

LAMP 法(図 4)はそれぞれにおいて、両法とも陽性の検体ではそれぞれから検出された菌数分布に多少相関が見られたが、LAMP 法と培養法(図 5)では、両法陽性検体の菌数分布はばらついていた。

浴槽水等 60 検体についてフィルターろ過前後の ATP 値を測定し、ATP 値の変化とレジオネラ属菌、SPC および HPC の検査結果を、表 4 に示した。

ATP 値の平均減少率が最も大きかったグループ A は、レジオネラ陽性検体が 7 検体中 6 検体で、SPC は  $10^5$  cfu/ml、HPC も  $10^6$  cfu/ml オーダーであった。ATP 実測値の高低もあるが、ろ過前後の ATP 値の減少率が大きいグループほど、HPC および SPC の菌数が多く、レジオネラ属菌の検出率も高かった。

#### D. 考察

浴槽水等のレジオネラ属菌検査結果は、培養法で 13.5%、遺伝子検査法の併用により 43.8% 検出され、それぞれ昨年度の結果(培養法 10.3%、遺伝子検査法 41.0%)より少し検出率が高かった。残留塩素濃度による検出率の比較では、昨年同様 0.2ppm 以下の検体が各検査法とも高い検出率を示し、0.2ppm 以上の検体でも特に qPCR 法による遺伝子検査法により、13.8%~54.5%と高率に検出された。このことから、培養法では陰性

であった残留塩素濃度の高い検体においても、死菌も含めたレジオネラ属菌の遺伝子を検出する qPCR 法や LAMP 法を併用することにより、浴槽水の循環系のどこかに隠れている汚染源の存在の可能性を発見する事ができ、同時に浴槽水を含めた循環系の重要な衛生管理指標になるものと考えられる。

qPCR 法は他の 2 法でレジオネラ属菌陽性となったすべての検体が陽性となり、qPCR 法と LAMP 法または培養法が同時に陽性の検体では、相互の検出菌数間に多少の相関が見られるなど、高感度で定量性が高く実用的で有効な検査法であると思われる。LAMP 法は定性的な検査において高感度な検出が可能であったが、今後定量的な検査への応用が課題である。培養法はこれらの検査法では最も検出率が低かったが、菌の分離は疫学的解析には不可欠である。

一方、浴槽水等をフィルターろ過した前後の ATP 値の減少率は、一般細菌数や従属栄養細菌数と関連が見られ、減少率が 95% と最も高かったグループ A では、ろ過前の ATP 値が 37~362 で低い値も含まれていたが、レジオネラ属菌検出率は高率であった。このことから、一般細菌数や従属栄養細菌数と同様に、ATP 値の減少率はレジオネラ汚染の指標となり得る可能性が示唆されたため、引き続き検討する必要があると考えられる。

表1 検体・検査法別レジオネラ属菌検出結果

検体名	検体数	陽性検体数(%)			計
		培養	qPCR	LAMP	
浴槽水(内湯)	68	6 (8.8)	28 (41.2)	13 (19.1)	28 (41.2)
浴槽水(露天風呂)	16	5 (31.3)	7 (43.8)	3 (18.8)	7 (43.8)
注湯口	2	0 (0)	1 (50.0)	1 (50.0)	1 (50.0)
その他	3	1 (33.3)	3 (100)	1 (33.3)	3 (100)
計	89	12 (13.5)	39 (43.8)	18 (20.2)	39 (43.8)

その他:原水2検体、足湯1検体

表2. 残留塩素濃度による各検査法のレジオネラ属菌検出率への影響

残留塩素濃度(ppm)	検体数	陽性検体数(%)		
		培養法	qPCR法	LAMP法
<0.2	26	11 (42.3)	23 (88.5)	15 (57.7)
0.2≤, ≤0.4	11	0 (0)	6 (54.5)	2 (18.2)
0.4<, ≤1.0	21	1 (4.8)	5 (23.8)	1 (4.8)
1.0<	29	0 (0)	4 (13.8)	0 (0)
不明	2	0 (0)	1 (50.0)	0 (0)

\*: %は各検体数に対する検出率

表3 検査法(qPCR法,LAMP法,培養法)によるレジオネラ属菌検出結果

検査法	陽性検体数	検出率(%)
3法で検出	8検体	9.0
qPCR法とLAMP法で検出	10検体	11.2
qPCR法と培養法で検出	4検体	4.5
qPCR法で検出	17検体	19.1
計	39検体	43.8

表4 ろ過前後のATP値とレジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌の検出状況

グループ	検体数	ATP値[平均値](RLU)		ATP値の平均減少率(%)	レジオネラ(培養)		一般細菌数 (cfu/ml)	従属栄養細菌数 (cfu/ml)
		ろ過前	ろ過後		陽性	陰性		
A	7	37~362[146]	4~13[7]	95	6	1	264960	1058800
B	2	17~239[128]	53~71[39]	70	0	2	652065	775160
C	3	10~103[59]	5~65[34]	42	1	2	1307	24087
D	48	1~341[37]	2~342[37]	0	0	48	9	4938
計	60				7	53		

\*一般細菌数及び従属栄養細菌数は、各グループ毎の平均値

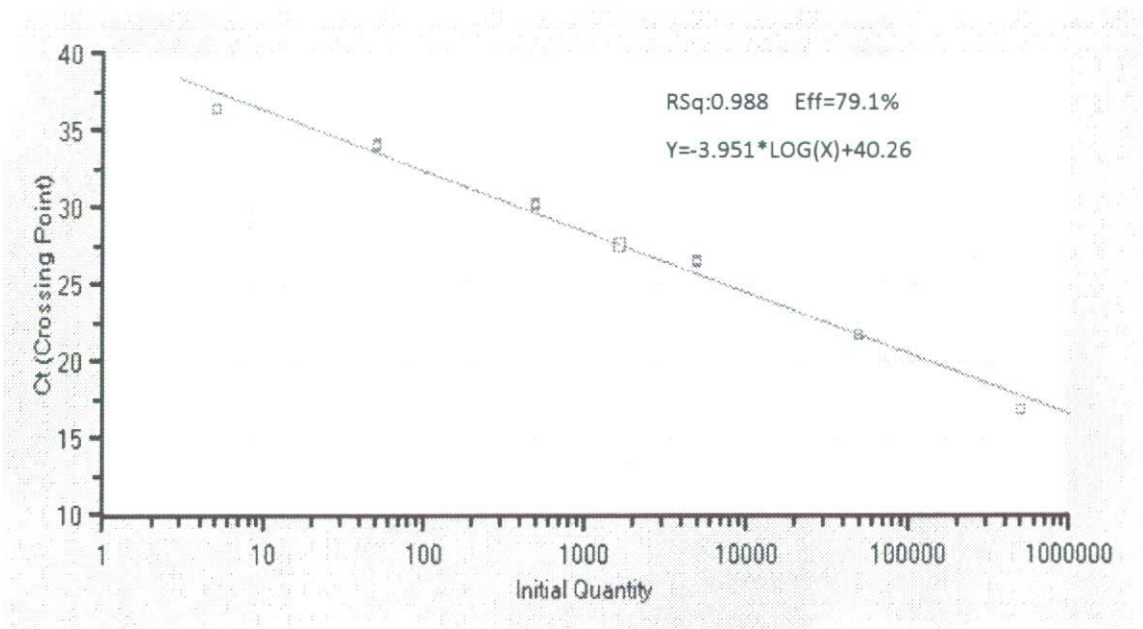


图1 Standard Curve (qPCR法)

