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

公衆浴場等施設の衛生管理における レジオネラ症対策に関する研究

平成 30 年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　　前川　純子

令和元（2019）年　5 月

目　次

I.　総括研究報告

公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究----------1

前川純子

II.　分担研究報告

1.　レジオネラ属菌迅速検査法の評価----------13

磯部順子、佐々木麻里、田栗利紹、金谷潤一、山口友美、淀谷雄亮、上野潤二、東出誠司、

中筋　愛、吉崎美和

2.　斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査および

実検体を用いたLAMP法と比色系パルサー法の検討----------23

佐々木麻里、神田由子、後藤高志、成松浩志、淀谷雄亮、江川英明、緒方喜久代

3.　レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発----------31

田栗利紹、倉　文明、蔡　国喜、下田貴宗、新道欣也

4.　MLVA法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴----------37

中西典子、田中　忍、野本竜平、米澤武志、水本嗣郎、前川純子

5.　感染源解明のための環境調査----------47

磯部順子、金谷潤一

6.　入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査----------58

黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、陳内理生、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹

7.　レジオネラ感染とアメーバ　レジオネラ属菌のVNC菌モデルとBCYEαでのVNC菌検出----------74

八木田健司、泉山信司

8.　モノクロラミン消毒のアルカリ性温泉への応用----------81

泉山信司、長岡宏美、栁本恵太、山上隆也、植松香星、久田美子、森　康則、赤地重宏、

永井佑樹、西尾正也、山本哲司、八木樹里奈、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二

9.　モノクロラミン消毒の薬湯への応用、並びに雑菌への対応----------91

泉山信司、藤井　明、松田宗大、松田尚子、枝川亜希子、吉田光範、星野仁彦

10.　入浴施設の衛生管理に関する研究成果の活用----------103

黒木俊郎、森本　洋、磯部順子、緒方喜久代、倉　文明、前川純子

11.　レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み----------133

森本　洋、磯部順子、黒木俊郎、佐々木麻里、田栗利紹、中西典子、大屋日登美、緒方喜久代、

小川恵子、金谷潤一、倉　文明、田中　忍、千田恭子、平塚貴大、三津橋和也、武藤千恵子、

山口友美、吉野修司、前川純子

12. レジオネラ属菌検査研修会の開催について----------203
長岡宏美、漆畑　健、森川正浩、稲葉尋高

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----------207

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）

総括研究報告書

公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

研究代表者　　前川純子　国立感染症研究所　細菌第一部　主任研究官

研究要旨：公衆浴場等の適切な衛生管理のための効果的な手法の検討を行った。また、公衆浴場等の衛生状態を確認するためにレジオネラ検査は不可欠であり、そのための手法の改良、評価を行い、その普及を目指した。以下にその成果を記す。

(1) レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、PALSAR 法、LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法および EMA-qPCR 法について、浴槽水などの実検体 233 検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。各種迅速検査法は、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であることが確認できた。RT-qPCR 法の結果から、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。したがって、PALSAR 法は、現時点ではシャワー水およびカラン水以外を対象として使用するのが望ましいと考えられた。

(2) 大分県内施設の浴場水 48 検体を対象に迅速培養法（斜光法を取り入れた培養法）を実施し、短期間で正確な培養結果を得ることができた。 多様な泉質を有する大分県の浴場水検査で、培養陽性、LAMP 法陰性の結果が不一致となる検体については、 Chelex 抽出法を採用することによりその不一致が解消されることが示唆された。

(3) 携帯型フローサイトメーターを用いた細菌数測定と *Legionella pneumophila* 抗体による特異的検出を組み合わせることで、当該菌の生死スクリーニングを含んだオンサイト定量解析法を確立した。遊離塩素消毒下の入浴施設現場におけるレジオネラリスク監視の有用なツールとしての利用が期待できる。

(4) 感染源推定のための遺伝子型別の迅速なタイピング方法として期待できる MLVA 法を用いて、過去の集団事例 6 事例について、MLVA 型を決定し、PFGE および SBT 型別との比較を行った。患者株と同一の ST および PFGE パターンを示した浴槽水由来株および拭き取り由来株は MLVA 型も同一であった。

(5) 患者検体から最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群 1（*Lp*1）に対する抗血清で感作した免疫磁気ビーズを用いた検体の選択的濃縮は、*Lp*1 を検出する qPCR によるスクリーニングと組み合わせることで、感染源調査に有用となると思われた。

(6) 入浴施設の浴槽、カラン並びにシャワー及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態調査を継続的に行ったところ、配管中のレジオネラ汚染の除去には塩素の添加や水温を上げることが有効であるが、効果は限定的であり、完全に汚染を除去するには追加の対策が必要であると推測された。また、給水・給湯系におけるレジオネラ汚染についてのシンポジウムには、160 名を超える参加者があり、関心の高さと、アンケート回答から参加者がその対応に苦慮している実情が明らかとなった。

(7) ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC（Viable but not culturable）モデル系を構築した。室温で約 7 週間培養した時点で VNC 菌が約 64%存在した。BCYE α 製品により菌の発育性が異なり、VNC 菌の評価に影響を与えること、また培養可能な菌の過少評価につながる可能性があることが示唆された。

(8)　pH8 から 10 の浴槽水において、機械的な添加と手投入のいずれによっても、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌を抑制し、遊離塩素管理に比較して、衛生状態を良好に維持できた。これまでの研究で得られたモノクロラミン消毒の成果を、一般利用者と営業者に向けて平易な表現で記述し、Web ページで公開した。

(9) 生薬及び無機塩薬湯にモノクロラミン消毒を実施すると、薬湯の退色や香りの変化は認められず、総残留塩素濃度 3mg/L 以上の維持が可能で、レジオネラ属菌は検出されなかった。次亜塩素酸ナトリウムでは、薬湯の色を保持しながら、遊離残留塩素濃度を 0.4mg/L 以上に安定的に維持することは困難であった。モノクロラミン消毒を継続すると 3 週目以降に従属栄養細菌数が増加した。

(10) 本研究班を含め、これまでに複数の研究班が行ってきた研究成果を見直し、公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言を行った。

(11) 民間会社が実施した外部精度管理サーベイについて、助言を行い、方法の改善を図った。全国 148 検査機関が参加し、本研究班からは 70 地衛研が参加した。本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことができる方法であり、今後も、継続的な外部精度管理サーベイができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要である。また、昨年度改訂された ISO との調整を図った「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示した。

(12) 静岡県内のレジオネラ属菌の検査を行っている検査機関 15 機関 25 名、保健所（静岡市及び浜松市を含む）職員 23 名を対象にレジオネラ属菌同定法について研修会を開催した。研修は講義と実習から成り、実習については検体の前処理、同定方法及び遺伝子検査法を実施した。

研究分担者・所属機関および職名
泉山信司・国立感染症研究所主任研究官
長岡宏美・静岡県環境衛生科学研究所班長
黒木俊郎・岡山理科大学教授
森本　洋・北海道立衛生研究所主幹
磯部順子・富山県衛生研究所部長
佐々木麻里・大分県衛生環境研究センター主任研究員
中西典子・神戸市環境保健研究所研究員
八木田健司・国立感染症研究所主任研究官
田栗利紹・長崎県環境保健研究センター科長

A. 研究目的

公衆浴場をはじめとする水系施設の衛生管理に不備があるとレジオネラ属菌が増殖し、そこから生じるエアロゾルを介してヒトに感染して、レジオネラ症を発症する。公衆浴場等のレジオネラ症対策の向上のために、レジオネラ検査法の改善、およびその普及をこれまで実施してきた。1～2 日で結果が得られる迅速検査法の妥当性の検証およびさらなる改良を行う。培養法についても、実検体での検証を重ね、「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提唱する。入

表1　研究協力者一覧

赤地重宏	三重県保健環境研究所	陳内理生	神奈川県衛生研究所	松田宗大	株式会社ヘルスケミカル
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	杉山寛治	株式会社マルマ	松田尚子	株式会社ヘルスケミカル
稲葉尋高	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所
上野潤二	栄研化学株式会社	田中　忍	神戸市環境保健研究所	三津橋和也	北海道立衛生研究所
江川英明	大分県南部保健所	田中慶郎	株式会社マルマ	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
植松香星	山梨県衛生環境研究所	千田恭子	仙台市衛生研究所	森　康則	三重県保健環境研究所
漆畑　健	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課	永井佑樹	三重県保健環境研究所	森川正浩	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	八木樹里奈	花王株式会社　ハウスホールド研究所
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	中筋　愛	タカラバイオ株式会社	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	成松浩志	大分県衛生環境研究センター	山上隆也	山梨県衛生環境研究所
小川恵子	北海道立衛生研究所	西尾正也	花王株式会社　ハウスホールド研究所	山口友美	宮城県保健環境センター
金谷潤一	富山県衛生研究所	野本竜平	神戸市環境保健研究所	山本哲司	花王株式会社　ハウスホールド研究所
神田由子	大分県衛生環境研究センター	東出誠司	栄研化学株式会社	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
倉　文明	国立感染症研究所	久田美子	山梨県衛生環境研究所	吉田光範	国立感染症研究所　ハンセン病研究センター
後藤高志	大分県衛生環境研究センター	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
蔡　国喜	長崎県環境保健研究センター	藤井　明	株式会社ヘルスケミカル	米澤武志	神戸市環境保健研究所
下田貴宗	シモダアメニティ株式会社	星野仁彦	国立感染症研究所　ハンセン病研究センター	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所
新道欣也	株式会社　お風呂のシンドー	政岡智佳	神奈川県衛生研究所		

浴施設等の効果的な衛生管理を達成するため、これまでもその有用性を明らかにしてきたモノクロラミン消毒のさらなる実践を行う。また、感染源の同定に必要な分子疫学法の検証や、効率的にレジオネラ属菌を分離する方法の開発やそのための基礎的検討を行う。レジオネラ検査実施機関に対して、外部精度管理や研修を行い、レジオネラ検査の質の向上を図る。以上のような研究を実施し、その成果に基づき、公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言を行うことで、レジオネラ症対策が進み、安心して入浴できる施設が増えることが期待される。

B. 研究方法

各研究項目は、1から数名の研究分担者および研究協力者（表1）が参加し、実施された。レジオネラ属菌の検出・定量は新版レジオネラ症防止指針に準じて行ない、実体顕微鏡を用いた斜光法による分離培地の観察を行った。遺伝子検査法である qPCR 法と LAMP 法は、複数の研究項目で実施された。qPCR 法は、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。LAMP 法は、Loopamp レジオネラ検査キット E（栄研化学）を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。各研究項目の研究方法を以下に記した。

1. レジオネラ属菌迅速検査法の評価

全国 5 か所の地方衛生研究所において、平成30年度に浴用施設などから採取された 233 検体（浴槽水 147 検体、湯口水 23 検体、シャワー水 29 検体、採暖槽水 16 検体、カラン水 15 検体、冷却塔水 2 検体、プール水 1 検体）を用いた。

EMA-qPCR 法は、qPCR 法における DNA 抽出の前に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0（タカラバイオ）を用いて、EMA 処理を1および2回実施した。EMA-LAMP 法は、3000 倍濃縮検体に EMA 処理を実施後、Chelex 溶液を用いて DNA を抽出し、LAMP 法に用いた。

2. LAMP 法と比色系パルサー法の検討

大分県衛生環境研究センターで、浴槽水および湯口水、25 施設 48 検体を対象とし、LAMP 法および比色系パルサー法を実施した。一部検体の LAMP 法実施時に、Chelex 抽出法を行い常法と比較した。川崎市健康安全研究所で、浴槽水や採暖槽水等 39 検体について、比色系パルサー法を実施した。

3. フローサイトメトリー技術の開発

1 週間毎に高濃度塩素洗浄処理（20 mg/L×1時間）を行っている入浴施設の処理前後の浴槽から、5 週間にわたり採水された 30 検体、3 社会福祉施設の循環ろ過式浴槽からオゾン処理前後および濯ぎ後に採水した合計 16 検体の浴槽水、研究協力者から郵送された検査を委託された 30 種類の循環ろ過式浴槽水について、フローサイトメーターminiPOC（シスメックスパルテック社）を使用し、細菌数を測定した。また、検水を濃縮後、*Legionella pneumophila* (LP)血清群 1 染色試薬および LP 非血清群 1 染色試薬で染色し、フローサイトメーターで計測し、検量線から LP 数を算出した。

4. MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴

今年度は、*L. pneumophila* 血清群1の124株、血清群 1 以外の *L. pneumophila* 187 株および過去の 6 集団感染事例に由来する 65 株を用いて、Sobral ら（Appl Environ Microbiol. 2011. 77:6899）により報告された 12 領域について、蛍光標識したプライマーによる 4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR を行い、AB3500 Genetic Analyzer および GeneMapper Ver. 4 (Applied Biosystems)を用いて、フラグメントサイズおよびリピート数を測定した。得られた MLVA 型から BioNumerics Ver7.6 を用いて、Minimum spanning tree（MST）を作成した。

5. 感染源解明のための環境調査

浴槽水 49 検体，シャワー水 28 検体，カラン水 15 検体を採取した．シャワー水およびカラン水については，温度を 40℃に設定後，約 10 秒間流出させた後，容器に採取した．

検水 100 ml あるいは滅菌水で 10 倍希釈した検水を滅菌容器に入れ，そこに Legiolert（アイデックスラボラトリーズ）培地を加え，試薬が完

全に溶解するまで混和した．検水 100 ml で検査する場合は，硬度試験紙にて硬度を測定し，度合いに応じてサプリメントを添加した．それを定量用のトレイ（Quanti-Tray/Legiolert）に入れ，専用シーラーで密封したものを湿潤箱に入れ，39℃で 7 日間培養した．

検体 100 倍濃縮液およびそれらを滅菌生理食塩水で 5 倍希釈した希釈検体について、デンカ生研で作製した Lp1-IMB 25 µl を接種し，10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸着させた．ビーズを磁石で集め，滅菌生理食塩水で洗浄した．この操作（洗浄）を 2 回実施した後，最終的に生食 200 µl に懸濁，ボルテックスでよく混和して，その 100 µl を GVPC 培地に接種し，培養した．

2018 年 5～8 月に道路沿いの 6 地点で，GVPC 培地（日水製薬）を設置した慣性衝突法によるエアーサンプラー（BIOSAMP，ミドリ安全株式会社）を用いて，100 l/min の条件で 5 および 15 分間、各 23 回、計 46 サンプルのエアロゾルを捕集した．

sg1-qPCR は，Mérault ら（Appl Environ Microbiol. 2011. 77:1708）に従い，プライマーおよびプローブを作製し，反応試薬として Premix Ex Taq（Probe qPCR）（タカラバイオ）を用いて実施した．

6. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

神奈川県内の入浴施設の地下貯湯槽、高置貯湯槽、浴槽水、湯口水、蛇口水、シャワー水をおよび神奈川県内の 3 医療機関洗面台等の蛇口水、受水槽水を採取し、検査した。

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染問題に関するシンポジウムを開催した。参加者に対してアンケート調査を実施した。

7. レジオネラ属菌の VNC（Viable but not culturable）菌モデルと BCYE α での VNC 菌検出

BCYE α で 3 日間培養した *L. pneumophila* SG1 378 株（Lp と省略）を 10^{-5} OD となるように無菌的にボトル内 200 ml の 5 mM のリン酸バッファー溶液（pH7.1）に添加し、密栓して室温ならびに 4℃で攪拌培養を行った。培養液を 100 倍希釈し、LIVE/DEAD BacLight（Thermo Fisher）で蛍光染色し、その 0.1 ml をポリカーボネートフィルター（0.2 µm、25 mm φ、ADVANTEC）中央にスポット（3-4 mm 径）し、フィルターから水分を吸引後、退色防止剤で封入し、FITC 用 B 励起バンドパスフィルターで蛍光観察を行い、赤色蛍光菌体を死菌、緑色蛍光菌体を生菌としてその数を測定した。BCYE α に様々な因子や pH の変化で VNC レジオネラ属菌が培地発育能を回復するかどうかを試験するため、カタラーゼ(ナカライテスク)、ピルビン酸 Na（ナカライテスク）、α ケトグルタル酸（Research Organic）、スペルミジン（富士フィルム・和光純薬）を無菌的に BCYE α 上に所定の濃度溶液 0.1mを塗布、乾燥させた。pH は BCYE α オートクレーブ滅菌前に調整した。ボトル培養液を 100 倍希釈し、その 0.1 ml を平板に塗布し 37℃で培養した。

8. モノクロラミン消毒のアルカリ性温泉への応用

以下に記す 3 営業施設の協力を得て、モノクロラミン消毒を実施した。利用者への配慮として、モノクロラミン消毒を実施している旨を掲示した。

施設 1 pH10 の温泉水を使用している循環式浴槽（約 26 m^3）で、モノクロラミン生成装置（ケイ・アイ化成）を設置し、モノクロラミン濃度は 3 mg/L を下回らないよう、タイマー式の一定量添加で管理し、6 週間の実証試験を行った。浴槽水の全残留塩素を、毎日正午と 14 時頃に測定した。週 1 回の完全換水時に 15～20 mg/L の高濃度のモノクロラミンで一晩配管を消毒し、チオ硫酸ナトリウムで中和した。試験前に 1 回、期間中は週に 1 回、浴槽水の採水と配管のふきとりを行った。

施設 2 pH10 の温泉水を使用している公衆浴場の毎日換水している循環式の露天風呂（約 3 m^3）の浴槽水に、アンモニア系顆粒と次亜塩素酸系顆粒を十分量の水道水に溶解し、生成したモノクロラミンを加えた。モノクロラミン濃度は 1 時間に 1 回測定を行い、3 mg/L を下回らないよう濃度を管理した。試験前に 1 回、4 日間の試験

期間中は毎日、採水と配管のふきとりを行った。

施設 3　pH8 で約 4〜5 mg/L のアンモニウムイオンが含まれ、遊離塩素消毒が困難な水質の浴槽（5.6m³）について 5 日間モノクロラミン消毒を実施した。1 日目の朝から 5 日目の夜まで、同一温泉水による循環ろ過を継続し、手投入のモノクロラミンを用いて、浴槽水内のモノクロラミン濃度を 3 mg/L 以上を目安に調整した。通常は浴槽に温泉水を継ぎ足しながら利用していたが、研究期間中は継ぎ足しを停止し、換水も行わないこととした。浴槽水を、毎晩営業終了後（PM11:00 過ぎ）に採取した。

採水した検体は、レジオネラ属菌数、アメーバ数、大腸菌群数、一般細菌数、従属栄養細菌数、pH、遊離残留塩素、全残留塩素を測定し、ふきとり検体はレジオネラ属菌の検出に供した。

9.　モノクロラミン消毒の薬湯への応用

神奈川県内に所在の一営業施設の協力を得て、実際の浴槽水を用いて検討を行った。井戸水を張った露天ひのき風呂において、生薬又は無機塩の薬湯を使用した。消毒には、モノクロラミンあるいは次亜塩素酸ナトリウムを用いた。モノクロラミン消毒時は、モノクロラミン生成装置を設置し、タイマー式の制御で、総残留塩素濃度 3mg/L 以上で管理した。次亜塩素酸ナトリウムは遊離残留塩素濃度 0.4mg/L 以上で管理した。退色が進むのに合わせて薬湯を追加投入した。浴槽水の湯色は目視又は吸光光度法により評価し、湯の香りは官能評価した。採水直後に pH（ガラス電極式 pH メーター、堀場）、遊離残留塩素と全残留塩素（DPD 法によるポケット残留塩素計、HACH 社）を測定し、レジオネラ培養検査を行い、一般細菌数を測定した。R2A 寒天培地を用いて従属栄養細菌数を測定し、優占であったコロニー形状を示す 3 コロニーの 16S rDNA 塩基配列を確認した。

10.　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

本研究班を含めて、これまでに複数の研究班が行ってきた研究成果を見直し、公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言を行った。

11.　レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

外部精度管理は、実施母体を日水製薬株式会社とし、全国 148 の検査機関（延べ 151 試料配付）が参加した。レジオネラ属菌配付試料として、メーカー保証が得られ、各施設へ直送可能なシスメックス・ビオメリュー社の BioBall（特注品）を使用した。配付試料を受け取った各機関は、50 mL の滅菌生理食塩水に懸濁混和した「非濃縮試料①」と、そこから試験用に 1 mL 分取した残りにさらに 441 mL の滅菌生理食塩水を加え、混和した「非濃縮試料②」、さらに各機関が行なっているろ過濃縮、あるいは遠心濃縮を実施して得られる「濃縮試料」について、それぞれレジオネラ分離培地 5 枚に 100 µL ずつ塗布し、各試料中のレジオネラ菌数を算出した。メーカー保証値および微生物学調査の考え方から、回答の良好範囲を 900〜18,000 CFU/100 mL と設定した。本年度から、濃縮検体については、回収率により判定を行った。目標とした回収率は、昨年度の外部精度管理で報告を求めたすべての試料（非濃縮①、②、濃縮）において目標良好範囲を報告し、かつ非濃縮の菌数が濃縮の菌数以上を報告した機関のうち、80%以上の機関がクリアしていた 20%を下限とし、上限を 100%未満とした。回答および解析結果の閲覧は専用ホームページにて行われた。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所等 70 機関については、独自に集計・解析を実施し、過去 3 年間の結果と比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがい、個人情報保護に充分に配慮して行われた。利益相反委員会の指導・管理に従って、研究協力関係にある企業等について、研究班内で情報共有を行った。開示すべき企業からの経済的利益は受けていない。

C. 研究結果

1.　レジオネラ属菌迅速検査法の評価

183 検体について LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 81.8%、特異度は 69.8%、一致率は 72.7%であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。EMA-LAMP 法を実

施した結果、平板培養法に対する感度は 69.1%と LAMP 法より低かったものの、特異度は 85.3%、一致率は 81.0%まで上昇した。

126 検体について qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 100%であり、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のすべてを検出できる迅速検査法であった。特異度は 34.8%、一致率は 52.4%であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。EMA 処理を 2 回実施すると、特異度は 68.5%、一致率は 75.4%まで上昇した。EMA 処理回数は、1 回と 2 回でほとんど結果に差はなかった。

92 検体について RT-qPCR 法を実施した結果、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。

2. LAMP 法と比色系パルサー法の検討

培養により浴槽水および湯口水 48 検体中 24 検体（50%）からレジオネラ属菌が検出された。6 検体は検水 100 mL あたり 1,000 cfu 以上検出され、最も菌数が多い検体は 3,500 cfu/100 mL であった。レジオネラ属菌が検出された 24 検体中 23 検体については、培養 3 日後の斜光法でレジオネラ属菌を確認することができた。確認できなかった 1 検体からは、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が 1 コロニーのみ（5 cfu/100mL に相当）検出された。

LAMP 法の DNA 抽出法について、常法と Chelex 抽出法を比較するため、対応のある 2 標本間の片側検定による t 検定を実施したところ、全検体間では有意差が見られなかったが、培養での菌数が 50 cfu/100 mL 以上の 9 検体間では、Tt 値の平均値と標準偏差は、常法で 45.8±9.9 分、Chelex 抽出法で 36.0±10.7 分となり、Tt 値が有意に低下した（p=0.012）。

大分県衛生環境研究センターにおいて、培養法が陽性でパルサー法が陰性となったのは 2 検体だけだったが、川崎市健康安全研究所において培養陽性だった 4 検体はすべてパルサー法陰性となる一方で、パルサー法陽性の 5 検体はすべて培養陰性であった。

3. フローサイトメトリー技術の開発

フローサイトメーターを用いるレジオネラリスクの現地迅速評価法（RDM）をレジオネラ・ニューモフィラ（LP）の特異検出法と組み合わせることで、当該菌の生死スクリーニングを伴うオンサイト定量解析法として改良した。浴槽水 76 試料を現地で RDM 法を行い、培養法に対するスクリーニングとしての有効性を検証したところ、RDM 法の培養法に対する感度は 93.3%、特異度は 95.1%を示した。LP 数の定量性については、RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し（R^2 = 0.65）、培養法の検出限界値（10 CFU/100mL）付近においてはやや高めの値を示したものの定性的には妥当な成績を示した。

4. MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴

前年度までの結果も合わせると、SBT 法により 164 種類の ST （sequence type）に分類される 439 株の *L. pneumophila* SG1 は、233 種類の MLVA 型に分類された。分解能（HGDI）は、SBT 法で 0.9599、MLVA 法で 0.9717 となり、ほぼ同等の値を示した。119 種類の ST を含む 187 株の SG1 以外の *L. pneumophila* は、131 種類の MLVA 型に分類された。

集団事例 6 事例について、MLVA 型を決定し、PFGE および SBT 型別との比較を行ったところ、患者株と同一の ST および PFGE パターンを示した浴槽水由来株および拭き取り由来株は MLVA 型も同一であった。

4 自治体に MLVA プロトコルを提供し、MLVA の汎用性の評価を行った。その結果、他の自治体においても、MLVA 型が PFGE と SBT タイピングと概ね相関する結果が得られた。

5. 感染源解明のための環境調査

Legionella 属菌が検出されたのは，浴槽水で 10/49 検体（20.4%），シャワー水で 4/28 検体（14.3%），カラン水で 5/15 検体（33.3%）であった．エアロゾル 46 検体からは *Legionella* 属菌は分離されなかった．

*Lp*1-IMB 法において，*Lp*1 は浴槽水 3/49（6.1%）検体，シャワー水では 1/28（3.6%）検体，また，カラン水 1/15（6.7%）検体から分離された．検体の種類による *Lp*1 の検出率に差は認められな

かった．また，qPCR 法による sg-1 特異的遺伝子は，全体で 19/92 検体（20.6%）から検出された．その内訳は，浴用水 15/49 検体（30.6%），シャワー水 2/28 検体（7.1%），およびカラン水 2/15（13.3%）で，浴用水での検出率が高かった．*Lp*1 について着目すると，通常培養法，*Lp*1-IMB 法，および sg1-qPCR 法の 3 法いずれにおいても *Lp*1 が検出されたのは，浴用水，シャワー水それぞれ 1 検体のみであった．濾過濃縮（100 倍）を 5 倍希釈した検体（20 倍濃縮液）を用いた *Lp*1-IMB 濃縮法による *Lp*1 の検出結果では，100 倍濃縮液で 2/8（25.0%），20 倍濃縮液では 5/8（62.5%）と，20 倍濃縮液で検出率が高かった．一方，濃縮検体を用いない検査法である「Legiolert」で *Lp* 陽性となったのは 100ml 検体で供試した場合 3/29（10.3%）検体，10ml 検体で供試した場合 8/63（12.7%）検体であった．

6.　入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

神奈川県内の 1 入浴施設において、カラン・シャワーにレジオネラ属菌による継続的な汚染が検出された。そこで、営業者が高置貯湯槽に入る配管に塩素添加装置を設置し、貯湯槽と配管中の温水を消毒する対策を行った。消毒開始後の調査では、培養によりレジオネラ属菌が検出されたため、継続的に観察したところ、再度レジオネラ属菌が検出された。医療機関については、これまでの調査によりレジオネラ属菌汚染が明らかとなっている医療機関が塩素濃度を上げる対策を取り、その後の経過を調査した。その結果、採水した水試料の遊離残留塩素濃度は対策前と比較して上昇していた。それによりレジオネラ属菌の菌数の減少が観察されたが、菌数が増加した場所もあった。給水系では初流水における遊離残留塩素濃度が 0.2mg/L を下回るあるいは 0.2mg/L 付近の濃度の試料において、給湯系では水温が低い試料においてレジオネラ属菌が検出された。

演者 2 名（うち 1 名は国外招聘）による講演会および演者 6 名によるシンポジウムから成る講演会・シンポジウム「医療機関の給湯・給水系に潜むレジオネラ感染リスク －実態と予防策－」を平成 30 年 10 月 27 日に国立感染症研究所にて開催し、160 人ほどが参加した。アンケート調査を実施し、108 人から回答を得た。バイオフィルムやレジオネラ汚染の除去の難しさや対策の重要を知ることができた、汚染問題を認識することができた、事前に準備・対策を立てておくことが必要であることを知った、基礎から実践までの内容が満載だった、異なる分野の人と交流できた、対策があいまいで根本的な問題解決に至っていない、対応ガイドラインを作ってほしいなど多くの感想・意見が寄せられた。

7.　レジオネラ属菌の VNC 菌モデルと BCYE α での VNC 菌検出

ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験を行った。室温で約 7 週間培養した時点で VNC 菌が約 64%存在した。４℃での培養では、VNC 菌がほとんど確認できなかった。

酸化ストレス抑制効果や細胞内代謝、DNA 合成促進に関与する物質をサプリメントの形で BCYE α に添加したが、VNC 菌の発育を促進するものはなかった。

BCYE α 製品により菌の発育性が異なり、VNC 菌の評価に影響を与えること、また培養可能な菌の過少評価につながる可能性があることが示された。

8.　モノクロラミン消毒のアルカリ性温泉への応用

pH8 から 10 の浴槽水において、機械的な添加と手投入のいずれによっても、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌を抑制し、遊離塩素管理に比較して、衛生状態を良好に維持できた。

これまで本研究で得られた成果を、一般利用者と営業者に向けて平易な表現で記述し、Web ページで公開した（https://sites.google.com/view/legionella-resgr/monochloramine_index）。

9.　モノクロラミン消毒の薬湯への応用

生薬及び無機塩薬湯使用時にモノクロラミンは総残留塩素濃度 3mg/L 以上の維持が可能で、レジオネラ属菌は検出されなかった。薬湯の退色や香りの変化は認められず、薬湯の追加投入の必要がなかった。次亜塩素酸ナトリウムでは、薬湯の色を保持しながら、遊離残留塩素濃度を 0.4mg/L 以上に安定的に維持することは困難で

あった。モノクロラミン消毒を継続しておよそ 3 週目以降に従属栄養細菌数が増加し、10^4～10^5CFU/mL の濃度で推移した。R2A 寒天培地より釣菌した優占 3 コロニーのうち、2 株は *Mycolicibacterium phlei*、1 株は *Microbacterium aurum*（99.4%＝466/469）に近縁な *Microbacterium* sp.と同定された。高濃度塩素消毒を行ったが、従属栄養細菌数は一過性に減少しただけであった。次亜塩素酸ナトリウム消毒下においても、*M. phlei* が検出された。

培養法で 60CFU/100mL のレジオネラを検出した試料水にモノクロラミン約 3.5mg/L 及び次亜塩素酸ナトリウム約 0.5mg/L を添加すると 1 時間後には培養法不検出となった。LAMP 法は、モノクロラミン添加の 24 時間後でも陽性であった。次亜塩素酸ナトリウム添加では、3 時間後に不検出となった。

10. 公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

公衆浴場における衛生等管理要領等「別添 1 公衆浴場における水質基準等に関する指針」において、原湯、原水、上り用湯及び上り用水の水質基準及び検査方法における過マンガン酸カリウム消費量を全有機炭素(TOC)量に、大腸菌群を大腸菌に変更し、レジオネラ属菌の検査方法については当研究班の推奨する検査法を参照することを提案した。「レジオネラ属菌検査の依頼にあたっては、精度管理を行っている検査機関に依頼することが望ましい。」を追記することを提案した。

「別添２ 公衆浴場における衛生等管理要領」については、重複した内容を除き、新しい知見等を加え、また、循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルと整合するよう施設設備構造および衛生管理方法についての修正を提案した。

11. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

外部精度管理に参加した地方衛生研究所において、4 年連続参加した機関は 52 機関あった。今年度、目標良好範囲を報告した機関は、非濃縮試料では 70 機関中 68 機関（約 97%）であった。ろ過濃縮試料では目標回収率 20%以上 100%未満をクリアしたのは、非濃縮②を分母とした場合、70 機関中 52 機関（約 74%：昨年度は非回答及び非濃縮②で非検出だった 4 機関を除く 67 機関中 37 機関、約 55%）であった。目標良好範囲外を報告した 18 機関のうち 14 機関は昨年度も参加していたが、うち 9 機関は 2 年連続で良好範囲外を報告していた。

外部精度管理用の配付試料である BioBall を利用して、ろ過濃縮におけるポリカーボネート製フィルターの洗浄時間を 1 分及び 2 分で比較したが、有意差は認められなかったことから、その洗浄時間を 1 分とし、国から自治体に技術的助言として示すための検査法として「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示する際の根拠とした。

12. レジオネラ属菌検査研修会の開催

レジオネラ属菌の検査を行っている検査機関を対象に研修会を開催した。参加者は検査機関 15 機関 25 名、静岡県内の保健所（静岡市及び浜松市を含む）23 名であった。研修は、講義と実習の二部構成で行った。また、各検査機関が実施している検査方法を把握するため、事前アンケートを実施した。講義では、検査についての解説のほか、静岡県行政担当による「静岡県のレジオネラ防止対策についての取組み」の解説、麻布大学古畑勝則教授による「レジオネラ属菌の細菌学的特徴と汚染対策」と題した特別講演を行った。実習では、検体の前処理方法、接種、同定方法、遺伝子検査法についての研修を行った。

D. 考察

レジオネラ属菌平板培養時に行う斜光法は高価かつ特殊な機器を必要とせず、培養 3 日後の時点で観察・同定し、速報することが可能となり、また、精度向上にもつながることから非常に有用な方法であることが確認できた。レジオネラ属菌を実験室下で長期間水中培養すると、一部が VNC 化し、平板培養による発育能を失うことがわかった。

4 年間継続実施されてきた外部精度管理（レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ）は、検査手技

の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことができる方法であり、今後さらにシステムの検討を重ね、継続的かつ安定した外部精度管理調査ができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要と思われた。検査機関における検査精度向上のためには実習を伴った研修会の開催が有用であると思われた。

迅速検査法（LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法、EMA qPCR 法、PALSAR 法）について、平板培養法の結果と比較し、評価した。温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。あるいは、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係ないと想定すれば、温泉検体には、膜構造が損傷している菌体が多く、DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、感度の低下を防ぐために、N = 2 で実施するのが望ましいと考えられた。Chelex 抽出法を行うと、LAMP 法において何らかの反応阻害が低減でき、50cfu/100mL 以上の検体で Tt 値が有意に低下した。Chelex 抽出法は LAMP 法において偽陰性を減らすのに有効な抽出法であると考えられた。qPCR 法は平板培養法に対する感度は 100%だが、特異度が低かった。そこで、EMA 処理を実施すると、死菌 DNA の遺伝子増幅を抑制でき、平板培養法とより相関する迅速検査法となった。EMA 処理回数は、1 回と 2 回でほとんど結果に差はなく、実用上 EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向にあることが分かったので、RNA を検出する PALSAR 法は、現時点ではシャワー水およびカラン水以外を対象として使用するのが望ましいと考えられた。また、特殊な機器を必要としない PALSAR 法は、現場での活用が期待されるが、今後時間を要する濃縮工程の再検討が必要である。

患者検体から最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群 1（*Lp*1）に対する抗血清で感作した免疫磁気ビーズ（*Lp*1-IMB）を用いた検体の選択的濃縮は、*Lp*1 を検出する qPCR によるスクリーニングと組み合わせることで、感染源調査に有用となると思われた。

MLVA タイピングは従来法の SBT タイピングや PFGE と相関があり、分解能は SBT タイピングと同等の値を示したことから、感染源の推定の菌株の迅速なタイピング方法として期待できると考えられた。

携帯型フローサイトメーターを用いたレジオネラリスクの現地迅速評価法を *Lp*1 判定を含めた *Lp* に対する抗体検出法と組み合わせることで、当該菌の生死スクリーニングを伴うオンサイト定量解析法として改良した。5 分間の消毒効果判定と約 1 時間の *Lp* 定量評価により遊離塩素消毒下の入浴施設現場におけるレジオネラリスク監視の有用なツールとして利用可能であるといえる。

入浴施設の浴槽、カラン並びにシャワー及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態調査を継続的に行ったところ、配管中のレジオネラ汚染の除去には塩素の添加や水温を上げることが有効であるが、効果は限定的であり、完全に汚染を除去するには追加の対策が必要であると推測された。また、給水・給湯系におけるレジオネラ汚染についてのシンポジウムには、多くの参加者があり、関心の高さと、アンケート回答から参加者がその対応に苦慮している実情が明らかとなった。

pH8 から 10 のアルカリ性の浴槽水および生薬あるいは無機塩薬湯において、モノクロラミン消毒の効果を確認できた。換水頻度が低い場合は、雑菌の増殖、すなわちバイオフィルムの蓄積が心配されることから、換水と洗浄を徹底する必要性が示唆された。モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムと比較して、DNA を分解（あるいは変性）しないことから、モノクロラミン消毒下では、レジオネラが培養不検出であっても、LAMP 法で高率に陽性となることがわかった。モノクロラミン消毒についてのこれまでの研究成果を一般利用者と営業者に向けて平易な表現で記述した Web ページを公開した。モノクロラミン消毒の

活用が期待される。

E. 結論

公衆浴場等施設の衛生管理の向上を目指して、研究を実施した。

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水等について培養検査および迅速検査を行い、レジオネラ属菌による汚染実態を明らかにし、その対策法を検討した。レジオネラ培養には斜光法を取り入れ、一部の検体には免疫磁気ビーズによる選択的濃縮法を適用した。レジオネラ属菌 DNA・RNA・表層抗原等を検出対象とする各種迅速検査法を検討し、感度の向上、時間の短縮を図った。

感染源の迅速な特定への有用性が期待される型別法である MLVA 法を多機関で実施した。

pH8 から 10 のアルカリ性の浴槽水および生薬あるいは無機塩薬湯において、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌を抑制し、遊離塩素管理に比較して、衛生状態を良好に維持できた。モノクロラミン消毒について、研究成果をわかりやすく記述し、Web ページで公開した。

レジオネラ外部精度管理サーベイを継続することで、各検査機関が継続してサーベイに参加する必要性を確認することができた。各種研修会でレジオネラ検査法の普及、検査精度の向上に努めた。

これまでの研究成果を踏まえ、公衆浴場における衛生等管理要領等のレジオネラ属菌に関連した項目の改訂の提言を行うことができた。その参照検査法として、これまでの研究成果に基づいた「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法（案）」を提示することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 大屋日登美、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、古川一郎、前川純子、倉文明、泉山信司、黒木俊郎 (2018)：医療機関の給水設備におけるレジオネラ属菌の汚染実態　日本感染症学雑誌　92:678-685.

2) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani J, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M, the Working Group for *Legionella* in Japan: *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. Appl Environmental Microbiol. 2018. 84(18). pii: e00721-18.

3) 田中忍、中西典子、野本竜平、有川健太郎、濵夏樹、岩本朋忠．温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証．神戸市環境保健研究所報 46; 39-42, 2018.

4) 磯部順子，金谷潤一，他．2018．富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況（2017 年）．富山県衛生研究所年報．41:32-37.

2. 総説

1) 倉 文明：講座　環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御　3. レジオネラ症の国内外の動向．　防菌防黴誌 46(8):365-76, 2018.

2) 前川純子：講座　環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御　7. レジオネラ属菌の同定法と SBT (Sequence-Based Typing).　防菌防黴誌 47(1):29-35, 2019.

3) 杉山寛治：講座　環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御　8. 浴槽のレジオネラ対策① 浴槽のどこで，どのように増えるのか．防菌防黴誌 47(2):83-89, 2019.

4) 杉山寛治：講座　環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御　9. 浴槽のレジオネラ対策② 浴槽水の各種消毒方法の効果．　防菌防黴誌 47(3):117-123, 2019.

5) 倉　文明：トラブル解決編、水に関するト

ラブル. Infection Control、27(8):763-768, 2018.

6) 倉　文明：いま公衆衛生を考える　レジオネラ対策、環監未来塾. 生活と環境 755:42-8, 2018.

3. 学会発表

1) 森中りえか、前川純子、加藤尚之、大野章、原口浩幸、高崎一人、布藤聡、倉文明. 比色系パルサー法によるレジオネラ属菌検出の特異性について. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.

2) 磯部順子、金谷潤一、木全恵子、内田　薫、綿引正則、小澤賢介、権平文夫、倉文明、前川純子. 浴用水から *Legionella pneumophila* 血清群 1 を検出するための免疫磁気ビーズによる濃縮分離法の検討. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.

3) 田栗利紹、蔡国喜、下田貴宗、倉　文明、前川純子. 遊離塩素消毒下の入浴施設におけるレジオネラニューモフィラの生死スクリーニングを伴ったオンサイト半定量解析. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.

4) 金谷潤一、綿引正則、木全恵子、加藤智子、内田　薫、倉　文明、前川純子、磯部順子. 大気エアロゾル中のレジオネラ属菌検出状況. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.

5) 柳本恵太、堀内雅人、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、山上隆也、植松香星、久田美子、泉山信司：pH10 のアルカリ性温泉におけるモノクロラミンの消毒効果、日本防菌防黴学会第 45 回年次大会、2018 年 11 月、東京都

6) 大河内由美子、前川純子、泉山信司. 貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.

7) 渡邉貴明、松田宗大、小倉徹、植園健一、松田尚子、枝川亜希子、泉山信司、藤井明、循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について、日本防菌防黴学会、2018 年 11 月、東京都

8) 小倉徹、植園健一、渡邉貴明、松田宗大、原口浩幸、森中りえか、枝川亜希子、藤井明、モノクロラミン及び次亜塩素酸ナトリウム消毒下におけるレジオネラ属菌の LAMP 法結果に及ぼす影響、日本防菌防黴学会、2018 年 11 月、東京都

9) 倉 文明：レジオネラ院内感染の国内外の動向、ランチタイム講演、講演会・シンポジウム「医療機関の給湯・給水系に潜むレジオネラ感染リスク～実態と予防策～」、2018 年 10 月、東京都.

10) Fumiaki Kura and Junko Amemura-Maekawa. Sources of infection and settings in outbreaks of legionellosis --- Japan, 2000-2017. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.

11) Toshitsugu Taguri, Cai Guoxi , Hiroko Ebisu-Ojima , Fumiaki Kura , and Junko Amemura-Maekawa. On-site inspection method for *Legionella pneumophila* in bath water. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.

12) Junko Isobe, Jun-ichi Kanatani, Keiko Kimata, Kaoru Uchida, Masanori Watahiki, Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa. Evaluation of an immunomagnetic separation method to detect *Legionellla pneumohila* serogroup 1 from environmental specimens. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.

13) 佐々木麻里、神田由子、後藤高志、成松浩志：あるレジオネラ症集団発生における積極的疫学調査、第 64 回大分県公衆衛生学会、2019 年 3 月、大分.

14) 中西典子、野本竜平、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：冷却塔に定着する *Legionella pneumophila* のゲノム分子疫学. 第 13 回

日本ゲノム微生物学会.平成 31 年 3 月、東京.

15) 倉　文明：レジオネラ症に関する最近の話題、特別講演、平成 30 年度（第 40 回）全国環境衛生職員団体協議会関東ブロック会研究発表会、2019 年 2 月、高崎.

16) 倉　文明：わかりやすいレジオネラの話：医療機関に潜む感染リスク、教育講演（モーニングセミナー）、第 34 回日本環境感染学会総会、2019 年 2 月、神戸.

17) 藤井明、渡邉貴明、松田宗大、松田尚子、小倉徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、薬湯使用時におけるモノクロラミン消毒の有用性評価、第 46 回建築物環境衛生管理全国大会、2019 年 1 月、東京.

18) 前川純子：レジオネラ. 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会シンポジウム「不思議なミクロの世界―目からウロコの微生物学講座― 」, 2019 年 2 月, 東京.

4. 研修会

1) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 30 年度環境監視員担当者会議、2018 年 4 月、大分.

2) 佐々木麻里：大分県のレジオネラ症とレジオネラ検査について、レジオネラ症防止対策講習会、2018 年 9 月、大分.

3) 佐々木麻里：加湿器を原因とした老人福祉施設でのレジオネラ症集団発生事例～検査について～、平成 30 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2019 年 2 月、東京.

4) 前川純子, 森本　洋, 磯部順子, 佐々木麻里, 金谷潤一, 倉　文明, 緒方喜久代, 他：レジオネラ検査法, レジオネラ培養法概論, 迅速診断法, レジオネラ分子疫学, レジオネラ感染症総論, 他：国立保健医療科学院平成 30 年度短期研修新興・再興研修, 2018 年 10 月 15-19 日, 東京.

5) 前川純子：培養法と遺伝子検査法の特徴と実際の検査事例. 第 34 回レジオネラ対策シンポジウム（主催：NPO 法人入浴施設衛生管理推進協議会）, 2018 年 6 月, 東京.

6) 倉　文明：いま公衆衛生を考える　レジオネラ対策、環監未来塾、2018 年 7 月、東京都.

7) 倉　文明：レジオネラ属菌の検査と対策、国立保健医療科学院平成 30 年度短期研修環境衛生監視指導研修、2018 年 11 月、和光.

8) 倉　文明：宿泊施設のレジオネラ対策、日本環境衛生センター第 1 回保健所環境衛生監視員講座、2018 年 11 月、東京都.

9) 柳本恵太：県内の公衆浴場におけるモノクロラミン消毒検証について、山梨県衛生環境研究所感染症等研修会、2018 年 11 月

10) 前川純子, 森本　洋, 他：レジオネラ検査法の現状と今後の展望, レジオネラ属菌培養検査について, 他：レジオネラ属菌検査セミナー（主催：日水製薬株式会社）, 2019 年 3 月, 東京.

11) 前川純子, 倉　文明：最近のレジオネラ症の発生動向と検査方法. 抗レジオネラ用空調水処理剤協議会講演会. 2019 年 1 月, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）
公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究
研究代表者　前川　純子　国立感染症研究所　細菌第一部　主任研究官

分担研究報告書
レジオネラ属菌迅速検査法の評価

研究分担者
○ 磯部 順子　富山県衛生研究所　　佐々木 麻里　大分県衛生環境研究センター
田栗 利紹　長崎県環境保健研究センター
研究協力者
金谷　潤一　富山県衛生研究所　　山口 友美　宮城県保健環境センター
淀谷 雄亮　川崎市健康安全研究所　　上野　潤二　栄研化学株式会社
東出　誠司　栄研化学株式会社　　中筋 愛　タカラバイオ株式会社
吉崎 美和　タカラバイオ株式会社

研究要旨

本研究では、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法および EMA-qPCR 法（EMA 処理を 1 および 2 回実施）について、浴槽水などの実検体 233 検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。また、RT-qPCR 法を用いて、検体中のレジオネラ属菌 RNA 量と平板培養法との菌数を比較し、シャワー水およびカラン水における PALSAR 法の感度低下の原因を調査した。

183 検体について LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 81.8%、特異度は 69.8%、一致率は 72.7%であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。EMA-LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 69.1%と LAMP 法より低かったものの、特異度は 85.3%、一致率は 81.0%まで上昇した。温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法は、感度の低下を防ぐために、N = 2 で実施するのが望ましいと考えられた。

126 検体について qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 100%であり、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のすべてを検出できる迅速検査法であった。しかしながら、特異度は 34.8%、一致率は 52.4%であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、EMA 処理を 2 回実施すると、特異度は 68.5%、一致率は 75.4%まで上昇したため、死菌 DNA の遺伝子増幅を抑制でき、全体として平板培養法とより相関する迅速検査法となったと考えられた。ただし、EMA 処理回数は、1 回と 2 回でほとんど結果に差はなかったことから、実用上 EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。

92 検体について RT-qPCR 法を実施した結果、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。したがって、PALSAR 法は、現時点ではシャワー水およびカラン水以外を対象として使用するのが望ましいと考えられた。

A　研究目的

現在、浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに 7〜10 日を要する。一方、濃縮検体から直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法［リアルタイム PCR（qPCR）法および LAMP 法］は、検査開始から数時間で結果を得られるため、配管洗浄などの効果確認に活用されている[1)]。これらの遺伝子検出法は簡便で迅速な手法であるが、死菌由来 DNA も検出するという課題があった。

近年、死菌由来 DNA を Ethidium monoazide（EMA）で修飾して PCR 増幅を阻害する EMA-qPCR 法が開発され、市販されている。平成 25 年には、液体培地による前培養を組み合わせた「生菌迅速検査法（LC EMA-qPCR 法）」が開発され[2)]、市販されている。

また、レジオネラ属菌特異的 16S rRNA を標的とし、プレート上の DNA プローブに結合させて検出する PALSAR 法が開発された。他の迅速検査法と同様に濃縮検体を用いる本検査は、特殊な機器が不要で肉眼による判定が可能であり、当日中に結果が判明する方法である。

これまで、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、上記の迅速検査法について評価してきた。その結果、1) EMA-LAMP 法については、EMA 処理濃度の再検討が必要であること、2) PALSAR 法については、シャワー水およびカラン水を対象としたとき、浴槽水などと比較し、平板培養法に対する感度が低いことが明らかとなった[3)]。一方、EMA-qPCR 法において、EMA 処理回数と平板培養法に対する相関については、これまで検討されていない。

そこで今回、改良 EMA-LAMP 法および EMA-qPCR 法（EMA 処理を 1 および 2 回実施）について、浴槽水などの実検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。また、実検体から抽出した RNA を用いて定量逆転写 PCR（RT-qPCR）を行い、PALSAR 法におけるシャワー水およびカラン水の感度低下の原因を調査した。

B　材料と方法

1　検査材料

全国 5 か所の地方衛生研究所（機関 A〜E）において、平成 30 年度に浴用施設などから 233 検体の試料を採取し、迅速検査法の検討に用いた（表 1）。検体の内訳は、浴槽水が 147 検体（63.1%）、シャワー水が 29 検体（12.4%）、湯口水が 23 検体（9.9%）、採暖槽水が 16 検体（6.9%）、カラン水が 15 検体（6.4%）、冷却塔水が 2 検体（0.9%）、プール水が 1 検体（0.4%）であった。

2　平板培養法

平板培養法は、新版レジオネラ症防止指針に準じて各機関の方法で実施し、10 CFU/100 ml 以上を陽性とした。

3　(EMA-) LAMP 法

LAMP 法は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E（栄研化学）を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。EMA-LAMP 法は、図 1 に従って実施した。いずれの方法においても、遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。また、EMA-LAMP 法は、124/205 検体（60.5%）は N = 2 で実施した。

4　(EMA-) qPCR 法

qPCR 法は、Lysis Buffer for *Legionella*（タカラバイオ）および Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。EMA-qPCR 法は、qPCR 法における DNA 抽出の前に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0（タカラバイオ）および LED Crosslinker 12（タカラバイオ）を用いて、EMA 処理を 1 および 2 回実施した。qPCR 法、EMA-qPCR 法ともに、遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。なお、レジオネ属菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、取扱説明書および過去の検討結果[4)]を参照した。

5　RT-qPCR 法

RT-qPCR 法は、烏谷らの方法に従って実施した[5]。検量線は、*L. pneumophila* 長崎 80-045 株を用いて作製した。菌株を BCYE α 寒天培地で 30℃4 日間培養後、生理食塩水で調製した McFarland No. 2 濁度の菌液（約 10^9 CFU/ml）を 10 倍段階希釈し、－1～－8 乗段階の希釈液を用いて RNA を抽出した。

（倫理面への配慮）

本研究は、研究機関内外の倫理委員会等における承認手続きが必要となる研究には該当しない。

C　結果

1　平板培養法による結果

233 検体について検査した結果、63 検体（27.0%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された（表 2）。菌数別に見ると、10～99 CFU/100 ml が 35 検体（15.0%）、100～999 CFU/100 ml が 19 検体（8.2%）、1,000 CFU/100 ml 以上が 9 検体（3.9%）であった。最も多かった検体では、4,830 CFU/100 ml のレジオネラ属菌が検出された。分離菌の血清群別を実施した結果、*L. pneumophila* 血清群（SG）4 が 17 検体から分離され、最も多かった（表 3）。次に多かったのは、*L. pneumophila* SG 1 および SG 6（各 16 検体）、*L. pneumophila* SG 5（14 検体）、*L. pneumophila* SG 3（13 検体）であった。また、*L. pneumophila* 以外の菌種が 14 検体から分離された。

2　LAMP 法による結果

LAMP 法を用いた 183 検体について、平板培養法と比較した（表 4a）。LAMP 法は平板培養法に対して、感度 81.8%、特異度 69.8%、陽性的中率 46.2%、陰性的中率 92.4%、一致率 72.7%であった。

3　EMA-LAMP 法による結果

205 検体について、EMA-LAMP 法を実施した（表 4b および 4c、EMA 未処理は 76 検体について実施）。EMA 未処理の場合、平板培養法に対して、感度 86.7%、特異度 54.1%、陽性的中率 31.7%、陰性的中率 94.3%、一致率 60.5%であった。EMA 処理を実施することで、感度 69.1%、特異度 85.3%、陽性的中率 63.3%、陰性的中率 88.3%、一致率 81.0%となった。

4　(EMA-) LAMP 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となったが、(EMA-) LAMP 法で陰性となった検体を表 5 に示した。23 検体のうち、12 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml と検出下限値であった。一方、平板培養法での菌数が 50 CFU/100 ml 以上であった 8 検体はすべて温泉であり、このうち 7 検体は EMA-LAMP 法が陰性であった。さらに、6/7 検体は、機関 D で実施した浴槽水および湯口水であった。泉種別に結果を見ると、温泉を対象とした場合、LAMP 法の感度は 91.7%であったのに対し、EMA-LAMP 法の感度は 70.6%であった（表 6）。一方、水道水などを対象とした場合、LAMP 法の感度は 70.0%、EMA-LAMP 法の感度は 66.7%であった。

5　(EMA-) qPCR 法による結果

(EMA-) qPCR 法を用いた 126 検体について、それぞれ平板培養法と比較した（表 7）。qPCR 法は平板培養法に対して、感度 100%、特異度 34.8%、陽性的中率 36.2%、陰性的中率 100%、一致率 52.4%であった。EMA-qPCR 法（EMA 処理 1 回）は、感度 97.1%、特異度 62.0%、陽性的中率 48.5%、陰性的中率 98.3%、一致率 71.4%であった。EMA-qPCR 法（EMA 処理 2 回）は、感度 94.1%、特異度 68.5%、陽性的中率 52.5%、陰性的中率 96.9%、一致率 75.4%であった。実検体を用いた qPCR 法および EMA-qPCR 法（EMA 処理 1 回）と平板培養法との菌数（定量値）の相関は、R^2 = 0.3425 および R^2 = 0.4040 であった（図 2）。

6　RT-qPCR 法による結果

RT-qPCR 法を用いた 92 検体について、平板培養法と定量値および菌数を比較した（図 3）。検体別に見ると、浴槽水 49 検体を対象とした場合、R^2 値は 0.3842 であった。一方、シャワー水およびカラン水 43 検体を対象とした場合、R^2 値は

0.1775 であった。

D 考 察

今年度は、5 種類の迅速検査法[LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法、EMA-qPCR 法（EMA 処理 1 回）、EMA-qPCR 法（EMA 処理 2 回）]および RT-qPCR 法について、平板培養法の結果と比較し、評価した。

LAMP 法では、平板培養法に対する感度は 81.8%であり、昨年度の 84.4%[3]と同等であった。LAMP 法における偽陰性検体の多く（6/8 検体）は、平板培養法での菌数が検出下限値の 10 CFU/100 ml であったことから、各種検査に検体を分取する際のばらつきの影響が考えられた。LAMP 法は、一致率 72.7%、陰性的中率 92.4%であることからも、迅速検査法として有用であると考えられた。

EMA-LAMP 法については、昨年度から、EMA 処理濃度などプロトコルの一部を変更して実施した。その結果、感度は 69.1%と LAMP 法より低かったものの、特異度は 85.3%、一致率は 81.0%まで上昇した。EMA-LAMP 法における偽陰性検体の約半数（8/17 検体）は、平板培養法での菌数が検出下限値の 10 CFU/100 ml であった。それ以外の偽陰性検体の多く（7/9 検体）は、機関 D で温泉検体を対象に検査した結果であった。全体として、温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であった。温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法および平板培養法が陽性となった 38 検体のうち、24 検体は N = 2 で実施したが、このうち 9 検体（37.5%）は 1 回のみ増幅反応が認められた（データ未掲載）。EMA-LAMP 法の感度低下を防ぐためには、N = 2 で実施するのが望ましいと考えられた。

qPCR 法は、平板培養法に対する感度は 100%であり、昨年度の結果（感度 97.0%）[3]と同様に、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のほとんどを検出できる迅速検査法であった。しかしながら、特異度は 34.8%、一致率は 52.4%であり、死菌 DNA を検出していると考えられる検体が多かった。一方、EMA 処理を 1 および 2 回と実施することで、特異度は 68.5%、一致率は 75.4%まで上昇したため、死菌 DNA の遺伝子増幅を抑制でき、全体として平板培養法とより相関する迅速検査法となったと考えられた。ただし、EMA 処理回数は、1 回と 2 回でほとんど結果に差はなかったことから（カイ二乗検定、$P = 0.48$）、実用上 EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。

PALSAR 法は、昨年度の結果では、浴槽水を対象とした場合、感度は 83.7%（41/49 検体）であったのに対し、シャワー水およびカラン水を対象とした場合は、感度が 37.5%（3/8 検体）と低かった[3]。今年度実施した RT-qPCR 法の結果から、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。したがって、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 1 CFU あたりの RNA 量は、浴槽水より少ない可能性が考えられた。検査に用いたシャワー水およびカラン水は、80%以上（36/43 検体）が混合水栓であり、レジオネラ属菌の増殖に適した温度である 37℃付近で滞留している検体が少ないと考えられた。そのため、レジオネラ属菌の遺伝子発現量が低かった可能性が考えられた。PALSAR 法は、現時点では、シャワー水およびカラン水以外を対象として使用するのが望ましい。

LAMP 法、qPCR 法、EMA-qPCR 法（EMA 処理 1 回）および EMA-qPCR 法（EMA 処理 2 回）は、いずれの方法においても陰性的中率が 90%以上であり、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であると考えられた。ま

た、EMA-LAMP 法は、LAMP 法と比較し、感度はやや低下するが、特異度および一致率は上昇する方法であった。PALSAR 法については、シャワー水およびカラン水以外を対象として使用することで、平板培養法と相関する方法であることが明らかとなった。

E　結　論

各種迅速検査法について、浴槽水などの実検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

LAMP 法は、平板培養法と相関する迅速検査法であると考えられた。EMA-LAMP 法は、LAMP 法より平板培養法と相関する方法であったが、感度はやや低下した。

温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法の感度低下を防ぐために、N = 2 で実施するのが望ましいと考えられた。

qPCR 法は、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のすべてを検出できる迅速検査法であったが、死菌 DNA を検出している検体が多かった。しかしながら、EMA 処理を実施することで、全体として平板培養法とより相関する迅速検査法（EMA-qPCR 法）となると考えられた。実用上、EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。

PALSAR 法は、シャワー水およびカラン水以外を対象として使用することで、平板培養法と相関する方法であることが明らかとなった。

参考文献

1) 浅野　陽子、核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について、生活と環境、2007、52 (1)、89-91.

2) 烏谷　竜哉　他、液体培養（Liquid Culture）EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討、公衆浴場等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、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　平成 24 年度分担研究報告書、71-84.

3) 磯部　順子　他、レジオネラ属菌迅速検査法の評価、公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究、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　平成 29 年度分担研究報告書、62-70.

4) 磯部　順子　他、レジオネラ属菌迅速検査法の評価、公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究、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　平成 28 年度分担研究報告書、51-61.

5) 烏谷　竜哉　他、液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の改良、公衆浴場等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、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　平成 24 年度分担研究報告書、59-69.

