

院内感染に關与する水棲菌について

2011年11月12日
社団法人 千葉県臨床検査技士会
平成23年度第4回微生物検査研究班
研修会

日本ポール株式会社
メディカル事業部
マーケティング
吉田 周理

本日お話しすること

1. 水棲菌に関連する法規制
2. 水道水・給湯水
 - 緑膿菌
 - レジオネラ属菌
3. 透析液
4. 培養法

水に関する規制

水道法

義務：一般細菌、大腸菌
推奨：従属栄養細菌

医療法

義務：院内感染対策の推進と実施

無菌室治療管理加算

常時、滅菌水の供給が条件

日本透析医学会基準

超純粋透析液0.1CFU/mL未満

ビル管理法

飲用水は、水道法に準拠（推奨）
レジオネラ症対策はレジオネラ症
防止指針に準拠
シャワーヘッドは6ヶ月に1回点検、
1年に1回分解・清掃
医療施設のシャワーヘッドは1ヶ月
に1回70℃でフラッシング

レジオネラ症 防止指針

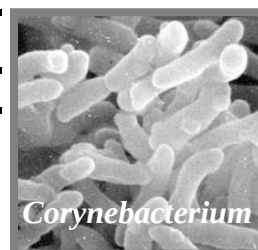
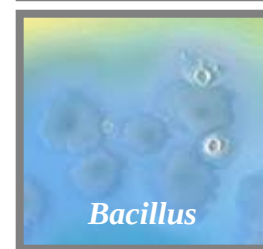
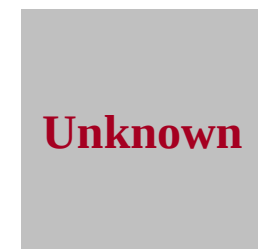
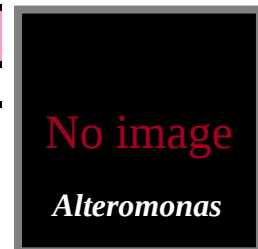
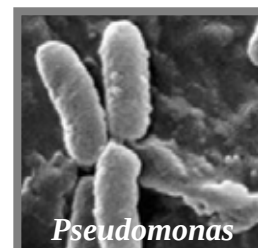
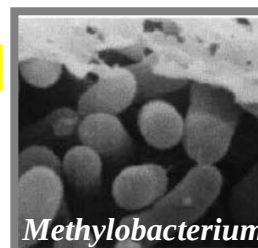
10cfu/100mL未満
（エアロゾル吸入の可能性がある部位
（シャワー、浴槽水）。
その他は、100cfu/100mL未満。
1年に1回以上検査
シャワーヘッドは1年に1回分解洗浄

感染症法

- 危険度に応じて感染症を第一類から第五類まで分類(四類までは、所有を制限)。
- 医師は、感染症が確定されるか、38℃以上の発熱及び呼吸器症状／発熱及び発しん又は水疱 があり感染症が疑わしい場合、都道府県知事(保健所)に届け出を行う必要がある。
- 分類の代表例
 - 第一類:エボラ出血熱、ペスト 他
 - 第二類:結核、ジフテリア、SARS、鳥インフルエンザ(H5N1) 他
 - 第三類:コレラ、細菌性赤痢、腸チフス 他
 - 第四類:E型肝炎、狂犬病、炭疽、鳥インフルエンザ(H5N1を除く)、ボツリヌス症、マラリア、**レジオネラ症** 他
 - 第五類:
 - (全数届出):ウイルス性肝炎(E型及びA型を除く)、HIV、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌
 - (定点届出):インフルエンザ(鳥及び新型を除く)、MRSA、**薬剤耐性緑膿菌**

病院内水道水における分離菌(1)

グラム染色	細菌形状	属	同定結果	(%)
グラム陰性	桿菌	Methylobacterium	108	
		Pseudomonas	71	
		Agrobacterium	2	
		Alteromonas	2	
		Unknown	274	
小計			457	(84.9)
グラム陽性	桿菌	Bacillus	12	
		Corynebacterium	5	
		Unknown	29	
		小計		
グラム陽性	球菌	Micrococcus	4	
		Staphylococcus	2	
		Unknown	29	
		小計		
合計			538	(100.0)



MF法を用いた病院内水道水の検査

培地	標準寒天培地 (水道法 一般細菌)	R2A培地 (水道法 従属栄養細菌)	NAC寒天培地 (NHS <i>Pseudomonas</i> 属菌培地)
分離された細菌	<i>Methylobacterium</i> sp. <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> グラム陰性桿菌(同定不能) <i>Bacillus</i> sp. <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enpedobacter brevis</i> <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> <i>E. cloacae</i> <i>Bacillus cereus</i>	<i>Methylobacterium</i> sp. <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> グラム陰性桿菌(同定不能) <i>Bacillus</i> sp. <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enpedobacter brevis</i> <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> <i>Mycobacterium mucogenicum</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> <i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Methylobacterium</i> sp. <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas</i> sp.
			GVPC α 寒天培地 (レジオネラ症防止指針 推奨培地)
			<i>Legionella pneumophila</i>

易感染患者をケアする3病棟における浴室・シャワー室・洗面台・作業スペースの給水・給湯水よりサンプリング

滅菌水製造装置

A224 無菌治療室管理加算(1日につき) 3,000点

注 治療上の必要があつて、保険医療機関において、無菌治療室管理が行われた入院患者〔第1節の入院基本料(特別入院基本料を除く)のうち、無菌治療室管理加算を算定できるものを現に算定している患者に限り、HIV感染者療養環境加算、重症者等療養特別加算又は小児療養環境特別加算を算定するものを除く〕について、90日を限度として所定点数に加算する。

- (1) 当該加算は、入院基本料(特別入院基本料を除く)を算定し、かつ、自家発電装置を有している病院において、白血病、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群、重症複合型免疫不全症等の患者に対して、必要があつて無菌治療室管理を行った場合に算定する。

なお、無菌治療室管理とは、当該管理を行うために、**滅菌水の供給が常時可能**であること、室内の空気清浄度がクラス1万以下であること等の要件を満たす無菌治療室において、医師等の立入、物資の供給等の際にも無菌状態が保たれるよう必要な管理をいう。

- (2) 当該加算は、一連の治療につき、無菌室に入院した日を起算日として90日を限度として算定する。

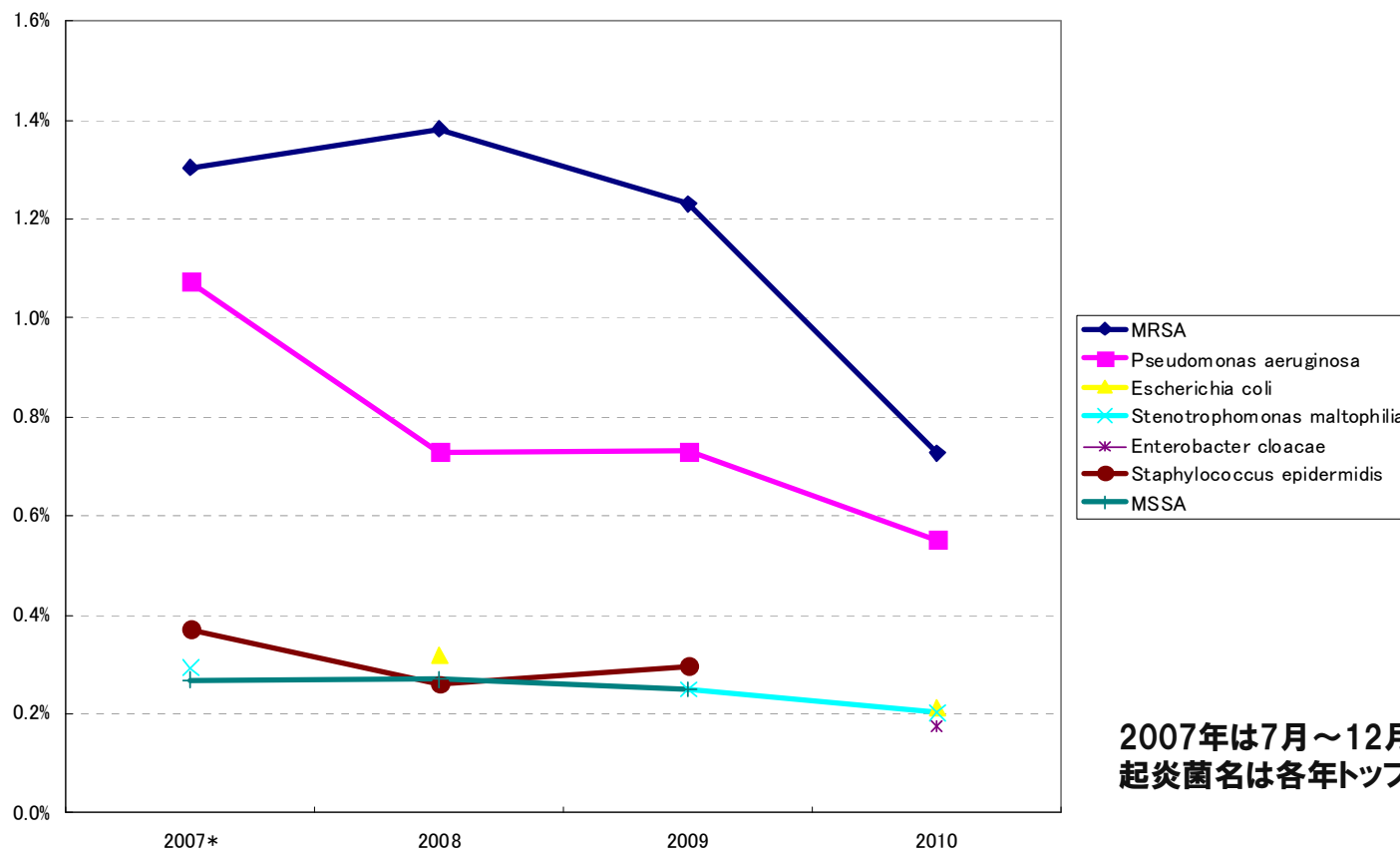
(平20保医発0305001)

