
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2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 前川 純子

令和3(2021)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. 省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験-----	13
泉山信司、長岡宏美、柳本恵太、森 康則、永井佑樹、枝川亜希子、山本哲司、細川賢人、田中孝典、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	
2. 弱酸性の人工炭酸泉へのモノクロラミン消毒の適用-----	27
泉山信司、長岡宏美、田栗利紹、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、茶山忠久、青木信和	
3. フローサイトメトリーによるモノクロラミンの消毒効果判定方法の開発-----	34
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、杉山寛治、田中慶郎、蔡 国喜、井原 基、中尾 元	
4. 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-----	45
淀谷雄亮、佐々木麻里、田栗利紹、武藤千恵子、井原 基、田中奈緒美	
5. 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、レジオラートを用いた定性試験法の検討-----	52
佐々木麻里、高野真実、溝腰朗人	
6. 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-----	58
金谷潤一、磯部順子、山口友美、武藤千恵子、淀谷雄亮、中筋 愛、吉崎美和、塩崎晋啓、水谷幸仁、村尾拓哉、森中えりか、小澤賢介	
7. 入浴施設の水環境におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン作成-----	66
金谷潤一、森本 洋、中西典子、佐々木麻里、田栗利紹、大森恵梨子、大屋日登美、磯部順子、枝川亜希子、平塚貴大、緒方喜久代、吉野修司、倉 文明、前川純子	
8. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析-----	76
中西典子、野本竜平、水本嗣郎、高橋直人	
9. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み-----	84
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. 入浴施設の衛生管理及び疫学調査ガイドライン作成-----	114
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、	

大屋日登美、陳内理生、中嶋直樹、磯部順子、平塚貴大、藤江香予、浅野由紀子、緒方喜久代、
倉 文明、中臣昌広、齊藤利明、藤井 明、縣 邦雄、前川純子

11.	新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果-----	186
	黒木俊郎、森川 茂	
12.	入浴施設及び医療機関のレジオネラ汚染実態調査-----	191
	黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、陳内理生、中嶋直樹、鈴木美雪、政岡智佳	
13.	レジオネラ属菌を対象とした次世代シーケンス解析-----	201
	黒木俊郎、大屋日登美、陳内理生、中嶋直樹、鈴木美雪、政岡智佳	
III.	研究成果の刊行に関する一覧-----	208

研究代表者 前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨： 今年度は新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言等のために、一部の研究実施が困難になったが、その一方で、入浴施設の長期休業がレジオネラ汚染に与えた影響の調査や、新型コロナウイルスへの消毒効果の確認等、新たに設定された研究を行うことができた。

入浴施設における省力化配管洗浄法を開発し、実地試験でその効果が検証できた。これまでアルカリ性や中性の泉質に適用されてきたモノクロラミン消毒が弱酸性の人工炭酸泉でも有効であることが確認できた。

遊離塩素により浴槽水が十分に消毒された細菌の状態をフローサイトメトリー（FCM）で検出することで「清浄」か「細菌増殖」かを5分で判定する迅速評価法を開発し、実証してきたが、モノクロラミン消毒では、FCMにより測定される散布図が遊離塩素消毒の場合と全く異なったことから、モデル実験でモノクロラミン消毒時のFCM特異領域を設定し、モノクロラミン消毒の迅速評価法の有効性を実検体で確認した。

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水等について培養検査および迅速検査を行い、レジオネラ属菌による汚染実態を明らかにした。これまでの成果を踏まえ、レジオネラ迅速検査ガイドラインを作成した。新しい培養検査法であるレジオラート/QT法は、検体の処理や結果の判定が容易で、平板培養法との結果一致率も高いことから、日常の衛生管理に有用な検査法であることが示されたが、今後、偽陽性の発生実態を解析し、偽陽性を低減する方法を検討する必要がある。採水現場での濃縮・測定を想定して開発されたモバイル型qPCR装置でのレジオネラ属菌の検出率は、平板培養法に対する感度がLAMP法よりも低かったため、フィルターや濃縮率についてプロトコルを再検討する必要があると思われる。シャワー・カラン水で感度が低かったPALSAR法は、MWY液体培地による増菌培養を取り入れた結果、平板培養法に対する感度が100%となった。感染源を特定するためには、環境検体から患者由来株の大半を占める*Legionella pneumophila* 血清群1 (Lp1) を分離することが重要となるため、Lp1で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) による選択的濃縮法を検討した。IMB処理前にLp1特異的なqPCRによるスクリーニングの実施が効率的で、平板培養法では分離されなかった検体からLp1が検出できた。

次世代シーケンサーを用いて浴槽水とシャワー水の菌叢解析を行ったところ、半数以上の検体からレジオネラ属菌、約9割の検体からマイコバクテリウム属菌のリードが検出された。次世代シーケンサーを用いて、1つの集団感染事例に由来する菌株、あるいは1つの入浴施設の複数個所から長期にわたって検出されるLp株のSNPs解析を行い、他の分子疫学解析法とも比較した。次世代シーケンサーはMLVA法の検証にも活用した。医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染を調査した。

公衆浴場等の衛生管理を計画的、体系的に行うための体制づくりに資するための総合衛生管理プログラムと、公衆浴場の浴槽並びに関連設備の具体的な衛生管理を記述した一般衛生管理の2つのパートからなるガイドラインを作成した。入浴施設が関連するレジオネラ症発生時の調査の実施をサポートする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の継続実施をサポートし、本研究班からは地方衛生研究所等72機関が参加した。

研究分担者・所属機関および職名
 泉山信司・国立感染症研究所主任研究官
 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（以下、標準法）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. 省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験

過炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、酒石酸を混合して量比による洗浄効果の違いを試験管内

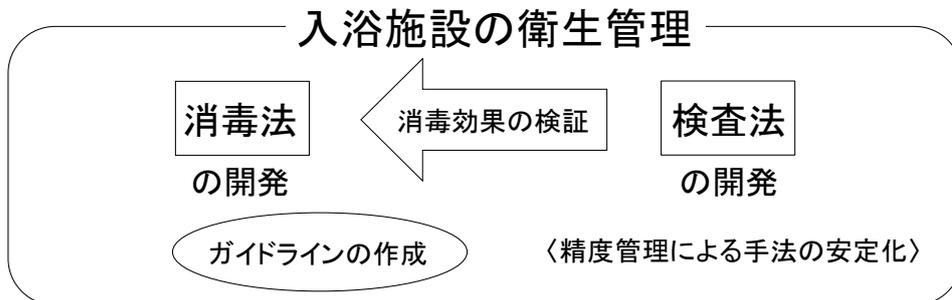


図1 本研究班の研究の流れ

表1

研究協力者一覧

青木信和	ケイ・アイ化成株式会社	塩崎晋啓	日本板硝子株式会社	藤江香予	愛媛県今治保健所
縣 邦雄	アクアス株式会社	陳内理生	神奈川県衛生研究所	細川賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所	杉山寛治	株式会社マルマ	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
磯部順子	富山県衛生研究所	鈴木美雪	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
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	高野真実	大分県衛生環境研究センター	水谷幸仁	日本板硝子株式会社
井上浩章	アクアス株式会社	高橋直人	静岡県環境保健研究所	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所
井原 基	長崎県環境保健研究センター	田中 忍	神戸市環境保健研究所	三津橋和也	北海道立衛生研究所
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	田中孝典	花王株式会社 ハウスホールド研究所	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
大森恵梨子	仙台市衛生研究所	田中奈緒美	アイデックスラボトリーズ株式会社	村尾拓哉	日本板硝子株式会社
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	森 康則	三重県保健環境研究所
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	森川 茂	岡山理科大学
小川恵子	北海道立衛生研究所	中尾 元	長崎県環境保健研究センター	森中えりか	株式会社ファスマック
小澤賢介	デンカ株式会社	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
倉 文明	国立感染症研究所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	山口友美	宮城県保健環境センター
小坂浩司	国立保健医療科学院	中臣昌広	日本環境衛生センター	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	野本竜平	神戸市環境保健研究所	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
斎藤利明	株式会社ヤマト	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
茶山忠久	ケイ・アイ化成株式会社	藤井 明	株式会社ヘルスビューティ	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所

で検討した。連続培養システム(アート科学社製)中に15mm×20mm(厚さ1.5mm)のステンレス製の試験片を設置し、某施設から採取した浴槽水を40°Cで14日間循環させてバイオフィルムを発生させた後、試験片を各種洗浄剤5mLに浸漬し、バイオシェーカーで回転させて洗浄した。蒸留水ですすいだ試験片をクリスタルバイオレットで染色し、吸光度(波長570nm)を測定して、残存バイオフィルム量を求め、バイオフィルム除去率を求めた。

4入浴施設の協力を得て、洗浄試験を実施した。新規の洗浄方法として、浴槽水1m³あたり過炭酸ナトリウム1kg(終濃度0.1%)にアスコルビン酸1kgと酒石酸1kgを助剤として用いた。浴槽水量を循環可能な最低限に減らし、上記の3化合物を同時に浴槽水に添加し、浴槽水を循環させた。60分後に、1m³あたり炭酸ナトリウム0.5kg程を添加して排水可能なpHに調整し、排水後、循環可能な水量まで給水し、1循環後、すすぎ水に次亜塩素酸ナトリウムまたはモノクロラミンを添加して、対照コントロールの精製水と同じ塩素濃度を示すまで、排水、すすぎを繰り返した。

従来の洗浄方法として、浴槽水1m³あたり過炭酸ナトリウム6kgおよびクエン酸4kgからなる市販の洗浄剤を用いた。新規の方法と同様に、浴槽の水量を循環可能な最低限に減らした後、先にクエン酸を浴槽水に添加して30分間循環、次に過炭酸ナトリウムを添加して90分間循環した。

1m³あたり亜硫酸ナトリウム1.2kgによって過炭酸ナトリウムを中和し、すすぎの工程に移行した。

洗浄前後に、ヘアキャッチャー近傍の配管2か所(5cm×5cm)を拭き取り、ATP検査および細菌検査を行った。

2. 弱酸性の人工炭酸泉へのモノクロラミン消毒の適用

酸性下のモノクロラミン安定性の検討として、pH3~8のりん酸-クエン酸緩衝液に、3mg/Lになるようモノクロラミンを添加し、室温下で緩やかに攪拌し、添加後1分、5分、10分後に、DPD-硫酸アンモニウム鉄(II)滴定法で遊離塩素、モノクロラミン、ジクロラミン、トリクロラミンの塩素濃度を測定した。

営業3施設の井水について、モノクロラミン濃度の安定性を事前に確認した。100mLの井水にモノクロラミンを3mg/Lの濃度になるよう添加し、ウォーターバスで40°Cに保温し、モノクロラミン濃度を経時測定した。

上記営業3施設の人工炭酸泉の4浴槽で、モノクロラミン濃度を3mg/L以上に維持する消毒実証試験を行なった。モノクロラミン濃度10mg/L、2時間の循環により、週一回の配管消毒と換水を実施した。換水日前日の夜間に浴槽水を採取し、レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、一般細菌数を定量した。

3. フローサイトメトリー(FCM)によるモノクロラミンの消毒効果判定方法の開発

24Lの水道水を入れた水槽にバケツヒーターを投入して42~45°Cに加温し、循環させモデル浴槽とし、モノクロラミンを調製して終濃度3.0mg/Lあるいはその5倍量になるように添加した。モノクロラミン濃度が安定した後、大腸菌を投与し、PI(propidium iodide)染色及び抗大腸菌抗体染色を行って、フローサイトメーターminiPOC(シスメックスパルテック社)を使用して測定し、大腸菌がモノクロラミンで完全に消毒される条件下でのFCM測定散布図の特異領域を設定した。

モノクロラミン消毒を採用している2施設28浴槽水を採水し、モデル実験と同様にPI染色を行って、miniPOCを用いて測定を行った。同時に、*Legionella pneumophila* (Lp)特異染色試薬を作製し、濃縮した検水に添加し、予め作成した検量線によりLp数を求めた。併せて、レジオネラ属菌平板培養検査、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)によるレジオネラ属菌全DNA量、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0(タカラバイオ)によるレジオネラ属菌の生菌DNA量を求めた。

4. 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、Lp検出用培地レジオラートと専用トレイQuanti-Tray/Legiolert(いずれもIDEXX)を用いて、飲料水用10mLプロトコールに従い、浴槽水等の検体10mLに対して実施した。同時に平板培養法を実施し、レジオラート

/QT 法及び平板培養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。レジオラート/QT 法で陽性となったウェルの液体培地をレジオネラ属菌選択分離培地に塗抹し、レジオネラ属菌の検出を試みた。非レジオネラ属菌のコロニーのみが生育した場合は、16S rDNA 配列決定により菌種を同定し、同定した菌がレジオラート/QT 法で陽性を示すか確認した。

5. 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、レジオラートを用いた定性試験法の検討

令和 2 年 8 月から 11 月に搬入された浴槽水および湯口水 21 施設分 41 検体を対象とし、標準法に準じて濃縮、前処理を行い、大分法と標準法で平板培養を実施し、併せてレジオラート/QT 法を実施した。レジオラート/QT 法で 10MPN/100mL 以上となった検体について、専用トレイの代わりにベントフィルター付き滅菌フラスコ (650 mL) を用いて 39°C で 7 日間培養し、レジオラート定性試験を実施した。

6. 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

4 地方衛生研究所において、令和 2 年度に採取された 169 検体 (浴槽水 107 検体、シャワー水 26 検体、カラン水 17 検体、採暖槽水 15 検体、その他 (プール水など) 4 検体) について標準法に準じて各機関の方法で平板培養を実施し、一部の検体については、LAMP 法、モバイル qPCR 法を実施した。モバイル qPCR 法はモバイル qPCR 装置 Picogene PCR1100 (日本板硝子) を用いて、2 種類の核酸抽出試薬 (法) および LAMP 法の核酸抽出試薬の抽出効率を検討した。シャワー・カラン水についてのみ PALSAR 法を実施した。

LAMP 法の際に抽出した DNA を鋳型として、*L. pneumophila* 血清群 1 (Lp1) 特異的な qPCR を実施した (Lp1-qPCR)。

Lp1 で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) を用いて、選択的濃縮法による Lp1 の分離について検討した。Lp1-qPCR が陽性となった検体の 100 倍濃縮液の 5 倍希釈試料 1 mL に 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、ビーズを磁石で集め、PBS での洗浄を 2 回実施した後、PBS 100 μ L に懸濁し、ボルテックスでよく混和後、GVPC 寒天培地 (日水製薬) に塗布し、35°C で 7 日間培養した。

浴槽水 31 検体およびシャワー水 17 検体について、検水 1,200 mL をフィルターろ過し (ポリカーボネート、0.22 μ m、47 mm)、ビーズでフィルターを破碎後、DNeasy PowerBiofilm Kit (キアゲン) で DNA を抽出した。イルミナ社のプロトコルに従い、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を Tks Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて PCR 増幅した後、Nextera XT Index Kit および MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) を用いて RUN を実施し、QIIME2 で解析した。

7. 入浴施設的环境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン作成

分担研究者及び研究協力者で構成するワーキンググループを形成し、ガイドラインの内容を検討した。

8. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

これまでに、約 800 株の Lp を用いて、その有用性について評価を行ってきた MLVA 法のプロトコル整備のため、Miseq および MinION を用いて、リピート数が 0 になったり、Intermediate-size を示したりする 12 株の完全長配列を決定し、計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 領域について解析した。

ある集団事例に由来する菌株 15 株について、コアゲノム SNPs の系統解析を行い、PFGE、MLVA、SBT 法の解析結果との比較検討を行った。

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 171 の検査機関 (180 名) 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 μ L 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 600~12,000 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 72 機関については、独自に集計・解析を実施し、過去 5 年間の結果と比較した。

10. 入浴施設の衛生管理及び疫学調査ガイドライン作成

昨年度に作成した「入浴施設における衛生管理ガイドライン(案)」(以下、衛生管理ガイドライン案)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(案)」(以下、調査ガイドライン案)を当研究班の分担研究者及び研究協力者に配付するとともに、所属する自治体の環境衛生担当者や感染症担当者に提示し、項目・内容・使い勝手等に対する意見を求めた。寄せられた意見に基づいてガイドライン案の内容を修正し、さらに修正案を分担研究者及び研究協力者で構成するワーキンググループに諮り、修正を加えた。

11. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

低濃度の次亜塩素酸ナトリウムあるいはモノクロラミンの SARS-CoV-2 ウイルスと FeCoV-2 に対する効果を評価した。ウイルス液を PBS で 100 倍に希釈し、その 1 mL に予め決定しておいた 0.1~0.2 mg/L となるのに必要な量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えて 25°C あるいは 41°C で 1、5、10 及び 20 分間曝露した。モノクロラミンについては、結合塩素濃度が 1、3、6 mg/L になるように PBS で希釈したモノクロラミン液 1 mL に 10 μ L のウイルス液を加え、1、5 及び 10 分間曝露した。曝露後に直ちに 0.1M チオ硫酸ナトリウムで中和し、1% FCS 加 D-MEM 培地 (SARS-CoV-2) または 5% FCS 加 D-MEM 培地 (FeCoV-2) で 10 倍段階希釈し、感受性細胞

(SARS-CoV-2 は VeroE6/TMPRSS2 細胞 ; FeCoV-2 は fcwf-4 細胞) に接種し、5%CO₂ 下、37°C で 4 日間 (SARS-CoV-2) あるいは 2 日間 (FeCoV-2) 培養した。各ウェルの細胞変性を観察し、TCID₅₀ (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量)を計算し、未処理群と比較し生存率を求め、100-生存率(%)を不活化率として算出した。

12. 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

緊急事態宣言により約 1 か月休業した神奈川県内の入浴施設において、令和 2 年 5 月の営業再開前日、再開後の 7 月、9 月、11 月に 2 つの浴室の浴槽水、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を採取、10 月にはカランから給水系のみを採取し、レジオネラ属菌検査、LAMP 法によるレジオネラ属菌遺伝子の検出、遊離残留塩素濃度の測定を行った。

神奈川県内の総合病院において、令和 2 年 10 月に 7 か所 (地下控室 1 か所、倉庫内 1 か所、病室洗面台 4 か所、授乳室 1 か所) の洗面台等の蛇口水を放水直後及び 3L 流水後に採取し、微生物検査 (レジオネラ属菌、従属栄養細菌、一般細菌数) 等を行った。

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。

13. レジオネラ属菌を対象とした次世代シーケンズ解析

神奈川県内の入浴施設において、2018 年 1 月から 2020 年 10 月までに検出された *L. pneumophila* SG1、8 株、同 SG6、5 株、同 SG9、5 株について、SBT 解析および SNPs 解析を行った。

(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. 省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験

試験管内で洗浄条件を検討した結果、過炭酸ナトリウムにアスコルビン酸と酒石酸をそれぞれ0.1%となるよう等量で混合した場合、バイオフィルムの除去率は80ないし90%程度と従来法を上回ることができ、薬剤の重量が従来法の3割となった。

4 浴場施設で新規の洗浄方法を実施したところ、配管内部およびろ過器内部のふき取りにおいて、ATP 値、一般細菌数、従属栄養細菌数の減少が見られ、高い洗浄効果を示した。すすぎは1-3回で完了した。

2. 弱酸性の人工炭酸泉へのモノクロラミン消毒の適用

pH5から8の緩衝液に添加されたモノクロラミンは濃度が維持された。pH3と4では、遊離塩素とジクロラミンに変化して、モノクロラミン濃度が低下した。

人工炭酸泉を使用している3施設の原水である井水に添加されたモノクロラミンは安定して維持されることを確認した。当該3施設の4浴槽(pH値は、5.6、5.1、5.0、5.2)に対して、モノクロラミン消毒を実施した。全塩素濃度は3mg/L以上に維持され、レジオネラ属菌、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌群の検出はなかった。入浴者からの臭気等に関する苦情もなかった。

3. フローサイトメトリー(FCM)によるモノクロラミンの消毒効果判定方法の開発

モデル実験により温浴水槽で 10^4 CFU/mLの大腸菌をモノクロラミンで完全に消毒する条件(14~26 mg/L、22~30時間)を明らかにして、同条件で得られるFCM測定散布図の特異領域を設定した。遊離塩素の消毒効果と同様に本方法をモノクロラミン消毒の迅速評価法(Rapid Detection Method, RDM法)と位置づけて、本測定領域において一定濃度以下(1000 cells/mL)を「清浄」と判定し、逸脱した場合を「細菌増殖」と判定した。現地調査では、モノクロラミン消毒を行っている循環ろ過式の2入浴施設から、計28サンプルの浴槽水を採取して、RDM法と、レジオネラ培養法、レジオネラ遺伝子量、FCMに

よるLp定量を行い、結果を比較した。RDM法により「清浄」と判定された19浴槽からは培養法においてレジオネラ属菌は検出されなかった。また、従属栄養細菌も検出されず、痕跡程度のレジオネラ属死菌遺伝子とLp細胞が残存していた。同じく「細菌増殖」と判定された9浴槽からは培養法でレジオネラ属菌は検出されず、レジオネラ属死菌遺伝子とLp細胞数は「清浄」と判定された検体と有意差はなかったが、BCYE α 培地表面に中程度~大量の細菌が確認され、*Mycolicibacterium phlei*と同定された。

4. 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

温泉水、浴槽水、プール採暖槽水、冷却塔水等計171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、両方法で陽性となったものが37検体、両方法で陰性となったものは106検体であった。平板培養法と比較したレジオラート/QT法の感度は61.7%、特異度95.5%であり、結果一致率は83.6%であった。レジオラート/QT法及び平板培養法ともに陽性であった37検体について検出菌量を比較したところ、回帰直線の R^2 は0.397となり、弱い相関が認められた。レジオラート/QT法のみ陽性であった5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、1検体で*L. pneumophila* SG3が検出されたが、4検体はレジオネラ属菌が検出されず、培地上で発育が見られたコロニーからDNAを抽出し、16S rDNAの塩基配列により同定したところ、それぞれ*Brevundimonas naejangsanensis*、*Pseudomonas otitidis*、*Pseudomonas* sp.、*Aeromonas hydrophila*であった。これら単離した菌株をそれぞれ滅菌水に懸濁し、レジオラート/QT法を実施したところ、茶色の発色を示し、陽性反応が見られた。

5. 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、レジオラートを用いた定性試験法の検討

41検体中、大分法では19検体、標準法では18検体からレジオネラ属菌が検出された。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5~1000cfu/100ml、10~2000cfu/100mL(濃縮

試料のみでは 10~430CFU/100mL) であった。大分法と標準法の菌数の相関は $R^2=0.7521$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8893$ であった。

レジオラート/QT 法では 41 検体中 12 検体から 11~1342 MPN/100mL の Lp が検出された。検出/不検出の一致率は大分法で 82.9% (10CFU/100mL 以上検出された検体に限ると 90.2%)、標準法で 85.4%、菌数の相関は大分法で $R^2=0.6682$ 、標準法で $R^2=0.6978$ (濃縮試料のみで $R^2=0.7134$) であった。

保存菌株を用いた希釈系列による検討では、レジオラート/QT 法及び BCYE α 寒天培地で検出限界となるまでレジオラート定性試験法でも陽性となった。実検体では、レジオラート/QT 法陽性の 12 検体中定性試験法で陽性となったのは 6 検体であった。

6. 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

公衆浴場などからの 169 検体中、44 検体 (26.0%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。最も多い菌数は、2,690 CFU/100 ml であった。Lp1 が 19/44 検体 (43.2%) から分離され、最も多かった。

モバイル qPCR 法は、2 種類のプロトコルで実施した (N = 59, 110) ところ、平板培養法に対する感度は 22.6% および 38.5% であり、LAMP 法 (N = 100, 94.1%) よりも低かった。

シャワー・カラン水 (N = 35) を対象とした PALSAR 法では、MWY 液体培地による増菌培養を取り入れた結果、平板培養法に対する感度は 100% となった。また、特異度および一致率は、それぞれ 60.7% および 68.6% であった。

浴槽水 31 検体、シャワー水 17 検体を用いて 16S アンプリコン解析を実施した結果、半数以上の検体からレジオネラ属菌、約 9 割の検体からマイコバクテリウム属菌のリードが検出され、Species level での解析では、レジオネラ症や非結核性抗酸菌感染症の原因菌である *L. pneumophila*、*M. gordonae* が検出された。

Lp1-qPCR スクリーニングを浴槽水など 76 検体について行った結果、12 検体が陽性となった。そのうち 5 検体について Lp1-IMB 法を実施した

ところ、4 検体から Lp1 が分離された。うち 3 検体は平板培養法では Lp1 が分離されなかった検体である。

7. 入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン作成

「入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン」を作成した。

ガイドラインでは、迅速検査を実施するにあたり、留意点すべき点を述べた。また、現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利であるという点から、各市販キットの特性などを一覧に示した。その上で、キットごとに、方法の概要、判定方法、平板培養法との結果の相関を示した。最後に、実検体を用いて迅速検査を使用する際の具体例を挙げた。

8. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

Miseq および MinION を用いて、12 株の完全長配列を決定し、計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 領域について詳細に解析し特徴づけを行った。その結果、一部の菌株でフラグメントが検出されない MLVA 領域において、primer のミスマッチにより、存在する当該領域が増幅されないことがあることが明らかになった。また、Intermediate-size が出現する MLVA 領域で、primer からリピート開始上流域までの長さで最後のリピートの長さの両方が短くなっている場合があった。

さらに、PFGE、MLVA、SBT で相違が見いだされた 1 つの集団事例に由来する株について、ゲノム系統解析の結果と各分子疫学手法の解析結果との比較検討を行った。その結果、コアゲノム SNPs 解析に基づいた系統樹は、PFGE、SBT、MLVA の結果と矛盾がなく、SNP 数 300 個程度までの菌株が、各分子疫学手法で clonal complex として認識されると考えられた。

また、2927 個の ST プロファイルからなるデータベースを用いて、Miseq リードデータやコンテイング配列から ST を決める方法を確立した。

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、6年連続参加した機関は44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。回収率については、判定を開始した2017年度からの推移を見ると、良好範囲を報告した機関の割合は2018年度に大きく上がったものの(74.3%)その他の年では本年度含め55%前後であった。

10. 入浴施設の衛生管理及び疫学調査ガイドライン作成

公衆浴場等の衛生管理を計画的、体系的に行うための体制づくりに資するための総合衛生管理プログラムと、公衆浴場の浴槽並びに関連設備の具体的な衛生管理を記述した一般衛生管理の2つのパートからなるガイドラインを作成した。一般衛生管理のパートでは、より具体的な内容にするとともに、図を追加した。また、入浴施設が関連するレジオネラ症発生時の調査の実施をサポートするガイドラインについては、レジオネラ症が弧発事例であっても集団発生であっても第一報からの調査方法に違いはなく、弧発事例であっても詳細な施設調査を行う場合もあるため、名称から「集団発生時」の文字を削除し、「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査ガイドライン」(案)とした。保健所等からの意見を取り入れ、本文の追加や削除を行い、施設調査票を大幅に変更した。

11. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

新型コロナウイルスは遊離塩素による消毒に感受性を示し、濃度が0.16mg/Lで25°Cでの1分後の不活化率は99.99%以上となり、0.11mg/L、41°Cでは5分後の不活化率が99.99%以上であった。モノクロラミンは遊離塩素と比較して相対的に効果が低く、6mg/Lでも25°Cで10分後の不活化率は98%であった。

12. 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

2015年からレジオネラ属菌の汚染実態調査と対策を継続してきた神奈川県内の1入浴施設において、営業再開前日及び再開後約1、3、5カ月

にそれぞれ調査を実施したところ、前年度では3つの採水箇所において、10~200 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されていたものが、休業期間中に定期的に配管内の原湯を入れ替え、循環させるとともに遊離残留塩素濃度を0.8~2.0 mg/Lと高濃度に保ったことにより、営業再開前日には1カ所から80 CFU/100 mLが、再開の1ヶ月後には同じ採水箇所において10 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されるのみとなった。

神奈川県内の総合病院において、調査した16試料中、2病室の洗面用蛇口3試料から、Lp1が検出され、菌数は10~20 CFU/100 mlであった。一般細菌数はいずれの試料でも不検出であった。従属栄養細菌は8カ所の蛇口のうち7カ所から採取した11試料で発育を認めた。この7カ所のうち給水系の6カ所の蛇口では、初流水と3L流水後の前後で最大2-log(100倍)の菌数の差がみられた。今回の結果では、従属栄養細菌の検出とLpの検出の間には相関がなかった(オッズ比1.077、95%信頼区間0.248-4.592)。

13. レジオネラ属菌を対象とした次世代シーケンシス解析

SBT解析において、SG1は1株がST1で、他の7株はすべてST552であった。SG6は5株すべてがST191であった。SG9の5株はすべてST2693であった。SNPs解析は*L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphiaをリファレンス配列として、血清群ごとに実施した。SG1では11,489のSNPsが得られた。ST552の7株のSNPsは全て一致した。ST1だった株は、他の株と7,176のSNPsが異なっていた。SG6では36,119のSNPsが得られ、5株は1~4つのSNPsが異なる3つの遺伝子型に分けられた。SG9では87,741のSNPsが得られ、5株は1~2つのSNPsが異なる3つの遺伝子型に分けられた

D. 考察

今年度は新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言等のために、予定された施設での実地調査や、消毒実験が行えなくなったり、多くの研修が中止されたりしたが、その一方で、入浴施設の長期休業がレジオネラ汚染に与えた影響の調査や、新型コロナウイルスへの消毒効果の

確認等、新たに設定された研究を行うことができた。班会議や関連会議は滞りなく web で行われ、全体的にみると、例年と遜色なく研究は遂行されたと思われる。以下に各研究項目についての考察を述べる。

過炭酸ナトリウムに助剤を併用する入浴施設の配管洗浄方法を開発した。本法は、バイオフィーム中の金属によるフェントン反応が生じることで、少ない薬剤量で効率よくバイオフィームが除去できる。既存薬剤と比較したところ、すすぎの回数が削減され、使用薬剤量も低減されることから、少ない労力で洗浄することが可能となった。本洗浄方法の活用により、洗浄頻度の向上、浴場施設の衛生の向上が期待される。

これまでアルカリ性や中性の泉質に適用され、酸性での適用事例がなかったモノクロラミン消毒を 3 施設の pH5 程度の弱酸性の人工炭酸泉に適用したところ、臭気を発生させることなく、レジオネラ属菌の増殖が抑制できた。従属栄養細菌数の増殖抑制も示唆された。

これまでに、遊離塩素により浴槽水が十分に消毒された細菌の状態をフローサイトメトリー (FCM) で検出することで「清浄」か「細菌増殖」かを 5 分で判定する迅速評価法を開発し、この判定がレジオネラ培養検査の定性結果とも一致することをモデル実験や施設調査で実証してきた。モノクロラミン消毒では、FCM により測定される散布図が遊離塩素消毒の場合と全く異なったことから、モデル実験でモノクロラミン消毒時の FCM 特異領域を設定し、モノクロラミン消毒の迅速評価法の有効性を実検体で確認した。「清浄」と判定された 19 浴槽からは培養法においてレジオネラ属菌は検出されなかった。「細菌増殖」と判定された 9 浴槽からもレジオネラ属菌は検出されなかったが、硝化細菌である *Mycobacterium phlei* が検出され、モノクロラミン消毒に影響を与えている可能性が示唆された。

ヒトから検出されるレジオネラ属菌のほとんどを占め公衆衛生上重要な菌種である Lp を選択的に検出・定量できるレジオラート/QT 法は、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。平板培養法との結果一致率は高いことから、本法は、日常の衛生管理には非常に有用な検査法と考える。しかしながら、今年度は偽陽性を示す菌種が複数確認されたため、偽陽性の発生頻度の把握や確認できる手法、偽陽性を低減する方法を検討する必要がある。また、定量検査のために専用トレイとシーラーが必要だが、それら高価な機器を使用しない定性法の確立には、培養条件等に多くの課題が残る。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、いずれのプロトコルにおいても、平板培養法に対する感度が LAMP 法よりも低かった。今後は、採水現場での濃縮・測定を想定したうえで、フィルターや濃縮率についてプロトコルを再検討する必要がある。

PALSAR 法は、これまでシャワー・カラン水を対象とした場合、感度が低かったが、MWY 液体培地で一晚増菌する方法で、平板培養法に対する感度は 100%であったため、これらの検体では増菌培養を実施することが望ましい。

16S アンプリコン解析では、半数以上の浴槽水・シャワー水からレジオネラ属菌のリードが検出され、Lp のリードも一部の検体から検出された。非結核性抗酸菌症の原因菌であるマイコバクテリウム属菌に関しては、浴槽水・シャワー水の約 9 割からリードが検出され、広くレジオネラ属菌およびマイコバクテリウム属菌が存在していることが示された。これらの菌が生きた状態で存在しているのかは明らかではないため、今後、死菌 DNA の PCR 増幅を阻害する EMA 処理などを取り入れた解析を実施する必要がある。

感染源を特定するためには、環境検体から患者由来株の大半を占める Lp1 を分離することが重要となるため、IMB により Lp1 を選択的に濃縮分離する方法を検討している。IMB 処理前に Lp1 特異的な qPCR によるスクリーニングを実施することで、不必要な IMB 操作を省くことができた。平板培養法で Lp1 不検出の 3 検体から Lp1 を分離することができた。平板培養法のみで Lp1 が分離された検体も過去にはあったことから、平板培養法と濃縮液を用いた Lp1-IMB 法を併用す

ることが望ましいと考えられた。

「入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン」を作成した。各施設において迅速検査法を導入する際は、それぞれの方法の特性を理解した上で自施設の平板培養法の結果と比較し、どのように利用するかを検討することが望ましい。

MLVA 法は利便性の高い利便性の高い分子タイピング法だが、primer のミスマッチにより MLVA 領域が増幅されないケースが明らかとなり、primer の改良が必要であると考えられた。Intermediate-size として扱う必要がある MLVA 領域については菌株数を増やし検討する必要がある。集団事例におけるコアゲノム SNPs 解析から詳細な菌株間の関連性が明らかとなったことから、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 PFGE、MLVA、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。

外部精度管理は、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複数人で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。

本研究で作成している衛生管理ガイドライン案及び調査ガイドライン案が、保健所による入浴施設の指導での参考として活用され、またレジオネラ症発生時の原因究明に資することができるように、さらに改良を進めていきたい。

公衆浴場の浴槽で維持すべきとされている遊離残留塩素濃度（0.4～1.0 mg/L）であれば、SARS-CoV-2 は短時間に不活化されることが明らかとなった。モノクロロミンは一般的にウイルスに対する効果は遊離塩素よりも低く、SARS-CoV-2 に対しても同様であるとの結果が得られた。

緊急事態宣言に伴い休業した入浴施設のレジオネラ汚染状況を調査したところ、営業休業中はむしろレジオネラ汚染が少なかった。これは、休

業期間中に定期的に配管内の原湯を入れ替え、循環させ、遊離残留塩素濃度を高濃度に保ったことによるものと考えられた。しかし、完全なレジオネラ属菌排除には至らず、営業再開後は増加傾向が認められた。このため、今後も調査を継続するとともに新たなレジオネラ属菌対策を実施する必要があると考えられた。

医療機関の給水・給湯系について、レジオネラ属菌と合わせて一般細菌数と従属栄養細菌数を調査し、レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌と一般細菌の指標性を検討した。一般細菌は検出されなかった。従属栄養細菌数もレジオネラ汚染との相関はなかった。したがって、医療機関の給水・給湯系においてそれらの細菌数はレジオネラ汚染の指標とならず、レジオネラそのものを測定する必要があると考えられた。

近年、次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されている。入浴施設の管理への応用を検討するため、2015 年から調査を継続してきた神奈川県内の入浴施設で検出された Lp を用いて、次世代シーケンサーによる SNPs 解析を実施した。同一のクローンを起源とする菌株が、一年以上にわたり検出されていたり、異なる浴室から検出されたりしていた。このため、この入浴施設内にレジオネラ属菌の供給源があるものと推察された。

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、以下のような効果的な手法の検討を行った。

入浴施設における省力化配管洗浄法を開発し、実地試験でその効果が検証できた。弱酸性の人工炭酸泉でモノクロロミン消毒が有効であることが確認できた。公衆浴場における適切な遊離塩素消毒で、SARS-CoV-2 は短時間に不活化されることが明らかとなった。

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。レジオラート/QT 法の平板培養法との比較、定性試験法の開発、モバイル型 qPCR 装置の試用、

PALSAR 法の改良を行った。Lp1-qPCR スクリーニングを併用した Lp1-IMB による Lp1 の選択的検出法を検証した。携帯型フローサイトメーターを使用したモノクロラミン消毒の効果判定系を作成した。次世代シーケンサーを用いて浴槽水とシャワー水の菌叢解析を行った。次世代シーケンサーを用いて、1つの集団感染事例に由来する菌株、あるいは1つの入浴施設の複数箇所から長期にわたって検出される菌株のSNPs解析を行い、他の分子疫学解析法とも比較した。次世代シーケンサーはMLVA法の検証にも活用した。医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染を調査した。

レジオネラ迅速検査ガイドライン、衛生管理ガイドライン案、調査ガイドライン案を作成した。

レジオネラ外部精度管理サーベイを継続実施した。

F. 健康危険情報

(1) 健康危険情報

新型コロナウイルス感染症対策で使用停止した建物や施設の再開時にレジオネラ感染の危険性がある。(令和2年5月12日報告済み)

(2) 情報源

Hospital Water Hygiene 研究会のホームページ (URL: <https://fs.lck-cloud.jp/u13673/>) 中の研究会からののお知らせ・最新情報 (URL: <https://fs.lck-cloud.jp/u13673/研究会からののお知らせ・最新情報/>) にある「新型コロナウイルス感染症対策で使用停止した建物や施設の再開時のレジオネラ感染の危険性」(2020年5月11日(月)10時00分掲載)

(3) 情報に関する評価・コメント

グレードA情報：重要情報

○本邦においてなんらかの健康への影響がある可能性があり、緊急性が高く、国外の関係機関*が重大な健康問題として警告している場合。

・情報源にリンクされている記事(ワシントン発ロイター通信、2020年4月24日)によると、米国疾病対策予防センターが長時間閉鎖された建築物の給水システムを再開するためのガイダンスを出している (URL: <https://www.cdc.gov/>

[coronavirus/2019-ncov/php/building-water-system.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/building-water-system.html)、2020年5月7日更新)。

・本邦に即した対応とするために、情報源中に「建物や施設の再開時の留意点 (HWH 研究会からの提言)」が述べられている (URL: <https://fs.lck-cloud.jp/u13673/研究会からの提言・推奨/>)。閉鎖されている施設の再開にあたり、給水・給湯系、冷却塔系について、洗浄・消毒による安全性の確保が必要である。本邦における特徴的な施設である、入浴施設の循環式浴槽系やシャワー系についても注意が必要である。諸施設の再開にあたっては本提言を参考にすることが望まれる。

(4) その他

ESGLI (ESCMID- Study Group for *Legionella* Infections: 欧州レジオネラ研究会、ESCMID は Europe's leading society in clinical microbiology and infectious diseases の略称) からも、「COVID-19 大流行下におけるレジオネラ感染制御のための歯科、高齢者施設、建築物、病院の水系システムのガイドライン」が出されている (URL: https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/legionella_infections/)。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. *Journal of Hot Spring Sciences*, 2020, 70, 50-60.
- 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におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策. *温泉科学*, 69, 192-201 (2020)
- 3) 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子, 紙上ミニシンポジウム I~水の衛生管理~3.貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況, 日本

防菌防黴学会誌, 2020, 48(8), 377-382.

- 4) Nakamura I, Amemura-Mackawa 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.
- 5) 金谷潤一 他. 環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価. 日本防菌防黴学会誌. 2020, 48, 515-522.
- 6) Seto J, Amemura- Mackawa J, Sampei M, Araki K, Endo M, Kura F, Ikeda T, Kato T, Ohnishi M, Mizuta K. Investigation of a Legionnaires' disease outbreak using direct sequence-based typing in Yamagata City, Japan, 2019. *Jpn J Infect Dis.* 2021. doi:10.7883/yoken.JJID.2020.815.
- 7) Inoue H, Baba M, Tayama S. Evaluation of Legiolert for Quantification of *Legionella pneumophila* from Bath Water Samples. 2020. 25:179-182.

2. 総説

- 1) 倉 文明 : special feature 知る・学ぶ・実践する 水回りの感染制御、水回りの環境調査の実践 — 検査の方法・対象・頻度とその活用術. 感染対策 ICT ジャーナル、15(4):301-5, 2020.
- 2) 倉 文明 : IV. 感染症-22 レジオネラ症. 小児内科増刊号 52(653):925-30. 2020

3. 学会発表

- 1) 前川純子. レジオネラ症の疫学. 第 94 回日本感染症学会総会・学術講演会シンポジウム 22. 2020 年 8 月. 東京.
- 2) 淀谷 雄亮、原 俊吉、小嶋 由香、本間 幸子、前川 純子、森田 昌知、大西 真、岡部 信彦. 川崎市におけるレジオネラ症患者からのレジオネラ属菌の分離及び解析状況. 第 32 回日本臨床微生物学会総会・学

術集会. 2021 年 1 月. Web 開催.

4. 研修会

- 1) 佐々木麻里 他 : レジオネラ症総論と培養法の注意点、レジオネラ web 研修会、2021 年 1 月、大分 (web 開催) .
- 2) 倉 文明 : レジオネラ症の最新の動向と ATP 測定を活用した衛生管理、第 123 回ルミテスターセミナー (web セミナー)、2020 年 6 月、東京都.
- 3) 倉 文明 : レジオネラについて (その正体、いかに対処するか)、第 78 回ウォーター研究会セミナー、機能水研究振興財団令和 2 年度第 1 回研修会、2020 年 6 月、東京都.
- 4) 前川純子 : 新通知法に基づくレジオネラ属菌検査. 専門研修「検査技術」. 2020 年 10 月. 東京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許出願中、配管の洗浄方法

令和2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

省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験

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	森 康則	三重県保健環境研究所 衛生研究課
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	細川 賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	田中 孝典	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

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌の汚染を低減するには、消毒だけでなく、定期的な洗浄が必要になる。ろ過器や配管はブラシを使った物理的な洗浄ができず、過酸化水素や過炭酸ナトリウムを使用した化学的な洗浄を行っている。しかし、これらの物質は劇物や危険物であり、多量の薬剤を使っでの頻回な洗浄は容易ではなかった。本研究では使用する薬剤量の低減を目的として、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法に着目した。バイオフィーム中の金属によるフェントン反応により、従来より少ない薬剤量でも効率よくバイオフィームの除去が可能になると期待された。最初にステンレス製試験片上に生成したバイオフィームを効率よく除去できる洗浄条件を検討し、次に営業4施設の協力を得て、最適条件による新規の洗浄方法を試行した。薬剤の使用量が重量にして従来の3割と低減したにも関わらず、9割以上の微生物が除去される洗浄効

果が得られた。洗浄後のすすぎの回数も多くなく、従来より少ない労力で洗浄することが可能となった。本洗浄方法の活用により、洗浄頻度の向上、浴場施設の衛生の向上が期待される。

A. 研究目的

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌の汚染に対応するため、次亜塩素酸ナトリウムやモノクロラミンといった塩素剤による消毒が行われている¹⁾。しかし、循環式浴槽のろ過器や複雑な配管においては、消毒剤だけでレジオネラ属菌とバイオフィルムを抑制し続けることは困難である。遊離塩素消毒では、低濃度のレジオネラ属菌が検出され、消毒が不足していることがある。レジオネラ属菌に対して効果が高いとされるモノクロラミン消毒にしても、連続使用に際して浴槽水の従属栄養細菌数の増加が報告され、洗浄の徹底が課題となっている²⁾。当然のことではあるが、消毒だけではなく、定期的な配管洗浄が必要とされる。

ところが、浴場施設の構造は、洗浄のしやすさの観点から抜け落ちている³⁾。ろ過器や配管にブラシを使うといった物理的な洗浄が不可能であることから、洗浄剤を使った化学的な洗浄方法に頼ることになる³⁻⁶⁾。現在の化学的な洗浄には、主に過酸化水素や過炭酸ナトリウムが用いられているが、前者は劇物であることから専門業者への委託が主となり、浴場施設にとっての金銭的な負担が大きい。薬剤の使用量も多く、原液 30～35%濃度を終濃度 3～3.5%の 10 倍希釈で使用する場合、例えば 10m³の浴槽水に対して 1m³もの原液を使用する計算になる。実際の洗浄作業には水位を可能な限り下げて、濃度をもっと薄くするとしても、洗浄範囲と洗浄効果を保つには減らすにも限度がある。

後者の過炭酸ナトリウムであっても、例えば

10m³の浴槽水に対して、1%の 100kg を使用し、固体であっても少なくない。つまり、いずれの方法を使うにしても、頻繁な洗浄とはならず、洗浄不足になりえる。洗浄頻度は、管理しやすく薬剤量の少ない洗浄方法があれば、向上が期待できる。

ちなみに、過炭酸ナトリウムは、危険物第 1 類(酸化性固体)の炭酸ナトリウム過酸化水素付加物(あるいは炭酸ナトリウム過酸化水素化物、 $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$)に炭酸ナトリウム(Na_2CO_3)等を(例えば 7:3 の割合で)混合して形状も工夫することで、爆発や燃焼を抑制し、非危険物として販売されている¹⁵⁻¹⁷⁾。本来、酸素を出して周囲の物質を燃焼させたり爆発したりする性質であり、ガス抜きのできる専用容器の使用を含め、注意を要する。洗浄剤の名目で販売中の過炭酸ナトリウムは安全性に配慮されているはずだが、純品の炭酸ナトリウム過酸化水素付加物は危険性の高いものであり、製造上の誤りや洗浄効果を目的に混合比率が高まっていたり、炭酸ナトリウム過酸化水素付加物と過炭酸ナトリウムの通称が混同・販売されるといった恐れが全く無いとは言えないので、大容量やバルク製品の購入には、燃焼試験や落球式打撃感度試験等で危険性の無いことが確認された製品を選択することが望ましい。

洗浄後のすすぎにかかる労力も、問題になる。過酸化水素や過炭酸ナトリウムを用いた洗浄の後に、すすぎを徹底する必要がある³⁾。すすぎが不足すると消毒の塩素濃度が維持できず、洗い残したレジオネラ属菌の遊離が懸念

される。すすぎの徹底には、多量の水を複数回入れ替える作業が生じて、それだけ費用と労力と時間を要するので、なおさら洗浄に消極的になる恐れがある。もし洗浄剤の使用量が少なければ、すすぎにかかる水量と回数を減らせる可能性がある。

本研究では薬剤量の低減を目的として、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法に着目した⁷⁾。水が循環する環境のバイオフィルムには、鉄などの金属が蓄積している。このバイオフィルム中の金属を触媒として利用するフェントン反応により、薬剤が除去目標のバイオフィルム中で特異的に働く。結果として、少ない薬剤量でバイオフィルムを除去できることが、新規洗浄方法の特長とされる。過酸化水素によるバイオフィルム処理は口腔衛生にも使われており、フェントン反応によって生じるヒドロキシラジカルが殺菌に有効と考えられている⁸⁾。この原理を循環式浴槽の配管洗浄に応用し、実際の営業施設において洗浄効果を検討した。

B. 研究方法

B1. 試験管内での洗浄条件の検討

循環水中の水流の再現装置によるバイオフィルム形成方法を参考にして、バイオフィルムの形成と、洗浄後の残存バイオフィルム量の測定を行った^{9, 10)}。すなわち、連続培養システム(アート科学社製)の中に 15mm×20mm(厚さ 1.5mm)のステンレス製の試験片を設置し、(後述の施設 A から D とは異なる)とある施設から採取した浴槽水を 40°C で 14 日間循環させることで、試験片上にバイオフィルムを発生させた(図 1)。試験片を 6 ウェルプレートに移し、洗浄剤 5mL に浸漬した。プレートバイオフィルムに移して 40°C、60rpm で回転さ

せることで、試験片を洗浄した。試験片から洗浄剤を除いて蒸留水 3mL で 2 回すすいだ後に、0.1%クリスタルバイオレット 3mL を加えて、30 分間バイオフィルムを染色した。染色液を除いて蒸留水 5mL で 2 回すすいだ後に、1mL のエタノールを加えてバイオシェーカーで 1 分間攪拌し、バイオフィルムからクリスタルバイオレットを溶出した。溶出液の吸光度(波長 570nm)を測定することで、クリスタルバイオレットの量、すなわち試験片上に残存したバイオフィルム量を測定した。