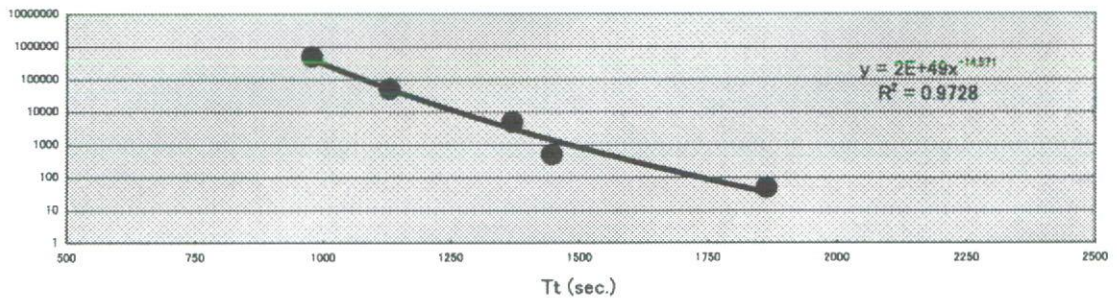


图2 Standard Curve (LAMP法)

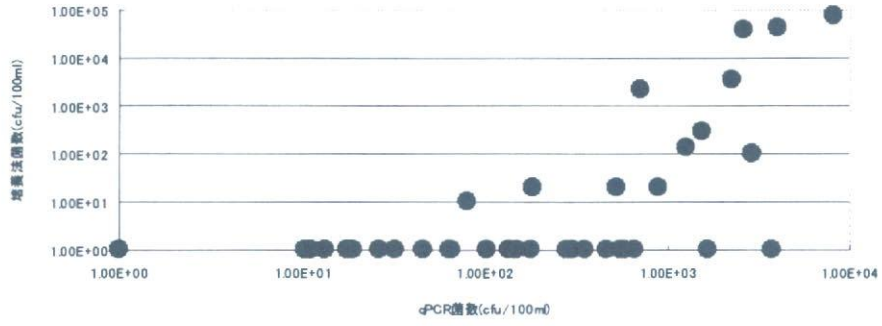


図3 培養法とqPCR法による検出菌数の分布

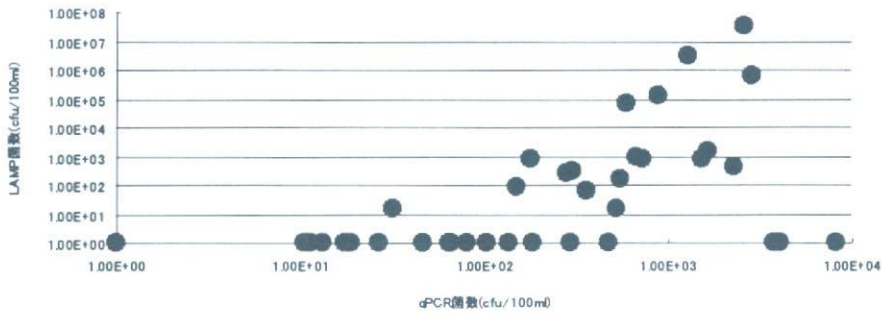


図4 qPCR法とLAMP法による検出菌数の分布

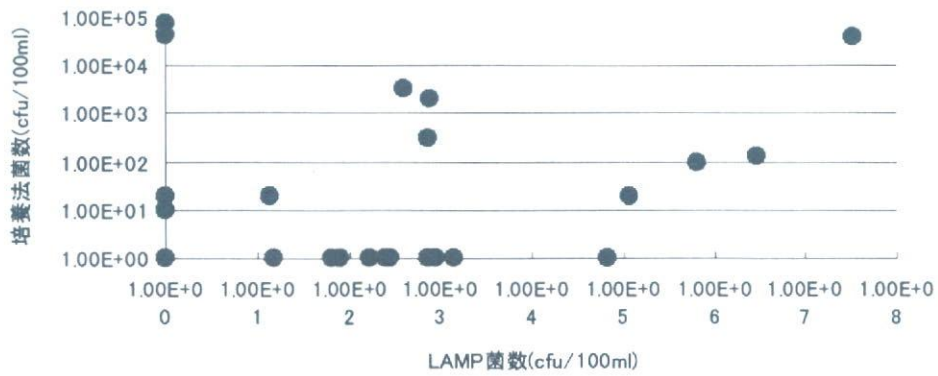


図5 培養法とLAMP法による検出菌数の分布



## [D] *Legionella* 属菌迅速検査の有用性に関する検討

### A 研究目的

レジオネラ症を防止するため、浴用施設の維持管理状況を把握、監視しなければならない。そのため、レジオネラ属菌による汚染状況をリアルタイムに把握することが必要となっている。そこで遺伝子増幅を利用した迅速測定法について、その有用性を検討した。

### B 研究方法

富山県内の温泉および銭湯等から浴用水 53 検体を採取、レジオネラ属菌の汚染状況について培養法および遺伝子検査法 (qPCR 法、LAMP 法) を用いて調査した。今年度は Ethidiummonoazide (EMA) 処理により、死菌の DNA を切断し、生菌の DNA のみ増幅させることを検討した。検水の採取は県内の厚生センターの職員の協力を得た。

#### ① 検水の濃縮

浴用水 500ml をメンブランフィルター (直径 47mm、0.2  $\mu$ m、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE) で吸引ろ過し、フィルターを 5.0ml の滅菌蒸留水で 5 分間ボルテックスしたものを試料とした。

#### ② 培養法

試料を 50°C 20 分加熱処理後、GVPC 培地 (ビオメュー)、WYO 培地 (栄研化学) にそれぞれの培地毎に 100  $\mu$ l、10  $\mu$ l 量をコンラージし、35°C で 7 日間培養した。

#### ③ Ethidiummonoazide (EMA) 処理 DNA を用いた生菌 PCR の検討

予備実験として、検量線に用いる標準菌を用い、各段階の加熱死菌を作成した。生菌と死菌それぞれに EMA 濃度 0、10、20  $\mu$ g/ml で処理した。また、実際の検査では、濃縮検体 10 件に 20  $\mu$ l/ml、

11 件に 10  $\mu$ l/ml、32 件に 1  $\mu$ l/ml の EMA を用いて処理した。この処理の方法は資料 1 に示す。

#### ④ DNA 抽出法

遺伝子増幅法に用いる DNA は、Chelex (Bio-rad) 法 (資料 2) に示すプロトコールに従って抽出した。得られた抽出 DNA を用い、遺伝子増幅法 (qPCR 法、LAMP 法) にてレジオネラ属菌を算定した。

