

5.5 調査-3

5.5.1 調査対象施設の概要

調査-3で、過酸化水素洗浄を行った施設は、施設Gが企業の社員寮、施設Hが温泉旅館である。両施設共に、仙台市内に建設されている洗浄の際は、両施設共にろ過材をろ過器から取り出した。

施設Gは寮室が約120室あり、現在約100名滞在している。カートリッジフィルタと石英斑岩を組み合わせたろ過装置が設置されている。浴槽は建物1階の屋内に設置されており、浴槽面積10.7㎡である。浴槽は、石を加工したもので仕上げている。浴槽水には市水を加温して使用している。施設Hには貸切り浴槽のほか、2つの大浴場それぞれに屋内浴槽と屋外浴槽（屋根付き露天浴槽）がある。今回、洗浄を行った浴槽は屋外にあり、自然石を積み上げ、浴槽面積は約16.2㎡である。ろ過方式は、塩化ビニルを加工したろ過材を利用した生物膜方式である。表5.5.1の泉質の温泉に、加水して浴槽水としている。

両施設共に、浴槽の消毒はトリクロロイソシアヌル酸錠剤を塩素供給装置に投入して自然溶解している。塩素供給装置はろ過器と並列に設置されているため、直接、ろ過以内部は消毒していない。施設Gは、平成16年5月12日～同年10月28日まで（但し9月6日～28日は除く）、二酸化塩素による消毒を実施した。

施設Gのカートリッジフィルタの交換と石英斑岩の水洗浄は、過酸化水素洗浄の1ヶ月前にあたる平成17年1月24日の日中に実施した。過酸化水素洗浄時の石英斑岩は写真5.5.1で、カートリッジフィルタの状態は写真5.5.2である。

表 5.5.1 施設Hの泉質

項目	値	備考
pH	8.0	
電気伝導率	280 mS/m	
全硬度	466 mg/L	(CaCO ₃)
Ca 硬度	160 mg/L	(CaCO ₃)
Mg 硬度	6 mg/L	(CaCO ₃)
酸消費量(pH4.8)	75 mg/L	(CaCO ₃)
塩化物イオン	780 mg/L	
硫酸イオン	130 mg/L	
シリカ	67 mg/L	
ナトリウム	410 mg/L	
カリウム	10 mg/L	



写真 5.5.1 施設Gの石英斑岩

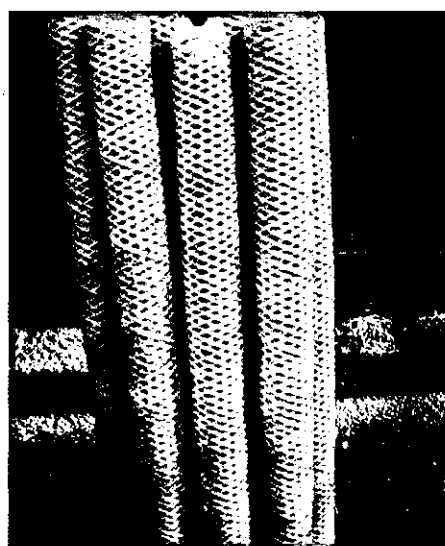


写真 5.5.2 施設Gのカートリッジフィルタ

ろ過器は試験用に透明の塩化ビニル製で作られているが、汚れが滲み込んでいる（写真5.5.3）。ろ過器内部の壁面には、生物膜状のぬめりはなかった。

前回のろ過循環システムの過酸化水素洗浄は、施設Gが平成13年1月23日の日中、施設Hが平成13年4月2日の深夜から翌4月3日早朝に掛けて実施した。共に前回の過酸化水素洗浄から、約4年経過した。

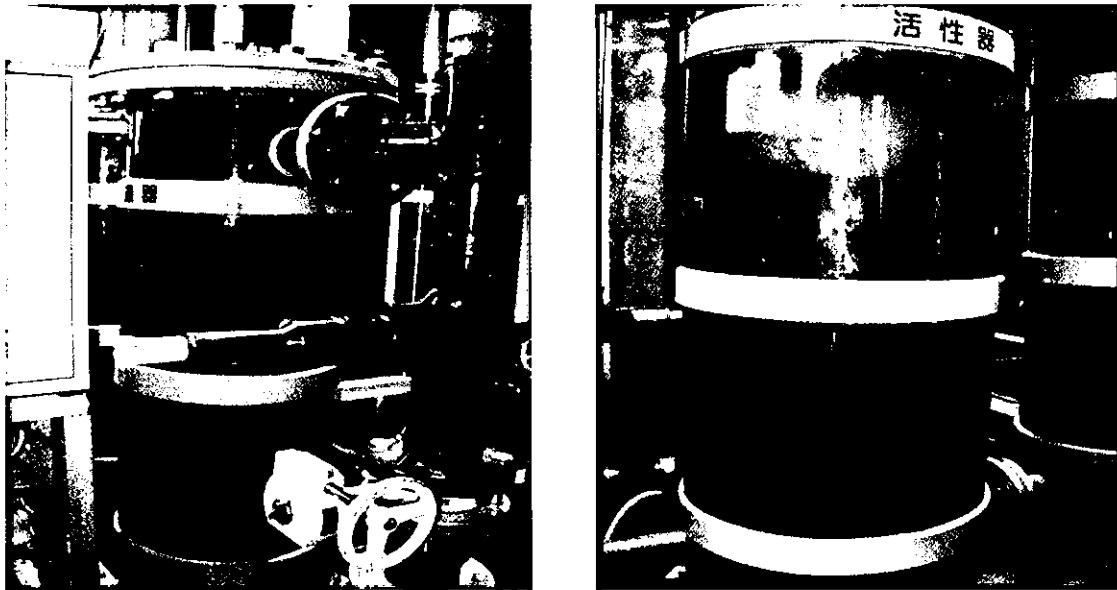


写真 5.5.3 施設Gのろ過器の外観
(左側がカートリッジフィルタ容器、右側が石英斑岩容器)

5.5.2 調査年月日

施設G・・・平成17年2月24日（木） 8:30～16:00

施設H・・・平成17年2月24日（木） 22:00～25日（金） 4:00

5.5.3 過酸化水素洗浄の状況

過酸化水素の実際の洗浄濃度は、施設Gが約4.2%、施設Hが約1.6%であった。施設Gでは、過酸化水素による洗浄は約2時間実施したが、浴槽内や透明のろ過器での発泡は確認されなかった（写真5.5.4）。洗浄後、過酸化水素分解酵素を投入して、発泡が起きた（写真5.2.5）。発泡による汚れの変化はほとんど見られず、発泡が生物膜の剥離に寄与するとは考えにくい。



写真 5.5.4 施設Gの過酸化水素洗浄後

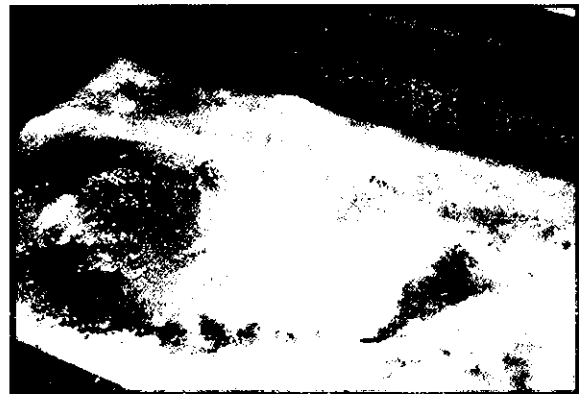


写真 5.5.5 施設Gの過酸化水素中和後

一方、施設Hは温泉成分（表 5.5.1）と過酸化水素とが反応して、細かい発泡が見られた（写真 5.5.6）。循環系統内でも発泡が発生したと推測され、過酸化水素投入から 20～30 分程度で浴槽水が循環できなくなった。その後、ポンプを停止した状態で約 1 時間 30 分過酸化水素を含んだ水を停滞させた。分解酵素投入後の状況が、写真 5.5.7 である。