蒸留水による洗浄を対照コントロールとして用い、これを基準として、他の洗浄条件によるバイオフィルムの除去率を評価した。洗浄剤は先行報告に従い、過炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、酒石酸を混合して用い、量比による洗浄効果の違いを検討した(表 1)。比較対象として、従来から用いられてきた過炭酸ナトリウムの単独³⁻⁶⁾、および過炭酸ナトリウムとクエン酸を有効成分とする市販品(本報告では現状の販売に配慮して、具体的な製品名を表示しない)を用いた。

B2. 実地の浴場施設における洗浄

施設 A~D の 4 つの入浴施設の協力を得て、洗浄試験を実施した(表 2)。いずれも循環式浴槽を備えており、定期的な洗浄が必要だが、洗浄の頻度や消毒の状況は様々であった。施設 A~C においては新規の洗浄方法を行い、施設 D においては 2 浴槽を用いて新規方法と従来方法の洗浄を並行して実施した。

新規の洗浄方法として、浴槽水 1m³あたり過炭酸ナトリウム 1kg(終濃度 0.1%)にアスコルビン酸 1kg と酒石酸 1kg を助剤として用いて、過酸化水素による洗浄効果を発揮させた。浴槽水の量を循環可能な最低限に減らした後、上

記の 3 化合物を同時に浴槽水に添加し、浴槽水を循環した。60 分後に、1m³ あたり炭酸ナトリウム 0.5kg 程を用いて排水可能な pH に調整し、すすぎの工程に移行した。

従来の洗浄方法として、浴槽水 1 m³あたり過炭酸ナトリウム 6kg およびクエン酸 4kg からなる市販の洗浄剤を用いた。新規の方法と同様に、浴槽の水量を循環可能な最低限に減らした後、先にクエン酸を浴槽水に添加して 30 分間循環、次に過炭酸ナトリウムを添加して 90 分間循環した。1m³あたり亜硫酸ナトリウム 1.2kg によって過炭酸ナトリウムを中和し、すすぎの工程に移行した。

洗浄後の浴槽から洗浄剤を除去するため、すすぎを行った。浴槽水を排水したら、循環可能な水量まで給水し、一定時間循環後、排水を繰り返した。循環する時間は、系全体での 1 循環に要する時間を目安とし、すすぎ時点の浴槽の水量 (m³) をポンプ能力 (m³/hr) で除して求めた。すすぎは、次亜塩素酸ナトリウムまたはモノクロラミンとの反応性が消失して、消毒剤の濃度が維持できるまで、数回を繰り返した。具体的には、すすぎ水 10mL に、1,000 mg/L 程度に調整した次亜塩素酸ナトリウムまたはモノクロラミンを 10μL 添加し、DPD 法によって対照コントロールの精製水と同じ塩素濃度を示すまで、すすぎを繰り返した。各塩素剤の調製法は下記の通り。

次亜塩素酸ナトリウム:6% 次亜塩素酸ナトリウム溶液を精製水で 0.1% に希釈した。

モノクロラミン:0.3% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (6% 溶液を精製水で希釈して調整) と 0.4% 塩化アンモニウム溶液を 1:2 の割合で混合した。

洗浄前後に、ヘアキャッチャー近傍の配管 2 か所 (5cm×5cm) を拭き取り、ATP 検査および細菌検査を行った。施設 A においてはろ過器内部からも拭き取り検査を実施した。ATP 検査には、UltraSnap (Hygiena) を添付文書の方法に従い使用した。細菌検査には、ふきふきチェック II (栄研化学) を用い、スワブは Voltex ミキサーを用いて付属の 10mL リン酸緩衝液に懸濁した。培養法では 10mL 懸濁液から、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌、レジオネラ属菌の検査を実施した。培養の詳細は以下の通り。

一般細菌数: 懸濁液を段階希釈後、100μL を標準寒天培地にコンラージ棒で塗抹した。培養温度は、浴槽水の培養で生育が良好だった条件を参考とし、37°C で 48 時間培養した後で、形成されたコロニー数を、適切な希釈段階で計数した^{11, 12)}。原液 100μL を塗布したので、検出下限は 100 cfu/25cm² であった。

従属栄養細菌数: 懸濁液を段階希釈後、100μL を R2A 寒天培地にコンラージ棒で塗抹した。30°C で 7 日間培養した後、形成されたコロニー数を、適切な希釈段階で計数した¹²⁾。検出下限は一般細菌数と同様に 100 cfu/25cm² であった。

大腸菌数: ペトリフィルム EC プレート (3M) を用いて、説明書に記載の方法によって測定した¹³⁾。原液 1mL を接種したため、検出下限は 10 cfu/25cm² であった。

レジオネラ属菌数: 懸濁液 4mL を等量のレジオネラ酸処理液 (関東化学) と混合し、室温で

20 分反応させた後、段階希釈後の 1mL を GVPC 寒天培地に塗布し、37°Cで 7 日培養した¹⁴⁾。出現したコロニーは羊血液寒天培地 M58 および BCYE α 寒天培地に転培し、37°Cで 5 日間培養した。羊血液寒天培地 M58 で陰性、かつ BCYE α 寒天培地で陽性のコロニーをレジオネラ属菌として計数した。検出下限は 50 cfu/25cm²であった。

C. 結果および考察

C1. 試験管内での洗浄条件の検討

過炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、酒石酸の量比を変えた場合(6 通り)に、過炭酸ナトリウム単独の場合と市販の洗浄剤を使った条件を加えた計 8 通りで、バイオフィルムの試験片を洗浄した(表 1)。

従来の洗浄方法である過炭酸ナトリウムの単独あるいは市販品を使用した場合(洗浄条件 7, 8)、いずれもバイオフィルムの除去率は 60%程度であった。市販品は説明書に従って 90 分間と洗浄時間を長くしたが、除去率の向上はほぼなかった。

過炭酸ナトリウムにアスコルビン酸と酒石酸を混合した新規の洗浄方法では、それぞれ 0.1%以上の等量で用いることで、除去率は 80 ないし 90%程度と従来法を上回ることができた(洗浄条件 3~5)。すなわち、薬剤の重量が従来の 3 割でも、従来以上の洗浄効果が得られた(洗浄条件 3)。薬剤量を 3 倍から 5 倍に増やすことで除去率は向上したが、1 ないし 2 割の範囲に留まった。一時の薬剤量を増やすよりも(洗浄条件 4, 5)、少ない量で 3 回、5 回と洗浄回数を増やすことが、衛生状態の維持や改善に好ましいと考えられた。

新規の洗浄方法に使用したアスコルビン酸を減らすと、除去率が低下した(洗浄条件 1,

2)。結果には示していないが、酒石酸を減らしても除去率が低下する恐れがあった。一方、助剤だけでは洗浄効果がなく、洗浄には過炭酸ナトリウムが必要であることを確認した(洗浄方法 6)。すなわち、バイオフィルム中の金属イオンがアスコルビン酸の還元剤の存在下で触媒として働き、フェントン様反応が生じて過炭酸ナトリウムによるバイオフィルムの除去・殺菌が効率よく働いたと考えられた⁷⁾。

以上の結果を受けて、洗浄条件 3 の方法を最善と判断し、この方法で実地の洗浄試験を進めた。

C2. 実地の浴場施設における洗浄

施設 A の試験では、新規の洗浄方法を実施中に、浴槽水の白濁する様子が見られたが、従来の方法にあった激しい発泡は認めなかった(図 2)。配管内部およびろ過器内部のふき取りにおいて、ATP 値の減少が確認された(表 3)。一般細菌数、従属栄養細菌数ともに減少が見られ、高い洗浄効果を示した(表 3)。すすぎは 2 回で完了した。

施設 B の試験では、新規方法による洗浄中に、バイオフィルム由来と思われる汚れが確認された(図 3)。ATP 値の減少、一般細菌数、従属栄養細菌数ともに検出限界未満まで減少する、高い洗浄効果が確認された(表 4)。すすぎは 3 回で完了した。

施設 C の試験では、新規方法による洗浄中に、浴槽水の濃褐色への変化が確認された(図 4)。洗浄前の ATP 値が低値であり評価不能であったものの、一般細菌数および従属栄養細菌数が検出下限未満まで減少した(表 5)。すすぎは 1 回で完了した。

施設 D の試験では、2 浴槽を用いて新規の洗浄方法と従来方法を並行して行った。新規

方法による洗浄では、浴槽水の褐色への変化が確認された(図 5B)。ATP 値の減少、一般細菌数、従属栄養細菌数ともに減少が見られ、高い洗浄効果が確認された(表 6)。すすぎは 2 回で完了した(表 7)。従来の洗浄法を実施した別の浴槽では、激しい発泡と共に浴槽水の褐色への変化が確認された(図 5D)。ATP 値と細菌数は、残念ながら洗浄前の測定値が低く、洗浄効果については評価不能であった(表 8)。すすぎは 5 回を要し、本研究内で最も回数が多かった(表 7)。

本報告では浴場施設の洗浄不足の解消を目的として、薬剤量の低減が可能となる、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法に着目した⁷⁾。浴槽水 1 m³あたり 6kg ないし 10kg の過炭酸ナトリウムが使われていた従来の方法に比べて³⁻⁶⁾、新規の洗浄方法では 1kg と量が大きく減少した。

従来の方法では発泡して過炭酸ナトリウムが消費されていくのに対して、新規の方法ではほとんど発泡をせず、有効な過炭酸ナトリウムの残留が長いこと、直接的にバイオフィームに作用できることが、減量できた理由と考えられた。助剤を含めて計算すると、10kg から 3kg へと 7 割の重量が削減され、新規の洗浄剤は従来に比べて取り扱いが相当に有利と考えられた。

営業施設での洗浄試験では、A~D のいずれにおいても洗浄効果が目視および細菌検査により確認された。一部の配管の拭き取りから検出限界付近のレジオネラの残存が見られたものの、この僅かな菌数から浴槽水への汚染の可能性は極めて低いものと考えられたため、繰り返しの洗浄には至らなかった。結果に示していないが、実際に、いずれの施設にお

いても洗浄後の浴槽水は、レジオネラ属菌が不検出であった。

例数は 1 回にとどまるが、新旧の作業負荷を施設 D において比較できた。薬剤量が減少することで、肉体的な作業負荷は明らかに低減した。すすぎ回数も削減できた(表 7)。施設 D のすすぎ工程は 1 回につき 60~90 分間を要し、3 回のすすぎ工程の削減は、4 時間以上の短縮を実現した。営業施設における洗浄は、休館日や営業終了後~翌日営業開始前の夜間などの空き時間に行われ、短時間に完了することが求められる。本来は洗浄時間を十分に取ることが望ましいが、24 時間営業や休業日のほとんど無いこともあり、洗浄時間の短縮は洗浄頻度と衛生の向上に有効と期待できた。

洗浄効果に施設間で若干の差が認められ、多くの測定結果は洗浄の前後で 99%以上の減少であったが、施設 A 配管部①においては 90%弱の減少にとどまった。元の菌数が大きいほど効果的な結果になりえるが、施設 C は、(施設 A と同様に)洗浄前の菌数が高くなっても洗浄効果が得られていた。施設 A に限って、バイオフィームの性質、水質、配管材質や表面の状態といった違いが考えられた。一方、試験管内実験の 70%を十分に超えた洗浄効果が得られており、90%にとどまることにこだわる必要はなさそうである。薬剤量を更に減少させるといった改良につながる可能性があり、詳細を検討する価値があるかもしれない。

D. 結論

バイオフィーム中のフェントン反応による新規の洗浄方法に着目し、最適な洗浄の条件を求めた。営業 4 施設の協力を得て、新規の洗浄方法を実施した。薬剤の使用量が重量にして従来の 3 割と低減したにも関わらず、9 割以

上の微生物除去の洗浄効果が得られて、洗浄後のすすぎの回数が減り、少ない労力で洗浄することができた。洗浄頻度の向上、浴場施設の衛生の向上が期待できた。

E. 参考文献

1. 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
2. 泉山信司、長岡宏美、他「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」、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、令和元年度分担研究報告書
3. 今関久和、過炭酸ナトリウムを用いた洗浄と施設設備の衛生上の問題及びその解決策、厚生労働省生活衛生課平成 30 年度生活衛生関係技術担当者研修会より、平成 31 年 2 月 (<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/0/000483756.pdf>、2021/2/16 現在)
4. 縣 邦雄、配管洗浄の方法、厚生労働省生活衛生課平成 28 年度生活衛生関係技術担当者研修会より、平成 29 年 2 月 (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000194934.pdf>、2021/2/16 現在)
5. 林 宏美、源田 健、吉田裕行、塩素管理の改善に奏功した過炭酸ソーダによる配管洗浄事例、生活と環境 62(1), 43-45, 2017
6. 藤井明、河合自立、松田和也、杉山寛治、大畑克彦、鈴木光彰、加藤宏一、循環ろ過式モデル浴槽系内におけるバイオフィーム形成とその洗浄・殺菌について、生活と環境 51(2), 67-73, 2006
7. 特願 2020-186228
8. Hasegawa H, Tomiyama K, Kumada H, Kawata A, Higashi K, Takahashi O, Hamada N, Mukai Y. Antimicrobial effects of carbamide peroxide against a polymicrobial biofilm model. *Am J Dent.* 2015 Feb;28(1):57-60.
9. Garmy, K., Horn, H. & Neu, T.R. Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. *Bioprocess Biosyst Eng* 31, 619–629 (2008).
10. Wunder DB, Bosscher VA, Cok RC, Hozalski RM. Sorption of antibiotics to biofilm. *Water Res.* 2011 Mar;45(6):2270-80.
11. 一般細菌 別表第一に定める方法、水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(平成 15 年厚生労働省告示第 261 号)より
12. 保坂三継、眞木俊夫、水の従属栄養細菌試験における培地並びに培養条件の検討、東京都立衛生研究所研究年報、2001、52、245-249
13. Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W, BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria, in FDA, *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A, 1998. (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-esc>)

[herichia-coli-and-coliform-bacteria](#),

2021/2/19 現在)

14. 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長、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(薬生衛発0919 第1号、令和元年9月19日)
15. 内閣、危険物の規制に関する政令の一部を改正する政令、(政令第405号、平成23年12月21日)
16. 草加八潮消防組合、「消防法上に新たな「危険物」が追加されます」(<https://soka-yashio119.jp/information/kikenbutsu.html>、2021/2/25 現在)
17. 林純薬工業(株)、安全データシート(MSDS、過炭酸ナトリウム)(<http://www.hpc-j.co.jp/pdf/msds/F2-16.pdf>、2021/2/26 現在)

F. 研究発表

誌上発表

1. Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. *Journal of Hot Spring Sciences*, 2020, 70, 50-60.
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におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策. *温泉科学*, 69, 192-201(2020)
3. 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子, 紙上ミニシンポジウムI~水の衛生管理~

3.貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況, 日本防菌防黴学会誌, 2020, 48(8), 377-382

口頭発表

1. 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ル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

1. 特許出願中、配管の洗浄方法

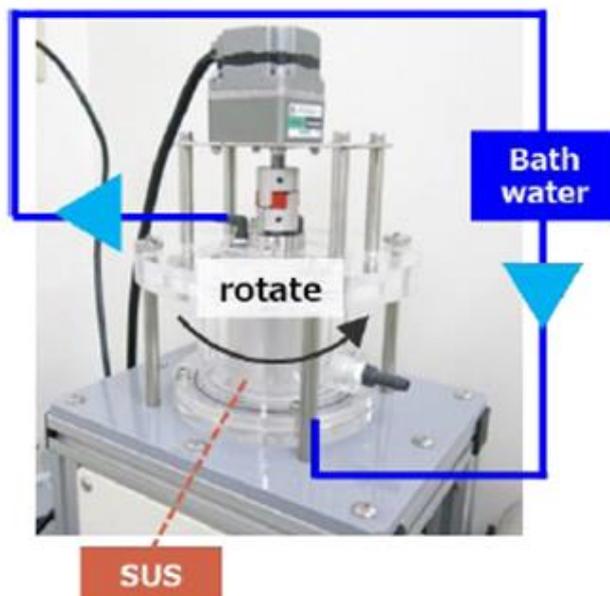


図1 バイオフィルムの生成

連続培養システム（アート科学社製）に 15mm×20mm（厚さ 1.5mm）のステンレス製の試験片(SUS)を設置し、とある施設から採取した浴槽水を 40°Cで 14 日間循環させることで、試験片上にバイオフィルムを発生させた。写真上の青字の線と矢印は浴槽水の循環、黒矢印は試験片の回転を表現している。

表1 試験管内での洗浄条件の検討

	洗浄条件 番号	1	2	3	4	5	6	7	8	
組成 (%)	過炭酸ナ トリウム	0.1	0.1	0.1	0.3	0.5	—	1	0.6	
	アスコル ビン酸	0.01	0.03	0.1	0.3	0.5	0.1	—	クエ ン酸	
	酒石酸	0.1	0.1	0.1	0.3	0.5	0.1	—	0.4* ¹	
pH		4.2	4.2	4.1	4.1	4.1	4.0	10.7	ND* ²	
洗浄時間 (分)		60							90	
バイオフィルム除 去率 (%)		37.7	53.8	77.1	91.2	90.0	10.0	60.5	63.0	

*1：市販の洗浄剤を使用し、アスコルビン酸と酒石酸は 0% *2：測定なし

表2 営業4施設の管理状況

施設、泉質	A、(井水)	B、アルカリ性単純泉	C、ナトリウム・カルシウム-塩化物泉	D、ナトリウム-塩化物泉
消毒方法	モノクロラミン	モノクロラミン	モノクロラミン	遊離塩素
配管洗浄頻度	1回/月	1回/年	数回/年(不定期)	1回/年
高濃度塩素消毒	1回/週	1回/週	1回/週	なし
浴槽(循環系)の大きさ	約7m ³	約20m ³	5.2m ³	D1: 8.3m ³ D2: 4.7m ³
実施した配管洗浄	新規方法	新規方法	新規方法	D1: 新規方法 D2: 従来の方法

A) 洗浄前



B) 洗浄中



図2 施設Aの新規方法による洗浄前後

表3 施設A 洗浄試験

施設A	配管部①		配管部②		濾過器内部	
	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後
ATP値	301	63	355	0	1723	57
一般細菌数	3.5 x 10 ⁴	5.0 x 10 ³	5.5 x 10 ⁶	3.5 x 10 ³	1.3 x 10 ⁵	2.5 x 10 ³
従属栄養細菌数	4.1 x 10 ⁴	2.5 x 10 ³	2.4 x 10 ⁶	2.0 x 10 ³	7.1 x 10 ⁴	5.0 x 10 ²
レジオネラ属菌数	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満

ATP値 (RLU/25cm²) 菌数 (cfu/ 25cm²)



図3 施設Bの洗浄中、循環給湯口から浴槽に汚れが入ってきた様子

表4 施設B 洗浄試験

施設B	配管部①		配管部②	
	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後
ATP 値	9237	362	3598	118
一般細菌数	2.7×10^6	検出限界未満	1.7×10^7	検出限界未満
従属栄養細菌数	1.9×10^6	検出限界未満	4.5×10^6	検出限界未満
大腸菌数	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
レジオネラ属菌数	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満

ATP 値 (RLU/25cm²) 菌数 (cfu/ 25cm²)

A) 洗浄前



B) 洗浄中



図4 施設Cの洗浄の前後

表5 施設C 洗浄試験

施設C	配管部①		配管部②	
	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後
ATP 値	0	2	19	3
一般細菌数	2.2×10^3	検出限界未満	4.0×10^2	検出限界未満
従属栄養細菌数	3.8×10^3	検出限界未満	3.4×10^4	検出限界未満
大腸菌数	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
レジオネラ属菌数	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満

ATP 値 (RLU/25cm²) 菌数 (cfu/ 25cm²)

A) 新規方法による洗浄前 (浴槽 D1)



B) 新規方法による洗浄中 (浴槽 D1)



C) 従来方法による洗浄前 (浴槽 D2)



D) 従来方法による洗浄中 (浴槽 D2)



図5 施設 D における新旧の洗浄方法による発泡の比較

写真では発泡の多少を比較している。B の新しい洗浄方法では、若干の発泡で細かなクリーム状の泡が浮いている。D の従来の洗浄方法では、激しい発泡により大きな泡が浮き、水中にも泡が多く、色調はあまり変わっていないにもかかわらず底面が見えていない。B で底面が見えないのは、泡が理由ではなく、汚れに由来する濃い褐色が妨げている。

表6 施設 D (浴槽 D1) の新規方法による洗浄試験

施設 D (浴槽 D1) 新規洗浄方法	配管部①		配管部②	
	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後
ATP 値	1856	46	1637	9
一般細菌数	2.4×10^7	3.0×10^2	1.1×10^7	1.0×10^2
従属栄養細菌数	2.2×10^7	4.4×10^4	1.2×10^7	1.1×10^5
レジオネラ属菌数	$>2.0 \times 10^4$	検出限界未満	$>2.0 \times 10^4$	140

ATP 値 (RLU/25cm²) 菌数 (cfu/ 25cm²)

表7 施設Dにおけるすすぎ回数の比較（残留塩素濃度の回復度）

すすぎ回数	塩素残留率（％）				
	1	2	3	4	5
新規洗浄方法 （浴槽 D1）	63.8*1	100	-*2	-	-
従来方法 （浴槽 D2）	0	12.5	71.3	91.3	100

*1：塩素の残留率は、100%になれば塩素消毒が消失せず、すすぎが完了したことを表し、0%は塩素消毒がすべて消費されてしまい、すすぎが全く足りていないことを表す。*2：測定なし。新規の洗浄方法では塩素濃度が2回のすすぎだけで維持できるようになり、3回目以降のすすぎを行っていない。

表8 施設D（浴槽 D2）における従来の洗浄試験

施設D（浴槽 D2） 従来方法	配管部①		配管部②	
	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後
ATP 値	2	1	0	0
一般細菌数	検出限界未満	5.0 x 10 ²	検出限界未満	検出限界未満
従属栄養細菌数	検出限界未満	2.0 x 10 ²	2.0 x 10 ²	3.0 x 10 ²
レジオネラ属菌数	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満

ATP 値（RLU/25cm²） 菌数（cfu/ 25cm²）

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

令和2年度 分担研究報告書

弱酸性の人工炭酸泉へのモノクロラミン消毒の適用

研究分担者	泉山信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	長岡宏美	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
	田栗利紹	長崎県環境保健研究センター 保健科
研究協力者	杉山寛治	株式会社マルマ 研究開発部
	田中慶郎	株式会社マルマ 営業部
	市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
	茶山忠久	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
	青木信和	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部

(研究要旨)

浴槽水の消毒に使われるモノクロラミンは、pHの酸性条件下で臭気のあるジクロラミンへ変化する可能性が心配されたことから、これまでのところアルカリ性や中性の泉質に適用され、酸性での適用事例がなかった。一方の遊離塩素消毒は、pH5程度の弱酸性、例えば人工炭酸泉に用いられており、同じ塩素系の消毒方法であるモノクロラミンは、同程度の弱酸性に適用できるかもしれない。現状、アルカリ性と酸性の浴槽が同一施設内にあるなどして、モノクロラミン消毒と遊離塩素消毒を併用する場合、両消毒方法の混入によりジクロラミンやトリクロラミンによる臭気の発生する恐れがあり、2つの消毒の併用は避けたい。そこで、弱酸性の浴槽水にもモノクロラミン消毒が適用できないか検討した。まず、pH3～8に調整した緩衝液中でモノクロラミン濃度3 mg/Lの安定性を比較したところ、pH3～4では濃度が減少したが、pH5～8では添加10分後も濃度が安定して維持されていた。次に、営業施設の人工炭酸泉、3施設の計4浴槽において、終濃度3 mg/L以上に維持したモノクロラミン消毒の効果を検証した。週1回の換水・配管洗浄前の細菌検査では、いずれの浴槽水からもレジオネラ属菌は検出されず、モノクロラミン消毒時に増殖の報告がある、従属栄養細菌数の増加もなかった。うち2浴槽ではフローサイトメトリーによる全菌数検査も行い、浴槽水が適正に消毒されているとの結果を得た。これまでの営業施設におけるモノクロラミン消毒の実施と同様に、入浴者からの臭気等に関する苦情もなかった。以上の結果から、これまで適用されていなかったpH5までの弱酸性にも、臭気を発生させることなくモノクロラミン消毒が利用可能であること、レジオネラ属菌だけでなく、従属栄養細菌数の増殖を抑制できることが示唆された。

A. 研究目的

浴槽水を連続的に使用し続ける循環ろ過で、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ると、緊急避難的に遊離塩素消毒が導入された。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てレジオネラ属菌が検出されたり、塩素消毒の臭気が敬遠されたりした。遊離塩素消毒に代わる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、臭気もほとんどなく、レジオネラ属菌の不

検出が維持可能となった¹⁾。

モノクロラミンは、pH の酸性条件下で臭気のあるジクロラミンへ変化する可能性が心配されたことから、これまでのところアルカリ性や中性の泉質に適用され、酸性での適用事例がなかった^{2, 3)}。pH7.5~9.0 程度が最適とされ、pH 値 5 未満でモノクロラミンからジクロラミンへの変換が報告されている^{4, 9)}。

一方の遊離塩素消毒は pH5 程度の弱酸性、例えば人工炭酸泉に用いられており、同じ塩素系の消毒方法であるモノクロラミンは、同程度の弱酸性の範囲であれば適用できる可能性がある。

近年の浴場施設は、複数の浴槽を設置して、複数の泉質を用意することがある。例えば一方は弱アルカリ性の単純泉、もう一方は弱酸性の炭酸泉を用意し、それぞれの消毒方法としてモノクロラミン消毒と遊離塩素消毒を同一施設内で併用することがありえる。もし併用すると、混入によりジクロラミンやトリクロラミンによる臭気が発生する恐れがあり、そのような事態は避けたいところである。従来は酸性側へのモノクロラミン消毒を意図していなかったが、酸性でも適用できるのであれば、消毒方法の混在を避けて、消毒方法を統一できるかもしれない。そこで当該研究ではモノクロラミン消毒の酸性側への適用拡大を企図した。

酸性側の泉質の例として、人工炭酸泉に着目した。昨今の入浴施設では、人工的に炭酸泉を作り出す人工炭酸泉製造装置の導入が進んでおり、1つの施設内にアルカリ性の泉質との併存が十分にありえる。炭酸泉は炭酸ガス（二酸化炭素）が溶け込んだ泉質で、入浴することで体表から吸収された炭酸ガスが毛細血管を拡張させ血行を促進し、疲労回復を促すと報告される⁵⁾。人気が高く、pH は 5 程度の弱酸性になる。

B. 研究方法

1 試験管内における pH3~8 に調整した緩衝液中でのモノクロラミンの安定性の比較

次亜塩素酸ナトリウムと硫酸アンモニウム水溶液を水道水と混合し、2,500 mg/L のモノクロラ

ミン水溶液を調製した。次に、りん酸-クエン酸緩衝液にて pH を調整した pH3~8 の各 pH 液に、3 mg/L 相当になるように上記モノクロラミンを添加し、緩やかに攪拌した。室温下で、添加後 1 分、5 分および 10 分後に、DPD-硫酸アンモニウム鉄 (II) 滴定法⁶⁾ で滴定し、遊離塩素、モノクロラミン、ジクロラミン、トリクロラミンの塩素濃度を測定した。

2 人工炭酸泉の原水における添加モノクロラミンの濃度安定性試験

協力を得た営業 3 施設の井水について、モノクロラミン濃度の安定性を事前に確認した。100mL の井水にモノクロラミンを 3 mg/L の濃度になるよう添加し、ウォーターバスで 40°C に保温し、一定時間ごとに、モノクロラミン濃度を測定した。

3 弱酸性の人工炭酸泉におけるモノクロラミン消毒の効果検証

営業 3 施設の人工炭酸泉の 4 浴槽で、モノクロラミン濃度を 3 mg/L 以上に維持する消毒実証試験を行なった。人工炭酸泉の原水には、3 施設いずれも井水を循環利用していた。モノクロラミンの生成、注入装置と人工炭酸泉製造装置の設置の概略を図 1 に示した。各施設では、モノクロラミン濃度 10 mg/L、2 時間の循環により、週一回の配管消毒と換水を実施した。

消毒効果の確認用に、浴槽水を換水日前日の夜間に採取した。レジオネラ属菌の定量は、浴槽水 500mL をメンブレンフィルター法により 100 倍濃縮後、GVPC 寒天培地に分離培養し、100mL あたりの CFU (Colony Forming Unit) を算出した。また、従属栄養細菌数 (R2A 寒天培地 (ニッスイ)) や一般細菌数 (標準寒天培地 (栄研化学)) についても常法により定量した。ただし、従属栄養細菌数については浴槽水に近い温度の 37°C で、20 日間培養した。大腸菌群についてはデゾキシコレート培地 (ニッスイ) で常法により定量した。一部の浴槽水は、フローサイトメトリー (FCM) により全菌数を測定した⁷⁾。

浴槽水の全塩素濃度の現場測定には、MD100

残留塩素計 (Lovibond 社) を用いて、DPD 法により測定した。なお、全塩素濃度の値はモノクロラミン濃度の値とほぼ一致することは前報⁸⁾で確認済みである。浴槽水の pH 測定には、コンパクト pH メータ LAQUAtwin<pH-22B> (堀場アドバンスドテクノ) を用いた。

C. 結果

1 試験管内における pH3~8 に調整した緩衝液中でのモノクロラミンの安定性の比較

pH5 から 8 の緩衝液に添加されたモノクロラミンは、いずれも所定の濃度が維持されていた (表 1)。一方、pH3 と 4 では、遊離塩素とジクロラミンに変化して、モノクロラミン濃度が低下した。

2 人工炭酸泉の原水における添加モノクロラミンの濃度安定性試験

2 施設の井水に添加されたモノクロラミンは、添加 6 時間後もほぼ安定して維持されていた (図 2)。なお、結果には示さないが、残りの 1 施設の井水においても、モノクロラミン濃度が安定して維持されていることを事前に確認している。

3 弱酸性の人工炭酸泉におけるモノクロラミン消毒の効果検証

人工炭酸泉を使用した 3 施設、4 浴槽において、モノクロラミンの消毒効果を確認した (表 2)。

A 施設の炭酸風呂浴槽水の pH 値は 5.6 と弱酸性であった。浴槽水の全塩素濃度は、試験期間を通じて 3mg/L 以上と安定して維持されており、レジオネラ属菌、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌群の検出はなかった。

B 施設の炭酸風呂浴槽水の pH 値は 5.1 と弱酸性で、全塩素濃度は 3 mg/L 以上に維持され、レジオネラ属菌、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌群の検出はなかった。

C 施設の炭酸風呂 2 浴槽の浴槽水の pH 値はそれぞれ 5.0 と 5.2 の弱酸性で、全塩素濃度は 3 mg/L 以上に維持され、レジオネラ属菌、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌群の検出はなかった。この 2 浴槽については、フローサイトメトリー

(FCM) により全菌数を測定し、いずれの浴槽水とも閾値 (1,000) 未満と、菌数は低かった。

D. 考察

モノクロラミンを適切に生成し、ジクロラミン等を発生させないためには、次亜塩素酸ナトリウムよりもアンモニアの比率を多くすることが最初に必要となる (図 1)。それに加えて pH も重要で、pH7.5~9.0 程度が最適とされ、酸性ではジクロラミンやトリクロラミンへ変化する可能性が指摘される^{4,9)}。臭気が発生しないことを利点の一つとしてモノクロラミン消毒を使用してきたことから、ジクロラミンやトリクロラミンと言った強い臭気が生じることを回避するために、これまでは酸性の浴槽水に対してモノクロラミン消毒を積極的に応用することがなかった。

ところが、近年の浴場施設では、複数の源泉を利用したり人工的な温泉を作出したりすることで複数の泉質を同時に取り扱い、酸性とアルカリ性の両方の pH が混在することがある。レジオネラ対策の一環としていずれの浴槽水にも常時の消毒を行うが、これまでの流れに従うと、酸性の浴槽水に従来の遊離塩素消毒、アルカリ性の浴槽水にモノクロラミン消毒を選択することになる。ここで 2 つの温泉が混入すると、アンモニアが入ることで遊離塩素消毒が打ち消されたり、遊離塩素が入ることでモノクロラミンがジクロラミンやトリクロラミンに変化する恐れがあった。いずれか一方の消毒方法だけを選択できれば、混入の問題は回避できる。もしアルカリ性の浴槽水を遊離塩素消毒に戻せば、元に戻ってレジオネラ汚染に悩むことになる。では酸性の浴槽水にモノクロラミン消毒を適用できないだろうか？

本研究の結果として、試験管内では pH5 と 6 の酸性条件であっても、モノクロラミン濃度が安定して維持されることを実験的に確認できた (表 1)。文献的には、モノクロラミンからジクロラミンへの変換が、pH 値 5 未満で生じるとの報告⁴⁾があり、我々の成績と一致した。すなわち、pH5 程度の弱酸性までであれば、モノクロラミン消毒の適用が可能と判断できた。

では実際の浴槽でも使用可能だろうか。本研究では、酸性の浴槽として、人工炭酸泉に着目した。これらを使用している施設では、すでにモノクロラミン消毒をアルカリ性の泉質に導入しており、消毒方法の統一による恩恵があり、協力を得られやすい背景があった。

3 施設の人工炭酸泉の原水はすべて井水であったことから、井水中にモノクロラミン濃度に影響する成分がないことを最初に確認した (図 2)。そして人工炭酸泉に適用し、塩素濃度に問題がなく、微生物が抑えられることを確認した。すなわち、3 施設、4 浴槽の人工炭酸泉の浴槽水のいずれからもレジオネラ属菌は検出されなかった。

モノクロラミン消毒の長期利用時に増加が問題となった従属栄養細菌数¹⁰⁾も、検出されなかった (表 2)。C 施設の 2 浴槽水のフローサイトメトリー (FCM) による全菌数は閾値未満 (表 2CD) であり、適正に消毒されているとの判定であった。遊離塩素消毒は低 pH で消毒効果が高いが、同様にモノクロラミン消毒の酸性条件はアルカリ性や中性よりより消毒効果が高いのかもしれない。これとは別に、人工炭酸泉に溶存している 1,000 mg/L を超える炭酸ガスがレジオネラ属菌の増殖を抑制¹¹⁾した可能性もあり、酸性条件と炭酸ガスの相乗効果も考えられた。

なお、すべての浴槽水で塩素臭等の苦情はなく、塩素濃度は適切に維持され、ジクロラミンやトリクロラミンの発生はなかったと考えられた。

E. 結論

弱酸性 (pH5 程度) の人工炭酸泉 (3 施設 4 浴槽) に、モノクロラミン消毒は適用可能で、従属栄養細菌数の上昇がなかった。

F. 参考文献

- 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への阻害要因を有する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の検証, 温泉科学, **69**, 90-102 (2019)
- 2) 杉山寛治: モノクロラミン消毒による浴槽水の衛生対策, ビルと環境, 148 号, 34-41 (2015)
- 3) 杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 神田 隆, 久保田 明, 縣 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**, 6, 295-300 (2017)
- 4) Feher P. P., Purgel M., Lengyel A., Stirling A. and Fabian I., The mechanism of monochloramine disproportionation under acidic conditions, Dalton Trans., **48**, 16713-16721, 2019
- 5) 西村直記: 高濃度人工炭酸泉浴による疲労回復効果, 日本福祉大学スポーツ科学論集, 第 1 巻, 5-10 (2018)
- 6) JIS 工業用水試験方法 JIS K 0101: 1998. 28.4 DPD-硫酸アンモニウム鉄 (II) 滴定法
- 7) 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: 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, 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 (研究代表者 前川 純子) p.37-68 (2020)
- 8) 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣邦雄, 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**, 109-115 (2010)
- 9) Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, Monochloramine in Drinking-water, https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/chloramine-background.pdf (2021.3.18 現在)
- 10) 長岡宏美, 泉山信司, 八木田健司, 杉山寛治, 小坂浩司, 壁谷美加, 土屋祐司, 市村祐二,

青木信和：社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について，厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28 年度分担研究報告書研究代表者（前川 純子） p.13-22 (2017)

なし

- 11) 住谷敬太，小森正人，木村哲也，斎藤利明，藤田雅弘，塚越博之，黒澤 肇，猿木信裕：浴槽水における溶存炭酸ガスのレジオネラ属菌抑制効果，平成 30 年度第 45 回日本防菌防黴学会年次大会講演要旨集，281（2018）

G.研究発表

誌上発表

1. Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. Journal of Hot Spring Sciences, 2020, 70, 50-60.
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におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策. 温泉科学, 69, 192-201 (2020)
3. 大河内由美子，泉山信司，前川純子，紙上ミニシンポジウム I～水の衛生管理～3.貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況，日本防菌防黴学会誌，2020，48(8)，377-382

口頭発表

1. 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ル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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

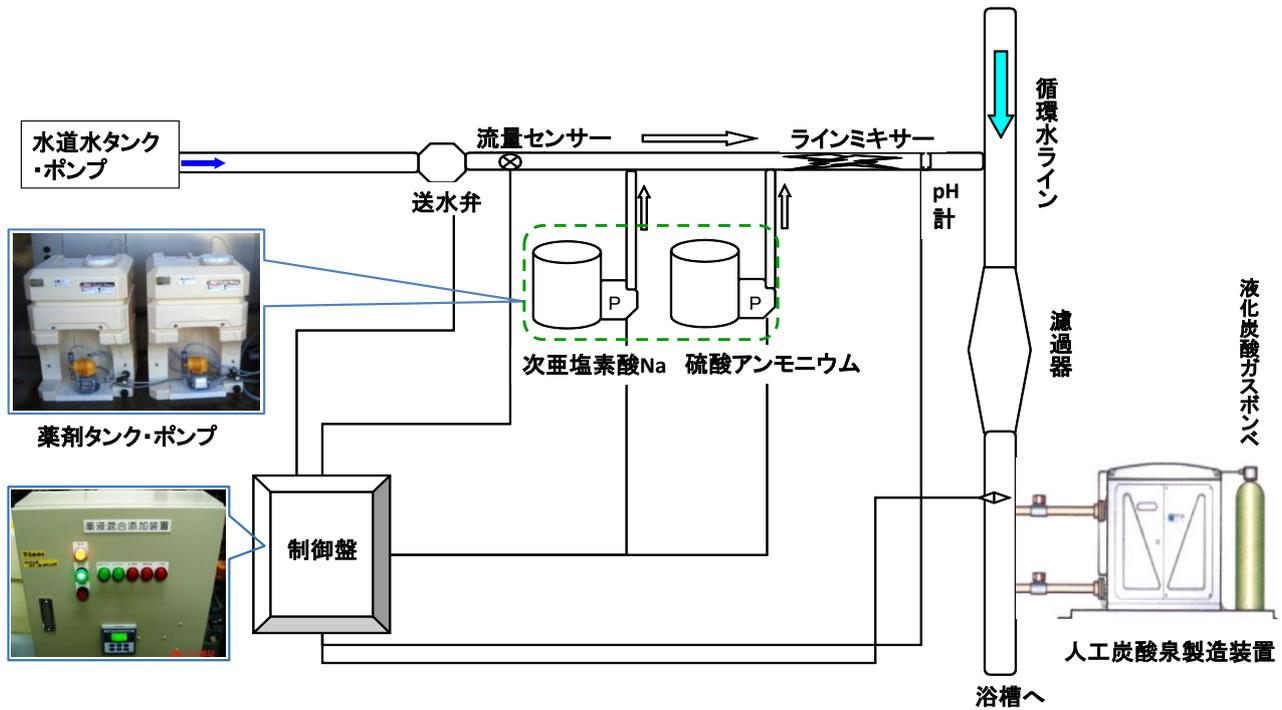


図1 モノクロラミンの生成と人工炭酸泉製造装置の位置関係

pH が中性の水道水または井水に、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) と硫酸アンモニウム ((NH₄)₂SO₄) を適正な比率で混合することで、モノクロラミンを生成した (2NaClO + (NH₄)₂SO₄ → 2NH₂Cl + Na₂SO₄ + 2H₂O)。モノクロラミンが循環系統の途中で添加されて十分に希釈された後、液化炭酸ガスの注入により人工炭酸泉を製造した。

表1 pH を3 から8 に調整した緩衝液中での、モノクロラミンの安定性を比較

添加 1分	塩素形態	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
	全塩素	(96.4)*	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	遊離塩素	14.3	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	モノクロラミン	78.6	92.8	100.0	100.0	100.0	100.0
	ジクロラミン	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0
添加 5分	塩素形態	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
	全塩素	(96.4)*	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	遊離塩素	25.0	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	モノクロラミン	67.9	92.8	100.0	100.0	100.0	100.0
	ジクロラミン	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0
添加 10分	塩素形態	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
	全塩素	(92.8)*	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	遊離塩素	17.8	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	モノクロラミン	67.9	92.8	100.0	100.0	100.0	100.0
	ジクロラミン	7.1	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0

*各 pH の緩衝液にモノクロラミンを 3mg/L の濃度で添加し、添加 1 分後、5 分後、10 分後の各塩素濃度を測定した。表内の数値は、全塩素濃度を 100%とした際の各塩素形態の比率(%)を表す。()内の全塩素測定は、滴定の終点が不明のため、遊離塩素濃度とモノクロラミン、ジクロラミンの合計として求めた。

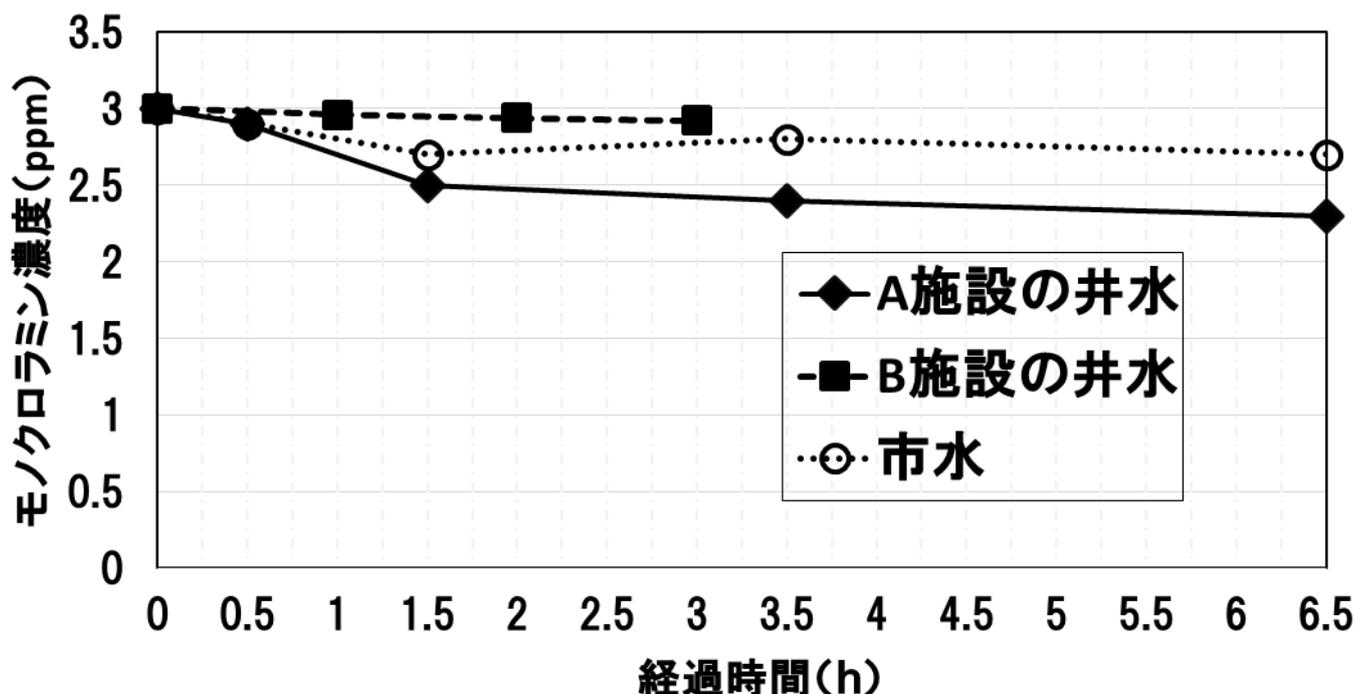


図2 人工炭酸泉の原水(井水)におけるモノクロラミン濃度の推移

本試験により、人工炭酸泉に用いる井水中に、モノクロラミン濃度を低減させる成分がないことを事前に確認した。

表2 炭酸風呂(3施設、計4浴槽水)におけるモノクロラミン消毒の効果

A施設の炭酸風呂

検査項目	モノクロラミン消毒期間		
	1週目	3週目	13週目
レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	<10	<10	<10
一般細菌数 (CFU/mL)	<1	<1	<1
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	<1	<1	<1
大腸菌群 (CFU/mL)	<1	<1	<1
全塩素濃度 (ppm)	4.2	4.1	3.8

浴槽水のpH値: 5.6

B施設の炭酸風呂

検査項目	モノクロラミン消毒期間	
	11ヵ月後	14ヵ月後
レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	<10	<10
一般細菌数 (CFU/mL)	<1	<1
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	<1	<1
大腸菌群 (CFU/mL)	NT	<1
全塩素濃度 (ppm)	4.1	4.9

浴槽水のpH値: 5.1、NT: 検査せず

C施設の男子炭酸風呂

検査項目	モノクロラミン消毒期間	
	15ヵ月後	19ヵ月後
レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	<10	<10
一般細菌数 (CFU/mL)	<1	<1
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	<1	<1
大腸菌群 (CFU/mL)	NT	<1
FCM値 (counts/mL)	333	NT
全塩素濃度 (ppm)	4.8	3.5

浴槽水のpH値: 5.0、NT: 検査せず

C施設の女子炭酸風呂

検査項目	モノクロラミン消毒期間	
	15ヵ月後	19ヵ月後
レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	<10	<10
一般細菌数 (CFU/mL)	<1	<1
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	<1	<1
大腸菌群 (CFU/mL)	NT	<1
FCM値 (counts/mL)	95	NT
全塩素濃度 (ppm)	4.3	3.2

浴槽水のpH値: 5.2、NT: 検査せず

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2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

フローサイトメトリーによるモノクロラミンの消毒効果判定方法の開発

研究分担者： 田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター
研究分担者： 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 貴広 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： 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 営業部
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： 井原 基 長崎県環境保健研究センター
研究協力者： 中尾 元 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

フローサイトメトリー (FCM) によるモノクロラミン (Mch) の消毒効果判定方法を作成し、その有効性を調査した。予め、モデル実験により温浴水槽 (42°C, 24 L) で 10^4 CFU/mL の大腸菌を Mch で完全に消毒する条件 (14~26 mg/L Mch で 22~30 時間) を明らかにして、同条件で得られる FCM 測定散布図の特異領域を設定した。遊離塩素の消毒効果と同様に本方法を Mch 消毒の迅速評価法 (Rapid Detection Method, RDM 法) と位置づけて、本測定領域において一定濃度以下 (1000 cells/mL) を満たす場合を「清浄」と判定し、逸脱した場合を「細菌増殖」と判定した。現地調査では、循環ろ過式である2か所の Mch 消毒施設から、計 28 サンプルの浴槽水を採取して、RDM 法とレジオネラ培養法で結果を比較した。レジオネラ属菌数は、培養法以外に、レジオネラ遺伝子量、FCM によるレジオネラニューモフィラ(LP)定量およびレジオラートによる LP 定量を行い、結果を比較した。RDM 法により「清浄」と判定された 19 浴槽からは培養法においてレジオネラ属菌は検出されなかった。また、従属栄養細菌も検出されず、痕跡程度のレジオネラ属死菌遺伝子と LP 細胞が残存していた。同じく「細菌増殖」と判定された 9 浴槽からは培養法でレジオネラ属菌は検出されず、一定量のレジオネラ属死菌遺伝子と LP 細胞の検出にすぎなかったが、BCYE α 培地表面に中程度~大量の細菌が確認された。レジオラートは測定した全ての検体から不検出であった。検出された菌は *Mycolicibacterium phlei* と同定され、栄養源としてアンモニアを要求する硝化細菌であることから、モノクロラミン消毒に影響を与えている可能性が示唆された。RDM 法は、Mch 消毒の衛生管理という観点から、同消毒方法の効果判定に有効であることが示された。

A. 研究目的

建築物等の配管により供給される水環境では、レジオネラニューモフィラ (LP) を含む日和見病原体が様々な水関連微生物と共存しながら、生物膜内で再生と生存を繰り返している¹⁾。循環式浴槽水もその一つと考えられ、入浴施設におけるレジオネラ汚染は温泉文化で知られる我国では社会問題となっている。

公衆浴場等におけるレジオネラ制御には安価で即効性の高い遊離塩素消毒が推奨されているが²⁾、最近、様々な条件により消毒効果が減じる遊離塩素の代替消毒剤としてモノクロラミン (Mch) が提案され³⁾、各地で有効事例が報告されている⁴⁻⁶⁾。アイルランドでは Mch 消毒は上水の 2 次消毒剤として適用されており、生物膜への有効性や残留性の高さなどが知られている⁷⁾。