#### ⑤ qPCR 法

使用したプライマーは LEG427F : 5'-GTAAAGCACTTTCAGTGGGGAG-3' および LEG880R : 5'-GGTCAACTTATCGCGTTTGCT-3'、Premix Ex TaqTM (タカラバイオ) を用い、DNA 2  $\mu$ l、全量 25  $\mu$ l の系でおこない、ABI PRISM7000 (アプライドバイオシステムズ) で測定した。反応は前熱変性 95°C 30 秒の後、変性 95°C 10 秒、アニーリングと伸長反応は 63.5°C 60 秒を 40 サイクルの条件でおこなった。

#### ⑥ LAMP 法

Loopamp レジオネラ検出試薬キット E を用い、濁度測定装置 LA320C で判定した。

#### ⑦ 検量線の作成

*L. pneumophila* Nagasaki 080045 を標準菌として、30°C 4 日間培養後、滅菌生理食塩水で菌を懸濁し、McF2 (10<sup>8</sup> cfu/ml 相当) になるよう調製した。それを用いて 10 倍段階希釈系列を作製した。この 2ml あるいは 1ml を用いて DNA を抽出した。また、この希釈系列の 100  $\mu$ l を BCYE  $\alpha$  (ビオメュー) にコンラージし、菌数を測定した。

### C 研究結果

#### 1. 浴用水中のレジオネラ属菌の検出

検水 53 件中、レジオネラ属菌陽性(>10cfu/100ml)となったのは、培養法 20 件(37.7%)、qPCR 法 37 件(69.8%)、LAMP 法 30 件(56.6%)で、遺伝子法で検出率が高かった(表 1)。今年度は、培養法陽性、遺伝子法陰性となった検水は、qPCR、LAMP いずれの方法とも 3 件のみで、昨年度の 11~12 件に比べると大きく減少した。これは DNA 抽出を昨年度の研究の中で検出率の高かった Chelex 法に変更したことによると考えられる。この 3 件のうち、1 件は薬湯で菌数が 15cfu/100ml、1 件は 10cfu/100ml と、その培養菌数が多くはなかったことを考えると、PCR での検出限界以下であった可能性は否定できない。薬湯については、阻害物質が含まれている可能性も考えられた。しかし、残る 1 件は 500cfu/100ml で、分離されたのは *L. pneumophilla* SG1 および SG6 であったことから、PCR で遺伝子を検出できなかった原因については不明である。一方、培養法で陰性となった検水 13 件のうち遺伝子法が、qPCR 法のみ陽性 8 件、LAMP 法のみ陽性 1 件、いずれも陽性となったのは 12 件であった(表 2)。一方、qPCR 法と LAMP 法を同様に比較したところ、結果が一致したのは 42 件(79.2%)であった(表 3)。

表 1 浴用水中のレジオネラ属菌検出率

	qPCR		計	LAMP法		計	
	+	-		+	-		
培 養	+	17	3	20	17	3	20
	-	20	13	33	13	20	33
計	37	16	53	30	23	53	

陽性：培養法 >10cfu/100ml

表 2 方法別レジオネラ属菌検出数の比較

	検体数	陽性数	%
培養法		20	37.7
qPCR	53	37	69.8
LAMP法		30	56.6

陽性：培養法 >10cfu/100ml  
：遺伝子検査法 >1cfu/100ml

表 3.qPCR と LAMP 法による検出率の比較

	LAMP法		計	
	+	-		
qPCR法	+	28	9	37
	-	2	14	16
計	30	23	53	79.2

+ : >1cfu/100ml

レジオネラ属菌数について、それぞれの方法で得られた菌数を log 対数で比較したところ、培養菌数との相関係数は qPCR 法で  $R^2 = 0.2619$ 、LAMP 法で  $R^2 = 0.4979$  と LAMP のほうが高かった(図 1)。

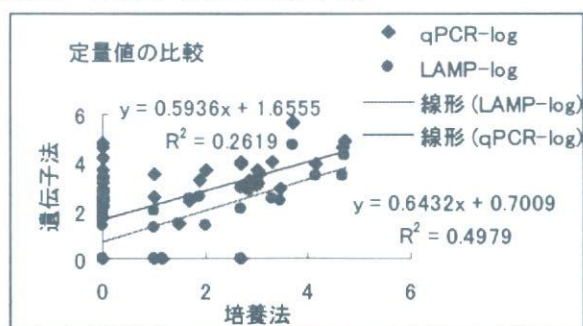


図 1. 培養法と遺伝子検査法の定量値の比較

## 2. EMA 処理による生菌 DNA 定量の検討

討

標準菌株の各段階希釈液から作製した生菌と加熱死菌について、それぞれ EMA 処理をおこなった系とおこなわなかった系で



DNA を抽出し、qPCRで定量した(図 2)。

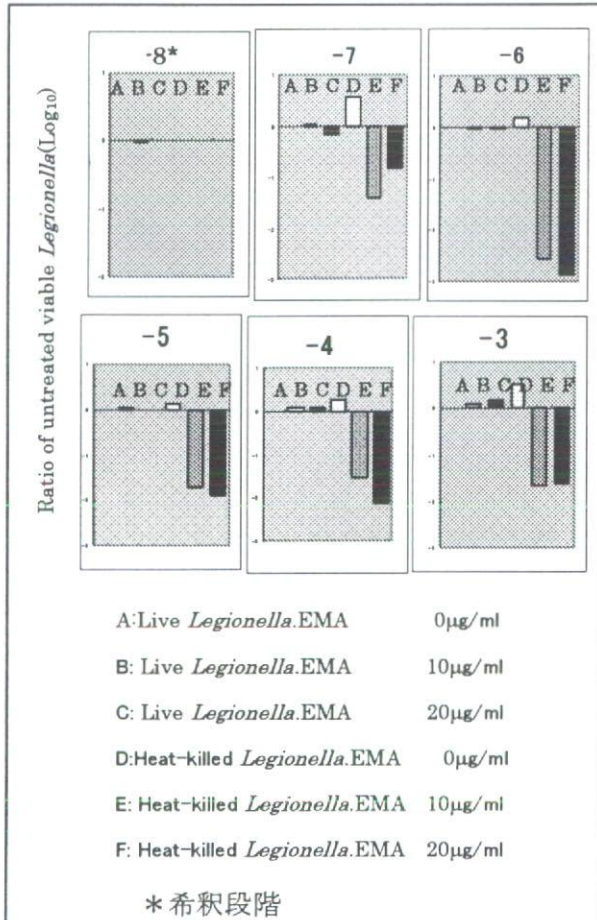


図 2. 標準菌株による EMA が死菌 DNA に与える損傷の效果測定

図2は、A(EMA 未処理の生菌の菌数)を基準に、EMA の濃度を変化させたときの定量値を希釈段階別に対数で示した。加熱死菌に EMA 処理した系(図中の E・F)は理論的には DNA が切断され、増幅しないはずであるが、今回の検討結果では増幅を認めた。すなわち死菌の DNA が完全に切断されなかったことを意味する。加熱による菌の死滅については、培養検査で確認したが、生菌が残存していた可能性はほとんどないと考えられる。一方、EMA 処理による減少割合は、希釈-6 液においては E・F で対数値 2~3、他の希釈段階では対数値 1~2 とほぼ一定で、菌数による減少率に差は認められ