F　研究発表

なし

G　知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 検体内訳と検査方法

		機関					
		A	B	C	D	E	計
検体内訳	浴槽水	49	23	12	25	38	147
	湯口水				23		23
	採暖槽水		16				16
	シャワー水	28	1				29
	カラン水	15					15
	冷却塔水		2				2
	プール水		1				1
	計	92	43	12	48	38	233
検査方法	LAMP	92	43		48		183
	EMA-LAMP（EMA未処理）	76					76
	EMA-LAMP（EMA処理）	76	43		48	38	205
	qPCR	76		12		38	126
	EMA-qPCR（EMA処理1回）	76		12		38	126
	EMA-qPCR（EMA処理2回）	76		12		38	126
	RT-qPCR	92					92

図1. EMA-LAMP法プロトコル

100倍濃縮液1.5 ml×2本
↓
遠心（13,000×g、4℃、5分）
↓
上清1 ml除去
↓
残った500 µlを用いて懸濁後、1本にまとめる（300倍濃縮液1 ml）
↓
遠心（13,000×g、4℃、5分）
↓
上清950 µl除去
↓
2% Yeast Extractを50 µl添加後、ピペッティングで懸濁
↓
EMA溶液（302.5 µg/ml）を10 µl添加後、十分に混和（終濃度27.5 µg/ml）
（7回タッピング後、スナップを利かせて1回だけ手で振り落とす）
↓
遮光して室温放置15分
（4分毎に7回タッピングし、スナップを利かせて1回だけ手で振り落とす）
↓
光照射15分（LED Crosslinker 12使用）

EMA未処理の場合は実施せず

↓
遠心（13,000×g、4℃、5分）
↓
10 µl程度残して上清除去
↓
10% Chelex溶液を40 µl添加（添加後はピペッティング禁止）
↓
ボルテックス後、スピンダウン
↓
加熱（95℃、10分）
↓
氷上静置2分
↓
ボルテックス後、遠心（13,000×g、4℃、10分）
↓
上清25 µl回収

表2. 平板培養法による検出率

菌数（CFU/100 ml）	検体数	（%）
10未満	170	(73.0)
10-99	35	(15.0)
100-999	19	(8.2)
1,000以上	9	(3.9)
計	233	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
L. pneumophila	
SG 4	17
SG 1	16
SG 6	16
SG 5	14
SG 3	13
SG 2	5
SG 7	4
SG 9	4
SG 8	3
SG 13	1
SG 15	1
UT	14
L. micdadei	5
L. dumoffii	1
L.gormanii	1
L.londiniensis	1
Legionella spp.	9

表4. 平板培養法と (EMA-) LAMP法との比較

a. LAMP法

	平板培養法（CFU/100 ml）		
	≧10	＜10	計
陽性	36	42	78
陰性	8	97	105
計	44	139	183

感度81.8%、特異度69.8%、陽性的中率46.2%、陰性的中率92.4%、一致率72.7%

b. EMA-LAMP法（EMA未処理）

	平板培養法（CFU/100 ml）		
	≧10	＜10	計
陽性	13	28	41
陰性	2	33	35
計	15	61	76

感度86.7%、特異度54.1%、陽性的中率31.7%、陰性的中率94.3%、一致率60.5%

c. EMA-LAMP法（EMA処理）

	平板培養法（CFU/100 ml）		
	≧10	＜10	計
陽性	38	22	60
陰性	17	128	145
計	55	150	205

感度69.1%、特異度85.3%、陽性的中率63.3%、陰性的中率88.3%、一致率81.0%

表5. (EMA-) LAMP法における偽陰性検体

No.	施設	検体	泉質など	湯温（℃）	残塩（mg/l）	pH	ATP (/10 ml)	平板培養法（CFU/100 ml）	血清型	LAMP法	EMA-LAMP法（EMA処理）	EMA-LAMP法（EMA未処理）	qPCR法	EMA-qPCR法（1回）	EMA-qPCR法（2回）
1	A	浴槽水	温泉	42	2		12	10	Lp 1	-	-	-	+	+	+
2	B	採暖槽水	水道水	32.5	2	7.98		10	Lp 1	-	-	NT	NT	NT	NT
3	E	浴槽水	白湯	39.3	0.1		9	10	Lp 5	NT	-	NT	+	-	-
4	E	浴槽水	温泉	41.3	0.1		52	10	Lp 1	NT	-	NT	+	+	+
5	A	浴槽水	白湯	39	0.5		11	10	Lp 1	-	NT	NT	NT	NT	NT
6	A	カラン水	井戸水		0		12	10	Lp 3	-	+	+	+	+	+
7	A	シャワー水	水道水		0.2		20	10	Lp 5	-	+	+	+	+	+
8	A	カラン水	水道水		0.2		24	10	Lp 5	-	+	+	+	+	+
9	A	シャワー水	井戸水		0.2		8	10	Lp 4	+	-	+	+	+	+
10	B	採暖槽水	水道水	37.4	1	8.12		10	Lp 6	+	-	NT	NT	NT	NT
11	B	浴槽水	水道水	35.9	0.2	7.96		10	Lp 1	+	-	NT	NT	NT	NT
12	D	浴槽水	自家ボーリング水					10	Lp 3, Lp 5, Lp 6	+	-	NT	NT	NT	NT
13	A	浴槽水	温泉	40.5	0.4		261	20	Lp 4, Lp 6	+	-	-	+	+	+
14	A	カラン水	井戸水		0.07		7	30	Lp 5, Lp 6	-	+	+	+	+	+
15	A	カラン水	井戸水		0.05		17	30	Lp 1	+	-	+	+	+	+
16	D	湯口水	温泉		0	9		50	Lp 3, Lp 6	+	-	NT	NT	NT	NT
17	D	湯口水	温泉			6.9		50	Lp 3, Lp 5	+	-	NT	NT	NT	NT
18	D	浴槽水	温泉		0	8.8		55	Lp 4, L. sp	-	+	NT	NT	NT	NT
19	E	浴槽水	温泉	43.7	0.05		980	60	Lp 1, Lp 4, L. micdadei, L. sp	NT	-	NT	+	+	+
20	D	湯口水	温泉		0	8.8		100	Lp 4, L. sp	+	-	NT	NT	NT	NT
21	D	湯口水	温泉		0.6			100	Lp 3, Lp 4, Lp 6, Lp UT	+	-	NT	NT	NT	NT
22	D	浴槽水	温泉		0	7.2		500	Lp 2, Lp 3, Lp 13, UT	+	-	NT	NT	NT	NT
23	D	湯口水	温泉		0	8.2		500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	+	-	NT	NT	NT	NT

表6. 泉種別における（EMA-）LAMP法の感度、特異度および一致率

検体	由来	方法	n	培養陽性	感度（%）	特異度（%）	一致率（%）
温泉	浴槽水、湯口水	LAMP法	63	24	91.7	66.7	76.2
		EMA-LAMP法（EMA処理）	82	34	70.6	83.3	78.0
その他（水道水、井戸水）	浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水、冷却塔水など	LAMP法	120	20	70.0	71.0	70.8
		EMA-LAMP法（EMA処理）	123	21	66.7	86.3	82.9

表7. 平板培養法と (EMA-) qPCR法との比較

a. EMA未処理

		平板培養法（CFU/100 ml）		
		≧10	＜10	計
qPCR	陽性	34	60	94
	陰性	0	32	32
計		34	92	126

感度100%、特異度34.8%、陽性的中率36.2%、陰性的中率100%、一致率52.4%

b. EMA処理（1回）

		平板培養法（CFU/100 ml）		
		≧10	＜10	計
EMA-qPCR	陽性	33	35	68
	陰性	1	57	58
計		34	92	126

感度97.1%、特異度62.0%、陽性的中率48.5%、陰性的中率98.3%、一致率71.4%

c. EMA処理（2回）

		平板培養法（CFU/100 ml）		
		≧10	＜10	計
EMA-qPCR	陽性	32	29	61
	陰性	2	63	65
計		34	92	126

感度94.1%、特異度68.5%、陽性的中率52.5%、陰性的中率96.9%、一致率75.4%

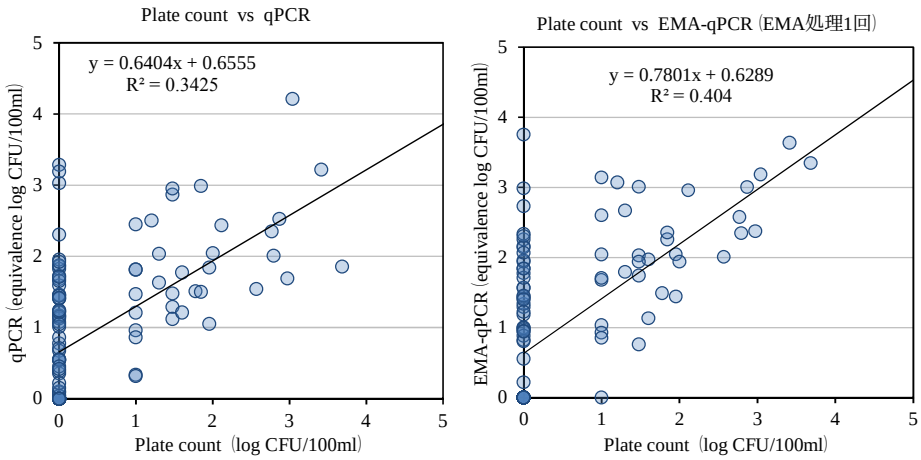


図 2. 平板培養法と qPCR 法および EMA-qPCR 法（EMA 処理 1 回）との相関

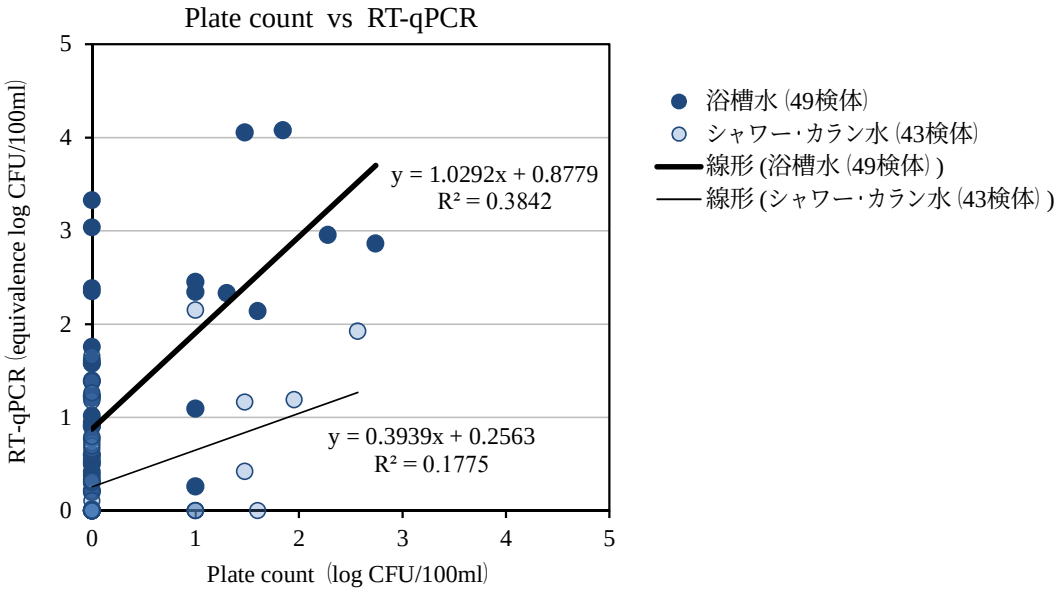


図 3. 平板培養法と RT-qPCR 法との相関

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）
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」

平成 30 年度分担研究報告書

斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査および実検体を用いた LAMP 法と比色系パルサー法の検討

研究分担者　佐々木　麻里　大分県衛生環境研究センター
研究協力者　神田　由子、後藤　高志、成松　浩志
大分県衛生環境研究センター
研究協力者　淀谷　雄亮　川崎市健康安全研究所
研究協力者　江川　英明　大分県南部保健所
研究協力者　緒方　喜久代　公益社団法人大分県薬剤師会検査センター

研究要旨：浴場水からのレジオネラ属菌の標準的な検査法を提示する一助として、迅速培養法（斜光法を取り入れた培養法）について平成 21 年度から検討を行っている。平成 30 年度は大分県内施設の浴場水 48 検体を対象に迅速培養法を実施した。その結果、短期間で正確な培養結果を得ることができた。

迅速培養法と併せて、遺伝子検査法（LAMP 法および比色系パルサー法）についても検討を行った。LAMP 法は、培養法でレジオネラ属菌が検出されるにもかかわらず LAMP 陰性となる不一致の結果が散見されていたが、抽出法を変更することにより改善が見られた。比色系パルサー法は、特殊な機器を必要としないため、保健所等監視指導機関等での活用が期待できる方法である。その検証ため、今年度は同一検水を用い、当所の培養検査と平行して、保健所にてパルサー法によるレジオネラ属菌検査を行なった。その結果、培養法ではレジオネラ属菌が検出されたが、パルサー法では陰性となった。

A．研究目的

浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として広く用いられている培養法は結果を得るまでに 7～10 日の長い時間を要する。患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時やレジオネラ属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中のレジオネラ属菌の存在あるいは菌数を速やかに把握する必要がある場合は、監視現場からより迅速で、かつ正確な検査が求められている。レジオネラ属菌は、培養 3 日後に分離培地上に出現する小コロニーへ 2 方向から斜に光を照射し、実体顕微鏡下で観察をすると特徴的なモザイク様模様を示すことが報告されている[1)]。そこで、この特徴をレジオネラ属菌の迅速スクリーニングに利用した方法（以下、斜光法）[1)] をレジオネラ属菌検査のいわゆる『標準的検査法』に導入することを目的に、大分県内の浴場水の調査の中で、斜光法を取り入れた検査法を併行・継続し、様々な泉質に対する有用性と実効性についての検討を平成 21 年度から重ねている。

また、LAMP 法については、迅速に結果が得られることから、大分県において多用しているが、様々な泉質を有する温泉水等を利用した公衆浴場水等では、培養法でレジオネラ属菌が検出されるにもかかわらず LAMP 法で陰性となる不一致の結果が得られることが多々あり、その解決が課題となっていた。そこで、培養法と LAMP 法の結果不一致検体について、抽出法を変更し、検討を行った。

比色系パルサー法（Fig. 1）は、レジオネラ属菌特異的 16S rRNA に自己集合体を結合させることで、標的遺伝子を増幅させずに目視で検知する検査法である。測定に特殊な機器を必要としないことから、試験検査機関のみならず監視指導機関等での活用が期待される。昨年度までに、検水ろ過後のフィルターを直接溶菌する方法で良好な結果を得た[2]ので、今年度の検体に適用し、併せて川崎市健康安全研究所（以下、川崎市衛研）、監視指導機関である大分県南部保健所衛生課（以下、保健所）においても同様の方法で実施し、検討した。

以下、培養法でレジオネラ属菌が検出されたこと、LAMP 法・パルサー法で陽性であったことを「(＋)」と表記し、培養法でレジオネラ属菌が検出されなかったこと、LAMP 法・パルサー法で陰性であったことを「(－)」と表記する。

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 30 年 5 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水、25 施設 48 検体を対象とした。

検査法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した。すなわち、検水 1200mL をメンブランフィルター（直径 47mm、孔径 0.2μm、ADVANTEC 社、POLYCABONATE）で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 12mL 入りの滅菌コニカルビーカー（100mL 容量）に移し、ボルテックスミキサーにて 1 分間洗い出しをした。ろ過濃縮後の濃縮検体と、50℃で 20 分加熱後急冷した濃縮検体（加熱処理と表記）をそれぞれ濃縮試料（100 倍濃縮）とした。

2. 培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYOα 寒天培地（栄研化学）、GVPC 寒天培地（日研生物）および MWY 寒天培地（自家製；Oxoid）を用い、非濃縮処理の検水および各濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、その 200μL を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布し、これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36℃で培養した。本法における検出感度は 5cfu/100mL である。

培養 3 日後に、2 方向から光を照射し、実体顕微鏡下で各分離培地を観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYEα 寒天培地（自家製；Oxoid）および血液寒天培地（ウマ血, 自家製）に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、EmviroAmp Legionella Kit のプライマー配列[3]を用いた PCR 法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は 36℃で 7 日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、同様の同定検査を行った。最終的に同定されたコロニー数をもって検水 100mL あたりのレジオネラ属菌数に換算した。分離した菌株は、Legionella Latex Test Kit（Oxoid）およびレジオネラ免疫血清（デンカ生研）を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

また、*Legionella pneumophila* SG1 と確認された分離株については *lag-1* 遺伝子の保有の有無について、Kozak ら[4]のプライマーlag-F と lag-R を用い、PCR 法にて確認した。

3. LAMP 法

濃縮検体 48 検体について、Legionella Detection Kit *E*（栄研化学）を用い、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行った。

培養（＋）で LAMP（－）となった 2 検体、菌数が多い（100cfu 以上/100mL）にも関わらず LAMP3 回中 2 回（－）であった 4 検体を含めた 20 検体について、以下の抽出法（Chelex 抽出法）で再度濃縮検体から抽出、測定し、キットの説明書どおりの抽出法（常法）と Tt（Threshold time）値*を比較した。抽出は同じ濃縮検体からで、測定は 3 回繰り返した。また、前年度[2]に、レジオネラ属菌数が 1500cfu/100mL で LAMP 陰性であった 1 検体と、6000cfu/100mL で LAMP3 回中 2 回陰性であった 1 検体についても、Chelex 抽出法を適用した。

Chelex 抽出法：予め Chelex 100 Chelating Resin（BioRad）を 10%w/v になるよう滅

菌蒸留水（遺伝子工学用）に懸濁させ、Chelex 液を調製した。濃縮検体 2mL をチューブに採取し 13,000g で 10 分間遠心した後、50μL を残して上清を除去、10%Chelex 液を 50μL 添加し、十分に混和した。沸騰水中で 10 分間加熱後、13,000g で 5 分間遠心した上清をサンプルとした。

*Tt 値：LAMP 法で一定の濁度に達するまでの時間（分）。菌数が多いほど値が小さい傾向にある。

4. 比色系パルサー法

大分県衛生環境研究センター（以下、大分衛研）では上記 1 に示す非濃縮検水 48 検体、川崎市衛研では浴槽水や採暖槽水等 39 検体、保健所では浴槽水および湯口水 4 検体について測定した。レジオネラ属菌迅速検査キット（ファスマック）を用い、以下のいずれかの方法（方法①、方法①で目詰まりを起こす場合は方法②）で溶菌液を調製し、添付の取扱説明書に従って測定を実施した。即日測定できなかった溶菌液については、測定するまで 1 日～4 日間、－30℃で冷凍保存した。川崎市衛研および保健所では方法①のみで実施した。

方法①：検水 100mL を注射筒に入れて直径 13mm のメンブランフィルター（孔径 0.22μm、Merck 社、セルロース混合エステル）に押出または吸引してろ過し、ろ過後のフィルターを 2mL チューブに移し、100/30 倍に希釈した変性液 100μL を加えてボルテックスミキサーで 1 分間混合後、フィルターを下にした状態で 37℃15 分間静置し、その後 10μL の中和液を加えて溶菌液を調製した。測定にはこの溶菌液の全量 110μL を用いた。

方法②：検水 200mL を注射筒に入れて直径 25mm のメンブランフィルター（孔径 0.22μm、Merck 社、セルロース混合エステル）に押出または吸引してろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌したピンセットで折り畳んで 2mL チューブに移し、100/30 倍に希釈した変性液をろ紙が漬かる量の 200μL 加えてボルテックスミキサーで 1 分間混合後、フィルターを下にした状態で 37℃15 分間静置し、その後 20μL の中和液を加えて溶菌液を調製した。測定には、検水 100mL 分に相当する半量 110μL の溶菌液を用いた。

C. 研究結果

1. 培養法

培養結果の概要を Table 1 に示した。48 検体中 24 検体（50%）からレジオネラ属菌が検出された。内訳は「掛け流し・非循環式施設」では浴槽水 19 検体中 12 検体（63%）、湯口水 19 検体中 8 検体（42%）で、「循環式施設」では浴槽水 6 検体中 2 検体（33%）、湯口水 4 検体中 2 検体（50%）であった。

浴槽水と湯口水ともにレジオネラ属菌が検出された施設は 9 施設であった。浴槽水（＋）で湯口水（－）となった施設は 4 施設、浴槽水（－）で湯口水（＋）となった施設は 1 施設であった（Table 2）。

検出された菌数を Table 3 に示す。検水 100mL あたり 1000cfu 以上検出された検体が 6 検体あり、高菌数の検体が多かった。菌数は最も多い検体で 3500cfu/100mL であった。

斜光法は培養 3 日後を判定日とし、特徴あるモザイク様のコロニーについて確認検査を行った。継続培養後に菌数が増加することはあったが、レジオネラ属菌が検出された 24 検体中 23 検体については、斜光法で（＋）を確認することができた。一方、その中には斜光法における検出菌と異なる種類・血清群の菌が継続培養後に検出された検体もあった。斜光法の段階で（＋）を確認できなかった 1 検体からは、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が 1 株のみ（5cfu/100mL に相当）検出された。検出された *L. pneumophila* の血清群別の結果を Table 4 に示した。SG1 株が 2 施設の 3 検体から検出されたが、*lag-1* 遺伝子を保有する株はなかった（Table 5）。

2. LAMP 法

濃縮検体 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行い、1 回でも検出された場合は（＋）と判定した。常法による結果は Table 6 のとおりで、2 検体が培養（＋）で LAMP（－）の不一致の結果となった。当該 2 検体のレジオネラ属菌数は 5cfu/100mL と 55cfu/100mL で、*L. pneumophila* が分離された。

Chelex 抽出法による 20 検体の結果については Table 7 のとおりであった。常法と Chelex

抽出法について、陰性の Tt 値を 60 分として t 検定を実施したところ、全検体間では有意差が見られなかった。しかし、培養で検出された菌数が 50cfu/100mL 以上の 9 検体間では、Tt 値の平均値と標準偏差は、常法で 45.8±9.9 分、Chelex 抽出法で 36.0±10.7 分であり、Chelex 抽出法の Tt 値が有意に低下した（p=0.012<0.05）。t 検定は対応のある 2 標本間の片側検定で実施した。

また、前年度レジオネラ属菌数が多いにも関わらず常法で LAMP3 回中 3 回または 2 回（－）であった 2 検体については、Chelex 抽出法で LAMP3 回中 3 回とも（＋）であった。

3. 比色系パルサー法

大分衛研で実施した 48 検体の結果を Table 8 に示す。培養法（＋）でパルサー法（－）の不一致の結果となったのは 2 検体で、*L. pneumophila* が分離され、菌数は 10cfu/100mL と 100cfu/100mL であった。

川崎市衛研で実施した 39 検体中、培養（＋）（川崎市衛研の方法で実施、100mL あたり 10cfu 以上を（＋）とした。）の検体は 4 検体あり、全てパルサー法は（－）であった（Table 9）。いずれも *L. pneumophila* が分離され、菌数は 3 検体が 10cfu/100mL、1 検体が 120cfu/100mL であった。一方、パルサー法（＋）となった 5 検体のうち 2 検体は温泉水を使用した浴槽水で、非常に濃い色を呈した。なお、パルサー法に供した 39 検体のうち、この 2 検体を除く 37 検体は水道水を原水とする検体であった。

保健所で実施した 4 検体の結果は Table 10 のとおりで、全て培養（＋）パルサー（－）の結果となった。

D. 考察

斜光法は高価かつ特殊な機器を必要とせず、簡便で迅速な結果が得られる培養法として、非常に有用な方法である。培養 7 日以降で発育を認めるレジオネラ集落もあるため、培養 3 日後での陰性の判定はできないが、3 日後の時点で観察・同定し、速報することで、速やかな行政対応につなげることが可能となる。少ない菌数のレジオネラ属菌が他の多数の菌に紛れているような状況でも、斜光法における特徴的なモザイク様の形態は、平板上に発育したコロニーを見分ける際の分かりやすい手がかりとなり、検査の迅速化だけでなく精度向上にもつながると考える。

LAMP 法について、50cfu/100mL 以上のレジオネラ属菌数が検出された検体については、Chelex 抽出法を用いることで Tt 値が有意に低下した。これは、LAMP（＋）となる回数が増えたことを反映している。常法と Chelex 抽出法による抽出物について、レジオネラ 16S rRNA 遺伝子コピー数を測定したところ、Chelex 抽出物のコピー数の方が少なかった（データ未掲載）。このことから、Chelex 抽出法により抽出された遺伝子コピー数が増えたからではなく、何らかの反応阻害を低減できたために LAMP（＋）の回数が増え、Tt 値が低下したと考えられる。レジオネラ属菌数が 5cfu/100mL の 3 検体については全く改善されなかったが、LAMP キット添付の説明書では 60cfu/test が検出限界とされており、また、菌数が非常に多いにもかかわらず LAMP（－）であった検体についても Chelex 抽出法では（＋）となったことからも、Chelex 抽出法は偽陰性を減らすのに有効な抽出法であると考える。

比色系パルサー法について、機器の揃った検査機関以外で実施することを想定し、実際に保健所での検査を行ったが、培養（＋）にもかかわらずパルサー法では全て（－）となった。川崎市衛研においても、培養（＋）の検体がパルサー法では（－）となった。保健所においては、溶菌液調製後に窓口対応が生じ、測定を開始するまで約 1 時間冷蔵保存した。パルサー法は RNA を検出する方法で、溶菌液中の RNA は時間の経過とともに加水分解されて減少するが、1 時間冷蔵保存による影響の有無については未検証である。一方、大分衛研で実施した 48 検体については、培養（－）でもパルサー（＋）となる検体が多かった。大分衛研の検体は温泉水が多く、保健所の検体および川崎市衛研の多くの検体は水道水である。川崎市衛研において温泉水の検体が濃い発

色を呈したことからも、水質の違いが発色に関与している可能性もあるが、今後の検討課題としたい。また、前年度までの検討[2)]から、パルサー法の溶菌工程は、検水をろ過したフィルターを直接溶菌処理するが、ろ過をするにはその場でシリンジを長時間押し続ける必要があり、窓口対応等で中座の多い保健所監視員の実施には困難が予想され、濃縮工程の再検討が必要である。

E. 結論

培養法の迅速化、精度向上を図るにあたって、斜光法は有用である。斜光法を含めた標準的検査法を提示し、精度の高いレジオネラ属菌検査を普及するための研修システム確立に向け、尽力したい。

LAMP 法については、抽出法を変更することにより、培養（＋）で LAMP（－）の不一致が解消されることが示唆された。多様な泉質を有する大分県の浴場水検査において Chelex 抽出法を導入する予定である。

一方、機器の揃った検査機関以外でもレジオネラ属菌の検査が可能になることは公衆浴場等の衛生管理の一助となる。パルサー法が有効に活用できるよう、今後の検討を図っていきたい。

参考文献

1) 森本洋：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
2) 佐々木麻里　他：斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査と比色系パルサー法感度向上のための検討．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）「公衆衛生等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 29 年度総括・分担研究報告書：71-77
3) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル（レジオネラ症）平成 23 年 10 月 7 日改訂,
4) Kozak et al. : Distribution of lag-1 alleles and equence-based types among Legionella pneumophila serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. J Clin Microbiol. 2009. 47(8) : 2525-2535

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 佐々木麻里、神田由子、後藤高志、成松浩志：あるレジオネラ症集団発生における積極的疫学調査、第 64 回大分県公衆衛生学会、2019 年 3 月、大分.

2. 研修会

1) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 30 年度環境監視員担当者会議、2018 年 4 月、大分.
2) 佐々木麻里：大分県のレジオネラ症とレジオネラ検査について、レジオネラ症防止対策講習会、2018 年 9 月、大分.
3) 佐々木麻里：加湿器を原因とした老人福祉施設でのレジオネラ症集団発生事例～検査について～、平成 30 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2019 年 2 月、東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig. 1　比色系パルサー法（出典：検査キット取扱説明書）

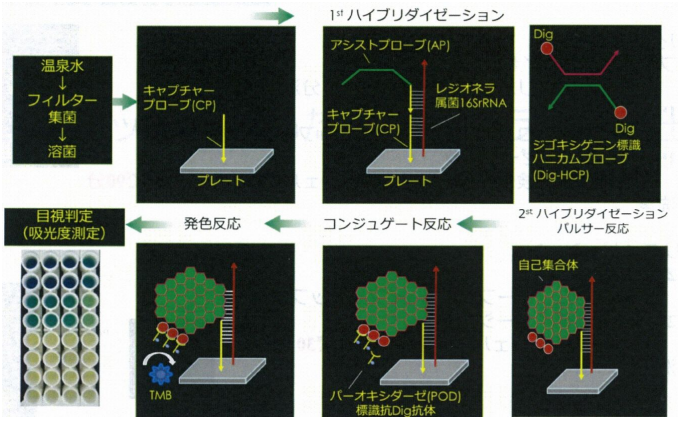


Table 1　培養法の結果

	採水箇所	検体数	検出数[a]	検出率
掛け流し式 非循環式	浴槽水	19	12	63%
	湯口水	19	8	42%
循環式	浴槽水	6	2	33%
	湯口水	4	2	50%
計		48	24	50%

[a] 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 2　浴槽水と湯口水の検出状況　（n=23）

		浴槽水		計
		＋	－	
湯口水	＋	9	1	10
	－	4	9	13
計		13	10	23

＋は 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 3　培養法の検出菌数別検体数（n=48）

菌数	検体数
5 未満	24
5－9	4
10－99	5
100－999	9
1000 以上	6
合計	48

Table 4　血清群別の陽性検体数（n=24）

血清群	検体数
SG1	3 (3)
SG2	4 (4)
SG3	10 (9)
SG4	8 (7)
SG5	5 (4)
SG6	7 (7)
SG7	2 (2)
SG13	1 (1)
SG15	1 (0)
SGUT	10 (9)

複数の血清群が同時に検出された検体あり

(　)内は斜光法で確認された検体数再掲

Table 5　浴場水における *lag-1* 検出状況

	lag-1 検出		SG1 検出		培養法検出		検査数	
	施設数	検体数	施設数	検体数	施設数	検体数	施設数	検体数
H24 年	0	0	6	8	23	29	29	47
H25 年*	0	0	0	0	7	10	9	17
H26 年	0	0	4	4	15	22	28	56
H27 年	0	0	5	6	15	25	25	50
H28 年	1	2	1	2	8	15	20	39
H29 年	0	0	7	10	12	20	25	49
H30 年	0	0	2	3	15	24	25	48

*血清群データのある検体のみ計上

培養法は 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 6　LAMP 法と培養法の比較　（n=48）

		LAMP		計
		＋	－	
培養法	＋	22	2	24
	－	8	16	24
計		30	18	48

培養法＋は 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 7　Chelex 抽出法と常用による LAMP 法結果（20 検体 60 テスト）

培養結果		Chelex 抽出法 LAMP	常法 LAMP
	検体数	陽性検体数	陽性検体数
菌数(/100mL)	テスト数	陽性テスト数	陽性テスト数
5cfu 未満	8	2	3
	24	6	5
5cfu	3	1	2
	9	1	4
50cfu 以上	9	8	8
	27	22	13
合計	20	11	13
	60	29	22

Table 8　パルサー法と培養法の比較
（大分衛研　n=48）

		パルサー		計
		＋	－	
培養法	＋	22	2	24
	－	15	9	24
計		37	11	48

培養法＋は 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 9　パルサー法と培養法の比較
（川崎市衛研　n=39）

		パルサー		計
		＋	－	
培養法	＋	0	4	4
	－	5	30	35
計		5	34	39

培養法＋は 10cfu/100mL 以上

Table 10　**保健所実施パルサー法結果**

№	採水年月	種類		泉質	培養結果 菌数(/100mL)	パルサー法 結果
1	2019 年 1 月	掛け流し	浴槽水	水道水	25cfu	陰性
2	2019 年 1 月	掛け流し	湯口水	水道水	15cfu	陰性
3	2019 年 1 月	掛け流し	浴槽水	水道水	85cfu	陰性
4	2019 年 1 月	掛け流し	湯口水	水道水	85cfu	陰性

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）
平成 30 年度（総括・分担）研究報告書
研究代表者：　前川　純子　国立感染症研究所　細菌第一部

公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発

研究分担者：　田栗　利紹　長崎県環境保健研究センター
研究協力者：　倉　　文明　国立感染症研究所　バイオセーフティ管理室
研究協力者：　蔡　　国喜　長崎県環境保健研究センター
研究協力者：　下田　貴宗　シモダアメニティ株式会社
研究協力者：　新道　欣也　株式会社　お風呂のシンドー

研究要旨

レジオネラ症対策として開発してきたレジオネラリスクの現地迅速評価法（RDM）とレジオネラニューモフィラ（LP）の特異検出法とを組み合わせて当該菌の生死スクリーニングを伴うオンサイト定量解析法として改良し、その有効性を評価した。現地調査において浴槽水 76 試料を RDM 法と培養法で処理し、本方法の培養法に対するスクリーニングとしての有効性を検証したところ、RDM 法の培養法に対する感度は 93.3%、特異度は 95.1%を示した。供試試料の LP 数の定量性については、RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し（$R^2 = 0.65$）、培養法の検出限界値（10 CFU/100mL）付近においてはやや高めの値を示したものの定性的には妥当な成績を示した。RDM 法は、5 分間の消毒効果判定と約 1 時間の LP 定量評価により、遊離塩素消毒下の入浴施設において現場でのレジオネラリスク監視の有用なツールとして利用可能であるといえる。

A. 研究目的

レジオネラニューモフィラ（LP）はレジオネラ症の主要な起因菌種であり、我国では特に入浴施設において大きな社会的影響を及ぼしている。LP を含むレジオネラ属菌によるアウトブレークが全国各地で発生して以降、浴槽水では塩素消毒による水質管理が普及してきたが、循環ろ過器式入浴施設に代表されるとおり、衛生管理に関わる諸問題のためにレジオネラ属菌汚染が再発を繰返して深刻な事態を引起している事例が少なくない。

我々は、これまでに浴槽水中レジオネラリスクの迅速評価法（RDM）を独自に開発してきた。最初に、ヒト HIV 診断用の携帯型フローサイトメーター（6.5 kg）を細菌測定に応用し、レジオネラ汚染が生じる浴槽水と清浄な浴槽水の細菌数を比較解析して両者を区別する一定の閾値を見出すことにより、非濃縮水を用いたレジオネラリスクの現地評価方法を開発した [1,2]。さらに濃縮水を用いて LP を特異染色することに成功し、現地における LP の定量法を作成した [3]。

今回、作成した LP 定量法により現地調査を実施した結果を報告する。

B. 研究方法

1. 現地調査

1) 高濃度塩素処理前後浴槽水の調査（第 1 回）

RDM 法は、レジオネラ属菌検査法のスクリーニング法として位置づけられ、その有効性検証にあたり、培養検査の検出限界（10 CFU/100mL）程度の浴槽水を検査する必要がある。その成績を満たす浴槽水を予測して採水することは困難な

ので、比較的厳格な塩素消毒を行っている入浴施設において、塩化物泉および井水を利用している3種の循環ろ過式浴槽を繰り返し調査した。当該施設の1日あたり利用者数は700人～1000人で毎日営業しており、一週間毎に高濃度塩素洗浄処理（20 mg/L×1時間）を行っている。この処理前後の浴槽から5週にわたって合計30検体のサンプルを採水した。

2) オゾン処理前後の浴槽水の調査（第2回）

異なる3施設5循環ろ過式浴槽から採水した浴槽水に発泡式オゾン処理（ナノバブル発生装置およびオゾン発生装置はシモダアメニティ株式会社製）を施し、処理前後および1回濯ぎ後（1浴槽のみ濯ぎ2回実施）の合計16検体の浴槽水を供試した。これらの施設は社会福祉施設であり、1日あたり50～100名の利用者を有し、原水として水道水を利用して塩素消毒を行い、7日に1回換水している。

3) その他の入浴施設の調査（第3回）

研究協力者が検査を委託された入浴施設において30種類の循環ろ過式浴槽水を冷蔵郵送により長崎県環境保健研究センターに搬入し調査した。採水後の検体は冷蔵保存して遅くとも1週間以内に試験に供した。本調査における浴槽水は循環ろ過式で塩素消毒を行っていることを除いて施設ごとの衛生管理状況のデータはない。

2. RDM法による浴槽水の処理方法

1) 非濃縮浴槽水を用いた塩素消毒効果の判定

供試した浴槽水は表1のとおり処理した。フローサイトメーターは miniPOC（シスメックスパルテック社）を使用し、最初に供試浴槽水における塩素消毒の効果を判定した。即ち、検体1 mLを5 mLチューブ（イナオプティカ）に分取し、0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)を含む希釈液1 mLと混合し、0.1%の蛍光色素 propidium Iodide (Wako chemicals) 10 μLを加えた後、miniPOC にセットして試験に供した。予め測定ノイズを除いた特定エリアを設定し、細菌細胞から得られる側方散乱光強度(SSC)と蛍光強度(FL)を2つの指標としてエリア内の細胞を計数し、装置独自の補正値を掛け合せて細菌数(Total Bacterial Counts)とした。この時、試料中の細菌数が後述の基準値1000 counts/mLを越した場合は「消毒効果なし」と判定して続くLP特異検査でLPが検出された場合は生菌と判断した。一方で、同値に満たない試料は「消毒効果有り」と判定し、LP が検出された場合でも死菌と判断した。

2) LPの特異的定量

昨年度の方法[3]に準拠して、LP 血清群1用染色試薬(FL lp SG1)とLP非血清群1染色試薬(FL non_lp SG1)を作製した。これらの試薬は抗 LP 抗体として約2 mg/mLを含む。検水1 Lを携帯用ろ過器でろ過した後、フィルターを剪刀にて細かく破断しながら50 mLプラスティック遠心管に入れた。これに1 mL PBSを加え、1分間ホモジナイズして濃縮懸濁液とした。RDM 計測に際して、各懸濁液を2本の5 mLサンプル管（イナオプティカ）に0.5 mLずつ分注し、等量の0.1% BSA（ミルテニーバイオテク社）入り PBS および0.75 μLのFL lp SG1 又はFL non-lp SG1を加えて常温で30分間染色したものをminiPOCにセットして計測した。特定エリア内の粒子数に装置独自の補正値を掛け合わせて RDM 値を算出し、その測定値を作成した検量線[3]により濃度換算してLP数とした。

3) 平板培養法によるレジオネラ属菌数の測定

レジオネラ属菌検査は当研究班の標準試験法に準拠した。即ち、培地はGVPCα培地（ビオメリュー）を使用し、100倍ろ過濃縮した検水を塗沫後35°Cで3～7日間培養し、システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。検出したレジオネラ属菌は定法により血清型別試験を行った。

C. 結果及び考察

1.現地調査の結果

1）表2に施設調査結果の概要を示した。RDM

法は前述のとおり最初に非濃縮検体を用いて消毒効果を判定し、検体を濃縮した後に LP 数を判定する 2 段階判定を行い、消毒効果を基に LP の生死を判別する。第 1 回目の調査で得られた培養陽性サンプルの最低 TBC 値（1260 counts/mL）に基づき、1000 counts/mL を消毒効果の暫定的な判定閾値として設定した（図 1）。この調査で RDM 法により LP SG1 が 21 回検出され（カットオフ: < 10 cells/100 mL）、その平均値は 10～146 cells/100 mL であった。このうち 5 回の細菌数は基準値以上を示したが、16 回は消毒効果が認められたために死菌と判定され、培養法も全て不検出であった（図 1）。LP 生菌と判定された 5 回のうち 3 回は、培養検査で 10 CFU/100 mL の LP SG1 が検出され、残る 2 回の細菌数は全て基準値以上を示したために、生菌と判定されたが、培養検査では不検出であった（表 2）。

このように本調査における 30 検体中 2 検体は偽陽性であったが、他の培養陽性検体のコロニー数が検出限界ぎりぎりの検体であったことから確率的な問題と思われる。少なくとも RDM 法において、培養検査で 10 CFU/100 mL を示した 3 浴槽水は全て生 LP 菌として定量できたために、感度のよい検査といえる。

2）第 2 回目の調査においては、培養検査でレジオネラ属菌を認めたのは 1 検体のみで、その菌数は 10 CFU/100 mL で LP SG5 と同定された。この時の RDM 値は非 SG1 の生 LP 菌として 112 細胞/100 mL を示した。他に RDM により 7 回 LP 非 SG1 が検出されたが、これらの塩素消毒は有効であったために全て死菌と判定され、培養法においても LP は不検出であった（表 2, 図 1）。

3）第 3 回目の調査においては、培養検査では 30 検体中 11 検体がレジオネラ属菌陽性を示し、その菌数は 10～23,000 CFU/100 mL であった。菌種は全て LP で、血清群は SG3、SG5、SG6、および SG untypable であった。このときの RDM 値は生きた非 SG1 の LP として 15～34,310 cells/100 mL と計測された。また、同時に RDM により LP SG1 が 2 回検出されたが（図 1: 65 回と 66 回）、そのときの培養検査では SG1 は検出されず、SG5 が多数検出されていた（ともに 10,000 CFU/100 mL 以上）ために FL lp SG1 の交差反応とも考えられるが、培養検査で分離できなかった可能性も否定できない。RDM により LP 非 SG1 が検出された 51 回、59 回、73 回および 74 回の 4 検体（図 1）は消毒効果が認められ全て死菌と判定されたが、培養検査でも LP は検出されておらず判定を支持する結果であった（表 2, 図 1）。RDM により死菌と判定されたが培養法でレジオネラが検出された 69 回（図 1）については次項で考察する。第 3 回目の調査施設における衛生管理状態が不明なために比較することは困難であるが、当回の LP 死菌の検出率が他 2 回と比べて明らかに少なかったことは興味深い（表 2）。

2. RDM 法のスクリーニング法としての妥当性

今回供試した 76 検体について、レジオネラ属菌の平板培養法に対する RDM 法のスクリーニングとしての妥当性を評価したところ（表 3）、その感度は 93.3%、特異度は 95.1%であった。培養法で陽性であった 15 例のうち 14 例は陽性と正しく判定され、1 例（図 1, 69 回）は偽陰性を示した。これは細菌数が 127 counts/mL と基準値より明らかに低くて消毒効果ありと判定されたにもかかわらずレジオネラが検出された例である。この時の RDM 法は非 SG1 の LP として 79 細胞/100 mL を示していたが、培養法が 10 CFU/100 mL で検出限界ぎりぎりであったことから確率的な問題と思われる。平板培養法で陰性であった 61 例のうち 58 例は陰性と正しく判定された。偽陽性であった 3 例の RDM による LP 数は非 SG1 として 54～246 cells/100mL であり死菌を検出した可能性もあるが、TBC が 10^3～10^4 counts/mL と高値を示したことを考慮すると培養法に原因があった可能性が示唆された。なお、これらの他に TBC が基準値を超えた 2 例が認められていたが、培養法でレジオネラが不検出であ

り、RDM による LP 数は SG1 も非 SG1 も不検出（< 10 cells /100 mL）であったため陰性と評価した。

3. RDM 法測定値の定量性

図 2 に培養法で検出されたレジオネラ属菌数と RDM 法による LP 数の相関を示した。全体的に RDM 法が培養法よりも高い値を示す傾向にあったものの、RDM 法は培養法と菌数において比較的高い相関を示した（R^2 = 0.65）。RDM 値による LP 数がレジオネラ属菌数よりも高い値を示す傾向が認められたが、その理由のひとつに、RDM 法が死菌を含む菌数であったことが考えられた。

E. 結論

LP 特異試薬を用いた RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し（R^2 = 0.65）、培養法の検出限界値（10 CFU/100mL）付近においても定性的に妥当な成績を示すことが施設調査において確認された。即ち、RDM 法は、遊離塩素消毒下において、レジオネラ属菌の生死スクリーニングに応用することができるとともに、SG1 型別判定を含めた LP の現場での定量ができるために、入浴施設現場におけるレジオネラリスク監視の有用なツールとして利用可能であるといえる。

F. 参考文献

1) Taguri, T, Oda, Y, Sugiyama, K, Nishikawa, T, Endo, T, Izumiyama, S, Yamazaki, M, and Kura, F. A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of *Legionella* in bath water. *Journal of Microbiological Methods*, **86**, 25–32, 2011.

2) 田栗 利紹ら, フローサイトメトリー法における不連続点を超えた塩素消毒の清浄化判定, 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）「公衆浴場等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 23 年度分担研究報告書, 研究代表者：倉文明, 53-58, 2011.

3) 田栗 利紹ら, レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発～携帯型フローサイトメーター用蛍光試薬の特異性の検討, 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）「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 29 年度分担研究報告書, 研究代表者：前川純子, 87-93, 2018.

G. 学会発表

Taguri, T, Cai, G, Ebisu-Ojima, H, Kura, F and Amemura-Maekawa, J, On-site inspection method for *Legionella pneumophila* in bath water, The 5th meeting for ESGLI, Lyon, France, August 30th, 2018.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1　RDM法の作業工程

工程	ステップ	対象物	操作方法	目的	操作時間（分）
1	細菌計数	非濃縮水試料	等量の希釈液とサンプルとを混合して核酸染色液を加えてシリンジに吸引後、装置にセットして計測	消毒効果判定	5
2	濃縮	非濃縮水試料	携帯型ろ過器を用いて1000 mLを1 mLに濃縮	水試料の1000倍濃縮	～30
3	菌の懸濁	濃縮試料	フィルターを剪刀で破砕して混釈	フィルターからの菌分離と混釈	2
4	染色	濃縮試料	懸濁液を2本の5mLサンプル管に0.5 mLずつ分注して、等量のBSA入りPBSを加えて、FL lp SG1 又はFL non-lp SG1により染色	特異染色	30
5	レジオネラ計数	濃縮試料	シリンジに吸引後、装置にセットして計測	レジオネラ菌計数	5

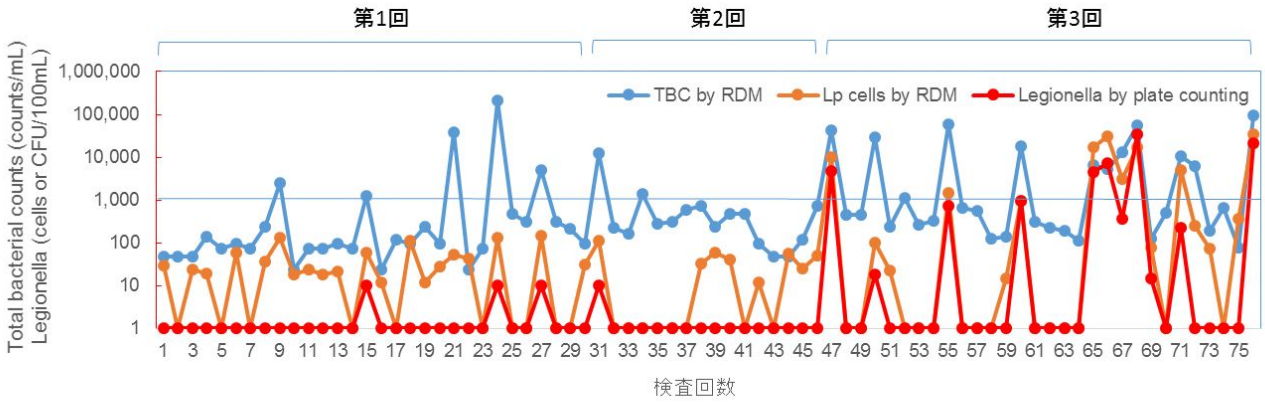


図1．施設調査におけるRDM法閾値と測定値ならびにレジオネラ生菌数の比較

※青線はRDM法における閾値(TBCとして1000 counts/mL)を表す．LP cellsのカットオフ値は10 cells/100mL.

表2　施設調査結果の概要

調査	検体数/浴槽数	培養法				RDM法				
		SG1陽性検体数	非SG1陽性検体数	陰性検体数（<10 CFU/100mL）	定量値の範囲（CFU/100mL）（検出された血清群）	SG1陽性検体数（生菌）	非SG1陽性検体数（生菌）	陰性検体数（<10 cells/100mL）	定量値の範囲（cells/100mL）	
									FL lp SG1	FL non-lp SG1
第1回	30/3	3	0	27	10（SG1）	21 (5)	0	9	10～146	-
第2回	16/5	0	1	15	10（SG5）	0	8 (1)	8	-	10～112
第3回	30/30	0	11	19	10～23,000（SG3, SG5, SG6, SGUT）	2	16 (12)	14	380～570	15～34,310

表3　レジオネラ属菌培養法とRDM法との定性結果の比較（n =76）

		平板培養法(CFU/100ml)		
		≧10	＜10	
Rapid Detection Method (cells/100mL)	≧10	14※	3	17
	＜10	1	58※※	59
		15	61	76
感度	93.3%	特異度	95.1%	

※うち3検体はSG1, ※※うち27検体はLP死菌と判定

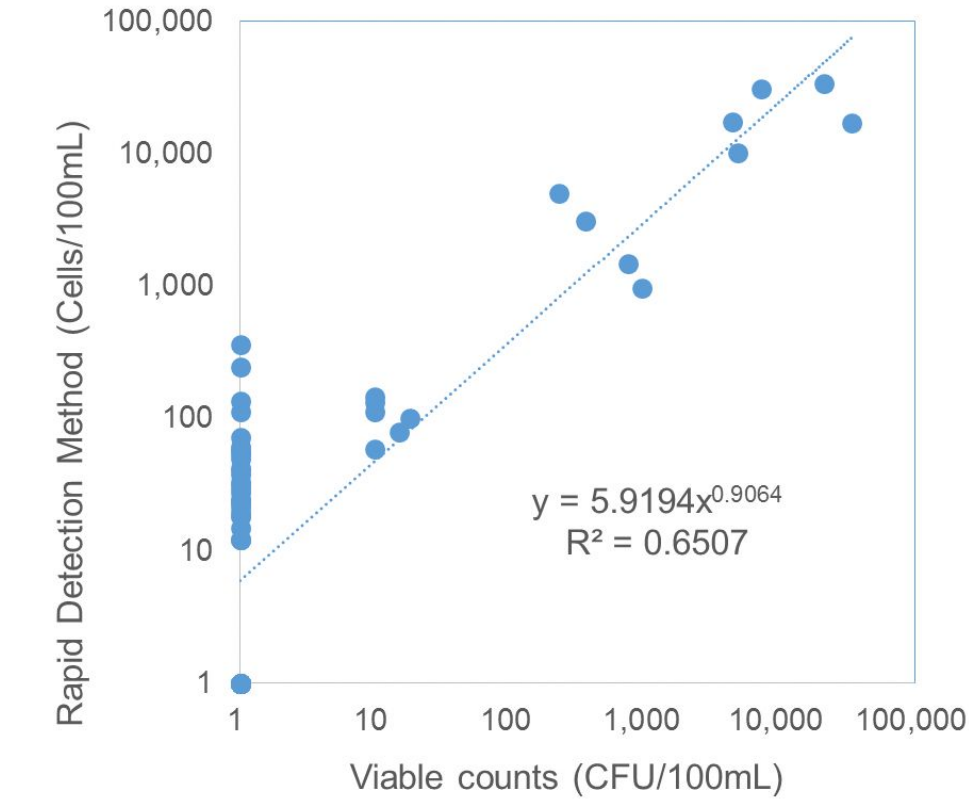


図2.　培養法とRDM法のレジオネラ菌数の相関

※RDMは10 cells/100mL未満を不検出．両方法ともに不検出は1 cells or CFU/100 mLで表示した．

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）

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

平成 30 年度分担研究報告書

MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴

研究代表者　前川純子　　国立感染症研究所　細菌第一部
研究分担者　中西典子　　神戸市環境保健研究所　感染症部
研究協力者　田中忍　　神戸市環境保健研究所　感染症部
研究協力者　野本竜平　　神戸市環境保健研究所　感染症部
研究協力者　米澤武志　　神戸市環境保健研究所　感染症部
研究協力者　水本嗣郎　　静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨：MLVA 法は、その特性として、安定性・迅速性・比較の容易性から、利便性の高い分子タイピング法となっている。*L. pneumophila* においても MLVA 法を適用し、従来の遺伝子型別法である SBT（Sequence based typing）法やパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）との比較を行うことで、MLVA 法の菌株識別能力を評価し、感染源特定のための迅速な遺伝子型別法としての有用性を検討した。

L. pneumophila 血清群 1 の菌株コレクション 124 株を追加し、昨年度分と合わせ計 439 株（臨床分離株 256 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 49 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 25 株、土壌由来 36 株）の MLVA 型を決定した。さらに、血清群 1 以外の *L. pneumophila* 血清群 2-15 の菌株 187 株の MLVA 型も同様に決定した。その結果、MLVA の分解能は、SBT 法と比較して同等の値を示し、SBT のタイピングと概ね相関することを見出した。

また、過去の集団事例 7 事例について、MLVA を適用し、PFGE および SBT との比較を行ったところ、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関していた。以上の結果から、簡便な MLVA タイピングは、感染源の推定のための遺伝子型別の迅速なタイピング方法として期待できると考えられた。

A. 研究目的

感染源の特定には、レジオネラ症患者からの分離株と感染源と推定される環境分離株の遺伝子型を比較し、遺伝子型の一致を確認する必要がある。その際に用いられる方法として主流になっているのが、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）や世界的に普及している SBT（Sequence based typing）法である。SBT法は、7つの遺伝子（*flaA, pliE, asd, mip, mompS, proA, neuA*）のシークエンスを行い、その塩基配列により型別を行う手法である。

しかしながら、これら従来法は、多検体処理の煩雑さ、時間、予算を要することが課題となっていた。そこで、他の細菌の遺伝子型別解析にも利用されているMLVAを*L. pneumophila*において導入することで、それらの課題を克服できることが期待される。今年度は、引き続き*L. pneumophila*血清群1の菌株コレクションから解析サンプル数を追加し、解析した全菌株数におけるMLVA法の分解能の評価を行った。さらに、血清群1以外の血清型の*L. pneumophila*においても同様にMLVA型を決定した。また、過去の集団事例についても事例数を増やし、集団事例のMLVA型を決定し、タイピングとしての有用性について検討を行った。

B. 研究方法

①菌株：

（1）*L. pneumophila* 血清群(SG)1 の菌株コレクション

今年度は、*L. pneumophila* SG1 の菌株コレクションの 124 株を追加した。昨年度分と合わせ、164 種類の ST （sequence type）が決定している計 439 株（臨床分離株 256 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 49 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 25 株、土壌由来 36 株）を用いて解析した。（表 1）。

（2） SG1 以外の他の血清型の *L. pneumophila*

119 種類の ST が決定している血清群 1 以外の *L. pneumophila* 187 株を用いた（表 2）。内訳は、SG2(14 株)、SG3(30 株)、SG4(12 株)、SG5(21 株)、SG6(27 株)、SG7(10 株)、SG8(13 株)、SG9(18 株)、SG10(16 株)、SG11(3 株)、SG12(5 株)、SG13(12 株)、SG14(3 株)、SG15(2 株)、SGUT(1 株)を用いた。分離由来別には、臨床分離株(P)68 株、浴槽水由来(B)64 株、冷却塔水由来(C)31 株、土壌由来(SO)22 株、給湯水由来(K)2 株となる。

（3）過去の集団事例

過去の集団事例 A~F の 6 事例を用いた。事例毎の菌株は、表 3 の通りである。

②MLVA： Sobral ら [1] によって報告された 12 領域（Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31, Lpms33, Lpms34, Lpms35, Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44）を用いた。蛍光標識したプライマーを用いて、4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR-A（Lpms01, Lpms31, Lpms33, Lpms35 ）, PCR-B （ Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms34 ）, PCR-C （Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44）とした。PCR 反応は、QIAGEN Multiplex を用いた。PCR 条件は、95℃15 分後に 95℃30 秒、60℃1 分、72℃70 秒を 35 サイクル行った。50 倍希釈した PCR 産物 1μl をサイズマーカー0.25μl（GeneScan 1200 LIZ Size Standard （PCR-A と PCR-B）, GeneScan 600 LIZ Size Standard （PCR-C）と Hi-Di Formamide（ABI）10μl に混合し、95℃で 3 分加熱後、氷中条件で 2 分間急冷した。その後、AB3500 Genetic

Analyzer にてフラグメント解析を行った。得られたデータは GeneMapper Ver. 4（Applied Biosystems）を用いて、フラグメントサイズおよびリピート数を測定した。得られた MLVA 型による株間の類縁関係を明らかにするために、BioNumerics Ver7.6 を用いて、Minimum spanning tree（MST）を作成した。MLVA の分解能評価には、HGDI（Hunter-Gaston Discrimination Index）を算出した[2]。また、各 MLVA 領域の多様性評価には、PIC（polymorphic information content）を算出した[3) 4)]。

C. 研究結果

① *L. pneumophila* SG1 の菌株コレクションの MLVA 型

164 種類の ST（sequence type）を含む計 439 株は、233 種類の MLVA 型に分類された。439 株の MLVA 型の株間の類似性を Minimum spanning tree（図 1）で示した。MLVA タイピングにおける樹形は、SBT 法による ST とある程度相関した樹形となった（図 1）。同一 ST において、MLVA 型が細分化される例も見られた一方で、異なる ST が同一 MLVA 型を示した例も存在した（図 1 矢印）。

さらに、439 株における SBT 法と MLVA 法の分解能（HGDI）を比較したところ、それぞれ 0.9599、0.9717 となり、ほぼ同等の値を示した。また、各 MLVA 領域のおける PIC 値は、Sobral ら[1)] の報告とほぼ同等の値を示した（表 4）。

②SG1 以外の *L. pneumophila* の MLVA

119 種類の ST (sequence type)を含む計 187 株は、131 種類の MLVA 型に分類された。同一 ST 株は MLVA 型も 1、2 ローカス違いとなった（表 5）。しかしながら、3 つ以上の遺伝子が異なる ST68、ST114、ST537 において、MLVA 型が一致した（表 5）。ST によっては、現行の 12 VNTR 領域では菌株が識別できないことを示唆する結果となった（表 5）。

187 株における MLVA の分解能（HGDI）は、0.9898 となり、SBT 法と同等の値を示した（表 4）。

③過去の集団事例

集団事例 6 事例について、MLVA 型を決定し、PFGE および SBT 型別との比較を行った（表 3）。事例 A、事例 E、事例 F について、株間の類似性を Minimum spanning tree（図 2）で示した。事例 A では、患者株と同一の ST および PFGE パターンを示した浴槽水由来株および拭き取り由来株は MLVA 型も同一であった（図 2a）。事例 B, C, D も同様の結果であった。事例 E は、患者由来株が ST23 と ST679 の二種類に分かれ、MLVA 型も異なっていた。また、感染源とされる浴槽水由来株およびシャワー水も ST23 および ST679 の二種類が分離されており、MLVA 型も ST23 と ST679 を示す株にそれぞれ分かれた（図 2b）。事例 F では、患者由来株は ST2114 と ST2113 であり、MLVA 型は 1 ローカス違いで存在し、clonal complex を形成した。ST2114、ST2113 の

浴槽水由来株および拭き取り由来株も clonal complex に存在した。ST2114、ST2113 以外の拭き取り由来株は clonal complex の外側に存在していた（図 2c）。

④MLVA の汎用性の評価

4 自治体に当所で作製している MLVA プロトコルを提供した。また、1 つの自治体は、5 月に研修を実施し、MLVA の汎用性の評価を行った。その結果、他の自治体においても、MLVA 型が PFGE と SBT タイピングと概ね相関する結果が得られた。

D. 考察

国際的に普及しているタイピング法である SBT と MLVA の比較において、類似性の高い ST の菌株は、MLVA 型における MST 解析でも近隣に存在していることから、ST と MLVA 型がある程度相関していると考えられる。しかしながら、同一 ST でも MLVA 型が 3 ローカス以上異なる例、3 つ以上遺伝子の異なる ST で MLVA 型が一致する例、SG1 と他の SG の MLVA 型が一致した例など少数見出されており、遺伝子型別の手法間の相違点が示された。今後は、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れることにより、SBT と MLVA のタイピングの妥当性評価と、より最適な VNTR 領域の検討も必要になることが考えられる。

その一方で、MLVA 法は SBT 法と同等の識別能力があることが示唆された。また、過去の集団事例から、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関しており、MLVA タイピングが感染源特定のためのスクリーニングとして迅速なタイピング方法としての有用性を示唆している。また、施設の衛生管理の際には、菌株の定着性を調べるための評価にも有用であると考える。

また、他の自治体において、MLVA の有用性を評価することができた点は、今後の MLVA の汎用性につながると考えている。その一方で、他の自治体間での比較の際に、フラグメントの大きさがずれる点や MLVA 領域によってリピート数換算の際に判断に迷う点等いくつかの課題も見出された。汎用性の高いタイピングとして MLVA を確立していくためには、見出された課題についても今後検討していく必要がある。

E. 結論

MLVA タイピングは従来法の SBT タイピングや PFGE と相関があり、分解能は SBT タイピングと同等の値を示したことから、感染源の推定の菌株の迅速なタイピング方法として期待できると考えられた。

謝辞

今回解析した分離株を分与くださった内田順子（香川県環境保健研究センター）、川上慶子（石川県保健環境センター）、磯部順子・金谷潤一（富山県衛生研究所）、岩渕香織（岩手県環境保健研究センター）、奥野ルミ（東京都健康安全研究センター）、

笠原ひとみ（長野県環境保全研究所）、勝川千尋（大阪府立公衆衛生研究所）、佐々木麻里（大分県衛生環境研究センター）、田村有美（相模原市衛生試験所）、冨田望（福島県衛生研究所）、山本一成（新潟市衛生環境研究所）、菊地孝司・小堀すみえ（さいたま市健康科学研究センター）、金子紀子（山形県衛生研究所）、金澤祐子（和歌山市衛生研究所）、黒澤肇（群馬県衛生環境研究所）、小笠原準（大阪市立環境科学研究所）、上田ひろみ（長野県環境保全研究所）、清水寧（北九州市環境科学研究所）、田中忍（神戸市環境保健研究所）、鈴木匡弘（愛知県衛生研究所）、清水麻衣（京都市衛生環境研究所）、中嶋 洋（岡山県環境保健センター）、野田万希子（岐阜県保健環境研究所）、福司山郁恵（熊本県保健環境科学研究所）、細谷美佳子（新潟県保健環境科学研究所）、吉田英弘・松永典久（福岡市保健環境研究所）、宮下安子（川崎市健康安全研究所）、山口友美（宮城県保健環境センター）、河野喜美子・吉野修司（宮崎県衛生環境研究所）、渡辺祐子（神奈川県衛生研究所）、田栗利紹（長崎県環境保健研究センター）、林千尋（尼崎市立衛生研究所）、佐々木林子・江川武（文京保健所）、井上浩章（アクアス筑波総合研究所）、藤田直久（京都府立医科大学附属病院）、伏脇猛司（（財）結核予防会大阪府支部大阪病院）、古畑勝則（麻布大学）、鈴木敦子（（財）東京都予防医学協会）、高瀬佳彦（荒川区保健所）、川口定男（板橋区保健所）（敬称略）の諸氏に感謝いたします。

F. 参考文献

1) Sobral D, Le Cann P, Gerard A, Jarraud S, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C. 2011. High-throughput typing method to identify a non-outbreak-involved *Legionella pneumophila* strain colonizing the entire water supply system in the town of Rennes, France. Appl Environ Microbiol. 77:6899-6907.

2) Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microb. 26, 2465–2466.

3) Keim, P., Price, L.B., Klevtska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E., 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relations within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 182, 2928-2936.

4) Iwamoto, T., Yoshida, S., Suzuki, K., Tomita, M., Fujiyama, R., Tanaka, N., Kawakami, Y., Ito, M., 2007. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing

family. FEMS Microbiol Lett. 270, 67-74.

G. 研究発表

1. 学会発表

1) **中西典子、野本竜平、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：冷却塔に定着する *Legionella pneumophila* のゲノム分子疫学. 第13回日本ゲノム微生物学会. 平成31年3月、東京.**

2. 論文発表

1) **温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証. 神戸市環境保健研究所報** 46; 39-42, 2018.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. *L. pneumohila* SG1 439株のSequence type (ST)

Sequence type (ST)	No. of isolates	Sequence type (ST)	No. of isolates
ST1	77	ST905	3
ST23	23	ST954	3
ST48	15	ST2	2
ST120	15	ST52	2
ST89	13	ST86	2
ST739	11	ST122	2
ST42	10	ST127	2
ST138	9	ST154	2
ST507	9	ST211	2
ST22	8	ST256	2
ST505	8	ST278	2
ST384	6	ST445	2
ST550	6	ST493	2
ST59	5	ST553	2
ST353	5	ST593	2
ST502	5	ST599	2
ST876	5	ST604	2
ST129	4	ST644	2
ST132	4	ST763	2
ST142	4	ST788	2
ST566	4	ST973	2
ST609	4	ST977	2
ST679	4	ST1027	2
ST687	4	ST1186	2
ST701	4	ST1187	2
ST1346	4	ST2061	2
ST352	3	ST2128	2
ST448	3		
ST642	3	other STs	108

表2. SG1以外の*L. pneumohila* 187株のSequence type (ST)

Sero groups	No. of isolates	ST (No. of isolates)
SG2	14	ST354 (7), ST1354 (4), ST39(3)
SG3	30	ST93 (10), ST508(3), ST506(2), ST710(2), ST87 (1), ST305(1), ST392(1), ST430(1), ST465(1), ST995(1), ST1080(1), ST1712(1), ST2343(1), ST2394(1), ST2623(1), ST2650(1), ST2675(1)
SG4	12	ST1966(2), ST145 (1), ST246(1), ST392(1), ST643(1), ST1975(1), ST2586(1), ST2633(1), ST2649(1), ST2654(1), ST2671(1)
SG5	21	ST1032(3), ST1427(3), ST1413(2), ST114(1), ST313(1), ST1146(1), ST1424(1), ST1531(1), ST1628(1), ST1631(1), ST1632(1), ST1975(1), ST2397(1), ST2494(1), ST2651(1), ST2656(1)
SG6	27	ST114(4), ST537(4), ST68(3), ST242(2), ST1143(2), ST1945(2), ST64(1), ST1049(1), ST1341(1), ST1616(1), ST1992(1), ST2580(1), ST2661(1), ST2662(1), ST2665(1), ST2667(1)
SG7	10	ST1422(3), ST2626(3), ST1720(1), ST2641(1), ST2663(1), ST-(1)*
SG8	13	ST2617(4), ST2664(3), ST1376(2), ST1324(1), ST1866(1), ST2609(1), ST2629(1)
SG9	18	ST390(3), ST1808(2), ST73(1), ST484(1), ST512(1), ST768(1), ST1097(1), ST1136(1), ST1283(1), ST1817(1), ST2094(1), ST2415(1), ST2616(1), ST2666(1), ST2674(1)
SG10	16	ST1288(1), ST1409(2), ST1425(1), ST1426(1), ST1427(2), ST1516(1), ST2004(1), ST2618(1), ST2622(1), ST2624(1), ST2625(1), ST2668(1), ST2672(1), ST2673(1)
SG11	3	ST-(3)*
SG12	5	ST68 (3), ST461 (1), ST863(1)
SG13	12	ST2256(9), ST1826 (1), ST2113 (1), ST2603(1)
SG14	3	ST1374 (1), ST1638 (1), ST1873(1)
SG15	2	ST392 (1), ST1996 (1)
UT	1	ST1136 (1)

＊ST-: *neuA(h)*が増幅できず、ST番号が付与されなかった株

表3. 過去の集団事例A～FにおけるSBT, PFGE, MLVAの比較

事例	ID	Patient (P) Bath (B) shower (SH) 拭き取り(BS) ヘアーキャッチャー等(O)	SBT	MLVA type											PFGE
				Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39	Lpms44	
事例A	NIIB0281	B	23	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0282	B	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0284	BS	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0286	B	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0288	B	unknown	17	8	3	1	1	9	5	8	4	0	6	9	unknown
	NIIB0290	B	unknown	14	9.5	18	2	2	0	0	8	4	3	10	9	unknown
	NIIB0291	BS	unknown	15	8	13	1	1	11	4	8	4	3	0	9	unknown
	NIIB0292	P	23	13.5	0	27	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0293	P	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
事例B	NIIB0299	P	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
	NIIB0300	P	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
	NIIB0301	P	2	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
	NIIB0302	B	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	21	9	NIIB0299型
	NIIB0303	B	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
事例C	NIIB0374	P	23	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0375	P	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0376	P	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0377	P	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0378	B	unknown	13.5	8	25	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0379	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0380	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0381	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0382	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB2427	O	unknown	14	9	17	3	4	11	4	8	4	3	10	9	NIIB2427型
	NIIB2428	B	unknown	20	8	16	4	1	11	4	7	5	0	12	9	NIIB2428型
	NIIB2429	B	unknown	20	7.5	16	4	1	11	4	7	5	0	12	9	NIIB2428型類似
	NIIB2430	F	unknown	20	7.5	16	4	1	11	4	7	5	0	12	9	NIIB2428型類似
事例D	NIIB0390	P	1531	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	3	8	9	NIIB0390型
	NIIB0392	B	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	0	8	0	NIIB0390型
	NIIB0393	B	unknown	17	8	3	1	1	12	4	8	4	3	6	9	NIIB0393型
	NIIB0394	B	unknown	17	8	3	1	1	10	4	8	4	0	6	9	NIIB0394型
	NIIB0395	B	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	0	8	0	NIIB0390型
	NIIB0398	B	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	3	8	9	NIIB0390型
	NIIB0401	B	unknown	17	8	3	1	1	12	4	8	4	3	6	9	NIIB0393型
	NIIB0402	O	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	0	8	0	NIIB0390型
事例E	NIIB3385	SH	679	16.5	8	18	4	3	12	0	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3386	SH	23	13.5	0	18	4	0	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386**型**
	NIIB3387	B	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3388	B	23	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386**型**
	NIIB3389	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3390	P	23	13.5	0	18	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386**型**
	NIIB3391	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3392	P	23	13.5	0	18	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386**型**
	NIIB3393	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3394	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3395	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3396	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
事例F	NIIB3424	P	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3425	P	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3425型
	NIIB3426	B	2121	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3427	B	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3428	B	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	unknown
	NIIB3429	P	2113	14	9	24	2	3	8	4	8	4	0	0	9	NIIB3425型
	NIIB3430	B	2113	14	9	24	2	3	8	4	8	4	0	0	9	NIIB3425型
	NIIB3431	P	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3425型
	NIIB3432	P	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3434	BS	1447	14	9.5	24	2	2	9	4	8	4	19	0	9	NIIB3434型
	NIIB3435	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3436	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3437	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3438	BS	2113	14	9	24	2	3	8	4	8	4	0	0	9	NIIB3425型
	NIIB3439	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	12	9	NIIB3424型
	NIIB3440	BS	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3425**型**
	NIIB3441	BS	2115	15	8	13	4	1	12	4	8	4	0	6	9	NIIB3441型
	NIIB3442	BS	2115	25	8	13	4	1	12	4	8	4	0	6	9	NIIB3441**型**

（注）各事例毎におけるMLVA一致および1ローカス違い（太字）をハイライトで示した。

表4. MLVA-12のHGDIと各VNTR領域の pymorphic information content (PIC)

VNTR(s)	PIC			
	Sobral et al.	This study		
	SG1 (n=320)	SG1 (n=439)	SG2-SG15 (n=187)	all (n=626)
Lpms01	0.6501	0.6913	0.6323	0.6777
Lpms03	0.5054	0.5219	0.4901	0.5421
Lpms13	0.7790	0.8409	0.8401	0.8467
Lpms19	0.2936	0.2869	0.4628	0.3449
Lpms31	0.8563	0.8836	0.8517	0.8943
Lpms33	0.7020	0.6453	0.7714	0.7183
Lpms34	0.6649	0.6772	0.6557	0.6863
Lpms35	0.8815	0.9083	0.8744	0.9196
Lpms38	0.2710	0.4450	0.4760	0.5484
Lpms39	0.8301	0.7885	0.8350	0.8344
Lpms40	0.5054	0.5221	0.3601	0.5222
Lpms44	0.5391	0.4119	0.3327	0.3944
HGDI of MLVA-12	0.9534	0.9717	0.9898	0.9843
HGDI of SBT		0.9599	0.9887	0.9792

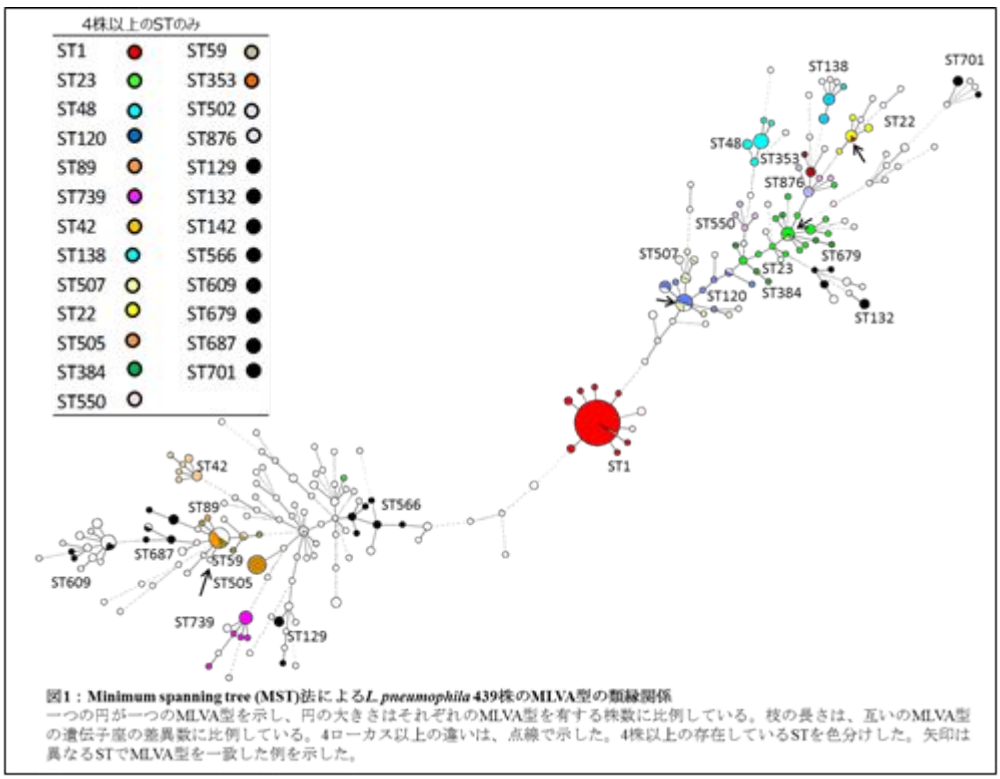


図1：Minimum spanning tree (MST)法による*L. pneumophila* 439株のMLVA型の類縁関係
一つの円が一つのMLVA型を示し、円の大きさはそれぞれのMLVA型を有する株数に比例している。枝の長さは、互いのMLVA型の遺伝子座の差異数に比例している。4ローカス以上の違いは、点線で示した。4株以上の存在しているSTを色分けした。矢印は異なるSTでMLVA型を一致した例を示した。