施設Gの過酸化水素洗浄前後の内視鏡による写真は、洗浄前吐水側が写真 5.5.8、洗浄前吸込側が写真 5.5.9、洗浄後吸込側が写真 5.5.10、吐水側洗浄後・中和後が写真 5.5.11、吸込側洗浄後・中和後が写真 5.5.12 である。鋼管の錆やコンクリートの垂れ等の生物膜以外の付着物も見られるが、洗浄により生物膜のほとんどが剥離できた。施設Hの内視鏡写真は、洗浄前吐水側が写真 5.5.13、洗浄前吸込側が写真 5.5.14、洗浄後・中和後吐水側が写真 5.5.15 である。循環できなかったためか、過酸化水素濃度が低かったためか、温泉成分も付着していたためか、あるいは付着量が多かったためなどの要因は特定できないが、目視での感覚では半分程度しか剥離できなかった。温泉を使っている浴槽系統での生物膜剥離作業では、水道水や飲料水の水質に準拠した井水のみを使用している浴槽系統に、過酸化水素濃度や絶対量をどの程度割増すべきか考察する必要がある。

高性能な内視鏡を使って撮影した断片的な写真を見て、生物膜なのか、その他の残渣物を後日判断することは困難である。実際の現場に居合わせて、内視鏡による画像による確認が重要である。

