

表1 培養法と核酸増幅検査結果 (qPCR、qRT-PCR) の比較 (n=102)

(核酸増幅検査で 10 CFU/100ml 以上の定量値を陽性と判定)

(1) qPCR 法と培養法

		qPCR		計
		陽性	陰性	
培養法	陽性	24	8*	32
	陰性	30	40	70
計		54	48	102

(2) qRT-PCR 法と培養法

		RT-qPCR		計
		陽性	陰性	
培養法	陽性	29	3*	32
	陰性	43	27	70
計		72	30	102

\*) 3 件は *L. londiniensis* を検出  
5 件の培養菌数は 10~50 CFU/100ml の原水

\*) 3 件全てに *L. londiniensis* を検出

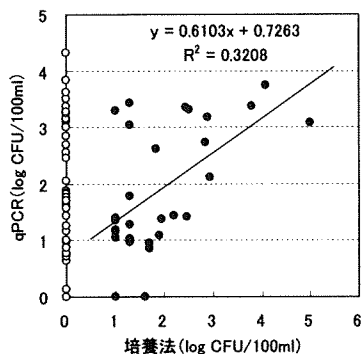
(3) qPCR 法と qRT-PCR 法

		RT-qPCR		計
		陽性	陰性	
qPCR	陽性	53	1*	54
	陰性	19**	29	48
計		72	30	102

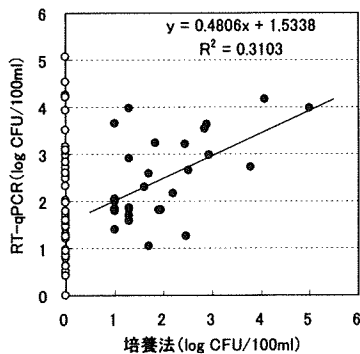
\*) 培養陰性、qPCR で 37 CFU/ml の原水が 1 件

\*\*\*) 5 件は培養陽性、13 件は qRT-PCR で 10~52 CFU/100ml、1 件は 360 CFU/100ml 未満

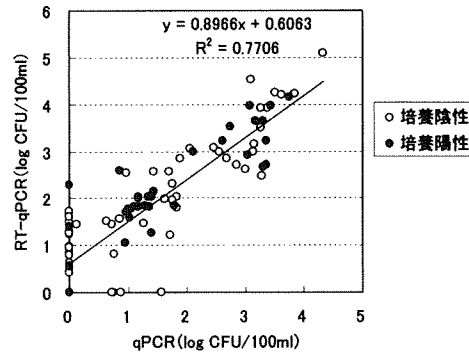
1) 全試料 (n=99)



(a) 培養法と qPCR

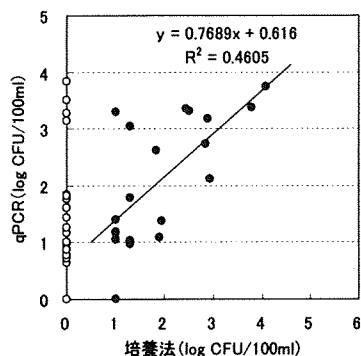


(b) 培養法と qRT-PCR

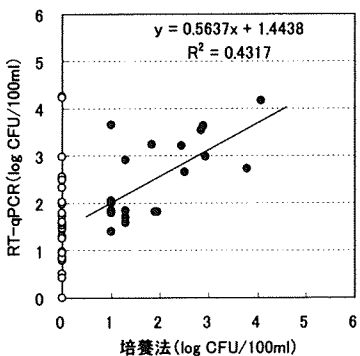


(c) qPCR と qRT-PCR

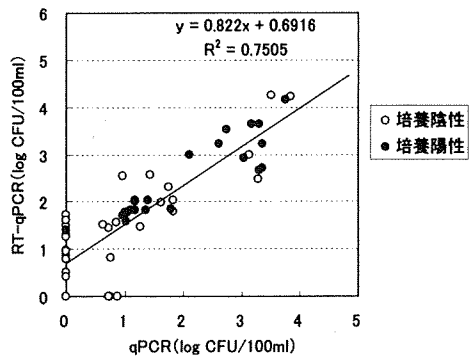
2) 浴槽水、逆洗水等 (n=61)



(a) 培養法と qPCR



(b) 培養法と qRT-PCR



(c) qPCR と qRT-PCR

図6 培養法、qPCR 法及び qRT-PCR 法の相関 (*L. londiniensis* が検出された 3 件を除く)

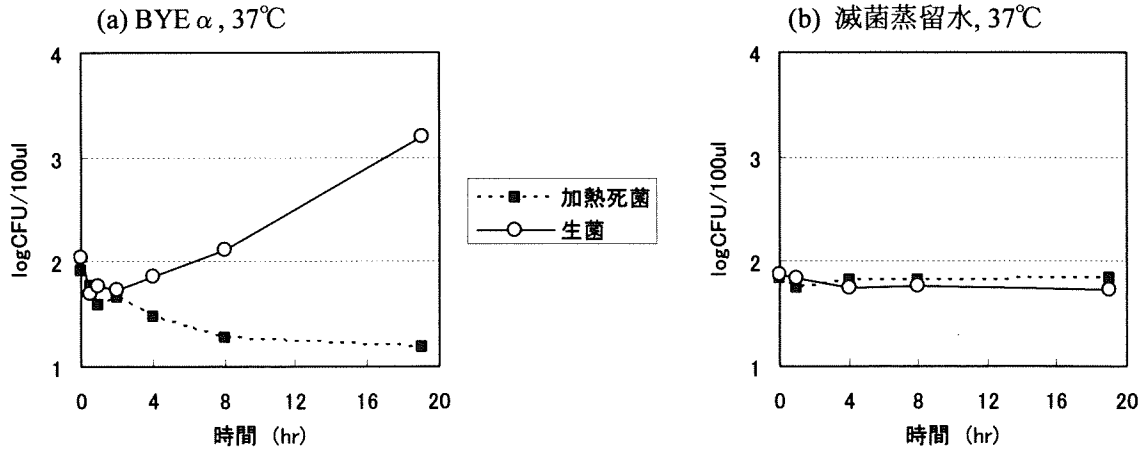


図7 LC qRT-PCR法におけるrRNAの増幅 (BYE  $\alpha$  液体培地)

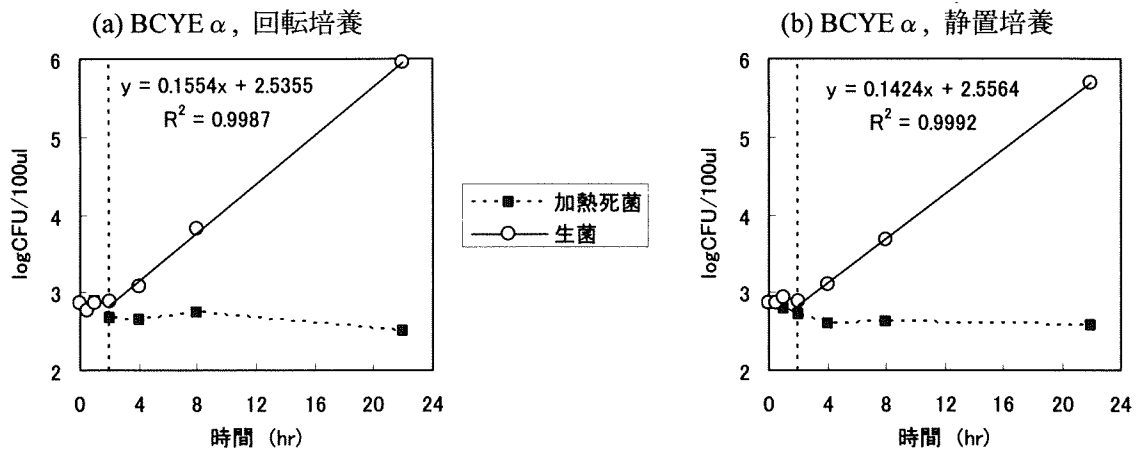


図8 LC qRT-PCR法におけるrRNAの増幅 (BCYE  $\alpha$  液体培地)

