際にレジオネラ検査を行ったことがない。
- 検査する機会があまりないため

# レジオネラ属菌と確定 (成績書への反映)させる根拠

複数の検査工程による結果から対応している  
施設が多かったが・・・。

- 75施設で53通りの確定方法があった。
- 大別すると4パターンに分類された。
  - ①レジオネラ属菌に対して広く対応
  - ②レジオネラ属菌に対して対応
  - ③レジオネラニューモフィラを中心に特定の種類だけに対応
  - ④線引きが読み取れなかった



# どの時点でレジと確定させるか？

- レジ様コロニーに対し
    - L-システイン要求性の確認
    - 血清学的検査やラテックスでの確認
    - DDHでの確認 (H26.12で販売終了)
    - 遺伝子学的検査による確認
- (行政検査では 一般的ではあるが、  
民間による自主検査では？)
- シークエンスの確認

# 検査法の統一は必要だと思いますか？

	回答数
必要	68 (約91%)
不必要	3 (4%)
その他	4 (約5%)

# 研修システムは 必要だと思いますか？

	回答数
必要	71 (約94.7%)
不必要	0 (0%)
その他	4 (約5.3%)

# 精度管理は必要だと思いますか？

	回答数
必要	71 (約96%)
不必要	2 (約3%)
その他	1 (約1%)
記載無し	1

# 今回の実態調査結果から

- 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

# 標準的な検査法（培養法）の検討

標準的検査法とは

- ① ≠ 公定法
- ② ISO 11731:1998(E)に準じた方法
- ③ 検査結果のバラツキを減らす
- ④ 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。

# 新版レジオネラ症防止指針には

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  $\mu$ l または100  $\mu$ 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 0.1～0.5ml

②酸処理（濃縮または非濃縮）検水 0.1～0.5ml

③熱処理（濃縮または非濃縮）検水 0.1～0.5ml

## 1.4 培養

接種後の

# 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を予測できないので、**濃縮検体**と**非濃縮検体**を  
並行して検査する。
- \* 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) $\mu$  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。



検体 500mL(よく混和)

3mL 分取

非濃縮検体

497mL

PC(ポリカーボネート)フィルターでろ過

50mL遠沈管

滅菌水 4.97mL

ボルテックス 1分

3mL 分取

濃縮検体

100 $\mu$  L  
塗布

200 $\mu$  L  
塗布

100 $\mu$  L  
塗布

1.97mL

保存

1mL

1mL

1mL

1mL:  
酸処理液

50 $^{\circ}$ C  
熱処理

4分

20分

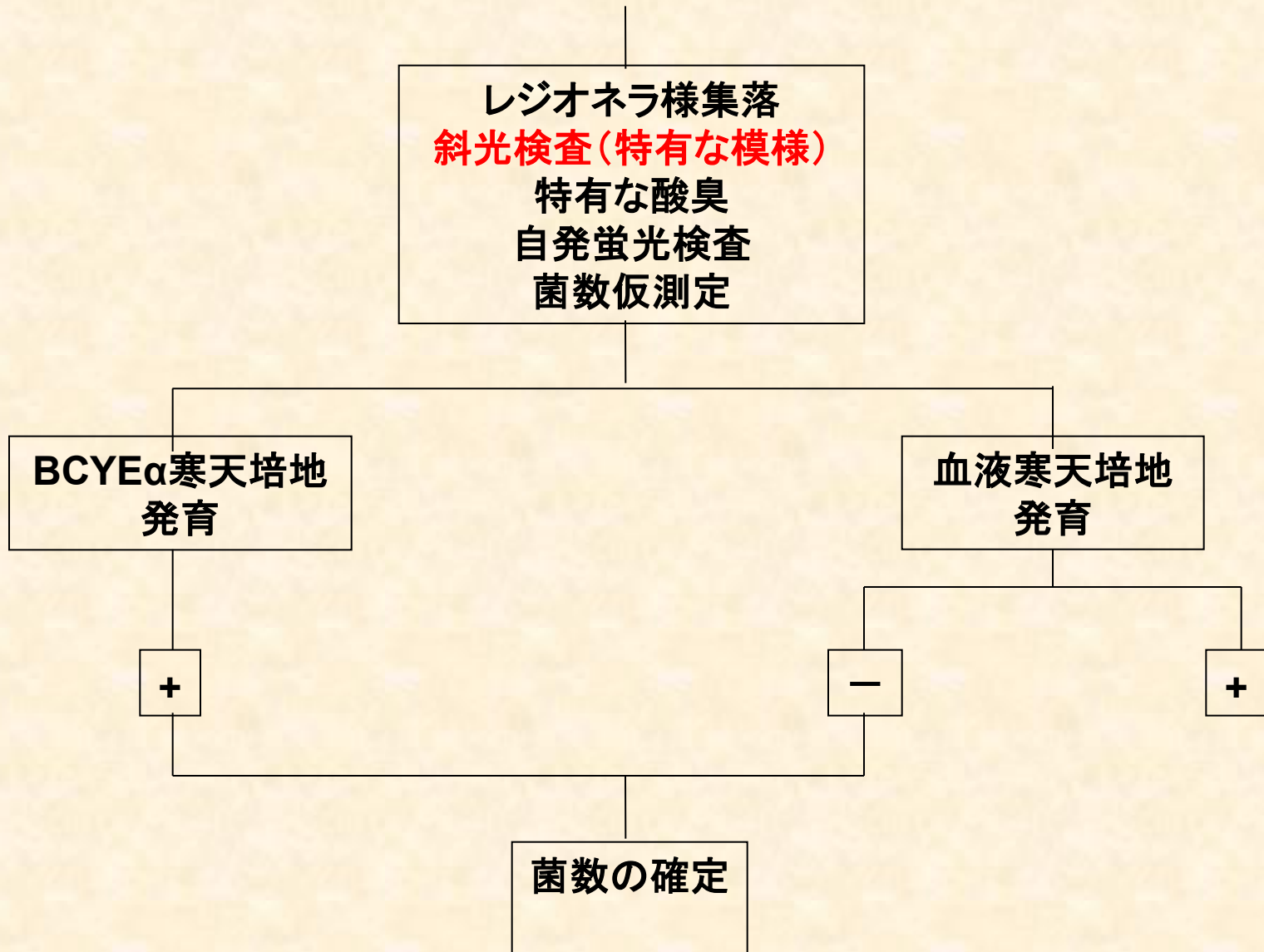
100 $\mu$  L  
塗布

200 $\mu$  L  
塗布

100 $\mu$  L  
塗布

塗布はソフトタッチで!

