
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

公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する
検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 前川 純子

令和 2 (2020) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告

公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究-----	1
前川純子	

II. 分担研究報告

1. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発-----	12
金谷潤一、磯部順子、山口友美、淀谷雄亮、中筋 愛、吉崎美和、塩崎晋啓、水谷幸仁、小澤賢介	
2. 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT法の有効性の検討-----	22
淀谷雄亮、佐々木麻里、田栗利紹、緒方喜久代、湯澤栄子、増輪文治、田中奈緒美	
3. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT法の評価、 比色系パルサー法の検討-----	27
佐々木麻里、神田由子、溝腰朗人、成松浩志、江川英明、緒方喜久代	
4. 公衆浴場等のイベント風呂で使われる柑橘系果物の清浄度試験の結果について-----	33
中臣昌広、井上浩章	
5. 携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化-----	37
田栗利紹、中西典子、倉 文明、田中 忍、平塚貴大、井上浩章、縣 邦雄、蔡 国喜、増輪文治	
6. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析-----	69
中西典子、野本竜平、田中 忍	
7. 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-----	78
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	
8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成-----	88
黒木俊郎、佐々木麻里、森本 洋、金谷潤一、中西典子、田栗利紹、大森恵梨子、中臣昌広、 大屋日登美、陳内理生、中嶋直樹、磯部順子、平塚貴大、烏谷竜哉、浅野由紀子、緒方喜久代、 倉 文明、前川純子	
9. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み-----	115
森本 洋、金谷 潤一、佐々木麻里、中西典子、磯部順子、大森恵梨子、大屋日登美、 緒方喜久代、小川恵子、倉 文明、平塚貴大、三津橋和也、吉野修司、前川純子	
10. モノクロラミン消毒を導入した循環式浴槽を洗浄する必要性-----	150
泉山信司、長岡宏美、柳本恵太、山上隆也、植松香星、久田美子、森 康則、赤地重宏、 永井佑樹、枝川亜希子、山本哲司、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、茶山忠久、藤井 明、 斎藤利明、小阪浩司	

研究要旨：公衆浴場のレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等について、効果的な手法の検討を行った。

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水等 149 検体中 34 検体 (22.8%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。シャワー・カラン水について見ると、14.3% (5/35 検体) が 1,000 CFU/100 ml 以上の菌数であった。滞留水において、塩素濃度及び温度が低下し、生物膜が形成されることが原因の一部であると推測される。エアロゾルが発生しやすいシャワー水の衛生管理の重要性について、改めて周知の必要性が示された。令和元年 9 月に通知された「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」の妥当性を検証し、非濃縮検体検査の併用実施は有用であることが示された。平易な培養法である *Legionella pneumophila* を検出するレジオラート/QT 法を検討したところ、浴槽水の培養では、従来の平板培養法と相関のある結果が得られた。平板培養法で *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が検出された蛇口水では陰性となった。入浴施設のイベント風呂に用いられることがある柑橘系果物を実験的に浴槽に投入し、経時的に微生物検査を行ったところ、投入前に用具を用いた物理的洗浄が有効であることが示された。

迅速検査法である比色系パルサー法については現場で行えるように方法の改良を行い、実践した。携帯型フローサイトメーターを使用したレジオネラリスク評価法については、標準作業書・ワークシート作成を行い、複数の協力機関で実施した。モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、DNA を抽出せずに浴用水の濃縮液をそのまま qPCR 反応に用いると感度が低下したため、現場で行えるような工程の工夫が求められる。

分子疫学的手法としての MLVA と SBT は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していることが示され、利便性の高い MLVA は菌株のスクリーニングに有用であると考えられた。

令和元年 9 月に改正された「公衆浴場における衛生等管理要領」に基づき、指導及び衛生管理実施の現場において利用できるように具体的な作業手順等を示した「入浴施設の衛生管理ガイドライン」並びに、毎年のように発生している入浴施設が関連するレジオネラ症集団感染事例における一連の患者調査及び環境調査を適切に実施するための「集団発生時調査ガイドライン」作成の 2 つのワーキンググループを立ち上げ、ガイドラインを作成した。

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。アンケート調査や直接の技術指導により、より一層の改善、安定化を目指している。

高 pH の温泉水を循環利用している 2 箇所の営業施設で、モノクロラミン消毒を行った。モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の制御に有用だが、従属栄養細菌数が増加する問題が再現され、循環式浴槽には、より強力な洗浄・消毒が必要と考えられた。

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
 金谷潤一・富山県衛生研究所主任研究員
 黒木俊郎・岡山理科大学教授
 佐々木麻里・大分県衛生環境研究センター
 主任研究員
 田栗利紹・長崎県環境保健研究センター科長
 長岡宏美・静岡県環境衛生科学研究所部長
 中西典子・神戸市環境保健研究所研究員
 森本 洋・北海道立衛生研究所主幹

における衛生等管理要領等」が改正され、また、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」の通知（薬生衛発 0919 第 1 号）が出されたのは、前研究班（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）を初めとするこれまでのレジオネラ研究班の成果によるものである。本研究班は改正された衛生等管理要領をより実効あるものにするために研究を遂行する（図 1）。

A. 研究目的

公衆浴場のレジオネラ症対策の向上のためには適切な衛生管理が要求される。そのための消毒法等の開発・評価およびレジオネラ検査法の改善・普及等を行う。令和元年 9 月に「公衆浴場に

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。各研究項目の研究方法を以下に記す。

1. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

3 か所の地方衛生研究所において、令和元年度

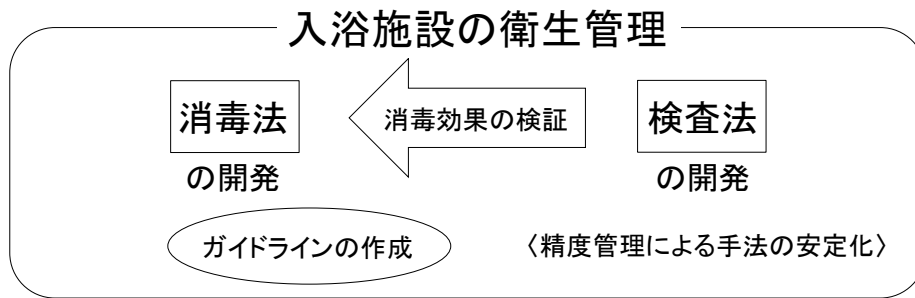


図1 本研究班の研究の流れ

表1

研究協力者一覧

赤地重宏	三重県保健環境研究所	小坂浩司	国立保健医療科学院	久田美子	山梨県衛生環境研究所
縣 邦雄	アクアス株式会社	蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所	斎藤利明	株式会社ヤマト	藤井 明	株式会社ヘルスビューティ
磯部順子	富山県衛生研究所	茶山忠久	ケイ・アイ化成株式会社	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	塩崎晋啓	日本板硝子株式会社	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
井上浩章	アクアス株式会社	陳内理生	神奈川県衛生研究所	溝腰朗人	大分県衛生環境研究センター
植松香星	山梨県衛生環境研究所	杉山寛治	株式会社マルマ	水谷幸仁	日本板硝子株式会社
江川英明	大分県南部保健所	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
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	高橋直人	静岡市環境保健研究所	三津橋和也	北海道立衛生研究所
大越 魁	静岡県環境衛生科学研究所	田中 忍	神戸市環境保健研究所	森 康則	三重県保健環境研究所
大森恵梨子	仙台市衛生研究所	田中奈緒美	アイデックスラボラトリーズ株式会社	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	田中慶郎	株式会社マルマ	山上隆也	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	永井佑樹	三重県保健環境研究所	山口友美	宮城県保健環境センター
小川恵子	北海道立衛生研究所	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
小澤賢介	デンカ株式会社	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
鳥谷竜哉	愛媛県今治保健所	中臣昌広	日本環境衛生センター	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
神田由子	大分県衛生環境研究センター	成松浩志	大分県衛生環境研究センター	湯澤栄子	川崎市健康安全研究所
倉 文明	国立感染症研究所	野本竜平	神戸市環境保健研究所	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所

に浴用施設などから 149 検体(浴槽水:104 検体、シャワー水:19 検体、カラン水:16 検体、採暖槽水:10 検体)を採取した。平板培養法は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法(以下、標準法)」に準じて各機関の方法で実施し、10 CFU/100 ml 以上を検出とした。

LAMP 法は Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) を用いて、取扱説明書に従い実施した。LC EMA-qPCR 法は、使用する各種試薬の取扱説明書に従い実施し、定量値 1 CFU 相当/100 ml 以上を陽性と判定した。モバイル qPCR は、KAPA3G Plant PCR Kit (KAPA) を用いて、モバイル qPCR 装置 Picogene PCR1100 (日本板硝子) により実施した。

Legionella pneumophila の血清群 1~3 を対象とした選択的濃縮を行う免疫磁気ビーズ (Lp-IMB) の回収率の検討には、培養菌株を用いて、デンカ生研調製ビーズ、および市販ビーズ粒子 (Dynabeads™ M-280 Sheep anti-Rabbit IgG) をレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) で感作した自家調製ビーズによる添加回収実験を行った。実検体については、*L. pneumophila* 血清群 1 を回収対象とし、どちらかのビーズを用いて、平板培養法と比較した。

2. 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT 法の有効性の検討

レジオラート/QT 法は、公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 138 検体を対象とし、*L. pneumophila* を特異的に検出する特定酵素基質培地レジオラートと専用トレイの Quanti-Tray/Legiolert (いずれも IDEXX) を用い、添付の取扱説明書に示された飲料水用 10mL プロトコールに従って測定した。本法の検出限界は 10MPN/100mL である。同時に各検査機関の方法で平板培養法にてレジオネラ属菌の分離を実施した。それに先立ち、BCYE α 寒天培地に塗布し増菌した *L. pneumophila* SGUT の菌株について、滅菌水で 10 倍ごとの希釈系列を作成し、平板培養法及びレジオラート/QT 法を行った。

3. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT 法の評価、比色系パルサー法の検討

令和元年 5 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水 24 施設分 45 検体を対象とし、前述のレジオラート/QT 法ならびに標準法あるいは大分県衛生環境研究センターの従来法(以下、大分法)で平板培養を実施した。大分法では、熱処理濃縮試料および未加熱濃縮試料を 10 倍および 100 倍希釈し、3 段階希釈試料 200 μ L それぞれを WYO α 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) 各 1 枚に塗布した。標準法では、酸処理濃縮試料 200 μ L、熱処理濃縮試料 100 μ L、濃縮処理を行わない検体 200 μ L を各分離平板 1 枚に塗布した。

比色系パルサー法については、令和元年 8 月に搬入された非濃縮検体 17 検体 100 mL あるいは 200 mL を 2 種類の孔径のセルロース混合エステルフィルター (Merck 社、0.22 μ m および 0.45 μ m) を用いてそれぞれろ過後、フィルターを移したチューブに、希釈した変性液を加えて直接 1000 倍濃縮溶菌液を調製し、レジオネラ属菌迅速検査キット (ファスマック) を用いて添付の取扱説明書に従って実施した。それらとは別に採水した浴槽水および湯口水計 4 検体 (各 100 mL) について、保健所で環境衛生監視員が上述の方法 (フィルター孔径は 0.45 μ m) で比色系パルサー法を実施した。

4. 公衆浴場等のイベント風呂で使われる柑橘系果物の清浄度試験の結果について

甘夏みかんを複数の方法 (中性洗剤でスポンジ洗い、水道水で手こすり洗い、歯ブラシによるこすり洗い、タワシによるこすり洗い) で洗浄した後、それぞれ自宅の浴槽に浮かべ、表面の微生物汚染度の経時変化をみた。前もって表面に縦に 4 分割の印を付けておき、洗浄前、洗浄後、浴槽投入 1 日後、浴槽投入 2 日後に、それぞれ 4 分割面から一定面積を拭き取り、ATP 値 (ルミテスター PD-30) および一般細菌数 (標準寒天培地で 37°C、24h)、従属栄養細菌数 (R2A 培地で 20°C、7d)、真菌数 (PDA 培地で 25°C、7d) を測定した。比較試験として未洗浄の甘夏みかんを湯を張ったバケツに投入し、投入前、バケツ投入 1 日後、バケツ投入 2 日後に同様に測定した。

5. 携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化

フローサイトメーターminiPOC（シスメックスパルテック社）を使用したレジオネラリスク評価法（RDM）の標準化のため、大腸菌およびレジオネラ属菌株を用いた菌量調整済み模擬試料の作製方法、添加回収実験、実際の検査についての標準作業書およびワークシートを作成し、2施設の地方衛生研究所と1施設の民間研究所の4名に技術研修を実施した。2施設に各種模擬試料および試薬等を配布して、回収実験を実施した。1施設で、34検体の循環ろ過式浴槽水を採水し、培養検査を行うとともに、14検体は当該施設でRDMを実施し、20検体は長崎県環境保健研究センターに冷蔵郵送し、RDMを実施した。

6. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

国内で分離されたSTが一致してMLVA型が異なる、あるいはMLVA型が一致してSTが異なる28株の*L. pneumophila* 菌株を用いた。MLVA型あるいはST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。QIAseqFX(QIAGEN)で調製した菌株DNAライブラリからMiseq regent Kit v.3によりリードデータを取得し、A5-Miseqでアセンブリし、PROKKAでアノテーションを行った。全ゲノム配列による系統解析にはkSNP3を用いた。

7. 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、微生物検査（レジオネラ属菌、従属栄養細菌、一般細菌数）を行った。分離されたレジオネラ属菌はPCR法およびレジオネラ免疫血清により同定した。検水のLAMP法、レジオラート/QT法も併せて実施した。

8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成

「入浴施設における衛生管理ガイドライン」及

び「公衆浴場等入浴施設を原因とするレジオネラ症集団発生時調査ガイドライン」を作成するために、研究班の分担研究者及び研究協力者で構成する2つのワーキンググループを形成し、検討した。衛生管理ガイドラインの総合衛生管理のパートは、平成16～18年度厚生労働科学研究費補助金健康総合科学研究事業「循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」の分担研究報告書「HACCPシステムの導入を伴う循環式浴槽の管理について」並びに米国CDCが発行した”Toolkit: developing a water management program to reduce *Legionella* growth and spread in buildings”を参考にした。一般的衛生管理のパートは、「公衆浴場における衛生等管理要領」及び「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」に基づいて、衛生管理方法の検討を行い、その内容を記載した。集団発生時調査ガイドライン案は、大分県においてレジオネラ症に関する調査に用いられている対応要領等、腸管出血性大腸菌感染症等に対する調査マニュアル、「入浴施設におけるレジオネラ症防止のための日常的な維持管理指針」（平成26年3月第2版発行；NPO法人入浴施設衛生管理推進協議会、大分県監修）、「レジオネラ症防止指針 第4版」（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター）等を参考に検討した。

9. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

外部精度管理は、実施母体を日水製薬株式会社とし、レジオネラ属菌配付試料として、シスメックス・ビオメリュー社のBioBall（特注品）を使用し、全国161の検査機関（延べ164試料配付）が参加した。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

600~15,000 CFU/100 mLと設定した。濃縮検体については、良好範囲を回収率により判定した。目標回収率は、20%以上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73機関については、独自に集計・解析を実施し、過去の結果と比較した。

地方衛生研究所レジオネラ・レファレンスセンターを通じ、昨年度の精度管理サーベイに参加した施設に対し、アンケート調査を実施した。

10. モノクロラミン消毒を導入した循環式浴槽を洗浄する必要性

温泉水（pH9.5あるいはpH10.0）を循環利用している2箇所の入浴施設で、モノクロラミン消毒を行い、洗浄、消毒、換水をしながら6~7週間の試験を行った。入浴中のモノクロラミン濃度は、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）により測定し、3~6 mg/Lとなるよう、設定・調整した。週に1~3回の完全換水と浴槽の清掃、ろ過器の10~30分間の逆洗、10~20 mg/Lの高濃度消毒を行った。各種微生物試験は、定法に従い実施した。（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、個人情報保護に十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. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

149検体中、34検体（22.8%）から10 CFU/100 ml以上のレジオネラ属菌が検出された。*L. pneumophila* 血清群6が20/34検体（58.8%）から分離され、最も多かった。シャワー・カラん水について見ると、14.3%（5/35検体）が1,000 CFU/100 ml以上の菌数であった。

LC EMA-qPCR法では、カラムを使用した新たな簡易抽出法（Lysis Buffer for *Legionella* Type2）を用いた場合においても、平板培養法に

対する感度などは、従来の簡易抽出法（Lysis Buffer for *Legionella*）と同等の結果であった。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、浴水の濃縮液をそのまま qPCR 反応に用いた場合、平板培養法に対する感度は、抽出した DNA を鋳型とした場合よりも優位に低かった（ $P < 0.05$ ）。各抽出法のコピー数を qPCR 法のコピー数と比較した結果においても、濃縮液を qPCR 反応に用いた場合は、全体的に定量値が低かった。

水検体における免疫磁気ビーズ（IMB）を用いた選択的濃縮法の検討の結果は、自家調製した IMB は、デンカ生研で調製した IMB に比べ、濃縮分離の性能はかなり劣っていた。

2. 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT法の有効性の検討

BCYE α 寒天培地に塗布し増菌した *L. pneumophila* SGUT の菌株を滅菌水で10倍ごとに希釈系列を作成し、レジオラート/QT法を行ったところ、概ね10倍ごと段階的に減少していき、同時に実施した平板培養法とほぼ同等の検出菌量を示した。

温泉水、浴槽水等計138検体についてレジオラート/QT法を実施したところ、平板培養法と比較したレジオラート/QT法の感度は75.6%、特異度81.7%であり、結果一致率は79.7%であった。結果が不一致であったものは28検体あり、比較的検出菌量の少ない検体が多かった。レジオラート/QT法のみ検出であった17検体について、陽性となったウェルの液体培地からレジオネラ属菌の分離を試みたところ、14検体で *L. pneumophila* が検出されたが、3検体についてはレジオネラ属菌が分離できなかった。レジオラート/QT法及び平板培養法ともに検出となった34検体について検出菌量の比較を行ったところ、レジオラート/QT法の方が検出菌量の多い傾向があるものの回帰直線の R^2 は0.778であり、強い相関が認められた。

3. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT法の評価、比色系パルサー法の検討

45検体中、大分法では25検体（5~44,500 CFU/100 mL）、標準法では22検体（10~31,500

CFU/100 mL) からレジオネラ属菌が検出された。レジオラート/QT 法では、45 検体中 17 検体から 10~22,726 MPN/100 mL の *L. pneumophila* が検出された。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.8553$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8607$ (標準法で検出不能となった 1 検体のデータを除く) であった。平板培養法とレジオラート/QT 法との菌数の相関は大分法で $R^2=0.8712$ 、標準法で $R^2=0.7844$ であった。

比色系パルサー法については、使用したセルロース混合エステルフィルターの孔径が 0.45 μm (14/17 検体が陽性) でも、0.22 μm (12/17 検体が陽性) と同等以上の結果となった。保健所で実施した 4 検体は 2 検体が陽性となった。

4. 公衆浴場等のイベント風呂で使われる柑橘系果物の清浄度試験の結果について

未洗浄の甘夏みかんは 1 日後に表面の微生物数が増加したが、2 日後には減少した。水道水での手こすり洗いにより表面の微生物数は一律減少したが、浴槽の湯に浸けて 1 日後には細菌数は増加し、2 日後には大きく減少した。中性洗剤でスポンジ洗い、歯ブラシによるこすり洗い、タワシによるこすり洗いは、いずれも表面を洗った後の微生物量は減少傾向にあり、1 日後、2 日後にさらに減少し、歯ブラシとタワシのこすり洗いでは、2 日後により減少した。

5. 携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化

協力機関の全体の回収率は大腸菌で 70%~90%、*L. pneumophila* で 70%~130% であった。一つの協力機関の現地調査において、浴槽水 34 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 85.7%、特異度は 96.3% を示した。供試試料の LP 数の定量性について、RDM 法は培養法との間に相関は認められなかったが ($R^2 = 0.0104$)、定性的には妥当な成績を示した。

6. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

公開されている配列情報から 7 遺伝子 (*flaA*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) の SBT

データベースを作成した。そのデータベースに対して、Miseq で得られたリードデータを、SRST2 を用いてマッピングを行い、得られたアシルプロファイルを既知の ST データベースと照合し、ST を決定するパイプラインをおおむね構築した。

ST が一致して MLVA 型が異なる菌株、あるいは MLVA 型が一致して ST が異なる菌株のコアゲノム SNPs の系統解析を行ったところ、MST で示される MLVA 型あるいは ST による株間の類縁関係は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していた。

7. 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

入浴施設の浴槽水、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 試料のうち、2 つの初流水のカラン水試料および 3 分間流水後採取したカラン水試料からレジオネラ属菌が検出された。

3 医療機関において給水・給湯系からレジオネラ属菌が検出された。全機関で受水槽に次亜塩素酸ナトリウムを独自に添加し、給水系の遊離残留塩素濃度を高くして管理していたが、蛇口の初流水の塩素濃度が低い試料があり、レジオネラ属菌の検出と関連していた。医療機関の給水系の蛇口水 32 試料 (培養法では 17 試料から最高 10^4 CFU/100 mL の *Legionella feeleii* SG1、*Legionella anisa* 及び *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が検出、4 試料からは 10~20 CFU/100ml の *L. pneumophila* が検出) を用いてレジオラート/QT 法を行ったが全て陰性であった。

8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成

総合衛生管理と一般的衛生管理の 2 つのパートで構成されている衛生管理ガイドライン案を作成した。総合衛生管理のパートは今年度は検討中のため、概要のみを示した。

集団発生時調査ガイドライン案を作成した。集団発生であっても第一報は散发例と区別できないことが多いため、集団発生時調査ガイドライン案は感染症法に基づく届出の受理から開始し、患者の調査方法についても記述することにした。施

設から分離されたレジオネラ属菌と患者から分離されたレジオネラ属菌の異同は、原因究明のための大きな情報となるので、患者由来株の収集についての手法についても併せて記述した。施設の調査及び施設のレジオネラ属菌検査については、レジオネラ属菌が増殖しやすい場所、感染源となりやすいエアロゾルが発生する場所を示した。具体的なレジオネラ属菌検査手法は「病原体検出マニュアル」を参照することとした。また、検査結果の解釈についても記述した。

9. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

外部精度管理に参加した地方衛生研究所において、5年連続参加した機関は50機関あったが、特定のいくつかの機関が連続して目標良好範囲外となっていた。本年度の回収率は、判定を開始した過去2年と比較し、全体的に低い傾向にあった。特に回収率0～10%未満の施設が全体の3割(30.1%)あり、過去2年(16.9%、8.5%)を大きく上回ったが、配付試料の確認実験において問題は認められなかった。

外部精度管理に係るアンケート調査の結果、ろ過法の変更、ろ過フィルターの変更、フィルターの洗い出し工程の追加、培地の変更、記載ミスの改善、工程全体の見直し等により、結果の改善が認められた機関がある一方で、明確な改善点が見つからず苦慮している機関もあった。

これまでの外部精度管理において不安定な結果を複数回報告していた機関のうち、3機関に対し研究班員が訪問し検査工程の確認を行い、その場で検討会を行った。

10. モノクロラミン消毒を導入した循環式浴槽を洗浄する必要性

高pHの温泉水を循環利用している2箇所の入浴施設での6～7週間にわたるモノクロラミン消毒の実地試験の結果、モノクロラミン濃度はほぼ安定的な濃度推移が認められ、レジオネラ属菌、大腸菌群ともに陰性で、一般細菌数も低く抑えられた。一方、従属栄養細菌数はいずれの施設でも遊離塩素管理時より増加した。1施設において、第5週から高濃度モノクロラミンによる消毒を1時間から一晩に延長したところ、従属栄養細菌数

は1/100程度に減少したものの、第6週以降は再び同様のオーダーにまで増加した。

D. 考察

入浴施設のシャワー・カラン水の約2割からレジオネラ属菌が検出された。レジオネラ属菌の検出は、水が滞留した際に、塩素濃度及び温度が低下し、生物膜が形成されることが原因の一部であると推測される。エアロゾルが発生しやすいシャワー水の衛生管理の重要性について、改めて周知していく必要性が示された。

レジオネラ症の感染源となるような浴用水からは、多くの種類のレジオネラ属菌が分離される場合が多く、目的とするレジオネラ属菌をIMBにより選択的に濃縮分離することは意義がある。血清群1以外の*L. pneumophila*を起因菌とするレジオネラ症も診断できる新しい尿中抗原検査試薬が保険適用となり、患者が増加することが予想される。様々な血清群のIMBを自家調製し、対応することが望ましい。自家調製IMBの回収率の向上に向けて、さらに改良、検討が必要である。

モバイル型qPCR装置による浴用水からのレジオネラDNA検出の検討では、従来のDNA抽出においては、既存の機器でのLAMP法、qPCR法と同等の結果が得られた。今後、モバイル型qPCR装置を採水現場で測定することを想定して、ろ過濃縮工程、DNA抽出法について、採水現場での実施に適したプロトコルを検討する必要がある。

温泉水、浴槽水等計138検体について、*L. pneumophila*を特異的に検出するレジオラート/QT法を平板培養法と併せて実施したところ、検出菌量の比較的少ない一部検体で、それぞれ一方のみ検出されるという結果の不一致が起こったが、ほぼ同等の検査結果が得られた。給水系の蛇口水17試料からは、*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌が平板培養法で検出されたが、すべてレジオラート/QT法では陰性となり、本法は特異性が高いことが示された。レジオラート/QT法の手技は、平板培養法と比較し非常に簡易であり、レジオネラ症患者の主要起因菌であり、浴槽水の

優占種として分離される *L. pneumophila* を特異的に検出するので有用な検査法であると考えられる。

特殊な機器を必要としない比色系パルサー法については、検体濃縮工程の工夫ができたので、保健所等監視指導機関等での活用が期待できる。

浴槽水の平板培養検査において、濃縮試料だけではレジオネラ属菌が検出できない検体があり、通知に基づく標準法で推奨されている非濃縮検体検査の併用実施により検出率が向上することが示された。非濃縮検体の塗抹量は 100 μL よりも 200 μL の方が望ましいと思われた。

入浴施設のイベント風呂に柑橘系果物が使われることがある。柑橘系果物の表面には凹凸が多いので、衛生管理上、浴槽水を清浄に保ちレジオネラ属菌の増殖を抑制するためには浴槽に投入する前に、スポンジ、ブラシ、タワシなどを使用した物理的洗浄の実施を提案した。

利便性の高い分子タイピング法である MLVA 法は、SBT と同様全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していて、菌株のスクリーニングに用いることは、有用であると考えられた。

「公衆浴場における衛生等管理要領」は令和元年 9 月に改正され、入浴施設の設備に対して新たに実施すべき衛生管理項目等が加えられたが、当管理要領には衛生管理の具体的な作業手順等に関する記述が少ないため、指導及び衛生管理実施の現場において利用できる、実践的な内容を示したガイドラインの作成が求められる。また、入浴施設が関連するレジオネラ症の集団感染事例は毎年のように発生している。患者発生と施設の関連性を解明して感染の拡大を阻止し、その後の集団感染事例を予防することは、公衆衛生上の重要な課題である。一連の患者調査及び環境調査を適切に実施するためには、レジオネラ属菌やレジオネラ症に関する知識や情報に基づいた手法を用いることが求められる。そこで研究班内に入浴施設の衛生管理ガイドライン作成並びに集団発生時調査ガイドライン作成の 2 つのワーキンググループを立ち上げ、ガイドラインを作成した。

外部精度管理については、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。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、直接技術指導を行った機関では、明確な改善ポイントが不明だった場合でも、検査工程全体に対し改めて注意を払い、一つ一つの作業を丁寧に対応することで改善方向に進んでいると思われた。一方、本年度の回収率は、判定を開始した過去 2 年と比較し、全体的に低い傾向にあった。配付試料の確認実験において問題は認められなかったが、参加機関側、配付試料側、双方について改めて検証したいと考える。今後も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。次年度もアンケート調査を実施し、情報の共有に努めたいと考える。

pH9 以上の高 pH の温泉水に対しては、次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が減弱し、レジオネラ属菌の増殖が問題となることがある。高 pH においてもレジオネラ属菌への消毒効果が発揮されるモノクロラミン消毒の活用が進められている。高 pH の温泉水を循環利用している 2 箇所の営業施設で、モノクロラミン消毒を行った。モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の制御に有用だが、従属栄養細菌数が増加する問題が再現され、循環式浴槽には、より強力な洗浄・消毒が必要と考えられた。

E. 結論

公衆浴場のレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等について、効果的な手法の検討を行った。

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た。令和元年 9 月に通知された「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」の妥当性を検証した。平易な培養法であるレジオラート/QT 法を検討したところ、浴槽水の培養では、従来の平板培養法と相関のある結果が得られた。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が現場で行えるように、モバイル型 qPCR 装置の試用や比色系パルサー法の改

良を行った。携帯型フローサイトメーターを使用したレジオネラリスク評価法については、標準作業書・ワークシート作成を行った。

分子疫学的手法としてのMLVAとSBTは全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していることが示され、MLVAは菌株のスクリーニングに有用であると考えられた。

入浴施設の衛生管理ガイドライン作成並びに集団発生時調査ガイドライン作成の2つのワーキンググループを立ち上げ、ガイドラインを作成した。

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。

高pHの温泉水を循環利用している2箇所の営業施設で、モノクロラミン消毒を行った。モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の制御に有用だが、従属栄養細菌数が増加する問題が再現され、循環式浴槽には、より強力な洗浄・消毒が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jiang L*, Amemura-Maekawa J*, Ren H, Li Y, Sakata M, Zhou H, Murai M, Chang B, Ohnishi M, Qin T (*: contributed equally). Distribution of *lag-1* alleles, *ORF7*, and *ORF8* genes of lipopolysaccharide and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates in Japan and China. *Front Cell Infect Microbiol.* 9:274. 2019.
- 2) Nakamura I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kobayashi T, Sato A, Watanabe H, Matsumoto T. Persistent *Legionella* contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan. *Int J Infect Dis.* 93:300-304. 2020.
- 3) 森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛治,

田中慶郎, 茶山忠久, 西 智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司. 次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証—三重県津市の榊原温泉における検討—. *温泉科学.* 69:90-102. 2019.

- 4) 磯部順子, 金谷潤一, 木全恵子, 内田 薫, 加藤智子, 綿引正則. 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況. *富山県衛生研究所年報.* 42:39-43. 2019.

2. 総説

- 1) 中植竜大, 前川純子, 村井美代: グラム陰性菌のリポ多糖の構造と合成経路の多様性—*Legionella pneumophila* の遺伝子検査による血清群別に向けて—. *保健医療福祉科学.* 8:40-47. 2019.
- 2) 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」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019, 47, 83-89.
- 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 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」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019, 47, 117-123.
- 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 10 浴槽のレジオネラ対策 3 モノクロラミンによる消毒方法について」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019, 47, 159-166.
- 5) 倉 文明: 給湯・給水系に潜むレジオネラ感染症. *感染症.* 287:10-17. 2019.
- 6) 枝川亜希子, 「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 12 レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019, 47, 229-232.
- 7) 井上浩章, 枝川亜希子, 「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 13 アメーバ共培養法を用いたレジオネラ属菌の検出」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019,

3. 学会発表

- 1) 中西典子、野本竜平、田中忍、岩本朋忠：冷却塔に定着する *L. pneumophila* が保有するプラスミドの遺伝的特徴. 第14回日本ゲノム微生物学会年会. 2020年3月、愛知.
- 2) 藤井明、松田宗大、小倉徹、小倉諒太、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、モノクロラミン管理下の循環浴槽におけるろ材付着バイオフィームに対する各種消毒剤の効果. 第47回建築物環境衛生管理全国大会、2020年1月、東京都.
- 3) Mori, Yasunori., Nagai, Yuki., Akachi, Shigehiro., Nishi, Tomohiro., Hamaguchi, Maho., Yoshimura, Hideki., Sugiyama, Kanji., Tanaka, Yoshirou., Sayama, Tadahisa., Izumiyama, Shinji. Field test of monochloramine disinfection for alkaline hot spring water that cannot sufficiently be disinfected with sodium hypochlorite because of its high pH - A case study in Sakakibara hot spring area of Tsu City, Mie Prefecture -. The 72th Annual Meeting of the Japanese Society of Hot Spring Sciences. Taichung, November 2019.
- 4) 森中理慧馨、前川純子、金谷潤一、磯部順子、加藤尚之、大野章、高崎一人、原口浩幸、布藤聡、倉文明. 日本温泉科学会第72大会. レジオネラ属菌の迅速検出法として比色系パルサー法の有用性の評価について. 2019年11月. 台中市.
- 5) 森 康則、赤地重宏、永井佑樹、吉村英基、泉山信司、温泉付随ガス分離設備のレジオネラ属菌による汚染実態と対策. 日本温泉科学会第72大会、2019年11月、台中市
- 6) 森本 洋、小川恵子、三津橋和也：レジオネラ症患者の喀痰からいかにしてレジオネラ属菌を検出するか. 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2019年10月、仙台.
- 7) 淀谷雄亮、原 俊吉、湯澤栄子、本間幸子、前川純子、森田昌知、大西 真、岡部信彦. レジオネラ症患者から分離された菌株等における SBT 法による遺伝子型別について. 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2019年10月. 仙台.
- 8) 田栗利紹、蔡 国喜、新道欣也、下田貴宗、倉文明、前川純子. レジオネラニューモフィラの定量検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の有用性評価. 日本防菌防黴学会第46回年次大会. 2019年9月、大阪.
- 9) 松田宗大、枝川亜希子、泉山信司、小倉 徹、植園健一、松田尚子、藤井 明、循環式浴槽から分離された *Mycolicibacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果. 日本防菌防黴学会第46回年次大会、2019年9月、大阪.
- 10) 小倉 徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、松田宗大、松田尚子、藤井 明、モノクロラミン管理下の浴槽循環ろ過装置内のろ材バイオフィームに対する各種消毒剤の消毒効果の検討. 日本防菌防黴学会第46回年次大会、2019年9月、大阪.
- 11) 前川純子. 「レジオネラ症発生事例について -作業環境を中心に-」. 第29回日本衛生産業学会全国協議会シンポジウム「生物学的ハザードと作業環境」. 2019年9月. 仙台.
- 12) Jun-ichi Kanatani, Masanori Watahiki, Keiko Kimata, Tomoko Kato, Kaoru Uchida, Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, and Junko Isobe. *Legionella* Species in Aerosols from Outdoor Sites near Asphalt Roads in Toyama Prefecture, Japan: Detection, Identification and Correlation with Precipitation. ESGLI 2019. Athens, Sep, 2019.
- 13) 前川純子. 「*Legionella pneumophila* の遺伝子型別から分かること」. 第92回日本細菌学会総会ワークショップ「レジオネラをめぐる新展開」. 2019年4月. 札幌.

4. 研修会

- 1) 黒木俊郎：公衆浴場の衛生等管理要領の改正につながった研究成果について、厚生労働省 令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020年2月、東京都.
- 2) 森本 洋：公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について、厚生労働省 令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020年2月、東京都.
- 3) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、令和元年度環境監視員担当者会議、2019年6月、大分.
- 4) 佐々木麻里 他：環境水等からのレジオネラ属菌の検査法について、レジオネラ実技研修会、2019年4月、福岡.