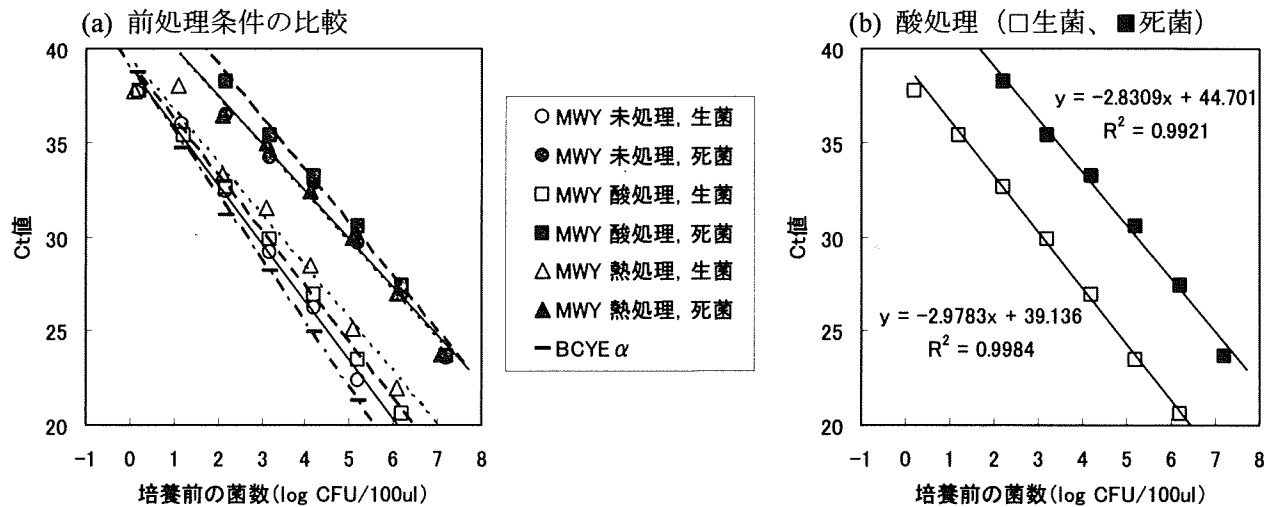
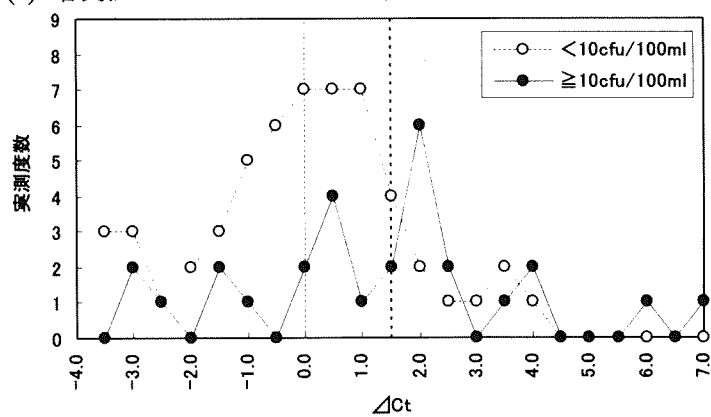


図9 LC qRT-PCRの検量線

(a) 培養法 10 CFU/100ml を基準とした場合



(b) 培養法 50 CFU/100ml を基準とした場合

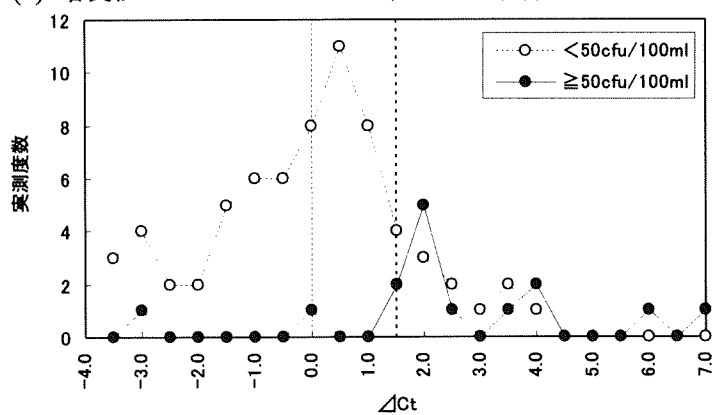


図 10 温泉試料における  $\Delta C_t$  値の度数分布

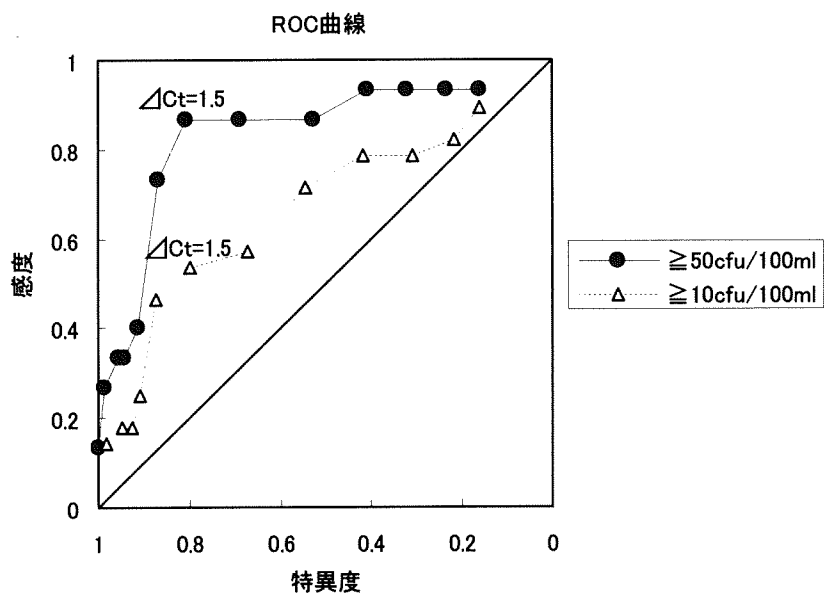


図 11 温泉試料を用いた  $\Delta C_t$  値の ROC 曲線

表 2 培養法と LC qRT-PCR 法の比較

(a) 培養法 10 CFU/100ml を基準とした場合

		培養法		計
		≥10 CFU/100ml	<10 CFU/100ml	
LC qRT-PCR	$\Delta Ct \geq 1.5$	15	11	26
	$\Delta Ct < 1.5$	13	44	57
計		28	55	83