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 法) を独自に開発してきた⁸⁻¹⁰⁾。本方法は、配管系統内で再発を繰り返すレジオネラリスクの迅速評価方法として開発され、遊離塩素の消毒効果を迅速に判定すること (約 5 分間) ができる。ここで、我々は遊離塩素により浴槽水が十分に消毒された細菌の状態がフローサイトメトリー (FCM) で作られる散布図内で一様な像として検出されることに着目し、この状態を満たすか満たさないかで「清浄」か「細菌増殖」かを判定する技術を開発した⁸⁾。驚くべきことに、遊離塩素消毒の場合、RDM 法の判定結果はレジオネラ培養検査の定性結果と同等であり、このことがモデル実験や施設調査で実証された⁸⁾。さらに、我々は、遊離塩素消毒の場合、清浄状態を満たすのは塩素消毒が不連続点を越えた時で、逸脱するのは細菌増殖が一定の閾値 (細胞数として 3000 cells/mL、測定装置は前方散乱光と核酸蛍光を指標とするフローサイトメーター) を越えた時であることを確認した⁹⁾。

上述の RDM 法は、浴槽水中の細菌が遊離塩素により破砕される状態を基準として水中の細菌増殖の動向を監視することによりレジオネラリ

スクを探知することを基本原理としている⁸⁾。本来、遊離塩素も Mch も殺菌機序は酸化反応による細胞膜の穿孔によるものと考えられている¹¹⁾。このために、遊離塩素よりも消毒強度が低いとはいえ、FCM により Mch 消毒時の特異領域を設定できる可能性はある。

筆者らはこれまでに十分に清浄度が保たれた Mch 消毒時の浴槽水に RDM 法を応用した場合、FCM により測定された散布図が遊離塩素消毒を施した浴槽水の場合と全く異なる特徴的な細胞像が認められることを経験している (模式図 1, データ未発表)。遊離塩素とモノクロラミンの消毒力の違いと作用機序を考慮すると^{7,11)}、模式図 2 のような消毒剤の酸化力と FCM の散布図との相互関係が推察されるが、これまでに証拠となる十分な知見は得られていない。

今回、RDM 法を Mch 消毒により管理している入浴施設の消毒効果判定に適用したのでその結果を報告する。

B. 研究方法

1. Mch 消毒を満たす FCM 特異領域の設定

1) 供試菌株

消毒効果判定のための FCM 特異領域の設定には、当所で分離保管している enterohemorrhagic *Escherichia coli* NIPH 0001 株 (O157H7) を用いた。後述のとおり、これは本菌株が本研究の FCM 測定系が確認されており、定量性を容易に検証できることによる。*E. coli* は、まず、-80°C 保存株を TSA 培地に接種後、30°C で 24 時間培養した。この試料を PBS に懸濁して、グルタルアルデヒドとアジ化ナトリウムをそれぞれ終濃度 0.05% と 0.1% になるように調整したのち、36°C で 3 時間培養して固定した後、モデル実験に供した。ここで、培養法によりこれらの固定済細胞が不活化されていることを確認した。

2) Mch の調製方法

Mch は杉山らの方法³⁾により随時作製した。即ち、予め 6% 次亜塩素酸ナトリウム (オーヤラッ

クス社) 1.08 mL を 12 mL 滅菌蒸留水に加えて希釈したものに、10%塩化アンモニウム (富士フィルムワコーケミカル社) 1.35 mL を一気に加えてよく攪拌した溶液の全量を、後述のモデル浴槽 24 L 水道水に加えた (終濃度 3.0 mg/L as NH₂CL)。5 倍濃度 Mch を調製する場合には、それぞれの試薬を同じ要領で 5 倍量混合して水槽に加えた。

3) FCM による細菌数と大腸菌数の測定

FCM は田栗らの方法¹⁰⁾に準拠して、miniPOC (シスメックスパルテック社) を使用して測定した。即ち、試料 1mL と 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) を含む希釈液 1 mL を混合し、0.1% propidium iodide (PI) を 10 μL 加えたのち、5 分間静置させ、miniPOC により予め設定した特異領域中の細胞を計測した数値を細菌数 (Total Bacterial Counts, TBC) とした。

大腸菌数は、市販の抗大腸菌抗体 (V1001, Virostat) を Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) により標識して抗大腸菌染色試薬 FL EC を作製して定量した。本試薬は抗体約 2 mg/mL を含む。試料 1 mL に等量の 0.1%BSA 加 PBS を加えて、染色試薬 FL EC 1.5 μL を加えて、30 分間回転振盪させたのち、2 mL ディスポシリンジで約 0.8 mL を採取し、miniPOC に装着して測定した。測定は試料ごとに 3 回繰り返して実施した。

なお、本機器は側方散乱光 (縦) と蛍光 (横) を両軸とする散布図を基に計測する。

4) モデル実験

モデル浴槽を用いた実験では、24 L の水道水を入れた水槽にバケツヒーターを挿入して 42~45°C に加温し、循環させた。前述のとおり、Mch 水を調製し、随時全塩素濃度用 DPD (N, N-diethyl-p-phenylene diamine) 試薬 (Hach 社) を用いて、通常の管理濃度 3~4 mg/L を目標として 5 日間実験を続けた。しかし、FCM の散布図に「清浄」を維持していると考えられる施設の浴槽水に見られた特徴的な細胞像 (模式図 1.4) が認めら

れなかったために、Mch 濃度を約 5 倍量の 14.6~29.6 mg/L にして同様に実験した。

5) 特異領域の設定

遊離塩素消毒の場合、細菌類の細胞 (模式図 1.1) は、FCM の測定領域から徐々に移動し、十分に消毒された後には縦軸と並行して形成されるノイズ部分と重なって測定領域から完全に消失する (模式図 1.2)⁸⁾。これは、塩素の酸化作用により細胞膜が穿孔され内部の核酸が破壊されて起こる現象と考えられる。Mch の場合も同様な現象が起こるのであれば、特定領域を設定できるはずである。模式図 1.3-4 は、我々がこれまでの研究で認識している、良好なモノクロラミン消毒管理下の循環式温泉施設浴槽水をフローサイトメトリーで測定したときの散布図である (データ未公表)。細菌群は遊離塩素 (模式図 1.2) と異なりノイズ粒子群と重ならず特徴的な像を示している。この時、遊離塩素の測定領域 (エリア A) を適用すると不適切な細胞群を測定するために (模式図 1.3)、この細胞群を含まない特異領域を測定領域として設定した (エリア B)。当時のフローサイトメーターは前方散乱光を用いており、側方散乱光を用いる本研究の miniPOC とは測定環境が異なるが、基本原理に矛盾はなく再現できる可能性は高い。本研究では、モデル実験により Mch 特有の像を再現し、模式図 1-4 に倣って miniPOC 使用時のエリア B を設定することを試みた。

2. 営業施設の調査

1) 対象施設

Mch 消毒を採用している 2 施設 28 浴槽水を調査した。A 施設は地下水 (pH6.7) 利用で 7 検体を採取した。B 施設では塩化物泉 (pH7.0~7.4) 19 検体と炭酸泉 (pH5.5) 2 検体を調べた。ともに循環ろ過式で全自動注入により Mch 消毒を実施していた。採取時に試料の全塩素濃度を DPD 試薬 (Hach 社) により求めた。全てのサンプルは 2.5% チオ硫酸ナトリウム 2mL 入りの 1000 mL 滅菌ポ

リ瓶 (終濃度 50 mg/L) により採取して、冷蔵状態で長崎県まで輸送したものを搬入後 1 週間以内に検査に供した。

2) 検査項目

2)-1 FCM による消毒効果判定

モデル実験と同様に試料 1mL と 0.1% MTAB を含む希釈液 1 mL とを混合し、PI を 10 μ L 加えたのち、5 分間静置させ、miniPOC により TBC を測定した。この時の測定エリアは B.1.5) で設定した特異領域に基づいている。消毒効果を判定する場合には、田栗らの方法¹⁰⁾に準拠して、TBC が 1000 cells/mL 未満であった場合に「清浄」、1000 cells/mL 以上であった場合に「細菌増殖」と判定した。

2)-2 FCM による LP 数の計測

FCM に用いる各種免疫蛍光染色試薬と LP 定量は、田栗らの方法¹⁰⁾に準拠した。即ち、蛍光抗体試薬は、市販の抗 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、Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) により抗体を標識して作製した。これらを等量混合して、FL LP mix として使用した。本試薬は各抗体約 1 mg/mL を含む。

施設調査において、検水 500 mL を吸引ろ過した後の孔径 0.2 μ m ポリカーボネート製フィルターを 55 mm シャーレに貼付けた。これに 0.6 mL PBS と等量の 0.1%BSA 加 PBS を加えて、10 回以上フィルター表面をピペッティングで洗い出したのち、洗浄液 1 mL を回収した。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 回目の回収液とした。各回収液に染色試薬 FL LP mix 1.5 μ L を加えて、30 分間回転振盪させたのち、2 mL ディスポシリンジで約 0.8 mL を採取し、miniPOC に装着して測定した。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 数とした。

3) レジオネラ属菌培養方法

レジオネラ属菌培養検査はレジオネラワーキンググループの方法¹²⁾に準拠した。即ち、検水 500 mL を吸引ろ過した後の孔径 0.2 μ m ポリカーボネート製フィルターを 5 mL 滅菌蒸留水で懸濁し、50°C、20 分の熱処理と 4 分の酸処理 (0.2M HCl・KCl 液 pH2.2 \pm 0.2 との等量混合) を行った後に、BCYE α 培地と GVPC α 培地に接種して 36 \pm 1°C 培養した。7 日まで培養して L-システイン要求性を示した菌をレジオネラ属菌とした。

4) リアルタイム PCR (生死判別含む)

リアルタイム PCR は、金谷らの方法¹³⁾に準拠して実施した。即ち、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 (タカラバイオ社) の取扱説明書に従って検水を吸引して 1,000 倍濃縮液を作製した。この 40 μ L を Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ社) を用いて DNA 抽出し、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ社) により得られたものをレジオネラ属菌の全 DNA 量とした。別の 40 μ L 濃縮液を予めエチジウムモノアザイド処理して DNA 抽出し、上記と同様に処理してレジオネラ属菌の生菌 DNA 量とした。死菌 DNA 量は、全 DNA 量から生菌 DNA 量を差し引いて求めた。

5) レジオラート培養法

施設調査で得られた浴槽水のうち 18 検体分について、レジオラート (Idexx 社) 法による培養を行った。淀谷らの方法¹⁴⁾に準拠して、滅菌水 90 mL にレジオラートに付属する粉末培地を加えよく溶かした後、浴槽水 10 mL を加えた。十分に混和した後、専用の Quanti-Tray/legiolert に封入し、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。

C. 結果及び考察

1. Mch 消毒を満たす特異領域の設定

1) モデル実験結果

図 1. A に実用濃度の Mch で消毒した場合の核酸染色 (PI) と蛍光染色 (FL) で求めた大腸菌数の推移を示した。検査開始から第 5 実験日までの 5 日間、Mch 濃度として 3~5 mg/L を目標として Mch 濃度を維持させたところ、平均±標準偏差は 4.06 ± 3.18 mg/L であったが、濃度の変動が激しく、夕方 5 時に 7 mg/L を示していたものが翌朝には 0.09 mg/L まで激減するなど、濃度の維持が非常に困難であった (図 1. A)。これは水温により Mch の自壊作用が促進されることによるものと推察された。試料の pH は 7.8 程度を維持していた。大腸菌は Mch 濃度が安定した第 1 日目夕刻に投与した。添加当初の菌数は若干減数したものの、PI 染色および FL 染色共に 5 日間経っても菌数に大きな変化は認められなかった。

図 1. B に高濃度 Mch で消毒した場合の大腸菌数の推移を示した。検査開始からの 3 日間、30 mg/L を目標として Mch を追加したところ、 21.54 ± 7.19 mg/L と Mch 濃度は比較的安定して、減少しても 10 mg/L 以上の状態を維持させることができた。この時にモノクロラミン消毒特有の像 (模式図 1. 4) が認められたため、エリア B (図 2-A. 2) を設定し、その後の測定に適用した。

大腸菌数は FL 染色が PI 染色よりも 5.4~75.7 倍高い値が認められた。また、異なる推移を示し、PI 染色では初期菌数 4.12×10^3 cells/mL から 5 時間後に 8.16×10^3 cells/mL に増加したが、22 時間後には初期濃度の 587 cells/mL まで減少し、最終的に 32~48 cells/mL となった。FL 染色では初期菌数 5.43×10^4 cells/mL から 5 時間後に 7.11×10^4 cells/mL に増加したが、22 時間後までは 4.45×10^4 cells/mL に減少し、2 日目に 1.89×10^3 cells/mL まで低下した後は同程度の濃度が最後まで維持された。

PI 染色が FL 染色よりも低い値を示したことは、前述のとおり、エリア B を設定したことにより (図 2) 計測値が減少しているためと考えられた。

一方で、PI 染色は 22 時間後に、FL 染色は 2 日目以降に減少が認められたことから両染色法共に Mch による酸化作用の影響を受けていると考えられた。酸化による細胞穿孔ののちに最初に核酸が影響を受け、次に表面抗原蛋白が影響を受けている可能性もある。FL 染色において最終的な測定値の到達点が FCM の検出限界 1000 cells/mL を超えていたことは、Mch による表面抗原蛋白の分解も核酸の分解と同様にある一定の閾値で停止するのかもしれない。

2. 営業施設の調査

A 施設から得られた No. 1~No. 7 の全塩素濃度の平均±標準偏差は 4.5 ± 0.6 mg/L を示した。B 施設から得られた炭酸泉 2 検体 (No.9, 15) は 4.8 mg/L および 4.3 mg/L を示し、塩化物泉 19 検体 (No.8, 10~14, 16~28) の全塩素濃度の平均±標準偏差は 4.5 ± 0.8 mg/L を示した。

表 1 (A) に泉質ごとの各種検査法成績を示した。レジオネラ属菌は、培養検査と生菌定量 PCR において全ての検体で検出限界以下 (10 colony forming units or copies/100 mL) であり、レジオラートでも検査に供した 18 検体は全て検出限界以下 (1 most probable numbers/10 mL) であった。RDM 法で計測した *L. pneumophila* の数は 192.4 ± 167.8 cells/100mL であり、死菌 DNA 量は $2,261.5 \pm 2,292.8$ copies/100 mL であった。これらのことから Mch 処理を実施した浴槽水中に生菌レジオネラは存在せず、Mch 消毒のレジオネラ属菌に対する有効性が改めて確認された。塩化物泉で細菌数が多いほかは泉質ごとの差は認められなかった (表 1-A)。

閾値 1000 counts/mL を基準とする RDM 法による消毒効果を判定したところ、清浄と判定された 19 検体は細菌数として 220.5 ± 124.0 counts/mL であったが、細菌増殖と判定した 9 検体は細菌数として $50,816.6 \pm 78,577.0$ counts/mL を示し、有意差が認められた (Mann-Whitney Test: $p < 0.0001$, 表 1-B, 図 3)。同様に RDM 法で測定した LP 数 ($p=0.089$) と死菌レジオネラ DNA 量 ($p=0.052$)

について、判定基準による差は認められなかった。培養法において、レジオネラ属菌数は全て検出限界以下を示したものの、細菌増殖と判定したレジオネラ属菌培地のうち BCYE α 培地からはカビと大量の微小露滴状の細菌が検出された (図 4, 右写真)。これらは Bacterial 16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ) を用いる PCR-ダイレクトシーケンス法により *Mycolicibacterium phlei* と同定された。

建物等の配管において、温水系統を含む場合にはレジオネラ属菌は宿主アメーバとともに容易に検出される反面、その排除は非常に難しく、改善には高額な設備投資等コストに直結してくる事例が報告されている¹⁵⁾。Mch は比較的安価に設備投資ができ、今回の結果で確認されたとおり、培養法等様々な検査法を使用しても生レジオネラ属菌は検出されなかった。加えて、RDM 法や遺伝子検査ですら僅かの死菌としてしか検出されなかったことから、温泉のレジオネラ対策の手段として非常に有力な消毒剤の一つと考えられる。しかしながら、Mch 濃度が十分でありながら発育できる硝化菌が無視できない量検出された。この硝化菌はヒトには無害とされている⁷⁾が、アンモニアの安定性に影響を与えるため Mch 管理の障害となりうると考えられ、その対策は確実に講じられる必要がある。

今回、Mch の適正条件で認められた FCM の特徴的な散布図像は、Mch の比較的低い酸化力を支持する一方で、持続的な酸化力がレジオネラ防除に有効であることを示しているかもしれない。

D. 結論

Mch 消毒により形成される細胞変性像を FCM を用いることで特有な散布図として可視化し、この像が出現する Mch 消毒条件を明らかにすることにより (14~26 mg/L Mch で 22~30 時間)、特徴的な Mch 消毒の RDM 法を設計した。本法により、28 検体の Mch 消毒を施した浴槽水について、レジオネラ属菌培養法、レジオネラ遺伝子量、

FCM による LP 定量およびレジオラートによる LP 定量を行ったところ、レジオネラリスクを疑う結果はなかった。一方、RDM 法により「清浄」と判定された 19 浴槽からは何も菌が検出されなかったが、「細菌増殖」と判定された 9 浴槽からは、中程度~大量の *Mycolicibacterium phlei* が検出された。本菌は Mch の安定性に影響を与えることから、RDM 法は、Mch 消毒においても、消毒効果判定に有効であり、入浴施設の衛生管理に寄与できることが確認された。

E. 参考文献

- 1) Buse, H.Y, Morris, B.J., Struewing, I.T., Szabo, J.G., Chlorine and Monochloramine Disinfection of *Legionella pneumophila* Colonizing Copper and Polyvinyl Chloride Drinking Water Biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e02956-18, 2019.
- 2) 厚生労働省生活衛生局長通知, 公衆浴場における衛生管理要領等について, 生衛発第 1811 号, 2000.
- 3) 杉山寛治ら, 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**, 109-115, 2010.
- 4) 柳本恵太ら, 山梨県内のレジオネラ属菌の消毒が困難な浴用水におけるモノクロラミンの消毒効果, *山梨衛環研年報*, **59**, 55-57, 2015.
- 5) 森 康則ら, 温泉を用いた公衆浴場におけるモノクロラミン消毒の試行とその有効性, *温泉科学*, **70**, 50-60, 2020.
- 6) 田栗利紹ら, モノクロラミン消毒による入浴施設の衛生管理, 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 年度分担研究報告書, 研究代表者: 倉 文明, 47-50, 2011.
- 7) Ireland Environment Protection Agency, Water Treatment Manuals: Disinfections, chloramination, pp62-66, <https://www.epa.ie/pubs/advice/drinkingwater/>

watertreatmentmanualdisinfection.html

Accessed March 19, 2021.

8) Taguri, T, Oda, Y, Sugiyama, K, Nishikawa, T, et.al., A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of *Legionella* in bath water. *J. Microbiol. Methods*, **86**, 25–32, 2011.

9) 田栗利紹ら, フローサイトメトリー法における不連続点を越えた塩素消毒の清浄化判定, 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)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 23 年度分担研究報告書, 研究代表者: 倉 文明, 53–58, 2011.

10) 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.

11) National research council, The disinfection of Drinking Water, In Drinking Water and Health, Volume 2. Washington, DC, The National Academic Press, 1980.

12) 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.

13) 金谷潤一ら, 環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価, 日本防菌防黴学会誌, **48**, 515–522, 2020.

14) 淀谷雄亮ら, 新規酵素基質培地キットであるレジオラートの有効性の検討: 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場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, 22–26, 2019.

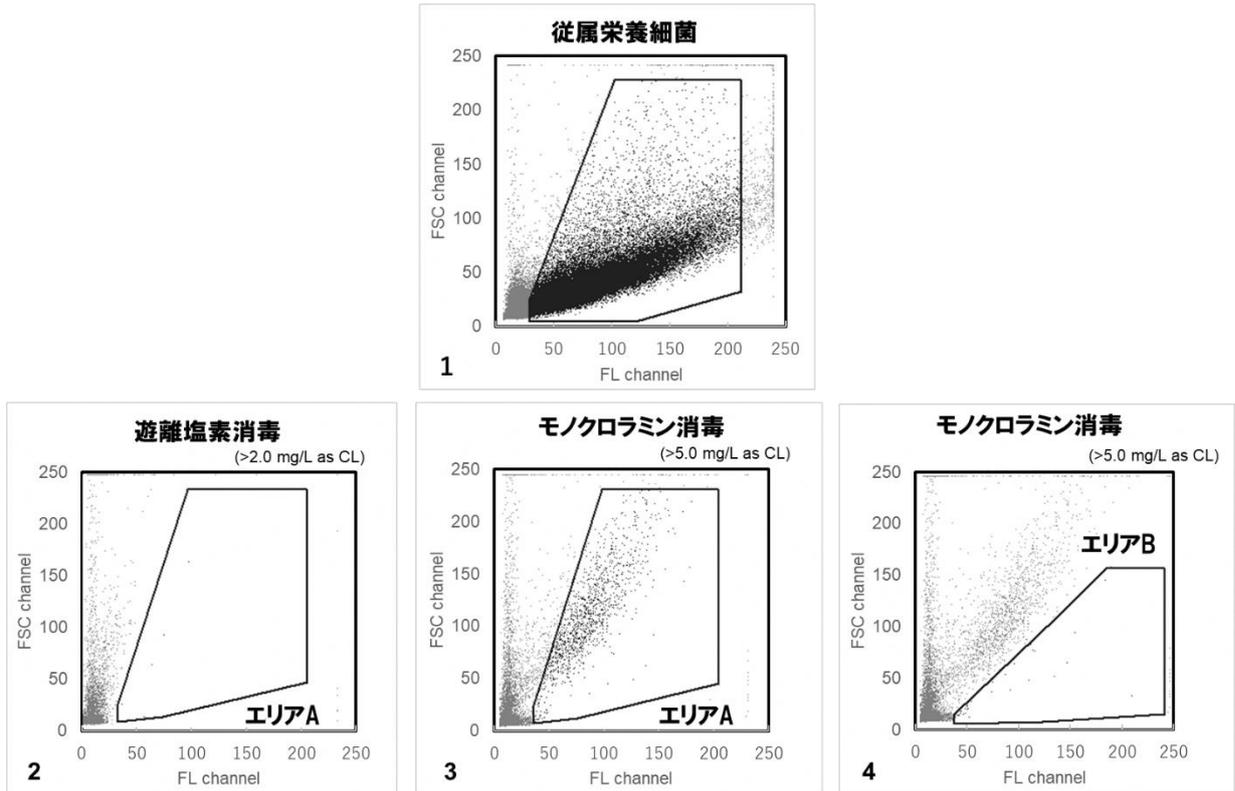
15) Quero, A, Parraga-Nino, N, Garcia-Nunez, M, et.al., The impact of pipeline changes and temperature increase in a hospital historically colonized with *Legionella*. *Sci. Rep.*, **11**, 1916, 2021.

F. 学会発表

なし

G. 知的産権の出願・登録状況

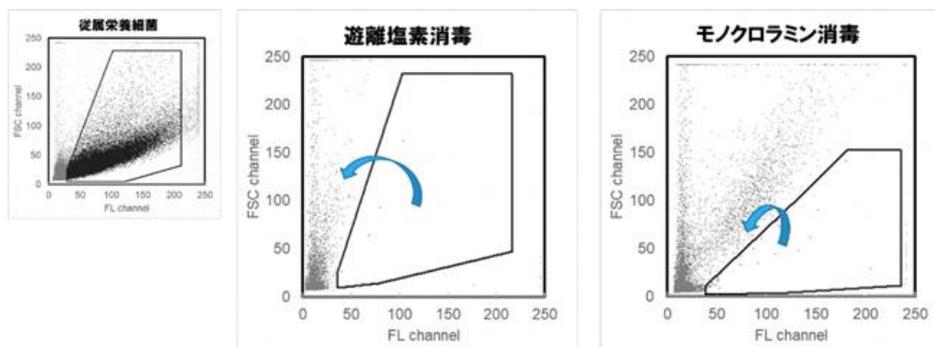
なし



模式図1 遊離塩素とモノクロラミンで消毒した浴槽水の RDM 法による散布図の違い

1: 未消毒時の浴槽水, 2: 遊離塩素消毒時の浴槽水, 3, 4: モノクロラミン消毒時の浴槽水を、前方散乱光と蛍光染色を指標とするフローサイトメーター (Sysmex) で測定した。判定方法等は田栗らの報告⁷⁾に基づく。遊離塩素消毒時のエリア A では、モノクロラミン消毒時には不適切な細菌が計測されるために (3)、特有のエリア B を設定する必要がある (4)。

モノクロラミンによる消毒効果判定



大 酸化力 小

模式図2 フローサイトメトリーを用いた消毒効果判定方法の想像図
前方散乱光と蛍光染色を指標とするフローサイトメーター (Sysmex) による測定散布図

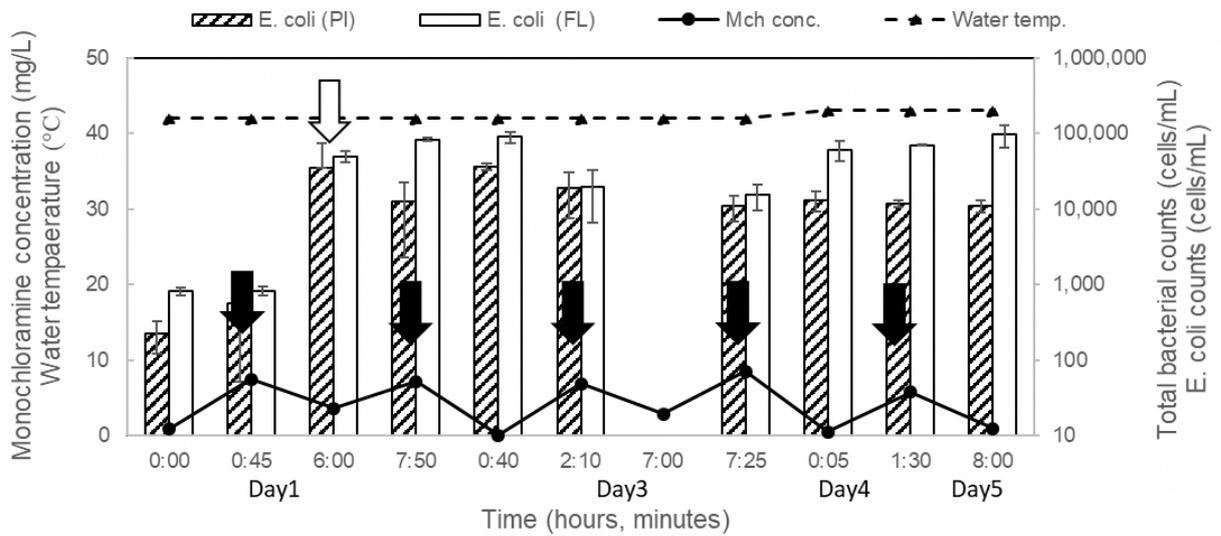


図 1. (A) 実用濃度モノクロラミン消毒による大腸菌数の変動

White and black arrows mean the addition of fixed *E. coli* of 10^4 cells and monochloramine of 5-7 mg/L, respectively, in final concentration. Each value indicates the mean \pm standard deviation.

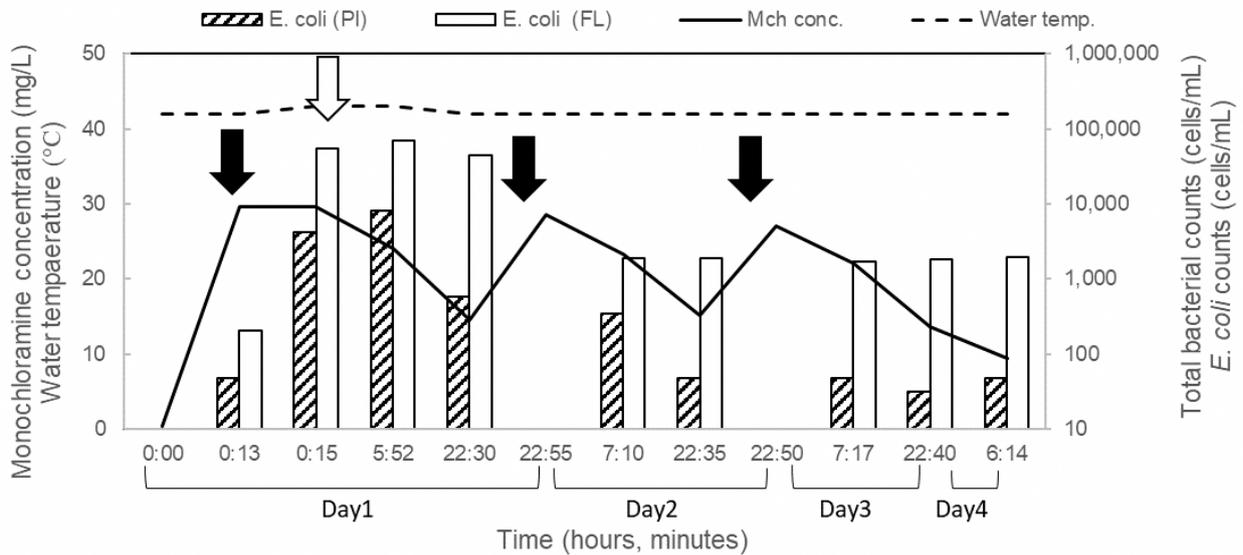


図 1. (B) 高濃度モノクロラミン消毒による大腸菌数の変動

White and black arrows mean the addition of fixed *E. coli* of 10^4 cells/mL and monochloramine of 24-30 mg/L, respectively, in final concentration.

表1-A 泉質ごとの各種レジオネラ属菌検査法成績

	Total bacterial counts (counts/mL)		Legionella by plate counting method (CFU [※] /100 mL)		Legionella pneumophila cells by RDM (cells/100 mL)		Dead Legionella DNA (copies/100 mL)		Live Legionella DNA (copies/100 mL)		Legiolart (MPN [※] /10 mL)	
	Mean	SD [※]	Mean	SD [※]	Mean	SD [※]	Mean	SD [※]	Mean	SD [※]	Mean	SD [※]
Ground water (N=7)	179.1	129.2	<10	-	73.6	29.6	1,397.7	405.1	<10	-	<1	-
Carbonated spring (N=2)	325.4	78.6	<10	-	355.0	392.7	2,576.1	3,428.3	<10	-	<1	-
Salt spring (N=19)	24,191.3	58,460.4	<10	-	219.0	155.6	2,546.6	2,605.9	<10	-	<1 ^{※※}	-
Total (N=28)	16,483.6	49,076.3	-	-	192.4	167.8	2,261.5	2,292.8	-	-	-	-

※SD: standard deviation, CFU: colony forming unit, MPN: most probable number. ※※Legiolart was applied to 9 samples of Salt spring samples.

表1-B 消毒効果判定ごとの各種レジオネラ属菌検査法成績

	Total bacterial counts (counts/mL)		Legionella pneumophila cells by RDM (cells/100 mL)		Dead Legionella DNA (copies/100 mL)		Heterotrophic bacteria
	Mean	SD [※]	Mean	SD [※]	Mean	SD [※]	
Clean (N=19)	220.5	124.0	159.2	146.0	1,622.5	1,252.0	negative
Bacterial growing (N=9)	50,816.6	78,577.0	236.2	197.3	3,610.6	3,346.2	>3.0×10 ⁴ CFU/mL

※SD: standard deviation, CFU: colony forming unit, MPN: most probable number.

(A) モデル実験試水

(B) モノクロミン消毒施設浴槽水

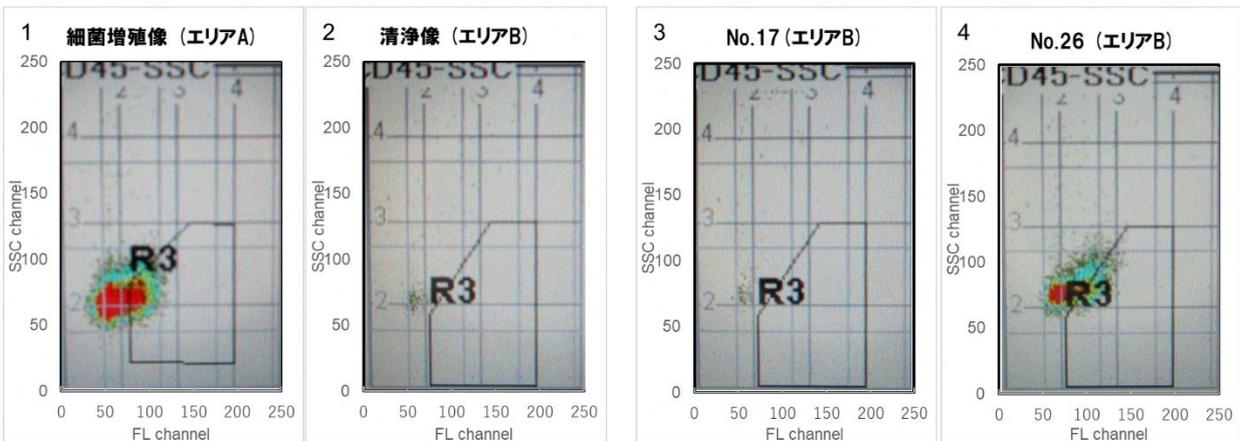


図2 RDM法におけるモノクロミン消毒用特定領域 (エリアB) と実試料 (No.17およびNo.26) の散布図

(A) 1と(A) 2はそれぞれモデル実験における高濃度モノクロミン消毒5時間後と22時間後の散布図, R3は特定エリアの記号.

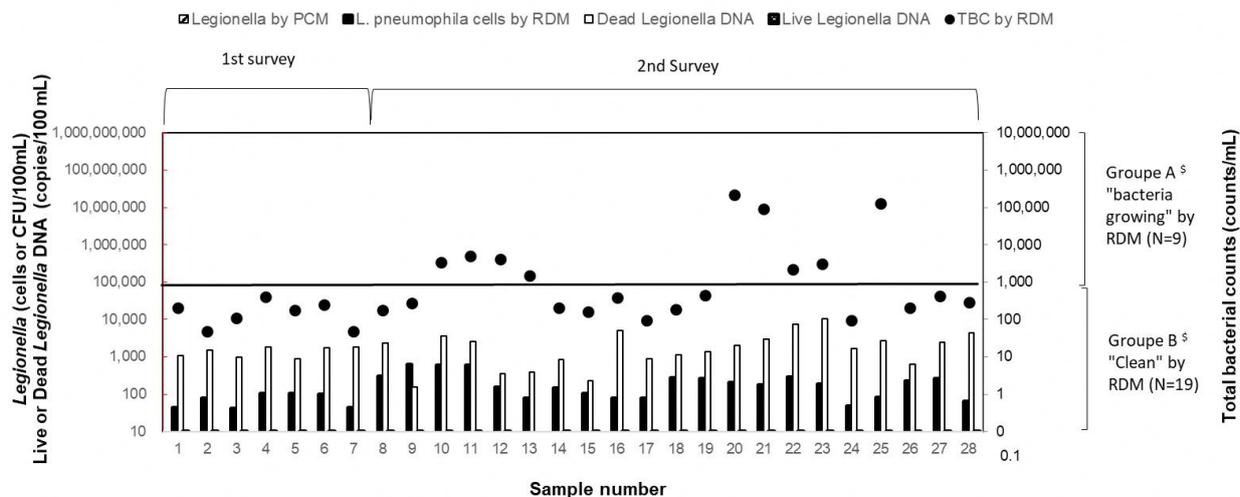


図3. Rapid Detection Method (RDM) による消毒効果判定法に基づくレジオネラ属菌培養法(Plate Counting Method, PCM)、RDM法によるレジオネラニューモフィラ数、生菌及び死菌レジオネラ属菌DNA量の比較。

*Horizontal line shows a threshold that satisfies effective chloramination (1000 counts as TBC/mL) .

** Legionella counts by PCR, RDM and qPCR are evaluated at cut-off level of 10 cells or CFU/100mL. No.1~7: Ground water, No. 10 and 16: carbonated spring, others: Salt spring. *There are significant difference between TBC in Groupe A and TBC in Group B ($p < 0.0001$, Mann-Whitney Test).

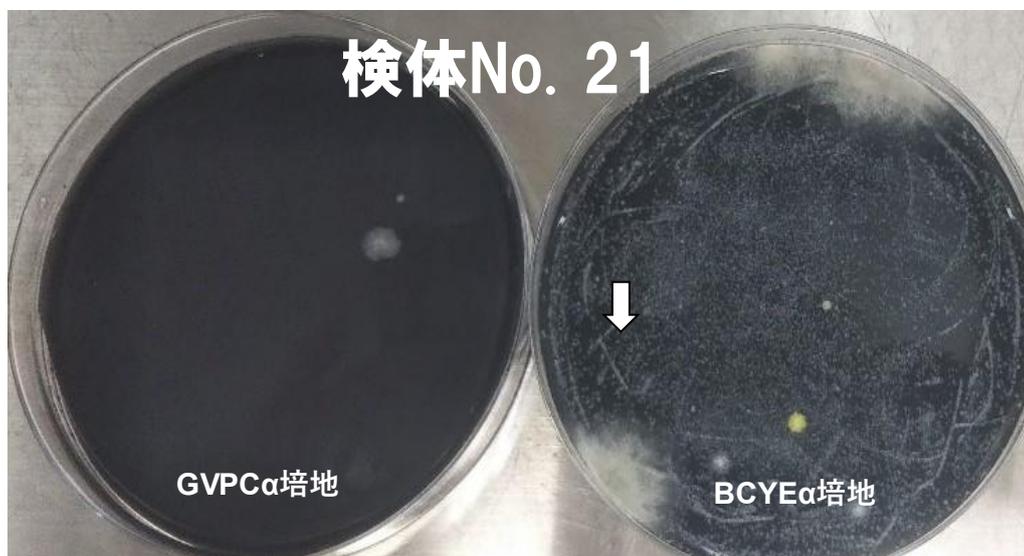


図4. レジオネラ属菌培養培地に生息した従属栄養細菌

Arrow shows many microcolonies which was identified *Mycolicibacterium phlei*. 0.1 mL of sample No.21 was applied BCYE α medium.

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2年度研究報告書

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

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	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	井原基	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。本検討では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 171 検体を対象として検討したところ、平板培養法と比較したレジオラート/QT法の感度は 61.7%、特異度 95.5%であり、結果一致率は 83.6%であった。35 検体中 33 検体でレジオラート陽性のウェルから平板培養法と同一の血清型の *L. pneumophila* が検出され、*L. pneumophila* 選択的に検出できたが、1 検体で *L. dumoffii* が検出された。レジオラート/QT法及び平板培養法ともに陽性であった 37 検体について検出菌量を比較したところ、回帰直線の R^2 は 0.397 となり、弱い相関が認められた。レジオラート/QT法で偽陽性を示す検体から原因となる菌種を同定することができた。偽陽性を示した *Aeromonas hydrophila* は液体培地の変色が比較的早期に認められることから、偽陽性を見分けることができる可能性が示された。レジオラート/QT法は *L. pneumophila* を選択的に検出できる検査法であり、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。

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、欧米等の諸外国で水質管理に使用されているレジオラート/QT法は、専用の粉末培地である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。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。平成 31 年度からレジオラート/QT 法の感度・特異度及び定量性を確認するため、従来法である平板培養法と比較検討してきた。本研究では、引続き実検体を使用した平板培養法との比較検討を実施するとともに、レジオラート/QT 法における偽陽性を引き起こす菌種の特特定を行った。

B. 研究方法

(1) 対象

4 カ所の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、冷却塔水等計 171 検体を対象とした。

(2) 方法

今回検討したレジオラート/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。

レジオラート/QT 法で陽性と判定されたものの、ウェルの液体培地からレジオネラ属菌が検出できなかった検体について、GVPC α 寒天培地で発育したコロニーから遺伝子を抽出し、16S rDNA により菌種を同定した。また、同定した菌についてレジオラート/QT 法で陽性を示すか確認するため、単離菌を滅菌水 100 mL に加え、レジオラートを混和した後、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、茶色または濁りが生じるか確認した。

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「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）」に準じた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。レジオネラ属菌が 10 CFU/100 mL 以上検出されたものを陽性とした。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。

レジオラート/QT 法及び平板培養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。

偽陽性菌株におけるレジオラート/QT 法の反応性について、本検討で検出された *Aeromonas hydrophila* 菌株 A 及び環境から分離された *A. hydrophila* 菌株 B の 2 種を用いてレジオラート/QT 法が陽性になる菌

量を検討した。各菌株を $10^5 \sim 10^1$ CFU/ml に希釈し、各 10ml ずつレジオラートに添加し、39°C で 7 日間培養した後、陽性となったセル数をカウントした。

C. 結果

温泉水、浴槽水、プール採暖槽水、冷却塔水等計 171 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、両方法で陽性となったものが 37 検体、両方法で陰性となったものは 106 検体であった (表 1)。平板培養法と比較したレジオラート/QT 法の感度は 61.7 %、特異度 95.5 % であり、結果一致率は 83.6 % であった。検出菌量はレジオラート/QT 法で 0-5223 MPN/100mL、培養法では 0-1100 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 法陽性で平板培養法陰性が 5 検体、レジオラート/QT 法陰性で平板培養法陽性が 23 検体であった。レジオラート/QT 法のみ陽性であった検体の検出菌量は 11-94 MPN/100mL、平板培養法のみ陽性であった検体の検出菌量は 10-280 CFU/100mL であった。

レジオラート/QT 法と平板培養法ともに陽性であった 37 検体のうち 35 検体について、ウェルの液体培地からレジオネラ属菌の検出を試みたところ、34 検体で平板培養法と同じ血清型のレジオネラ属菌が分離された。33 検体は *L. pneumophila* であったが、1 検体は *L. dumoffii* であった。1 検体については交雑菌が多くレジオネラ属菌が分離できなかったため、平板培地上で発育が見られたコロニーから遺伝子抽出し、16S rDNA の塩基配列により菌種を同定したところ、*Ochrobactrum* sp. であった。単離した

菌株を滅菌水に懸濁し、レジオラート/QT 法を実施したところ、濁りを生じ、陽性反応が見られた。

平板培養法で *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が検出された検体は 13 検体あり、このうち、12 検体が *L. pneumophila* も同時に検出された (表 2)。この 12 検体についてレジオラート/QT 法は全て陽性であり、平板培養法で検出された *L. pneumophila* が検出された。1 検体は平板培養法で *L. nautarum* が検出され、レジオラート/QT 法は陰性であった。

レジオラート/QT 法のみ陽性であった 5 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、1 検体で *L. pneumophila* SG3 が検出されたが、4 検体はレジオネラ属菌が検出されなかった (表 3)。培地上で発育が見られたコロニーから遺伝子抽出し、16S rDNA の塩基配列により同定したところ、それぞれ *Brevundimonas naejangsanensis*、*Pseudomonas otitidis*、*Pseudomonas* sp.、*Aeromonas hydrophila* であった。これら単離した菌株をそれぞれ滅菌水に懸濁し、レジオラート/QT 法を実施したところ、茶色の発色を示し、陽性反応が見られた。

レジオラート/QT 法で陽性反応を示した菌株のうち *A. hydrophila* について、偽陽性となる菌量を検討するため、希釈系列を用いた検討を行った。浴槽水由来株 A は 10^1 から陽性となったが、環境由来株 B は 10^3 から陽性と菌株によって大きい差がみられたが、少量の菌量でも陽性反応を示した (表 4)。また、レジオネラ属菌が陽性となる検体ではおおよそ 5 日目ごろから陽性となるのに対し、本菌株による陽性反応は 2 日目

から3日目と比較的早期に見られた。

レジオラート/QT法及び平板培養法ともに陽性であった37検体について検出菌量の比較を行った(図1)。回帰直線の R^2 は0.397となり、弱い相関が認められた。

D. 考察

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、平板培養法との結果一致率は83.6%と高い一致率を示した。特に、平板培養法と比較した特異度は95.5%と非常に高い値であった。一方で、本検討では感度は61.7%と昨年度の75.6%から大幅に低下した結果となった。レジオラート/QT法と平板培養法で結果の不一致が見られた28検体のうち、23検体がレジオラート/QT法陰性、平板培養法陽性であり、その菌数は10-280 CFU/100 mLであった。このうち、18件は50 CFU/100 mL以下であり、比較的少ない菌数の検体での不一致が多かった。一方で、レジオラート/QT法陽性、平板培養法陰性の検体が5検体あった。そのうち1検体はレジオラート培養液から*L. pneumophila*が検出され、平板培養法でも10 CFU/100 mL未満であるものの、同一の血清型が検出されており、真の陽性であったことが確認できた。レジオネラ属菌の培養法は手技が複雑であり、培養日数も7日から10日と非常に時間がかかるため、検査者の技能や菌の発育状況、交雑菌の影響により、含まれるレジオネラ属菌が少ない場合は何れか一方のみが検出される不一致が生じやすいと考えられる。また、本検討においては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。今後検体数の蓄積及び検体種類別の検

討を加えて、感度特異度についてより詳細に解析する必要があると考える。

浴槽水等の環境検体では複数のレジオネラ属菌の菌種が検出される事例が多く見られるが、本検討においても37検体中13検体(35.1%)で確認された。このうち、12検体では*L. pneumophila*と他のレジオネラ属菌が検出された検体であり、この12検体はレジオラート/QT法で陽性となった。レジオラートの培養液からは1検体を除き、*L. pneumophila*のみが検出された。また、平板培養法で*L. nautarum*のみが検出されたプール水の1検体においてはレジオラート/QT法では陰性となった。レジオラート/QT法は*L. pneumophila*を特異的に検出できるよう設計された方法であるが、本検討の結果からはレジオネラ属菌が複数混在する検体においても*L. pneumophila*を選択的に検出できることが実証されたものと考えられる。また、今回の検討においてはレジオネラ属菌検出であった37検体中36検体で*L. pneumophila*が検出される結果となった。このことから、レジオネラ属菌陽性の検体のほとんどを*L. pneumophila*を選択的に検出するレジオラート/QT法で陽性と判定できると考えられる。

一方で、今回、1検体のみではあるが、*L. dumoffii*によりレジオラート/QT法で陽性を示した検体があった。平板培養法においては*L. pneumophila* SG5も検出されていたことから、レジオラート培養液内に*L. pneumophila*が存在したものの、平板培地上でうまく分離できなかった可能性もあるため、*L. dumoffii*に対するレジオラート/QT法の反応性はより詳細に検討する必要がある。レジオネラ属菌は非常に多くの菌

種があることから、浴槽水で頻繁に検出される菌種についてはレジオラート/QT 法の反応性を確認する必要があると思われる。

検出菌量の検討では回帰直線の R^2 は 0.397 となり、弱い相関が認められる結果となった。昨年度の検討においては 32 検体において回帰直線の R^2 は 0.778 となり、強い相関が認められており、本検討と乖離する結果となった。この原因として、本検討では 37 検体中検出菌量が 100 CFU/100mL であった検体が 23 検体、100 MPN/100 mL であった検体が 24 検体と比較的検出菌量の少ない検体が多かったため、相関が弱くなったことが考えられた。検出菌量の検討においては検体数を増やし検討を重ねる必要があると考えられた。

本検討においてレジオラート/QT 法で偽陽性を示す菌種が複数確認された。今回確認された菌種は水環境や土壌などの環境中で分離が報告されている菌種である。また、これら偽陽性を示した 4 検体は残留塩素がそれぞれ 0, 0, 0.1, 0.4 mg/L と「公衆浴場における衛生等管理要領等について（生衛発第 1811 号）」に規定される浴槽水中の遊離残留塩素濃度を通常 0.4 mg/L と比較し、4 検体中 3 検体が残留塩素の低い検体であった。残留塩素により多くの細菌は消毒されるが残留塩素が含まれない場合に多数の菌種が生存できることになり、このうち本検討で明らかとなったレジオラートに反応する一部菌種によりレジオラート/QT 法で偽陽性を示すことがあるものと考えられる。
A. *hydrophila* においては陽性反応がレジ

オネラ属菌ものより早期にみられることから、培地の観察を頻繁に実施することで、偽陽性を見つけることが可能であると考えられる。

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ろ過、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。しかしながら、本検討で見られたように、一定の確率で偽陽性が起こることを理解した上で使用する必要がある。レジオラート/QT 法をより有用に使用するため、偽陽性の発生頻度の把握や確認できる手法、偽陽性を低減する方法を検討する必要があると考える。

E. 総括

レジオラート/QT 法は *L. pneumophila* を選択的に検出できる検査法であり、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 実検体におけるレジオラート/QT法と平板培養法の比較結果