# レジオネラ属菌の確認



# WG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

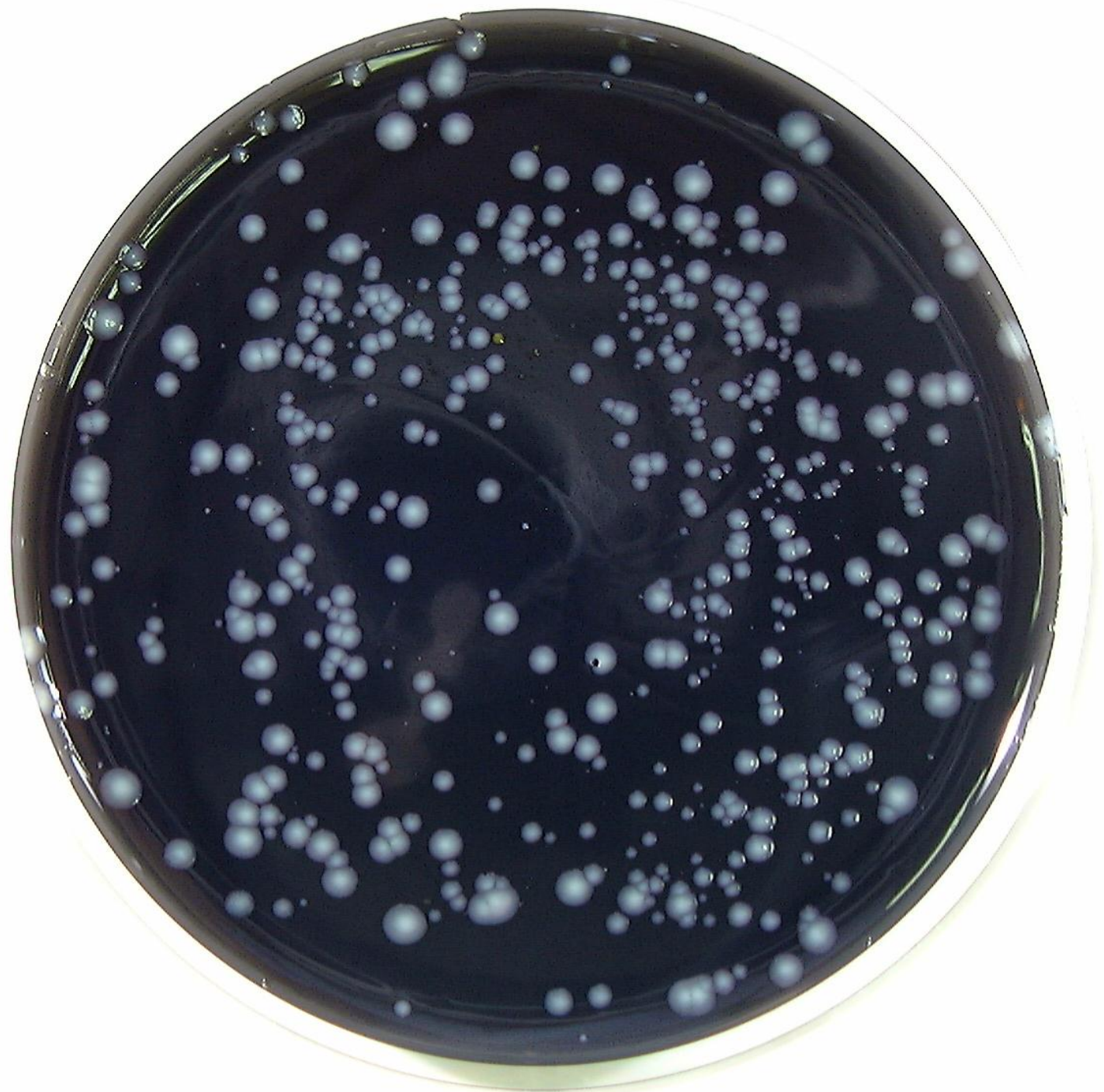
# 斜光法

- \* 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