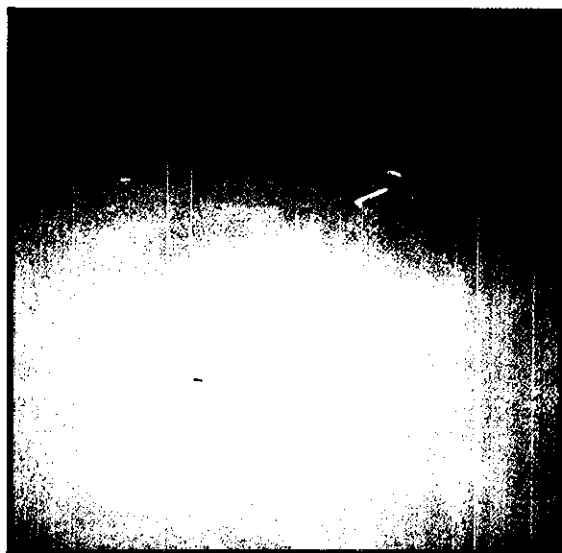


写真 5.5.6 施設Hの過酸化水素洗浄後

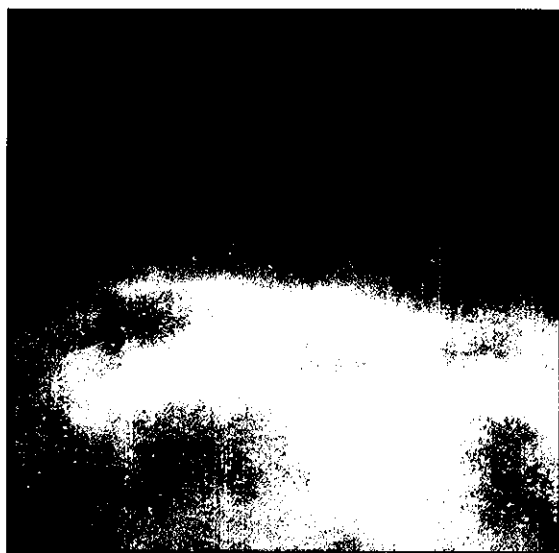


写真 5.5.7 施設Hの過酸化水素中和後



写真 5.5.8 施設G吐水側の過酸化水素洗浄前（内視鏡）



写真 5.5.9 施設G吸込側の過酸化水素洗浄前（内視鏡）

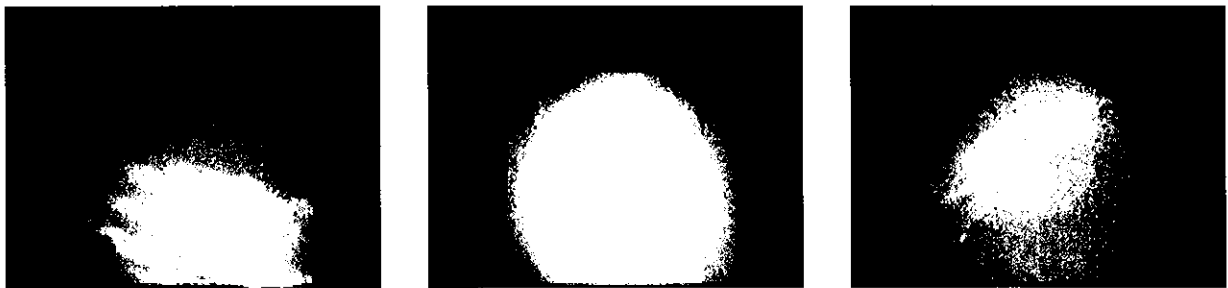


写真 5.5.10 施設G吸込側の過酸化水素洗浄後（内視鏡）

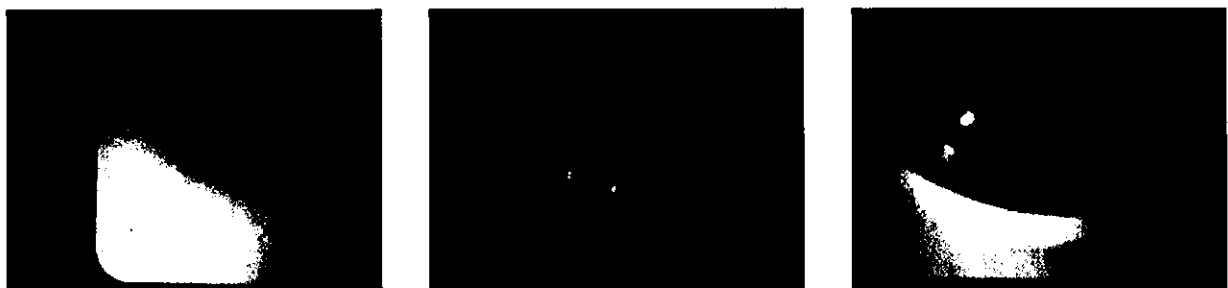


写真 5.5.11 施設G吐出側の過酸化水素洗浄後・中和後（内視鏡）



写真 5.5.12 施設G吸込側の過酸化水素洗浄後・中和後（内視鏡）

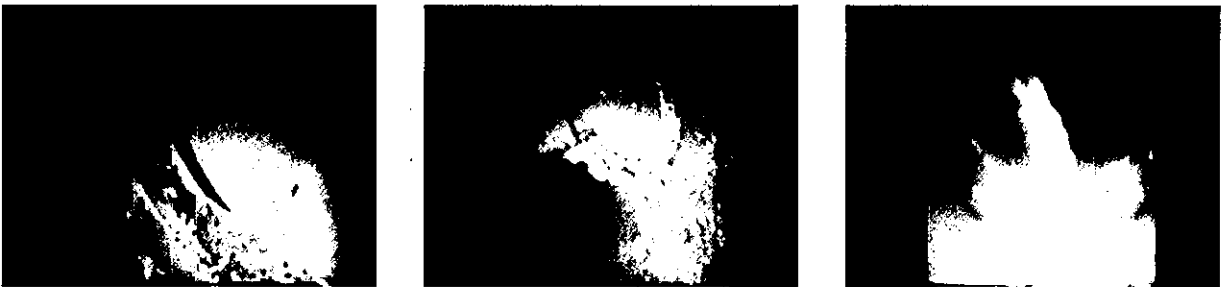


写真 5.5.13 施設H吐水側の過酸化水素洗浄前（内視鏡）

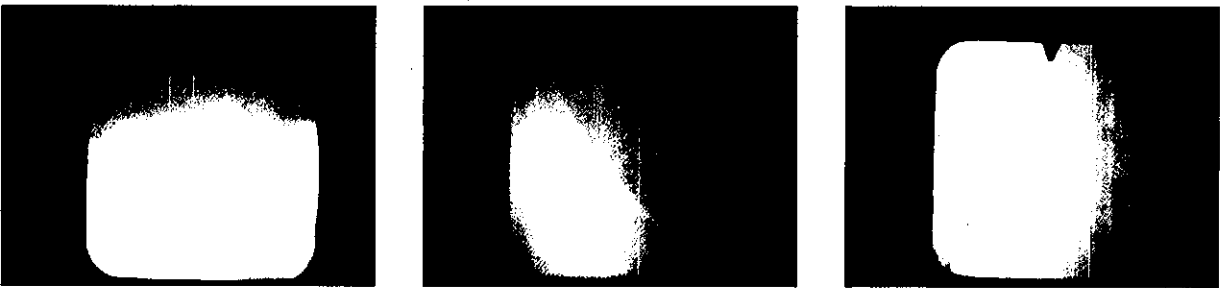


写真 5.5.14 施設H吸込側の過酸化水素洗浄前（内視鏡）

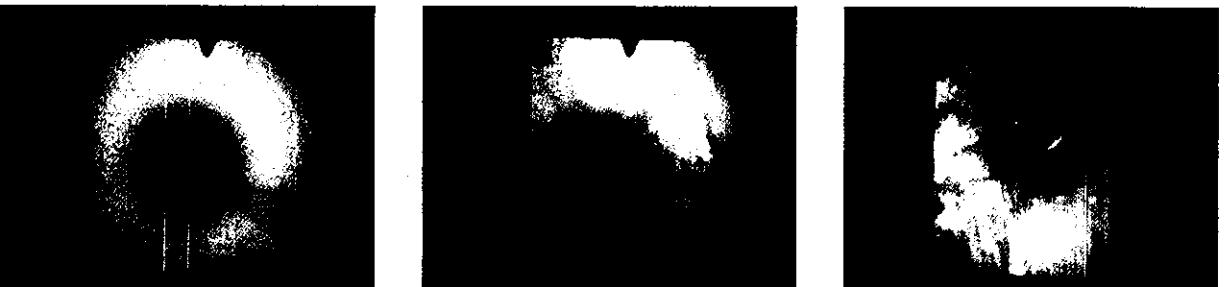


写真 5.5.15 施設H吐水側の過酸化水素洗浄後・中和後（内視鏡）

5.5.4 配管表面付着物の剥離量の推定

施設Gでは、洗浄水量 0.87m³に過酸化水素を添加して、過酸化水素濃度 4.2%として、配管表面からの生物膜の剥離を行った。その結果、洗浄水量内の浮遊物質濃度は 80mg/Lであった。したがって、生物膜量を浮遊物質質量として現すと、配管表面 1 m²当たり 13.9g となった。

施設Hでは、洗浄水量 2.52m³に過酸化水素を添加して、過酸化水素濃度 1.6%として、配管表面からの生物膜の剥離を行った。その結果、洗浄水量内の浮遊物質濃度が 1,155mg/Lであった。したがって、生物膜量を浮遊物質質量として現すと、配管表面 1 m²当たり 289.7g となった。温泉を利用していることから、生物膜のほかに配管内に付着・蓄積していた温泉成分等も剥離したと推測される。

福祉施設の浴槽水の調査を行った施設Eでも、同様に過酸化水素洗浄を行ったことがある。洗浄水量 2.01m³に過酸化水素を添加して、過酸化水素濃度 2%として、配管表面からの生物膜の剥離を行った。その結果、洗浄水量内の浮遊物質濃度は 4.27mg/Lであった。したがって、生物膜量を浮遊物質質量として現すと、配管表面 1 m²当たり 6.9g となった。

このように、隔離した洗浄水中の浮遊物質濃度を測定することによって、配管内の生物膜の程度が把握できる。

5.5.5 剥離物を含んだ洗浄後の水質

過酸化水素洗浄終了後、循環配管内を水道水にて濯いだところ、米粒の半分大の茶色い剥離物が洗浄水中に吐出・混入し、沈殿しているのが多数確認された。その剥離物を指で触ったところ、細かい粉末状になった。剥離物が鉄さびのようであったため、金属分析を実施した。剥離物に精製水と硝酸を加えて前処理を行い、試料原水を作製した。この試料原水を 10 倍希釈して試料水とした。この試料水を高周波プラズマ質量分析装置 ICPM-8500 (株島津製作所製) (以下、ICP-MS とする。) により金属成分検査を実施した。

最初に定性分析を実施した結果、その成分は鉄が主であり、その他に硫黄やカリウム、ナトリウム、ケイ素といったものが検出された。次に、試料水中に含まれる鉄の含有量を測定したところ、鉄の量に関して 1.73mg/L が検出された。しかし、鉄の分析において ICP-MS 法は上水試験方法に準じていないこと、また、試料処理時に剥離物の重量を測定しなかったことから、今回得られた鉄の濃度はあくまでもスクリーニング程度と考えて欲しい。

5.5.6 考察

水道水を用いた循環式浴槽の場合、目視可能な過酸化水素の発泡作用が生物膜剥離とは直接関係していないと推測された。むしろ発泡により循環系にエア溜まりが生じ、循環不可能となり、還元反応していない過酸化水素が供給されず、剥離作用が低下する。

施設Eでは浴槽深さの 1/3、施設Fでは 30cm の深さの浴槽水に過酸化水素を投入した。施設Gでは、6cm の深さの浴槽水に過酸化水素を投入した。浴槽水の嵩を浅くすることで、大幅な過酸化水素の投入量が節約できた。浅めの浴槽水のため、過酸化水素の絶対量が少ないが、支障なく生物膜を除去できた。本事例では、水道水を浴槽水としていることもあり、少量の過酸化水素でも十分に生物膜除去ができることがわかった。

5.6 調査・実測の課題と今後の調査

今回は、実際の施設で過酸化水素洗浄試験を実施した。日本の業務用大型浴槽では、温泉を利用している系統の割合が多い。温泉利用浴槽系統の場合、経年や泉質、源泉温度・供給温度でどの程度配管内に付着物が形成されるか等の検討を要する。生物膜以外の温泉成分を剥離させるのに、予備洗浄として高圧洗浄を実施し、仕上げに過酸化水素洗浄とすることなども検討し、コストの低減をはかる必要もある。

循環ろ過を持たない浴槽でレジオネラ属菌が検出される場合、源泉槽や温泉供給配管内に生物膜が付着し、レジオネラ属菌の温床となる例もある（例：宮崎市青島自然休養村センター「加江田荘」）。平成13年度に（財）ビル管理教育センターが設置した循環式浴槽及び水景施設における微生物に関する研究委員会では、遊離残留塩素濃度を一定濃度に維持することで、配管内に生物膜の生成を抑制することが解った。しかし、遊離残留塩素濃度管理を充分に行った施設Eでは、洗浄後1年経過時に生物膜が形成された。これらの事実から、生物膜抑制方法を検討するための実証試験や調査を行うことも検討すべきである。二酸化塩素は比較的生物膜の生成を抑制するとの報告もあり、その効果を検証すると共に、生物膜が生成され難い消毒剤の開発が望まれる。