レジオラート /QT法	平板培養法		
	陽性	陰性	計
陽性	37	5	42
陰性	23	106	129
計	60	111	171

表2 平板培養法で *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が検出された検体の結果一覧

検体 No.	検体種別	レジオラート /QT法 (MPN/100 mL)	レジオラート /QT法 検出菌種	平板培養法 (CFU/100 mL)	平板培養法 検出菌種
1	プール水	0	-	51	<i>L. nautarum</i>
2	浴槽水	47	Lp SG5	12	Lp SG5, 14 <i>L. quinlivanii</i>
3	浴槽水	58	<i>L. dumoffii</i>	85	Lp SG5 <i>L. dumoffii</i>
4	冷却塔水	659	Lp SG8	30	Lp SG8 <i>L. rubrilusens</i> , <i>L. sainthelensi</i>
5	浴槽水	223	Lp SG2	430	Lp SG1,2,3,5,6,UT <i>L. londiniensis</i> <i>Legionella</i> sp.
6	浴槽水	474	Lp SG3	230	Lp SG3,UT <i>Legionella</i> sp.
7	浴槽水	23	Lp SGUT	40	Lp SG13,UT <i>Legionella</i> sp.
8	湯口水	23	Lp SGUT	50	Lp SG1,13,UT <i>Legionella</i> sp.
9	浴槽水	223	Lp SG6	120	Lp SG1,3,6 <i>Legionella</i> sp.
10	湯口水	361	Lp SG1,6	120	Lp SG1,3,6 <i>Legionella</i> sp.
11	湯口水	11	Lp SG1	70	Lp SG1,UT <i>Legionella</i> sp.
12	浴槽水	23	Lp SG2	10	Lp SG2 <i>Legionella</i> sp.
13	浴槽水	106	Lp SG1	120	Lp SG1 <i>L. anisa</i>

表3 レジオラート/QT法の陽性ウェルからレジオネラ属菌が検出できなかった検体一覧

検体 No.	検体種別	残留塩素 (mg/L)	レジオラート /QT法 (MPN/100 mL)	レジオラート /QT法 検出菌種	平板培養法 (CFU/100 mL)	平板培養法 検出菌種
1	浴槽水	0.4	94	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	<10	-
2	浴槽水	0.1	11	<i>Pseudomonas otitidis</i>	<10	-
3	浴槽水	0	90	<i>Pseudomonas sp.</i>	<10	-
4	浴槽水	0	23	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	<10	-

表 4 *A. hydrophila* におけるレジオラート/QT 法の結果

表 4-1 浴槽水から分離された *A. hydrophila* の結果

菌量 (CFU/100 mL)	大ウェル 陽性数	小ウェル 陽性数	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)
10 ¹	6	65	6469
10 ²	6	90	>22726
10 ³	6	90	>22726
10 ⁴	6	90	>22726
10 ⁵	6	90	>22726

表 4-2 環境から分離された *A. hydrophila* の結果

菌量 (CFU/100 mL)	大ウェル 陽性数	小ウェル 陽性数	レジオラート/QT法 (MPN/100mL)
10 ¹	0	0	-
10 ²	0	0	-
10 ³	2	4	72
10 ⁴	6	6	361
10 ⁵	6	50	4096

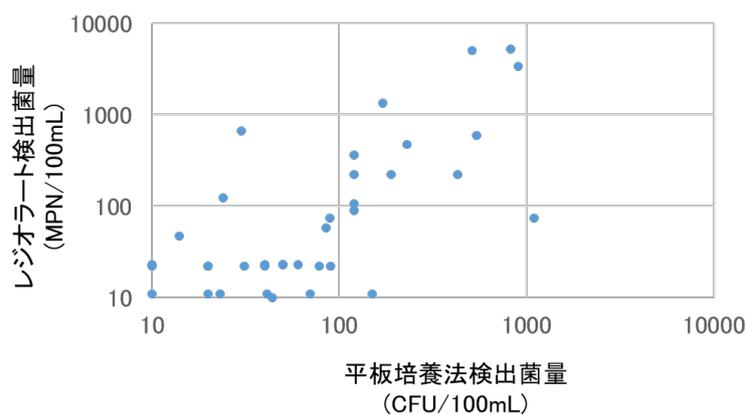


図 1 レジオラート/QT 法と平板培養法の検出菌量の比較

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2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、
レジオラートを用いた定性試験法の検討

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 高野 真実 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 溝腰 朗人 大分県衛生環境研究センター

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かなり相関が見られた。一方で、専用トレイとシーラーを使用せずに特定酵素基質培地のみを用いた定性的な試験法については、結果が陰性であっても、平板培養法やレジオラート/QT法では陽性となる検体が存在し、今後解決すべき課題が多い。

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、昨年度に引き続き、多様な泉質を有する大分県の実検体を用いて評価した。また、*Legionella pneumophila*（以下、*Lp*）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（以下、QT法）についても実検体を用いた評価を行った。併せて専用トレイとシーラーを必要としない定性的な試験法について検討した。

B. 研究方法

1. 試料および調製法

令和2年8月から11月に搬入された浴槽水および湯口水21施設分41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℃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（武藤化学又は関東化学）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³⁾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 41 検体について、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。QT 法は、大小 2 種類のウエルについて、茶色・濁りのいずれか又は両方を生じた陽性ウエル数の組み合わせから、Lp 菌数を最確数法で定量する方法である。測定に使用した検体量は 10mL で、滅菌蒸留水 90mL を加えて 100mL とし、39 $^{\circ}$ C で培養した。本法の検出限界は 10MPN/100mL である。ま

た、陽性ウエルから採取した培養液を GVPC 寒天培地に画線塗抹し、レジオネラ属菌の分離同定を行った。

4. レジオラート定性試験法（保存菌株による検討）

浴槽水から分離された Lp 菌株 2 種類（血清群 1 と血清群 2）を用いてそれぞれ希釈系列を調製し、QT 法及び下記 5. のフラスコを用いた定性試験法を実施し、比較した。具体的には、Lp 菌株を BCYE α 寒天培地で 2 日間培養し、発育した菌を PBS(-) に懸濁、10 倍階段希釈し、各希釈段階の菌液 0.1mL を、予めレジオラートを溶解させた 100mL の滅菌蒸留水に混和した後、上記 3. 及び下記 5. の方法で培養した（培養温度は 36 $^{\circ}$ C）。平行して、各希釈段階の菌液 0.1mL を BCYE α 寒天培地に塗布し、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養して菌数を測定した。

5. レジオラート定性試験法（実検体による検討）

上記 3. で 10MPN/100mL 以上検出された 12 検体について、それぞれ 10mL を、予めレジオラートを溶解させた 90mL の滅菌蒸留水に加え、ペントフィルター付きのフラスコ（CELLSTAR フラスコ SC、白 FT キャップ 650mL 滅菌：Greiner Bio-One）に入れて 39 $^{\circ}$ C で 7 日間培養し、茶色・濁りのいずれか又は両方が見られたものを陽性とした。

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、QT 法で陽性と判定したウエルがあったこと、レジオラート定性試験法（以下、定性法）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、QT 法で陽性と判定したウエルがなかったこと、定性法で陰性であったことを「(-)」と表記する。

1. 平板培養法

41 検体中、大分法では 19 検体、標準法では 18 検体からレジオネラ属菌が検出された（表 2）。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 5～1000cfu/100ml、10～2000cfu/100mL（濃縮試料のみでは 10～430CFU/100mL）であつ

た。大分法でのみ検出された2検体の菌数はともに5cfu/100mLで、*Lp*が検出された。標準法でのみ検出された1検体の菌数は10cfu/100mLで、*Lp*が検出された。大分法と標準法の菌数の相関は $R^2=0.7521$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8893$ であった(図1)。

2. レジオラート/QT法

41検体中12検体から11~1342MPN/100mLの*Lp*が検出された。平板培養法(+)QT法(-)の結果となったのは、大分法で7検体(10CFU/100mL以上検出された検体に限ると4検体(菌数は100mLあたり10、20、50、500CFUが1検体ずつ))、標準法で6検体(菌数は100mLあたり10CFUが4検体、20CFUと80CFUが各1検体)、平板培養法(-)QT法(+)の結果となった検体はなかった(表3a、3b)。平板培養法の結果と比較したところ、検出/不検出の一致率は大分法で82.9%(10CFU/100mL以上検出された検体に限ると90.2%)、標準法で85.4%、菌数の相関は大分法で $R^2=0.6682$ 、標準法で $R^2=0.6978$ (濃縮試料のみで $R^2=0.7134$) であった(図2)。12検体中11検体の培養液からは*Lp*が検出されたが、1検体(1342MPN/100mL)からはレジオネラ属菌は検出されなかった。当該1検体の培養液を塗抹したGVPC寒天培地上で優勢であったコロニー1種(16S rDNAを用いた遺伝子解析で *Ochrobactrum* sp.と確認)をQT法に供したところ、ウェルに濁りが生じた。茶色は検体を供試した場合よりかなり薄かった。なお、平板培養法ではこの検体から多数の夾雑菌と共に*Lp*が検出された(100mLあたり大分法1000CFU、標準法170CFU)。

3. レジオラート定性試験法(保存菌株による検討)

QT法及びBCYE α 寒天培地で測定した菌量は希釈系列ごとに段階的に減少していき、検出限界未満になった希釈段階において、レジオラート定性試験法でも陰性となった(表4)。

4. レジオラート定性試験法(実検体による検討)

結果を表5に示す。12検体中6検体が定性法陽性と判定された。平板培養法及びQT法でレジオネラ属菌数の多い検体が陽性となる傾向が見られたが、上記2.でQT法培養液からレジオネラ属菌が検出されなかった1検体(検体No.10)については、菌数が多いにも関わらず定性法は陰性であった。

D. 考察

平板培養法について、昨年度⁴⁾と同様、使用培地枚数の少ない標準法で大分法と同等の結果が得られた。大分法または標準法の一法のみでレジオネラ属菌が検出された検体もあったが、菌数の少ない検体(5または10cfu/100mL)であったため、ばらつきが生じたと考える。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の水質検査には適した方法だと言える。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。

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。41検体を検査したところ、平板培養法で検出された菌量とおおむね同等であり、昨年度⁴⁾の結果ほどではないがかなり相関が見られた。一方、今回レジオネラ属菌以外の菌でもQT法で陽性ウェルを生じることが確認され、そこから*Lp*が分離されなくても陽性と判定される(偽陽性)の可能性が示された。当該菌が検出された検体は、平板培養法で*Lp*が検出されており、QT法でウェルの茶色が当該菌のみを供試した場合より濃かったことから、この検体自体については偽陽性ではないと考えられた。平板培養法でも夾雑菌が非常に多く、レジオネラ属菌の分離に困難を来した検体であったので、QT法の培養液(前処理なし)から*Lp*が分離されなかったと推察する。QT法は、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。偽陽性の可能性はあるものの、平板培養法との結果一致率は高いことから、ヒトから検出されるレジオネラ属菌のほとんどを占め公衆衛生上重要な菌種である *Lp*⁵⁾ の検査が簡便に行える QT 法は、日常の衛生管理には非常に有用な検査法と考える。

QT 法は簡便で有用な検査法であるが、専用トレイとシーラーを必要とする。そこで、それら高価な機器を使用しない定性法について検討した。予試験において、空気の量が少ないと検出できないことが示唆された（データ未掲載）ため、培養容器としてベントフィルターが付いた大きめのフラスコを用いた。保存菌株による検討ではフラスコ内に入った *Lp* 菌数が数個であっても検出可能という結果が得られた一方、実検体を用いた場合には一桁多い菌数が必要であった。保存菌株を用いた場合、実検体と同じ 39℃ 培養では QT 法で発育抑制が見られたため 36℃ 培養としたが、その温度差が検出可能菌量の差となった可能性も考えられる。実検体には様々な夾雑菌が含まれており、36℃ 培養ではその抑制も弱くなるため、*Lp* の発育と夾雑菌抑制とが釣り合うよう、定性法の培養温度については今後の検討課題としたい。表 5 の検体 No.10 は平板培養法及び QT 法で検出された *Lp* 菌数は多かつたにも関わらず定性法は陰性であった。この検体は夾雑菌が非常に多かつたので、それが関与しているのかもしれないが、原因は定かでない。その夾雑菌の 1 つ (*Ochrobactrum* sp.) は QT 法で培養液に濁りを生じることが確認されたが、定性法は透明のままであった。レジオネラ属菌も *Ochrobactrum* sp. も好気性菌であることから、ベントフィルターだけでは酸素の量が

足りないことが考えられる。培養容器についても再検討が必要で、定性法について手法を確立するには多くの課題が残る。

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) 森本 洋：分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 日本環境感染学会誌, 2010. 25 (1) : 8-14
- 4) 佐々木麻里 他：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. 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 : 27-324)
- 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)

F. 研究発表

研修会

- 1) 佐々木麻里 他：レジオネラ症総論と培養法の注意点、レジオネラ web 研修会、2021 年 1 月、大分 (web 開催) .

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=41)

	標準法		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
大分法	+	17	2	19
≥5cfu/100mL	-	1	21	22
計		18	23	41

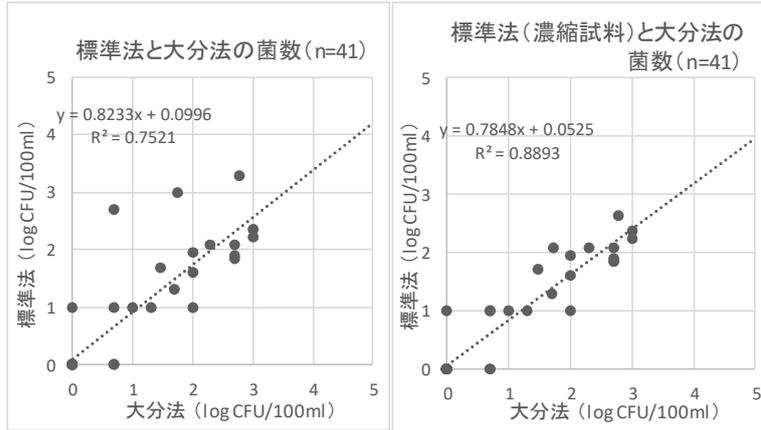


図 1. 標準法と大分法との相関

表 3a. レジオラート/QT 法と大分法の比較 (n=41)

	レジオラート		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
大分法	+	12	7	19
≥5cfu/100mL	-	0	22	22
計		12	29	41

表 3b. レジオラート/QT と標準法の比較 (n=41)

	レジオラート		計	
	≥10cfu/100mL			
	+	-		
標準法	+	12	6	18
≥10cfu/100mL	-	0	23	23
計		12	29	41

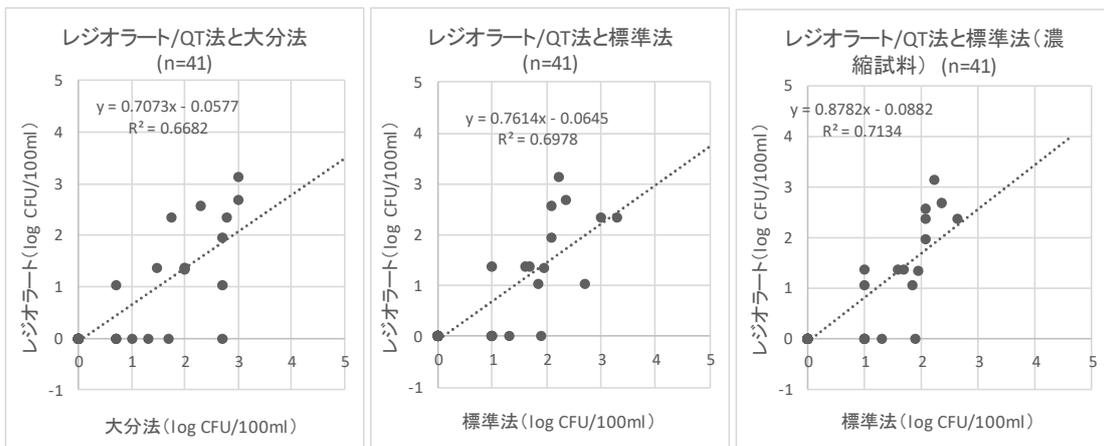


図 2. レジオラート/QT法と平板培養法との相関

表 4. 保存菌株を用いたレジオラート定性試験法の結果

菌株	希釈系列	レジオラート 定性試験法	レジオラート/QT 法 MPN/菌液 0.1mL	菌数 (BCYE α) CFU/菌液 0.1mL
菌株 1 <i>Lp</i> 血清群 1	3	+ (茶色&濁り)	>2272.6	試験せず
	4	+ (茶色&濁り)	>2272.6	>300
	5	+ (茶色&濁り)	230.7	290
	6	+ (茶色&濁り)	22.3	30
	7	+ (茶色&濁り)	2.3	2
	8	—	<1.0	0
	9	—	<1.0	試験せず
菌株 2 <i>Lp</i> 血清群 2	3	+ (濁りのみ)	>2272.6	試験せず
	4	+ (濁りのみ)	2272.6	>300
	5	+ (濁りのみ)	134.2	225
	6	+ (濁りのみ)	10.6	28
	7	+ (濁りのみ)	1.1	4
	8	—	<1.0	0
	9	—	1.1	試験せず

注) + : 陽性 — : 陰性 *Lp* : *L.pneumophila*

表 5. 実検体を用いたレジオラート定性試験法の結果

検体	レジオラート定性試験法	レジオラート/QT 法	平板培養法 (標準法濃縮試料)	
	(検水量 10mL)	MPN/100mL	CFU/100mL	検出菌種
1	+ (濁りのみ)	223	430	<i>Lp</i> 及びそれ以外
2	+ (濁りのみ)	474	230	<i>Lp</i> 及びそれ以外
3	—	23	40	<i>Lp</i> 及びそれ以外
4	—	90	120	<i>Lp</i>
5	—	23	50	<i>Lp</i> 及びそれ以外
6	+ (茶色のみ)	11	10	<i>Lp</i>
7	+ (濁りのみ)	223	120	<i>Lp</i> 及びそれ以外
8	+ (濁りのみ)	361	120	<i>Lp</i> 及びそれ以外
9	—	11	70	<i>Lp</i> 及びそれ以外
10	—	1342	170	<i>Lp</i>
11	—	23	10	<i>Lp</i> 及びそれ以外
12	+ (濁りのみ)	22	90	<i>Lp</i>
陰性対照	—	<10		試験せず

注) + : 陽性 — : 陰性 *Lp* : *L.pneumophila*

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
武藤 千恵子	東京都健康安全研究センター	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
村尾 拓哉	日本板硝子株式会社	森中 りえか	株式会社ファスマック
小澤 賢介	デンカ生研株式会社		

研究要旨

本研究では、公衆浴場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。

公衆浴場などからの 169 検体中、44 検体 (26.0%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。最も多い菌数は、2,690 CFU/100 ml であった。分離菌の血清群別の結果、*Legionella pneumophila* 血清群 1 (Lp1) が 19/44 検体 (43.2%) から分離され、最も多かった。

モバイル qPCR 法は、2 種類のプロトコルで実施した (N=59、110)。その結果、平板培養法に対する感度は 22.6%および 38.5%であり、LAMP 法 (N=100、94.1%) よりも低かった。採水現場での濃縮・測定を想定したうえで、フィルターや濃縮方法についてプロトコルを再検討する必要がある。

シャワー・カラン水 (N=35) を対象とした PALSAR 法では、MWY 液体培地による増菌培養を取り入れた結果、平板培養法に対する感度は 100%となった。また、特異度および一致率は、それぞれ 60.7%および 68.6%であった。

浴槽水 31 検体、シャワー水 17 検体を用いて 16S アンプリコン解析を実施した結果、半数以上の検体からレジオネラ属菌およびマイコバクテリウム属菌のリードが検出され、これらの菌が広く存在していることが示された。Species level での解析では、レジオネラ症や非結核性抗酸菌感染症の原因菌である *L. pneumophila*、*M. gordonae* が検出された。

浴槽水など 76 検体を用いた Lp1-IMB 法においては、平板培養法と濃縮液を用いた Lp1-IMB 法を併用することで、Lp1 の分離率を上げることができると考えられた。また、濃縮液を用いた Lp1-qPCR 法は、Lp1 分離のためのスクリーニングとして有用であった。

A 研究目的

2020年の国内におけるレジオネラ症の患者報告数は、新型コロナウイルスによる外出自粛の影響もあり、前年比87.7%であったが、2,031件（暫定値）の届出がある¹⁾。レジオネラ症対策として、感染源のおよそ4割を占める公衆浴場の衛生管理の向上は重要である。したがって、公衆浴場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。本研究では、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）について検討した。また、レジオネラ属菌特異的16S rRNAを標的とし、プレート上のDNAプローブに結合させて検出するPALSAR法については、シャワー・カラン水を対象とした検査において感度を上げるため、プロトコルを改良し、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²⁾。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で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) を用いて、選択的濃縮法によるLp1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³⁾。したがって、浴槽水だけでなくシャワー・カラン水も対象

とし、培養検査のみならず、16S アンプリコン解析による結果も踏まえて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

4か所の地方衛生研究所(機関A~D)において、令和2年度に公衆浴場などから169検体の試料を採取した(表1)。検体の内訳は、浴槽水が107検体、シャワー水が26検体、カラン水が17検体、採暖槽水が15検体、その他(プール水など)が4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を用いて、Loopamp レジオネラ検出試薬キットE(栄研化学)を使用して取扱説明書に従い実施した。

4 モバイル qPCR 法

検水を用いて、下記の2種類のいずれかの方法でDNAを抽出した。検水100 mlをフィルター過(セルロース混合エステル、0.45 μm、47 mm)、核酸抽出試薬200 μl添加し、室温で5分間静置した(プロトコルA)。または、上記と同様に検水をろ過したフィルターをスワブで拭き、核酸抽出試薬 Ver. 2を100 μl添加し、室温で5分間静置した(プロトコルB)。プロトコルAは原液、プロトコルBは5倍希釈液の5 μlを鋳型として、qPCR反応を実施した。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、モバイル qPCR 装置 Picogene PCR1100 (日本

板硝子) を用いた。

5 モバイル qPCR 法における核酸抽出試薬の比較

L. pneumophila 長崎 80-045 株を BCYE α 寒天培地で 30°C 4 日間培養後、PBS で調製した McFarland No. 2 濁度の菌液 (約 1×10^9 CFU/ml) を 10 倍段階希釈し、 10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} の希釈液を作製した。菌液 0.1 ml を用いて、LAMP 法の核酸抽出試薬およびモバイル qPCR 法の核酸抽出試薬 Ver. 2 を用いて DNA を抽出し、モバイル qPCR 法の qPCR 反応を実施した。その後、DNA を -20°C で 4 週間保存した後、再度 qPCR 反応を実施した。

6 PALSAR 法

シャワー・カラン水についてのみ検討した。PALSAR 法は、100 倍濃縮検体 4 ml を遠心後、上清を除去し、活性炭を除いた MWY 液体培地 1 ml に懸濁した。36°C で 18 時間培養後、添付の取扱説明書に従い実施した。なお、溶菌条件は 70°C 5 分とした。目視の発色確認により 16S rRNA が検出された場合を陽性と判定した。当日中に測定しない場合は、増菌液を 4°C で保存した。

7 Lp1-IMB 法

1) Lp1-IMB 作製方法

Lp1 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 Lp1 抗体を磁気ビーズに感作し、免疫磁気ビーズとした。

2) 実検体における qPCR 法による Lp1 スクリーニング

LAMP 法の際に抽出した DNA を鋳型として用いた。また、検水の増菌培養液も用いた。検水の 100 倍濃縮液 1 ml を 15,000 rpm で 5 分間遠心後、上清 900 μ l を除去し、1,000 倍濃縮液 100 μ l とした。等量の酸処理液で 5 分間処理後、MWY 液体培地を 900 μ l 添加し、36°C で 18 時間培養した。培養液 100 μ l を遠心後、上清を除去し、5%キレック

ス溶液を 50 μ l 添加した。100°C で 10 分間処理後、遠心上清を鋳型とした。既報に従い、Lp1 特異的な qPCR 反応を実施した (Lp1-qPCR) ⁴⁾。

3) 実検体における Lp1 選択的濃縮分離

IMB による選択的濃縮法には、Lp1-qPCR が陽性となった検体の 100 倍濃縮液および MWY 増菌液を 5 倍希釈して供試した。すなわち、濃縮・増菌検体 200 μ l に PBS 800 μ l を加え 1 ml とした試料 (5 倍希釈試料) を、100 倍濃縮液では 5 検体、MWY 増菌液では 8 検体用いた。5 倍希釈試料 1 ml に 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、ビーズを磁石で集め、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 100 μ l に懸濁、ボルテックスでよく混和後、GVPC 寒天培地 (日水製薬) 1 枚にコンラージ棒で塗布し、35°C で 7 日間培養した。

8 16S アンプリコン解析

浴槽水 31 検体およびシャワー水 17 検体について、検水 1,200 ml をフィルターろ過し (ポリカーボネート、0.22 μ m、47 mm)、ビーズでフィルターを破碎後、DNeasy PowerBiofilm Kit (キアゲン) で DNA を抽出した。イルミナ社のプロトコルに従い、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を Tks Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて PCR 増幅した後、Nextera XT Index Kit および MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) を用いて RUN を実施し、QIIME2 で解析した。

(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

169 検体中、44 検体 (26.0%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された (表 2)。菌数別に見ると、10~99 CFU/100 ml が 33 検体

(19.5%)、100～999 CFU/100 mlが10検体(5.9%)、1,000 CFU/100 ml以上が1検体(0.6%)であった。最も多い菌数は、2,690 CFU/100 mlであった。分離菌の血清群別の結果、Lp1が19/44検体(43.2%)から分離され、最も多かった(表3)。次に多かったのは、Lp6(18/44検体、40.9%)であった。また、Lp以外の菌種が9検体から分離された。

2 LAMP法およびモバイル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。LAMP法を用いた場合、平板培養法に対する感度は100%、特異度は71.1%、一致率は75.0%であった。一方、プロトコルAによるモバイルqPCR法を用いた場合は、感度38.5%、特異度95.7%、一致率83.1%であった。また、プロトコルBによるモバイルqPCR法を用いた場合は、感度22.6%、特異度88.6%、一致率70.0%であった。

モバイルqPCR法の核酸抽出試薬 Ver. 2は、LAMP法の核酸抽出試薬と同等の抽出効率であった(表5)。また、-20℃で4週間保存しても、その効率は変わらなかった。

3 PALSAR法による結果

35検体のシャワー・カラン水について検討した結果、平板培養法に対する感度は100%、特異度は60.7%、陽性的中率は38.9%、陰性的中率は100%、一致率は68.6%であった(表6)。

4 16Sアンプリコン解析

16Sメタゲノム解析で取得したリード数は、浴槽水検体で中央値97,685(17,437～201,267)、シャワー水で中央値103,697(54,401～187,772)であった。

浴槽水17/31検体およびシャワー水9/17検体からレジオネラ属菌のリードが検出された。各検体に占めるレジオネラ属菌のリードの割合の平均値は、浴槽水検体で0.5%、シャワー水検体で0.1%であった(表7)。また、浴槽水13/31検体およびシ

ャワー水5/17検体から*L. pneumophila*のリードが検出され、各検体に占める*L. pneumophila*のリードの割合の平均値は、浴槽水検体で0.095%、シャワー水検体で0.089%であった(表8)。

また、浴槽水28/31検体およびシャワー水15/17検体からマイコバクテリウム属菌のリードが検出された。各検体に占めるマイコバクテリウム属菌のリードの割合の平均値は、浴槽水検体で3.1%、シャワー水検体で3.3%であった。また、浴槽水19/31検体およびシャワー水10/17検体から*M. gordonae*のリードが検出され、各検体に占める*M. gordonae*のリードの割合の平均値は、浴槽水検体で0.5%、シャワー水検体で1.9%であった。

5 Lp1-IMB法による結果

Lp1-qPCRスクリーニングを浴槽水など76検体について行った結果、濃縮液または増菌液で12検体が陽性となった(表9)。平板培養法においてLp1が分離された4検体は、100倍濃縮液ではすべてLp1-qPCR陽性であったが、MWY増菌液では2検体で陰性であった。MWY増菌液で陰性となった検体は、100倍濃縮液でのqPCRのCt値が大きく、平板培養法での菌数は10および30 CFU/100 mlであった。

一方、Lp1-PCRが陽性となった12検体のうち、100倍濃縮液では5検体、MWY増菌液では8検体についてLp1-IMB法を実施した。その結果、濃縮液を用いた場合は4検体、増菌液を用いた場合は3検体からLp1が分離された。これらの検体のうち、1検体(No. 7)は平板培養法でもLp1が分離されたが、3検体(No. 6、10、12)は、平板培養法ではLp1が分離されなかった。

D 考察

モバイル型qPCR装置を使用した検討では、いずれのプロトコルにおいても、平板培養法に対する感度がLAMP法よりも低かった。この理由の一つとして、LAMP法は2,000倍の濃縮液を使用し

ているのに対して、モバイル qPCR 法は 500 または 200 倍の濃縮液を使用していることが考えられた。また、採水現場での濃縮・測定を想定したため、モバイル qPCR 法ではポアサイズ 0.45 μm のセルロース混合エステルフィルターを使用した。ISO11731 や厚生労働省通知においては、0.2 μm のフィルターを使用する旨が記載されている^{5,6)}。また、枝川らは、フィルターの材質によって回収率が変わり、ポリカーボネートの回収率が高いことを報告している⁷⁾。したがって今後は、採水現場での濃縮・測定を想定したうえで、フィルターや濃縮率についてプロトコルを再検討する必要がある。

一方、今回の検討では、抽出した核酸を約 1 か月間冷凍 (-20°C) 保存した後、qPCR 反応を実施し、長期間の核酸保存がその後のモバイル qPCR 反応に与える影響を調べた。LAMP 法、モバイル qPCR 法いずれの方法においても、核酸の長期保存による影響は認められなかった。

PALSAR 法におけるこれまでの検討では、シャワー・カラン水を対象とした場合、浴槽水などを対象とした場合と比較し、感度が低かった⁸⁾。しかしながら、MWY 液体培地で一晩増菌する方法では、平板培養法に対する感度は 100%であったため、これらの検体では増菌培養を実施することが望ましい。

16S アンプリコン解析では、半数以上の浴槽水・シャワー水からレジオネラ属菌のリードが検出され、*L. pneumophila* のリードも一部の検体から検出された。非結核性抗酸菌症の原因菌であるマイコバクテリウム属菌に関しては、浴槽水・シャワー水の約 9 割からリードが検出され、広くレジオネラ属菌およびマイコバクテリウム属菌が存在していることが示された。ただし、これらの菌が生きた状態で存在しているのかは明らかではない。そのため、今後、死菌 DNA の PCR 増幅を阻害する EMA 処理などを取り入れた解析を実施し、より詳細に汚染実態を解明する必要がある。

感染源を特定するためには、環境検体から患者

由来株の大半を占める Lp1 を分離することが重要となるが、主な感染源である浴槽水からは、複数の血清群のレジオネラ属菌が分離される場合がある⁹⁾。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、IMB により Lp1 を選択的に濃縮分離する方法を検討している。今年度は、MWY 液体培地による増菌培養と、IMB 処理前に Lp1 特異的な qPCR によるスクリーニングを検討した。その結果、MWY 液体培地による増菌培養の効果は認められなかった。しかしながら、Lp1-IMB 法においては、100 倍濃縮液を用いた場合、平板培養法で Lp1 不検出の 3 検体から Lp1 を分離することができた。また、Lp1-qPCR によるスクリーニングを実施することで、不必要な IMB 操作を省くことができると考えられた。ただし、過去の検討結果¹⁰⁾では、平板培養法のみで Lp1 が分離された検体もあったことから、平板培養法と濃縮液を用いた Lp1-IMB 法を併用することが望ましいと考えられた。

E 結論

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、いずれのプロトコルにおいても、平板培養法に対する感度が LAMP 法よりも低かった。採水現場での濃縮・測定を想定したうえで、フィルターや濃縮率についてプロトコルを再検討する必要がある。シャワー・カラン水を対象とした PALSAR 法では、増菌培養を実施することで平板培養法に対する感度を向上させることができた。16S アンプリコン解析では、浴槽水・シャワー水からレジオネラ属菌およびマイコバクテリウム属菌のリードが検出され、これらの菌が広く存在していることが示された。Lp1-IMB 法においては、平板培養法と濃縮液を用いた Lp1-IMB 法を併用することで、Lp1 の分離率を上げることができると考えられた。

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 2020 年第 53 週。
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/10103-idwr-sokuho-data-j-2053.html>

2) 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.

3) 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.

4) Mérault N et al. Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. *Appl Environ Microbiol.* 2011, 77(5), 1708-1717.

5) ISO11731:2017. Water quality. Enumeration of *Legionella*.

6) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知. 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. 薬生衛発 0919 第 1 号. 令和元年 9 月 19 日.

7) 枝川亜希子 他. レジオネラ検査ろ過濃縮法におけるメンブレンフィルター材質の回収率比較. 日本防菌防黴学会誌. 2013, 41, 63-66.

8) 磯部順子 他. レジオネラ属菌迅速検査法の評価. 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28～30 年度総合研究報告書, 19-33, 2019.

9) 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.

10) 金谷潤一 他. 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. 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, 12-21,

2020.

F 研究発表

金谷潤一 他. 環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価. 日本防菌防黴学会誌. 2020, 48, 515-522.

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	D	
検体内訳	浴槽水	41	12	34	20	107
	採暖槽水		13		2	15
	シャワー水	18	4	4		26
	カラン水	17				17
	その他				4	4
	計	76	29	38	26	169
検査方法	モバイルqPCR(プロトコルA)	24	16	7	12	59
	モバイルqPCR(プロトコルB)	52	13	31	14	110
	LAMP	76	25			101
	PALSAR(一晩培養)	35				35

表2. 平板培養法による検出率

菌数 (CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	125	(74.0)
10-99	33	(19.5)
100-999	10	(5.9)
1,000以上	1	(0.6)
計	169	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 1	19
SG 6	18
SG 5	12
SG 3	7
SG 8	4
SG 4	2
SG 9	2
SG 2	1
SG 14	1
UT	5
<i>Legionella</i> spp.	9

表4. 浴用水における各種迅速検査法の結果

方法	検体数	培養法に対する:		
		感度	特異度	一致率
LAMP(2,000倍濃縮)	100	94.1%	71.1%	75.0%
モバイルqPCR(プロトコルA、500倍濃縮)	59	38.5%	95.7%	83.1%
モバイルqPCR(プロトコルB、200倍濃縮)	110	22.6%	88.6%	70.0%

表5. モバイルqPCR法における核酸抽出試薬の比較

検体	Ct値	
	抽出直後	-20℃で4週間保存
LAMP法添付試薬		
10 ⁻³	30.0	30.0
10 ⁻⁵	38.0	37.0
10 ⁻⁷	不検出	未実施
モバイルqPCR法抽出試薬 Ver. 2		
10 ⁻³	30.0	30.0
10 ⁻⁵	37.0	37.0
10 ⁻⁷	不検出	未実施

表6. 浴用水におけるPALSAR法の結果(シャワー・カラン水)

		平板培養法		計
		≥10	<10	
PALSAR 法	陽性	7	11	18
	陰性	0	17	17
計		7	28	35

感度100%、特異度60.7%、陽性的中率38.9%、
陰性的中率100%、一致率68.6%

表7. 16Sアンプリコン解析結果 (Genus Level)

Bath water (N=31)	Mean (%)	No. of detected samples	Shower water (N=17)	Mean (%)	No. of detected samples
<i>Pseudomonas</i>	13.3	31	<i>Novosphingobium</i>	9.9	15
<i>Hydrogenophilus</i>	3.2	5	<i>Sphingomonas</i>	7.7	17
<i>Propionibacterium</i>	3.1	23	<i>Bradyrhizobium</i>	3.8	15
<i>Mycobacterium</i>	3.1	28	<i>Mycobacterium</i>	3.3	15
<i>Staphylococcus</i>	2.8	24	<i>Nevskia</i>	2.1	6
<i>Legionella</i>	0.5	17	<i>Legionella</i>	0.1	9

表8. 16Sアンプリコン解析結果 (Species Level)

Bath water (N=31)	Mean (%)	No. of detected samples	Shower water (N=17)	Mean (%)	No. of detected samples
<i>Mycobacterium</i>			<i>Mycobacterium</i>		
<i>celatum</i>	7.9E-03	3	<i>celatum</i>	2.0E-04	1
<i>gordonae</i>	5.0E-01	19	<i>gordonae</i>	1.9E+00	10
<i>llatzerense</i>	1.2E-01	12	<i>llatzerense</i>	5.9E-01	11
<i>vaccae</i>	3.8E-02	10	<i>vaccae</i>	2.0E-02	1
<i>Legionella</i>			<i>Legionella</i>		
<i>geestiana</i>	2.2E-01	2	<i>drozanskii</i>	8.9E-04	1
<i>londiniensis</i>	7.8E-02	3	<i>geestiana</i>	1.3E-04	1
<i>maceachernii</i>	4.6E-02	11	<i>maceachernii</i>	1.1E-02	3
<i>nautarum</i>	3.9E-04	2	<i>pneumophila</i>	8.9E-02	5
<i>oakridgensis</i>	6.7E-04	1	<i>rubrilucens</i>	2.0E-03	2
<i>pneumophila</i>	9.5E-02	13			
<i>quinlivanii</i>	2.6E-03	2			
<i>rubrilucens</i>	1.1E-03	2			

表9. 浴用水(76検体)におけるLp1-qPCR法陽性検体

No.	検体種	Lp1-IMB法			MWY増菌培養液			平板培養法		
		Lp1-qPCR	Ct値	菌分離	Lp1-qPCR	Ct値	菌分離	分離菌の血清型	菌数 (CFU/100ml)	分離菌の血清型
1	浴槽水	+	37.86	NT	—	—	—		<10	
2	浴槽水	+	22.63	NT	—	—	—		<10	
3	シャワー水	+	33.45	NT	—	—	—		<10	
4	カラン水	+	18.06	NT	—	—	—		<10	
5	浴槽水	+	37.84	—	—	—	NT		<10	
6	浴槽水	+, +	36.92	+	—	—	+	Lp1	<10	
7	浴槽水	+	36.10	+	+	38.89	+	Lp1	50	Lp1, Lp6
8	シャワー水	-, +	39.70	NT	-, +	39.81	NT		40	Lp1
9	カラン水	+	39.12	NT	—	—	NT		30	Lp1
10	浴槽水	+	37.84	+	+	34.71	+	Lp1, Lp6	350	Lp6
11	浴槽水	-, +	39.38	NT	—	—	NT		10	Lp1, UT
12	浴槽水	+, +	39.26	+	—	—	—	Lp1	10	UT

NT:Not tested

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

入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン作成

研究分担者

○金谷 潤一	富山県衛生研究所	森本 洋	北海道立衛生研究所
中西 典子	神戸市環境保健研究所	佐々木 麻里	大分県衛生環境研究センター
田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター		

研究協力者

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
磯部 順子	富山県衛生研究所	枝川 亜希子	大阪健康安全基盤研究所
平塚 貴大	広島県衛生研究所	緒方 喜久代	大分県薬剤師会検査センター
吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所	倉 文明	国立感染症研究所

研究要旨

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。一方、濃縮検体から直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法は、検査開始から1～2日で結果を得られるため、その必要性は高い。また、令和元年には、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）が通知され、迅速検査に関する記述が盛り込まれた。そこで本研究では、「入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン」を作成するため、研究班の分担研究者及び研究協力者で構成するワーキンググループを形成した。

迅速検査ガイドライン案を示した。まず、迅速検査を実施するにあたり、留意点すべき点を述べた。また、現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利であるという点から、各市販キットの特性などを一覧に示した。その上で、キットごとに、方法の概要、判定方法、平板培養法との結果の相関を示した。

最後に、実検体を用いて迅速検査を使用する際の具体例を挙げた。前提として、迅速検査法は様々な用途で利用できると考えられるが、各施設において迅速検査法を導入する際は、それぞれの方法の特性を理解した上で自施設の平板培養法の結果と比較し、どのように利用するかを検討することが望ましい。

A 研究目的

現在、浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに7～10日を要する。一方、濃縮検体から直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法は、検査開始から1～2日で結果を得られるため、その必要性は高い。また、令和元年には、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）が通知され、迅速検査に関する記述が盛り込まれた。

迅速検査は、入浴施設における浴槽水などの水検体から、PCR法、リアルタイムPCR法（qPCR法）、LAMP法、PALSAR法などで直接、菌の核酸（DNA、RNA）を定性的あるいは定量的に検出する方法である。現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利である。ただし、反応阻害や死菌の存在など結果の解釈に留意すべき点がある。

そこで、これまで得られた知見から、入浴施設の水におけるレジオネラ属菌迅速検査のガイドラインを作成することとした。本ガイドラインを参照することにより、迅速検査の適切な利用が可能になると考えられる。

B 方法

本研究では、「入浴施設の水におけるレジオネラ属菌迅速検査ガイドライン」を作成するため、研究班の分担研究者及び研究協力者で構成するワーキンググループを形成した。「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」（令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）に基づき、ガイドラインの内容を検討した。

C 結果および考察

迅速検査ガイドライン案を別添に示した。まず、迅速検査を実施するにあたり、留意点すべき点を述べた。コンタミネーションを防止するため、フィルター付き製品を使用すること、遺伝子増幅前後の作業エリアを区別することが重要である。また、インターナルコントロールの使用により、反応阻害を確認することが望ましい点も述べた。

現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利であるという点から、各市販キットの特性などを一覧に示した。その上で、キットごとに、方法の概要、判定方法、平板培養法との結果の相関を示した。LAMP法は、試薬キットにはインターナルコントロールが追加されていないが、追加する方法が文献で報告されていることを紹介した。PALSAR法は、シャワー・カラん水を対象とする場合、検水の濃縮液を一晩培養した後に測定する必要があることを述べた。

最後に、実検体を用いて迅速検査を使用する際の具体例を挙げた。前提として、迅速検査法は様々な用途で利用できると考えられるが、各施設において迅速検査法を導入する際は、それぞれの方法の特性を理解した上で自施設の平板培養法の結果と比較し、どのように利用するかを検討することが望ましい。また、公衆浴場の水質基準に係る検査として、平板培養法に置き換えて実施する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法（LC EMA-qPCR法）を用いることが望ましいことを留意する点として述べた。ただし、検査法は、各自治体の条例等で規定されている場合があるため、事前に確認する必要がある。LC EMA-qPCR法を用いる際は、過去の検討結果から、平板培養法と相関の高い1 CFU/100 ml相当をカットオフ値とし、判定する。

D まとめ

令和2年度の研究活動として、入浴施設の水

水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン案を作成した。現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利である。しかしながら、各検査法における特性などをまとめたものはないため、ガイドライン案を作成して、利用する際の具体的な留意点などを示した。

E 研究発表

なし

F 知的財産権の出願・登録状況

なし

入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン

迅速検査は、入浴施設における浴槽水などの水検体から、PCR法、リアルタイムPCR法、LAMP法、PALSAR法などで直接、菌の核酸（DNA、RNA）を定性的あるいは定量的に検出する方法である。現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利である（別表）。迅速検査を実施する場合は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」（令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）にも記載されているとおり、以下の点に十分留意する必要がある。以下に、市販の検出試薬キットを用いた環境水における各種迅速検査法の概要と、浴槽水、湯口水、採暖槽水、シャワー水、カラン水、プール水を対象とした実検体における平板培養法との相関を示した。また、迅速検査法の活用例も記載した。

1 留意する点

- (1) 迅速検査法は反応系によりそれぞれ特性があるので、検出試薬キットの説明書をよく読み理解して用いる。各種迅速検査法における結果の判定は、添付の取扱説明書に従う。
- (2) 迅速検査法によっては、生菌のみならず死菌 DNA や VNC (viable but non culturable)状態の菌も検出する。
- (3) 器具類はすべてディスポーザブル又は滅菌済みのものを使用する。コンタミネーション防止のために、ピペットチップはフィルター付きの製品を使用する。
- (4) コンタミネーション防止のために、1. 反応試薬の調製、分注を行うエリア（検水及び核酸を持ち込まない）、2. 検水の濃縮、核酸調製を行うエリア（検水を扱うため安全キャビネットが設置されていなければならない）、3. 陽性対照の調製、添加を行うエリア、の3つに作業環境を分けることが望ましい。ピペット等もエリアごとに別のものを使う。
- (5) 温泉水などに含まれるフミン質などの遺伝子増幅反応の阻害物質が含まれている場合、迅速検査法によっては結果が偽陰性となることがある。したがって、インターナルコントロールを用いるなど、偽陰性確認が可能な検出試薬キットの使用が望ましい。
- (6) 常に陽性対照と陰性対照を用意し、反応が正常に進行していることを確認する。
- (7) 試料中の核酸が分解酵素により分解されることを防ぐため、使用する試薬は、市販の調整済み試薬や、DNA分解酵素、RNA分解酵素を含まない分子生物学グレ

ードのものとする。なお、試薬の保存は取扱説明書の条件に従う。

- (8) 核酸抽出した後、直ちに反応を行わない場合は、試料を凍結保存（-20℃以下）する。

2 各種迅速検査法の概要

(1) qPCR 法および EMA-qPCR 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、タカラバイオ株式会社から市販されている。Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 の取扱説明書に従い、検水の 2,000 倍濃縮液 40 μL を作製し、使用する。DNA 抽出は Lysis Buffer for *Legionella*、qPCR 反応は Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いる。反応液にインターナルコントロールが添加されており、反応阻害確認が 1 本のチューブで可能である。また、EMA-qPCR 法は、DNA 抽出前に Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 および LED Crosslinker 12 を用いて、EMA 処理を 1 回実施する。

② 平板培養法との相関¹⁾

a. qPCR法

		平板培養法 (CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
qPCR	陽性	120	257	377
	陰性	3	224	227
計		123	481	604

感度 97.6%、特異度 46.6%、陽性的中率 31.8%、陰性的中率 98.7%、一致率 57.0%

b. EMA-qPCR法(EMA処理 1 回)

		平板培養法 (CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
EMA-qPCR	陽性	113	190	303
	陰性	11	299	310
計		124	489	613

感度 91.1%、特異度 61.1%、陽性的中率 37.3%、陰性的中率 96.5%、一致率 67.2%

(2) LC EMA-qPCR 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、タカラバイオ株式会社から市販されており、各種試薬の取扱説明書に従い実施する。作製した検水の 1,000 倍濃縮液 0.1 mL を 5 分間酸処理し、*Legionella* LC Medium base、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 時間培養する。増菌液 0.1 mL を分取し、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR および LED Crosslinker 12 を用いて EMA 処理を実施する。その後、qPCR 法と同様に DNA を抽出後、qPCR 反応を実施する。

② 平板培養法との相関¹⁾

LC EMA-qPCR法のカットオフ値を 1 CFU/100 mL相当とした場合

		平板培養法(CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
LC EMA-qPCR	≥1	125	82	207
	<1	15	296	311
計		140	378	518

感度 89.3%、特異度 78.3%、陽性的中率 60.4%、陰性的中率 95.2%、一致率 81.3%

(3) LAMP 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、栄研化学株式会社から市販されている。検水の 100 倍濃縮液 2 mL を使用する。Loopamp レジオネラ検出試薬キット E を用いて、取扱説明書に従い、添付の試薬を用いて DNA を抽出後、LAMP 反応を実施する。本試薬には、インターナルコントロールは添付されていない。ただし、以下の方法で、試料中の反応阻害物質の有無を確認することが可能である²⁾。1 検体につき 2 本チューブを用意し、1 本目のチューブには試料水の DNA 抽出液 5 μL と LAMP 法試薬 20 μL を加えて反応液とし、2 本目のチューブには 1 本目のチューブと同様の反応液に陽性コントロール 2 μL をインターナルコントロールとして添加する。冷凍保存した DNA 抽出液を用いて LAMP 反応を実施する場合、95°C で 5 分間加熱し、氷上で急冷後(加熱変性)、LAMP 反応に用いる。

② 平板培養法との相関¹⁾

	平板培養法(CFU/100 mL)		計
	≥10	<10	
陽性	192	141	333
陰性	39	483	522
計	231	624	855

感度 83.1%、特異度 77.4%、陽性的中率 57.7%、陰性的中率 92.5%、一致率 78.9%

(引用文献 6 および 7 を改変)

(4) PALSAR 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、株式会社ファスマックから市販されている。本試薬には、インターナルコントロールは添付されていない。浴槽水、湯口水および採暖槽水を対象とする場合は、検水の 100 倍濃縮液 4 mL を遠心後、上清を除去し、レジオネラ属

菌迅速検出キットを用いて取扱説明書に従い実施する。ただし、溶菌条件は70℃で5分間とする。

シャワー水およびカラン水を対象とする場合は、上述の条件では平板培養法に対する感度が37.5%と低く、一晚培養液で測定することで改善した¹⁾。具体的には、検水の100倍濃縮液4 mLを遠心後、上清を除去し、MWY培地の組成から活性炭を抜いた培地1 mLに懸濁する。36℃で18時間培養後、遠心して上清を除去し、レジオネラ属菌迅速検出キットを用いて取扱説明書に従い実施する。ただし、溶菌条件は70℃で5分間とする。

② 平板培養法との相関^{1,3)}

a. 浴槽水、湯口水および採暖槽水

		平板培養法(CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
PALSAR	陽性	41	40	81
	陰性	8	85	93
計		49	125	174

感度 83.7%、特異度 68.0%、陽性的中率 50.6%、陰性的中率 91.4%、一致率 72.4%

b. シャワー水およびカラン水(一晚培養)

		平板培養法(CFU/100 mL)		計
		≥10	<10	
PALSAR (一晚培養)	陽性	7	11	18
	陰性	0	17	17
計		7	28	35

感度 100%、特異度 60.7%、陽性的中率 38.9%、陰性的中率 100%、一致率 68.6%

3 迅速検査の活用例

迅速検査法は、上記のとおり、様々な用途で利用できると考えられる。ただし、各施設において迅速検査法を導入する際は、それぞれの方法の特性を理解した上で自施設の平板培養法の結果と比較し、どのように利用するかを検討することが望ましい。

(1) 清掃・消毒管理された検水におけるレジオネラ属菌の陰性を確認する場合

日常的に清掃・消毒管理している入浴施設等において、定期的な平板培養検査の結果、レジオネラ属菌が陰性であることを確認している検水において、迅速検査法を用いて、レジオネラ属菌の有無を判定する。この場合の迅速検査は、自治体の条例で定められた水質基準に係る検査ではなく、自主的な検査として実施し、衛生管理状態の確認のための参考値として活用する。qPCR法、EMA-qPCR法、LC EMA-qPCR法、LAMP法、PALSAR法（浴槽水、湯口水および採暖槽水についての

み) が市販されている。

(2) 平板培養法と併用したスクリーニング検査として利用する場合

レジオネラ属菌が検出され、営業を停止している施設・浴槽において、浴槽・配管等の洗浄実施後、迅速な営業再開のために、洗浄効果の確認に利用する⁴⁾。平板培養法と同時に迅速検査法を実施し、迅速検査が陰性であることをもって、一旦営業を再開する。ただし、最終的な陰性の判断は、平板培養法の結果により判定する。平板培養法からレジオネラ属菌が検出された場合は、直ちに営業を停止し、必要な措置を講じる。この場合、患者発生リスクが高まる気泡発生装置の使用は控えるのが望ましい。qPCR法、EMA-qPCR法、LC EMA-qPCR法、LAMP法、PALSAR法(浴槽水・湯口水、採暖槽水についてのみ) が市販されている。

(3) 公衆浴場の水質基準に係る検査として、平板培養法に置き換えて実施する場合

平板培養法との整合性の観点から、迅速検査法のみで水質基準に適合しているか否かを判断する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法(LC EMA-qPCR法)を用いることが望ましい。ただし、検査法は、各自治体の条例等で規定されている場合があるため、事前に確認する必要がある。過去の検討結果⁵⁾から、LC EMA-qPCR法はカットオフ値を1 CFU/100 ml相当とした場合に、平板培養法に対する感度を約9割に保ったまま8割以上の一致率を示したため、カットオフ値1 CFU/100 ml相当で判定する。

(4) レジオネラ症患者発生時における感染源追究のための検査の場合

レジオネラ症患者の感染源として疑われる検水の検査においては、患者検体から菌が分離された場合、遺伝子型別(PFGE法、SBT法、MLVA法など)により分子疫学的な調査も必要となることから、平板培養法により菌を分離する必要がある。ただし、同時に迅速検査法を実施することで、汚染されている検水を推定することが可能となり、コロニーの選別の際、有用な情報となる。

4 参考文献

1. 金谷潤一，磯部順子，山口友美，武藤千恵子，淀谷雄亮，飯高順子，佐々木麻里，田栗利紹，蔡国喜，川野みどり，倉文明，前川純子：環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価.日本防菌防黴学会誌. 48:515-522, 2020.
2. 枝川亜希子，土井 均，木村明生，田中榮次，肥塚利江，渡辺 功：LAMP法を用いた浴槽水からのレジオネラ属菌検出時における反応阻害確認の必要性. 日本防菌防黴学会誌, 37:3-8, 2009.
3. 金谷潤一，磯部順子，山口友美，武藤千恵子，淀谷雄亮，中筋愛，吉崎美和，塩崎晋

啓, 水谷幸仁, 村尾拓哉, 森中りえか, 小澤賢介: 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. 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2年度総括・分担研究報告書, 2021(印刷中).