水環境中の緑膿菌



ICUにおける院内感染の起炎菌

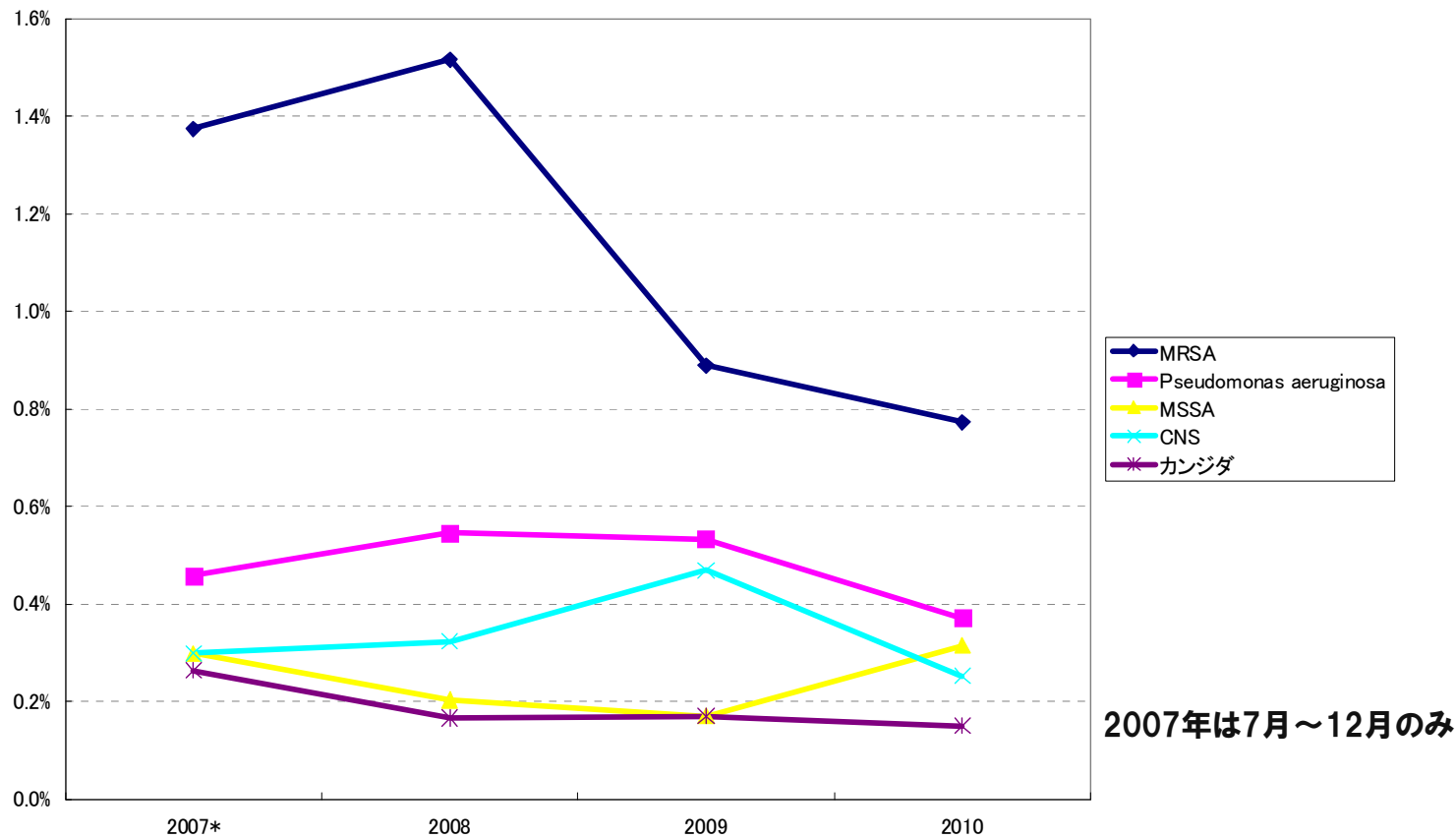
(菌検出患者数 ÷ ICU3日以上入室患者数)



2007年は7月～12月のみ
起炎菌名は各年トップ5のみ

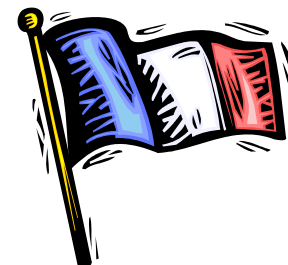
NICUにおける感染率

(菌検出患者数 ÷ NICU入室患者数)



水サンプルと患者おける *P. aeruginosa* の遺伝子型一致率 (%)

著者	施設	部署	一致率(%)
Ferroni <i>et al.</i> 1998	Paris/France	小児外科	21.4 %
Berthelot <i>et al.</i> 2001	St. Etienne/France	2 mixed ICUs	14-25%
Trautmann <i>et al.</i> 2001	Ulm/Germany	外科	29.4%
Reuter <i>et al.</i> 2001	Ulm/Germany	外科	42%
Vallés <i>et al.</i> 2004	Barcelona/Spain	Mixed ICU	37-42%
Blanc <i>et al.</i> 2004	Lausanne/Switzerland	5 ICUs	42%
Trautmann <i>et al.</i> 2005	Ulm/Germany	Medical ICU	50%



ICUにおける*P. aeruginosa* 感染に対する フィルターの効果(フランス)

- 対象期間:フィルター無し 30ヶ月 vs. フィルター有り 60ヶ月
- 総入院日数:23,611総入院日数
- 調査内容:血液、尿、肺の*P.aeruginosa*感染

1000総入院日数当たりの感染率

	フィルター無し	フィルター有り
総感染率	8.7	3.92
多剤感受性感染率	2.7	0.5

血液内科における*P. aeruginosa* アウトブレイクに対する フィルターの効果(イタリア)



サンプリング部位と*P. aeruginosa*陽性数

採取場所	採取数	陽性数
洗浄液	4	0
空気	11	0
浴室のドアノブ	6	0
水のサイフォンタンク	6	0
トイレの便座	6	0
トイレのフラッシュハンドル	6	0
水道関連	46	29
合計	85	29

培養方法

- 空気：
 - 500μLをシュードモナス選択培地stripにて培養
- その他：
 - 滅菌スワブにて各所表面もしくは、水道蛇口、シャワーヘッド、サイフォン等の内面から採取
 - シュードモナス選択培地を用い37℃で48時間培養し、API20NE (Biomeieux)にて確定。

血液内科における*P. Aeruginosa* アウトブレイクに対する フィルターの効果(イタリア)



フィルター導入前後における*P. aeruginosa* 陽性数(血液培養)

	2001	2002	2003	2004
POUフィルター	無し		有り	
患者数	387	486	514	546
総血液培養数	824	1487	1445	1479
血液培養陽性数	236	330	258	402
血液培養 <i>P. aeruginosa</i> 陽性数 (培養陽性に対する陽性率)	19 (8%)	61 (18%)	7 (2.7%)	11 (2.7%)
統計学的検定	2002 vs. 2003 $p=0.0001$			

血液内科における*P. Aeruginosa* アウトブレイクに対する フィルターの効果(イタリア)



フィルター導入前後における患者サーベイランス 結果

POUフィルター		無し	有り	P値
咽頭スワブ培養	採取数	169	570	
	<i>P. Aeruginosa</i> 陽性数	9 (5.3%)	2 (0.4%)	P=0.0001
直腸スワブ培養	採取数	166	563	
	<i>P. Aeruginosa</i> 陽性数	8 (4.8%)	5 (0.9%)	P=0.0008

ICUにおける*P. aeruginosa* 感染に対する フィルターの効果(ドイツ)



- **施設:** Ulm University Hospital

- ~210,000人の周辺住人をカバーするドイツ南部の490床の救急病院
- 感染制御看護師1名
(外部の病院疫学者および微生物ラボのサポートを受けている)
- ICU 11床(部屋の構成)
 - 1号室:定員2名
 - 2号室:定員2名
 - 3号室:定員1名
 - 4号室:定員2名
 - 5号室:定員2名
 - 6号室:定員1名
 - 7号室:定員1名
- 洗面台:各部屋(7部屋)及び、清潔作業部屋、排泄物室に1台ずつ
- 細菌培養はMRSAのリスクが高くない限り、臨床的な兆候が見られた場合にのみ行う。

開放されたドアで接続(5名部屋を形成)



ICUにおける*P. aeruginosa* 感染に対する フィルターの効果(ドイツ)

フィルター導入前後の*P. aeruginosa*感染の比較

		フィルター前群 (2000/6/1～ 2001/5/30)	フィルター後群 (2002/5/1～ 2003/4/30)	P値
総患者数		649	585	
3日以上在室患者		304	282	
	感染／定着数※	47(15.5%)	12(4.3%)	p<0.0001
	CDCの定義を 満たす感染	34(11.2%)	10(3.6%)	p<0.0003

※ICU感染の確認方法＝ICU入室後、2日目以降に感染判明(初日を0日として)



ICUにおける*P. aeruginosa* 感染に対する フィルターの効果(ドイツ)

*P.aeruginosa*培養の結果

- **フィルター導入前**: 2001年5月～10月
 - 水サンプル
 - 陽性=97% (113/117) (2週間に1度)
 - 遺伝子型=全てクローンA
 - 患者サンプル
 - 27症例
 - 遺伝子型=92.6% (25/27) でクローンA
- **フィルター導入後**
 - 水サンプル
 - 陽性=0% (0/52) (1～3ヶ月に1度)

レジオネラ属菌について



WHO Guideline of Legionella



Example of limit values for *Legionella* concentrations and microbiological indicators in water used in health-care settings in France

Limit values

For patients with classical individual risk factors such as the elderly, those with alcoholism or tobacco addiction:

- target level <1000 CFU/l *Legionella pneumophila*
- alert level 1000 CFU/l *Legionella pneumophila*
- maximum level 10,000 CFU/l *Legionella pneumophila*

For **high-risk patients**, such as those with severe immunodepression, transplantation, corticotherapy with an equivalent dose of 0.5 mg/kg per day prednisolone for 30 days or more, or 5 mg/kg per day for 5 days or more:

- target level not detectable
- alert level 250 CFU/l *Legionella* spp.

Microbiological indicators

Aerobic flora at 22 ° C and 36 ° C. No variation above a 10-fold increase compared with the usual value at the entry point. One control per 100 beds per year, with a minimum of four controls per year.

- *Pseudomonas aeruginosa* <1 CFU/100 ml quarterly
- total coliforms <1 CFU/100 ml quarterly

Values may vary in other countries. Control measures should be implemented, these could include “point-of-use filters” fitted at the outlets.

Because no detailed risk assessment has focused on the immunosuppressed, these values are based on the precautionary principle.

Source: Adapted from Ministère de la Sante et des Solidarités (2005)



ドイツ環境機関の推奨

ドイツ厚生省の飲用水小委員会(2006)審問後の ドイツ環境instituteの勧告

建物	レジオネラ属 (cfu/100 ml)	対策	追加調査	試験間隔
病院 高危険区域	目標: 0 リスク値: ≥ 1	限定使用もしくは、 使用点ろ過	直ちに	6ヶ月後

高危険区域: 集中治療室および重度の免疫不全患者のいる部署

**1CFU/ Leginolella/100mL はリスク因子なので、水の厳格な使用もしくはPOU
フィルターを用いることが推奨されている。**

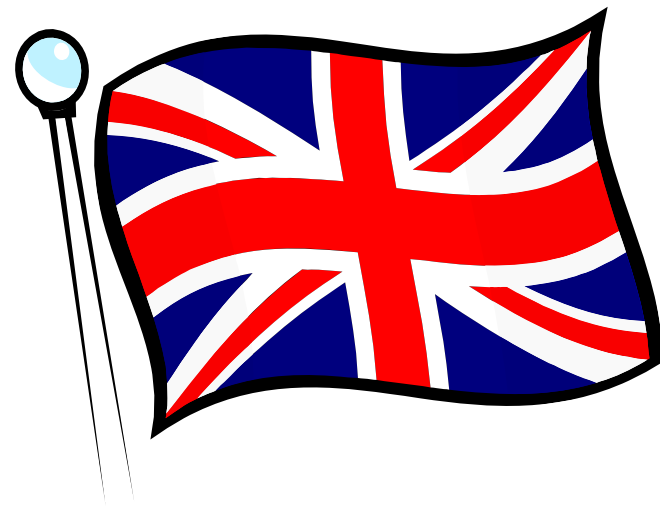
フランス保健省のガイドライン



- フランス保健省は、ハイリスク患者を受け入れる部門向けにガイドラインを発行した。
- ガイドラインでは、「安全な使用ポイント」が設置されている領域を作ること奨励している。例えば、試験サンプル水において、*L. pneumophila*が、検出感度以下の水準であることを保証するために何らかの対策が実施されている領域である。
- これらの要件を達成するために、自動瞬間湯沸かし器や、特定の水処理等々と同様に、0.2 μm 膜からなる末端におけるマイクロフィルター使用を提案している。

イギリス Yorkshireガンネットワークのガイドライン

- POUフィルターは、病院における免疫不全患者に飲料水を提供する方法として最適である、と述べている。



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

厚生労働省告示第二百六十四号

第一 レジオネラ症の発生を防止する対策の基本的考え方

一 レジオネラ症の発生を防止する対策の基本は、レジオネラ属菌が繁殖しやすい状況をできるだけなくし、これを含むエアロゾルの飛散を抑制する措置を講ずることである。特に、多数の者が利用する公衆浴場、宿泊施設、旅客船舶等の施設又は高齢者、新生児及び免疫機能の低下を来す疾患にかかっている者が多い医療施設、社会福祉施設等においては、入浴設備、空気調和設備の冷却塔及び給湯設備における衛生上の措置を徹底して講ずることが重要である。