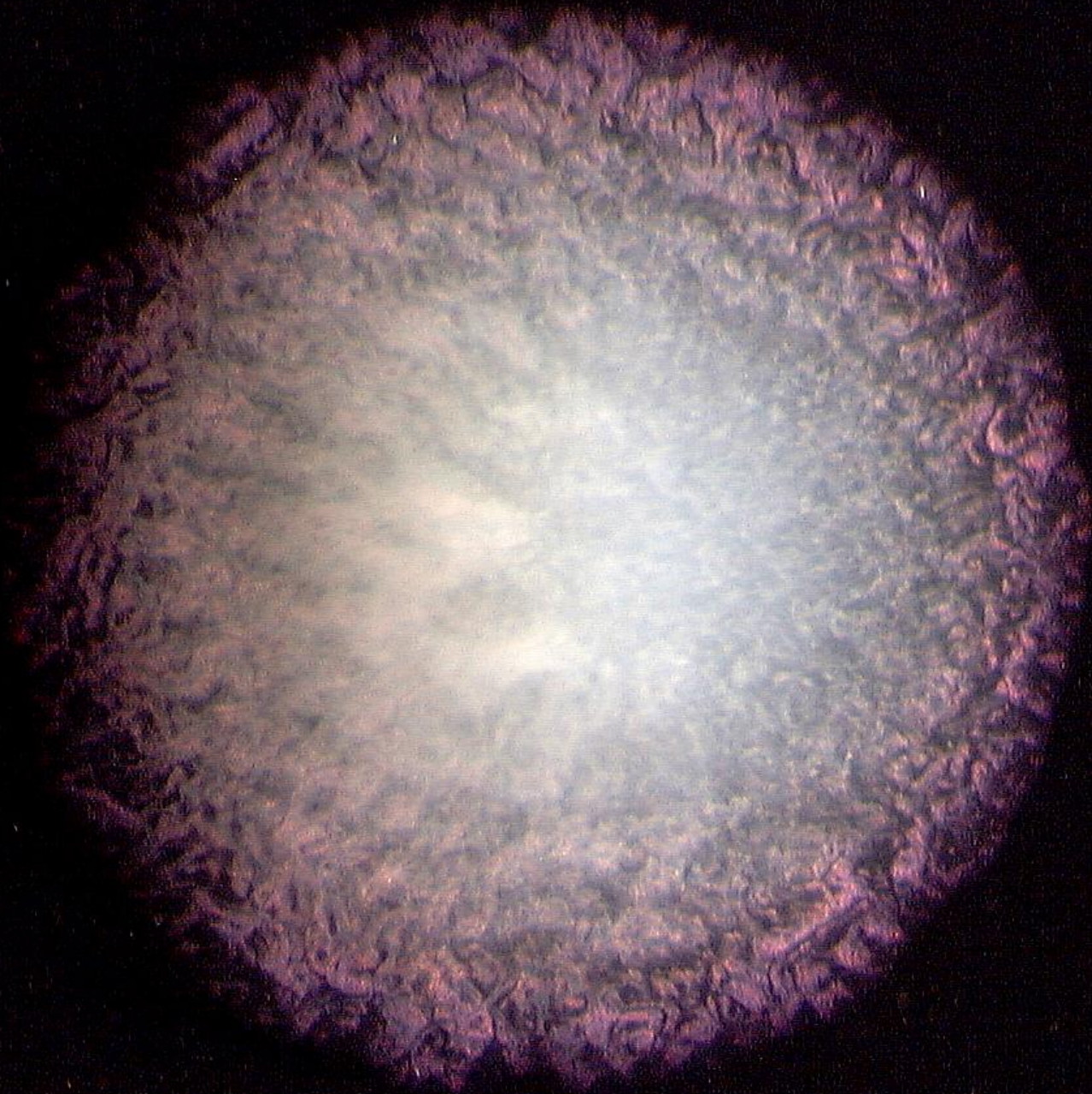




分離培地上に発育した  
レジオネラ属菌を見逃さない  
ために！

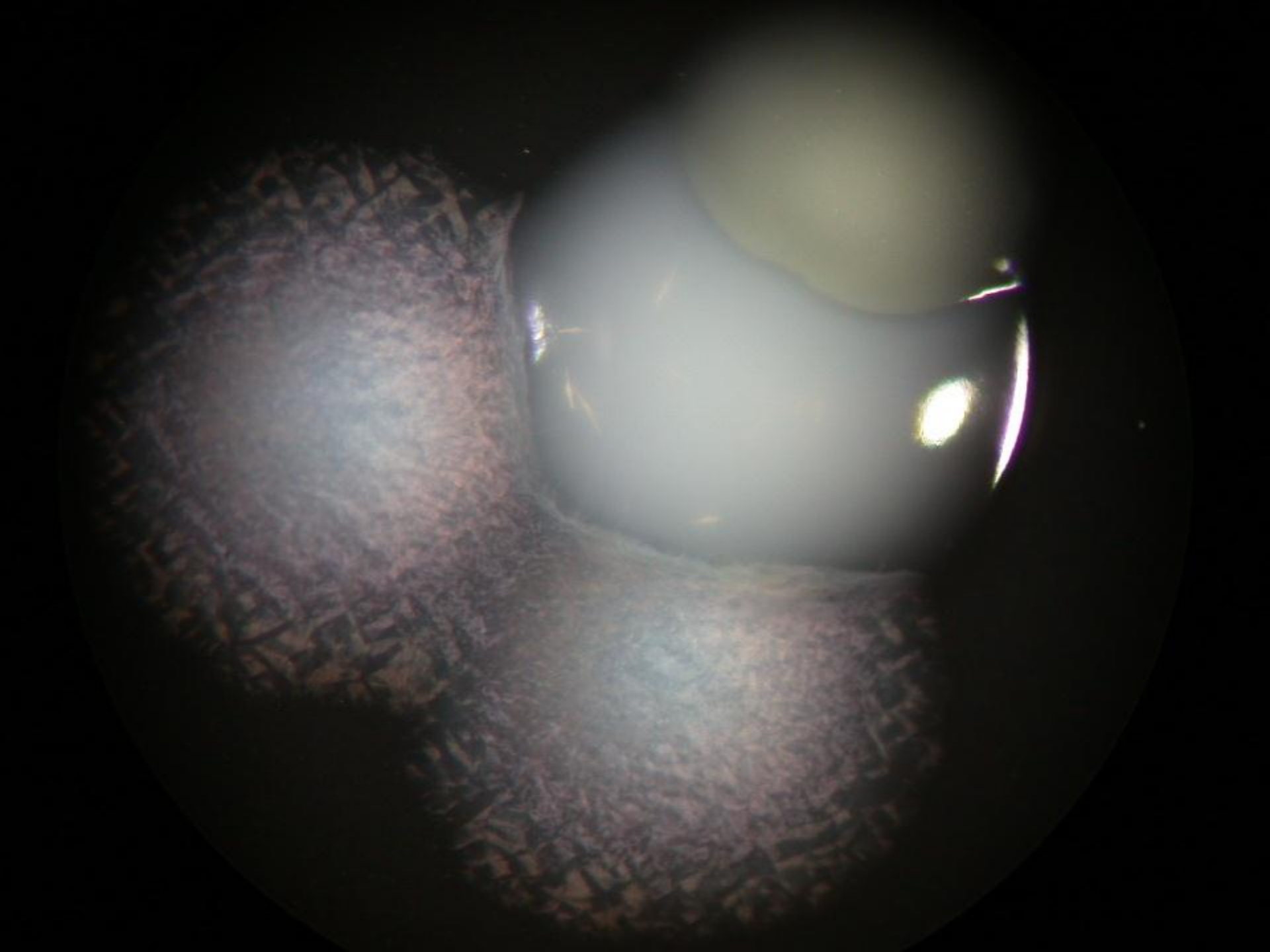




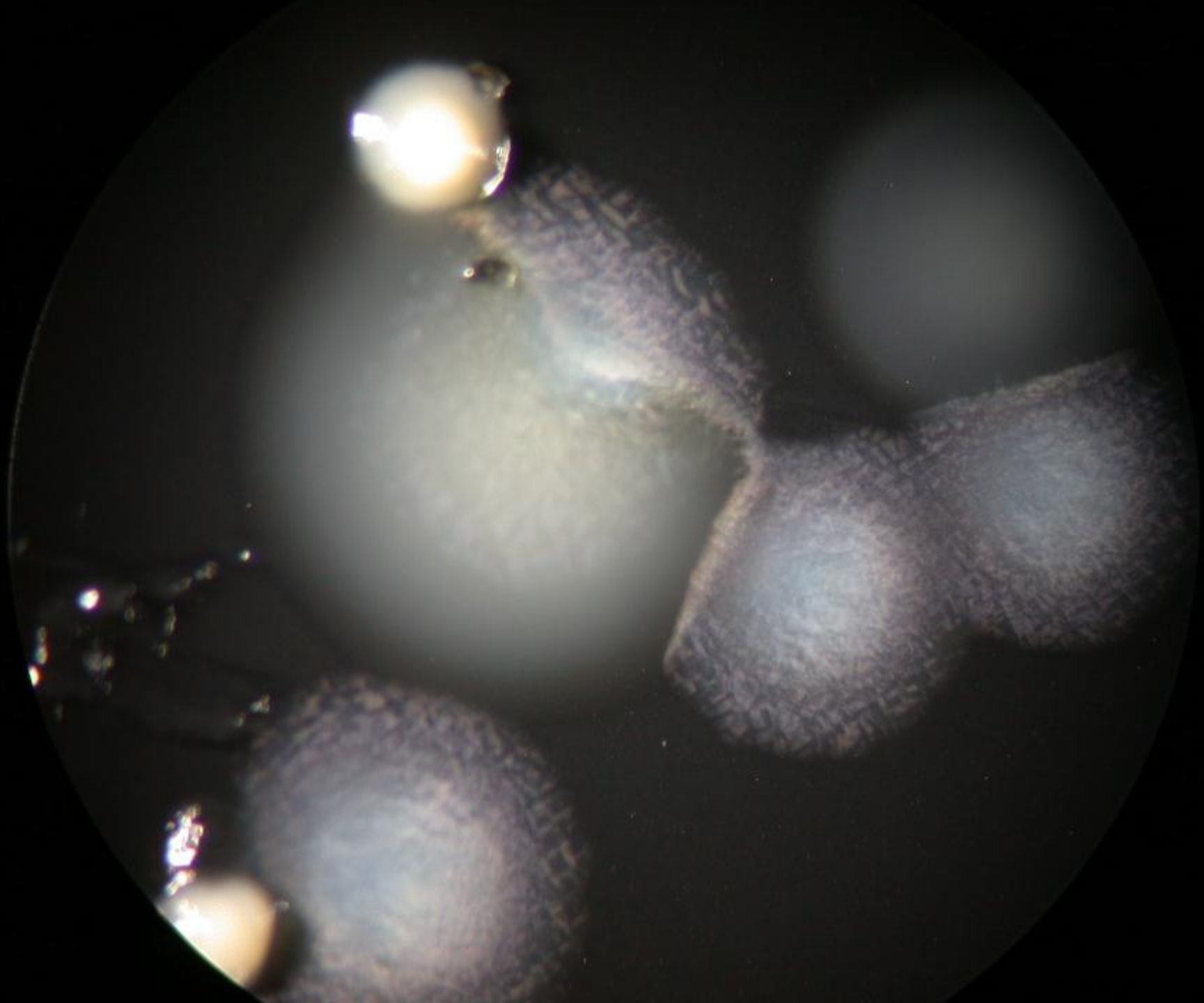


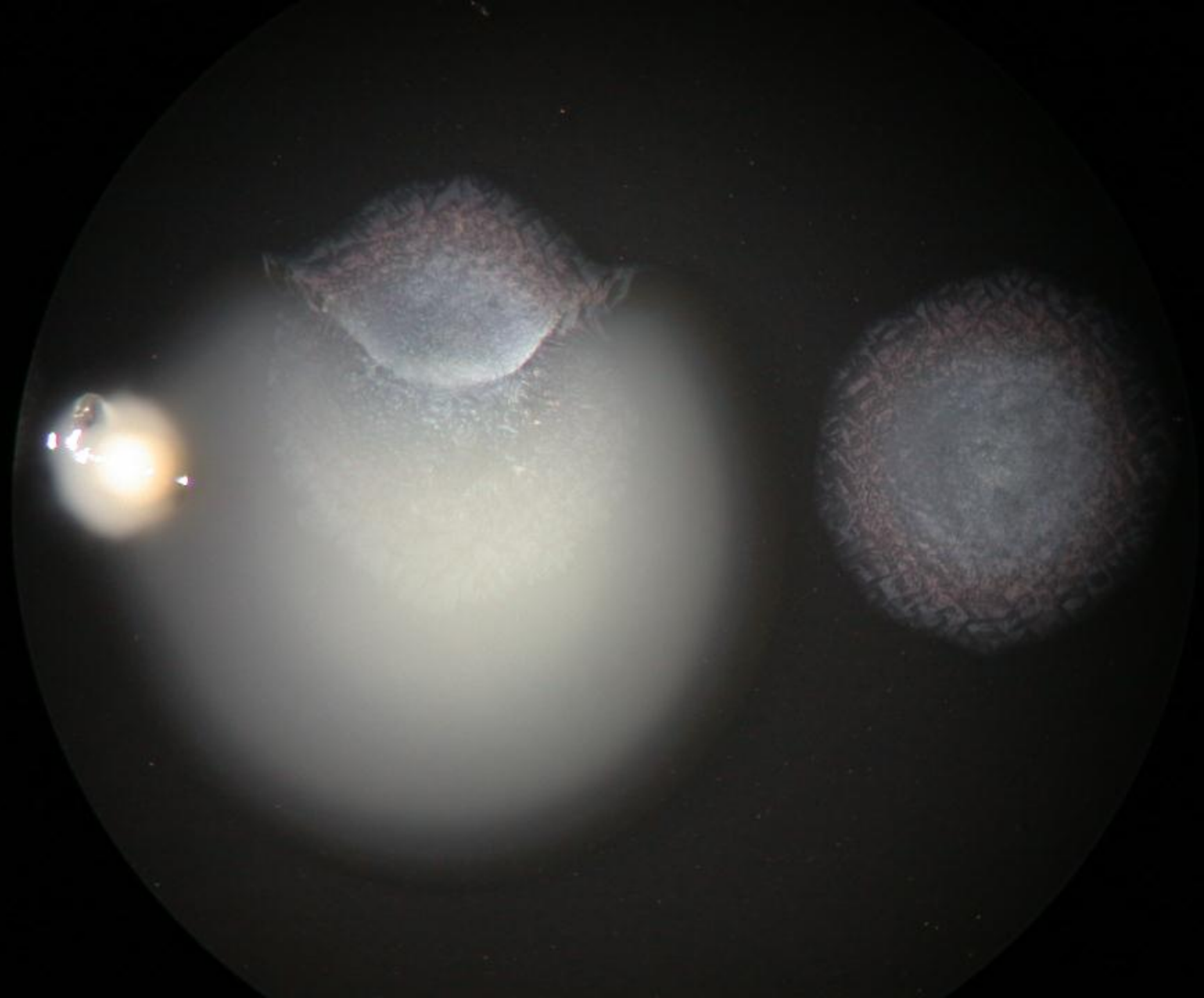