4. 浅野陽子: 核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について, 生活と環境, 52, 89-91, 2007.
5. 磯部順子, 烏谷竜哉, 佐々木麻里, 八木田健司, 山口友美, 武藤千恵子, 飯高順子, 淀谷雄亮, 金谷潤一, 浦山みどり, 田栗利紹, 緒方喜久代, 原口浩幸, 森中りえか, 泉山信司: レジオネラ属菌迅速検査法の評価. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「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25~27年度総合研究報告書, 53-60, 2016.

別表 各種迅速検査法一覧

方法	試薬 メーカー	検出する核酸	検水濃縮後の 所要時間	特徴	反応阻害の確認	検水での活用例
qPCR法	タカラバイオ 株式会社	レジオネラ属菌の 16S rRNA遺伝子	約2.5時間	・死菌DNAも検出	・試薬にインターナルコントロールが添加されている	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及
EMA-qPCR法	タカラバイオ 株式会社	レジオネラ属菌の 16S rRNA遺伝子	約3.5時間	・EMA処理により、死菌DNAのPCR増幅を阻害	・試薬にインターナルコントロールが添加されている	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及
LC EMA-qPCR法	タカラバイオ 株式会社	レジオネラ属菌の 16S rRNA遺伝子	約21時間	・液体培地による前増菌培養とEMA処理を組み合わせ、生菌を選択的に検出	・試薬にインターナルコントロールが添加されている	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及、水質基準適合 判断*
LAMP法	栄研化学 株式会社	レジオネラ属菌の 16S rRNA遺伝子	約2時間	・死菌DNAも検出	・インターナルコントロールは添付されていない ・反応液に陽性コントロールを添加して確認する方法が報告されている	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及
PALSAR法	株式会社 ファスマック	レジオネラ属菌の 16S rRNA	約5時間	・16S rRNAを直接検出 ・特別な反応装置や検出機器が不要 ・遺伝子を増幅しないので増幅産物によるコンタミネーションが無い	・インターナルコントロールは添付されていない ・検討した報告はない	陰性確認、スクリーニング、 感染源追及

*検査法は、各自治体の条例等で規定されている場合がある。

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	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所	
研究協力者	高橋直人	静岡市環境保健研究所	

研究要旨：MLVA 法は、その特性として、安定性・迅速性・比較の容易性から、利便性の高い分子タイピング法となっている。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、Miseq および MinION を用いて、12 株の完全長配列を決定し、計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 領域について詳細に解析し特徴づけを行った。その結果、フラグメントが検出されない菌株の中には、リピート領域は存在しているが、primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域の存在が明らかになった。一方で、Intermediate-size として扱っていた MLVA 領域は、リピート領域が始まる上流の長さが短くなっていた。さらに、最後のリピートの長さも短くなっていることが明らかとなった。

さらに、PFGE、MLVA、SBT で相違が見いだされた 1 つの集団事例に由来する株について、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、PFGE、SBT、MLVA のタイピングでは、SNP 数 300 個程度の菌株間を clonal complex として認識されていると考えられた。また、コアゲノム SNPs 解析では、SBT、PFGE それぞれの手法の結果を反映した系統樹となっていた。また、Miseq リードデータやコンティグ配列から ST を決める方法を確立し、2927 個の ST のプロフィールのデータベースに更新した。

A. 研究目的

感染源の特定には、レジオネラ症患者からの分離株と感染源と推定される環境分離株の遺伝子型を比較し、遺伝子型の一致

を確認する必要がある。その際に用いられる方法として主流になっているのが、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）や世界的に普及している SBT（Sequence

based typing) 法である。SBT法は、7つの遺伝子 (*flaA*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) のシーケンスを行い、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領域によってリポ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。

今年度は、MiseqおよびMinIONを用いて、12株の完全長配列を決定し、計算上推測されるフラグメントの大きさから外れるMLVA領域について詳細に解析し特徴づけを行った。さらに、PFGE、MLVA、SBT

で相違が見いだされた1つの集団事例に由来する菌株について、ゲノム分子疫学を用いて各分子疫学解析手法の解析結果との比較検討を行った。また、Miseqリードデータやコンティグ配列からSTを決める方法を確立し、データベースを更新した。

B. 研究方法

①菌株：完全長配列決定の菌株は、リポート数が0になる株やIntermediate-sizeの株12株を用いた（表1）。

集団事例Aに由来する解析で用いた菌株は、表2の通りである。

②MLVA：Sobralら¹⁾によって報告された12領域（Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31, Lpms33, Lpms34, Lpms35, Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44）を用いた。蛍光標識したプライマーを用いて、4領域を1セットとした3種類のmultiplex PCR-A（Lpms01, Lpms31, Lpms33, Lpms35）、PCR-B（Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms34）、PCR-C（Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44）とした。PCR反応は、QIAGEN Multiplexを用いた。PCR条件は、95°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、Illumina Miseq system を用いてリードデータを取得した。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は kSNP3 を用いて実施した^{3,4)}。

完全長ゲノム配列は、MinION (Nanopore 社) から得られたロングリードと Miseq のショートリードデータを Unicycler により Hybrid assembly して決定した。

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およびデータベースの更新

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。

前年度では、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、得られたアリア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、アリアルが正しくアサインされないケースが稀に存在するという課題があった。

今年度は、*mompS2* の配列にのみマッピングできる pipeline を動かすことができるようにし、7 遺伝子すべてに対応可能となった。また、データベースに登録されている 2927 個の ST のプロファイルのデータベースに更新した。サンガー法で決定した配列でも利用可能となっており、一時的に SBT の web サイトが使用できない状態になっている場合の有用な解析ツールとなった。

(2) MLVA 領域の特徴づけ

計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 型を示した菌株の完全長ゲノム配列を取得し、MLVA 領域周辺構造を解析した。その結果、フラグメントが検出されない菌株の中には、リピート領域は存在しているが、primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領

域 (Lpms31、Lmps01、Lmps13、Lpms39) の存在が明らかになった。

一方で、Intermediate-size として扱っていた Lpms31 領域は、リピート領域が始まる上流の長さが Philadelphia 株と比較して短くなっていた。さらに、最後のリピートの長さも短くなっていた。Lpms03 については、リピート数 7.5 を示した菌株は非特異的な領域が増幅している可能性が示唆された。

(3) 集団事例におけるゲノム分子疫学を用いた PFGE、MLVA、SBT の遺伝子型別の比較

PFGE、MLVA、SBT の相違点が見いだされた集団事例について、ゲノム系統解析を用いて各分子疫学解析手法の解析結果との比較検討を行った。

PFGE において、患者由来株と F20-1 (⑥レーン) と F25 (⑦レーン) 株以外の浴槽水由来株および拭き取り由来株の PFGE パターンは完全に一致した (図 1 A)。拭き取り由来株である F20-1 と F25 は他の菌株と 3 バンド違いであったが、UPGMA による近似性は 86.9% となった。

PFGE を実施した SG1 の 13 菌株の ST は、ST59 とデータベースに存在しない新しい ST の二種類に分かれたが、それらは *neuA* の 1 遺伝子違いであった。ST59 を示した 2 株は同じ浴槽の浴槽水と拭き取り由来であった。MLVA 型は、ST59 の 1 株が 1 領域違いであったが、他の 12 株の MLVA 型は一致した。

環境から分離された SG1 ではない F9-2、

F20-2 の ST、MLVA 型は他の菌株とは異なっていた。

これら 15 株のコアゲノム SNPs の系統解析を行った (図 1 B)。F9-2、F20-2 は、他の菌株と比較して SNP 数が 10000 個以上となり、他の菌株とは系統的に離れた位置にカテゴリズされた。患者由来株は系統的に近い位置に集約された。患者由来株と SNP 数 20 個以内の株が拭き取り由来 F9-1 と F10 であった。患者由来株と同一 ST だが、PFGE で 3 バンド違いだった F20-1 と F25 株は、患者由来株との SNP 数約 300 個であり、PFGE の結果を反映していた。また、ST59 の 2 株も患者由来株との SNP 数は約 300 個であり、SBT の結果を反映した系統樹となった。

D. 考察

MLVA 周辺構造の解析から、フラグメントが増幅されない菌株の中には、リピート領域は存在しているが、primer のミスマッチにより MLVA 領域が増幅されていないことが明らかとなり、primer の改良が必要であると考えられる。一方で、MLVA 領域の中には、Intermediate-size として扱っていた MLVA 領域があったが、リピート領域が始まる前の長さが短くなっており、また、最後のリピートの長さも短くなっていた。このような株は、計算通りのリピート数をとる菌株とは区別する必要があるが、計算通りのリピート数をとる菌株の中にリピート領域が始まる前の長さが異なるような株が存在するののかについては、菌株数を増やし検討

する必要がある。

集団事例における全ゲノム系統解析から、患者由来株と近縁な 2 株 (SNP 数が 20 個以内) は同一の浴槽の拭き取りから分離されており、その浴槽が直接の感染源となっていた可能性が考えられた。コアゲノム SNPs 解析では、SBT、PFGE それぞれの手法の結果を反映した系統樹となっていた。また、この結果から、PFGE、SBT、MLVA のタイピングでは SNP 数 300 個程度の菌株間を clonal complex として認識されていると考えられた。

さらに、Miseq リードデータやコンティグ配列から ST を決める方法を確立し、2927 個の ST のプロファイルのデータベースに更新した。今後も定期的に ST プロファイルを更新する予定である。一時的に SBT の web サイトが使用できない状態になっているが、サンガー法で決定した配列でも利用可能となっており、迅速で有用な解析ツールとなった。

E. 結論

MLVA 領域の中には、primer の再考が必要な領域、Intermediate-size として扱う必要がある MLVA 領域が明らかとなった。

さらに、集団事例におけるコアゲノム SNPs 解析から詳細な菌株間の関連性が明らかとなった。PFGE、SBT、MLVA のタイピングでは、相同性の高い株として認識されるが、コアゲノム SNPs 解析ではそれぞれの手法の結果を反映した系統樹となっていた。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 PFGE、MLVA、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。

また、Miseq リードデータやコンティグ配列から ST を決める方法を確立し、2927 個の ST のプロファイルのデータベースに更新した。

謝辞

今回解析した分離株を分与くださった菊地孝司・小堀すみえ (さいたま市健康科学研究センター)、井上浩章 (アクアス筑波総合研究所)、渡辺祐子 (神奈川県衛生研究所) (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.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

G. 研究発表
なし

表1: 完全長配列決定の菌株

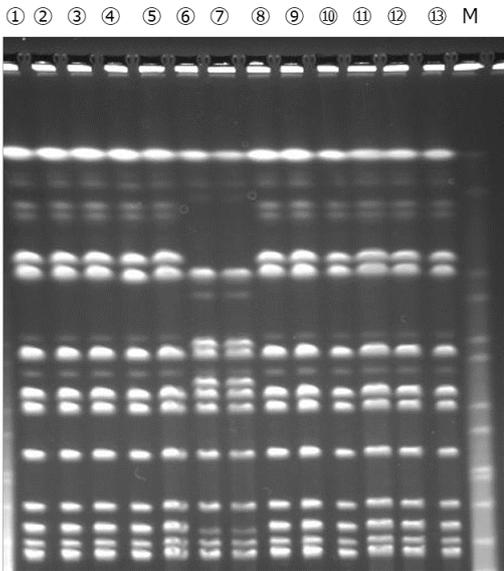
strain ID	SG	ST	Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39	Lpms44
KL06-287	1	1	9.5	7	17	4	2	10	4	7	5	3	14	7
KL10-682	1	1008	9.5	7	17	4	2	10	4	7	5	3	14	7
KL05-209	13	2603	6.5	7	3	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
KL10-685	UT	2603	6.5	7	3	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
KL09-603	1	154	0	0	8	2	0	3	0	7.5	0	3	11	0
KL12-819	7	1422	9.5	7	17	4	2	10	4	7	5	0	14	7
KL09-578	13	2603	6.5	7	3	2	1	0	4	7.5	0	0	0	7
KL09-548	1	598	0	8	8	2	0	0	4	0	0	3	10	0
KL10-679	1	1334	0	0	11	1	0	3	0	7.5	0	0	12	0
NIIB3710	1	507	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	3	20	9
NIIB3758	1	507	16.5	7	25	4	3	5	4	7	5	19	20	9
NIIB3150	1	22	15.5	8	26	5	3	11	4	7	5	19	14	9

表2：集団事例Aにおける菌株のSTとMLVA型

菌株番号	分離場所	SG	PFGE	ST	allele番号										MLVA型									
					<i>flaA</i>	<i>pile</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	Lpm31	Lpm01	Lpm35	Lpm33	Lpm34	Lpm13	Lpm19	Lpm03	Lpm40	Lpm38	Lpm39	Lpm44	
B69	男2浴槽水	SG1	①	59	7	6	17	3	13	11	11	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
F9-1	男4-1ふさ取り	SG1	②	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
F9-2	男4-1ふさ取り	SG5	-	1417	8	6	34	9	2	8	209	15	8	8	3	1	8	0	7	4	0	10	0	
F10	男4-2ふさ取り	SG1	③	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
F14	女4ふさ取り	SG1	④	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
F19	男2ふさ取り	SG1	⑤	59	7	6	17	3	13	11	11	15	8	13	4	1	7	5	8	4	3	10	9	
F20-1	男1ふさ取り	SG1	⑥	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
F20-2	男1ふさ取り	SG8	-	-	2	3	9	10	2	1	-	17.5	7	18	4	3	10	4	7	5	0	22	7	
F25	男8ふさ取り	SG1	⑦	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
SK1	患者2	SG1	⑧	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
SK2	患者3	SG1	⑨	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
S1ぬ	患者1	SG1	⑩	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
S5ぬ	患者4	SG1	⑪	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
S6ぬ	患者5	SG1	⑫	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	
S9ぬ	患者7	SG1	⑬	NT	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9	

*NT：データベースに存在しない新しいST

(A)



(B)

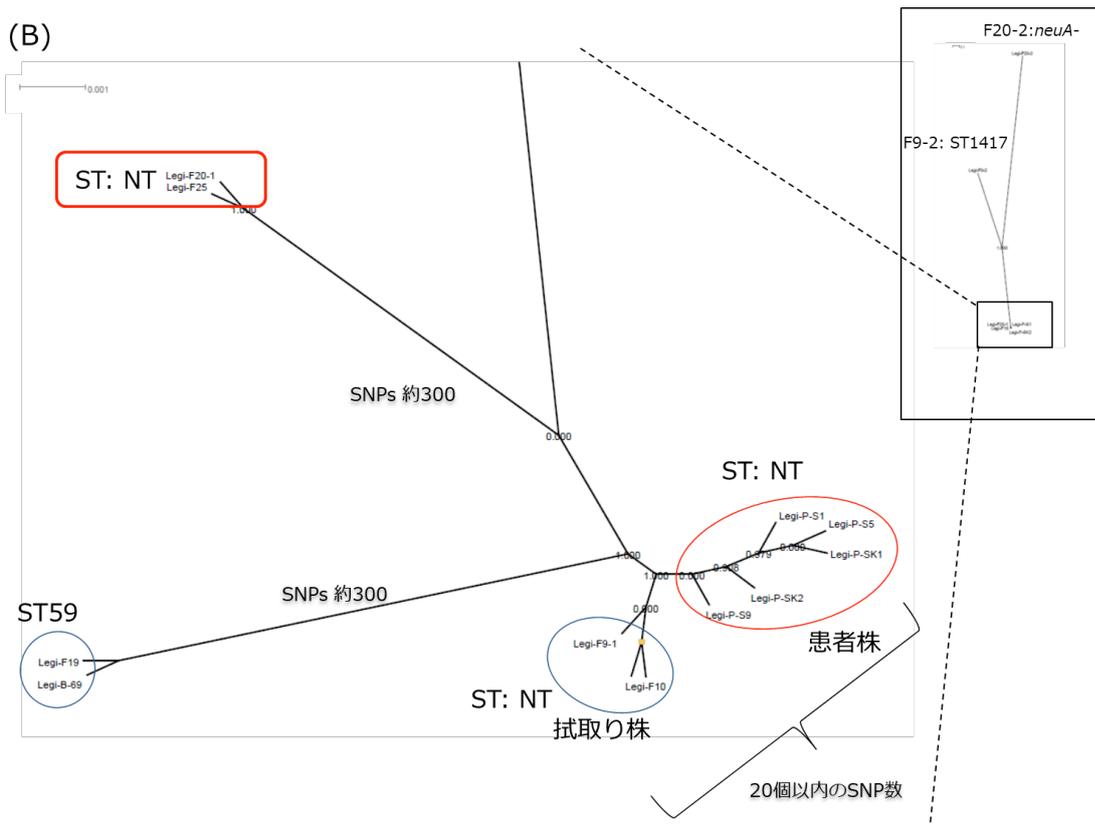


図 1 : (A)集団事例AのPFGE。レーン毎の菌株No.は表2の通り。
(B)コアゲノムSNPsに基づいた系統樹

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2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
研究代表者	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
	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)検査法技術指導、3)検査研修システムの構築について、検討を行う予定だったが、新型コロナウイルスの影響により、予定していた技術指導及び研修会が中止となり、本年度は外部精度管理を中心に、検討を行った。

令和元年9月に「公衆浴場における衛生等管理要領等」が改正され、「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)が出されたが、この通知の中では、精度管理が必須と記載されている。研究班で進める外部精度管理は国内唯一のレジオネラ属菌検査サーベイであり、その重要性は極めて高い。本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、2020年度は公的、民間を問わず全国171の検査機関、180名に対し行われた。研究班への協力として参加した地方衛生研究所等72機関については、独自に集計・解析を実施し、過去5年間の結果とも比較した。6年連続参加した機関は44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。回収率については、判定を開始した2017年度からの推移を見ると、良

好範囲を報告した機関の割合は 2018 年度に大きく上がったものの(74.3%)その他の年では本年度含め 55%前後であった。良好範囲報告機関割合を上げるためには、各機関において検査手技について適切に理解すること、検査担当者間差を無くすこと、検査担当者の異動等に伴う変更に対応すること、などが挙げられる。なお、今回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、より安定した配付試料となるべく引き続き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、今後も実施主体となる民間会社との連携が必要である。

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)検査法技術指導、3)研修システムの構築について、以上を目的とした。

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9月上旬に日水製薬より「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 30 日(金)に締め切られた。その後の日程を、12 月 2 日(水)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)を参加者に向け発送、回答期限 2021 年1月 15 日(金)17 時、結果閲覧開始を2月下旬としていたが、コロナ禍による発送試料到着遅れが見込まれたため、日程を約1カ月変更し、試料発送等を 2021 年1月6日、回答期限を2月 19 日(金)17 時とした。結果については、3月 30 日(火)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)によりログインすることで閲覧可能となった。

<参加機関>

全国 171 の検査機関、180 名に対し実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所等 72 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 72 機関については、独自に集計・解析を実施し、過去5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、濃縮検体は×10)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 10210.1cfu/Ball、上限値 15133.9 cfu/Ball）をレジオネラ属菌検査で使用される、検体 100ml 中の cfu (colony forming unit) に換算すると、下限値 2,050.32、上限値 3026.78 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 の位以下を切り捨て、上限値については切り上げ 2,000 ~ 4,000cfu/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 ~ 12,000cfu/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、2021年 3 月 30 日(火)、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) 検査法技術指導

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、2~3 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う予定としていた。

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い、2021年1月に試行的に研修会を行う予定としていた。

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 72 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(2016-20 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、②共に 72 機関中 69 機関(約 96%)であり、例年通り 90%以上の機関が良好な結果を報告し、過去4年間と比較しても安定した結果が得られていた。また、昨年度はレジオネラ属菌を検出できなかった機関が非濃縮①で 1 機関、②で 2 機関あったが、今年度は全ての機関から検出報告があった。一方、非濃縮①、②共に目標良好範囲外(下限良好範囲未満)の報告をした機関が 2 機関、非濃縮①または②のみ目標良好範囲外(下限良好

範囲未満)の報告をした機関がそれぞれ1機関あった。これらの機関は、試料作成工程の確認、特に試料の混ぜ方について改めて確認する必要があると思われた。また、コンラージ棒での塗抹状況、特にその力加減、使用培地表面の乾燥加減等についても確認する必要があると思われた。最大値については、昨年度は非濃縮②において良好上限を大きく超える回答をした機関が2機関あったが、今年度は良好上限を超える報告はなかった。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3機関あった。これらの機関は、濃縮工程の見直しが急務であり、また、検査工程全体を通してのコンラージ棒での塗抹状況、特にその力加減、使用培地表面の乾燥加減等についても確認する必要があると思われた。

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 44 機関(約 62%)が目標良好範囲を報告していた。一昨年度までは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、昨年度は約 77%、本年度はさらに割合が低く約 62%という結果となった。研究班では、選択分離培地がレジオネラ属菌に対し発育抑制があることをこれまでも報告し²⁾、本供試菌株においても同様であることを報告している^{1,3)}。元々の配付試料の菌数が毎年異なること、その他いくつかの要因が影響している可能性があり、この結果だけで判断することはできないが、昨年度の配付試料から培地の選択剤による感受性が高まっている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。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、72 機関中 39 機関(約 54%:昨年度約 58%)であった。非濃縮①を分母とした場合では、72 機関中 42 機関(約 58%:昨年度約 55%)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、72 機関中 33 機関(約 46%:昨年度約 45 %)であった。本年度の回収率は、どの分母を基準にした場合も昨年度と同程度の結果となっていた。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るが³⁾、改めて過去のデータとの比較を行った。

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(2020 年度)までの回収率の比較(分母:非濃縮②)を表4と図1に示した。2017 年度と本年度を比較すると、回収率1%未満の特殊な区分を除き、ほぼ同様の割合を示した。しかしながら、全体平均値や良好平均値等においては、2017 年度の方が明らかに高い値を示しており、これらについては昨年度と同様の結果であった。また、回収率1%未満の特殊な区分での傾向についても昨年度と同様の結果であった。一方で、回収率 20%未満だった報告値の平均では、2017 年度に近い値であった。これらのことから、本年度の傾向は、2017 年度と2019 年度の両方の要素を持つ結果であった。このような状況においては、2018 年度が特殊な結果に見えるが、昨年度の考察において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あったと報告した。今年度は2017年度同様にこの区分での割合(20.8%)が高かったことから、この区分の機関が来年度も参加することで、良好範囲の機関が増えることを期待したい。

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、昨年度に引き続き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があった。しかしながら、日水製薬及び北海道立衛生研究所における配付試料のサーベイ指定法上での確認実験において、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、2015～20年度の結果判定一覧を示した。ここでは、過去6年間の比較をしやすいするために、2016年度までの報告菌数から見た判定による結果も記載した。6年連続で参加した機関は44機関あった。回収率による判定では、今年度目標良好範囲外を報告したのは39機関あった。このうち16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4年連続で良好範囲外を報告していた機関も4機関あった。一方、2016年度までの報告菌数から見た判定を当てはめた場合、目標良好範囲外の結果を報告したのは36機関あり、うち6年連続が2機関、5年連続が1機関、4年連続が3機関、3年連続が5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6機関あった。

なお、今年度は初参加の機関が8機関、数年ぶりに参加した機関が2機関あり、このような機関が占める比率が例年より高かった。前者では6機関、後者では2機関ともが回収率で目標良好範囲外の結果を報告していた。これらの機関は、適切な手技が行えていなかった可能性が示唆された。

以上、回収率、報告菌数を総合的に見ると、検査結果が安定する方向に向かっている機関もあるが、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、その結果を次に活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た。その際、必ず複数人で検証することが肝要である。なお、安定している、安定傾向にある機関として、6年連続良好な結果を報告している機関が7機関、5年連続が2機関、4年連続が2機関、3年連続が6機関、2年連続が6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、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適切な手技が行えていなかった可能性もあり、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) 検査法技術指導

昨年度同様、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、2〜3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う予定としていたが、コロナ禍の影響により現地に出向いての技術指導を行うことができなかった。

なお、国立感染症研究所がホームページ上で発信している、病原体検出マニュアルにおいて研究班で作成した改訂版「レジオネラ症」が2020年9月に掲載され、詳細な検査法について対応している。また、関東化学株式会社のレジオネラ検査パンフレットに斜光法によるレジオネラ集落観察写真を提供し、広く本法の啓発に努めた。

3) 検査研修システム

これまでの経緯を以下に述べる。過去研究班が関わりながら行ってきた研修会として、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。そこで本年度は、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、本年度試行的に開催できるよう準備を進めていたところであったが、コロナ禍の影響により研修会を中止せざるを得ない状況となった。

なお、関東化学株式会社主催により、研究班員である、緒方喜久代氏、佐々木麻里氏協力のもと、2021年1月27日(水)に、web研修会「レジオネラ症総論と培養法の注意点」が開催されている。

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。回収率、報告菌数を総合的に見ると、検査結果が安定する方向に向かっている機関もあるが、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。良好範囲報告機関割合を上げるためには、各機関において検査手技について適切に理解すること、検査担当者間差を無くすこと、検査担当者の異動等に伴う変更に対応すること、などが挙げられる。北海道においては、令和元年(2019年)9月19日付け生食発0919第8号別添1「公衆浴場における水質基準等に関する指針」第4の2のエの規程(検査の依頼にあたっては、精度管理を行っている検査機関に依頼することが望ましい)及び令和元年(2019年)9月19日付け薬生衛発0919第1号別添「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」3(精度管理)に基づき、「レジオネラ属菌外部精度管理実施要領」を策定し運用を開始している。同様の対応をしている自治体もあると思われるが、未対応の自治体においては検査精度を適正に保つことを目的とした対応が望まれる。現在研究班で進める外部精度管理は国内唯一のレジオネラ属菌検査サーベイであり、その重要性は極めて高い。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考える。

2) 検査法技術指導

コロナ禍の影響により現地に出向いての技術指導を行うことができなかったが、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があり、直接現場で検討会を行うことで、改善に向かう機関はあると

思われる。次年度可能であれば直接現場に向き確認作業を行いたいと考える。なお、今年度病原体検出マニュアルに掲載された、改訂版「レジオネラ症」において詳細な検査法を確認することが可能である。

3) 検査研修システム

実技を伴った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、実現のハードルが高い中、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。今年度はコロナ禍の影響により研修会が中止となったが、改めて次年度試行的に開催できるよう準備を進めたい。

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:検査法の検討: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)「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」平成19～平成21年度総合研究報告書 pp.88-126.
- 3) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成26年度総括・分担研究報告書 pp.77-101.

F. 研究発表

なし

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

2020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「2020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、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.「2020年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」（参考：「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 令和元年9月19日厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知））による検査対応が可能なお施設様

■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	「2020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）。 ■ 2020年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、「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 令和元年9月19日厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）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	200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）

9月上旬	参加募集開始 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)の2020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30日（金）	参加募集締切
12月2日（水）	試料発送 ● 検査試料到着後は直ちに-18~-33℃で保管願います。
12月14日（月）	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。
12月3日（木）～ 1月15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。
1月15日（金）17時	回答締切
2月26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月下旬	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

2020年9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する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

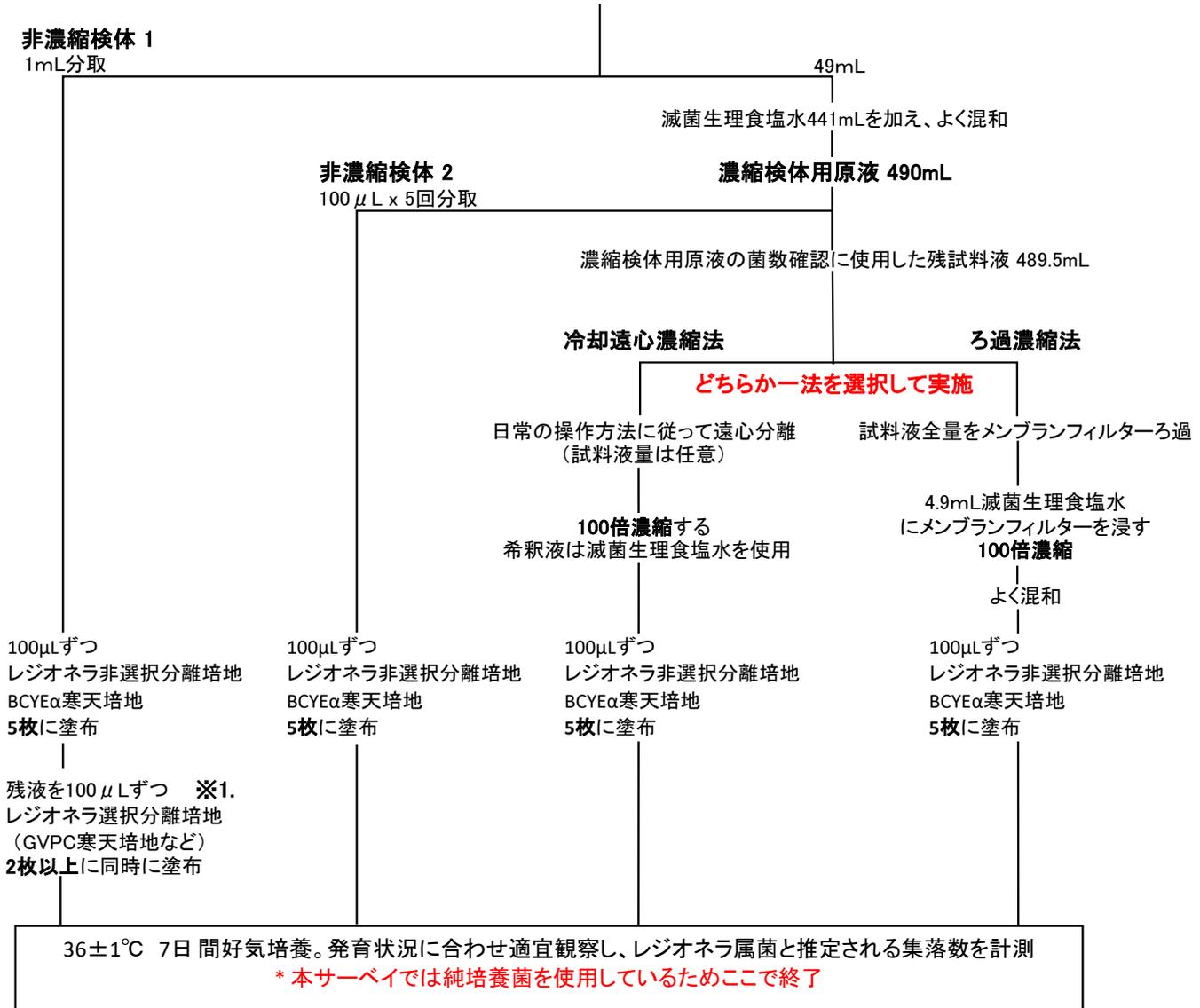
予告なく実施スケジュールが変更となることがあります。変更後のスケジュールは、メール等にてご連絡いたします。

以上

2020 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

参考:「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 令和元年9月19日厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)

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バイアルを加えよく混和



■ 2020年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、「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 令和元年9月19日厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)を参考に、本精度管理サーベイ用に変法したものです。

■ 2020年度サーベイにおいては、濃縮操作や培地接種操作などの手技の精度確認に主眼を置いています。レジオネラ属菌以外の夾雑菌は入っていないため、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。

2020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、2020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、よろしくお願い申しあげます。

謹白

記

1. 送付内容一覧

- ・ 試料送付のご案内（本案内状）
- ・ 試験概要・・ 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
2021年1月7日(木) ～1月8日(金)	■ 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。
2021年2月19日(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2/19 (金) 17時とさせていただきます。
2021年3月29日(月)	■ 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 : 03-5846-5729 FAX : 03-5846-5629 E-mail : legi-srvy@nissui-pharm.jp

2020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の使用法・操作手順

非濃縮検体 1		非濃縮検体 2	ろ過濃縮法	冷却遠心濃縮法
		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	ろ過濃縮法、冷却遠心濃縮法 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、【ろ過濃縮法】または、【冷却遠心濃縮法】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（2020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よく混和します。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 を加えよく混和します。これを【非濃縮検体 2】、【濃縮検体 ろ過濃縮法】または【濃縮検体 冷却遠心濃縮法】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

※【ろ過濃縮法】または【冷却遠心濃縮法】どちらか一方を実施してください。

■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 $500\mu\text{L}$ 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 11 : 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 $0.3\sim 0.9\times 2\sim 20\mu\text{m}$ 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 $0.45\mu\text{m}$ 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 $0.2\mu\text{m}$ と規定されている。

■参考情報 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 令和元年 9 月 19 日 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)より抜粋

- ・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 $0.20\mu\text{m}$ 又は $0.22\mu\text{m}$ 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) 各施設の方法で洗浄・混和し、100 倍濃縮液とします。

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。

- (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

■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 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 令和元年 9 月 19 日 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)より抜粋

- ・遠心加速度 $6,000\text{g}$ で 10 分又は $3,000\text{g}$ 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 13：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 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。

■ 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

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。

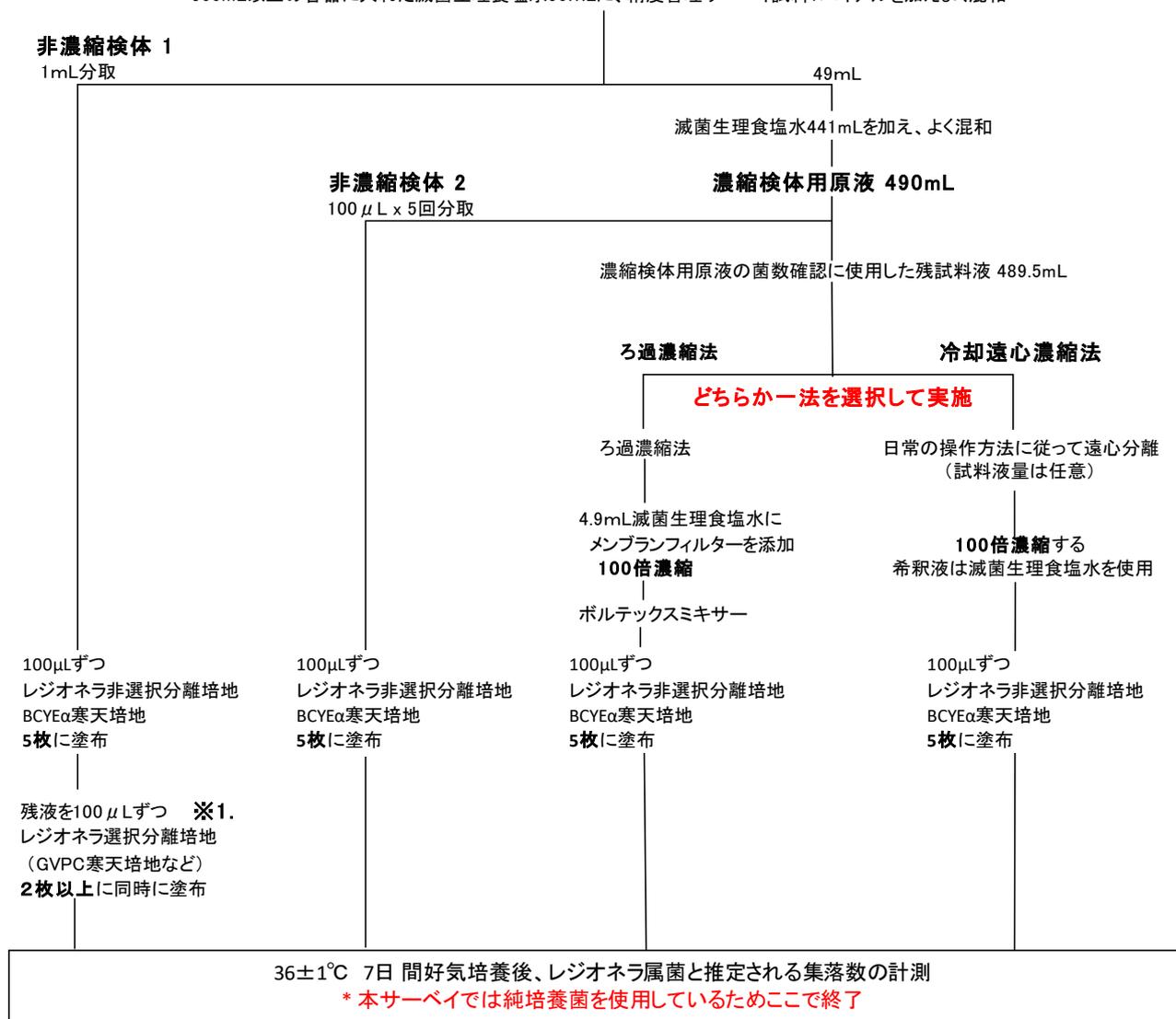
注 15：同じ PC で複数の方が入力・確認を行う際には、ユーザー毎に作業完了後、一度ブラウザを全て閉じ、再度結果入力画面にアクセスし、ログインしてください。表示されている内容が試験担当者ご本人のものであるかご確認ください。



2020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バイアルを加えよく混和



■ 2020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。2020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。

2020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。

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 令和元年 9 月 19 日 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)

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

病原体検出マニュアル 2020 (国立感染症研究所) その他

(2) 日常の検査法は何を採用していますか。

非濃縮 ろ過濃縮法 冷却遠心濃縮法

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

■2020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

WYO 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

バイオメリュー・ジャパン

極東製薬工業

メルク

その他

--

□濃縮検体

【ろ過濃縮法】もしくは【冷却遠心濃縮法】どちらか一方を実施してください。

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

(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) 混和方法は何をされましたか。

手で混和 ボルテックスミキサー等の攪拌機器 (機器名)

(8) 混和時間は何分行いましたか。

分

■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

以上

2020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、1月14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： 2021年 1月 日

貴施設名	
ご所属部署	
ご担当者名	(印)
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	2620	740	2800	1512		41	2360	500	2500	472	
2	1660	480	2800	454		42	3000	1050	2800	138	
3	4120	1150	3600	590		43	2500	650	1800	1258	
4	520	450	1400	192		44	4120	1250	5000	1944	
5	5900	1733	6600	2444		45	3020	700	1600	406	
6	2880	575	2200	604		46	3640	500	4600	1104	
7	1100	333	800	32		47	3740	1300	4600	72	
8	1960	750	1800	252		48	3320	600	1600	830	
9	1500	540	2000	422		49	1860	375	1800	838	
10	3360	1540	2400	96		50	3740	1633	5800	838	
11	2660	275	3800	0		51	3440	1100	3200	1632	
12	3100	950	3400	476		52	2580	300	2200	788	
13	1440	200	1600	440		53	3380	1575	3600	1164	
14	2500	67	2400	958		54	3960	600	4800	492	
15	4400	600	5600	1708		55	2800	500	1800	94	
16	2280	100	1200		4	56	3780	650	3200	1008	
17	1460	300	1800	134		57	2480	600	2800	650	
18	2620	1800	2200		410	58	3080	2750	600	0	
19	3300	1150	4000	246		59	2660	700	4600	752	
20	1180	500	200	0		60	2680	1000	2200	782	
21	2060	650	1600	376		61	2560	825	2400	496	
22	3360	575	5200		234	62	3180	1275	4000	1674	
23	580	75	200	58		63	3560	1600	3600		1354
24	720	150	600	4		64	2800	700	1200	318	
25	4020	1400	3800	766		65	1560	433	2600	1212	
26	3220	450	2400	1246		66	5180	733	4400	844	
27	2920	600	3000	544		67	2520		1200	1342	
28	2620	525	1400	734		68	4340	1467	6600	1383	
29	2980	767	2600	1216		69	5620	900	3800	2264	
30	1500	100	2000	376		70	2680	433	3600	928	
31	3800	1850	6000	1092		71	2860	367	3000	20	
32	3300	880	2800	230		72	360	50	200	12	
33	4040	1500	3000	1330							
34	3300	1375	4200	1230		平均値	2816	805	2904	735	500
35	2200	850	3600	1062		最大値	5900	2750	6600	2444	1354
36	3500	1433	5200	870		最小値	360	50	200	0	4
37	2460	250	4400	1166		中央値	2800	650	2700	692	322
38	1660	1150	2200	484		対象機関	72	71	72	68	4
39	2480	600	2600	136		良好機関	69(96%)	44(62%)	69(96%)		
40	2080	600	2000	734							

* 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比較(2016-20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%
2020	72	96%	62%	96%

* 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	57.7	54	27	18.6	18.1	53	34.4	32.3
2	27.3	16.2	28	28	52.4	54	12.4	10.3
3	14.3	16.4	29	40.8	46.8	55	3.4	5.2
4	36.9	13.7	30	25.1	18.8	56	26.7	31.5
5	41.4	37	31	28.7	18.2	57	26.2	23.2
6	21	27.5	32	7	8.2	58	0	0
7	2.9	4	33	32.9	44.3	59	28.3	16.3
8	12.9	14	34	37.3	29.3	60	29.2	35.5
9	28.1	21.1	35	48.3	29.5	61	19.4	20.7
10	2.9	4	36	24.9	16.7	62	52.6	41.9
11	0	0	37	47.4	26.5	63	38	37.6
12	15.4	14	38	29.2	22	64	11.4	26.5
13	30.6	27.5	39	5.5	5.2	65	77.7	46.6
14	38.3	39.9	40	35.3	36.7	66	16.3	19.2
15	38.8	30.5	41	20	18.9	67	53.3	111.8
16	0.2	0.3	42	4.6	4.9	68	31.9	20.9
17	9.2	7.4	43	50.3	69.9	69	40.3	59.6
18	15.6	18.6	44	47.2	38.9	70	34.6	25.8
19	7.5	6.2	45	13.4	25.4	71	0.7	0.7
20	0	0	46	30.3	24	72	3.3	6
21	18.3	23.5	47	1.9	1.6	平均値	24.7	25.1
22	7	4.5	48	25	51.9	最大値	77.7	111.8
23	10	29	49	45.1	46.6	最小値	0	0
24	0.6	0.7	50	22.4	14.4	中央値	25.7	21.6
25	19.1	20.2	51	47.4	51	有効機関	72	72
26	38.7	51.9	52	30.5	35.8	良好機関	42(58%)	39(54%)

*参考

表4 回収率の比較(分母:非濃縮②、2017-20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
2020	54	25.1	35.8	69.9	20.2	32.3	9.5

図1 回収率の比較(分母:非濃縮②)

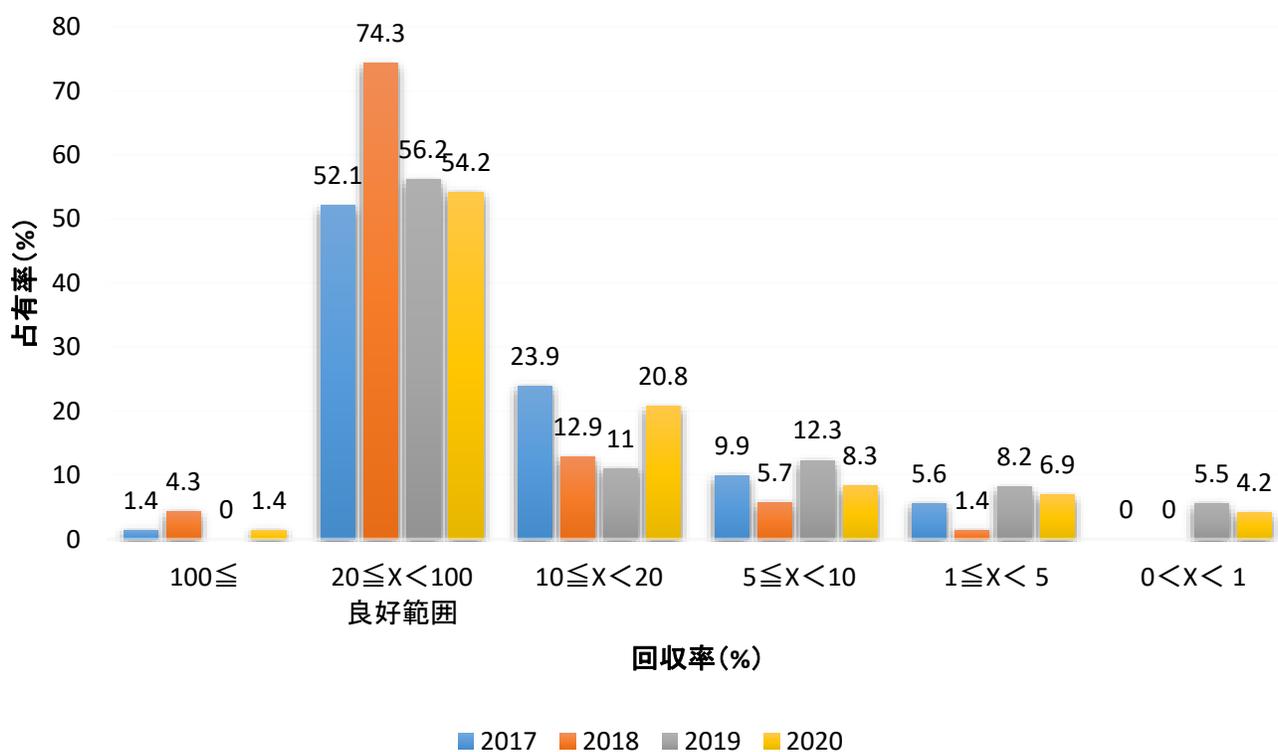


表5 2015~2020年度結果概略(2015/16/17/18/19/20、良好範囲(菌数○、回収率(分母非濃縮② 2017~)黒字)、範囲外(菌数*、回収率(2017~)赤字、検査項目外又は不参加-)