新版レジオネラ症防止指針

平成21年 財団法人 ビル管理教育センター

感染危険度のスコア化

1. 菌の増殖とエアロゾル化の要因

- － 給湯水など 1点
- － 浴槽水、シャワー水、水景用水など 2点
- － 冷却塔水、循環式浴槽水など 3点

2. 環境・吸入危険度

- － 開放的環境(屋外など) 1点
- － 閉鎖的環境(屋内など) 2点
- － エアロゾル吸入の危険性が高い環境 3点

3. 人側の要因

- － 健常人 1点
- － 喫煙者、慢性呼吸器疾患患者、高齢者、乳児など 2点
- － 臓器移植後の人、白血球減少症患者、免疫不全患者など 3点

スコア例:

ICUのシャワー

①2点、②2点、③3点 計7点

NICUの給湯水

①1点、②2点、③3点 計6点

新版レジオネラ症防止指針

平成21年 財団法人 ビル管理教育センター

スコア 細菌検査の回数

- 5点以下 常に設備の適切な維持管理に心がけ、必要に応じて細菌検査を実施
- 6～7点 常に設備の適切な維持管理に心がける。**1年に最低1回**の細菌検査を実施する。水系設備の再働時には細菌検査を実施する。
- 8点以上 常に設備の適切な維持管理に心がける。**1年に最低2回**の細菌検査を実施する。水系設備の再働時には細菌検査を実施する。

検査の結果レジオネラ属菌が検出された場合の対応

- ① エアロゾルを直接吸引する可能性の低い人工環境水
10²CFU/100mL以上のレジオネラ属菌が検出された場合には、直ちに菌数を減少させるため、清掃、消毒等の対策を講じる。また、対策実施後は、検出菌数が検出限界以下(10CFU/100ml未満)であることを確認する。
- ② 人がエアロゾルを直接吸引する恐れのあるもの(浴槽水、シャワー水等)
レジオネラ属菌数の目安値を**10CFU/100ml未満**とする。レジオネラ属菌が検出された場合には、前項と同様に対処する。

一般施設におけるレジオネラ属菌

- 古畑勝則他：給湯水におけるレジオネラ汚染とその対策.
日本公衛誌 41: 1073-1083, 1994

試料	検査数	検出数	検出率	菌出菌数 (CFU/100mL)
瞬間式	20	0	0	
貯湯式	20	2	10.0	4
循環式	40	5	12.5	24~170

- Edagawa A et al., Detection of culturable and nonculturable Legionella species from hot water systems of public buildings in Japan. J Appl Microbiol. 105(6). 2104-2114, 2008
 - 大阪府内の病院以外の公共施設40施設のうち17施設(42.5%)でレジオネラ属菌が検出された

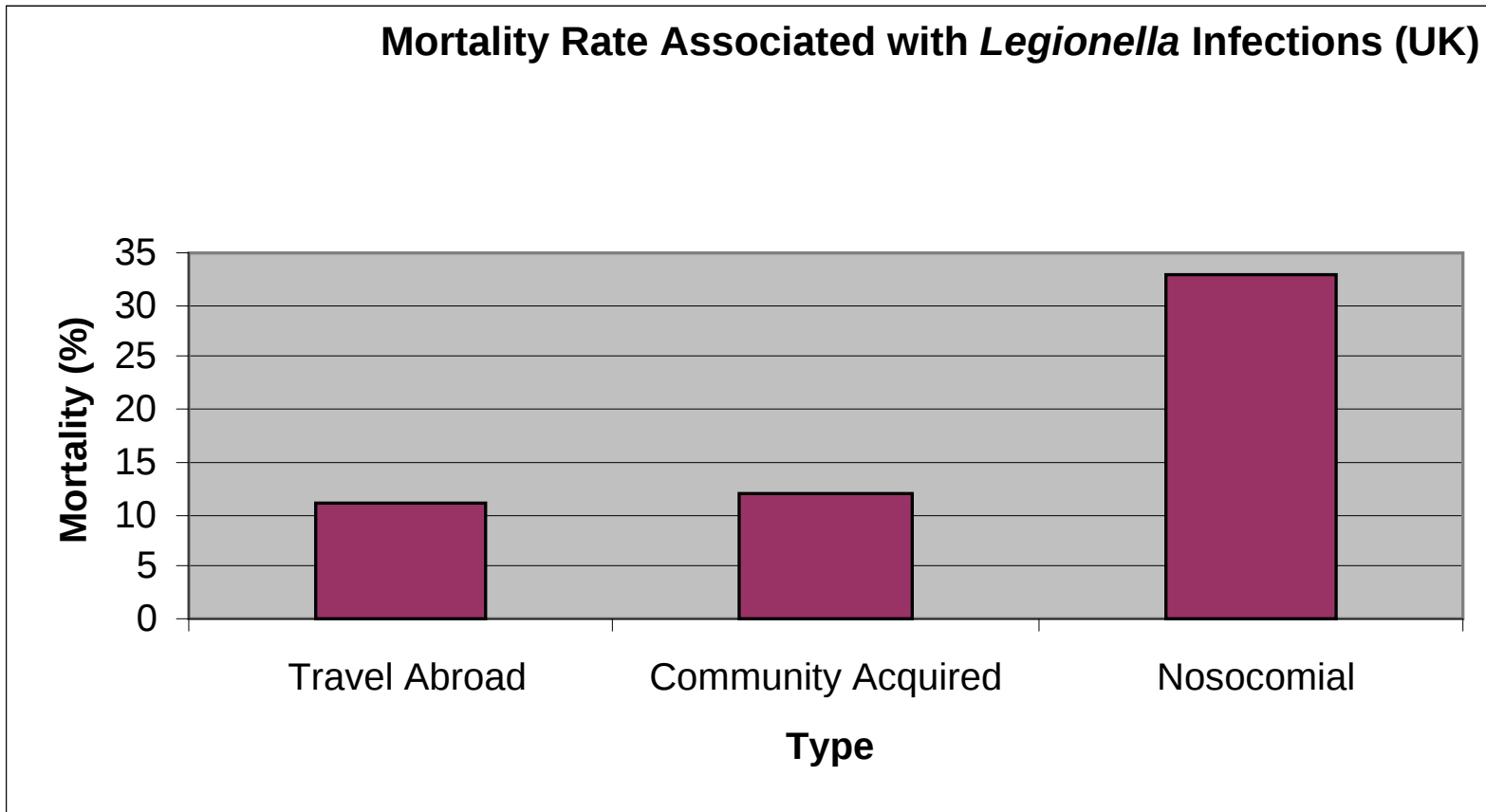
病院におけるレジオネラ属菌の実際

1. 宮本比呂志他:病院給湯設備におけるレジオネラ汚染とその除菌. 環境感染 19 (4):483-490, 2004
産業医科大学病院。シャワーヘッドや給湯栓からレジオネラ属菌を検出
2. 大湾知子他:感染予防対策の実際2) シャワーヘッドの交換(新生児室)と看護演習室の除菌の実際. 化学療法の領域 20 (4):620-622, 2004
琉球大学医学部保健学科基礎看護学教室。大学看護演習室のシャワー11ヶ所中9ヶ所からレジオネラ属菌を検出
3. 岡山大学医学部附属病院感染対策予防委員会:岡山大学附属病院におけるレジオネラ症に関する調査報告書(平成15年).2003
給湯水が原因と思われる院内感染発生。313ヶ所中21ヶ所でレジオネラ属菌が検出された。なお、3日間連続60℃の湯で3分間フラッシングを行い検出されなくなった。
4. 矢野知美他:病院内の給水・給湯水における微生物汚染調査. 環境感染 24 (5):303-311, 2009
検査した19ヶ所の給水／給湯水のうち1ヶ所からレジオネラ属菌を検出。

国内における主な感染事例

発症年月	都道府県	施設・感染源	推定患者数(死亡数)
1990年12月	長崎	老人ホーム	2 (0)
1994年8月	東京	研修施設	45 (0)
1996年1月	東京	新生児病棟	4 (1)
1996年6月	岩手	温泉施設	3 (0)
1998年8月	東京	老人ホーム	12 (1)
2000年1月	広島	新生児病棟	2 (0)
2000年2月	静岡	温泉施設	23 (2)
2000年6月	茨城	温泉施設	45 (3)
2002年6月	福島	乳児室	8 (0)
2002年7月	宮崎	温泉施設	295 (7)
2002年7月	山形	温泉施設	2 (0)
2002年8月	鹿児島	温泉施設	9 (1)
2003年1月		客船の入浴施設	3 (0)
2003年9月	京都	クーリングタワー	2 (0)
2006年12月	新潟	ジャグジー風呂	2 (0)
2008年1月	兵庫	温泉施設	2 (0)

Mortality Rates



透析液と細菌汚染



透析液水質確保加算

J038 人工腎臓(1日につき)

9. 別に厚生労働大臣が定める施設基準に適合しているものとして地方厚生局長等に届け出た保険医療機関において行った場合には、透析液水質確保加算として、所定点数に10点を加算する。

透析液水質確保加算の施設基準 (保医発0305第3号)

- (1) 関連学会(日本透析医学会※)から示されている基準に基づき、水質管理が適切に実施されていること。
- (2) 透析機器安全管理委員会を設置し、その責任者として専任の医師又は専任の臨床工学技士が1名以上配置されていること。

届出に関する事項

透析液水質確保加算の施設基準に係る届出は別添2の様式49の3を用いること。

また、透析機器安全管理委員会において作成した透析機器及び水処理装置の管理計画を添付すること。



透析液水質基準

	標準透析液	超純粋透析液	オンライン補充液
透析液水質基準2008 (日本透析医学会) ¹⁾	<100CFU/mL <0.5EU/mL	<0.1CFU/mL <0.001EU/mL	<10 ⁻⁶ CFU/mL <0.001EU/mL
透析液清浄化ガイドライン Ver. 1.07 (日本臨床工学技士会) ²⁾	<1CFU/mL <0.001EU/mL	—	注射用水の水質レベル
第15改正日本薬局方	—	—	無菌 ³⁾ 検出感度未満 ³⁾
ISO11663:2009	<100CFU/mL <0.5EU/mL	<0.1CFU/mL <0.03EU/mL	無菌 発熱性物質を含まない

上段:生菌数、下段:エンドトキシン値

1) 日本透析医学会雑誌. Vol.41(3). 159-167. 2008、2) 日本臨床工学技士会ホームページより
(2010年4月時点)、3) 注射剤に関する要求事項から改変・引用

透析における清浄化の必要性

1. 細菌由来のエンドキシンは透析膜を通過

- 透析液中で増殖した細菌の産生物は、**透析膜を通過**する。
 - Jones DM, et al., Brit.Med. J., 3, pp. 135-137, 1970
 - Kidd EE, Brit. Med. J., pp. 880-882, 1964
- 透析液中で増殖したグラム陰性菌はエンドキシンを産生し、透析患者の**抗エンドキシン抗体産生を刺激**する。
 - Gazenfeldt-Gazit E. and Eliahou HE. , Israel J. Med. Sci., 5, pp. 1032-1036, 1969
 - Raij L, et al., Kidney Int., 4, pp. 57-60, 1973
- 10^3 - 10^4 CFU/mLの*Pseudomonas*属を含む透析液で透析すると**血清中のエンドキシン濃度が上昇**する。
 - Vanholder R, et al., Nephrol. Dial. Transplant, 7, pp. 333-339, 1992