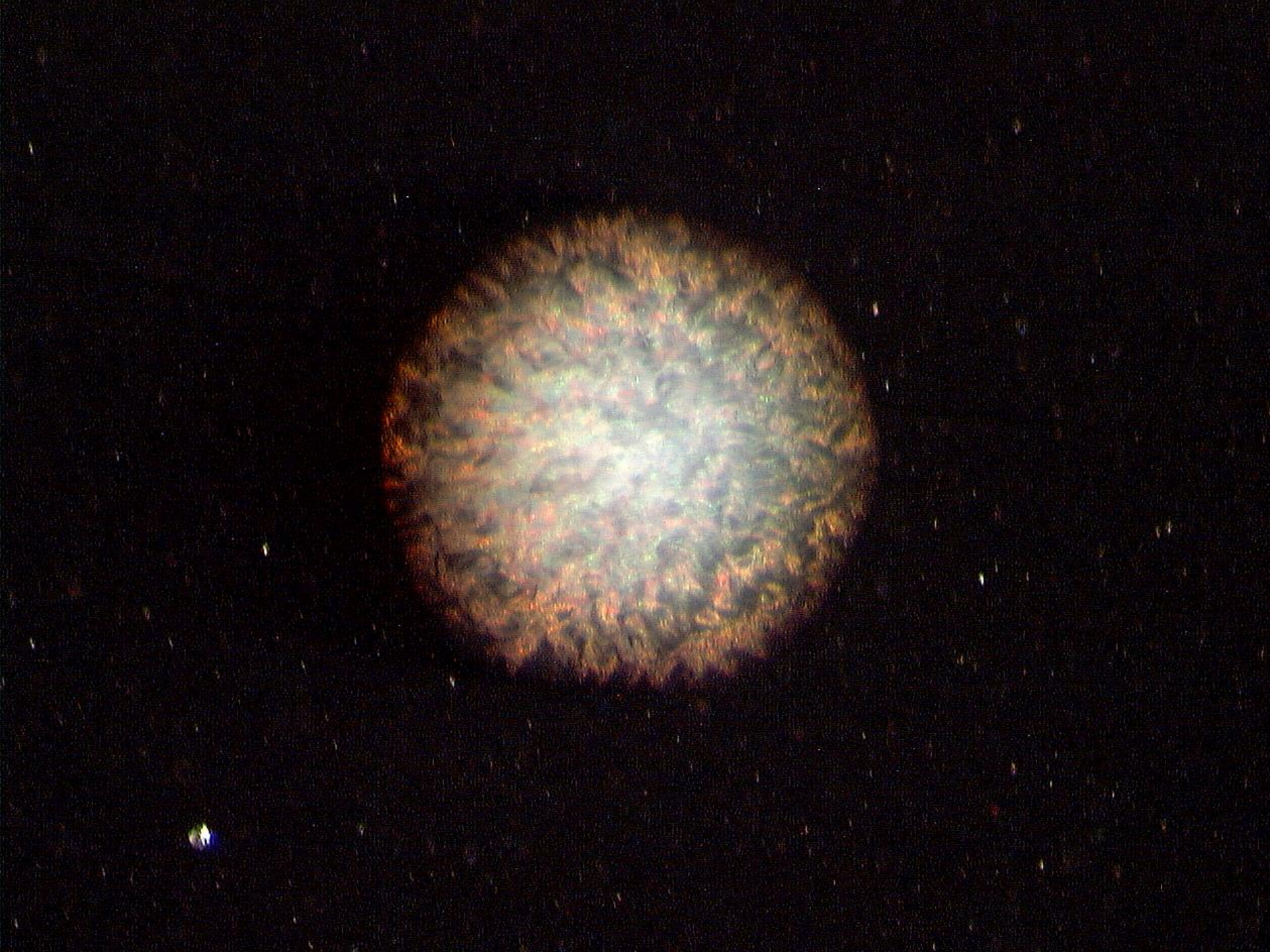




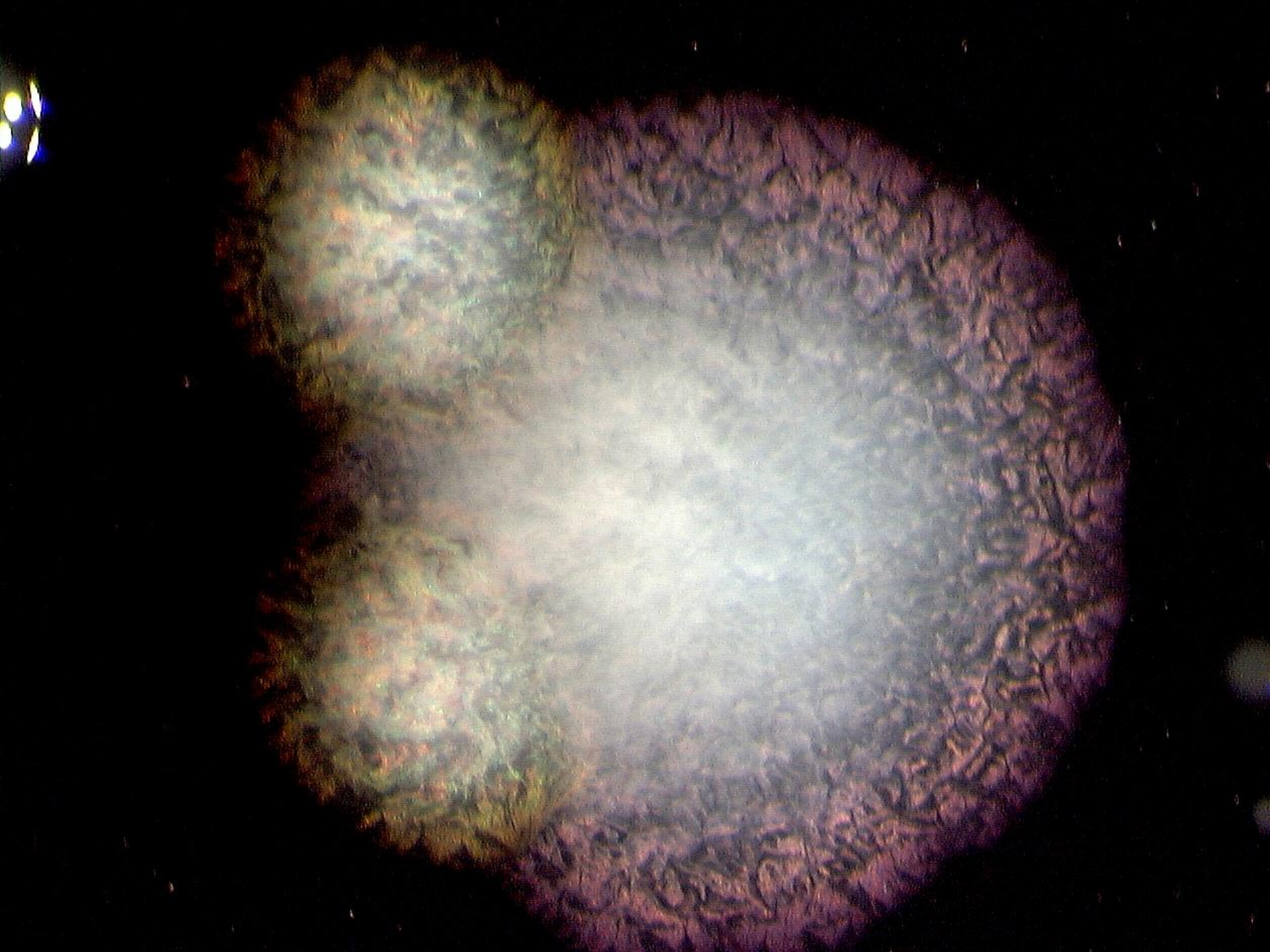








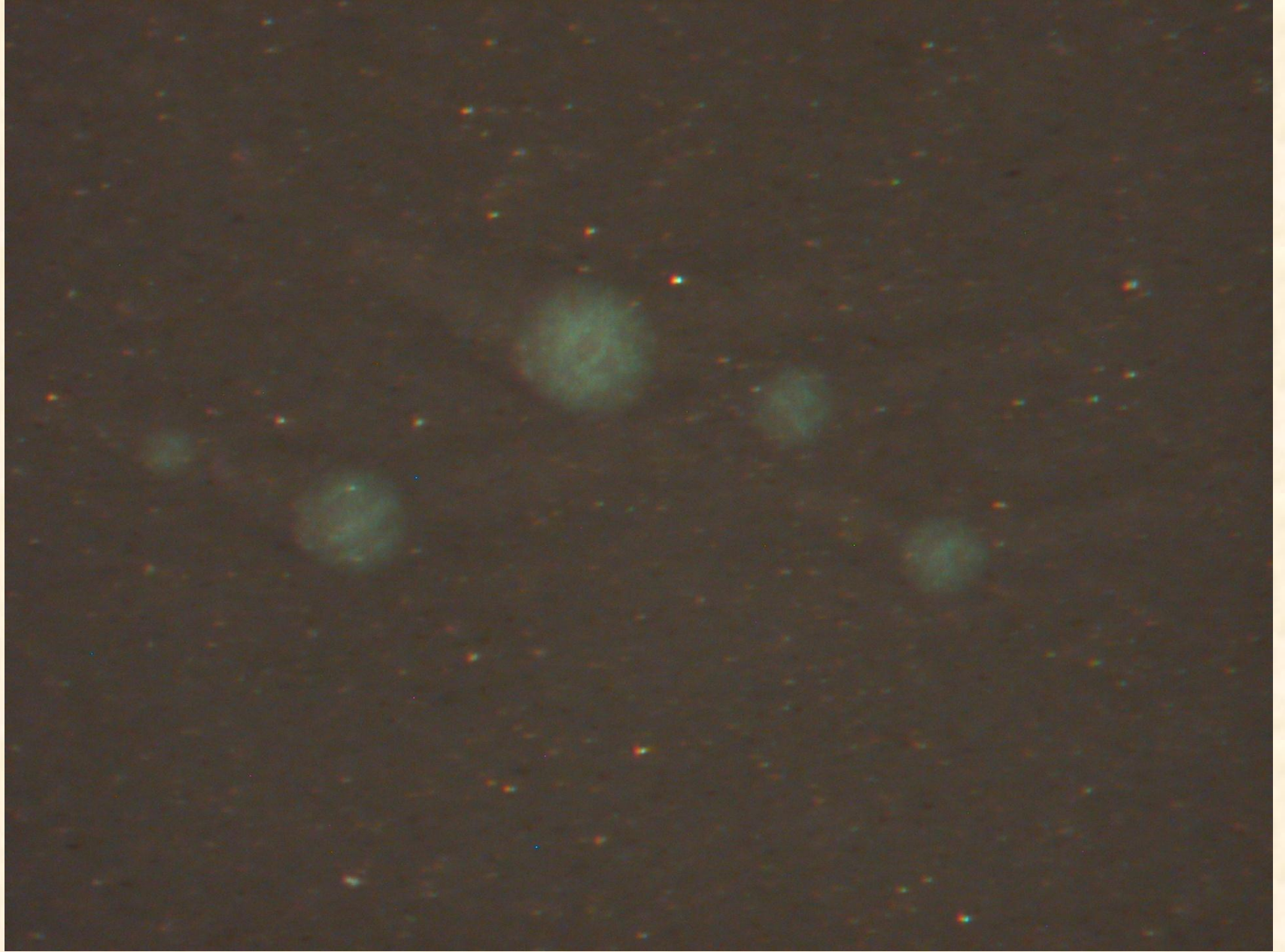




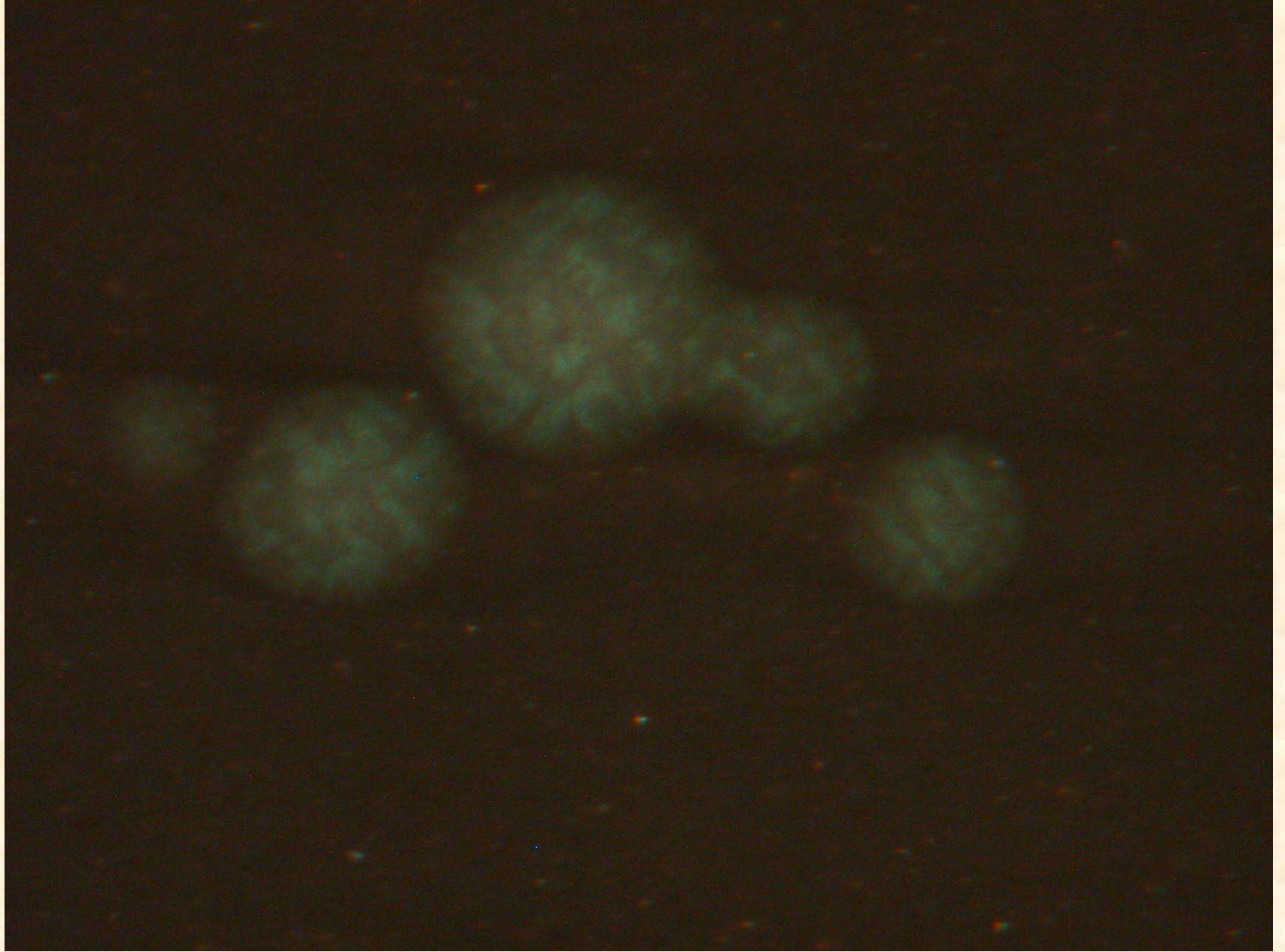




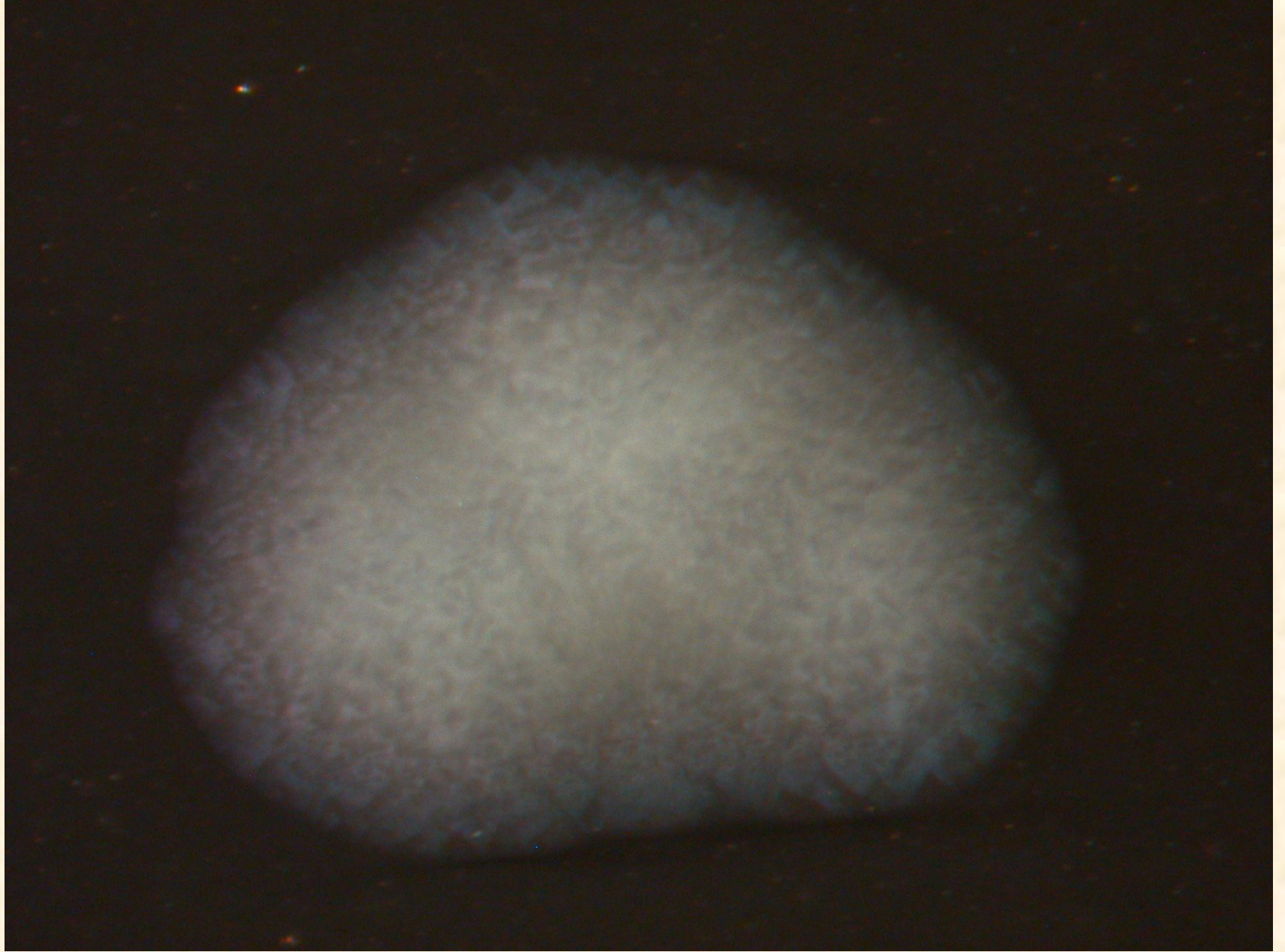