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

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2年度分担研究報告書

「入浴施設の衛生管理及び疫学調査ガイドライン作成」

研究代表者	前川純子	国立感染症研究所
○ 研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学
○ 研究分担者	佐々木麻里	大分県衛生環境研究センター
研究分担者	森本 洋	北海道立衛生研究所
研究分担者	金谷潤一	富山県衛生研究所
研究分担者	中西典子	神戸市環境保健研究所
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	大森恵梨子	仙台市衛生研究所
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	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所
研究協力者	磯部順子	富山県衛生研究所
研究協力者	平塚貴大	広島県衛生研究所
研究協力者	藤江香子	愛媛県今治保健所
研究協力者	浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター
研究協力者	倉 文明	国立感染症研究所
研究協力者	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	斉藤利明	株式会社ヤマト
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	縣 邦雄	アクアス株式会社

公衆浴場や旅館等の入浴施設の衛生管理に関する指導は「レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針」（指針）、「公衆浴場における衛生等管理要領」（管理要領）並びに「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」（マニュアル）を参考にして行われ、入浴施設においては指導に基づいて施設の衛生管理を実施している。これらの指針、管理要領とマニュアルには日常の衛生管理の具体的な記載が少ないため、より具体的で実践的な内容の解説の要望があった。そこで、公衆浴場等で行われている衛生管理を計画的、体系的に行うための体制づくりに資する

ための総合衛生管理プログラムを記述したパートと、公衆浴場の浴槽並びに関連設備の具体的な衛生管理を記述した一般衛生管理のパートからなるガイドラインを作成した。また、わが国のレジオネラ症の発生には入浴施設が大きく関わっていることから、レジオネラ症発生時に患者発生と施設の関連性を適切に調査し、感染症の拡大を防ぐことは公衆性状の重要な課題である。患者調査とともに入浴施設の環境調査を迅速・的確に行うには、レジオネラ症に関する知識や情報とともに、調査に適した手法が求められる。そこで、入浴施設が関連するレジオネラ症発生時の調査の実施をサポートするガイドラインを作成した。

A. はじめに

わが国では入浴施設が関連したレジオネラ症の発生を減少させることが公衆衛生上の重要な課題となっている。そこで、「レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針」(指針)、「公衆浴場における衛生等管理要領」(管理要領)並びに「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」(マニュアル)が厚生労働省から発出され、入浴施設の衛生管理はこれらを参考にして行われている。

上記の指針、管理要領あるいはマニュアルには衛生管理に関する具体的な記述が少ない。自治体の指導の現場では、入浴施設の設備の概要や洗浄・消毒といった管理手法が具体的で実践的な内容が記載されたガイドラインやマニュアルが求められていた。

上述のように、わが国では入浴施設がレジオネラ症発生の主要な関連施設となっている。そのため、レジオネラ症の発生時には入浴施設の環境調査がしばしば実施されるが、その調査を迅速・的確に行うことで感染症発生の原因を究明し、感染の拡大を食い止めることが可能となる。しかし、こうした調査にはレジオネラ症に関する知識や情報とともに、調査に適した手法が求められる。

本研究では、令和元年度にこれまでの厚

生労働科学研究の成果や水環境に関するガイドラインを参考にして、公衆浴場の衛生管理に関するガイドラインを、また自治体が独自に作成したレジオネラ症発生時の調査要領等を参考にして作成した。令和2年度は、令和元年度に作成したガイドラインの内容を向上することを目的に検討を行った。

B. 方法

本研究では昨年度に続き、「入浴施設における衛生管理ガイドライン(案)」(以下、衛生管理ガイドライン案)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(案)」(以下、調査ガイドライン案)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ワーキンググループを形成した。各ガイドラインの内容はワーキンググループで検討した。

令和元年度に作成したガイドライン案を当研究班の分担研究者及び研究協力者に配付するとともに、所属する自治体の環境衛生担当者や感染症担当者に提示し、項目・内容・使い勝手等に対する意見を求めた。寄せられた意見に基づいてガイドライン案の内容を修正し、さらに修正案をワーキンググループに諮り、修正を加えた。

C. 結果および考察

衛生管理ガイドライン案を別添ガイドライン1に示した。このガイドラインは総合衛生管理プログラムと一般衛生管理の2つのパートで構成している。

総合衛生管理プログラムのパートでは、レジオネラ属菌による汚染を防ぐために衛生管理を計画的に実施し、その効果を評価して向上・改善する体制を確立する試みとして、衛生管理プログラムを提案した。

一般衛生管理のパートは、「衛生等管理要領」並びに「対策マニュアル」を基にして、より具体的な管理方法を記述することに注力するとともに、図を多用してわかりやすいガイドラインの作成を行った。例えば、「衛生等管理要領」ではシャワーの管理について、「少なくとも週に1回、内部の水が置き換わるように通水、シャワーヘッドとホースは6か月に1回以上点検し、内部の汚れとスケールを1年に1回以上洗浄、消毒」と記述されているが、ガイドライン案では「毎日営業終了後に通水する」、「月に1~2回、遊離残留塩素濃度が10~50mg/Lの液に1~3時間漬け置く」などの具体的な消毒方法を紹介した。

調査ガイドライン案は別添ガイドライン2のとおりである。ガイドライン本文に、「別添1患者調査票」、「別添2施設調査票」、「別添3持ち物チェックリスト」を加えて構成した。レジオネラ症が弧発事例であっても集団発生であっても第一報からの調査方法に違いはなく、弧発事例であっても詳細な施設調査を行う場合もあるため、本ガイドラインの名称について、令和元年度案から「集団発生時」の文字を削除し、令和2年度から「公衆浴場等入浴施設が原因と疑

われるレジオネラ症調査ガイドライン」(案)とした。

ガイドライン本文について、「1.届出の受理」の項に臨床検体や患者由来菌株を確保することについて「3.患者由来株の収集」の項とは別に記載した。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、患者由来のレジオネラ属菌株を収集することが望まれる。しかし、実際には検体採取前に治療が開始されてしまい患者由来株を確保できないことが多いので、届出の段階で注意を促すために記載した。「4.施設の調査」、「5.施設のレジオネラ属菌検査」の内容は、実際に調査等を実施している保健所の意見を取り入れ、項目の追加・削除を行った。ATP簡易測定キットについて、ふき取り方法や目安の注釈を付けた。また、調査者の感染防止の観点から、冒頭に感染防止対策についての記載を加えた。「6.検査結果の解釈」については、検査結果が絶対との誤解を招かないよう表現を変更した。

施設調査票については大幅に変更した。令和元年度の施設調査票案では、単語で調査項目を列挙し、調査結果を記録する方式をとった。ベテラン監視員であれば、その調査記録から問題点をあぶり出すことが可能であるが、新人監視員は問題点がどこなのか気づきにくいことが考えられた。本ガイドラインは調査のノウハウが少ない保健所を対象に作成していることから、どういう観点から当該項目の調査をしているかが分かるように、調査項目を文章で記載するという方式に改めた。当研究班所属自治体で使用されている調査票のうち、この方式を

採用していた富山県の調査票を基にして項目を加えて作成した。また、調査項目の説明を調査票の印刷範囲外に記載し、調査の一助となるよう工夫した（図1）。

レジオネラ症に関する行政の調査は主に保健所が行うが、人員削減に加え頻繁な人事異動のために調査技術の継承に困難を生じている。本調査ガイドライン案は、調査手法の一例を示し、レジオネラ症発生時の原因究明に資するものとする。当研究班内外からさらなる意見を取り入れ、改良していきたい。

D. まとめ

令和2年度の研究活動では、令和元年度に作成したガイドライン案の内容に対する意見や要望、質問を集め、それらを参考にして修正した。衛生管理ガイドライン案は総合衛生管理プログラムと一般衛生管理の2つのパートで構成し、総合衛生管理プログラムのパートでは衛生管理を計画、実施、評

価、改善を行うことができる体制の確立を目指し、衛生管理プログラムを提案した。一般衛生管理のパートでは、衛生管理の具体的な内容にするとともに、図を追加した。調査ガイドラインでは、名称を「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査ガイドライン」に修正した。さらに、保健所等からの意見を取り入れて本文の追加や削除を行い、施設調査票を大幅に変更した。本研究で作成するガイドラインが、保健所による入浴施設の指導での参考として活用され、またレジオネラ症発生時の原因究明に資することができるように、さらに改良を進めていきたい。

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

入浴施設の衛生管理ガイドライン

はじめに

入浴施設の衛生管理は、「レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針」、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」、「公衆浴場における衛生等管理要領」並びに「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」に基づいて行われています。このガイドラインは、これらの指針・要領等の内容をより具体的でわかりやすく、かつ実践的な内容を示すことを目指して作成しました。自治体が行う衛生管理指導や入浴施設での日常の衛生管理において参照されることが望まれます。

このガイドラインは、入浴施設でのレジオネラ属菌の増殖を抑え、それにより患者の発生を防ぐことを目的とした衛生管理に主体を置いており、総合衛生管理プログラムと一般衛生管理の2部構成になっています。総合衛生管理プログラムでは、入浴施設においてレジオネラ属菌の増殖・定着を防ぎ、これによりレジオネラ症患者の発生を予防するための衛生管理体制を構築するのに必要な事項を示しています。一般衛生管理は、入浴施設の設備等の衛生管理の実際の内容を具体的に示しています。総合衛生管理プログラムの実施は一般衛生管理が適切に行われていることが前提になっています。レジオネラ属菌の増殖・定着のない望ましい衛生状態を維持・向上させるために、総合衛生管理プログラムと一般衛生管理の両方を進めることが望まれます。

目次

用語

I. 総合衛生管理プログラム

1. 総合衛生管理プログラムとは
 2. 総合衛生管理プログラムの作成
 - ステップ1 衛生管理の適切な進め方を決めるためのチームの編成
 - ステップ2 施設・設備の確認
 - ステップ3 レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定
 - ステップ4 重点的に衛生管理を実施する場所とモニタリング法の決定
 - ステップ5 基準を外れた際の対策の決定
 - ステップ6 総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認
 - ステップ7 総合衛生管理プログラムの記録等の作成
 3. 衛生管理の実施
 4. 衛生管理の判定・評価
 5. 判定・評価に基づく管理の修正・改善
 6. 修正・改善した衛生管理の実施
- 参考資料

II. 一般衛生管理

1. 全般
2. 原水、原湯
3. 貯湯槽
4. 補給配管
5. 湯口
6. 浴槽
7. 浴槽水
8. 循環配管
9. ろ過器
10. 水位計及び水位計配管
11. 集毛器
12. 循環ポンプ
13. 消毒装置
14. 加熱器（熱交換器）
15. オーバーフロー回収槽

16. 気泡発生装置等
17. 連通管
18. 調節箱
19. シャワー、打たせ湯
20. 上がり用湯、上がり用水
21. 排水

用語

このガイドラインで使用する用語は、公衆浴場における衛生等管理要領（衛生等管理要領）に準じています。衛生等管理要領で定義を示されていない用語も併せて以下に示します。

「原湯」とは、浴槽の湯を再利用せずに浴槽に直接注入される温水を指します。

「原水」とは、原湯の原料に用いる水及び浴槽の水の温度を調整する目的で、浴槽の水を再利用せずに浴槽に直接注入される水を指します。

「上がり用湯」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた湯栓から供給される温水を指します。

「上がり用水」とは、洗い場及びシャワーに備え付けられた水栓から供給される水を指します。

「浴槽水」とは、浴槽内の湯水を指します。

「貯湯槽」とは、原湯等を貯留する槽（タンク）を指します。

「ろ過器」とは、浴槽水を再利用するため浴槽水中の微細な粒子や繊維、ごみ等を除去する装置を指します。

「集毛器」とは、浴槽水を再利用するため、浴槽水に混入した毛髪や比較的大きな異物を捕集する網状のかご（ストレーナー）が設置された装置を指します。

「調節箱」とは、原湯と水を混ぜて洗い場の湯栓（カラン）やシャワーに送る湯の温度を調節するための槽（タンク）を指します。

「循環配管」とは、湯水を浴槽とろ過器等との間で循環させるための配管を指します。

「循環式浴槽」とは、温泉水や水道水の使用量を少なくする目的で、浴槽の湯をろ過器等を通して循環させる構造の浴槽を指します。

「補給配管」とは、原湯や原水等を浴槽に補給するための配管を指します。

「湯口」とは、原水または原湯が浴槽に入りを指します。

「水位計」とは、浴槽水の水位を計測する装置を指します。

「循環ポンプ」とは、循環式浴槽の浴槽やろ過装置等に湯水を循環させるためのポンプを指します。

「消毒装置」とは、循環配管に接続して消毒剤を注入するための装置を指します。

「加熱器（熱交換器）」とは、ボイラー等温水器からの温水または浴槽の排水（排熱）を熱源として補給水や循環水と熱交換する装置を指します。

「オーバーフロー回収槽」とは、浴槽からのオーバーフロー水を回収し、再利用する装置を指します。

「気泡発生装置等」とは、浴槽で気泡を発生させるための装置を指します。

「連通管」とは、浴槽間をつなぐ配管を指します。

「シャワー」とは、入浴者に湯水を当てるために湯水を多数の細かい穴から噴出させる装置を指します。

「打たせ湯」とは、入浴者に湯水を当てるために高い位置から湯水を落とす装置を指します。

I. 総合衛生管理プログラム

1. 総合衛生管理プログラム^{注)}とは

入浴施設における衛生管理を組織的・計画的に行うためには、そのための体制を作ることが必要です。ここで説明している総合衛生管理プログラムとは、衛生管理の体制を確立するために実施すべき事柄をリスト化し、これを順番に実施していく業務計画です。

総合衛生管理プログラムを適正に進めるために次の図のように5つの段階に分けて説明しています。

注：ここで紹介する総合衛生管理プログラムは米国疾病管理予防センター（CDC）が発行した”Developing a water management program to reduce *Legionella* growth & spread in buildings A practical guide to implementing industry standards “
<https://www.cdc.gov/legionella/wmp/toolkit/index.html> を参考にしています。この総合衛生管理プログラムは HACCP の考え方を模していますが、HACCP とは異なるプログラムです。したがって、入浴施設に総合衛生管理プログラムを導入する際に HACCP の手法をそのまま使うことは控えてください。

日常の一般衛生管理を行うだけであり、① 衛生管理の進め方に計画性がない、② 問題発生時の対応が決まっていない、③ 衛生管理の効果を評価しない（衛生管理が適切に行われているかどうか分からない）、④ 課題があっても改善されない、⑤ 問題発生時の責任の所在があいまいになる（たらい回しにする）、⑥ 衛生管理に関する情報が共有されていない、といったことの全てあるいはいずれかが施設内で起きている可能性があります。これにより突然問題（例えばレジオネラ属菌の増殖）が発生・顕在化し、慌てることになりかねません。

総合衛生管理プログラムを導入する利点として以下の事項が挙げられます。

- 1) チームを編成することにより、入浴施設全体で衛生管理に取り組む体制が構築され、管理方法をチームが様々な観点を配慮して決めることで上意下達にならずに衛生管理のスムーズな運用が期待される。
- 2) チームを編成することにより、衛生管理に関する情報を共有し、責任の所在を明らかにすることができる。
- 3) 衛生管理を計画的に進めることができる。
- 4) 重点的に管理・監視する場所を設定することで効率的な管理を行うことができる。
- 5) モニタリングによる監視を行うことで異常の迅速な探知と対応を可能にする。
- 6) プログラムの評価と改善を行うことで管理状態の維持・向上を可能にする。

総合衛生管理プログラムの流れ

1. 総合衛生管理プログラムの作成

総合衛生管理プログラムの体制をどのように作るか、それをどのように進めていくかを1)～7)の7つのステップで決めていきます。

- 1) 衛生管理の適切な進め方を決めるためのチームの編成
- 2) 施設・設備の確認
- 3) レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定
- 4) 重点的に衛生管理を実施する場所とモニタリング法の決定・確認
- 5) 設定値等を外れた際の対策の決定
- 6) 衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認
- 7) 衛生管理プログラムの記録等の作成

2. 衛生管理の実施

総合衛生管理プログラムに基づき一般衛生管理とモニタリングを行います。

3. 衛生管理の判定・評価

チームは定期的にあるいは必要に応じて総合衛生管理プログラムの効果の判定・評価を行います。

4. 判定・評価に基づく管理の修正・改善

一般衛生管理の内容や総合衛生管理プログラムの体制あるいは内容等の変更の必要が生じれば協議を行って修正・改善を行います。

5. 修正・改善した総合衛生管理プログラムの実施

修正・改善を行った内容に従って総合衛生管理プログラムを実施します。

第1段階として総合衛生管理プログラムを作成し、第2段階として実際に運用を始め、第3段階(判定と評価)、第4段階(修正と改善)、第5段階(修正・改善した内容の実施)と進めていきます。第5段階から第3段階に戻って進めていきます。

2. 総合衛生管理プログラムの作成

入浴施設でのレジオネラ対策は、担当者が衛生管理に関する個々の業務を決められたとおりに行っているだけでは十分とは言えません。安全で安心できる入浴施設を運営するためには、施設の運営に携わる多くの関係者が協力・連携して業務にあたることがとても重要です。

ステップ1 衛生管理の適切な進め方を決めるためのチーム^{注1)}の編成

入浴施設の総合衛生管理プログラムの作成をチームを編成して行うことが非常に重要です。その役割は、次のとおりです。

- ① 衛生管理の進め方や計画を作成し、決める。
- ② 衛生管理の状況を把握し、情報を共有する。
- ③ 衛生管理上の問題発生を迅速に把握し、改善する。
- ④ 決められた衛生管理の評価を行い、必要に応じて修正・変更する。

チーム編成の1例

チーム責任者（施設管理責任者等）

清掃担当責任者

施設維持管理担当責任者

人事・総務担当責任者

経理担当責任者

接客担当責任者

企画・営業担当責任者

レジオネラ属菌対策・施設管理講習会等の受講者（レジオネラ属菌の知識を持った者）

注1：チームというのは、食品衛生のHACCPに準じた呼称です。部門を横断して管理者や担当者を招集して構成される、上記の役割を持つ集団・グループを指しています。

施設長、衛生管理責任者など、総合衛生管理プログラムを管理・運用できる人をチームリーダーとします。メンバー構成は規模の大きな施設では関連する担当・部門の長や責任者あるいは豊富な経験を有する人などとします。規模が小さい施設では、各部署の代表者をメンバーとするのがよいでしょう。^{注2,3)}

入浴設備の衛生管理に関連する業務や設備の管理業務に携わっているスタッフや衛生管理に関する各種記録の管理を行っているスタッフあるいは清掃・消毒を担当するスタッ

フだけではなく、接客を担当するスタッフや人事・総務のスタッフなど幅広い担当・部門のスタッフがチームに参加するようにすることが推奨されます。人事・総務スタッフはヒューマンエラーの発生や人材の確保に関する経験、接客スタッフは入浴客数や客からの情報、企画スタッフは施設の改修やイベント等の開催情報を持っており、こうしたスタッフが参加することで様々な知識や経験をチームの活動に活かすことができ、実効性の高い総合衛生管理プログラムを作成・運用することができます。レジオネラ属菌に関する勉強会や衛生管理に関する講習会等に参加して知識を持っているスタッフがいたら、そのスタッフも加えます。

チームにおいては共通の目的（レジオネラ属菌の汚染がない安全で安心できる入浴を提供するなど）とその必要性の認識を確認し、施設での衛生管理に関するデータや情報を共有し、連帯して衛生管理の責任を果たすことが求められます。ここで、データとは日々の記録、水質検査結果などであり、情報とはレジオネラ属菌やそれによる疾病、衛生管理に関する技術・手技に関することなどです。^{注4)}

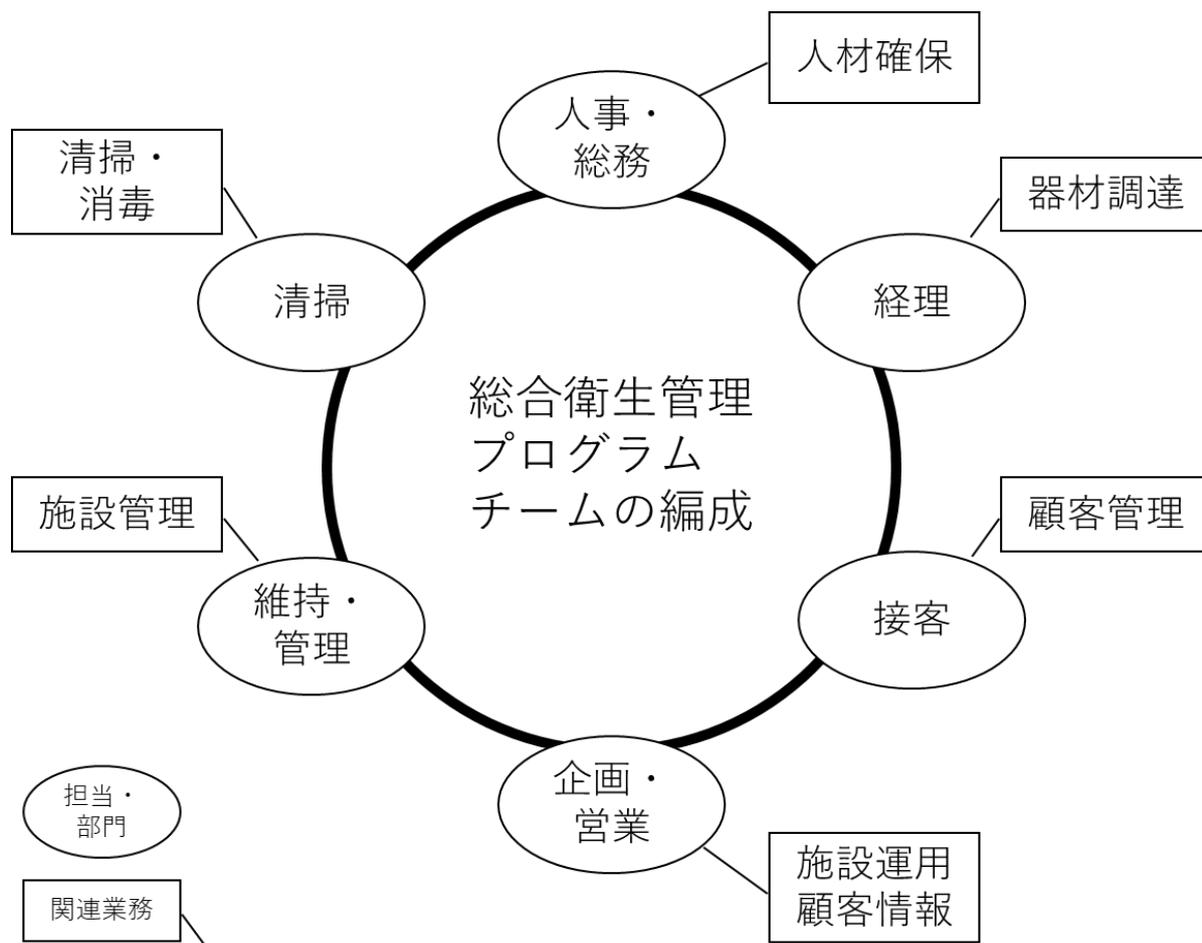
チームのメンバーが決まったら、各メンバーの役割を明確に決め、あるいは再確認を行い、記録しておきます。

注2：チーム編成の目的は、チームのメンバー全員で考え、話し合っ合意のもとに衛生管理の方針や方法を決定し、管理に関するデータや情報を共有して管理の状況や生物膜の形成及びレジオネラ属菌の発生の有無等を把握し、さらに評価を行って必要に応じて改善することです。こうすることで衛生管理を担当者だけの責任とせず、例えば、浴槽水からレジオネラ属菌が検出されたときに、チームの連帯責任として衛生管理の方針や方法等を評価し、改善することになります。

注3：規模が小さく少人数で運営・管理する施設ではチーム編成にこだわる必要はありません。チームを編成する目的は、できるだけ幅広い担当・部門の関係者が衛生管理の進め方に関わることです。したがって、スタッフが10人ほど以下の小さい施設ではチームを作るのではなく、全員で衛生管理について考え、話し合い、決定し、評価することが重要です。

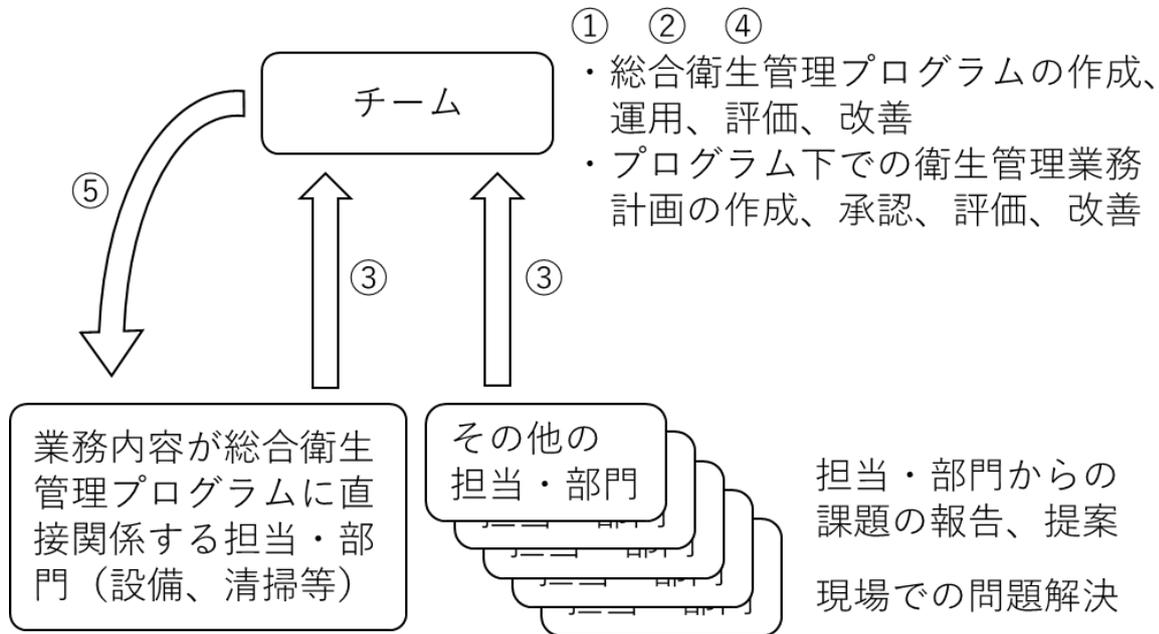
注4：チームのメンバーは日ごろから衛生管理に関する課題や問題を意識し、各担当・部門の担当者と話し合い、その内容をチームが行う衛生管理の進み具合の確認や改善の協議に活かすことが重要です。例えば、各担当・部門で行う業務連絡会や業務報告会において衛生管理について話し合いや報告を行い、その内容をチームでの検討に活かし、総合衛生管理プログラムの改善を行います。こうすることで総合衛生管理プログラムがトップダウンではなく、現場の意見を取り上げてボトムアップで進めることとなります。

ステップ1 総合衛生管理プログラムのチームの編成



- ・ 広い範囲の担当・部門からメンバーを選びます。
- ・ 研修の受講などによりレジオネラ属菌の知識を持っている人もメンバーに加えます。
- ・ 10人以下の小規模の施設では全員がチームに参加します。
- ・ 入浴者に安全で安心できる入浴を提供するなどの目標をメンバーで共有します。
- ・ 各メンバーが持っている知識や経験を活用します。

ステップ1 総合衛生管理プログラムのチームの編成 入浴施設におけるチームと担当・部門との関係



- ① チームは、総合衛生管理プログラムの作成、運用、評価及び改善、並びに総合衛生管理プログラムの下での衛生管理に関する業務計画の作成、承認、改善を行います。
- ② さらにチームは総合衛生管理プログラムや関連する業務計画が適切に進められていることの検証・評価を行います。
- ③ 各担当・部門ごとに日常的に衛生管理に関する課題についての話し合いや報告を行い、その内容をチームメンバーがチームの検討会に持ち寄り、総合衛生管理プログラムの運用や改善に活かします。
- ④ チームは各担当・部門から上がってくる衛生管理に関する報告、要望、意見をもとにして総合衛生管理プログラムの評価や改善を行います。
- ⑤ 総合衛生管理プログラムに直接関係する担当・部門は、チームが決定した衛生管理に関する業務計画等に従って業務を進めます。

ステップ2 施設・設備の確認

施設における原水・原湯から浴槽、排水までの設備の状況を配管図等の図面を参照しながら、チームで現場確認を行います。^{注1,2)}

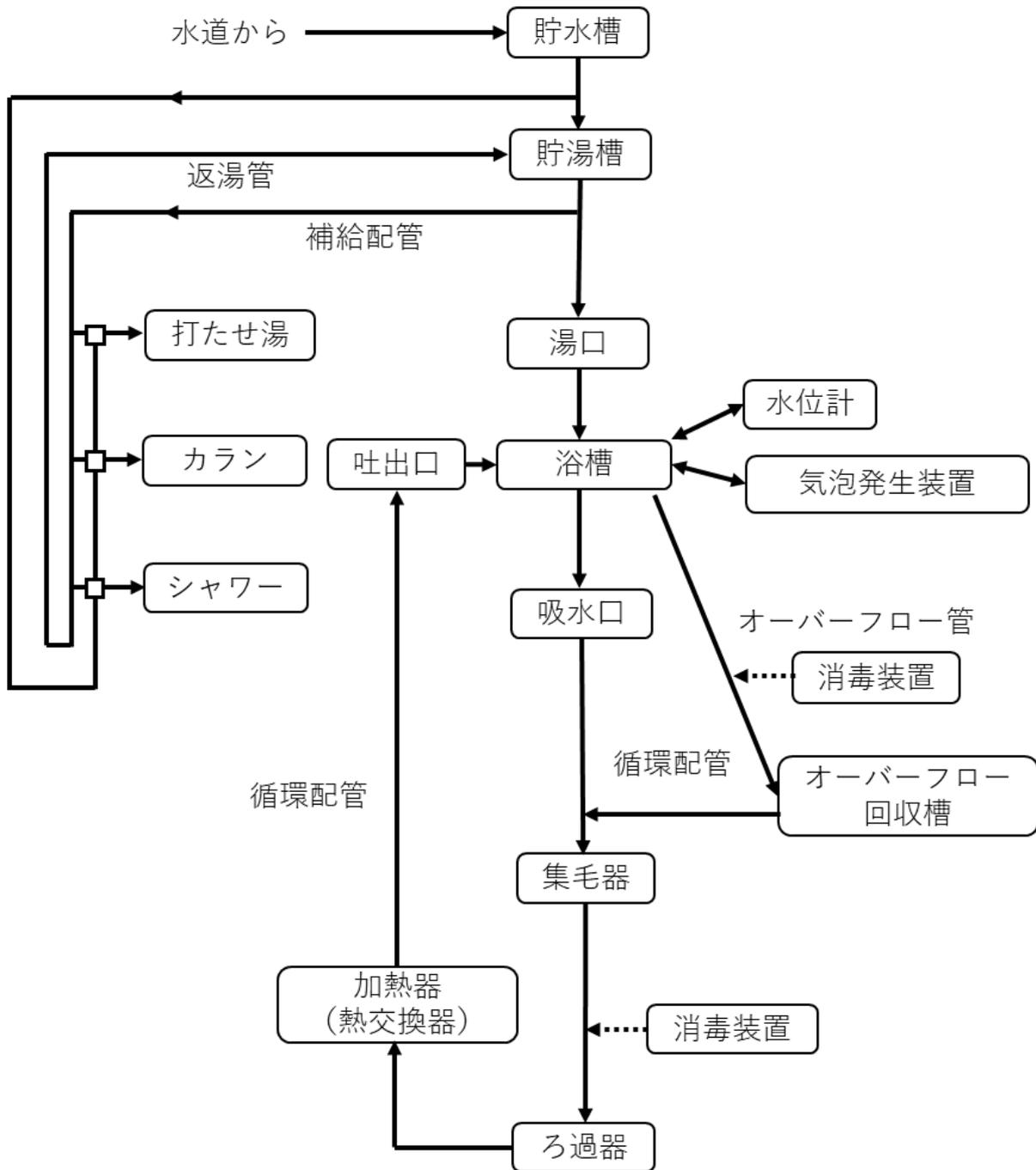
図面での確認は、設備の構造を確認するために重要な工程になります。これにより、ステップ3で衛生管理の方法を決めることや、レジオネラ属菌が増えやすい場所を特定することができます。

施設の配管図は複雑で設備の設置状況を容易に判断することが難しい場合があるので、理解しやすくするために設備と配管を簡単な図（流れ図など）に書き換えることが推奨されます。次頁に1例を示します。

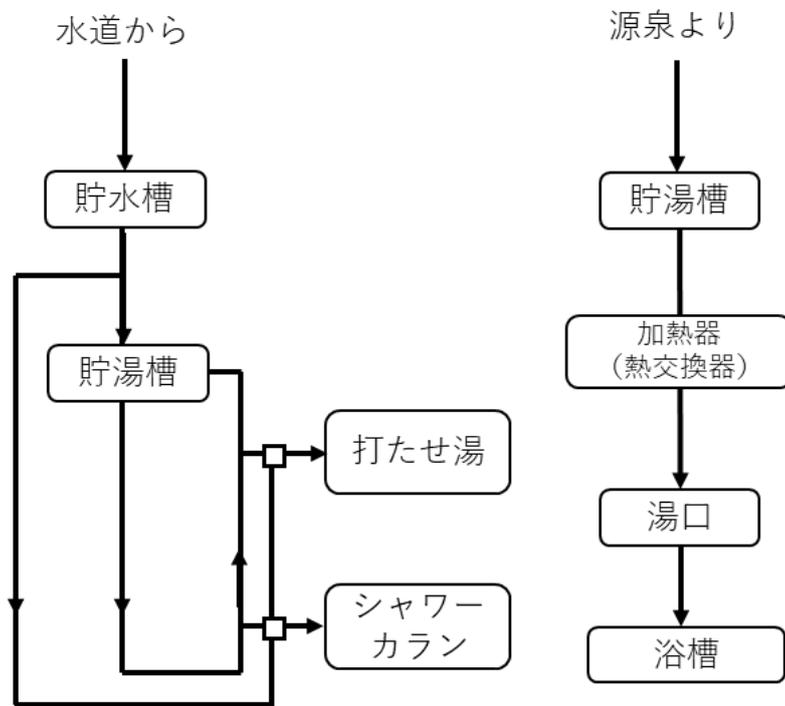
注1：貯湯槽、調節箱、シャワー、カラン、集毛器、ろ過器、消毒剤添加装置、気泡発生装置などの付帯設備や配管の状況等もすべて確認します。また、温泉であれば泉質と湯量、原水との混合状況なども確認します。合わせて、利用客の利用状況（入浴者数の日・季節変動など）を確認します。入浴施設の概要図はこのガイドラインの一般衛生管理編を参照してください。

注2：図面とは異なる構造や設備が明らかになったり、使用されていない配管等が見つかる場合は、レジオネラ属菌が増える可能性を勘案して改修するなどの措置を検討します。

ステップ2 施設・設備の確認



配管図等の図面を参照しながらチームで現場確認を行った後に作成する簡略図（流れ図）の1例を示します。簡略図を作成すると施設の状況が把握しやすくなり、のちのステップで使用することもできます。この図は循環式浴槽の例を示しています。個々の入浴施設の設備の設置に合わせて図を作成してください。



この図はかけ流し式浴槽の簡略図（流れ図）の1例を示しています。

ステップ3 レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定

現場確認をしたのちに、レジオネラ属菌が増えやすい場所や流れ込む場所、レジオネラ属菌が増えた場合に感染の危険性が高い場所や設備を確認します。^{注1,2)}

レジオネラ属菌が増えやすい場所の確認ができたなら、その場所のリストと確認内容の記録を作成しておきます。レジオネラ属菌は生物膜の形成を抑えれば増えないため、生物膜ができる場所・設備を挙げ、形成の有無の確認方法も決めておきます。

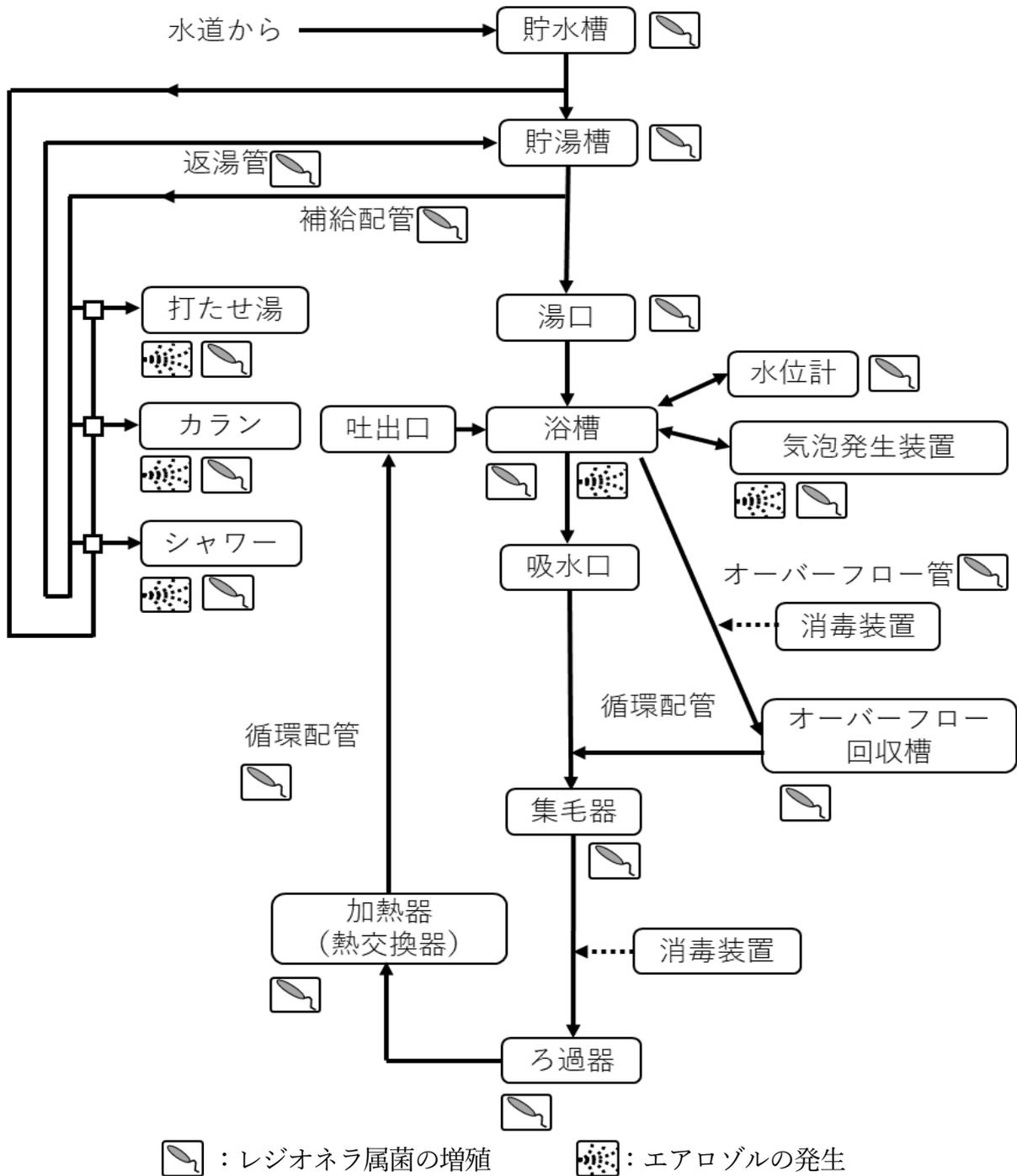
各設備の衛生管理の方法を決め、手順書・作業書を作成します。衛生管理の方法は公衆浴場の衛生等管理要領や一般衛生管理ガイドラインなどを参考にします。既に手順書・作業書が作成されている場合はその内容を確認し、必要に応じて修正します。

注1：レジオネラ属菌が増えやすい場所としては、貯湯槽、浴槽、ろ過装置、配管、湯口（吐出口）、気泡発生装置、集毛器、連通管、調節箱、加熱器、オーバーフロー回収側溝、オーバーフロー管、オーバーフロー回収槽、水位計があります。湯が滞留する場所や設備ではレジオネラ属菌が増殖しますので、そのような場所の確認も行います。

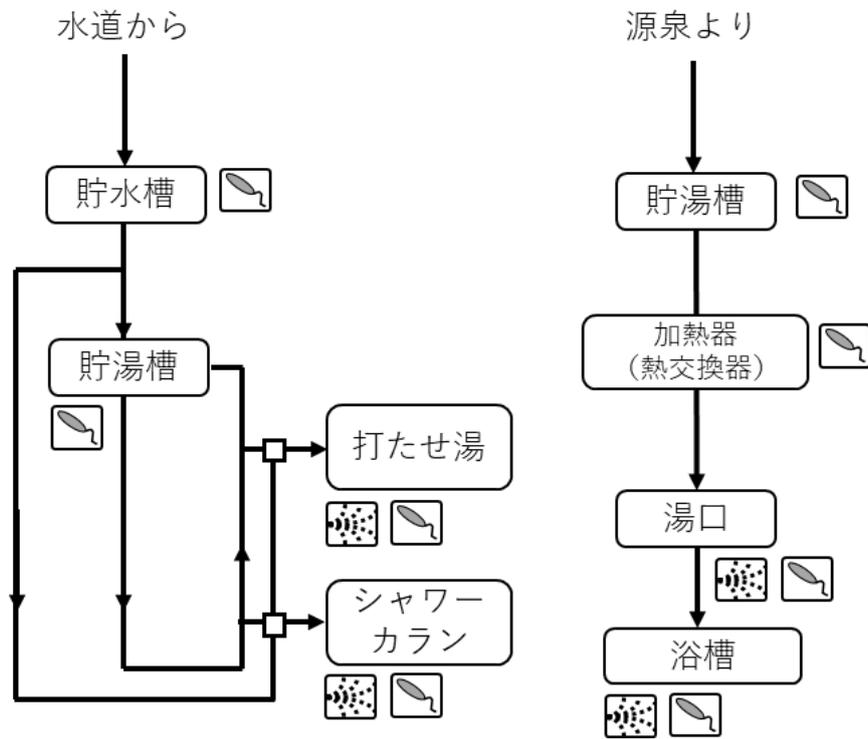
レジオネラ属菌が増えやすく、清掃・消毒が難しい材質として木や岩があり、清掃・消毒が難しい場所・設備として、タイルの目地の破損部分、気泡発生装置、シャワー、カランがあります。

注2：感染の危険性がある設備は、入浴者が湯を吸い込みやすい場所として浴槽、エアロゾルを発生させる設備としてシャワー、カラン、ジェットバス、気泡発生装置、打たせ湯が挙げられます。エアロゾルは微細な粒子のことで、レジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸い込むことで感染します。

ステップ3 レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所 の特定



ステップ2) で作成した配管の簡略図を利用して、レジオネラ属菌が増殖する可能性がある設備やエアロゾルが発生しやすい箇所を特定します。循環式浴槽の例を示しています。この図は1例ですので、設備の状況等に応じて適宜リスクのある場所を特定してください。



この図はかけ流し式浴槽の1例を示しています。

ステップ4 重点的に衛生管理を実施する場所とモニタリング法の決定

生物膜が形成されやすくレジオネラ属菌が増殖しやすい場所を特定しましたので、次に重点的に衛生管理を実施する場所を決定し、あるいは既に実施している場所を確認します。消毒剤の投入場所と方法、消毒剤の設定濃度（塩素消毒を行っている場合は塩素濃度）や設定水温とその測定方法を決定あるいは確認します。また、生物膜の形成状況を調べることもレジオネラ属菌の増殖を抑えるのに役立ちます。^{注3)}

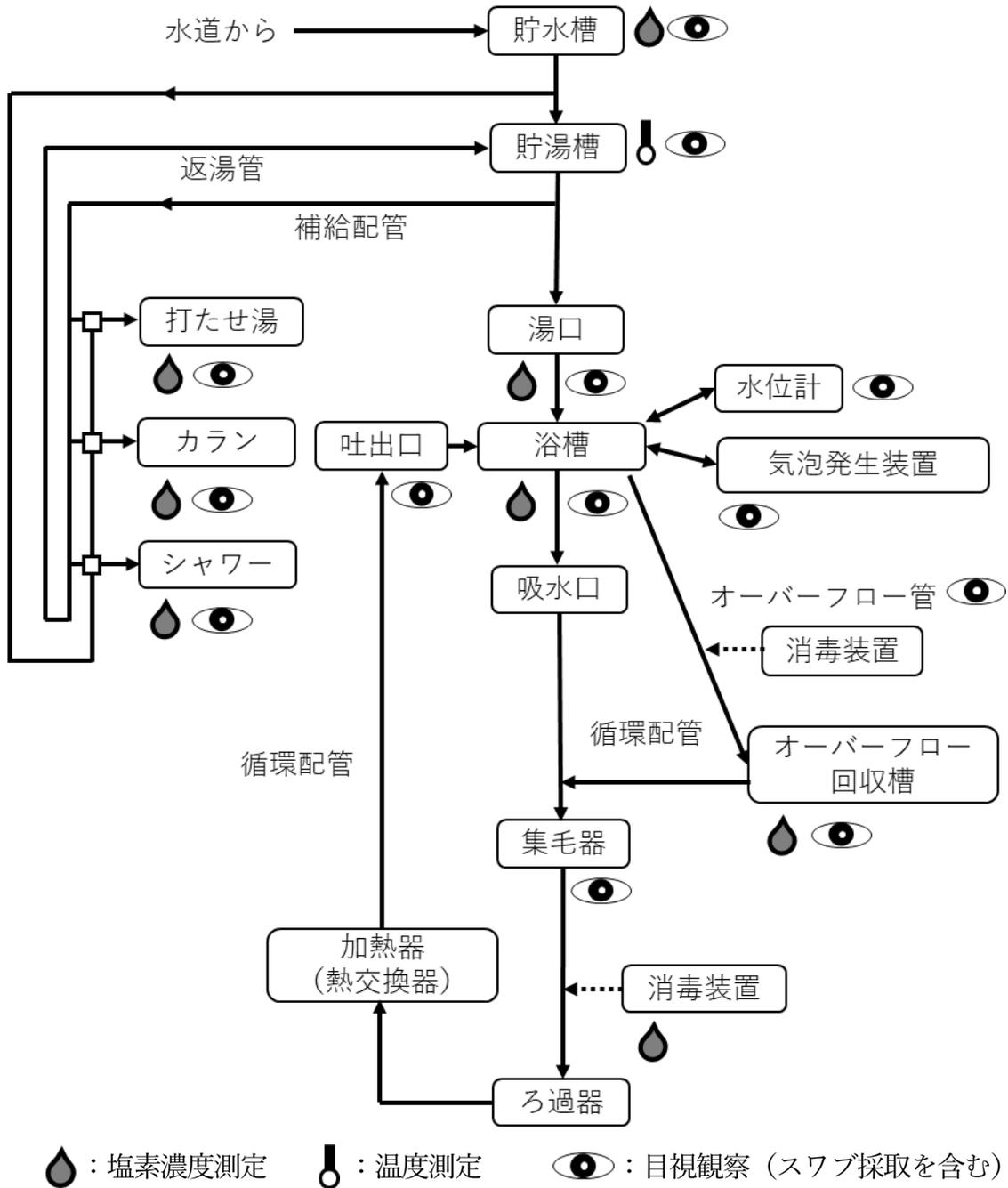
レジオネラ属菌の増殖と生物膜の形成を抑えるには、浴槽水や配管水の消毒と貯湯槽等の高温の維持だけではなく、設備の清掃と消毒が重要です。重点的に衛生管理を実施する場所を決定あるいは確認する際には、一般衛生管理業務の内容を確認することも必要です。