2. ハイフラックス膜はエンドキシンのリスクがより高い

- ハイフラックス膜では従来型の膜と比較して抗エンドキシン抗体濃度が高くなる。
 - Yamagami S, et al., Int. J. Artif. Organs, 13, pp. 205-210, 1990
- ハイフラックス膜は発熱反応に関する有意なリスク因子である。
 - Tokars JI, et al, ASAIO J., 42, pp. 219-229, 1996

次に続く

3. 透析液の清浄化の臨床効果報告

1. $\beta 2$ -ミクログロブリン濃度を減少

- Quellhorst E, Nieren u Hochdruck, 27, pp. 35-41, 1998
- Ouseph et al., Nephrol. Dial. Transplant., 22, pp. 2269-2275, 2007

2. 炎症反応および酸化ストレスマーカーの減少

- Schindler R, et al., Nephron, 68, pp. 229-233, 1994
- Sitter T, et al., Nephrol. Dial. Transplant, 15, pp. 1207-1211, 2000
- Arizono K, et al., Blood Purif., 22 (Suppl 2) pp. 26-29, 2004
- Izuhara Y, et al., Am. J Kidney Dis., 43, pp. 1024-1029, 2004
- Furuya R et al., Blood Purif., 23, pp. 311-316, 2005

3. $\beta 2$ -ミクログロブリン関連アミロイド症の発生を減らす

- Baz M, et al., Int. J. Artif. Organs, 14, pp. 681-685, 1991
- Kleophas W, et al., Nephrol. Dial. Transplant., 13, pp. 3118-3125, 1998
- Schiff H, et al., Nephrol. Dial. Transplant, 15, pp. 840-845, 2000

4. 残腎機能のよりよい維持

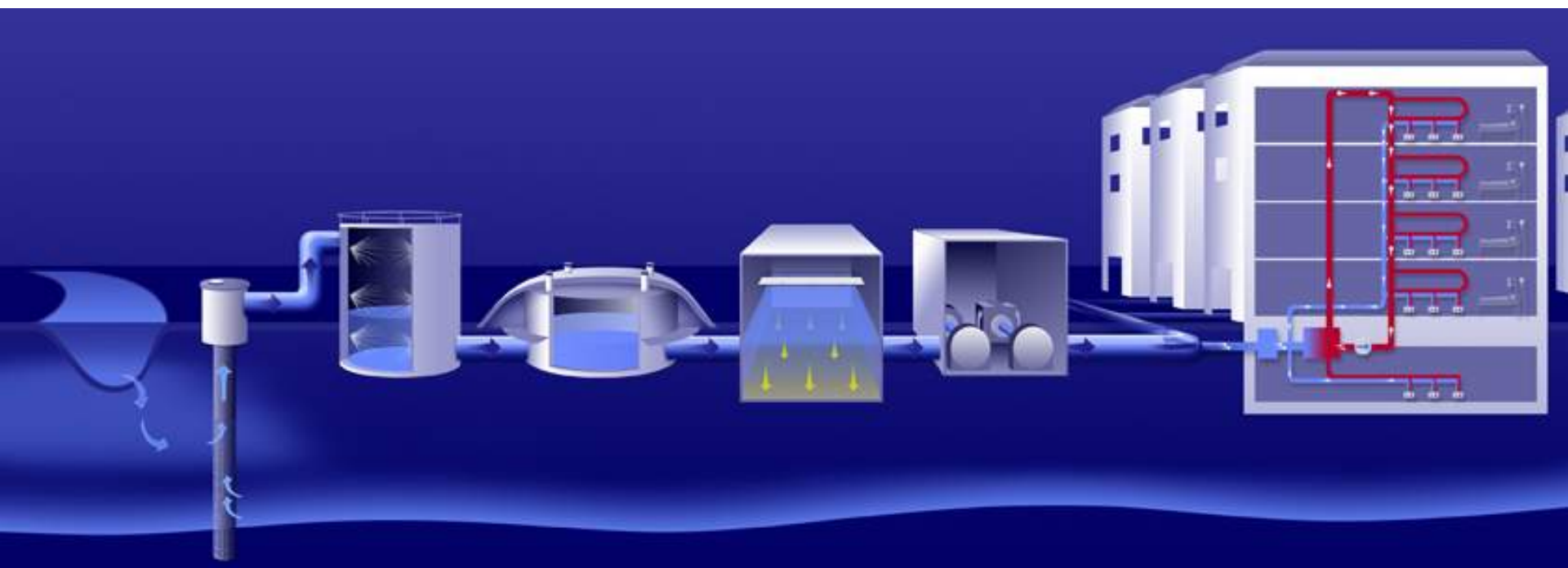
- McKane W, et al., Kidney Int., 61, pp. 256-265, 2002
- Schiff H, et al., Nephrol. Dial. Transplant, 17, pp. 1814-1818, 2002

5. 栄養状態の改善

- Schiff H, et al., Nephrol. Dial. Transplant, 16, pp. 1863-1869, 2001
- Arizono K, et al., Blood Purif., 22 (Suppl 2) pp. 26-29, 2004
- Ouseph R, et al., Nephrol. Dial. Transplant., 22, pp. 2269-2275, 2007