なかった。実際の浴用水による検査では、EMA 処理の前後で定量値が減少した検水は、qPCRで24/37件(64.9%)、LAMP法で17/30件(56.7%)であった。また、培養法で菌が検出されないにもかかわらず、EMA 処理後に PCR で遺伝子が確認された検体も認められた。

### 考察

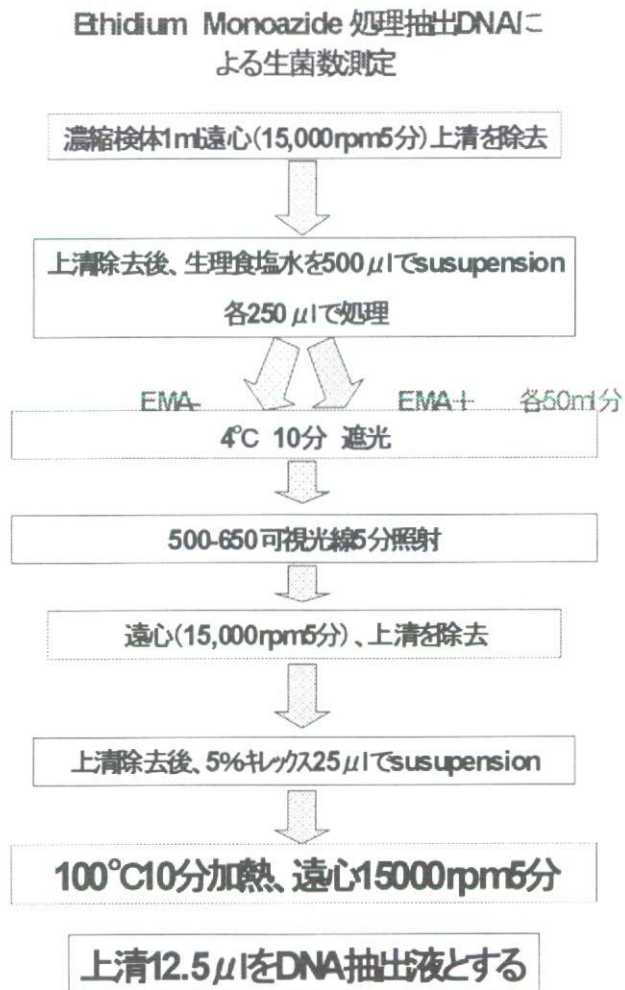
今年度、DNA 抽出を Chelex 法で実施した結果、培養法でレジオネラ属菌が分離されたにもかかわらず、遺伝子検査法で 0cfu/100ml となった検水はわずか 3 件であり、抽出法の改善が効果的であったことを示す結果となった。しかし、この 3 件が示すように、PCR 阻害物質が完全に除去される DNA 抽出法の検討が必要である。PCR 法と培養法による定量値との相関は、qPCR、LAMP 法ともに  $R^2$  が 0.26、0.48 とよくない。しかし、これは PCR の特性である死菌の DNA を検出するため、遺伝子検査で定量値が高くなるためと考えられる。そこで、すでに報告されている EMA 処理することで死菌 DNA を増幅させない方法を検討したが、標準菌における予備実験の段階で、EMA 処理により死菌を完全に排除することはできなかった。実際の浴用水検査においても EMA 処理の有無による結果に大きな差は認められなかった。しかし、検査した浴用水中が死菌を含んでいたか、すなわち、すべてが生菌であった可能性もあることから、これだけで有用性を判断することはできない。中には 177cfu/100ml が 0cfu/100ml となった検体もあり、EMA 処理が有効であることが確認できた。したがって、EMA 処理については、浴用水がどれだけの死菌を含むのか、また、水質によりその効果が抑制されるかなど、詳細な検討が必要であると思われる。定量性

が求められるこの検査において、死菌の排除は必要である。したがって、標準法に取り入れることを視野に入れ、安定した定量値が得られるよう、今回の結果を詳細に検証し、

標準菌でおこなった実験で、死菌DNAが切断されなかった原因を突き止めなければならぬ。



資料 1



## 資料 2

### 核酸検出法の手順 (Chelex100 法)

#### 濾過濃縮

1. 検水 500mLをメンブランフィルター(直径 47mm、0.2 $\mu$ m、ミリポア社 ポリカーボネート ISOPORE)で吸引ろ過する。
2. 滅菌蒸留水 50mLでメンブランフィルター及びカップを洗浄し、吸引ろ過する。  
このとき、カップ壁面を洗うように滅菌水をピペットで流しかける。
3. 吸引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50mL 滅菌コニカルチューブに入れる。
4. チューブに 5.0mL の滅菌蒸留水を加え、5分間ボルテックスする。このとき、まんべんなく滅菌水がフィルターに接触するようにチューブの角度を調節する。
5. この試料を濃縮試料とする。
6. 濃縮試料 5.0mLのうち、1.0mLを微量高速遠心機 15,000rpm 5分間遠心し、上清を除去する。
7. この沈さに 5% Chelex TE (pH8.8) 50 $\mu$ lを加え、ボルテックスする。このとき、均一に添加するため、Chelex はスターで攪拌しながら採取する。
8. 7の試料を 100 $^{\circ}$ Cで 10分加熱し、15,000rpm 5分遠心し、この上清を精製DNAとする。
9. 精製DNAを95 $^{\circ}$ C、5分間加熱後、冷却試料の 5 $\mu$ lをqPCR装置 (ABI PRISM 7000)、および LAMP 装置で核酸増幅。
10. 標準菌株の希釈系列から検量線 (LAMP法の検量線は希釈系列で菌数の少ないものを採用すると直線性が悪くなるので、菌数の高いほうで得られた直線を採用)を作成し、試料のCt値、またはTt値をもとに試料の菌数とした。
11. 得られた菌数は試料 10mL中の菌数に相当するので、培養法の 100mLと比較するために、核酸法の菌数を 10倍にする。

平成 20 年度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  
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  
分担研究報告書

「ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究」

研究代表者	国立感染症研究所細菌第一部	倉 文明
研究分担者	神奈川県衛生研究所	黒木俊郎
研究分担者	横浜市衛生研究所	荒井桂子
研究分担者	静岡県環境衛生科学研究所	杉山寛治
研究分担者	岡山県環境保健センター	中嶋 洋
研究分担者	長崎県環境保健研究センター	田栗利紹
研究分担者	大分県衛生環境研究センター	緒方喜久代
研究協力者	宮城県保健環境センター	佐々木美江
研究協力者	群馬県衛生環境研究所	藤田雅弘
研究協力者	富山県衛生研究所	磯部順子