感度: 53.6%      Fisher exact test p=0.0027  
 特異度: 80.0%

(b) 培養法 50 CFU/100ml を基準とした場合

		培養法		計
		≥50 CFU/100ml	<50 CFU/100ml	
LC qRT-PCR	$\Delta Ct \geq 1.5$	13	13	26
	$\Delta Ct < 1.5$	2	55	57
計		15	68	83

感度: 86.7%      Fisher exact test p=0.000001  
 特異度: 80.9%

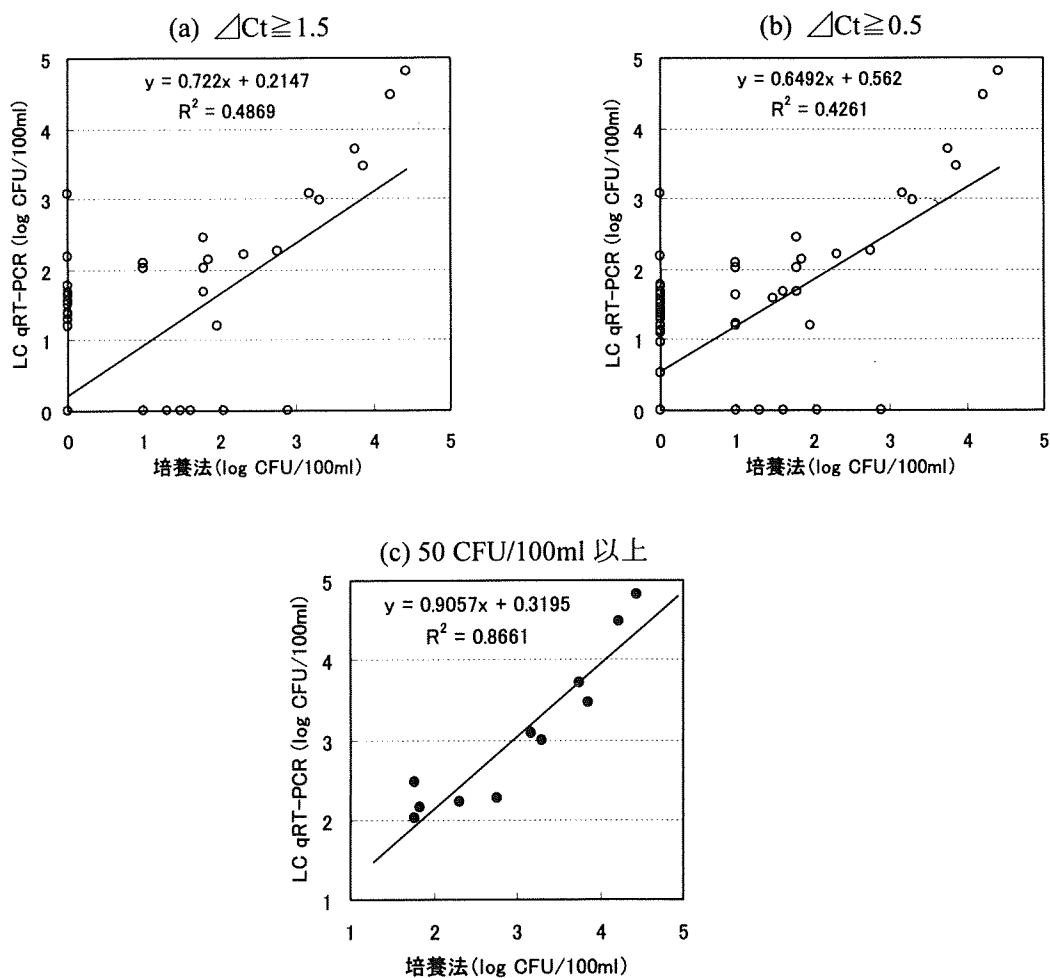


図 12 培養法と LC qRT-PCR 法の相関

表3 培養法陽性、LC qRT-PCR 法陰性検体の内訳

No.	平板培養法		LC qRT-PCR			種別	遊離残留塩素 (mg/L)
	定量値 (CFU/100ml)	菌種	Ct(N)	Ct(H)	ΔCt (H-N)		
1	750	Legionella sp.	—	37.40	—	浴槽水	0.2
2	110	L. pneumophila SG 3,4	35.81	36.28	0.47	浴槽水	0.2
3	40	L. pneumophila SG 3,4,8,UT	35.89	36.77	0.88	浴槽水	0.3
4	40	L. pneumophila SG 1,6	37.91	36.81	-1.10	浴槽水	0.1
5	30	L. pneumophila SG 5,6,UT	36.20	37.08	0.88	浴槽水	0.3
6	20	L. pneumophila SG 1,6	39.02	36.64	-2.38	浴槽水	1.0
7	20	L. pneumophila SG 3	37.18	37.25	0.07	逆洗水	不明
8	20	L. pneumophila SG UT	37.46	36.55	-0.91	浴槽水	1.0
9	10	L. pneumophila SG 8	—	37.13	—	浴槽水	0.6
10	10	L. pneumophila SG 1	37.25	36.23	-1.02	浴槽水	1.0
11	10	L. pneumophila SG 6	37.14	37.90	0.76	浴槽水	0.6
12	10	L. pneumophila SG 1	36.43	37.80	1.37	浴槽水	0.4
13	10	L. pneumophila SG 6	37.17	37.92	0.75	浴槽水	2.0

表4 培養法陰性、LC qRT-PCR 法陽性検体の内訳

No.	LC qRT-PCR				種別	遊離残留塩素 (mg/L)
	定量値 (CFU/100ml)	Ct値 (N)	Ct値 (H)	ΔCt (H-N)		
1	1200	32.69	36.77	4.08	浴槽水	0.6
2	160	35.24	38.85	3.61	浴槽水	0.4
3	60	36.43	—	—	浴槽水	0.4
4	50	36.48	38.37	1.89	原水	0.0
5	40	36.80	—	—	原水	0.0
6	40	36.82	38.60	1.78	浴槽水	0.4
7	30	36.95	38.82	1.87	浴槽水	0.3
8	20	37.53	39.23	1.70	原水	0.0
9	20	37.93	—	—	浴槽水	0.3
10	20	37.45	—	—	原水	0.0
11	20	37.51	—	—	原水	2.0

## 研究班の総合報告書概要版（3年分）

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

Ethidium monoazide (EMA) または propidium monoazide (PMA) 処理とリアルタイム PCR の  
コンビネーションによる環境中のレジオネラ生菌のみを定量検出する方法に関する研究

研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部  
研究分担者 常 彬 国立感染症研究所 細菌第一部  
研究分担者 前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部  
研究分担者 田栗利紹 長崎県環境保健研究センター  
研究分担者 杉山寛治 静岡県環境衛生科学研究所

#### A. 研究目的

近年、リアルタイム PCR は病原細菌を定量的に検出する方法として、レジオネラ検査にも使われている。しかし、生菌と死菌の DNA 両方が検出される欠点がある。EMA および PMA は特異的に死菌の損傷された細胞膜を透過し、その菌の染色体 DNA と結合することにより、PCR の増幅を抑制することが報告されている。この特性を利用し、我々は EMA または PMA 処理と PCR/リアルタイム PCR のコンビネーションの使用によって、レジオネラ生菌のみの DNA の存在を特異的に検出する方法を試した。