バイオフィルム

水環境から細菌が分離される理由

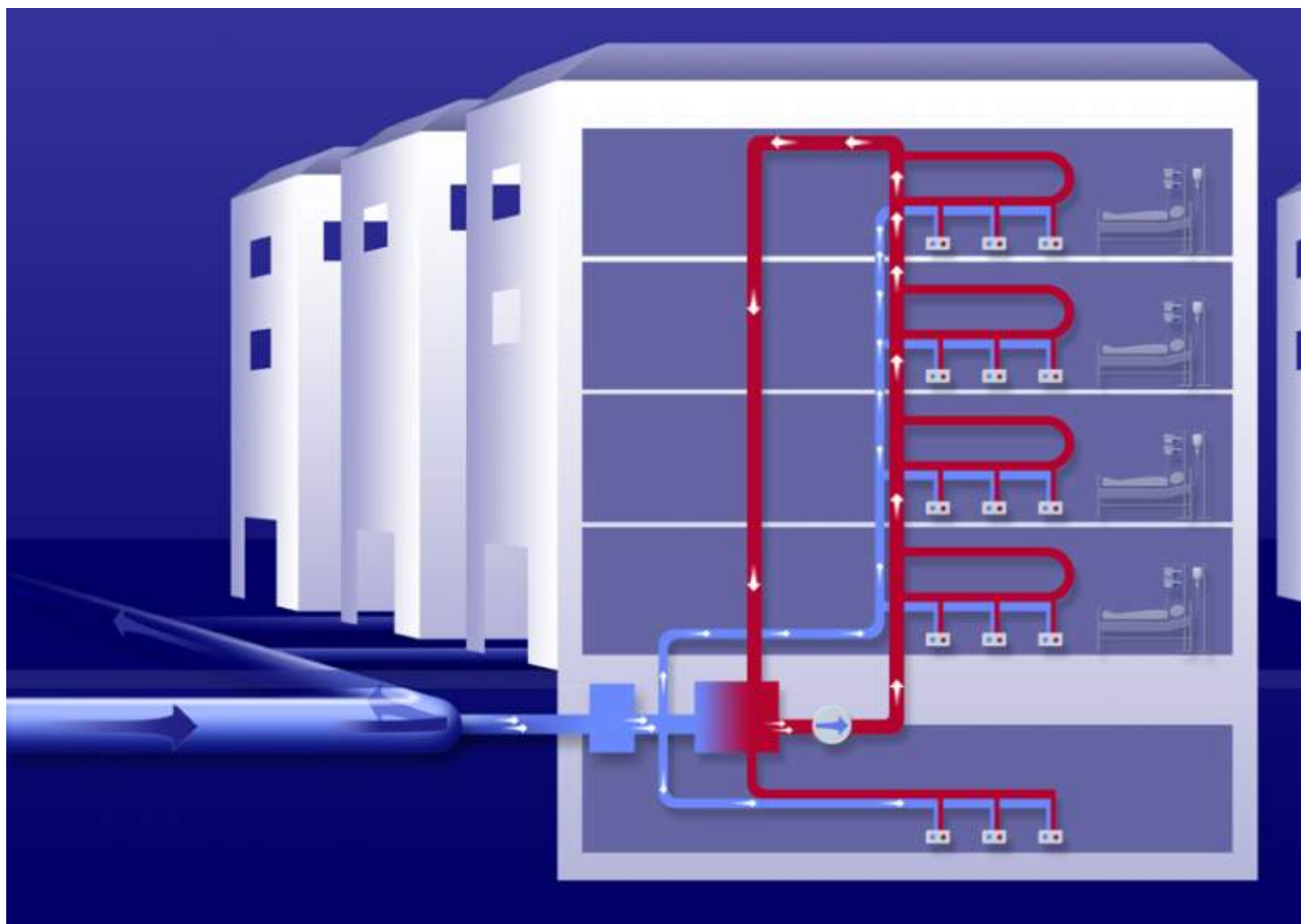


水源

水処理工場

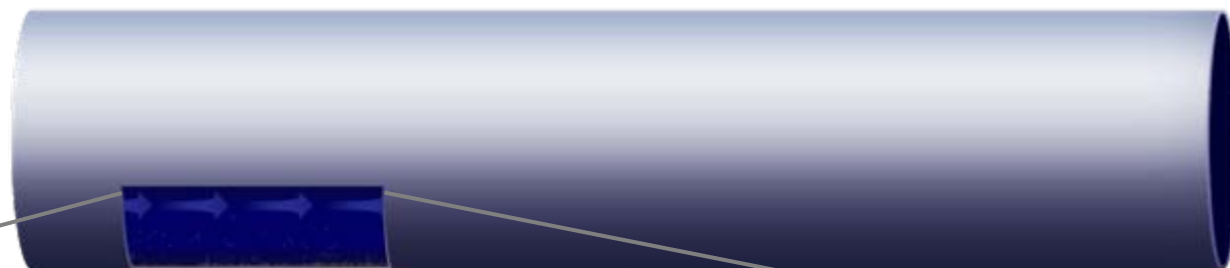
大規模施設

施設内配管とバイオフィルム



配管内におけるバイオフィルム形成の仕組み

バイオフィルムは段階的に形成される

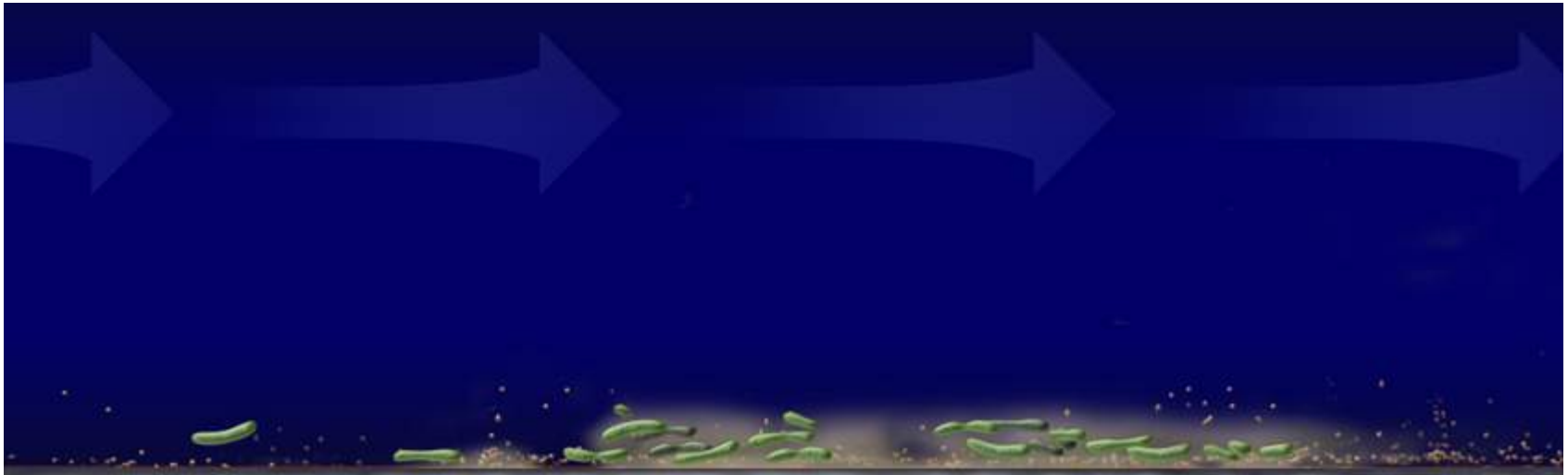




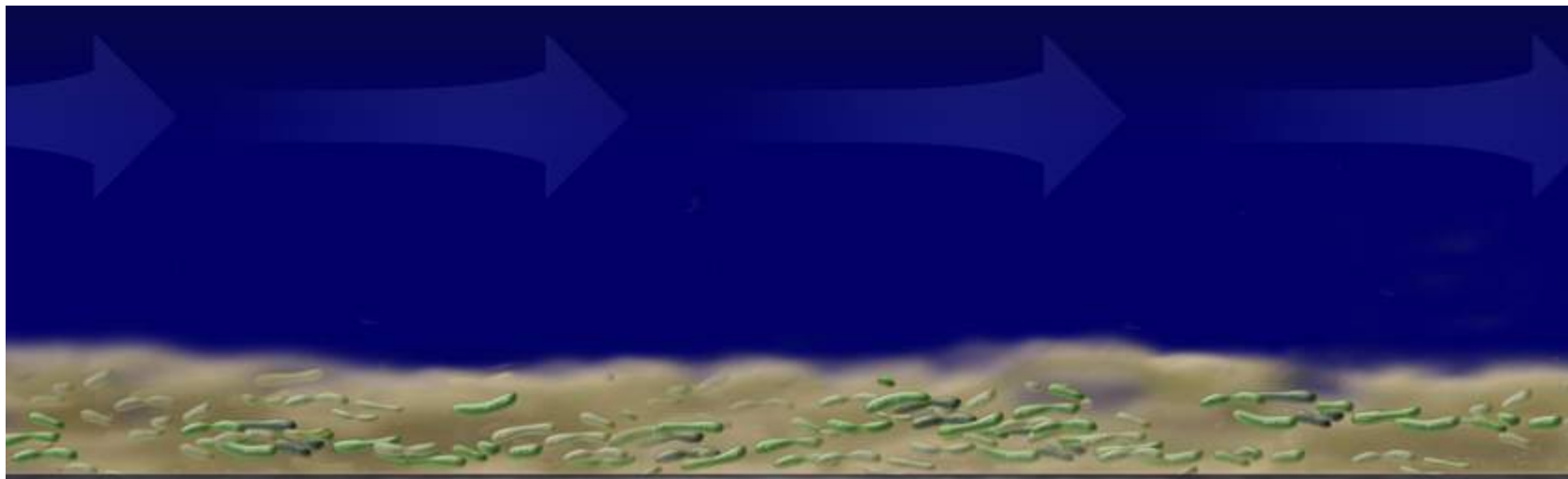
第1段階： 水配管の内側表面に**粒子が吸着する**（コンディショニング）



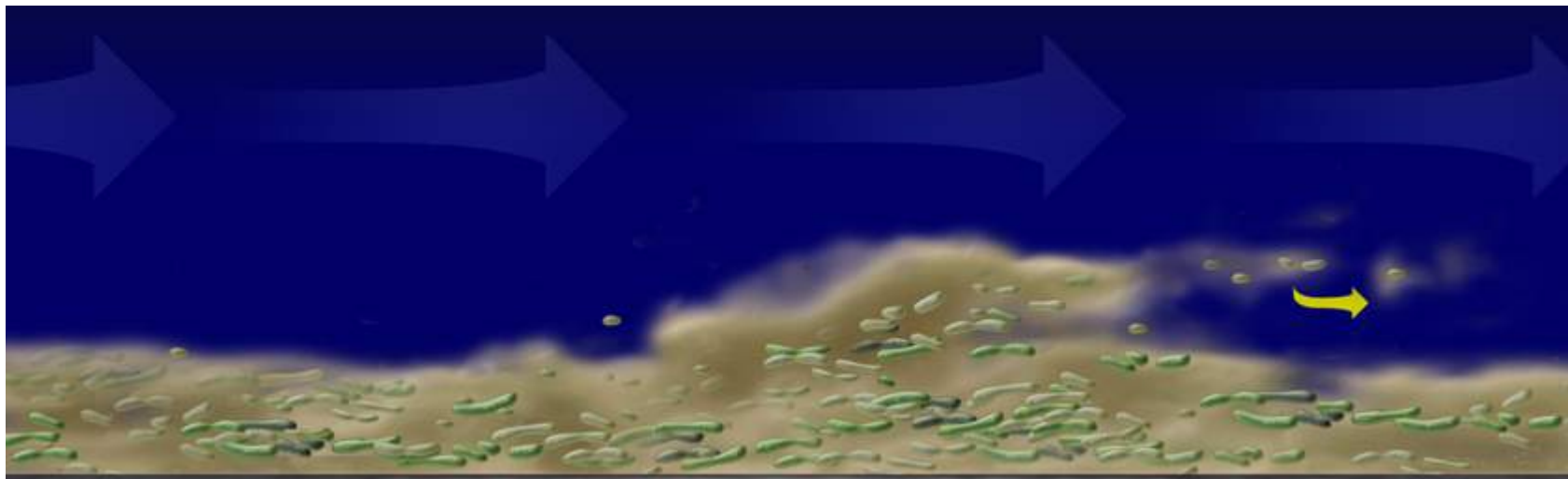
第2段階： コンディショニングされた表面に細菌が付着する



第3段階: 付着した細菌が**粘着性の細胞外基質**を分泌する。
これが短期間で繰り返される。
→バイオフィルムの形成の初期段階



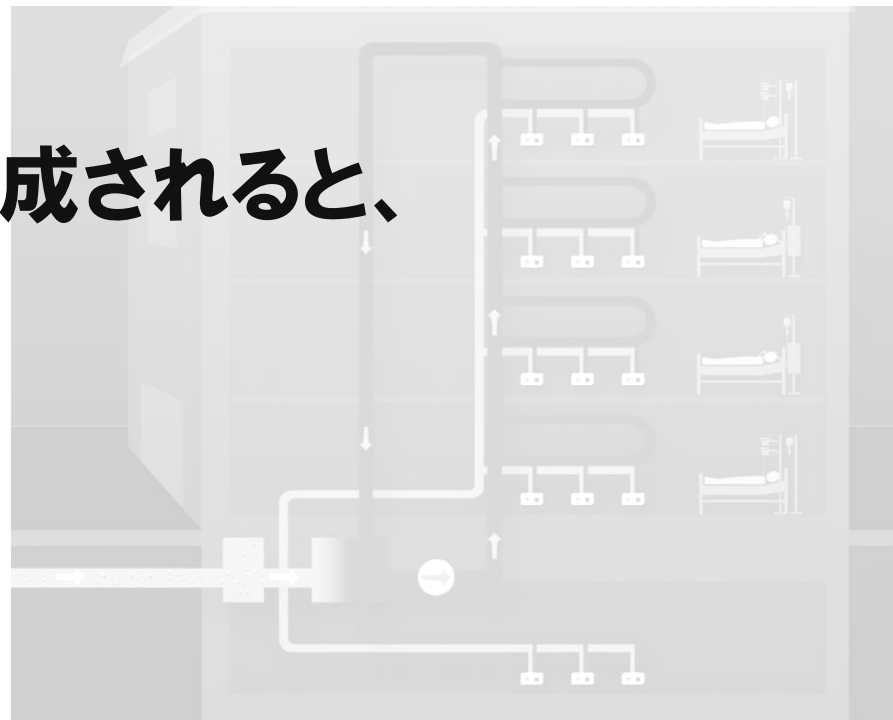
第4段階: バイオフィルムの大きさが増大し、その中で微生物を保護する



第5段階: 水流によって**バイオフィルムの一部が剪断される**

大規模施設におけるバイオフィルムの形成

- 大規模施設における複雑な水供給配管では、バイオフィルムの形成を避けられない。
(配管の長さは50kmにも達する)
- 一度バイオフィルムが形成されると、除去することは困難



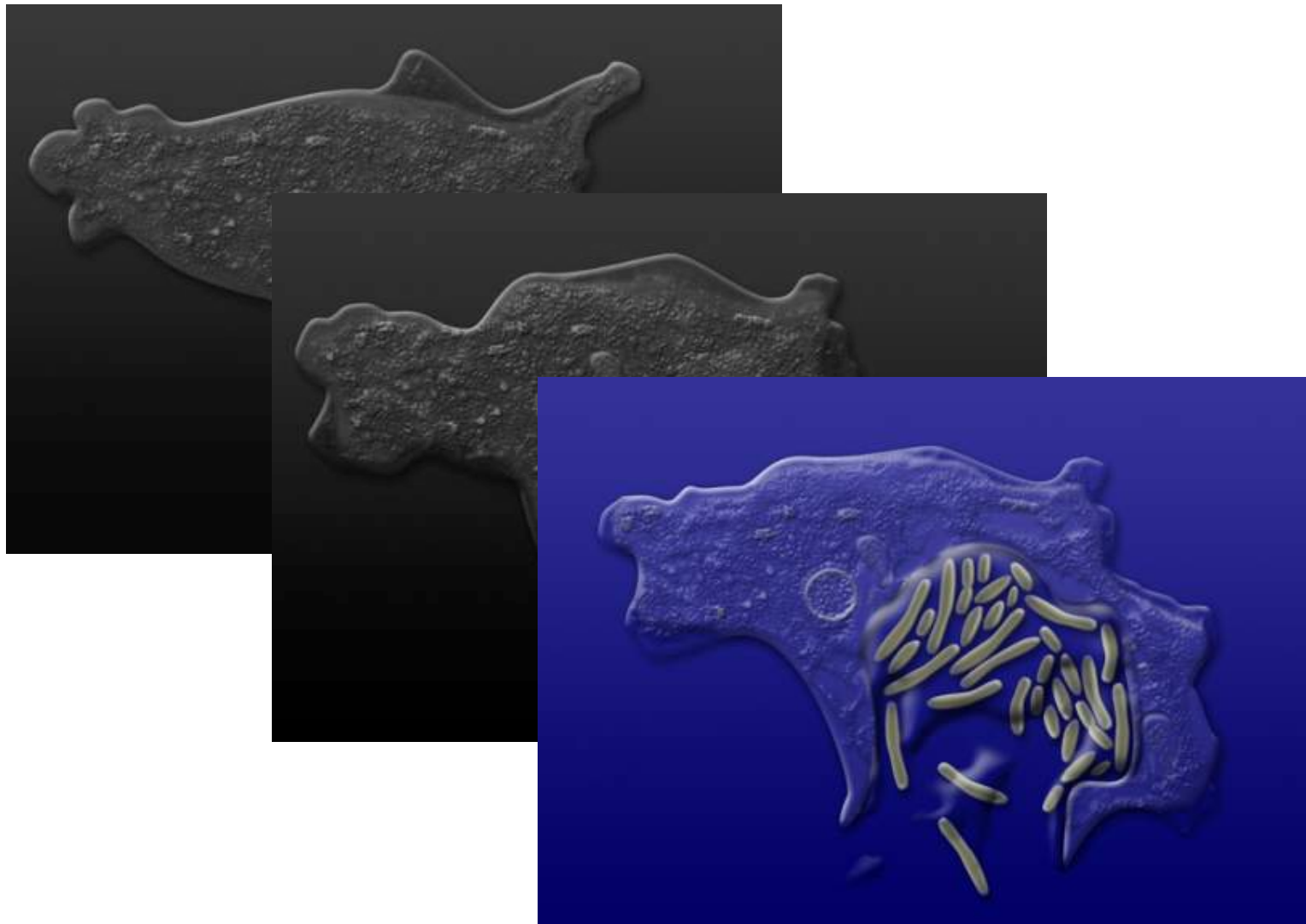
レジオネラ属菌と原生動物の関係

- アメーバ等に取り込まれたレジオネラ属菌は、それらの中で増殖することができる。
- 寄生したレジオネラ属菌は、遊離状態と比較して外界からの有害作用から保護されている。