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）
公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究

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

レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

研究分担者

○金谷 潤一 富山県衛生研究所

研究協力者

磯部 順子	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	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	塩崎 晋啓	日本板硝子株式会社
水谷 幸仁	日本板硝子株式会社	小澤 賢介	デンカ生研株式会社

研究要旨

本研究では、浴用施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握し、新たな検査法を確立・普及することを目的とし、1. 迅速な検査法の開発、2. 感染源特定のための検査法の確立、3. 公衆浴場における水系の総合的な汚染実態の解明を行った。

149 検体中、34 検体（22.8%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。シャワー・カラン水について見ると、14.3%（5/35 検体）が 1,000 CFU/100 ml 以上の菌数であった。分離菌の血清群別の結果、Lp6 が 20/34 検体（58.8%）から分離され、最も多かった。

LC EMA-qPCR 法では、カラムを使用した新たな簡易抽出法（Lysis Buffer for *Legionella* Type2）を用いた場合においても、平板培養法に対する感度などは、従来の簡易抽出法（Lysis Buffer for *Legionella*）と同等の結果であった。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、浴用水の濃縮液をそのまま qPCR 反応に用いた場合、平板培養法に対する感度は、抽出した DNA を鋳型とした場合よりも優位に低かった（ $P < 0.05$ ）。各抽出法のコピー数を qPCR 法のコピー数と比較した結果においても、濃縮液を qPCR 反応に用いた場合は、全体的に定量値が低かった。

水検体における免疫磁気ビーズ（IMB）を用いた選択的濃縮法の検討では、レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1～3 を対象とした。培養菌株を用いた添加回収実験および実検体を対象とした検討の結果、自家調製した IMB は、デンカ生研で調製した IMB に比べ、濃縮分離の性能はかなり劣ることが判明した。

シャワー・カラン水の約 2 割からレジオネラ属菌が検出されたため、エアロゾルが発生しやすいシャワー水の衛生管理の重要性について、改めて周知していく必要性が示された。

A 研究目的

国内におけるレジオネラ症の患者報告数は年々増加しており、2019年の全国での届出数は2,314件（暫定値）であった¹⁾。レジオネラ症対策として、感染源のおよそ4割を占める浴用施設の衛生管理の向上は重要である。したがって、浴用施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握し、新たな検査法を確立・普及することを目的とし、1. 迅速な検査法の開発、2. 感染源特定のための検査法の確立、3. 公衆浴場における水系の総合的な汚染実態の解明を行う。

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。このような培養法に替わる迅速検査法に対して、監視指導のためにリアルタイムに結果を提供すること、営業再開の時期を早めることなどの理由により、行政・業者双方からの要望があり、必要性は高い。特に、培養法と関連する遺伝子検査法は、浴用水の衛生状態を的確に、かつリアルタイムに把握する点から重要な方法である。現在、死菌由来DNAのPCR増幅を阻害するEthidium monoazide (EMA)と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。本研究では、より簡便な方法として開発された、カラムを使用した抽出法を用いたLC EMA-qPCR法について検討した。また、採水現場で測定可能なモバイル型装置を使用したqPCR法 (モバイルqPCR法)についても検討した。

一方、国内における患者由来株の87%は*Legionella pneumophila* 血清群1 (Lp1)であるが、残りの13%は、Lp1以外の19種類の菌種・血清群である³⁾。したがって、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、患者由来株と同一の菌種・血清群の菌株を効率よく検出するため、Lp1をはじめとする様々な血清群で感作した

免疫磁気ビーズ (Lp-IMB)を用いて、選択的濃縮法によるLpの分離について検討した。

近年、公衆浴場のシャワー水を原因としたレジオネラ症感染事例も報告されているため⁴⁾、浴槽水だけでなく、シャワー水、カラン水なども調査し、公衆浴場の水系の総合的な汚染実態を明らかにする。

B 材料と方法

1 検査材料

3か所の地方衛生研究所(機関A~C)において、令和元年度に浴用施設などから149検体の試料を採取した(表1)。検体の内訳は、浴槽水が104検体、シャワー水が19検体、カラン水が16検体、採暖槽水が10検体であった。

2 平板培養法

平板培養法は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法 (薬生衛発0919第1号)」に準じて各機関の方法で実施し、10 CFU/100 ml以上を検出とした。

3 LAMP法

検水の100倍濃縮液2 mlを使用した。Loopampレジオネラ検出試薬キットE (栄研化学)を用いて、取扱説明書に従いDNAを抽出した。LAMP反応には、LA-320C (栄研化学)を用いた。

4 LC EMA-qPCR法

LC EMA-qPCR法は、使用する各種試薬の取扱説明書に従い実施した。すなわち、5分間酸処理した検水の1,000倍濃縮液0.1 mlを、*Legionella* LC Medium base (タカラバイオ)、レジオネラBCYE α 発育サプリメント (関東化学)およびレジオネラMWY選択サプリメント (関東化学)を用いて作製したMWY液体培地を添加後、36°Cで18時間培養した。その増菌液0.1 mlを分取し、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (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回実施した。EMA処理後、1検体につき、3種類の方法でDNAを抽出した。Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ)、NucleoSpin Tissue (タカラバイオ)、Lysis Buffer for *Legionella* Type2 (カラム抽出、タカラバイオ)を用いてそれぞれDNAを抽出後、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を用いてqPCR反応を実施した。機器は、Thermal Cycler Dice Real Time System II (TP900、タカラバイオ)を使用した。反応後、添付の取扱説明書に記載された方法で、16S rRNA 遺伝子のコピー数をCFU相当値に換算し、定量値1 CFU相当/100 ml以上を陽性と判定した。また、平板培養法の菌数との散布図を作成した。ただし、平板培養法における10 CFU/100 ml未満、qPCRにおけるCFU相当値1未満はそれぞれlog値0にプロットした。

5 モバイル qPCR 法

1検体につき、2種類の方法でDNAを抽出した。検水の100倍濃縮液1 mlおよび2 mlについて、それぞれLysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ)およびLoopamp レジオネラ検出試薬キットE (栄研化学)に付属のアルカリ熱抽出試薬を用いて、取扱説明書に従いDNAを抽出した。同時に、検水の100倍濃縮液1 mlを15,000 rpmで5分間遠心後、上清を除去し、滅菌水50 μ lに懸濁したものを鋳型とした。レジオネラ属菌に特異的な16S rRNA 遺伝子配列を標的として、プライマー、プローブおよび内部コントロール用プラスミドを作製し、KAPA3G Plant PCR Kit (KAPA)を用いてqPCR反応を実施した。qPCR反応には、モバイルqPCR装置 Picogene PCR1100 (日本板硝子)を用いた。

比較として、Lysis Buffer for *Legionella* で抽出したDNAについてはqPCR装置 (TP900)、アルカリ熱抽出試薬で抽出したDNAについてはLAMP装置 (LA-320C)を用いて、それぞれ反応を実施した。

また、qPCR法およびモバイルqPCR法における16S rRNA 遺伝子のコピー数から散布図を作成した。ただし、コピー数1未満はlog値0にプロットした。

6 Lp-IMB 法

1) Lp-IMB 作製方法

今年度は対象をLp1、2、3の3血清群とし、IMBは当所(自家調製IMB)とデンカ生研(D社調製IMB)の2施設で作製した。D社調製IMBは、目的以外の血清群に対する交差反応を吸収後、硫酸分画にて粗精製し、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、免疫磁気ビーズとした。自家調製IMBでは、市販されているビーズ粒子(Dynabeads™ M-280 Sheep anti-Rabbit IgG)をレジオネラ免疫血清で感作した。方法は国立感染症研究所の病原体検出マニュアルの中の「腸管出血性大腸菌検査検出診断マニュアル」に準拠した⁵⁾。

2) Lp-IMB の回収率の比較

添加回収には当所で凍結保管しているLp1、Lp2、Lp3をBCYE寒天培地(ビオメリュー)に画線塗抹し、30°Cで3日間培養した。その培養菌をMcFarland 2.0となるようPBSに懸濁し、10倍段階希釈して最終的に菌濃度 $1 \times 10^{1-4}$ CFU/mlの菌液を作製した。この菌懸濁液100~1,000 μ lにLp-IMBを25 μ l接種し、10分毎に転倒混和しながら30分間ビーズに吸着させた。ただし、菌懸濁液が1,000 μ lに満たない場合は、ビーズとよく混和するようPBSを加えて1,000 μ lとした。PBSで2回洗浄したのち、PBSにて100または200 μ lに懸濁してビーズ濃縮液とした。これら100 μ lをBCYE寒天培地にコンラージ棒で塗布し、湿潤箱に入れて、35°Cで7日間培養し、3日目以降は斜光法で観察した。レジオネラを疑うコロニーは血液寒天とBCYE寒天培地に再分離し、BCYE寒天培地のみに発育した菌をレジオネラ属菌とし、その数を測定した。

3) 実検体からのLp1 選択的濃縮分離

供試検体は、前述の感染源調査で 100 倍濃縮された浴槽水 38 検体、シャワー水 16 検体、カラン水 16 検体、計 70 検体とした。

Lp1-IMB 濃縮法：100 倍濃縮検体を、滅菌 PBS で 2 倍と 5 倍に希釈し、Lp-IMB 濃縮分離検体とした。これらの検体に自家調製（56 検体）または D 社調製（15 検体）Lp1-IMB 25 μ l 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 PBS で洗浄した。この操作（洗浄）を 2 回実施した後、最終的に PBS 200 μ l 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 μ l を 2 枚の GVPC 寒天培地（日水製薬）にコンラージ棒で塗布し、35°C 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

149 検体中、34 検体（22.8%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された（表 2a）。菌数別に見ると、10~99 CFU/100 ml が 19 検体（12.8%）、100~999 CFU/100 ml が 9 検体（6.0%）、1,000 CFU/100 ml 以上が 6 検体（4.0%）であった。最も多い菌数は、4,000 CFU/100 ml であった。分離菌の血清群別の結果、Lp6 が 20/34 検体（58.8%）から分離され、最も多かった（表 3）。次に多かったのは、Lp1（9/34 検体、26.5%）であった。また、Lp 以外の菌種が 3 検体から分離された。

シャワー・カラン水について見ると、全体の 14.3%（5/35 検体）が 1,000 CFU/100 ml 以上の菌数であった（表 2b）。これらの検体からは、Lp1（1 検体）、Lp3（2 検体）、Lp6（5 検体）、Lp12（1 検体）、Lp 以外の菌種（1 検体）が検出された。

2 LC EMA-qPCR 法による結果

各抽出法における、平板培養法に対する相関は

表 4 に示した。Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を用いた場合、平板培養法に対する感度（91.2%）・特異度（78.3%）・陽性的中率（55.4%）・陰性的中率（96.8%）・一致率（81.2%）全てにおいて、他の 2 つの方法と比較し最も高かった。とりわけ、感度および陰性的中率は、NucleoSpin Tissue を用いた場合よりも有意に高かった（ $P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるカイ二乗検定）。Lysis Buffer for *Legionella* と Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を用いた場合では、感度などに有意な差はなかった。

各抽出法を用いた LC EMA-qPCR 法の定量値（CFU 相当値）と平板培養法の菌数との相関は、それぞれ $r = 0.4172$ （Lysis Buffer for *Legionella*）、 $r = 0.522$ （Lysis Buffer for *Legionella* Type2）、 $r = 0.1931$ （NucleoSpin Tissue）であった（図 1）。

3 モバイル qPCR 法による結果

24 検体について検討した（表 5）。Lysis Buffer for *Legionella* およびアルカリ熱抽出液を用いて DNA を抽出した場合、平板培養法に対する感度などは、既存の機器を使用した LAMP 法（LA-320C）および qPCR 法（TP900）と同等であった。一方で、浴用水の濃縮液を鋳型としてそのまま qPCR 反応を実施した場合は、平板培養法に対する感度は 33.3%と、Lysis Buffer for *Legionella* およびアルカリ熱抽出液を用いた場合よりも優位に低かった（ $P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるフィッシャーの正確確率検定）。各抽出法のコピー数を qPCR 法のコピー数と比較した結果においても、濃縮液を鋳型として用いた場合は、全体的に定量値が低かった（図 2）。

1 検体については、アルカリ熱抽出した DNA を用いたモバイル qPCR 法で反応阻害が確認され、陰性となった。この DNA を用いた LAMP 法では陽性であった。また、同一検体から Lysis Buffer for *Legionella* で抽出した DNA を用いた qPCR 法およびモバイル qPCR 法も陽性であった。

4 Lp-IMB 法による結果

1) Lp-IMB の回収率の比較

Lp1 の回収率の結果を表 6 に示した。自家調製 IMB による Lp1 の回収率は 0.0~1.5%、平均 0.33% であった。これに対し、D 社調製 IMB を用いた場合の回収率は 50.6~113.3%、平均 80.6%と、自家調製 IMB に比べ高かった。ただし、D 社調製 IMB による添加回収実験では、 10^3 CFU/mL 以上を添加した場合、回収された菌が多く、計測不能として平均値には加えなかった。

Lp2、3 の 2 血清群を対象とした添加回収の結果を表 7 に示した。Lp1 と同様に発育菌が多く、菌数測定ができなかった場合、その回収率は解析から外した。自家調製 IMB による回収率は 0.0~0.4%、平均 0.1%であった。これに対し、D 社調製 IMB による回収率は 8.3~100.0%、平均 48.2%と、Lp1 の場合と同様、D 社調製 IMB で高かった。しかしながら、Lp2 の D 社調製 IMB による回収率は、1 回目と 2 回目で大きく異なった。

2) 実検体からの Lp1 選択的濃縮分離

IMB を用いて Lp1 を選択的に検出する方法と平板培養法との比較結果を表 8 に示した。11 検体中 Lp1 が分離されたのが、ビーズ法では 4 検体であったのに対し、平板培養法では 6 検体であった。平板培養法で Lp1 が分離されたにも関わらず、Lp1-IMB 法で Lp1 が分離されなかった検体 (No. 4、5、11) の内、No. 4、5 は菌数が 10 CFU/100ml と多くなかったが、No. 11 では 90 CFU/100ml であった。Lp1-IMB 法で使用したビーズは、検体 No.1~9 では D 社調製 IMB、No. 10、11 では自家調製 IMB であった。

D 考 察

LC EMA-qPCR 法における DNA 抽出では、Lysis Buffer for *Legionella* を使用しているが、本試薬は、界面活性剤と PCR 阻害物質を吸着する樹脂からなり、遠心操作後に吸着樹脂の上にゲル層が形成され、上清を回収するプロトコルとなっている。し

かしながら、容量が 50 μ l と少なく、ピペット操作のミスによりゲルや樹脂を回収してしまうと、その後の qPCR 反応に反応阻害などの影響を与える可能性がある。本研究では、この可能性を防ぐため、ゲルを含まずカラムで樹脂を除去する抽出法による新たな試薬 (Lysis Buffer for *Legionella* Type2) を検討した。平板培養法との比較では、従来の Lysis Buffer for *Legionella* を使用した場合と同等の結果であり、問題なく使用できることを確認できた。一方で、NucleoSpin Tissue を使用した場合は、平板培養法に対する感度 (61.8%) および陰性的中率 (87.1%) は、Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を使用した場合よりも有意に低かった。NucleoSpin Tissue はカラムを使用した DNA 抽出法であるため、純度の高い DNA を得ることができる。したがって、反応阻害物質の存在が予想される検体においては有用となる場合もある。しかしながら、抽出工程が多いため、DNA の収量が低下し、感度や陰性的中率が低下すると考えられた。したがって、LC EMA-qPCR 法における DNA 抽出には、既にプロトコルに記載されている Lysis Buffer for *Legionella*、または新たな試薬である Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を使用するのが望ましい。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、Lysis Buffer for *Legionella* またはアルカリ抽出液で抽出した DNA を用いた場合、平板培養法との相関は既存の機器を使用した LAMP 法 (LA-320C) および qPCR 法 (TP900) と同等の結果であった。qPCR 法との定量値の比較においても、概ね相関していた。ただし、1 検体については、アルカリ熱抽出した DNA を用いたモバイル qPCR 法でのみ反応阻害が確認され、陰性となった。遺伝子検査法においては、反応阻害などにより偽陰性となることを防ぐため、内部コントロールにより反応阻害を確認することは重要である。DNA を抽出せず、濃縮液をそのまま qPCR 反応に使用した検討では、平板培養法に対する感度 (33.3%) は、Lysis Buffer for

Legionella またはアルカリ抽出液で抽出した DNA を用いた場合よりも、有意に低かった。採水現場で測定することを想定した場合、検査機器、工程はできる限り簡略化することが求められるため、DNA 抽出工程の省略を検討したが、感度は低かった。今後は、DNA 抽出法だけでなく、ろ過濃縮工程についても、採水現場での実施に適したプロトコルを検討する必要がある。

感染源を特定するために、患者検体から分離されたレジオネラ属菌と同じクローンのレジオネラ属菌を分離することが重要となるが、感染源となるような浴用水からは、多くのレジオネラ属菌が分離される場合が多い⁶⁾。現在、レジオネラ属菌を血清群、あるいは菌種により鑑別する培地などはないため、目的とするレジオネラ属菌を IMB により選択的に濃縮分離することを検討した。これまで D 社調製 IMB を使用して検討してきたが⁷⁾、今年度は自家調製 IMB を用いた検討を行った。なぜなら、新しい検査試薬が保険適用となったことにより、Lp1 以外の Lp を原因とするレジオネラ症患者が増加することが予想されるため、それに対応するため、様々な血清群の IMB を自家調製し、対応するためである。しかしながら、検討結果は、自家調製 IMB は、D 社調製 IMB に比べ、濃縮分離の性能はかなり劣ることが判明した。原因のひとつとして、自家調製した場合、ビーズ粒子が塊を形成する状況がしばしば認められ、これにより、レジオネラ属菌のビーズへの吸着が阻害されたこと、培地上で十分に広がらなかったことが考えられた。前年度までの検討⁷⁾ から、IMB を併用することに意義が認められることから、自家調製する場合の回収率の向上に向けて、さらに改良、検討が必要である。

シャワー水はエアロゾルが発生しやすく、リスクの高い環境水であることから、重点的な監視が必要である。カラン水は、シャワー水と同じ水を使用するため、同様に定期的な監視および清掃・消毒による衛生管理が必要である。今年度も、例

年の調査と同様に、シャワー・カラン水の約 2 割からレジオネラ属菌が検出され、改めて衛生管理の徹底を周知していく必要性が示された。

E 結論

LC EMA-qPCR 法の検討の結果、DNA 抽出には既にプロトコルに記載されている Lysis Buffer for *Legionella*、または新たな試薬である Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を使用するのが望ましい。モバイル qPCR 法の検討では、現プロトコルでは、濃縮液をそのまま qPCR 反応に使用せず、DNA を抽出する必要があることが明らかとなった。また、内部コントロールにより反応阻害を確認することも重要である。患者検体から分離されたレジオネラ属菌と同じクローンのレジオネラ属菌を分離するために IMB を併用することは、意義が認められることから、IMB を自家調製する場合の回収率の向上に向けて、さらに改良、検討が必要である。シャワー・カラン水の約 2 割からレジオネラ属菌が検出され、改めて衛生管理の徹底を周知していく必要性が示された。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ 2019 年第 52 週。
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/9289-idwr-sokuho-data-j-1952.html>
- 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) Amemura-Maekawa J et al. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84 (18), pii: e00721-18.
- 4) 石山 康史 他. シャワー水を感染源としたレ

ジオネラ症例について．病原微生物検出情報 (IASR)．2010，31，331-332.

5) 腸管出血性大腸菌感染症 2019 年 9 月版．病原体検出マニュアル．

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20190920.pdf>

6) 平塚貴大．2017 年に広島県で発生したレジオネラ症集団感染事例案について．平成 29 年度生活衛生関係技術担当者研修会資料，厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課．

7) 磯部 順子 他．感染源解明のための環境調査．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 30 年度分担研究報告書，47-57.

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			計
		A	B	C	
検体内訳	浴槽水	38	32	34	104
	採暖槽水		10		10
	シャワー水	17	2		19
	カラン水	16			16
	計	71	44	34	149
検査方法	LC EMA-qPCR	71	44	34	149
	モバイルqPCR	24			24
	LAMP	24			24
	qPCR	24			24

表2. 平板培養法による検出率

a. 全検体

菌数(CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	115	(77.2)
10-99	19	(12.8)
100-999	9	(6.0)
1,000以上	6	(4.0)
計	149	(100)

b. シャワー・カラン水のみ

菌数(CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	27	(77.1)
10-99	1	(2.9)
100-999	2	(5.7)
1,000以上	5	(14.3)
計	35	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数(%)
<i>L. pneumophila</i>	
SG 6	20 (58.8)
SG 1	9 (26.5)
SG 3	3 (8.8)
SG 4	3 (8.8)
SG 5	3 (8.8)
SG 8	3 (8.8)
SG 9	3 (8.8)
others	2 (5.9)
UT	4 (11.8)
<i>Legionella</i> spp.	3 (8.8)

表4. LC EMA-qPCR法における平板培養法との相関(149検体、平板培養陽性34検体)

DNA抽出法	培養法に対する(%)				
	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率	一致率
Lysis Buffer for <i>Legionella</i>	85.3%	73.9%	49.2%	94.4%	76.5%
Lysis Buffer for <i>Legionella</i> Type2	91.2%*	78.3%	55.4%	96.8%*	81.2%
NucleoSpin Tissue	61.8%*	76.5%	43.8%	87.1%*	73.2%

* $P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるカイ二乗検定

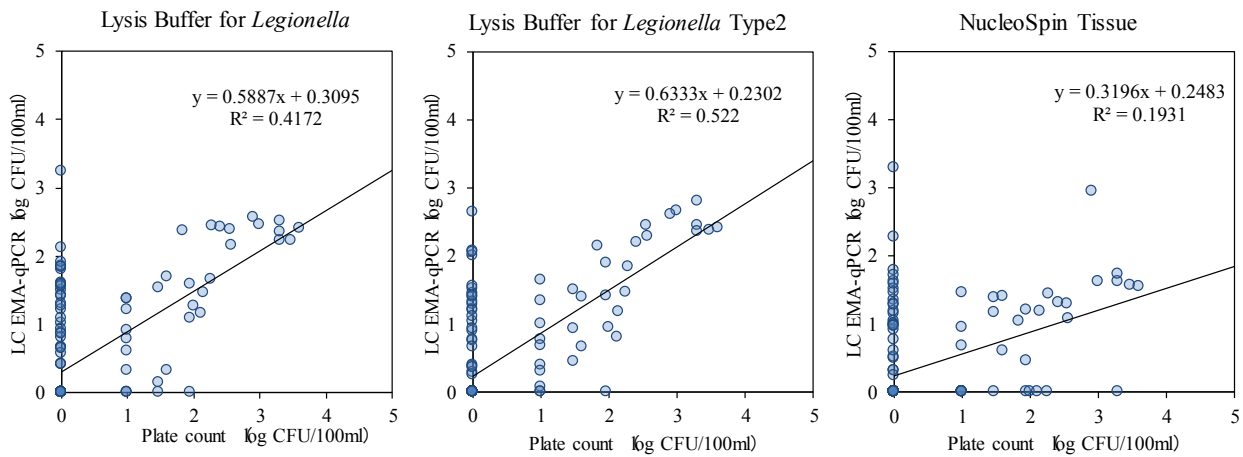


図1 LC EMA-qPCR 法と平板培養法との定量値の相関

表5. モバイル型装置を用いたqPCR法における平板培養法との相関(24検体、平板培養陽性15検体)

迅速検査法(DNA抽出法)	培養法に対する(%) :				
	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率	一致率
モバイルqPCR (Lysis Buffer for <i>Legionella</i>)	93.3%A	66.7%	82.4%	85.7%	83.3%
モバイルqPCR (アルカリ熱抽出)	86.7%A	66.7%	81.3%	75.0%	79.2%
モバイルqPCR (未抽出、濃縮液を鋳型)	33.3%B	77.8%	71.4%	41.2%	50.0%
qPCR (Lysis Buffer for <i>Legionella</i>)	93.3%	66.7%	82.4%	85.7%	83.3%
LAMP (アルカリ熱抽出)	100.0%	66.7%	83.3%	100.0%	87.5%

AとBは有意差あり($P < 0.05$)、ボンフェローニ補正によるフィッシャーの正確確率検定

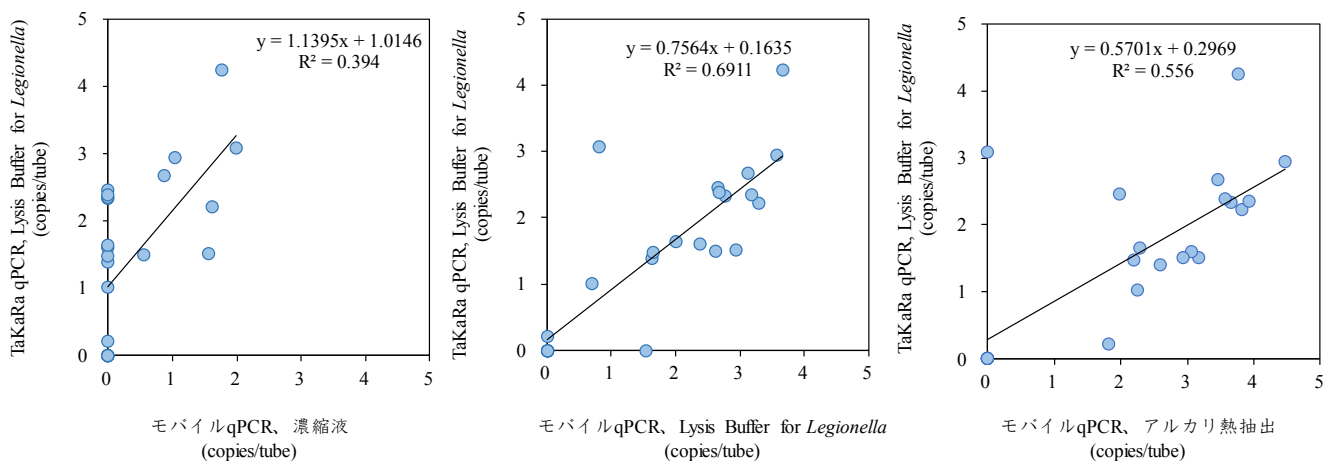


図2 qPCR 法とモバイル qPCR 法との定量値の相関

表 6 Lp1-IMB による添加回収の結果

	理論値 CFU/1,000 ml	自家調製IMB		D社調製IMB	
		測定値	回収率 (%)	測定値	回収率 (%)
1	30,000	119	0.40	>1,000	UC*
	3,000	5	0.17	>1,000	UC
	300	0	0.00	237	79.0
	30	0	0.00	34	113.3
2	53,000	146	0.28	>1,000	UC
	5,300	12	0.23	>1,000	UC
	530	0	0.00	374	70.6
	53	0	0.00	42	79.2
3	67,000	282	0.42	>1,000	UC
	6,700	33	0.49	>1,000	UC
	670	3	0.45	339	50.6
	67	1	1.5	61	91.0
平均			0.33		80.6

*UC: Un calculable

表 7 Lp2、Lp3-IMB による添加回収の結果

	理論値 CFU/1,000 ml	自家調製MB		D社調製IMB	
		測定値	回収率 (%)	測定値	回収率 (%)
Lp2	14000	2	0.0	>1,000	UC*
	1400	1	0.1	>1,000	UC
	140	0	0.0	126	90.0
	14	0	0.0	14	100.0
	27000	44	0.2	>1,000	UC
	2700	12	0.4	>1,000	UC
	270	1	0.4	162	60.0
	27	0	0.0	13	48.1
Lp3	24000	11	0.05	>1,000	UC
	2400	1	0.04	497	20.7
	240	0	0.0	24	10.0
	24	0	0.0	2	8.3
平均			0.1		48.2

*UC: Un calculable

表 8 Lp1-IMB による浴用水からの Lp1 の分離

検体No.	検体名*	分離されたレジオネラ属菌および血清群			
		ビーズ法		平板培養法	
		血清群	使用した IMB	血清群	CFU/100 ml
1	B7	Lp6	D社	Lp6	10
2	B15	Lp1	D社		<10
3	B17	Lp1	D社	Lp1	370
4	B21		D社	Lp1	10
5	B25		D社	Lp1、5、6	10
6	C10	Lp1	D社	Lp1,9	360
7	C11	Lp1、9	D社	Lp1,6	1,000
8	S4	Lp6	D社	Lp6	2,000
9	S5	Lp6	D社	Lp6	2,000
10	B34		自家	Lp4、6	90
11	B36		自家	Lp1	90

*B: 浴用水、C: カラン水、S: シャワー水

公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究

新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT法の有効性の検討

研究代表者	前川純子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所
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	緒方喜久代	公益社団法人大分県薬剤師会 検査センター
研究協力者	湯澤栄子	川崎市健康安全研究所
研究協力者	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
研究協力者	田中奈緒美	アイデックスラボラトリーズ株式会社

研究要旨:レジオネラ属菌の検査においては平板培養法が広く利用されているが、手技が煩雑であり、検査室における手技の安定性が問われる試験である。今回、手技が非常に簡易な特定酵素基質培地キットであるレジオラート/QT法の感度、特異度及び定量性を検討するため、平板培養法と比較した。温泉水、浴槽水等計138検体について実施したところ、平板培養法と比較したレジオラート/QT法の感度は75.6%、特異度81.7%であり、結果一致率は79.7%であった。結果が不一致であったものは28検体あり、比較的検出菌量の少ない検体が多かった。レジオラート/QT法のみ検出であった17検体について、陽性となったウェルの液体培地からレジオネラ属菌の分離を試みたところ、14検体で*L. pneumophila*が検出されたが、3検体についてはレジオネラ属菌が分離できなかった。レジオラート/QT法及び平板培養法ともに検出となった34検体について検出菌量の比較を行ったところ、レジオラート/QT法の方が検出菌量の多い傾向があるものの回帰直線の R^2 は0.778であり、強い相関が認められた。本検討の結果からレジオラート/QT法は平板培養法と同等の検査法であるとともに、手技も平板培養法と比較し非常に簡易であり有用な検査法であると考えられる。

A. 研究目的

レジオネラ属菌の検査においては平板培養法が広く用いられているが、検体の濃縮、分離培地の選択、加えてコロニーの鑑別などに熟練を要する等、検査機関内外での検査手技の安定性が課題となっている。近年、*Legionella pneumophila* 検出用の特定酵素基質培地であるレジオラートと培養兼計数用の専用トレイ Quanti-Tray/legiolert が販売されており、欧米等の諸外国で使用されている。レジオラートには *L. pneumophila* が特異的にもつ酵素によっ

て分解できる基質が含まれており、これが分解されることにより茶色の発色が起こり、選択的に菌を検出することができる。レジオラート/QT法はレジオラートを溶かした検体を専用トレイ Quanti-Tray/legiolert で培養することにより *L. pneumophila* を選択的に検出・定量できる検査法であり、濃縮手順がなく、確定試験が不要である等、操作が非常に簡易なキットである。今回、国内における浴槽水及び温泉水等についてレジオラート/QT法の感度・特異度及び定量性を確認するため、従来の平板培養法と

比較検討した。

B. 研究方法

1. 基礎的検討

基礎的検討として、循環ろ過式入浴施設から入手したろ材より分離された *L. pneumophila* SGUT の菌株を BCYE α 寒天培地に塗布し増菌した後、希釈系列を作成し、平板培養法及びレジオラート/QT 法を行い、各々の検出菌数を比較した。

方法としては、*L. pneumophila* の菌株を BCYE α 寒天培地で 2~4 日間培養し、発育したコロニーを滅菌水に懸濁し、希釈系列を 10 倍ごと 4 段階作成したものを用いて比較実験を実施した。BCYE α 寒天培地に各希釈段階の菌懸濁液 0.1 mL を添加し湿潤環境で 36 °C で 7 日間培養した。並行して、レジオラートを溶解した滅菌水 100 mL に各希釈段階の菌懸濁液 0.1 mL を添加し混和した後、Quanti-Tray/legiolert にシーラーPLUS を用いて封入し、湿潤環境で 36 °C で 7 日間培養した。本培養温度はレジオネラ症防止指針第 4 版に準拠している。培養後、茶色または濁りの生じたウェル数を陽性とし、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。上記の実験を 3 回繰り返した。

2. 実検体の検討

(1) 対象

各施設に搬入された公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 138 検体を対象とした。

(2) 方法

レジオラート/QT 法は添付された説明書の飲料水用 10 mL プロトコールに従い実施した。滅菌水 90 mL にレジオラートを加えよく溶かした後、浴槽水等の検体 10 mL を加えた。よく混

和した後、専用の Quanti-Tray/legiolert にシーラーPLUS を用いて封入し、湿潤環境で 39 °C で 7 日間培養した。培養後、茶色または濁りの生じたウェル数を陽性とし、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。陽性となったウェルの液体培地を GVPC α 寒天培地等レジオネラ属菌選択分離培地に塗抹し、レジオネラ属菌の分離を行い、システイン要求性又は免疫血清により検出菌の同定を行った。

同時に平板培養法にてレジオネラ属菌の分離を実施した。平板培養法は各検査機関の方法で実施し、ろ過濃縮法にてレジオネラ属菌の分離を行い、システイン要求性又は免疫血清により検出菌の同定及び検出菌量を算出した。なお、大分県衛生環境研究センターの検出菌量は、標準法（非濃縮検体を除く）で実施したものである。

各検査方法における検出率を比較するとともに、レジオラート/QT 法で求められた MPN 値と平板培養法で求められた CFU 値を比較した。

C. 結果

1. 基礎的検討

レジオラート/QT 法における検出菌量は希釈系列ごとに概ね 10 倍ごと段階的に減少していき、希釈ごとに表のとおり検出菌量を示した（表 1）。また、同時に実施した平板培養法においてもレジオラート/QT 法とある程度同等の検出菌量を示した。

2. 実検体の検討

温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 138 検体についてレジオラート/QT 法及び平板培養法を実施したところ、両方法で検出となったものが 34 検体、両方法で不検出となったものは 76 検体であった（表 2）。平板培養法と比較したレ

レジオラート/QT法の感度は75.6%、特異度81.7%であり、結果一致率は79.7%であった。検出菌量はレジオラート/QT法で0-22726 MPN/100mL、培養法では0-16640 CFU/100mLであった。結果が不一致であった検体は28検体あり、レジオラート/QT法検出で平板培養法不検出が17検体、レジオラート/QT法不検出で平板培養法検出が11検体であった(表3)。レジオラート/QT法のみ検出であった検体の検出菌量は10-534 MPN/100mL、平板培養法のみ検出であった検体の検出菌量は10-80 CFU/100mLであった。レジオラート/QT法のみ検出であった検体について、陽性となったウェルの液体培地からレジオネラ属菌の分離を行ったところ、14検体で*L. pneumophila*が検出されたが、3検体についてはレジオネラ属菌が分離できなかった。一方で平板培養法のみ検出であった11検体の菌量は10-80 CFU/100mLであり、このうち、*L. pneumophila*が検出された6検体は10-40 CFU/100mLであった。5検体についてはレジオネラ属菌であることをシステイン要求性により確認したが、菌種同定は未実施であった。

レジオラート/QT法及び平板培養法ともにレジオネラ属菌を検出した34検体について検出菌量の比較を行った(図1)。レジオラート/QT法の方が検出菌量の多い傾向があるものの、回帰直線の R^2 は0.778となり、強い相関が認められた。

D. 考察

レジオラート/QT法の有効性を確認するため、既存菌株を用いた希釈系列を作成し検討したところ、希釈系列ごとに検出菌量が減少した。また、平板培養法と比較してもほぼ同等の検出菌量であったことから、既存菌株を用いた検討においてレジオラート/QT法は平板培養法と同等の性能であることが示された。

続いて、実検体におけるレジオラート/QT法の有効性を検討したところ、平板培養法との一致率が79.7%と高い一致率を示した。また、検出菌量についても平板培養法との強い相関が確認され、実検体においても有用な検査であることが示された。28検体についてはそれぞれ一方のみ検出の検体が確認されたが、検出菌量の比較的少ない検体に結果の不一致が起こった。この28検体中レジオラート/QT法検出で平板培養法不検出が17検体、レジオラート/QT法不検出で平板培養法検出が11検体であり、レジオラート/QT法及び平板培養法の検出感度は同程度であることが示唆された。レジオラート/QT法のみ検出であった検体について、陽性反応を示したウェルの液体培地からレジオネラ属菌の分離を試みたが、3検体についてはウェルの液体培地からレジオネラ属菌を分離することはできなかった。この原因として、検体に含まれる他の細菌がレジオラートに含まれる基質に反応した偽陽性の可能性、あるいは分離培養の困難な菌種であった可能性が考えられる。一方で、平板培養法のみ検出された検体のうち、5検体についてはレジオネラ属菌の菌種を同定しておらず、レジオラート/QT法で検出できない菌種、つまり*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌であったため、レジオラート/QT法では検出できなかった可能性が考えられる。

本検討の実検体における検討は各施設で行っており、対象検体がそれぞれ異なることに加え、温泉水が多く含まれ、含有成分やpH等検体の性質が異なること、また、平板培養法を各施設の方法で実施したことによる差を留意する必要がある。また、レジオラート/QT法は*L. pneumophila*を特異的に検出するキットであるが、本検討においてレジオラート/QT法で検出され、かつ*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌のみが検出される検体はなかった。*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌が含まれ

る検体においてレジオラート/QT法がどのような結果を示すか確認する必要があると考えられる。また、本検討においてレジオラート/QT法検出、平板培養法不検出であり、レジオラート/QT法からレジオネラ属菌が分離できなかった偽陽性の可能性がある検体が3検体確認された。頻度は少ないものの、どのような菌種がキットに影響を与えているか、より詳細な検討が必要である。しかしながら、レジオラート/QT法の手技は非常に簡易であり、平板培養法における過、前処理等の複雑な手技がなく多検体の処理が短時間で可能であること、コロニーの鑑別が不要であることから結果判定も容易であり、検査経験が浅い検査員でも検査が可能である利点があると考えられる。このことから、レジオラート/QT法は平板培養法と比較し検査者間、検査室間の差が出にくく使用しやすい有用なキ

ットであると考えられる。

E. 総括

レジオラート/QT法は平板培養法と同等の検査法であるとともに、手技も平板培養法と比較し非常に簡易であり有用な検査法である。

F. 健康危険情報

なし

G. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 レジオラート/QT法の基礎的検討結果

検体	希釈系列	レジオラート/QT法 (MPN/mL)	平板培養法 (CFU/mL)
1	10 ⁻³	>22726	>300
	10 ⁻⁴	>22726	>300
	10 ⁻⁵	17178	>300
	10 ⁻⁶	1644	1540
2	10 ⁻³	>22726	>300
	10 ⁻⁴	>22726	>300
	10 ⁻⁵	>22726	>300
	10 ⁻⁶	2580	2460
3	10 ⁻³	5067	>300
	10 ⁻⁴	788	640
	10 ⁻⁵	39	20
	10 ⁻⁶	<1	0

表2 実検体におけるレジオラート/QT法と平板培養法の結果

レジオラート/QT法	平板培養法		
	検出	不検出	計
検出	34	17	51
不検出	11	76	87
計	45	93	138

表 3 不一致検体の一覧

表 3-1 レジオラート/QT 法のみ検出であった検体一覧(n=17)

検体No.	検体種別	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)	平板培養法 (CFU/100mL)	検出菌種
1	温泉水	10	<10	<i>L. pneumophila</i>
2	採暖槽水	11	<10	<i>L. pneumophila</i> SG5
3	浴槽水 (水道)	11	<10	<i>L. pneumophila</i> SG5
4	浴槽水 (水道)	10	<10	<i>L. pneumophila</i> SG6
5	採暖槽水	11	<10	<i>L. pneumophila</i> SG6
6	温泉水	534	<10	<i>Legionella</i> sp.
7	温泉水	35	<10	※検出できず
8	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
9	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
10	温泉水	223	<10	<i>Legionella</i> sp.
11	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
12	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
13	温泉水	11	<10	※検出できず
14	温泉水	20	<10	<i>Legionella</i> sp.
15	温泉水	23	<10	※検出できず
16	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.
17	温泉水	11	<10	<i>Legionella</i> sp.