本調査は、浴槽施設の衛生管理に HACCP システムの導入を図ることを前提に、モニタリング項目としての ATP 量測定の有用性を検討することを目的に行った。昨年度の神奈川県内の浴槽施設を対象にした調査により、ATP 量は浴槽水中の従属栄養細菌数および一般細菌数にほぼ相関しており、浴槽水の菌濃度あるいは汚れの度合いの指標として ATP 量を利用することの可能性を示すことができた。今年度は調査対象地域と検体数を拡大し、広い地域の温泉施設の試料水を対象とし、従属栄養細菌数、一般細菌数、レジオネラ属菌数および ATP 量を測定した。試料水の ATP 測定値の 39.8RLU（常用対数値=1.6）をはさんで、レジオネラ属菌の検出の検出頻度が異なることが観察された。さらに、実験浴槽を利用して、浴槽水中の従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数および ATP 量を測定し、経時的な変化を追った。この実験においても、ATP 値の 50RLU（常用対数値=1.7）を超えた場合にレジオネラ属菌が検出されることが観察された。これらの結果から、ATP 値が 50RLU に達し、これを超えた場合はレジオネラ属菌が検出される可能性が高いため、この数値を超えないように浴槽の衛生管理を行うことが必要であり、モニタリング項目として ATP 量の測定が有用であることが示された。



## A. はじめに

浴槽施設が関連したレジオネラ症の発生を予防するには、浴槽施設の衛生管理を強化することが不可欠であり、HACCP システムは有効な手段となる。そこで、浴槽施設の衛生管理への HACCP システムの導入をこれまで検討してきた。HACCP システムでは、浴槽水におけるモニタリングが可能な項目は限られるため、新たな指標が必要であった。そこでモニタリング対象としての ATP 量の有用性を検討することとした。

ATP の測定は従来非常に難しいものであったが、近年簡易測定法が開発され、そのシステムを用いて、既に食品衛生等の分野では広く利用されている。このシステムでは、キットを用いて現場において簡単に ATP 量を測定することが可能である。浴槽水中の ATP は、入浴者、浴槽の構造物（木造物）、混入し増殖する細菌類などに由来する。

本調査では、入浴施設の浴槽水等の従属栄養細菌数、一般細菌数、レジオネラ属菌数を測定し、これらの数値と ATP 量の関係から、レジオネラ属菌発生の指標値としての ATP 測定値の有用性を検討した。さらに、実験浴槽を使用し、実験条件下における従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数ならびに ATP 量を測定し、ATP 測定の有用性を検証した。

## B. 材料と方法

### 1) レジオネラ属菌の測定

レジオネラ属菌の培養は、各衛生研究所において通常用いている方法により行った。試料水（浴槽水あるいは吐出水）200ml または 500ml を滅菌メンブランフィルターでろ過した。フィルターを 10ml の滅菌水が

入った 50ml 遠沈管に入れ、激しく振り、フィルターから菌をはがした。菌浮遊液を熱または酸処理した後、滅菌水で 10 倍段階希釈し、原液と各段階の 0.1ml をレジオネラ属菌用の選択分離寒天培地に塗抹し、36℃で 5 日間以上培養した。レジオネラ属菌と推定される平板上の集落を計数し、試料中の 100ml あたりのレジオネラ属菌数を算定した。

レジオネラ属菌が疑われる集落は、レジオネラ属の確認には 16S rRNA をターゲットとした PCR 法、*L. pneumophila* の確認には *mip* 遺伝子をターゲットとした PCR 法を用いて鑑別を行った。レジオネラ属菌あるいは *L. pneumophila* であることが確認された菌株は市販血清により菌種あるいは血清型を決定した。

### 2) 従属栄養細菌数と一般細菌数の測定

浴槽水の試料を滅菌水で 10 倍段階希釈し、原液と各段階の 0.1ml を従属栄養細菌数の測定には R2A 寒天平板培地へ、一般細菌数の測定には標準寒天培地へそれぞれ接種した。R2A 寒天平板は 42℃で 7 日間、標準寒天平板は 36℃で 3 日間培養した。培養後、集落数を計数し、試料 1ml 中の従属栄養細菌数と一般細菌数を決定した。

### 3) ATP 量の測定

ATP 量の測定は簡易測定キット（ルシパックワイド（キッコーマン））により行った。試料水の ATP 量は原液とフィルターろ過水を測定した。試料水の 5ml 程度を孔径 0.45  $\mu$  m の滅菌メンブランフィルターでろ過した。キットの綿棒ホルダーから綿棒を抜き、キットの先端のチューブを外し、マ

マイクロピペットのチップで試料（原液あるいはフィルターろ過水）100 $\mu$ lを注入した。チューブと綿棒ホルダーをキットの本体に戻し、チューブの内部の試薬と試料を混合した。説明書に従って専用の測定器（ルミテスターPD-10N）にキット本体をセットし、測定器に表示された数値を読み、ATP量を測定した。試料（原液およびフィルターろ過液）をそれぞれ3回測定し、平均値を算出した。

#### 4) 浴槽に関するデータの収集

レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、一般細菌数の測定を行った浴槽施設について、水温、pH、残留塩素濃度、入浴者数、泉質、浴槽の材質のデータも同時に収集した。

#### 5) 実験浴槽における細菌類およびATP値の動向の観察

静岡県環境衛生科学研究所に設置された実験浴槽（循環式）を用い、実験1と実験2を企画し、それぞれの実験において従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数およびATP量の観察を経目的に行った。なお、実験浴槽における検討は、本研究班の「フローサイトメトリーを利用した浴槽の管理法の確立」の実験と同時に実施された。

##### (1) 実験1

実験初日に、高濃度塩素（終濃度50ppm）により浴槽および配管の洗浄3時間と、逆洗処理+換水処理を3回行った。その後、塩素自動調節装置を用いて0.2~0.4ppmの濃度で塩素消毒を行いながら、16人が入浴した。そのまま循環を継続し、実験開始から7日目に塩素の注入を停止し、入浴した。細菌数およびATP量の測定を開始した。実

験開始から10日目の試料採取後に、塩素自動調節装置を用いて0.2~0.4ppmの濃度での塩素消毒を再開した。細菌数およびATP量は随時計測した。実験開始から15日目に実験を終了した。

##### (2) 実験2

実験初日に、高濃度塩素（終濃度50ppm）により浴槽および配管の洗浄3時間と、逆洗処理+換水処理を3回行い、さらに浴槽壁の高圧洗浄3回実施した。その後、塩素自動調節装置を用いて0.2~0.4ppmの濃度で塩素消毒を行いながら、10人が入浴した。そのまま循環を継続し、実験開始から4日目に塩素の注入を停止し、入浴した。5日目から細菌数およびATP量の測定を開始した。実験開始から10日目に塩素自動調節装置を用いて0.2~0.4ppmの濃度での塩素消毒を再開した。細菌数およびATP量は随時計測した。実験開始から12日目に実験を終了した。

#### C. 結果

1) 浴槽水のレジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、一般細菌数

8地域で採取された356検体を対象とした。このうち、237検体が採取された浴槽は塩素消毒が行われていた。

107検体からレジオネラ属菌が検出され、菌数は5~72,000CFU/100mlであった。

従属栄養細菌数は検出限界以下(<10CFU/ml)~95,000,000CFU/ml、一般細菌数は検出限界以下(<10CFU/ml)~40,000,000CFU/mlであった。従属栄養細菌数と一般細菌数の相関係数は0.70で、回