注1：レジオネラ属菌を増やさない管理をするためには、60°C以上の温度（貯湯槽水の温度）あるいは塩素系消毒剤の濃度が重点的に管理する項目となります。（泉質によっては低 pH もレジオネラ属菌の増殖を抑えますが、完全に死滅するわけではありません）

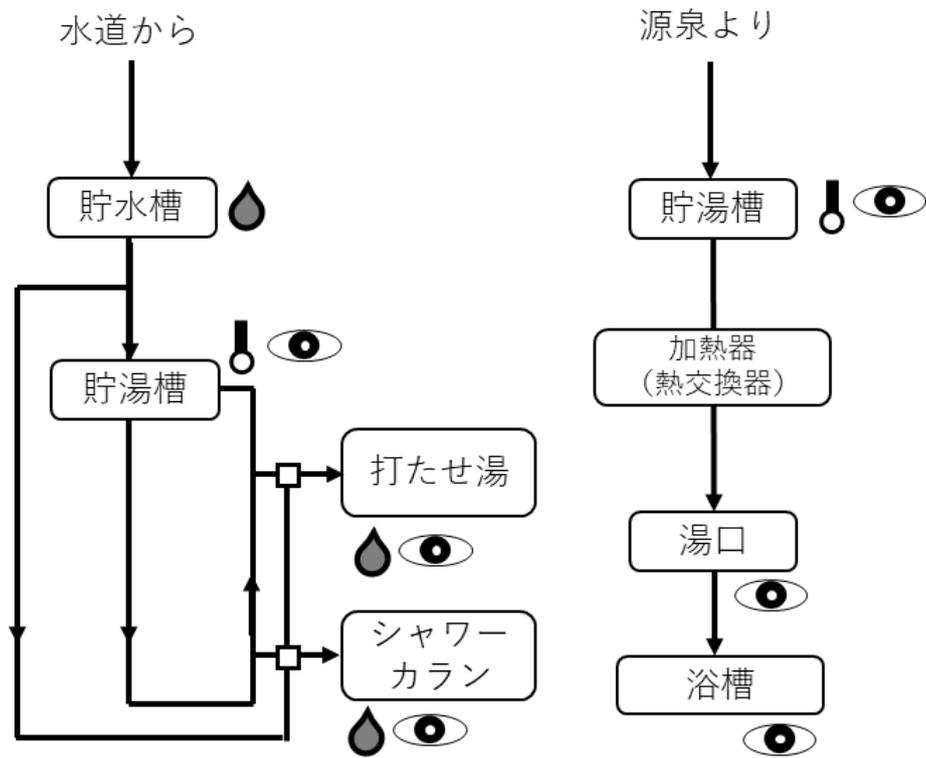
注2：温度の測定はどこでどのように行うか、消毒剤の量（塩素濃度）はどこでどのように測定するかを決め、あるいは既に実施している内容をその現場と手順書・作業書から確認します。

注3：生物膜ができた状況の確認方法、設備の洗浄・消毒方法を決めて、手順書・作業書を作成し、あるいは手順書・作業書があれば内容を確認します。生物膜を調べる方法の1つとして、簡易測定装置を使った ATP 値の測定があります。生物膜の形成を調べる場所として適しているのは、前項3)の注1にある貯湯槽、浴槽、配管内面、湯口（吐出口）、気泡発生装置、集毛器、連通管、調節箱、オーバーフロー回収側溝、オーバーフロー管、オーバーフロー回収槽、水位計が挙げられます。ATP 測定用キットのスワブを用い、浴槽や貯湯槽の壁面や床などの広く平らな面では 10x10cm 程度を拭い、それ以外の場所では可能な範囲でスワブ全体で表面を拭い取り、ATP 値を計測します。清掃・消毒後に 1,000 RLU 以下となることが推奨されています。

ステップ4 重点的に衛生管理を実施する場所とモニタリング法の決定・確認



重点的に管理する設備や箇所を決め、モニタリング方法を設定します。モニタリング方法として測定方法と管理に必要な濃度や温度を設定します。循環式浴槽でのモニタリングの例を示します。この図は1例ですので、設備の設置状況等に応じて適宜設定してください。



この図はかけ流し式浴槽のモニタリングの1例を示しています。

ステップ5 設定値等を外れた際の対策の決定

ステップ4で決めた設定濃度や温度から外れたとき、異常を発見したとき、あるいはレジオネラ属菌の増殖が明らかになったとき等の措置を決めておきます。重要なことは、決められた温度や濃度から逸脱した場合は、逸脱の状態を記録するとともに、逸脱した原因を明らかにすること、及び正常に戻す措置の内容を可能な範囲で決めておくことです。

施設においてレジオネラ属菌が検出された場合の具体的な対応と対策を予め決めておきます。さらに、レジオネラ症の患者が発生した場合を想定した対応と対策もここで決めておきます。

具体例1：循環式浴槽で浴槽水の遊離残留塩素濃度が0.4mg/Lを下回っていた。

対応：原因究明を直ちに行い、対応措置を取ります。

- 1) 濃度が下回っていることを直ちに責任者に報告する。
- 2) 記録簿から、いつから濃度が不十分であるかを確認する。
- 3) 消毒装置を点検する。必要に応じて修理する。
- 4) 高濃度消毒を直ちに実施する。
- 5) 対応内容を記録する。

具体例2：貯湯槽水の温度が45°Cまで低下していた。

対応：原因究明を直ちに行い、貯湯槽水の温度を設定温度の60°Cに保ちます。

- 1) 温度が低下していたことを直ちに担当責任者に報告する。
- 2) 記録簿から、いつから温度が低下していたかを確認する。
- 3) 原因調査として加温装置を点検し、必要に応じて修理する。
- 4) 2日以上設定温度よりも低下していれば、高濃度消毒を実施する。
- 5) 浴槽水の遊離残留塩素濃度が0.4mg/Lであることを確認する。
- 6) 対応の内容を記録する。

具体例3：シャワーヘッドの内部に生物膜の形成が観察された。

対応：シャワーヘッドとホースの高濃度消毒を行い、通常の洗浄・消毒方法を検討します。

- 1) 生物膜が形成されていたことを直ちに担当責任者に報告する。
- 2) 必要に応じてレジオネラ属菌の増殖の有無を検査する。
- 3) 高濃度消毒・洗浄を直ちに実施する。

- 4) 記録簿から、前回の観察までに生物膜が形成されていたか、及び洗浄・消毒の実施状況を確認する。
- 5) 通常の洗浄・消毒の方法と頻度を検討し、改善する。
- 6) 対応の内容を記録する。

具体例4：浴槽水の定期検査でレジオネラ属菌が検出された。

対応：直ちに対応措置を取り、原因究明を行います。

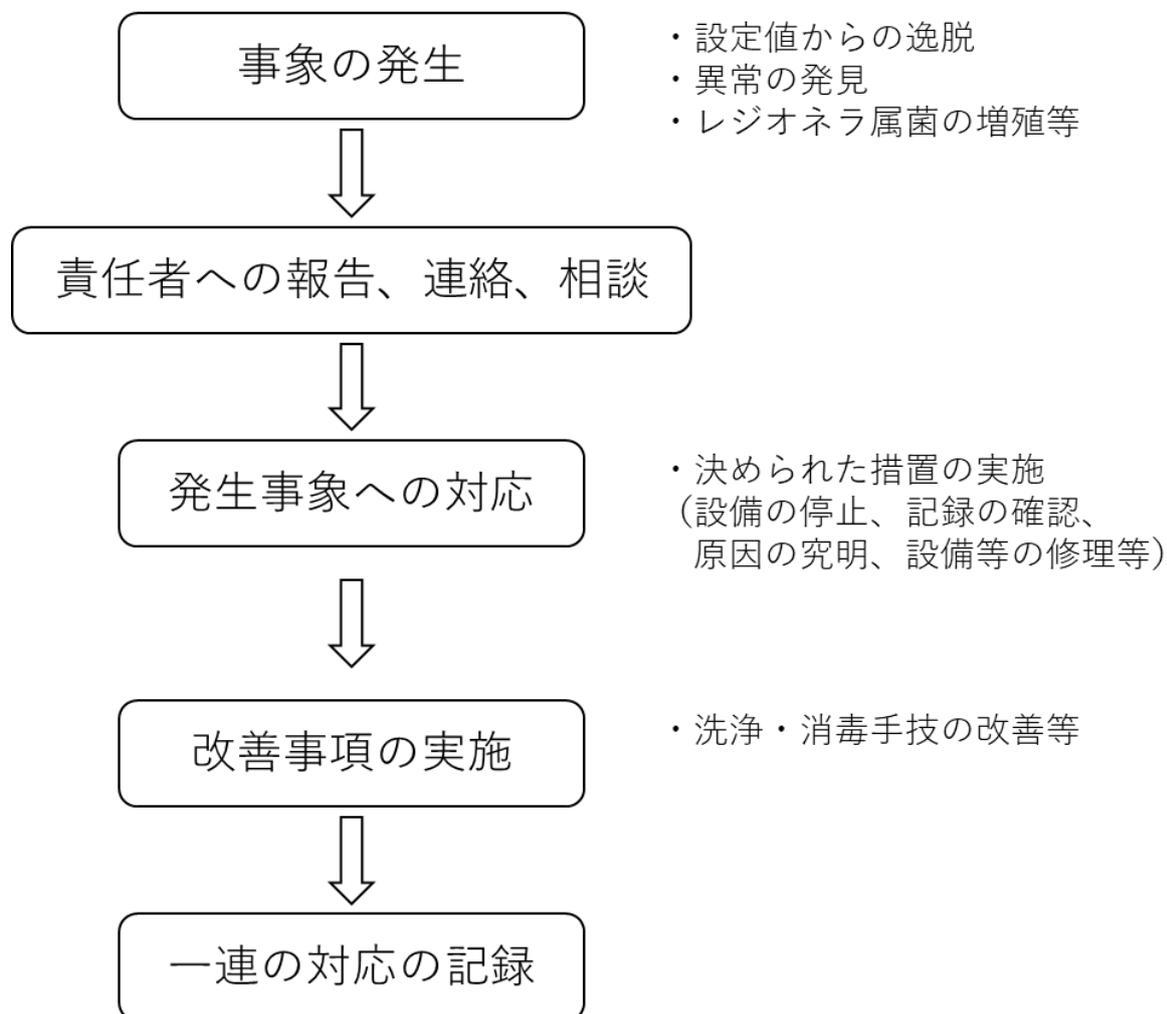
- 1) レジオネラ属菌が検出されたことを直ちに担当責任者及びチームリーダーに報告する。
- 2) 清掃方法を確認し、再度、清掃を行う。塩素消毒をしている場合は、塩素濃度の確認も併せて行う。
- 3) 清掃後、再度検査を行う。その際、補給湯（浴槽への注ぎ湯など）・水（加水している場合）の検査も併せて行うと良い。上流へのさかのぼり検査を行うことにより、問題点を明確にすることができる。
- 4) 洗浄・消毒方法の見直し、浴槽壁等の損傷の有無の確認、付随設備の確認、記録簿による塩素濃度の確認、消毒装置の点検など、原因の究明を行う。
- 5) 対応の内容を記録する。

具体例5：施設利用者からレジオネラ症患者が発生した。

対応：施設利用者からレジオネラ症患者あるいはその疑いがある患者が発生した場合、次の点に注意して対応します。

- 1) 利用者からの連絡により患者発生を探知した場合は施設責任者に伝えるとともに、直ちに保健所に連絡する。
- 2) 保健所から患者発生連絡を受けた場合は、直ちに施設責任者に報告するとともに保健所の指示に従う。
- 3) 施設の利用を直ちに中止する。
- 4) 消毒や清掃は行わず、施設の現状を保持する。
- 5) 施設が原因であることが確定し、事実を公表する。
- 6) 記録簿等から衛生管理状況を確認する。
- 7) レジオネラ属菌の増殖の原因を探り、衛生管理の問題点を見出す。
- 8) 衛生管理の方法を改善する。
- 9) 対応の内容を記録する。

ステップ5 設定値等を外れた際の対策の決定



貯湯槽水の温度や浴槽水の遊離残留塩素濃度などの予め設定した温度や濃度（基準値）から逸脱した場合、あるいはバイオフィームが形成された、レジオネラ属菌の増殖が明らかになった場合等の逸脱が発生した場合の措置を決めておきます。対応の流れの概要の例を図に示します。

ステップ6 総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認

総合衛生管理プログラムの運用状況とその効果をチームにより評価・確認する必要があります。そのための検討会のやり方と開催頻度を決めておきます。

決められたとおりに日常の衛生管理を行い、レジオネラ属菌が増殖していないことを確認することで管理が適切に行われているかどうかを評価することが重要です。その評価のために、一般衛生管理が手順書・作業書で決められたとおりに行われているか、モニタリングが正しく行われているか、異常等の発生の報告が漏れていないかといったことを確認する方法と頻度を決めておきます。^{注1)} 必要に応じてモニタリングの現場の確認も行いますので、その方法も決めます。

衛生管理の進め方が妥当であるかどうかを検証するために、レジオネラ属菌の検査を行います。^{注2)} 実施する場所と頻度、検査の依頼先等を決め、さらに検査結果をどのように評価するかということも決めておきます。

生物膜の形成状態を確認することでも、衛生管理が適切に行われているかどうかの評価に役立ちます。^{注3)} 確認する場所や設備、確認方法及び頻度を決めておきます。

各チームメンバーは、各担当・部門で行われた衛生管理に関する話し合いあるいは報告の内容を一般衛生管理や総合衛生管理プログラムの評価や改善に活用します。(2. 総合衛生管理プログラムの作成 1) 衛生管理の適切な進め方を決めるためのチームの編成の項の注4を参照)

入浴者からの意見や苦情の有無、その内容等も総合衛生管理プログラムの効果を確認・検証するための重要な情報となります。

注1：モニタリングの対象である残留遊離塩素濃度の測定に使用するキットや測定器の信頼性を検証するための方法を定めておきます。必要に応じてメーカーなどに相談することもあるため、手順書・作業書に連絡先等を記載しておきます。

注2：レジオネラ属菌の検査は、毎日完全換水している入浴施設では1年に1回以上、連日使用している入浴施設では1年に2回以上(浴槽水の消毒が塩素消毒でない場合、1年に4回以上)実施することが公衆浴場の衛生等管理要領で推奨されています。一般衛生管理の7. 浴槽水の項の水質管理を参照してください。

注3：通常の衛生管理で生物膜の形成状態をATP値で調べていれば、その数値から評価することができます。4) 重点的に衛生管理を実施する場所とモニタリング法の決定の項を参照してください。

ステップ6 総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認

チームによる検討会

- ・チームによる検討会の開催方法、頻度等を決定
- ・一般衛生管理が手順書・作業書とおりに行われているかの確認の方法
- ・モニタリングの適切な実施の確認の方法
- ・レジオネラ属菌の検体採取場所、検査頻度、検査依頼先等の決定
- ・レジオネラ属菌の増殖の有無の確認の方法
- ・生物膜の形成の有無の確認の方法
- ・各担当・部門からの意見、要望、報告の持ち寄りかたの確認
- ・入浴者からの意見や苦情の有無の確認の方法
- ・検討結果や評価の還元の仕事方を決定

チームは検討会を開いて、総合衛生管理プログラムの運用状況を確認するとともに、総合衛生管理プログラムの効果を評価・確認します。総合衛生管理プログラムの内容を決定する際に検討会の開催方法と開催頻度等を決めるとともに、上に示すような検討会での検討内容を決めておきます。

ステップ7 総合衛生管理プログラムの記録等の作成

上記の1)～6)で検討した内容、確認した事項を記録に残します。チームメンバーのリストや協議した内容を記録しておくこと、役割分担を明確にすることができ、衛生管理の進め方を確認するときに役立ちます。^{注)}

記録する検討した内容や確認した事項には、例として以下の項目が含まれます。

- ・チームメンバー関連（氏名、部署、連絡先、チームでの担当等）
- ・施設の概要（施設が複数ある場合の場所、築年数、入浴者数等）
- ・入浴設備関連（配管図、フローチャート、浴槽数、レジオネラ属菌が増殖・拡散しうる設備・箇所、エアロゾルが発生しやすい設備等）
- ・モニタリング方法と基準
- ・総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認手順
- ・水質検査実施時の計画、実施方法、実施検査機関等
- ・チームの検討会で検討した内容

上記のステップ1)～6)で検討したことにより、衛生管理の週ごと、月間あるいは年間の実施計画を作成することが可能になります。計画的に衛生管理を実施するためにこの段階で計画書を作成します。

注：モニタリングの結果や清掃等の実施状況は記録に残して保存しますので、既存の記録簿の様式と記録の保管方法などをチームで確認します。

3. 衛生管理の実施

前頁までで総合衛生管理プログラムの内容とその進め方が決まりました。ここからは第2段階として実際に総合衛生管理プログラムの下で衛生管理を進めていきます。入浴施設の一般衛生管理業務と上記4)で決めたモニタリングを行い、施設の衛生管理を実施します。一般衛生管理業務とモニタリングは手順書・作業書に従って行います。

4. 衛生管理の判定・評価

第1段階のステップ3)で決めた方法で衛生管理が行われているかどうかを現場の作業や日誌等の記録から確認します。さらに、第1段階のステップ6)で決めたように、生物膜の形成やレジオネラ属菌の増殖を検査により調べ、一般衛生管理の業務が適切であるかどうかの評価を行います。確認や評価の内容やそれらについて話し合った内容は記録に留めておきます。

5. 判定・評価に基づく一般衛生管理あるいは総合衛生管理プログラムの修正・改善

第3段階において行った判定・評価を受けて、手順書・作業書の修正も含め、一般衛生管理の実施内容や総合衛生管理プログラムの必要な改善や修正を行います。さらに、チームメンバーが持ち寄った各担当・部門で話し合われたあるいは報告された内容を検討し、改善・修正を行います。話し合った内容や改善・修正した内容を記録に残します。^{注)}

チームメンバーの変更や施設の改修・更新、その他の理由により総合衛生管理プログラムの変更の必要があれば検討を行い、変更し、その内容を記録します。

注：各担当・部門において衛生管理に関する話し合いや報告を行うとともに、定期的にチームによる検討会を開催することで、各スタッフの役割の確認や衛生管理の状況に関する情報の共有を行い、衛生管理が適切に行われていることを確認することができ、モチベーションの維持にも役立ちます。

6. 修正・改善した衛生管理の実施

第3段階に戻り、判定・評価に基づいて修正・改善された総合衛生管理プログラムを進めていきます。

参考資料

1) Centers for disease control and prevention: Developing a water management program to reduce Legionella growth & spread in buildings. A practical guide to implementing industry standards. pp31, 2017. <https://www.cdc.gov/legionella/wmp/toolkit/index.html>

2) 平成 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 HACCP システムの導入を伴う循環式浴槽の管理について 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 総合研究報告書

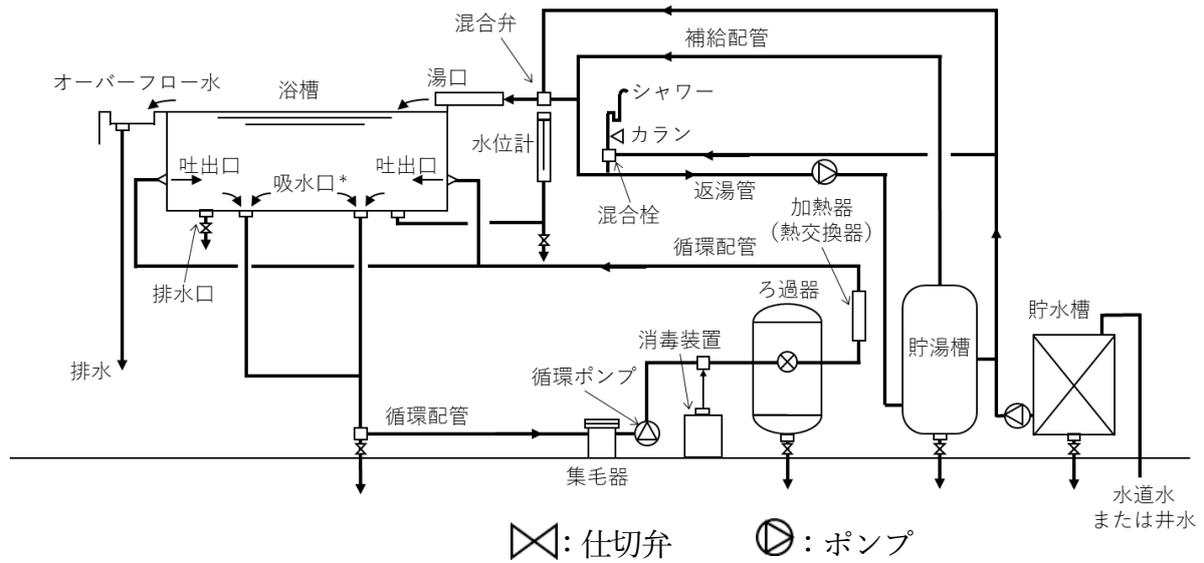
II. 一般衛生管理

1. 全般

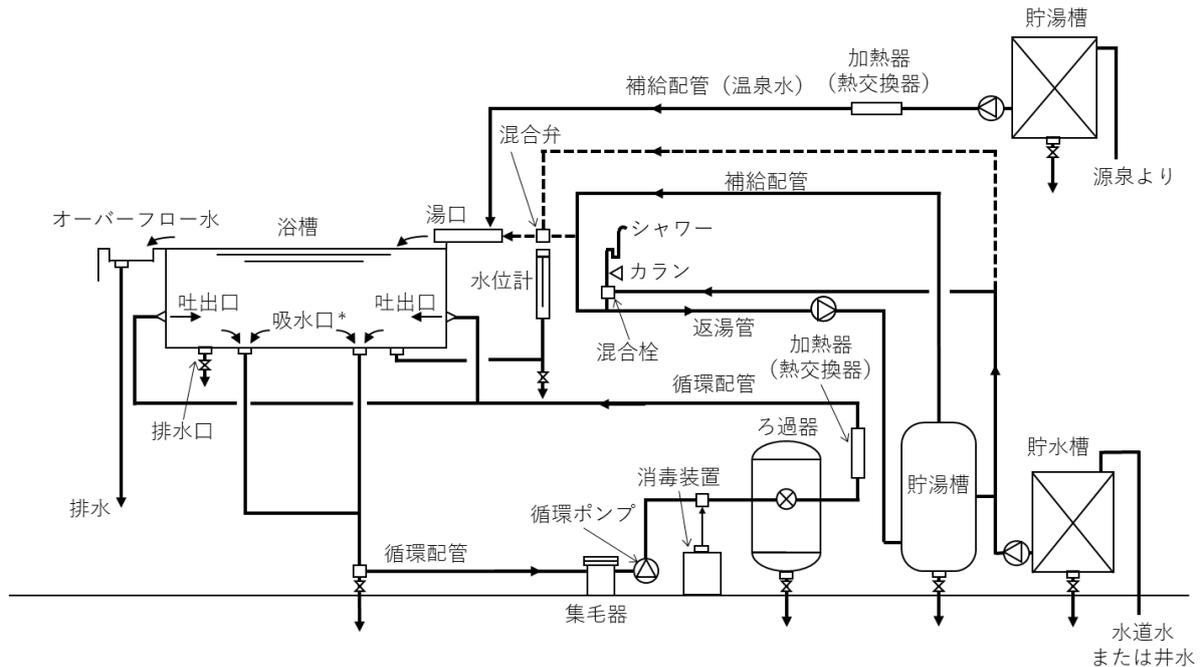
施設の各設備の洗浄方法並びに消毒方法等の具体的な手順を定め、作業書・手順書を作成し、これに従って作業を行います。

浴槽の設備の概要の例を以下に示します。

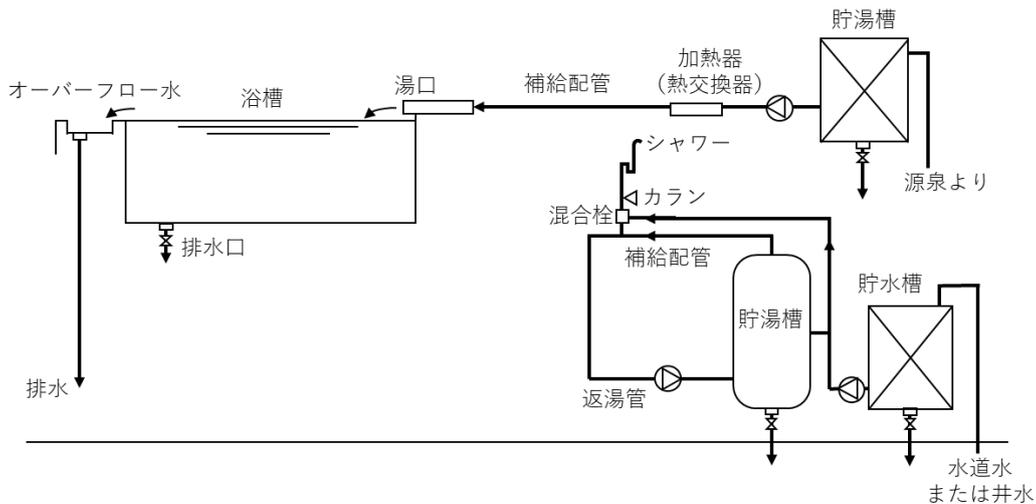
この図は水道水または井水を原水とする循環式浴槽施設の概要の例です。



この図は温泉を原水とする循環式浴槽施設の概要の例です。点線は設置している場合とない場合があることを示しています。



この図はかけ流し温泉施設の概要の例です。



2. 原水、原湯

管理

原湯とは、浴槽の湯を再利用せずに浴槽に直接注入する湯水のことです。原水とは、原湯にするための水や浴槽の湯水の温度を調整するために使う、浴槽の水を再利用していない水のことです。

原湯や原水は、水質基準に適合するように管理しなければなりません。適切に管理されていることを確認するため、1年に1回以上水質検査を行い、結果は3年間保存します。なお、水質検査は、精度管理を行っている検査機関に依頼することが望まれます。

温泉の泉質等の理由から自治体に申請することで水質基準の適用除外が認定されることがあります。

水質基準

- ・色度は5度以下であること
- ・濁度は2度以下であること
- ・pH値は5.8以上8.6以下であること
- ・有機物（全有機炭素(TOC)の量）は3mg/L以下、又は、過マンガン酸カリウム消費量は10mg/L以下であること^{注1)}
- ・大腸菌は検出されないこと^{注2)}
- ・レジオネラ属菌は検出されないこと（10 cfu/100mL未満）

注1：消毒剤として塩素化イソシアヌル酸またはその塩を使用している場合、有機物は全有機炭素（TOC）量ではなく、過マンガン酸カリウム消費量を測定します。全有機炭素（TOC）は、塩素化イソシアヌル酸またはその塩由来の炭素も合わせて有機物量として測定するため、測定値が有機物汚れの有機物量よりも高くなることがわかっています。

注2：大腸菌の検査方法である特定酵素基質培地法は、海水を含む試料では海洋細菌により偽陽性になることがあります。海水を含む試料で陽性になった場合は、ダーラム管が入ったECブイヨン10 mLに陽性検体100 µLを接種し、44.5°Cで24時間培養してガス産生が認められた場合は陽性、ガス産生が認められない場合は陰性と判定します。

3. 貯湯槽

構造

貯湯槽は、浴槽までの配管が短くなるよう、できるだけ浴槽に近接して設置します。また、水抜管を槽底の最低部に取り付けるなどにより、完全に排水できる構造とします。これにより内部の洗浄を確実に行うことができます。貯湯槽は少なくとも1年に1回、排水して内部を洗浄することが推奨されており、洗浄を容易に行うことができるようにするために完全に排水できる構造にする必要があります。

貯留する原湯は、いつも60°C以上に保ち、最大使用時であっても55°C以上に保つことができるように加温装置を設置します。シャワー・カランにも湯を供給する給湯系では補給配管から返湯管を設け、系全体が60°C以上に保たれるようにします。温度計は貯湯槽の中位よりも下に設置することで平均的温度を測定することができます。

温泉水を原水としている施設において、温泉の貯湯槽水を55~60°C以上に保つことができず、レジオネラ属菌が増殖する危険性がある場合は、必要に応じて消毒装置を設置して遊離残留塩素濃度を0.4mg/L以上に保って貯湯槽水を消毒し、レジオネラ属菌が増えないようにします。

水道水や井水を60°C以上に加熱して保つ密閉式貯湯槽では、逃がし管（または膨張管）あるいは逃がし弁や密閉式膨張水槽を設置します。逃がし管は末端が解放されているので開放部の点検を行って汚染や異物混入に注意し、必要に応じて内部を清掃します。密閉式膨張水槽は常に60°C以上に保つことで生物膜の形成を抑え、定期的に点検を行います。

管理

貯湯槽の湯の補給口から底に至るまでを 60°C以上を保つようにします。この場合、槽内側の壁面等に生物膜ができていないかに注意して目視や布・脱脂綿によるふき取り、てざわりなどで観察し、少なくとも年1回は貯湯槽水を完全に排水して、内部の清掃と消毒を行います。

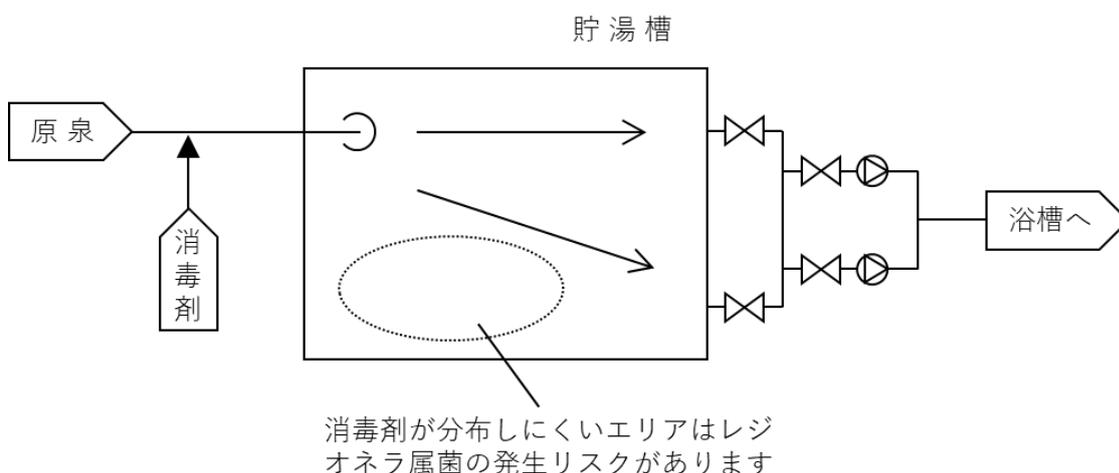
貯湯槽の清掃方法は、建築物環境衛生維持管理要領(平成20年1月25日健発第0125001号厚生労働省健康局長通知別添)に準じて実施します。清掃はブラッシングにより生物膜を取り除き、次亜塩素酸ナトリウム溶液等を用いて消毒します。高圧洗浄はブラッシングよりも洗浄力が劣るので、洗浄後に徹底した消毒により生物膜を取り除きます。作業時にエアロゾルを吸い込まないようにします。

定期的に設備の破損等の確認や温度計の性能確認を行います。また、通気管の防虫網が破損するなどして貯湯槽に外からごみやほこりが入らないかを月に1回は確認します。

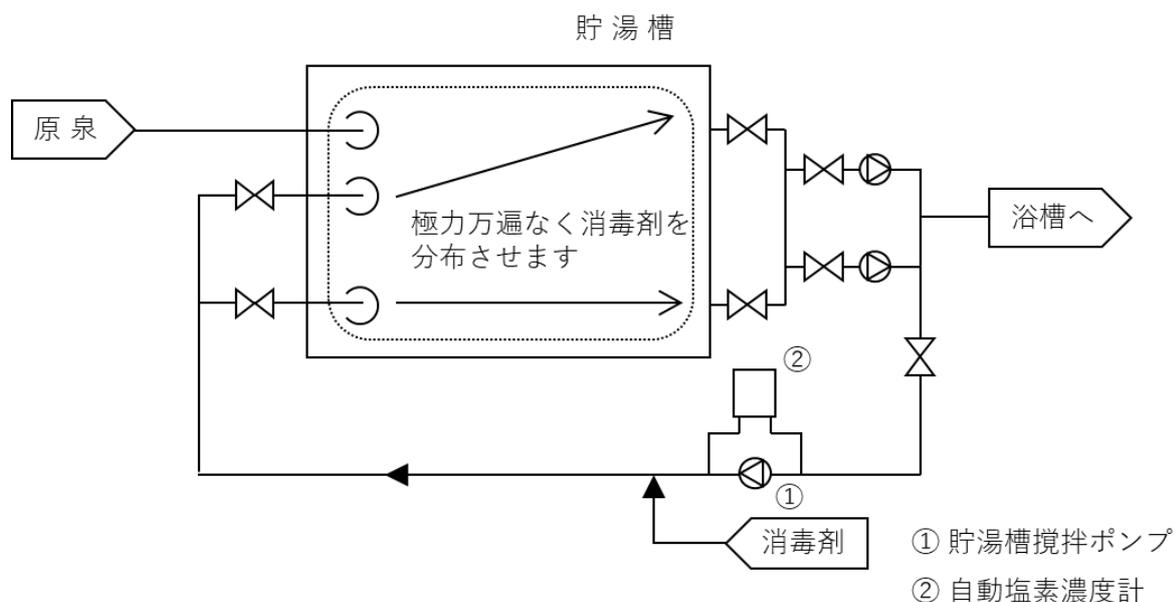
貯湯槽の底部は湯が停滞しやすく、上部よりも低温になったり、ごみが蓄積しやすいので、ドレインから底部の湯を排水したり、攪拌により槽内で湯を均等にすることが推奨されます。

下図に貯湯槽に消毒剤を投入する場合の改善例の1例を示します。滴下注入するだけでは消毒剤が均等に分布せず、滞留により塩素剤濃度が低下することがあるため、攪拌することにより解決します。

一般的な消毒剤の注入方法では消毒剤が不均一に分布することがあります。



万遍なく消毒剤を分布させる注入方法の1例を示します。



自動塩素濃度計を設置することで管理が容易になります。

4. 補給配管

構造

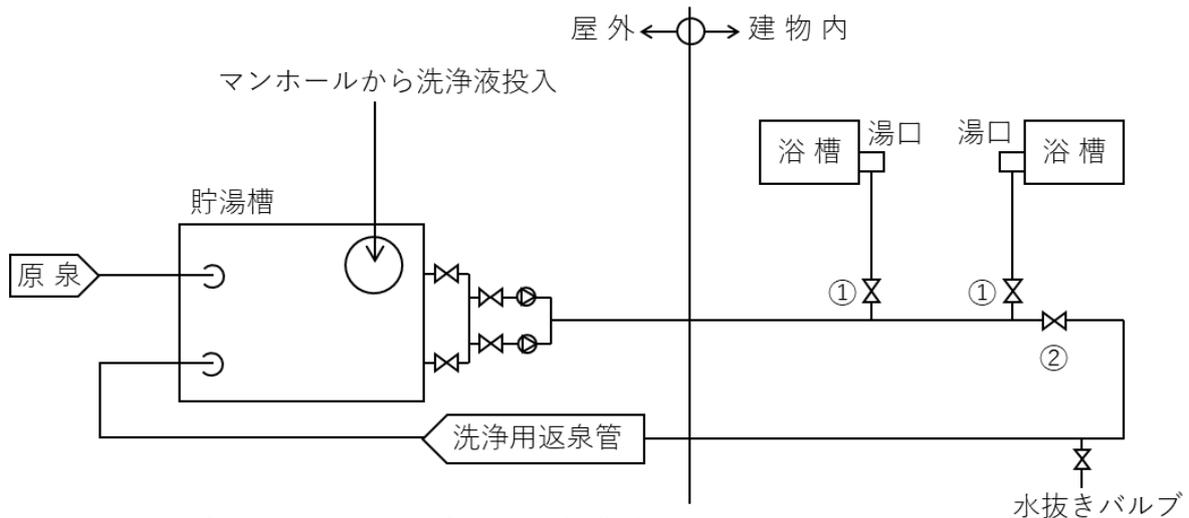
浴槽に補給する湯や水は浴槽水面よりも上から注ぎ込むようにし、給湯配管あるいは給水配管を循環配管に接続するのは適切ではありません。循環配管ではレジオネラ属菌やその他の菌が増える可能性があり、そうした細菌が逆流して給湯・給水配管に入ることを防ぐためです。

配管は生物膜の形成場所になるため、できるだけ配管が短くなるよう設計・施工し、不要な既存配管を除去するとともに、容易に洗浄できるよう配慮します。

60°C以上の湯を貯めた貯湯槽から各施設への配湯管は、高温でも劣化せず、かつ配管内の湯の温度が下がりにくい材質のものを使用する必要があります。

管理

生物膜を除去するため、貯湯槽の清掃に併せて定期的に配管洗浄を行うことが望まれます。通常、温泉水の補給配管は往きのみであるため、返泉管を設けて洗浄時に洗浄液を循環させて管内を洗浄する例を以下に示します。返泉管は使用しないときは中を空にしておきます。



貯湯槽に薬剤を投入し、ポンプによる循環洗浄を行います。

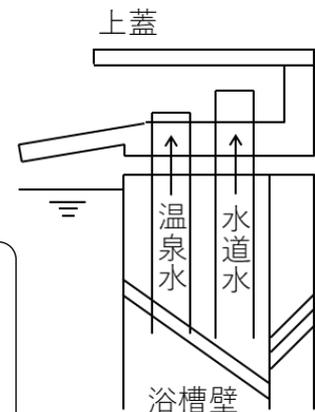
バルブ①は常時：開、洗浄時：閉→開 バルブ②は常時：閉、洗浄時：開

5. 湯口

構造

湯口と水面が接しないよう、原水や原湯が浴槽水面上部から浴槽に注ぎ込むように湯口を設置することが推奨されています。こうすることで浴槽水が湯口から逆流することを防ぎます。公衆浴場における衛生等管理要領では、ろ過器を設置する場合は循環配管を湯口に接続して湯口から循環湯が浴槽に出る構造とせず、循環湯が浴槽の底部に近いところから補給する構造にすることとしています。^{注)} これにより入浴者が循環水を飲まないようにします。また、循環湯はレジオネラ属菌に汚染される危険性があり、もしもレジオネラ属菌に汚染された循環湯が湯口から流れ出るとエアロゾルが発生し、レジオネラ症患者が発生する原因になります。また、原湯を水等で希釈して浴槽に供給する場合はできるだけ湯口の直近で混合し、レジオネラ属菌が繁殖しやすい温度領域を短くするようにします。

温泉水に水道水等を混合して湯口から浴槽に注ぐ場合、水道水に温泉水が混入しないようにするために配管は繋がず、右図のように湯口内に別々の吐出口を設け、水道水を上流側にします。内部は上蓋を外して清掃・消毒します。

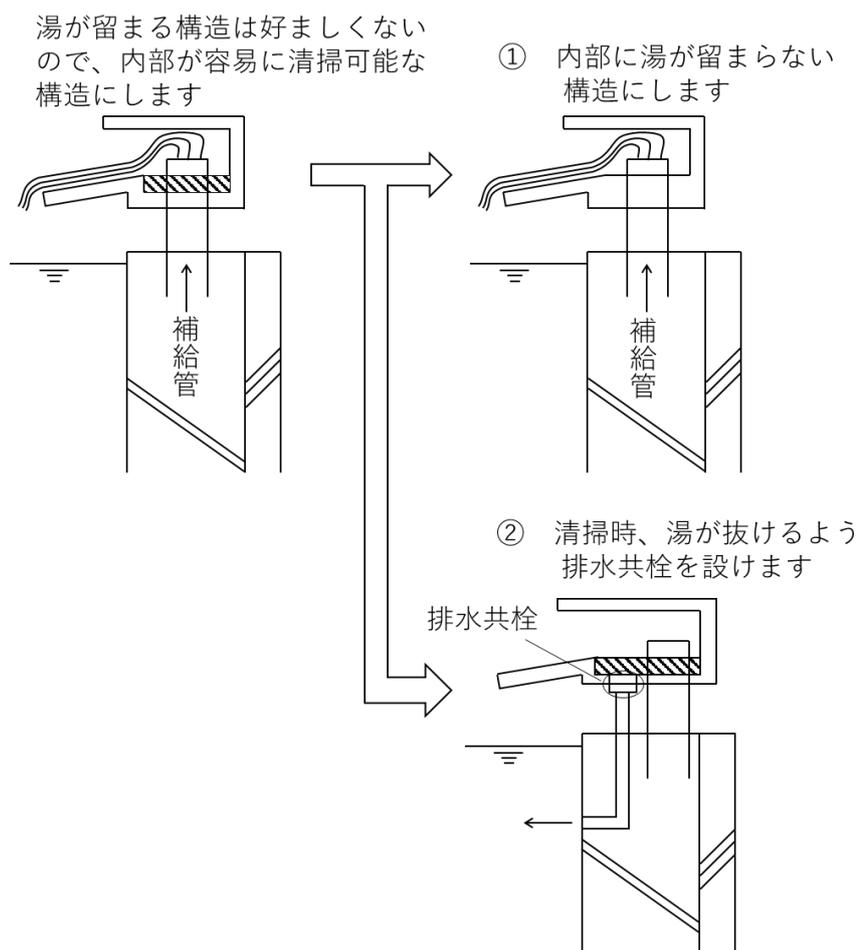


注：循環水を湯口から注入している浴槽では、ろ過器と循環配管の徹底した管理が必要です。例えば、ろ過器を毎日逆洗浄し、その都度ろ過器と循環配管を消毒します。また、エアロゾルが発生しにくい構造とし、誤飲を防ぐ表示をします。

管理

湯口はレジオネラ属菌が繁殖可能な温度となる場合が多いため、定期的にブラシを使って洗浄したり、貯湯槽や補給配管と併せて洗浄を行うことが望まれます。

湯口の内部に湯水が溜まる構造になっているとレジオネラ属菌が増殖しやすくなるため、参考となる湯口の改善例を示します。①の構造が望ましいですが、②のように排水共栓を設ける場合は共栓部分の配管を頻繁に塩素等で消毒します。



6. 浴槽

構造

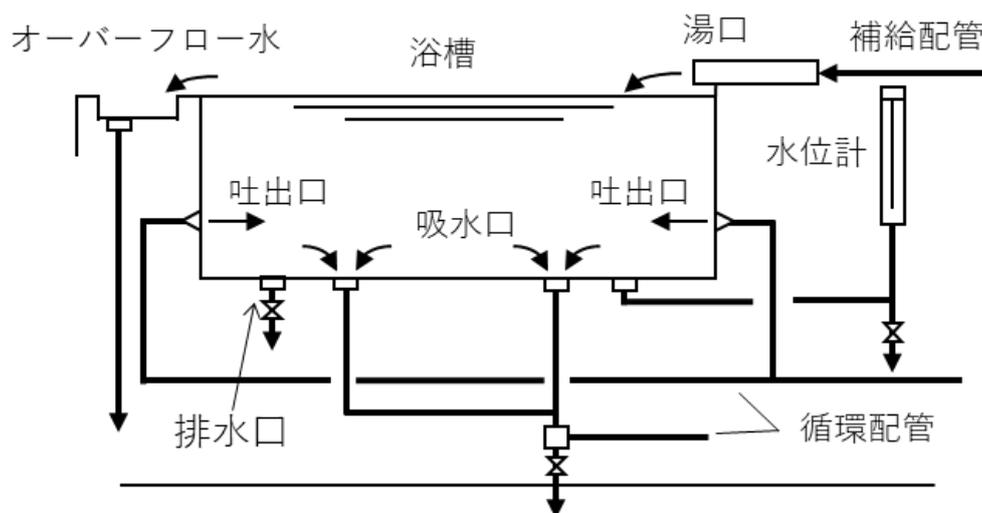
循環式浴槽では、循環湯は浴槽の底部に近い部分から浴槽に補給するようにします。これにより循環湯からのエアロゾルの発生を防ぎます。また、循環湯が浴槽内で部分的に滞留しないよう、浴槽水の流れを考慮して吐出口と吸水口を配置しなければなりません。

内湯と露天風呂を配管で接続しないこととされています。配管を通じて露天風呂の湯が内湯に混じることを防ぐためです。

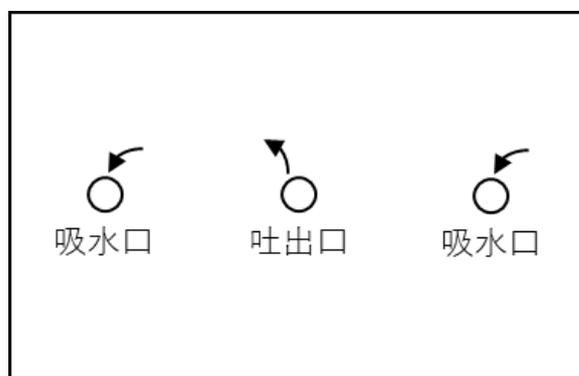
浴槽内に開口している吸水口、吐出口、排水口、水位計配管等を把握し、使用していない開口穴は物理的に塞ぐことが重要です。廃止した気泡発生装置等がそのまま放置され、そこに蓄積した生物膜が原因となったレジオネラ検出例が多くみられます。

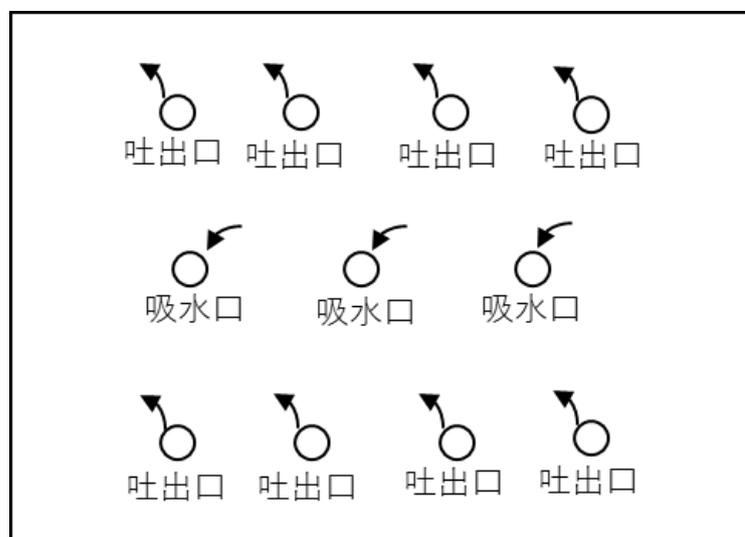
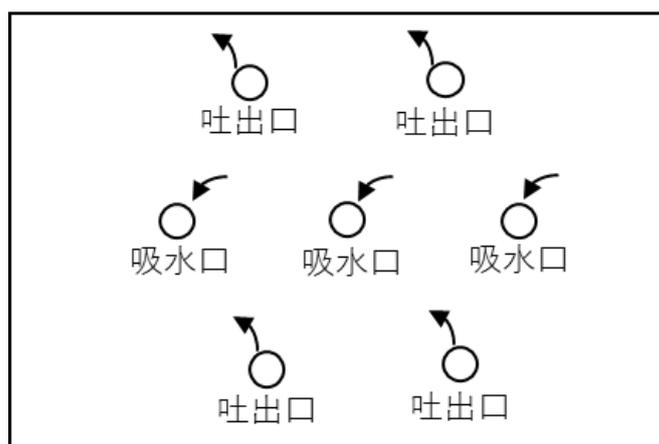
浴槽の表面はタイルの他に岩、生木等の様々な材料で作られています。岩や生木等の表面が凸凹した素材や構造は洗浄・消毒が難しく、生物膜の形成やレジオネラ属菌の増殖が起きやすいため、表面が滑らかな素材を使用すれば管理が容易になります。

循環式浴槽の基本的な構造を示します。



浴槽の吸水口と吐出口の配置の例（平面図）を以下に示します。この例では吸水口と吐出口を浴槽の床面に設置しています。吐出口から補給された循環湯が浴槽内で滞留しないように吐出口と吸水口を配置します。設置数は浴槽の容量により増減します。