表 3-2 平板培養法のみ検出であった検体一覧(n=11)

検体No.	検体種別	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)	平板培養法 (CFU/100mL)	検出菌種
1	温泉水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SG6, UT
2	温泉水	0	40	<i>L. pneumophila</i> SG5, 7, UT
3	温泉水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SG3
4	温泉水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SGUT
5	温泉水	0	10	<i>Legionella</i> sp.
6	再暖槽水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SG1
7	浴槽水	0	10	<i>L. pneumophila</i> SG6
8	温泉水	0	10	<i>Legionella</i> sp.
9	温泉水	0	80	<i>Legionella</i> sp.
10	温泉水	0	20	<i>Legionella</i> sp.
11	温泉水	0	10	<i>Legionella</i> sp.

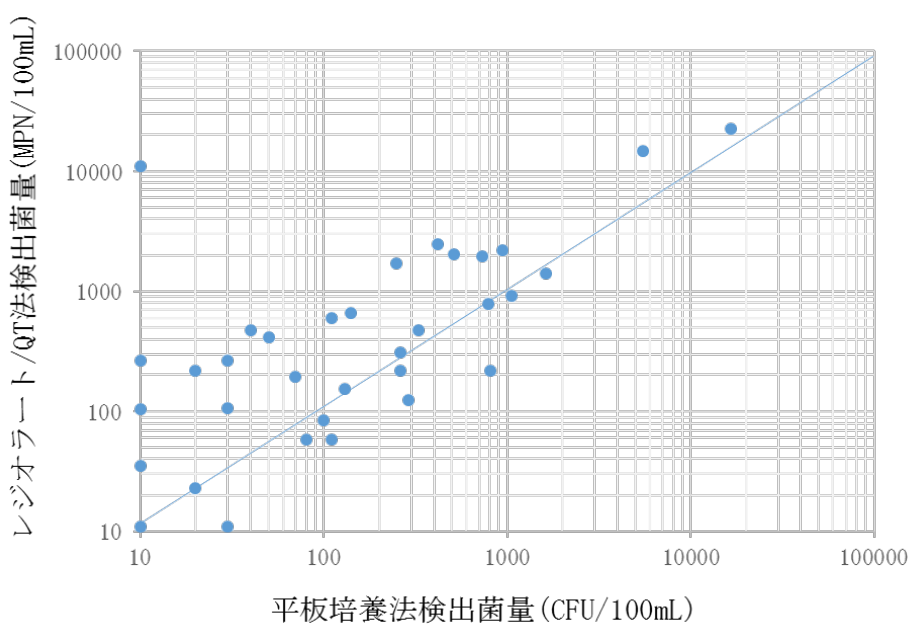


図 1 レジオラート/QT 法と平板培養法の検出菌量の比較(n=34)

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）
「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の
衛生管理手法の開発のための研究」

令和元年度分担研究報告書

大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT 法の評価、
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、溝腰 朗人、成松 浩志
大分県衛生環境研究センター
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：浴場水のレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として厚生労働省から示された方法について、多様な泉質を有する大分県の実検体を用いて評価した。当所で従来から実施している方法と比較して、培地枚数が少ないにも関わらず同等の結果が得られた。特定酵素基質培地と専用トレイを組み合わせたレジオラート/QT 法は、公衆衛生上重要な菌種である *Legionella pneumophila* を簡便に検査でき、検出された菌量は平板培養法とおおむね同等で強い相関が見られた。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。溶菌液調製に用いるセルロース製フィルターの孔径を $0.45\mu\text{m}$ に大きくすることでろ過の時間が短縮され、なおかつ孔径 $0.22\mu\text{m}$ と同等の結果が得られた。保健所にて孔径 $0.45\mu\text{m}$ のセルロース製フィルターを用いたパルサー法によるレジオネラ属菌検査を行なったところ、平板培養法でレジオネラ属菌が検出された 2 検体中 1 検体が、パルサー法で陽性となった。

A. 研究目的

公衆浴場において問題となるレジオネラ属菌への対応として、厚生労働省の指針¹⁾により定期的に水質検査を行うこととされており、そのレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として検査法²⁾（ここでは、標準法と称する。）が通知された。この標準法について、多様な泉質を有する大分県の実検体を用いて評価した。併せて、*Legionella pneumophila* を特異的に検出する特定酵素基質培地と最確数（MPN）法で定量する専用トレイを組み合わせたレジオラート/QT 法についても実検体を用いた評価を行った。培養法に加えて、迅速検査法として比色系パルサー法について検討を行った。比色系パルサー法は、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。前年度、保健所においてパルサー法によるレジオネラ属菌検査を実施したところ、平板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の結果となった³⁾。今年度は濃縮工程を見直し、フィルター孔径を大きくすることで検体濃縮時間の短縮を図った。

B. 研究方法

1. 試料および調製法

令和元年 5 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水 24 施設分 45 検体を対象とした。

濃縮と前処理の方法は標準法に準じて実

施した。すなわち、検体 1200mL をメンブ
ランフィルター（直径 47mm、孔径 0.2 μ m、
ADVANTEC 社、POLYCARBONATE）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。ろ過濃縮後の濃縮試
料（100 倍濃縮）について、50 $^{\circ}$ C で 20 分加
熱後急冷したもの（以下、熱処理試料）、濃
縮試料に等量の 0.2M HCl・KCl 液 pH2.2 \pm
0.2（武藤化学）を加え混和し室温で 5 分間
静置したもの（以下、酸処理試料）、熱や酸
による前処理を行わないもの（以下、未処理
試料）を調製した。

2. 平板培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYO
 α 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、従来から当所で実施してい
た方法（以下、大分法）と標準法とで実施し
た。大分法として、熱処理試料および未加熱
試料について、それぞれ 10 倍階段希釈を 2
段（10 倍、100 倍）まで行い、各希釈段階
（1 倍～100 倍）の試料 200 μ L を各分離平板
1 枚にコンラージ棒で塗布した。標準法とし
て、酸処理試料については 200 μ L、熱処理試
料については 100 μ L、濃縮処理を行わない
検体（以下、非濃縮検体）については 200 μ L
を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布し
た。なお、標準法として通知に記載されてい
る非濃縮検体の塗抹量は 100 μ L であるので、
本研究方法ではその 2 倍量を塗抹している
ことになる。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 $^{\circ}$ C で培養した。検出限界は大分法では
5cfu/100mL、標準法では 10cfu/100mL（非濃
縮検体では 500cfu/100mL）である（表 1）。

標準法に採用され、大分法においても従
前より実施していた斜光法⁴⁾にて、培養 3
日後に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、BCYE α 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
発育の有無を確認した。BCYE α 寒天で発育
し、血液寒天では発育しなかったコロニー

について、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 $^{\circ}$ C 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体 100mL あたりのレジ
オネラ属菌数に換算した。

3. レジオラート/QT 法

非濃縮検体 45 検体について、
L.pneumophila を特異的に検出する特定酵素
基質培地レジオラートと専用トレイの
Quanti-Tray/Legiolert（いずれも IDEXX）を
用い、添付の取扱説明書に示された飲料水
用 10mL プロトコールに従って測定した。
測定に使用した検体量は 10mL で、90mL の
滅菌蒸留水を加えて 100mL とした。本法の
検出限界は 10MPN/100mL である。

4. 比色系パルサー法

非濃縮検体 17 検体（令和元年 8 月に搬入さ
れた検体）について、レジオネラ属菌迅速検査
キット（ファスマック）を用いた。検体をろ過
したフィルターに直接変性液を加える溶菌法
（下記記載の方法①または方法②）で、1 検体
につき孔径の異なる 2 種類のフィルター
（0.22 μ m、0.45 μ m）でそれぞれろ過後に溶菌液
を調製し、添付の取扱説明書に従って測定した。
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 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。

上記 1 に示した検体とは別に採水した浴槽
水および湯口水 4 検体について、保健所で環境
衛生監視員が測定した。保健所では孔径
0.45 μ m のフィルターを用いた方法①で溶菌液
を調製後すぐに -30 $^{\circ}$ C で冷凍保存し、測定は 5
日後に実施した。平板培養法によるレジオネラ
属菌数の測定は、当所で大分法にて実施した。
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 0.22 μ m
または 0.45 μ m、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 100 μ L 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 $^{\circ}$ C 15 分間静置し、その後 10 μ L 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 110 μ L 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 0.22 μ m または 0.45 μ m、Merck 社、セルロース混合エステル）に押し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 200 μ L 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 $^{\circ}$ C 15 分間静置し、その後 20 μ L 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 110 μ L の溶菌液を用いた。

C. 研究結果

以下、平板培養法でレジオネラ属菌が検出されたこと、レジオラート/QT 法で陽性と判定したウェルがあったこと、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、レジオラートで陽性と判定したウェルがなかったこと、パルサー法で陰性であったことを「(-）」と表記する。

1. 平板培養法

45 検体中、大分法では 25 検体、標準法では 22 検体からレジオネラ属菌が検出された（表 2）。標準法のうち 1 検体については、濃縮試料を塗抹した培地は夾雑菌が多く発育したためにレジオネラ属菌検出不能であったが、非濃縮検体からはレジオネラ属菌が検出された。この 1 検体を含む 2 検体は非濃縮検体のみからレジオネラ属菌が検出され、標準法の濃縮試料からは検出されなかった。検出されたレジオネラ属菌数は大分法と標準法でそれぞれ 5~44500cfu/100ml、10~31500cfu/100mL であった。大分法でのみ検出された 4 検体の菌数は 100mL あたり 5cfu が 2 検体、20cfu と 50cfu が各 1 検体で、*L. pneumophila* が検出された。標準法でのみ検出された 1 検体からは *L. pneumophila* が検出され、その菌数は 10cfu/100mL であった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.8553$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8607$ （標準法で検出不能となった 1 検体のデータを除く）であった（図 1）。

2. レジオラート/QT 法

45 検体中 17 検体から 10 ~ 22726

MPN/100mL の *L. pneumophila* が検出された。平板培養法 (+) レジオラート (-) の結果となったのは、大分法で 8 検体 (10cfu/100mL 以上検出された検体に限ると 3 検体 (菌数は 50cfu/100mL))、標準法で 6 検体 (菌数は 10~40cfu/100mL が 5 検体、500cfu/100mL (非濃縮検体のみで検出) が 1 検体)、平板培養法 (-) レジオラート (+) の結果となったのは標準法のみ 1 検体 (菌数はレジオラートで 10MPN/100mL、大分法で 20cfu/100mL) であった（表 3a、3b）。平板培養法との菌数の相関は大分法で $R^2=0.8712$ 、標準法で $R^2=0.7844$ であった（図 2）。

3. 比色系パルサー法

17 検体の結果を表 4a、4b、4c に示す。ろ過フィルターの孔径を 0.45 μ m にしても 0.22 μ m と同等以上の結果となった。平板培養法 (+) 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 5cfu/100mL と 50cfu/100mL であった。なお、この 2 検体は標準法ではレジオネラ属菌が検出されなかった。

保健所で実施した 4 検体のうち、平板培養法 (+) パルサー法 (+) となった 1 検体の菌数は 45cfu/100mL、平板培養法 (+) でパルサー法 (-) となった 1 検体の菌数は 25cfu/100mL で、ともに *L. pneumophila* が検出された（表 5）。なお、これら 2 検体は、前年度の検討で共に 85cfu/100mL のレジオネラ属菌が検出されたがパルサー法 (-) であった 2 検体³⁾と同一施設の検体であった。

D. 考察

平板培養法について、使用する培地枚数は 1 種類につき標準法で 3 枚、大分法で 6 枚である。単純に培地枚数の多い方が検出確率は上がるが、枚数の少ない標準法で大分法と同等の結果が得られた。大分法のみでレジオネラ属菌が検出された検体もあったが、5cfu/100mL の検体を含むいずれも菌数の少ない検体であったため、ばらつきが生じたと考えられる。指針による基準ではレジオネラ属菌は 10cfu/100mL 未満とされており、標準法は指針による定期的水質検査には適した方法だと言える。ただし、標準

法において濃縮試料では検出できない検体があったことから、濃縮試料のみでなく非濃縮検体についても併せて検査を実施することが重要と考える。また、今回非濃縮検体の塗抹量を 100 μ L でなく 200 μ L としたが、夾雑菌の増加による平板観察の困難さは感じなかった。より検出率を上げるために、非濃縮検体の塗抹量は 100 μ L よりも 200 μ L の方が望ましいと考える。

レジオラート/QT 法については、検体の濃縮工程や菌の確定試験が不要であるため、検体の処理や結果の判定が容易で、検査者の手技による差異が生じにくい。45 検体を検査したところ、レジオラート/QT 法と平板培養法で検出される菌量はおおむね同等であり、強い相関が見られた。レジオラート/QT 法は *L.pneumophila* のみを特異的に検出する方法であり、それ以外のレジオネラ属菌は検出できない。しかし、患者から検出されるレジオネラ属菌の多くは *L.pneumophila* である⁵⁾ ことから、公衆衛生上重要な菌種である *L.pneumophila* の検査が簡便に行えることは日常の衛生管理には非常に有用な検査法と言える。

比色系パルサー法については、前年度保健所で実施した結果³⁾ から、改善のために濃縮工程の時間短縮を図った。フィルターの孔径を 0.45 μ m に大きくしたところ、ろ過の時間が 1 検体当たり約 20 分から約 5 分に短縮され、なおかつ孔径 0.22 μ m フィルターと同等の結果が得られた。第 4 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 \times 2~20 μ m である。培養法のろ過濃縮工程においては、洗い出し操作で菌がフィルターから剥がれやすいように均一な表示径の円筒状孔を持つポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いるので、レジオネラ属菌が 0.45 μ m の孔を通過してしまう可能性がある。しかし、パルサー法に用いたセルロース製フィルターは網目構造のため、膜の内部に菌が入り込んで残りやすく、フィルターごと溶菌処理することでロスが少なかったと考えられる。保健所で実施したパルサー法につ

いて、前年度孔径 0.22 μ m のフィルターを用いて（-）であった施設の検体が、今回孔径 0.45 μ m のフィルターを用いて（+）となった。前年度よりレジオネラ菌数が少ないにも関わらず（+）となったことからパルサー法に使用するフィルターの孔径は 0.45 μ m がよいと言える。

E. 結論

浴場水のレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として厚生労働省から示された標準法は、定期的な水質検査に適した方法である。検査においては、濃縮試料だけでなく、非濃縮検体の検査実施も望まれる。

特定酵素基質培地と専用トレイを組み合わせたレジオラート/QT 法は、簡便な手技で *L.pneumophila* の検査ができ、平板培養法と同等の結果を得られた。日常の衛生管理に有用な検査法である。

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。検体をろ過した孔径 0.45 μ m のセルロース製フィルターに直接変性液を加える溶菌法を用いたパルサー法が活用できる可能性がある。

参考文献・通知

- 1) 「公衆浴場における水質基準等に関する指針」（平成 12 年 12 月 15 日生衛第 1811 号厚生省生活衛生局長通知 令和元年 9 月 19 日一部改正）
- 2) 「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」（令和元年 9 月 19 日付け薬生衛発 0919 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）
- 3) 佐々木麻里 他：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。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 30 年度総括・分担研究報告書：23-30
- 4) 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

感染症学会誌, 2010. 25 (1) : 8-14

5) Junko Amemura-Maekawa et al. : Legionella pneumophila and Other Legionella Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. Appl Environ Microbiol 84:e00721-18 (2018)

- 1) 佐々木麻里 他：環境水等からのレジオネラ属菌の検査法について、レジオネラ実技研修会、2019年4月、福岡。
- 2) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、令和元年度環境監視員担当者会議、2019年6月、大分。

F. 研究発表
研修会

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 平板培養法

前処理		希釈段階	平板塗抹量	検出限界	使用培地枚数	
大分法	濃縮試料	熱処理	1倍、10倍、100倍	各 200 μ L	5cfu/100mL	6枚
		未処理	1倍、10倍、100倍	各 200 μ L	5cfu/100mL	
標準法	濃縮試料	熱処理	1倍	100 μ L	10cfu/100mL	3枚
		酸処理	1倍	200 μ L	10cfu/100mL	
	非濃縮検体	1倍	200 μ L*	500cfu/100mL		

*通知に記載されている塗抹量は「100 μ L」

表 2. 標準法と大分法の比較 (n=45)

	標準法			計
	≥ 10 cfu/100mL		計	
	+	-		
大分法	+	21	4	25
≥ 5 cfu/100mL	-	1	19	20
計		22	23	45

表 4a. パルサー法 (孔径 0.22 μ m) と
平板培養法の比較 (n=17)

	パルサー 0.22 μ m			計
			計	
	+	-		
平板培養 法*	+	10	2	12
	-	2	3	5
計		12	5	17

*平板培養法は大分法

表 3a. レジオラートと大分法の比較 (n=45)

	レジオラート			計
	≥ 10 MPN/100mL		計	
	+	-		
大分法	+	17	8	25
≥ 5 cfu/100mL	-	0	20	20
計		17	28	45

表 4b. パルサー法 (孔径 0.45 μ m) と
平板培養法の比較 (n=17)

	パルサー 0.45 μ m			計
			計	
	+	-		
平板培養 法*	+	10	2	12
	-	4	1	5
計		14	3	17

*平板培養法は大分法

表 3b. レジオラートと標準法の比較 (n=45)

	レジオラート			計
	≥ 10 MPN/100mL		計	
	+	-		
標準法	+	16	6	22
≥ 10 cfu/100mL	-	1	22	23
計		17	28	45

表 4c. パルサー法フィルター孔径の比較
(n=17)

	0.45 μ m			計
			計	
	+	-		
0.22 μ m	+	12	0	12
	-	2	3	5
計		14	3	17

表 5. 保健所実施パルサー法結果

No.	採水年月	種類	泉質	培養結果		パルサー法
				菌数(100mL)	結果	
1	2020年2月	循環式	浴槽水	井水	5cfu 未満	(-)
2	2020年2月	循環式	湯口水	井水	5cfu 未満	(+)
3	2020年2月	循環式	浴槽水	水道水	25cfu	(-)
4	2020年2月	循環式	湯口水	水道水	45cfu	(+)

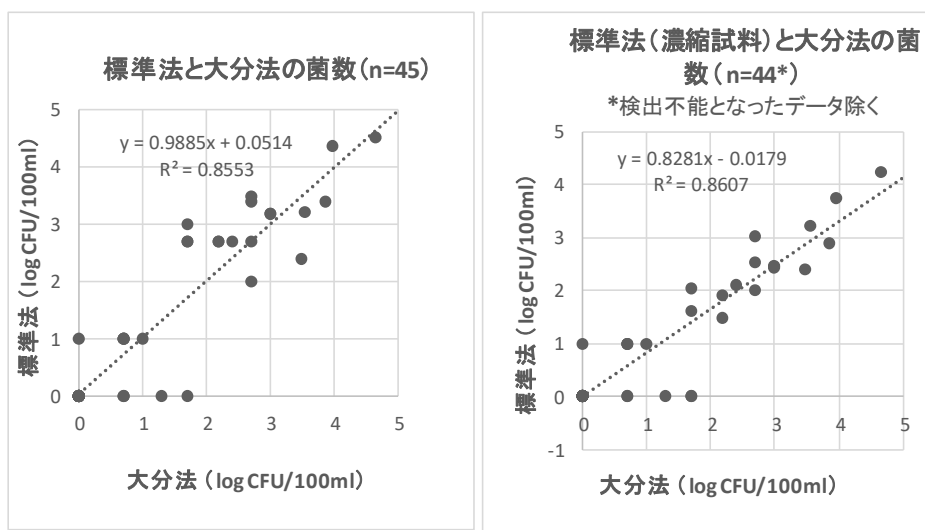


図1. 標準法と大分法との相関

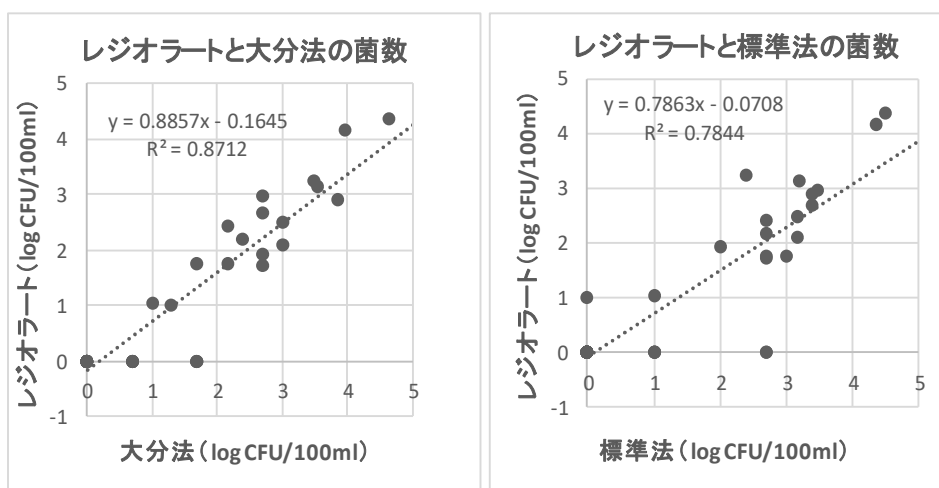


図2. レジオラートと平板培養法との相関

令和元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）
公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の
開発のための研究

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

公衆浴場等のイベント風呂で使われる柑橘系果物の清浄度試験の結果について

研究協力者 中臣 昌広（一般財団法人日本環境衛生センター）

研究協力者 井上 浩章（アクアス株式会社 つくば総合研究所）

研究要旨

公衆浴場やホテル・旅館等の入浴施設では、柚子、リンゴ、ポンタンなどの果物を浴槽に浮かべる、いわゆるイベント風呂を実施することがある。なかでも、表面に細かい凹凸がある柑橘系果物は、果実の収穫から運搬、消費者へ届くまでの過程で、汚れが表面に残りやすいと考えられる。柑橘系果物の表面の汚れの度合いはどのくらいなのか。どのような洗浄方法を使用すれば、表面の汚れを除去できるのか。実際に公衆浴場等で柑橘系果物をイベント風呂に使うとき、どのような衛生管理の注意点があるのか。これらの点にふれて、柑橘系果物の表面清浄度を上げることによって、公衆浴場等のレジオネラ症対策につなげたい。

A. 研究目的

ある施設の浴槽水の ATP 値を測定したところ、160 RLU と比較的高い値を示した。換水頻度と利用者数を確認したところ 3 日前に換水したばかりで、測定時の浴室の利用者は 2 名であった。特段の湯の濁りは認められず、湯の汚れが過剰に発生している状況ではなかったが、浴槽には柑橘類のポンタンが複数個浮かんでいた（写真 1）。これらのポンタンに土埃等の汚れが付着した状態で浴槽に入れられたのであれば、浴槽水にも影響する可能性が考えられた。ポンタンに収穫・出荷からの流通の過程において、表面に様々な汚れが付着することは容易に想像できる。



写真 1 イベント風呂（ポンタン湯）

『第4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）には、拭き取りの清浄度の目安がしめされており、浴槽壁等を10 cm 四方を綿棒で拭き取った時のATPの値が1000 RLUを超えないこととされる。この1000 RLUを目安として、ボンタン表面のATPを測定したところ、表面の数値は、77000 RLUであり、高い数値を示した。

イベント風呂で使われる柑橘系果物が浴槽水を汚染して微生物の増殖を促進し、結果としてレジオネラ属菌の増殖につながることはないよう、イベント風呂に使用する柑橘系果物の適切な衛生管理が求められるのではないだろうか。本研究では、ボンタンなど柑橘系果物をイベント風呂で使用する場合、浴槽水へ汚れが移行しないためにどのような衛生管理が必要なのかを検証した。

B. 研究方法

柑橘系果物の甘夏みかんを複数の方法で洗浄した後、実際のイベント風呂を想定した自宅の浴槽に浮かべ、表面の微生物汚染度の経時変化をみた。

洗浄方法

- ①水道水で手こすり洗い（写真2）
- ②中性洗剤でスポンジ洗い（写真3）
- ③歯ブラシ・こすり洗い（写真4）
- ④タワシ・こすり洗い（写真5）

甘夏みかんは表面を縦に4分割して、洗浄前、洗浄後、浴槽投入1日後、浴槽投入2日後の4点で表面清浄度を測定した。表面の一定面積（4分割の1区画）を拭き取りATP値（ルミテスターPD-30）、一般細菌数（標準寒天培地で37℃、24h）、従属栄養細菌数（R2A培地で20℃、7d）、真菌数

（PDA培地で25℃、7d）を測定した。一般細菌数、従属栄養細菌数、真菌数は拭き取った綿棒を10 mLの滅菌生理食塩水に懸濁させ、その懸濁液の菌数を測定した。比較試験として未洗浄の甘夏みかんを用いて、湯を張ったバケツに浸ける前、バケツ投入1日後、バケツ投入2日後の3点を同様に測定した。



写真2 水道水で手こすり洗い



写真3 中性洗剤でスポンジ洗い



写真4 歯ブラシ・こすり洗い



写真5 タワシ・こすり洗い

C. 研究結果及び考察

図1は未洗浄の甘夏みかん表面の微生物数の推移を示す。湯につけて1日後に甘夏みかん表面の微生物数が増加した。これは湯温が増殖に適しており、表面に付着していた微生物が増殖したためと考える。2日後には、表面の微生物量が減少する傾向にあったが、表面の汚れが湯へ移行することによって減少した可能性が考えられた。

図2の水道水で手こすり洗いは洗浄により表面の微生物数は一律減少した。しかし、浴槽に投入して1日後には表面の細菌数は増加し、2日後に表面の細菌数が大きく減少した。これは、手こすり洗いでは細かい

凹凸のある甘夏の表面の汚れが十分に取れておらず、湯に浸けたことで微生物数が増加し、2日目には逆に湯に浸かる時間が長くなり、表面の汚れが湯へ移行したために微生物量が減少した可能性が考えられた。

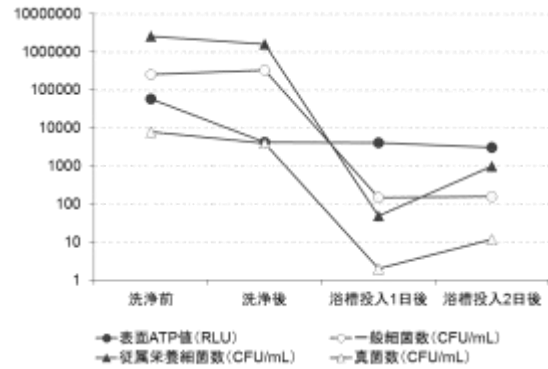


図3 中性洗剤でスポンジ洗い

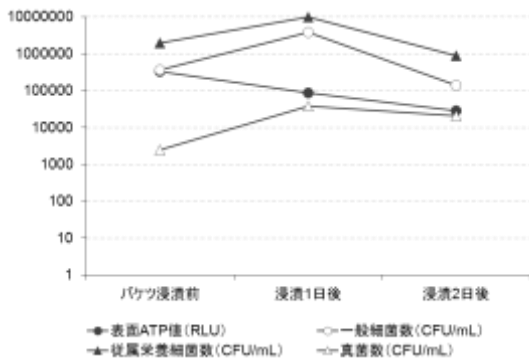


図1 未洗浄

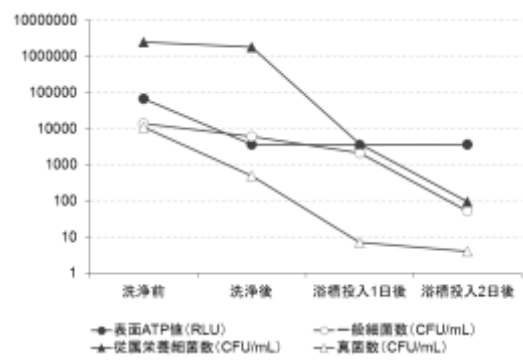


図4 歯ブラシ・こすり洗い

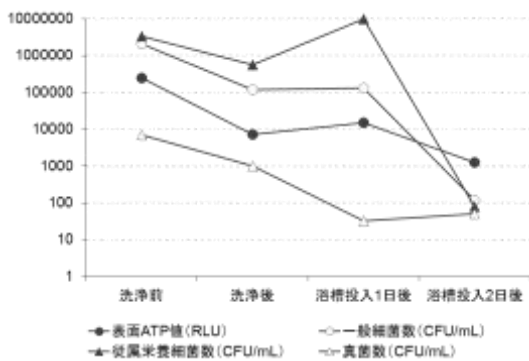


図2 水道水で手こすり洗い

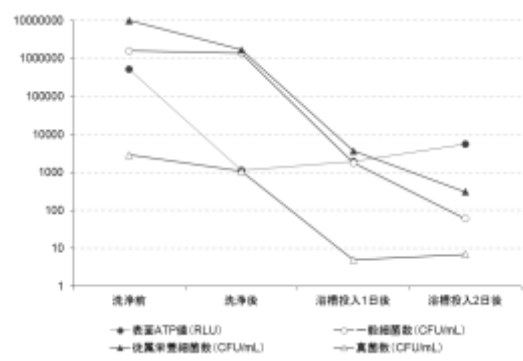


図5 タワシ・こすり洗い

一方、図 3 の中性洗剤スポンジ洗い、図 4 の歯ブラシ・こすり洗い、図 5 のタワシ・こすり洗いは、いずれも表面を洗った後の微生物量は減少傾向にあり、浴槽の湯に浸けて 1 日後、2 日後にはさらに減少した。これは、それぞれの洗いで表面の凹凸の部分まで一定の汚れを落とすことができたため、湯に浸けても微生物数が増加しなかったと考える。また、甘夏みかんの表面の一部に残っていた微生物は、浴槽の湯に投入しても表面で増殖することはなく、時間の経過とともに湯へ移行したため減少したと推測する。このことも表面の汚れが洗浄により減少したことを示唆すると考える。

D. 結論

今回の検討結果から、柑橘系果物の表面には微生物が存在しており、それらは中性洗剤のスポンジ洗い、歯ブラシ・こすり洗い、タワシ・こすり洗いによって減少する傾向にあった。したがって、イベント風呂に柑橘系果物を使う場合は、浴槽の衛生管理上、浴槽水を清浄に保ちレジオネラ属菌の増殖を抑制するためにも浴槽に投入する前に、スポンジ、ブラシ、タワシなどを使用した物理的洗浄の実施を提案する。

E. 参考文献

1. 『レジオネラ症対策のてびき』
中臣昌広著、倉文明監修、一般財団法人
日本環境衛生センター、2013 年発行

F. 研究発表

1. 報告文発表
『設備と管理』2020 年 5 月号 P32～P38、
株式会社オーム社

「公衆浴場、旅館・ホテルのレジオネラ
症対策、物理的に菌を除去する」

中臣昌広

2. 学会発表予定

日本防菌防黴学会第 47 回年次大会、
2020 年 9 月 24 日

「公衆浴場等のイベント風呂で使われる柑
橘系果物の清浄度試験の結果について」

中臣昌広、井上浩章

G. 知的所有権の取得状況

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）
令和元年度 分担研究報告書

公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の
衛生管理手法の開発のための研究

研究代表者： 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部

携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化

研究分担者： 田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター
研究分担者： 中西 典子 神戸市環境保健研究所
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： 田中 忍 神戸市環境保健研究所
研究協力者： 平塚 貴大 広島県立総合技術研究所保健環境センター
研究協力者： 井上 浩章 アクアス株式会社 つくば総合研究所
研究協力者： 縣 邦雄 アクアス株式会社
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： 増輪 文治 長崎県環境保健研究センター

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) の有効性を全国の検査機関で検証した。精度管理に必要な大腸菌とレジオネラニューモフィラ (LP) の定量管理した模擬試料の作製方法を考案し、回収実験および実試料の検査方法について標準作業書および作業用ワークシートを作成した。これらを用いて、全国の地方衛生研究所や民間研究所に協力を求めて、技術研修とともに実地検証を行った。協力機関の全体の回収率は大腸菌で70%~90%、LPで70%~130%であった。一つの協力機関の現地調査において、浴槽水34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85.7%、特異度は96.3%を示した。供試試料のLP数の定量性について、RDM法は培養法との間に相関は認められなかったが ($R^2 = 0.0104$)、定性的には妥当な成績を示した。RDM法は、全国の研究機関においても、一定の有効性が認められた。

A. 研究目的

レジオネラニューモフィラ (LP) は、自然環境において、原生動物と共生する他に、生物膜内の他の微生物とともに集塊として定着し、感染を伝播しうることが知られている¹⁾。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イ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り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²⁻³⁾。この方法により、現地で生死判別を含めたレジオネラ属菌の迅速判定 (約5分間) が可能となり、

血清群1株と非血清群1株に判別しながらレジオネラニューモフィラ数を1~2時間程度で定量することができる³⁾。本研究では、現地における衛生指導者と施設管理者との対話促進とレジオネラ対策技術の管理ツールとしての応用を目指す。

今回、3か所の検査機関により洗浄・消毒効果の迅速評価が行えるRDM法技術の検証を行い、現地調査を実施した結果を報告する。

B. 研究方法

1. 標準作業書及びワークシートの作成

1) レジオネラ属菌株を用いた菌量調整済み模擬試料の作製方法、同模擬試料を用いた添加回収実験、および実試料の検査の標準作業書を作成して、研究協力者に配布した(資料1)。