今後、実際の施設での洗浄でデータを収集・解析すると共に、実験室での試験の実施も重要である。また、温泉を多く使用しているドイツ、オーストリア、英国、イタリア、アメリカ合衆国等の欧米や台湾、韓国等の東アジアでの調査により、抑制方法や洗浄方法の技術導入や検証等が早急に必要である。

（担当：赤井仁志・岡田誠之・小川正晃・杉山順一）

6章 レジオネラ属菌の迅速検出法に関する検討

6.1 目的

近年、日本では浴槽水を感染源とする集団感染事例が相次ぎ、浴槽水の衛生的管理の強化が求められている。浴槽水中のレジオネラ属菌数を監視するには培養法による検査が必要であるが、選択培地上での発育が非常に遅いため、試験成績が出るまでには7日から10日を要しているのが現状であり、これは培養法の限界である。試験結果が遅れることは対策の遅れにつながり、結果的に患者数の拡大が懸念される。また、殺菌対策実施後の検証の遅れは長期間の営業停止による大きな経済的損失を招く。こうしたことから、培養法に替わる浴槽水におけるレジオネラ属菌迅速検査法の確立が強く望まれている。

一方、遺伝子増幅法による病原微生物の検出は数時間程度で行えることは周知の事実である。なかでも新しい遺伝子増幅法である LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法は従来の PCR (Polymerase Chain Reaction) 法に比べ、感度及び操作性ともに優れている。そこで今回は、LAMP 法を用いてレジオネラ属菌の検出に関する基礎的検討を行った。

6.2 LAMP 法の特徴

LAMP 法は従来の増幅法にはない以下のような特徴を有している。

- (1) 一定の温度で増幅反応が進行：一定温度で増幅可能な方法はほかにもいくつかあるが、一つの酵素のみで実施できるのは LAMP 法だけである。しかも特殊な試薬は不要であり、安価に実施可能である。LAMP 法は 60~65℃付近の一定の反応温度で行い、核酸二重鎖を不安定にする試薬の効果もあり、2 本鎖 DNA の変性をあらかじめ行わなくても反応を開始することが可能である。
- (2) 高い特異性：他の増幅法では2つの領域で特異性を決定しているが、LAMP 法の増幅反応では6つの領域、4つのプライマーを必要とし、さらにこの6つの領域は順番まで規定されるため、原理的に増幅の特異性は極めて高い。このことにより、増幅の有無によって標的遺伝子が存在したか否か、つまり検出すべき細菌が存在したか否かの判定が可能となる。
- (3) 迅速、高い増幅高率（高感度）：LAMP 法は特異性が極めて高いので、標的遺伝子のみを効率よく増幅し、1時間以内に検出可能である。感度も10コピー程度から増幅可能で、PCR 法と同等である。また、鎖置換型合成反応を利用しているため、PCR 法で見られるような生成物阻害もなく、増幅産物は0.5mg/mLにも達する。増幅時間については、ダンベル構造の5'末端側にあるループの一本鎖部分に相補的な配列を持つループプライマーを用いることにより、DNA 合成の起点を増やすことが可能となる。これにより、従来利用されていなかったループ部分も利用され、増幅効率は飛躍的に増大した。
- (4) RNA からの1ステップ増幅が可能：標的遺伝子が RNA の場合、通常はまず逆転写酵素で cDNA を合成してから増幅反応を行うが、逆転写酵素も鎖置換活性をもっているため、LAMP 法の場合は逆転写酵素を同時に添加しておくことで、DNA の場合と全く同様に増幅が可能である。
- (5) 簡易検出が可能：検査、診断用途の場合、結果の信頼性が重要であることから、従

来の増幅法では増幅反応後、確認のための検出反応が必須であった。このことが、遺伝子検査における煩雑性の一因になっていたが、LAMP法は原理的に配列を確認しながら増幅を行っているので、前述したとおり、特異性が高く、結果を増幅の有無で判定可能である。また、増幅産物の量も非常に多いので簡単な検出手段を選択することができる。

6.3 LAMP法の特異性の確認

6.3.1 供試菌株

Legionella 属菌は *L. pneumophila* の serogroup 11 種を含む 12 菌種 31 株を用い、BCYE α 寒天培地 (栄研化学) で 37°C、3 日間培養した。*Legionella* 属以外の菌 (非 *Legionella* 属菌) はグラム陰性桿菌 14 菌種、グラム陽性球菌 4 菌種、各 1 株の計 18 菌種 18 株を用いた。これらの菌株のうち *Haemophilus influenzae*、*Branhamella catarrhalis* 以外の菌種は血液寒天培地 (栄研化学) を用い、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌は 30°C で 18~48 時間、それ以外の菌は 37°C で 18 時間培養した。*H. influenzae*、*B. catarrhalis* はチョコレート寒天培地 (栄研化学) で 5% CO₂ 条件下、37°C で 18 時間培養した。試験に際しては、平板培地上の各菌株のコロニーを生理食塩水中に McFarland No. 3.0 (約 1.2×10^9 CFU/mL) になるように菌懸濁液を調製した。

6.3.2 方法

各種菌懸濁液を TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) により、*Legionella* 属菌は約 6×10^6 CFU/mL、非 *Legionella* 属菌は約 6×10^6 CFU/mL および約 6×10^8 CFU/mL に希釈した。これらは 95°C で 5 分間の熱処理後、氷冷して、12,000 rpm、4°C、10 分間の遠心分離を行い、その上清 1 μ L を DNA 溶液として試験に用いた。すなわち、*Legionella* 属菌は約 6×10^3 CFU/test 相当、非 *Legionella* 属菌は約 6×10^3 CFU/test 相当および約 6×10^5 CFU/test 相当の DNA 溶液を検体として用いた。

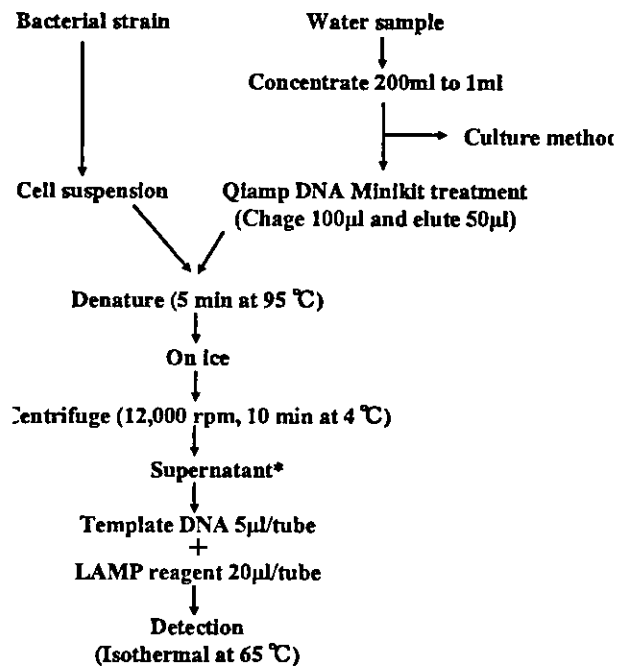
Legionella 属菌の 16S rRNA 遺伝子とした LAMP プライマーを使用して試験した。なお、今回のプライマーは *Legionella micdadei* も増幅可能に改良したものを用いた。LAMP 反応は鎖置換型 DNA ポリメラーゼである *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs, USA)、プライマー、dNTPs (各 1.4 mM)、0.8 M Betaine、バッファー (20 mM Tris-KCl [pH 8.8]、10 mM KCl、8 mM MgSO₄、10 mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Tween20) を含む反応溶液 20 μ L に、検体 5 μ L を添加して 65°C の等温で 90 分間行った (図 6-1)。LAMP 増幅産物の検出には専用の濁度測定装置 LA-200 (テラメックス) を使用し、濁度を反応開始から経時的に測定し、反応時間内に明らかに濁度の上昇を示した検体を陽性と判定した。