#### B. 研究方法

*Legionella pneumophila* を生理食塩水に

懸濁し、約  $10^7$  CFU/100 ml の懸濁液を作製した。これらの菌液を遊離塩素 1 ppm で室温 30 分処理し、死菌の調製を行った。レジオネラの生菌および塩素処理した死菌を含む懸濁液それぞれを 500 ml の水道水に添加し、モックサンプルを作製した。一方、公衆浴場およびモデル浴槽から水サンプルを採集し、解析を行った。これらのサンプルは遠心により濃縮し、酸処理したサンプル 0.1 ml を BCYE または GVPG 寒天培地に塗布し、37°C で培養した。濃縮サンプルに EMA または PMA を添加し、遮光下 4°C で 5 分間放置した後、可視光を 5 分間照射した。常法により染色体 DNA を精製し、レジオネラの 16S rDNA をターゲットとする PCR およびリアルタイム PCR を行っ

た。

### C. 研究結果および考察

#### 1. *L. pneumophila* を加えたモックサンプルにおける生菌のみの検出

はじめに、EMA または PMA 処理および PCR によるレジオネラ生菌のみの検出ができるか否かを調べるために、*L. pneumophila* を水道水に懸濁したモックサンプルを用いて、解析を行った。その結果、50  $\mu\text{M}$  の EMA または 200  $\mu\text{M}$  の PMA 処理を行ったことによって、塩素処理した死菌の染色体 DNA の PCR 増幅が見られなくなった（データは示さない）。

続いて、EMA または PMA 処理およびリアルタイム PCR によるレジオネラ生菌のみの定量ができるか否かを調べた。50、100、200 または 400  $\mu\text{M}$  の EMA と PMA を用い、それぞれ解析を行った。その結果を図 1 に示した。水道水に加えた実際の菌数は BCYE 培地に接種して決定した（図 1、Plating）。*L. pneumophila* 生菌を含むサンプルのリアルタイム PCR により推測した菌数は、実際に懸濁した菌数と差が見られなかった（図 1、Untreated）。また、塩素処理を行ったレジオネラを培養した結果は、10 CFU/100 ml 以下だったが、リアルタイム PCR により推測された菌数は生菌の場合との差がなかった（図 1、Untreated）。しかし、同一のサンプルを EMA (50-200  $\mu\text{M}$ ) 処理した後に、リアルタイム PCR により推測した菌数は実際に懸濁した死菌の  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  となり、約  $10^1$ - $10^2$  CFU/100 ml だった。400  $\mu\text{M}$  の EMA で *L. pneumophila* を処理し

た場合、リアルタイム PCR により推測した生菌の菌数は実際に懸濁した生菌より少なくなった。一部分の生菌の染色体 DNA は高濃度の EMA により PCR の増幅が抑制されたことを示唆された。一方、PMA 処理を行った場合も、リアルタイム PCR により推測した菌数は実際に懸濁した死菌のより少なくなったことが証明された。しかし、懸濁した死菌の数の  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  となるために、200  $\mu\text{M}$  PMA が必要であり、EMA の 4 倍であった。

本研究班による人工的水利用設備のサーベイランス検査の結果では、90% 以上の環境検体のリアルタイム PCR により推測されたレジオネラの菌数（生菌と死菌の和）は  $10^5$  CFU/100ml 以下であった。EMA または PMA 処理およびリアルタイム PCR のコンビネーションは約  $10^4$ - $10^5$  CFU/100 ml の死菌の DNA の PCR 増幅を抑制することができたため、この方法は環境中に存在するレジオネラの生菌のみの染色体 DNA を迅速に検出できると考えられた。

#### 2. モデル浴槽サンプルにおけるレジオネラ生菌のみの定量検出

EMA または PMA 処理およびリアルタイム PCR による環境サンプル中のレジオネラ生菌のみの定量検出ができるか否かを調べるために、モデル浴槽由来の 10 サンプル（表 1）を用いて、解析を行った。酸処理を行った 1 ml の濃縮液を GVPC 培地に塗布し、含まれたレジオネラの生菌数を決定した。さらに、0.5 ml の濃縮液を 12.5、25、50

$\mu\text{M}$  の EMA または 50、100、200  $\mu\text{M}$  の PMA で前処理を行った後、染色体 DNA の精製を行った。また、処理を行わない 0.5 ml の濃縮液から染色体 DNA を精製し、コントロールとした。レジオネラの 16S rDNA をターゲットとするリアルタイム PCR により菌数を推定した。培養により決めた実際の生菌数およびリアルタイム PCR により推定された菌数を表 1 に示した。

検査された 10 サンプルのうち 6 サンプル (No. 1-6) は GVPC 培地で培養した結果では 10 CFU/100ml 以上のレジオネラが検出された。残り 4 サンプル (No. 7-10) は培養ではレジオネラの検出が見られなかった。リアルタイム PCR によるレジオネラの検出では、6 サンプル (No. 1-4、9-10) は 12.5  $\mu\text{M}$  の EMA または 50  $\mu\text{M}$  の PMA 処理をすることにより、リアルタイム PCR で推測された菌数と培養により得られた菌数がほぼ一致した。高濃度の EMA や PMA 処理を行った後のリアルタイム PCR で推測された菌数は培養の菌数より少なかった。これらのサンプルに含まれていたレジオネラの死菌が少なく、低濃度の EMA または PMA が PCR による死菌 DNA の増幅を抑制できたと考えられた。一方、残ったサンプル (No. 5-8) では、50  $\mu\text{M}$  の EMA または 200  $\mu\text{M}$  の PMA で処理後のリアルタイム PCR で推測されたレジオネラ菌数と、培養により得られた菌数がほぼ一致した。低濃度の EMA や PMA 処理を行った後のリアルタイム PCR で推測された菌数は培養の菌数より多かった。これらのサンプルにはレジ

オネラの死菌が多く含まれていて、全部の死菌の染色体 DNA が PCR により増幅されるのを抑制するためには、高濃度の EMA と PMA 処理を行う必要があると考えられた。

モデル浴槽サンプルを解析した結果では、死菌の染色体 DNA の PCR 増幅を抑制するには、PMA の使用量は EMA の 4 倍であることが明らかにした。さらに、PMA は EMA に比べ高価であったため、環境水中からレジオネラ生菌のみを検出するには、EMA は優れたことを示唆された。

### 3. 公衆浴場サンプルにおけるレジオネラ生菌のみの定量検出

EMA 処理およびリアルタイム PCR による実の環境水中のレジオネラ生菌のみの定量検出ができるか否かを調べるために、公衆浴場由来の 9 サンプル (表 2) を用いて、定量解析を行った。