2) レジオネラ属菌株を用いた菌量調整済み模擬試料の作製方法、同模擬試料を用いた添加回収実験、および実試料の検査のワークシートを作成して、研究協力者に配布した(資料2)。

3) レジオネラリスク評価用フローサイトメーター(miniPOC, シスメックスパルテック社)の取扱説明書を作成して、研究協力者に配布した(資料3)。

4) 菌量調整済み大腸菌模擬試料の作製方法の標準作業書および検査のワークシートを作成して、研究協力者に配布した(資料4)。

2. 模擬試料の作製

1) 大腸菌

大腸菌は、当所で保管している腸管出血性大腸菌株を用いた。RDM法で検出する粒子や細胞は、miniPOCのレーザー波長532nmに合った蛍光色素で標識される必要がある。ここで本装置の仕様がヒト白血球専用で細菌に対応していないために細菌を核酸染色と免疫蛍光染色という異なる手法により細菌染色の有効性を確認する必要がある。確認用の対象微生物として核酸染色色素propidium iodide (PI, Wako chemicals)に染まりやすいために大腸菌を選択した。一方で、免疫蛍

光染色に用いた市販の抗大腸菌抗体は一般的な大腸菌株と反応せず、腸管出血性大腸菌O157H7とのみ反応したために、今回は本菌株を使用した。

供試した腸管出血性大腸菌は上記標準作業書に基づいて菌量を調整した後で、Eugeneらの方法⁴⁾に基づいて不活化処理を行った。即ち、試料はpH7.0リン酸緩衝液で調製し、遊離塩素として2mg/Lになるよう次亜塩素酸ナトリウムを添加した後、室温で10分間反応させた。その後に塩素と等量のチオ硫酸ナトリウムで中和した調整試料1mLを15mL標準寒天培地で混釈して、寒天が固化したのち5mLの同培地を重層して、36°Cで48時間培養して不活化されていることを確認した。元の試料は、終濃度0.05%グルタルアルデヒドおよび終濃度0.1%アジ化ナトリウムを用いて固定し、その後の試験に供した。

大腸菌の模擬試料は最終濃度 10^4 、 10^3 および 10^2 CFU/mL見当となるように調整し、それぞれEC-A、EC-BおよびEC-Cとした。

2) LP血清群1およびLP非血清群1

LP血清群1はATCC33152株、LP非血清群1は循環風呂ろ材由来の当所保存株(LP型別不能)を用いた。資料1のとおりで作製した模擬試料を上記大腸菌と同じように不活化処理後に固定した。なお、遊離塩素処理後に中和した菌液は、その0.1mLをBCYE α 寒天培地に塗抹して36°Cで1週間培養し、不活化処理の有効性を確認した。

LP血清群1の模擬試料は、最終濃度 10^4 、 10^3 および 10^2 CFU/mL見当となるように調整し、それぞれSG1-A、SG1-BおよびSG1-Cとした。

LP非血清群1の模擬試料は、最終濃度 10^4 、 10^3 および 10^2 CFU/mL見当となるように調整し、それぞれUT-A、UT-BおよびUT-Cとした。

3) 模擬試料の菌量検証とその安定性

資料1および資料2に準拠して、SG1-A、SG1-BおよびSG1-C、ならびにUT-A、UT-BおよびUT-Cを作製した。資料4に準拠してEC-A、EC-BおよびEC-Cを作製した。

これらの試料の保存性を検証するために、作製

後に 4℃で保管した試料を当日、23 日目、50 日目および 90 日目で測定し、測定値の推移を確認した。測定は 3 回繰り返した。

3. 各種染色試薬および測定機器

1) 核酸染色試薬

消毒効果判定時に使用する核酸染色では、PI を 0.1% になるように滅菌蒸留水に溶解し、冷蔵保存して使用した。試料 1 mL と 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) を含む希釈液 1 mL を混合し、PI を 10 μL 加えたのち、5 分間静置させ、後述のフローサイトメーターにより計測して得られた数値を細菌数 (Total Bacterial Counts) とした。消毒効果を判定する場合には、田栗らの方法³⁾に準拠して、この値が 1000 cells/mL 未満であった場合に消毒効果有り、1000 cells/mL 以上であった場合に消毒効果なしと判定した。

2) 各種免疫蛍光染色試薬

各種免疫蛍光染色試薬は、市販の抗大腸菌抗体 (V1091, Virostat)、抗 LP 血清群 1 抗体 (V6051, Virostat) および抗 LP 非血清群 1 抗体 (アークリソース) を購入し、田栗らの方法³⁾に準拠して、Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて作製した。抗大腸菌抗体、抗 LP 血清群 1 抗体および抗 LP 非血清群 1 抗体を用いて作製した免疫蛍光染色試薬を、それぞれ FL EC、FL lp SG1 および FL ARK_lp とした。これらの試薬は各抗体約 2 mg/mL を含む。

3) 携帯型フローサイトメーターの使用法

フローサイトメーターは田栗らの方法³⁾に準拠して、miniPOC により標的細胞数を計測した。

4) 細菌の培養方法

模擬試料調製時における大腸菌の計数は標準寒天培地による混釈平板法を用い、LP の計数はレジオネラワーキンググループの方法⁵⁾に準拠した。実試料については、採取した研究機関の操作法に準拠することとした。今回施設調査を実施した機関は上記と同じ方法を採用していた。

4. 各種実験の方法

1) 技術研修

資料 1~4 の標準作業書およびワークシート等を用いて、2 施設の地方衛生研究所と 1 施設の民間研究所の 4 名の研究協力者を対象として技術研修を実施した。

2) 添加回収実験

技術研修ののちに、2 施設の研究所に各種模擬試料および試薬等を配布して、各研究所にて資料 1 および資料 2 に則した回収実験を実施した。

なお、別の 1 施設の研究所において、設置機器の調整不良により回収実験が間に合わなかったため本報告書には結果を記載していない。

3) 実試料の調査

1 施設の研究所において、34 検体の循環ろ過式浴槽水を採水し、14 検体は自研究所で処理し、20 検体は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。輸送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。RDM 法については資料 4 に準拠して、各々の研究所で行ったが、培養検査は採水地の研究所で全検体を処理した。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。

C. 結果及び考察

1. 添加回収実験の結果

1) 模擬試料の菌量検証とその安定性

これらの試料の保存性を検証するために、菌量を調整し、殺菌および固定の後に 4℃で保管した試料を作製後 1 日目、23 日目、50 日目および 90 日目で測定し、測定値の推移を確認した (図 1)。

大腸菌模擬試料 EC-A、EC-B および EC-C の生菌数はそれぞれ 5.30×10^4 CFU/mL、 6.05×10^3 CFU/mL および 5.45×10^2 CFU/mL であった。作製後 1 日目の EC-A、EC-B および EC-C のフローサイトメトリー (FCM) による核酸染色の測定値はそれぞれ 4.61×10^4 cell-equivalent

counts/mL (以下 CEC/mL と略す)、 4.87×10^3 CEC/mL および 5.56×10^2 CEC/mL であり、免疫蛍光染色の測定値は 6.07×10^4 CEC/mL、 7.41×10^3 CEC/mL および 8.57×10^2 CEC/mL であった。

LP 血清群 1 模擬試料 SG1-A、SG1-B および SG1-C の生菌数はそれぞれ 6.60×10^4 CFU/mL、 5.25×10^3 CFU/mL および 8.95×10^2 CFU/mL であった。作製後 1 日目の SG1-A、SG1-B および SG1-C の FCM による核酸染色の測定値はそれぞれ 2.57×10^4 CEC/mL、 2.84×10^3 CEC/mL および 7.14×10^2 CEC/mL であり、免疫蛍光染色の測定値は 1.35×10^5 CEC/mL、 1.45×10^4 CEC/mL および 2.06×10^3 CEC/mL であった。

大腸菌模擬試料は核酸染色および免疫蛍光染色ともによく染まり、FCM 測定値は生菌数とほぼ同等の値を示した (図 1)。LP 血清群 1 模擬試料は免疫蛍光染色には染まるものの核酸染色に染まりにくい傾向にあり、核酸染色では測定値のばらつきも顕著であった (変動係数 CV: 5~77%)。EC-A の CV は核酸染色で 1~5%、免疫蛍光染色で 1~3% であり、EC-B の CV は核酸染色で 1~9%、免疫蛍光染色で 3~8% であったが、EC-C の CV は核酸染色で 5~46%、免疫蛍光染色で 9~47% とばらつきが大きかった。LP 血清群 1 模擬試料の免疫蛍光染色による測定値において、SG1-A の CV は 1~6%、SG1-B の CV は 2~9% であったが、SG1-C の CV は 9~21% とばらつきが大きかった。大腸菌模擬試料の核酸染色および免疫蛍光染色、並びに LP 血清群 1 模擬試料の免疫蛍光染色において、試料作製後 1 日目は免疫蛍光染色の測定値が比較的高めに検出される傾向にあったものの 23~50 日は安定的に推移し、90 日後には若干 FCM 測定値が生菌数と比較してやや減少していたもののほぼ同等の値が認められた (図 1)。ただし、これらは静置した冷蔵保存状態の安定性であり、現段階で回収実験等の物理的な負荷がかかるときの安定性を保証するものではない。

2) 研究協力施設における回収実験

施設 A および B において実施した回収実験の結果を表 1 に示した。

施設 A において、LP 血清群 1 模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $0.94 \times 10^3 \sim 1.02 \times 10^5$ CFU/mL であり、回収率は 97.7%~121.0% を示した。LP 非血清群 1 模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $1.01 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5$ CFU/mL であり、回収率は 103.8%~130.8% を示した (表 1)。

施設 B において、大腸菌模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $1.4 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5$ CFU/mL であり、回収率は 76.2%~83.7% を示した。LP 血清群 1 模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $4.0 \times 10^2 \sim 3.1 \times 10^4$ CFU/mL であり、回収率は 70.8%~112.9% を示した。LP 非血清群 1 模擬試料の配布時の菌量は生菌数として $3.0 \times 10^2 \sim 2.9 \times 10^4$ CFU/mL であり、回収率は 51.2%~76.2% を示した (表 1)。

2. 入浴施設調査の結果

施設 A においては、34 循環ろ過式入浴施設の調査を実施した。図 2 には培養法と RDM 法の相関図、表 2 には培養法と RDM 法との定性結果の比較並びに図 3 には RDM 法の消毒効果閾値、定量値および生菌数結果の相互関係の比較を示した。

本施設調査において、培養法と RDM 法との間に相関は認められなかったが (図 2)、感度と特異度はそれぞれ 85.7% と 96.3% であり (表 2)、概ね消毒効果の閾値を逸脱した検体からのみレジオネラ生菌が分離されていることが確認された (図 3)。

田栗らの報告³⁾と比べると培養法と RDM 法がともに検出限界 (培養法: 10 CFU/100mL, RDM 法: 10 CEC/100mL) を超えた検体が少なく、定量値が低い傾向にあったことから、両者の相関の違いについては未だ確定的なことは言及できない。しかし、消毒効果判定とレジオネラ数生菌値との比較において、他施設でも、消毒効果が認め

られない浴槽水においてレジオネラの生菌が検出されるということが実証された。

E. 結論

協力機関における模擬試料を使った RDM 法の回収率は大腸菌で 70%~90%、LP で 70%~130%を示した。現地調査において、浴槽水 34 試料について、定量的な相関は認められなかったもの、RDM 法の培養法に対する感度は 85.7%、特異度は 96.3%を示し、消毒効果判定能の妥当性ととも定性的には培養法と同等の成績を示した。以上から、RDM 法は全国の研究機関においても一定の有効性が認められたといえる。

F. 参考文献

- 1) Abdel-Nour, M, Duncan, C, Donald, E L and Guyard, C, Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*, *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 21660–21675, 2013.
- 2) 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.
- 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, 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 28~30 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 31–36, 2019.
- 4) Eugene W. R, Robert M C, and Clifford H J, Chlorine Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Emerging Infectious Diseases*, **5**, 461–463, 1999.
- 5) 森本 洋ら, 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, 研究代表者: 倉 文明, 93–130, 2012.

G. 学会発表

- 1) 田栗 利紹, 蔡 国喜, 新道 欣也, 下田 貴宗, 倉 文明, 前川 純子, レジオネラニューモフィラの定量検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の有用性評価, 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会, 2019.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

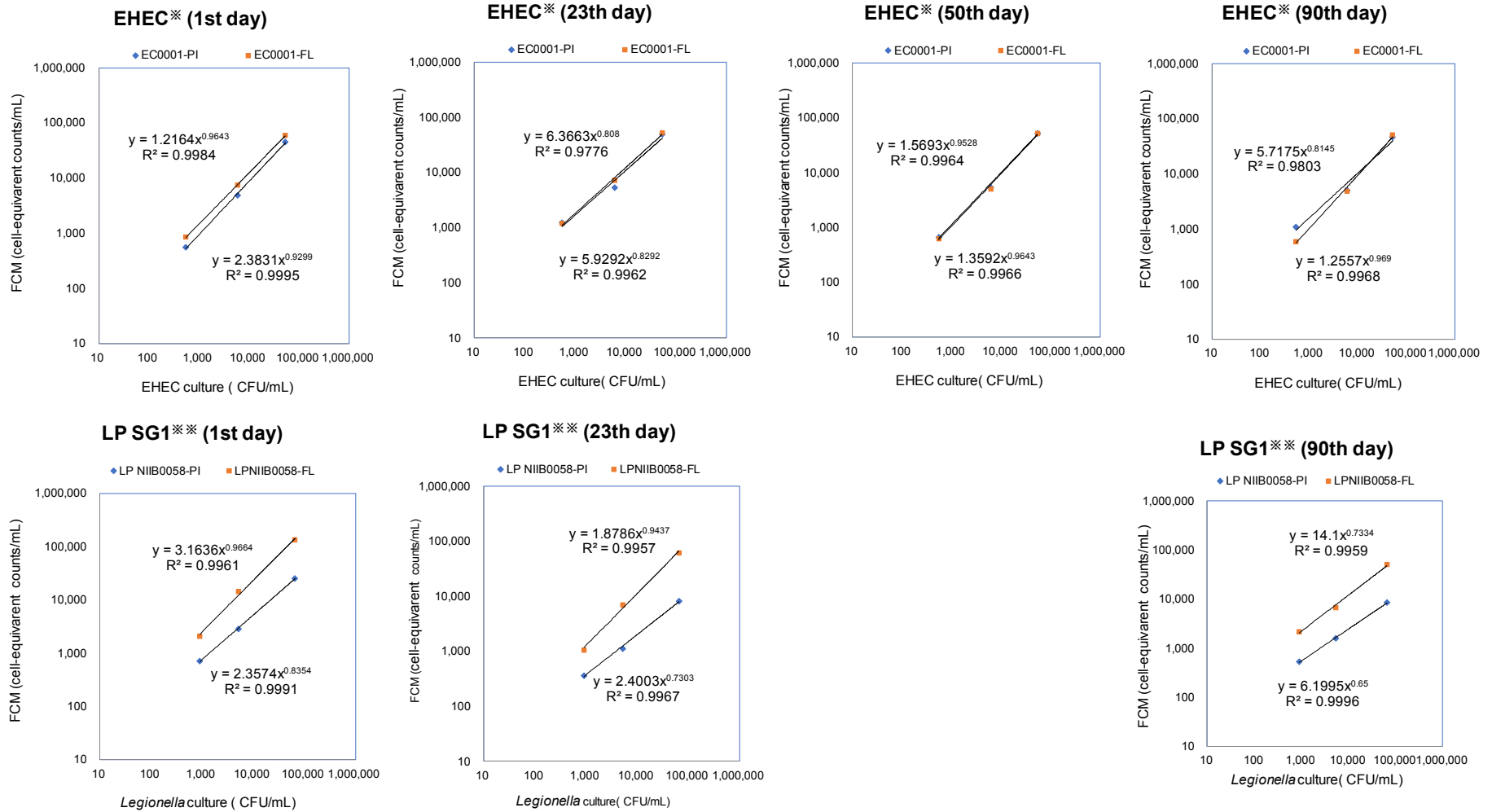


図1. 菌量調整済み模擬試料の安定性

※EHEC: enterohemorrhagic *Escherichia coli*, ※※LP SG1: *Legionella pneumophila* serogroup 1

表 1. 施設ごとの回収実験結果

	施設A		施設B	
	配布時の菌量 (CFU/mL)	回収率	配布時の菌量 (CFU/mL)	回収率
EC-A			1.1×10^5	78.8%
EC-B			1.2×10^4	76.2%
EC-C			1.4×10^3	83.7%
SG1-A	1.02×10^5	97.7%	3.1×10^4	70.8%
SG1-B	0.85×10^4	112.2%	3.1×10^3	112.9%
SG1-C	0.94×10^3	121.0%	4.0×10^2	86.3%
UT-A	1.1×10^5	103.8%	2.9×10^4	73.4%
UT-B	1.16×10^4	130.8%	2.9×10^3	51.2%
UT-C	1.01×10^3	118.8%	3.0×10^2	76.2%

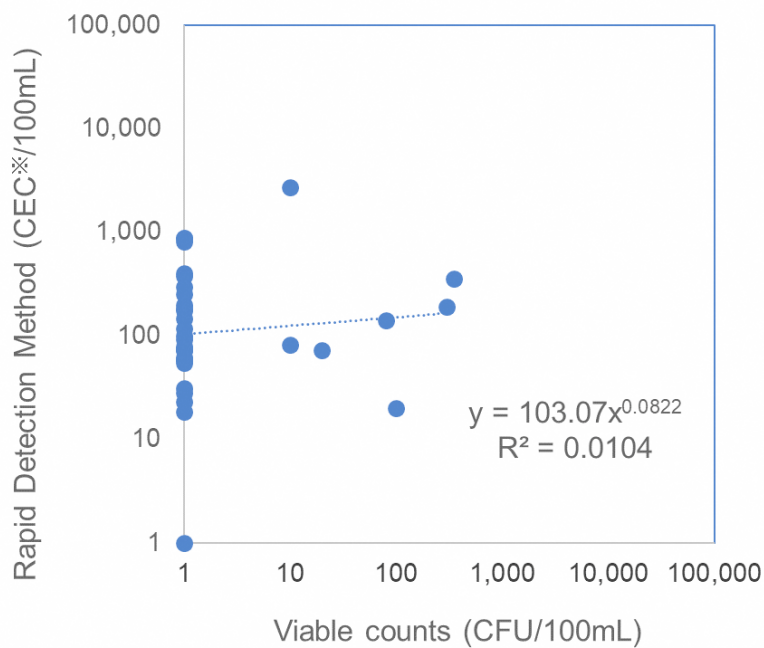
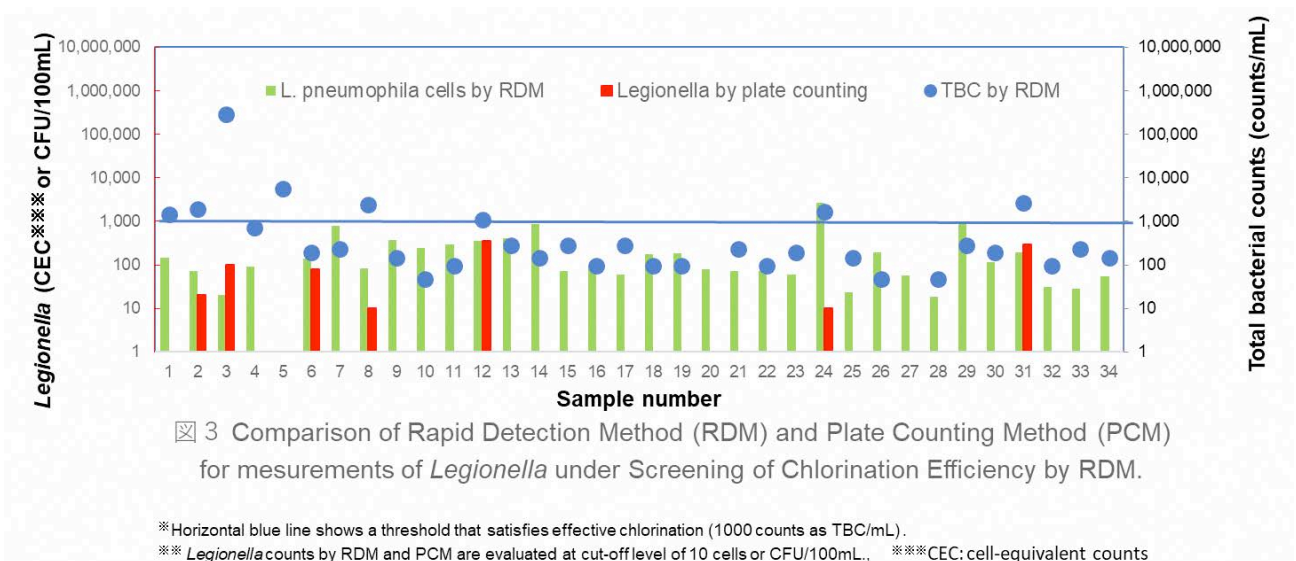


図2. 培養法とRDM法のレジオネラ菌数の相関

CEC: cell-equivalent counts

表 2 培養法とRDM 法との定性結果の比較 (N =34)

		平板培養法 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	
Rapid Detection Method (cell-equivalent counts/100mL)	≥10	6	1	7
	<10	1	26	27
		7	27	34
感度	85.7%	特異度		96.3%



検査実施標準作業書

SOP No.	
作成年月日	令和元年 5 月 8 日
改訂年月日	令和元年 11 月 26 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：レジオネラニューモフィラ定量
2. 試験の種類：レジオネラニューモフィラ標準菌株による模擬試料の作製
3. 検体の採取および試料の調製：-80 保存の *Legionella pneumophila* 標準菌株を BCYE 培地に復元後（接種後 36 ± 1 で 24 時間培養して冷蔵保存、シャーレ周りをパラフィルム等でシールすること）、増菌培地（*Legionella* LC Medium Base (9016, TAKARA), BYE (自家調製) 等）1 mL 入り 1.5 mL マイクロチューブに小コロニー 1 ~ 数個程度を接種して、恒温水槽で 36 ± 1 、18 ~ 24 時間培養した後の懸濁液の上清 0.5 mL を 4.5 mL PBS (pH7.2) に接種して原液とする。この時の原液は、これまでの実績から約 $1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/mL と推定される。予め 9 mL PBS (pH7.2) を入れた中試験管を必要分調製して、4 段階で 10 倍段階希釈列を作製した後、 10^2 および 10^3 cells/mL と予測される試料の 0.1 mL を各 2 枚の BCYE 培地に接種してコンラージ棒で塗抹する。 10^7 (原液)、 10^6 および 10^5 cells/mL オーダーの希釈液のそれぞれ 1 mL を予め 99 mL PBS (pH7.2) を入れた 100 mL 滅菌容器に接種して、 10^5 、 10^4 および 10^3 cells/mL オーダーの希釈液とし、各希釈液の菌数を測定する。適切に希釈して希釈液の濃度が 10^2 および 10^3 cells/mL と予測される試料の 0.1 mL (低菌数が予測される場合は 0.5 mL まで増やしてよい；この時の希釈倍率に要注意) を各 2 枚の BCYE 培地に接種してコンラージ棒で塗抹する。 36 ± 1 、72 ~ 96 時間培養した後、1 平板に 30 ~ 300 の集落がえられたものを生菌数として計測する。
4. 使用する機械器具の選択
 - 高圧蒸気滅菌器
 - 滅菌採取器具 (薬さじ、はさみ、ピンセット等)
 - 滅菌採取ピン
 - 滅菌シャーレ (直径9 ~ 10 cm、深さ2.0 cm)
 - 中試験管
 - 滅菌ピペット (1 mL、10 mL)
 - マイクロピペット (1 mL)
 - マイクロチップ (1 mL)
 - ふ卵器 ($36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)
 - 恒温水槽
 - 電子天秤
 - メスシリンダー
 - 三角フラスコ
 - ストマッカー
 - ステリカップフィルターユニット

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1 L として、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験ではフィルターろ過は2回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

グルタルアルデヒド溶液

グルタルアルデヒドの 50% 溶液、20% 溶液、和光純薬製または同等品を用いる。市販品を適切に希釈して 5% 液を調製、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。最終濃度が 0.05% となるように試験液に注入する。

アジ化ナトリウム溶液

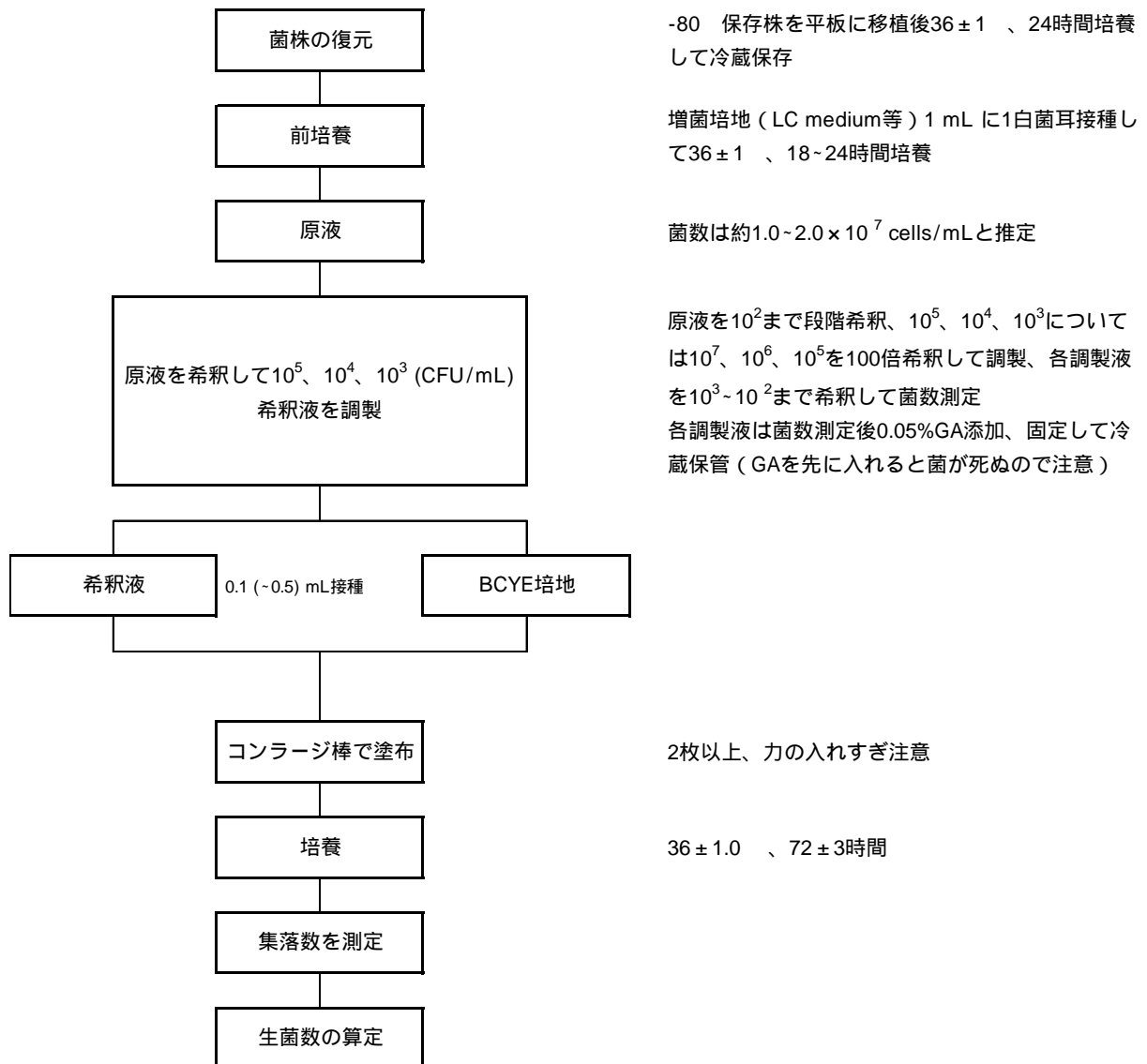
アジ化ナトリウムの和光純薬製または同等品を用いる。市販品を適切に希釈して 10% 液を調製、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。最終濃度が 0.1% となるように試験液に注入する。

2) 培地

BCYE 培地 (市販の生培地; ビオメリューなど)

使用前に常温に戻して試験に供す。ふらん器での乾燥は行わない。

6. 製品検査の方法



7. 製品検査にあたっての注意事項

- 1) 試料の滅菌シャーレへの分注から冷却凝固までの操作は、20分以内に完了する。
- 2) 対照として、検体の希釈に用いた滅菌生理食塩水 1 mL に、試料に用いた同一同量の培地を混合し培養したものをを用いて、生理食塩水および培地が無菌であったこと並びに操作が完全であったことを確認する。

8. 製品検査の結果の処理

1) 集落数の算定

1 平板に 30～300 個の集落数がある場合

a) 1 段階の希釈にのみ 30～300 個の集落数が得られた場合：2 枚の平板の集落数の算術平均を求める。

b) 連続した 2 段階の希釈に 30～300 個の集落数が得られた場合：希釈ごとに 2 枚の平板の算術平均を算定し、両者の比を求める。

- 両者の比が 2 倍未満のときは、以下の計算式により連続する 2 段階の希釈平板の集落数から菌数を算定する。

$$N = \{ (A+B) / 2d_1 + (C+D) / 2d_2 \} / 2$$

A, B：低希釈の集落数

C, D：高希釈の集落数

d₁：希釈が低いほうの希釈倍率

d₂：希釈が高いほうの希釈倍率

- 両者の比が 2 倍を超えたときは希釈段階の低いほうの集落数の算術平均を求める。

全平板が 300 個を超えた集落数である場合

最も希釈倍率の高いものについて、正確に 1 cm² の区画のある密集集落計算版を用いて計測する。

a) 1 cm² の区画に 10 個以下の集落数の場合：中心を通過し直行する 2 直径を作り、その中心より区分された 1 cm² 区画の 6 箇所集落数を数えて、1 cm² 区画の平均集落数を求め、これに滅菌シャーレの面積を乗じて 1 平板あたりの集落数を算出する。直径 9 cm の滅菌シャーレでは、得られた 1 cm² の平均集落数に 65 を乗じる。

b) 1 cm² の区画に 10 個以上の集落数の場合：前記と同様にして 4 区画の集落数から 1 cm² 区画の平均集落数を求め、滅菌シャーレの面積を乗じて 1 平板あたりの集落数を算出する。

全平板が 30 個未満の場合

最も低い希釈倍数に 30 を乗じる。試料液は 10 倍希釈であるので 300 以下として記載する。

拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分を計測する

a) 他の集落がよく分散していて、拡散集落があっても計測に支障のないもの。

b) 拡散集落の部分が平板の 1/2 以下の場合。

2) 菌数の記載

算定対象とした平板の集落数に希釈倍数を乗じ、さらに得られた数字の上位 3 桁目を四捨五入して、上位 2 桁を有効数字として表示し、1 mL 当たりの菌数とする。例えば、算定された菌数値を 30500/mL または 3.1×10^5 /mL と記載し、試料液は 10 倍希釈されているので、算定された菌数値を 10 倍した値が 1 mL 当たりの菌数となる。試料液はなお、最低希釈平板の集落発生数が 30 未満の場合も、必要があれば測定値をそのまま記載しておく。

検査実施標準作業書

SOP No.	
作成年月日	令和元年 5 月 8 日
改訂年月日	令和元年 12 月 16 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：レジオネラニューモフィラ定量
2. 試験の種類：フローサイトメトリーによる模擬試料の添加回収実験
3. 検体の採取および試料の調製：予め 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mL オーダーの生菌数測定済み模擬試料を調製して冷蔵保存したものを常温に 15 分以上放置する。まず、各非濃縮模擬試料についてそれぞれの菌数を測定する。全菌数測定に際しては、検体 1 mL を 5 mL チューブに分取し、0.1% MTAB 希釈液 1 mL と混合し、0.1%の蛍光色素 PI 10 μ L を加えた後、5 分間静置し、携帯型フローサイトメーター (FCM) にセットして測定する。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と蛍光強度を 2 つの指標としてエリア内の細胞を計数する。レジオネラ菌数測定に際しては各試料 1 mL を 5 mL チューブに分取し、等量の 0.1%BSA 入り PBS および 1.5 μ L の抗レジオネラ属菌用染色試薬 FL Lp SG1 を加えて常温で 30 分間、旋回振とうしたものを FCM にセットして特定エリア内の粒子数を算出する。PI 染色で得られた数値とレジオネラニューモフィラ (Lp) 特異染色で得られた数値 (μ L: 装置に表示される) に装置独自の補正值 (2000/42) を掛け合せて、それぞれ細菌数および Lp 数とする。 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mL オーダーの生菌数測定済み模擬試料の各 1 mL を 500 mL PBS に挿入して 10^0 、 10^1 および 10^2 cells/mL オーダーの模擬試料を作製する。0.2 μ m Membrane Filter でろ過濃縮したのち、MF を 55 mm シャーレに貼付け、0.6 mL PBS に等量の 0.1%BSA 加 PBS を加えて、10 回以上 MF 表面をピペッティングで洗い出すことにより回収する。回収液 1 mL に染色試薬 FL Lp SG1 0.75 μ L と FL non_Lp SG1 0.75 μ L (あらかじめ等量を混合しておき 1.5 μ L を加えてもよい) を加えて、30 分間回転振盪したのち、ディスポシリンジで 0.8 mL を採取し、目盛を 1.1 mL に合わせて FCM に設置、測定する。Lp 特異染色で得られた数値 (μ L: 装置に表示される) に装置独自の補正值 (2000/42) を掛け合せて、回収後の Lp 数とする。予め求めた非濃縮液菌数の 2 倍の値と回収した菌数により回収率を求める。
4. 使用する機械器具の選択
 - 高圧蒸気滅菌器
 - 滅菌採取器具 (葉さじ、はさみ、ピンセット等)
 - 電子天秤
 - りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2, Wako chemicals)
 - ポリカーボネート製ポリ瓶 (1 L、12本、洗浄後からの状態で予め滅菌しておく)
 - スTERILカップフィルターユニット (1 L用)
 - フローサイトメーター (miniPOC; Sysmex)
 - 染色試薬 (0.1% propidium Iodide (PI)、2 mg/L LP血清群I用染色試薬 (FL Lp SG1)、2 mg/L Lp非血清群I染色試薬 (FL non-Lp SG1))
 - 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) (核酸染色用緩衝液)

- 0.1% BSA入りPBS (特異抗体染色用緩衝液)
- 小形滅菌シャーレ (直径60 mm、深さ10 mm)
- 中試験管またはディスポポリチューブ
- 滅菌ピペット (1 mL、10 mL)
- マイクロピペット (1 mL)
- マイクロチップ (1 mL用、10 µL用)
- マイクロチューブ (5 mL)
- オールプラスチックシリンジ (2 mL)
- ふ卵器 (36 ± 1)
- 恒温水槽
- メスシリンダー
- 三角フラスコ
- ストマッカー