分離培地上に発育した  
レジオネラ属菌を見逃さない！



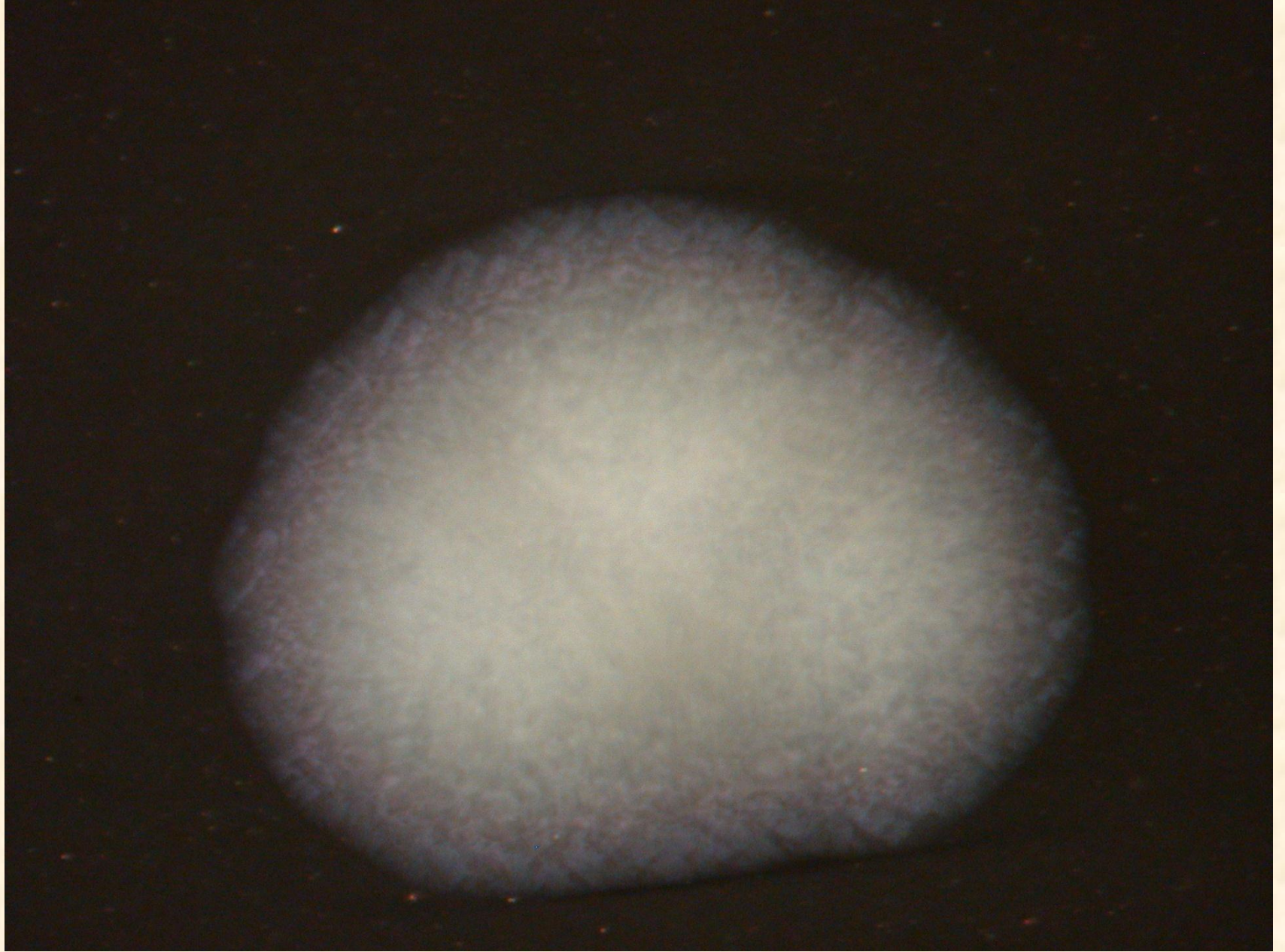
温泉水培養35時間目 *L.p.SG6*



温泉水培養42時間目 *L.p.*SG6



温泉水培養55時間目 *L.p.*SG6



温泉水培養64時間目 *L.p.*SG6

# 斜光法導入によって

- 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



# 外部精度管理に向けた検討

- 平成23、24年度  
自家調製試料によるプレ外部精度管理を実施  
参加機関：WG
- 平成25、26年度  
シスメックス・バイオメリューのBioBallを利用した  
プレ外部精度管理を実施  
参加機関：約40の地方衛生研究所

# 全国規模の精度管理を行うためには

- ①外部精度管理用菌株の検討(安定性と管理)
- ②配付試料の安定化に向けた検討(作製、輸送法・温度管理)
- ③外部精度管理参加条件の設定(設備が対象菌に「適」?)
- ④配付方法の検討(梱包は?、配送機関は?)
- ⑤検査方法の検討(定義:どの部分に重きを置くのか)
- ⑥プレ外部精度管理実施
- ⑦評価と解析方法の検討
- ⑧内部精度管理の必要性
- ⑨外部機関との協力(将来的な外部精度管理委託機関)
- ⑩その他(検査法の標準化、研修会等)