検査された 9 サンプルのうち 5 サンプル (No. 5-9) はリアルタイム PCR によるレジオネラの検出が見られなかった。GVPC 培地で培養した結果では、そのうち 3 サンプルではレジオネラの生菌が検出されず、残り 2 サンプル (No. 5、8) では 20 CFU/100ml および 10 CFU/100ml のレジオネラが検出された。サンプル No. 1-4 には 100 CFU/100 ml 以上のレジオネラ (生菌と死菌の和) が存在していることがリアルタイム PCR (EMA 処理なし) により推測された。そのうちの 2 サンプル (No. 3-4) には塩素濃度が低く、含まれていたレジオネラの死菌



が少ないと考えられ、6.25  $\mu\text{M}$  の EMA 処理をすることにより、リアルタイム PCR で推測された菌数と培養により得られた菌数がほぼ一致した。25 または 50  $\mu\text{M}$  の EMA 処理を行った後のリアルタイム PCR で推測された菌数は培養の菌数より少なかった。一方、サンプル No. 1 には塩素濃度が高く、レジオネラの死菌が多く含まれていると考えられ、全部の死菌の染色体 DNA が PCR により増幅されるのを抑制するためには、50  $\mu\text{M}$  での EMA 処理後のリアルタイム PCR で推測されたレジオネラ菌数と、培養により得られた菌数がほぼ一致した。

これらの解析結果は、EMA 処理およびリアルタイム PCR による環境水中のレジオネラ生菌のみを定量検出できることを明らかにした。

#### D. 結論

環境からレジオネラを分離するには 4-7 日間が必要であり、時間がかかる。本研究では EMA または PMA 処理およびリアルタイム PCR のコンビネーションによりレジオネラ生菌のみ検出できることを証明した。PMA に比べて、EMA は環境中レジオネラ生菌のみの検出に優れていることを明らかにした。また、水サンプルの中に存在しているレジオネラ死菌の量が違うため、EMA や PMA の使用量の調整が必要である。死菌が多く存在する場合（例えば、塩素濃度が高いとき）は、多量の EMA または PMA が必要である。その一方、死菌が少ないサンプルには、少量の EMA または PMA で十分である。

#### E. 論文発表

- 1) Chang B, Sugiyama K, Taguri T, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. 2009. Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 147-53.
- 2) Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. 2009. An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of PFGE agarose plugs for the analysis of *Legionella* isolates. *JJID.* 62: 54-6.
- 3) 常彬、前川純子、渡辺治雄。2008. レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の改良。病原微生物情報。29: 333-334。

#### F. 学会発表

- 1) Chang B, Honda N, Yoshida S, Amemura-Maekawa J, Kura F, and Watanabe H. 2008. Discrimination of viable and dead *Legionella* cells by a combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Istanbul, Turkey.
- 2) 常彬、前川純子、渡辺治雄: レジオネラ解析用パルスフィールドゲル電気泳動

法の改良。第 82 回日本細菌学会総  
会。2009 年。

3) Chang B, Taguri T, Sugiyama K,  
Amemura-Maekawa J, Kura F, and  
Watanabe H. 2009. Detection and  
quantification of viable *Legionella* cells

from environmental water samples by  
combined use of ethidium monoazide and  
real-time PCR. The 7th International  
Conference, *Legionella* 2009, Paris.

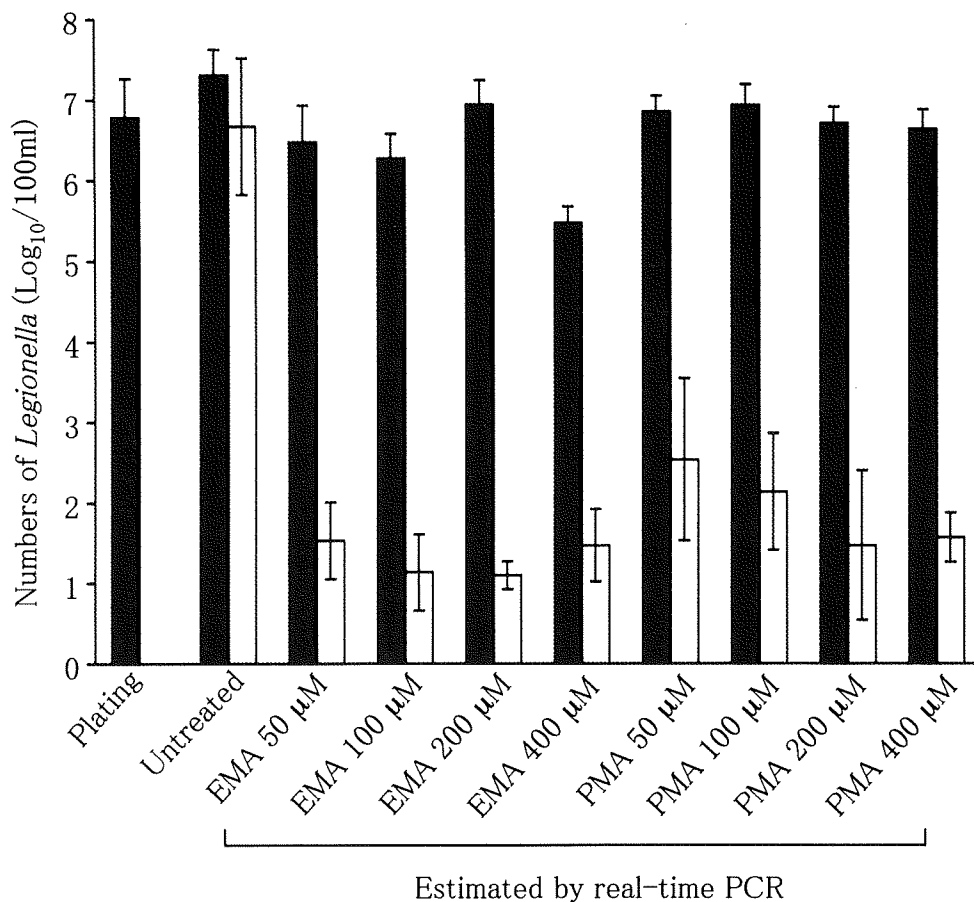


図1. *L. pneumoniae* のモックサンプルにおける生菌のみの定量検出  
■:生菌 □:塩素処理した死菌

表 1. モデル浴槽サンプルにおけるレジオネラ生菌のみの定量検出

Sample No. <sup>a)</sup>	The number of <i>Legionella</i> by plating (log <sub>10</sub> CFU/100ml) <sup>b)</sup>	The number of <i>Legionella</i> estimated by real-time PCR target 16S rRNA gene (log <sub>10</sub> CFU/100ml) <sup>c)</sup>						
		Without treatment	Treatment with EMA at			Treatment with PMA at		
			12.5 μM	25 μM	50 μM	50 μM	100 μM	200 μM
1	3.6	3.3	3.3	2.6	2.2	3.5	3.5	3.3
2	3.3	3.1	3.0	2.8	2.6	2.8	3.0	3.1
3	4.7	4.5	3.8	3.2	2.8	4.3	3.8	2.9
4	4.6	4.4	4.3	3.7	2.9	4.3	3.9	3.2
5	2.4	4.4	2.4	2.5	2.1	2.7	2.5	2.6
6	1.3	4.1	3.7	2.5	1.6	3.2	2.5	2.9
7	<1	3.7	2.6	—	—	2.6	2.3	1.3
8	<1	3.2	2.0	2.1	1.1	2.8	1.7	1.4
9	<1	2.1	—	—	—	—	—	—
10	<1	1.9	—	—	—	—	—	—

<sup>a)</sup>: Samples of No.1, 3, 5, 7, and 9 were obtained from the bathtub, No. 2, 4, 6, 8, and 10 were from the filter tank of a model spa.