6.3.3 結果

Legionella 属 12 菌種 31 株は、LAMP 法ですべて遺伝子の増幅が認められた。しかし、非 *Legionella* 属 18 菌種 18 株は、LAMP 法では約 6×10^3 CFU/test 相当および約 6×10^5 CFU/test 相当のいずれの場合でもすべて遺伝子の増幅が認められなかった (表 6-1)。

表6-1 LAMP法によるレジオネラ属菌検出の特異性

Bacterial strain	LAMP	Bacterial strain	LAMP
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3677	+	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> supsp. <i>xylosoxidans</i> EKN 6	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3679	+	<i>Acinetobacter baumannii</i> EKN 62	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3680	+	<i>Acinetobacter lwoffii</i> EKN 2575	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> EKN 3681	+	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> EKN 42	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> EKN 3683	+	<i>Branhamella catarrhalis</i> EKN 5652	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3682	+	<i>Chryseobacterium indologenes</i> EKN 358	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F82-1211	+	<i>Empedobacter breve</i> EKN 2590	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F81-1210	+	<i>Escherichia coli</i> EKN 4496	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F78-1163	+	<i>Haemophilus influenzae</i> EKN 2009	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F14-70G	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> EKN 5262	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F1-34G	+	<i>Myroides odoratus</i> EKN 2588	-
<i>Legionella anisa</i> EKN 5828	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EKN 6633	-
<i>Legionella bozemanii</i> EKN 3684	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EKN 2553	-
<i>Legionella dumoffii</i> EKN 3686	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i> EKN 259	-
<i>Legionella erythra</i> EKN 5887	+	<i>Serratia marcescens</i> EKN 233	-
<i>Legionella feeleyi</i> EKN 6081	+	<i>Staphylococcus aureus</i> EKN 4542	-
<i>Legionella gormanii</i> EKN 3687	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i> EKN 5172	-
<i>Legionella longbeachae</i> EKN 3689	+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> EKN 4043	-
<i>Legionella micdadei</i> EKN 3685	+	<i>Streptococcus pyogenes</i> EKN 6547	-
<i>Legionella oakridgensis</i> F85-342	+		
<i>Legionella sainthelehsi</i> F57-178	+		



*: Case of bacterial strains, diluted 5 times with distilled water

図 6-1 LAMP法の検出手順

6.4 LAMP法の感度の確認

6.4.1 供試菌株

L.pneumophila ATCC 33152 株を用いた。

6.4.2 方法

供試菌の懸濁液を TE 緩衝液を用いて約 10^5 CFU/test 相当になるよう調製し、これから 6 段階の 10 倍連続希釈系列を作製し、それぞれ 95°C で 5 分間の熱処理を行った。氷冷後、

12,000 rpm、4°C、10 分間の遠心分離を行い、その上清 1 μL を検体として用いた。また無添加の陰性対照をあわせて試験した (図 6-1)。菌懸濁液中の菌数は BCYE α 寒天培地を用いた生菌数測定法で確認した。

6.4.3 結果

試験に用いた試料中の菌数は、6 CFU/test から 6×10^5 CFU/test の 6 段階であった。LAMP 法による *L.pneumophila* ATCC 33152 の検出は 6 CFU/test まで可能であり、検出時間に要する時間は 50 分以内であった (図 6-2)。

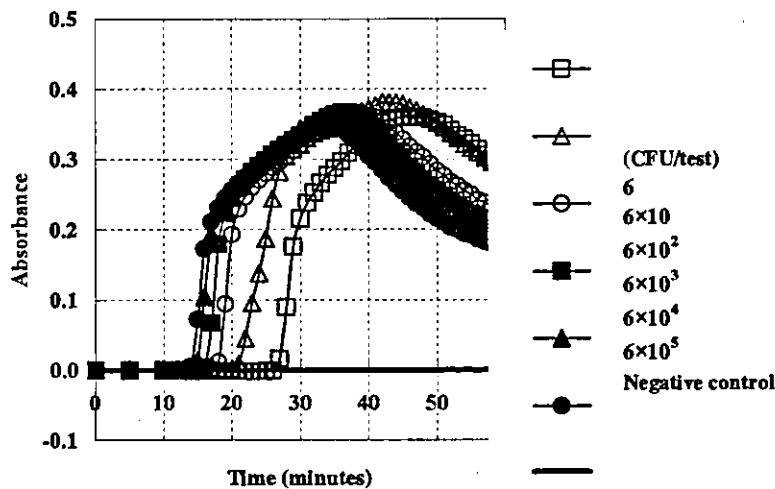


図 6-2 LAMP 法における *Legionella pneumophila* ATCC33152 株の検出感度

6.5 温泉水からのレジオネラ属菌検出における LAMP 法と培養法の比較

6.5.1 材料及び方法

(1) 供試材料

2004 年 3 月から 11 月の間に、20 道都県において採取した温泉水 (500mL) 125 試料を試験に供した。地方での採取の場合は冷蔵にて輸送した。原則的に浴槽水であるが、一部源泉や湯口水も含まれた。

(2) 試料の濃縮

試料 500mL を 6,000rpm、30 分間の遠心分離により最終的に 5mL に再懸濁し、100 倍濃縮試料を調製した。

(3) 培養法によるレジオネラ属菌の検出

「新版レジオネラ症防止指針」に準拠し、滅菌小試に分注した 100 倍濃縮試料 1mL に 1mL の 0.2M HCl-KCl 溶液 (pH2.2) を加え、十分攪拌してから室温に 15 分間放置した。この試料を WY0 α 寒天培地と GVPC α 寒天培地にそれぞれ 0.1mL ずつ滴下し、コンラージ棒で塗抹した。これを 37°C、7 日間培養後、両培地上でレジオネラ属菌の特徴を持つ集落を計数するとともに、これらの培地上から数個の集落を釣菌し、血液寒天培地と BCYE α 寒天培地に塗抹して 37°C で純培養と同時にシステイン要求性試験を行った。培養 3 日後、血液寒天培地には発育せず、BCYE α 寒天培地にのみ発育した菌株をレジオネラ属菌と推定し、グラム染色によって陰性桿菌であることを確認した。菌種の同定にはラテックス凝集反応、免疫血清凝集反応、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを用いた。なお、この試験での検出限界

は 10 CFU/100ml である。

(4) LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出

LAMP 法は市販の「レジオネラ検出試薬キット E」を用い、添付資料に準拠した。まず、100 倍濃縮試料 2mL を 13,000×g、10 分間、4℃で遠心分離し、上清を除去して 40 μL 程度を残し、その沈査に「Extraction Solution for Legionella」50 μL を添加した。次にボルテックスミキサーで攪拌混合してから 95℃、15 分間加熱処理後、直ちに急冷し、1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) 8 μL を添加して中和した。再度同条件で遠心分離し、上清を核酸抽出液とした。氷上にて LAMP 法反応試薬「マスターミックス」20 μL に核酸抽出液 5 μL を加え、Loopamp リアルタイム濁度測定装置を用いて 65℃で 60 分間増幅反応を行った。1 時間以内に増幅に伴う特徴的な濁度上昇が認められた試料をレジオネラ属菌陽性と判定した。なお、酵素失活処理を 80℃、2 分間行った。この試験での検出感度は 10 Cells/100mL である。