帰直線は  $y=0.62x+0.07$  であった (図1)。

消毒無：  $R=0.58 \quad y=1.34x+1.19$

消毒不明：  $R=0.72 \quad y=1.48x+0.72$

## 2) ATP 測定結果

356 検体の ATP 値は、原液は 0.1～3263RLU、フィルターろ過水は 0～2726RLU の範囲にあった。

図2に試料水原液とフィルターろ過水の ATP 値の割合の分布を示した。試料水原液とフィルターろ過水の ATP 値の割合は次式により求めた。

ATP 値の割合 (%) = {ATP 値 (フィルターろ過水) / ATP 値 (原液)} × 100

塩素消毒が施されていない試料水では、ATP 値に関わらず 0～100% の範囲に収まっていた。塩素消毒が施された試料水の場合、ATP 値が 31RLU 以下ではフィルターろ過水の ATP 値が原水の ATP 値よりも高い検体が多く観察された。

図3に試料水原液とフィルターろ過水の ATP 値の割合の頻度を示した。塩素消毒が施されていない試料水では、原液とフィルターろ過水の ATP 値の割合が 11% 未満となった検体の頻度が高かった。塩素消毒が施されている試料水では、割合が 41% 以上となった検体の頻度が多くなり、100% 前後でピークに達し、150% まで徐々に減少した。

図4に試料水原液の ATP 値と従属栄養細菌数の相関を示した。全試料、塩素消毒が施された試料、塩素消毒が施されていない試料、塩素消毒の有無が不明の試料に分けて相関係数を算出したところ、以下のような結果であった。

全試料：  $R=0.60 \quad y=1.62x+0.08$

消毒有：  $R=0.56 \quad y=1.58x-0.15$

ATP 測定値とレジオネラ属菌検出の関係を図5に示した。レジオネラ属菌が不検出の検体の頻度は ATP 値が低い検体が多いが、ATP 値の 1.6～1.7 を境にして不検出の検体の頻度が低くなった。逆にレジオネラ属菌が検出された検体は、1.6 付近から多くなった。

ATP 値の累積度数分布を図6に示した。レジオネラ属菌が検出されなかった試料水では、ATP 値の常用対数値が 1.7 まではグラフの傾きが急であったが、1.7 から傾きが緩やかになった。また、レジオネラ属菌が検出された試料水では、1.7 までは傾きが緩やかで、1.7 を過ぎると傾きがやや急になった。ATP 値が 1.7 未満と 1.7 以上を示した検体のレジオネラ属菌の検出率は有意差がみられた。

## 3) 実験浴槽の浴槽水のレジオネラ属菌検出、従属栄養細菌数および ATP 量

実験1および実験2の従属栄養細菌数と ATP 量の結果を、レジオネラ属菌の検出の有無と塩素消毒の有無で分けて示した (図7および8)。実験1では、塩素消毒を停止した実験開始7日目に従属栄養細菌が徐々に増殖したが、ATP 量は変化はなかった。8日目には従属栄養細菌数は  $10^6$  CFU/ml でピークに達し、レジオネラ属菌も検出され、ATP 量は 100RLU を超えていた。9日目、10日目と ATP 量はやや減少するが、従属栄養細菌数は  $10^6$  CFU/ml を維持していた。8日目から10日目までの浴槽水原液の ATP 測定値に占めるフィルターろ過液の ATP



測定値は平均 22.4%であった。10 日目に塩素消毒が再開され、12 日目には従属栄養細菌数は当日中に急激に減少した。しかし、ATP 量は消毒開始時よりもむしろ増加した。このときの浴槽水原液の ATP 測定値に占めるフィルターろ過液の ATP 測定値は平均 97.5%であった。13 日目には従属栄養細菌数は検出限界以下となったが、ATP 量は 90RLU であった。実験が終了した 15 日目には塩素消毒を開始した 7 日目とほぼ同じ値を示した。

実験 2 では、実験開始時は従属栄養細菌数は 10CFU/ml で塩素消毒を停止した 4 日目の最初の測定時もほぼ同様であった。しかし、4 日目から 5 日目に従属栄養細菌数と ATP 量は徐々に増加し、 $10^6$ CFU/ml でピークに達した。6~8 日目に ATP 量はやや減少するが、従属栄養細菌数は  $10^6$ CFU/ml を維持した。レジオネラ属菌は 6 日目から検出された。5 日目から 8 日目までの浴槽水原液の ATP 測定値に占めるフィルターろ過液の ATP 測定値は平均 49.7%であった。10 日目に塩素消毒を再開し、当日中に従属栄養細菌数は 10CFU/ml 程度まで減少したが、ATP 量はやや増加した。11 日目、12 日目と従属栄養細菌数は 10CFU/ml 程度であり、ATP 量も減少した。このときの浴槽水原液の ATP 測定値に占めるフィルターろ過液の ATP 測定値は平均 96.9%であった。

実験 1 および 2 の結果を統合して図 9 に示した。レジオネラ属菌は従属栄養細菌数が  $10^5$ CFU/ml を超えているときに検出された（図中の大きな楕円形内）。従属栄養細菌数が  $10^3$ CFU/ml（図中の小さい楕円形内）でレジオネラ属菌が検出されているが、

いずれも塩素消毒を再開した後に測定した結果であった。

#### D. 考察

本研究では、入浴施設の衛生管理における HACCP システムのモニタリング項目としての ATP 量の測定の有用性を検討した。入浴施設におけるレジオネラ属菌の増殖を抑制し、これによりレジオネラ感染症の発生を予防することを目的にして、これまでに入浴施設の衛生管理に HACCP システムを導入することを検討してきた。HACCP システムでは重要管理点の設定、危害の有無の検討、モニタリングの設定、基準の設定等の作業を行い、設定に従って管理が行われる。ここで、モニタリングは危害を減らすための重要な管理作業であり、HACCP システムにおいては不可欠の項目である。しかし、入浴施設ではモニタリングの対象項目が限られ、項目の選択が課題であった。

浴槽で細菌が増殖し、それに伴ってレジオネラ属菌が増える。そのため、細菌数やレジオネラ属菌の増殖を測定して、その結果に基づいて衛生管理を進めることが理想であるが、細菌数やレジオネラ属菌の検出には日数がかかるため、日常的に測定してその結果を入浴施設の衛生管理に活用することは不可能である。これにより ATP 量の測定は、浴槽水の細菌数および入浴者等に由来する汚れを監視し、レジオネラ属菌が増殖する状況を把握するための指標とすることにある。

ATP（アデノシン三リン酸）は生物のエネルギーの保存や利用に関与する物質で、ATP の存在は、生物が存在していることを

示している。したがって、ATP を測定すれば試料中の細胞や微生物の存在を間接的に定量することができる。近年、ATP の測定をルシフェラーゼを利用して行う方法が開発され、非常に簡単に行うことが可能になった。ルシフェラーゼは発光酵素とも呼ばれ、ホタルなどの発光生物において発光の化学反応を触媒する働きがある。ルシフェラーゼは ATP を消費してルシフェリンを発光させる酸化還元酵素の一種である。発光する種々の物質を総称してルシフェリンと呼ばれている。ATP の測定は、ATP 存在下でルシフェラーゼの触媒反応によりルシフェリンが発光することを利用している。発光強度は、ルシフェラーゼ量が一定であれば ATP 量に依存する。したがって、発光強度を測定すれば ATP 量を測定することができる。