<sup>b)</sup>: The number of bacteria were determined by plating cells on the GVPC plates.

<sup>c)</sup>: (—), Not detected.

表 2. 公衆浴場サンプルにおけるレジオネラ生菌のみの定量検出

Sample No. <sup>a)</sup>	Free chlorine concentration (ppm)	The number of <i>Legionella</i> by plating (log <sub>10</sub> CFU/100ml) <sup>b)</sup>	The number of <i>Legionella</i> estimated by real-time PCR (log <sub>10</sub> CFU/100ml) <sup>c)</sup>				
			Without EMA treatment	Treatment with EMA at			
				6.25 μM	12.5 μM	25 μM	50 μM
1	1.0	1.3	3.2	ND	ND	ND	1.4
2	0.1	2.4	2.2	ND	ND	ND	1.3
3	0.5	1.3	2.8	1.9	1.3	—	—
4	0	3.0	3.2	2.9	2.4	2.2	1.9
5	0.1	1.3	—	—	—	—	—
6	3	<1	—	—	—	—	—
7	2	<1	—	—	—	—	—
8	0	1	—	—	—	—	—
9	2.4	<1	—	—	—	—	—

<sup>a)</sup>: No.1, 2, and 7-9 samples were obtained from bathtub, No. 3-5 were from filter tank, and No. 6 was from pipeline of public spas.

<sup>b)</sup>: The number of bacteria were determined by plating on the GVPC plates.

<sup>c)</sup>: ND, Not done. (—), Not detected.

平成 19-21 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  
総合研究報告書

「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	国立感染症研究所寄生動物部	倉 文明
研究分担者	神奈川県衛生研究所微生物部	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

入浴施設の衛生的管理を機能的かつ効果的に行うために、食品衛生において活用されている HACCP システムの導入を検討した。HACCP システムでは危害を防ぐために重要管理点を設けてモニタリングにより常に管理状況を監視する必要がある。塩素消毒を実施している施設では残留塩素濃度を、貯湯槽や配管中の水温が 55℃以上になる施設では水温をモニタリングの対象とすることができる。しかし、塩素消毒を実施していない施設や水温を 55℃以上にできない施設もあり、モニタリング項目の選定に苦慮する場合が想定された。そこで、浴槽水の ATP 量をモニタリング項目として利用することについて検討した。

平成 19 年度は、浴槽水から分離された従属栄養細菌株を用いて ATP 測定キットの評価を行い、さらに神奈川県内の温泉施設の浴槽水を対象にして、従属栄養細菌数、一般細菌数、レジオネラ属菌数および ATP 量を経日的に測定し、菌数と ATP 量の関係を調べた。これにより、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。

平成 20 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 39.8 RLU (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。これらの結果から、ATP 値が 50 RLU に達し、これを越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。

平成 21 年度は、3 か所の温泉入浴施設において、実際に衛生管理担当者が ATP 簡易測定装置を用いて浴槽水の ATP 測定を行った。入浴施設での ATP 測定実施期間中に一般細菌数、従属栄養細菌数およびレジオネラ属菌数を測定し、ATP 測定値との関係を解析した。ATP 値の測定は、浴槽水の汚染状況の指標として使用することが可能であり、入浴施設での衛生管理に有効であると考えられた。

はじめに

レジオネラ属菌は環境中に広く分布し、入浴施設においても条件が整えば、何らの対策も行わなければ容易に増殖する。したがって、レジオネラ属菌の増殖を抑え、患者発生の事故を防ぐためには、徹底した衛生管理が不可欠である。食品衛生で活用されている HACCP システムを入浴施設に導入することで、衛生管理を強化することが可能となることから、これまでに導入を検討してきた。その中で、モニタリング項目の選定が問題となった。

本研究は、HACCP システムの入浴施設への導入を前提に、ATP 量の測定のモニタリング項目としての有効性を検証することを目的とした。

材料と方法

平成 19 年度

#### 1) レジオネラ属菌の測定

神奈川県内の温泉施設の浴槽を対象にレジオネラ属菌の菌数測定を行った。対象とした浴槽は清掃を実施した日を 1 日目とし、次の清掃が行われる 5 日目まで、毎日午前 10 時前後に採水した。浴槽水 500ml を採

取し、冷蔵にて輸送した。

浴槽水 500ml を滅菌メンブレンフィルター（直径 49mm、孔径 0.45  $\mu$ m）で吸引ろ過した。フィルターを 10ml の滅菌 MQ 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。菌浮遊液を熱処理し、滅菌 MQ 水で 10 倍段階希釈し、原液と各段階の 0.1ml を WYO 寒天培地 2 枚に塗抹し、36°C で 5 日間培養した。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 MQ 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 2 枚へ、一般細菌数の測定には標準寒天培地 2

枚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) 従属栄養細菌の同定

従属栄養細菌数計数に用いた高希釈段階の R2A 寒天平板上に集落を形成した菌を分離し、同定を試みた。分離菌は MicroSeq 500 16S rRNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用して菌の同定を行った。新鮮培養菌を滅菌 MQ 水に懸濁し、100℃で 5 分間加熱して DNA を抽出した。この 1 $\mu$ L と滅菌 MQ 水 24 $\mu$ L と PCR マスターミックス 25 $\mu$ L を混合し、GeneAmp PCR system 2400 にて 95℃、10 分の初期解離反応の後、95℃30 秒、60℃30 秒および 72℃45 秒を 1 サイクルとし、30 サイクル反応させ、72℃10 分の最終伸長反応の後 4℃で保存した。PCR 産物は 2%アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、PCR 産物を確認した。

PCR 産物は精製後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は BLAST サーチにより既存の塩基配列と比較し、菌株の属の推定を行った。

### 4) ATP の測定

ATP 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。キットの綿棒ホルダーを抜き、綿棒にて浴槽水を採取した。綿棒ホルダーをキットの本体に戻し、本体に押し込んだ。キット本体を振り下ろして採取した浴槽水を本体下部に落とし、内部の試薬を溶解した。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 を測定した。

### 5) 菌浮遊液の ATP 測定

R2A 寒天平板から分離した従属栄養細菌株を R2A 寒天平板に接種し、42℃で 7 日間培養し、平板上の集落を掻き取って 10ml の滅菌 MQ 水に浮遊させた。各菌浮遊液から 10 倍段階希釈液を作製し、各菌浮遊液の 100 $\mu$ L を取り、ATP 用簡易測定キットを用いて ATP 量を測定した。

平成 20 年度

#### 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。レジオネラ属菌の鑑別は平成 19 年度と同様に行った。

#### 2) 従属栄養細菌数と一般細菌数の測定

従属栄養細菌数と一般細菌数の測定は平成 19 年度と同様に行った。

#### 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{l}$  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。

#### 平成 21 年度

##### 1) レジオネラ属菌の測定

レジオネラ属菌の培養は、平成 20 年度と同様に、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。

##### 2) 従属栄養細菌数と一般細菌数の測定

従属栄養細菌数と一般細菌数の測定は平成 19 年度と同様に行った。

##### 3) ATP 量の測定

ATP 量の測定は入浴施設の管理担当者に依頼し、簡易測定キット（ルシパックスワイド（キッコーマン））により行った。キットの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。