表5. SG1以外の*L. pnuemophila*における4株以上ある同一STによるMLVA型

菌株No.	serogroup	ST	Source*	MLVA型											
				Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39	Lpms44
NIIB2503	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2504	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2505	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2609	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2637	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2757	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2776	3	93	P	17	8	3	1	1	10	4	8	4	3	6	9
NIIB2914	3	93	P	17	8	5	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB3069	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	0	6	9
NIIB3859	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	0	6	9
NIIB0834	13	2256	C	7	7	10	2	1	11	4	7.5	4	0	7	7
NIIB1358	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1371	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1507	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	5	0	7	7
NIIB1620	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1656	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1820	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1929	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1534	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	4	3	7	7
NIIB2464	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB2495	2	354	P	16	7	3	3	2	8	4	8	4	3	6	9
NIIB2758	2	354	P	16	7	3	3	2	9	4	7	4	3	6	9
NIIB3017	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB3475	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB3654	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB3826	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB2791	6	68	P	0	8	5	1	1	18	4	8	4	3	6	9
NIIB2865	12	68	P	17	8	5	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1349	6	68	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1759	6	68	C	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2843	12	68	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2844	12	68	B	17	8	3	2	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2552	6	114	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB0815	6	114	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1786	6	114	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1794	6	114	C	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2046	5	114	C	17	8	3	1	1	11	4	8	4	0	6	9
NIIB2137	5	1427	P	17	7	3	1	1	10	4	8	4	0	6	9
NIIB2299	5	1427	P	17	7	3	1	1	10	5	8	4	3	6	9
NIIB2915	10	1427	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	0	6	9
NIIB2961	5	1427	P	17	8	3	1	1	10	4	8	4	0	6	9
NIIB1283	10	1427	B	17	7	3	1	1	11	4	8	4	0	6	9
NIIB2487	6	537	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2634	6	537	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2868	6	537	P	17	8	5	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB0864	6	537	B	17	8	3	1	1	9	4	8	4	3	6	9
NIIB0811	8	2617	B	17.5	7	18	4	3	8	4	7	5	0	22	7
NIIB0948	8	2617	B	17.5	8	17	4	3	10	4	7	5	0	29	9
NIIB1446	8	2617	B	17.5	7	18	4	3	10	4	7	5	0	22	7
NIIB2341	8	2617	SO	17.5	8	17	4	3	10	4	7	5	0	29	9

*P：患者、B：浴槽水、C：冷却塔水、SO：土壌

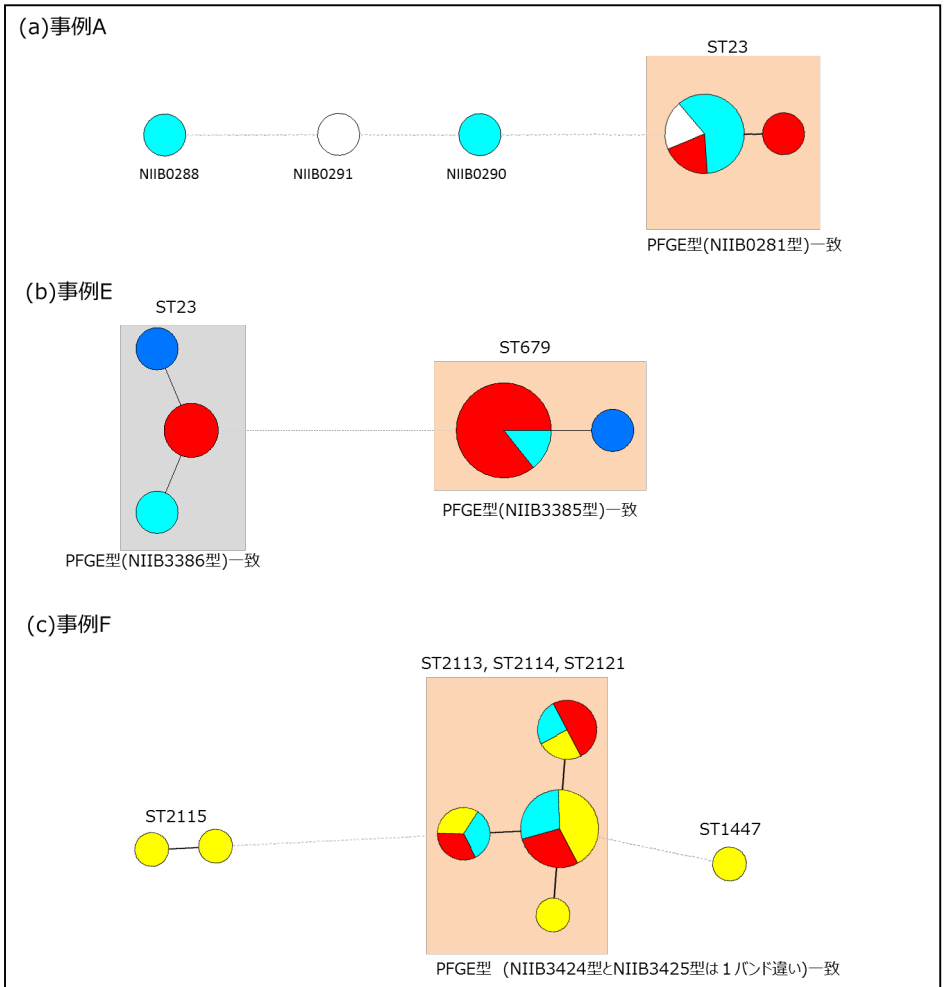


図2：過去の集団事例におけるMLVA、SBT、PFGEの比較
(a)事例AにおけるMLVA型に基づくMSTを描いた。患者由来株(n=2)が赤色、浴槽水由来(n=5)が水色、浴槽水の拭き取り(n=2)を白色で示した。
(b)事例EにおけるMLVA型に基づくMSTを描いた。患者由来株(n=8)が赤色、浴槽水由来(n=52が水色、シャワー水 (n=2)を青色で示した。
(c)事例FにおけるMLVA型に基づくMSTを描いた。患者由来株(n=5)が赤色、浴槽水由来(n=4)が水色、浴槽水の拭き取り(n=9)を黄色で示した。
一つの円が一つのMLVA型を示し、円の大きさはそれぞれのMLVA型を有する株数に比例している。枝の長さは、互いのMLVA型の遺伝子座の差異数に比例している。4ローカス以上の違いは、点線で示した。

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）
公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究
研究代表者　前川　純子　国立感染症研究所　細菌第一部　主任研究官

分担研究報告書
感染源解明のための環境調査

研究分担者　磯部　順子　富山県衛生研究所
研究協力者　金谷　潤一　富山県衛生研究所

研究要旨　本研究では，浴槽水，シャワー水およびカラン水における *Legionella* 属菌の汚染状況調査と，感染源となり得る環境検体周辺の空気中の *Legionella* 属菌の棲息状況について，平板培養法で調査した．また，患者検体から最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群 1（以下 *Lp*1）を環境検体から効率よく検出するため，*Lp*1 抗血清で感作した免疫磁気ビーズ（*Lp*1-IMB）を用いて選択的に濃縮する方法について検討した．

Legionella 属菌が検出されたのは，浴槽水で 10/49 検体（20.4%），シャワー水で 4/28 検体（14.3%），カラン水で 5/15 検体（33.3%）であった．エアロゾルの調査については，46 検体について検査した結果，いずれの検体からも *Legionella* 属菌は分離されなかった．

*Lp*1-IMB 法において，*Lp*1 は浴槽水 3/49（6.1%）検体，シャワー水では 1/28（3.6%）検体，また，カラン水 1/15（6.7%）検体から分離された．検体の種類による *Lp*1 の検出率に差は認められなかった．また，qPCR 法による sg-1 特異的遺伝子は，全体で 19/92 検体（20.6%）から検出された．その内訳は，浴用水 15/49 検体（30.6%），シャワー水 2/28 検体（7.1%），およびカラン水 2/15（13.3%）で，浴用水での検出率が高かった．*Lp*1 について着目すると，通常培養法，*Lp*1-IMB 法，および sg1-qPCR 法の 3 法いずれにおいても *Lp*1 が検出されたのは，浴用水，シャワー水それぞれ 1 検体のみであった．濾過濃縮（100 倍）を 5 倍希釈した検体（20 倍濃縮液）を用いた *Lp*1-IMB 濃縮法による *Lp*1 の検出結果では，100 倍濃縮液で 2/8（25.0%），20 倍濃縮液では 5/8（62.5%）と，20 倍濃縮液で検出率が高かった．

一方，濃縮検体を用いない検査法である「Legiolert」で *Lp* 陽性となったのは 100ml 検体で供試した場合 3/29（10.3%）検体，10ml 検体で供試した場合 8/63（12.7%）検体であった．

以上の結果から，感染源となり得る環境（エアロゾル）検体から *Legionella* 属菌を分離することができなかったが，ヒトへの感染経路の一端を解明することが必要であると思われる．*Lp*1-IMB 法については，*Lp*1 の選択的濃縮に有用であることが示された．sg1‐qPCR 法と組み合わせることで，感染源調査に有用となると思われた．

A．研究目的

レジオネラ症は，感染症発生動向調査によると，2018 年の全国での届出数が未確定ながら 2,130 件と，統計を取り始めた 2000 年から 19 年間でもっとも多かった [1]．富山県においてもレジオネラ症の届出は全国と同様な状況となっているが，加えて，レジオネラ症罹患率（対人口 10 万人）は全国の中でもっとも高く [1]，散発事例での感染源は特定されることは極めて少ないという状況が続いている．

そこで，レジオネラ症の発生予防を目的とし，感染源を明らかにするため，富山県の公衆浴場の浴槽水，シャワー水およびカラン水の *Legionella* 属菌の棲息状況を調査した．また，これまでの調査で *Legionella* 属菌が検出された環境検体について，ヒトへの感染様式を明らかにするため，検体採取近辺で空気中に浮遊する *Legionella* 属菌を調査した．一方，感染源特定のために必要となる感染源疑いの環境検体から，患者検体で最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群 1（以下 *Lp*1）を効率よく検出するため，*Lp*1 で感作した免疫磁気ビーズ（*Lp*1-IMB）を用いて選択的濃縮法による *Lp*1 の分離について検討した．

B．研究方法

1．感染源調査（浴槽水，シャワー水およびカラン水）

①検体

調査対象は，公衆浴場の浴槽水，シャワー水およびカラン水とした．浴槽水，シャワー水およびカラン水については，対象施設の選定と採水を厚生センター職員に依頼した．

②調査期間と試料

浴槽水，シャワー水およびカラン水の試料は，それぞれ 49，28 および 15 検体，計 92 検体である．シャワー水およびカラン水については，温度を 40℃に設定後，約 10 秒間流出させた後，容器に採取した．

③*Legionella* 属菌の分離

Legionella 属菌の分離は，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）「公衆浴場等における *Legionella* 属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」の精度管理ワーキンググループが推奨する浴用水の方法 [2,3]に準じて行なった（通常培養法）．

濃縮方法：浴用水（1,500 ml），シャワー水（1,500 ml）およびカラン水（1,500 ml）は，メンブランフィルター（直径 47 mm，0.2 μm，ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE）で吸引ろ過し，そのフィルターを 100 倍濃縮液となるように滅菌蒸留水で１分間ボルテックスしたものを試料とした．

培養法：浴槽水，シャワー水およびカラン水は，100 倍濃縮液について未処理，酸処理（0.2M KCl-HCl，pH2.2 で等量混合後 5 分間静置），加熱処理（50℃20 分アルミバスで加熱）を行い，その 100 μl を GVPC 培地（日水製薬）にコンラージ棒で広げて 35℃で 7 日間培養した．ただし，酸処理検体は，200 μl について同様に培養した．非濃縮検体については，未処理の 100 μl を GVPC 培地にコンラージ棒で広げて，35℃で 7 日間培養した．

２．エアロゾル調査

2018 年 5～8 月に道路沿いの 6 地点で，慣性衝突法によるエアーサンプラー（BIOSAMP，ミドリ安全株式会社）を用

いて, エアロゾルを計 46 サンプル捕集した. エアーサンプラーに GVPC 培地(日水製薬)を設置し，100 l/min の条件で 5 および 15 分間(各 23 検体)捕集した．捕集後, GVPC 培地を 35℃で 7 日間培養し，レジオネラ属菌を探索した.

３. IMB による *Lp*1 の選択的濃縮法の検討

①*Lp*1-IMB 作製方法

*Lp*1-IMB はデンカ生研で作製した．*Lp*1 以外の血清群に対する交差反応を吸収後, 硫安分画にて粗精製し，至適感作濃度（ビーズに結合しやすい抗体の濃度）とした抗体を磁気ビーズに感作し，*Lp*1 免疫磁気ビーズとした.

②*Lp*1-IMB による実検体からの *Lp*1 濃縮分離法

供試検体は，前述の感染源調査で 100 倍濃縮された浴槽水 49 検体，シャワー水 28 検体, カラン水 15 検体, 計 92 検体とした.

*Lp*1-IMB 濃縮法：検体（100 倍濃縮液）を，希釈しない濃縮検体 1 ml と，滅菌生理食塩水で 5 倍希釈した希釈検体 1 ml の 2 通り準備した．これらの検体に *Lp*-1IMB 25 µl を接種し，10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸着させた．ビーズを磁石で集め, 滅菌生理食塩水で洗浄した．この操作（洗浄)を 2 回実施した後, 最終的に生食 200 µl に懸濁，ボルテックスでよく混和し，IMB 検体とした. この IMB 検体 100 µl を GVPC 培地にコンラージ棒で拡げるだけとし，表面に接種した検体が確認できなくなってから 35℃で 7 日間培養した.

③*Lp*1 特異的遺伝子の検出（sg1-qPCR 法）

DNA 抽出は，Loopamp レジオネラ検出試薬キット E（栄研化学）に添付の抽出試薬を用い，取扱説明書に従い実施した．sg1-qPCR は, Mérault らの報告[4] に従い, プライマーおよびプローブを作製し，反応試薬として Premix Ex Taq（Probe qPCR）（タカラバイオ）を用いて実施した.

④ATP の測定

検水 100 倍濃縮液にルシパック Pen（キッコーマン）の専用綿棒を浸して約 100 µl を吸い取り，携帯用簡易測定器を用いて検水 10 ml 当たりの RLU 値を測定した.

⑤非濃縮検体を用いた培養法による *L. pneumophila* 最確数の検討

検水を付属の滅菌容器入れ，そこに Legiolert（アイデックスラボラトリーズ）培地を入れ，試薬が完全に溶解するまで混和した. 検水 100 ml で検査する場合は，硬度試験紙にて硬度を測定し，度合いに応じてサプリメントを添加した．10 ml で検査する場合は，滅菌水 90 ml を付属の容器に入れ，そこに検水 10 ml を添加しよく混和し，10 倍希釈検体とした．それを定量用のトレイ（Quanti-Tray/Legiolert：QT-L）に入れ，専用のゴムシートに装着したのち，専用シーラーで密封した．それを湿潤箱に入れ，乾燥しないように水を含ませたペーパータオル等と共に密閉し，39℃で 7 日間培養した.

（倫理面への配慮）

本研究は，研究機関内外の倫理審査委員会等において承認手続きが必要となる研究には該当しない.

C．研究結果

１．浴槽水，シャワー水およびカラン水における *Legionella* 属菌検出状況

浴槽水，シャワー水およびカラン水から

検出された *Legionella* 属菌の菌数および菌種（血清群）を表 1(a.b)に示した. *Legionella* 属菌が検出されたのは，浴槽水 10/49 検体（20.4%），シャワー水 4/28 検体（14.3%），カラン水 5/15 検体（33.3%）であった．浴槽水から分離された *Legionella* 属菌で最も多かったのは，*Lp*1 および *Lp*9（3 検体）であった.

２．バイオエアロゾルにおける *Legionella* 属菌検出状況

46 検体について検査した結果，いずれの検体からもレジオネラ属菌は分離されなかった.

３．免疫磁気ビーズによる *Lp*1 の選択的濃縮法の検討結果

①*Lp*1 の分離

*Lp*1-IMB 法で，*Lp*1 は浴槽水 3/49（6.1%）検体から，シャワー水で 1/28（3.6%）検体から，また，カラン水では 1/15（6.7%）検検体から分離され，検体の種類による差は認められなかった（表 2）．また，*Lp*1 以外に，浴用水 2 検体から *Lp*9 が，また，シャワー水 1 検体から *Lp*5，１検体から *Lp*6 が分離された.

②*Lp*1 特異的遺伝子の検出（sg1-qPCR 法）

*Lp*1 特異的遺伝子は，全体では 19/92 検体（20.6%）から検出された．その内訳は，浴用水 15/49 検体（30.6%），シャワー水 2/28 検体（7.1%）およびカラン水 2/15 検体（13.3%）で，浴用水での検出率が高かった.

③ATP 値

ATP 値は，浴用水 49 検体で 58,161 RLU/10 ml がもっとも高く，平均値は 2,334 RLU/10 ml ，シャワー水 28 検体で 279 RLU/10 ml がもっとも高く，平均値は 47 RLU/10 ml，カラン水 15 検体では高くても 75 RLU/10 ml で，平均値は 14 RLU/10 ml であった（データ未掲載）.

④方法別レジオネラ属菌の検出状況

①～③に示した *Lp*1-IMB 濃縮法，通常培養法，sg1-qPCR 法および ATP 値の結果について，いずれかの方法で *Legionella* 属菌が検出された検体を表 4 に示した．*Lp*1-IMB 法，sg1-qPCR 法は，*Lp*1 を選択的に検出する方法であることから，*Lp*1 について着目すると，3 法すべてで *Lp*1 が検出されたのは，浴用水，シャワー水それぞれ 1 検体（No.2 と No.20）のみであった．浴用水の No.6 と No.15 では，*Lp*1-IMB 濃縮法および sg1-qPCR 法で *Lp*1 が検出されたが，通常培養法では *Lp*1 は検出されず，それぞれ *Lp*6（10 cfu/100 ml），*Lp*9（190 cfu/100ml）が検出された．No.15 の検体では *Lp*1-IMB 濃縮法においても *Lp*9 が検出された．また，浴用水の No.18 では，sg1-qPCR 法陽性であったが，*Lp*1-IMB 濃縮法および通常培養法で検出されたのは *Lp*9 であった．他に，*Lp*1-IMB 濃縮法で *Lp*1 以外のレジオネラ属菌が検出されたのは，No.21，No.23 のシャワー水で，それぞれ *Lp*6，*Lp*5 が検出された．検体 No.14 では *Lp*1-IMB 濃縮法では，*Legionella* 属菌は検出されなかったが，通常培養法，sg1-qPCR 法で *Lp*1 陽性となった．一方，sg1-qPCR 法が陽性となった 19 検体のうち，通常培養法，*Lp*1-IMB 法それぞれ 15 検体で *Lp*1 は検出されなかった（表 5）．いずれの方法も sg1-qPCR 法に対して，感度 21.1%，特異度 98.6%，一致率 82.6%であ

った．遺伝子検査法と培養法での *Lp*1 の分離結果が異なった検体において，ATP との間に相関は認められなかった．

⑤20 倍濃縮液を用いた *Lp*1-IMB 濃縮法による *Lp*1 の検出

*Lp*1-IMB 濃縮法によって *Lp*1 が検出された浴用水 5 検体について、100 倍濃縮液と、それを 5 倍希釈した 20 倍濃縮液における検出結果を比較した（表 6）．*Lp*1 は 20 倍濃縮液すべてから検出されたのに対し、100 倍濃縮液では 3 検体から検出されたのみであった。

⑥非濃縮検体を用いた培養法による *L. pneumophila* 最確数の検討

Legiolert で *Lp* 陽性となったのは 100 ml 検体で 3/29（10.3%）検体，10ml 検体で 8/63（12.7%）検体であった．これを通常培養法と比較すると，100ml，10ml 検体を用いた結果の特異度はそれぞれ 95.8％，96.0%，感度は 40.0%，43%であった（表 7-a,b）．感度は高くなかったが、特異度は高く、陰性をよく予想できる結果であった。これを、浴用水検体のみに限って見ても同様の傾向であった。通常培養法で陽性，Legiolert 陰性となった 11 検体および Legiolert 陽性，通常培養陰性となった 3 検体を表 8 示した．通常培養で 550 cfu/100 ml，Legiolert で 126 MPN/100 ml であるにも関わらず，一方の培養法で *Legionella* 属菌が検出されない原因は明らかにはならなかった．

D．考察

医療機関等で分離され，レファレンス事業として収集された臨床分離株について *Lp*1 の SBT の遺伝子型を Minimum Spanning Tree で解析した結果では，これらの由来は土壌・水溜り分離株グループに多く属する傾向が報告された [5]．このデータは，レジオネラ症の患者の感染源を特定するため，検体を絞込むことが困難であることを示すものである．すなわち，現在のように浴用施設に着目しているだけでは，感染源を特定するのは困難であるものと思われる．

このような背景を踏まえ，本研究では，これまで報告されていない感染源を探求した．そして，環境検体から発生するエアロゾルまたはミスト中の *Legionella* 属菌を証明し，とりわけ，水溜りなど，これまで直接的な感染源と証明されていない環境のリスクを明らかにしようと試みた．

今年度は，エアーサンプラーで捕集したエアロゾルを直接培地に吹き付けるタイプの機器を使用した．しかしながら，昨年度と同様 *Legionella* 属菌を分離することはできなかった [6]．

一方，2007 年から 2016 年にわが国におけるレジオネラ症患者から分離（臨床分離株）され，レファレンスセンターで解析されたレジオネラ属菌は，86.7%が *Lp*1 であった [7]．従って，分子疫学的解析を実施し，感染源を特定するには，環境検体から *Lp*1 を検出することが重要となる．しかしながら，感染源となるような，すなわち衛生管理の不十分な浴用水は *Lp*1 だけでなく，他の血清群の *L. pneumophila* をはじめ，他の *Legionella* 属菌種もしばしば検出される．従って，培地上の *Legionella* 属菌を形状だけで *Lp*1 と特定するのは不可能であることから，*Lp*1 を見落とすことが懸念される．また，夾雑菌による *Lp*1 の発育抑制（マス

キング）も課題である．本年度は，このマスキングに対応するため，一度濃縮した検体を 5 倍に希釈して，すなわち希釈率を変更して免疫磁気ビーズを試行したところ，濃縮検体そのままで検査した時より検出数が多かった．感染源調査などの場合には検討すべき方法であると思われた. 一方, sg-1 特異的遺伝子を標的とした PCR 法と比較すると，*Lp*-1IMB 法での検査法で *Lp* **1** を検出できていないと思われる検体が認められた. 一部は PCR 法で死菌の DNA を検出している場合も考えられるが，一部は通常培養法でも *Lp*1 が検出されていることから, *Lp*1-IMB 法の感度を上げる必要が示された．これらの結果から，感染源調査においては，qPCR 法で *Lp*1 陽性となった検体を対象に，検体の希釈倍率を段階的にする，培地枚数を増やすなどの工夫が必要である. qPCR 法は，前年度の研究報告書 [6] において報告したように, 感度を上げる必要から, コンベンショナル PCR 法に代えて, プローブを用いた方法である．その結果，*Lp*1 特異遺伝子の検出率は昨年度，5/86（5.8%）検体であったのに対し，qPCR 法を用いた今年度の検出率は 19/92（20.6%）と高かった．検体が異なることから，単純に比較はできないが，昨年度の検体について，保管していた DNA 抽出液で qPCR 法を実施したところ，さらに 6 検体で sg-1 特異遺伝子が検出された．これはプローブ法への変更で感度が高くなったことを示すものである. 本法がスクリーニングと成りうるかについて，検体数を増やして，検討すべきと思われた.

通常培養法と *Lp*-1IMB 法で結果が異なった検体では，*Lp*1 の菌数が 10～30 cfu/100 ml と検出限界に近いものであった. 1 検体では, sg1-qPCR 法の結果も陰性であった．したがって，この相違は供試した検体に *Lp*1 が含まれる確率の問題によることが考えられる．今年度は，5 倍希釈した濃縮試料（20 倍濃縮）を用いて IMB 法を実施したところ，*Lp*1 の分離数が希釈前の濃縮試料に比べ多かった．夾雑菌が多い試料では，磁気ビーズへの接着が阻害されることを示すデータであると考える．しかしながら，夾雑菌の量を確認する方法として考えられる ATP の値が，その指標になるか，さらなる検討が必要かもしれない．IMB 法はこれまでにも様々な菌種での検査法 [8] に採用されている事からも，その有用性が高いという結果は信頼できるものと考える.

今年度，濃縮しないで用いる検査法について検討したが，通常培養法との相関は良くなかった．色の判定が難しかったことが一つの原因であると思われた．色の判定基準が必要と思われた．本法は *L. pneumophila* のみを検出するが，操作が非常に簡便であることから，特別な機器を使用する定量の系ではなく，より簡便な定性試験法となるような改良を加えることで，浴用施設で自主衛生管理に有用となると思われた．とりわけ、浴用水の検体については、検体数は少ないものの通常培養法と良い相関がみられたことから、検体数を増やして検討すべきと思われた。

結語

感染源となり得る環境（エアロゾル）検体から *Legionella* 属菌を分離することはできなかったが，ヒトへの感染経路の一端を解明するため, 継続した調査が必要である.

一方，*Lp*-1IMB 法については，感染源調査に有用と思われるため，検出感度の向上を目指し，実用化に向けて具体的な使用手順などの検討が必要である．

謝辞

本実態調査を実施するにあたり，富山県生活衛生課，各厚生センター，富山市保健所の担当者および採水にご協力いただいた浴用施設の皆様に深謝いたします．

E. 参考文献

1) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報．
http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/239-idwr/data/6998-idwr-sokuho-data-j-1652.html.

2) 森本　洋，他．*Legionella* 属菌検査法の安定化に向けた取り組み．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)「公衆浴場等における *Legionella* 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 24 年度分担研究報告書 93-131.

3) 森本　洋．2010．分離集落の特徴を利用した *Legionella* 属菌分別法の有用性．日本環境感染誌．25:8-14.

4) Mérault N, Rusniok C, et al. 2011. Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. Appl Environ Microbiol. 77:1708-1717.

5) レジオネラレファレンスセンター会議報告．2015 年．衛生微生物技術協議会第 36 回研究会.
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H28_Legionnaires_2.pdf. 6）

6) 磯部　順子，他．レジオネラ属菌迅速検査法の評価. 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）「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」 平成 29 年度分担研究報告書　45-51.

7） レジオネラレファレンスセンター会議報告．2017．衛生微生物技術協議会第 38 回研究会.
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H29_Legionnaires.pdf.

8）工藤由起子，他．2015．腸管出血性大腸菌 O26，O103，O111，O121，O145 および O157 の食品からの検出における選択増菌培地および酵素基質培地の検討．日本食品微生物学会誌．32:60-66.

F．研究発表

報告

磯部順子，金谷潤一，他．2018．富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況（2017 年）．富山県衛生研究所年報．41:32-37.

学会発表

1) Junko Isobe, Jun-ichi Kanatani, Keiko Kimata, Kaoru Uchida, Masanori Watahiki, Fumiaki Kura,Kensuke Ozawa, Fumio Gondaira3, Junko Amemura-Maekawa：Evaluation of an immunomagnetic separation method to detect *Legionella pneumophila* serogroup 1 from environmental specimens. ESGLI 2018. Lyon. August 2018.

２）磯部順子，金谷潤一，木全恵子，内田

薫，綿引正則，倉　文明，小澤賢介，権平文夫，前川純子．浴用水から *Legionella pneumophila* 血清群 1 を検出するための免疫磁気ビーズによる濃縮分離法の検討　第 45 回日本防菌防黴学会　2018 年 11 月　東京.

３) 金谷潤一，綿引正則，木全恵子，加藤智子，内田　薫，倉　文明，前川純子，磯部順子．大気エアロゾル中のレジオネラ属菌検出状況　第 45 回日本防菌防黴学会 2018 年 11 月　東京.

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 浴用施設における *Legionella* 属菌検出結果

a. 陽性数および菌数

	施設数	検体数	陽性数	検出率 (%)	菌数		
					10 未満	10 – 99	100 – 999
浴槽水	12	49	10	20.4%	39	8	2
シャワー水	13	28	4	14.3%	24	3	1
カラン水	11	15	5	33.3%	10	5	0

b. 血清型別

	血清型別								
	*Lp*1	*Lp*3	*Lp*4	*Lp*5	*Lp*6	*Lp*8	*Lp*9	*L. londiniensis*	UT
浴槽水	3		1		2	2	3		
シャワー水	1		1	1	1				1
カラン水	1	1	1	2	1			1	

表 2. 浴用施設における *Lp*1 の分離状況（IMB 法）

	施設数	検体数	*Lp*1-IMB 陽性数	検出率 (%)	*Lp*1以外の分離菌
浴槽水	12	49	3	4.7%	*Lp*9
シャワー水	13	28	1	3.6%	*Lp*5, *Lp*6,
カラン水	11	15	1	6.7%	

表 3. 浴用施設における *Lp*1 の分離状況（sg1-qPCR 法）

	施設数	検体数	sg1-qPCR 陽性数	検出率 (%)
浴槽水	12	49	15	30.60%
シャワー水	13	28	2	7.10%
カラン水	11	15	2	13.30%

表 4. *Lp*1-IMB 法，通常培養法，sg1-qPCR 法の結果の比較

No.	検水種類	*Lp*1-IMB培養法		通常培養		sg1-qPCR (*Lp*1特異遺伝子)	ATP (RLU/10 ml)
		*Lp*1の分離	*Lp*1以外の分離菌	*Lp*1分離菌数 (CFU/100ml)	*Lp*1以外の分離菌 血清群 (cfu/100ml)		
1	浴槽水	陰性		<10		**陽性**	58,161
2		**陽性**		**40**		**陽性**	53
3		陰性		<10	*Lp*8 (70)	**陽性**	24,543
4		陰性		<10	*Lp*8 (30)	**陽性**	20,983
5		陰性		<10		**陽性**	13
6		**陽性**		<10	*Lp*6 (10)	**陽性**	10
7		陰性		<10		**陽性**	9
8		陰性		<10	*Lp*4 (10) ,*Lp*6 (10)	陰性	261
9		陰性		**10**	*Lp10* (1)	陰性	12
10		陰性		<10		**陽性**	14
11		陰性		<10		**陽性**	19
12		陰性		<10		**陽性**	12
13		陰性		<10		**陽性**	4
14		陰性		**10**	*Lp*10 (10)	**陽性**	11
15		**陽性**	*Lp*9	<10	*Lp*9 (190)	**陽性**	1,719
16		陰性		<10		**陽性**	16
17		陰性		<10	*Lp*9 (10)	陰性	8
18		陰性	*Lp*9	<10	*Lp*9 (550)	**陽性**	1,044
19	シャワー水	陰性		<10		**陽性**	11
20		**陽性**		**370**		**陽性**	70
21		陰性	*Lp*6	<10	*Lp*6 (90)	陰性	6
22		陰性		<10	*Lp*4 (10)	陰性	8
23		陰性	*Lp*5	<10	*Lp*5 (10) *Lp*6 (10)	陰性	20
24	カラン水	陰性		**30**	***Lp*1**	**陽性**	17
25		**陽性**		<10		陰性	9
26		陰性		<10		**陽性**	11
27		陰性		<10	*Lp*3 (10) *Lp*4 (10)	陰性	12
28		陰性		<10	*L. londiniensis* (30)	陰性	7
29		陰性		<10	*Lp*5 (30)	陰性	7
30		陰性		<10	*Lp*5 (10)	陰性	24

表 5. 方法別 *Lp*1 の検出数の比較

		sg1-qPCR		
		＋	－	計
IMB	＋	4	1	5
	－	15	72	87
	計	19	73	92
通常培養法	＋	4	1	5
	－	15	72	87
	計	19	73	92

表 6. 希釈による *Legionella* 属菌の検出状況

	濃縮率	
Legionella 属菌（血清群）（*Lp*1-IMB法）	100倍濃縮液	20倍濃縮液
陽性（Lp1）	○*	○
陽性（Lp1）		○
陽性（Lp1）		○
陽性（Lp1）	○	○
陽性（Lp1）	○	○

○*：*Lp*1が分離された検体

表 7. Legiolert による *Legionella* 属菌の分離結果

a. 検水 100 ml の場合

		通常培養法		
		＋	-	計
Legiolert（100ml）	＋	2	1	3
	-	3	23	26
	計	5	24	29

b. 検水 10 ml の場合

		通常培養法		
		＋	-	計
Legiolert（10ml）	＋	6	2	8
	-	8	47	55
	計	14	49	63

表 8. 通常培養法と Legiolert の結果が異なった検体

	検水量	Legiolert（MPN/100ml）	判定	通常培養法
1 カラン水	100	0	<10	30
2 浴槽水	100	0	<10	40
3 浴槽水	100	5.8	<10	30
4 シャワー水	10	0	<10	370
5 カラン水	10	0	<10	10
6 シャワー水	10	0	<10	10
7 浴槽水	10	0	<10	10
8 浴槽水	10	0	<10	190
9 浴槽水	10	0	<10	10
10 浴槽水	10	0	<10	550
11 シャワー水	10	0	<10	10
12 浴槽水	100	119.8	119.8	<10
13 浴槽水	10	11	11	<10
14 シャワー水	10	126	126	<10

平成 28–30 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
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」
平成 30 年度分担研究報告書

「入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査」

○	研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学
	研究分担者	泉山信司	国立感染症研究所
	研究協力者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	陳内理生	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所

汚染予防対策を確立することを目的として、入浴施設の浴槽、カラン並びにシャワー及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態調査を行った。神奈川県内の 1 入浴施設においては、カラン・シャワーにレジオネラ属菌による継続的な汚染が検出された。そこで、施設では高置貯湯槽に入る配管に塩素添加装置を設置し、貯湯槽と配管中の温水を消毒する対策を行った。消毒開始後の調査では、培養によりレジオネラ属菌が検出されたため、継続的に観察したところ、再度レジオネラ属菌が検出された。医療機関については、これまでの調査によりレジオネラ属菌汚染が明らかとなっている医療機関が塩素濃度を上げる対策を取り、その後の経過を調査した。その結果、採水した水試料の遊離残留塩素濃度は対策前と比較して上昇していた。それによりレジオネラ属菌の菌数の減少が観察されたが、菌数が増加した場所もあった。給水系では初流水における遊離残留塩素濃度が 0.2mg/L を下回るあるいは 0.2mg/L 付近の濃度の試料において、給湯系では水温が低い試料においてレジオネラ属菌が検出された。これらの結果から、配管中のレジオネラ汚染の除去には塩素の添加や水温を上げることが有効であるが、対策の適切な運用が必要であることが示唆された。医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染問題に関するシンポジウムを開催した。参加者に対してアンケート調査を実施し、レジオネラ汚染問題への認識ができた、新たな情報を得ることができた等の感想や要望が得られた。

A. 研究目的

本調査は、入浴施設の浴槽、カラン並びにシャワー及び医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染の実態を調査し、汚染予防対策並びに感染症予防対策を策定するための基礎的情報を得ることを目的として実施した。調査の対象は入浴施設並びに医療機関の給水・給湯設備とした。

医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染は、その実態を把握している医療機関において対策の実施等に関する関心が非常に高い。一方で、その実態を把握していない医療機関の多くは、給水・給湯系がレジオネラ属菌により汚染されるリスクが存在することさえ認識していない。そこで、医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染問題の存在を広く周知するとともに、問題の解決に向けた活発な議論を展開する場を設けることを目的として、シンポジウムを開催した。

B. 研究方法

１）試料の採取

調査の対象は、神奈川県内の 1 入浴施設及び 3 医療機関とした。

入浴施設では地下の貯湯槽と高置貯湯槽からの各 1 試料と、2 つの浴室のそれぞれについて浴槽水及び湯口水の各 1 試料を採取した。蛇口とシャワーは各浴室の各 2 か所と 1 か所から放水直後に採取した。また、蛇口 2 か所のうち 1 か所からの水は 3 分間流水後にも採取した。レジオネラ属菌用水試料は、25%チオ硫酸ナトリウム 1.0ml を添加した滅菌容器に 500ml を採取した。水試料は温度を採取時に、pH を実験室に搬入時にガラス電極法で測定した。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりハンディ水質計“アクアブ”AQ-101 型（柴田科学）を用いて実験室に搬入時に測定した。各試料は冷蔵にて実験室に搬送し、搬入当日に実施する検査まで冷蔵保存した。

医療機関では、洗面台等の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。蛇口からの放水直後、3L 流水後にレジオネラ属菌と従属栄養細菌用の 500ml と pH 及び塩素濃度測定用の 50ml の 2 本ずつを採取した。レジオネラ属菌及び従属栄養細菌用水試料は、25%チオ硫酸ナトリウム 1.0ml を添加した滅菌容器に 500ml を採取した。温度、pH、遊離残留塩素濃度の測定及び搬送は、上記の入浴施設のシャワー・カランの試料と同様に行った。

２）レジオネラ属菌の分離

試料は直径 47mm、孔径 0.2μm のポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、5ml の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した。試料の浮遊液は 0.5ml を 50℃、20 分の加熱処理を行った。別の 0.5ml に同量の pH2.2 緩衝液を加え、4 分間酸処理した。未処理の試料及び処理後の浮遊液を 50 倍希

釈 PBS で 10 倍段階希釈し、原液と 10 倍および 100 倍希釈液の各 100μl を MWY 寒天平板培地（Oxoid）及び GVPC 寒天平板培地（日水製薬）に塗抹し、36℃で 7 日間培養した。*Legionella* 属菌を疑う集落を BCYEα 寒天平板培地（Oxoid）に転培し、性状により鑑別を行った。

３）LAMP 法によるレジオネラ属菌遺伝子の検出

LAMP 法によるレジオネラ属菌遺伝子の検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E（栄研化学）により行った。メンブランフィルターでろ過濃縮後、5ml の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した試料に対して、キット添付の説明書に従って実施した。

４）レジオネラ属菌の同定

調査試料から分離されたレジオネラ属菌は、LEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene) および *Lmip* (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene)のプライマーを用いた PCR によりレジオネラ属菌と *L. pneumophila* であることを決定した [1, 2]。さらに、型別用血清（デンカ生研）より種の鑑別を行った。

５）従属栄養細菌数

医療機関から採取した水試料を 50 倍希釈 PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の試料の 1.0ml を R2A 寒天培地（BD）に接種し、混釈培養法により 25℃で 7 日間培養した。培養後、集落数を計数した。

６）給水系への次亜塩素酸ナトリウム添加実験

調査対象とした 3 医療機関のうち、1 医療機関において、平成 28 年度から給水系のレジオネラ汚染対策として、給水系に次亜塩素酸ナトリウムを添加している。

７）*L. pneumophila* 計数用キットの評価

海外において、水道水における *L. pneumophila* 汚染を簡易に検出し、計数も可能であるキットが市販されている。医療機関の給水系を対象にして、キットの評価を行った。

８）シンポジウムの開催

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ属菌の汚染問題を扱ったシンポジウムを企画し、開催した。

C. 結果及び考察

１）入浴施設

調査対象とした入浴施設は、2015 年 11 月 17 日から汚染実態調査を継続的にしている。今年度は試料を平成 30 年 10 月 2 日に採取して解析した。2 つの浴室のそれぞれの浴槽水、湯口水、カラン並びにシャワーの温水及び地下タンクと高置タンクの温水の計 14 試料を採取した。このうち、レジオネラ属菌は浴室 A の 2 つのカラン（*L. pneumophila* SG1, 9：10

CFU/100ml、*L. pneumophila* SG1, 9：400 CFU/100ml）並びに浴室 B のカラン（*Legionella* sp.：10 CFU/ml）から検出された。400 CFU/100ml 検出されたカランでは 3 分間流水後に *L. pneumophila* SG1, 6 及び *Legionella* sp.が 70 CFU/100ml 検出された。他の試料からはレジオネラ属菌は検出されなかった。

これまでの結果を整理して表 1 に示した。2015 年 11 月 17 日の調査によりレジオネラ属菌が検出されたことから、対策として①毎日、カランとシャワーの営業前の流水と定期的なシャワーヘッドの塩素による消毒を行った。しかし、2016 年 3 月 17 日の検査によりカランとシャワーからレジオネラ属菌が検出された。

そこで次に、②カランとシャワーの新品の交換を合わせて実施したが、2016 年 7 月 26 日のレジオネラ検査ではレジオネラ属菌の除去はできていなかった。そこで、さらに③専門業者による高置水槽からカランとシャワーまでの配管の高濃度塩素を用いた消毒を実施したところ、2016 年 11 月 2 日のレジオネラ検査ではレジオネラ属菌 DNA は検出されたが、培養では菌は検出されなかった。その後、経過観察として 2017 年 2 月 28 日と 5 月 9 日にレジオネラ検査を行ったところ、培養によりレジオネラ属菌が検出された。

当該施設は、源泉からの原湯を地下の貯湯槽に受け、高置水槽に上げて、そこからカランやシャワーに配水している。原湯は約 60℃あり、カランとシャワーでは原湯と水道水を混合して温度を調整している。水道水は公共水道で、塩素濃度は 0.5mg/L で供給されている。そこで、地下の貯湯槽と高置貯湯槽の間に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置して給湯水を消毒する対策を行った。この対策の効果を検証するために、2018 年 1 月 30 日に採水を行い、レジオネラ属菌等の検査を実施した。その結果、給湯栓及びシャワーから採取した試料からレジオネラ属菌が検出された。夜間や休日に高置貯湯槽とその先の配管中の温度が低下するとともに遊離残留塩素濃度が低下する、あるいは次亜塩素酸ナトリウムの添加が不十分等の原因となってレジオネラ属菌が増殖したと推測された。今回はその後の経過観察として調査を実施した。その結果、菌数が減少した傾向はみられるが、*L. pneumophila* SG1,6 及び 9 が検出された。

２）医療機関

調査に協力いただける神奈川県内の 3 か所の総合病院（A、B、C）を対象とした。

医療機関 A では、採水場所は 5 か所（病室洗面台 1 か所、トイレ洗面台 1 か所、手術準備室 1 か所、手術室手指洗浄場 1 か所､受水槽 1 か所）とし、13 試料を 2018 年 12 月 10 日に採取した。レジオネラ属菌は受水槽及び手術室手指洗浄場を除く、3

か所から採取した 9 試料から、*L. pneumophila* SG1、SG5、*L. feeleii* SG1、*L. anisa* 及びレジオネラ属菌（菌種未同定）が検出され、菌数は 10～200 CFU/100ml であった。初流水と 3L 流水後の試料では、レジオネラ属菌及び従属栄養細菌数の減少が観察された。医療機関 A では実験的に次亜塩素酸添加装置を設置し、効果を検証中であるが、手術室の手指洗浄場ではレジオネラ属菌が検出されなかったことから、次亜塩素酸濃度を上げたことの効果があったと考えられる（表２）。その他の地点でもレジオネラ属菌数が 2017 年の調査と比較して減少していることから、添加量の増加の効果が表れたと思われる。定期的なフラッシングを実施することで効果がさらに上がることが期待される。

医療機関 B では、6 か所（談話室洗面台 2 か所、浴室給湯栓 1 か所、浴室洗面台 1 か所、病室洗面台 2 か所）とし、20 試料を 2018 年 8 月 16 日に採取した。レジオネラ属菌は 4 か所から採取した 12 試料から検出され、菌数は 30～12000 CFU/100ml であった。医療機関 B では 2017 年の調査結果を受けて、給水系の塩素濃度を上げるように次亜塩素酸ナトリウムの添加量を増加した。これにより 2018 年の調査では、2017 年と比較して遊離残留塩素濃度が上昇した。しかし、レジオネラ属菌が検出された場所は減少せず、また菌数も減少しなかった。次亜塩素酸ナトリウム添加量を増やしたにもかかわらず、初流水の塩素濃度は 0.2mg/L 前後あるいはそれ以下であったことから、蛇口の使用頻度が低いことが原因である可能性が推定された。また、給湯系では３L 流水後も水温が 50℃に達しておらず、これも使用頻度が低いことが推測された。

浴室からはレジオネラ属菌は全く検出されなかったが、給水系の初流水の遊離残留塩素濃度は 0.4mg/L 前後であり、給湯系は 3L 流水後の水温が 55℃であったことから、使用頻度が高いことが推測された。

医療機関 C では、6 か所（地下控室 1 か所、倉庫内 1 か所、病室洗面台 4 か所）とし、給水系の試料 12 試料を 2018 年 8 月 20 日に採取した。病室の 1 か所から採取した 2 試料から、*L. pneumophila* SG1 が 10 CFU/100ml 分離された。

今回の調査対象とした医療機関は、塩素添加装置を設置して給水系に遊離残留塩素濃度を独自に添加することでレジオネラ対策を行っている。医療機関 A 及び B では対策を強化するために遊離残留塩素濃度を上げ、レジオネラ属菌の検出箇所が減少する、あるいは検出菌数が減少するなどの効果が見られたが、限定的であった。調査結果から、使用頻度の低い蛇口があることが推測され、これらの蛇口に対する別の対策（フラッシングを一定の間隔で実施する等）が必要であると考えられる。給湯系からもレジオネラ属菌が検出されて

おり、一定の間隔でフラッシングを実施する等の同様の対策が必要であると思われる。

医療機関Cは、末端給水栓の遊離残留塩素濃度を0.9mg/Lとなるように添加量を設定し、さらに全病室の蛇口から毎日1分間のフラッシングを行う対策を実施している。今回の調査ではレジオネラ属菌の培養で6か所12試料、検出キットで26か所20試料を検査したが、培養で1か所2検体から10 CFU/100ml、*L. pneumophila*計数用キットで1か所から9 MPN/100ml検出されたにとどまった。給水系からレジオネラ汚染を完全に取り除くことはかなり困難であることが示されているが、感染のリスクを確実に減少させていると思われる。

３）*L. pneumophila*計数用キットの評価

医療機関Bの6か所20試料及びCの26か所32試料を用いて、*L. pneumophila*計数用キット（レジオラート：アイデックスラボラトリーズ）による*L. pneumophila*の計数を試みた。医療機関Bの20試料のうち、1試料で*L. pneumophila*が1.1 MPN/100mlとの結果が得られた。しかし、同一試料の培養検査では菌は検出できず、キットの陽性ウェルからも菌を分離することはできなかった。また、医療機関Bの12試料から*L. anisa*及び*Legionella* sp.（表３）が検出されたが、レジオラートでは陽性の反応は示されなかった。

医療機関Cの12試料では、培養により2試料から*L. pneumophila* SG1が10 CFU/100ml検出されたが（表４）、レジオラートはすべて不検出であった。培養による検査を実施しなかった20試料（浴槽カラン、シャワー、病室洗面、処置室洗面等）では、1試料が9 MPN/100mlを示した。

今回のレジオラートの評価では、*L. pneumophila*以外の菌種（*L. anisa*及び*Legionella* sp.）では菌数が$10^{2\sim4}$であるにもかかわらずキットが陽性を示さなかったことから、特異性が高いことが示された。一方、*L. pneumophila*が検出されたにもかかわらずレジオラートが陽性反応を示さなかった。この試料の検出菌数が10 CFU/100mlと低かったことから、不一致が生じたものと思われる。

今回の事例ではレジオラートを評価するだけの十分な試料を得ることができなかったため、今後さらに評価を行う必要がある。

４）講演会・シンポジウムの開催

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染問題の現状と課題を周知し、解決のための議論の場を提供することを目的として、講演会・シンポジウム「医療機関の給湯・給水系に潜むレジオネラ感染リスクー実態と予防策ー」を平成30年10

月 27 日に国立感染症研究所にて開催した。講演会・シンポジウムの内容は図１に示した。

講演会・シンポジウムには 160 人ほどが参加した。講演会・シンポジウムに関する感想や意見を集めるためにアンケート（資料１）を作成して参加者に対してアンケート調査を実施し、108 人から回答を得た。結果を図２～７に示した。具体的に記載された回答としては、バイオフィルムやレジオネラ汚染の除去の難しさや対策の重要を知ることができた、汚染問題を認識することができた、事前に準備・対策を立てておくことが必要であることを知った、講演会・シンポジウムは基礎から実践までの内容が満載だった、異なる分野の人と交流できた、対策があいまいで根本的な問題解決に至っていない、対応ガイドラインを作ってほしいなど多くの感想・意見が寄せられた。

D.まとめ

これまで継続して入浴施設及び医療機関の給水系及び給湯系を対象にしてレジオネラ汚染状況の調査を実施し、レジオネラ属菌が検出された。汚染の原因は①使用頻度の低い蛇口や配管における遊離残留塩素濃度の低下、②給湯系における配管中の温度の低下が推測された。こうした汚染に対して種々の対策を検討してきたが、効果が限定的であり、完全に汚染を除去するには追加の対策が必要であると推測された。今後さらに検討すべき対策として、①使用頻度の低い蛇口での流水(フラッシング)、②塩素濃度・温度の維持、③定期的な配管の消毒、④使用頻度の低い蛇口の廃止、⑤レジオネラ対策を踏まえた系の設計･管理等が挙げられる。今後さらに汚染状況の把握と対策の検証を行い、効果的な対策の追及を行っていく必要があると考えられる。

講演会・シンポジウムでは多くの参加者があり、医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染に対する関心の高さが示された。また、参加者がレジオネラ汚染への対応に苦慮している実情がアンケートの回答より窺うことができた。

E. 研究発表

大屋日登美、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、古川一郎、前川純子、倉文明、泉山信司、黒木俊郎（2018）：医療機関の給水設備におけるレジオネラ属菌の汚染実態　日本感染症学雑誌　92:678-685.

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表１　神奈川県内の入浴施設における湯口、シャワー及び給湯栓のレジオネラ属菌汚染状況

L. p. Legionella pneumophila、*L.* sp. *Legionella* sp.、SG 血清型

	2015 年			2016 年									2017 年						2018 年					
	11 月 17 日[1]			3 月 17 日[2]			7 月 26 日[3]			11 月 2 日[4]			2 月 28 日[5]			5 月 9 日[5]			1 月 30 日[6]			10 月 2 日[5]		
検体	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数
浴室 A 湯口	+	−		+	*L. p.* SG1	30	−	−		+	−		+	−		−	−		+	−		−	−	
浴室 A シャワー	−	−		+	−		−	*L. p.* SG9	10	+	−		+	*L. p.* SG9	X	+	*L. p.* SG9	1000	+	−		−	−	
浴室 A 給湯栓 1	+	*L. p.* SG9	530	+	*L. p.* SG1, SG6, SG9	100	+	*L. p.* SG6, SG9	40	+	−		+	*L. p.* SG9	3000	+	*L. p.* SG9	1000	+	*L. p.* SG9, *L.* sp.	170	−	*L. p.* SG1, SG9	10
浴室 A 給湯栓 2	+	*L. p.* SG1	110	+	*L. p.* SG9	120	−	*L. p.* SG9	20	−	−		+	−		+	*L. p.* SG6, SG9	1000	−	*L. p.* SG1	200	+	*L. p.* SG1, SG9	400
浴室 B 湯口	+	−		−	−		−	−		+	−		−	−		−	−		+	−		−	−	
浴室 B シャワー	+	*L. p.* SG1, *L.* sp.	60	ND	ND		−	−		+	−		+	−		−	*L.* sp.	10	+	*L.* sp.	20	+	−	
浴室 B 給湯栓 1	+	*L. p.* SG9	80	+	*L. p.* SG9	10	+	*L.* sp.	100	+	−		+	*L.* sp.	20	+	−		+	−		+	*L.* sp.	70
浴室 B 給湯栓 2	+	*L. p.* SG1	690	+	*L. p.* SG1	120	−	*L.* sp.	20	+	−		+	−		−	−		+	−		−	−	

1　実態調査の初回、2　流水処置実施後、3　カラン・シャワー交換後、4　高濃度塩素による消毒後、5　経過観察、
6　次亜塩素酸添加装置設置後

表２　医療機関 A の給水・給湯系の調査結果（平成 29 年度と平成 30 年度）

検体名	水系	種類	遊離残留塩素 (mg/L)		レジオネラ属菌				従属栄養細菌数 CFU/mL	
					検出菌	CFU/100mL	検出菌	CFU/100mL		
			2018	2017	2018		2017		2018	2017
病室 水道蛇口	給水系	初流水	0.38	0.1	*L. anisa, L. feeleii* SG1, *Legionella* sp.	200	*L. pneumophila* SG5, *L. feeleii* SG1, *Legionella* sp.	100	3100	181
	給水系	3L 流水後	0.93	0.1	*L. feeleii* SG1	10	*Legionella* sp.	300	41	33
	給湯系	初流水	0.51	0.3	*L. pneumophila* SG1,5, *L. feeleii* SG1, *L. anisa*	10	*L. feeleii* SG1, *Legionella* sp.	1000	53	31
	給湯系	3L 流水後	0.38	0.4	*L. anisa*	100	*L. feeleii* SG1, *Legionella* sp.	190	21	34
トイレ前 洗面台	混合	初流水	1.06	0.5	*L. pneumophila* SG1,5, *L. feeleii* SG1	100	*L. pneumophila* SG1, *L. feeleii* SG1, *Legionella* sp.	1000	254	5300
	混合	3L 流水後	1.07	0.6	*L. feeleii* SG1	40	*L. pneumophila* SG1, *L. feeleii* SG1, *Legionella* sp.	300	19	870
手術室 準備室	給水系	初流水	0.89	0.6	*L. feeleii* SG1	200	*L. feeleii* SG1, *Legionella* sp.	2100	3358	26
水道蛇口	給水系	3L 流水後	1.11	0.6	*L. feeleii* SG1	70	*Legionella* sp.	70	7	10
	給湯系	初流水	0.53	0.2	*L. feeleii* SG1	60	*Legionella* sp.	10	6	380
	給湯系	3L 流水後	0.66	0.2	不検出		不検出		1	2
手術室	混合	初流水	0.78	0.2	不検出		*Legionella* sp.	10	5	4
洗浄水道蛇口	混合	3L 流水後	0.88	0.5	不検出		不検出		1	3
受水槽	混合	初流水	1.14	0.7	不検出		不検出		21	9

表３　医療機関Ｂの給水・給湯系の調査結果（平成 29 年度と平成 30 年度）

検体名	水系	種類	遊離残留塩素 (mg/L)		レジオネラ属菌				従属栄養細菌数 CFU/mL	
					検出菌	CFU/100mL	検出菌	CFU/100mL		
			2018	2017	2018		2017		2018	2017
談話室右	加温装置	初流水	0.18	0	*Legionella* sp.	4000	*Legionella* sp.	1710	2623	1160
	加温装置	３Ｌ流水後	0.23	0.1	*Legionella* sp.	210	*Legionella* sp.	2000	600	219
談話室左	加温装置	初流水	0.21	0	*Legionella* sp.	100	*Legionella* sp.	280	680	4200
	加温装置	３Ｌ流水後	0.22	0.3	*Legionella* sp.	30	*Legionella* sp.	180	55	139
浴室 給湯栓	給水系	初流水	0.44	0	不検出		不検出		40	640
	給水系	３Ｌ流水後	0.48	0.3	不検出		不検出		0	6
	給湯系	初流水	0.02	0.05	不検出		不検出		12	11
	給湯系	３Ｌ流水後	0.02	0.1	不検出		不検出		2	6
浴室 洗面台	給水系	初流水	0.39	0	不検出		不検出		119	209
	給水系	３Ｌ流水後	0.48	0.3	不検出		不検出		21	9
	給湯系	初流水	0.02	0.05	不検出		不検出		28	22
	給湯系	３Ｌ流水後	0.02	0	不検出		不検出		6	12
個室 洗面	給水系	初流水	0.02	0	*L. anisa*, *Legionella* sp.	2000	*Legionella* sp.	100	540	1100
	給水系	３Ｌ流水後	0.1	0	*L. anisa*, *Legionella* sp.	200	*Legionella* sp.	40	64	38
	給湯系	初流水	0.01	0	*L. anisa*, *Legionella* sp.	2000	*L. micdadei*, *Legionella* sp.	500	2935	2150
	給湯系	３Ｌ流水後	0.03	0	*L. anisa*, *Legionella* sp.	600	*L. micdadei*, *Legionella* sp.	50	1190	280
4 人部屋 洗面	給水系	初流水	0.25	0.2	*L. anisa*, *Legionella* sp.	1000	*L. micdadei*, *Legionella* sp.	50	232	257
	給水系	３Ｌ流水後	0.41	0.3	*L. anisa*, *Legionella* sp.	30	不検出		79	275
	給湯系	初流水	0.02	0	*L. anisa*, *Legionella* sp.	12000	*L. micdadei*, *Legionella* sp.	160	630	710
	給湯系	３Ｌ流水後	0.02	0	*L. anisa*, *Legionella* sp.	4000	*L. micdadei*, *Legionella* sp.	20	510	269

表 4　医療機関 C の給水・給湯系におけるレジオネラ属菌汚染状況調査（平成 30 年度）

検体名	水系	種類	遊離残留塩素 (mg/L)	LAMP	レジオネラ属菌		従属栄養細菌数
					血清型	CFU/100mL	CFU/mL
地下控室（水栓）	給水	初流水	1.12	－	不検出		1840
	給水	3L 流水後	1.07	－	不検出		41
倉庫内（水栓）	給水	初流水	0.02	－	不検出		21900
	給水	3L 流水後	0.01	＋	不検出		2905
病室１	給水	初流水	1.12	－	不検出		2
	給水	3L 流水後	1.26	－	不検出		0
病室２（手洗い）	加温装置	初流水	1.14	－	不検出		102
	加温装置	3L 流水後	1.16	－	不検出		19
病室３（洗面用）	給水	初流水	0.98	－	*L. pneumophila* SG1	10	0
	給水	3L 流水後	1.26	＋	*L. pneumophila* SG1	10	0
病室４（洗面用）	給水	初流水	1.13	－	不検出		0
	給水	3L 流水後	1.29	－	不検出		0

図１　講演会・シンポジウムのポスター

資料１　講演会・シンポジウムで使用したアンケート

平成 30 年 10 月 27 日

講演会・シンポジウムに関するアンケート

本日は、「医療機関の給水・給湯系に潜むレジオネラ感染リスク」の講演会・シンポジウムにご参加いただき、ありがとうございました。お手数ですが下記のアンケートへのご協力をお願いします。(□にチェックまたは自由記載願います。)

本アンケートの結果は、今後の研究班の活動の参考とさせていただくとともに、本年度の研究報告書において報告させていただきますことをご了承ください。

質問１．貴方の勤務先をお聞きします

□行政 □医療機関 □施設管理 □施設設計 □検査・研究機関

□大学等教育機関　□上水場　□コンサルタント

□その他(　　)

質問２．今回の講演会・シンポジウムの内容はいかがでしたか？

□大変満足している　□満足している　□普通　□不満である

質問３．質問２の内容を具体的に教えてください。(複数回答可)

□問題を認識することができた

(具体的に　　)

□日常の問題や業務に生かすヒントが得られた

(具体的に　　)

□期待した内容だった(具体的に　　)

□期待した内容とは違っていた(具体的に　　)

□その他　(具体的に　　)

質問４．講演会・シンポジウムの講演時間はいかがですか？

□長い　□少し長い　□適当　□少し短い　□短い

質問５．特に興味を持ったテーマがあれば教えてください。（複数回答可）

☐　バイオフィルム―飲料水において微生物が社会生活を送る手段

☐　レジオネラ院内感染の国内外の動向

☐　レジオネラ肺炎の院内発症を契機に給湯・給水系のレジオネラ汚染の実態把握とその除菌対策

☐　レジオネラの院内感染事例とその対応

☐　浴室汚染で発生した院内レジオネラ症への対策

☐　汚染される理由と事例

☐　ビル等の給水・給湯設備と維持管理

☐　給水・給湯系のレジオネラ対策

質問６．「医療機関の給水・給湯系に潜むレジオネラ感染リスク」に関する今後の活動には何が必要とお考えですか？（複数回答可）

☐今回取り上げたテーマの講演会・シンポジウムの継続的な開催

☐今回取り上げたテーマに関する研究会の立ち上げと開催

☐問題解決のための研究の実施

☐実態調査

☐その他（　　）

質問７．ご意見・ご感想・今後取り上げてほしいテーマ等があればご記入ください。

ご協力ありがとうございました。

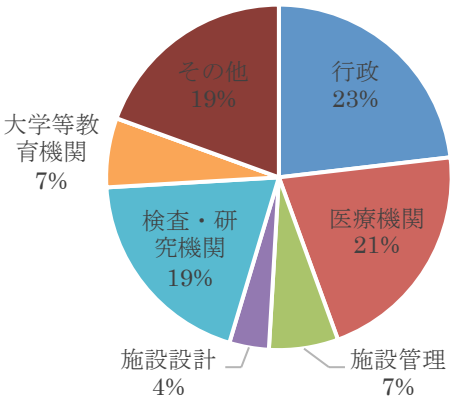


図２　講演会・シンポジウムの参加者の所属（質問１）

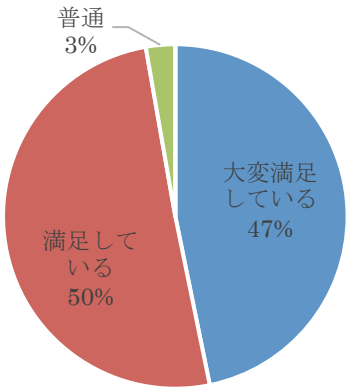


図３　講演会・シンポジウムに対する満足感（質問２）

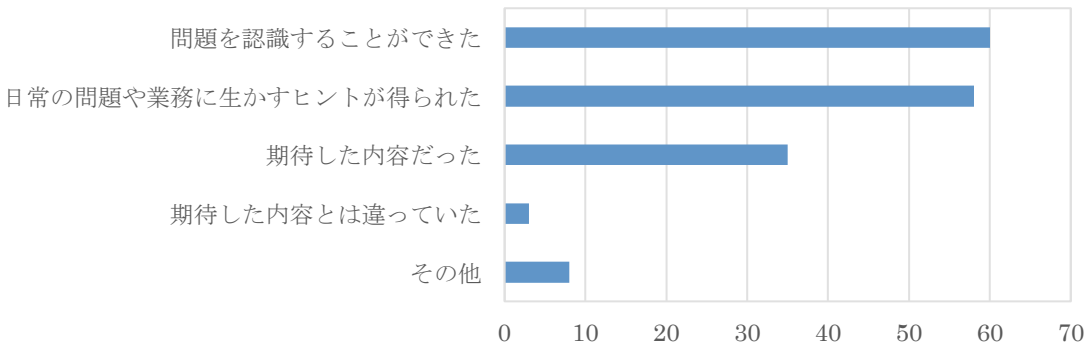


図４　満足感の内容（質問３）

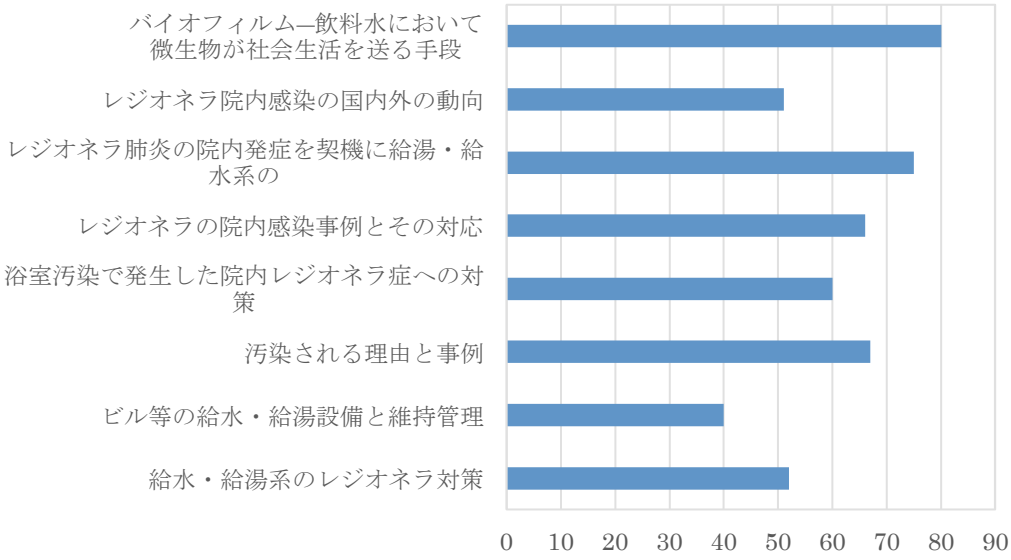


図５　興味を持った内容（質問５）

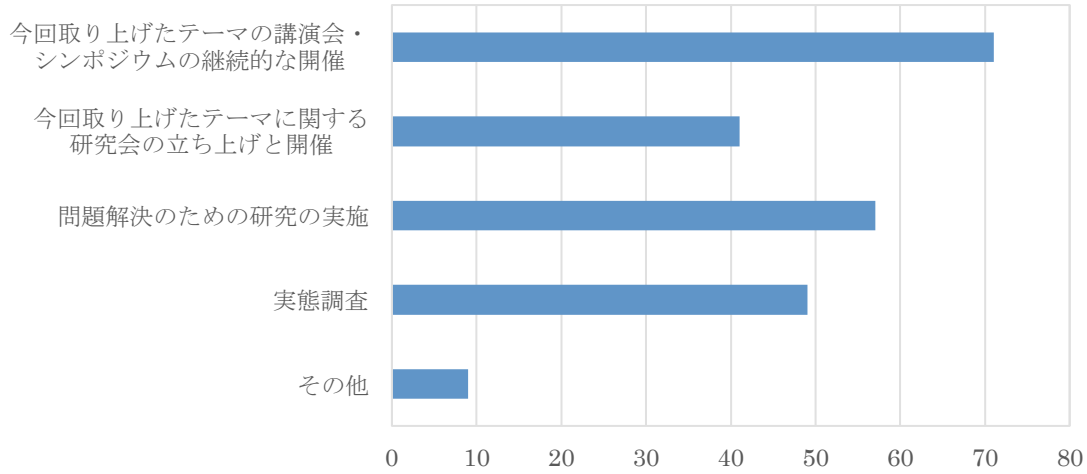


図６　今後必要と考えられる活動（質問６）

厚労科研(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」
平成 30 年度　分担研究報告書

研究分担者　国立感染症研究所　寄生動物部　八木田健司
研究分担者　国立感染症研究所　寄生動物部　泉山信司

レジオネラ感染とアメーバ

レジオネラ属菌の VNC 菌モデルと BCYE α での VNC 菌検出

研究要旨:

1. ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験を行った。BCYE α で CFU を測定し、BacLight により生菌数を測定した。室温で約 7 週間培養した時点で VNC 菌が約 64%存在した。一方同時に進めた4℃での培養では、VNC 菌がほとんど確認できなかった。
2. 酸化ストレス抑制効果や細胞内代謝、DNA 合成促進に関与する物質をサプリメントの形で BCYE α に添加したが、VNC 菌の発育を促進するものはなかった。
3. BCYE α 製品により菌の発育性が異なり、VNC 菌の評価に影響を与えること、また培養可能な菌の過少評価につながる可能性があることが示された。また調べた中では BD 社の自家調製 BCYE α において CFU が最も高かった。
4. 培地基材である寒天は、製品により培養可能な菌の発育が低下するものがみられ、BCYE α での菌発育に影響する因子の一つと考えられた。

A. 研究目的

これまでの宿主アメーバとレジオネラ属菌の相互作用に関する研究から、環境細菌であるレジオネラ属菌には BCYE α で難培養化する、いわゆる他の細菌類で観察される VNC(Viable but not culturable)菌と同様な生物学的変化が生ずることが示されてきた。遺伝子検査では存在が示唆されるものの、実際に目にみえない VNC 菌の存在は、レジオネラ属菌の生態、汚染の評価、感染リスクなど、あらゆるレジオネラ症の問題に関わる重要な問題であると考えられ、これを解析する手段が必要である。

本研究はこのレジオネラ属菌における VNC 菌の問題に対し、実験的に VNC 菌を誘導し、これを *in vitro* 検査、即ち汎用性のある寒天平板培地を用いて培養可能にし、その存在を可視化する方法を確立することにある。 本年度は VNC 菌のモデル実験と VNC 菌発育促進因子の探求及び BCYE α の質と VNC 菌検出の関係を調べた。

B. 研究方法

1. レジオネラ属菌株

L. pneumophila SG1 378 株(Lp と省略)を用いた。菌株は自家調製の平板培地 BCYE α /BD (Legionella Agar Base 218301、Becton, Dickinson and Company、以下単に BCYE α と略す)を用いて 30℃で培養し、実験に供した。

2. レジオネラ属菌の水環境における VNC 菌モデル

蒸留水をオートクレーブ後残留塩素濃度が 0.0 ㎎/L であることを確認し、これを用いて 5mMのリン酸バッファー溶液(pH7.1、以下PBと略す)を調製し

た。300ml容量の滅菌したメディウムボトルに 0.45μm フィルターろ過したPBを 200ml入れ、その中に滅菌したスターラーバーも入れたのち密栓し、実験室内で低速スターラー上でゆっくり攪拌が可能な環境を整えた。

BCYEαで 3 日間培養した菌を 10^{-5}OD となるように無菌的にボトル内 200mlのPBに添加し、密栓して室温ならびに 4℃で攪拌培養を行った。

菌の生残性は、以下の手順で調べた。培養ボトルのレジオネラ属菌浮遊PBを 100 倍希釈したのち、その 1ml を蛍光染色試薬 LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fisher)を添加して蛍光染色を行った。さらにその 0.1mlをポリカーボネートフィルター(0.2μm、25mmφ、ADVANTEC)中央にスポット(3－4mm径)しながら吸引ろ過した。十分にフィルターから水分を吸引後、退色防止剤で封入した。FITC 用B励起バンドパスフィルターで蛍光観察を行い、赤色蛍光菌体を死菌、緑色蛍光菌体を生菌としてその数を測定した。

3. BCYEαを用いた VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

本研究では、BCYEαあるいは菌体に様々な因子を加えることで VNC レジオネラ属菌が培地発育能を回復するかどうかを試験した。調べた因子としては、VNC コレラ菌等で培地発育能回復の効果が認められているカタラーゼ(ナカライテスク)やピルビン酸Na(ナカライテスク)、また加熱による菌体への物理的刺激、レジオネラ属菌の発育に関わる栄養的因子となっているαケトグルタル酸(Research Organic)など培地成分、また発育に制約を与える培地pH、そして一般的に細胞内代謝および DNA 増幅に関与するスペルミジン(富士フィルム・和光純薬)などである。pH調整を要する場合はオートクレーブ滅菌前に試験濃度に調整し平板を作製した。加熱で活性を失うようなカタラーゼなどは無菌的にBCYEα上に所定の濃度溶液 0.1mを塗布、乾燥後に試験した。単にpHのみの変化は標準BCYEαに対する1NKOHの添加量で調整した。上記のように調整した試験用BCYEαに、ボトル培養したレジオネラ属菌浮遊PBを 100 倍希釈し、その 0.1mlを平板に塗布し37℃で培養した。温度刺激試験は 100 倍希釈したレジオネラ属菌浮遊PBをウォーターバス中で 40-50℃に加温処理後、試験に供した。培地は培養 3-4 日後に CFU を測定した。各試験につき 3 枚の平板を用い、平均CFUを求めた。

5. メーカーの異なるBCYEαを用いた VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

BDのBCYEαに加え、市販されている製品 2 ブランドのBCYEα生培地の計 3 種類のBCYEαを用いて、ボトル培養で VNC 化したレジオネラ属菌の発育を比較した。菌の接種および培養条件は 4. と同様である。なお市販 BCYEαは使用期限 3ヶ月前のものを購入し、試験に供した。発育因子としてはカタラーゼ、αケトグルタル酸、スペルミジンと4℃培養菌では 50℃・5 分間の加温処理も因子として加えた。

6. メーカーの異なる寒天試薬で自家調製したBCYEαを用いた VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

培地基材の寒天、Agar が培地平板における細菌のコロニー形成に影響することが知られている。そこで BCYEαの成分である寒天以外の条件はすべて同一にして、細菌培地用として市販されている 4 種類の寒天試薬を用いて、各種寒天による自家調製の BCYEαを作製した。なお Yeast Extract には BD の Ｂａｃｔｏ Yeast Extract (212750) を使用した。菌の接種および培養条件は 4. と同様である。

C. 研究結果

1. レジオネラ属菌の水環境における VNC 菌モデル

ボトル内 PB にレジオネラ属菌を添加した時点をD0 として、その後撹拌培養を継続し、経時的に菌浮遊液を採取し、CFU をモニタリングした。結果を図1に示した。培養開始直後 D1の CFU は 262、以後室温では 100−300CFU の間を推移し、D49 時点で 224CFU を検出した。培地発育菌数の低下が見られないことから、コレラ菌等での低温培養による VNC 化のデータを参考に、D23 の時点で室温培養中の菌浮遊液を 100ml 滅菌ボトルに移し、4℃で撹拌培養を開始した。その結果、D35 の時点でCFU は 83 に低下、以後若干の低下を重ねて D49 時点で約 53cfu まで培地発育菌数は低下した。

ボトル培養中の菌について Bac Light で生残性を

調べた（図2）。室温培養菌は D21 時点で生菌数は 682cells/ml であった。このときの BCYEα発育菌数は 247CFU/ml であったことから、生菌数の 36.2%が BCYEαで発育した、即ち、残り 63.8%は VNC 状態と考えられた。一方、4C 培養の菌は D32 時点で測定し、生菌数は 64cells/ml、生菌数は 69CFU/ml であったことから、生残した菌のほぼすべてが BCYEαで発育し、VNC 菌としては残存していなかったと考えられた。なお死菌数も生菌数と同時に測定したが、菌体が明瞭に染色で判別できたもののみ測定しており、菌体が死んで変性した状態で染色されていると思われるものについては測定していない。従って測定した死菌数は参考値として記載するに止める（死菌数：室温培養菌 253cells/ml、4C 培養菌 25 cells/ml）

2. BCYEαにおける VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

室温培養菌は D14 以後、4℃培養菌は D32 以後、適時サンプリングし発育試験を行った。培養レジオネラ属菌の培地開発の中で重要な発育因子として見出されたαケトグルタル酸は、通常の 3 倍濃度まで変化させたが大きなCFUの変化は見られなかった（図3）。鉄 Fe は VNC の原因の一つと考えられる活性酸素による酸化ストレスを防ぐ SOD の補酵素であり、VNC 化に関連する可能性を考え通常の3倍濃度まで変化させたがCFUには変化がなかった（図4）。培地 pH は VNC の至適pH は通常と異なる可能性を考え、
pH6.6～7.8 まで変化させたが、通常のpH6.9 以上にCFUが上昇することはなく、アルカリ側ではCFUの減少が示された（図5）。

カタラーゼ（2000U/plate）、ピルビン酸(0.1%)は VNC 大腸菌での培地発育促進の効果が認められている。カタラーゼは室温培養菌において若干のCFU増加が見られたが、4℃培養菌では対照と比べてCFUの変化は見られなかった（図6）。ピルビン酸は 4℃培養菌に対し、発育促進効果を認めなかった。細胞内代謝活性化、DNA 合成促進につながる可能性のあるスペルミジンは、1mM/plate までCFUに変化はみられなかった（図7）。Yeast RNAも調べた範囲（～50mg/plate）でCFUの変化は見られなかった。

短時間の加熱 Heat shock が VNC コレラ菌の培地発育能回復に関係することから、レジオネラ属菌検査法の中で試料の前処理方法の一つである加熱（50℃）の条件を 4℃培養菌で試験した。CFUは 5 分間加熱では対照と差がなかったが、15 分間加熱では CFU の減少が示めされた（図8）。

3. メーカーの異なるBCYEαを用いた VNCレジオネラ属菌の培地発育能回復試験

自家調製した BCYE/BD と市販 BCYEα生培地（A 社ならびに B 社）を用いて、製品による VNC レジオネラ属菌の発育能を比較した。室温および 4℃で培養（D49）したレジオネラ属菌の発育を調べた結果を図9に示した。室温培養菌は自家調製BDの場合、対照では 224CFU であったのに対し、カタラーゼ添加は若干の増加を認めるものの、全体として各因子と対照の間には大差がなかった。一方 A ならびにB 社の場合はBD の結果と比較し、すべての因子について、70-90%の CFU の減少が見られ、BD よりも発育が抑制され

次に 4℃培養菌の場合は、BD の対照が 53 cfu であり、因子間のCFUは室温での結果と同様に大差がなかった。ただし 4℃培養菌でのみ調べた 50C・5 分間加温条件では、対照より明らかなCFUの減少が認められた。A ならびに B 社の場合は室温培養菌の場合と同様、すべての因子についてBD よりも発育が抑制された。図 10には室温ならびに 4℃培養したレジオネラ属菌の 3 種類の BCYEα対照実験における菌の発育状況を示した。

4. 異なる寒天試薬で自家調製したBCYEαを用いたVNCレジオネラ属菌の培地発育能回復試験

試薬として異なる4種類の市販寒天A～Dを用いて BCYEαを調製し、平板作製後直ちに試験に供した。調製方法は異なるが、対照としてBDのBCYEαを用いた。室温、4℃ともに培養時点 D52 の菌を用いた。

結果を図 11に示したが、室温培養菌の場合は寒天試薬間に若干の発育差が見られた。B ならびに D は 140CFU前後で差がなかったが、A が 125CFUとやや低くかったのに対し、C では 84CFUとなり B、D と比較し 40%の減少が見られた。一方 4℃培養菌の場合は、やはり C のCFUが最も低かったものの、全体として大差がなくすべての寒天試薬の結果は 40-60CFUの範囲に含まれた。なお対照として調べた BD の BCYEαの結果は、上記寒天条件

を変えたBCYEαの結果と大差が見られなかった。

D. 考 察

大腸菌やコレラ菌は、菌を栄養飢餓状態にする、また低温暴露することで実験的に VNC 状態に誘導できる。本研究では、まずレジオネラ属菌において、このような他菌種と同様な実験的 VNC 化が可能かどうか、水系環境のモデル実験で検証した。

今回の実験では、約 7 週間の室温条件での培養で残存した生菌の中に、BCYEα での発育能を喪失した菌が存在することを確認できた。レジオネラ属菌でも「生きているが（BCYEα では）培養ができない、発育しない VNC 菌」という存在を、実験的に証明した結果と考えた。このモデルは感染源となりやすい温泉のような高温条件での VNC 菌の特性（菌数や病原性など）について、重要な情報を提供する有用なモデルになるものと思われる

温度は VNC 菌への誘導因子であり、低温暴露の効果が他菌種で知られている。今回レジオネラ属菌で調べた結果では、4℃で培養したレジオネラ属菌は他菌種の VNC 形態とは異なり、培養不能な VNC 菌には移行せず、死滅に向かうことが示唆された。レジオネラ属菌は環境細菌ではあるが、低温環境はその生残性に対し大きなストレスになっているのかもしれない。寒冷期におけるレジオネラ属菌の野外環境における生態とどのような関係をもつのか、興味深い結果と考えられた。

目に見えない、培養不能なレジオネラ属菌を、どうすれば可視化して、また試料から分離できるのか。本研究では BCYEα を用いた培養をベースとして、この問題を考えた。BCYEα はレジオネラ属菌の細菌学的特性を考慮し開発された、ユニークな培地とされる。発育因子として見つかったαケトグルタル酸は、実は大腸菌 O157 の VNC 発育回復の因子でもあり、過酸化水素等による酸化ストレスを抑制する作用をもつ。これが BCYEα にも十分量含まれているということは、そもそも環境中で酸化ストレスに弱くなりつつも長期生存しているレジオネラ属菌を培養する上で、その抗酸化性が有用と判断された、ということではないかと思われる。

本研究では、αケトグルタル酸のような菌発育促進の培地サプリメントを探った。αケトグルタル酸も改めて濃度を変え、その効果を調べた。また可能性のある様々な物質を選択し試験した。結果としては、発育因子といえるものは見つからなかったが、酸化ストレス以外のVNC化因子、現状ではそれは不明だが、その因子の特性から BCYEα を改良し、VNC 菌を少しでも多く culturable にするという方法論があることを、本研究は示しているものと思われた。その根拠であるが、現在、BCYEα は生培地、また自家調製用粉末培地の形で、多くの企業が製造、市販している。各社製品の品質という点から見れば、かなり多様と考えられる。同一組成の培地間で菌発育性に差があれば、使われる試薬の品質と発育性との関係を知ることができ、培地の改良につながる。

研究期間の都合で今回は市販 2 種類の BCYEα 生培地と BD 社の自家調製用培地を用いたBCYEα について比較試験を行ったが、市販生培地で菌の発育性に大きな低下がみられた。この結果からすれば、調べた2種類の市販培地を基準にした場合、既にして自家調製培地は VNC レジオネラ属菌を culturable にする改良型 BCYEα である、と評価することができる。そして何が生菌の発育に促進的あるいは抑制的に作用するのか、これは実験的に証明することは可能と思われる。

今回、細菌のコロニー形成に影響を与えることが知られる寒天、Agar の品質が、レジオネラ属菌の発育性に影響することが明らかとなった。一部の製品ではあるが、発育阻害的な結果が見られたことから、寒天がBCYEα 製品の発育差に関係することが推測され、品質によってはBD社以上の菌発育を示すものがあることを期待させる結果である。同様に品質に差がありうる Yeast extract も検討の必要があると思われる。

本研究の結果は、VNC 菌とは、レジオネラ属菌に限らず培地によって評価が変わる相対的な存在であり、どのような培地あるいは培養法を基準にするかを含め、議論すべき点があることを示している。さらに現実的な問題として、BCYEα の製品によってはVNC 菌を含むレジオネラ属菌の存在と量を過少評価するリスクの可能性がある、ということも本研究で示されたと考えられる。より多くの生菌を検出する、可視化する（VNC 菌を減らす）ことは、レジオネラ症問題の現状についてのより正確な理解につながる。培地発育能の高い菌（例えば実験

室培養株）に加え、環境ストレス等で発育能の低下した菌も利用した評価と、それに基づく培養法、培地改良が必要であると考えられる、今後のレジオネラ症問題にその対策が活かされることを期待する。

E. 結　論

他菌種でみられる VNC 菌は、レジオネラ属菌においても認められることが明らかとなった。VNC 菌は見えない、分離できない菌であり、これを培地上で発育させることは難しく、現在汎用される BCYE α にも菌発育のサポート力には限界が見られる。さらに製品間で菌の発育性に差があり、培養可能な菌の過少評価にもつながる可能性がある。今後は VNC 菌も含めた培地性能の評価と開発が必要と考えられた。

参考文献

1. Mizunoe Y. et al., Arch Microbiol., 17, 63-67, 1999
2. Mizunoe Y. et al., FEMS Microbiology Letter, 186, 115-120, 2000
3. Wai S.N. et al., FEMS Microbiology Letter, 136,187-191, 1996

Ｆ．健康危険情報　なし

Ｇ．研究発表
1.　論文発表 なし
2.　学会発表　なし

Ｈ．知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得　なし
2. 実用新案登録　なし
3. その他　なし

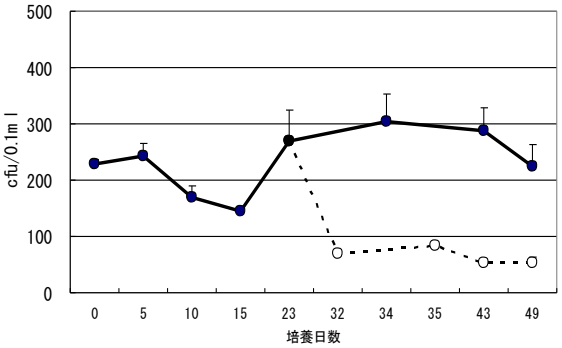


図1、ボトル水系環境におけるレジオネラ属菌の経時的CFUの変動
実践は室温培養、破線は4℃培養

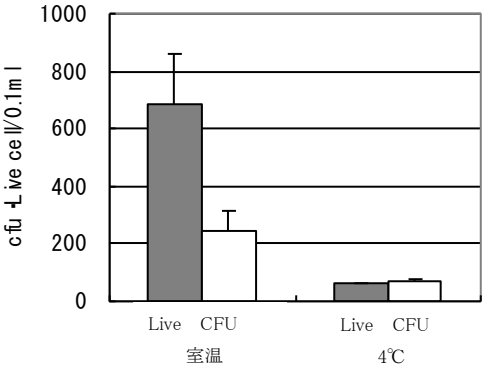


図２、ボトル水系環境での生菌数(Live)とCFU

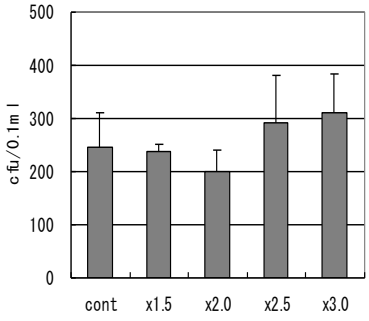


図３．αケトグルタル酸添加BCYEαにおける
VNCレジオネラ属菌の発育
菌は室温培養、横軸は対 cont 濃度比

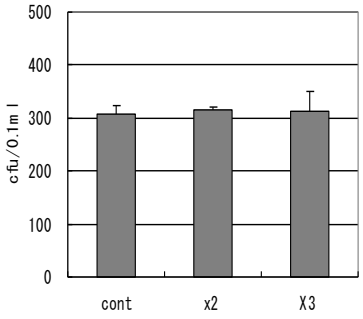


図４．ピロリン酸鉄添加BCYEαにおける
VNCレジオネラ属菌の発育
菌は室温培養、横軸は対 cont 濃度比

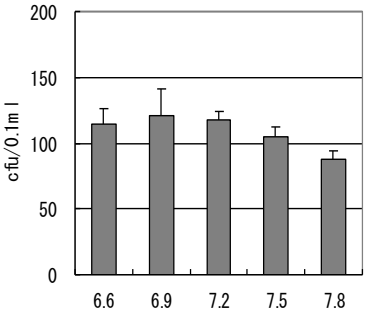


図５．pH調整BCYEαにおける発育
VNCレジオネラ属菌の
菌は室温培養、横軸は培地pH

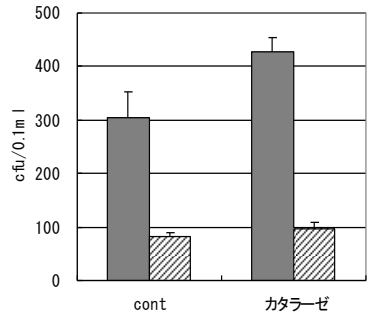


図６．カタラーゼ添加BCYEαにおける
VNCレジオネラ属菌の発育
室温培養菌、 4℃培養菌
カタラーゼ量は 2000U/plate

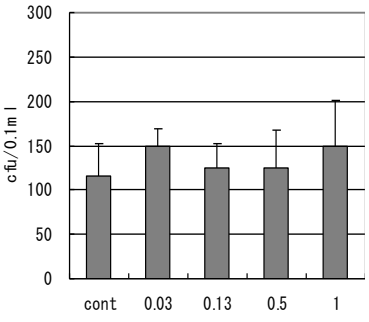


図7．スペルミジン添加BCYEαにおける
VNCレジオネラ属菌の発育
菌は室温培養、横軸は濃度mM

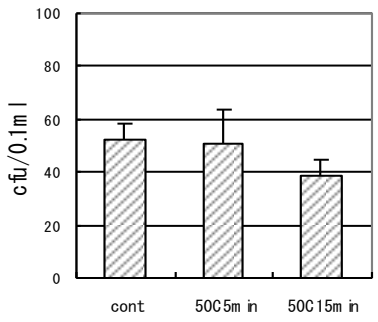


図8．加温前処理VNCレジオネラ属菌の
BCYEαにおける発育
菌は4℃培養、横軸は加温条件

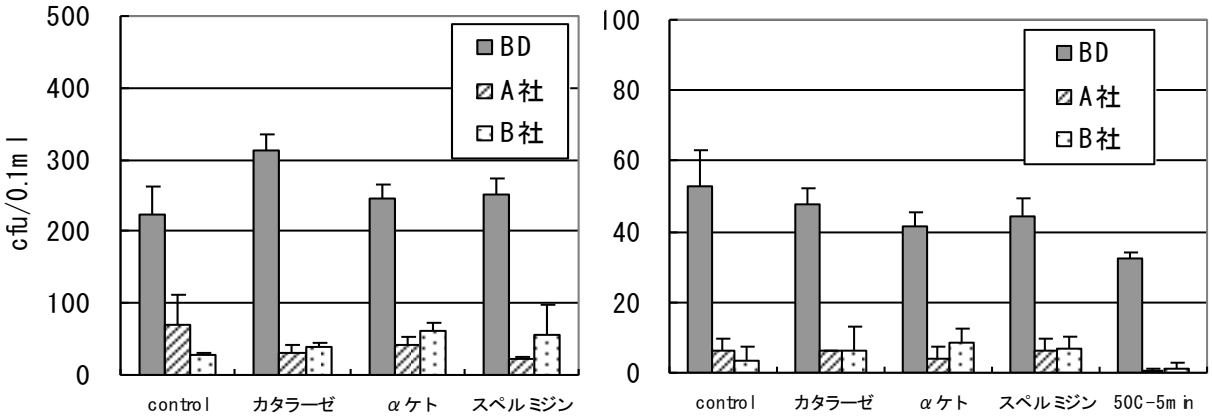


図9. 市販 BCYEα生培地(A ならびに B 社)と自家調製 BCYEα(BD 社)における VNC レジオネラ属菌の発育
左図:室温培養菌、右図:4℃培養菌、カタラーゼは 2000U/plate、αケトグルタル酸は通常の 2 倍濃度、スペルミジンは2mM で使用

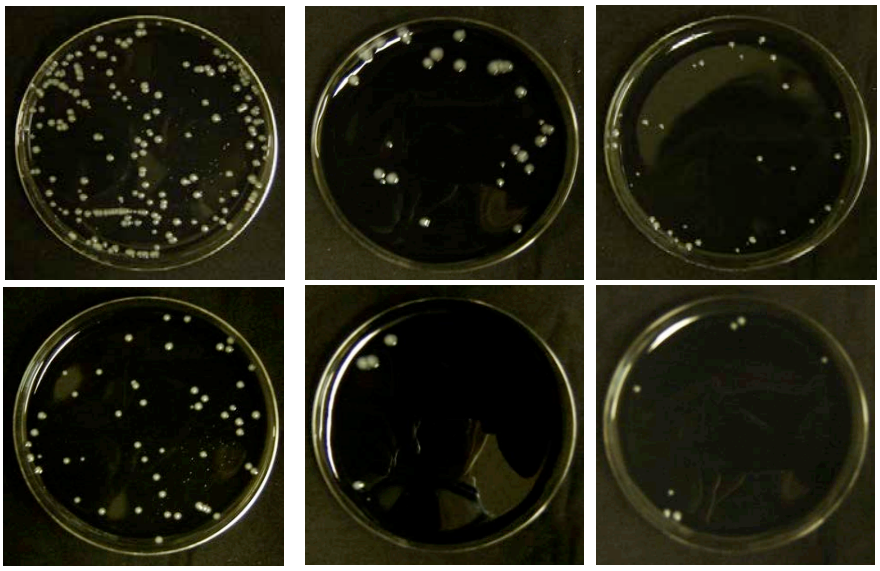


図 10. VNCレジオネラ属菌の 3 種類の BCYEαを用いた対照実験における菌の発育
左側:自家調製BCYEα(BD社)、中央:A社BCYEα、右側:B社BCYEα
上段:室温培養菌、下段:4℃培養菌

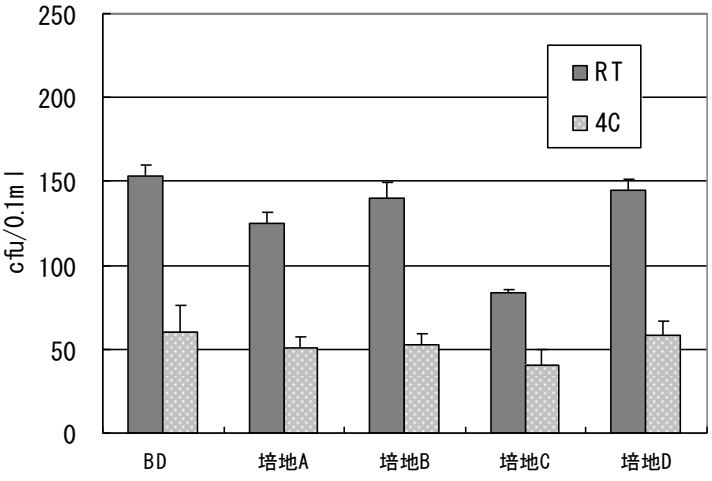


図11. 異なる寒天試薬(A－D)で自家調製したBCYEαを用いたVNC
レジオネラ属菌の発育

平成 30 年度厚生労働科学研究 （健康安全・危機管理対策総合研究事業）
公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究
研究代表者　　前川　純子（国立感染症研究所　細菌第一部）

分担研究報告書
モノクロラミン消毒のアルカリ性温泉への応用

研究分担者　泉山　信司　国立感染症研究所　寄生動物部
研究分担者　長岡　宏美　静岡県環境衛生科学研究所　微生物部
研究協力者　柳本　恵太　山梨県衛生環境研究所　微生物部
研究協力者　山上　隆也　山梨県衛生環境研究所　微生物部
研究協力者　植松　香星　山梨県衛生環境研究所　微生物部
研究協力者　久田　美子　山梨県衛生環境研究所　微生物部
研究協力者　森　康則　三重県保健環境研究所　衛生研究課
研究協力者　赤地　重宏　三重県保健環境研究所　微生物研究課
研究協力者　永井　佑樹　三重県保健環境研究所　微生物研究課
研究協力者　西尾　正也　花王株式会社　ハウスホールド研究所
研究協力者　山本　哲司　花王株式会社　ハウスホールド研究所
研究協力者　八木樹里奈　花王株式会社　ハウスホールド研究所
研究協力者　杉山　寛治　株式会社マルマ　研究開発部
研究協力者　田中　慶郎　株式会社マルマ　PC 営業部
研究協力者　市村　祐二　ケイ・アイ化成株式会社　機能性薬品部

研究要旨

pH が高い温泉施設では従前より遊離塩素による消毒が困難であったが、これまでの研究成果としてモノクロラミン消毒であれば有効なことが実験的に明らかになってきた。本研究では pH8 から 10 の 3 浴場施設にモノクロラミン消毒を適用し、改めてその効果を確認した。モノクロラミンは高濃度溶液の保存ができないので現場調製を要するが、機械的に行うには初期投資が問題となる。そこで手投入の方法を用意して、うち 2 施設に適用して消毒が可能であることを確認した。モノクロラミン消毒の普及を企図して、一般利用者と営業者向けの解説に、次の Web ページを用意した
（https://sites.google.com/view/legionella-resgr/monochloramine_index）。

A. 研究目的

レジオネラ症の報告数は年々増加しており、2018 年の速報値では 2,000 件を超えている。レジオネラ症の主な感染源は公衆浴場等の浴槽水とされ、次亜塩素酸ナトリウム（塩素）による浴槽水の消毒が指導されているが、鉄、マンガン、アンモニア態窒素が存在している場合や、特に高 pH の浴槽水では消毒効果が減弱し、レジオネラ汚染に苦慮している[1]。

結合塩素の一種であるモノクロラミンは、従来の遊離塩素消毒に代わる消毒法として期待されている[2)~4)]。これまでに毎日換水している pH10 のアルカリ性温泉においてもモノクロラミン消毒の有効性を確認しているが、例数がまだ少なく、

さらなる実績が求められている。モノクロラミンは高濃度溶液の保存がきかないことから現場調製を要するが、経済的な負担のある自動装置だけでなく、初期投資が抑えられる手投入があればより好ましい。モノクロラミンの単語は、臭気の原因となる（有機）クロラミンと混同される恐れがあり、モノクロラミン消毒の詳細について、一般利用者や営業者の理解を得ることも必要になってきた。例えば、モノクロラミン自体に臭気はほとんどなく、遊離塩素消毒に比べていわゆる塩素臭がしないことが利点であるといったことである。

そこで本研究では、多様な温泉施設の規模や形態を考慮しつつ、高 pH の温泉、換水頻度の低い温泉や、小規模な温泉での検証を進めることを目的とした。加えて、これまで得られた成果を平易な文章にまとめて、WEB ページにアップロードし、普及に資することも企図した。

B. 研究方法

当該研究では3営業施設の協力を得た。いずれの施設においても、利用者への配慮として、モノクロラミン消毒を実施している旨を掲示した。

施設 1　pH10 の公衆浴場に自動装置

pH10 の温泉水を使用している公衆浴場に、協力を依頼した（表 1）。試験対象は男湯女湯それぞれ 1 つの浴槽（同一系統、容量約 26 m^3）のみとし、他は従来の遊離塩素消毒で管理した。浴槽は循環式で、常時少量の源泉水が供給されていた。モノクロラミン生成装置（ケイ・アイ化成）を設置し、6 週間の実証試験を行った。モノクロラミン濃度は 3 mg/L を下回らないよう、タイマー式の一定量添加で管理した。浴槽水の全残留塩素を、毎日正午と 14 時頃に測定した。週に 1 回の完全換水をしており、それにあわせて 15～20 mg/L の高濃度のモノクロラミンで一晩配管を消毒した。消毒後はチオ硫酸ナトリウムにより塩素を中和し、排水した。試験前に 1 回、期間中は週に 1 回、浴槽水の採水と配管のふきとりを行った。**調査期間中に 1 日で 50 名弱の利用客の入浴があった。**

施設 2　pH10 **の公衆浴場で手投入**

pH10 の温泉水を使用している公衆浴場に、協力を依頼した（表 2）。当該研究では現場での簡便なモノクロラミンの調製方法として、図 1 の方法を考案した。具体的には、アンモニア系顆粒と次亜塩素酸系顆粒を十分量の水道水に溶解し、生成したモノクロラミンを浴槽水に加えた。モノクロラミン濃度は 1 時間に 1 回測定を行い、3 mg/L を下回らないよう濃度を管理した。試験前に 1 回、4 日間の試験期間中は毎日、採水と配管のふきとりを行った。施設の浴槽は複数あるが、試験対象は露天風呂（容量約 3 m^3）とし、他の浴槽水は従来の遊離塩素消毒で管理した。**調査期間中に 1 日で 100～200 名の利用客の入浴があった。**なお、浴槽水は循環式で、毎日換水し、清掃が行われた。

施設 3　pH8 の温泉施設で手投入

施設と同一敷地内から湧出するナトリウム－塩化物温泉を原湯として用いている（表 3）。同温泉水には、約 4～5 mg/L のアンモニウムイオンが含まれ、遊離塩素消毒が困難な水質であった。試験は 5 日間実施した。1 日目の朝から 5 日目の夜まで、同一温泉水による循環ろ過を継続し、手投入のモノクロラミンを用いて、浴槽水内のモノクロラミン濃度を 3 mg/L 以上を目安に調整した。この施設では通常、浴槽に温泉水を継ぎ足しながら利用していたが、本研究期間中は継ぎ足しを停止し、換水も行わないこととした。浴槽の大きさは 5.6m^3で、調査期間中に 100 名前後の利用客の入浴があった。浴槽水を、毎晩営業終了後(PM11:00 過ぎ)に採取した。

分析方法

微生物試験用の水試料はチオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に採水し、細菌培養用は冷蔵、アメーバ培養用は常温にて搬送･保存した。レジオネラ属菌は、0.20 μm フィルターでろ過濃縮した 100 倍濃縮液を、ふきとり検体は懸濁した原液を、それぞれ熱処理または酸処理し、

GVPC 寒天培地で 36℃、7 日間培養した。大腸菌群は浴槽水 100 mL を EC ブルー100P「ニッスイ」、一般細菌数は標準寒天培地を用いて 36℃、24 時間培養した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 42℃、14 日間で求めた。アメーバは、浴槽水原液および 1,000×g、5 分間で 50 倍に遠心濃縮した浴槽水から、大腸菌塗布無栄養寒天培地を用いて、42℃で 14 日間培養した。

pH（ガラス電極式 pH メーター、堀場）、遊離残留塩素と全残留塩素（DPD 法によるポケット残留塩素計、HACH 社）、モノクロラミン（インドフェノール法によるポケットモノクロラミン･アンモニア計、HACH 社）の測定を行った。アンモニア態窒素は、上記ポケットモノクロラミン･アンモニア計、あるいは**インドフェノール法により波長 640 nm の吸光度（紫外可視分光光度計、SHIMADZU UV-2450）から測定した。施設 3 では TOC（全有機炭素計、SHIMADZU TOC-V CPH）も測定した。**

C. 研究結果および考察

施設 1　pH10 の公衆浴場に自動装置

湯温は 40℃前後、pH は 9.42～10.06 であり、実証試験前における遊離残留塩素は 1 mg/L 程度、ただし全残留塩素濃度は 2.5 mg/L であった（表 4）。試験管内では、遊離塩素消毒に比べて、モノクロラミン消毒は安定であった（図 2）。ただし、180 分間で 3～4 mg/L 低下しており、全く消費されないわけではなかった。

モノクロラミン消毒試験の 6 日目に薬液不足、30 日目に停電、多くの入浴者の一度の入浴などの影響があり、全残留塩素濃度が 3 mg/L を下回ることがあった（図 3）。モノクロラミンは遊離塩素と比較して安定性はあったが、源泉水が常時供給されていたことから、濃度が低下する時間帯が生じた。濃度確認が 12 時と 14 時の 2 回は少なく、より高頻度な測定が必要と考えられた。費用をかけられるほど高性能な自動化が可能だが、費用を抑えた簡易な装置での維持管理は厄介であった。

モノクロラミン濃度が一時的に低下することはあったが、レジオネラ属菌は試験期間中の全ての浴槽水、配管ふきとり検体において検出されなかった。レジオネラ属菌増殖の温床となるアメーバ、衛生指標菌である大腸菌群についても、全て不検出であった。一般細菌数と従属栄養細菌数は、実証試験前と比較すると、濃度低下があった試験 6 日目に一時増加したものの、その後は適切な濃度管理や一晩での高濃度モノクロラミン消毒により、10 CFU/mL 未満を維持することができた（表 4）。

施設 2　**pH10 の公衆浴場で手投入**

湯温は 40℃前後、pH は 9.85～10.94 であり、実証試験前における遊離残留塩素は 0.6 mg/L であった（表 5）。

浴槽水のモノクロラミン濃度は午前中 1 回、午後 2 回の追添加により、いずれの試験日においても 3 mg/L 以上を 10 時間維持することができた（図 4）。手投入によっても、モノクロラミン消毒を維持できた。

レジオネラ属菌は実証試験前の浴槽水から 100 CFU/100mL 検出されたが、試験期間中には全ての浴槽水において検出されなかった（表 5）。また、配管ふきとり検体については全ての検体でレジオネラ属菌は検出されなかった。さらに、レジオネラ属菌増殖の温床となるアメーバ、衛生指標菌である大腸菌群については、全て不検出であった。一般細菌数と従属栄養細菌数は、実証試験前後を比較すると、いずれも全ての検体において減少した。

施設 3　pH8 の温泉施設で手投入

モノクロラミン濃度は、日によって添加量とタイミングを検討しながら、営業時間内は 3 mg/L 以上を維持するようにした（図 5）。源泉の pH は 7.3 と低かったが、時間の経過とともに 8.5 まで上昇した（表 6）。

モノクロラミン消毒中のレジオネラ属菌は、いずれも陰性であった（表 6）。しかしながら、同一検体中の一般細菌数、従属栄養細菌数は、経

日的な菌数の増加が認められた。レジオネラ属菌以外の何らかの細菌が、モノクロラミンに対して一定の抵抗性を有し、増加したと示唆された。

モノクロラミンの濃度管理に伴って、pH の上昇、アンモニウムイオン濃度の上昇、TOC の上昇がそれぞれ認められた。これらの濃度上昇は、モノクロラミンの添加と、入浴者の垢に由来するものと考えられた。浴槽水中の有機物濃度が高くなれば、その有機物を捕食する細菌の増殖リスクが考えられる。換水や洗浄等の衛生管理に留意する必要があると考えられた。

以上の通り、pH8 から 10 の浴槽水において、機械的な添加と手投入のいずれによっても、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌を抑制し、遊離塩素管理に比較して、衛生状態を良好に維持できた。換水頻度が低くても、レジオネラ属菌を抑制できていたが、雑菌の増殖、すなわちバイオフィルムの蓄積が心配されることから、洗浄はしっかり行う必要があると考えられた。

これまで本研究で得られた成果を、一般利用者と営業者に向けて平易な表現で記述し、Web ページで公開した。アドレスは、以下の通り、
https://sites.google.com/view/legionella-resgr/monochloramine_index
Google 検索で「レジオネラ研究班　google sites」と入れると、トップヒットしている（2019 年 3 月 13 日時点）。モノクロラミン消毒の活用が期待される。

D. 結論

pH8 から 10 のアルカリ性の浴槽水において、モノクロラミン消毒の実績を積むことができた。装置による機械的な生成と、手投入のいずれにおいても、モノクロラミン濃度の維持と、レジオネラ属菌の抑制が可能であった。換水頻度が低い場合は特に、雑菌の増殖、すなわちバイオフィルムの蓄積が心配され、換水と洗浄を徹底する必要性が示唆された。モノクロラミン消毒の活用を期待して、Web ページに解説を用意した。

E. 謝辞

本研究にご協力いただいた営業施設、管轄保健所衛生課に深く感謝します。

F. 参考文献

1. **杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，懸邦雄，遠藤卓郎：モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策，保健医療科学**, 59, (2010), 109~115
2. **杉山寛治 長岡宏美，佐原啓二，神田隆，久保田明，懸邦雄，小坂浩司，前川純子，遠藤卓郎，倉文明，八木田健司，泉山信司：モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策，防菌防黴**，45, (2017), 295~300
3. 長岡宏美、泉山信司、八木田健司、「社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について」、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「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究（研究代表者、前川純子）」より、平成 28 年度分担研究報告書
4. 田中忍、中西典子、野本竜平、有川健太郎、濵夏樹、岩本朋忠、温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証、神戸市環境保健研究所報、第 46 巻、39―42 頁、2018

G. 研究発表

誌上発表

なし

口頭発表

1. **柳本恵太、堀内雅人、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、山上隆也、植松香星、久田美子、泉山信司：**pH10 **のアルカリ性温泉におけるモノクロラミンの消毒効果、日本防菌防黴学会第** 45 **回年次大会、**2018 **年** 11 **月、東京都**
2. **柳本恵太：県内の公衆浴場におけるモノ**

クロラミン消毒検証について、山梨県衛生環境研究所感染症等研修会、2018 **年** 11 **月** 1 **日**

知的所有権の取得状況
特許申請、実用新案登録、その他
なし

表 1　施設 1 の源泉成分

項目	分析値	項目	分析値
pH	9.93	※硫黄	< 0.1 ppm
アンモニア態窒素	< 0.1 ppm	チオ硫酸イオン	2.5 ppm
総鉄イオン	0.1 ppm	塩化物イオン	7.6 ppm
マンガンイオン	< 0.1 ppm		

※硫化水素（H_2S）、硫化水素イオン（HS^-）、硫化物イオン（S_2^-）の合計値

表 2　施設 2 の源泉成分

項目	分析値	項目	分析値
pH	10.17	遊離硫化水素	< 0.1 ppm
アンモニア態窒素	< 0.1 ppm	チオ硫酸イオン	＜0.1 ppm
鉄（Ⅱ）イオン	0.03 ppm	硫化水素イオン	＜0.1 ppm
マンガンイオン	0.01 ppm		

表 3　施設 3 の源泉成分

項目	分析値	項目	分析値
pH	7.3	※硫黄	< 0.1 ppm
アンモニア態窒素	3.3 ppm	チオ硫酸イオン	< 0.1 ppm
総鉄イオン	4.5 ppm	塩化物イオン	4,025 ppm
マンガンイオン	2.3 ppm		

※硫化水素（H_2S）、硫化水素イオン（HS^-）、硫化物イオン（S_2^-）の合計値

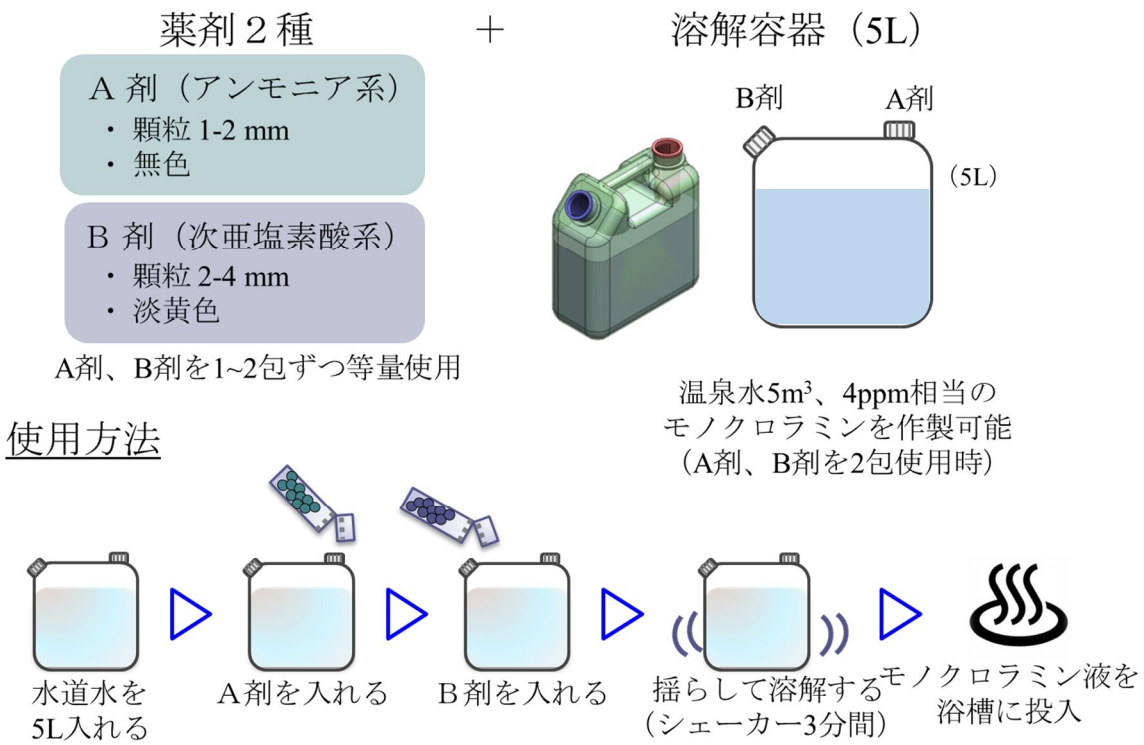


図１　手投入によるモノクロラミンの調製方法

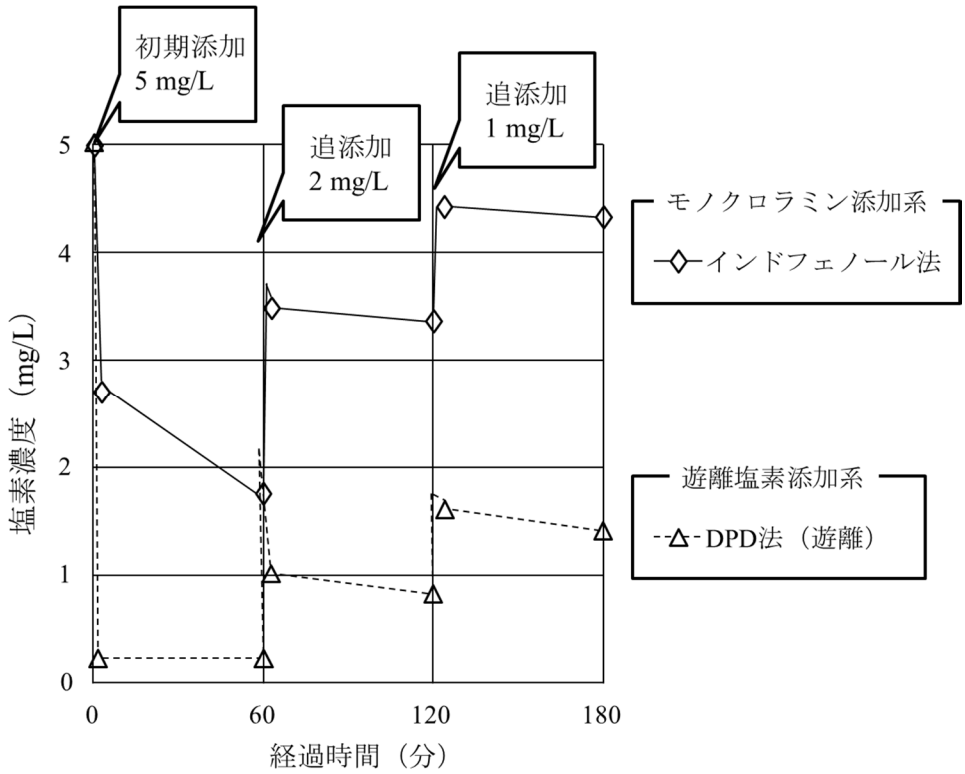


図２　施設１源泉でのモノクロラミン安定性

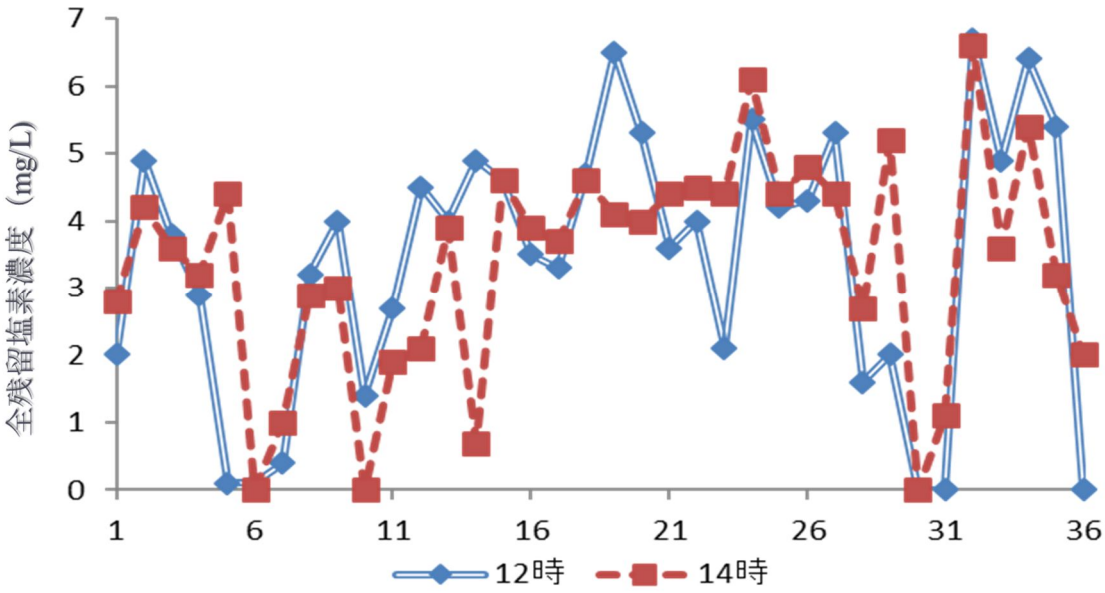


図 3　施設 1 浴槽水の全残留塩素濃度の推移

表 4　施設 1 における各種検査結果

検査項目	モノクロラミン導入前 (10/15)	採水1回目 (10/22)	採水2回目 (10/29)	採水3回目 (11/5)	採水4回目 (11/12)	採水5回目 (11/26)
レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
レジオネラ属菌 （ヘアキャッチャー配管ふきとり）	不検出	-	不検出	不検出	不検出	不検出
アメーバ数 (/ 50 mL)	0	0	0	0	0	0
大腸菌群 (/ 100 mL)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
一般細菌数 (CFU/mL)	0	1	1	2	0	0
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	5	370	6	6	4	4
pH	9.95	9.42	9.57	9.96	9.97	10.06
遊離残留塩素 (mg/L)	1.05	0.05	0.03	0.02	0.1	0.05
全残留塩素 (mg/L)	2.5	1.1	2.8	4.0	4.7	5.8
モノクロラミン (mg/L)	-	1.21	3.06	4.60	4.4	3.86
アンモニア態窒素 (mg/L)	-	3.0	1.7	3.9	0.93	8.7

*—：測定なし

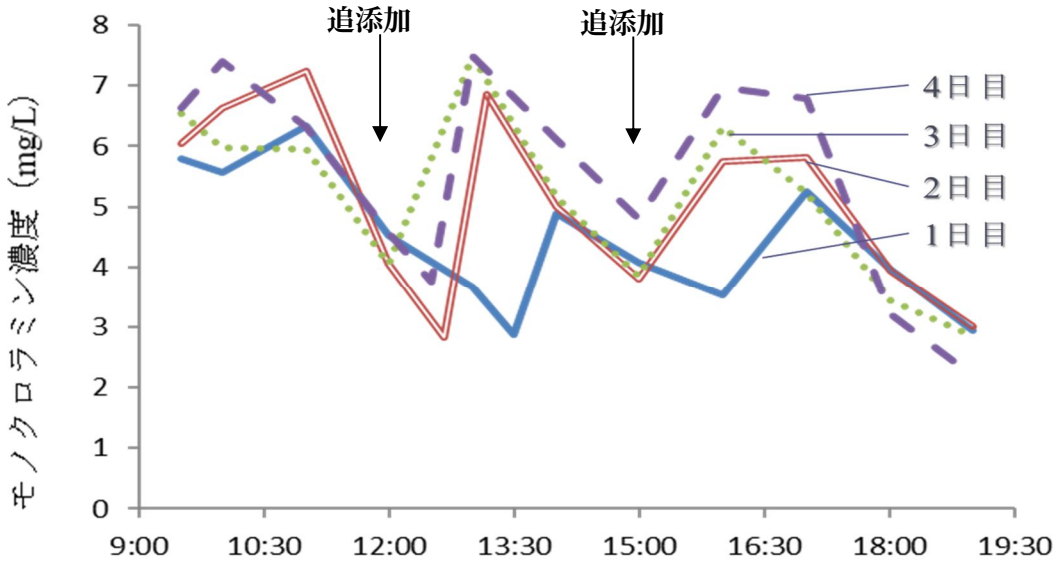


図 4　施設 2 の浴槽水のモノクロラミン濃度

表 5　施設 2 における浴槽水、配管ふきとり検体の検査結果

検査項目	モノクロラミン導入前 (7/29)	採水1回目 (7/30)	採水2回目 (7/31)	採水3回目 (8/2)	採水4回目 (8/3)
レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	100	不検出	不検出	不検出	不検出
レジオネラ属菌 （ヘアキャッチャー配管ふきとり）	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
アメーバ数 (/ 50 mL)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
大腸菌群 (/ 100 mL)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
一般細菌数 (CFU/mL)	15	1	9	6	5
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	118	0	5	1	9
pH	10.29	10.94	9.85	10.02	9.87
遊離残留塩素 (mg/L)	0.6	＜0.1	＜0.1	＜0.1	＜0.1
全残留塩素 (mg/L)	0.7	3.2	3.4	3	2.3
モノクロラミン (mg/L)	-	2.95	3	2.86	2.19
アンモニア態窒素 (mg/L)	-	0	0	0	0.04

*―：測定なし

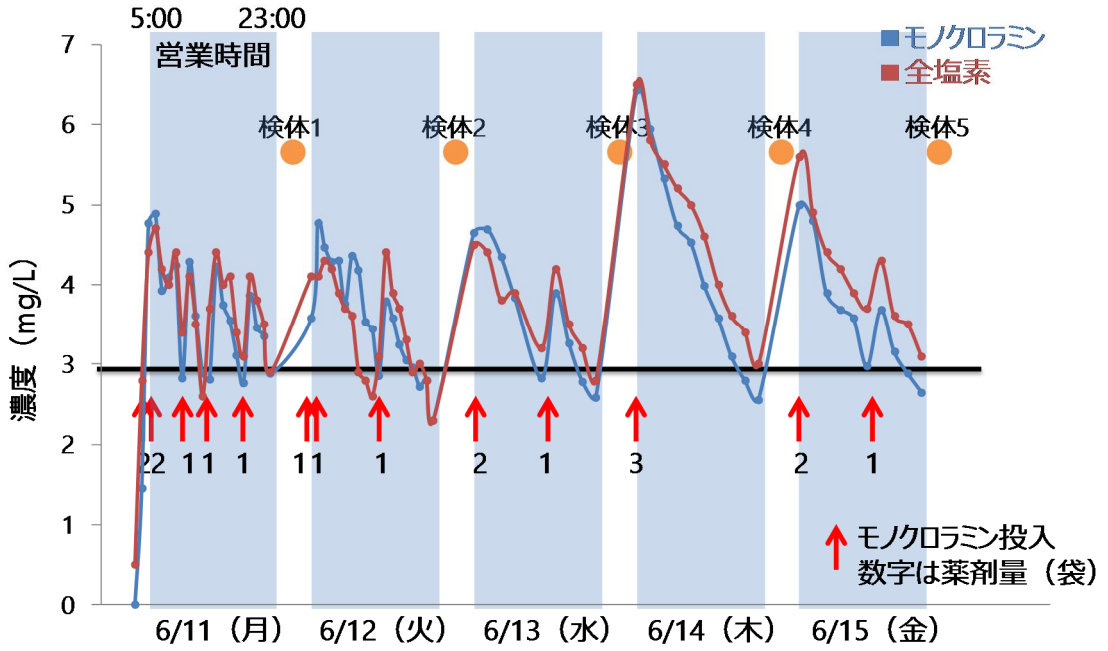


図 5　施設 3 における塩素濃度の推移

表 6　施設 3 における分析結果

日数*	1 日後	2 日後	3 日後	4 日後	5 日後
pH	8.15	8.34	8.44	8.50	8.54
NH_4-N (mg/L)	6.6	7.2	7.7	8.6	8.9
TOC (mg/L)	8.2	10.4	14.1	16.4	19.0
レジオネラ属菌数 (CFU/mL)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
一般細菌数 (CFU/mL)	不検出	27	16	4	1,080
従属栄養細菌 (CFU/mL)	4	31	14	26	210

※　日数は、実験開始（モノクロラミン消毒を開始）からの日数を示し、図 5 の検体 1 から 5 に対応する

平成 30 年度厚生労働科学研究 （健康安全・危機管理対策総合研究事業）
公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究
研究代表者　　前川　純子（国立感染症研究所　細菌第一部）

分担研究報告書
モノクロラミン消毒の薬湯への応用、並びに雑菌への対応

研究分担者　泉山　信司　国立感染症研究所　寄生動物部
研究協力者　藤井　明　(株)ヘルスケミカル
研究協力者　松田　宗大　(株)ヘルスケミカル
研究協力者　松田　尚子　(株)ヘルスビューティー
研究協力者　枝川亜希子　(地独)大阪健康安全基盤研究所
研究協力者　吉田　光範　国立感染症研究所　ハンセン病研究センター
研究協力者　星野　仁彦　国立感染症研究所　ハンセン病研究センター

研究要旨

公衆浴場等の入浴施設では、生薬や無機塩などの薬湯が使用されているが、レジオネラ属菌の増殖を招くことがある。ところが次亜塩素酸ナトリウムのいわゆる遊離塩素は激しく消費され、薬湯の種類によっては色が退色し、濃度管理は困難である。モノクロラミン消毒を用いることで、これら問題の解消と、レジオネラ抑制の両立が実現できた。一方、薬湯使用の有無にかかわらず、モノクロラミン消毒の長期継続により従属栄養細菌数の増加が確認されたため、その推移と菌種、並びに制御方法を検討した。モノクロラミン消毒下では、レジオネラが培養不検出であっても、LAMP 法が高率に陽性となったことから、消毒が LAMP 法の結果に及ぼす影響も確認した。

A. 研究目的

レジオネラ症の報告数は年々増加しており、2018 年の速報値では 2,000 件を超えている。レジオネラ症の主な感染源は公衆浴場等の浴槽水とされ、次亜塩素酸ナトリウム（塩素）による浴槽水の消毒が指導されているが、鉄、マンガン、アンモニア態窒素が存在している場合や、薬湯では消毒効果が減弱することから、その対策が必要となっている。

薬湯は、有機物や無機物の薬剤を浴槽水に溶解、懸濁して使用するが、遊離塩素消毒と両立せず、レジオネラが問題となることがある。言い換えると、薬湯に次亜塩素酸ナトリウムのいわゆる遊離塩素消毒を加えると、塩素は激しく消費され、薬湯は退色し、両者の濃度管理は著しく困難になり、レジオネラの増殖を来すことがある。そこで本研究では、薬湯に対して結合塩素の一種であるモノクロラミン消毒の適用を試みた。モノクロラミンは、温泉等の鉄、マンガン、アンモニア態窒素の存在下においても消毒効果が得られ、浴槽水中の安定性が高く消費量が少ないことから、従来の遊離塩素消毒に代わる方法として期待されている[1-2]。

一方、薬湯使用の有無に関係なく、モノクロラミン消毒の長期継続により従属栄養細菌数が増加することがあった[3-4]。本研究におい

ても従属栄養細菌数の増加を見たことから、その推移と菌種、並びに制御方法を検討した。雑菌に病原性はなくても、バイオフィルムの発生はレジオネラ属菌等の病原性細菌の増殖を招く恐れがあることから、菌数は少ないほうが好ましい。これに関連して、レジオネラ属菌を標的とした LAMP 法が陽性になることがあり、バイオフィルム中での増殖が懸念された。レジオネラ属菌を的確に検出できているのか、LAMP 法に及ぼす消毒の影響について併せて検討することとした。

B. 研究方法

B1 モノクロラミン消毒の薬湯への応用

神奈川県内に所在の一営業施設の協力を得て、実際の浴槽水を用いて検討を行った。すなわち、薬湯の実施、モノクロラミン消毒と各種塩素濃度の測定、レジオネラ属菌と従属栄養細菌数の検査を行った。

施設の循環式浴槽は複数系統あるが、試験を行ったのは、露天ひのき風呂系統のみとし、他は従来の遊離塩素消毒で管理した。井戸水を張った露天ひのき風呂において、生薬又は無機塩の薬湯を使用した（図 1）。消毒には、モノクロラミン（いわゆる結合塩素消毒）又は次亜塩素酸ナトリウム（いわゆる遊離塩素消毒）を用いた。モノクロラミン生成装置を設置し、タイマー式の制御で管理した。具体的には、モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムとアンモニウム塩溶液を用いて用時調製し、ろ過器手前に注入し、総残留塩素濃度 3mg/L 以上で管理した。次亜塩素酸ナトリウムは遊離残留塩素濃度 0.4mg/L 以上で管理した。薬湯の遊離塩素消毒では、退色が進むのに合わせて薬湯を追加投入した。浴槽水の湯色は目視又は吸光光度法により評価し、湯の香りは官能評価した。

採水直後に pH（ガラス電極式 pH メーター、堀場）、遊離残留塩素と全残留塩素（DPD 法によるポケット残留塩素計、HACH 社）の測定を行った。施設では、浴槽水の全残留塩素を、毎日 2～3 時間おきに測定した。

B2 雑菌への対応

試験期間中は任意のタイミングで採水し、各種微生物試験を行った。水試料はチオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に採水、冷蔵にて搬送、保存した。レジオネラ培養検査は、レジオネラ症防止指針に記載のろ過濃縮法 [5]に準じて行った。すなわち 100 倍ろ過濃縮液を熱処理または酸処理し、GVPC 寒天培地で 36℃、7 日間培養した [3]。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 25 ないし 37℃、2 から 3 週間で求めた。コロニー形状から優占であった 3 コロニーを釣菌し、常法に従い 16S rDNA 塩基配列を確認した。一般細菌数は標準寒天培地を用いて 37℃、48 時間培養した。

高濃度のモノクロラミン、あるいは次亜塩素酸ナトリウムを用いて、営業終了後に定期的に消毒を行った。洗浄後は、チオ硫酸ナトリウムにより中和し、排水した。浴槽水はセラミックろ材ろ過の循環式で管理されていたが、週 2 回完全換水し、ろ過器の逆流洗浄は毎日行われていた。

B3 LAMP 法への消毒の影響

LAMP 法への消毒の影響は、循環式浴槽において新しい湯を張り、無消毒下で循環約 2 時間後の浴槽水を試験水として用いた。この試験水に総塩素 3.5mg/L 前後となるよう調製したモノクロラミン溶液又は遊離塩素 0.5mg/L 前後となるよう調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加した。各消毒剤添加後は約 25℃に置き、1、3、5 及び 24 時間後に塩素濃度測定後、塩素を中和した試験水につき、レジオネラ属菌培養検査及び LAMP 法を行った。LAMP 法反応は添付文書の条件で実施した（レジオネラ検出試薬キット E、栄研化学）。

Legionella pneumophila（ATCC33152）より抽出した DNA 溶液を、直接に消毒する試験も実施した。DNA の抽出は QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いた。総塩素 4.4mg/L 前後となるよう調製したモノクロラミン溶液又は遊離塩素 0.7mg/L 前後となるよう調製した次亜塩素酸

ナトリウム溶液を、DNA に添加した。各消毒剤添加後は約 25℃に置き、15 及び 30 分、1、3、5 及び 24 時間後に採水し、塩素濃度も測定した。塩素を中和した試験水を鋳型として、LAMP 法を行った。

C. 研究結果および考察

C1 モノクロラミン消毒の薬湯への応用

薬湯管理における塩素注入量と塩素濃度の推移、及び薬湯の状況を図 2 及び図 3 に示した。生薬及び無機塩薬湯使用時のいずれにおいても、モノクロラミンは総残留塩素濃度として 3mg/L 以上の維持が可能であり、レジオネラ属菌は検出されなかった。薬湯の退色や香りの変化は認められず、薬湯の追加投入の必要がなかった（表 1）。

一方、次亜塩素酸ナトリウムでは、生薬による塩素の消費が激しく、薬湯の色を保持しながら、遊離残留塩素濃度を 0.4mg/L 以上に安定的に維持することは困難であった。無機塩薬湯使用時も同様で、遊離残留塩素濃度が上昇するに従って薬湯は顕著に退色した（図 4）。適正な塩素濃度と薬湯の維持の両立が極めて困難であった。

C2 雑菌への対応

モノクロラミン消毒を継続しておよそ 3 週目以降に従属栄養細菌数が増加し、10^4～10^5CFU/mL の濃度で推移した（図 5、1 月 3 日～2 月 20 日頃）。R2A 寒天培地より釣菌した優占 3 コロニーのうち、2 株は *Mycolicibacterium phlei*（1 株の塩基配列が 100％一致（466/466bp）、もう 1 株は 99.8% 一致（465/466））、1 株は *Microbacterium aurum*（99.4%＝466/469）に近縁な *Microbacterium* sp.（100%＝469/469）と同定された。*M. phlei* は、モノクロラミン消毒の浴槽で以前にも報告されており、病原性はないとされているが、バイオフィルムの蓄積は好ましくないと考えられた。

高濃度塩素消毒を行ったが、従属栄養細菌数は一過性に減少しただけであった（図 6）。モノクロラミン(総塩素 3～6mg/L)消毒下 10^5 の菌数は、次亜塩素酸ナトリウム(遊離塩素 0.2～0.9mg/L)に切替後は 10^2 に、その後再びモノクロラミンに切替後は 10^4 まで増加した(図 5)。また、モノクロラミン及び次亜塩素酸ナトリウム消毒下いずれの期間においても、*M. phlei* が検出された。週 1 回、60mg/L、1 時間の高濃度塩素消毒実施により、10^2～10^3 レベルの菌数低下は見られたが、3 日後にはほぼ元の菌数に戻った。60mg/L、7 時間の消毒でも同様の結果であった。持続的な低減のためには、モノクロラミン消毒の場合は、週に 2 回以上が従属栄養細菌数の低減に必要と考えられた。バイオフィルムを徹底して除去することが好ましいと考えられた。

C3 LAMP 法への消毒の影響

レジオネラ検査では、試料水から培養法で 60CFU/100mL を検出し、LAMP 法も陽性であった。ここにモノクロラミン約 3.5mg/L 及び次亜塩素酸ナトリウム約 0.5mg/L を添加して 1 時間後は培養法不検出であった。LAMP 法は、モノクロラミン添加の 24 時間後でも陽性であった。次亜塩素酸ナトリウム添加では、3 時間後以降に不検出であった（表 2）。

DNA にモノクロラミンあるいは次亜塩素酸ナトリウムを直接に添加すると、モノクロラミン約 4.4mg/L では 24 時間後でも LAMP 法陽性であった（表 3）。次亜塩素酸ナトリウム約 0.7mg/L 添加では 15 分後から LAMP 法で不検出となった。すなわち、モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムと比較して、DNA を分解（あるいは変性）しない結果であった。仮に、浴槽水がモノクロラミン消毒によりレジネラが培養不検出となっても、LAMP 法陽性が長時間続く場合があると考えられた。一方、次亜塩素酸ナトリウムでは速やかに LAMP 法で不検出となり、消毒が DNA 検出に及ぼす影響は大きく異なっていた。