# 信頼性確保のための精度管理の位置づけ

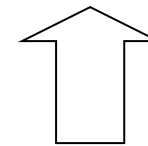
## 外部精度管理

- 検査技術レベル
- 検査精度の確認  
（平均値、結果のばらつき）
- 検査手法の確認

（共通試料を用いた比較）

## 内部精度管理

- 検査精度の確認  
（回収率等の確認）
- 担当者間でのばらつき
- 機器の点検、整備



実施状況の確認

内部点検

（検査施設内で完結）

他検査施設との比較が可能

（秦野研究所資料より）

# 微生物学調査試料の作製

- 微生物学検査用調査試料の最大の問題点は、添加菌の増殖、死滅、変異をいかに抑えるのか
- 定性検査で結果に影響を及ぼさないことを前提とした場合には、いかに死滅させないか  
⇒ 調査試料中の添加菌の均一性、安定性の担保

これらは定量検査では結果のばらつき、定性検査では誤判定につながる可能性がある

外部精度管理調査期間中にどの容器を用いても、いつ検査を実施しても一定の結果が得られることが調査試料に求められる前提条件

# 特注品BioBallの使用により

- ①外部精度管理用菌株の検討
- ②配付試料の安定化に向けた検討
- ③外部精度管理参加条件の設定
- ④配付方法の検討
- ⑤検査方法の検討(定義:どの部分に重きを置くのか)
- ⑥プレ外部精度管理実施
- ⑦評価と解析方法の検討
- ⑧内部精度管理の必要性
- ⑨外部機関との協力(将来的な外部精度管理委託機関)
- ⑩その他(検査法の標準化、研修会等)

ほぼ解決！

## ⑤&⑥&⑦

【H25プレ外部精度管理で確認した検査法、結果、解析】

\* 本来の外部精度管理は、各検査機関のSOPが適切であるかを確認するもの。

\* 検査方法を指定せず、各地研のSOPに従って実施。

\* WGにおいては、WG推奨法による検査も実施。

\* 目標値: BioBall メーカー95%信頼区間の30~300%と定義し300~15000 cfu/100mlと設定。**メーカー中央値: 3383.2 cfu/100ml**

参加機関	SOP	参加機関	SOP
1	2000	24	20
	5000	25	920
2	3000	26	530
3	110	27	120
4	2000		190
5	60		30
6	20	28	40
7	20	29	25
8	56	30	30
9	160	31	10
10	220	32	20
11	400	33	70
12	10	34	850
13	30	35	110
14	40	36	3000
15	350	37	810
16	310	38	370
17	300	39	560
18	80	機関数別	14/39(36%)
19	80	のべ試料数別	15/42(36%)
20	50	平均値	532.761905
21	15	最大値	5000
22	200	最小値	10
23	160	中央値	115

## WG法による結果(全条件中最大値) cfu/100ml

参加機関	試料	結果	濃縮処理		前処理			使用培地			
			非濃縮	ろ過法	未	酸	熱	BCYEα	WYOα	GVPC	MWY
A	1	3000	○	○	○	○	○	○(未)		○	○
	2	2000	○	○	○	○	○	○(未・酸)		○(未)	○(未)
B	3	3000	○	○	○	○	○	○(未)	○	○	○
C	4	2000	○	○	○	○	○	○(未)		○(熱)	○(未)
	5	5000	○	○	○	○	○	○(未)		○	○
D	6	4000	○	○	○	○	○	○		○(未)	
E	7	6000	○	○	○	○	○	○(未)	○	○	
F	8	1000	○	○	○	○	○			○(未・酸・熱)	
	9	2000	○	○	○	○	○		○	○(未)	
	10	1000	○	○	○	○	○		○(未)	○(未)	
	11	210	○	○	○	○	○		○	○(未)	
G	12	1500	○	○	○	○	○	○(未)	○	○	○
	13	1500	○	○	○	○	○	○(酸)	○	○(未)	○
H	14	2500	○	○	○	○	○	○		○(未)	
I	15	5000	○	○	○	○	○	○(熱)	○	○	
	16	8000	○	○	○	○	○	○(未)	○	○	
	17	10000	○	○	○	○	○	○(未)	○	○	
J	18	2500	○	○	○	○	○	○(未)		○	
K	19	4300	○	○	○	○	○	○(未)		○	

18/19(95) 18/19(95) 1/19(5) 18/19(95) 3/19(16) 3/19(16) 13/15(87) 1/10(10) 9/19(47) 2/7(29)

平均 3395  
 最大 10000  
 最小 210  
 中央 2500

WG法による結果(ろ過濃縮後酸または熱処理し選択分離培地を使用した条件による最大値) cfu/100ml

参加機関	試料	結果	濃縮処理		前処理			使用培地			
			非濃縮	ろ過法	未	酸	熱	BCYEα	WYOα	GVPC	MWY
A	1	410	○	○	○	○	○	○(未)		○	○(酸)
	2	320	○	○	○	○	○	○(未)		○	○(酸)
B	3	270	○	○	○	○	○	○(未)	○	○	○(熱)
C	4	110	○	○	○	○	○	○(未)		○	○(酸)
	5	160	○	○	○	○	○	○(未)		○	○(酸)
D	6	520	○	○	○	○	○	○(未)			○(酸)
E	7	300	○	○	○	○	○	○(未)	○		○(酸)
F	8	160	○	○	○	○	○				○(酸)
	9	120	○	○	○	○	○		○(酸)	○	
	10	140	○	○	○	○	○		○(酸)	○	
	11	170	○	○	○	○	○		○		○(酸)
G	12	250	○	○	○	○	○	○(未)	○(熱)	○	○
	13	350	○	○	○	○	○	○(未)	○		○(酸)
H	14	50	○	○	○	○	○	○(未)			○(酸・熱)
I	15	120	○	○	○	○	○	○(未)	○		○(酸)
	16	190	○	○	○	○	○	○(未)	○(酸)	○	
	17	30	○	○	○	○	○	○(未)	○		○(酸)
J	18	595	○	○	○	○	○	○(未)			○(酸)
K	19	140	○	○	○	○	○	○(未)			○(熱)

6/19(32)

16/19(84) 5/19(21)

4/10(40)

10/19(53)

5/7(71)

1/15 平均  
最大  
最小  
中央

231  
595  
30  
170



## ⑤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。

# 現状と今後

- 全国規模の外部精度管理においては、様々な条件に対応できるだけのサンプルを作り出すのはかなり困難な状況。
- 検査のどの部分に重きを置いた外部精度管理を行うかの定義付けをしっかりと、それに即した外部精度管理を行う。
- 各検査施設ごとに内部精度管理が適切に行えるような環境を整える。

## ⑧ & ⑩

# 内部精度管理の充実 及び 標準的検査法の提示とその研修会

- \* 検査手技に問題があった場合、それを各施設内で解決できる技術、知識、確認能力が必要

## ⑨外部精度管理委託機関の選定

- BioBallを利用するのであれば、レジオネラ属菌及び検査法の知識を十分有している必要はあるが、検体調製ノウハウを有する必要はない。
  - 配付製品の品質確認
    - レジオネラ検査研修受け入れ機関と提携
- \* 上記により、レジオネラ属菌を直接扱える機関  
でもなくとも委託機関として選定可能。