6.5.2 結果

(1) 培養法及び LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出状況

培養法及び LAMP 法を用いて 125 試料におけるレジオネラ属菌の検出状況を表 6-2 に示した。両法で本菌が共通して検出された試料が 38 試料 (30.4%)、また検出されなかった試料が 47 試料 (37.6%) あり、合計 85 試料 (68.0%) が両法の一致率であった。また、培養法陰性であったが LAMP 法陽性の試料が 38 試料 (30.4%) あった。逆に培養法陽性で LAMP 法陰性の試料が 2 試料 (1.6%) あった。これらのことから両法による検出状況に有意差 ($p < 0.01$) が認められた。すなわち、LAMP 法によりレジオネラ属菌を検出すると、危険倍率 0.303、相対危険度 0.526、寄与危険度 0.288 となり、検出率は培養法より高くなった。

表 6-2 LAMP 法および培養法による温泉浴槽水からの
レジオネラ属菌検出状況

試験方法	LAMP 法		合計	
	陽性	陰性		
培養法	陽性	38 (30.4)	2 (1.6)	40 (32.0)
	陰性	38 (30.4)	47 (37.6)	85 (68.0)
合計	76 (60.8)	49 (39.2)	125 (100.0)	

(2) 培養法により検出されたレジオネラ属菌

培養法によりレジオネラ属菌が検出された 40 試料の菌数分布を図-3 に示した。10~40 CFU/100mL が 18 試料 (45.0%) と最も多かった。次に 50~90 CFU/100mL、100~400 CFU/100mL および 1,000~4,000 CFU/100mL がそれぞれ 6 試料 (15.0%) であった。なお、10 CFU/100mL 未満 (すなわち不検出) が 85 試料 (68.0%) あったが、このうち選択培地上にレジオネラ属菌以外の細菌や真菌が早期に発育することにより、レジオネラ属菌の発育が確認できず、結果として陰性と判定された試料が 7 試料 (8.2%) あった。分離された 49 株を同定したところ、42 株 (85.7%) が *L.pneumophila* に同定され、他に *L.micdadei* や *L.gormanii* がわずかながら同定された。また、*L.pneumophila* の血清型別では 1 群が 17 株 (34.7%) と最も多く、次に 6 群が 8 株 (16.3%) であった。その他、3 群、4 群、10 群に比較的多く

型別された。

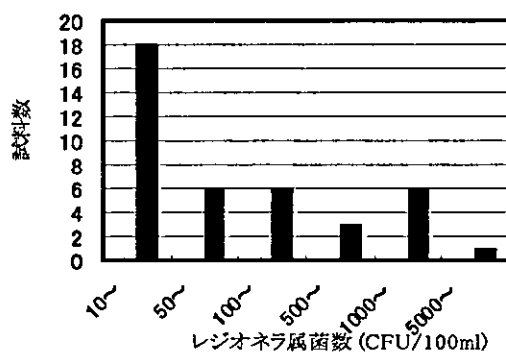


図 6-3 温泉浴槽中のレジオネラ属菌数

(3) レジオネラ属菌数と LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出状況

温泉浴槽水 125 試料について、LAMP 法によりレジオネラ属菌の検出を試みた結果を培養法による菌数分布とともに表 6-3 に示した。培養法で不検出 (10 CFU/100mL 未満) の 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料 (44.7%) が陽性を示した。また、培養法で 10~40 CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出された 18 試料については、LAMP 法では 16 試料 (88.9%) が陽性を示したが、2 試料 (11.1%) は陰性であった。これら LAMP 法で陰性を示した 2 試料のレジオネラ属菌数はそれぞれ 10 CFU/100mL、30 CFU/100mL であり、分離された菌種はいずれも *L.pneumophila* であったが、血清型は不明であった。なお、50 CFU/100mL 以上のレジオネラ属菌が検出された 22 試料では、すべて LAMP 法陽性であった。

表 6-3 レジオネラ属菌数と LAMP 法による検出状況

レジオネラ属菌数 (CFU/100ml)	培養法	LAMP 法	
		陽性	陰性
不検出	85*	38	47
10-40	18	16	2
50-90	6	6	0
100-490	6	6	0
500-990	3	3	0
1,000-4,900	6	6	0
5,000-9,900	1	1	0
合計	125	76	49

*: 試料数

6.5.3 考 察

新しい遺伝子増幅法である LAMP 法は *Legionella* 属菌に対して優れた特異性を有し、*L.pneumophila* では 60 CFU/test まで検出可能であり、高い感度を有しているといわれている。この LAMP 法の評価は、蛍光インターカレーターを使用し、リアルタイム PCR 測定装置を用いているが、本測定装置は非常に高価であり、広い設置場所も必要であることから、

検査現場での使用はかなり困難であった。LAMP 法は非常に効率のよい遺伝子増幅法であり、増幅産物が 0.5mg/mL と桁外れに多く、増幅の有無を反応過程で生成されるピロリン酸塩とマグネシウムの沈殿物の濁度として計測が可能であることから、今回濁度による測定法により、LAMP 法の評価を行った。その結果、特異性は蛍光による測定と全く変わらず、供試 *Legionella* 属菌のすべてで増幅が確認でき、非 *Legionella* 属菌の 18 菌株は全株とも増幅が認められなかった。今回用いたプライマーは *L.micdadei* に対しても反応するように改良されたものであり、他の *Legionella* 属菌と同様、良好に増幅することが確認できた。また、*L.pneumophila* の血清型 6, 8, 9, 12, 13 と *L.oakridgensis*, *L.sainthelensis* も増幅されることが確認できた。

L.pneumophila ATCC 33152 株を用いた感度試験の結果では、6 cfu/test の菌量でも増幅を確認できたが、この菌液量での試験の再現性を考慮すると 60 cfu/test を検出限界とするのが妥当と思われ、これも蛍光法と同じであった。ただし、濁度法は蛍光法と比べ増幅開始時間が遅れる傾向がみられたが、これは蛍光測定と濁度により吸光度測定の感度の差が影響していると考えられた。しかし、その程度は数分であり、20 分以内に確認可能なことから実用面では全く問題がないと考えられた。今回使用したリアルタイム濁度測定装置 LA-200 は市販されている蛍光リアルタイム PCR 測定装置の約 1/5~1/10 の価格で、装置自身も小さいことから (W245×D282×H188mm)、実際の検査現場で使用しやすい方法と思われた。

レジオネラ属菌の検出方法において、一般的に用いられている培養法の最大の欠点は検査時間が長いことである。このため、迅速検査法の一つとして核酸の検出が普及しつつある。両法の相違点は、培養法では培地上に集落を形成できる生菌のみを対象とするのに対し、遺伝子検査法では、生菌に加え、死菌や培養不能 (VNC) 菌、さらに核酸のみでも検出可能である。したがって、培養法と遺伝子検査法の結果を完全に一致させることは困難である。

今回は 125 試料の温泉浴槽水について、従来の培養法と近年開発された LAMP 法によってレジオネラ属菌の検出状況を比較検討したところ、培養法でレジオネラ属菌が検出された 40 試料については LAMP 法では 38 試料 (95.0%) が陽性を示し、一致率は高かった。なお、培養法で陽性を示し、LAMP 法で陰性を示した 2 試料については、試料中に不溶性物質が多く、温泉浴槽水中に存在する増幅阻害物質の影響が考えられた。また、培養法によって不検出であった 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料 (44.7%) が陽性を示した。Ng らは冷却塔水のレジオネラ属菌検査において、培養法では検出されない試料でも PCR 法では陽性を示す要因として死菌や VNC 菌の存在を指摘している。温泉浴槽水においても同様な影響が考えられ、適切な塩素消毒が行われていても遺伝子検査法では陽性を示す場合がある。このことから、遺伝子検査法は培養法と異なり、陽性結果が即感染性の有無にはつながらない。すなわち、遺伝子検査陽性の温泉浴槽水が直ちに感染源になるとは限らない。この点が今後、遺伝子検査法をレジオネラ属菌の迅速検査法として採用する場合に十分考慮すべき課題である。