以上の結果に従えば、モノクロラミン消毒では LAMP 法陽性でも培養法不検出の可能性が高く、遊離塩素消毒の LAMP 法陽性は消毒の不足が示唆されそうである。レジオネラの DNA 検

査の解釈には、使用消毒剤の把握が必要であり、いずれの陽性にしても、浴槽やろ過器に汚染とバイオフィルムの存在が示唆されることから、消毒･洗浄作業が不可欠と考えられた。

D. 結論

生薬及び無機塩薬湯の塩素管理には、次亜塩素酸ナトリウムに比べてモノクロラミン消毒が有用であった。すなわち無機塩及び生薬のどちらの薬湯においても、モノクロラミンの濃度維持が可能であり、レジオネラ属菌は検出されなかった。モノクロラミン消毒では薬湯の色や香りに対する影響が少なく、薬湯の使用量が少なく済んだ。モノクロラミン消毒を継続していて、*M. phlei* が検出された。高濃度塩素消毒は従属栄養細菌数を一過性に減少させたが、週に 2 回以上の消毒や、洗浄によるバイオフィルムの徹底除去が必要と考えられた。モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムと比較して、DNA を分解又は変性しない結果であった。

E. 参考文献

1. **杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，懸邦雄，遠藤卓郎：モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策，保健医療科学**, 59, (2010), 109~115
2. **杉山寛治 長岡宏美，佐原啓二，神田隆，久保田明，懸邦雄，小坂浩司，前川純子，遠藤卓郎，倉文明，八木田健司，泉山信司：モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策，防菌防黴**，45, (2017), 295~300
3. 長岡宏美、泉山信司、八木田健司、「社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について」、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「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究（研究代表者、前川純子）」より、平成 28 年度分担研究報告書
4. 田中忍、中西典子、野本竜平、有川健太郎、濵夏樹、岩本朋忠、温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証、神戸市環境保健研究所報、第 46 巻、39―42 頁、2018
5. レジオネラ症防止指針作成委員会：レジオネラ症防止指針（第 3 版）、pp.28～36、2009、（財）ビル管理教育センター

F. 研究発表

誌上発表

なし

口頭発表

1. **藤井明、渡邉貴明、松田宗大、松田尚子、小倉徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、薬湯使用時におけるモノクロラミン消毒の有用性評価、第 46 回建築物環境衛生管理全国大会、2019 年 1 月、東京都**
2. **渡邉貴明、松田宗大、小倉徹、植園健一、松田尚子、枝川亜希子、泉山信司、藤井明、循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について、日本防菌防黴学会、2018 年 11 月、東京都**
3. **小倉徹、植園健一、渡邉貴明、松田宗大、原口浩幸、森中りえか、枝川亜希子、藤井明、モノクロラミン及び次亜塩素酸ナトリウム消毒下におけるレジオネラ属菌の LAMP 法結果に及ぼす影響、日本防菌防黴学会、2018 年 11 月、東京都**

知的所有権の取得状況

特許申請、実用新案登録、その他

なし

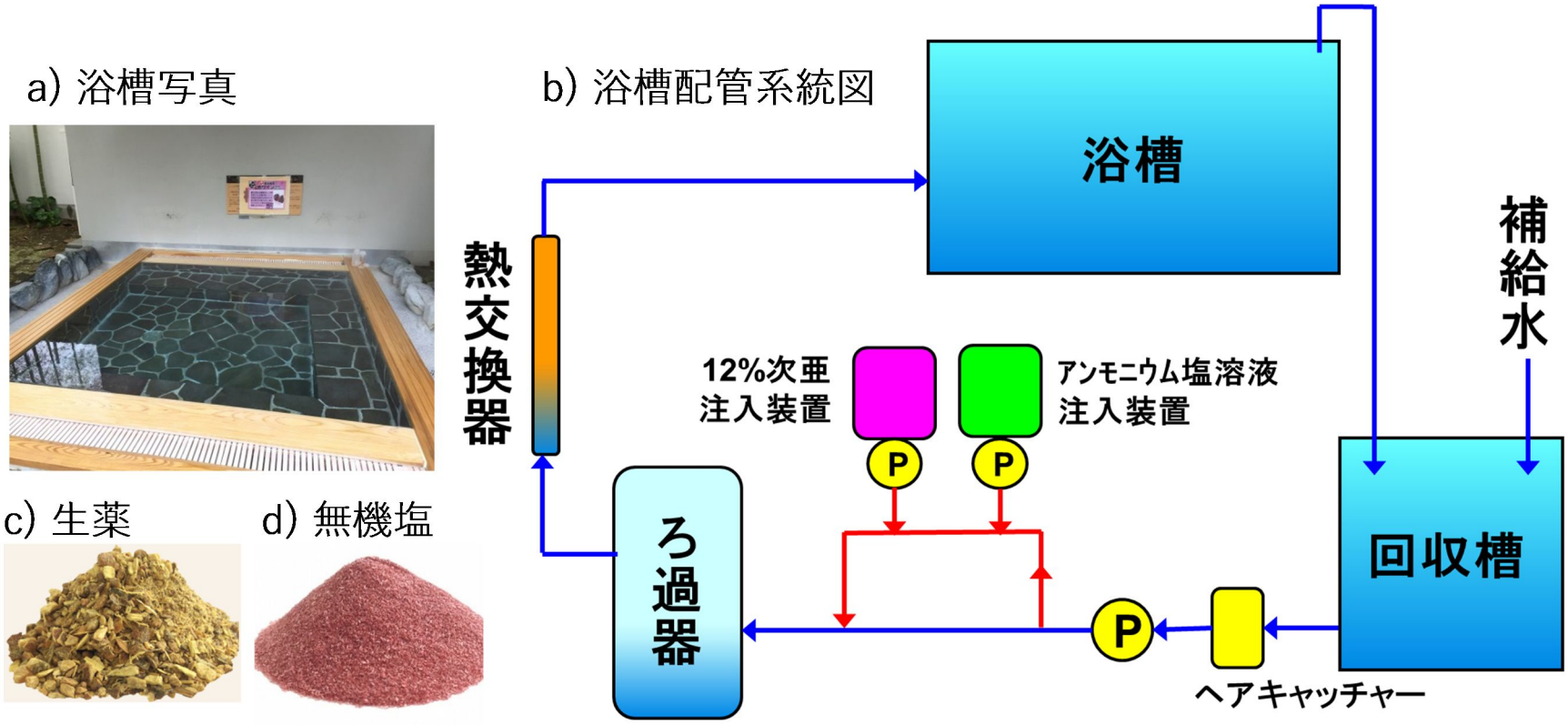


図 1　試験施設概要

施設は神奈川県内のいわゆるスーパー銭湯で、入館者数は 1 日あたり平日で 800 人、土日祝日は 1,700 人ほど。

a)浴槽写真、露天のひのき風呂。

b)浴槽配管系統図、総水量は 7m³、ろ過器にセラミックろ材を使用。ろ過器の手前にモノクロラミン消毒装置（並びに遊離塩素消毒装置）を設置。現在は推奨されない回収槽を利用しており、レジオネラ属菌により汚染されやすい難がある。

c, d)薬湯に添加する薬剤の写真、生薬あるいは無機塩の薬湯を使用している。

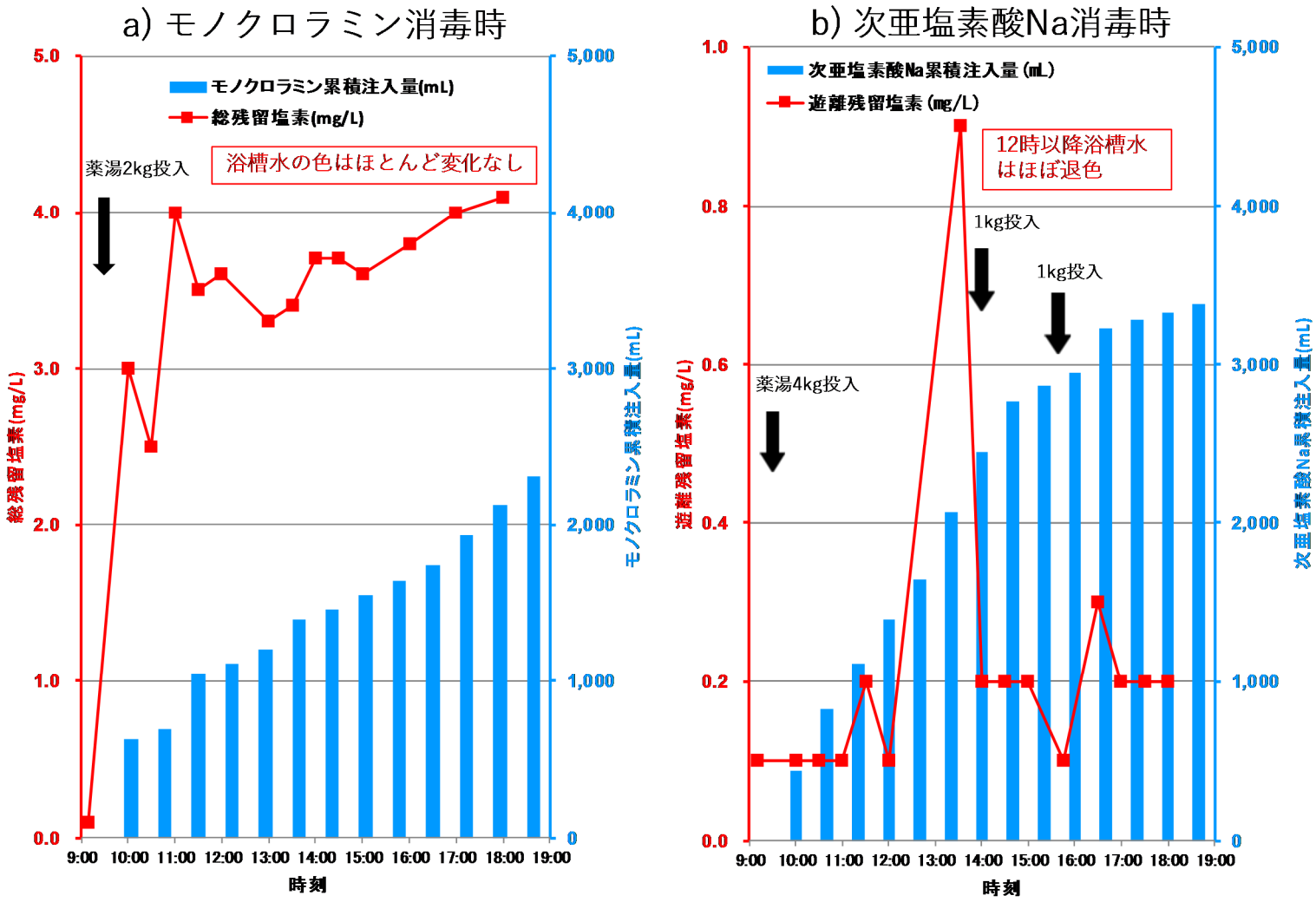


図２　生薬使用の薬湯に対する塩素消毒の推移

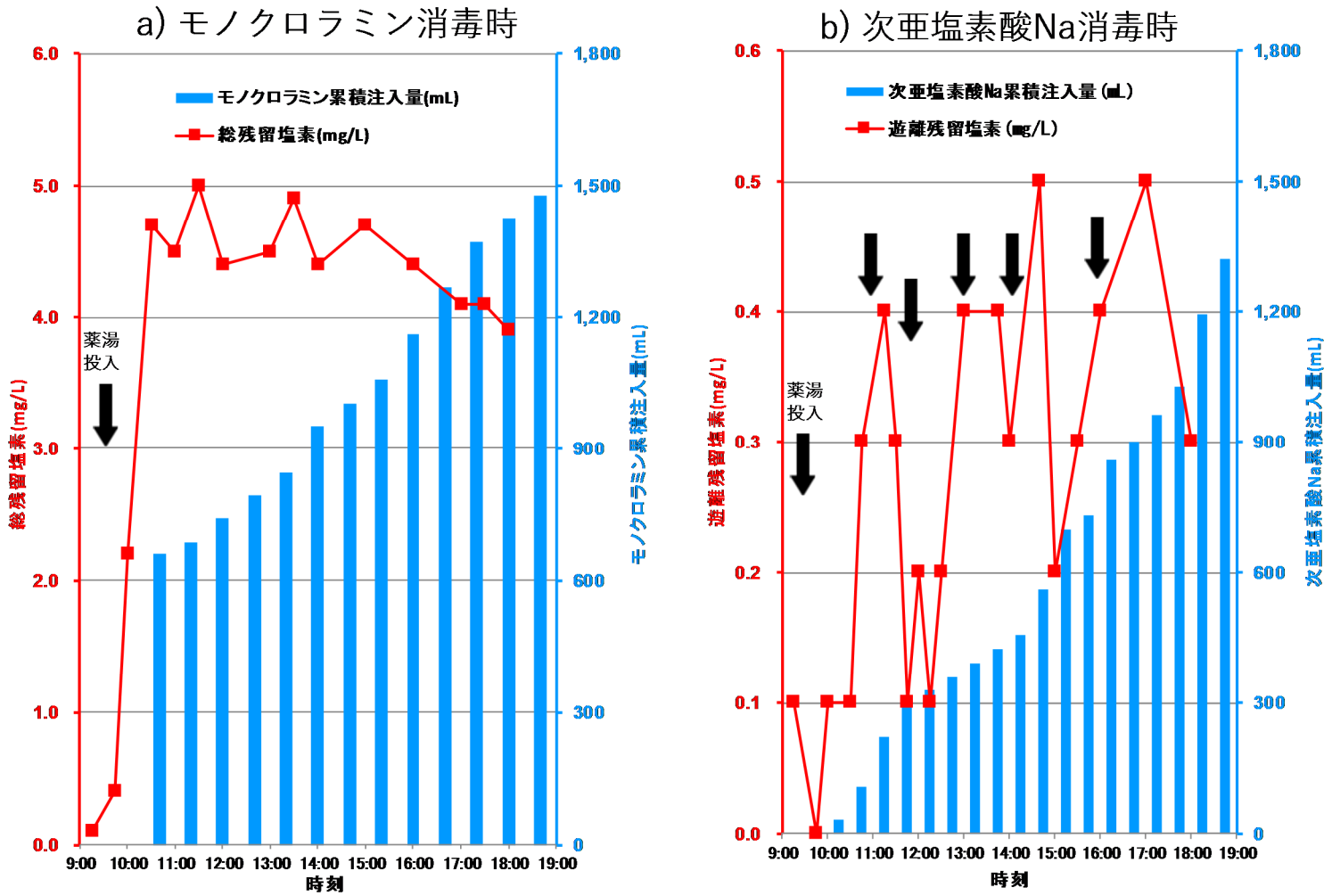
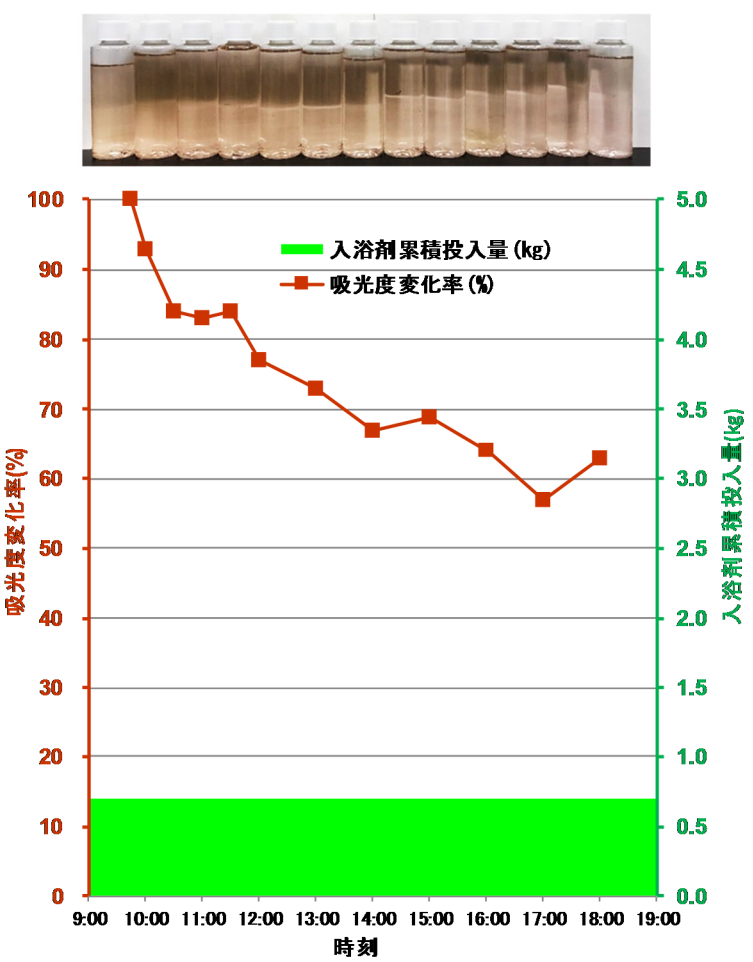


図 3　無機塩の薬湯に対する塩素消毒の推移

a) モノクロラミン消毒時



b) 次亜塩素酸Na消毒時

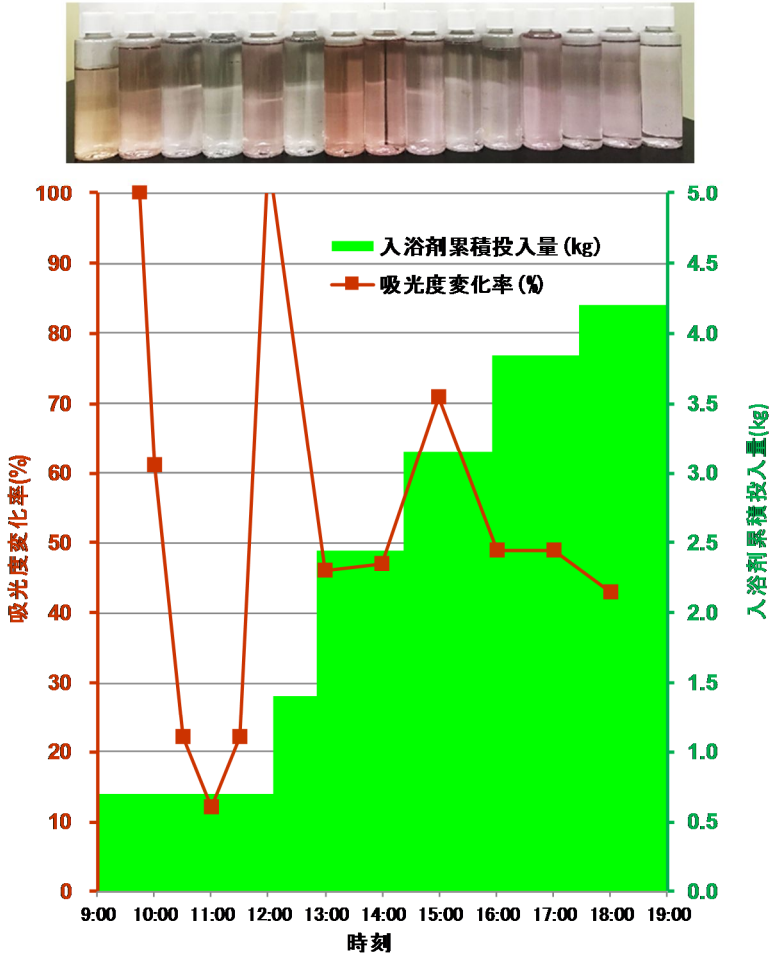


図４　無機塩の薬湯の色調の変化

表１　薬湯に対するモノクロラミン消毒と次亜塩素酸ナトリウム消毒の比較

項　　目	生薬薬湯		無機塩薬湯	
	モノクロラミン	次亜塩素酸Na	モノクロラミン	次亜塩素酸Na
残留塩素の保持性	◎	×（消費が激しい）	◎	×（消費が多い）
レジオネラ属菌不検出	◎	○（適正濃度維持が条件）	◎	○（適正濃度維持が条件）
浸出色の維持	◎	×（退色）	◎	×（退色・色調変化）
入浴剤使用量	◎（少ない）	×（多い）	◎（少ない）	×（多い）
においの保持性	◎	×（塩素臭に変化）	◎	○
◎：極めて良好、○：良好、△：やや不良、×：不良				

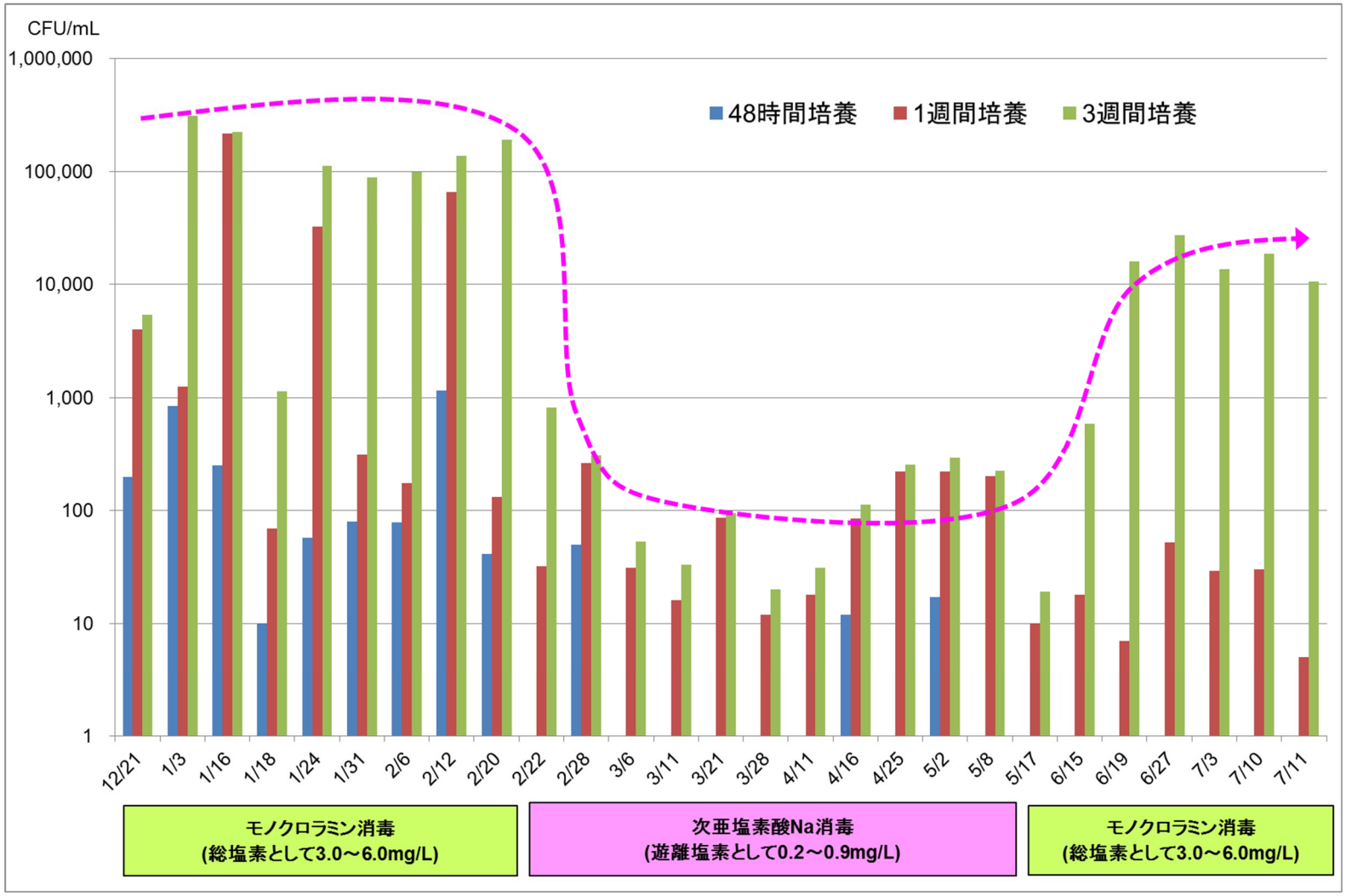


図５　モノクロラミン消毒時の従属栄養細菌数の推移

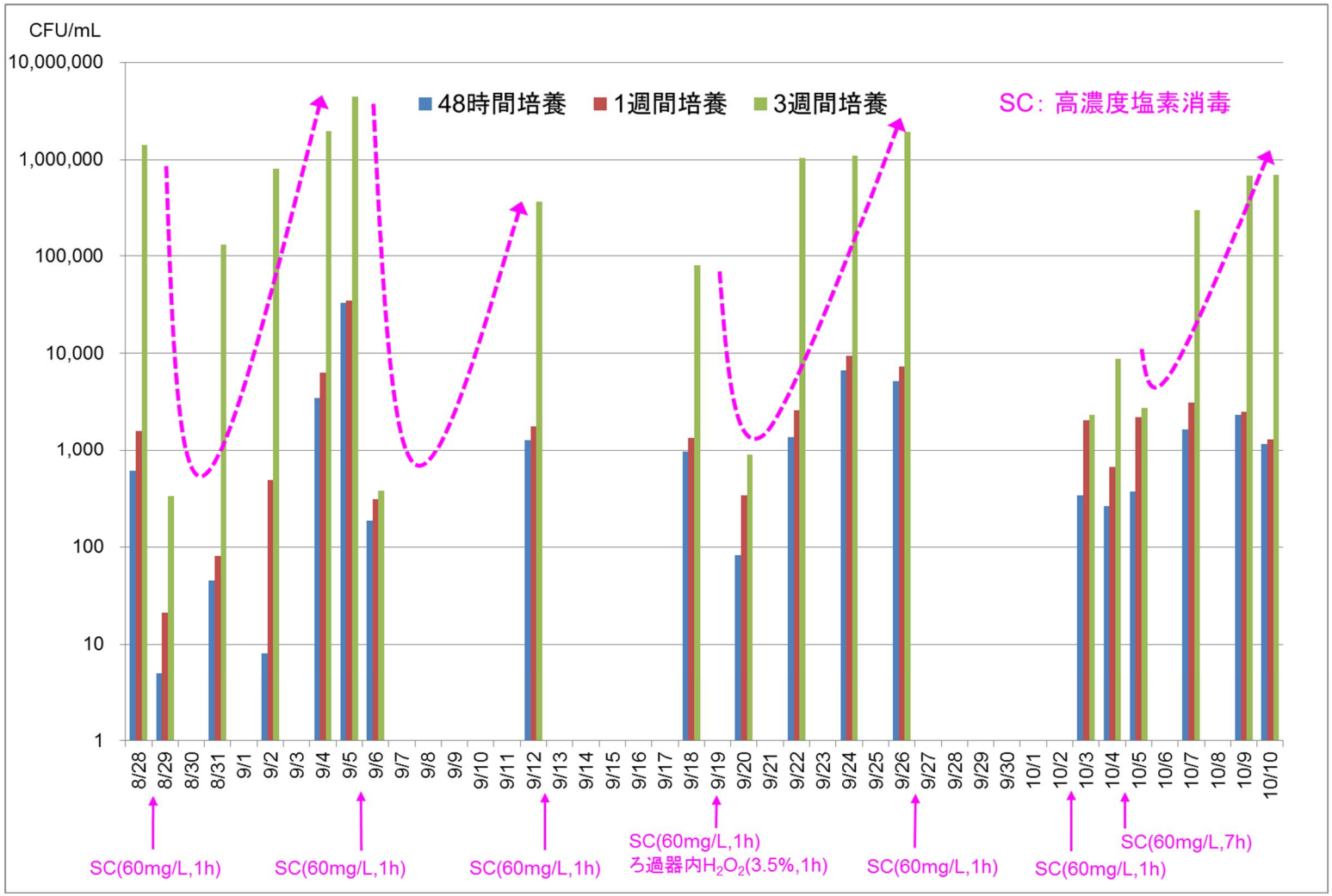


図 6　高濃度塩素消毒後の従属栄養細菌数の推移

表 2　浴槽水中のレジオネラ属菌の消毒と LAMP 法検出の関係

消毒剤	測定項目	消毒剤添加後、経過時間				
		0h	1h	3h	5h	24h
無添加	培養菌数（CFU/100mL）	60	―	―	―	不検出
	LAMP (Tt 値:min)	21.1	―	―	―	19.9
	遊離塩素濃度(mg/L)	0	―	―	―	0
モノクロラミン	培養菌数（CFU/100mL）	―	不検出	不検出	不検出	不検出
	LAMP (Tt 値:min)	―	18.5	19.5	21.4	23
	総塩素濃度(mg/L)	3.5	3.6	3.5	3.5	3.5
次亜塩素酸 Na	培養菌数（CFU/100mL）	―	不検出	不検出	不検出	不検出
	LAMP (Tt 値:min)	―	19.1	不検出	不検出	不検出
	遊離塩素濃度(mg/L)	0.6	0.5	0.5	0.4	0.3

―：未実施

表 3　精製水中の DNA の消毒と LAMP 法検出の関係

消毒剤	測定項目	消毒剤添加後、経過時間						
		0min	15min	30min	1h	3h	5h	24h
モノクロラミン	LAMP(Tt 値:min)	21	21.1	41	20.2	23.4	23.9	21.5
	総塩素濃度(mg/L)	0	4.4	4.4	4.4	4.5	4.5	3.6
次亜塩素酸 Na	LAMP(Tt 値:min)	22.4	不検出	不検出	不検出	不検出	―	―
	遊離塩素濃度(mg/L)	0	0.5	0.4	0.5	0.4	―	―

―：未実施

平成 28–30 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
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」
平成 30 年度分担研究報告書

「入浴施設の衛生管理に関する研究成果の活用」

研究代表者	前川純子	国立感染症研究所
○研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学
研究分担者	森本　洋	北海道立衛生研究所
研究分担者	磯部順子	富山県衛生研究所
研究協力者	緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター
研究協力者	倉　文明	国立感染症研究所

研究要旨

入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染とこれに起因する感染症の発生を予防する目的で、これまでに複数の研究班により研究が実施されてきている。得られた研究成果は、入浴施設におけるレジオネラ汚染対策として活用することが求められている。今年度はこれまでの研究成果を見直し、公衆浴場における衛生等管理要領等のレジオネラ属菌に関連した項目の改訂の提言を行った。

A. 研究目的

入浴施設のレジオネラ汚染とそれに起因する感染に関連して、これまでに複数の研究班において汚染実態の把握、衛生管理法・消毒法等の検討、水試料を対象にした試験法の検討等を行ってきている。得られた研究成果に基づいて対策マニュアル等が改訂され、実際に活用されている。今年度は、これまでの研究成果を検証し、公衆浴場における衛生等管理要領等のレジオネラ属菌に関連した項目の改訂の提言を行った。

B. 研究方法

入浴施設におけるレジオネラ対策等を検討するために、「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」班を含めて、これまでに複数の研究班が研究活動を行ってきている。これらの研究班により得られた成果を見直し、公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言を行った。

C. 結果及び考察

１)別添１ 公衆浴場における水質基準等に関する指針

（１）原湯、原水、上り用湯及び上り用水の水質基準及び検査方法

原湯、原水、上り用湯及び上り用水の水質基準は水道水質基準に準じている。水道水質基準は水道法第４条に基づいて決められており、水質基準に関する省令により定められている。本省令は平成 15 年 5 月 30 日に改定され、さらに検査方法が示されたことから、それに準じて公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂が必要であった。そこで、衛生等管理要領等を以下のように改訂することを提言した。

過マンガン酸カリウム消費量は有機物（全有機炭素(TOC)の量）に変更されたことからこれに準じることを提案した。水道水質基準では過マンガン酸カリウムの基準値 10mg/L が TOC の 3mg/L にすることが適当であるとの報告に従って、原水での TOC も 3mg/L とした[1)]。

TOC 測定ではイソシアヌル酸が消毒で用いられている場合に正確な TOC 値が得られなかったとする報告があることから[2,3)]、「イソシアヌル酸で消毒している等の理由により TOC の正確な測定が困難と考えられる場合は、過マンガンカリウム消費量の測定で、10mg/L 以下であることとする。」との注釈を加えることを提案した。

水道水質基準では糞便汚染指標として大腸菌群に代わり、大腸菌を対象とすると変更されている。また、大腸菌の検査方法として特定酵素基質培地法が採用されていることから、原湯等での検査でも特定酵素基質法を採用することを提案した。

本方法を海水が含まれる試料を検査した場合に、一部の海洋細菌が大腸菌と同様の反応を呈し、偽陽性を引き起こすことがある。そのため、「大腸菌の検査に酵素基質法を利用する場合、海水を含む試料では海洋性細菌により偽陽性となることがあるため、確認が必要である。」との注釈を加えることを提案した。

（２）レジオネラ属菌の検査方法

現行の公衆浴場における衛生等管理要領ではレジオネラ属菌の検査方法として、「「新版レジオネラ症防止指針」の「＜付録＞１環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること。」となっている。平成 29 年に ISO 11731:2017 が発出されたことから、当研究班では新たな ISO のレジオネラ属菌検査法を参照して、研究班として推奨される検査法を提案している。そこで、公衆浴場における衛生等管理要領でも、当研究班の推奨する検査法を参照することを提案した。

（３）精度管理実施の確認

食品検査や医学検査等の検査においては、その検査結果が高い信頼性を有することを担保するために、精度管理（内部精度管理及び外部精度

管理）を実施することが必須であるとされている。

上記の観点から、公衆浴場等の施設が検査機関にレジオネラ属菌検査を依頼する際に、依頼先の検査機関が精度管理を実施していることを確認することが望ましいことから、「検査の依頼にあたっては、精度管理を行っている検査機関に依頼することが望ましい。」を追加することを提案した。

（３）浴槽水の水質基準

浴槽水の水質基準は原水の水質基準に準じて項目の変更を検討し、過マンガン酸カリウム消費量を有機物（全有機炭素（ＴＯＣ）の量）に変更した。過マンガン酸カリウム消費量の基準値 25mg/L は、水道水質基準の過マンガン酸カリウム消費量から TOC への変更[1)]を参照して 8mg/L 以下とした。

２)別添２ 公衆浴場における衛生等管理要領

（１）第３ 特に留意すべき事項

重複した内容を除き、新しい知見等を加え、改訂の提案の内容と整合するようにした文章に修正することを提案した。

さらに、レジオネラ属菌の増殖のリスクを減らすために配管やろ過装置の表面積を小さくすることが重要である。また配管中の滞留水をなくすことと、配管内の水を完全に排水することはレジオネラ汚染を防ぐ重要なポイントとなる。このような観点から「配管は生物膜の形成場所となりやすいため、配管の状況を正確に把握する必要がある。そのためには、設計施工時に配管を最短にする、既存の不要な配管を除去する等の対応が必要である。」の文章を追加することを提案した。

（２）ろ過器の設置

ろ過装置を使用している循環式浴槽では、ろ過器１基にかかる汚れ等の負荷を軽減させ、レジオネラ属菌が増殖するリスクを減少させるために、浴槽ごとに設置するようにすることを提案した。

（３）循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルとの整合性

循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルが平成 27 年 3 月 31 日に改訂された。その内容と現行の公衆浴場の衛生等管理要領と整合するように提案を行った。

具体的には、以下の内容を提案した。

・気泡発生装置、ジェット噴射装置等微小な水粒を発生させる設備は連日使用している浴槽水を用いる構造でないこと。

・調節箱を設置する場合は、清掃しやすい構造とし、レジオネラ属菌が繁殖しないように、薬剤注入口を設けるなど塩素消毒等が行えるようにすること。

・結合塩素のモノクロラミンの場合

には、3 mg/L 程度を保つこと。

（４）気泡発生装置等

気泡発生装置の空気取入口から浴槽水等の水が入ることでレジオネラ属菌が増殖することがあることから、入らない構造とするとともに、衛生管理を強化するために内部に生物膜が形成されないように管理することを提案した。

（５）水位計

水位計でのレジオネラ汚染事例が報告されていることから、水位計の洗浄・消毒に関する記載を追加することを提案した。

（６）貯湯槽

貯湯槽の衛生管理を強化するために、貯湯槽は完全に排水できる構造とし、清掃・消毒を確実に実施できるようにすることを提案した。

（７）浴槽水の残留塩素濃度

遊離残留塩素が 0.2mg/L ではレジオネラ属菌は 15 分以内に死滅することが実験的に示されている[4]。しかし、浴槽水の遊離残留塩素濃度を確実に 0.2mg/L に維持することは容易ではなく、濃度が維持できないあるいは正確に測定できないことによりレジオネラ属菌が増殖するリスクが高まることから、現行の「通常 0.2 ないし 0.4mg/L 程度を保ち」を「通常 0.4mg/L 程度を保ち」に変更することを提案した。

神奈川県の日帰り入浴施設では浴槽水の遊離残留塩素濃度の記録は 0.2mg/L であったにもかかわらずレジオネラ属菌が増殖し、患者が発生した[5]。

（８）露天風呂

露天風呂でのレジオネラ属菌の増殖のリスクを軽減するために、植栽からの土が入らないようにすることを提案した。

（９）自主管理体制

レジオネラ属菌による汚染が入浴施設で発生すると、消毒された後でもレジオネラ属菌の遺伝子を検出することが可能であることから、疫学調査等での活用に配慮して、「（注）浴槽内等に消毒剤が投入されると生きたレジオネラ属菌の検出は困難となるが、遺伝子を定量的に検出することは可能である。」の文章を追加することを提案した。

（10）施設整備の表

施設設備の衛生管理をまとめた表中の各設備（ろ過器及び循環配管、水位計配管、シャワー、集毛器、貯湯槽、調整箱、気泡発生装置）は、衛生管理を強化する目的で加筆変更することを提案した。

今回行った、別添 1　公衆浴場における水質基準等に関する指針及び別添 2　公衆浴場における衛生等管理要領の改訂の提言の内容を、資料

として示した（資料１、２及び３）。

D. 参考文献

1. 厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業) 最新の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究　平成 16 年度総括・分担研究報告書 23-31, 2005.
2. 分析化学 59 巻第 4 号 335-340, 2010.
3. 東京都健康安全研究センター年報　第 61 号 325-332, 2010.
4. 感染症学雑誌　第 69 巻第 2 号 151-157, 1995.
5. 病原微生物検出情報　37 巻 7 月号 140-141, 2016.

E. 発表

該当なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

資料１　別添１　対照表

（傍線部分は提案）

改訂案	現行
公衆浴場における水質基準等に関する指針	公衆浴場における水質基準等に関する指針
第１　この指針は、公衆浴場において使用する水につき、水質の基準及び水質の検査方法を定めることを目的とする。	第１　この指針は、公衆浴場において使用する水につき、水質の基準及び水質の検査方法を定めることを目的とする。
第２　この指針において使用する用語は、次の各号で定めるとおりとする。 １　「原湯」とは、浴槽の湯を再利用せずに浴槽に直接注入される温水をいう。 ２　「原水」とは、原湯の原料に用いる水及び浴槽の水の温度を調整する目的で、浴槽の水を再利用せずに浴槽に直接注入される水をいう。 ３　「上り用湯」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた湯栓から供給される温水をいう。 ４　「上り用水」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた水栓から供給される水をいう。 ５　「浴槽水」とは、浴槽内の湯水をいう。	第２　この指針において使用する用語は、次の各号で定めるとおりとする。 １　「原湯」とは、浴槽の湯を再利用せずに浴槽に直接注入される温水をいう。 ２　「原水」とは、原湯の原料に用いる水及び浴槽の水の温度を調整する目的で、浴槽の水を再利用せずに浴槽に直接注入される水をいう。 ３　「上り用湯」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた湯栓から供給される温水をいう。 ４　「上り用水」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた水栓から供給される水をいう。 ５　「浴槽水」とは、浴槽内の湯水をいう。
第３　原湯、原水、上り用湯及び上り用水の水質基準及びその検査方法は、次の各号に規定するとおりとする。 ただし、温泉水又は井戸水を使用するものであるため、この基準により難く、かつ、衛生上危害を生じるおそれがないときは、１のアないしエの基準の一部又は全部を適用しないことができる。 １　水質基準 ア　色度は、５度以下であること。 イ　濁度は、２度以下であること。	第３　原湯、原水、上り用湯及び上り用水の水質基準及びその検査方法は、次の各号に規定するとおりとする。 ただし、温泉水又は井戸水を使用するものであるため、この基準により難く、かつ、衛生上危害を生じるおそれがないときは、１のアないしエの基準の一部又は全部を適用しないことができる。 １　水質基準 ア　色度は、５度以下であること。 イ　濁度は、２度以下であること。

ウ　pH 値は、5.8 以上 8.6 以下であること。 エ　有機物（全有機炭素(TOC)の量）は、3mg／L 以下であること。 オ　大腸菌は検出されないこと。 カ　レジオネラ属菌は、検出されないこと（10cfu/100mL 未満)。 ２　検査方法 ア　色度、濁度、pH 値、有機物（全有機炭素(TOC)の量）及び大腸菌の検査方法は、それぞれ「水質基準に関する省令」（平成 15 年厚生労働省令第 101 号）で定める検査方法によること。 イ　レジオネラ属菌の検査方法は、冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること。また、その具体的手順は、「新版レジオネラ症防止指針」の「＜付録＞１環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること。 ウ　１年に１回以上、水質検査を行い、その結果は検査の日から３年間保管すること。 エ　検査の依頼にあたっては、検査機関が適切に精度管理を行っていることを確認すること。 第４　浴槽水の水質基準及びその検査方法は次の各号に規定するとおりとする。 　ただし、温泉水又は井戸水を使用するものであるため、この基準により難く、かつ、衛生上危害を生じるおそれがないときは、１のア及びイの基準のどちらか又は両方を適用しないことができる。 １　水質基準 ア　濁度は、５度以下であること。 イ　有機物（全有機炭素（ＴＯＣ）の量）は、8mg／L 以下であること。 ウ　大腸菌群は、１個／mL 以下であること。 エ　レジオネラ属菌は、検出されないこと（10cfu/100mL 未満)。	ウ　水素イオン濃度は、ｐＨ値 5.8～8.6 であること。 エ　過マンガン酸カリウム消費量は、10mg／L 以下であること。 オ　大腸菌群（グラム陰性の無芽胞性の桿〈かん〉菌であって、乳糖を分解して、酸とガスを形成するすべての好気性又は通性嫌気性の菌をいう。）は 50mL 中に検出されないこと。 カ　レジオネラ属菌は、検出されないこと（10cfu/100mL 未満)。 ２　検査方法 ア　色度、濁度、水素イオン濃度、過マンガン酸カリウム消費量及び大腸菌群の検査方法は、それぞれ「水質基準に関する省令」（平成４年厚生省令第 69 号）で定める検査方法によること。 イ　レジオネラ属菌の検査方法は、冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること。また、その具体的手順は、「新版レジオネラ症防止指針」の「＜付録＞１環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること。 ウ　１年に１回以上、水質検査を行い、その結果は検査の日から３年間保管すること。 第４　浴槽水の水質基準及びその検査方法は次の各号に規定するとおりとする。 　ただし、温泉水又は井戸水を使用するものであるため、この基準により難く、かつ、衛生上危害を生じるおそれがないときは、１のア及びイの基準のどちらか又は両方を適用しないことができる。 １　水質基準 ア　濁度は、５度以下であること。 イ　過マンガン酸カルウム消費量は、25mg／L 以下であること。 ウ　大腸菌群は、１個／mL 以下であること。

２　検査方法 ア　濁度、有機物（全有機炭素（ＴＯＣ）の量）及びレジオネラ属菌の検査方法については、第３の検査方法によること。 イ　大腸菌群の検査方法 「下水の水質の検定方法等に関する省令」（昭和 37 年厚生省令・建設省令第１号）別表第１（第６条）の大腸菌群数の検定方法によること。なお、試料は希釈せずに使用すること。 ウ　ろ過器を使用していない浴槽水及び毎日完全に換水している浴槽水は、１年に１回以上、連日使用している浴槽水は、１年に２回以上（ただし、浴槽水の消毒が塩素消毒でない場合には、１年に４回以上。）、水質検査を行い、その結果は検査の日から３年間保管すること。	エ　レジオネラ属菌は、検出されないこと（10cfu/100mL 未満）。 ２　検査方法 ア　濁度、過マンガン酸カリウム消費量及びレジオネラ属菌の検査方法については、第３の検査方法によること。 イ　大腸菌群の検査方法 「下水の水質の検定方法等に関する省令」（昭和 37 年厚生省令・建設省令第１号）別表第１（第６条）の大腸菌群数の検定方法によること。なお、試料は希釈せずに使用すること。 ウ　ろ過器を使用していない浴槽水及び毎日完全に換水している浴槽水は、１年に１回以上、連日使用している浴槽水は、１年に２回以上（ただし、浴槽水の消毒が塩素消毒でない場合には、１年に４回以上。）、水質検査を行い、その結果は検査の日から３年間保管すること。

資料２　別添２　対照表

（傍線部分は提案）

改訂案	現行
公衆浴場における衛生等管理要領	公衆浴場における衛生等管理要領
Ⅰ 総則	Ⅰ 総則
第１　　目的	第１　　目的
この要領は、公衆浴場における施設、設備、水質の衛生的管理、従業者の健康管理、その他入浴者の衛生及び風紀に必要な措置により公衆浴場における衛生等の向上及び確保を図ることを目的とする。	この要領は、公衆浴場における施設、設備、水質の衛生的管理、従業者の健康管理、その他入浴者の衛生及び風紀に必要な措置により公衆浴場における衛生等の向上及び確保を図ることを目的とする。
第２　　適用の範囲及び用語の定義	第２　　適用の範囲及び用語の定義
１　この要領は、公衆浴場及び浴場業を営む者について適用する。	１　この要領は、公衆浴場及び浴場業を営む者について適用する。
２　この要領において用いる用語は、次のとおり定義する。	２　この要領において用いる用語は、次のとおり定義する。
（１）「一般公衆浴場」とは、温湯等を使用し、同時に多数人を入浴させる公衆浴場であって、その利用の目的及び形態が地域住民の日常生活において保健衛生上必要なものとして利用される入浴施設をいう。	（１）「一般公衆浴場」とは、温湯等を使用し、同時に多数人を入浴させる公衆浴場であって、その利用の目的及び形態が地域住民の日常生活において保健衛生上必要なものとして利用される入浴施設をいう。
（２）「その他の公衆浴場」とは、一般公衆浴場以外の公衆浴場をいい、以下に分類される。	（２）「その他の公衆浴場」とは、一般公衆浴場以外の公衆浴場をいい、以下に分類される。
１）　温湯等を使用し、同時に多数人を入浴させるものであって、保養又は休養のための施設を有するもの	１）　温湯等を使用し、同時に多数人を入浴させるものであって、保養又は休養のための施設を有するもの
２）　温湯等を使用し、同時に多数人を入浴させるものであって、スポーツ施設に付帯するもの	２）　温湯等を使用し、同時に多数人を入浴させるものであって、スポーツ施設に付帯するもの
３）　温湯等を使用し、同時に多数人を入浴させるものであって、工場、事業場等が、その従業員の福利厚生のために設置するもの	３）　温湯等を使用し、同時に多数人を入浴させるものであって、工場、事業場等が、その従業員の福利厚生のために設置するもの
４）　蒸気、熱気等を使用し、同時に多数人を入浴させることができるもの	４）　蒸気、熱気等を使用し、同時に多数人を入浴させることができるもの
５）　蒸気、熱気等を使用し、個室を設けるもの	５）　蒸気、熱気等を使用し、個室を設けるもの

6） その他のもの （3）「原湯」とは、浴槽の湯を再利用せずに浴槽に直接注入される温水をいう。 （4）「原水」とは、原湯の原料に用いる水及び浴槽の水の温度を調整する目的で、浴槽の水を再利用せずに浴槽に直接注入される水をいう。 （5）「上り用湯」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた湯栓から供給される温水をいう。 （6）「上り用水」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた水栓から供給される水をいう。 （7）「浴槽水」とは、浴槽内の湯水をいう。 （8）「貯湯槽」とは、原湯を貯留する槽（タンク）をいう。 （9）「ろ過器」とは、浴槽水を再利用するため、浴槽水中の微細な粒子や繊維等を除去する装置をいう。 (10)「集毛器」とは、浴槽水を再利用するため、浴槽水に混入した毛髪や比較的大きな異物を捕集する網状の装置をいう。 (11)「調節箱」とは、洗い場の湯栓（カラン）やシャワーに送る湯の温度を調節するための槽（タンク）をいう。 (12)「循環配管」とは、湯水を浴槽とろ過器との間で循環させるための配管をいう。 (13)「循環式浴槽」とは、温泉水や水道水の使用量を少なくする目的で、浴槽の湯をろ過器を通して循環させることにより、浴槽内の湯を清浄に保つ構造の浴槽をいう。 (14)「かけ流し式浴槽」とは、浴槽水のろ過装置を持たない毎日換水型浴槽をいう。	6） その他のもの （3）「原湯」とは、浴槽の湯を再利用せずに浴槽に直接注入される温水をいう。 （4）「原水」とは、原湯の原料に用いる水及び浴槽の水の温度を調整する目的で、浴槽の水を再利用せずに浴槽に直接注入される水をいう。 （5）「上り用湯」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた湯栓から供給される温水をいう。 （6）「上り用水」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた水栓から供給される水をいう。 （7）「浴槽水」とは、浴槽内の湯水をいう。
第３　特に留意すべき事項 近年の入浴施設では、湯水の節約を行うため、ろ過器を中心とする設備、湯水を再利用するための貯湯槽、及びそれらの設備をつなぐ配管等により、複雑な循環系を構成することが多くなって	第３　特に留意すべき事項 近年の入浴施設では、湯水の節約を行うため、ろ過器を中心とする設備、湯水を再利用するため一時的に貯留する槽（タンク）及びそれらの設備をつなぐ配管を伴い、複雑な循環系を構成する

いる。また、かけ流し式浴槽施設においても、施設の大型化や多様化に伴い、温泉資源や湯量の確保を目的とした貯湯槽の設置したり、複数の浴槽への配水のために配管が複雑になっている。加えて、温泉水を利用する設備、湯を豊富にみせるための演出や露天風呂、ジャグジーや打たせ湯の設置など様々な工夫により、入浴者を楽しませる設備が付帯されるようになってきた。これまでのレジオネラ症の発生事例を踏まえると、これらの設備は土ぼこりを入りにくくし、清掃や消毒を十分行うことができるよう、衛生管理、構造設備上の措置を十分行う必要がある。 浴槽水の微生物汚染は、入浴者の体表、土ぼこり等に存在する微生物が持ち込まれることにより発生する。さらに、それらの微生物は、常に供給される入浴者からの有機質により増殖し、ろ過器、浴槽や配管の内壁等に生物膜を形成する。しかも、その生物膜により、外界からの不利な条件（塩素剤等の殺菌剤）から保護されているため、浴槽水を消毒するだけではレジオネラ属菌等の微生物汚染を除去できない。そのため、浴槽水の消毒のみならず常にその支持体となっている生物膜の発生を防止し、生物膜の形成を認めたならば直ちにそれを除去しなければならない。ろ過器に次いで、配管は生物膜の形成場所となりやすいため、配管の状況を正確に把握する必要がある。そのためには、設計施工時に配管を最短にする、既存の不要な配管を除去する等の対応が必要がある。 ジャグジーや打たせ湯、シャワー等は、エアロゾルを発生させ、レジオネラ属菌感染の原因ともなりやすい。連日使用している浴槽水をジャグジー等で使用しない、打たせ湯等で再利用された浴槽水を使用しない等、汚染された湯水によるレジオネラ属菌の感染の機会を減らさなければならない。 II 施設設備	ことが多くなっている。また、温泉水を利用する設備、湯を豊富にみせるための演出や露天風呂、ジャグジーや打たせ湯の設置など様々な工夫により、入浴者を楽しませる設備が付帯されるようになってきた。これまでのレジオネラ症の発生事例を踏まえると、これら設備の衛生管理、構造設備上の措置を十分行う必要がある。 浴槽水を汚染する微生物は、入浴者の体表に付着したり、土ぼこり及び露天風呂等から侵入する。温泉水等を利用する施設で一時的に湯を貯留する設備を設けると、それが微生物に汚染されやすい。これらの設備は、土ぼこりが入りにくくし、清掃や消毒を十分行うことが必要である。 また、浴槽水は、入浴者から各種の有機質が常に補給され、これらを栄養源として、ろ過器、浴槽や配管の内壁等に定着して微生物が定着・増殖する。しかも、その菌体表面に生産された生物膜によって、外界からの不利な条件（塩素剤等の殺菌剤）から保護されているため、浴槽水を消毒するだけではレジオネラ属菌等の微生物の繁殖は防げない。そのため、浴槽水の消毒のみならず常にその支持体となっている生物膜の発生を防止し、生物膜の形成を認めたならば直ちにそれを除去することが必要である。 ジャグジーや打たせ湯等は、エアロゾルを発生させ、レジオネラ属菌感染の原因ともなりやすいので、連日使用している浴槽水でジャグジー等の使用を控えたり、打たせ湯等で再利用された浴槽水の使用を控える等、汚染された湯水によるレジオネラ属菌の感染の機会を減らすことが必要である。 II 施設設備 第１　一般公衆浴場

第１　一般公衆浴場 １　施設全般 （１）　施設の周囲は、清掃及び排水が容易にできる構造であること。 （２）　ねずみ、衛生害虫等の侵入を防止するため、外部に開放する排水口、窓等に金網を設ける等必要に応じて防除設備を設けること。 （３）　施設内の採光、照明及び換気が十分行うことができる構造設備であること。 ２　下足場 　はきものを安全に保管することができる設備を入浴者数に応じて設けること。 ３　脱衣室 （１）　男女を区別し、その境界には隔壁を設けて、相互に、かつ、屋外から見通しのできない構造であること。 （２）　脱衣室の床面積（洗濯機、乾燥機、自動販売機等の面積を除く。）は、男女それぞれその入浴者数に応じ、次により算出される面積以上であることが望ましいこと。 毎時最大浴場利用人員×20／60×1.1 平方メートル×1.5 （注）　毎時最大浴場利用人員……おおむね、平均人員の２倍 20……着脱衣、休憩等に要する時間（分） 1.1 平方メートル……入浴者１人当たりの衣服の着脱等に要する面積 1.5……脱衣箱、通路、洗面化粧等に要する面積 （３）　床面は、耐水性の材料を用いること。 （４）　入浴者の衣類その他の携帯品を安全に保管できる設備を入浴者数に応じて設けること。 なお、脱衣箱（かご）の数は、次により算出される数以上であることが望ましいこと。 毎時最大浴場利用人員×50／60	１　施設全般 （１）　施設の周囲は、清掃及び排水が容易にできる構造であること。 （２）　ねずみ、衛生害虫等の侵入を防止するため、外部に開放する排水口、窓等に金網を設ける等必要に応じて防除設備を設けること。 （３）　施設内の採光、照明及び換気が十分行うことができる構造設備であること。 ２　下足場 　はきものを安全に保管することができる設備を入浴者数に応じて設けること。 ３　脱衣室 （１）　男女を区別し、その境界には隔壁を設けて、相互に、かつ、屋外から見通しのできない構造であること。 （２）　脱衣室の床面積（洗濯機、乾燥機、自動販売機等の面積を除く。）は、男女それぞれその入浴者数に応じ、次により算出される面積以上であることが望ましいこと。 毎時最大浴場利用人員×20／60×1.1 平方メートル×1.5 （注）　毎時最大浴場利用人員……おおむね、平均人員の２倍 20……着脱衣、休憩等に要する時間（分） 1.1 平方メートル……入浴者１人当たりの衣服の着脱等に要する面積 1.5……脱衣箱、通路、洗面化粧等に要する面積 （３）　床面は、耐水性の材料を用いること。 （４）　入浴者の衣類その他の携帯品を安全に保管できる設備を入浴者数に応じて設けること。 なお、脱衣箱（かご）の数は、次により算出される数以上であることが望ましいこと。 毎時最大浴場利用人員×50／60 （注）50……浴場利用時間（分）

（注）50……浴場利用時間（分） （５） 開放できる窓又は換気設備等を有すること。 （６） 洗面設備を設けること。 （７） 洗濯機、乾燥機、自動販売機等を設置する場合は、脱衣室の機能に支障を来さない場所とすること。 （８） 洗濯機を設置する場合には、専用の排水口を設けること。 なお、ドライクリーニング用洗濯機を備えないこと。 また、乾燥機を設置する場合には、水蒸気、燃焼ガス等を屋外に排出できる構造であること。 ４ 浴室 （１） 男女を区別し、その境界には隔壁を設け、相互に、かつ、屋外から見通しのできない構造であること。 （２） 浴室の床面、周壁（床面から１m以上）及び浴槽は、耐水性の材料を用いること。 （３） 浴室の床面は、流し湯が停滞しないよう適当な勾配（おおむね 100 分の 1.5 以上）を設け、かつ、隙間がなく、清掃が容易に行える構造であること。 また、すべりにくい材質又は構造とすることが望ましいこと。 （４） 浴室の天井は、適当な勾配を設ける等して、水滴が落下しないようにすること。 また、浴室には、湯気抜き、換気扇等を設けること。 （５） 洗い場の面積は、男女それぞれその入浴者数に応じ、次により算出される面積以上であることが望ましいこと。 毎時最大浴場利用人員×20／60×1.1 平方メートル×1.5 （注） 20……洗い場使用時間（分） 1.1 平方メートル……入浴者１人当たりの洗い場使用面積 1.5……通路等に要する面積の係数 （６） 洗い場には、入浴者数に応じた十分な数の給水（湯）栓、洗い桶及び腰掛を備えること。 なお、給水（湯）栓は、男女それぞれその入浴者数に応じ、次に	（５） 開放できる窓又は換気設備等を有すること。 （６） 洗面設備を設けること。 （７） 洗濯機、乾燥機、自動販売機等を設置する場合は、脱衣室の機能に支障を来さない場所とすること。 （８） 洗濯機を設置する場合には、専用の排水口を設けること。 なお、ドライクリーニング用洗濯機を備えないこと。 また、乾燥機を設置する場合には、水蒸気、燃焼ガス等を屋外に排出できる構造であること。 ４ 浴室 （１） 男女を区別し、その境界には隔壁を設け、相互に、かつ、屋外から見通しのできない構造であること。 （２） 浴室の床面、周壁（床面から１m以上）及び浴槽は、耐水性の材料を用いること。 （３） 浴室の床面は、流し湯が停滞しないよう適当な勾配（おおむね 100 分の 1.5 以上）を設け、かつ、隙間がなく、清掃が容易に行える構造であること。 また、すべりにくい材質又は構造とすることが望ましいこと。 （４） 浴室の天井は、適当な勾配を設ける等して、水滴が落下しないようにすること。 また、浴室には、湯気抜き、換気扇等を設けること。 （５） 洗い場の面積は、男女それぞれその入浴者数に応じ、次により算出される面積以上であることが望ましいこと。 毎時最大浴場利用人員×20／60×1.1 平方メートル×1.5 （注） 20……洗い場使用時間（分） 1.1 平方メートル……入浴者１人当たりの洗い場使用面積 1.5……通路等に要する面積の係数 （６） 洗い場には、入浴者数に応じた十分な数の給水（湯）栓、洗い桶及び腰掛を備えること。 なお、給水（湯）栓は、男女それぞれその入浴者数に応じ、次により算出される数（組）以上であることが望ましいこと。

より算出される数（組）以上であることが望ましいこと。 毎時最大浴場利用人員×20／60 （注）20……洗い場使用時間（分） （７） 給水（湯）栓は他の組の中心点との距離がおおむね70cm以上であること。 なお、90cm程度の間隔が望ましいこと。 （８） 洗い場の排水溝は、危害を防止し、かつ、排水等に支障のない構造であること。 （９） 浴槽内面積の合計は、男女それぞれその入浴者数に応じ、次により算出される面積以上であることが望ましいこと。 毎時最大浴場利用人員×10／60×0.7平方メートル×1.2 （注） 10……浴槽使用時間（分） 0.7平方メートル……入浴者１人当たりの浴槽使用面積 1.2……浴槽内の踏段、注（湯水）口等に要する面積の係数 (10) 浴槽は、洗い水等の流入を防止するため上縁が洗い場の床面よりおおむね５cm以上(15cm以上が望ましいこと。）の適当な高さを有すること。 また、必要に応じて手すり及び内側に踏段を設ける等、高齢者、小児等に配慮したものであることが望ましいこと。 (11) 浴槽は、熱湯及び熱交換器が入浴者に直接接触しない構造であること。 ただし、給湯栓等により熱湯を補給する構造のものにあっては、その付近のよく見やすい場所に熱湯に注意すべき旨の表示をすること。 （12） ろ過器を設置する場合にあっては、以下の構造設備上の措置を講じること １）ろ過器は、浴槽ごとに設置することが望ましく、１時間当たり浴槽の容量以上のろ過能力を有し、かつ、逆洗浄等の適切な方法でろ過器内のごみ、汚泥等を排出することができる構造であるとともに、ろ過器に毛髪等が混入しないようろ過器の前に集毛器	毎時最大浴場利用人員×20／60 （注）20……洗い場使用時間（分） （７） 給水（湯）栓は他の組の中心点との距離がおおむね70cm以上であること。 なお、90cm程度の間隔が望ましいこと。 （８） 洗い場の排水溝は、危害を防止し、かつ、排水等に支障のない構造であること。 （９） 浴槽内面積の合計は、男女それぞれその入浴者数に応じ、次により算出される面積以上であることが望ましいこと。 毎時最大浴場利用人員×10／60×0.7平方メートル×1.2 （注） 10……浴槽使用時間（分） 0.7平方メートル……入浴者１人当たりの浴槽使用面積 1.2……浴槽内の踏段、注（湯水）口等に要する面積の係数 (10) 浴槽は、洗い水等の流入を防止するため上縁が洗い場の床面よりおおむね５cm以上(15cm以上が望ましいこと。）の適当な高さを有すること。 また、必要に応じて手すり及び内側に踏段を設ける等、高齢者、小児等に配慮したものであることが望ましいこと。 (11) 浴槽は、熱湯及び熱交換器が入浴者に直接接触しない構造であること。 ただし、給湯栓等により熱湯を補給する構造のものにあっては、その付近のよく見やすい場所に熱湯に注意すべき旨の表示をすること。 （12） ろ過器を設置する場合にあっては、以下の構造設備上の措置を講じること １）ろ過器は、１時間当たり浴槽の容量以上のろ過能力を有し、かつ、逆洗浄等の適切な方法でろ過器内のごみ、汚泥等を排出することができる構造であるとともに、ろ過器に毛髪等が混入しないようろ過器の前に集毛器を設けること。 ２）浴槽における原水又は原湯の注入口は、湯水を浴槽とろ過器

を設けること。 ２）浴槽における原水又は原湯の注入口は、循環配管に接続せず、浴槽水面上部から浴槽に落とし込む構造とすること。 ３）循環してろ過された湯水は浴槽の底部に近い部分から補給される構造とし、当該湯水の誤飲及びエアロゾルの発生を防止すること。 ４）浴槽水の消毒に用いる塩素系薬剤の注入又は投入口は、浴槽水がろ過器内に入る直前に設置されていること。 (13)　打たせ湯及びシャワーは、循環している浴槽水を用いる構造でないこと。 (14)　浴槽に気泡発生装置、ジェット噴射装置等微小な水粒を発生させる設備（以下「気泡発生装置等」という。）を設置する場合には、連日使用している浴槽水を用いる構造でないこと。また、空気取入口から土ぼこりや浴槽水等が入らないような構造であること。 (15)　内湯と露天風呂の間は、配管等を通じて、露天風呂の湯が内湯に混じることのない構造であること。 (16)　オーバーフロー回収槽（以下「回収槽」という。）内の水を浴用に供する構造になっていないこと。ただし、これにより難い場合には、回収槽は、地下埋設を避け、内部の清掃が容易に行える位置又は構造になっているとともに、レジオネラ属菌が繁殖しないように、回収槽内の水が消毒できる設備が設けられていること。 (17)　浴槽には、入浴者が容易に見える位置に温度計を備えること。 (18)　水位計等の配管を設ける場合は、配管内が洗浄・消毒できる構造とすること。 (19)　配管内の浴槽水が完全に排水できるように配管すること。 (20)　使用済みのカミソリ等を廃棄するための容器を備えること。	との間で循環させるための配管（以下「循環配管」という。）に接続せず、浴槽水面上部から浴槽に落とし込む構造とすること。 ３）循環してろ過された湯水が浴槽の底部に近い部分から補給される構造とし、当該湯水の誤飲又はエアロゾルの発生を防止すること。 ４）浴槽水の消毒に用いる塩素系薬剤の注入又は投入口は、浴槽水がろ過器内に入る直前に設置されていること。 (13)　打たせ湯及びシャワーは、循環している浴槽水を用いる構造でないこと。 (14)　浴槽に気泡発生装置、ジェット噴射装置等微小な水粒を発生させる設備（以下「気泡発生装置等」という。）を設置する場合には、空気取入口から土ぼこりが入らないような構造であること。 (15)　内湯と露天風呂の間は、配管等を通じて、露天風呂の湯が内湯に混じることのない構造であること。 (16)　オーバーフロー回収槽（以下「回収槽」という。）内の水を浴用に供する構造になっていないこと。ただし、これにより難い場合には、回収槽は、地下埋設を避け、内部の清掃が容易に行える位置又は構造になっているとともに、レジオネラ属菌が繁殖しないように、回収槽内の水が消毒できる設備が設けられていること。 (17)　浴槽には、入浴者が容易に見える位置に温度計を備えること。 (18)　使用済みのカミソリ等を廃棄するための容器を備えること。 (19)　シャワー設備を設ける場合は、適当な温度の湯を十分に供