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

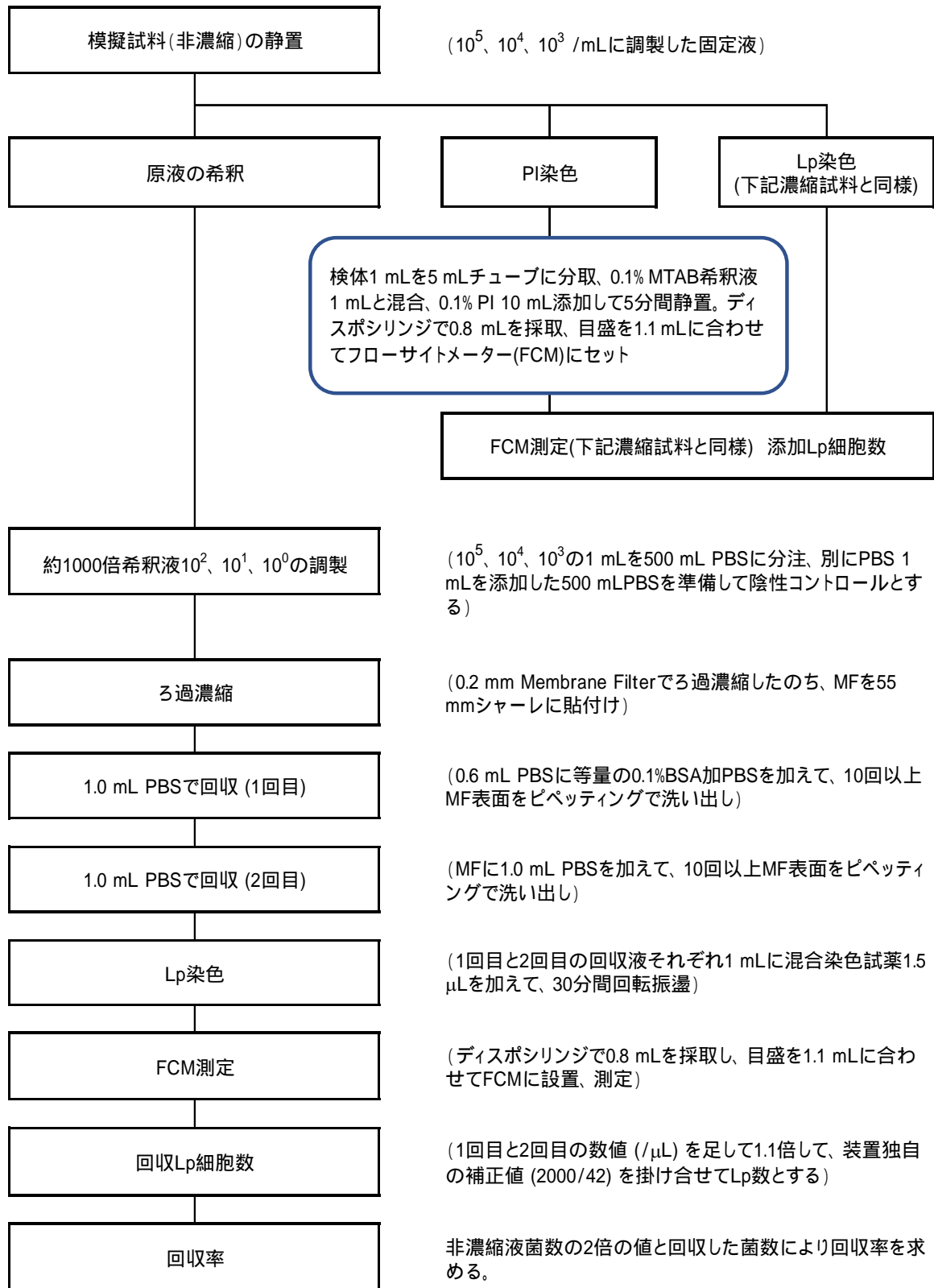
Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2)を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、0.2 µm ボトルトップフィルターでフィルターする。フローサイトメトリー用実験であるのでフィルターする時は 2 回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

フローサイトメトリー用染色試薬

- 0.1% propidium iodide (全菌数測定用)
- 2 mg/L Lp 血清群 1 用染色試薬 (FL Lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (V6051, virostat 社) の 2 mg/L × 0.5 mL をキット取説に沿って標識し、40 µL ずつ小分けして冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 2 mg/L Lp 非血清群 1 染色試薬 (FL non_lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (アークリソース社) の 2 mg/L × 0.5 mL をキット取説に沿って標識し、50 µL ずつ小分けして冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)
- 0.1% BSA 入り PBS: で作製した PBS500 mL ~ 100mL に 0.1% となるように 10%BSA (ミリテニーバイオテク社) を加えて調製する。

6. 製品検査の方法



検査実施標準作業書

SOP No.	
作成年月日	令和元年 11 月 28 日
改訂年月日	令和元年 月 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：レジオネラニューモフィラ定量
2. 試験の種類：フローサイトメトリーによる実試料の検査

3. 検体の採取および試料の調製：

(消毒効果判定) 試料は終濃度 500 mg/L (望ましくは 50 mg/L) となるようにチオ硫酸ナトリウムを入れた 500 mL あるいは 1 L の滅菌済み PP プラスチック容器に採水する。採水後の試料は冷蔵保存して遅くとも 1 週間以内に試験に供する。最初にフローサイトメーター (FCM) を用いて非濃縮浴槽水中の塩素消毒効果を判定する。即ち、検体 1 mL を 5 mL チューブに分取し、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 (PI) 10 μ L を加えた後、FCM にセットして全細菌数 (TBC) を測定する。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とする。この時、試料中の TBC が判定基準値 1000 counts/mL を越した場合は「消毒効果なし」と判定して、続くレジオネラニューモフィラ (Lp) 特異検査で Lp が検出された場合は生菌と判断する。一方で、1000 counts/mL 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定する。

(Lp の特異的定量) 施設調査における Lp 定量は、Lp SG1 用染色試薬 (FL Lp SG1) と Lp 非 SG1 染色試薬 (FL ARK_Lp) を用いる。検水 500 mL を吸引し過した後、0.2 μ m Membrane Filter (MF) を 55 mm シャーレに貼付け、0.6 mL PBS に等量の 0.1% BSA 加 PBS を加えて、10 回以上 MF 表面をピペティングで洗い出すことにより回収する。次いで、回収後のシャーレに 1 mL 0.1% BSA 加 PBS を加えて前述と同じ操作を繰り返し 2 回目の回収液とする。各回収液 1 mL に染色試薬 FL Lp SG1 0.75 μ L と FL non-Lp SG1 0.75 μ L (あらかじめ等量を混合しておき 1.5 μ L を加えてもよい) を加えて、30 分間回転振盪させたのち、ディスポシリンジで約 0.8 mL を採取し、目盛を 1.1 mL に合わせて FCM に設置して測定する。この時、Lp 特異染色試薬由来の測定ノイズを除くように予め設定した特定エリア内の細菌数 (μ L: 装置に表示される) を計数し、装置由来の誤差 (2000/42) と回収時に発生する誤差 (容量比: 1.1) を補正したのち、予め作成した検量線により濃度換算して Lp 数とする。

4. 使用する機械器具の選択

- 高圧蒸気滅菌器
- 滅菌採取器具 (薬さじ、ピンセット等)
- 電子天秤
- りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2, Wako chemicals)
- ポリカーボネート製ポリ瓶 (1 L、12本、洗浄後からの状態で予め滅菌しておく)
- スTERILカップフィルターユニット (1 L用)

- フローサイトメーター (miniPOC; Sysmex)
- 染色試薬 (0.1% propidium Iodide (PI)、2 mg/L LP血清群1用染色試薬 (FL Lp SG1)、2 mg/L LP非血清群1染色試薬 (FL non_Lp SG1))
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) (核酸染色用緩衝液)
- 0.1% BSA入りPBS (特異抗体染色用緩衝液)
- 小形滅菌シャーレ (直径60 mm、深さ10 mm)
- 中試験管またはディスポリチューブ
- 滅菌ピペット (1 mL、10 mL)
- マイクロピペット (1 mL)
- マイクロチップ (1 mL用、10 µL用)
- マイクロチューブ (5 mL)
- オールプラスチックシリンジ (2 mL)
- ふ卵器 (36 ± 1)
- 恒温水槽
- メスシリンダー
- 三角フラスコ
- ストマッカー

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

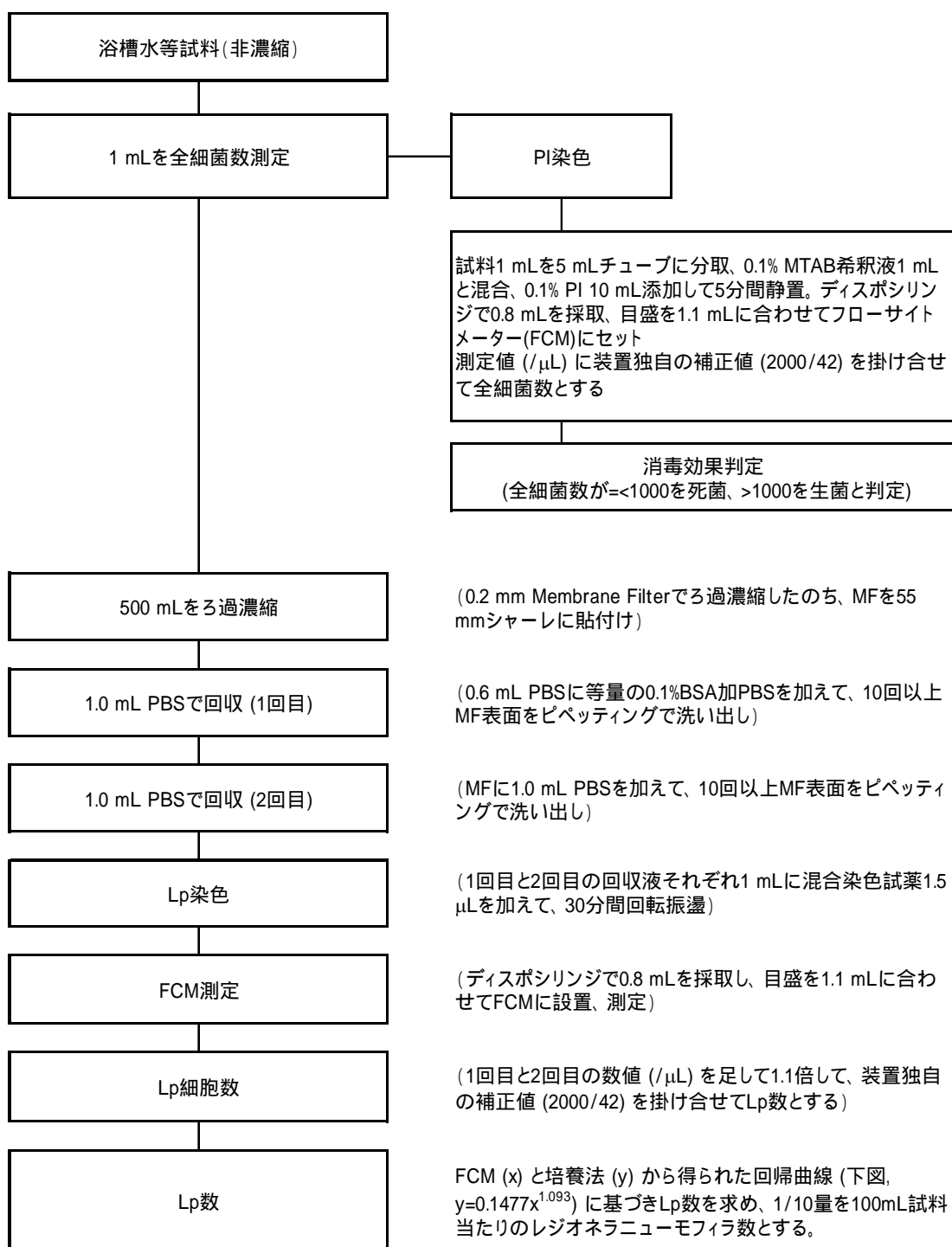
Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、0.2 µm ボトルトップフィルターでフィルターを過す。フローサイトメトリー用実験であるのでフィルターを過すは 2 回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

フローサイトメトリー用染色試薬

- 0.1% propidium iodide (全菌数測定用)
- 2 mg/L LP 血清群 1 用染色試薬 (FL Lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (V6051, virostat 社) の 2 mg/L × 0.5 mL をキット取説に沿って標識し、40 µL ずつ小分けして冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 2 mg/L LP 非血清群 1 染色試薬 (FL non-Lp SG1): Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (アークリソース社) の 2 mg/L × 0.5 mL をキット取説に沿って標識し、50 µL ずつ小分けして冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)
- 0.1% BSA 入り PBS : で作製した PBS500 mL ~ 100 mL に 0.1% となるように 10% BSA (ミルテニーバイオテク社) を加えて調製する。

6. 製品検査の方法



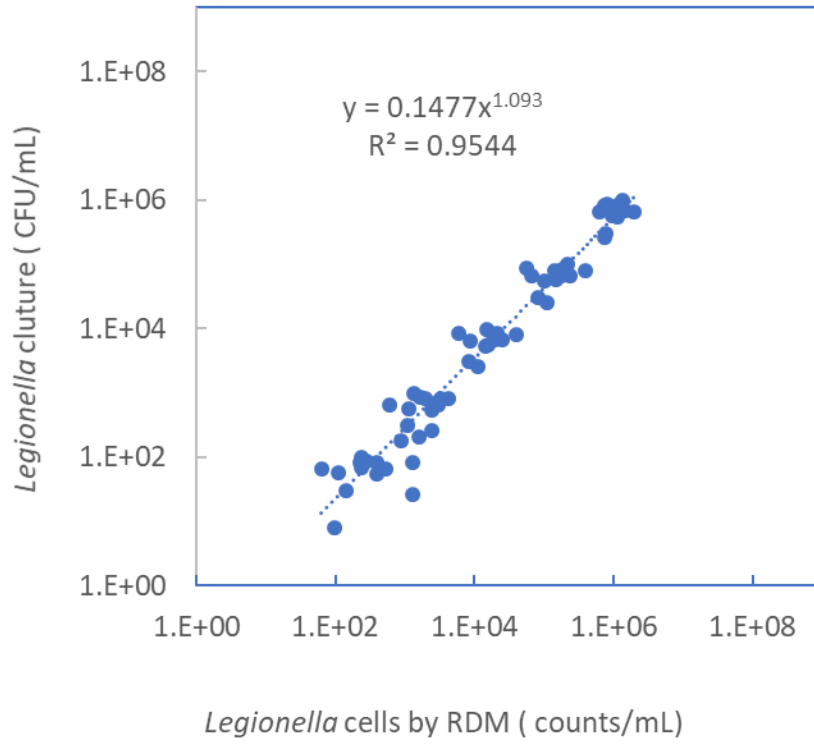


Fig. Correlation between culture method and RDM (11 strains of *Legionella pneumophila*)

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日～ 年 月 日

[検体数：]

担当者
2019.11.27作成 田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ数
2. 製品の種類：標準菌株を用いた模擬試料作製方法

3. 培地の作製

(1) 作製月日： 月 日

滅菌リン酸緩衝水

(PBS (pH7.2) 1包/ L、NaCl 8.5g / L、121 , 15分間高圧滅菌処理)

99 ml (本)、9 ml (本) 作製

(2) 処理月日： 月 日

BCYE 培地【メーカー： , Lot： 】

購入日 ()

4. 生菌数の試験

菌株の復元 -80保存株 (No.) を平板に移植培養 (36 ± 1 、 <18h)、冷蔵保存

前培養 増菌培地 (LC medium等) 1 mL に1白菌耳接種して恒温水槽 36 ± 1 、18時間培養

原液作製 4.5 mL PBSに前培養液上清0.5 mLを滅菌スポイトで接種 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/mL相当)

原液の希釈 原液を 10^2 まで段階希釈、 10^3 と 10^2 の0.1 mL分注 (原液用2枚以上)

段階試料液の調製 10^5 、 10^4 、 10^3 については 10^7 、 10^6 、 10^5 の1 mLを99 mL PBSに分注して100倍希釈

段階試料液の希釈 10^5 、 10^4 、 10^3 を、 $10^3 \sim 10^2$ まで希釈 (菌数測定後に固定)

各希釈液の分注 滅菌シャーレに0.1 mL分注 (各希釈段階で2枚以上)

培養 36 ± 1 、 72 ± 3 時間

集落数の測定

グルタルアルデヒドで固定 (終濃度0.05%) ・冷蔵保管して、1か月以内に使用する。

検体番号	各希釈段階における集落数				
	10 ^()	10 ^()	10 ^()	10 ^()	10 ^()
原液					
10 ⁵					
10 ⁴					
10 ³					

生菌数の算定

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日～ 年 月 日

[検体数：]

担当者
2019.1126改版
田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ (Lp) 定量

2. 製品の種類：フローサイトメトリーによる模擬試料の添加回収実験

3. 器具・試薬の作製

(1) 処理月日： 月 日

滅菌ろ過器 (115 , 15分間高圧滅菌処理) () mL (本) 作製

0.2 μm Membrane Filter【メーカー： , Lot：】

滅菌PPポリ容器 (121 , 15分間高圧滅菌処理)

() mL (本) 作製

(2) 作製月日： 月 日

滅菌リン酸緩衝水

(PBS(pH7.2)1包/ L、NaCl 8.5g / L、0.2 μm steri-cup filter unit る過 () 回)

() mL (本) 作製

(3) フローサイトメーター関連試薬

0.1%propidium Iodide (PI)【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

2 mg/L LpSG1用染色試薬【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

2 mg/L Lp non-SG1用染色試薬【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

2 mg/L Lp用染色試薬【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

0.1% MTAB【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

0.1% BSA入りPBS【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

4. フローサイトメトリー

模擬試料の静置 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mLオーダーの固定Lp懸濁液を常温に静置1時間

非濃縮液の細菌数計測

検体1 mLを5 mLチューブに分取、0.1% MTAB希釈液1 mLと混合、0.1% PI 10 μL添加して5分間静置。ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてフローサイトメーター (FCM) にセット

FCMからMethod Leg area 04を呼び込み測定スイッチオン(連続して2回以上測定する)

非濃縮液のLp数計測

検体1 mLを5 mLチューブに分取、等量の0.1%BSAと混合、1.5 μL FL Lp SG1添加

常温で30分間、回転振とう

ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてFCMにセット

FCMからMethod Leg area 04を呼び込み測定スイッチオン（連続して2回以上測定する）

希釈液作製 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mLオーダーの固定Lp懸濁液1 mLを予めろ過滅菌済み500 mL PBSに添加して約 10^0 、 10^1 および 10^2 cells/mLオーダーの希釈試料とする。別に、PBS 1 mLを添加した500 mL PBSを準備して陰性コントロールとする。

ろ過濃縮 0.2 μ m Membrane Filterで定法によりろ過濃縮したのち、MFを55 mmシャーレに貼付け

回収 0.6 mL PBSに0.6 mLの0.1%BSA加PBSをシャーレに貼り付けたMF表面に加えて、10回以上MF表面をピペティングで洗い出し、1 mLを1回目回収試料とする。

回収後、1.0 mLの0.1%BSA加PBSをシャーレに貼り付けたMF表面に加えて、10回以上MF表面をピペティングで洗い出し、1 mLを2回目回収試料とする。

上記1回目および2回目回収試料1 mLに0.75 μ L FL Lp SG1添加
 常温で30分間、回転振とう
 ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてフローサイトメーター(FCM)にセット
 FCMからMethod Leg area04を呼び込み測定スイッチオン

装置に表示される数値(/ μ L)を1.2倍して、装置独自の補正值(2000/42)を掛け合せてLp数とする
 注) 洗い出しがうまくいけば上記2回目が1回目の1/5 ~ 1/10量程度となる。

検体番号	添加液						回収液		
	全菌数			Lp数			Lp数（1回目）	Lp数（2回目）	備考
A-1									
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)									
A-2									
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)									
A-3									
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)									
D									
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)									

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日～ 年 月 日

[検体数：]

担当者
2019.12.16版
田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ (Lp) 定量
2. 製品の種類：フローサイトメトリーによる実試料の検査
3. 器具・試薬の作製

(1) 処理月日： 月 日

滅菌ろ過器 (115 , 15分間高圧滅菌処理) () mL () 本) 作製

0.2 μm Membrane Filter 【メーカー： , Lot： 】

滅菌PPポリ容器 (121 , 15分間高圧滅菌処理)

() mL () 本) 作製

(2) 作製月日： 月 日

滅菌リン酸緩衝水

(PBS (pH7.2) 1包/ L、NaCl 8.5g / L、0.2 μm steri-cup filter unit ろ過 () 回)

() mL () 本) 作製

(3) フローサイトメーター関連試薬

0.1%propidium Iodide (PI) 【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

2 mg/L LpSG1用染色試薬【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

2 mg/L Lp non-SG1用染色試薬【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

2 mg/L Lp用染色試薬【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

0.1% MTAB 【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

0.1% BSA入りPBS 【試薬作製日(年 月 日)、保管状態(冷蔵、冷凍)】

4. フローサイトメトリー

非濃縮液の細菌数計測

検体1 mLを5 mLチューブに分取、0.1% MTAB希釈液1 mLと混合、0.1% PI 10 μL添加して5分間静置。ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてフローサイトメーター (FCM) にセット

FCMからMethod Leg area 04を呼び込み測定スイッチオン (連続して2回以上測定する)

ろ過濃縮 0.2 μm Membrane Filterで定法によりろ過濃縮したのち、MFを55 mmシャーレに貼付け

回収 0.6 mL PBSに0.6 mLの0.1%BSA加PBSをシャーレに貼り付けたMF表面に加えて、10回以上MF表面をピペティングで洗い出し、1 mLを1回目測定試料とする。

回収後、1.0 mLの0.1%BSA加PBSをシャーレに貼り付けたMF表面に加えて、10回以上MF表面をピペ

ッティングで洗い出し、1 mLを2回目測定試料とする。

上記1回目および2回目測定試料1 mLに0.75 μL FL Lp SG1と0.75 μL Lp non-SG1添加
 常温で30分間、回転振とう
 ディスポシリンジで0.8 mLを採取、目盛を1.1 mLに合わせてフローサイトメーター(FCM)にセット
 FCMからMethod Leg area04を呼び込み測定スイッチオン

1回目および2回目測定で装置に表示される数値(/μL)を足し合わせ、1.1倍した後に、装置独自の補正
 値(2000/42)を掛け合せる。値を $y=0.1477x^{1.093}$ に代入して得られた数値をLp数とする

検体番号	消毒効果			レジオネラニューモフィラ (Lp) 数定量			
	全菌数	平均	判定	Lp数 (1回目)	Lp数 (2回目)	和	Lp数 ($y=0.1477x^{1.093}$)
1							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
2							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
3							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
4							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
5							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							
6							
換算値 ($\times 1.1 \times 2000/42$)							

■立ち上げ

1. 廃液容器が満杯でないか確認する。 空気が少なければ廃棄する。
2. シース液容器の残量を確認する。 残量が少なければ追加する。
3. 電源を入れる。 電源ボタンは装置左側にあります。
4. クリーニングシーケンスを呼び出す。

Settings – Load Script – “Cleaning.scr” – Select

5. シリンジにクリーニング液または生理食塩水などを 1mL 吸引し、ホルダーセットし、Start ボタンを押す。

■測定

1. 前回の測定結果あるいは測定用スクリプトを呼び出す。

Work – Reload Data – “データ” – Select

Settings – Load Script – “測定用スクリプト” – Select

2. シリンジに測定試料を 1mL 吸引し、ホルダーにセットし、Start ボタンを押す。
3. 測定結果を保存・印字する。

保存 : 画面左下アイコン (ファイル画) を押し、名前を付けて保存

印刷 : 画面左下アイコン (プリント画) を押して印刷

■スクリプトの作成

エリアや電圧を変更した場合はスクリプトを保存します。

Settings – Store Script – 名前を付けて保存

前回の測定結果を利用する場合はスクリプトとして保存していなくても構いません。

■機器の管理

1. 光軸調整用データを呼び出す

Work – Reload Data – QC Files – “ccb OA” – Select

2. Count Check Beads green あるいは Green beads 調製液をシリンジに吸引する。
3. 装置にセットして測定する。
4. 呼び出した測定結果と同様に細い粒度分布で濃度が適切なら OK。

FL2 の CV 値_4%未満 濃度_20000~30000/mL

幅が広い場合や濃度が低い場合は、気泡抜き手順を実施してから再度測定する。

■気泡抜き

1. シース液容器を外して、右下奥に治具 (消しゴム) を置く。
2. 空のシリンジに置き換える。
3. Start ボタンを押す。
4. 5 秒ほど経過したら Cancel ボタンを押す。
5. 右下奥の治具 (消しゴム) を取り除き、シース液容器をセットする。

検査実施標準作業書

SOP No.	
作成年月日	平成 31 年 4 月 22 日
改訂年月日	年 月 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：細菌数（生菌数）
2. 試験の種類：標準菌株の定量試験（大腸菌の場合）
3. 検体の採取および試料の調製：-80 保存株を *Escherichia coli* は TSA 培地（ほかに普通寒天培地、ミューラーヒントン寒天培地等）に復元後（接種後 18 時間培養して冷蔵保存）増菌培地（mEC 培地、TSB 培地、ミューラーヒントン液体培地等）10mL に小コロニー 1 個程度を接種して 36 ± 1 で 3～4 時間培養した後の懸濁液 2 mL を 9 mL PBS (pH7.2) に接種して原液とする。この時の原液は混釈したときにブイヨン中の菌が目視で薄く確認できる状態であり、これまでの実績から約 $1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/mL と推定される。予め 9 mL PBS (pH7.2) を入れた中試験管を必要分調製して、4 段階で 10 倍段階希釈列を作製した後、 10^2 および 10^3 cells/mL と予測される試料の 1mL を各 2 枚の深型滅菌シャーレに分注する。希釈列のうち 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mL オーダーの希釈液についてそれぞれの菌数を測定する。適切に希釈して希釈液の濃度が 10^2 および 10^3 cells/mL と予測される試料の 1mL を各 2 枚の深型滅菌シャーレに分注する。定法により、標準寒天培地を約 800 mL を滅菌後に 55 程度で保存した培地を準備しておき、それぞれのシャーレに分注して常温で固める。 36 ± 1 、24～48 時間培養した後、1 平板に 30～300 の集落がえられたものを生菌数として計測する。
4. 使用する機械器具の選択
 - 高圧蒸気滅菌器
 - 滅菌採取器具（薬さじ、はさみ、ピンセット等）
 - 滅菌採取ピン
 - 滅菌シャーレ（直径9～10 cm、深さ2.0 cm）
 - 中試験管
 - 滅菌ピペット（1 mL、10 mL）
 - マイクロピペット（1 mL）
 - マイクロチップ（1 mL）
 - ふ卵器（ 36 ± 1 ）
 - 恒温水槽
 - 電子天秤
 - メスシリンダー
 - 三角フラスコ
 - ストマッカー
 - ステリカップフィルターユニット

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2)を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験ではフィルターろ過は 2 回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

グルタルアルデヒド溶液

50%液、20%液 和光純薬製または同等品を用いる。

市販品を適切に希釈して最終濃度が 0.5%となるように試験液に注入し調製する。

2) 培地

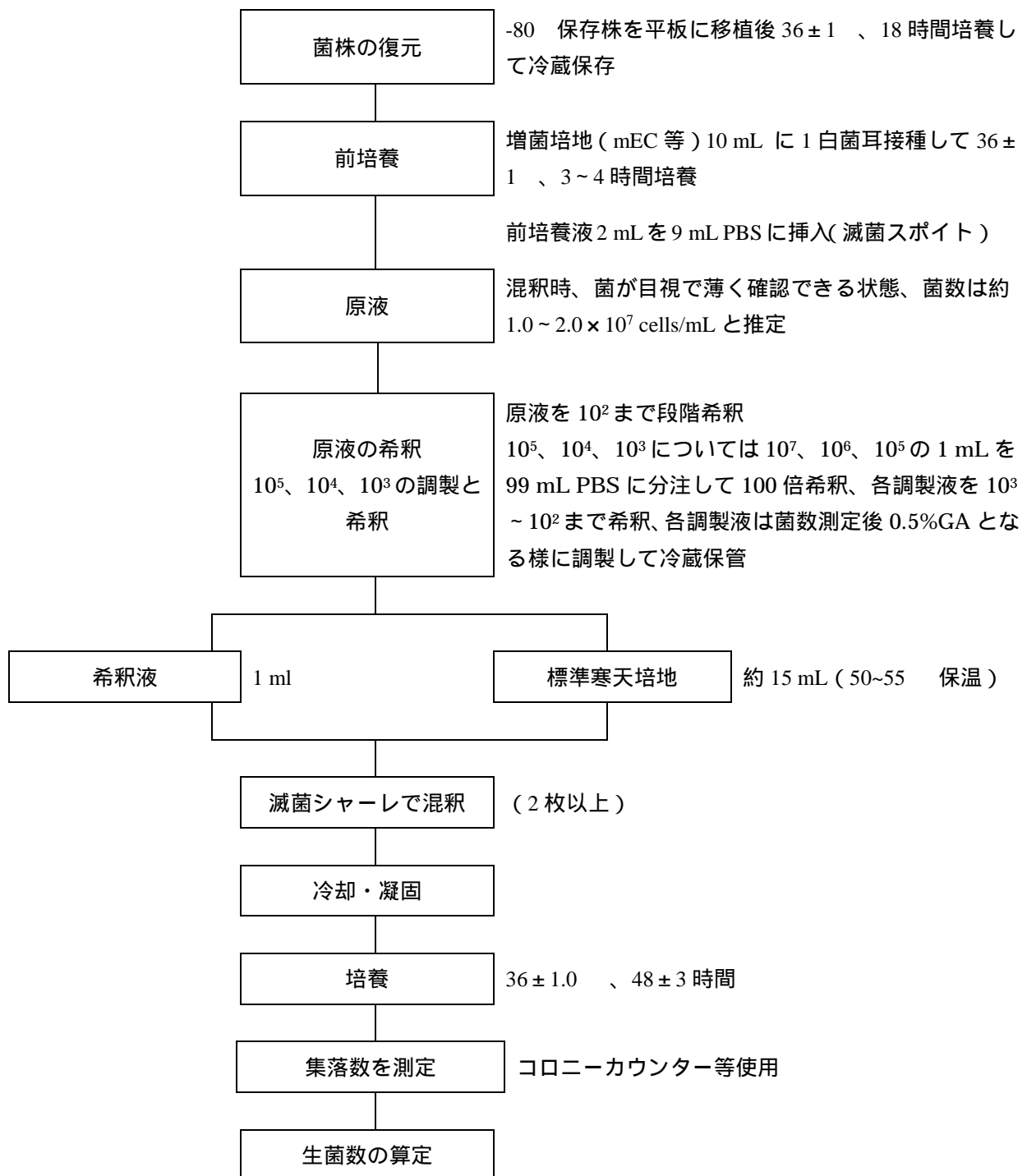
標準寒天培地

ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.5 g
ブドウ糖	1.0 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

加温溶解し、121 °C、15 分間高圧滅菌処理する。最終 pH は 7.0~7.2 とする。

市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

6. 製品検査の方法



7. 製品検査にあたっての注意事項

- 1) 試料の滅菌シャーレへの分注から冷却凝固までの操作は、20 分以内に完了する。
- 2) 対照として、検体の希釈に用いた滅菌生理食塩水 1 mL に、試料に用いた同一同量の培地を混合し培養したものをを用いて、生理食塩水および培地が無菌であったこと並びに操作が完全であったことを確認する。

8. 製品検査の結果の処理

1) 集落数の算定

1 平板に 30～300 個の集落数がある場合

a) 1 段階の希釈にのみ 30～300 個の集落数が得られた場合：2 枚の平板の集落数の算術平均を求める。

b) 連続した 2 段階の希釈に 30～300 個の集落数が得られた場合：希釈ごとに 2 枚の平板の算術平均を算定し、両者の比を求める。

- 両者の比が 2 倍未満のときは、以下の計算式により連続する 2 段階の希釈平板の集落数から菌数を算定する。

$$N = \{ (A+B) / 2d_1 + (C+D) / 2d_2 \} / 2$$

A, B：低希釈の集落数

C, D：高希釈の集落数

d₁：希釈が低いほうの希釈倍率

d₂：希釈が高いほうの希釈倍率

- 両者の比が 2 倍を超えたときは希釈段階の低いほうの集落数の算術平均を求める。

全平板が 300 個を超えた集落数である場合

最も希釈倍率の高いものについて、正確に 1 cm² の区画のある密集集落計算版を用いて計測する。

a) 1 cm² の区画に 10 個以下の集落数の場合：中心を通過し直行する 2 直径を作り、その中心より区分された 1 cm² 区画の 6 箇所集落数を数えて、1 cm² 区画の平均集落数を求め、これに滅菌シャーレの面積を乗じて 1 平板あたりの集落数を算出する。直径 9 cm の滅菌シャーレでは、得られた 1 cm² の平均集落数に 65 を乗じる。

b) 1 cm² の区画に 10 個以上の集落数の場合：前記と同様にして 4 区画の集落数から 1 cm² 区画の平均集落数を求め、滅菌シャーレの面積を乗じて 1 平板あたりの集落数を算出する。

全平板が 30 個未満の場合

最も低い希釈倍数に 30 を乗じる。試料液は 10 倍希釈であるので 300 以下として記載する。

拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分計測する

a) 他の集落がよく分散していて、拡散集落があっても計測に支障のないもの。

b) 拡散集落の部分が平板の 1/2 以下の場合。

2) 菌数の記載

算定対象とした平板の集落数に希釈倍数を乗じ、さらに得られた数字の上位 3 桁目を四捨五入して、上位 2 桁を有効数字として表示し、1 mL 当たりの菌数とする。例えば、算定された菌数値を 30500 /mL または 3.1×10^5 /mL と記載し、試料液は 10 倍希釈されているので、算定された菌数値を 10 倍した値が 1 mL 当たりの菌数となる。試料液はなお、最低希釈平板の集落発生数が 30 未満の場合も、必要があれば測定値をそのまま記載しておく。

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日 ~ 年 月 日

[検体数：]

担当者
田栗

1. 試験項目：生菌数

2. 製品の種類：標準菌株の定量試験

3. 培地の作製

(1) 作製月日： 月 日

滅菌リン酸緩衝水

(PBS(pH7.2)1包/L、NaCl 8.5g / L、121 , 15分間高压滅菌処理)

99 ml (本)、9 ml (本) 作製

(2) 作製月日： 月 日

標準寒天培地【メーカー： , Lot： 】

(121 , 15分間高压滅菌処理, 1検体につき5本) (mL) 作製

4. 生菌数の試験

菌株の復元 -80保存株 (No.) を平板に移植培養 (36 ± 1 、 <18h)、冷蔵保存

前培養 増菌培地 (mEC等) 10 mL に1白菌耳接種して 36 ± 1 、3~4時間培養

原液作製 9 mL PBSに前培養液2 mLを滅菌スポイトで接種 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/mL相当)

原液の希釈 原液を 10^2 まで段階希釈、 10^3 と 10^2 の1 mL分注 (原液用2枚以上)

段階試料液の調製 10^5 、 10^4 、 10^3 については 10^7 、 10^6 、 10^5 の1 mLを99mLPBSに分注して100倍希釈

段階試料液の希釈 10^5 、 10^4 、 10^3 を、 $10^3 \sim 10^2$ まで希釈 (菌数測定後に固定)

各希釈液の分注 滅菌シャーレに1 mL分注 (各希釈段階で2枚以上)

標準寒天培地の分注混釈・冷却・凝固 約15 mL (50~55 保温)

培養 35 ± 1 、 48 ± 3 時間

集落数の測定

検体番号	各希釈段階における集落数				
	10 ^()	10 ^()	10 ^()	10 ^()	10 ^()
原液					
10 ⁵					
10 ⁴					
10 ³					

生菌数の算定

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）

公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の
衛生管理手法の開発のための研究
令和元年度分担研究報告書

MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

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	野本竜平	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。そこで、本研究では、これまでの研究から見出された問題点を解決するために、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れることで、SBT と MLVA のタイピングの妥当性評価を行い、より最適な MLVA 領域の検討を行うことで、遺伝子型別方法としての MLVA タイピングを確立し、汎用性を高めることを目的とする。

今年度は、ST が一致で MLVA 型が異なる例、MLVA 型が一致で ST 型が異なる例について計 28 株のゲノム配列を決定し、ゲノム系統解析の結果と各分子疫学解析手法の解析結果との比較検討を行った。その結果、それぞれの例において、分子疫学的手法としての MLVA と SBT は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられた。MLVA を菌株のスクリーニング（SBT の代替的）に用いることは、有用である。ただし、それぞれの手法だけでは、菌株識別できない場合も存在するので、双方の手法を併用するのが望ましいと考えられた。また、Miseq のリードデータから ST を決めるパイプラインの構築について大部分で完了した。Miseq リードデータから直接に多検体の ST を決定できるので、非常に有用な解析ツールとなると期待される。