一方、塩素などの酸化性殺菌剤を添加した場合、死菌の核酸は分解され、殺菌剤濃度と接触時間によっては遺伝子検査法で不検出となることが報告されている。また、近年 RNA 迅速増幅技術として研究開発されている NASBA 法や TRC 法などが多分野で検討されている。こうした技術の導入により遺伝子検査と培養法による結果を近づけることが可能になるで

あろう。

6.6 結 語

本法は極めて高い増幅能を特長としていることから増幅の有無を反応過程で生成されるピロリン酸塩とマグネシウムの沈殿物の濁度として計測が可能であり、今回この濁度測定を用いた LAMP 法での *Legionella* 属菌の検出を保存菌株を用いて確認した。その結果、LAMP 法を用いた *Legionella* 属菌の検出は、本属菌に対して高い特異性を有し、*L.pneumophila* では 60 CFU/test まで検出可能と高い感度を有していた。このように濁度による感度、特異性は蛍光インターカレータを用いた場合と同等で濁度測定の有用性が確認できた。

日本各地の温泉浴槽水 125 試料について培養法と LAMP 法を併用してレジオネラ属菌の検出を試み、両者の成績について比較検討を行った。培養法でレジオネラ属菌が検出された 40 試料については LAMP 法では 38 試料 (95.0%) が陽性を示し、一致率は高かった。また、培養法において不検出であった 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料 (44.7%) が陽性を示した。このように LAMP 法は従来の培養法に比べて検出率が高く、しかも試験操作が簡便なうえ、数時間で判定が可能であることからレジオネラ属菌の迅速検査法の一つとして有用であった。

(担当：古畑 勝則)

文 献

- 1) 安中敏光、ほか：LAMP 法による環境水からの *Legionella* 属菌の検出。防菌防黴誌 32、195-201、2004.
- 2) Furuhashi, K., *et al.* : Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and conventional culture for the detection of *Legionella* species in hot spring water samples in Japan. *Biocontrol Sci.*, (in submitting)

7章 文献調査

塩素消毒と臭気の関係について文献調査を行なった結果を示す。

7.1 (社)日本水道協会：上水試験方法 解説編(2001年度版)、pp294~295

13 残留塩素

13.4 水道との関係

次亜塩素酸は、水中にアンモニア、アミノ酸、アミン類などがあると反応してモノクロラミン (NH_2Cl) 及びジクロラミン (NHCl_2) を生成する。この反応の最終的な平衡状態における各クロラミンの存在割合は、pH値及び塩素とアンモニア性窒素との濃度比によって異なる。pH7~8の範囲で、塩素とアンモニアのモル比が1:1(重量比で5:1)のとき、クロラミンの生成量は最大で、モノクロラミンの占める比率が高い。塩素の濃度費が高く、又はpH値が低い場合はジクロラミンの比率が高くなる。更に、塩素のモル比が高く遊離残留塩素が存在する場合又はpHが4以下だとトリクロラミン (NCl_3) が生成する。また、クロラミンが分解される反応が起こる。

殺菌力はジクロラミンの方がモノクロラミンより強い。また、ジクロラミンは遊離残留塩素よりも塩素臭が強い。トリクロラミンは殺菌力はなく、特有の刺激臭がある。

7.2 森実圭二、梅谷友康、寺嶋勝彦：「浄化処理に起因する臭気の基礎的調査 塩素とアンモニア及びアミノ酸の反応、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績」Vol.49(1997)、pp1-5(1998/8)

水道水の塩素処理における結合型塩素の種類による臭気の種類について調査を行なった結果を報告している。

水道水に強い臭気が発生する条件として、以下の2つがある。

① pHが中性の場合、アンモニアに対する塩素注入モル比が高い場合

pH6.5で、塩素注入モル比の増加に従って、臭気強度が増加する。図-1において、塩素注入量20~80mg/l(塩素注入モル比0.4~1.6)に比較して塩素注入量100~160mg/l(塩素注入モル比2.0~3.2)で臭気強度が高くなっている。つまり、ブレイクポイント反応により強い臭気が発生する物質が生成された。

但し、pHが8.3の場合は塩素注入量がpH6.5と同じ場合でも、臭気強度は低いままである(図-2)。これはpHが8.3の場合、塩素注入モル比が1.2以下ではモノクロラミンが生成するためと考えられる。(pH6.5の場合はジクロラミンが生成)

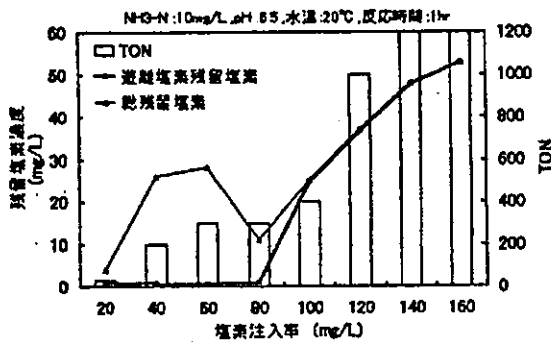


図-1 pH5.5でのブレイクポイント塩素処理曲線における残留塩素濃度と臭気強度(TON)の関係

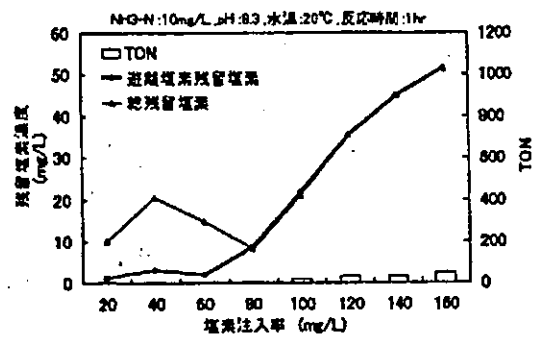


図-2 pH3.0でのブレイクポイント塩素処理曲線における残留塩素濃度と臭気強度(TON)の関係

②水のpHが低い場合

pH3.0では塩素注入モル比が0.4でも臭気強度300となり、他のpH条件に比較して少ない塩素注入量でも強い臭気が発生する。(図-3)

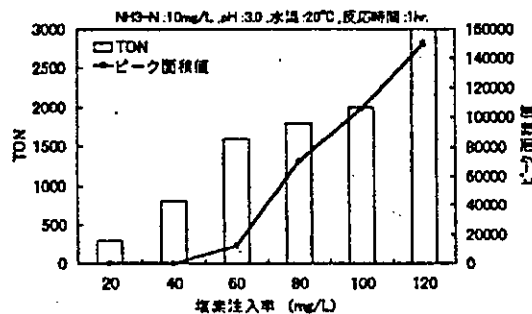


図-3 反応pH3.0における塩素注入率、臭気強度(TON)及び未知物質ピーク面積値の関係

以上の結果から、トリクロラミンが存在する条件で強い臭気が発生すること及び、GC-MSによる解析の結果、3つ以上の塩素が付加した窒素化合物が塩素臭に関係することが明らかになった。

7.3 鍋田好雄、西川真人：カルキ臭の原因物質と低減化、水道協会雑誌、No4, Vol. 66, pp16-23(1997)