(21)　シャワー設備を設ける場合は、適当な温度の湯を十分に供給でき、湯の温度を調節できるものであること。 また、立位で使用するシャワー設備を設ける場合は、シャワー水が浴槽及び入浴者にかからないよう、十分な距離を設け、又はカーテン等を備えること。 (22)　調節箱を設置する場合は、清掃しやすい構造とし、レジオネラ属菌が繁殖しないように、薬剤注入口を設けるなど塩素消毒等が行えるようにすること。 ５　飲料水供給設備 浴室、脱衣室の入浴者の利用しやすい場所に１か所以上の飲料水を供給する設備を設けること。 ６　給水、給湯設備 （１）　水道水以外の水を原水、原湯、上り用水及び上り用湯として使用する場合は、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」に適合していることを確認したものであること。 （２）貯湯槽は、通常の使用状態において、湯の補給口、底部等に至るまで60℃以上に保ち、かつ、最大使用時においても55℃以上に保つ能力を有する加温装置を設置すること。それにより難い場合には、レジオネラ属菌が繁殖しないように貯湯槽水の消毒設備が備えられていること。貯湯槽は完全に排水できる構造とすること。 （３）放熱管及び給配湯は、露出せず、直接身体に接触させない設備とすること。 ７　便所 （１）　男女それぞれの脱衣室等入浴者が利用しやすい場所にそれぞれ便所を設けること。 また、高齢者、小児等に配慮した便器を設けることが望ましいこと。 （２）　窓又は換気設備等を有すること。 （３）　流水式手洗い設備が備えられていること。	給でき、湯の温度を調節できるものであること。 また、立位で使用するシャワー設備を設ける場合は、シャワー水が浴槽及び入浴者にかからないよう、十分な距離を設け、又はカーテン等を備えること。 ５　飲料水供給設備 浴室、脱衣室の入浴者の利用しやすい場所に１か所以上の飲料水を供給する設備を設けること。 ６　給水、給湯設備 （１）　水道水以外の水を原水、原湯、上り用水及び上り用湯として使用する場合は、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」に適合していることを確認したものであること。 （２）原湯を貯留する貯湯槽（以下「貯湯槽」という。）の温度を、通常の使用状態において、湯の補給口、底部等に至るまで 60℃以上に保ち、かつ、最大使用時においても 55℃以上に保つ能力を有する加温装置を設置すること。それにより難い場合には、レジオネラ属菌が繁殖しないように貯湯槽水の消毒設備が備えられていること。 （３）放熱管及び給配湯は、露出せず、直接身体に接触させない設備とすること。 ７　便所 （２）　男女それぞれの脱衣室等入浴者が利用しやすい場所にそれぞれ便所を設けること。 また、高齢者、小児等に配慮した便器を設けることが望ましいこと。 （２）　窓又は換気設備等を有すること。 （３）　流水式手洗い設備が備えられていること。 ８　排水設備

８　排水設備 （１）　浴場の汚水を屋外の下水溝、排水ます等に遅滞なく排水できる排水溝等を設けること。 （２）　排水溝、排水管及びこれに付属する排水ますは、コンクリート等の不浸透性材料を用い、臭気の発散、汚水の漏出を防ぐために必要な設備とすること。 （３）　排水溝及び排水ますは、衛生害虫等が発生せず、かつ、ねずみが侵入しにくい構造であること。 ９　休息室 必要に応じ、休息のための場所を設けること。 10　その他の入浴設備を設ける場合 （１）　サウナ室又はサウナ設備（蒸気又は熱気のもの）を設ける場合 １）　サウナ室は、男女を区別し、床面、内壁及び天井は、耐熱性の材料を用いて築造すること。 ２）　サウナ室の床面は、排水が容易に行えるようおおむね 100 分の 1.5 以上の適当な勾配を付け、隙間がなく、清掃が容易に行える構造であること。 また、室内には、掃除の際に使用される水が完全に屋外に排出できるよう排水口を設けること。 ３）　サウナ室又はサウナ設備の蒸気又は熱気の放出口、放熱パイプは、直接入浴者の身体に接触しない構造であること。 また、入浴者が接触するおそれのあるところに金属部分がある場合は、断熱材で覆う等の安全措置を講ずること。 ４）　サウナ室は、換気を適切に行うため、給気口は室内の最も低い床面に近接する適当な位置に設け、排気口は天井に近接する適当な位置に設けること。 ５）　サウナ室又はサウナ設備の適温を保つため、温度調節設備を備えること。 ６）　サウナ室又はサウナ設備には、サウナの利用基準温度を表示	（１）　浴場の汚水を屋外の下水溝、排水ます等に遅滞なく排水できる排水溝等を設けること。 （２）　排水溝、排水管及びこれに付属する排水ますは、コンクリート等の不浸透性材料を用い、臭気の発散、汚水の漏出を防ぐために必要な設備とすること。 （３）　排水溝及び排水ますは、衛生害虫等が発生せず、かつ、ねずみが侵入しにくい構造であること。 ９　休息室 必要に応じ、休息のための場所を設けること。 10　その他の入浴設備を設ける場合 （１）　サウナ室又はサウナ設備（蒸気又は熱気のもの）を設ける場合 １）　サウナ室は、男女を区別し、床面、内壁及び天井は、耐熱性の材料を用いて築造すること。 ２）　サウナ室の床面は、排水が容易に行えるようおおむね 100 分の 1.5 以上の適当な勾配を付け、隙間がなく、清掃が容易に行える構造であること。 また、室内には、掃除の際に使用される水が完全に屋外に排出できるよう排水口を設けること。 ３）　サウナ室又はサウナ設備の蒸気又は熱気の放出口、放熱パイプは、直接入浴者の身体に接触しない構造であること。 また、入浴者が接触するおそれのあるところに金属部分がある場合は、断熱材で覆う等の安全措置を講ずること。 ４）　サウナ室は、換気を適切に行うため、給気口は室内の最も低い床面に近接する適当な位置に設け、排気口は天井に近接する適当な位置に設けること。 ５）　サウナ室又はサウナ設備の適温を保つため、温度調節設備を備えること。 ６）　サウナ室又はサウナ設備には、サウナの利用基準温度を表示し、温度計を適当な位置に設置し、必要に応じて湿度計を設置す

し、温度計を適当な位置に設置し、必要に応じて湿度計を設置すること。 7） サウナ室の室内を容易に見通すことができる窓を適当な位置に設けること。 また、入浴者の安全のため、室内には、非常用ブザー等を入浴者の見やすい場所に設けること。 （2） 露天風呂を設ける場合 1） 4浴室(1)、(2)及び(10)～(17)に準じた構造とすること。 2） 屋外に設けられる浴槽の浴槽内面積及び浴槽に付帯する通路等の面積は、男女それぞれその入浴者数に応じ、十分な面積であること。 3） 屋外には洗い場を設けないこと。 4） 浴槽に付帯する通路等には脱衣室、浴室等の屋内の保温されている部分から直接出入りできる構造であること。 （3） 電気浴器を設ける場合 電気用品取締法に基づく型式承認を受けたものであること。 11 付帯施設 娯楽室、マッサージ室、アスレチック室等を設ける場合は、入浴施設と明確に区分すること。 第2 その他の公衆浴場 その他の公衆浴場にあっては、前記第1を準用する。 なお、公衆浴場の利用目的、利用形態等により、これにより難い場合であって、公衆衛生上及び風紀上支障がないと認められるときは、一部適用を除外することができるものとする。 III 衛生管理 第1 一般公衆浴場 1 施設全般の管理 （1） 施設整備は、次表により清掃及び消毒し、清潔で衛生的	ること。 7） サウナ室の室内を容易に見通すことができる窓を適当な位置に設けること。 また、入浴者の安全のため、室内には、非常用ブザー等を入浴者の見やすい場所に設けること。 （2） 露天風呂を設ける場合 1） 4浴室(1)、(2)及び(10)～(17)に準じた構造とすること。 2） 屋外に設けられる浴槽の浴槽内面積及び浴槽に付帯する通路等の面積は、男女それぞれその入浴者数に応じ、十分な面積であること。 3） 屋外には洗い場を設けないこと。 4） 浴槽に付帯する通路等には脱衣室、浴室等の屋内の保温されている部分から直接出入りできる構造であること。 （3） 電気浴器を設ける場合 電気用品取締法に基づく型式承認を受けたものであること。 11 付帯施設 娯楽室、マッサージ室、アスレチック室等を設ける場合は、入浴施設と明確に区分すること。 第2 その他の公衆浴場 その他の公衆浴場にあっては、前記第1を準用する。 なお、公衆浴場の利用目的、利用形態等により、これにより難い場合であって、公衆衛生上及び風紀上支障がないと認められるときは、一部適用を除外することができるものとする。 III 衛生管理 第1 一般公衆浴場 1 施設全般の管理 （1） 施設整備は、次表により清掃及び消毒し、清潔で衛生的に保つこと。

に保つこと。 なお、消毒には材質等に応じ、適切な消毒剤を用いることとし、河川及び湖沼に排水する場合には、環境保全のための必要な処理を行うこと。 表　別表参照 （注）※１　消毒方法は、循環配管及び浴槽の材質、腐食状況、生物膜の状況等を考慮して適切な方法を選択すること。消毒方法の留意点は、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」等を参考にすること。 ※２　上記措置に加えて、年に１回程度は循環配管内の生物膜の状況を点検し、生物膜がある場合には、その除去を行うことが望ましい。 ※３　作業従事者はエアロゾルを吸引しないようにマスク等を着用すること。 また、貯湯槽の底部は汚れが堆積しやすく低温になりやすいので、定期的に貯湯槽の底部の滞留水を排水すること。 ※４　貯水槽の清掃は「空気調和設備等の維持管理及び清掃等に係る技術上の基準」(平成 15 年 3 月 25 日厚生労働省告示第 119 号)の第２に準じて行うこととし、専門の業者に行わせることが望ましいこと。 （２）　施設の内外におけるねずみ、衛生害虫等の生息状態について、次表により点検し、適切な防除措置を講じ、清潔で衛生的に保つこと。 表　略 ２　換気、温度	なお、消毒には材質等に応じ、適切な消毒剤を用いることとし、河川及び湖沼に排水する場合には、環境保全のための必要な処理を行うこと。 表　別表参照 （注）※１　消毒方法は、循環配管及び浴槽の材質、腐食状況、生物膜の状況等を考慮して適切な方法を選択すること。消毒方法の留意点は、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」等を参考にすること。 ※２　上記措置に加えて、年に１回程度は循環配管内の生物膜の状況を点検し、生物膜がある場合には、その除去を行うことが望ましい。 ※３　作業従事者はエアロゾルを吸引しないようにマスク等を着用すること。 また、貯湯槽の底部は汚れが堆積しやすく低温になりやすいので、定期的に貯湯槽の底部の滞留水を排水すること。 ※４　貯水槽の清掃は「中央管理方式の空気調和設備等の維持管理及び清掃等に係る技術上の基準」（昭和 57 年 11 月 16 日厚生省告示第 194 号）の第２に準じて行うこととし、専門の業者に行わせることが望ましいこと。 （２）　施設の内外におけるねずみ、衛生害虫等の生息状態について、次表により点検し、適切な防除措置を講じ、清潔で衛生的に保つこと。 表　略 ２　換気、温度 脱衣室及び浴室は、脱衣又は入浴に支障のない温度に保ち、かつ、

脱衣室及び浴室は、脱衣又は入浴に支障のない温度に保ち、かつ、換気を十分に行うこと。 　なお、空気中の炭酸ガス濃度は 1500ppm 以下、一酸化炭素濃度は 10ppm 以下であること。 ３　採光、照明 　施設内の各場所は、十分な照度があり、おおむね次の範囲の照度であることが望ましいこと。 表　略 ４　脱衣室の管理 （１）　床面は、常に適度な乾燥が保たれていること。 （２）　足ふきマット及びベビー用シーツは、消毒等を行ったものと適宜取り替え、衛生的に保つこと。 なお、消毒には、材質等に応じ、適切な消毒剤を用いること。 （３）　脱衣室の給水栓には、飲用適又は飲用不適の旨をその付近の見やすい場所に表示すること。 （４）　洗濯機及び乾燥機については、利用者の見やすい場所に使用方法、禁止事項等を表示し、１月に１回以上保守点検し、事故防止に留意すること。 （５）　脱衣室等の入浴者の見やすい場所に、浴槽内に入る前には身体を洗うこと等、公衆衛生に害を及ぼすおそれのある行為をさせないよう注意喚起すること。 ５　浴室の管理 （１）　浴室は、湯気抜きを常に適切に行うとともに、給水（湯）栓等が、常に使用できるよう毎日保守点検すること。 （２）　浴槽水は適温に保つこと。 （３）　水道法（昭和 32 年法律第 177 号）第３条第９項に規定する	換気を十分に行うこと。 　なお、空気中の炭酸ガス濃度は 1500ppm 以下、一酸化炭素濃度は 10ppm 以下であること。 ３　採光、照明 　施設内の各場所は、十分な照度があり、おおむね次の範囲の照度であることが望ましいこと。 表　略 ４　脱衣室の管理 （１）　床面は、常に適度な乾燥が保たれていること。 （２）　足ふきマット及びベビー用シーツは、消毒等を行ったものと適宜取り替え、衛生的に保つこと。 なお、消毒には、材質等に応じ、適切な消毒剤を用いること。 （３）　脱衣室の給水栓には、飲用適又は飲用不適の旨をその付近の見やすい場所に表示すること。 （４）　洗濯機及び乾燥機については、利用者の見やすい場所に使用方法、禁止事項等を表示し、１月に１回以上保守点検し、事故防止に留意すること。 （５）　脱衣室等の入浴者の見やすい場所に、浴槽内に入る前には身体を洗うこと等、公衆衛生に害を及ぼすおそれのある行為をさせないよう注意喚起すること。 ５　浴室の管理 （１）　浴室は、湯気抜きを常に適切に行うとともに、給水（湯）栓等が、常に使用できるよう毎日保守点検すること。 （２）　浴槽水は適温に保つこと。 （３）　水道法（昭和 32 年法律第 177 号）第３条第９項に規定する給水装置により供給される水（以下「水道水」という。）以外の水

給水装置により供給される水（以下「水道水」という。）以外の水を使用した原水、原湯、上り用水及び上り用湯並びに浴槽水は、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」に適合するよう水質を管理すること。 （４） 浴槽水は、常に満杯状態に保ち、かつ、十分にろ過した湯水又は原湯を供給することにより溢水させ、清浄に保つこと。 （５） 浴槽水の消毒に当たっては、塩素系薬剤を使用し、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して、通常 0.4mg/L 程度を保ち、かつ、遊離残留塩素濃度は最大 1.0mg/L を超えないよう努めること。結合塩素のモノクロラミンの場合には、3 mg/L 程度を保つこと。また、当該測定結果は検査の日から３年間保管すること。 ただし、原水若しくは原湯の性質その他の条件により塩素系薬剤が使用できない場合、原水若しくは原湯のｐＨが高く塩素系薬剤の効果が減弱する場合、又はオゾン殺菌等他の消毒方法を使用する場合であって、併せて適切な衛生措置を行うのであれば、この限りではない。 （注）※１ 温泉水等を使用し、塩素系薬剤を使用する場合には、温泉水等に含まれる成分と塩素系薬剤との相互作用の有無などについて、事前に十分な調査を行うこと。 ※２ 塩素系薬剤が使用できない場合とは、低ｐＨの泉質のため有毒な塩素ガスを発生する場合、有機質を多く含む泉質のため消毒剤の投入が困難な場合、又は循環配管を使用しない浴槽で、浴槽の容量に比して原湯若しくは原水の流量が多く遊離残留塩素の維持が困難な場合などを指す。この場合、浴槽水を毎日完全に換水し、浴槽、ろ過器及び循環配管を十分清掃・消毒を行うこと等により、生物膜の生成を防止すること。 ※３ 高ｐＨの泉質に塩素系薬剤だけを用いて消毒をする場合には、レジオネラ属菌の検査により殺菌効果を検証し、遊離残留塩素濃度を維持して接触時間を長くするか、必要に応じて遊離残留塩素濃度をやや高く設定すること（例えば 0.5～1.0mg/L など）で	を使用した原水、原湯、上り用水及び上り用湯並びに浴槽水は、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」に適合するよう水質を管理すること。 （４） 浴槽水は、常に満杯状態に保ち、かつ、十分にろ過した湯水又は原湯を供給することにより溢水させ、清浄に保つこと。 （５） 浴槽水の消毒に当たっては、塩素系薬剤を使用し、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して、通常 0.2 ないしは 0.4mg/L 程度を保ち、かつ、遊離残留塩素濃度は最大 1.0mg/L を超えないよう努めること。また、当該測定結果は検査の日から 3 年間保管すること。 ただし、原水若しくは原湯の性質その他の条件により塩素系薬剤が使用できない場合、原水若しくは原湯のｐＨが高く塩素系薬剤の効果が減弱する場合、又はオゾン殺菌等他の消毒方法を使用する場合であって、併せて適切な衛生措置を行うのであれば、この限りではない。 （注）※１ 温泉水等を使用し、塩素系薬剤を使用する場合には、温泉水等に含まれる成分と塩素系薬剤との相互作用の有無などについて、事前に十分な調査を行うこと。 ※２ 塩素系薬剤が使用できない場合とは、低ｐＨの泉質のため有毒な塩素ガスを発生する場合、有機質を多く含む泉質のため消毒剤の投入が困難な場合、又は循環配管を使用しない浴槽で、浴槽の容量に比して原湯若しくは原水の流量が多く遊離残留塩素の維持が困難な場合などを指す。この場合、浴槽水を毎日完全に換水し、浴槽、ろ過器及び循環配管を十分清掃・消毒を行うこと等により、生物膜の生成を防止すること。 ※３ 高ｐＨの泉質に塩素系薬剤だけを用いて消毒をする場合には、レジオネラ属菌の検査により殺菌効果を検証し、遊離残留塩素濃度を維持して接触時間を長くするか、必要に応じて遊離残留塩素濃度をやや高く設定すること（例えば 0.5～1.0mg/L など）で十分な消毒に配慮をすること。

十分な消毒に配慮をすること。あるいは、結合塩素であるモノクロラミン消毒によること。アンモニア性窒素を含む場合や高 pH の温泉浴槽水の消毒には、濃度管理が容易で、充分な消毒効果が期待できるモノクロラミン消毒がより適していること。 ※４　オゾン殺菌、紫外線殺菌、銀イオン殺菌、光触媒などの消毒方法を採用する場合には、塩素消毒を併用する等適切な衛生措置を行うこと。また、オゾン殺菌等塩素消毒以外の消毒方法を用いる場合には、レジオネラ属菌の検査を行い、あらかじめ検証しておくこと。 ※５　オゾン殺菌による場合は、高濃度のオゾンが人体に有害であるため、活性炭による廃オゾンの処理を行うなど、浴槽水中にオゾンを含んだ気泡が存在しないようにすること。 ※６　紫外線殺菌による場合は、透過率、浴槽水の温度、照射比等を考慮して、十分な照射量であること。また、紫外線はランプのガラス管が汚れると効力が落ちるため、常時ガラス面の清浄を保つよう管理すること。 （６）循環式浴槽の浴槽水を塩素系薬剤によって消毒する場合は、当該薬剤はろ過器の直前に投入すること。 （７）消毒装置の維持管理を適切に行うこと。 （注）※１　薬液タンクの薬剤の量を確認し、補給を怠らないようにすること。 ※２　注入弁のノズルが詰まっていたり、空気をかんだりして送液が停止していないか等、送液ポンプが正常に作動し薬液の注入が行われていることを毎日確認すること。 ※３　注入弁は定期的に清掃を行い、目詰まりを起こさないようにすること。 （８）回収槽の水を浴用に供しないこと。ただし、これにより難い場合にあっては、回収槽の壁面の清掃及び消毒を頻繁に行うとともに、レジオネラ属菌が繁殖しないように、別途、回収槽の水	※４　オゾン殺菌、紫外線殺菌、銀イオン殺菌、光触媒などの消毒方法を採用する場合には、塩素消毒を併用する等適切な衛生措置を行うこと。また、オゾン殺菌等他の消毒方法を用いる場合には、レジオネラ属菌の検査を行い、あらかじめ検証しておくこと。 ※５　オゾン殺菌による場合は、高濃度のオゾンが人体に有害であるため、活性炭などによる廃オゾンの処理を行い、浴槽水中にオゾンを含んだ気泡が存在しないようにすること。 ※６　紫外線殺菌による場合は、透過率、浴槽水の温度、照射比等を考慮して、十分な照射量であること。また、紫外線はランプのガラス管が汚れると効力が落ちるため、常時ガラス面の清浄を保つよう管理すること。 （６）循環式浴槽の浴槽水を塩素系薬剤によって消毒する場合は、当該薬剤はろ過器の直前に投入すること。 （７）消毒装置の維持管理を適切に行うこと。 （注）※１　薬液タンクの薬剤の量を確認し、補給を怠らないようにすること。 ※２　注入弁のノズルが詰まっていたり、空気をかんだりして送液が停止していないか等、送液ポンプが正常に作動し薬液の注入が行われていることを毎日確認すること。 ※３　注入弁は定期的に清掃を行い、目詰まりを起こさないようにすること。 （８）回収槽の水を浴用に供しないこと。ただし、これにより難い場合にあっては、回収槽の壁面の清掃及び消毒を頻繁に行うとともに、レジオネラ属菌が繁殖しないように、別途、回収槽の水を塩素系薬剤等で消毒すること。

を塩素系薬剤等で消毒すること。 （９）浴槽に気泡発生装置等を設置している場合は、連日使用している浴槽水を使用しないこと。気泡発生装置等の内部に生物膜が形成されないように適切に管理すること。 （10）打たせ湯及びシャワーには、循環している浴槽水を使用しないこと。 （11）その他、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」等を参考にして、適切に管理すること。 ６　飲用水供給設備の管理 （１）飲用水を供給する設備については、飲用適の旨をその付近の見やすい場所に表示すること。 （２）水道法の適用を受けない飲用水及び水道事業の用に供する水道から供給を受ける水のみを水源とする受水槽（以下、「小規模受水槽」）から供給を受ける飲用水について次の表による水質検査を「水質基準に関する省令（平成 15 年厚生労働省令第 101 号）」の基準に従い行い、その結果を検査の日から３年間保管するとともに、基準を超える汚染が判明した場合は、保健所に通報し、その指示に従うこと。また、これら飲用水の消毒は、遊離残留塩素が 0.1mg/L 以上になるように管理すること。 ただし、「温泉法」（昭和 23 年法律第 125 号）第 12 条に基づき、都道府県知事が飲用の許可を与えている温泉については、適用しない。 （水道法の適用を受けない飲用水） 表　別表参照 （注）飲用水に異常を認めたときは、臨時に水道法第４条に係る検査項目のうち、必要な検査を行うこと。 （小規模受水槽）	（９）浴槽に気泡発生装置等を設置している場合は、連日使用している浴槽水を使用しないこと。 （10）打たせ湯及びシャワーには、循環している浴槽水を使用しないこと。 （11）その他、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」等を参考にして、適切に管理すること。 ６　飲用水供給設備の管理 （１）飲用水を供給する設備については、飲用適の旨をその付近の見やすい場所に表示すること。 （２）水道法の適用を受けない飲用水及び水道事業の用に供する水道から供給を受ける水のみを水源とする受水槽（以下、「小規模受水槽」）から供給を受ける飲用水について次の表による水質検査を「水質基準に関する省令（平成４年厚生省令第 69 号）」の基準に従い行い、その結果を検査の日から３年間保管するとともに、基準を超える汚染が判明した場合は、保健所に通報し、その指示に従うこと。また、これら飲用水の消毒は、遊離残留塩素が 0.1mg/L 以上になるように管理すること。 ただし、「温泉法」（昭和 23 年法律第 125 号）第 12 条に基づき、都道府県知事が飲用の許可を与えている温泉については、適用しない。 （水道法の適用を受けない飲用水） 表　別表参照 （注）飲用水に異常を認めたときは、臨時に水道法第４条に係る検査項目のうち、必要な検査を行うこと。 （小規模受水槽）

表　略 （注）飲用水に異常を認めたときは、臨時に水道法第４条に係る検査項目のうち、必要な検査を行うこと。 ７　給水、給湯設備の管理 （１）貯湯槽の温度を、通常の使用状態において湯の補給口、底部等に至るまで60℃以上に保ち、かつ、最大使用時においても55℃以上に保つようにすること。ただし、これにより難い場合には、レジオネラ属菌が繁殖しないように貯湯槽内の湯水の消毒を行うこと。 （２）給水、給湯設備は、１年に１回以上保守点検し、必要に応じて被覆その他の補修等を行うこと。 　また、小規模受水槽については、簡易専用水道に準じて管理状況について保健所等の検査を受けることが望ましいこと。 ８　その他の設備の管理 （１）　サウナ室又はサウナ設備（蒸気又は熱気のもの）を設ける場合 １）　毎日清掃・洗浄し、１月に１回以上消毒及びねずみ、衛生害虫等の点検を行うとともに、必要に応じて防除措置を講じ、清潔で衛生的に保つこと。 ２）　換気を十分に行うこと。 ３）　見やすい場所に入浴上の注意を掲示し、使用中は、入浴者の安全に注意すること。 ４）　１月に１回以上保守点検するとともに、室内の温度及び湿度について定期的に測定し、その記録を作成し、これを３年以上保存すること。 （２）　露天風呂を設ける場合	表　略 （注）飲用水に異常を認めたときは、臨時に水道法第４条に係る検査項目のうち、必要な検査を行うこと。 ７　給水、給湯設備の管理 （１）貯湯槽の温度を、通常の使用状態において湯の補給口、底部等に至るまで60℃以上に保ち、かつ、最大使用時においても55℃以上に保つようにすること。ただし、これにより難い場合には、レジオネラ属菌が繁殖しないように貯湯槽内の湯水の消毒を行うこと。 （２）給水、給湯設備は、１年に１回以上保守点検し、必要に応じて被覆その他の補修等を行うこと。 　また、小規模受水槽については、簡易専用水道に準じて管理状況について保健所等の検査を受けることが望ましいこと。 ８　その他の設備の管理 （１）　サウナ室又はサウナ設備（蒸気又は熱気のもの）を設ける場合 １）　毎日清掃・洗浄し、１月に１回以上消毒及びねずみ、衛生害虫等の点検を行うとともに、必要に応じて防除措置を講じ、清潔で衛生的に保つこと。 ２）　換気を十分に行うこと。 ３）　見やすい場所に入浴上の注意を掲示し、使用中は、入浴者の安全に注意すること。 ４）　１月に１回以上保守点検するとともに、室内の温度及び湿度について定期的に測定し、その記録を作成し、これを３年以上保存すること。 （２）　露天風呂を設ける場合 １）　浴槽に付帯する通路等は毎日清掃し、１月に１回以上消毒及

１） 浴槽に付帯する通路等は毎日清掃し、１月に１回以上消毒及びねずみ、衛生害虫等の点検を行うとともに、必要に応じて防除措置を講じ、清潔で衛生的に保つこと。 ２） 浴槽及び浴槽に付帯する通路等は、十分に照度があること。 ３） 露天風呂の周囲に植栽がある場合は、浴槽に土が入り込まないような構造とすること。 ４） その他、５浴室（２）～（11）に準じて適切に管理すること。 （３） 電気浴器を設ける場合 １） １月に１回以上保守点検するとともに、絶縁抵抗、接地抵抗等について定期的に検査を受け、その記録を作成し、これを３年以上保存すること。 ２） 見やすい場所に入浴上の注意を掲示し、使用中は、入浴者の安全に注意すること。 ９ 入浴者に対する制限 （１） おおむね 10 歳以上の男女を混浴させないこと。 （２） 入浴を通じて人から人に感染させるおそれのある感染症にかかっている者、下痢症状のある者及び泥酔者等で他の入浴者の入浴に支障を与えるおそれのある者を入浴させないこと。 （３） 浴槽に入る前に石ケン等を用いて身体をよく洗うとともに、出る際にもシャワー等で身体を洗い流すよう入浴者に衛生上の注意を喚起すること。 （４） 浴槽内で身体を洗うこと、浴室で洗濯をすること等、公衆衛生に害を及ぼすおそれのある行為をさせないこと。 10 従業者の衛生管理 （１） 衣服は、常に清潔に保つこと。 （２） ~~結核若しくは~~「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（平成 10 年法律第 114 号）により就業が制限される感染症にかかっている者又はその疑いのある者は、当該感染症	びねずみ、衛生害虫等の点検を行うとともに、必要に応じて防除措置を講じ、清潔で衛生的に保つこと。 ２） 浴槽及び浴槽に付帯する通路等は、十分に照度があること。 ３） その他、５浴室（２）～（11）に準じて適切に管理すること。 （３） 電気浴器を設ける場合 １） １月に１回以上保守点検するとともに、絶縁抵抗、接地抵抗等について定期的に検査を受け、その記録を作成し、これを３年以上保存すること。 ２） 見やすい場所に入浴上の注意を掲示し、使用中は、入浴者の安全に注意すること。 ９ 入浴者に対する制限 （１） おおむね 10 歳以上の男女を混浴させないこと。 （２） 入浴を通じて人から人に感染させるおそれのある感染症にかかっている者、下痢症状のある者及び泥酔者等で他の入浴者の入浴に支障を与えるおそれのある者を入浴させないこと。 （３） 浴槽に入る前に石ケン等を用いて身体をよく洗うとともに、出る際にもシャワー等で身体を洗い流すよう入浴者に衛生上の注意を喚起すること。 （４） 浴槽内で身体を洗うこと、浴室で洗濯をすること等、公衆衛生に害を及ぼすおそれのある行為をさせないこと。 10 従業者の衛生管理 （１） 衣服は、常に清潔に保つこと。 （２） 結核若しくは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（平成 10 年法律第 114 号）により就業が制限される感染症にかかっている者又はその疑いのある者は、当該感染症をまん延させるおそれがなくなるまでの期間業務に従事させない

をまん延させるおそれがなくなるまでの期間業務に従事させないこと。 （３） 従業者は、１年に１回以上健康診断を受けることが望ましいこと。 11　その他 （１） 脱衣室等の入浴者の見やすい場所に、浴槽内に入る前には身体を洗うこと等、公衆衛生に害を及ぼすおそれのある行為をさせないよう注意喚起する他、入浴料金、営業時間、入浴者の心得、その他必要な事項を掲示すること。 （２） 入浴施設内において、物品販売等を行う場合には、相互汚染のないよう衛生的に保つこと。 （３） 入浴者の衣類、貴重品等の盗難防止を図ること。 （４） 入浴者にタオルを貸与する場合は、新しいもの、又は消毒したもの（「クリーニング所における衛生管理要領（昭和 57 年３月 31 日環指第 48 号)」第４消毒に規定される消毒方法及び消毒効果を有する洗濯方法に従って処理されたもの）とすること。 （５） 入浴者に、くし、ヘアブラシを貸与する場合は、新しいもの、又は消毒したもの（材質等に応じ、逆性石ケン液、紫外線消毒器等を使用して処理されたもの。）とすること。 （６） 入浴者にカミソリを貸与する場合は、新しいもののみとすること。 （７） 使用済みのカミソリを放置させないこと。 （８） 入浴者に洗面道具を保管する箱を貸与するときは、不衛生にならないよう注意させるとともに、定期的に当該箱内を清掃及び消毒すること。 （９） 善良な風俗の保持に努めなければならないこと。 第２　その他の公衆浴場 　その他の公衆浴場にあっては、前記第１を準用する。 　なお、公衆浴場の利用目的利用形態等により、これにより難いこと。 （３） 従業者は、１年に１回以上健康診断を受けることが望ましいこと。 11　その他 （１） 脱衣室等の入浴者の見やすい場所に、浴槽内に入る前には身体を洗うこと等、公衆衛生に害を及ぼすおそれのある行為をさせないよう注意喚起する他、入浴料金、営業時間、入浴者の心得、その他必要な事項を掲示すること。 （２） 入浴施設内において、物品販売等を行う場合には、相互汚染のないよう衛生的に保つこと。 （３） 入浴者の衣類、貴重品等の盗難防止を図ること。 （４） 入浴者にタオルを貸与する場合は、新しいもの、又は消毒したもの（「クリーニング所における衛生管理要領（昭和 57 年３月 31 日環指第 48 号)」第４消毒に規定される消毒方法及び消毒効果を有する洗濯方法に従って処理されたもの）とすること。 （５） 入浴者に、くし、ヘアブラシを貸与する場合は、新しいもの、又は消毒したもの（材質等に応じ、逆性石ケン液、紫外線消毒器等を使用して処理されたもの。）とすること。 （６） 入浴者にカミソリを貸与する場合は、新しいもののみとすること。 （７） 使用済みのカミソリを放置させないこと。 （８） 入浴者に洗面道具を保管する箱を貸与するときは、不衛生にならないよう注意させるとともに、定期的に当該箱内を清掃及び消毒すること。 （９） 善良な風俗の保持に努めなければならないこと。 第２　その他の公衆浴場 　その他の公衆浴場にあっては、前記第１を準用する。 　なお、公衆浴場の利用目的利用形態等により、これにより難い場合であって、公衆衛生上及び風紀上支障がないと認められると

場合であって、公衆衛生上及び風紀上支障がないと認められるときは、一部適用を除外することができるものとする。 IV 自主管理体制 １　営業者は、本要領に基づき、自主管理マニュアル及びその点検表を作成し、従業者に周知徹底すること。 ２　営業者は、自主管理を効果的に行うため、自らが責任者となり又は従業者のうちから責任者を定めること。 ３　責任者は、責任をもって衛生等の管理に努めること。 ４　施設利用者中にレジオネラ症又はその疑いのある患者が発生した場合は、次の点に注意し、直ちに保健所に通報し、その指示に従うこと。 （１）浴槽、ろ過器等施設の現状を保持すること。 （２）浴槽の使用を中止すること。 （３）独自の判断で浴槽内等への消毒剤の投入を行わないこと。 注）浴槽内等に消毒剤が投入されると生きたレジオネラ属菌の検出は困難となるが、遺伝子を定量的に検出することは可能である。	きは、一部適用を除外することができるものとする。 IV 自主管理体制 １　営業者は、本要領に基づき、自主管理マニュアル及びその点検表を作成し、従業者に周知徹底すること。 ２　営業者は、自主管理を効果的に行うため、自らが責任者となり又は従業者のうちから責任者を定めること。 ３　責任者は、責任をもって衛生等の管理に努めること。 ４　施設利用者中にレジオネラ症又はその疑いのある患者が発生した場合は、次の点に注意し、直ちに保健所に通報し、その指示に従うこと。 （１）浴槽、ろ過器等施設の現状を保持すること。 （２）浴槽の使用を中止すること。 （３）独自の判断で浴槽内等への消毒剤の投入を行わないこと。

資料３　表　対照表

改訂案		現行	
場所	清掃及び消毒	場所	清掃及び消毒
脱衣室内の人が直接接触するところ〈床、壁、脱衣箱、体重計等〉	毎日清掃 1月に1回以上消毒	脱衣室内の人が直接接触するところ〈床、壁、脱衣箱、体重計等〉	毎日清掃 1月に1回以上消毒
浴室内の人が直接接触するところ(床、壁、洗いおけ、腰掛、シャワー用カーテン等)	毎日清掃 1月に1回以上消毒	浴室内の人が直接接触するところ(床、壁、洗いおけ、腰掛、シャワー用カーテン等)	毎日清掃 1月に1回以上消毒
浴槽	毎日完全に換水して浴槽を清掃すること。ただし、これにより難い場合にあっても、１週間に１回以上完全に換水して浴槽を清掃	浴槽	毎日完全に換水して浴槽を清掃すること。ただし、これにより難い場合にあっても、１週間に１回以上完全に換水して浴槽を清掃
ろ過器及び循環配管	１週間に１回以上、ろ過器を十分に逆洗浄して汚れを排出するとともに、ろ過器及び循環配管について、適切な消毒方法で生物膜を除去（注）※１※２ 配管の状況を正確に把握し、不要な配管を除去すること。	ろ過器及び循環配管	１週間に１回以上、ろ過器を十分に逆洗浄して汚れを排出するとともに、ろ過器及び循環配管について、適切な消毒方法で生物膜を除去（注）※１※２
水位計配管	１週間に１回以上、適切な消毒方法で生物膜を除去	（新規）	
シャワー	少なくとも週に１回、内部の水が置き	（新規）	

	換わるように流水。シャワーヘッドとホースは6か月に1回以上点検し、内部の汚れとスケールを1年に1回以上洗浄、清掃。		
集毛器	毎日清掃、消毒	集毛器	毎日清掃
貯湯槽	60℃以上を保ち、最大使用時にも55℃以上とし、これにより難い場合は消毒装置を設置し、生物膜の状況を監視し、必要に応じて清掃及び消毒（注）※３ 設備の破損等の確認、温度計の性能の確認を行うこと。	貯湯槽	生物膜の状況を監視し、必要に応じて清掃及び消毒（注）※３
調節箱~~（洗い場の湯栓、シャワーへ湯を送る箱）~~	生物膜の状況を監視し、必要に応じて~~適宜~~清掃及び消毒（注）※３	調整箱（洗い場の湯栓、シャワーへ湯を送る箱）	適宜清掃及び消毒
気泡発生装置	適宜清掃及び消毒	（新規）	
浴室内の排水口	適宜清掃し、汚水を適切に排水~~する~~	浴室内の排水口	適宜清掃し、汚水を適切に排水する
空気調和装置（フィルター等）、換気扇	適宜清掃	空気調和装置（フィルター等）、換気扇	適宜清掃
飲用水を供給する受水槽、高置水槽	1年に1回以上清掃（注）※４	飲用水を供給する受水槽、高置水槽	1年に1回以上清掃（注）※４
その他の給水、給湯設備	必要に応じて清掃、消毒	その他の給水、給湯設備	必要に応じて清掃、消毒
便所	毎日清掃し、防臭に努める1月に1回	便所	毎日清掃し、防臭に努める1月に1回以

	以上消毒		上消毒
排水設備（排水溝、排水管、汚水ます、温水器（排湯熱交換器）等）	適宜清掃し、防臭に努め、常に流通を良好に保ち、1月に1回以上消毒	排水設備（排水溝、排水管、汚水ます、温水器（排湯熱交換器）等）	適宜清掃し、防臭に努め、常に流通を良好に保ち、1月に1回以上消毒
その他の施設（娯楽室、マッサージ室、アスレチック室等）	毎日清掃 6月に1回以上消毒	その他の施設（娯楽室、マッサージ室、アスレチック室等）	毎日清掃 6月に1回以上消毒
施設の周囲	毎日清掃	施設の周囲	毎日清掃

（水道法の適用を受けない飲用水）

改訂案		現行	
検査対象	検査回数	検査対象	検査回数
色、濁り、臭い、味	1日に1回以上	色、濁り、臭い、味	1日に1回以上
水質基準に関する省令（平成26年2月28日厚生労働省令第15号）の表の上欄に掲げる事項のうち、一般細菌、大腸菌、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素、塩化物イオン、有機物（全有機炭素（TOC）の量）、pH値、味、臭気、色度及び濁度並びにトリクロロエチレン及びテトラクロロエチレン~~、1,1,1-トリクロロエタン~~等に代表される有機溶剤その他の水質基準項目のうち周辺の水質検査結果等から判断して必要となる事項	1年に1回以上	水質基準に関する省令（平成4年厚生省令第69号）の表の上欄に掲げる事項のうち、一般細菌、大腸菌群、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素、塩素イオン、有機物等（過マンガン酸カリウム消費量）、pH値、味、臭気、色度及び濁度並びにトリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタン等に代表される有機溶剤のうち周辺の水質検査結果等から判断して必要となる事項	1年に1回以上

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)
公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究
平成 30 (2018) 年度分担研究報告書

レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

研究分担者	○森本　洋	北海道立衛生研究所
	磯部　順子	富山県衛生研究所
	黒木　俊郎	岡山理科大学
	佐々木麻里	大分県衛生環境研究センター
	田栗　利紹	長崎県環境保健研究センター
	中西　典子	神戸市環境保健研究所
研究協力者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
	緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター
	小川　恵子	北海道立衛生研究所
	金谷　潤一	富山県衛生研究所
	倉　文明	国立感染症研究所
	田中　忍	神戸市環境保健研究所
	千田　恭子	仙台市衛生研究所
	平塚　貴大	広島県立総合技術研究所
	三津橋和也	北海道立衛生研究所
	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
	山口　友美	宮城県保健環境センター
	吉野　修司	宮崎県衛生環境研究所
研究代表者	前川　純子	国立感染症研究所

研究要旨

レジオネラ属菌検査法の標準化を目的とし、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの3点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下、WG)内で検討を行った。

外部精度管理はWGサポートのもと、平成27年度以降、実施母体を日水製薬株式会社とし、平成 30 年度は公的、民間を問わず全国 148 の検査機関(延べ 151 試料配付)に対し行われた。配付試料については、信頼性においてメーカーにより品質と多施設への発送が保証されることから、ビオメリュー社のBioBall(特注品)を使用した。検査法については、配付試料がより安定した性能を維持できる範囲内で、検査工程のどの部分に重きを置くかの定義付けを行い、一部指定した。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所等 70 機関については、WG においても独自に集計・解析を実施し、過去 3 年間の結果とも比較した。今年度の濃縮検査結果については、回収

率で判定した。4 年連続参加した機関は 52 機関あった。解析の結果、これまで同様特定のいくつかの機関に検査手技の再確認が必要と判定される傾向が認められた。以上のことから、本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことができる方法であり、今後さらに調査システムの検討を重ね、継続的かつ安定した外部精度管理調査ができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要と思われた。標準的検査法については、これまで WG が推奨している方法と改訂された ISO 法との調整を行い、「公衆浴場における衛生等管理要領」内の推奨検査法「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」として提示した。

A. 研究目的

レジオネラ属菌検査法の標準化を目的とし、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの 3 点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下、WG)内で検討を行った。

B. 研究方法

1)精度管理

外部精度管理の実施

〈実施概要〉

平成 27 年度以降、実施母体を日水製薬株式会社(以下、日水製薬)とし、公的、民間を問わず全国の検査機関に案内を発信し外部精度管理が実施された。

まず平成 30 年 7 月下旬に日水製薬より「参加募集案内文、参加要件、指定法」(別紙参照)が示され参加募集が行われ、9 月 20 日(木)に締め切られた。その後、10 月 15 日(月)に試料、試料送付案内、試験概要、結果記入メモ及び試料受領書兼承諾書(別紙参照)が参加者に向け発送された。回答期限は 11 月 16 日(金)17 時に指定された。解析結果は、平成 31 年 1 月 31 日(木)より、検査実施者が専用ホームページから個別の ID とパスワード(以下 PW)によりログインし閲覧可能となることが案内で示された。

〈参加機関〉

全国 148 の検査機関(延べ 151 試料配付)に対し実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所等 70 機関が参加した。

〈配付試料〉

信頼性においてメーカーにより品質と多施設への発送が保証されることから、例年通りビオメリュー社の BioBall(特注品)を使用した。

〈検査法〉

配付試料がより安定した性能を維持できる範囲内で、検査工程のどの部分に重きを置くかの定義付けを行い、一部指定した(別紙サーベイ指定法参照)。

〈結果集計と解析〉

全参加機関に対する集計・解析は日水製薬が実施した。地方衛生研究所等 70 機関については、WG においても独自に集計・解析を実施し、過去 3 年間の結果とも比較した。なお報告値について、WG では平成 25 年度から実施している研究報告と同じ換算値として集計することとした[1-4]。また、各機関の最終菌数は、コロニー数の平均値に換算のための定数(非濃縮検体①は×100、非濃縮検体②は×1000)を乗じたのち、小数第一位を四捨五入した数値を表示した。

本調査での非濃縮検体の目標良好範囲は、以下のように設定した。メーカー保証による95%信頼区間（下限値 18802.8cfu/Ball、上限値 27668.3 cfu/Ball)をレジオネラ属菌検査で使用される、検体 100ml 中の cfu（colony forming unit)に換算すると、下限値 3760.56、上限値 5533.66 cfu/100ml となる。例えば、非濃縮検体においては、分離平板上の1集落を1000cfu/100ml と換算することから、結果は1000cfu の整数倍となる。このことを勘案し、前述の 100ml 中の cfu を下限値については 100 の位を切り捨て、上限値については切り上げ 3000 ～ 6000cfu/100ml と補正した。さらにこの範囲に対し、国内における食品衛生外部精度管理で実績のある一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が統計処理で行っている「Xbar 管理図における管理線を理化学調査では添加量の 70%および 120%、微生物学調査では全体の平均値の 30%および 300%」という考え方を参考に、本外部精度管理では、「メーカー保証されている菌数をベースに補正した範囲に対し、その下限値の 30%および上限値の 300%」という考え方を導入することとした。その結果、本外部精度管理においては、目標良好範囲を 900～18000cfu/100ml として設定することとした。

本年度から、濃縮検体については、回収率により判定を行った。目標とした回収率は、一昨年度の外部精度管理で報告を求めたすべての検体（非濃縮①、②、濃縮）において目標良好範囲を報告し、かつ非濃縮の菌数が濃縮の菌数以上を報告した機関のうち、80%以上の機関がクリアしていた 20%を下限とし、上限を 100%未満とした。この回収率については、昨年度参考値として解析した判定値と同じであり、評価基準として妥当と判断した。

日水製薬で行った全国の結果集計・解析は、平成 31 年 1 月 31 日（木)、検査実施者が専用ホームページから個別の ID と PW によりログインし、解析結果をダウンロードすることが可能となった。

2)標準的検査法および研修システム

これまで WG が推奨している方法[1, 5]と平成 29 年 5 月に改訂された ISO 法との調整を行った。一部の検査工程（ろ過濃縮におけるろ過フィルターの洗浄時間)について、改訂 ISO 法との比較が必要であったことから、外部精度管理用の配付試料である BioBall を利用して検証を行った。検証方法を以下に示す。滅菌生理食塩水1Lに BioBall 2 個を入れ、十分混和後、外部精度管理の手法に従い非濃縮②による菌数を測定した。均質化された試料各 500mL をポリカーボネート製フィルターで同時にろ過後、それぞれのろ過フィルターをボルテックス 1 分、2 分により洗浄し菌数測定を行い、回収率の比較を行った。これらの比較を 10 試料について行った。培地は OXOID のアガーベースとサプリメントにより調製した BCYEα培地を使用した。本検証後、「公衆浴場における衛生等管理要領」内の推奨検査法「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」について WG内で検討した。なお、本検査方法は、公衆浴場施設が日常の衛生管理を確認するために必要な基本となる検査法を提示するものであり、レジオネラ症患者発生時の感染源調査での検査においては、これに縛られるものではない。外部精度管理に参加した施設を対象に日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナー（別紙参照)において、適切な検査法の普及に努めた。研修システムについては、WG 内でこれまでの課題につい

て改めて検討した。

C. 研究結果及び考察

1）精度管理

WG が集計した地方衛生研究所等 70 機関の報告菌数を表 1 に示した。非濃縮検体において目標良好範囲を報告した機関は、非濃縮検体①、②ともに回答のあった 70 機関中 68 機関（約 97%）であった。平均値、中央値においては、若干非濃縮検体②で低い値だったが、有意な差は認められなかった。一方、濃縮検体では、これまで同様非濃縮検体と比べ報告菌数の減少が認められた。ろ過濃縮では、回収率算出の分母となる非濃縮検体②の結果と比較すると、報告菌数が平均値、中央値ともに約 63％低い報告値となっていた。またレジオネラ属菌を検出できなかった機関も 1 機関あった。遠心濃縮では、実施機関が少なかったが、非濃縮検体②の結果と比較すると、報告菌数が平均値では約 60％、中央値では 49％低い報告値となっていた。参考値として報告を求めた選択分離培地による結果では、検査を実施した 68 機関中 63 機関（約 93％）が目標良好範囲を報告していた。しかしながら、非選択分離培地である BCYEα培地の結果と比較すると、報告菌数が平均値、中央値ともに約 14％低い報告値となっていた。減少率には違いがあるが、毎年同様の傾向が認められ、選択分離培地による供試菌に対する発育抑制があったと考えられた。このことは、過去にも WG で報告している[1, 5-7]。

表 2 に回収率を示した。日水製薬による外部精度管理では、非濃縮検体②が 100 倍濃縮のスタート検体だったことから、非濃縮②の結果を分母として回収率を算出し判定の基準としたが、本報告では、参考値として非濃縮①を分母とした場合も算出した。目標回収率 20％以上 100％未満をクリアしたのは、非濃縮②を分母とした場合、70 機関中 52 機関（約 74％：昨年度 非回答及び非濃縮②で非検出だった計 4 機関を除く 67 機関中 37 機関 約 55％）であった。非濃縮①を分母とした場合、70 機関中 55 機関（約 79％：昨年度 非回答だった 1 機関を除く 70 機関中 45 機関 約 64％）であった。また、どちらの試料を分母にしても目標回収率をクリアしていたのは、70 機関中 51 機関（約 73％：昨年度 非回答及び非濃縮②で非検出だった計 4 機関を除く 67 機関中 34 機関 約 51 ％）であった。本年度の回収率は、前述のどの分母を基準にしても昨年度を大きく上回る結果が報告されていた。WG では、これまでにも試料を濃縮した際のレジオネラ属菌の効率的な回収について報告してきたところである[1, 5]が、本年度の結果から、各検査機関での濃縮検査に対する意識が高まってきている結果と思われる。一方で、この回収率については検査機関ごとで差がある、あるいは同一の検査機関であっても安定しない場合がある、など今後も検討が必要な事項である。その不安定となる要因は、各検査機関で異なると考えられ、内部精度管理により自施設の実態把握に努めることが肝要である。今回目標として設定した回収率 20％は、数値だけでみると低い回収率に思われるが、レジオネラ属菌の検査においては、前述のとおり各項目において 2～3 割の機関がクリアできていない数値であること、また計算上では 50CFU/100mL のレジオネラ属菌数の試料まで定性的に確認できる数値であることから、目標としては適当な回収率であると思われる。引き続き WG 内でも回収率の向上と安定に向け検討したいと考える。

表 3 に平成 27～30 年度の結果判定一覧を示した。ここでは、過去 4 年間の比較をしやすくするために、昨年度までの報告菌数から見た判定による結果も記載した。参加機関は、平成 27 年度 67 機関、平成 28、29 年度 71 機関、平成 30 年度 70 機関、4 年連続で参加した機関は 55 機関であった。回収率による判定では、今年度目標良好範囲外を報告したのは 18 機関あった。このうち 14 機関は参考的に回収率による判定を取り入れた昨年度も参加していたが、うち 9 機関は 2 年連続で良好範囲外を報告していた。一方、昨年度までの報告菌数から見た判定を当てはめた場合、目標良好範囲外の結果を報告したのは 28 機関あり、うち 4 年連続が 2 機関、3 年連続が 2 機関、2 年連続が 7 機関、同様の結果を報告していた。これらの機関を含め 4 回の外部精度管理中複数回目標良好範囲外を報告していたのは 28 機関あった。総合的に見ると、検査結果が安定する方向に向かっている機関もあるが、特定のいくつかの機関については、特に検査手技の再確認が必要と思われた。外部精度管理の結果は、検査機関の良し悪しを判断するためのものではなく、その時の結果を次に生かすためのものである。目標良好範囲を報告した機関は、安定した検査環境を継続すること、目標良好範囲外の結果を報告した機関は検査法の再確認を行うこと、それぞれの立場に立った認識と対応が必要である。特に複数年連続して目標良好範囲外の結果を報告している機関は、改めて検査手技を再確認する必要があると思われた。

以上のことから、本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ手技の検証を促すことができる方法であることが確認された。

ここまでの結果を解析した結果、以下の項目に該当する検査機関は、報告状況に応じた検査手技を再確認する必要があると思われた。

・非濃縮試料①で目標良好範囲外を報告。

・非濃縮試料②で目標良好範囲外を報告。

・ろ過濃縮（回収率）で目標良好範囲外を報告（特にレジオネラ属菌非検出だった機関）。

・遠心濃縮（回収率）で目標良好範囲外を報告。

・非濃縮及び濃縮試料（回収率）で目標良好範囲外を報告。

・2 年連続濃縮試料（回収率）で目標良好範囲外を報告。

・回収率の良し悪しにかかわらず、複数年連続で濃縮試料（報告菌数）が、目標良好範囲外を報告。

・本年度濃縮試料（報告菌数）で目標良好範囲外を報告し、4 回の外部精度管理中複数回目標良好範囲外を報告。

・非濃縮①と②で報告菌数が大きく異なっていた。

これまでにも報告してきたが、レジオネラ属菌検査においては、コンラージや濃縮時のいくつかの検査工程等が結果へ影響し、菌数減少の原因となるので丁寧な検査対応が必要である。また複数年連続で良好範囲外の結果を報告していた機関は、試料の混ぜ方、培地の状態、5 枚の培地への各接種量が安定していたか、コンラージの力加減、濃縮操作等、改めて検査工程を見直し検証する必要があると思われる。

2）標準的検査法および研修システム

改訂 ISO 法では、ろ過攪拌時間を少なくとも 2 分としているが、WG 推奨法では、これまで新

版レジオネラ症防止指針に従い1分としてきた。今回ポリカーボネート製フィルターを対象に洗浄時間を1分及び2分で比較した。結果を表4に示した。洗浄時間1分の平均値と洗浄時間2分の平均値の差の有意性を確かめるために、有意水準5%で両側検定の t 検定を行ったところ、t (9)＝0.95、p＝0.37(p>0.05)であり、洗浄時間の違いによる平均値の差に有意差は見られなかった。そのため、WGでは、ポリカーボネート製フィルターを使用した場合、その洗浄時間を1分間とした。この結果を考慮したWG推奨法と平成29年5月に改訂されたISO 11731で示された方法との調整を改めて行い、公衆浴場の水質基準を担保するため、国から自治体に技術的助言として示すための検査法として「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示した。本報告書では、検査法作成過程についても示す意義があると考え、本法の叩き台となった検査法案と、それをもとにWG内で検討した検査法最終提示案を収載することとした。

研修については、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修　新興再興感染症技術研修」内で、WG 推奨法に沿った実習を伴ったレジオネラ検査研修会を行った。本研修会は、平成26、28年度に続いて3度目であった。対象は、地方衛生研究所等の公的機関である。内容的には、充実したものであったが、その反面、準備、調整には大きな労力と時間を要した。一方、座学による研修会として、日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナーに4年連続参加し、WG推奨法の普及に努めた。しかしながら、座学のみであることから、毎年実習を伴った研修会についての要望を耳にしている。これまでにも、公的、民間等対象となる検査機関を区別することなく、実習を伴った研修会を開催するための検討がWG内でなされているが、主催者、場所、条件、予算、講師の養成等クリアすべき課題が多く、目立った進展が見られていない。このことについては、本研究班において解決策を見出すのは困難と思われ、研究班内外からの幅広い意見を求め方策を検討していかなければならないと考える。

D.結論

1)精度管理

平成27年度以降、外部精度管理調査実施主体を民間会社とし、官民問わず幅広い調査を試みた。これにより、感染症法の検査対象となる病原体を用いた、全国規模での外部精度管理調査(積極的疫学調査における環境調査)の一モデルを示すことができたと思われる。また4年連続して参加した検査機関のデータ解析から、本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことができる方法であることが確認された。このことからも、今後さらに調査システムの検討を重ね、継続的かつ安定した外部精度管理調査ができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要と思われる。

内部精度管理については、2)に記載する。

2)標準的検査法および研修システム

公衆浴場の水質を担保するため、国から自治体に技術的助言として示すための検査法として「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示した。なお、本検査方法は、公衆浴場施設が日常の衛生管理を確認するために必要な基本となる検査法を提示するものであり、レジオネラ症患者発生時の感染

源調査での検査においては、これに縛られるものではない。今後は、本検査法を適切に全国へ普及・周知させるとともに、本法に沿った内部精度管理が各検査機関で実施できるよう、その対応方法を検討する必要がある。

研修会については、実施母体、講師養成、経費等を含めクリアすべき課題が多く、本研究班において解決策を見出すのは困難と思われ、研究班内外からの幅広い意見を求め方策を検討していかなければならないと考える。

E. 参考文献

1) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み: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)「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」平成 25 年度総括・分担研究報告書 pp.105-132.

2) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み: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)「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」平成 26 年度総括・分担研究報告書 pp.77-101.

3) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み: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)「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」平成 27 年度総括・分担研究報告書 pp.71-95.

4)森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み: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)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28 年度総括・分担研究報告書 pp.85-104.

5) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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)「公衆浴場等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 24 年度総括・分担研究報告書 pp.93-130.

6) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討-レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループの発足及び地方衛生研究所を対象としたレジオネラ属菌検査法アンケート調査結果-,-外部精度管理試料安定化に向けた取り組み-: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)「公衆浴場等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 22 年度総括・分担研究報告書 pp.101-161.

7) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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)「公衆浴場等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 23 年度総括・分担研究報告書 pp.113-134.

F. 研究発表

研修会

1) 森本 洋:レジオネラ培養法概論ほか、平成 30 年度 短期研修 新興再興感染症技術研修、2018 年 10 月、東京

2) 森本　洋:レジオネラ属菌培養検査について、2018 年度レジオネラ属菌検査セミナー、2019 年 3 月、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1　全参加機関報告菌数　　cfu/100ml

施設No.	非濃縮①	非濃縮①*	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮	施設No.	非濃縮①	非濃縮①*	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮
1	6660	5860	6200	3346		41	3640	3200	3400	784	
2	2940	2200	2200	1126		42	3160		4000	1194	
3	3320	2000	1400	1114		43	3040	3200	2400	840	
4	3080	2500	3600	0		44	3840	3375	2800	1762	
5	760	933	400		570	45	3160	3600	3000	1740	
6	2240	1525	2600	120		46	4720	3600	2800	1344	
7	4700	4900	6000	440		47	4400	3500	2200	2568	
8	2300	1500	2000	710		48	5040	5060	3200	228	
9	4300	4400	4600	2800		49	4100	3800	3600	1300	
10	1600	2100	1000	500		50	4900	3700	6000		1490
11	1000	250	1400		310	51	3300	3000	4000	740	
12	3560	2900	5200		1808	52	4100	3900	4200	1590	
13	4000	3450	2200	394		53	2920	2050	3600		1672
14	5300	4900	4000	1290		54	4700	4600	4000	760	
15	3580	2625	3200	910		55	1740	600	1200	518	
16	3640	2830	6200		1764	56	2300	1380	2800	1200	
17	2620	1800	1600	1132		57	1980	1000	1800	1212	
18	5380	4750	6800	2900		58	3400	2800	4000	1250	
19	5160	5900	3000	1346		59	3980	4000	3400	1430	
20	4500	3600	3600	680		60	2300	2000	2000	1490	
21	3600	4000	3800	2300		61	900	950	1400	188	
22	3120	3550	4200	1584		62	4300	3000	3400	1960	
23	1180	1400	1400	506		63	4580	3575	6400	602	
24	3640	3150	4600	618		64	2080		2800	1368	
25	2100	1900	2000	1600		65	7160	5425	7200	1478	
26	3400	3300	2400	2098		66	840	850	200	872	
27	3500	4100	4200	2100		67	2600	1500	2000	590	
28	3600	2200	5000	510		68	2650	2675	2000	1850	
29	2340	2350	2000	682		69	2180	2120	1800	320	
30	2380	2000	2200	1698		70	3160	2430	4400	888	
31	2000	650	2600	1058							
32	2560	1075	1600	378							
33	3500	2700	4000	1172							
34	3740	4000	2600	1830							
35	3900	2700	4400	670							
36	3000	2900	2000	1890							
37	1300	550	1400	640							
38	4440	3350	3200	1216							
39	3000	3150	3600	2138							
40	3880	3050	4000	325							

平均値	3314	2851	3206	1186	1269
最大値	7160	5900	7200	3346	1808
最小値	760	250	200	0	310
中央値	3360	2900	3100	1152	1581
対象機関	70	68	70	64	6
良好機関	68(97%)	63(93%)	68(97%)		

＊選択分離培地による結果

表2　全施設の回収率　　（%）

施設No.	分母* 非濃縮①	分母* 非濃縮②	施設No.	分母* 非濃縮①	分母* 非濃縮②	施設No.	分母* 非濃縮①	分母* 非濃縮②
1	50.2	54	27	60	50	53	57.3	46.4
2	38.3	51.2	28	14.2	10.2	54	16.2	19
3	33.6	79.6	29	29.1	34.1	55	29.8	43.2
4	0	0	30	71.3	77.2	56	52.2	42.9
5	75	142.5	31	52.9	40.7	57	61.2	67.3
6	5.4	4.6	32	14.8	23.6	58	36.8	31.2
7	9.4	7.3	33	33.5	29.3	59	35.9	42.1
8	30.9	35.5	34	48.9	70.4	60	64.8	74.5
9	65.1	60.9	35	17.2	15.2	61	20.9	13.4
10	31.3	50	36	63	94.5	62	45.6	57.6
11	31	22.1	37	49.2	45.7	63	13.1	9.4
12	50.8	34.8	38	27.4	38	64	65.8	48.9
13	9.9	17.9	39	71.3	59.4	65	20.6	20.5
14	24.3	32.3	40	8.4	8.1	66	103.8	436
15	25.4	28.4	41	21.5	23.1	67	22.7	29.5
16	48.5	28.5	42	37.8	29.9	68	69.8	92.5
17	43.2	70.8	43	27.6	35	69	14.7	17.8
18	53.9	42.6	44	45.9	62.9	70	28.1	20.2
19	26.1	44.9	45	55.1	58			
20	15.1	18.9	46	28.5	48	平均値	38.6	47.8
21	63.9	60.5	47	58.4	116.7	最大値	103.8	436
22	50.8	37.7	48	4.5	7.1	最小値	0	0
23	42.9	36.1	49	31.7	36.1	中央値	34.8	37.8
24	17	13.4	50	30.4	24.8	対象機関	70	70
25	76.2	80	51	22.4	18.5	良好機関	55（79%）	52（74%）
26	61.7	87.4	52	38.8	37.9			

＊参考

表3　2015～2018年度結果一覧(2015/2016/2017/2018、良好範囲(菌数〇、回収率(分母非濃縮② 2017/2018)黒字)、範囲外(菌数＊、回収率(2017/2018)**赤字**、検査項目外又は不参加－)

No.	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮	No.	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮
1	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇		37	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／＊／＊	
2	－／－／〇／〇	－／－／＊／〇	－／－／＊／〇		38	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／＊／〇／〇	
3	－／－／－／〇	－／－／－／〇	－／－／－／〇		39	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／〇／〇	
4	－／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	－／－／＊／＊	－／＊／－／－	40	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／〇／＊	
5	－／〇／〇／＊	－／〇／〇／＊		－／＊／〇／＊	41	－／－／－／〇	－／－／－／〇	－／－／－／＊	
6	〇／〇／－／〇	－／〇／－／〇	＊／＊／－／＊		42	＊／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／＊／〇	
7	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／＊／＊		43	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	－／－／〇／＊	＊／＊／－／－
8	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／＊		44	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇	
9	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇		45	＊／＊／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／＊／＊／〇	
10	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／＊		46	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇	
11	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇		＊／〇／＊／＊	47	〇／－／〇／〇	－／－／〇／〇	〇／－／〇／〇	
12	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇－／－／－	〇／〇／〇／〇	48	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／＊／＊	
13	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／＊／＊／＊		49	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／〇／〇	
14	＊／〇／〇／〇	－／＊／〇／〇	＊／＊／＊／〇		50	－／－／〇／〇	－／－／〇／〇		－／－／〇／〇
15	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／＊／〇		51	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／＊	
16	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	－／－／〇／－	＊／〇／－／〇	52	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇	
17	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／＊／〇／〇		53	－／〇／〇／〇	－／〇／＊／〇		－／＊／〇／〇
18	－／－／〇／〇	－／－／〇／〇	－／－／〇／〇		54	〇／〇／－／〇	－／〇／－／〇	〇／〇／－／＊	
19	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／〇／〇		55	〇／〇／〇／〇	－／〇／＊／〇	＊／＊／＊／＊	
20	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／〇／＊		56	＊／〇／〇／〇	－／〇／＊／〇	＊／〇／＊／〇	
21	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／＊／〇		57	－／－／〇／〇	－／－／〇／〇	－／－／〇／〇	
22	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇		58	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／＊／〇／〇	
23	－／－／＊／〇	－／－／＊／〇	－／－／＊／＊		59	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇	
24	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／＊／＊		60	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇	
25	－／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇		61	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／＊／＊	
26	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇		62	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／〇／〇	
27	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇		63	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	＊／〇／〇／＊	
28	－／－／－／〇	－／－／－／〇	－／－／－／＊		64	〇／－／〇／〇	－／－／〇／〇	－／－／〇／〇	
29	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／＊		65	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	－／＊／〇／〇	＊／－／－／－
30	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇		66	〇／〇／〇／＊	－／〇／〇／＊	〇／＊／〇／＊	
31	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇		67	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	－／〇／〇／＊	＊／－／－／－
32	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／＊		68	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	
33	〇／＊／－／〇	－／＊／－／〇	＊／＊／－／〇	〇／－／－／－	69	〇／－／－／〇	－／－／－／〇	〇／－／－／＊	
34	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／〇／〇／〇		70	〇／〇／〇／〇	－／〇／〇／〇	〇／＊／〇／＊	
35	〇／〇／〇／〇	－／＊／〇／〇	＊／＊／〇／＊						
36	〇／〇／〇／〇	－／＊／〇／〇	〇／＊／〇／〇						

表4　ポリカーボネート製フィルターを使用した洗浄時間の違いによる回収率の比較

条件		実験①	実験②	実験③	実験④	実験⑤	実験⑥	実験⑦	実験⑧	実験⑨	実験⑩	平均
非濃縮	菌数	3000	2600	3400	3000	5600	3600	4200	2400	3800	4600	3620
ろ過濃縮洗浄1分	菌数	1964	1808	1670	1336	1934	1438	2142	1158	1546	1936	1693
	回収率	65.5	69.5	49.1	44.5	34.5	39.9	51	48.3	40.7	42.1	48.5
ろ過濃縮洗浄2分	菌数	1450	1998	1452	1292	1766	1508	1702	1352	1350	2062	1593
	回収率	48.3	76.8	42.7	43.1	31.5	41.9	40.5	56.3	35.5	44.8	46.1

2018年 7月吉日

レジオネラ属菌検査実施施設様各位

2018年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ のご案内

日頃は弊社製品のご愛顧を賜り厚く御礼申しあげます。
さて、この度レジオネラ属菌検査を実施されている施設様を対象に、下記の要領で「2018年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」を実施致します。
日常の検査精度の確認のため、奮ってご参加いただきますようお願い申しあげます。

■参加要件

別紙1.「参加要件」を満たし、かつ、別紙2.「2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」（参考 ： 厚労科研費レジオネラ属菌検査推奨法 / ISO11731:1998 / ISO 11731:2017）による検査対応が可能なご施設様

■実施概要

検査試料	レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料（凍結乾燥品、-18～-33℃保存） 同封書類：①試料送付のご案内、②試料の使用方法・操作手順、③結果記入用メモ、④試料受領書兼承諾書
実施方法について	「2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」に従って実施お願いします（参照：別紙2）。 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、"ISO 11731:1998"の考え方を基本として平成23年度より検討されている「厚生労働省科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業」（以下、レジオネラ研究事業）において報告された方法に基づき、また"ISO11731:2017"を参考に、本精度管理サーベイ用に変法したものです。
参加費	1 セット 35,000 円（消費税別） ※原材料の値上げにより昨年度の価格から変更となっております。
参加募集数	150セット（募集数に達し次第、締め切らせていただきますのでご了承ください。）

■実施スケジュール（予定）

7月 下旬	参加募集開始 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)の2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ申込フォームから申込手順に従いお申込ください。 ● 1施設複数名のお申込みも可能です。検査試料はそれぞれの試験実施者様へお送りさせていただきます。
9月20日（木）	参加募集締切
10月15日（月）	試料発送 ● 検査試料到着後は直ちに-18～-33℃で保管願います。
10月31日（水）	請求書送付 ● 請求書はお申込み者様へ一括でお送りさせていただきます。
10月16日（火）～ 11月16日（金）	検査実施 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)にてIDとパスワードでログイン後、結果を入力していただきます。 ● 成績入力方法は検査試料に同封の資料を参照してください。
11月16日（金）17時	回答締切
12月21日（金）	参加費お支払い期限 ● 振込用紙をご利用いただくか、弊社指定の口座にお振り込みいただきます。なお、振込手数料は貴施設ご負担でお願い致します。銀行振り込みの控えをもって領収書とさせていただきます。
1月31日（木）	解析結果返却 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)にてID 番号とパスワードでログイン後、結果を表示・ダウンロードができます。

日水製薬株式会社

■問い合わせ先

日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局

〒110-8736 東京都台東区上野3丁目24番6号

TEL：03-5846-5729 FAX:03-5846-5629

E-mail: legi-srvy@nissui-pharm.jp

別紙 1.