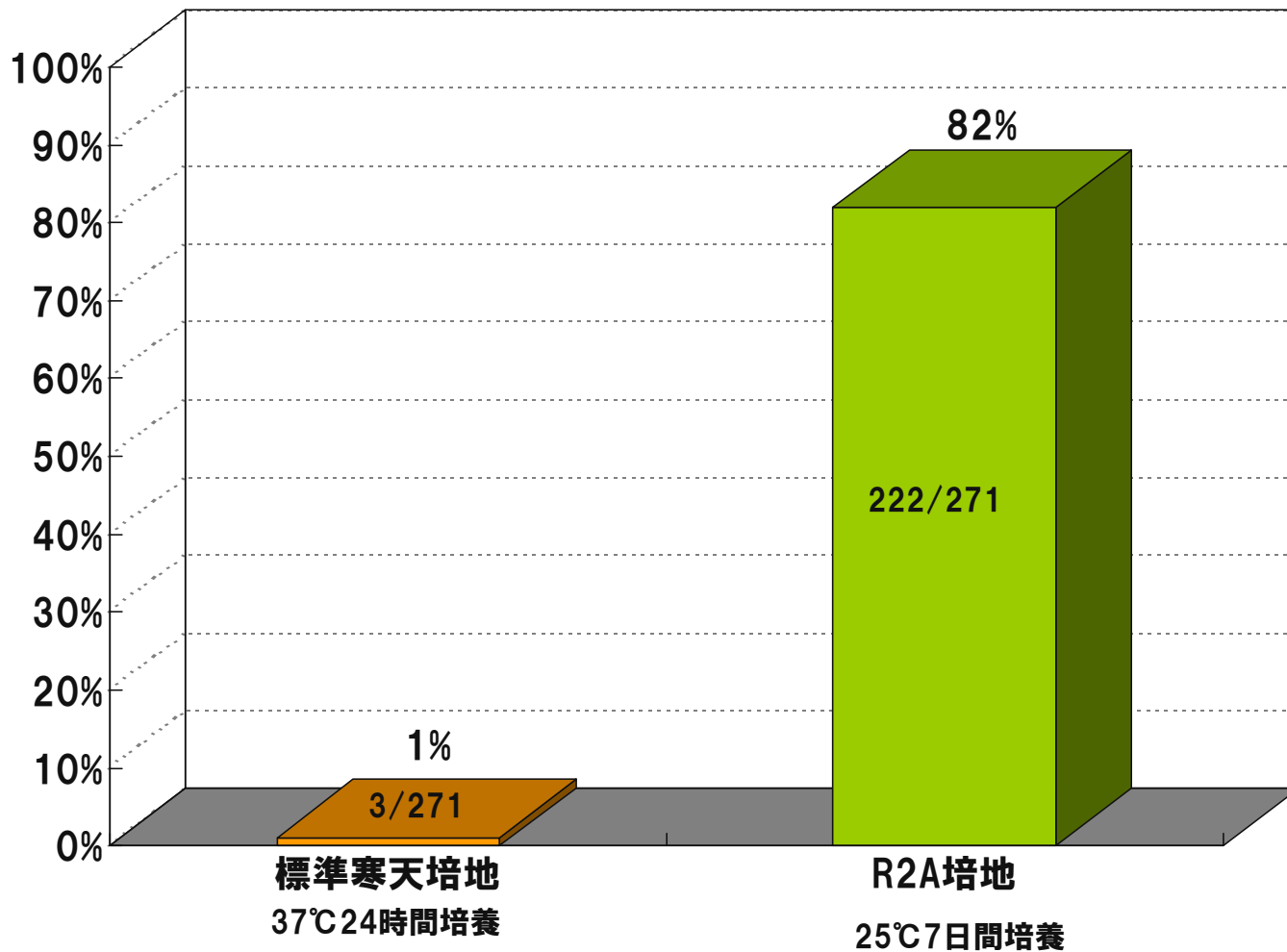
水環境からの細菌培養



水道法

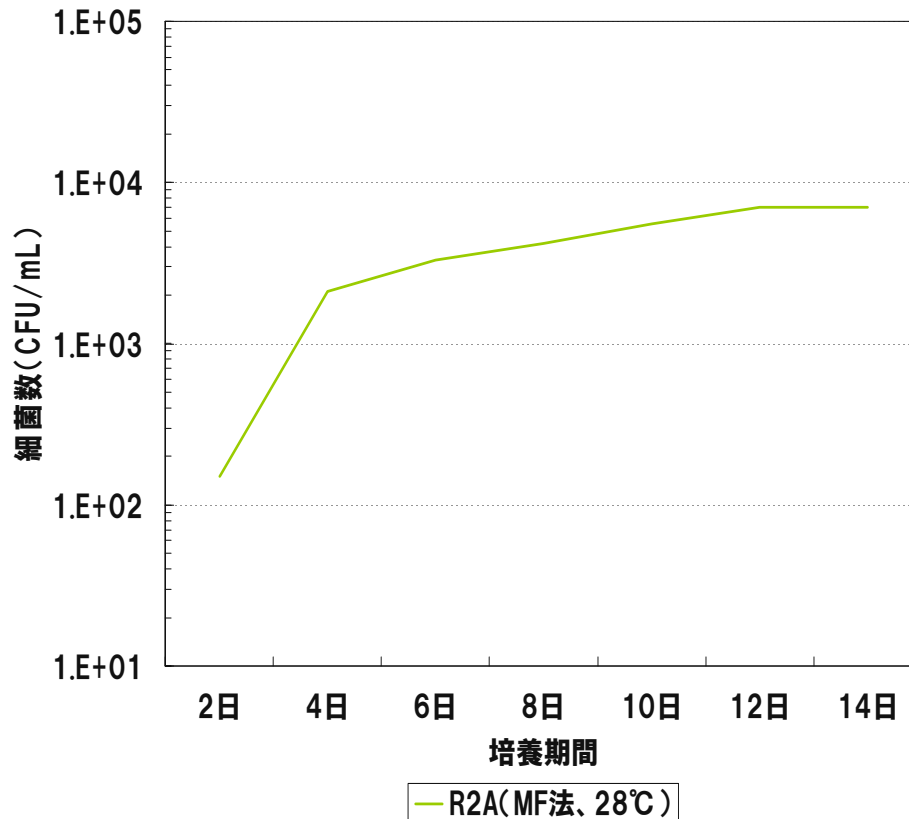
対象菌	方法	基準	分類
一般細菌	標準寒天培地の混釈法を用い35～37℃で24時間培養	100cfu/mL以下	水質基準 (必須)
大腸菌	MMO-MUG培地等(液体)を用い35～37℃で24時間培養	検出されない	水質基準 (必須)
従属栄養細菌	R2A寒天培地の混釈法を用い19～21℃で1週間培養	2000cfu/mL以下	管理目標 (任意)

培地の違いによる細菌検出の違い



病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況

培養期間



- 細菌数は、14日培養時に最も多い。
- しかし、培養期間は、より短期間であることが望まれる。
- 短期間で、高精度に細菌数を監視する目的において、5～7日の培養が適切

(考察より改変)