微生物が関与する分野での ATP の測定は、培養菌数の測定、製品中の汚染菌数の測定、抗菌性試験、食品衛生管理（食品製造工程でのふき取り検査、調理器具などの洗浄度チェックなど）、工業製品の微生物管理（化粧品、石油類など）に応用され、培養検査に代わる迅速検査法とされている。

ATP は生物細胞内に存在するが、細胞が破壊することにより細胞外にも ATP が放出され、そのため通常は生物細胞内外に ATP が存在している。今回の調査で使用した ATP 測定用キットは細胞内と細胞外の ATP を区別することなく測定する。したがって、試料中の細菌に由来する ATP のみならず、その他の生物に由来する ATP を測定する。浴槽水を検体とする場合は、浴槽水中の細菌のみならず、入浴者から放出された ATP や浴槽が木製であれば木に由来す

る ATP、さらに浴槽外からの様々な混入物に由来する ATP を測定してしまう。

浴槽の管理においては、上記の全 ATP を測定することで、細菌類の増殖状況と種々の汚れを総合的に監視することになる。レジオネラ属菌の防除のための衛生管理では、細菌類の監視は重要であるが、種々の汚れは細菌類の栄養源となるものであり、これを監視対象とすることも細菌類の増殖を抑制するために重要である。

浴槽施設の衛生管理において浴槽水の ATP 量を測定した場合、本調査の結果から、測定値が 50RLU（常用対数値=1.7）に達し、これを超えた場合はレジオネラ属菌の増殖の可能性が高いことを示していると判断することができる。したがって、ATP 測定値が 50RLU を超えないように浴槽の管理を行う必要があると判断される。図 5 で示したように、ATP 量の常用対数値の 1.6（実数値=39.8）をはさんで、レジオネラ属菌が検出される頻度が異なっていた。1.6 以下の数値を示した浴槽水からレジオネラ属菌が検出された浴槽施設は、貯湯槽が設けられた掛け流し式温泉施設であり、浴槽水中の従属栄養細菌数と一般細菌数は低かったことから ATP 値も低く、レジオネラ属菌が貯湯槽あるいは配管中で増殖したことが疑われた。

浴槽水中の従属栄養細菌数と一般細菌数が多くなると、レジオネラ属菌が増殖する可能性が高くなる。そこで細菌の増殖の状況を把握し、レジオネラ属菌の増殖を推測するために ATP 量を測定するのであるが、貯湯槽や配管等の浴槽以外の場所でレジオネラ属菌が増殖し、これが浴槽水に混入する場合は、浴槽水中の細菌数が低くてもレ



ジオネラ属菌が検出される。このような場合は、ATP量はレジオネラ属菌の存在を推測する指標には適していない。

今回の調査では、ATPの測定を試料原液とフィルターろ過水を対象にし、試料中の細菌細胞内由来ATPと細胞外ATPを分けて測定することを試みた。浴槽水中のATPがすべて細胞膜が無傷の微生物由来であれば、フィルターろ過水中のATP量はほぼ0になることと予想された。塩素消毒を施していない浴槽水での原液のATP量に占めるフィルターろ過水のATP量の割合が0%となる検体が多いのは、このことを示している(図2)。塩素消毒を施した浴槽水で、原液のATP量に占めるフィルターろ過水のATP量の割合が高いのは、遊離塩素により微生物の細胞が破壊され、浴槽水中にATPとして存在していたと推測された(図2、図3)。しかし、フィルターろ過水でのATP値が原液よりも高くなった原因は明らかではない。

実験浴槽を利用して、計画された条件下で従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数およびATP量の測定を行った。実験浴槽を用いることで余計な要因を除き、菌数とATP量の動向を観察することが可能であり、浴槽の衛生管理を検討するうえで非常に有効な手段であった。

従属栄養細菌数とATP量の変化を観察すると、塩素消毒停止後に従属栄養細菌数とATP量は並行して急激に増加し、菌数がピークに達すると菌数はそのままにATP量がやや減少した。ここで塩素消毒を再開すると従属栄養細菌数は減少するが、ATP量は逆に増加した。このとき、浴槽水原液とフィルターろ過液のATP値がほぼ同じ

であることから、遊離塩素により細菌が破壊され、ATPが浴槽水中に放出されるが、しばらく浴槽水中に溶解して残存していることが推測された。やがて従属栄養細菌数とATP量がともに減少し、塩素消毒開始時のレベルに戻っていた。このように、従属栄養細菌数とATP量はグラフ上に8の字を描くような動向を示すことが明らかとなった。

実際の現場の浴槽において測定したATP量と従属栄養細菌数およびレジオネラ属菌の検出の関係から、ATP測定値が50RLU(常用対数値:1.7)を超えればレジオネラ属菌が検出される危険性が高くなるため、50RLUを超えない浴槽の管理が必要であることを提言したが、実験浴槽における実験においても、ほぼ同様の結果が得られた。浴槽の衛生管理にATP測定を導入された場合には、この結果に基づいて管理されることが望まれる。

## E. 結論

浴槽施設の衛生管理にHACCPシステムを導入することを前提に、リアルタイムで浴槽水の監視をするための項目としてATP量の測定を取り上げ、その有用性を検討した。

ATP量は従属栄養細菌数と相関し、またATP測定値の39.8RLU(常用対数値=1.6)をはさんでレジオネラ属菌の検出頻度が異なり、ATP値が高ければレジオネラ属菌の検出頻度が高いことが観察された。そこで、ATP測定値が50RLU(常用対数値=1.7)を超えないように浴槽の衛生管理をする必要があり、ATP量の測定がモニタリング項



目として有用であることを示すことができた。

今回の調査では、ATP 測定を市販の簡易キットを用いて実施したが、測定方法は説明書に記載の方法とは異なり、試料のキットへの採取をキットの綿棒を用いずに、マイクロピペットで 100  $\mu$  L 採取して、3 回測定し、平均値により解析を行った。これは測定の正確性を向上させるために行った。キットの綿棒で試料を採取する場合、綿棒による採取量はおおよそ 100  $\mu$  L であることは事前に確認した。実際の入浴施設の衛生管理において ATP 測定を行う場合は、キットの説明書とおりに綿棒で試料を採取し、1 回測定することで十分有効であると考えられる。

#### F. 研究発表

Toshiro Kuroki, Tomoe Ishihara, Kumiko Ito, Fumiaki Kura: Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan with special reference to *Legionella* concentrations in water. Jpn J Infect Dis 62: 2009 (in press).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