参加要件

2018 年 7 月吉日

日水製薬株式会社

レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局

下記の 1. 使用要件、2. 使用承諾、および 3. 注意事項について了承頂けるご施設様に参加をお願いいたします。

1. 使用要件

1)病原体のバイオセーフティ―レベル(以下 BSL)規定について

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では、病原体を病原性の最も高いものを一種病原体として、四種病原体まで規定しています。

また、病原体の規定とは別に、病原体の取扱者に対しての感染被害などの健康影響に基づき、BSL が規定されています。この BSL にも基づき、最も低リスクの病原体を扱うリスク群を BSL1 として、BSL4 までのリスク群を規定しています。

本菌種は BSL2 に分類されます。BSL2 の微生物に対して設備・技術に対する要件を以下に記載いたします。

2)施設要件

1. 実験室内に、適切に管理された微生物試験を行う管理区域を有すること。管理区域の出入口にはバイオハザードマークを標示すること。
2. 管理区域の出入口及び病原体保管庫は施錠が出来る構造であること。保管設備にはバイオハザードマークを標示すること。
3. 消毒用の薬剤が常備されており、壁・床等の消毒が可能であること。
4. 管理区域内もしくは実験施設内に、高圧蒸気滅菌装置、もしくはそれに準ずる滅菌設備を有すること。
5. 本サーベイでは、検査工程上エアロゾル発生の危険があることから、生物学用安全キャビネットが必要です。

3)作業従事者要件

作業従事者に求められる基本的な要件について以下に記載します。

1. 1 年に 1 回以上、病原体に関するセキュリティ及びセーフティに関して教育を受けていること。
2. 1 の要件を満たさない場合には、微生物試験に習熟しており十分な知識・技能を有すること。あるいは微生物試験に習熟した人の指導のもとで試験を行うこと。

2. 精度管理サーベイ試料の使用承諾

1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

3. 注意事項

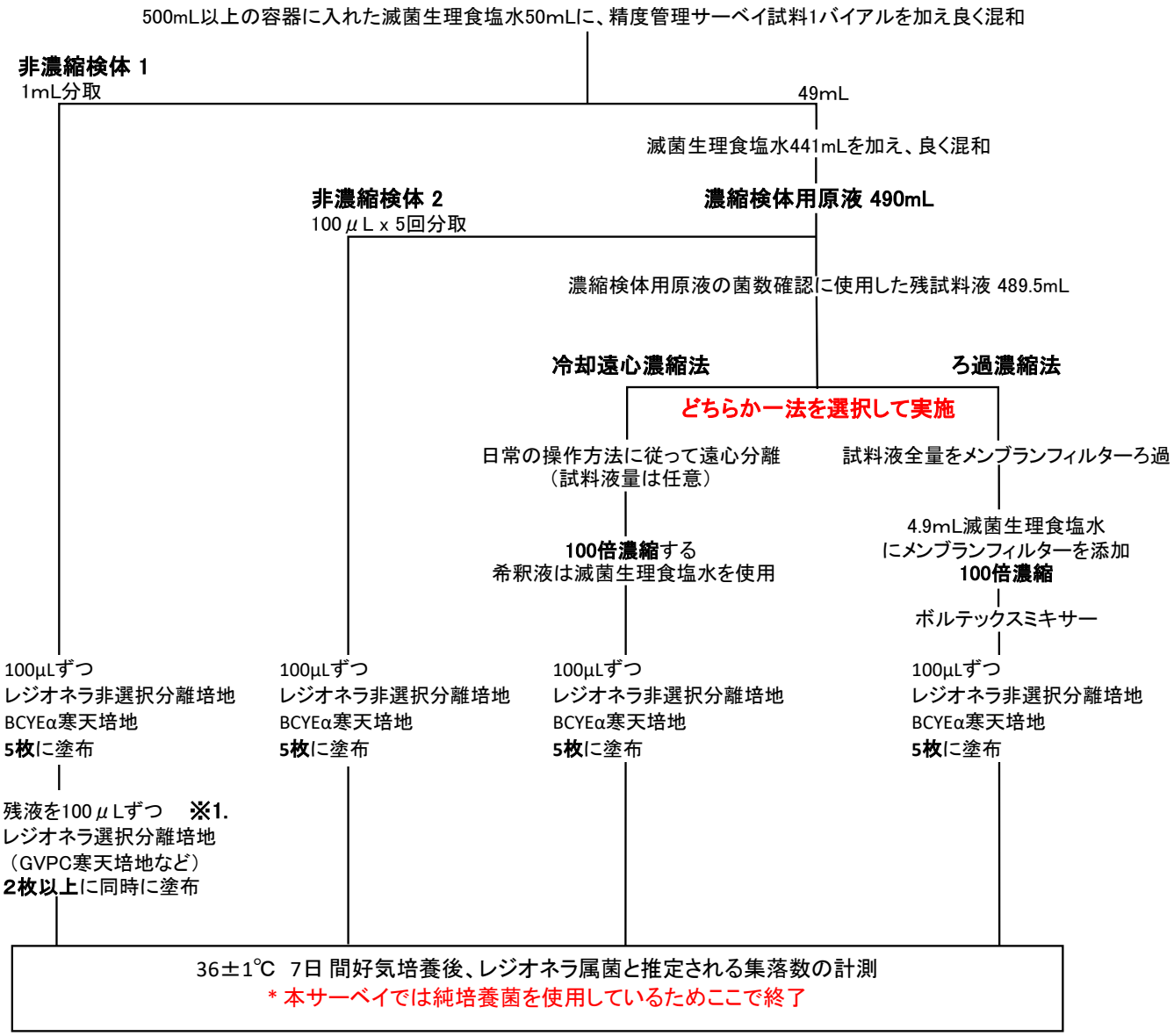
予告なく実施スケジュールが変更となることがあります。変更後のスケジュールは、メール等にてご連絡をいたします。

以上

別紙2.

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

（参考：厚労科研費レジオネラ属菌検査推奨法 / ISO11731:1998 / ISO 11731:2017）



■ 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、"ISO 11731:1998"の考え方を基本として平成23年度より検討されている「厚生労働省科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業」（以下、レジオネラ研究事業）において報告された方法に基づき、また"ISO 11731:2017"を参考に、本精度管理サーベイ用に変法したものです。

■ 本精度管理サーベイ試料は、平成26年度のレジオネラ研究事業において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されています。2017年度サーベイにおいては、濃縮操作法や培地接種操作などの手技の精度確認に主眼を置くこととし、日常検査において濃縮加熱処理もしくは酸処理を実施している施設におかれましても、上記指定法に従って行った検査法での結果の報告をお願いします。

■ 指定法に記載されていない手技、使用器材（例：冷却遠心濃縮液量、メンブランフィルター材質、培地メーカー、レジオネラ選択分離培地の種類、など）は、各施設の操作方法で行ってください。

■ 各法におけるレジオネラ属菌数は、レジオネラ非選択分離培地BCYEα寒天培地から得られた集落数から算出し、報告してください。

※1. 日常の試験にレジオネラ選択分離培地を使用している施設におきましては、参考値として、同培地における集落数も計測してください。なお、レジオネラ研究事業において、レジオネラ選択分離培地における集落数は、組成中の選択剤による影響等により、レジオネラ非選択分離培地における集落数に比べ減少することが報告されています。

2018年10月15日
日水製薬株式会社

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試料送付のご案内

謹啓　日頃は弊社製品をご愛顧賜り厚く御礼申しあげます。

この度は、2018年度レジオネラ属菌細菌検査精度管理サーベイにお申し込み頂きましてありがとうございます。精度管理サーベイ試料を送付させて頂きますのでご査収のほど、よろしくお願い申しあげます。

謹白

記

1. 送付内容一覧

・試料送付のご案内（本案内状）
・試験概要・・・

2018年10月15日
日水製薬株式会社

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試験概要

1. レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試験項目

試料名	試験項目
精度管理サーベイ試料Ａ（1本）	レジオネラ属菌

精度管理サーベイ試料は、菌をボール状に凍結乾燥処理しバイアル瓶に封入したもので、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ用に菌数を特別に調整しています。瓶ラベルには「A」と記載されています。

精度管理サーベイ試料Ａの使用方法・操作手順および結果入力をご確認のうえ、試験を実施してください。

2. 精度管理サーベイ試料Ａの使用方法・操作手順

<table>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">非濃縮検体 1</td><td rowspan="2">非濃縮検体 2</td><td>冷却遠心濃縮法</td><td>ろ過濃縮法</td></tr>
<tr><td colspan="2">濃縮検体</td></tr>
<tr><td>非選択分離培地
（5 枚）</td><td>選択分離培地
（2 枚以上）</td><td>非選択分離培地
（5 枚）</td><td colspan="2">非選択分離培地
（5 枚）</td></tr>
<tr><td>実施</td><td>実施（参考値）</td><td>実施</td><td colspan="2">冷却遠心濃縮法、ろ過濃縮法
どちらか一方を実施</td></tr>
</table>

精度管理サーベイ試料Ａ は、「レジオネラ属菌」の【非濃縮検体】および【濃縮検体】の菌数試験に使用します。濃縮検体については、【冷却遠心濃縮法】または【ろ過濃縮法】のどちらか一方を実施してください。

以下の操作手順をよく読み、記載された方法に従って使用してください。

注 1：本操作手順（2018 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法）は、本精度管理サーベイ用のみの検査方法であり、サンプル量、濃縮倍率などにおいて、実検体の検査方法と異なる部分があります。

■ 試料液の調製

① 検査を開始する 30 分前に保管庫より取り出して室温に戻し、以下の操作を始めてください。

注 2：精度管理サーベイ試料 A は、到着後から試験開始日までマイナス 18℃～マイナス 33℃で保管してください。

注 3：室温に戻っていない瓶を開封した場合、瓶内壁の結露水により凍結乾燥処理したボールが瓶から取り出しにくい場合があります。

注 4：精度管理サーベイ試料は 1 個のみですので、取扱いに十分注意のうえ試験を実施してください。

② 500mL 以上の滅菌容器に滅菌生理食塩水 50mL を用意し、精度管理サーベイ試料を加え良く混和します。これを試料原液とします。

注 5：精度管理サーベイ試料の特性上、本サーベイにおいては、すべての溶解液、希釈液は、**滅菌生理食塩水**を使用してください。

注 6：完全に溶解したことを確認してください。この時、加温はしないでください。

注 7：溶解後の保存は測定誤差をもたらす原因となりますので、溶解後は直ちに試験を開始し、操作の流れを止めることなく試験を終了させてください。

③ 試料原液から 1mL を正確に分取してください。【非濃縮検体 1】の試験に使用します。

④ 残りの試料原液 49mL に、滅菌生理食塩水 441mL を加え良く混和します。これを【非濃縮検体 2】、【濃縮検体　冷却遠心濃縮法】、または【濃縮検体　ろ過濃縮法】の試験に使用します。

注 8：試料が均一になるよう十分に混和してください。

注 9：混和後フタを開ける場合には、エアロゾルが発生しているため安全キャビネット内で操作を行ってください。特に、転倒混和等を行った場合には、フタの開閉時における試料の飛散には十分注意してください。

□非濃縮検体1

※非選択分離培地と選択分離培地に塗布します。

■非選択分離培地

(1) 試料液の調整③で分取した 1mL の検体より、レジオネラ非選択分離培地 5 枚に、100μL ずつ塗布します。

■参考情報　「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）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　平成 25 年度分担研究報告書　レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み」（以下、平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究）表 14 より抜粋

・検体の塗布方法は、コンラージ棒の力加減においてソフトタッチを意識すること。

・コンラージ棒の力加減が発育集落数に影響する可能性が示唆されたため（平成 24 年度厚労科研費「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データより」）。

(2) 36±1℃　7 日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。

注 10：「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）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　平成 26 年度分担研究報告書　レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み」（以下、平成 26 年度レジオネラ属菌検査法研究）において、GVPC 寒天培地等のレジオネラ選択分離培地へ接種した場合、レジオネラ非選択分離培地へ接種した場合に比べ集落数の減少が認められたため、レジオネラ非選択分離培地（BCYEα寒天培地）を使用してください。

■参考情報　ISO11731：2017　Water quality – Enumeration of *Legionella*

・雑菌が少ない場合の検体では、BCYEα寒天培地の使用が必須となっています。

(3) 試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式　：　100mL あたりの菌数 ＝ 平均値 × 1000

■選択分離培地(参考値)

※日常の試験にレジオネラ選択分離培地を使用している施設におきましては、参考値として、同培地における集落数も計測してください。

(1)　【非濃縮検体 1　非選択分離培地】(1)の残液を、レジオネラ選択分離培地 2 枚以上に、100μL ずつ塗布します。

(2)　36±1℃　7 日間 好気培養後、レジオネラ選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。培地から得た集落数の平均値を算出します。

(3)　試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式　：　100mL あたりの菌数 ＝ 平均値 × 1000

■非濃縮検体2

(1)　試料液の調整④の検体 490mL より、500μL を分取して、非選択分離培地に 100μL ずつ 5 枚に塗布します。

(2)　試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式　：　100mL あたりの菌数 ＝ 平均値 × 10000

□濃縮検体

※【冷却遠心濃縮法】、または【ろ過濃縮法】どちらか一方を実施してください。

■冷却遠心濃縮法

(1)　試料液の調整④で作製した検体 490mL より、日常の検査工程に従って、冷却遠心分離を行います。試料液量は任意で実施してください。

■参考情報　平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 12 より抜粋

・遠心加速度と遠心時間は、6000g×10 分または 3000g×30 分とする。 ISO 11731: 1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 による。

・遠心加速度(g)＝1118×回転半径（cm）×回転速度^2（rpm）×10^{-8}　本来遠心加速度の統一が必要であって、回転数を統一しても使用機種により遠心加速度は異なる。遠心加速度が設定できない場合は、機種ごとに計算する必要がある。

・冷却設定温度は、15～25℃とする。

(2)　【冷却遠心濃縮法】(1)で得られた検体を、希釈液に滅菌生理食塩水を用いて 100 倍濃縮します。

注 11：精度管理サーベイ試料の特性上、本サーベイにおいては、すべての溶解液、希釈液は、**滅菌生理食塩水**を使用

してください。

注 12：精度管理サーベイ試料は、平成 26 年度のレジオネラ研究事業において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されているため、本サーベイにおいては、加熱処理および酸処理を行わないでください。

■参考情報　平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 12 より抜粋

・沈殿物を巻き上げないように注意して上清を滅菌ピペットで慎重に除去し、沈殿物を含めて残りの体積を 2mL にする。

・沈渣は大変浮遊しやすく、上清のデカンテーションによる除去や全量除去では、実験ロスにより回収率に大きく影響する場合が考えられる。（森本　洋ほか：濃縮法の違いによる温泉水中のレジオネラ属菌検出結果の比較. 北海道衛研所報, 59, 73-74, 2009（厚労科研費「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」データより））。これらの実験ロスによる影響を防止するために、その手順は、ISO 11731: 1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 に従う。

(3)　得られた検体を、レジオネラ非選択分離培地 5 枚に、100μL ずつ塗布します。

(4)　36±1℃　7 日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。

(5)　試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式　：　100mL あたりの菌数 ＝ 平均値 × 100

■ろ過濃縮法

(1)　試料液の調整④で作製した検体 490mL より、【非濃縮検体 2】で非濃縮検体用に 500μL 分取した残液 489.5mL を、メンブランフィルターにてろ過を行います。

注 13：本サーベイにおいては、日常検査において異なる検水量をろ過している施設におかれましても 489.5mL の検水にて、ろ過を行ってください。

■参考情報　平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 11 より抜粋

・ポリカーボネートタイプフィルターは、ろ過後の水の検査ではなく、フィルターに捕集されたレジオネラ属菌を回収することを目的としている。ポリカーボネートタイプフィルターは、均一な表示径の円筒状孔を持ち、その孔径分布が一定のため、サイズによる正確な分離が可能となる。他の材質のフィルターでは、膜の内部に菌が入り込んで回収されにくくなる場合がある。

・包装製品ラベル側を補集面にする。（光沢度が高い側）。ポリカーボネートタイプフィルターは、その構造上表裏対象面となっているが、製法として電子銃で打ち抜き後片面をアルカリ処理することで作製されている。そのためアルカリ処理面の平滑性が若干低下している可能性がある。

・新版レジオネラ症防止指針には、レジオネラ属菌体サイズを 0.3～0.9×2～20μm と記載されている。レジオネラ属菌がフィルターを縦に通過しようとした場合、状況によっては 0.40 や 0.45μm のポアサイズであればトラップされず、そのまま通過してしまう可能性がある。
ISO11731：1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 では孔径 0.2μm と規定されている。

■参考情報　ISO11731：2017　Water quality – Enumeration of *Legionella*

・フィルターの種類は、ポリカーボネートもしくは、ポリエーテルスルホンを、ポアサイズは 0.2μm を使用する旨が記載されている。

(2) 50mL の遠沈管等に 4.9mL の滅菌生理食塩水を用意します。

(3) 吸引後のメンブランフィルターを剥がし、(2)で用意した遠沈管中の滅菌生理食塩水にメンブランフィルターを入れます。

(4) ボルテックスミキサーで洗浄し、100 倍濃縮液とします。

注 14：精度管理サーベイ試料は、平成 26 年度のレジオネラ研究事業において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されているため、本サーベイにおいては、加熱処理および酸処理を行わないでください。

(5) 得られた検体を、レジオネラ非選択分離培地 5 枚に、100μL ずつ塗布します。

(6) 36±1℃　7 日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。

(5) 試料原液の 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式　：　100mL あたりの菌数 ＝ 平均値 × 100

3.　結果入力方法

(1) 結果の記入は、コスモ会HP（https://cosmokai.com/）より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPW（別送ハガキ参照）を入力してログインしてください。

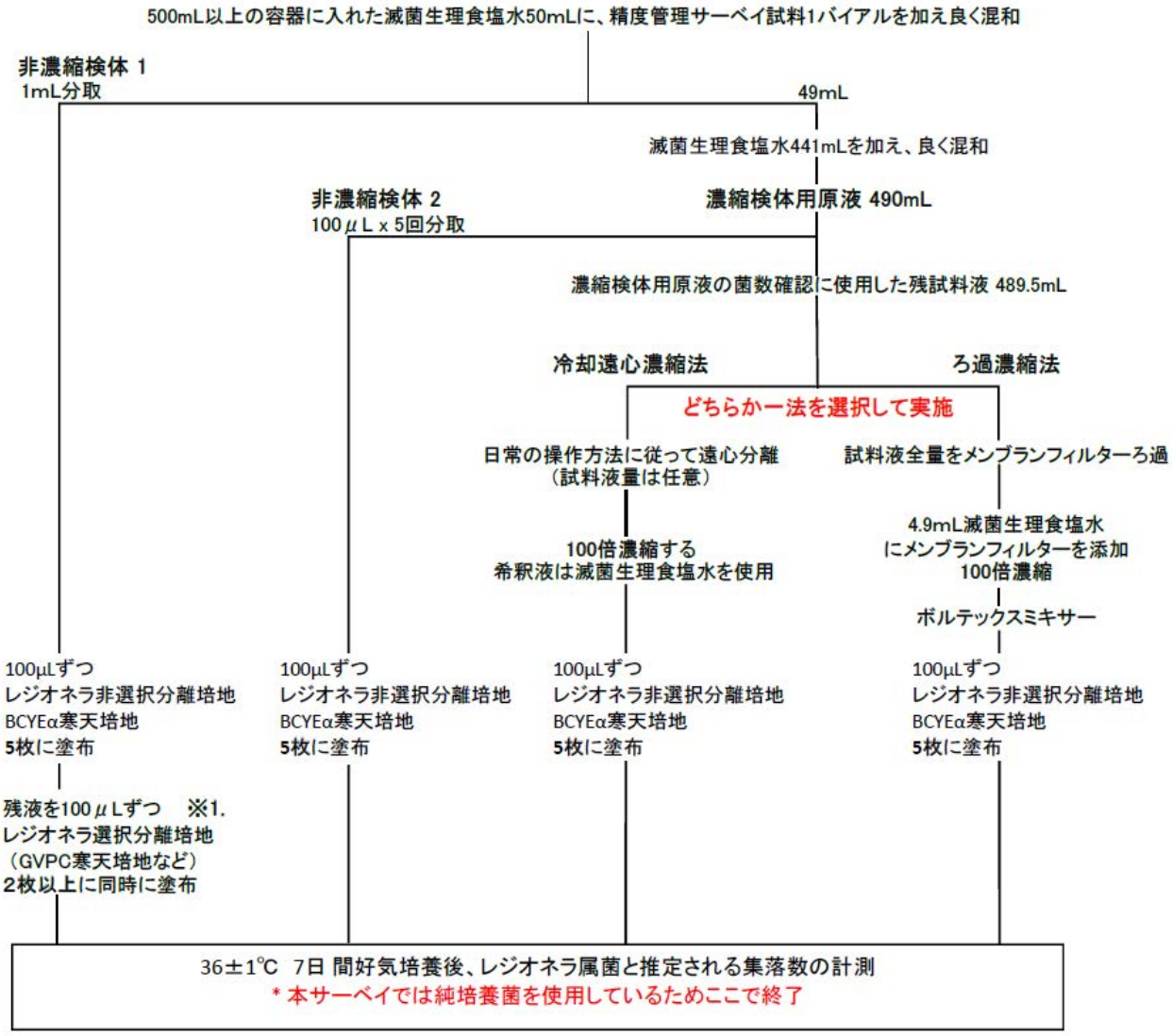
(2) 登録画面が表示されますので、ご登録内容をご確認ください。ご確認後は、ページの下にあります【変更なし　データ入力画面へ進む】をクリックしてください。

(3) データ入力画面に進み結果の入力が完了したら、ページの下にあります【入力内容を確認】をクリックし入力内容を確認してください。入力に間違いがなければ、ページの下にあります【送信】をクリックしてください。

注 15：同じ PC で複数の方が入力・確認を行う際には、ユーザー毎に作業完了後、一度ブラウザを全て閉じ、再度結果入力画面にアクセスし、ログインしてください。表示されている内容が試験担当者ご本人のものであるかご確認ください。

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

（参考 ： 厚労科研費レジオネラ属菌検査推奨法 / ISO11731:1998 / ISO11731:2017）



■ 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、″ISO 11731:1998″の考え方を基本として平成23年度より検討されている「厚生労働省科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業」（以下、レジオネラ研究事業）において報告された方法に基づき、また″ISO 11731:2017″を参考に、本精度管理サーベイ用に変法したものです。

■ 本精度管理サーベイ試料は、平成26年度のレジオネラ研究事業において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されています。2018年度サーベイにおいては、濃縮操作法や培地接種操作などの手技の精度確認に主眼を置くこととし、日常検査において濃縮加熱処理もしくは酸処理を実施している施設におかれましても、上記指定法に従って行った検査法での結果の報告をお願いします。

■ 指定法に記載されていない手技、使用器材（例：冷却遠心濃縮液量、メンブランフィルター材質、培地メーカー、レジオネラ選択分離培地の種類、など）は、各施設の操作方法で行ってください。

■ 各法におけるレジオネラ属菌数は、レジオネラ非選択分離培地BCYEα寒天培地から得られた集落数から算出し、報告してください。

※1. 日常の試験にレジオネラ選択分離培地を使用している施設におきましては、参考値として、同培地における集落数も計測してください。なお、レジオネラ研究事業において、レジオネラ選択分離培地における集落数は、組成中の選択剤による影響等により、レジオネラ非選択分離培地における集落数に比べ減少することが報告されています。

2018 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

結果記入用メモ (Web 入力する際にご活用ください)

貴施設名	所属部署
氏　名	I　D

■共通設問

貴施設で行っている日常の検査方法に関してご回答ください。**あてはまるものはすべて選択してください。**
※半角英数（整数）で入力してください。指数表記および数式での入力は認識出来ません。

(1) 参考としている基準は何ですか。
□ISO11731：2017　□ISO11731：1998　□新版レジオネラ症防止指針 1999
□第 3 版レジオネラ症防止指針 2009　□上水試験法 2011　□衛生試験法注解 2015
□病原体検出マニュアル 2011（国立感染症研究所）　□厚労科研レジオネラ研究班 WG 推奨法
□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

(2) 日常の検査法は何を採用していますか。
□非濃縮　□冷却遠心濃縮法　□ろ過濃縮法
□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

(3) 日常検査の前処理は何を採用していますか。
□処理なし　□酸処理　□熱処理　□酸処理と熱処理　□その他 ＿＿＿＿＿＿

(4) 冷却遠心濃縮法を採用している方にお聞きします。
1) 検水量は何mL ですか。 ＿＿＿＿ mL

2) 遠心加速度は何 g ですか。 ＿＿＿＿ g

3) 回転数は何 rpm ですか。 ＿＿＿＿ rpm

4) 遠心時間は何分間ですか。 ＿＿＿＿ 分

5) 設定温度は何℃ですか。 ＿＿＿＿ ℃

6) 冷却遠心機のローターは何ですか。
□固定角ローター（アングルローター）
□水平ローター（スウィングローター）
□その他 ＿＿＿＿＿＿

7) 上清除去の方法は何ですか。
□デカンテーション　□ピペット等による吸引
□その他 ＿＿＿＿＿＿

8) 上清は全量除去しますか。
□全量除去　□一部残す ＿＿＿＿ mL

9)全量除去の場合、菌体回収のための溶液は何ですか。

□滅菌精製水　□滅菌生理食塩水
□滅菌リン酸緩衝液　□その他 ＿＿＿＿＿＿

10)濃縮倍率は何倍ですか。 ＿＿＿＿＿＿ 倍

(5) ろ過濃縮法を採用している方にお聞きします。

1)検水量は何mL ですか。 ＿＿＿＿＿＿ mL

2)フィルターから菌体を回収するための溶液は何ですか。

□滅菌精製水　□滅菌生理食塩水
□滅菌リン酸緩衝液　□その他 ＿＿＿＿＿＿

3)フィルターメーカーはどちらですか。 □ミリポア　□アドバンテック
□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

4)フィルター表裏は統一して使用していますか。 □している　□していない

5)フィルターの材質は何ですか。 □ポリカーボネート　□ナイロン　□セルロースアセテート
□セルロース混合エステル　□ポリエーテルスルホン
□その他 ＿＿＿＿＿＿

6)フィルターの直径は何 mm ですか。 ＿＿＿＿＿＿ mm

7)フィルターのポアサイズは何μm ですか。 ＿＿＿＿＿＿ μm

8)ボルテックスミキサーは何分かけていますか。 ＿＿＿＿＿＿ 分

(6) 酸処理を行っている方にお聞きします。

1)酸処理剤は何を使用していますか。 □0.2M・HCl KCl (pH2.2)
□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

2)酸処理する量は何 mL ですか。 ＿＿＿＿＿＿ mL

3)酸処理剤は市販品を使用していますか。自家調製を使用していますか。
□市販品を使用　□自家調製品を使用

4)添加量は検体に対し何%ですか。 ＿＿＿＿＿＿ %

5)処理温度は何度ですか。 □室温　□その他 ＿＿＿＿＿＿ ℃

6)処理時間は何分ですか。 ＿＿＿＿＿＿ 分

(7) 加熱処理を行っている方にお聞きします。

1)加熱処理には何を使用していますか。 □ウォーターバス　□ヒートブロック
□インキュベータ　□その他 ＿＿＿＿＿＿

2)加熱処理する量は何 mL ですか。　　mL

3)処理温度は何度ですか。　　℃

4)処理時間は何分ですか。　　分

(8) 使用している培地とメーカーは何ですか。

培地名＼メーカー	日水製薬	栄研化学	関東化学（OXOID）	日本 BD	日研生物医学	ﾋﾞｵﾒﾘｭｰ・ｼﾞｬﾊﾟﾝ	極東製薬工業	メルク	その他（　　）
BCYEα 寒天培地									
GVPC 寒天培地									
WYOα 寒天培地									
MWY 寒天培地									
その他＿＿＿＿＿＿									
その他＿＿＿＿＿＿									

(9) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

□市販の生培地　　□自家調製

(10) 培地は 1 検体あたり合計何枚に接種していますか。　　枚

(11) 月あたりの検体数はおよそどのくらいですか。　夏期（5～10 月）　　検体/月

冬期（11～4 月）　　検体/月

■2018 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ結果回答

※試験を実際されていない場合は、空欄でお願いいたします。
※半角英数（整数）で入力してください。指数表記および数式での入力は認識出来ません。

□非濃縮検体 1

※非選択分離培地と選択分離培地に塗布します。

■非選択分離培地

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

CFU／100mL　（本サーベイ用計算式＝ 平均値 × 1000 ）

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。

□BCYEα 寒天培地　□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿

(4) 培地メーカーはどちらですか。

□日水製薬　□栄研化学　□関東化学（OXOID）　□日本 BD　□日研生物医学
□ビオメリュー・ジャパン　□極東製薬工業　□メルク　□その他 ＿＿＿＿＿＿

(5) どのような方法で試料を混和しましたか。

□手　□ミキサー　□その他 ＿＿＿＿＿＿

(6) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

□市販の生培地　□自家調製

(7) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

□検査当日　□前日以前

■選択分離培地（参考値）

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

CFU／100mL　（本サーベイ用計算式 = 平均値 × 1000 ）

(2) 使用した培地の枚数は何枚ですか。　　枚

(3) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(4) 使用した培地は何ですか。

□GVPC 寒天培地　□WYOα 寒天培地　□MWY 寒天培地　□CCVC 寒天培地　□PAC（BMPAα）寒天培地
□PAV 寒天培地　□その他

(5) 培地メーカーはどちらですか。

□日水製薬　□栄研化学　□関東化学（OXOID）　□日本 BD　□日研生物医学
□ビオメリュー・ジャパン　□極東製薬工業　□メルク　□その他

(6) どのような方法で試料を混和しましたか。

□手　□ミキサー　□その他

(7) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

□市販の生培地　□自家調製

(8) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

□検査当日　□前日以前

■非濃縮検体 2

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

CFU／100mL　（本サーベイ用計算式 = 平均値 × 10000 ）

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。　□BCYEα 寒天培地　□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿

(4) 培地メーカーはどちらですか。

□日水製薬　□栄研化学　□関東化学（OXOID）　□日本 BD　□日研生物医学

□ビオメリュー・ジャパン　□極東製薬工業　□メルク　□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿

(5) どのような方法で試料を混和しましたか。

□手　□ミキサー　□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿

(6) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

□市販の生培地　□自家調製

(7) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

□検査当日　□前日以前

□濃縮検体

【冷却遠心濃縮法】、もしくは【ろ過濃縮法】どちらか一方を実施してください。

■冷却遠心濃縮法

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

CFU／100mL　（本サーベイ用計算式 = 平均値 × 100 ）

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。　□BCYEα 寒天培地　□その他

(4) 培地メーカーはどちらですか。

□日水製薬　□栄研化学　□関東化学（OXOID 製品）　□日本 BD　□日研生物医学

□ビオメリュー・ジャパン　□極東製薬工業　□メルク　□その他

(5) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

□市販の生培地　□自家調製

(6) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。　□検査当日　□前日以前

(7) どのような方法で試料を混和しましたか。

□手　□ミキサー　□その他

(8) 遠心加速度は何 g ですか。　g

(9) 回転数は何 rpm ですか。　rpm

(10) 遠心時間は何分間ですか。　分

(11) ブレーキをかけていますか。　□かけている　□かけていない

(12) 設定温度は何℃ですか。　℃

(13) 冷却遠心機のローターは何ですか。

□固定角ローター（アングルローター）

□水平ローター（スウィングローター）

□その他

(14) 上清除去の方法は何ですか。

□デカンテーション　□ピペット等による吸引

□その他

(15) 上清は全量除去しますか。　□全量除去　□一部残す　mL

■ろ過濃縮法

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

CFU／100mL　（本サーベイ用計算式 = 平均値 × 100 ）

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。

□BCYEα 寒天培地　□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

(4) 培地メーカーはどちらですか。

□日水製薬　□栄研化学　□関東化学（OXOID 製品）　□日本 BD　□日研生物医学
□ビオメリュー・ジャパン　□極東製薬工業　□メルク　□その他＿＿＿＿＿＿

(5) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

□市販の生培地　□自家調製

(6) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

□検査当日　□前日以前

(7) フィルターメーカーはどちらですか。

□ミリポア　□アドバンテック　□その他 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

(8) フィルター表裏は、包装製品のラベル側を捕集面にして使用しましたか。

□した　□しない

(9) フィルターの材質は何ですか。

□ポリカーボネート　□ナイロン　□セルロースアセテート
□セルロース混合エステル　□ポリエーテルスルホン　□その他 ＿＿＿＿＿＿

(10) フィルターの直径は何 mm ですか。 ＿＿＿＿＿＿ mm

(11) フィルターのポアサイズは何μm ですか。 ＿＿＿＿＿＿ μm

(12) ボルテックスミキサーは何分かけていますか。 ＿＿＿＿＿＿ 分

以上

2018 年 10 月 15 日
日水製薬株式会社

2018 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試料受領書兼承諾書

今回使用する菌株は、バイオセーフティーレベル 2 に該当する菌種ですので、レジオネラ属菌精度管理サーベイ試料受領書兼承諾書を以て、サーベイ試料受領と菌株取扱いに関する承諾の確認とさせていただいております。

精度管理サーベイ試料の内容をご確認いただき、下記サーベイ試料受領書兼承諾書に必要事項をご記入のうえ、**10 月 18 日(木)まで**に、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局宛に FAX してください。

FAX:03－5846－5629

日水製薬株式会社　レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局　宛

レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料受領書兼承諾書

受領日：　2018 年　　10 月　　日

貴 施 設 名	
ご所属部署	
ご担当者名	㊞
ID 番号 注	

注:弊社より、別途送付したはがきに記載した ID 番号をご記入ください。

本サーベイ試料の取扱いについては、バイオハザード防止のために以下のことを確認、承諾いたします。

1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

以 上

2018年度 レジオネラ属菌検査セミナー 開催のご案内

主催：日水製薬株式会社

平素は格別なるお引き立てを賜り、厚く御礼申しあげます。
この度、弊社では下記の内容にてレジオネラ属菌検査に関するセミナーを開催致します。
ご多用中とは存じますが、是非ご参加頂きますようご案内申しあげます。

記

■開催日時　**2019年3月12日(火)　13:30～17:00**　(受付け開始 13:00)

■開催場所　**文京シビックホール　スカイホール（26階）**
〒112-0003 東京都文京区春日1-16-21
※東京メトロ後楽園駅徒歩1分、都営地下鉄春日駅徒歩1分、JR総武線水道橋駅徒歩9分

■定員　**96名**
※会場の都合により、定員に達し次第受講をお断りさせていただきますのでご了承くださいますようお願いいたします。なお、お申込みは1施設あたり2名様までとさせていただきます。

■内容
13:00~　受付開始
13:30~14:30　講演 1.　「レジオネラ検査法の現状と今後の展望」
国立感染症研究所　細菌第一部　前川純子先生
14:30~15:00　報告　「2018 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ結果報告」
日水製薬株式会社
15:00~15:15　休憩
15:15~16:25　講演 2.　「レジオネラ属菌培養検査について」
北海道立衛生研究所 感染症センター 感染症部 細菌グループ　森本洋先生
16:25~17:00　事前質問回答・質疑応答

■参加費　**無料**

■申込方法　**E-mailにてお願いします。**
下記内容を【E-mail：**legi-srvy@nissui-pharm.jp**】までお送りください。

≪参加申込≫
****
お名前：
貴社名：
ご所属：
ご住所：　〒
TEL：
E-mail：
ご質問事項：
****
※受付返信につきましては受付 1 週間を目安に受付番号と共にメールにてご連絡させて頂きます。

■締切り　**2019年2月28日(木)**
※2019年2月15日(金)までに受付た質問につきましては、セミナー当日に分野別に分類して回答させていただきます。

以上

お問合せ先　日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局
TEL 03-5846-5729　E-mail：legi-srvy@nissui-pharm.jp

（案）

別添　公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法

概　　要

環境水中のレジオネラを計数する方法を記載したISO11731:1998 Water quality - Enumeration of *Legionella*が2017年5月に改訂され（以下「改訂ISO法」という。）、環境水の状況に応じて、使用培地や前処理法を選択するような記載となった。

現在、国内における公衆浴場の浴槽水等の検査においては、培地上でレジオネラ属菌の発育を阻害する夾雑菌の存在を前提とした検査対応が一般的となっている。本検査方法においても選択分離培地を使用し、熱や酸による前処理を行うことを基本とした。また、濃縮検水に加え非濃縮検水の検査方法についても記載した。改訂ISO法ではろ過濃縮法を推奨していることから、本検査方法においても検水の濃縮についてはろ過濃縮法を推奨した。なお、検査工程ごとで必要となる基本的な注意事項のほかに、検査結果に影響する可能性のあるポイントも示した。本検査方法は、公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検出のための基本となる検査方法について技術的助言として示しているものである。レジオネラ症患者発生時の感染源特定のための検査については、この限りではない。

分離培地上の発育集落に斜光を当て実体顕微鏡で観察すると、レジオネラ属菌は特徴的な外観構造（モザイク・カットグラス様）を呈する。効率よく集落を選定でき、より正確な定量結果の報告が可能となることから、この集落観察法（斜光法）の実施を推奨する。

さらに、近年普及してきた核酸を検出する迅速検査法についても記載した。また、精度管理の必要性についても言及した。

1　検水の採取

1）試薬

25%チオ硫酸ナトリウム水溶液（121℃15分間オートクレーブ滅菌又はろ過滅菌）：
塩素を含んでいる検水を採取する場合に塩素中和剤として用いる。

2）器具及び器材

（1）採水容器：ポリプロピレン及びポリエチレン製並びにガラス製等の密栓ができる容器で、滅菌済みのもの。

（2）柄杓：採水に用いる。滅菌したプラスチック容器を用いることもできる。

3）採水手技

採水にあたっては、滅菌又は消毒した柄杓等を使用する。複数の検水を採取する場合

は必要数の滅菌した柄杓を準備するか、採水するたびに消毒用アルコールで柄杓を消毒して使用する。なお、採水時は手袋とマスクを装着することが望ましい。

採水量は、一検体あたり 500mL 以上とする。検水で容器を満杯にせず、上部に空間を残すように採水する（注 1）。

採水後、容器の周囲をアルコール綿等で消毒する。塩素を含んでいる検水を採取する場合は、採水容器に 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を 1/500 量になるように加える。又は、あらかじめチオ硫酸ナトリウムを検水 100mL につき 0.02～0.05g の割合で採水容器に入れ滅菌したものを使用する（注 2）。ねじ栓を固く締め検水が漏れないようにする。パラフィルム等で固定するとなおよい（注 3）。

注 1　開栓時にこぼさないようにし、採水容器内に空気を残すため。
注 2　市販のチオ硫酸ナトリウムの入った容器の使用も可能。
注 3　温かい検水を採取した時は、温度が下がると合成樹脂容器が収縮して栓がゆるみ、検水が漏れることがあるので注意する。

4）検水の搬送と保存

検水は、6～18℃で搬送し、検査室に搬入後速やかに検査に供する。ただちに検査が実施できない場合は、6±2℃で冷蔵保存し、採水後 2 日以内に検査を実施することが望ましい。再検査を含め 5 日以内に検査を実施する。採水から検査までに要した時間を記録する（注 4）。

注 4　検水の輸送又は保存中に生菌数が変化する可能性を考慮して、温度の記録も残すことが望ましい。

2　検査

2.1　はじめに

検査にあたってはあらかじめ標準作業手順書を作成しておく。また、検水中にはレジオネラ属菌が存在していると想定し、BSL2 実験室内でその取り扱い基準に従い実施する。エアロゾルを発生する操作（注 5）は、クラス 2 の安全キャビネット内で作業する。

検査工程を図 1 に示す。原則として非濃縮検水と濃縮検水の両方を検査する（注 6）。非濃縮検水は未処理（注 7）、濃縮検水については熱処理又は酸処理を実施し（注 8）、原則として選択分離培地で培養する。濃縮法はろ過濃縮法を推奨する。

注 5　培地への接種、濃縮工程、ピペットからの吹き出し、洗い出し時等における強い振と

うや攪拌、混合等。

注 6　清掃消毒直後の検水等、レジオネラ属菌数が少ないことが推定される場合においては、濃縮検水のみでもよい。

注 7　未処理とは、検水の夾雑菌が少ないと想定される場合に熱や酸による前処理を行わないこと。未処理の非濃縮検水で夾雑菌が抑制できなかった場合は、熱処理や酸処理を行う。

注 8　熱処理と酸処理のどちらが適しているかを判断できない場合は、両方を行う。

2.2　レジオネラ用培地

1）非選択分離培地：BCYEα寒天培地

レジオネラ属菌は、一般的な細菌培養に用いる培地には発育することができない。そのため、レジオネラ属菌の培養には、発育に必須である鉄、L-システイン及び発育阻害物質を吸着するための活性炭末を加えた CYE（Charcoal yeast extract）寒天に、培地の緩衝性を高め発育時間を短縮する ACES Buffer、α-ケトグルタル酸カリウムを添加した BCYEα寒天培地が用いられる。市販生培地や市販基礎培地に市販サプリメントを添加した培地が利用できる。

利用法：L-システイン要求性試験（2.8　菌の鑑別・同定と計数参照）、釣菌後の培養、夾雑菌が少ないと推定される検水からの分離培養等。

2）選択分離培地：GVPCα寒天培地、MWY 寒天培地、WYOα寒天培地等

選択分離培地は、BCYEα寒天培地に各種抗菌剤を加えて作られている。「新版レジオネラ症防止指針」（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター発行）にも記載されているとおり、３種の選択分離培地の発育支持力に大差は認められなかった。実際の検査においては、検水中に混在する夾雑菌の抑制に有用な選択剤が特定できないことから、特に培地の種類は指定しない（注 9）。

利用法：検水からのレジオネラ属菌の分離培養。

注 9　培地の種類や製造業者の違いにより、形成集落の大きさ等に違いが見られる。検査者は、事前に自施設で使用している培地上でのレジオネラ属菌集落を経日的に観察し、集落の性状等を確認しておく。

3）培地の保存

培地は製造業者の推奨温度で冷蔵保存する。自家調製した培地は、4±2℃で保存し、できるだけ新鮮なものを使用する（注 10）。

注 10　嫌気ジャーやクーラーボックスに入れ密封し冷蔵保存することで、乾燥、結露をか

なり防ぐことが出来る。自家調製した培地は、適切な保存により3か月間のレジオネラ属菌発育性能を保持できる。

2.3　検水の濃縮

1）メンブレンフィルターろ過濃縮法

1）－1　試薬

(1) 滅菌蒸留水：ろ過後のフィルターから菌を再浮遊させるのに用いる。また、採水容器やフィルターホルダーに残る検水を洗い流す場合に用いる。

(2) 消毒用エタノール：アルコール綿の作製に用いる。

1）－2　器具及び器材

(1) メンブレンフィルター：ポリカーボネート製で、ポアサイズ0.20μm又は0.22μm（製造業者により異なる）（注11、12）。

(2) 滅菌したフィルターホルダー：ガラス製又はポリスルホン製（注13）を推奨。吸引ビンと一体化している製品もあり、個別対応する時に便利である。

(3) マニホールド：多連のマニホールドが便利である。検水数が少なければ吸引ビンで代用することもできる。

(4) 吸引ポンプ等

(5) 吸引ビン：マニホールドに繋いで廃液を貯める。

(6) シリコン栓：吸引ビンに使用する。

(7) ガラス管：シリコン栓に刺して用いる。チューブの太さに合わせる。

(8) チューブ：マニホールドと吸引ビン、吸引ポンプ等を繋ぐ。

(9) ピンセット：メンブレンフィルターの操作に用いる。

(10) スクリューキャップタイプの滅菌50mL遠沈管：ろ過後のフィルターから菌を再浮遊させる時に用いる（注14）。

(11) 撹拌機：ボルテックス又は同等品を用いる。

(12) アルコール綿：ピンセットの消毒に用いる。

注11　ポリカーボネート製メンブレンフィルターは、均一な表示径の円筒状孔を持つため、サイズによる正確な分離が可能となる。他の材質のフィルターでは、膜の内部に菌が入り込んで回収率が下がる場合がある。

注12　新版レジオネラ症防止指針（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター発行）によると、レジオネラ属菌の菌体サイズは0.3～0.9×2～20μmであり、0.40や0.45μmのポアサイズのフィルターではトラップされずに通過してしまう場合がある。

注13　使用後の洗浄時にブラシ等で傷がつかないように注意する。

注14　他の容器で代用可能であるが、フィルターからの洗い出しはエアロゾルが最も発生

しやすい工程のため、密封できる容器を使用すること。

1）－3　操作

(1) 安全キャビネット内で操作し、検水量は 500mL とする。

(2) マニホールドにフィルターホルダーをセットし、チューブでマニホールドと吸引ビン、吸引ポンプ等を繋ぐ。

(3) フィルターホルダーにメンブレンフィルターを滅菌又はアルコール綿で消毒したピンセットを用いてセットする。

(4) 検水を注ぐ前に適量の滅菌蒸留水をフィルターホルダーのファネルに注ぎ、ホルダーが適切にセットされているか確認する。

(5) 採水容器の外側をアルコール綿で消毒後、十分転倒混和し、採水容器から検水をファネルに注ぎ、吸引を開始する（注 15)。

(6) 検水の全量を注ぎ終わったら、適量の滅菌蒸留水で容器を洗い、その洗浄液もろ過する。ろ過が終了したら、ファネルの内側も同様に洗い、その洗浄液もろ過する。

(7) 滅菌又はアルコール綿で消毒したピンセットでフィルターを取り出し、5mL の滅菌蒸留水が入った滅菌 50mL 遠沈管等に入れて栓をする。

(8) 振とうを最大にした撹拌機で遠沈管を 1 分間撹拌する（注 16)。

注 15　検水に強い混濁がある場合には、大孔径のフィルター（材質は指定しない）で前ろ過を行い、そのろ液をろ過濃縮する。

注 16　ISO11731 では改訂前を含め、攪拌時間 2 分以内としているが、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（以下、「厚労科研」という。)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 30 年度総括研究報告書 p103 において 1 分及び 2 分で比較した結果、ポリカーボネート製メンブレンフィルターでは明確な差は認められなかったため、1 分間とした。

2）冷却遠心濃縮法

ろ過濃縮が困難（検水の質、検査設備等）と判断された場合に行う。また、その基本操作手順は、ISO 11731:1998 を基礎として検討された JIS K 0350-50-10:2006 を参照すること。

2）－1　器具及び器材

(1) 冷却遠心機：スイング式ローターは沈殿物がチューブの底に集積し、上清が除去しやすい。アングル式ローターは強い遠心力がかけられる。

(2) 滅菌したスクリューキャップタイプ遠沈管（注 17)

(3) アスピレーター又は滅菌ピペット

注 17　破損のないことを確認し、劣化したものは使わない。

2）－2　操作

(1) 安全キャビネット内で、検水を十分転倒混和した後、遠沈管に 200±５mL の検水を注ぐ。遠心加速度 6,000g で 10 分又は 3,000g で 30 分、15～25℃で遠心する（注 18）。遠心はブレーキ設定せず、自然に停止するのを待つ（注 19）。

(2) 遠沈管を取り出し、安全キャビネット内において、滅菌ピペットもしくはアスピレーター等で液量が 100 倍濃縮となるまで慎重に上清を除去する。滅菌ピペット等で残した液を用いて管壁に付着したレジオネラ属菌を勢いよく洗って剥がし、沈渣とよく混和する。

注 18　使用機器で遠心加速度設定が出来ない場合は、以下の計算式で計算する。

遠心加速度(g)＝1,118×回転半径(cm)×回転速度^{2}(rpm)×10^{-8}

注 19　ブレーキをかける場合は、諸条件を検討し、ブレーキによる影響が出ないことを確認すること。

2.4　前処理

レジオネラ属菌の検出を阻む夾雑菌を抑制するため、培地に接種する前に検水の前処理を行う。方法には、熱処理、酸処理、熱及び酸処理があり、方法により夾雑菌の抑制状況に違いが認められる。レジオネラ属菌の発育を抑制する場合があるので、処理時間には注意を要する。清掃直後等で検水の夾雑菌が少ないと想定される場合は、熱や酸による前処理を行わないこと（未処理）もある。

1）未処理

本検査方法では、非濃縮検水の検査を実施する場合、原則として未処理とする。

2）熱処理

2）－1　器具及び器材

(1) キャップ付き滅菌試験管等：熱処理を行う時に使用する（注 20）。

(2) 滅菌ピペット等：試料を滅菌試験管に移す時に使用する。

(3) タイマー：処理時間の計測に使用する。

(4) ウォーターバス等：熱処理を行う時に使用する。

注 20　熱処理中、試験管内の空気の膨張によりキャップが緩んだり開いたりするのを防ぐため、スクリューキャップタイプを推奨する。

2）－2　操作

試料 0.5mL 以上を滅菌試験管に取り、50±1℃に設定したウォーターバス等に 20 分間静置後、速やかに接種する。速やかに接種できない場合は水冷する（注 21、22)。

注 21　新版レジオネラ症防止指針（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター発行）には、50℃、20 分及び 50± 1 ℃、30±2 分間の 2 通りの記載がある。厚労科研「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」平成 26 年度総括研究報告書 p111 において、50± 1 ℃、20 分の加熱時間の方がより有効だという検査結果が得られている。

注 22　加熱処理試料は 6±2℃で、再検査まで保存できる。

3）酸処理

3）－1　試薬

酸処理液：0.2M HCl･KCl 液 pH2.2±0.2（注 23）

注 23　市販されている。自家調製した場合は、pH を測定し、品質の確保に努めること。

3）－2　器具及び器材

（1）キャップ付き滅菌試験管等：酸処理を行う時に使用する。

（2）滅菌ピペット等：試料及び酸処理液を滅菌試験管に移す時に使用する。

（3）タイマー：処理時間の計測に使用する。

3）－3　操作

安全キャビネットの中で、試料 0.5mL 以上を滅菌試験管に取り、等量の酸処理液を加え混和し室温で 5 分間静置する（注 24)。

注 24　夾雑菌が多いと予想される場合は、20 分まで処理時間を延長してもよい。酸処理後の検水は保存には適さない。

4）熱及び酸処理

検水中に夾雑菌が非常に多く、熱処理又は酸処理だけではそれらを抑制できなかった、もしくは抑制できないと予想される場合に実施する。

4）－1　試薬

酸処理液：0.2M HCl･KCl 液 pH2.2±0.2

4）－2　試料

2.4　前処理 2）熱処理の工程で作製した試料。

4）－3　器具及び器材

2.4　前処理 3）－2 器具及び器材に準ずる。

4）－4　操作

2.4　前処理 3）－3 操作に準ずる。

2.5　接種

非濃縮検水、前項までに準備した濃縮検水を接種する。

1）試薬

分離培地：GVPCα寒天培地、MWY 寒天培地、WYOα寒天培地等の選択分離培地（注 25）。

注 25　夾雑菌が少ないと推定される検水からの分離培養には､非選択分離培地である BCYEα寒天培地で良い結果が得られる場合がある。改訂 ISO 法では清浄度の高い検水の培養には BCYEα寒天培地の使用を求めている。

2）器具及び器材

（1）マイクロピペット：100μL 及び 200μL が量り取れるもの。

（2）滅菌チップ：100μL 及び 200μL の試料を培地に接種する。

（3）滅菌コンラージ棒：試料の培地への塗布に使用する。

3）操作

（1）インキュベーター（孵卵器）又は安全キャビネット内で、分離培地表面の水滴を取り除く程度まで乾燥させる（注 26）。非濃縮検水及び熱処理試料は 100μL を、酸処理試料並びに熱及び酸処理試料は 200μL を培地に接種する（注 27）。

（2）試料を接種後、直ちにコンラージ棒で均等に広げ、試料が吸収されるまで静置する（注 28）。

注 26　乾燥し過ぎるとレジオネラ属菌の検出率が低下する。

注 27　検水中に多数のレジオネラ属菌又は夾雑菌が存在し、菌数を定量的に算出することが困難であると予想される場合は、試料を滅菌リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）等で希釈することで良い結果が得られる場合がある。

注 28　試料が培地に完全に吸収されるまでコンラージ棒で塗布し続けてはいけない。厚労

科研「公衆浴場等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 24 年度総括研究報告書 p122 により、コンラージ棒の力加減が出現集落数に影響する可能性が示唆されている。

2.6　培養

1）器具及び器材

（1）インキュベーター：培養に使用する。

（2）湿潤箱等

2）操作

（1）試料を接種した分離培地を裏返し、培養中の乾燥を防ぐため湿潤箱等に入れる（注 29)。

（2）36±1℃に設定したインキュベーターに入れて培養する。

（3）培養期間は 7 日間とする（注 30)。

注 29　培養日数が長いことから、培地の乾燥に注意する。蓋付きの水切りバットの外側に純水等を入れて使用する。あるいは、透明ビニール袋に分離培地と湿らせ丸めたペーパータオル等を入れてもよい。

注 30　まれに 7 日目以降にレジオネラ属菌の発育が認められる場合もあるので、7 日目に実体顕微鏡観察で疑わしいコロニーがあれば、培養を 10 日まで続ける。

2.7　分離培地上の集落の観察

1）器具及び器材

（1）実体顕微鏡：分離培地上の集落の観察に用いる。

（2）実体顕微鏡用照明装置：光量調節可能で、斜光角度が自由に変えられるフレキシブルアームの装置が望ましい。

（3）長波 UV ランプ：集落の自発蛍光の有無の観察に用いる。

2）操作

（1）分離培地を培養開始翌日から 7 日目まで毎日観察する。夾雑菌が少ない場合は、観察日を減らしても良い。レジオネラ属菌は 3 日目から観察されることが多いが、出現が遅い菌もある。レジオネラ属菌は灰白色湿潤集落として観察される。

（2）実体顕微鏡下で発育集落に斜光を当て（図 2)、培地上の集落を観察し、モザイク・カットグラス様が確認できた集落（図 3）を、レジオネラ属菌と推定する（注 31、32、33)。斜光法は集落の特徴が確認しやすい暗所で行うことを推奨する。

（3）暗所で長波 UV ランプを照射し、集落の自発蛍光の有無を観察することで、自発蛍光

を有する菌種群が選定できる（図 4、表 1)。

注 31　分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別方法の有用性.環境感染学会誌,25:8-13,2010.

注 32　肉眼観察で翌日から確認できる集落はレジオネラ属菌ではない可能性が高い。実体顕微鏡を用いると、培養 2 日目（30～35 時間程度）からレジオネラ様集落を確認できる場合がある。

注 33　実体顕微鏡の観察では、エアロゾルは発生しないため、安全キャビネットを必要としないが、培地の取り扱いに十分注意すること。また、分離培地のフタを開けて集落の確認を行う時は、空中落下細菌による汚染に注意する。

2.8　菌の鑑別・同定と計数

本検査方法では、斜光法でレジオネラ属菌と推定された灰白色湿潤集落のうち、L-システインの要求性を有していたものをレジオネラ属菌とする。

1）試薬

（1）BCYEα培地

（2）L-システイン不含 BCYEα寒天培地（血液寒天培地、トリプトソイ寒天培地、普通寒天培地でも可）

2）器具及び器材

白金耳又は白金線

3）操作

(1)斜光法により集落を観察し、レジオネラ属菌と推定される集落を全て数える(注 34)。

（2）観察期間中にレジオネラ様集落を適宜釣菌し、L-システイン不含 BCYEa寒天培地と BCYEa寒天培地の順に画線培養し、L-システイン要求性の確認を行う（注 35)。釣菌する集落数は、集落数が 10 個以下の場合はすべてとし、それ以上の場合もできる限り釣菌する。

(3) L-システイン不含寒天培地には発育が認められず、BCYEa寒天培地に発育した菌をレジオネラ属菌とする（注 36)。

注 34　菌数が極めて多い場合は、分離培地を 4 分割して 1 区画分を計測する。

注 35　釣菌した集落を滅菌生理食塩水に懸濁後、それぞれの分離培地に画線してもよい。夾雑菌と少しでも接触している場合は、BCYEα培地で分離培養し単一菌としてから、L-システイン要求性試験を実施する。

注 36　釣菌後の培養は 48 時間程度で十分な発育が確認される場合が多い。

4）菌の算定

（1）分離培地ごとにレジオネラ属菌と確定した集落数を算出する。非濃縮検水では、集落 1 個が検水 100mL 中 1,000CFU、100 倍濃縮検水では 10CFU に相当する。レジオネラ様集落の全てを釣菌しない場合、釣菌した集落のうち、レジオネラ属菌と確定された集落数の割合を基に、分離培地全体のレジオネラ属菌集落数を算出する（注 37）。

（2）前処理法が異なる場合や、異なる種類の培地に接種した場合、菌数は多い方の値を採用する（注 38）。

（3）本検査方法での濃縮検水における不検出は 10CFU/100mL 未満となる。報告に際しては検出下限値を明示する。夾雑菌が多く観察不能のときは「検出不能」とし、レジオネラ属菌「不検出」としてはいけない。

注 37　例えば、濃縮検水を塗布した分離培地の 1/4 区画に発育しているレジオネラ様集落数が 50 個で、25 集落を釣菌し、性状の確認を行い、20 個がレジオネラ属菌であると確認された場合、計算は次のようになる。
20（レジオネラ属菌確定数）/25（釣菌数）×50（レジオネラ様菌発育数）×4(分画数)×10(濃縮係数)＝1600CFU/100mL

注 38　夾雑菌等の影響で、濃縮検体からは検出されず、非濃縮検体からは検出されることもある。

2.9　迅速検査法

検水中のレジオネラ属菌由来の核酸（DNA、RNA）を直接検出する方法（迅速検査法）としては、リアルタイム PCR（qPCR）法、LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)法、PALSAR(Probe Alternation Link Self-Assembly Reaction)法等を利用した検出試薬キットが市販されている。これらは、レジオネラ属菌の 16S rRNA 等の配列特異性が高く、多コピー存在する核酸を標的としている。

一般的に、迅速検査法は生菌のみならず死菌 DNA や VNC(viable but non-culturable)状態の菌も検出する。すなわち、迅速検査により陽性となった検水にその時点で必ず生菌が存在するわけではない。しかしながら、その結果はレジオネラ属菌の存在履歴を示すことから、衛生管理上の注意が促される。この特性を有効活用する場としては、清掃・消毒管理された検水におけるレジオネラ属菌の陰性確認や、培養法と併用したスクリーニング検査としての利用が挙げられる。迅速検査法のうち、リアルタイム PCR 法は検出試薬キットに添付されている試薬を用いて検量線を作成することにより、遺伝子の定量的な検出が可能である。

迅速検査法で生菌のみを検出するには、DNA 増幅反応前に EMA（ethidium monoazide）処

理をおこなうことで、死菌由来 DNA、膜損傷菌由来 DNA の増幅を抑制し、生菌由来 DNA を選択的に増幅させる（注 39)。EMA 処理前に液体培養を加えてリアルタイム PCR 法を行うと、より平板培養法と高い相関を示す生菌検出方法となる（LC EMA-qPCR 法)。培養法との整合性の観点から、迅速検査法のみで水質基準に適合しているか否かを判断する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法（LC EMA-qPCR 法）を用いる。

迅速検査法は反応系によりそれぞれ特性があるので、検出試薬キットの説明書をよく読み理解して用いる。特に注意を要するのは、検水に含まれる物質により反応が阻害され、偽陰性となることである。したがって、インターナルコントロールを用いるなど、偽陰性確認が可能な検出試薬キットの使用が望ましい。各迅速検査法における結果の判定は、取扱説明書に従う。

注 39　VNC 菌を検出する場合もある。

1）試薬

市販のレジオネラ属菌検出試薬キットを用いる（注 40)。

注 40　論文等に記載のプライマー、プローブの自家調製も可能であるが、その場合は検出感度や検出精度を把握するための予備実験が不可欠である。

2）器具及び器材

検出試薬キットの説明書に従って準備する。器具類はすべてディスポーザブル又は滅菌済みのものを使用する。コンタミネーション防止のために、ピペットチップはフィルター付きの製品を使用する。

3）操作(注 41)

（1）100 倍濃縮検水 1～4mL を検出試薬キットの説明書に従って再濃縮する（注 42)。

（2）検出試薬キットの説明書に従って DNA 又は RNA を抽出し、増幅反応を行う。常に陽性対照と陰性対照を用意し、反応が正常に進行していることを確認する。

注 41　コンタミネーション防止のために、1.反応試薬の調製、分注を行うエリア（検水及び核酸を持ち込まない)、2.検水の濃縮、核酸調製を行うエリア（検水を扱うため安全キャビネットが設置されていなければならない)、3.陽性対照の調製、添加を行うエリア、の 3 つに作業環境を分けることが望ましい。ピペット等もエリアごとに別のものを使う。

注 42　培養検査と共通の濃縮検水を用いることができる。

3　精度管理

昨今のさまざまな試験検査においては、「信頼性確保のため、精度管理を実施すること」が求められている。レジオネラ属菌検査においても例外ではなく、精度管理は必須と言える。精度管理には、検査施設内で行う内部精度管理と別の機関が実施主体となる外部精度管理に分けられる。各検査施設が外部精度管理に参加したり、内部精度管理を実施したりすることで、信頼性の高い検査結果の保証に繋がる。

内部精度管理で確認する点として、検水の濃縮手順、培地への接種方法、斜光法の手順、レジオネラ属菌の確定方法、算定方法等がある。一例として回収率の確認方法を次に示す。すなわち、保管しているレジオネラ属菌を 30℃で 3 日間培養後、レジオネラ属菌懸濁液を作製し、McFarland 標準液や濁度計等を用いて濁度を測定する。それを適宜希釈し、培地に塗布してあらかじめ濁度と菌数の相関を確認しておく。濁度によりおよその菌数が算出できるレジオネラ属菌懸濁液を希釈したもの（例えば 10^4CFU/mL 見当）を滅菌生理食塩水等 500mL に適量添加する。それを検水として、自施設の標準手順作業書に従い、検水中のレジオネラ属菌数を算定し、元のレジオネラ属菌懸濁液を培地に塗布した場合と比較して回収率を求める。迅速検査法についても同様に検水を作製し実施する。

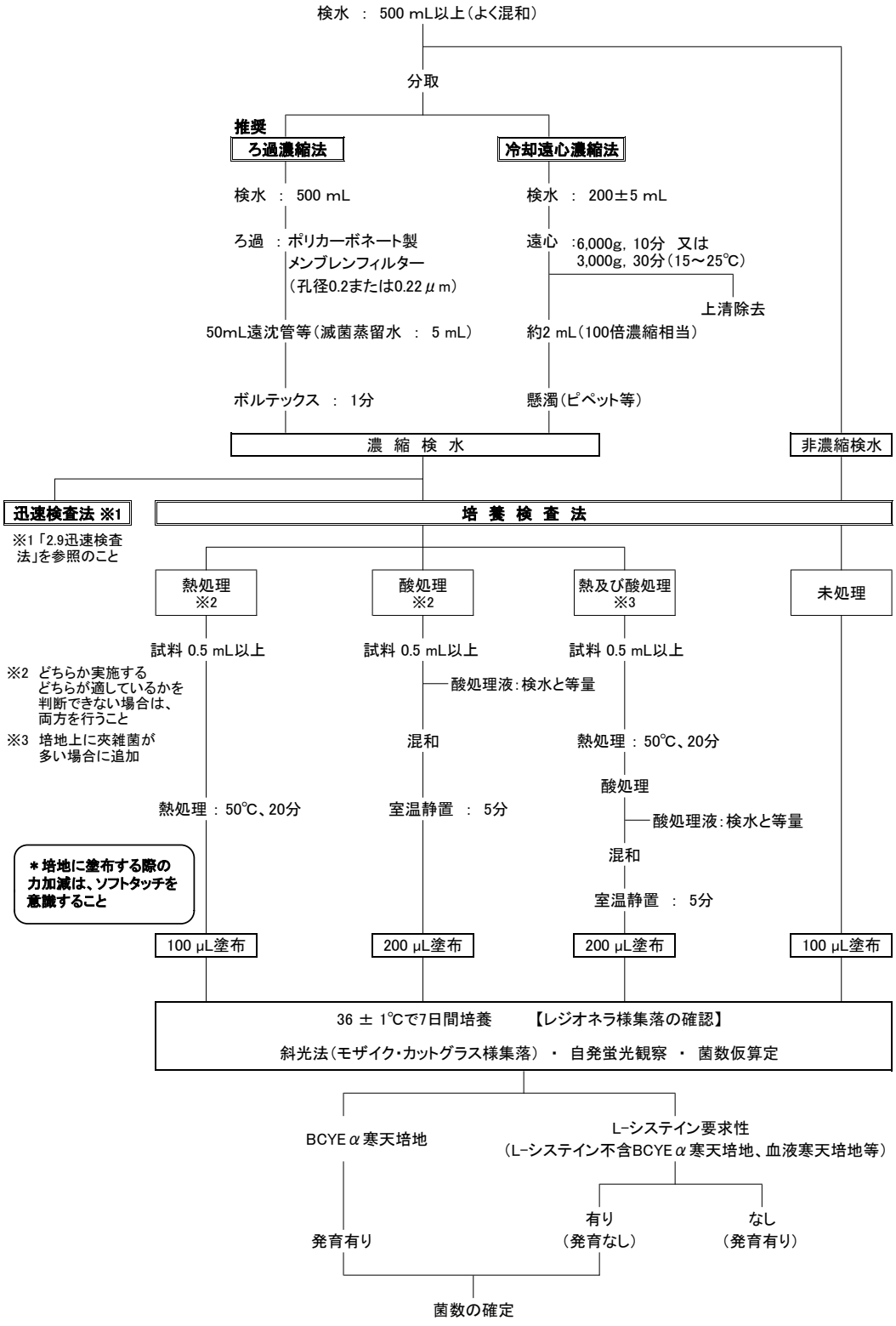


図１　公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法

※レジオネラ症患者の発生時の感染源の特定のための検査については、この限りではない。

図２　斜光法による分離培地上の
集落観察
（提供：北海道立衛生研究所　森本　洋氏）

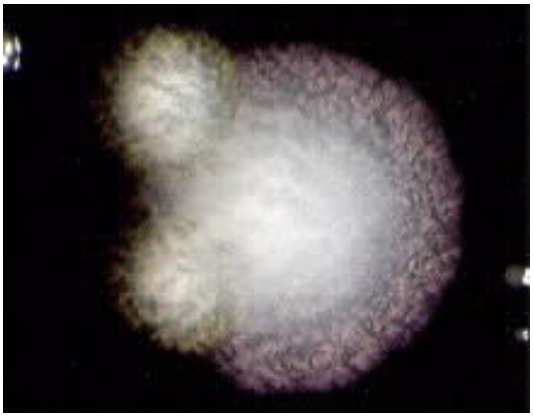


図３　実体顕微鏡で観察される１個の
大きな *L. pneumophila* 血清群１と
２個の *L. cherrii* の集落。
集落周縁部がモザイク・カットグラ
ス様を呈する。
（提供：北海道立衛生研究所　森本　洋氏）