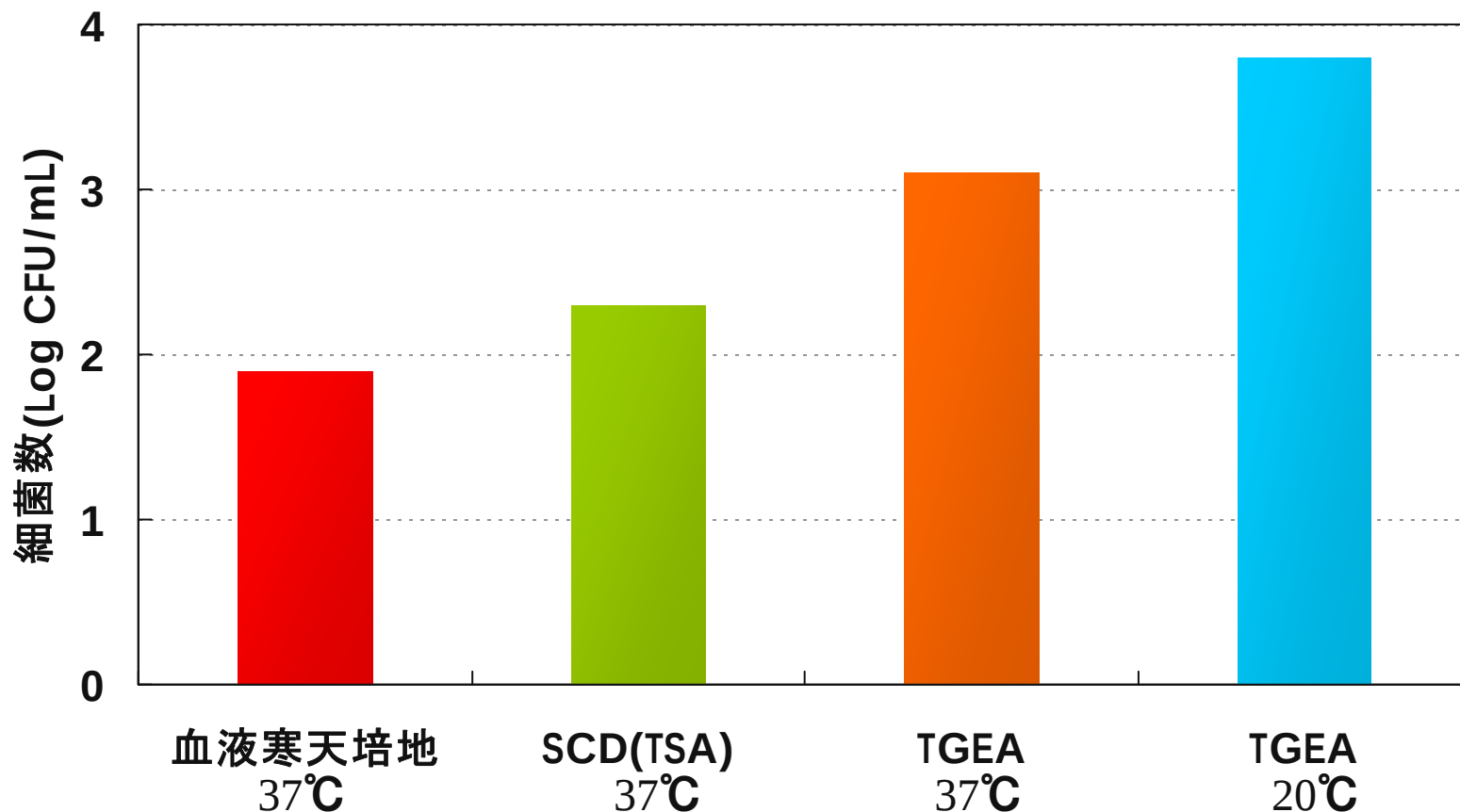
図. 水サンプルにおける培養期間と細菌数の推移

Reasoner DJ, Geldrich EE. Appl. Environ. Microbiol. 19985;49:1-7

- 工程管理における検査においては、利便性も考慮して培養期間が決められる。
- 透析液における培養では1週間(168時間)が採用されている。

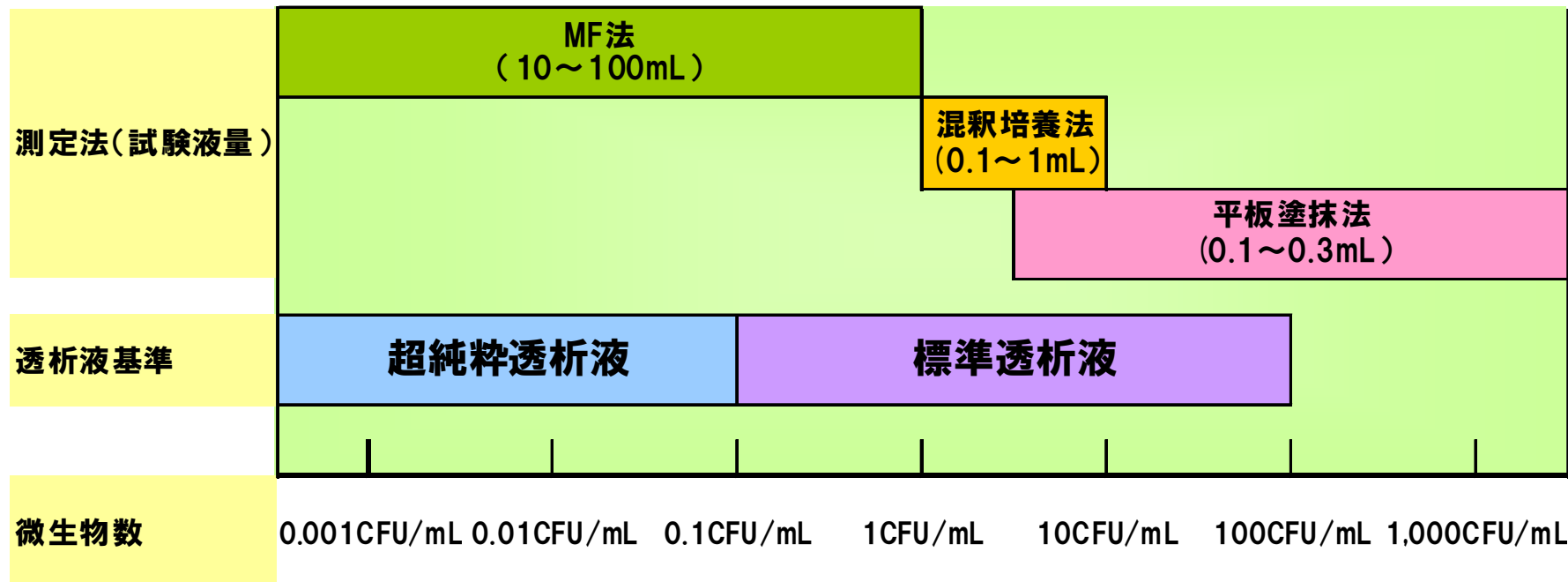
培地と培養温度

透析液培養時の生菌数と培地・温度の関係



- ISOでは、低温域(20°C)でTGEA培地等を用いた培養が推奨されている。

培養法の種類



- 測定法は試験液の微生物数に応じて使い分ける。
- 高度に清浄化された透析液等は、MF法が適用となる。

透析液基準(ISO11663)

分 類	培養法	検体量 (mL)	基 準 (CFU/mL)	エンドトキシン (EU/mL)
標準透析液	平板塗抹法	0.1～0.3	<100	<0.5
	混釈培養法	0.1 ～1		
超純粋透析液 ※ 補充液の供給液としても用いられる	メンブレン フィルター法	10～1,000	<0.1	<0.03
オンライン 補充液	バリデーションに従う		滅菌	発熱性物質 無し

培養方法: **TGEA、R2A**、もしくは同等の培地を用い、
17～23℃で168時間(7日間)培養する。

レジオネラ属菌の検査方法

- **採取**
 - 滅菌容器(ガラス、ポリエチレン製など)に採取。
 - 容器は満杯にしない。
- **採取量**
 - 100mL以上(検査制度 最低10CFU/100mL)
- **搬送と保存**
 - 塩素が添加されている検水には25%チオ硫酸ナトリウムを1/500量加えて中和する。
 - 採取後2~5日以内に検査する。
 - 搬送する場合、6~18℃。直射日光と熱を避ける。
 - 0~6℃では壁面に付着した菌が培養不能になる可能性が高い。
 - 20℃以上では他の菌が増殖してしまう。
- **レジオネラ属菌数が 10^2 CFU/100mLと予測される場合は検水を濃縮する。**

検査法別検出限界

方法	接種検水量	検出限界
非濃縮、 非酸／熱処理検体	100 μ L接種	10CFU/100mL
冷却遠心濃縮法	100 μ L接種	10CFU/100mL
フィルター濃縮法 (酸処理)	100 μ L×2枚接種	10CFU/100mL
フィルター濃縮法 (熱処理)	100 μ L接種	10CFU/100mL
フィルター貼付法	100mLろ過	1CFU/100mL

ろ過濃縮法

検水500mL



ろ過(0.22 μ m)



フィルターを滅菌蒸留水5mL (100倍濃縮) 中で**1分間洗浄**



0.2M HCl・KClバッファー, pH2.2を等量加え(50倍濃縮)、**25℃で4分間おく**

Or

50℃で20分間加熱(100倍濃縮)



100 μ L (100もしくは50倍濃縮の1/10mL)をWY0 α 培地等に塗布(酸処理の場合は2枚)



37℃ 5-7日間 培養

感度

10CFU/100mL

フィルター貼付法

検水 100mL



感度

1CFU/100mL

0.2M HCl・KClバッファー, pH2.2を等量加え、
25℃で20分間おく



ろ過(0.45 μ m) (100倍濃縮)



フィルターをWY0 α 培地等に貼付



37℃ 5-7日間 培養

メンブレンフィルター法(MF法)製品例



マイクロファンネル

多数の検体を同時処理



37mmコーリティモニター

吸引装置の必要なし

メンブレンフィルター(MF)法とは

- フィルターの細菌保持能を利用し、大量の試料溶液を用いた高精度な検査を簡便に実現
- 1855年には既にレビュー論文に記載がある古典的な検査法
- 現在では、各国の薬局方、環境微生物検査法、そして透析液水質基準等に収載

CLARK HF, GELDREICH EE, JETER HL, KABLER PW. The membrane filter in sanitary bacteriology. Public Health Rep. 1951 Jul 27;66(30):951-77.

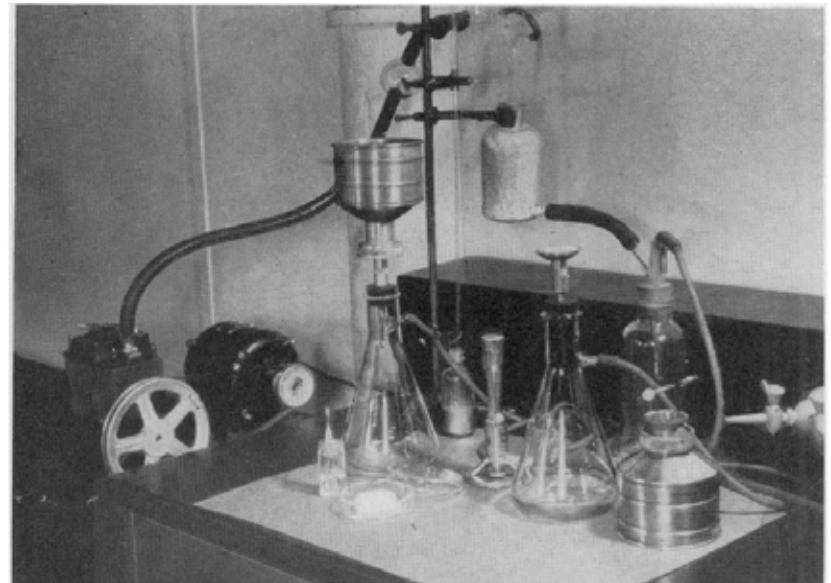
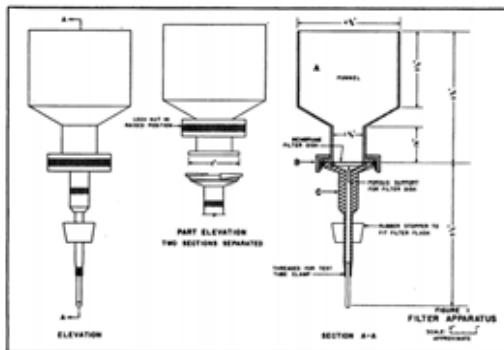


Figure 2. Filtration assembly.

MF法培養の仕組み

透析液等をろ過



液体培地を注入



培養

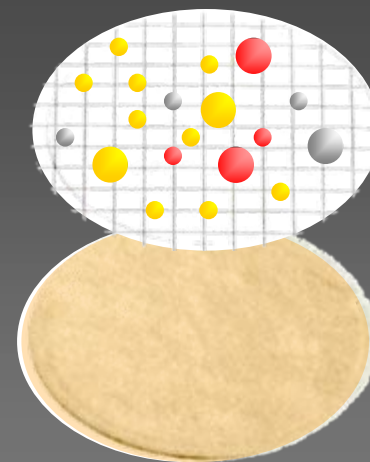
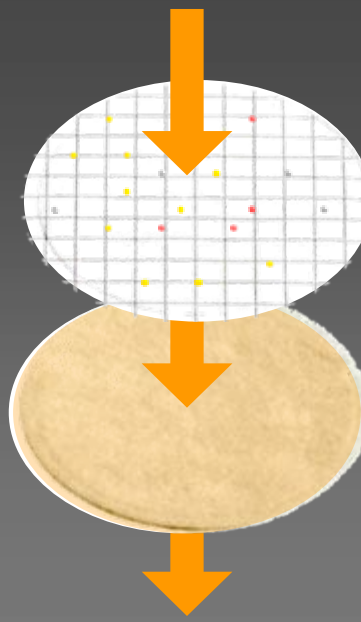
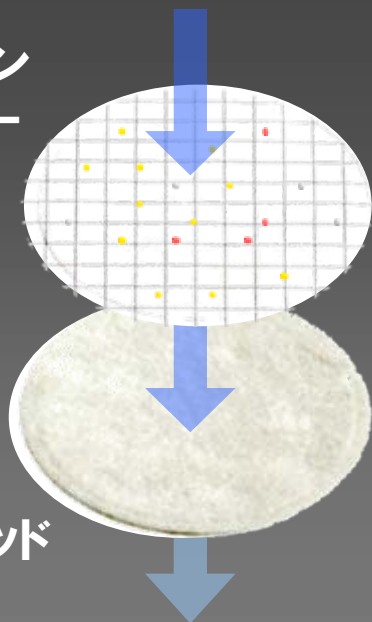
細菌をメンブレン上に
に捕捉