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*）のシーケンスを行い、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。近年、細菌の遺伝子型別解析として MLVA 法がよく用いられている。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。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法を*L. pneumophila*において導入することで、それら従来法の課題を克服できることが期待される。これまでに、約800株の*L. pneumophila*を用いて、従来法であるPFGEやSBTと比較し、MLVAタイピングの有用性について評価を行ってきた。その結果、MLVA型は、SBTのタイピングと同等の菌株識別能力を有することが明らかになった。その一方で、遺伝子型別の手法間の相違点も見出された。また、他自治体間との比較の際にも、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が見出され、汎用性の高いタイピングとしてのMLVAを確立するためには、プロトコル整備の必要性が示唆された。

そこで、本研究では、これまでの研究から見出された問題点を解決するために、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れることで、SBTとMLVAのタイピングの妥当性評価を行い、より最適なMLVA領域の検討を行うことで、遺伝子型別方法としてのMLVAタイピングを確立し、汎用性を高めることを目的とする。

B. 研究方法

① 菌株：STが一致でMLVA型が異なる例としてST507の9株を用いた（表1）。また、MLVA型が一致でST型が異なる例として20株を用いた（表2）。さらに、ST1でMLVA型が大きく異なる1株を用

いた。

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°C15分後に95°C30秒、60°C1分、72°C70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°C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²⁾。

③ゲノム解析：QIAseqFX(QIAGEN)を用いてDNAライブラリを調製し、Miseq reagent Kit v.3を用いてリードデータを取

得した。A5-Miseq でアッセンブリし、PROKKA でアノテーションを行った。全ゲノム配列による系統解析には kSNP3 を用いて解析した^{3,4)}。

C. 研究結果

(1) Miseq リードデータから ST を決める方法の確立

L. pneumophila の ST は、EWGLI (The European Working Group for Legionella Infections) により運用されている website に 7 遺伝子の必要な部分の配列情報を照合することで決定するが、ドラフトゲノムのコンティグ配列から当該遺伝子配列部分のみを正確に抽出するのは効率的ではないため、リードデータをそのまま当該遺伝子配列にマッピングしすることで直接 ST が決定できるパイプラインの構築を目指した。

まず、公開されている配列情報から 7 遺伝子 (*flaA*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) の SBT データベースを作成した。そのデータベースに対して、Miseq で得られたリードデータを、SRST2 を用いてマッピングを行い、得られたアリルプロファイルを既知の ST データベースと照合し、ST を決定するパイプラインを構築した。但し、*mompS* についてはゲノム上にタンデムに存在するオルソログ領域のリードがマッピングされ、アリルが正しくアサインされないケースが稀に存在したため、今後異なるツールを併用することで対応する予定である。

(2) ゲノム分子疫学における MLVA, SBT の遺伝子型別の比較

SBT と MLVA における相違の要因を NGS を利用した *L. pneumophila* の全ゲノム配列を用いた系統解析から明らかにするために、ST が一致で MLVA 型が異なる例、MLVA 型が一致で ST 型が異なる例についてゲノム配列を決定し、ゲノム系統解析の結果と各分子疫学解析手法の解析結果との比較検討を行った。

① ST が一致で MLVA 型が異なる例

ST507 の 9 株の MLVA 型は 5 種類に分類された。そのうち、1 株だけが、Clonal Complex (CC) から外れた MLVA 型を示した (表 1 と図 1(A))。9 株のコアゲノム SNPs の系統解析を行った。その結果、CC から外れた菌株は、コアゲノム系統樹でも、他の菌株とは系統的に離れた位置にカテゴライズされており、MLVA の MST の近縁関係を反映していた (図 1(B))。

② MLVA 型が一致で ST 型が異なる例

同一 MLVA 型を示した 20 株の ST は、11 種類含まれており、ST に基づく菌株間の関連性を図 2 (A) に示した (表 2)。ST2311 と ST622 は CC から外れた。これらの株のコアゲノム SNPs の系統解析を行った結果、コアゲノム SNPs の系統樹が ST の MST の近縁関係を反映していた (図 2 (B))。

③ MLVA 解析により ST の誤同定が明らかになった事例

ST1 の 77 株のうち、1 株だけが全く異

なる MLVA 型を示したため (図 3 (A))、その株のゲノム解析を行い、冷却塔水より分離された ST1 のゲノム配列との比較を行った⁴⁾。(1)で構築したパイプラインを用いて ST を調べたところ、ST22 であることが判明し、ST1 の株とは異なる系統を示した (図 3 (B))。これまで蓄積してきた MLVA 型のプロファイルから ST22 の MLVA 型との比較を行ったところ、ST22 の MLVA 型と同一の MLVA 型を示した (図 3 (C))。

D. 考察

全ゲノム系統解析から、SBT、MLVA の手法間の相違点について比較した。ST が一致で MLVA 型が異なる例では MLVA 型の MST が、MLVA 型が一致で ST が異なる例においては ST の MST が、それぞれ全ゲノム系統解析の傾向を反映していた。従って、MLVA と SBT はレジオネラの全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられる。しかし、大まかな系統的位置は一致するものの、片方の手法で細分化されているクラスターが、もう片方の手法では遺伝子型が一致するというケースが存在することも明らかとなった。そのため、集団発生事例等個々の菌株の同一性を詳細に確定させたい場合は、可能であればゲノム解析を実施することが望ましいが、コスト等の面で難しい場合は MLVA と SBT を併用して分子疫学解析を実施することが必要であるかもしれない。今後はさらに、このような事例を増やし検討を重ね、より最適な VNTR 領域の提示も必要になるだろう。また、MLVA

型からどの ST グループに入るのか予想できる可能性があることが明らかとなったので、ST 毎の MLVA プロファイルをデータベースとして整備しておくことも重要であることが示唆された。

さらに、Miseq のリードデータから ST を決めるパイプラインの構築について大部分で完了した。Miseq リードデータから直接に多検体の ST を決定できるので、非常に有用な解析ツールとなると期待される。

E. 結論

分子疫学的手法としての MLVA と SBT は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられた。MLVA を菌株のスクリーニング (SBT の代替的) に用いることは、有用である。ただし、それぞれの手法だけでは、菌株識別できない場合も存在するので、双方の手法を併用するのが望ましい。

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)、富田望 (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) 中西典子ら, MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴, 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 28~30 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 37-46, 2019
- 3) Raphael BH, Baker DJ, Nazarian E, Lapierre P, Bopp D, Kozak-Muiznieks NA, Morrison SS, Lucas CE, Mercante JW, Musser KA, Winchell JM., 2016. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol.* 82:3582-3590.
- 4) Nakanishi N, Nomoto R, Tanaka S, Arikawa K, Iwamoto T., 2019. Analysis of Genetic Characterization and Clonality of *Legionella pneumophila* Isolated from Cooling Towers in Japan. *Int J Environ Res Public Health.* 16. doi: 10.3390/ijerph16091664.

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 中西典子、野本竜平、田中忍、岩本朋忠: 冷却塔に定着する *L. pneumophila* が保

有するプラスミドの遺伝的特徴. 第 14 回
日本ゲノム微生物学会年会. 2020 年 3 月、
愛知

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 : ST507のMLVA型

ID	Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39	Lpms44
N IIB2532	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	19	20	9
N IIB2630	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	19	20	9
N IIB3309	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	19	20	9
N IIB3758	16.5	7	25	4	3	5	4	7	5	19	20	9
N IIB3280	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	3	20	9
N IIB3637	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	3	20	9
N IIB3710	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	3	20	9
N IIB3261	13.5	7	25	4	2	4	4	7	5	3	20	9
N IIB3204	13.5	8	27	4	3	11	4	7	5	3	20	9

表2：同一M LVA型を示した菌株のST

ID	SG	ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>
N IIB 1349	6	68	3	13	1	28	14	9	3
N IIB 1759									
N IIB 2843	12								
N IIB 2552									
N IIB 0815	6	114	3	6	1	6	14	11	9
N IIB 1786									
N IIB 1794									
N IIB 3815	12								
N IIB 2603	15	392	3	13	1	6	14	9	11
N IIB 2487	6	537	3	13	1	28	12	9	3
N IIB 2634									
N IIB 3660	1	553	3	6	1	3	14	11	9
N IIB 3914									
N IIB 3410	1	561	3	6	1	6	14	11	1
N IIB 2581	1	609	3	13	1	1	14	9	1
N IIB 3464									
N IIB 3645	1	622	3	13	1	3	9	9	9
N IIB 3811	1	1077	3	6	1	1	14	11	1
N IIB 0850	6	1992	3	6	1	6	11	11	9
N IIB 3741	1	2311	3	7	1	3	5	11	11

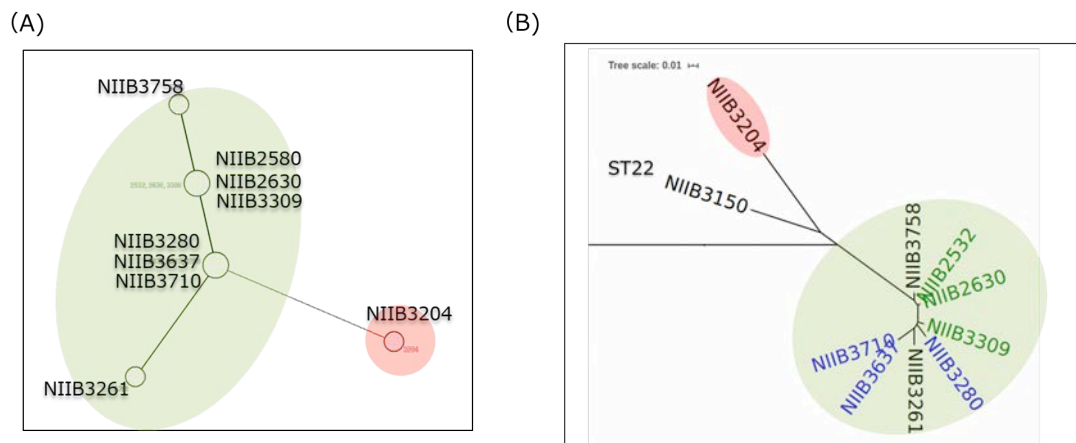


図1. ST507でMLVA型が異なる菌株の全ゲノム系統解析
 (A) MLVAに基づくMST (B) コアゲノムSNPsに基づいた系統樹

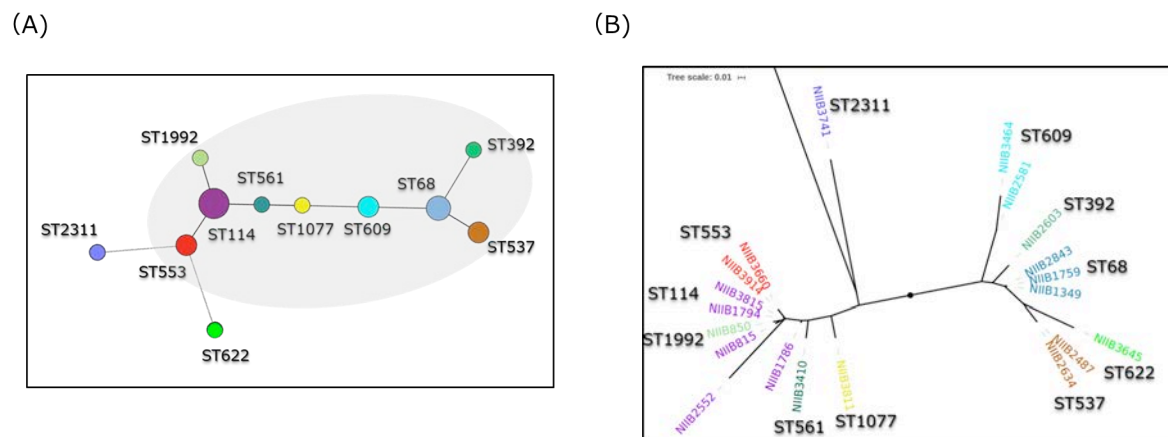
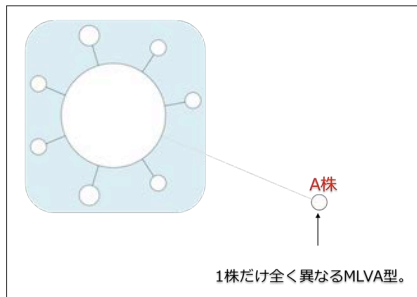
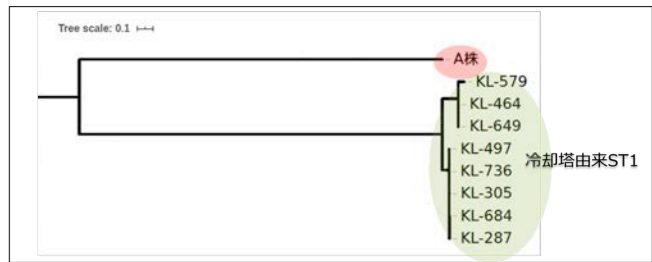


図2. MLVA型が一致でST型が異なる例。
 (A) STに基づくMST (B) コアゲノムSNPsに基づいた系統樹

(A)



(B)



(C)

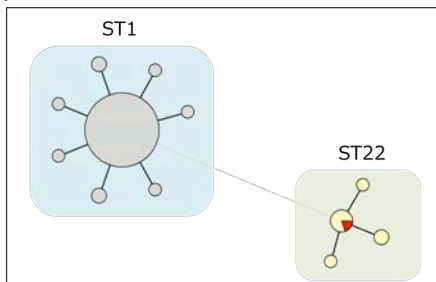


図3. ST1の77株のMLVA型と全ゲノム系統樹。

(A) ST1の77株のMLVAに基づくMST。A株は他のST1とはMLVA型が異なった。

(B) 冷却塔水由来ST1株とA株のコアゲノムSNPsに基づいた系統樹。

(C) ST1とST22のMLVA型に基づくMST。A株（赤色）はST22と同じMLVA型を示した。

令和元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」
令和元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 |

レジオネラ属菌は水環境に広く分布しており、これまでの調査において入浴施設や医療機関の水道の蛇口水から検出されている。いずれもレジオネラ属菌感染症の感染源となりうるため、管理により菌汚染を除くことで感染を予防する必要がある。今年度の調査では、入浴施設の浴槽、カー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、カーン及びシャワー水からレジオネラ属菌が検出された。当該施設は塩素消毒と貯湯槽の55℃以上の維持による対策がとられているが、レジオネラ属菌が検出された。医療機関については、神奈川県内の3機関の協力を得て、給水・給湯系におけるレジオネラ属菌による汚染を調査した。いずれの医療機関においても給水・給湯系からレジオネラ属菌が検出された。3機関では受水槽に次亜塩素酸ナトリウムを独自に添加し、給水系の遊離残留塩素濃度を高くして管理していた。しかし、蛇口の初流水の塩素濃度が低い試料があり、レジオネラ属菌の検出と関連していた。医療機関の給水系の蛇口水32試料を用いて *L. pneumophila* 計数用キットの評価を行った。培養により4試料から *L. pneumophila* が検出されたがキットでは検出されなかった。これは検出菌数が10~20 CFU/100mlであったことが原因と推測された。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は建物や配管等の人工物の水環境にも広く分布し、こうした環境はレジオネラ感染症の感染源となりうる。本調査は、入浴施設の浴槽と付随する設備（カーン、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状況を継続的に監視し、汚染除去対策等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。

B. 研究方法

1) 試料の採取

調査の対象は、本調査に協力をいただいている神奈川県内の1入浴施設及び3医療機関（A、B、C）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。レジオネラ検査用試料は、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。温度は採取時に、pHは実験室に搬入時に測定した。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。検査用試料は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、前述の入浴施設のシャワー・カー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0.2 μ m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 $^{\circ}$ C、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100 μ l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 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。*Legionella*属菌を疑う集落をBCYE α 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) より血清型別及び種の鑑別を行った。

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) 一般細菌数

採取した水試料を PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の試料の 1.0ml を標準寒天培地 (日水製薬) に接種し、混釈培養法により 36℃ で 24 時間培養した。培養後、集落数を計数した。

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。

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 2019 年 9 月 20 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 つのカラン並びに浴室 B のカランから検出された。浴室 A の 1 つのカランは初流水のみを検査し、*L. pneumophila* SG9 が 10 CFU/100ml 検出された。もう一方のカランでは、初流水は *L. pneumophila* SG 1 が 40 CFU/100ml、3 分間流水後は *L. pneumophila* SG1、6 及び *Legionella* sp. が 200 CFU/ml 検出された。

2017 年 2 月から 2019 年 9 月までの結果を表 1 に示した。2015 年の調査においてレジオネラ属菌が検出されたことから、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、②カランとシャワーの新品の交換、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という対策を行った。カランとシャワーの消毒や交換は効果がなかった。高濃度塩素による消毒によりレジオネラ属菌は検出されなくなったが、しばらくすると再度検出されるようになった。そこで、2018 年に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。これにより菌数の減少はみられたが、*L. pneumophila* が検出された。

当該入浴施設では、次亜塩素酸ナトリウムによる消毒及び貯湯槽の55℃以上の高温水による管理を行っている。こうした管理下でのレジオネラ属菌の検出は、滞留等による塩素濃度及び温度の低下が原因の一部であることが推測される。塩素と温度で管理を行う場合は、配管等における滞留や循環の停止による塩素濃度や水温の低下に留意した衛生管理が求められる。令和元年9月19日に発せられた公衆浴場における衛生等管理要領では、「浴槽に湯水がある時は、ろ過器及び消毒装置を常に作動させること」が追加されている。入浴施設の休館日等で入浴を止める場合にも塩素濃度や水温の低下が起きないようにすることで生物膜の形成やレジオネラ属菌の増殖を防ぐことが必要とされている。今後、滞留の有無の確認や滞留に留意した管理の検討が必要と思われる。

2) 医療機関

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2019年9月17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7試料から、*L. pneumophila* SG1、*L. feeleii* SG1、*L. anisa* 及び *Legionella* sp.（菌種未同定）が検出され、菌数は10～2000

CFU/100mlであった（表2）。

医療機関 A では末端の遊離残留塩素濃度が高いところでは1.0mg/L程度となっているが、初流水の濃度が0.04mg/Lの病室の蛇口水ではレジオネラ属菌が高い菌数で検出された。0.4mg/Lを超える濃度の試料水でもレジオネラ属菌が検出された。

医療機関 A の蛇口水の遊離残留塩素濃度が0.4～1.0mg/Lと高いにもかかわらずレジオネラ属菌が検出されているのは、蛇口水のpHが8.0を超えていることが関連していると推測される。レジオネラ属菌対策を行う際に、水道水のpH調整を行うことも考慮する必要があると考えられる。

医療機関 B では採水場所は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2019年9月26日に採取した。レジオネラ属菌は6か所17試料から *L. feeleii* SG1、*L. anisa* 及び *Legionella* sp.（菌種未同定）が検出され、菌数は10～97,000 CFU/100mlであった（表3）。

医療機関 B では末端の遊離残留塩素濃度が高い試料では0.5mg/L程度であり、初流水の濃度が0.44mg/Lの蛇口水からはレジオネラ属菌は検出されなかったが、塩素濃度が低い蛇口水では検出された。病室や談話室等で蛇口を使用しないことにより水道水が滞留して塩素濃度が低下し、生物膜の形成やレジオネラ属菌の増殖が起きたことが推測される。このことから、フラッシングによって塩素濃度を高く保つことがレジオネラ属菌増殖防止に効果があると思われ

る。給湯系においても、初流水の水温が低い結果となっており、フラッシングが必要と考えられる。

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、12 試料を 2019 年 9 月 30 日に採取した。病室の 2 か所から採取した 4 試料から、*L. pneumophila* SG1 が検出され、菌数は 10 ~ 20 CFU/100ml であった（表 4）。

医療機関 C では末端の遊離残留塩素濃度が高い試料では 0.8~1.2mg/L であるが、*L. pneumophila* が検出された試料の濃度は 0.8~1.1mg/L であった。一方で、ほとんど塩素が消失していた 3 試料では、従属栄養細菌数は高かったが、レジオネラ属菌は検出されなかった。遊離残留塩素濃度が高い試料でレジオネラ属菌が検出され、低い濃度の試料で検出されなかった原因は明らかではない。

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 6 か所 12 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 試料ではレジオラートの結果はすべて不検出であった。培養では 17 試料から *L. feeleii* SG1、*L. anisa* 及びレジオネラ属菌 (*Legionella* sp.) が検出されたが、*L. pneumophila* は全く検出されておらず、*L. pneumophila* のみを検出するレジオラートの結果は培養の結果

と一致した。

医療機関 C では 12 試料のうち培養で 4 試料から *L. pneumophila* が検出されたが、レジオラートでは不検出であった。培養検査とレジオラートの結果が一致しなかったのは、培養による検出菌数が 10 ~ 20 CFU/100ml と少なかったことが原因と推測された。

今回のレジオラートの評価においては、*L. pneumophila* 以外の菌種 (*L. feeleii*、*L. anisa* 及び *Legionella* sp.) の菌数が最高 10^4 CFU/100ml であるにもかかわらず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。しかし、*L. pneumophila* の検出菌数が 10~20 CFU/100ml と少ない試料ではレジオラートが陽性反応を示さなかった。レジオラートの感度について、さらに解析する必要があることが示された。

D. まとめ

入浴施設の調査では、塩素消毒と貯湯槽の 55℃ 以上の維持により管理しているが、カランとシャワー水からレジオネラ属菌が検出された。滞留等による塩素濃度あるいは温度の低下を防ぎ、菌増殖を抑える衛生管理が必要と思われる。

医療機関については、いずれの機関も給水系に独自に次亜塩素酸ナトリウムを添加する管理を行っている。遊離残留塩素が通常の水道水よりも高い濃度での管理を行っており、限定的ではあるが効果が出ている。一方で、pH の影響が推測される効果の

低減もあり、さらに解析する必要がある。蛇口の使用頻度が低い場合には配管中の遊離残留塩素濃度は低くなり、それにより生物膜の形成やレジオネラ属菌の増殖が起きるとされている。これは調査対象とした蛇口の試料の解析結果でも示されている。

医療機関の給水系の蛇口水 32 試料を用いて *L. pneumophila* 計数用キットの評価を行った。培養により 4 試料から *L. pneumophila* が検出され

たがキットでは検出されなかった。これは検出菌数が 10 ~ 20 CFU/100ml であったことが原因と推測された。

E. 研究発表
該当なし

F. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

表1 入浴施設におけるレジオネラ属菌の検出状況 (2017~2019年)

検体	2017年						2018年						2019年		
	2月28日			5月9日			1月30日			10月2日			9月20日		
	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	+	-		-	-		+	-		-	-		-	-	
浴室A シャワー	+	<i>L. p.</i> SG9	X	+	<i>L. p.</i> SG9	1000	+	-		-	-		-	-	
浴室A カラン1	+	<i>L. p.</i> SG9	3000	+	<i>L. p.</i> SG9	1000	+	<i>L. p.</i> SG9, <i>L. sp.</i>	170	-	<i>L. p.</i> SG1, SG9	10	-	<i>L. p.</i> SG9	10
浴室A カラン2	+	-		+	<i>L. p.</i> SG6, SG9	1000	-	<i>L. p.</i> SG1	200	+	<i>L. p.</i> SG1, SG9	400	+	<i>L. p.</i> SG1, SG6, <i>L. sp.</i>	200
浴室B 湯口	-	-		-	-		+	-		-	-		-	-	
浴室B シャワー	+	-		-	<i>L. sp.</i>	10	+	<i>L. sp.</i>	20	+	-		-	-	
浴室B カラン1	+	<i>L. sp.</i>	20	+	-		+	-		+	<i>L. sp.</i>	70	-	<i>L. p.</i> SG1	30
浴室B カラン2	+	-		-	-		+	-		-	-		-	-	

表2 医療機関Aの給水・給湯系試料の性状と細菌汚染状況

検体名	水系	種類	温度 (℃)	pH	遊離残 留塩素 (mg/L)	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌	菌数 (CFU/100mL)	一般細菌	従属栄養細菌
							検出菌		菌数 (CFU/100mL)	菌数 (CFU/100mL)
病室水道 蛇口	給水系	初流水	24.3	8.62	0.04	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1 <i>Legionella sp.</i>	2000	25	24000
	給水系	3L 流水後	26.6	8.54	0.85	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	30	0	77
	給湯系	初流水	35.1	8.46	0.43	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	10	0	46
	給湯系	3L 流水後	35.8	8.38	0.43	+	<i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	40	0	21
トイレ前 洗面台	混合	初流水	24.7	8.06	0.93	+	<i>Legionella pneumophila</i> 血清 群 1 <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	400	0	680
	混合	3L 流水後	23.3	8.18	1.01	-	<i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	20	0	40
手術室 準備室 水道蛇口	給水系	初流水	25.1	8.10	0.98	-	不検出		0	19
	給水系	3L 流水後	24.3	8.11	1.00	-	<i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	10	0	4
	給湯系	初流水	41.7	8.05	0.33	-	不検出		0	4
	給湯系	3L 流水後	52.9	8.04	0.48	-	不検出		0	1
手術室洗浄 水道蛇口	混合	初流水	30.7	8.06	0.57	-	不検出		0	6
	混合	3L 流水後	38.1	7.91	0.75	-	不検出		0	5
受水槽	混合	初流水	22.2	7.90	0.99	-	不検出		0	9

表3 医療機関Bの給水・給湯系試料の性状と細菌汚染状況

検体名	水系	種類	温度 (°C)	pH	遊離残 留塩素 (mg/L)	LAMP (核酸 検出)	レジオネラ属菌		一般生菌 菌数 (CFU/mL)	従属栄養細菌 菌数 (CFU/mL)
							検出菌	菌数 (CFU/100mL)		
談話室右	加温装置	初流水	39.4	7.68	0.01	+	<i>Legionella</i> sp.	200	0	2700
	加温装置	3L 流水後	41.7	7.61	0.10	+	<i>Legionella</i> sp.	200	0	360
談話室左	加温装置	初流水	41.3	7.52	0.01	+	<i>Legionella</i> sp.	4000	0	6300
	加温装置	3L 流水後	41.2	7.50	0.15	+	<i>Legionella</i> sp.	200	0	1300
個室洗面	給水系	初流水	25.1	7.44	0.02	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	40	0	310
	給水系	3L 流水後	25.2	7.35	0.36	+	<i>Legionella</i> sp.	40	0	34
	給湯系	初流水	28.3	7.31	0.01	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	280	0	550
	給湯系	3L 流水後	45.9	7.27	0.02	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	200	0	37
4人部屋 洗面	給水系	初流水	24.1	7.27	0.44	+	不検出		0	37
	給水系	3L 流水後	23.8	7.22	0.46	-	不検出		0	7
	給湯系	初流水	39.1	7.22	0.02	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	200	0	42
	給湯系	3L 流水後	42.8	7.21	0.01	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	100	0	41
ナース ステー ション 流し	給水系	初流水	25.8	7.14	0.02	-	<i>Legionella feeleii</i> SG1	330	1400	>30000
	給水系	3L 流水後	25.4	7.16	0.07	-	<i>Legionella feeleii</i> SG1	10	16	200
	給湯系	初流水	33.9	7.15	0.02	+	<i>Legionella feeleii</i> SG1	8800	3600	>30000
	給湯系	3L 流水後	53.2	7.17	0.05	+	<i>Legionella feeleii</i> SG1	800	0	1
浴室 シャワー 付き カラン	給水系	初流水	26.4	7.09	0.02	+	<i>Legionella</i> sp.	97000	0	28000
	給水系	3L 流水後	25.0	7.13	0.35	+	<i>Legionella</i> sp.	8000	0	93
	給湯系	初流水	26.0	7.11	0.01	-	<i>Legionella</i> sp.	150	180	>30000
	給湯系	3L 流水後	26.6	7.08	0.02	-	不検出		0	21000

表4 医療機関Cの給水・給湯系試料の性状と細菌汚染状況

検体名	水系	種類	温度 (°C)	pH	遊離残 留塩素 (mg/L)	LAMP (核酸 検出)	レジオネラ属菌		一般細菌 菌数 (CFU/100mL)	従属栄養細菌 菌数 (CFU/100mL)
							検出菌	菌数 (CFU/100mL)		
地下控室 (水栓)	給水	初流水	24.9	7.38	0.82	-	不検出		1	170
	給水	3L 流水後	24.9	7.37	0.88	-	不検出		1	15
倉庫内 (水栓)	給水	初流水	25.0	7.34	0.00	+	不検出		0	18000
	給水	3L 流水後	25.1	7.36	0.01	-	不検出		0	1500
病室1	給水	初流水	23.6	7.36	0.85	+	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	20	0	1
	給水	3L 流水後	22.4	7.37	1.13	+	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	20	0	0
病室2 (手洗い)	加温装置	初流水	24.5	7.42	0.01	-	不検出		8	2600
	加温装置	3L 流水後	22.3	7.38	1.10	-	不検出		1	9
病室3 (洗面用)	給水	初流水	23.1	7.38	1.08	-	不検出		0	4
	給水	3L 流水後	22	7.36	1.16	-	不検出		0	3
病室4 (洗面用)	給水	初流水	26.1	7.36	0.81	-	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	10	0	67
	給水	3L 流水後	24.0	7.34	1.12	-	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	20	0	7

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)
 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の
 衛生管理手法の開発のための研究
 令和元年度分担研究報告書

レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

研究分担者	○森本 洋	北海道立衛生研究所
	金谷 潤一	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
	中西 典子	神戸市環境保健研究所
研究協力者	磯部 順子	富山県衛生研究所
	大森恵梨子	仙台市衛生研究所
	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
	倉 文明	国立感染症研究所
	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
	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精度の安定に向けた取り組みとして、1)外部精度管理、2)2018年度外部精度管理に係るアンケート調査及び検査法技術指導、3)検査研修システムについて、地方衛生研究所のレジオネラレファレンスセンター担当者を中心に検討を行った。

外部精度管理は研究班サポートのもと、2015年度以降、実施母体を日水製薬株式会社とし、2019年度は公的、民間を問わず全国161の検査機関(延べ164試料配付)に対し行われた。研究班への協力として参加した地方衛生研究所等73機関については、独自に集計・解析を実施し、過去4年間の結果とも比較した。5年連続参加した機関は50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。一方、本年度の回収率は、判定を開始した過去2年と比較し、全体的に低い傾向にあった。特に回収率0～10%未満の施設が全体の3割(30.1%)あり、過去2年(16.9%、8.5%)を大きく上回った。配付試料の確認実験において問題は認められなかったが、参加機関側、配付試料側、双方について改めて検証したいと考える。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である。

アンケート調査からは、各検査機関の現状把握ができた一方で、検査が不安定な施設への対応が求められた。今年度技術指導を行った施設においては、結果改善が認められたことから、引き続き直接技術指導を行えるよう努めたい。

検査研修システムについては、民間企業と連携し規模を調整することで、一定の基盤が整いつつある。現在、次年度試行的に開催できるよう準備を進めている。

A. 研究目的

レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組みとして、1)外部精度管理、2)2018年度外部精度管理に係るアンケート調査及び検査法技術指導、3)研修システムについて、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>

2015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2019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、10月18日(金)に締め切られた。その後、11月18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12月20日(金)17時に指定された。解析結果は、2020年2月28日(金)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161の検査機関(延べ164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73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73機関については、独自に集計・解析を実施し、過去4年間の結果とも比較した。なお報告値については、2013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⁾。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%予測区間(下限値12,877.7cfu/Ball、上限値24,546.3cfu/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2,575.54、

上限値 4,909.26 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1,000cfu/100ml と換算することから、結果は1,000cfu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2,000～5,000cfu/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600～15,000cfu/100mlとして設定することとした。

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、これまで同様、2016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。

日水製薬で行った全国の結果集計・解析は、2020年2月28日(金)、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)2018年度外部精度管理に係るアンケート調査及び検査法技術指導

2019年8月、検査精度が安定しない検査機

関に対する原因究明と安定化に向けた検討を行うため、現状の把握として地方衛生研究所レジオネラレファレンスセンターを通じ、「2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」に参加した施設に対し、アンケート調査(別紙参照)を実施した。

これまでの外部精度管理において不安定な結果を複数回報告していた機関のうち、3機関に対し研究班員が訪問し検査工程の確認を行い、その場で検討会を行った。

3)検査研修システムについて

2013年8月、2019年4月に、民間機関としてレジオネラ属菌検査研修実績のある関東化学株式会社と継続的な研修会実施に係る協議を行った。

C. 研究結果及び考察

1)精度管理

研究班で集計した地方衛生研究所等73機関の報告菌数を表1に示した。また、非濃縮検体における設定良好範囲内菌数報告機関の割合(2016-19年度)を表2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では73機関中71機関(約97%)、非濃縮検体②では73機関中67機関(約92%)であり、ともに例年通り90%以上の機関が良好な結果を報告し、過去3年間と比較しても安定した結果が得られていた。一方、非濃縮①ではレジオネラ属菌を検出できなかった機関が1機関あった。この機関は、どの検査工程の試料に対しても検出できていなかった。今後詳細を確認する必要がある。非濃縮検体②では、レジオネラ属菌を検出できなかった機関が前述の1機関に加え、もう1機関あった。この機関は、非濃縮①では良好範囲を報

告していたことから、改めて試料作製工程の確認、コンラージ棒での塗抹状況等を確認する必要があると思われた。また、検出はされたが、下限値を下回る回答をした機関が2機関あった。そのうち、1機関は総合的に見て良好下限値付近の試料が配付されていた可能性がある。回収率は適正であったことから、特に問題はないと考えられた。もう1機関は、非濃縮①でも下限良好範囲を下回っていたこと、また選択分離培地での結果の方が、非選択分離培地の倍近い菌数を報告していたことから、改めて試料作製工程の確認、コンラージ棒での塗抹状況、使用培地等について確認する必要があると思われた。最大値においては、良好上限を大きく超える回答をした機関が2機関あった。この2機関は、非濃縮①では適切な回答をしていた。濃縮工程だけではなく、データ入力時のミスの可能性も示唆された。濃縮検体では、過去のサーベイ同様非濃縮検体と比べ報告菌数の値が低かった。またレジオネラ属菌を検出できなかった機関も4機関(1機関は、全検査工程で検出できなかった機関)あった。

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71機関中55機関(約77%)が目標良好範囲を報告していた。例年非選択分離培地での結果と比較し、割合は低くなるものの90%前後と高い値で推移していたが、本年度は約77%と過去3年間の平均値と比較し約13%低い結果となっていた。また報告菌数も、昨年度は非選択分離培地の結果と比較すると、平均値、中央値ともに約14%低い報告値であったが、本年度は平均値で64%、中央値で72%低く、大幅な報告値の低下が認められた。選択分離培地による供試菌に対する発育抑制があることはこれまでも報告している¹⁻⁴⁾が、本年度の配付試料

においては、その感受性が高かった可能性も考えられた。

表3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。なお、分母となる数値が0であった場合は「-」と表記した。目標回収率20%以上100%未満を報告したのは、非濃縮②を分母とした場合、73機関中41機関(約56%:昨年度約74%)であった。非濃縮①を分母とした場合では、73機関中40機関(約55%:昨年度約79%)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、73機関中33機関(約45%:昨年度約73%)であった。本年度の回収率は、前述のどの分母を基準にした場合も昨年度を大きく下回る結果となっていた。これは、一昨年度に近い結果であった。研究班では、これまで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り^{1, 5)}、昨年度は良好な回収率を報告した機関が大幅に増えていたことから、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状況にあると推察していた。そのような中、今回の結果となったことから、改めて過去のデータとの比較を行ってみた。

本外部精度管理において、回収率による判定が開始された2017年度から本年度(2019年度)までの回収率の比較(分母:非濃縮②)を表4に示した。2017、2019年度を比較すると、良好機関割合は若干2019年度が高かったが、大きな差はなかった。しかしながら、全体平均値では10.4%、良好平均値では8.4%、良好最大値では28.8%、良好中央値では5.8%と

いずれの値も 2017 年度の方が高かった。また、回収率 20%未満だった報告値の平均では、2019 年度の方が 4.2%低かった。つまり、2017、2019 年度では、良好機関割合では大きな差はなかったが、実際の報告値においては、2019 年度の方が明らかに低い値を示していたことが分かる。次に、回収率の範囲を7区分に分け、その占有率を図1に示した。2017、2019 年度を比較すると、少しの検査工程の見直しにより、良好範囲に入る可能性の高い回収率 10%以上 20%未満の施設割合が 2017 年度では 23.9%と高かった。このことが 2018 年度の良好範囲占有率の増加に繋がった可能性が示唆されたのに対し、2019 年度では、その範囲の施設割合が 11%と低く、逆に回収率 10%未満の施設割合が 30.1%と、過去2年(16.9%、8.5%)を大きく上回る結果となっていた。