浴槽水の ATP 量の測定は、午前中と夕方の 1 日 2 回行っていただくように依頼した。

#### 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。

#### 結果

##### 平成 19 年度

##### 1) 浴槽水のレジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、一般細菌数および ATP 量

神奈川県内の温泉施設の対象とした 1 浴槽の浴槽水のレジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、一般細菌数および ATP 量の結果を図 1 に示した。レジオネラ属菌は 1 日目と 2 日目は検出されなかったが、3 日目から検出された。

浴槽水の ATP 量は、清掃後では 7RLU と非常に低く、2 日目には 156RLU、3 日目には 1855RLU に達したが、4 日目には 156RLU に減少した。この ATP 量の変化は従属栄養細菌数あるいは一般細菌数とほぼ並行していた。

なお、今回の調査でレジオネラ属菌が検出された浴槽は清掃を直ちに行い、衛生管理を徹底した。

##### 2) 従属栄養細菌の浮遊液の ATP 測定結果

従属栄養細菌として分離した菌株を、16S rRNA の塩基配列から属の推定を行ったところ、*Caldimonas* sp. および *Schlegelella* sp./ *Leptothrix* sp. に属して

いることが推定された。

各菌浮遊液の ATP 測定結果を図 2 に示した。ATP 測定を行ったいずれの菌株でも菌数と ATP 量は非常によく相関していた。

## 平成 20 年度

### 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。

### 2) ATP 測定結果

356 検体の ATP 値は、0.1~3263RLU の範囲にあった。

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。

試料水原液の ATP 値と従属栄養細菌数について、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：  $R=0.60$   $y=1.62x+0.08$

消毒有：  $R=0.56$   $y=1.58x-0.15$

消毒無：  $R=0.58$   $y=1.34x+1.19$

消毒不明：  $R=0.72$   $y=1.48x+0.72$

ATP 値とレジオネラ属菌検出の関係を

図 3 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。

## 平成 21 年度

3ヶ所の入浴施設において、ATP 量の計測は衛生管理担当者に依頼して行った。A 県においては 1 入浴施設の 2 浴槽 (a および b) の浴槽水を 10 月 26 日から 11 月 11 日までの 18 日間にわたり 1 日 1 回 ATP 量を測定することを衛生管理担当者に依頼するとともに、レジオネラ属菌数、一般細菌数および従属栄養細菌数を計測した。浴槽 a および b において、それぞれレジオネラ属菌数は 10~2,600CFU/100ml および 10~3,270CFU/100ml が検出された。検出されたレジオネラ属菌は *L. pneumophila* SG3 および SG4 で、頻度は低いですが SG6 も検出された。浴槽 a では清掃後に従属栄養細菌数、一般細菌数および ATP 値が減少したが、レジオネラ属菌数は減少しなかった。これに対して、浴槽 b では清掃後にレジオネラ属菌数が減少したが、その他の項目は減少しなかった。ATP 値は、浴槽 a では 16 回測定したうち 11 回、浴槽 b では 13 回は 50RLU を越えていた。

B 県においては、1 入浴施設の 2 浴槽 (ヒノキおよび陶器) の浴槽水を 9 月 19 日から 10 月 12 日に 1 日 2 回 ATP 量を測定することを衛生管理担当者に依頼した。清掃 (簡易な水洗い、ブラッシングあるいは塩素消毒) は毎日実施していた。ATP 量の測定は 13 日で 21 回行い、浴槽「ヒノキ」では 0~1,308RLU で 8 回、「陶器」では 0~



141RLUで2回、50RLUを超えていた。

C県においては、1入浴施設の2浴槽(大浴場およびヒノキ)の浴槽水を15日間にわたり1日2回ATP量を測定することを衛生管理担当者に依頼するとともに、レジオネラ属菌数、一般細菌数および従属栄養細菌数を10月27日、30日、11月2日、6日、9日および10日に計測した。清掃は、「大浴場」は週1回の割合で10月28日、11月2日および9日の深夜に、「ヒノキ」は毎日午前中に実施していた。それぞれレジオネラ属菌数は43～912,000CFU/100mlおよび<10～550CFU/100mlであった。ATP値は、29回測定したうち「大浴場」では26回、「ヒノキ」では7回、50RLUを超えていた。「大浴場」の清掃後はATP値は50RLUを下回ったが、翌日には50RLUを超えた。

#### 考察

本研究は、入浴施設の衛生管理にHACCPシステムの導入を前提に、モニタリング項目としてのATP量の測定の有効性を検証することを目的として実施した。3年間の検討により、浴槽水のATP量の測定はモニタリング項目として有効であることが示された。

まず、1入浴施設の浴槽水のATP量、従属栄養細菌数および一般細菌数を経日的に測定したところ、ATP量は菌数とほぼ並行

して変化した。さらに、従属栄養細菌を分離し、分離株の菌数とATP量も相関した。これらのことからATP量を指標として利用することの可能性が示された。

次いで、全国8地域の温泉施設の試料水(356検体)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。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。

続いて、入浴施設の管理で実際にATP量の測定を行い、モニタリング項目としての有用性を検討した。その結果、50RLUを超えないように管理されている浴槽ではレジオネラ属菌は検出されないか、菌数が低い状態であった。これに対し、50RLUを高頻度で超えていた浴槽では、レジオネラ属菌が浴槽内で増殖し、高い菌数で検出された。以上の結果から、ATP量の測定が入浴施設の衛生管理において有用であることが示された。