液体培地を吸収
パッドに吸収

捕捉された細菌が
培地成分により増殖し、
コロニーを形成

メンブレン
フィルター

吸収パッド



適切な検体量

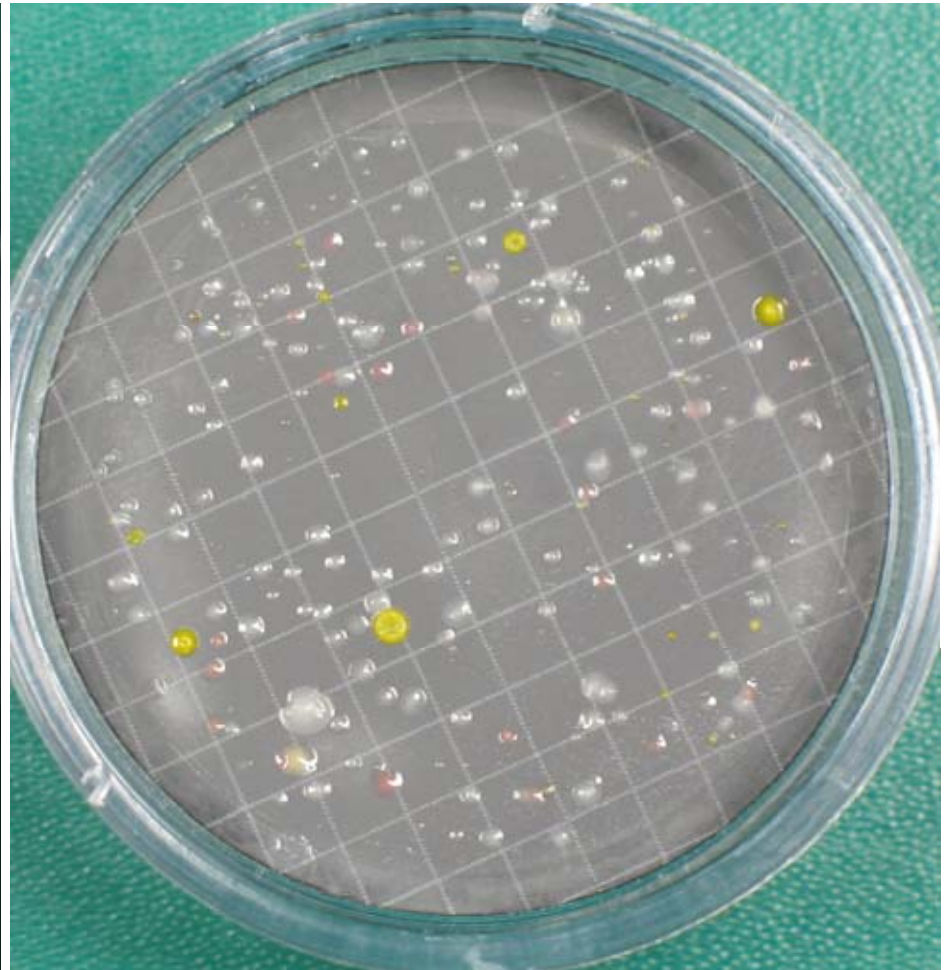
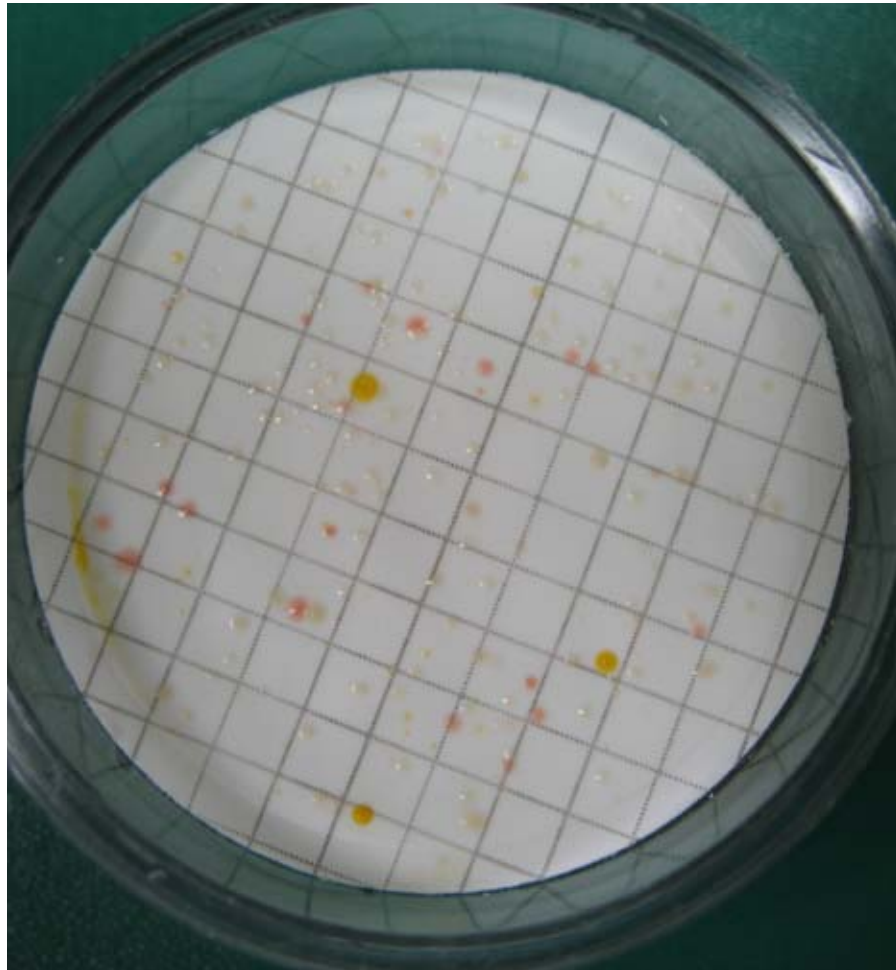
検体量 菌汚染濃度	0.1 mL	1 mL	10 mL	100 mL	1000 mL
0.01 CFU/mL	ND	ND	ND	1	10
0.1 CFU/mL	ND	ND	1	10	100
1 CFU/mL	ND	1	10	100	+++
10 CFU/mL	1	10	100	+++	+++
50 CFU/mL	5	50	+++	+++	+++
100 CFU/mL	10	100	+++	+++	+++

0.1CFU/mL未満であることを高い信頼性で保証するには
100mL以上の検体量が望ましい。

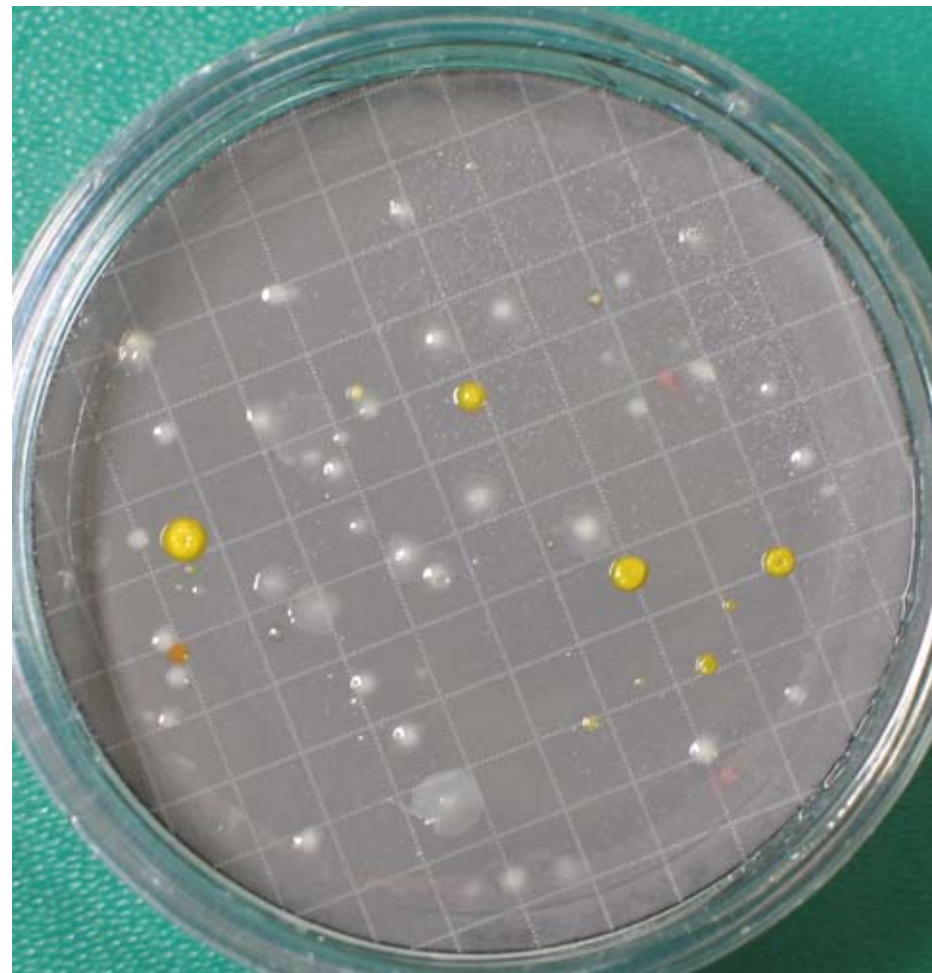
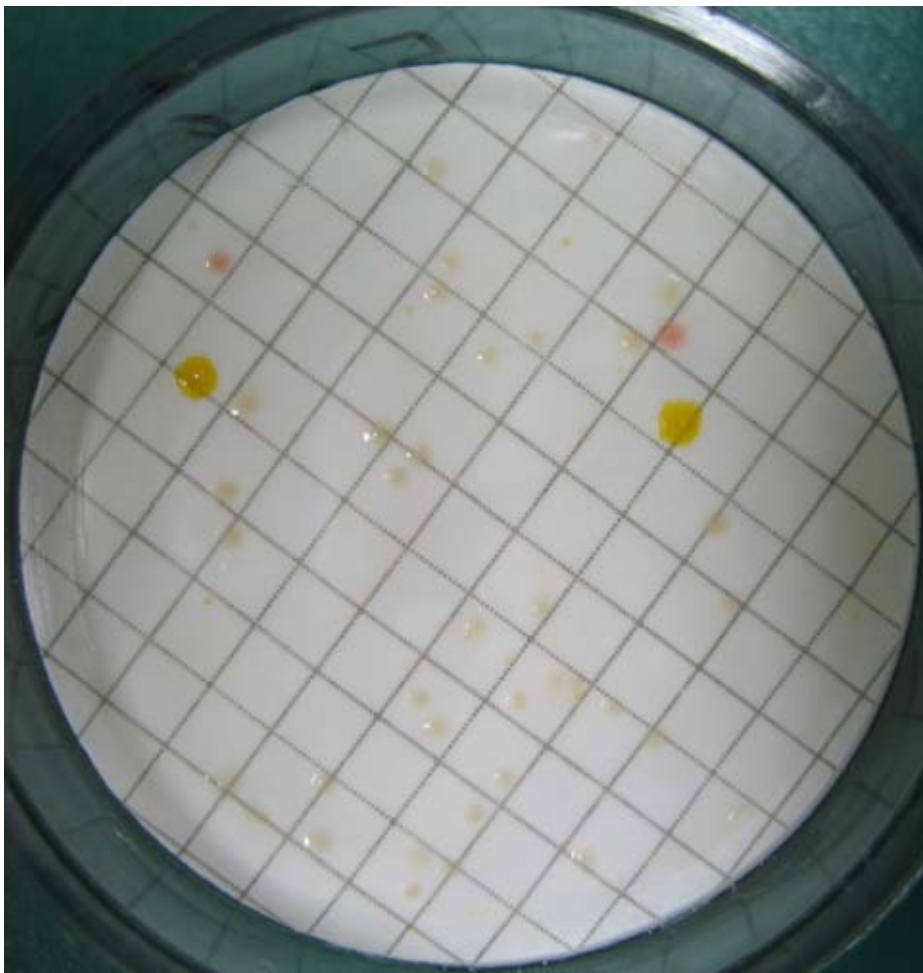
菌が多すぎる場合



水道水20mL



水道水5mL



ポール アクアセーフ ウォーターフィルター





AQ14F1S



AQ14F1R

Pall-Aquasafe™ AQF product family
all bacteria



AQF3



まとめ

- **水環境には、多くの菌が存在します。**
- **通常問題無いレベルの汚染も、易感染患者や暴露が大きい場合には問題となる場合があります。**
- **適切な培地、温度、方法で培養を行います。**
- **モニタリングにより水系システム内の菌の挙動を把握し、適切な対策を取ることが可能です。**