配付試料に使用している供試菌については、試料製造メーカーが保有する *Legionella pneumophila* ACM 5197 を 2015 年の本事業開始以来使用しているが、ここまでの検証から、今回の配付試料においては、選択分離培地の選択剤に対する感受性がこれまでよりも高かった可能性、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状況であることを踏まえると、濃縮工程の影響による発育抑制が過去の精度管理時より高かった可能性も考えられた。また、解析結果とは別であるが、配付試料の色に違和感を覚えながら検査をした 1 機関において、低い回収率となったことから、新たな試料で再検査をしたところ良好な結果が得られたとの報告もあった。以上、本年度は、配付試料の質について気になる点が認められているところであるが、日水製薬及び北海道立衛生研究所における配付試料の確認実験においては、問題は認められていない。

表5に本年度参加機関における、2015～19 年度の結果判定一覧を示した。ここでは、過去 5 年間の比較をしやすくするために、2016 度までの報告菌数から見た判定による結果も記載した。5年連続で参加した機関は 50 機関あった。本年度は、配付試料において濃縮工程の影響による発育抑制が過去の精度管理時より高かった可能性も考えられたが、これまでと同じ方式で以下に報告する。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 32 機関あった。このうち 10 機関は連続で良好範囲外を報告しており、回収率判定を実施している 2017 年度から3年連続で良好範囲外を報告していた機関も5機関あった。一方、2016 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 32 機関あり、うち5年連続が2機関、4年連続が1機関、3年連続が4機関、2年連続が 10 機関あった。この中には、回収率は良好結果を報告していたが、常に報告菌数で低い値を報告している機関もあり、潜在的に不安定な状況である可能性がうかがえる機関も複数あった。また複数年参加している機関で、参加以来目標良好外を報告している機関も5機関あった。以上、回収率、報告菌数を総合的に見ると、5 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 37 機関あった。この中には、検査結果が安定する方向に向かっている機関もあるが、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等、それぞれの結果

に応じた認識の共有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る。なお、安定している、安定傾向にある機関として、5年連続良好な結果を報告している機関が9機関、4年連続が3機関、3年連続が3機関、2年連続が7機関あった。

これまでも報告してきたが、レジオネラ属菌検査においては、コンラージ棒による塗抹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手技が必要である。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、塗抹の力加減、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。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。特に初参加の機関や検査担当者を変更した機関では、これまでも良好範囲外を報告する傾向が認められることから注意が必要である。引き続き研究班でも回収率の向上と安定に向け検討したいと考える。

2) 2018年度外部精度管理に係るアンケート調査及び検査法技術指導

アンケート調査で収集したコメントを表6に示した。良好範囲外の結果から改善したという機関のコメントを集約すると、

- ①濃縮をろ過濃縮法へ変更。
- ②ろ過フィルターをポリカーボネート製(ポアサイズ $0.2\mu\text{l}$)へ変更。
- ③ファネルの洗い出し工程を追加。
- ④培地への塗布方法を改善し、コンラージ棒

によるソフトタッチな塗抹を意識した。

- ⑤培地の検討(種類、乾燥度合い)
- ⑥濃縮工程全体を見直し、ミスを改善。
- ⑦報告値の記載ミスがあったため、検査チェックシートを改善。
- ⑧レジオネラ属菌検査セミナー(日水製薬主催)に派遣して、改めて検査工程を確認。

一方、上手く改善が進んでいない機関のコメントを集約すると、

- ①明確な改善ポイントが見つからず苦慮している。
- ②検査機会が少ない、検査担当者の入れ替わりが激しいなどで、技術の継承、維持に苦慮している。

という内容になると思われた。改善点が明確で上手く対応できた機関がある反面、明確な改善点が見つからず苦慮している機関もあった。後者は、今回直接技術指導を行った3機関のうち2機関も同様の状況であった。直接技術指導を行った3機関の過去の結果を表7に示す。検査機関A、Bは明確な改善ポイントが見つからず苦慮していた。現地で機材確認や検査担当者からも状況説明を受けたが、明確な問題点は見つからなかった。研究班からは、培地の取扱い、ろ過フィルターの洗い出し、培地塗布時のコンラージ棒によるソフトタッチな塗抹等を中心に、これまでの研究報告同様の説明をし、改めて検査全体を丁寧に実施することを心がけるよう求めた。これら2機関からは、本年度良好な結果報告がなされている。このことから、研究班の確認により、機材や検査工程で問題がなければ、明確な改善ポイントが不明だった場合において、検査工程全体に対し改めて注意を払い、一つ一つの作業を丁寧に対応することが、改善に繋がる要素の一つと考えられた。一方、機関Cは年間を通じて検査機

会が少ない状況にあった。今年度も良好な結果が得られなかったが、過去3年間の検査工程等に問題があったことが明確となり、本年度改善に向け対応した結果、あと少しの検査工程の見直しにより、良好範囲に入る可能性の高い回収率10%以上20%未満の範囲での報告値となっていた。今後ポイントを押さえればより改善に向かうと思われた。

今回、直接技術指導を行った機関では、いずれも改善方向に進んでいると思われた。直接現場で検討会を行うことで、改善に向かう機関は他にもあると思われる。各検査機関で使用機材が異なること、検査の考え方や検査頻度等に違いもあるため、簡単ではない部分もあるが、次年度以降も引き続き直接現場に向き確認作業を行いたいと考える。また、現在、改善を検討中の機関もあること、本年度の報告値が全体的に低かったことなどからも、次年度もアンケート調査を実施し、情報の共有に努めたいと考える。

3) 検査研修システムについて

これまで継続的な研修という意味合いでは、2014、2016、2018年度に、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、研究班推奨法に沿った実習を伴ったレジオネラ検査研修会がある。内容的には、充実したものであったが、その反面、規模が大きく、準備、調整には大きな労力と時間を要すること、今後継続できるかは不明であること、行政機関のみを対象にした研修会であったことが問題点として挙げられていた。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が毎年開催されている。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研究班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、難航していた。そこで本年度、2013年8月、2019年4月に、民間機関として実習を伴ったレジオネラ属菌検査研修実績のある関東化学株式会社に打診し、研究班との間で継続的な研修会実施に係る協議を行った。その結果、規模を調整することで一定の基盤が整いつつあり、現在、次年度試行的に開催できるよう準備を進めている。

D. 結論

1) 精度管理

本外部精度管理事業は、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はこれまでも報告しているところである。一方、本年度の配付試料において、日水製薬及び北海道立衛生研究所における確認実験で問題は認められていないが、選択分離培地の選択剤に対する感受性がこれまでよりも高かった可能性、濃縮工程の影響による発育抑制が過去の精度管理時より高かった可能性も考えられた。また、配付試料の色に違和感を覚えながら検査をした1機関において、低い回収率となったことから、新たな試料で再検査をしたところ良好な結果が得られたとの報告もあった。これらのことから、改めて参加機関側、配付試料側、双方について検証したいと考える。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。

2) 2018年度外部精度管理に係るアンケート調査及び検査法技術指導

アンケート調査からは、各検査機関の現状把握ができた一方で、検査が不安定な施設への対応が改めて求められた。今年度技術指導を行った施設においては、結果改善が認められたことから、引き続き直接技術指導を行えるよう努めたい。また、現在、改善を検討中の機関もあること、本年度の報告値が全体的に低かったことなどからも、次年度もアンケート調査を実施し、情報の共有に努めたいと考える。

3) 検査研修システムについて

検査研修システムについては、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、難航していた。本年度、関東化学株式会社と連携することで一定の基盤が整いつつある。現在、次年度試行的に開催できるよう準備を進めている。

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)「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.

3) 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.

4) 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

1) 森本 洋、小川恵子、三津橋和也:レジオネラ症患者の喀痰からいかにしてレジオネラ属菌を検出するか、第 68 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2019 年 10 月、仙台

2) 森本 洋:公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について、厚生労働省令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020 年 2 月、東京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

レジオネラ属菌検査実施施設様 各位

2019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上げます。

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「2019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上げます。

■参加要件

別紙1.「参加要件」を満たし、かつ、別紙2.「2019年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」（参考：厚生労働省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	「2019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）。 2019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）
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2019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。
10月18日（金）	参加募集締切
11月18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。
11月29日（金）	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。
11月19日（火）～ 12月20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。
12月20日（金）17時	回答締切
1月24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けます。なお、振込手数料は貴施設ご負担をお願い致します。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。
2月28日（金）	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。

■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



日水製薬株式会社

参加要件

2019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ーレベル(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

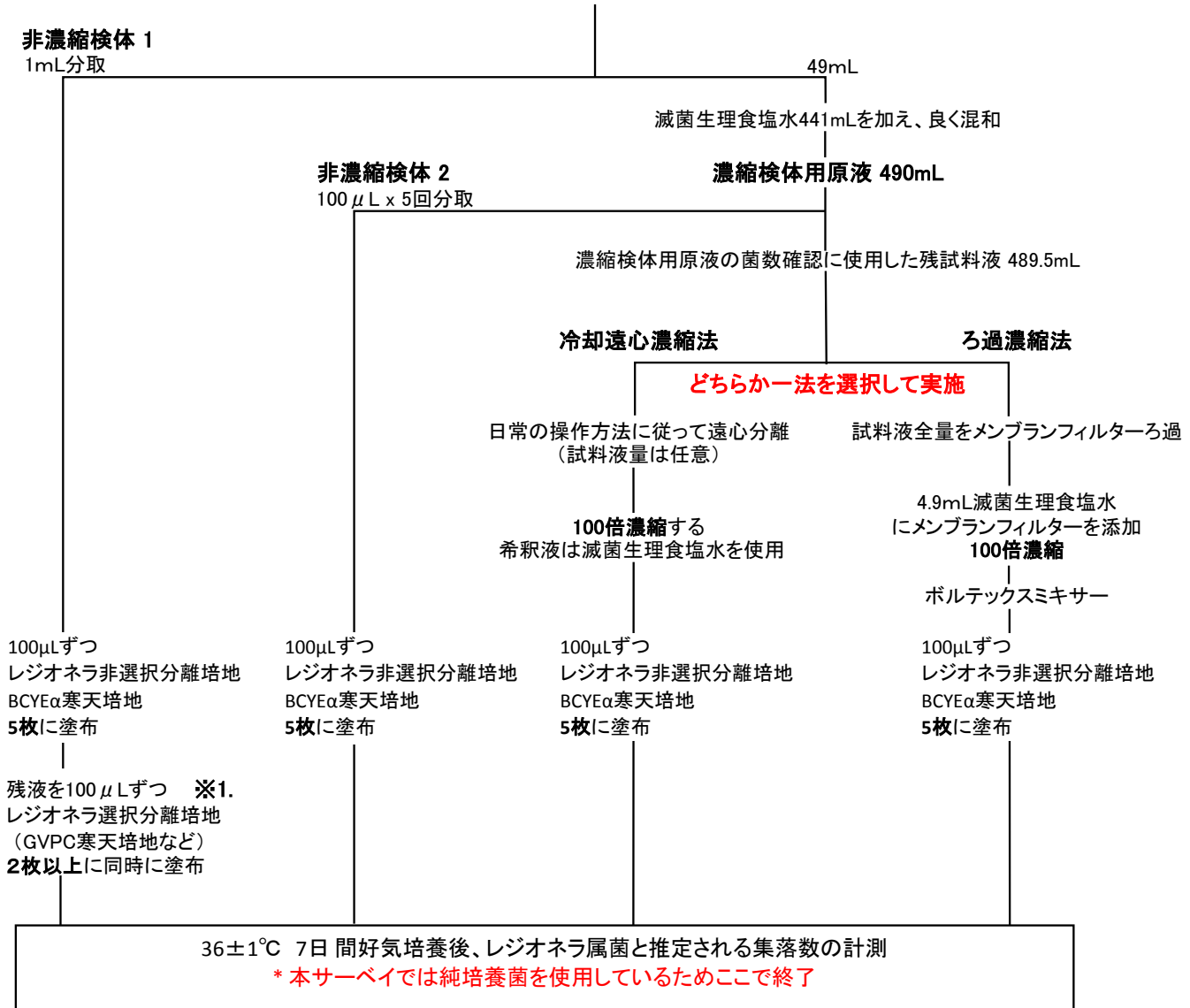
予告なく実施スケジュールが変更となることがあります。変更後のスケジュールは、メール等にてご連絡をいたします。

以上

2019年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

(参考：厚生労働省研究費レジオネラ属菌検査推奨法 / ISO11731:1998 / ISO 11731:2017)

500mL以上の容器に入れた滅菌生理食塩水50mLに、精度管理サーベイ試料1バイアルを加え良く混和



■ 2019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。2019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。

2019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、2019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いただきますのでご査収のほど、よろしくお願ひ申しあげます。

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・・ 6枚
- ・ 結果記入用メモ（Web入力する際にご活用ください）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4枚
- ・ 試料受諾書兼承諾書・・ 1枚
- ・ 精度管理サーベイ試料A（瓶ラベルに「A」と記載）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1本

*** 到着後直ちにマイナス18℃～マイナス33℃で適切に保管してください。**
*** 到着後直ちに内容を確認し、書類の不備や精度管理サーベイ試料Aの破損等を認めた場合、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局にご連絡ください。**

2. 結果入力手順

- 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。

注意：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。

3. スケジュール

期 日	内 容
11/19(火)～20(水)	■ 精度管理試料到着 精度管理サーベイ試料が到着します。送付内容を確認してください。
12/20(金) 17時	■ 回答締切 検査を実施し、上記結果入力手順にそって結果の入力をお願いいたします。回答期限を12/20(金) 17時とさせていただきます。
2/28(金)	■ 解析結果開示 解析結果はコスモ会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を入力後、試験実施者様の画面にて解析結果の閲覧・印刷ができます。

4. お問い合わせ先

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
TEL : 03-5846-5707 FAX : 03-5846-5629 E-mail : legi-srvy@nissui-pharm.jp

2019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

非濃縮検体 1		非濃縮検体 2	冷却遠心濃縮法	ろ過濃縮法
		濃縮検体		
非選択分離培地 (5枚)	選択分離培地 (2枚以上)	非選択分離培地 (5枚)	非選択分離培地 (5枚)	
実施	実施 (参考値)	実施	冷却遠心濃縮法、ろ過濃縮法 どちらか一方を実施	

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（2019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、100 μ L 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 \pm 1 $^{\circ}$ C 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（BCYE α 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、BCYE α 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 \times 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、 $100\mu\text{L}$ ずつ塗布します。
- (2) $36\pm 1^\circ\text{C}$ 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 \times 1000

■非濃縮検体2

- (1) 試料液の調整④の検体 490mL より、 $500\mu\text{L}$ を分取して、非選択分離培地に $100\mu\text{L}$ 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 \times 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 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(薬生衛発 0919 第 1 号)より抜粋 ■参考情報 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(薬生衛発 0919 第 1 号)より抜粋

・遠心加速度 $6,000g$ で 10 分又は $3,000g$ で 30 分、 $15\sim 25^\circ\text{C}$ で遠心する。遠心はブレーキ設定せず、自然に停止するのを待つ。

・使用機器で遠心加速度設定ができない場合は、以下の式で計算する。

遠心加速度(g) = $1,118 \times$ 回転半径(cm) \times 回転速度²(rpm) $\times 10^{-8}$

- (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、100 μ L ずつ塗布します。
- (4) 36 \pm 1 $^{\circ}$ C 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 \times 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 500 μ L 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 \sim 0.9 \times 2 \sim 20 μ m 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 0.45 μ m 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 0.2 μ m と規定されている。

■参考情報 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(薬生衛発 0919 第 1 号)

- ・メンブランフィルター：ポリカーボネート製で、ポアサイズ 0.20 μ m 又は 0.22 μ m と記載されている

■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 $0.2 \mu\text{m}$ 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、 $100 \mu\text{L}$ ずつ塗布します。
- (6) $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 \times 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。

COSMO
コズモ会

コズモ会は食品衛生検査に安全と安心をご提供する情報サイトです。
最新の検査データや最新の検査結果を掲載しております。

[検査結果](#)
[検査結果](#)
[検査結果](#)
[検査結果](#)

[検査結果](#)
[検査結果](#)
[検査結果](#)
[検査結果](#)

HAPPINESS WILL BE YOURS
10年間の実績と信頼をあなたのもとへ。

WHAT'S NEW

- 20170629 2017年度食品衛生検査結果
- 20170628 2017年度食品衛生検査結果
- 20170628 2017年度食品衛生検査結果
- 20170628 2017年度食品衛生検査結果
- 20170628 2017年度食品衛生検査結果

製品情報

- 20170629 検査結果報告書(CPR)2017年度版
- 20160901 検査結果報告書(CPR)2016年度版
- 20160901 検査結果報告書(CPR)2016年度版

学会・セミナー情報

- 20170314 2017年度食品衛生検査結果報告書発表会
- 20160901 2016年度食品衛生検査結果報告書発表会
- 20160901 2016年度食品衛生検査結果報告書発表会

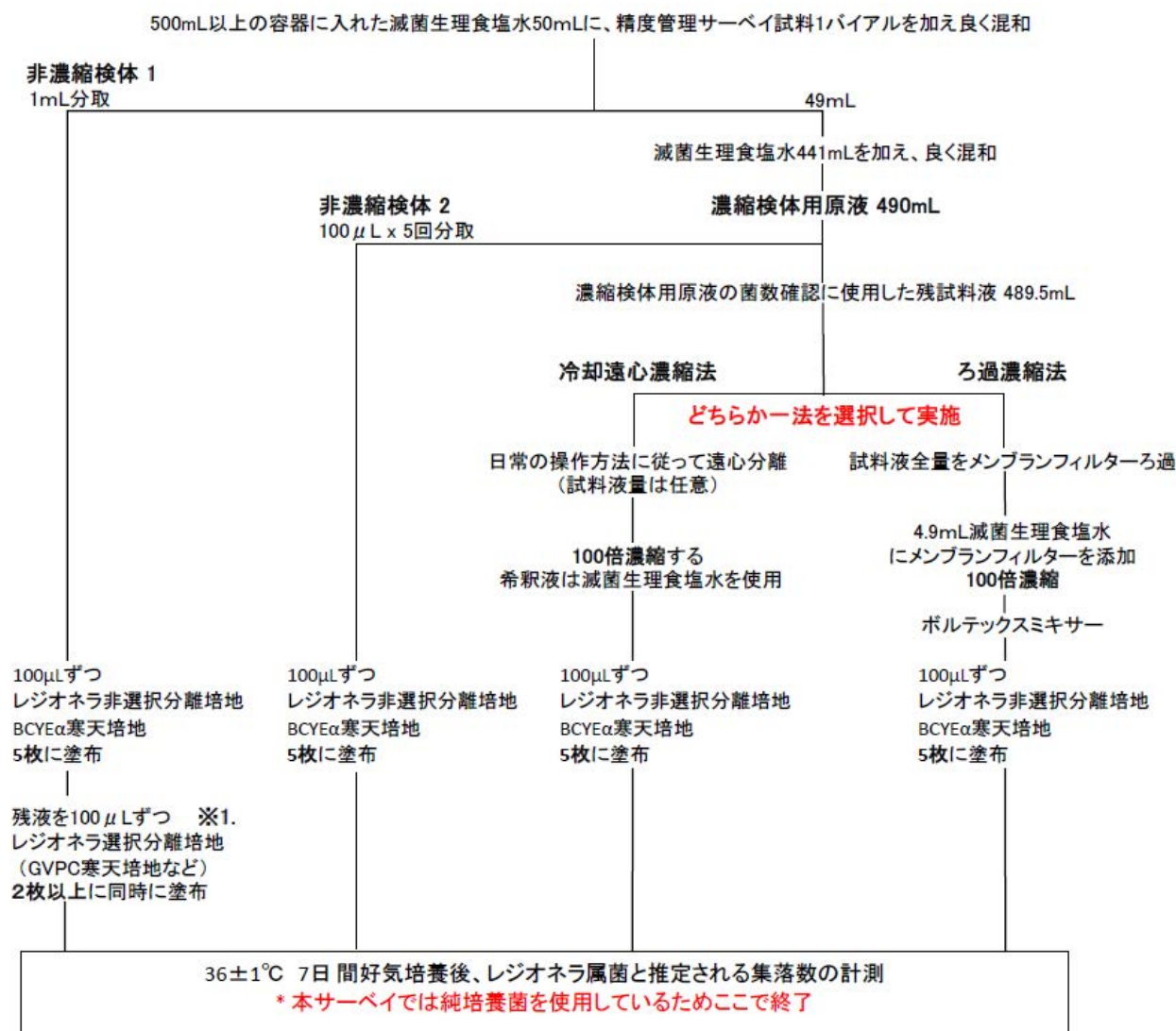
検査管理ページ

細菌検査 2017年度

検査結果報告書 2017年度

2019年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

(参考：厚生労働省レジオネラ属菌検査推奨法 / IS011731:1998 / IS011731:2017)



■ 2019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。2019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BCYE α 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。

2019 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。

- 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(薬生衛発 0919 第 1 号)
IS011731 : 2017 IS011731 : 1998 新版レジオネラ症防止指針 1999
第 4 版レジオネラ症防止指針 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

■2019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。

BCYE α 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

■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) 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。

GVPC 寒天培地

WY0 α 寒天培地

MWY 寒天培地

CCVC 寒天培地

PAC (BMPA α) 寒天培地

PAV 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

■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。

BCYE α 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

--

□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 = $\frac{\text{平均値}}{100} \times 100$)

(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。 BCYE α 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
バイオメリュー・ジャパン 極東製薬工業 メルク その他

(5) 遠心加速度は何 g ですか。 g

(6) 遠心時間は何分間ですか。 分

(7) 設定温度は何℃ですか。 °C

■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 = $\frac{\text{平均値}}{100} \times 100$)

(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。

BCYE α 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) フィルターの材質は何ですか。

ポリカーボネート その他

(6) フィルターのポアサイズは何 μm ですか。

μm

(7) ボルテックスミキサーは何分かけていますか。

分

以上

2019年11月18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、レジオネラ属菌検査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きます。

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、11月21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： 2019年 11月 日

貴施設名
ご所属部署
ご担当者名 ⑩
ID 番号 <small>注</small>

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

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	5020	1300	4200	1538		42	2420	800	2400	626	
2	660	130	1000	68		43	1400	150	2000	410	
3	8300	2070	7200	12		44	980		1600	28	
4	4800	760	4600	590		45	4000	1300	4400	12	
5	5180	950	5600	1134		46	3860	1330	6000	1540	
6	3580	1130	1600	680		47	6100	2380	6600	2066	
7	1520	500	1200	182		48	2740	650	2600	892	
8	4480	900	3600	1804		49	660	120	400	92	
9	2040	3080	2800	224		50	4900	1100	6600	1518	
10	6400	1150	7600		584	51	1580	500	1200	70	
11	7300	3370	4200	1936		52	2320	200	2400	846	
12	4540	3100	5000	36		53	4460	1180	2800	1062	
13	2400	950	2000	472		54	3880	1050	3000	138	
14	2820	830	2800	774		55	4920	1630	5400	1640	
15	2700	575	5800		248	56	7240	1480	4200	2822	
16	2720	950	3200	586		57	5200	1900	93200		976
17	500	950	200	28		58	6240	3000	6200	2442	
18	4700	550	3600	1696		59	4700	3630	6000	1400	
19	5280	1930	5000	1042		60	3400	300	4200	516	
20	5240	1950	5000	2052		61	2600	240	2000	0	
21	2420	1400	1800	644		62	3340	1130	4200	4	
22	5320	2330	3600	734		63	2500	760	3800	506	
23	5980	1770	6600	1620		64	3940	600	2400	202	
24	1120	140	0	224		65	5800	3900	4800	2504	
25	4800	1250	6200	1196		66	4300	1900	2400	576	
26	4100	3780	37000	2180		67	3300		2200	980	
27	4200	2080	4000	1272		68	5180	2240	6800	1462	
28	7080	2840	6200	1286		69	1680	880	2000	870	
29	5240	1270	7000	476		70	3100	980	2200	894	
30	5260	1450	5200	1748		71	10540	5000	13400	4888	
31	5900	2570	8200	2796		72	1460	230	2800	328	
32	3300	550	3600	1358		73	0	0	0	0	
33	3820	500	4800	0							
34	2120	800	2400	95							
35	3920	600	3600	1006							
36	4180	2750	6400		390						
37	3700	1200	2400	72							
38	7960	1950	10200	916							
39	4020	1000	7200	0							
40	5500	2300	4800	1714							
41	1980	270	1800	1008							
						平均値	3984	1415	5745	964	550
						最大値	10540	5000	93200	4888	976
						最小値	0	0	0	0	248
						中央値	4000	1130	4000	846	487
						対象機関	73	71	73	69	4
						良好機関	71(97%)	55(77%)	67(92%)		

* 選択分離培地による結果

表2 設定良好範囲内菌数報告施設数の割合(2016-19年度)

年度	参加施設数*	非濃縮①	非濃縮①選択分離	非濃縮②
2016	71	97%	87%	94%
2017	71	99%	91%	93%
2018	70	97%	93%	97%
2019	73	97%	77%	92%

* 各項目で非回答の施設有り

表3 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	30.6	36.6	28	18.2	20.7	55	33.3	30.4
2	10.3	6.8	29	9.1	6.8	56	39	67.2
3	0.1	0.2	30	33.2	33.6	57	18.8	1
4	12.3	12.8	31	47.4	34.1	58	39.1	39.4
5	21.9	20.3	32	41.2	37.7	59	29.8	23.3
6	19	42.5	33	0	0	60	15.2	12.3
7	12	15.2	34	4.5	4	61	0	0
8	40.3	50.1	35	25.7	27.9	62	0.1	0.1
9	11	8	36	9.3	6.1	63	20.2	13.3
10	9.1	7.7	37	1.9	3	64	5.1	8.4
11	26.5	46.1	38	11.5	9	65	43.2	52.2
12	0.8	0.7	39	0	0	66	13.4	24
13	19.7	23.6	40	31.2	35.7	67	29.7	44.5
14	27.4	27.6	41	50.9	56	68	28.2	21.5
15	9.2	4.3	42	25.9	26.1	69	51.8	43.5
16	21.5	18.3	43	29.3	20.5	70	28.8	40.6
17	5.6	14	44	2.9	1.8	71	46.4	36.5
18	36.1	47.1	45	0.3	0.3	72	22.5	11.7
19	19.7	20.8	46	39.9	25.7	73	-**	-**
20	39.2	41	47	33.9	31.3			
21	26.6	35.8	48	32.6	34.3	平均値	22.2	22.5
22	13.8	20.4	49	13.9	23	最大値	53.2	67.2
23	27.1	24.5	50	31	23	最小値	0	0
24	20	-**	51	4.4	5.8	中央値	22.2	21.5
25	24.9	19.3	52	36.5	35.3	対象機関	73	73
26	53.2	5.9	53	23.8	37.9	良好機関	40(55%)	41(56%)
27	30.3	31.8	54	3.6	4.6			

* 参考

** 分母となる数値が0

表4 回収率の比較(分母:非濃縮②、2017-19年度) (%)

年度	良好機関割合	全体平均値	良好平均値	良好最大値	良好最小値	良好中央値	<20%平均値
2017	52	32.9	42.4	96	20	39.9	10.9
2018	74	47.8	47.6	94.5	20.2	43.1	12.1
2019	56	22.5	34	67.2	20.3	34.1	6.7

図1 回収率の比較(分母:非濃縮②)

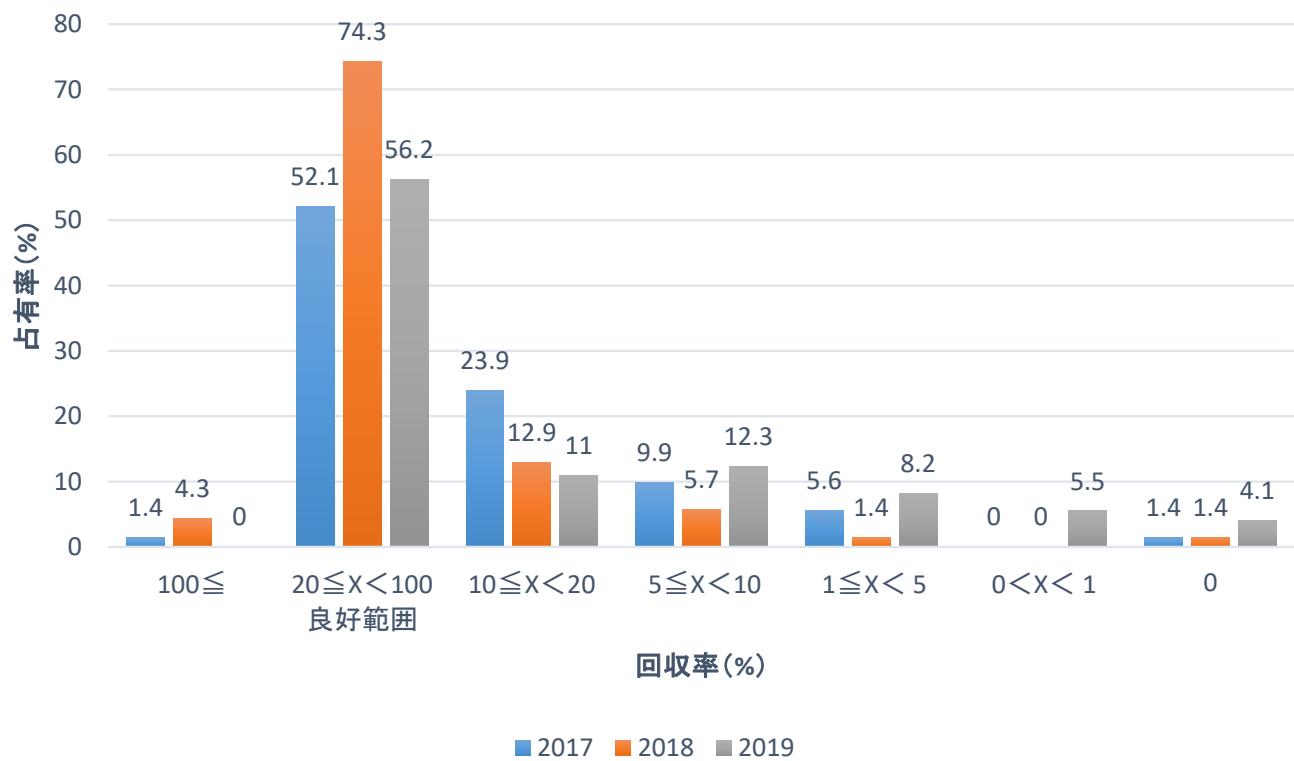


表5 2015~2019年度結果概略(2015/2016/2017/2018/2019、良好範囲(菌数○、回収率(分母非濃縮② 2017~)黒字)、範囲外(菌数*、回収率(2017~)赤字、検査項目外又は不参加: -)

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	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○		38	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/*/○/○/○	
2	-/-/○/○/○	-/-/*/○/○	-/-/*/○/*		39	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/○/*/*	
3	-/-/-/○/○	-/-/-/○/○	-/-/-/○/*		40	○/○/○/○/○	-/*/○/○/○	○/*/○/○/○	
4	-/○/○/○/○	-/○/○/○/○	-/-/*/*/*	-/*/-/-/-	41	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/○/○/○	
5	-/○/○/*/○	-/○/○/*/○	-/-/-/-/○	-/*/○/*/-	42	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○	
6	○/○/-/○/○	-/○/-/○/○	*/*/-/*/○		43	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/*/*/*	
7	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/*/*		44	*/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/*/○/*	
8	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○		45	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/*/*	
9	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/*/*		46	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○	
10	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○		*/○/*/*/*	47	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/○/○/○	
11	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/*/*/○		48	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	-/-/○/*/○	*/*/-/-/-
12	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/*/*/*/*		49	○/○/○/○/○	-/○/○/○/*	○/○/○/○/*	
13	*/○/○/○/○	-/*/○/○/○	*/*/*/*/○*		50	-/-/○/○/○	-/-/○/○/○		-/-/○/○/○
14	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/*/*/○/○		51	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○	-/-/-/-/*	
15	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	-/-/○/-/-	*/○/-/○/*	52	○/-/○/○/○	-/-/○/○/○	○/-/○/○/○	
16	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/*/*/○/○*		53	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/*/*/○	
17	-/-/○/○/*	-/-/○/○*	-/-/○/○/*		54	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/*/○/○/*	
18	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/○/○/○		55	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○	
19	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/○/*/*		56	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○	
20	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/*/*/○/○		57	-/○/○/○/○	-/○/*/○/*		-/*/○/○/○
21	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○		58	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○	
22	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○		59	○/○/-/○/○	-/○/-/○/○	○/○/-/*/*	
23	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○		60	○/○/○/○/○	-/○/*/○/○	*/*/*/*/*	
24	-/-/*/○/○	-/-/*/○/*	-/-/*/*/*		61	-/-/-/-/○	-/-/-/-/○	-/-/-/-/*	
25	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/*/*/○		62	-/-/○/○/○	-/-/○/○/○	-/-/○/○/*	
26	-/○/○/○/○	-/○/○/○*	-/○/○/○/○		63	*/○/○/○/○	-/○/*/○/○	*/○/*/○/*	
27	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○		64	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/*/*/*	
28	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○		65	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/○/○/○	
29	-/-/-/○/○	-/-/-/○/○	-/-/-/*/*		66	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	*/○/○/*/*	
30	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/*/*		67	○/-/○/○/○	-/-/○/○/○	-/-/○/○/○	
31	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○		68	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	-/*/○/○/○	*/-/-/-/-
32	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○		69	○/○/○/*/*	-/○/○/*/*	○/*/○/*/*	
33	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/*/*		70	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	-/○/○/*/*	*/-/-/-/-
34	○/*/-/○/○	-/*/-/○/○	*/*/-/○/*	-/○/-/-/-	71	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	-/○/○/○/○	
35	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/○/○/○/○		72	○/○/○/○/○	-/○/○/○/*	○/*/○/*/*	
36	○/○/○/○/○	-/○/○/○/○	○/-/-/-/-	○/○/○/○/*	73	○/-/-/○/*	-/-/-/○/*	○/-/-/*/*	
37	○/○/○/○/○	-/*/○/○/○	*/*/*/*/*						

表6 アンケート調査コメント一覧

* 本調査は、白水製薬が主催した「2018年度 レジオネラ属菌精度管理サーベイ」に参加した施設を対象にしております。

設問			全国集計
1: 機関名			全国集計
2: 担当者名			
3: メールアドレス			
		選択番号	詳細コメント
4: 昨年度(2018年度)の自施設の外部精度管理の結果について			
1. 良好範囲 2. 良好範囲外 (1.の場合は8へ)			1:52, 2:17
* 4:で2と回答した施設にお尋ねします。(5/6)			
5: 良好範囲外だったのは以下のどの結果でしたか?			
1. 菌数 2. 回収率 3. 両方			1:0, 2:15, 3:2
6: 良好範囲外の結果を受け、何か改善を試みましたか?			A:濃縮検体について下限良好範囲外
1. 試みた(その内容を記載下さい) 2. 試みなかった(理由等記載下さい)			<p>1</p> <p>A:原因を推測し、改善措置および再発防止策として、以下の2点を行った。・ポルテックス操作の改善 ・検査担当者をレジオネラ属菌検査セミナーに派遣。 B:ろ過濃縮の手順を確認した。 C:検査法を冷却過心法からろ過濃縮法に変更した。 D:保存菌株を用いて同様に試験を実施したが、菌数・回収率ともに問題はなかったため、原因がわからず苦慮している。 E:フィルターホルダーの洗い方を変えた。 F:ろ過濃縮の工程で、ろ過した後にホルダーをよく洗うこととした。 G:ポルテックスをかける時間を長した。他自治体から情報収集を行っている。 H:塗抹法の改善(濃縮検体の回収率が低かった。濃縮検体についてソフトタッチの塗抹を実施、培地辺縁に菌集落ができたが、単独コロニーでないため菌数算定から除外したことが原因と考えられた) I:内部精度管理を実施し、全検査工程を確認した。その際に、フィルターや培地等の検討も行った。 J:非濃縮検体の菌数は、良好範囲内なので、ろ過濃縮時に問題があると思われる。そのため、ろ過の工程を確認したが、不明な点等が多く苦慮している。 K:全行程の振り回り検証を行ったが、改善箇所は判明しなかった。 L:全検査工程の確認(試薬、フィルター等の器具機材、ワークシート)の確認を実施した。 M:培地塗布数日後に生えたコロニーについて、遺伝子検査の結果、レジオネラ属菌陰性と判定した。さらに数日後に生えたコロニーについても同様の形態で陰性で見做したため、下限良好範囲外となった可能性があった。別日に生えたコロニーについても遺伝子検査するようにした。</p> <p>2</p> <p>N:ろ過濃縮したフィルターからの再浮遊に問題があったと思われるが、今回の方法と日常検査では工程が若干異なるため、改善するに至らなかった。 O:濃縮工程において何処が適切でないのかは不明で改善には至っていないが、フィルターの取扱い、ポルテックスによる回収、接種等については細心の注意を払っている。 P:検査方法を確認した結果、試料をろ過した後、試料の溶解に用いた容器の内部を洗った滅菌生理食塩水もろ過する必要があるのではと考えたが、試料の作成等ができず検討することができなかった。 Q:検査工程を確認してみたが、原因となる箇所がわからなかった。</p>
* 6:で1と回答した施設にお尋ねします。(7)			
7: 改善を試みた結果			
1. 改善箇所が判明した(具体的な改善策を記載下さい) 2. 改善箇所が判明しなかった(理由等記載下さい)			<p>1</p> <p>B:ろ過濃縮に使用したフィルターホルダーの使用方法を誤っていたことが分かった。 C:ろ過濃縮法に変更し、回収率が改善した。 H:塗抹法の改善(菌液がある程度、培地に浸透するまで、ソフトタッチで塗布を行うこととした) I:BCYE α培地の培地メーカーによる回収率に差があった。回収率がよく、コロニー形態も見やすい関東化学社のBCYE α培地を用いることとした。また、ろ過濃縮後に壁面を200mLで洗い出したことで、回収率が良くなった。</p> <p>2</p> <p>A:検証方法がないため。 F:業務としては、略痰検査は実施しているが、浴槽水検査を実施していないため。 G:検査工程を確認してみたが、改善箇所を見つけることができていない。 J:ろ過工程のどこ段階で菌数が減少しているか、見つかることができていない。 L:工程に特に大きな改善点は見当たらなかった。今後添加回収試験を実施し、詳細な検討したい。 M:再検査は実施していないため、不明である。 N:非濃縮法を併用するなどして、濃縮法による結果をチェックしている。</p>
8: 過去のサーベイの結果について			
1. 良好範囲外があった 2. 良好範囲外は無かった 3. 参加していない			<p>1</p> <p>A:H29不参加、H28濃縮検体下限良好範囲外。 M:2017及び2015年度は良好範囲外は無かった。2016年度は濃縮検体ろ過濃縮法が「下限良好範囲外」であった。 R:2015,2016年度のろ過濃縮法のみ下限良好範囲外。 その他 N:不明。</p>
* 8:で1と回答した施設にお尋ねします。(9)			
9: 良好範囲外の結果を受け、何か改善を試みましたか?			