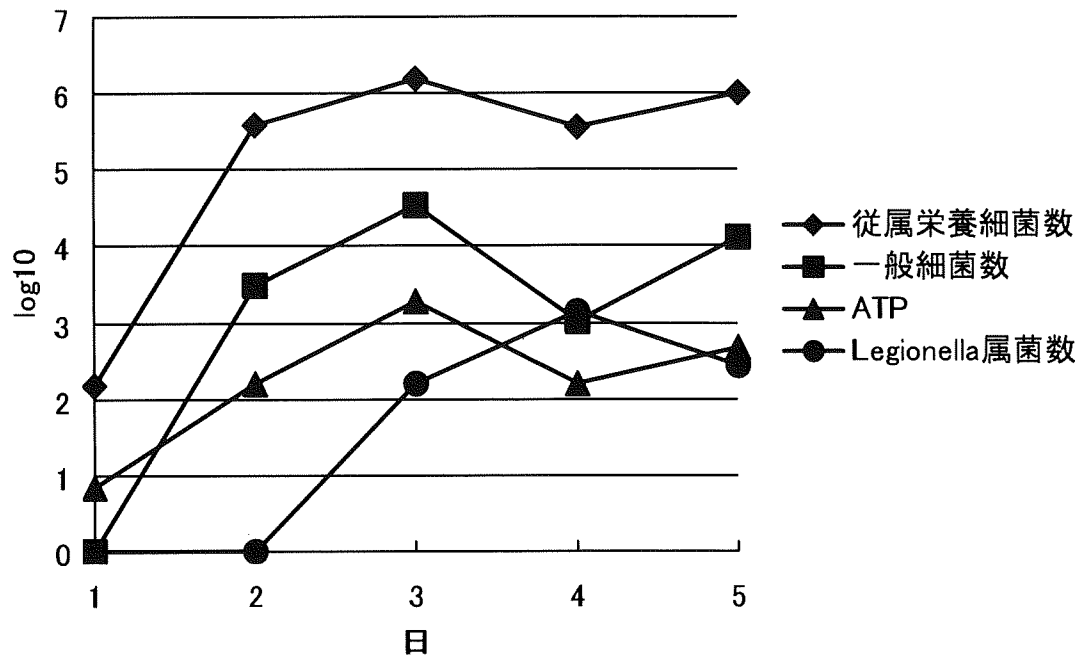


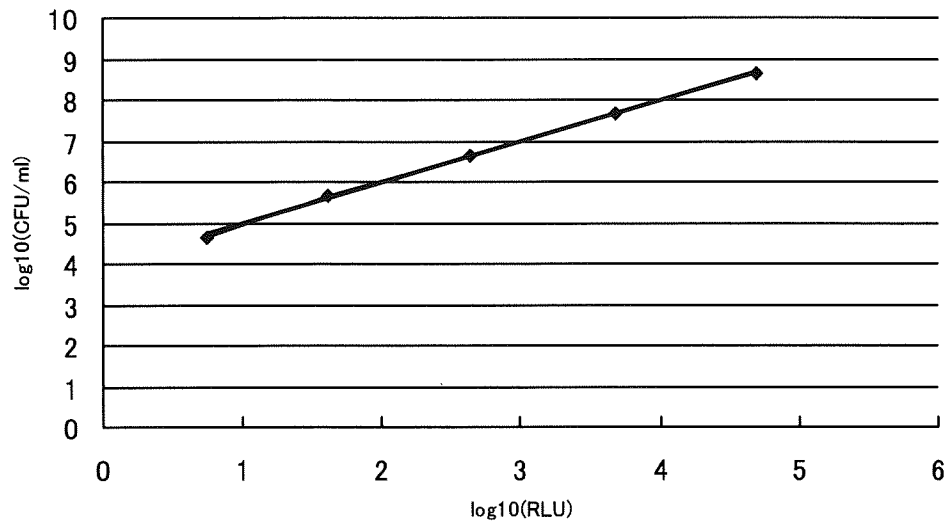
図1 温泉施設の浴槽水の細菌数および ATP 量の経日変化

従属栄養細菌数、一般細菌数 : CFU/ml

ATP 量 : RLU

*Legionella* 属菌数 : CFU/100ml

A.



B.

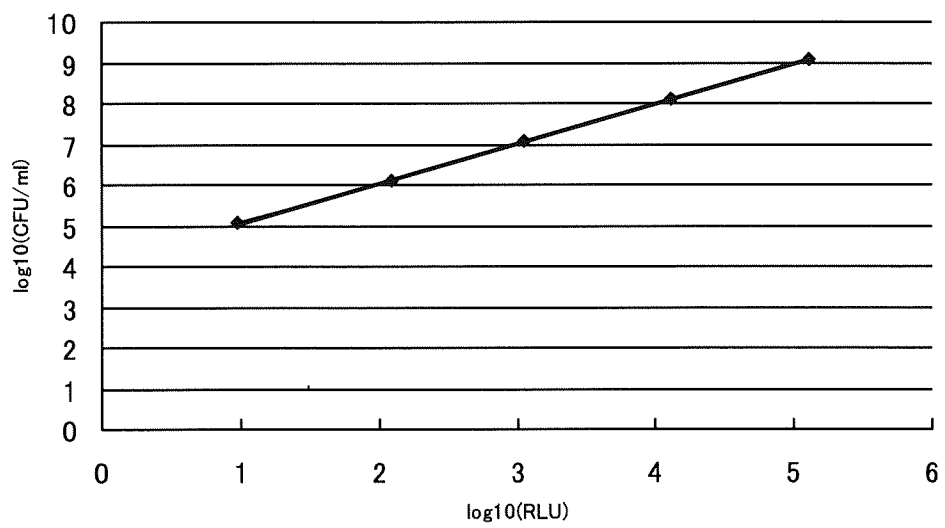


図2 従属栄養細菌株の菌数と ATP 量の相関

A : *Caldimonas* sp.

B : *Schlegelella* sp. or *Leptothrix* sp.

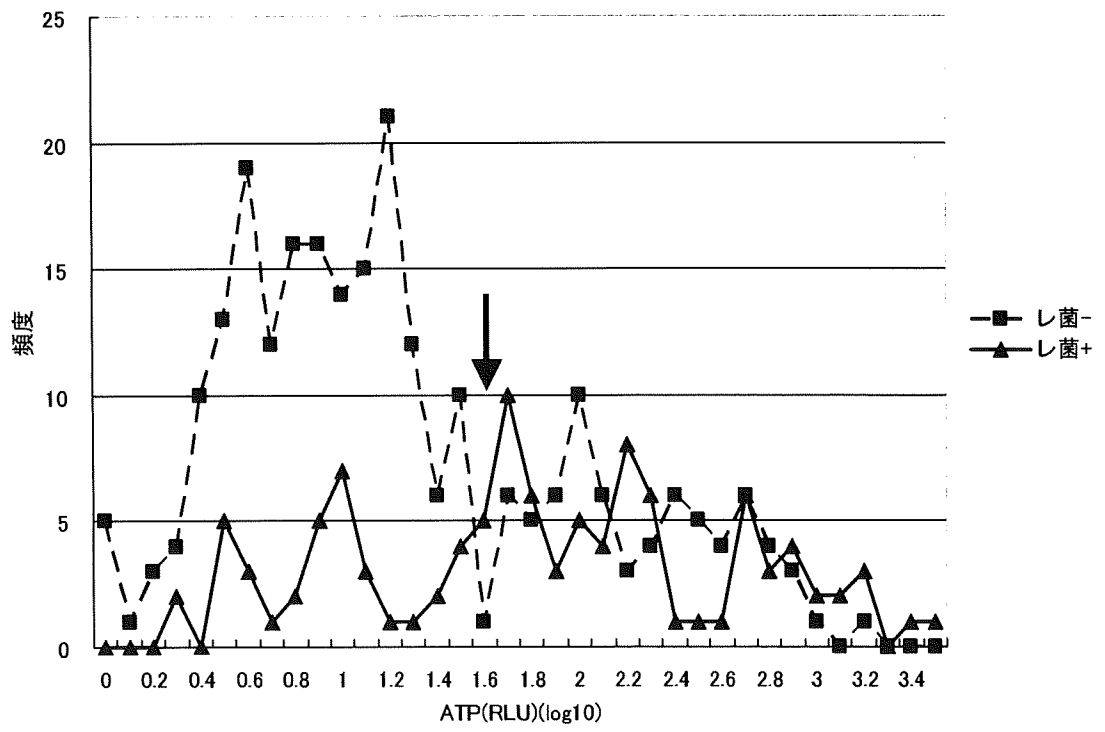


図3 ATP測定値におけるレジオネラ属菌検出・不検出検体数の頻度