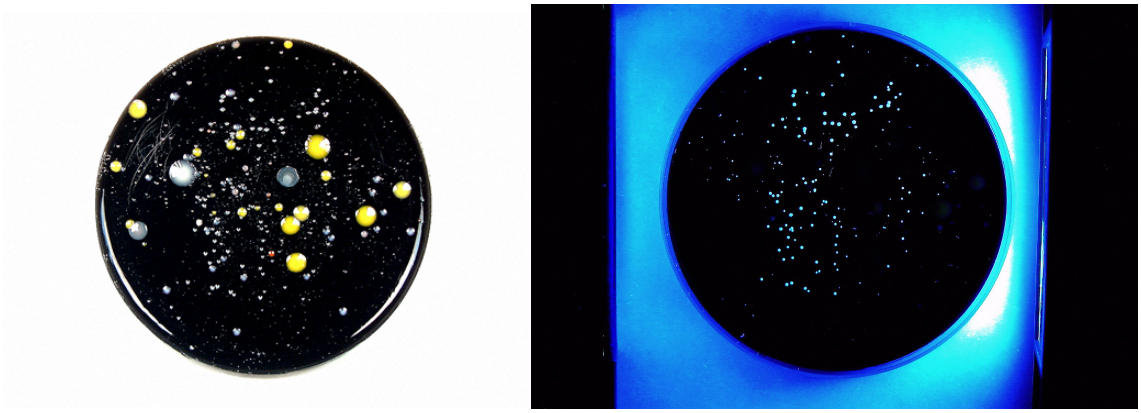


図４　同じ分離培地での可視光（左）と長波長紫外光（右）による観察
（提供：北海道立衛生研究所　森本　洋氏）

表 1　長波 UV ランプ照射時のレジオネラ属菌 61 種の自発蛍光の有無

	自発蛍光		自発蛍光		自発蛍光
L. anisa	＋青白	*L. adelaidensis*	-	*L. longbeachae*	-
L. bozemanae	＋青白	*L. beliardensis*	-	*L. maceachernii*	-
L. cherrii	＋青白	*L. birminghamensis*	-	*L. massiliensis*	-
L. dumoffii	＋青白	*L. brunensis*	-	*L. micdadei*	-
L. gormanii	＋青白	*L. busanensis*	-	*L. moravica*	-
L. lytica	＋青白 V	*L. cardiaca*	-	*L. nagasakiensis*	-
L. parisiensis	＋青白	*L. cincinatiensis*	-	*L. nautarum*	-
L. qingyii	＋青白	*L. drancourtii*	-	*L. norrlandica*	-
L. rowbothamii	＋青白	*L. drozanskii*	-	*L. oakridgensis*	-
L. saoudiensis	＋青白	*L. fairfieldensis*	-	*L. pneumophila*	-
L. steelei	＋青白 V	*L. fallonii*	-	*L. quateirensis*	-
L. steigerwaltii	＋青白	*L. feeleii*	-	*L. quinlivanii*	-
L. tucsonensis	＋青白	*L. geestiana*	-	*L. sainthelensi*	-
L. dresdenensis	＋暗赤	*L. gratiana*	-	*L. santicrucis*	-
L. erythra	＋暗赤	*L. gresilensis*	-	*L. shakespearei*	-
L. rubrilucens	＋暗赤	*L. hackeliae*	-	*L. spiritensis*	-
L. taurinensis	＋暗赤 V	*L. impletisoli*	-	*L. thermalis*	-
		L. israelensis	-	*L. tunisiensis*	-
		L. jamestowniensis	-	*L. wadsworthii*	-
		L. jordanis	-	*L. waltersii*	-
		L. lansingensis	-	*L. worsleiensis*	-
		L. londiniensis	-	*L. yabuuchiae*	-

V：株により異なる。

叩き台

別添　浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法（案）

概　　要

公衆浴場におけるレジオネラ属菌検査については、平成 12 年 12 月 15 日付け 公衆浴場における衛生等管理要領等について（生衛発第 1811 号厚生省生活衛生局長通知）で初めて「公衆浴場における水質基準等に関する指針」に盛り込まれた。その後、平成 15 年 2 月 14 日付け 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について（健発第 0214004 号厚生労働省健康局長通知）において、また、その具体的手順は「新版レジオネラ症防止指針」の「＜付録＞1 環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること、という一文が加えられ現在に至っている。レジオネラ属菌検査法については、平成 21 年度の生活衛生関係技術担当者研修会で検査施設間差が指摘され、「検査法の確立」と「行政・民間の精度管理のあり方」について質疑応答がなされ、その後、厚生労働科学研究内で検討されてきたが、この度、前述「新版レジオネラ症防止指針」記載検査法の根拠となっている ISO 法の改定が行われたことなどから、これまでの「新版レジオネラ症防止指針」をベースに、厚生労働科学研究の成果及びレジオネラ症（国立感染症研究所病原体検出マニュアル）と合わせ検討し、新たにレジオネラ属菌標準的検査法を作成することとなった。なお、ここで示す標準的検査法は、一般的な浴槽水の自主検査等に必要と考えられる基本的な検査工程に加え、レジオネラ感染症発生時の感染源調査等において、より詳細な検査が必要となった場合にも対応できるような記載にした。また、厚生労働科学研究内で、検査法と合わせて検討を重ねてきた精度管理についても、その必要性について記載した。

留意事項

レジオネラ属菌培養法の基本は、BCYEα寒天培地（非選択分離培地）を用い、36℃前後で培養することである。改訂された ISO11731:2017 Water quality - Enumeration of Legionella（以下改訂 ISO 法）では、検体となる環境水の状況に応じ使用培地や前処理法を選択するよう記載されており、清浄度が高いと考えられる検体については、BCYEα寒天培地の使用や前処理をしないなどの検査対応も含まれている。一方で、清浄度が中等度から低いと考えられる検体については、非濃縮検体の検査、選択分離培地の使用、熱や酸による前処理の実施について記載されている。現在、国内における浴槽水の検査においては、混在する細菌・真菌叢の状況を予測することが困難なため、培地上でレジオネラ属菌の発育を阻害する様々な細菌・真菌が検体中に存在していることを前提とした検査対応をすることが一般的となっている。そのため、本法においても、選択分離培地の使用及び熱や酸

による前処理を行うことを基本とした。ただし、レジオネラ感染症発生時等においては、その感染源調査において、より詳細な検査が求められる可能性もあることから、検体の状況に合わせた検査法についても記載した。

本来検体を濃縮する工程は、レジオネラ属菌数が少ないと想定される場合に有用となるが、前述の通り、国内においては、浴槽水に混在する細菌・真菌同様、レジオネラ属菌についてもその菌数を予測することが困難な検体についての検査が一般的であるため、濃縮検体に加え非濃縮検体の検査実施についても記載した。ただし、清掃消毒直後の検体等、レジオネラ属菌数が少ないと根拠立てて推定される場合においては、濃縮検体のみでの検査対応も可とした。

濃縮法については、ろ過濃縮法と冷却遠心濃縮法が利用されているが、これまでの厚生労働科学研究において、これら２つの濃縮方法を同一検体に対し比較した報告によると、ろ過濃縮法の方が冷却遠心濃縮法よりも検出菌数が多く、また菌数が少ない場合、ろ過濃縮法でしかレジオネラ属菌が検出されなかった場合があった。また同様に、改訂された ISO 法でもろ過濃縮法を強く推奨している。これらのことから、本法においても、ろ過濃縮法を推奨した。

なお、これまでの厚生労働科学研究において、使用培地・前処理方法・培地への塗布方法・非濃縮検査の有無・濃縮方法・その他濃縮工程等の違いが、単独または複数組み合わさることで、検査結果に影響する可能性を報告してきた。ここでは、検査工程ごとで必要となる基本的な注意事項のほかに、検査結果に影響する可能性のあるポイントも示した。より詳細な検査を必要とする場合には参考にしていただきたい。

分離培地上のレジオネラ集落は、一般的に灰白色湿潤集落を形成するが、実際の検査現場においては、分離培地上に雑菌が多数発育している場合や種々の灰白色湿潤集落が発育している場合が多く、その集落の選定においては、検査者を悩ませることがしばしばある。この様なとき、分離培地上の発育集落に斜光を当て、実体顕微鏡で観察すると、レジオネラ属菌は、特徴的な外観構造（カットグラス様、モザイク様）を呈する（ **２．７　培地上の集落の観察参照**）。この集落観察法を利用することで、効率よく集落を選定でき、より正確な定量結果を報告することが可能となることから、本法での推奨法とした。

昨今のさまざまな試験検査においては、信頼性確保のための精度管理を実施することが求められている。このことは、レジオネラ属菌の検査についても同様である。精度管理には、検査施設内で完結させる内部精度管理と共通の試料を用いることによって他施設との比較が可能な外部精度管理に分けられる。各検査施設がこれら精度管理を実施することで、より適切な検査結果の保証に繋がることから、検査施設には積極的な対応が望まれ、検査依頼者もその依頼にあたっては、依頼施設が適切に精度管理を行っているかを確認することが望ましい。

1　試料の採取

1）試薬

（1）チオ硫酸ナトリウム：25%の溶液を作製する。

2）器具及び器材

（1）採水容器：容量が 500mL あるいは 1000mL のポリプロピレンやポリエチレン製またはガラス製などの密栓ができる容器で、滅菌してあるもの。

（2）柄杓：採水に用いる。滅菌したプラスチック容器を用いることもできる。

（3）保冷箱：採水した検体の搬送に用いる。

（4）保冷剤：採水した検体の保冷に用いる。

3）採取手技

容器入水による採水方法の場合、浴槽水中にレジオネラ属菌が存在していると、容器表面へレジオネラ属菌が付着することが考えられる。このような検水が検査室に持ち込まれると、場合によっては検査室内での相互汚染が懸念される。そのため、採水には消毒した柄杓等を使用し、採水容器表面を検水で濡らさないように採水すること。採水者は、容器表面が検水で濡れた場合、十分に水分を拭き取りアルコール綿等で消毒すること。複数の検体を採取する場合は必要数の滅菌した柄杓を準備するか、採取するたびにアルコールで柄杓を消毒して使用する。　**注１**　検水で容器を満杯にせず、上部に空間を残すように採水すること。　**注２**　採水後はねじ栓を固く締め、パラフィルム等で固定するのが望ましい。　**注３**

水道水や浴槽水のように塩素を含んでいる水試料を採取する場合には、採水容器にあらかじめ 25%チオ硫酸ナトリウム溶液を 1/500 量を加えて滅菌しておく。または、採水後、無菌的に 25%チオ硫酸ナトリウム溶液を 1/500 量添加する。

注１　容器入水による採水を行った場合、及び容器表面が検水で濡れた場合には、そのことを検査者に伝えること。検査者は、状況により、搬入後、容器周囲を消毒してから検査を行うこと。

注２　開栓時にこぼさないようにするためと、採水容器内に酸素を残すためとされている。

注３　浴槽水など温かい検水を採取した時は、温度が下がると合成樹脂容器が収縮して栓がゆるみ検水が漏れることがあるので注意する。

4）採水量

採水量については、検査精度を 10CFU/100ml にするため、最低 100ml 以上を必要とする

が、ここでは、500ml のろ過濃縮法を推奨している（ **２．３　試料の濃縮**参照)。このことから、一般的な浴槽水の自主検査においては 500ml 以上、レジオネラ感染症発生時の感染源調査では、予備の検水確保のため、ろ過量の倍量である 1000ml 以上を採水すること。なお、冷却遠心濃縮法で対応する場合には、JIS K 0350-50-10:2006 を参照し、自施設の機材に合わせ対応すること。ただし、ろ過濃縮では 500ml が検査に供試されることから、可能な限り 500ml に近い検水量が望ましい。また、レジオネラ感染症発生時の感染源調査では、基本遠心量の倍量以上を確保すること。

５）試料の搬送と保存

検水採水後の採水容器は、直射日光を避けるため保冷箱等に入れ、保冷剤で 6～18℃に保って搬送する。　**注４**

検査は、検査室に搬入後ただちに実施することが推奨される。ただちに実施できない場合は、6±2℃で冷蔵保存し、採水後 2～5 日以内に実施することが望ましい。予備検体及び濃縮検体の保存は 14 日を超えてはならない。　**注５、６、７、８**

注４　自主的に搬送する場合、温度を一定に保つことは難しいが、レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバによる影響押さえ、検水中の微生物層を可能な限り安定させることが必要となる。そのため 6～18℃で搬送すること。宅配便等の冷蔵システム利用の場合はそれに従う。検査室への速やかな搬入が可能な場合は常温も可とする。

注５　集団事例発生時には、培養後の予備検体及び残余濃縮検体を 3 カ月まで保存すること。

注６　検水の輸送又は保存中に生菌数が変化する可能性も念頭に置くこと。

注７　検体の採取から検査までに要した時間を報告書に記載すること。

注８　検査に供するまでの保存期間、保存温度等が検査結果に影響を及ぼしている可能性がある場合は、そのことを報告書に付記すること。

２　検査

２．１　はじめに

検査は､検体中にレジオネラ属菌が存在している可能性を常に意識し､P2 実験室内で BSL2 の取り扱い基準に従い実施すること。操作によってエアロゾルを発生する可能性が有るとき（**注 9**）は、レベル２の安全キャビネット内で作業すること。このことは検査者の感染防護、検査施設内汚染等を考える上で重要である。

検査工程を図 1 に示す。非濃縮検水と濃縮検水を同時に検査することを基本とし、一般的な検水についての必須検査として、非濃縮検体に未処理、濃縮検体について熱処理及び酸処理を実施し培養する（**２．５　接種**参照)。なお、濃縮法はろ過濃縮法を推奨する（**２．**

３　**試料の濃縮**参照)。

発育集落の観察には斜光法を推奨する（ **２．７　培地上の集落の観察参照**)。

注９　培地への接種、濃縮工程、ピペットからの吹き出し、遠心、攪拌、強い振とうや混合、超音波破砕、等。

２.２　レジオネラ用培地

市販生培地や市販基礎培地に市販サプリメントを定法通り添加した培地の使用が一般的であるが、成分表に準じて培地を作製する場合には調製に十分注意し品質確保に努める必要がある。成分表に準じて培地を自家調製した場合は、レジオネラ属菌の分離性能の検証（雑菌の抑制を含む）を行い、そのデータを保管する。

１）非選択分離培地：BCYEα寒天培地

レジオネラ属菌は、酵母エキスやペプトン等を含む一般的に利用される細菌培養用の培地には発育することができない。そのため、Feeley らにより鉄成分と特にその発育に必須となる L-システイン、及び発育阻害物質を吸着するための活性炭末を加えた CYE（Charcoal yeast extract）寒天培地が考案された。その後、Pasculle らによって培地の緩衝性を高め発育時間を短縮するため ACES Buffer を加えた BCYE（Buffered charcoal yeast extract）寒天培地が考案され、さらに Edelstein らによりα-ケトグルタル酸カリウムの添加により本菌の発育が促進されると報告されたことにより、現在の BCYEα寒天培地となった。本培地は、国内でレジオネラ属菌の培地を扱うすべてのメーカーから入手することが可能である。　**注 10**

利用法：L-システイン要求性試験（**２．８　菌の鑑別・同定と計数**参照)、釣菌後の一般的な培養、混在する雑菌が少ないと推定される検水への分離培養など。

注 10　メーカーによって成分組成が若干異なっていたり、同じ組成であったとしても異なるメーカーの寒天、酵母エキス、活性炭末等によって、形成集落の大きさ等に違いが見られることがある。検査者は、事前に自施設で使用している培地上でのレジオネラ属菌集落を経日的に観察し確認しておく必要がある。

２）選択分離培地：GVPCα寒天培地、MWY 寒天培地、WYOα寒天培地等

現在国内で市販され普及している主なものを示した。いずれの培地も、BCYEα寒天培地を基礎培地として考案された選択分離培地である Wadowsky and Yee の GVP 寒天培地を改良して作られた培地である。改訂 ISO 法では、選択分離培地として GVPCα寒天培地を推奨しているが，新版レジオネラ症防止指針にも記載されていたとおり、レジオネラ純培養菌の浮遊液を用いて BCYEα寒天培地と比較した実験では，これら 3 種の選択分離培地の発育支持力に大差はなく，検水中に混在する細菌・真菌叢の抑制にどの選択剤が有

用かにかかっていることから、ここでは特に培地の種類を指定しない。　**注 11、12**

利用法：一般的な検水からのレジオネラ属菌の分離培養。

注 11　使用されている選択剤は、レジオネラ属菌の発育にも影響を与えている場合があるので注意すること。また、基礎培地である BCYEα寒天培地のメーカー間差に加え、添加されている選択剤の影響により、異なる種類の培地はもとより、同じ名称の培地であっても、少なからずメーカー間差があることに注意すること。

注 12　各種選択分離培地に同一のレジオネラ菌株が発育していたとしても、その集落形状に違いが認められる場合があることから、検査者は、事前に自施設で使用している培地上でのレジオネラ属菌集落を経日的に観察し、確認しておくこと。

3）培地の保存

市販の生培地には、それぞれ使用期限が示されている。メーカーによって使用期限が異なる培地があるので、よく確認すること。粉末基礎培地と添加物を用いて最終自作した培地では、発育支持力や選択能力の経時的変化があることを考慮し、できるだけ新鮮なものを使用すること。保存温度は 4℃が一般的ではある。　**注 13、14**

注 13　保存中の乾燥や結露、カビの発生には十分注意し、実験前に使用に適当な状況であるか判断する。生培地が消費期限内であっても、使用前に十分確認すること。

注 14　少量であれば嫌気ジャーで、大量であればクーラーボックスに入れ密封し冷蔵保存することで乾燥と結露をかなり防ぐことが出来る。自家調製培地においても、適切な保存により、3 カ月間のレジオネラ属菌発育性能を保持することが可能である。

2．3　試料の濃縮

ここでは、ろ過による濃縮を推奨する。

本操作は、安全キャビネット内で実施する。

1）メンブレンフィルターろ過濃縮法

1）－1　試薬

（1）滅菌蒸留水：ろ過後のフィルターから菌を再浮遊させるのに用いる。また、採水容器やフィルターホルダーに残る検水を洗い流す場合に用いる。

（2）消毒用エタノール:アルコール綿の作製に用いる。

1）－2　器具及び器材

（1）ポリカーボネート製メンブレンフィルター：ポアサイズ 0.20μm または 0.22μm が推奨される。メーカーの違いは特に問わない。　**注 15、注 16**

（2）フィルターホルダー：ガラス製でもポリカーボネート製でも構わない。ポリカー

ボネート製では使用後の洗浄時にブラシなどで傷がつかないように注意する。　**注 17**

（３）**マニホールド**：多数の検体を処理するには多連のマニホールドが便利であるが、検体数が少なければ吸引ビンで代用することもできる。

（４）**吸引ポンプ**：特に指定しない。

（５）**吸引ビン**：マニホールドに繋いで廃液を貯めるのに用いる。検体数に応じて容量を決める。

（６）**シリコン栓**：吸引ビンに使用する。

（７）**ガラス管**：シリコン栓に刺して用いる。チューブの太さに合わせる。

（８）**チューブ**：マニホールドと吸引ビン、吸引ポンプを繋ぐ。

（９）**ピンセット**：メンブレンフィルターの操作に用いる。

(10) **スクリューキャップタイプの滅菌 50mL 遠沈管：**ろ過後のフィルターから菌を再浮遊させる時に用いる。　**注 18**

(11) **撹拌機**：ボルテックスあるいは同等品を用いる。

(12) **アルコール綿**：ピンセットの消毒に用いる。(検体数に応じ、事前に滅菌ピンセットを準備することで、検体ごとに交換する対応方法も)

(13) **安全キャビネット**：レジオネラ属菌は BSL2 に属する病原体であり、検体の操作時の感染を予防するために、安全キャビネット内での操作が推奨される。

注 15　ろ過後の水の検査ではなく、フィルターに捕集されたレジオネラ属菌を回収することを目的としている。ポリカーボネートタイプフィルターは、均一な表示径の円筒状孔を持ち、その孔径分布が一定のため、サイズによる正確な分離が可能となる。他の材質のフィルターでは、膜の内部に菌が入り込んで回収されにくくなる場合がある。改訂 ISO 法においても、ポリカーボネートタイプフィルターが推奨されている（他にポリエーテルスルホンフィルターが推奨されている）。一般的な検査室では、オートクレーブ滅菌可能な製品が使用しやすい。

注 16　ポリカーボネートタイプフィルターの対応孔径を記載した(メーカーにより異なる)。新版レジオネラ症防止指針には、レジオネラ属菌体サイズは 0.3～0.9×2～20μｍと記載されている。レジオネラ属菌がフィルターを縦に通過しようとした場合、0.40 や 0.45μｍ のポアサイズであればトラップされず、そのまま通過してしまう可能性がある。 ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 では孔径 0.2μｍと規定されている。

注 17　吸引ビンと一体化している製品もあり、個別対応する時に便利である。

注 18　他の容器で代用可能であるが、フィルターからの洗い出しはエアロゾルが最も発生しやすい工程のため、密封出来るタイプの容器を使用すること。

１）－３　操作

（１）ろ過濃縮する場合の検水量は 500mL とする。

（２）マニホールドにフィルターホルダーをセットし、チューブでマニホールドと吸引ビン、吸引ポンプを繋ぐ。

（３）フィルターホルダーにメンブランフィルターを滅菌またはアルコール綿で十分に消毒したピンセットを用いてセットする。この時にフィルターの表裏に注意する。**注 19、20**

（４）採水容器から検水をフィルターホルダーに注ぎ、吸引を開始する。　**注 21、22**

（５）検水の全量を注ぎ終わったら、適量の滅菌蒸留水で容器を洗い、洗浄液もろ過する。

（６）全量をろ過し終わったら、適量の滅菌蒸留水でフィルターホルダーの内側を洗浄し、その洗浄液もろ過することを推奨する。

（７）ろ過が終了したら滅菌またはアルコール綿で十分に消毒したピンセットでフィルターを取り出し、5mL の滅菌蒸留水が入った滅菌 50mL 遠沈管などに入れて栓をする。　**注 23**

（８）遠沈管を撹拌機で振盪を最大にして 1 分間撹拌する。　**注 24**

注 19　包装製品のラベル側を捕集面。（光沢度が高い側）にすることを推奨する。ポリカーボネートタイプフィルターは、その構造上表裏対象面となっているが、製法として電子銃で撃ち抜き後片面をアルカリ処理することで作製されている。そのためアルカリ処理面の平滑性が若干低下している可能性がある。なお、セルロースアセテートやセルロース混合エステルタイプの表面が指定されている製品でも、包装製品のラベル側が表面となっている。

注 20　フィルターホルダーと吸引ビンが一体化している製品などでは、検体数に応じ、フィルターセット後個別滅菌しておく対応方法も。

注 21　検水を注ぐ前に一度滅菌水を注ぎ、ホルダーが適切にセットされているか確認する。

注 22　検体に混濁があり、ろ過時間がかかることが予想される場合は、プレフィルター（大孔径のフィルター、材質は指定しない）でろ過後、孔径 0.2～0.22 μm のポリカーボネートメンブランフィルターで再ろ過を行うことで対応。

注 23　ろ過フィルターは、滅菌蒸留水にひたすとしているが、塩分が含まれる温泉水等を検査する時などは、滅菌生理食塩水の利用で良い結果が得られる場合がある。また、検体ごとにろ過後の水が貯留されている場合は、そのろ過水を利用することで良い結果が得られる場合がある。

注 24　ISO 法では改訂前を含め、洗浄時間 2 分以内と記載されているが、厚生労働科学研究において 1 分及び 2 分で比較した結果、明確な差は認められなかったため、これまで通り 1 分とした。

２）　冷却遠心濃縮法

ろ過濃縮が困難（検体の質、検査設備等）と判断された場合に行う。またその基本操作手順は、ISO 11731:1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10:2006（以下 JIS 法）を参照すること。

操作概略　注 25、26、27、28、29（以上改訂 ISO 法）、注 30

（１）遠心条件

遠心加速度 6000g で 10 分又は 3000g で 30 分、15～25℃で遠心する。　**注 31**

使用機器で遠心加速度設定が出来ない場合は、以下の計算式で機種ごとに計算する必要がある。

遠心加速度(g)＝1118×回転半径(cm)×回転速度^2(rpm)×10^{-8}

（２）上清除去

デカンテーションによる上清除去の場合、沈渣も同時に除去されやすいことから、滅菌ピペットもしくはアスピレーター等で慎重に除去することを推奨する。この場合、上清を全量除去せず、100 倍希釈となる液量を残すように除去する。　**注 32**

注 25　検体中の沈殿物がハイレベルであり、ろ過濃縮が困難な場合において遠心濃縮を行う。

注 26　ローターは、沈殿物がチューブの底に集約し安定しており、上清が除去しやすいことから、スイングローターが最も良い。アングルローターでは、沈殿物が不安定であり、このドキュメントにある他のどの方法よりも回収率が低い。

注 27　検体をよく混ぜた後、300～500ml の滅菌したスクリューキャップタイプの遠心管に 200±5ml 検体を注ぎ、遠心加速度 6000g で 10 分又は 3000g で 30 分、15～25℃で遠心する。（操作についての説明であり、総検体量を 200±5ml とすること、との記載ではない。）

注 28　遠心中にボトルが破損した場合のエアロゾルによる曝露を防ぐため、開封前のローターごと安全キャビネットに入れる。

注 29　上清は、沈殿物のロスを避けるために、デカンテーションよりもバキュームによる除去を推奨する。再懸濁のための希釈量を調整しながら除去する。

注 30　総遠心量はろ過濃縮法同様 500mL にする。

注 31　遠心終了時のブレーキは設定せずに自然に停止するのを待つ。

注 32　遠心管の内側表面にレジオネラ属菌が付着しているため、菌をはがすために懸濁溶液を用いてピペットで表面を勢いよく洗う。この洗浄操作は回収率に影響する。必ず安全キャビネット内で行うこと。

２．４　検水の前処理

前処理には、未処理、熱処理、酸処理、熱＋酸処理がある。熱処理、酸処理、熱＋酸処理は、検水中に混在する細菌・真菌叢が、選択分離培地だけでは上手く抑制することができないことを想定し実施する工程であるが、これら前処理は、同じ処理能力を有しているわけではなく、検水ごとで前処理状況に応じレジオネラの検出率に違いが認められる場合がある。なお、選択分離培地同様、熱処理、酸処理、熱＋酸処理がレジオネラ属菌自体にも影響をあたえている場合があるので注意する。

１）未処理　注 33

検水に対し、前処理を行わないこと。本法では、非濃縮検体の検査を実施する場合、必須とする。

注 33　検体の清浄度が高いと想定される場合に実施する(改訂 ISO 法でも同様の記載あり)と、良い結果が得られやすい。

２）酸処理

２）－１　試薬

（１）酸処理液：0.2M HCl・KCl 液 pH2.2±0.2　**注 34**

注 34　市販の酸処理液を使用する場合は、保管温度、使用期限を遵守すること。自家調製した酸処理液を使用する場合は､必要に応じ pH を測定し､品質の確保に努めること。特に長期間使用していなかった場合は、使用前に確認すること。

２）－２　器具及び器材

（１）キャップ付き滅菌試験管等：酸処理を行うのに使用する。

（２）滅菌ピペット等：試料及び酸処理液を滅菌試験管に移すのに使用する。

（３）時計またはストップウォッチ：処理時間の計測に使用する。

２）－３　操作

非濃縮の検水、ろ過あるいは遠心により 100 倍に濃縮された試料それぞれ 0.5mL を滅菌試験管に取り、等量の酸処理液を加え混和し 25℃程度の室温で 4 分間静置する。

注 35、36、37、38

注 35　検水を各試験管に移したり、酸処理を行う工程は安全キャビネット内で実施すること。

注 36　参考文献によって、反応時間が異なっている場合があるが、その手技上では、反応時間後の接種、塗布の間も反応しており時間差が生まれている。これらを含め 5 分前後の反応時間においては、レジオネラ属菌の検出に大きく影響を与えることはな

い。

注 37　参考文献によっては、共存するレジオネラ属菌以外の微生物の量が多いと予想される場合には、20 分まで処理時間を延長しても良いとされている。しかしながら、検体に含まれるその他微生物の状況により結果は異なり、すべての場合に対応できるというわけではない。また、反応時間の延長は、検体中のレジオネラ属菌自体にも影響を与えている可能性があるので、注意すること。

注 38　前処理後の検体を保存するのには適していない。

３）熱処理

３）－１　試薬

（１）特になし。

３）－２　器具及び器材

（１）キャップ付き滅菌試験管等：熱処理を行うのに使用する。　**注 39**

（２）滅菌ピペット等：試料を滅菌試験管に移すのに使用する。

（３）時計またはストップウォッチ：処理時間の計測に使用する。

（４）ウォーターバス：熱処理を行うのに使用する。　**注 40**

注 39　熱処理中、試験管内の空気の膨張によりキャップが緩んだり開いたりするのを防止すること（スクリューキャップタイプを推奨)。

注 40　機器の表示温度だけではなく実際の温度を処理前に確認すること。代替としてヒートブロックを使用する場合は、特に注意すること。

３）－３　操作

非濃縮の検水、ろ過あるいは遠心により 100 倍に濃縮された試料それぞれ 1mL を滅菌試験管に取り、50±1℃に設定したウォーターバスに 20 分間静置し試料とする。速やかに培地に接種出来ない場合は、反応時間後の余熱による影響を考慮し水冷する。

注 41、42、43、44

注 41　新版レジオネラ症防止指針には、50℃、20 分及び 50℃±1℃、30±2 分間の 2 通りの記載がある。厚生労働科学研究において、50℃±1℃、20 分の加熱時間で十分な検査結果が得られていることから、本法ではこちらを採用した。

注 42　検体を 60℃、4 分以上処理すると、検出率はきわめて低率となるので注意温度管理には十分注意をすること。

注 43　氷冷は避けること。

注 44 前処理後の検体を保存（6±2℃）する場合に適した方法である。

４）熱＋酸処理

検体中に混在する細菌・真菌叢が非常に多く、前述の熱処理又は酸処理だけではそれら雑菌を抑制できなかった、もしくは抑制できないと予想される場合に実施する。

４）－１　試薬

（１）酸処理液：0.2M HCl・KCl 液 pH2.2±0.2

４）－２　試料

（１）熱処理液：**３）熱処理**で作製したものを使用する。

４）－３　器具及び器材

（１）キャップ付き滅菌試験管等：酸処理を行うのに使用する。

（２）滅菌ピペット等：試料及び酸処理液を滅菌試験管に移すのに使用する。

（３）時計またはストップウォッチ：処理時間の計測に使用する。

４）－４　操作

熱処理した試料又は熱処理後保存していた試料の適量を滅菌試験管に取り、等量の酸処理液を加え混和し 25℃程度の室温で 4 分間静置する。　**注 45、46**

注 45　**２）酸処理**の注意事項に準じる。

注 46　検体により結果は異なり、すべての場合に対応できるというわけではない。

２．５　接種

これまでの参照検査法である新版レジオネラ症防止指針同様に、検水中のレジオネラ属菌数を予測できないので、非濃縮検水と濃縮検水を同時に検査する。なお、本法では、一般的な検水について、非濃縮検水に未処理、濃縮検水について熱処理及び酸処理を実施した試料を選択分離培地で培養することを必須検査とする。ただし、レジオネラ属菌数が少ないと根拠立てて推定される場合は、濃縮検水のみでの検査対応も可とする。　**注 47、48**

注 47　これまで参照検査法となっていた新版レジオネラ症防止指針には、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、またそれぞれの検体に対し、未処理、酸処理、熱処理した検水を接種する、と記載されている（6 つの異なる条件を選択分離培地各 1 枚、計 6 枚）。厚生労働科学研究において、本条件を検証した結果、様々な状況の検体に対し幅広く対応できる方法であることが確認された。患者発生事例等、より詳細な結果が求められる場合の検査条件として推奨する。

注 48　必要に応じ熱＋酸処理試料を接種する。

１）－１　**試薬**

（１）**分離培地**：GVPCα 寒天培地、MWY 寒天培地、WYOα 寒天培地等の適切な選択分離培地。　**注 49**

（２）**滅菌リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）**

注 49：清浄度が高く混在する雑菌が少ないと推定される検水への分離培養には、非選択分離培地である BCYEα寒天培地の使用で良い結果が得られる場合がある。改訂 ISO 法では清浄度の高い検体への BCYEα寒天培地の使用を求めている。

１）－２　**器具及び器材**

（１）**滅菌試験管**：試料の希釈に使用する。

（２）**滅菌 1mL ピペット**：試料の希釈に使用する。

（３）**滅菌 5mL または 10mL ピペット**：リン酸緩衝生理食塩水の滅菌試験管への分注に使用する。

（４）**マイクロピペット**：100μL 及び 200μL の試料を培地に接種する。

（５）**滅菌コンラージ棒**：試料の平板培地への塗布に使用する。

１）－３　**操作**

（１）使用する分離培地 1 枚につき、酸処理（熱＋酸処理）後では 200μL を、加熱処理後及び未処理では 100μL を接種する。　**注 50、51、52**

（２）コンラージ棒で培地に接種した試料を培地表面に均等に塗布する。コンラージ棒の力加減は、ソフトタッチを意識する。　**注 53**

注 50　試料を接種する前に分離用培地の表面を乾燥させる必要が往々にしてあるが、表面にしわがよるほど乾燥させるとレジオネラ属菌の検出率が低下するので、乾燥しすぎないように注意する。ただし、培地メーカーでは、市販生培地表面の乾燥を必要としないと回答する場合がある。検査者は、実験前に使用に適当な状況であるか確認し判断すること。保存中の結露等により、培地表面に水滴がみられる場合には、乾燥の前に滅菌ピペット等で取り除く。

注 51　検水中に多数のレジオネラ属菌あるいは雑菌が存在し、菌数を定量的に算出することが困難であると予想される場合は、未処理試料と酸処理及び熱処理試料を 10 倍段階希釈することで良い結果が得られる場合がある。

注 52　酸処理試料は培地 2 枚に各 100μL ずつ接種する方法で対応しても良いが、培地 1 枚に 200μL 接種で十分対応できることが確認されている。もし培地を増やすことが可能である場合は、**注 47** に記載した別の接種条件を増やすことを推奨する。

注 53　厚生労働科学研究により、コンラージ棒の力加減が発育集落数に影響する可能性が

示唆された。接種した試料が培地表面に均等に広がるよう、コンラージ棒の重さだけを利用し塗布し、強く塗り込むことを避ける。特に酸処理試料では接種量が多いため、培地に吸収されるまでに時間を要することがある。試料が培地に完全に吸収されるまでコンラージ棒で塗布する必要はない。試料が培地表面にほぼ均等に塗布された時点で塗布をやめ、試料が吸収されるまで静置する。

２．６　培養

１）－１　試薬

（１）特になし。

１）－２　器具及び器材

（１）**インキュベーター（孵卵器）**：分離培地の培養に使用する。

（２）**湿潤箱等**：培養中の分離培地乾燥防止のために使用する。　**注 54**

１）－３　操作

（１）試料を接種した分離培地を裏返し、培養中の乾燥を防ぐため湿潤箱等に入れる。

（２）36±1℃に設定したインキュベーターに入れて培養する。

（３）培養期間は 7 日間とする。　**注 55**

注 54　本菌の培養日数が長いことから、培地の乾燥に注意をしなければならない。蓋付きの水切りバットの外側に純水を入れ、内側に分離培地を入れてインキュベーターに入れると良い。検水ごとに、透明なビニル袋に分離培地と湿らせ丸めたペーパータオル等を入れ、口を結び（状況によって輪ゴムを利用）インキュベーターに入れると場所をとらない。

注 55　まれに 7 日目以降にレジオネラ属菌が発育してくる場合もあるので注意が必要であるが、発育集落の観察に斜光法（ **２．７　培地上の集落の観察参照**）を利用することで、7 日目以降の見逃しを軽減させることができる。

２．７　分離培地上の集落の観察

本法では、一般的な検水について、非濃縮検水に未処理、濃縮検水について熱処理及び酸処理した試料を選択分離培地で培養することを必須検査としたが、この検査条件で雑菌数が多く培養初期から観察が困難と判断された場合は、**注 45** に記載した異なる別の条件及び熱＋酸処理をする条件を増やすなどで可能な限り再検査を実施する。　**注 56**

注 56　最終的に夾雑菌が多く観察不能のときは「不能」とし、レジオネラ属菌「不検出」としてはいけない。

１）－１　斜光法

分離培地上の発育集落に斜光を当て、実体顕微鏡で観察（図 2）すると、レジオネラ属菌は、特徴的な外観構造（カットグラス様、モザイク様：図 3）を呈する。従来法では、肉眼で観察し、灰白色湿潤集落をレジオネラ様集落と推定し、菌数測定や釣菌を行ってきた。しかしながら、この方法では、他の発育菌との分別が困難であり、不確かな菌数測定や非効率的な釣菌作業を行わなければならないことが多い。斜光法を利用することで、多数の灰白色湿潤集落を含む集落が分離培地上に発育していたとしても、レジオネラ属菌の存否を高い確率で確認することができる。この結果、他の菌の発育の多少にかかわらず、釣菌対象となる集落が限定され、その後の確認検査を効率良く行うことができ、菌数測定も極めて正確に行うことができる。また、実体顕微鏡を利用することから、培養 2 日目（30～35 時間程度）から特徴的な微小集落を確認できる場合がある。発育早期から高い確率でレジオネラ属菌の存在が確認できることは、定性的な判定日数を短縮できる可能性がある。特に行政検査で早期対応が必要な場合、斜光法とコロニーＰＣＲの組み合せによる対応が便利である。培養 2 日目以降、しばしば分離培地を観察することで、より正確に定性、定量結果を求めることができる。　**注 57、58**

注 57　分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別方法の有用性. 環境感染学会誌, 25:8-13, 2010.

注 58　実体顕微鏡での観察は、エアロゾルは発生しないため、安全キャビネットを必要としない。しかしながら、分離培地のフタを開けて集落の確認を行う場合には、空中落下細菌による汚染を十分に注意すること。また、顕微鏡を覗きながら分離培地を観やすい位置に動かす場合には、取り扱いに十分注意すること。

１）－２　器具及び器材

（１）実体顕微鏡：分離培地上の集落の観察に用いる。

（２）照明装置：斜光法に用いる。　**注 59**

（３）長波 UV ランプ：集落の自発蛍光の有無の観察に用いる。

注 59　実体顕微鏡での様々な観察に使用されている、観察対象に集光できるライトを使用する。ファイバーアームの照明であれば、斜光角度を自由に変更できるので便利である。また、光量調節が可能であれば、各検査者の見やすさに合わせて調節できるので便利である。

１）－３　操作

（１）見落としを防ぐために、分離培地を培養開始 3 日目から 7 日目まで毎日観察する

ことを推奨するが、培地上の他の雑菌等の発育状況に合わせ、検査者が見落としなく適切に観察できると判断可能であった場合には、適宜観察日程を調整する。平板上のレジオネラ属菌は 3 日目から観察しやすくなることが多いが、出現が遅い菌もあるので注意が必要である。　**注 60**

（2）培地上の集落の観察には斜光法を用いて、レジオネラ属菌の推定を行う。レジオネラ属菌を推定するには、発育集落に斜光を当て実体顕微鏡でモザイク・カットグラス様集落の確認を行い、その集落数を測定する。なお、斜光法は暗所で行うことを推奨する。　**注 61**

（3）暗所で UV ランプを用いて集落の自発蛍光の有無の観察を行う（図４）。　**注 62**

注 60　肉眼的には通常、培養 3～5 日で確認される集落が多い。肉眼的に 2 日目から観察できる集落はレジオネラ属菌ではない可　能性が高い。斜光法により培養 30～35 時間でレジオネラ様集落が確認できることもある。また、発育が遅いレジオネラ属菌に対しても、培養日数にかかわらず斜光法で発育初期に確認できる可能性が高く、見落としが減少する。

注 61　レジオネラ属菌とその他の菌を効率良く分別、釣菌することができ、菌数測定も簡便に極めて正確に行うことができる。なお、集落出現後、3 日目以降は、培養時間の経過とともに本特徴の確認が困難になる場合があるので注意する。斜光法は暗所で行うことで、集落の特徴が確認しやすい。

注 62　分離平板上の集落に対し本検査を行うことで自発蛍光を有する菌種群選定に役立つ。また本タイプのみが発育していた場合の見落としが減少する。

２．８　菌の鑑別・同定と計数　表１

本法では、斜光法で特徴的な集落が確認され、L-システインの要求性を有していたものをレジオネラ属菌とする。

１）－１　試薬

（１）BCYEα培地

（２）L-システイン不含 BCYEα寒天培地(血液寒天培地、トリプトソイ寒天培地でも可)

（３）市販抗血清・市販型別用ラテックス凝集試薬

１）－２　器具及び器材

（１）白金耳または白金線

（２）スライドグラス

１）－３　操作

（1）集落の観察とともに釣菌を行う。釣菌する集落数の目安は、培地上の集落数が 10 個以下の場合はすべてとし、それ以上の場合は培地 1 枚につき 10 個までとする。周

囲の夾雑菌と少しでも接触している可能性がある場合は、再分離し、純培養であることを確認してから、次の検査を実施する。

（２）釣菌した菌は、L-システイン不含 BCYEα寒天培地(血液寒天培地、トリプトソイ寒天培地でも可)と BCYEα寒天培地の双方に画線培養し、L-システイン要求性の確認を行う。 **注 63、64、65、66**

（３）BCYEα寒天培地に画線培養した菌は菌苔が観察されるまで培養し、鑑別・同定を行う。一般的には、培養 48 時間程度で十分な発育が確認される場合が多い。この時、L-システイン不含寒天培地には発育が認められず、BCYEα寒天培地のみに発育した菌をレジオネラ属菌とする。ただし、斜光法で観察を行っていない集落については、推定とする。 **注 67、68**

（４）市販の抗血清を用いてスライド凝集を行い、レジオネラ属菌の種の鑑別と血清群の決定を行う。 **注 69、70、71**

（５）各培地ごとにレジオネラ属菌と確定した集落に基づいてレジオネラ属菌集落数を決定し、各培地の中で最大集落数から菌数を算出し、報告する。 **注 72**

注 63 釣菌するタイミングは、培養 3 日目以降に毎日斜光法で集落の観察を行い、レジオネラ属菌と推定される集落や周辺の雑菌や真菌の発育に応じて適宜決める。

注 64 発育が遅いレジオネラ属菌もあるので、培養 3 日目以降斜光法で毎日観察して釣菌することで見落としが減少する。

注 65 釣菌した菌には検水ごとに適宜番号を振り、釣菌日、前処理法、分離した培地の種類、希釈した場合は希釈倍数、自発蛍光の有無等を記録する。

注 66 釣菌後の画線培養は、元々の分離培地由来の L-システインの持ち込みを防ぐため、まず、L-システイン不含寒天培地に、次いで BCYEα寒天培地に画線する。可能であれば、釣菌した集落を滅菌生理食塩水に懸濁後それぞれの平板培地に画線すると便利である。

注 67 レジオネラ属菌は、検水からの初期分離時は、肉眼的な確認まで往々に 3 日以上を有するが、釣菌後の培養は 2 日程度で十分な発育が確認されることが多い。

注 68 馬尿酸水解試験が鑑別法として実施される場合があるが、本法では必須検査としない。グラム染色については適宜対応する。

注 69 患者発生時の検査では必須検査とするが、一般的な浴槽水の自主検査においては、必須検査としない。

注 70 市販抗血清やラテックス凝集試薬は、限られた血清群にしか対応することができないため、本検査が陰性だったことをもってレジオネラ属菌を否定してはならない。また、不明瞭な凝集を示した場合には安易な判定をしないこと。

注 71 レジオネラ属菌鑑別用と *Legionella pneumophila* 鑑別用の PCR システムを用いることもできる。なお、PCR システムについては、国立感染症研究所発行の病原体検

出マニュアルを参照すること。

注 72 分離平板培地ごとに条件が異なるため、最も多く確認された条件の分離平板培地からの測定値を報告する。ISO 11731:1998（E）では、レジオネラ集落数（CFU）の推定は 3 枚（未・熱・酸処理）の平板（非濃縮を行った場合は 6 枚）から集落を同定した最大値数とする、としている。

２．９　迅速検査法

検体中のレジオネラ属菌由来の核酸（DNA、RNA）を定性的あるいは定量的に直接検出する迅速検査法は、培養法に比べ、検査に要する時間が大幅に短縮される。

リアルタイム PCR 法、LAMP（Loop-mediated isothermal amplification）法、PALSAR（Probe Alternation Link Self-Assembly Reaction)法等を利用した検出試薬キットが市販されている。それらは、レジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子あるいは 16S rRNA 等の配列特異性が高く多コピー存在する核酸を標的としている。 これら迅速検査法の特性は、生菌のみならず死菌であっても、該当するレジオネラ核酸を直ちに検出することである。**注 73**　このため、一般的には核酸検出法における陽性率の方が培養法より高い傾向にある。したがって、陽性結果のすべてが感染の危険性を示しているわけではない。ただし、水系にレジオネラ属菌核酸が存在することは、レジオネラ属菌を供給するバイオフィルムの存在を示唆しており、衛生管理上の注意が必要となる。

各反応系はそれぞれ特性があり、検出しない菌種や検出感度の低い菌種が存在することを理解した上で使用する。

１）－１　試薬

市販のレジオネラ属菌検出試薬キットを用いる。　**注 74**

１）－２　器具及び器材

キットの説明書にしたがって準備する。器具類はすべてディスポーザブルあるいは滅菌済みのものを使用する。コンタミネーション防止のために、ピペットチップはフィルター付きの製品を使用する。

１）－３　操作　注 75

（１）100 倍濃縮試料 1～4mL を検出試薬キットの説明書に従って再濃縮する。　**注 76**

（２）検出試薬キットの説明書に従って DNA あるいは RNA を抽出し、増幅反応を行う。常に陽性対照と陰性対照を用意し、反応が正常に進行していることを確認する。**注 77**

注 73　生菌を特異的に検出する方法もある。

注 74　論文等に記載のプライマー、プローブの自家調製も可能であるが、その場合検出感

度や検出精度を把握するための予備実験が不可欠である。

注 75 コンタミネーション防止のために、1. 反応試薬の調製、分注を行うエリア（検体および核酸を持ち込まない）、2. 検体の濃縮、核酸調製を行うエリア（検体を扱うため安全キャビネットが設置されていなければならない）、3. 陽性対照の調製、添加を行うエリアの 3 つに作業環境を分けることが望ましい。ピペット等もエリアごとに用意する。

注 76 試料の濃縮は培養試験法と共通化できる。

注 77 浴槽水には様々な泉質の湯水が用いられており、泉質によっては増幅反応阻害物質が含まれている場合がある。

3　精度管理

昨今のさまざまな試験検査においては、信頼性確保のための精度管理を実施することが求められている。このことは、レジオネラ属菌の検査についても同様である。精度管理には、検査施設内で完結させる内部精度管理と共通の試料を用いることによって他施設との比較が可能な外部精度管理に分けられる。各検査施設がこれら精度管理を実施することで、より適切な検査結果の保証に繋がることから、検査施設には積極的な対応が望まれ、検査依頼者もその依頼にあたっては、依頼施設が適切に精度管理を行っているかを確認することが望ましい。

図２　分離培地上の集落観察
（北海道立衛生研究所　森本　洋氏・提供）

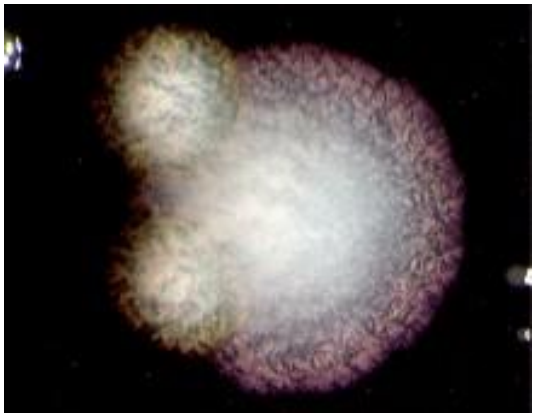


図３　１個の大きな *L. pneumophila*
血清群１と２個の *L. cherrii*
（北海道立衛生研究所　森本　洋氏・提供）

図４　同じ分離培地での可視光と長波長紫外光による観察
（北海道立衛生研究所　森本　洋氏・提供）

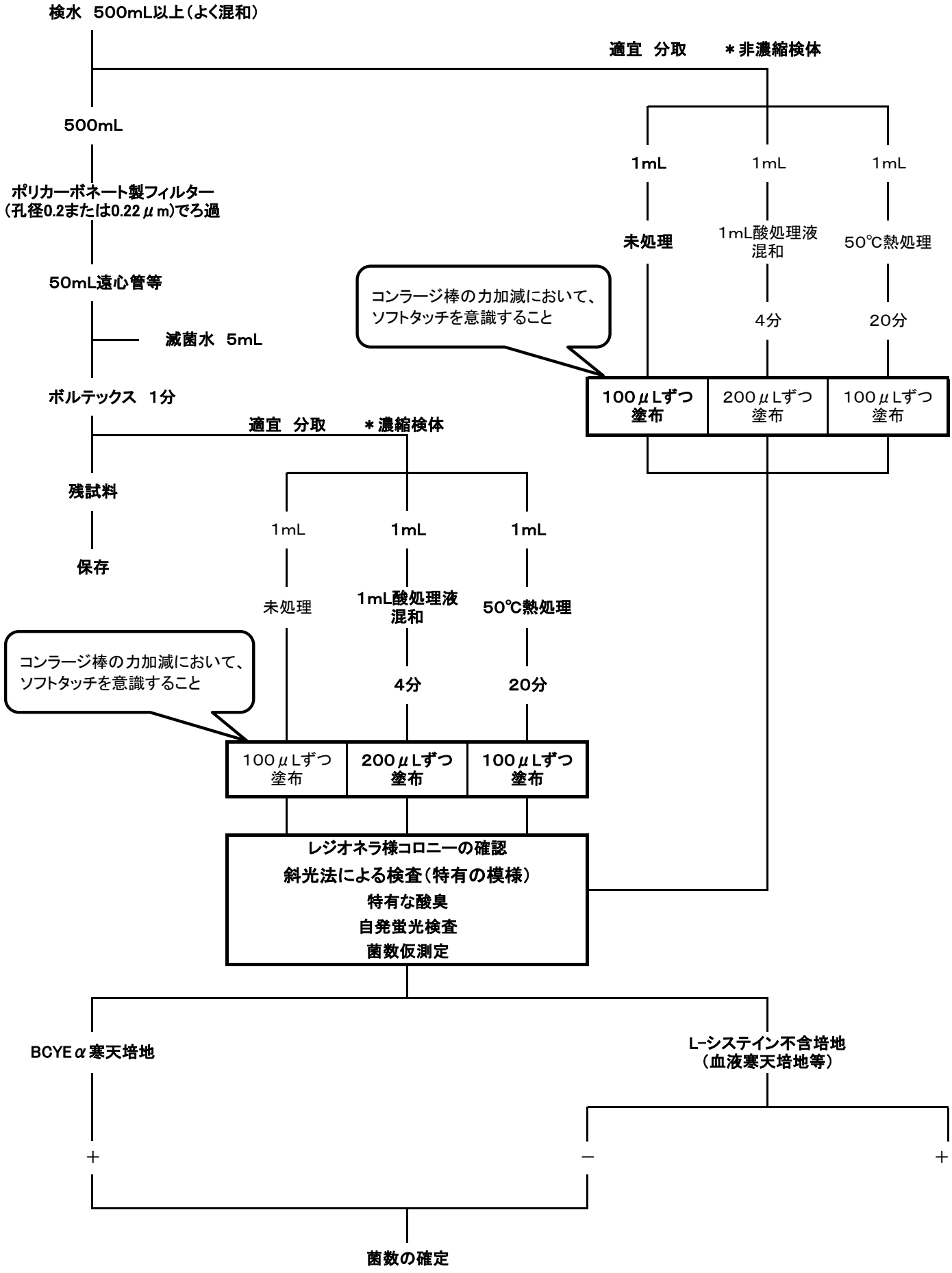


図1　検査フローチャート

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）
公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究
研究代表者：前川純子　国立感染症研究所 細菌第一部

平成 30 年度　分担研究報告書

レジオネラ属菌検査研修会の開催について

研究分担者　○長岡宏美　静岡県環境衛生科学研究所　微生物部
研究協力者　漆畑　健　静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
森川正浩　静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
稲葉尋高　静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課

（研究要旨）
レジオネラ属菌の検査を行っている検査機関を対象にレジオネラ属菌同定法について研修会を開催した。参加者は検査機関 15 機関 25 名、静岡県内の保健所（静岡市及び浜松市を含む）23 名であった。
研修は、講義と実習の二部構成で行った。
また、各検査機関が実施している検査方法を把握するため、事前アンケートを実施した。
講義では、検査についての解説のほか、静岡県行政担当による「静岡県のレジオネラ防止対策についての取組み」の解説の時間を設けた。また、麻布大学古畑勝則教授による「レジオネラ属菌の細菌学的特徴と汚染対策」と題した特別講演を行った。
実習では、検体の前処理方法、接種、同定方法、遺伝子検査法についての研修を行った。
事後アンケートでの参加者の評価は良好で、来年度以降も開催を望む意見が多かった。

Ａ．研究目的

入浴施設のレジオネラ防止対策において最も重要なのは自主管理であり、自主管理は日常のレジオネラ検査がベースとなっている。すなわち、自主検査のレベルアップが自主管理の向上につながっていくことになる。しかし、現状では検査法が多様であることから、検出率は検査機関によって大きな差が生じているのが実情である。そこで、検査方法の違いによる問題点の認識を共有するとともに、検体採取から同定・定量に至る検査技術の標準化を図るため研修会を開催した。

Ｂ．研修内容

１．研修対象

静岡県内の保健所に提出されるレジオネラ属菌の自主検査結果にて確認できる検査機関を調査し、県内検査機関の概要を把握した。

研修会の開催はホームページに掲載し参加希望機関を公募した。また、県内保健所に対しても開催を案内し参加を募った。

２．研修参加機関

検査機関 15 機関 25 名、静岡県内の保健所等行政関係職員（静岡市及び浜松市を含む）23 名が参加した。なお、参加者には実施している検査方法について事前アンケートを行った。

３．研修内容（資料１及び２）

①講義　（４時間）

健康福祉部生活衛生局の行政担当からレジオネラ防止対策について、汚染事例を例に挙

げて解説を行った。

続いて、感染研で開催された「レジオネラ感染リスクシンポジウム」の伝達講習、レジオネラ検査の現状と静岡県環境衛生科学研究所のSOPに基づく検査方法について解説した。
さらに、「レジオネラ対策について～現場からの報告～」と題し保健所担当職員が実際の指導状況等について事例紹介を含め解説した。

今回は、「レジオネラ属菌の細菌学的特徴と汚染対策」と題し麻布大学古畑勝則教授による特別講演を行った。

②実習（1日）

実習はバイオハザード区域で行うため、最初に、バイオセーフティー講義を行った後に、検体の前処理、同定方法及び遺伝子検査について実習した。

・ 検体の前処理及び前処理

濃縮ろ過法、酸処理、熱処理の３法をデモンストレーション後に研修生が実習した。それぞれの検体は、GVPC培地に塗抹した。

・ 同定方法

あらかじめ準備したレジオネラ属菌を塗抹したGVPC培地で、典型コロニーを観察した。

また、斜光観察を行い、レジオネラ属菌と他の菌との違いを観察した。

鑑別培地への塗抹を実習し、あらかじめ準備した鑑別培地でシステイン要求性の違いによるレジオネラ属菌の同定方法を実習した。

レジオネラ属菌と同定された株について、ラテックス凝集反応による血清型別試験を実習した。

また、昨年度希望の多かったPCRについても実習を行った。

４．アンケート結果

参加した 13 の検査機関に対し、検体の採取、濃縮、前処理、培養、同定、検体数について事前アンケートを行った。

アンケート項目及び結果を資料３に示した。検体採取では90%がチオ硫酸ナトリウム処理を行っていた。また81.8%が検体を濃縮しており、うち60%がろ過濃縮法を行っていた。前処理は酸処理を採用している機関が54.4%と最も多く、酸処理と熱処理を併用している機関が 36.4%であった。同定では、30％が斜光観察を実施していた。また、77.8%が L-システイン要求性を鑑別項目とし、44.4%の機関が抗血清による同定をあわせて実施していた。また、遺伝子検査は87.5%の機関が実施していなかった。

今回のアンケート結果から、検査機関ごとに実施している方法は様々であることが改めて確認された。

Ｃ．考察

事後アンケートの結果、研修は概ね好評であった。すべての参加者が次年度の開催を希望しており、検査技術レベルを維持するためにも、研修は必要であると思われた。

事前の各機関で実施している検査法に関するアンケート結果から、レジオネラ属菌の検査方法は機関ごとに大きく異なっており、これがレジオネラ属菌の検査結果に差異を生じる原因の一つであると考えられた。今回の研修会では、静岡県環境衛生科学研究所のSOP に基づく検査法により研修を実施したが、斜光観察法は安価な機材を準備するだけで実施可能であり、同定に際しての形態観察には大変有用であるため導入を検討したいとする機関が多かった。しかし、今後も研修を継続して実施するにあたっては、標準的検査法を示すことが不可欠である。現在のレジオネラ症防止指針に準拠するのか、ISO に準ずる方法を取り入れるかなど早急に検討すべき課題であると思われる。研修の成果を検討するには精度管理体制の構築も不可欠であり、標準検査法の確立と精度管理体制の構築を進めることが、検査精度向上のために重要であることが示唆された。

【資料１】平成 30 年度レジオネラ属菌検査研修会（講義）次第

平成 30 年度　レジオネラ属菌検査研修会（講義）

日　時：平成 30 年 11 月 22 日（木）　13：00～17：00
場　所：静岡県環境衛生科学研究所　別館会議室

－研修次第－

13：00～	受　付
13：10～13：15	開　会（挨　拶） 健康福祉部生活衛生局　衛生課技監兼課長代理　漆畑　健
13：15～13：30	静岡県のレジオネラ防止対策についての取組み 健康福祉部生活衛生局衛生課　生活衛生班　稲葉尋高
13：30～13：45	「レジオネラ感染リスク　シンポジウム」伝達講習 環境衛生科学研究所微生物部　神田　隆
13：45～14：00	レジオネラ属菌の検査方法について 環境衛生科学研究所微生物部　細菌班　村田学博
14：00～14：15	レジオネラ属菌の分子疫学解析について 環境衛生科学研究所微生物部　細菌班　水本嗣郎
14：15～14：35	レジオネラ対策について～現場からの報告～ 熱海健康福祉センター　衛生薬務課　望月秀章
14：35～14：50	質　疑
14：50～15：00	休　憩
15：00～16：30	【特別講演】 レジオネラ属菌の細菌学的特徴と汚染対策 麻布大学大学院教授　古畑勝則先生
16：30～16：50	質　疑
16：50～17：00	事務連絡
17：00	閉　会

【資料　２】平成 30 年度レジオネラ属菌検査研修会（実習）次第

レジオネラ属菌検査技術研修会（実習）

平成 30 年 11 月 27 日、29 日

10:00～10:05　受付
10:05～10:15　バイオハザード講義
10:15～10:30　SOP 解説
10:30～10:40　PCR 説明
10:40～11:40　PCR　DNA 抽出（1 班 1 株）
　　Mixture
　　サーマルサイクラーへ
11:40～12:00　フィルターろ過（デモのみ）
12:00～13:00　　昼　　食
13:00～14:20　　遠心法
　各処理法の説明　　酸処理、熱処理、コンラージ
14:20～14:40　　PCR 産物　ゲルにアプライ⇒泳動
14:40～15:00　　斜光観察、鑑別培地
15:00～15:10　　休　　憩
15:10～15:20　　ゲル染色
15:20～16:00　　血清型
16:00～16:30　　PCR　写真
16:30～16:45　　まとめ
16:45～16:55　　質疑
16:55～17:00　　終了挨拶

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大屋日登美、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、古川一郎、前川純子、倉文明、泉山信司、黒木俊郎	**医療機関の給水設備におけるレジオネラ属菌の汚染実態**	**日本感染症学雑誌**	92(5)	678-685	2018
Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani J, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M, the Working Group for *Legionella* in Japan	*Legionella pneumophila* and other *Legionella* species from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016.	Appl Environmental Microbiol.	84(18)	pii: e00721-18	2018
倉 文明	**講座　環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御　3. レジオネラ症の国内外の動向**	**防菌防黴誌**	46(8)	365-76	2018
前川純子	**講座　環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御　7. レジオネラ属菌の同定法とSBT** (Sequence-Based Typing)	**防菌防黴誌**	47(1)	29-35	2019
杉山寛治	**講座　環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御　8. 浴槽のレジオネラ対策 ① 浴槽のどこで，どのように増えるのか**	**防菌防黴誌**	47(2)	83-89	2019
杉山寛治	**講座　環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御　8. 浴槽のレジオネラ対策 ② 浴槽水の各種消毒方法の効果**	**防菌防黴誌**	47(3)	117-123	2019

国立保健医療科学院長　殿

平成31年4月4日
機関名　国立感染症研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　脇田　隆字

次の職員の平成３０年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）細菌第一部・主任研究官

（氏名・フリガナ）前川　純子・マエカワ　ジュンコ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 ■　無 □（有の場合はその内容：当該企業と共同研究契約・秘密保持契約を締結し、研究方法を共有、研究情報予備技術を供与していること、および、当該企業からの所外研究員の受け入れにについて、研究分担者と情報を共有し、報告書作成及び論文掲載に当たっては、当該企業の研究参加者を明示すること）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月4日

国立保健医療科学院長　殿

機関名　国立感染症研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　脇田　隆字　印

次の職員の平成３０年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）　寄生動物部・主任研究官

（氏名・フリガナ）　八木田　健司・ヤギタ　ケンジ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□ ■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□ ■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□ ■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□ ■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□ ■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月4日

国立保健医療科学院長　殿

機関名　国立感染症研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　脇田　隆字

次の職員の平成３０年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）　国立感染症研究所寄生動物部・主任研究官

（氏名・フリガナ）　泉山信司・イズミヤマシンジ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 ■　無 □（有の場合はその内容：企業との共同研究契約、研究情報の共有協力、予備技術の供与について、企業名と研究情報を研究班の中で共有すること。当該企業との秘密保持について、企業名と研究情報を研究班の中で共有すること。研究班の報告書や論文に、企業の研究参加者を明示すること。）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。　・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月19日

国立保健医療科学院長　殿

機関名　大分県衛生環境研究センター

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　森下　昌勅　印

次の職員の平成３０年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）　微生物担当　主任研究員

（氏名・フリガナ）　佐々木　麻里　（ササキ　マリ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 □　無 ■（無の場合はその理由：研究管理に対する人的、予算的な措置が無く、体制整備が遅れているため。　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 □　無 ■（無の場合は委託先機関：国立感染症研究所　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 ■　無 □（有の場合はその内容：当該企業と共同研究契約を締結、研究情報を共有、協力又は研究情報予備技術を供与していることについて、その企業名及び研究概要に関する情報を研究班の中で最低限、分担研究者と共有すること。）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年　3月　　1日

国立保健医療科学院長　殿

機関名　　神戸市環境保健研究所

所属研究機関長　職　名　　所長

氏　名　　飯島義雄

次の職員の平成３０年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）　神戸市環境保健研究所感染症部・研究員

（氏名・フリガナ）　中西典子・ナカニシノリコ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□	☑	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□	☑	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□	☑	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□	☑	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□	☑	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☑　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年　3月　29日

国立保健医療科学院長　殿

機関名　長崎県環境保健研究センター

所属研究機関長　職　名　所　長

氏　名　古賀　浩光　　印

長崎県環境保健研究センター所長印

次の職員の平成３０年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）　長崎県環境保健研究センター　保健衛生研究部　保健科　科長

（氏名・フリガナ）　田栗 利紹　（タグリ　トシツグ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 □　無 ■（無の場合はその理由：現在策定中で平成 30 年度内完了予定）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 □　無 ■（無の場合は委託先機関：国立感染症研究所　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 ■　無 □（有の場合はその内容：研究代表者及び分担者間での情報共有）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成３１年3月２９日

国立保健医療科学院長　殿

機関名　北海道立衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　森　昭久　印

次の職員の平成３０年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）感染症部細菌グループ　主幹

（氏名・フリガナ）森本　洋　（モリモト　ヨウ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□	■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□	■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□	■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□	■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□	■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年４月19日

国立保健医療科学院長　殿

機関名　静岡県環境衛生科学研究所

所属研究機関長　職　名　所　長

氏　名　神　山　正　之　印

次の職員の平成３０年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）　微生物部細菌班　班長

（氏名・フリガナ）　長岡（ナガオカ）　宏美（ヒロミ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□　☑	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　☑	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　☑	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　☑	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□　☑	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☑　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

31年　4月　9日

国立保健医療科学院長　殿

機関名　富山県衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　大石　和徳　印

次の職員の平成３０年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）　富山県衛生研究所細菌部・部長

（氏名・フリガナ）　磯部順子（いそべじゅんこ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成３１年４月１日

国立保健医療科学院長　殿

機関名　岡山理科大学

所属研究機関長　職　名　学長

氏　名　柳澤　　康信　印

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　健康安全・危機管理対策総合研究事業

２．研究課題名　公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

３．研究者名　（所属部局・職名）　獣医学部・教授

（氏名・フリガナ）　黒木　俊郎　・　クロキ　トシロウ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有　無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。