表6 アンケート調査コメント一覧

* 本調査は、日水製薬が主催した「2018年度 レジオネラ属菌精度管理サーベイ」に参加した施設を対象にしております。

設問		
<p>1. 試みた(その内容を記載下さい) 2. 試みなかった(理由を記載下さい)</p>	<p>1: 20、2: 8</p>	<p>1 A: 原因工程および操作について推測・検討し、自家調整検体を用いて内部精度管理を実施することとした(実施できず)。 B: 初回のサーベイでは、濃縮方法を見直した。2回目のサーベイでは、培養手順を確認した。 D: 保存菌株を用いて同様に試験を実施したが、菌数・回収率ともに問題はなかったため、原因がわからず苦慮している。 E: 培地への塗布の際、力を入れずやさしくそっとコーンラージするようにした。 H: 培地メーカー毎の比較、塗布方法の検討。 K: 全行程の振り返り検証を行ったが、改善箇所は判明しなかった。 S: 操作上の問題ではなく検体希釈倍率の計算上の誤りがあったため、記録シートを改良し計算式を記録することとした。 T: 全検査工程を確認してみたが、どこが適切でないのか苦慮している。 U: 濾過濃縮後、フィルターからポルテックスにて菌を回収する方法の検討を実施した。具体的には、容器の種類、フィルターの捕集面の向き、ポルテックス以外の回収方法(超音波処理)などの検討を実施した。 V: 2015年に冷却遠心法で良好範囲外の結果だったため、ろ過法へ切り替えた。翌年、ろ過法で良好範囲外となった。そのときは全工程を再度確認したが、不明な点も多く苦慮した。 W: 再度、精度管理の検体を購入し検査した。 X: フィルターをポルテックスにかける時間を延長する等の変更を加えたが、それが適切なかは不明で、苦慮している。 Y: 日水製薬株式会社主催のレジオネラ属菌検査セミナーに参加し、手技を確認。コンラージにて塗りのばす際のソフトタッチの徹底、フィルターを50mL遠沈管に入れる際の注意の周知をした。 Z: 濃縮検体だけでなく非濃縮検体も菌数が少ない傾向があったため、検体塗布以降の検査工程に改善可能な点がないか検討した。 a: 濃縮工程を冷却遠心濃縮法からろ過濃縮法に変更した。 b: 濃縮後の結果が範囲外であったため、ろ過後に容器内をPBSで洗浄する、フィルターを乾燥状態にしない、ポルテックス中はフィルターがPBSに触れていることを確認する等、菌が弱らないよう注意を払うようにした。 c: レジオネラ属菌検査セミナーへの参加。 d: 冷却遠心濃縮法からろ過濃縮法(ポリカーボネート製フィルター使用)へ変更した。 e: 濃縮水からの回収率に問題があったので、当時使用していたフィルターでの回収率を確認し、フィルターに問題があることが判明した。 2 C: 精度管理サーベイの方法と通常の検査の方法は異なるため。 M: 良好範囲内の対数値は3.48~4.89に対し、報告値(対数)は3.44であり、僅かに外れてしまった可能性があり、参加施設全体も下限側に分布していた。 P: 検査方法を確認した結果、試料をろ過した後、試料の溶解に用いた容器の内部を洗った滅菌生理食塩水もろ過する必要があるのではと考えたが、試料の作成等ができず検討することができなかった。 R: 2015,2016年度のろ過濃縮法のみ下限良好範囲外であったため。また、2017,2018年度では、実施した全ての項目で良好範囲内であったため。 f: 原因が培地の調整ミスと明らかであったため。 g: 記録がなく、理由は不明です。 h: Bioballを溶解しただけなのに添加菌量の10分の1であり、当センターに問題がないと判断した(回収率に問題はなかった)。 i: 原因不明のため、特に改善を試みなかった。</p>
<p>* 9: で1と回答した施設にお尋ねします。(10)</p>		
<p>10: 改善を試みた結果</p>		
<p>1. 改善箇所が判明した(具体的な改善策を記載下さい) 2. 改善箇所が判明しなかった</p>	<p>1: 11、2: 9</p>	<p>1 B: 初回のサーベイ結果を受け、濃縮法を冷却遠心濃縮法からろ過濃縮法に変更した。2年目のサーベイ結果を受け、培養時はシャーレのふたを上にするようにした。 E: 非濃縮検体の菌数について、改善が見られた。(培地への塗布の際、力を入れずやさしくそっとコーンラージする) S: 操作上の問題ではなく検体希釈倍率の計算上の誤りがあったため、記録シートを改良し計算式を記録することとした。 U: フィルターの捕集面の向きを容器の底面に対して上向きから下向きに変更した。また、回収方法をポルテックス1分間から超音波処理24秒に変更した(精度管理では指定通りポルテックスにて実施)。 V: 冷却遠心法からろ過法への切り替えを行った。ろ過法でも良好範囲外の結果報告があり、過時の吸引が強すぎるのかと考え、吸引を弱めに行うように心がけたところ2017年からは良好範囲内である。 Y: その後上記を徹底し実施したところ、良好範囲外と出た翌年より良好範囲となった。 Z: 培地塗布時におけるコンラージ棒の力加減が発育集落数に影響する可能性を検証し、ターンテーブルを導入のうえソフトタッチを意識して塗布するようにした。 a: 濃縮工程を冷却遠心濃縮法からろ過濃縮法に変更すると良好範囲内になった。 d: 検査法の変更により、回収率が上がった。 e: 濃縮に使用するフィルターをセルロース混合エステル素材、ポアサイズ0.45μmのフィルター(37mmモニターユニットシステム)からポリカーボネート素材、ポアサイズ0.2μmのフィルターに変更した。 j: 2015年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイにおいて、ろ過濃縮法で、良好範囲外があったが、回収率は低くなかった。よって、濃縮工程以外の試料の混ぜ方、培地への接種量、コンラージの力加減などを中心に改善を試みた。 2 A: 検証方法がないため。 T: 当所では、冷却遠心濃縮法で実施している。良好範囲内および良好範囲外でも、結果は下限値に近く改善箇所が判明しない。 W: 精度管理と同じように検査をしたが、再検査では良好な結果となったため、問題点がわからなかった。 X: 2018年度については良好な結果であったが、それが、ポルテックス時間の延長によるものなのか判明していない。 b: 改善以降、範囲外となったことはないが、具体的にどの対応が良かったのかは不明。 c: 改善箇所は判明しなかったが、翌年以降は良好な結果が得られている。</p>
<p>—* その他 *— 自由に記載下さい。</p>		
		<p>A: 外部精度管理以外に改善措置について検証の手段・機会がなく、精度管理に苦慮している。また、業務経験の浅い職員が入れ替わって参加していることも、連続して良好範囲外の結果が出ている要因の一つとして考えられる。B: 当センターでは、本サーベイ以外でレジオネラ属菌を扱う機会が非常に少なく、技術の維持に苦慮している。 E: 検査工程の改善箇所を見つけるべく、2018年度レジオネラ属菌検査セミナーを受講する等したが、改善箇所が見つからず苦慮している。研究班から直接アドバイスを頂きたい。 G: 当所では、回収率が低い原因が見つからず苦慮している。 L: 当所では、検査員の入れ替わりが激しく、また、レジオネラの検査も年に数件しかないため、技術の維持が課題である。レジオネラの実技研修会があれば参加したい。また、このような精度管理で良好範囲外の場合の適切な対処法や適切な添加回収試験の方法があれば知りたい。 M: 2019年度に入って、レジオネラ症患者発生に伴う検査が例年より多いが、全国的にも多いのでしょうか。何か要因はあるのでしょうか。 O: 研究班から直接アドバイスを頂くことは可能でしょうか。 V: 本アンケートの主旨とは異なると思いますが、研究班でレジオネラの外部精度に参加した自治体間の結果をフィードバックしていただけたらとありがたいです。 Z: サーベイ結果入力時のアンケート集計で、サーベイ成績と有意に連動する項目があるようなら、ぜひ情報還元をお願いしたい。 l: 2018年度は冷却遠心法での精度管理の参加でしたが、今年度からろ過濃縮法へ切り替えました。今年度の精度管理にも参加予定ですが、その際に良好範囲外になれば他所にアドバイスをもらうことになると思います。 k: 検査者の技量等の確認の意味でも地衡研として精度管理の継続をお願いしたい。 m: 当センターは良好範囲内ではありますが、回収率が高いわけではありません。ワーキンググループの方法をしっかりと見ながら行っているつもりですが本当に出来ているのかわかりません。</p>

ご協力ありがとうございました。

表7 直接技術指導を行った3機関の過去4年間の結果

機関	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮
A	○/○/-/○	-/○/-/○	*/*/-/*	
B	○/○/○/○	-/○/○/○	○/○/*/*	
C	-/○/○/○	-/○/○/○	-/-/*/*	-/*/-/-

(2015/2016/2017/2018、判定は表5に準じる)

令和元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)
公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究

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を導入した循環式浴槽を洗浄する必要性

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	枝川亜希子	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
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	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
研究協力者	茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
研究協力者	藤井 明	株式会社ヘルスビューティー
研究協力者	斎藤 利明	株式会社ヤマト 温浴事業部
研究協力者	小坂 浩司	国立保健医療科学院 生活環境研究部

研究要旨

pH9 以上の高 pH の温泉水に対して、次亜塩素酸ナトリウムが消毒剤として使用されると、高 pH 等が理由で消毒効果が減弱し、レジオネラ属菌の増殖が問題となることがある。これを回避すべく、高 pH においてもレジオネラ属菌への消毒効果が発揮される、モノクロラミン消毒の活用が進められている。ところがモノクロラミンを長期に使用すると、浴用水中の従属栄養細菌数が増加することがある。そこで本研究では、従属栄養細菌数の増加の再現と、洗浄・消毒の必要性について検討した。協力を得た 2 箇所の営業施設はいずれも高 pH の温泉水を循環利用している施設で、モノクロラミン消毒を行い、洗浄、消毒、換水をしながら 6~7 週間の試験を行った。入浴中のモノクロラミン濃度が 3~6 mg/L、週に 1~3 回の完全換水と浴槽の清掃、ろ過器の 10~30 分間の逆洗、10~

20 mg/Lの高濃度消毒を行った。浴用水は、レジオネラ属菌、大腸菌群ともに陰性であったが、従属栄養細菌数は増加した。モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の制御に有用だが、従属栄養細菌数が増加する問題が再現され、循環式浴槽には、より強力な洗浄・消毒が必要と考えられた。

A. 研究目的

昔の入浴施設は、毎日の洗浄と換水が行われ、塩素消毒はされていなかった。ところが浴槽水を連続的に使用し続ける循環ろ過の方法が導入されるようになり、いつしか洗浄や換水の頻度が週1回程度（あるいはさらに低頻度）と、衛生管理の状態が悪化していった様である。レジオネラ属菌による集団感染が生じて循環式浴槽の問題が明らかとなり、緊急避難的に遊離塩素消毒が導入された¹⁾。ところが高pHの温泉水等では遊離塩素消毒の効果が減弱し、レジオネラ属菌が検出され、必ずしも遊離塩素消毒だけでは解決できない場合が指摘された。

遊離塩素消毒に代わって、モノクロラミン消毒であれば、高pHであっても消毒効果が得られて、レジオネラ属菌の不検出が維持可能となった^{1,2)}。ところが、従属栄養細菌数が増加し、バイオフィルムの蓄積が懸念されている³⁾。ろ過器に蓄積する汚れは逆流洗浄（逆洗）により除き、浴槽も週に1回の完全換水と清掃が現行の指針では最低限求められているが⁴⁾、果たしてそれで足りているかが問題となる。ろ過器のろ材が交換されることは稀であり、ヒトの垢の汚れが蓄積している。

本研究では、三重県内と山梨県内の温泉営業施設の協力を得て、実地試験を行った。いずれの温泉においても、pH9~10の高pH

の温泉を利用している。入浴中のモノクロラミン消毒に加えて、定期的なろ過器の逆洗、浴槽の洗浄、高濃度のモノクロラミン消毒を行い、従属栄養細菌数の上昇が防がれるよう、管理の徹底に努めた。

B. 研究方法

施設1 高pH温泉水を用いた大容量浴槽

(1) 対象施設

三重県内のpH9.5の温泉水（表1）を利用する施設において、男女の浴槽がそれぞれ連通管で接続されている循環系統内容量約30m³の浴槽（写真1・2）を研究対象とした。同施設は砂ろ過方式であり、毎営業日に逆洗処理を行うとともに、週1回の休館日に完全換水および浴槽清掃を行っている。

ろ過器の逆洗浄は、毎営業日の営業時間外に行った。ろ過器（容量約5m³直径約1.8m×高さ約2mの円筒状目視による概寸）に対して、毎分100~200L程度の流速で30分程度、浴用水をろ過の逆方向に通水し、洗浄水は排水した。浴用水の減少分は、後から新たな温泉水を補給した。

(2) モノクロラミンの濃度管理

対象施設のろ過器導入前に、次亜塩素酸ナトリウム製剤（ケイミックスSP）とアンモニウム製剤（レジサイド いずれもケイ・アイ化成株式会社製）によって用時調製されたモノクロラミン溶液を、循環ろ過系統

内に添加した。注入頻度は、浴用水のモノクロラミン濃度が、常時およそ 3~6 mg/L (ppm) の範囲で推移することを意図して設定した。モノクロラミン濃度がこの管理濃度範囲に入らない場合は、手動操作によって追添加し、濃度調整を図った。施設による濃度測定は、全塩素濃度を測定することにより行われた。

さらに、週 1 回、循環配管内の高濃度モノクロラミン消毒、洗浄と完全換水を行った。具体的には、モノクロラミンを追加して、濃度を 10~15 mg/L に上昇させ、循環ろ過及び逆洗処理を行った。具体的には毎営業日の逆洗浄と同様に、毎分 100~200 L 程度の流速で浴用水を 30 分ずつ、ろ過の順方向、および逆方向に通水し、逆方向の洗浄水は排水した。消毒後、浴用水は全て排水し、浴槽をタイル用ポリッシャーで洗浄した。営業開始前日に新たな温泉水を補給し、営業開始 3 時間半前にモノクロラミンを添加、循環させ、営業開始直前にはモノクロラミン濃度が管理濃度範囲であることを確認した。

(3) 各種測定

各種微生物試験は、定法に従い実施した。すなわち、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休館日前日の営業中に採水し、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、GVPC 寒天培地で 36°C、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°C、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°C、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°C 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2 週3回換水する高pH温泉水を用いた浴槽

(1) 対象施設

山梨県内の pH10 の温泉水 (表 3) を有する一日の入浴者数が約 500~1000 人程度の施設において、男女の浴用水が同一系統の 15~20m³ の内湯を対象とした。ろ過器 (容量約 1.5 m³、直径約 1 m×高さ約 2 m の円筒状、目視による概寸) の逆洗は毎日深夜 3 時と早朝 6 時に 5 分間ずつ計 10 分間実施された。週に 3 回、浴用水の完全換水と、清掃が行われた。浴槽水採水は週に 1 回営業日の営業開始前に行った。

(2) モノクロラミンの濃度管理

施設 1 と同様に用時調製されたモノクロラミン溶液を同様の濃度範囲になるよう循環ろ過系統内に添加した。毎日の初期添加で 4.1mg/L 相当を添加し、残存濃度は 0~2.4 mg/L (算術平均 0.5 mg/L 程度) となり、その後は注入頻度を調整して常時およそ 3

～6 mg/L の範囲で設定した。施設による濃度測定は、全塩素濃度を測定することにより行われた。週 1 回、完全換水時に浴槽水のモノクロラミン濃度を 15～20 mg/L に調整し、1 時間または一晩中消毒を行った。

(3) 各種測定

各種微生物試験と塩素濃度測定は、施設 1 同様に、定法に従い実施した。

C. 研究結果および考察

施設 1 高 pH 温泉水を用いた大容量浴槽

本研究における浴用水中のモノクロラミン濃度を図 1、浴用水の微生物学的検査結果を表 2 に示す。

浴用水中のモノクロラミン濃度は、ほぼ安定的に推移していることが認められた。入浴客の増加に伴って温泉水の足し湯をした場合に管理濃度範囲よりも若干低くなる傾向が見られたが、この場合も即座に手動操作によって追添加を行うことにより、短時間で管理濃度範囲に回復した。

また、微生物学的検査の結果、6 週間の実地試験期間を通じて、レジオネラ属菌、一般細菌、大腸菌群はいずれも陰性であった。この結果は、本研究の条件下において、モノクロラミン消毒が、レジオネラ属菌、一般細菌、大腸菌群の殺菌に十分な効果があることを示している。

一方、従属栄養細菌についてはいずれも陽性であった。従属栄養細菌数は一般細菌数より多く、浴槽の汚れをより高感度に検査できると考えられた。従属栄養細菌の制御のために、10～15 mg/L の高濃度モノクロラミン消毒を行ったが、それでも従属栄養細菌数が上昇した。本研究で行った消毒方法では従属栄養細菌の制御までには至ら

ず、汚れの残留と微生物の増殖が生じてしまったと考えられた。

施設 2 週 3 回換水する高 pH 温泉水を用いた浴槽

浴用水中のモノクロラミン濃度を図 2、浴用水の微生物学的検査結果を表 4 に示す。浴用水中のモノクロラミン濃度はほとんどの測定において 3～6 mg/L の範囲にあり、安定して濃度を維持することができた。試験期間前半はやや低い濃度になることもあったが、複数回の添加時間の微調整により、後半は 3 mg/L を下回らなかった。

微生物学検査の結果、遊離塩素管理時および 7 週間の実地試験期間を通じて、レジオネラ属菌、アメーバ、大腸菌群はいずれも検出下限値未満または陰性であった。一般細菌数については、遊離塩素管理時よりも実地試験期間の方が若干少ないか、同程度であった。週 3 回換水のアルカリ性温泉において、モノクロラミン消毒はこれらに対して効果が期待できると考えられた。

一方で、施設 1 と同様に従属栄養細菌数が上昇し、遊離塩素管理時より多かった。試験開始時に設定していた 15～20mg/L、1 時間の高濃度モノクロラミンによる消毒では増加を抑制できなかった。消毒時間を一晩に延長し、直後の第 5 週では 1/100 程度に減少したものの、第 6 週以降は再び同様のオーダーにまで増加した。一度増加してしまった従属栄養細菌の抑制は困難であった。

逆洗の時間は、施設 1 では毎日 30 分間に対して、施設 2 では毎日 10 分間に留まった。例数が少ないので確たる事は言えないが、一般細菌数や従属栄養細菌数が施設 2 の方

が桁違いに多かった。残留した汚れの量(逆洗の時間等)によるのかもしれない。または、施設 2 では営業開始前の浴槽水にモノクロラミンを添加し、管理濃度範囲で安定した直後に採水を行っていた。接触時間が不足したのかもしれない。

モノクロラミン消毒は、従来の衛生管理工程を省略できるものではなく、今なお洗浄が大切であると考えられた。

D. 結論

2 箇所の温泉施設の協力を得て、6~7 週間にわたるモノクロラミン消毒の現地試験を行った。モノクロラミン濃度はほぼ安定的な濃度推移が認められ、レジオネラ属菌、大腸菌群ともに陰性で、一般細菌数も低く抑えられた。高 pH の温泉水であっても、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の抑制が可能であることを改めて確認した。一方、従属栄養細菌数はいずれの施設でも増加した。モノクロラミン消毒は浴槽水を連続使用するための方法ではなく、循環式浴槽には、より強力な洗浄方法が必要と考えられた。

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. 泉山信司, 長岡宏美, 他「モノクロラミン消毒のアルカリ性温泉への応用」、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 30 年度分担研究報告書
4. 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」の改正について、薬生衛発 1217 第 1 号

F. 研究発表

誌上発表

1. 森 康則、永井佑樹、赤地重宏、杉山寛治、田中慶郎、茶山忠久、西 智広、濱口真帆、吉村英基、泉山信司、次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の現地検証—三重県津市の榊原温泉における検討—、温泉科学、2019, 69, 90-102.
2. 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」、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 83-89.
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 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」、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 117-123.
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 10 浴槽のレジオネラ対策 3 モノクロラミンによる消毒方法について、日本防菌防黴学

会誌、2019, 47, 159-166.

5. 枝川亜希子、「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 12 レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 229-232(2019)
6. 井上浩章、枝川亜希子、「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 13 アメーバ共培養法を用いたレジオネラ属菌の検出、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 273-277.

口頭発表

1. Mori, Yasunori., Nagai, Yuki., Akachi, Shigehiro., Nishi, Tomohiro., Hamaguchi, Maho., Yoshimura, Hideki., Sugiyama, Kanji., Tanaka, Yoshirou., Sayama, Tadahisa., Izumiyama, Shinji. Field test of monochloramine disinfection for alkaline hot spring water that cannot sufficiently be disinfected with sodium hypochlorite because of its high pH - A case study in Sakakibara hot spring area of Tsu City, Mie Prefecture -. The 72th Annual Meeting of the Japanese Society of Hot Spring Sciences. Taichung, November 2019.
2. 森 康則、赤地重宏、永井佑樹、吉村英基、泉山信司、温泉付随ガス分離設備の

レジオネラ属菌による汚染実態と対策、日本温泉科学会、2019年11月、台湾、台中市

3. 小倉 徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、松田宗大、松田尚子、藤井 明、モノクロラミン管理下の浴槽循環ろ過装置内のろ材バイオフィームに対する各種消毒剤の消毒効果の検討、日本防菌防黴学会、2019年9月、大阪府
4. 松田宗大、枝川亜希子、泉山信司、小倉徹、植園健一、松田尚子、藤井 明、循環式浴槽から分離された *Mycolicibacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果、日本防菌防黴学会、2019年9月、大阪府
5. 藤井明、渡邊貴明、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
6. 藤井明、松田宗大、小倉徹、小倉諒太、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、モノクロラミン管理下の循環浴槽におけるろ材付着バイオフィームに対する各種消毒剤の効果、第47回建築物環境衛生管理全国大会、2020年1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

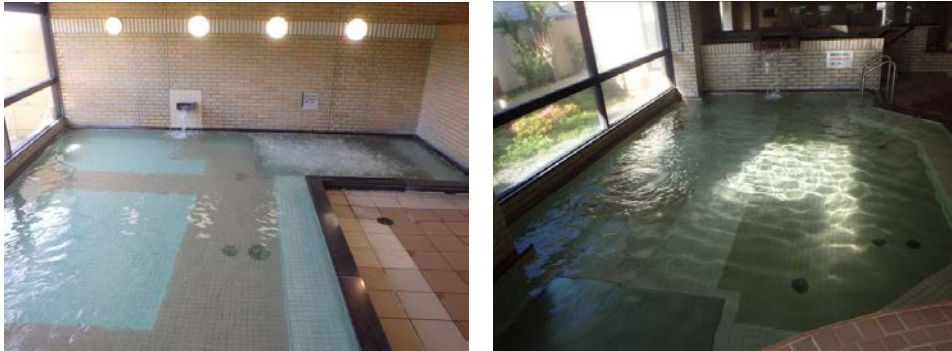


写真 1・2 施設 1 の 2 つの浴槽

2 つの浴槽が連通管でつながった、計 30m³ の循環系水量を有する循環式浴槽

表 1. 施設 1 の温泉水質

陽イオン	mg/kg	陰イオン	mg/kg	非解離成分	mg/kg
Na ⁺	92.5	F ⁻	1.5	H ₂ SiO ₃	52.2
K ⁺	1.1	Cl ⁻	16.1		
Ca ²⁺	0.5	SO ₄ ²⁻	29.5		
		HPO ₄ ²⁻	0.3		
		HCO ₃ ⁻	112.9		
		CO ₃ ²⁻	27.0		
		BO ₂ ⁻	2.0		
合計	94.1	合計	189.3	合計	52.2

※ pH:9.5, 泉温:24.6°C, 分析日: 2010 年 10 月 1 日

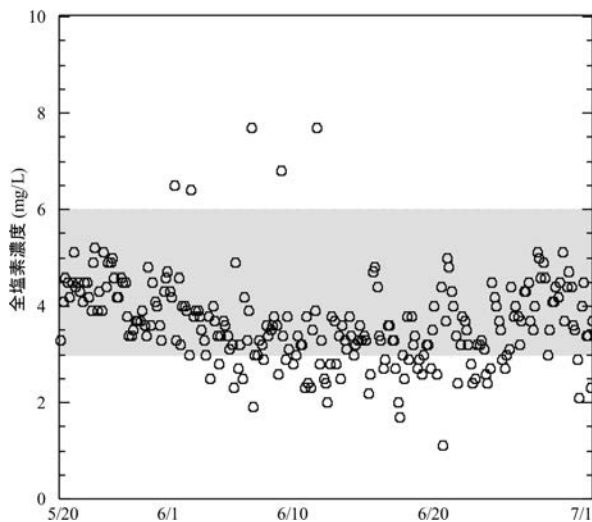


図 1. 施設 1 における浴用水中の全塩素濃度（モノクロラミン濃度）の推移

図のグレー部分は、目標としたモノクロラミン濃度 3～6mg/L の範囲を図示した。

表 2. 施設1における微生物検査の結果

採取日	レジオネラ属菌	一般細菌数	大腸菌群	アメーバ (PFU/mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)
2019/5/27 (1 週目)	—※1	—	—	—	+ (3,900)
2019/6/3 (2 週目)	—	—	—	—	+ (>100,000)
2019/6/10 (3 週目)	—	—	—	+ (2)	+ (45,700)
2019/6/17 (4 週目)	—	—	—	—	+ (59,300)
2019/6/24 (5 週目)	—	—	—	—	+ (21,250)
2019/7/1 (6 週目)	—	—	—	+ (0.5)	+ (31,400)

※1 —: 陰性(レジオネラは 10CFU/100mL 未満、他の細菌は 1CFU/mL 未満、アメーバは 0.5PFU/mL 未満)

※2 括弧内の数字は菌数又はアメーバ数を示す(CFU: Colony Forming Unit、PFU: Plaque Forming Unit)

表 3. 施設 2 の温泉水質

項目	分析値	項目	分析値
pH	10.2	硫黄 (mg/kg)	< 0.1
ORP (mV)	-146	総鉄イオン (mg/kg)	< 0.1
一般細菌数(CFU/mL)	1.0×10^2	アンモニア態窒素 (mg/kg)	< 0.1
Cl ⁻ (mg/kg)	1.2	マンガンイオン (mg/kg)	< 0.1
Br ⁻ (mg/kg)	未検出		
I ⁻ (mg/kg)	未検出		
S ₂ O ₃ ²⁻ (mg/kg)	未検出		

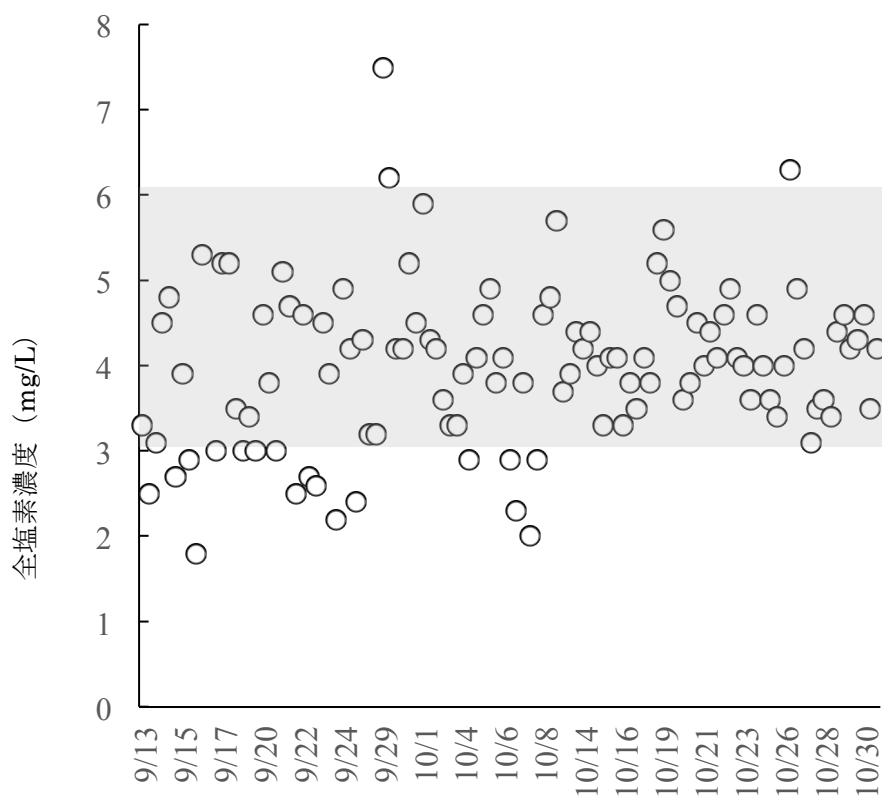


図 2. 施設 2 における浴用水中の全塩素濃度（モノクロラミン濃度）の推移
 図のグレー部分は、目標としたモノクロラミン濃度 3~6mg/L の範囲を図示した。

表 4. 施設 2 における微生物検査の結果

採取日	レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	レジオネラ属菌 (ヘアキャッチャー配管ふきとり)	大腸菌群 (/ 100 mL)	アメーバ数 (/ 50 mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)
2019/9/10 (遊離塩素消毒時)	<10	—※	—	—	52	100
2019/9/17 (第 1 週)	<10	—	—	—	7	93
2019/9/24 (第 2 週)	<10	—	—	—	20	495,000
2019/9/24 (第 3 週)	<10	—	—	—	2	179,000
2019/10/1 (第 4 週)	<10	—	—	—	18	393,000
2019/10/8 (第 5 週)	<10	—	—	—	5	4,670
2019/10/15 (第 6 週)	<10	—	—	—	48	246,000
2019/10/29 (第 7 週)	<10	—	—	—	9	275,000

※ —: 陰性

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

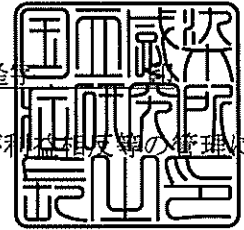
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kobayashi T, Sato A, Watanabe H, Matsumoto T.	Persistent <i>Legionella</i> contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan.	Int J Infect Dis	93	300-304	2020
Jiang L*, Amemura-Maekawa J*, Ren H, Li Y, Sakata M, Zhou H, Murai M, Chang B, Ohnishi M, Qin T (*: contributed equally)	Distribution of <i>lag-1</i> Alleles, <i>ORF7</i> , and <i>ORF8</i> Genes of Lipopolysaccharide and Sequence-Based Types Among <i>Legionella pneumophila</i> Serogroup 1 Isolates in Japan and China.	Front Cell Infect Microbiol	9	274	2019
森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛治, 田中慶一郎, 茶山忠久, 西智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司	次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証ー三重県津市の榊原温泉における検討ー	温泉科学	69	90-102	2019
杉山寛治	「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アムニバ検出とその制御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」	日本防菌防黴学会誌	47	83-89	2019
杉山寛治	「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アムニバ検出とその制御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」	日本防菌防黴学会誌	47	117-123	2019
杉山寛治	「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アムニバ検出とその制御10 浴槽のレジオネラ対策3 モノクロラミンによる消毒方法について」	日本防菌防黴学会誌	47	159-166	2019
倉 文明	給湯・給水系に潜むレジオネラ感染症	感染症	287	10-17	2019

磯部順子, 金谷潤一, 木全恵子, 内田 薫, 加藤智子, 綿引正則	富山県における浴用水中 <i>Legionella</i> 属菌の分離状況	富山県衛生研究所年報	42	39-43	2019
中植竜大, 前川純子, 村井美代	グラム陰性菌のリポ多糖の構造と合成経路の多様性— <i>Legionella pneumophila</i> の遺伝子検査による血清群別に向けて—	保健医療福祉科学	8	40-47	2019

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



次の職員の令和元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 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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。

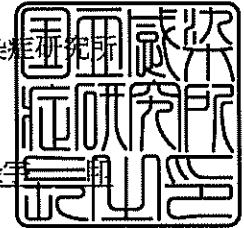
令和2年4月17日

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



次の職員の令和元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 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
- 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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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。

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



次の職員の令和元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。

- 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 研究課題名 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
- 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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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) 未審査の場合は、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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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。

令和2年 4月 6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



次の職員の令和元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 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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。

令和2年 3月 31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 立花 理彦



次の職員の令和元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。

- 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 研究課題名 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
- 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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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) 未審査の場合は、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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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。

令和2年3月17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 小林 貴廣 印



次の職員の令和元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 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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。

令和2年5月31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



次の職員の令和元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 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 細菌部 主任研究員
(氏名・フリガナ) 金谷 潤一 (カナタニ ジュンイチ)

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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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。

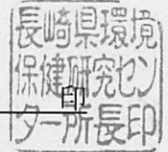
令和2年4月20日

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



次の職員の令和元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 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
- 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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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。

令和2年3月31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



次の職員の令和元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。

- 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
- 研究課題名 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 細菌班 班長
(氏名・フリガナ) 長岡 宏美 (ナガオカ 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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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。