各種形態の残留塩素の濃度におけるニオイの調査を行なった。また、カルキ臭を低減する塩素添加法について検討を行なった。

塩素注入率と形態別残留塩素濃度の関係を図-4に示す。塩素添加率により、生成される形態別残留塩素の割合は異なり、3つの領域に分けることができる。

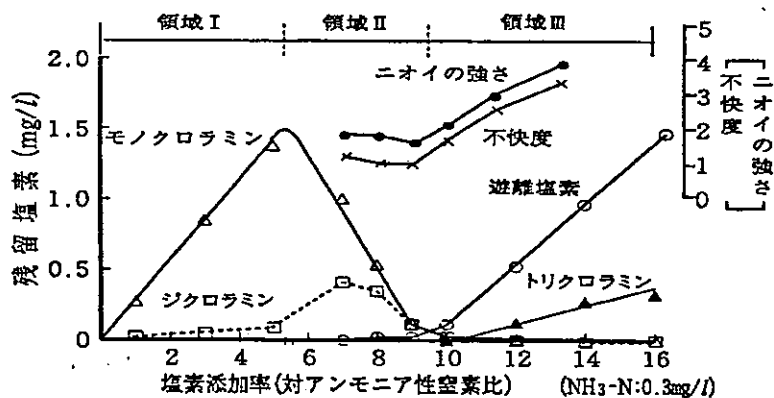


図-4 塩素添加率と形態別残留塩素およびニオイの強さ・不快度の関係

嗅覚試験の結果、各領域（Ⅰ～Ⅲ）のニオイの種類は次のように分類された。

対照水：遊離塩素のみ：塩素系漂白剤のニオイ（塩素臭）

試験水：領域Ⅰ：塩素臭にわずかな甘味を含んだニオイ

領域Ⅱ：遊離塩素とほとんど同じニオイ

領域Ⅲ：刺激性があり強い

領域Ⅰではモノクロラミンが、領域Ⅱではモノクロラミンとジクロラミンが、領域Ⅲでは約 1.0mg/L の遊離塩素と 0.3mg/L のトリクロラミンが含まれていた。臭気を低減する塩素処理法を検討した結果、pH が 8.0 以上でブレイクポイント処理を行えばトリクロラミンの生成が抑制されることを確認した。実際の浄水場では、最初に不連続点までの塩素量を加えてトリクロラミンの発生を抑制し、その後に必要な遊離塩素確保のための塩素添加を行なうという 2 段処理を行なうことでカルキ臭の抑制が可能である。

7.4 (社)日本プールアメニティ施設協会：水泳プール管理マニュアル、p119

Ⅳプールの水質管理の実際 7 プール水中の化学物質 (2) 結合残留塩素

プール環境では、有効塩素と汗や尿の成分であるアミノ酸や尿素のような水中に混入している窒素化合物が反応して結合塩素であるクロラミンが発生する。クロラミンは目と粘膜への刺激や悪臭のため、入泳者に嫌われる原因となっている。クロラミン類及び特に三塩化窒素 (NC1_3) は、強力な刺激物質及び催涙物質として認められている。フランスの INRS の実験結果では、結合塩素による遊泳プールの空気汚染のほぼ 90% が三塩化窒素に起因していると報告している。

7.5 まとめ

浴槽水の塩素消毒に伴う臭気問題に関連して、文献調査 (JOIS) を行なった。

浴槽水の塩素臭に関する文献は無く、水道水塩素消毒時の臭気に関する文献を得た。

それらによれば、刺激のある塩素臭の主原因物質はトリクロラミンであり、生成条件は水のpHが8.0以下及び、塩素の添加量がブレイクポイント以上である場合とされている。また、pHが6.5以下、例えば3.0などに低くなると少量の塩素の添加でもトリクロラミンが生成されて臭気が強くなるとされている。

「学校環境衛生の基準」13文科ス第264号（平成13年8月28日）によれば屋内プールの空気中塩素ガス濃度は0.5ppm以下が望ましいとされている。これは、施設利用者の健康被害の防止、臭気対策及び室内設備の金属腐食防止対策と考えられる。

浴室内は屋内プールと同様又は臭気に関してはより良い環境であることが望ましい。

浴槽水の塩素臭気対策は、過剰注入による高濃度残留塩素濃度の状態を防止することは勿論のこと、アンモニウムイオンを含有する浴槽水の場合はトリクロラミンの発生を抑制する管理が必要である。

（担当：縣 邦雄）

残留塩素測定器の比較

品名	解説	ポイント
DPD法比色式 メーカー：アドバンテック東洋、 柴田科学、オーヤラックス、 共立理化学研究所、等	残留塩素がジエチルパーフェニレンジアミン(DPD)と反応して生じる桃～桃赤色を標準比色板(液)と比較して残留塩素を測定する。試料水にリン酸緩衝液を加えpH6.5とした後、DPD試薬を加え発色させ、1分以内に測定する。 遊離残留塩素濃度の測定値を得る。	水道水の残留塩素濃度を測定する標準的方式である。 温泉水でCaを高濃度で含む場合、緩衝液を添加するとリン酸カルシウムの白濁を生じて測定不能になる場合がある。 試験器によっては、結合型塩素の一部を発色するものがあり、測定値は必ずしも遊離残留塩素とはならないので注意が必要である。亜硝酸イオンが存在する場合、擬似発色を生じることがある。
DPD法デジタル式 メーカー：セントラル科学 (HACH)、タクミナ、等	上記DPD法の発色程度を吸光度法(波長510ないし550nm)で測定し残留塩素濃度を求める。 デジタルで表示するので人による測定差が少ない。	試薬が液体のため、溶解の手間が不要。pH緩衝液が酢酸系なので高硬度水でも沈殿を生じない。DPD法と比較すると結合型塩素を測定する程度が小さい。試料水の温度に応じた比色板を変更し、浴槽水(温水)でも誤差が小さい。
SBT法比色式 メーカー：同人化学研究所	残留塩素がSBTと反応して生じる青緑色(675nm)を標準比色板と比較して残留塩素を測定する。 遊離残留塩素濃度の測定値を得る。	試験紙なので煩雑な試薬添加の手間が不要。
試験紙(シリンガルダジン法) メーカー：日産化学	試験紙の先端を浴槽水に浸漬し、15秒後に発色部の色を(シリンガルダジンと残留塩素との発色)色見本と比較して遊離残留塩素濃度を測定する。	水道水以外は使用できないとしている製品が多い。測定一回あたりのコストは安い。
電極式ハンデン計器 (ポーラログラフ法) メーカー：東亜アイケーケー、等	電極間に特定の電圧を印加し流れる電流値により残留塩素濃度を定量する。 DPD法などに代えて手作業で残留塩素を測定するため用いる。	ガルバニ法を採用しているものもある。
電極式塩素濃度監視制御計器 (ポーラログラフ法) メーカー：イワキ、タクミナ、等	比較電極を設けた三電極式のポーラログラフ法が採用されている。測定可能なpH範囲は6～8程度、温度は0～45℃である。 測定対象水を、流通式セルに導いて、リアルタイムで連続的に残留塩素濃度を測定するので測定の手間が掛からない。塩素剤の注入ポンプの制御に使用できることと浴槽水の残留塩素濃度を安定に維持できる。	温泉水で使用できるものもあるが、水道水に比較し誤差を生じる恐れが高いので注意する。また、結合型塩素の一部を測定する。 塩素以外の酸化剤(オゾン、二酸化塩素)はプラス誤差を与える。Al, NO ₂ , Cu, Fe, Mn、アルカリ度等は測定誤差を与えない。