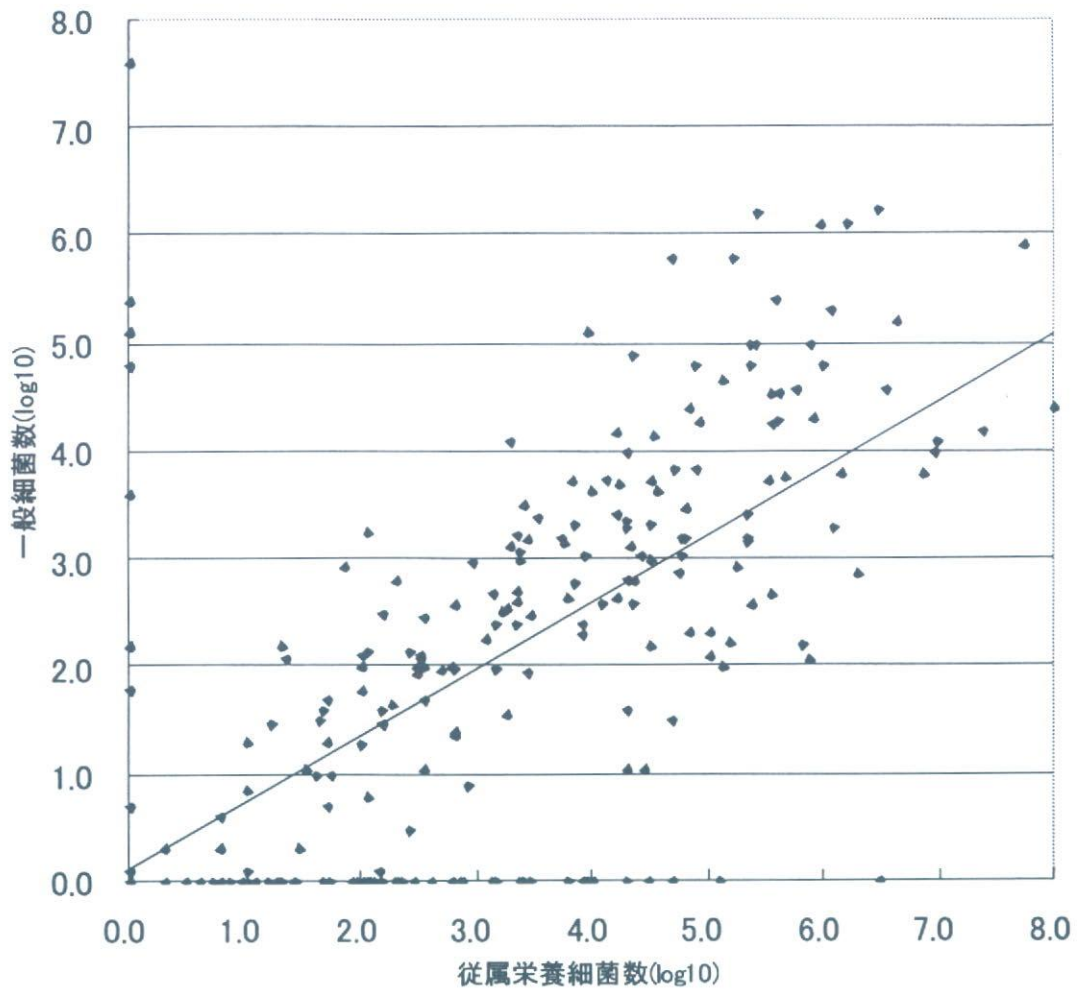


図1 従属栄養細菌数と一般細菌数の相関

$$R=0.70 \quad y=0.62x+0.07$$

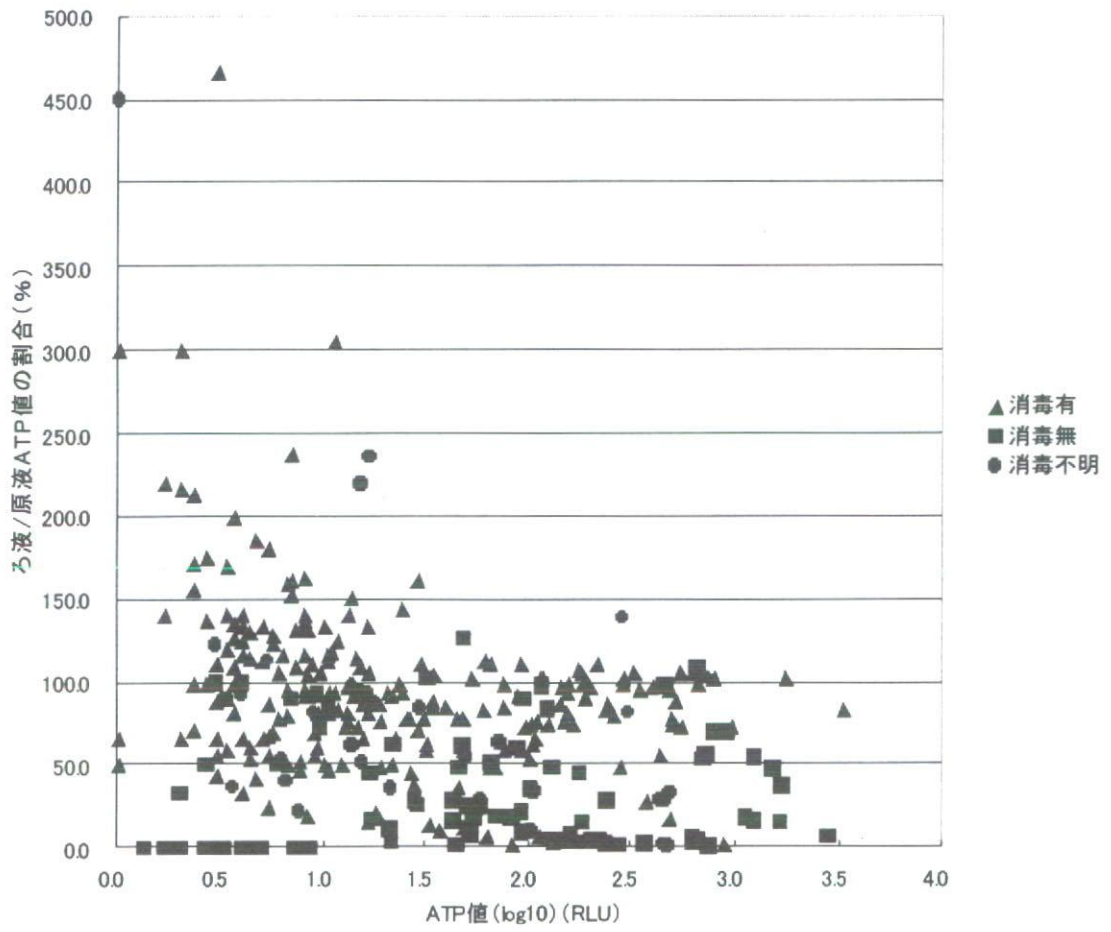


図2 試料水原液とフィルターろ過水の ATP 値の割合の分布

$$\text{ATP 値の割合 (\%)} = \{ \text{ATP 値 (フィルターろ過水)} / \text{ATP 値 (原液)} \} \times 100$$