管理

浴槽の湯を常に満水状態とし、溢水により浮遊物の除去に努めます。また、露天風呂では周囲に植栽がある場合に浴槽に土が入らないように注意する必要があります。

毎日完全に換水して浴槽を清掃、消毒します。消毒方法の1例として、毎日の換水前に高濃度塩素消毒を週に複数回行うことが有効です。毎日換水することができない場合は、週に1回以上、完全に排水して清掃、消毒します。

気泡発生装置、ジェット噴射装置等を使用している浴槽や、塩素系薬剤が使用できない場合は、毎日完全に換水して浴槽や配管等を十分清掃・消毒を行い、生物膜の発生を防止する必要があります。塩素系薬剤が使用できない場合としては、低pHの泉質で有毒ガスが発生する場合、有機質を多く含む泉質で消毒効果が得られない場合、かけ流しで浴槽容

量に比べて原湯の流量が多く遊離残留塩素の維持が困難な場合などが挙げられます。

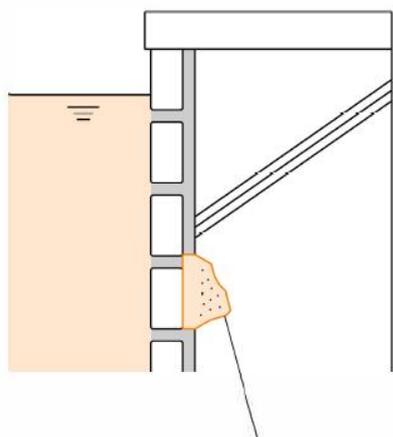
日常の清掃で浴槽壁等に発生した生物膜を取り除くには、調査した範囲では洗浄剤を用いてブラシ洗浄（ブラッシング：ブラシやたわしによる洗浄）するのが最も効果的であったとの研究報告がありますが、ブラシ洗浄や高圧洗浄の方法ややり方によっては生物膜を十分に除去できない場合があります。ぬめりの有無や ATP 簡易測定により生物膜の除去を確認することが推奨されます。さらに、洗浄後に塩素系消毒剤等を用いて消毒することが推奨されています。消毒剤の濃度は「8. 循環配管」の項の注を参照してください。

注1：ブラシ洗浄や高圧洗浄によりエアロゾルが発生するため、作業者はマスクやゴーグル等を装着するなどの対策が必要です。

注2：ヒノキ風呂等の生木を用いた浴槽は消毒剤により変色等が起きるので注意が必要です。また、洗浄にブラシを使うと表面が粗くなりやすいため、スポンジや布を使って清掃する施設もあります。ヒノキ風呂等は、洗浄・消毒後の乾燥が菌の抑制に有効です。

タイルや岩等あるいはヒノキ等の生木で作られた浴槽は施工時にあるいは経年劣化によりタイルや岩等の裏側に鬆（す：空間）が生じたり、隙間ができることがあります。そこには浴槽水が死に水となって滞留し、消毒剤が届きにくいために生物膜が形成され、レジオネラ属菌が増殖しやすくなります。そこで、鬆の有無を確認し、発見された場合には施工のやり直しなどの措置が必要となります。タイルの浮きや割れ、目地の落ちや割れ、木部の腐れなどを毎日目視等で確認し、打診棒による確認は施工終了時及び年に1回程度行います。

浴槽の断面



鬆があると死水エリアになり、レジオネラ属菌が増殖しやすい

鬆の確認方法



打診棒でタイルをたたき、鬆の有無を確認する
鬆が確認されたら、施工し直す

7. 浴槽水

管理

浴槽水の消毒は、浴槽水中の遊離残留塩素が 0.4mg/L 以上を維持し、1mg/L を超えないようにします。浴槽水の消毒をモノクロラミンで行う場合は、結合塩素濃度 3mg/L 以上を維持します。

遊離残留塩素の測定方法には、比色法（DPD 法）や吸光光度法、電流法などがあります。一般には、比色法や DPD 法を用いた携帯型の簡易測定器が用いられています。モノクロラミンを使用している場合は結合塩素を測定します。

浴槽水の塩素濃度の測定頻度は、浴槽水の循環の頻度、溢水や加水の状況、入浴者数等を勘案して決める必要があります。消毒剤の濃度は、個々の施設で決めた頻度で測定・記録し、測定結果は検査の日から 3 年間保管します。

水質検査

ろ過器を使用していない浴槽水や毎日換水している浴槽水は 1 年に 1 回以上、ろ過器と循環設備を使用している浴槽水は 1 年に 2 回以上、浴槽水の消毒が塩素消毒でない場合は 1 年に 4 回以上、水質検査を行うことが公衆浴場の衛生等管理要領に記載されています。衛生管理が適切に行われていることを評価するためには、1 例として 2 ヶ月に 1 回実施するなど、水質検査の頻度を増やすことを検討することが重要です。また、循環式浴槽や循環配管を新設・更新した際には水質検査の実施頻度を増やし（1 例として 1 か月以内に 3 回）、管理状態の確認を行うことが推奨されます。水質検査の結果は検査の日から 3 年間保管しておかなければなりません。なお、水質検査は、精度管理を行っている検査機関に依頼することが望まれます。

水質基準

- ・濁度は 5 度以下。
- ・有機物（全有機炭素(TOC)の量）は 8mg/L 以下、又は、過マンガン酸カリウム消費量は 25mg/L 以下。
- ・大腸菌群は 1 個/mL 以下。
- ・レジオネラ属菌は検出されないこと（10cfu/100mL 未満）。

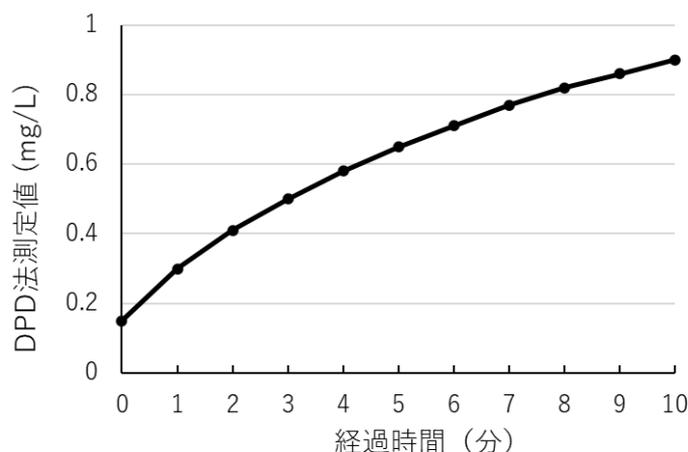
注：消毒剤として塩素化イソシアヌル酸またはその塩を使用している場合の有機物の測定は 2. 原水、原湯の項の注 1 を参照してください。

遊離残留塩素濃度の測定

水質基準のための水質検査とは別に、浴槽水の遊離残留塩素濃度を頻繁に（1時間毎、あるいは2時間毎など）測定する必要があります。遊離残留塩素濃度の測定法の1つであるDPD法では、遊離塩素と結合塩素のどちらでも発色しますが、遊離塩素では早く発色し、結合塩素は遅れて発色します。特に塩素と浴槽水等に含まれるアンモニア態窒素の反応により生成される結合塩素の濃度が高い場合は、下図のように試薬添加後の時間経過とともに色調が変化し、見かけの測定値が上昇します。そのため、遊離残留塩素濃度を正しく測定するには取扱説明書を熟読し、DPD試薬を試料に添加してから測定までの時間を厳守する必要があります。下図では添加5秒以内の測定値が正しい濃度になります。

DPD法の発色を利用した目視による測定は、明確に比色ができる測定に適した明るい場所で行うことも重要です。また、吸光光度計で測定する場合はDPD試薬を添加する前に検水のゼロ調整を必ず行います。

温泉水の泉質（成分、濁質、色など）によっては、いずれの測定法であっても正しく測定できない場合があるので、注意が必要です。取扱説明書に従って使用し、必要に応じてメーカー等に問い合わせてください。

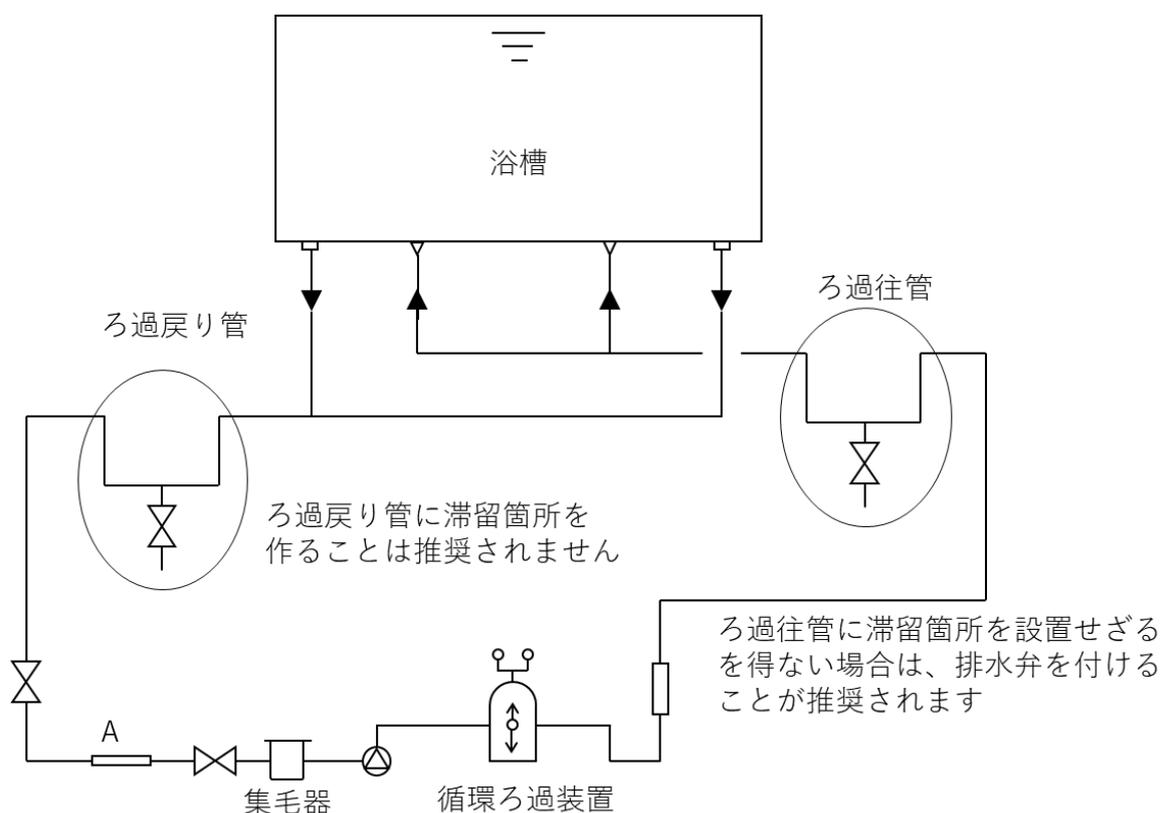


8. 循環配管

構造

配管内部の面積は非常に大きく、生物膜が形成されてレジオネラ属菌が増える可能性がとて大きいとされています。そのため、配管の状況を正確に把握して、不要な配管があれば取り除くようにします。また、配管内部を確実に消毒できるようにするために、配管内の浴槽水が完全に排水できるように配管し、滞留箇所（次図の○で囲ったU字型の配管など）には排水弁を設けて滞留水を排水できるようにすることが推奨されます。ただし、浴槽からのろ過戻り管は浴槽水の汚れが溜まりやすいため、滞留箇所を作ることは推奨できません。次図のAに透明塩ビ管を設置し、抜管を可能にしておくことで拭き取り検査が可能になります。

補給配管の項で説明しているように、逆流並びに汚染防止のために、循環配管に給湯配管あるいは給水配管を直接接続しないこととされています。循環配管及びそれに接続されているろ過装置は、レジオネラ属菌による汚染が発生する可能性が他の設備よりも高いため、汚染菌が給湯配管や給水配管に逆流して汚染しないようにします。



管理

1週間に1回以上(毎日が推奨されます)、決められた配管洗浄・消毒を行って配管内部の生物膜を取り除きます。配管洗浄・消毒は循環配管と浴槽の材質、腐食状況、生物膜の状況などから適切な方法を決めます。高濃度塩素消毒を行う場合は、浴槽水を循環可能な水位まで減らし、循環配管などの材質の腐食を考慮して5~10mg/Lの残留塩素濃度^{注)}で数時間循環させた後、必要に応じてチオ硫酸ナトリウムで中和して排水します。この操作を換水の都度行うことで、循環配管への生物膜の蓄積を防止することができます。

1年に1回以上、循環配管内の生物膜の状況を点検するとともに、あらかじめ消毒方法を決めておき、徹底的な清掃・消毒により生物膜を除去します。具体的には、循環配管等の内壁に繁殖した生物膜の剥離効果が高い、過酸化水素ならびに過炭酸ナトリウムなどの

発泡系洗浄剤や二酸化塩素等を用いた洗浄が考えられますが、これらの処理には危険が伴い、適用できる泉質や洗浄廃液の処理などに知識が必要なため、専門業者に相談のうえ消毒方法を選択するとよいでしょう。また、洗浄後の循環水の濁りを確認し、汚れが酷ければ頻度を増やす、汚れが少なければ頻度を減らす等の対策が望まれます。

温泉や井水等でスケール成分が付着しやすい水質の場合は、スケールを溶解除去する洗浄も適切な頻度で実施することが望まれます。配管へのスケール付着により配管内面の平滑性が失われると、生物膜が付着しやすくなり除去も難しくなります。一般にスケールの溶解除去には酸性の薬品が用いられます。

ろ過のための循環ではなく、湯水を均一にするための循環配管も生物膜を除去するための管理が必要です。

浴槽水を循環することで浴槽水の有機物が蓄積し、有機物量（過マンガン酸カリ消費量、TOC）が増加します。循環水とオーバーフロー水を適宜排水し、新しい水を補給する必要があります。

注：「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」では高濃度塩素消毒を 5～10 mg/L で行うことを推奨していますが、汚染の状況によっては 10～20 mg/L、場合によっては 50 mg/L での消毒が行われることがあります。この場合は、金属の腐食に十分留意して実施する必要があります。特にステンレス製の熱交換器には塩素濃度と時間を配慮する必要があります。

高濃度のモノクロアミンで消毒する場合は濃度を 10 mg/L 以上として、1 時間以上循環した後には中和して排水することが報告されています。（厚生労働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 25～27 年度総合研究報告書 種々の温泉水におけるモノクロアミン消毒効果と高濃度洗浄の検証）

9. ろ過器

構造

ろ過器は浴槽ごとに設置することが望まれます。これは、浴槽の入浴者数や使用状態で有機物等の汚濁負荷や消毒剤の消費量が異なるため、複数の浴槽で消毒剤の濃度や清浄度を均一に保つのが困難なためです。

1 時間当たり浴槽の容量以上のろ過能力を有し、逆洗浄等の適切な方法でろ過器内のごみ、汚泥等を排出することができる構造とする必要があります。

管理

循環ろ過システムにおける表面積のほとんどは、ろ過器内で占められています。従って、ろ過器内の適切な管理を怠ると、生物膜が成長し、レジオネラ属菌が増殖するリスクが増大します。

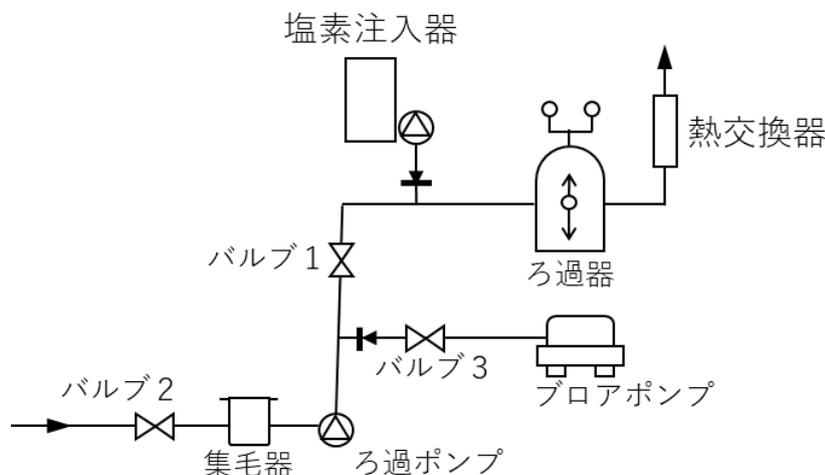
循環を停止することにより配管やろ過器内の湯が滞留して塩素濃度が低下し、生物膜が発生しやすくなります。そこで、浴槽に湯が張られている状態では、消毒剤の濃度維持と生物膜の蓄積防止のため、営業時間外であっても、ろ過器と消毒装置を常に作動させる必要があります。

1週間に1回以上(毎日が推奨されます)、逆洗浄を十分に行って汚れを排出するとともに、適切な消毒方法で生物膜を取り除きます。消毒方法は循環装置や浴槽の材質、腐食状況、生物膜の状況等を考慮して適切な方法を選択します。^{注)} 消毒・洗浄は、通常、前記の循環配管と同時に行います。

年に1度はろ過器の上蓋を開けて内部の様子を確認し、特に砂式ろ過器では3~5年に1度はろ材を交換することが推奨されます。スケール成分が多い水質では、ろ材同士の固着により水路(みずみち)が形成されると、ろ過器としての機能を喪失します。

注：泉質が強酸性である入浴施設ではろ過器と循環配管の内部の塩素消毒を実施することができません。このような場合の1例として、ろ過器と循環配管内の湯水を水道水に置き換えてから塩素消毒を行うことができます。

逆洗浄の効果を上げる方法としてエアレーションを組み合わせた方法が報告されていますので、1例として示します。



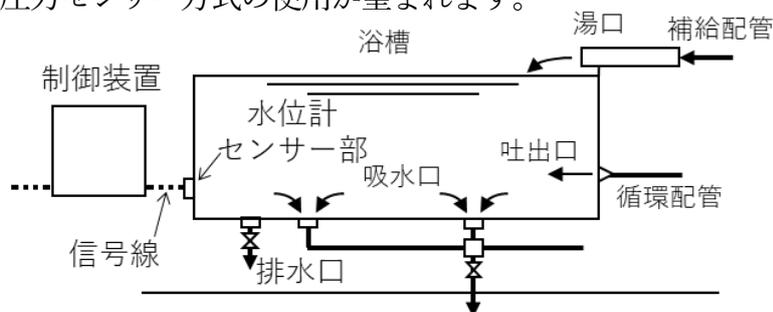
操作手順

- ① ろ過ポンプを停止します。
- ② バルブ1と2を閉めます。
- ③ 集毛器に次亜塩素酸ナトリウムをろ過器内の塩素濃度が 50 mg/L になるように投入します。
- ④ ろ過器の五方弁を逆洗ポジションにします。
- ⑤ バルブ1と2を開きます。
- ⑥ ろ過ポンプを10秒程度稼働して次亜塩素酸ナトリウムをろ過器内に移します。
- ⑦ バルブ2を閉じます。
- ⑧ ブロアポンプをバルブ3の接続口に接続します。
- ⑨ ブロアポンプを稼働させ、バルブ3を調整しながらろ過器内にエアを吹き込み、30分程度攪拌した後にブロアポンプを停止します。
- ⑩ バルブ2を開けて通常の逆洗・洗浄を行います。

10. 水位計及び水位計配管

構造

配管がある水位計は、浴槽水が滞留することで生物膜が定着しやすいうえ、洗浄が難しいことから、最もレジオネラ属菌汚染の原因になりやすい場所の一つです。このため、配管等が不要な圧力センサー方式の使用が望まれます。

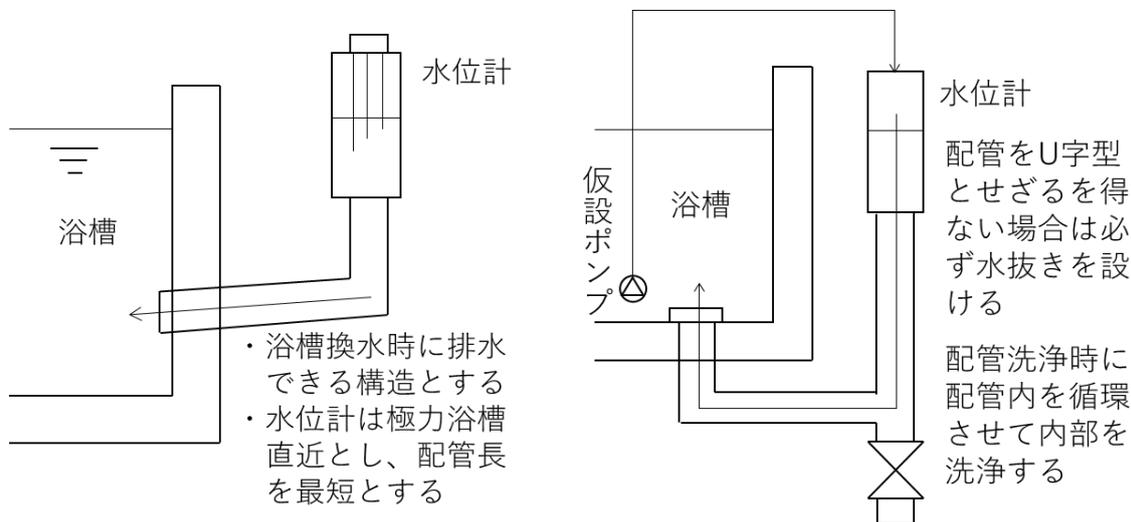


やむを得ず水位計配管を設ける場合は、水位計をできるだけ浴槽に近付けて配管を短くし、浴槽側に下り勾配を設けて、浴槽換水時に完全に排水できるようにし、内部を洗浄・消毒できる構造にします。配管に立ち上がりの部分がある場合は滞留しやすいため、水抜きを設けて排水と洗浄・消毒がしやすい構造とします。

水位計をバックヤードに設けるなど配管が長い場合は、循環系の洗浄・消毒時に水位計配管が洗浄できるよう、循環系と水位計配管を繋ぐバイパス配管を設けるなど、水位計配管内が定期的に洗浄できる構造とし、配管内の浴槽水が完全に排水できるように排水弁を設置します。

管理

水位計及び配管は、循環系統の換水洗浄に合わせて少なくとも週1回以上高濃度塩素や過酸化水素等で洗浄・消毒するなど、施設毎に週当たりの洗浄・消毒の回数と方法を決め、それによって内部の生物膜を取り除きます。



1 1. 集毛器

構造

集毛器はろ過器の前に設置しなければなりません。毎日清掃・消毒する必要があるので、内部の汚れが確認できるよう透明な蓋を使用し、手で容易に開閉できる構造とします。

管理

ストレーナーのスペアを準備して毎日交換して使用することが推奨されます。取り出したストレーナーは洗浄後、消毒剤に10分程度浸けて消毒（濃度は前項の注1を参照）してから乾燥させます。ストレーナーを取り出した際、配管内部の生物膜の蓄積状態を確認し、配管洗浄を行う目安にします。集毛器の内部も清掃し、消毒剤で消毒します。

1 2. 循環ポンプ

管理

浴槽に湯が張られている状態では、滞留水を作らず、消毒剤の濃度維持と生物膜の蓄積防止のため、営業時間外であっても、ろ過器と消毒装置を常に作動させる必要があります。

1 3. 消毒装置

構造

浴槽水の消毒に用いる塩素系薬剤の注入口または投入口は、浴槽水がろ過器に入る直前に設置しなければなりません。

管理

入浴者数、泉質、浴槽や配管の形態・仕様などにより塩素系消毒剤の消費量は異なるため、消毒剤の濃度の変化を確認しながら添加量を調整します。

浴槽に湯が張られている状態では、ろ過器と消毒装置を常に作動させる必要があります。薬液タンクの薬剤の量を常に確認し、補給を怠らないようにします。長期保管されていた次亜塩素酸ナトリウムは、有効塩素濃度が大きく低下している可能性があるため使用を避けます。注入弁のノズルが詰まっていたり、空気をかんでいたりして送液が止まっていなかなど、定量注入ポンプが正常に作動して薬液が注入されていることを毎日確認します。注入弁は定期的に清掃し、目詰まりを防ぎます。カルシウム濃度の高い水質の場合、注入弁のノズル先端がカルシウムスケール固着により詰まりやすくなるので、特に注意が必要です。

1 4. 加熱器（熱交換器）

加熱器（熱交換器）は、ボイラー等温水器からの温水と循環水・補給水を熱交換する装置と浴槽の排水（排熱）と補給水を熱交換する装置の2種類があります。1. 全般の概要図では温水と循環水・補給水を熱交換する装置を示しています。

構造

補給配管や循環配管に設置して配管内の水の熱交換を行います。排水と補給水を熱交換する場合は、給水管は常に正圧（排水管等よりも圧力が高い状態）にします。これにより、腐食等で管にピンホールができていても排水が給水系に入ることを防ぎます。

管理

給水管にピンホールができていないかを施設で決めた頻度で定期的に検査します。熱交換器内部にも生物膜やスケール成分が付着するので、適切な頻度でこれらの除去が必要となります。スケール付着は、熱伝導率悪化による昇温能力の低下をきたし、燃料費の増大にも繋がります。

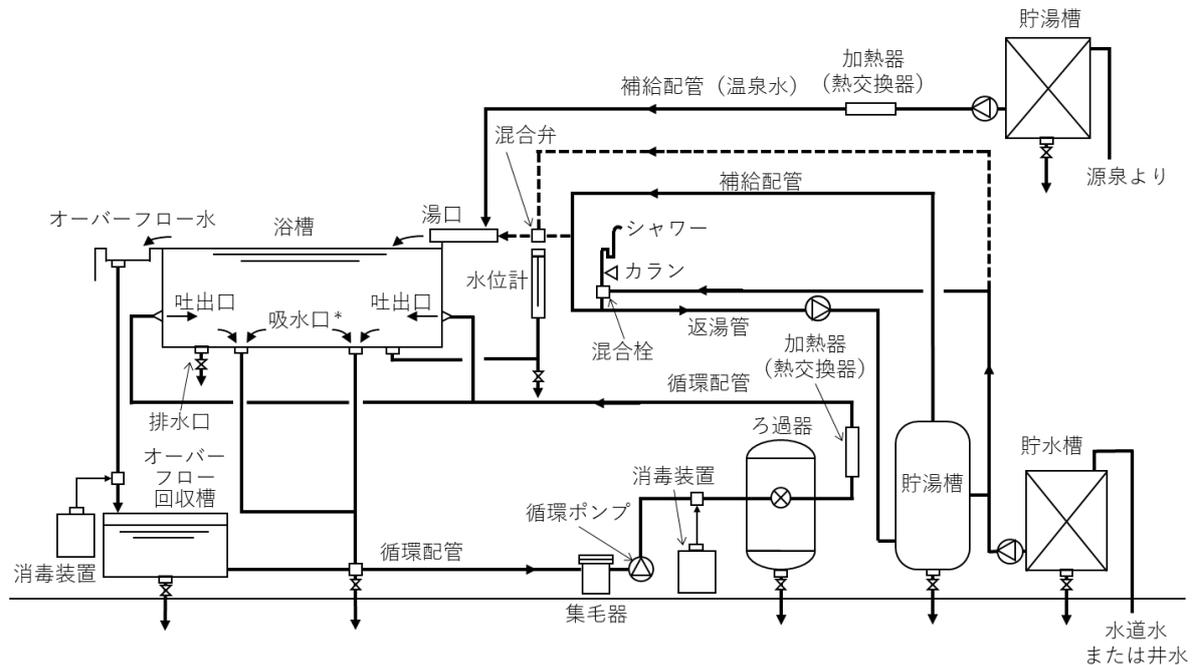
15. オーバーフロー回収槽

オーバーフロー回収槽はレジオネラ属菌の増殖が起きやすいことから、公衆浴場における衛生等管理要領（令和元年9月19日生食発 0919 第8号）では、オーバーフロー回収槽の水は浴用に供さないこととしています。

構造

オーバーフロー水及びオーバーフロー回収槽内の水を浴用に供する構造にならないようにします。やむを得ずオーバーフロー水を再利用する場合は、浴槽からのオーバーフロー水だけを回収し、浴場床排水が混入しないようにします。また、オーバーフロー還水管は直接循環配管に接続せず、消毒設備を備えた回収槽で消毒後に循環配管に戻し、集毛器とろ過器を通過したのち、浴槽に入る構造とします。回収槽は地下埋設しないようにして、内部の清掃が容易に行える位置に設置します。管理するには回収槽内の水が完全に排水できる構造が推奨されます。また、回収槽内の水が消毒できる設備とします。

この図はオーバーフロー回収槽を設置している循環式浴槽施設の概要の例です。



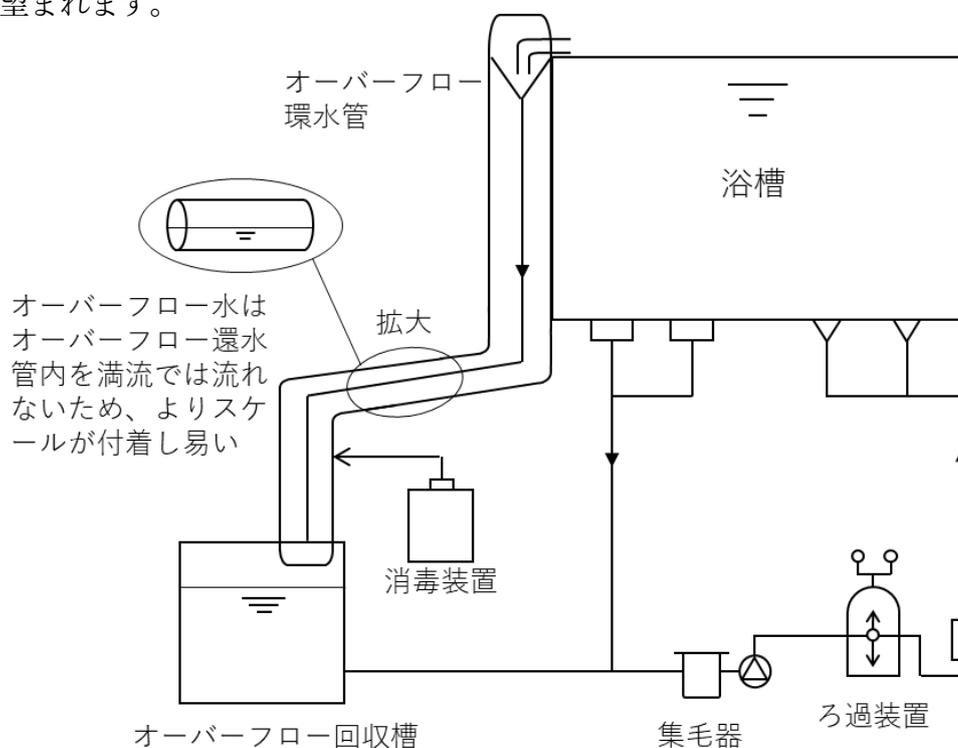
管理

レジオネラ属菌が増殖しないように別途回収槽の水を塩素系薬剤等で消毒します。遊離残留塩素濃度を0.4~1.0mg/Lに維持します。

1週間に1回以上完全に排水して、回収槽の壁面をブラッシングで清掃し、消毒します。回収槽の水面付近に生物膜がつきやすく、そこを中心に内部の壁面全体のブラッシングと

消毒が生物膜の除去に効果があります。回収槽の消毒と同時に浴槽から回収槽までの配管の消毒を行い、高圧洗浄で生物膜を除去します。下図にオーバーフロー回収槽の構造と洗浄の1例を示します。

オーバーフロー回収槽は3か月ごとにレジオネラ属菌検査を行って、不検出を確認することが望まれます。



オーバーフロー環水管内は高圧洗浄で生物膜の除去を行うことが推奨されます。そのため曲部には大曲エルボの使用が勧められます。

オーバーフロー水を回収・再利用することで浴槽水の有機物量が増加します。適宜排水して、新しい水を補給する必要があります。

16. 気泡発生装置等

構造

気泡や微小な水粒を発生させる装置を指します。気泡発生装置等を使用する場合、浴槽水は毎日換水しなければなりません。ろ過器を用いている循環式浴槽では気泡発生装置等を用いることは望ましくありません。空気取入口から土ぼこりや浴槽水等が入らない設置位置と構造とし、砂塵侵入防止に目の細かい防虫網を設置します。また、気泡発生装置は気泡板を取り外し可能とし、内部に排水口を設けるなど、点検、清掃や排水が容易にできる構造にします。

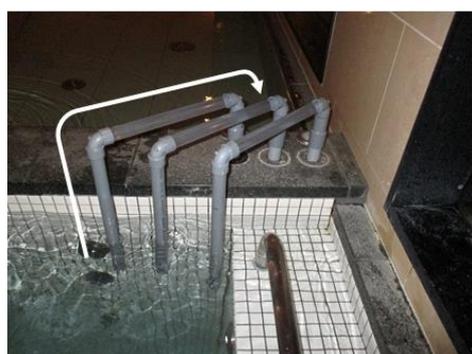
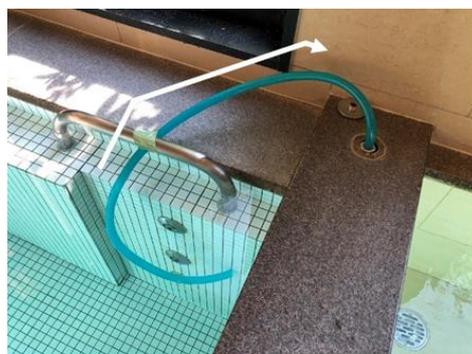
管理

装置の内部に生物膜が形成されないように施設で決めた方法で清掃と消毒を行います。
例) 気泡発生装置：浴槽水換水の都度、気泡板を取り外し、内部を洗浄後、完全に排水します。

ジェット噴射装置：浴槽水換水の都度、ジェット配管内部の高濃度塩素洗浄を行います。

管理責任者を決めて、責任の所在を明確にしたうえで、洗浄作業の結果を記録に残すなどして管理を強化します。浴槽水等の水質検査でレジオネラ属菌が検出された場合は、直ちに気泡発生装置等の使用を中止します。

洗浄方法の例を下図に示します。循環配管の高濃度塩素消毒や過酸化水素水での消毒時に写真の仮設配管を取り付け、空気吸込管の洗浄・消毒を行います。写真に示す空気吸込口は浴槽水を吸い込みやすく、生物膜が形成されやすいので確実な洗浄・消毒が必要です。



ホースや中央の写真のパイプを用いると
水が吸引され洗浄されます

17. 連通管

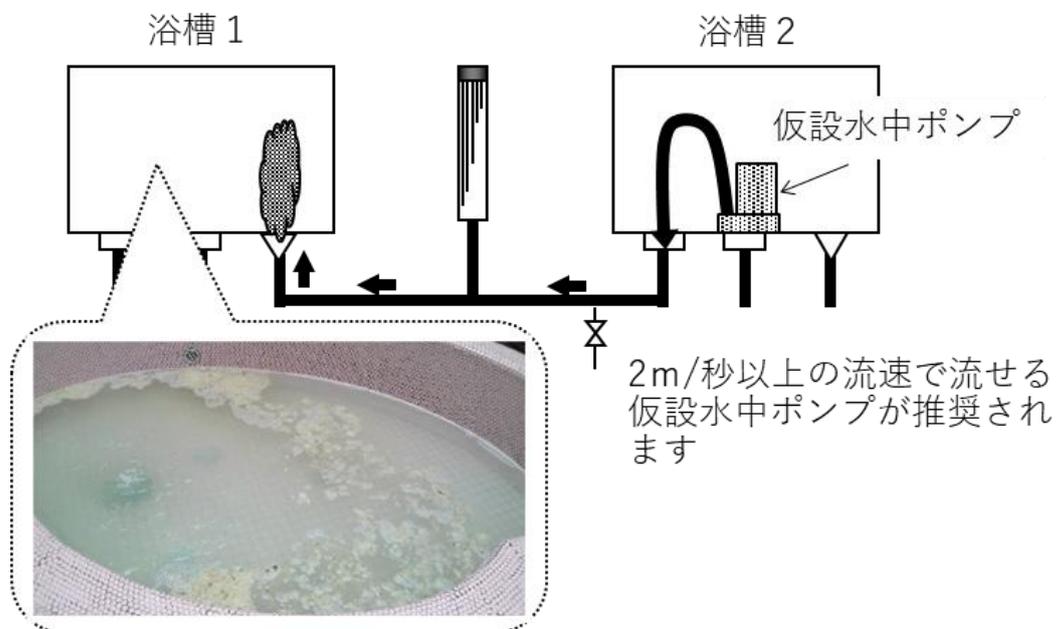
構造

1台のろ過器で複数からの浴槽の浴槽水を処理する場合、浴槽水位を調整するため、複数の浴槽を繋ぐ配管を設けることがあります。生物膜が蓄積しやすく、最もレジオネラ属菌が発生しやすい場所の一つです。そのため、ろ過器を浴槽ごとに設置することが推奨される理由の1つになっています。

管理

連通管は、通常の循環配管とは別経路であるため、浴槽水を換水する際に、別途、洗浄・消毒を行います。ブラシ等で物理的に洗浄することが望ましく、物理洗浄が困難な場合は、高濃度塩素等で高圧洗浄を行います。循環配管の通常の化学洗浄では、連通管内部に洗浄剤が入りにくく、生物膜除去効果が発揮されません。仮設水中ポンプを用いて強制的に洗浄剤の入った水を流すことにより、生物膜が除去しやすくなります。なお、連通管の長さが短い場合は、ブラシ等による物理洗浄や高圧洗浄が有効です。

洗浄方法の1例を下図に示します。片方の浴槽から仮設ポンプで連通管内に浴槽水を流し込みます。薬剤による化学洗浄だけではなく、流速2m/秒で流せる水中ポンプを使って物理的洗浄も併用します。



18. 調節箱

構造

沸かし湯と水を混ぜて洗い場の湯栓（カラン）やシャワーに送る湯の温度を調節し、貯留する装置です。1例としては、幅1m、奥行き60cm、高さ60cmほどの鋼鉄製あるいはステンレス製の箱型の調節箱の中で、90℃ほどの沸かし湯と20℃ほどの水とを混ぜて45～50℃の湯をつくり貯留し、ポンプで送ります。箱の中で、湯栓用の湯とシャワー用の湯と間に仕切り板が設けられているものもあります。

内部の湯水面は空気と接触し、レジオネラ属菌の増殖に適した温度になります。そこで、清掃しやすい構造とし、薬剤注入口を設けて塩素消毒等が行えるようにします。

管理

水道水を原水とする場合は沸かし湯と混ぜるために塩素濃度が足りず、地下水の場合は塩素が含まれていません。カランやシャワーでの遊離残留塩素濃度が0.4～1.0mg/Lに保たれるように調節箱に塩素を注入できる装置を設置する必要があります。

19. シャワー、打たせ湯

構造

シャワーや打たせ湯はエアロゾルを発生させ、レジオネラ感染を引き起こす原因となりやすいため、循環している浴槽水やオーバーフロー水を用いない構造にします。

シャワーヘッド及びシャワーホースに湯が滞留することで、レジオネラ属菌が発生しやすくなります。

管理

シャワーは定期的な点検、洗浄、消毒、交換が必要です。シャワーは、1日の使用の最後に内部の水が置き換わるように水道水等の塩素（水道水に含まれる程度の濃度）を含む水で20～30秒程度通水することが推奨されます。これによりシャワーヘッドやホース内の温度を下げることで塩素で、菌の増殖を抑えます。

シャワーヘッドとホースは公衆浴場における衛生等管理要領では1年に1回以上点検するとしていますが、下記の消毒の際に点検することが推奨されます。破損の有無の確認と、目視や布、綿棒でこすることで内部の汚れとスケールの確認を行います。

さらに、定期的にレジオネラ属菌検査を行い、不検出であることを確認します。^{注)}

シャワーヘッドとホースの消毒方法の例を紹介します。

- ① 月に1～2回、シャワーヘッドとホースを外し、可能であれば内部をブラシ類を用いて洗浄してから、遊離残留塩素濃度が10～50mg/Lの液に1～3時間漬けて置いて消毒します。濃度と時間はバイオフィルムの形成状況やシャワーヘッドとホースの材質、腐食の可能性などにより調整します。消毒の効果は漬けて置き前後に内部を拭き取り、簡易測定装置を用いたATP値の測定値で判断することができます。漬けて置き後のATP値が0に近い値であれば効果ありとなります。また、漬けて置き前のATP値が0に近ければ、洗浄・消毒実施の間隔を長くすることも可能です。
- ② 月に1～2回、60℃以上の高温水を30分間通水します。

レジオネラ属菌が検出された場合の高濃度塩素による消毒の例を紹介します。台所用塩素系漂白剤(界面活性剤の効果が期待できる)の100倍希釈液(塩素濃度500mg/L程度)、12%次亜塩素酸ナトリウムの200倍希釈液(塩素濃度600mg/L程度)またはジクロロイソシアヌル酸ナトリウム(有効塩素60%)で作成した塩素濃度600mg/L溶液(水1Lに顆粒1gを溶解)に30分間漬けて置きます。その後水道水等ですすぎます。

打たせ湯は湯口と同様にレジオネラ属菌が繁殖可能な温度となる場合が多いため、定期的な点検・洗浄・消毒を行うことが重要です。打たせ湯の管理は湯口の管理に準じて行います。

注：シャワー水からレジオネラ属菌が検出されても、シャワーヘッドやホースの内部でレジオネラ属菌が増殖しているとは限りません。配管や貯湯槽等の調査も必要です。

20. 上がり用湯、上がり用水

管理

水質基準に合うように管理します。1年に1回以上、水質検査を行い、その結果は検査の日から3年間保管します。

水質基準

- ・色度は5度以下であること
- ・濁度は2度以下であること
- ・pH値は5.8以上8.6以下であること
- ・有機物(全有機炭素(TOC)の量)は3mg/L以下、又は、過マンガン酸カリウム消費量は10mg/L以下であること^{注)}

- ・大腸菌は検出されないこと
- ・レジオネラ属菌は検出されないこと（10 cfu/100mL 未満）

注：消毒剤として塩素化イソシアヌル酸を使用している場合の有機物の測定は2. 原水、原湯の項の注1を参照してください。

2 1. 排水

河川及び湖沼に排水する場合には、環境保全のために必要な処理を行います。

公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査ガイドライン（案）

○ガイドライン作成の趣旨

レジオネラ症は、環境からヒトに直接感染して発生するため、感染拡大を防止するには、患者発生の原因となる環境要因を迅速に特定し、対策をとることが大切である。このガイドラインは、レジオネラ症患者が発生した場合の行政の対応について、特に公衆浴場等入浴施設を原因とする集団発生時の調査方法について参考となるよう作成した。なお、集団発生も第一報は散发例と区別できないため、初発患者からの調査を想定して作成した。

レジオネラ症の調査には、患者調査を行う感染症担当部門と公衆浴場等入浴施設調査を行う衛生担当部門との協力が不可欠である。本ガイドラインでは役割を分けずに記載しているため、各自治体の組織・職務分掌に合わせて役割分担していただきたい。

1. 届出の受理

レジオネラ症は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症法）で四類感染症に分類されており、保健所は診断した医師から届出を受理する。保健所は、届出に基づき、当該医療機関に対し、次の対応をとる。

- ・喀痰等患者由来検体の確保・保存を依頼する。
- ・患者からレジオネラ属菌分離ができている場合は、患者株の保存・提供を依頼する。
- ・患者の症状や臨床経過（患者からの聞き取りが行えるか）、治療や投薬の有無を聴取する。
- ・患者やその家族への聞き取り調査が行えるよう協力を依頼する。
- ・他にレジオネラ症を疑う患者発生があるかどうかを確認する（患者発生が散発的か集団的か判断の参考にするため）。

【ポイント】

- 1) 医療機関ではレジオネラ症と判断しても喀痰等を採取せずに治療を開始することが多いため、レジオネラ症患者発生の連絡が来たら速やかに喀痰等の確保を依頼する。（患者の感染源が入浴施設である場合において施設に強い指導をするためには、患者の菌株と入浴施設の菌株の関連性を示す必要があるため。）
- 2) 診断結果を医師から患者等に伝えてあるかを確認しておく、スムーズに患者等の聞き取りが開始できる。

2. 患者の調査

▽目的

患者本人の行動履歴や周辺環境を聞き取ることにより、感染経路や原因となりうる場所・施設・設備を絞り込む。

▽方法

患者調査票（別添1）をもとに患者（患者が対応できない場合は、家族等）や医療機関から聞き取り調査を実施する。

- ①発症前 2 週間以内に、感染源となりうる水利用設備（入浴施設、冷却塔、加湿器、噴水、スプリンクラー、自動車洗車機等）や土壌（ガーデニングの腐葉土、工事現場の粉塵等）からのエアロゾルに暴露された可能性の有無
- ②発症前 10 日以内に、国内・国外旅行の有無
- ③家族、患者周辺住民、同一職場における発症者の有無 等

【ポイント】

- 1) 疫学調査は、調査表等を用い、項目に沿って聞き取りを行う。
- 2) 潜伏期間(2～10 日程度)にあわせて、行動調査をするため、空白の暦(カレンダー)を持参すると、本人の記憶やイベント状況等が確認しやすい。

患者等への調査の結果、公衆浴場等入浴施設を原因とする集団発生が疑われる場合は、「3. 患者由来株の収集」以下の流れで調査を実施する。また、集団発生でなくても、患者の行動履歴の中に感染の原因となりうる公衆浴場等入浴施設がある場合は「4. 施設の調査」を参考に施設の調査を行い、必要に応じて「5. 施設のレジオネラ属菌検査」等を行う。当該施設が管外の自治体にある場合は、情報提供や施設調査の依頼を行う。

3. 患者由来株の収集

▽目的

レジオネラ属菌は自然環境中に広く生息しているため、環境からレジオネラ属菌が分離されたというだけでは感染源の特定には至らない。患者から分離された菌株と環境から分離された菌株の異同を調べる必要がある。菌株の血清学的、分子疫学的解析（後述）を実施するため、医療機関等から菌株を分与してもらったり臨床検体から分離したりして、患者由来株を確保する。

▽方法

3-1. 医療機関等で菌分離がされている場合

- ・ 医療機関（主治医）に菌株の入手についての承諾を得る。
- ・ 医療機関外で分離された場合、医療機関が発注した検査機関等へ連絡し、菌株の確保を依頼する。
- ・ 菌株を検査機関等から送付してもらい、又は受取に行く。送付してもらい場合、送り賃が必要となることがあるので、その支払い方法については発送元検査機関等と受取保健所等とで協議しておく。
- ・ 地方衛生研究所等に搬入し、検査に供する。

3-2. 医療機関等で菌分離がされていない場合

- ・ 医療機関に患者由来検体（喀痰等）の確保と提供について依頼する。
- ・ 検体採取ができれば、医療機関に受取に行き、適切に保存（0～4℃に保冷：「病原体検出マニュアル『レジオネラ症』」を参照）して地方衛生研究所等に搬入する。

- ・地方衛生研究所等で菌の分離を行う。

検査法については「病原体検出マニュアル『レジオネラ症』」を参照する。

【ポイント】

- 1) 喀痰等はできる限り速やかに検査に供する。
- 2) 抗生物質投与前の検体が望ましいが、投与後でも菌が検出できる場合がある。
- 3) 必ずしも菌が分離できるわけではないが、様々な培地や前処理方法を使って地衛研等で菌を分離できる可能性があるため、菌株が入手できない場合には患者検体を確保することが望ましい。
- 4) 患者由来株の収集については、届出のあった全患者に対して行うことが望ましい（集団発生の第一報の可能性があるため）。

4. 施設の調査

レジオネラ属菌の発生源となりうる場所・設備の現地調査にあたっては、調査者はマスクを着用するなど感染防止対策をとる。

▽目的

当該施設が患者の感染源である蓋然性を判断するため、当該施設においてレジオネラ属菌の発生源となりうる（レジオネラ属菌が増殖しやすい、エアロゾルが発生する）場所・設備の有無を調査する。

▽方法

施設調査票（別添 2）をもとに施設から聞き取り調査を行い、現地を確認する。可能な場合は、現地調査時に ATP 簡易測定キット等を用いて汚れの程度を見る（注）。記録類の確認では、届出患者の施設利用日を念頭に置いて確認する。

4-1. 入浴施設において調査する内容

①浴槽

- ・使用水の種類（温泉の場合は泉質）
- ・温度、pH、加水の有無（加水の種類）
- ・浴槽水等の水質検査記録の確認と実施頻度
- ・浴槽水の消毒の有無と方法、消毒剤の種類及び濃度（遊離残留塩素濃度の測定を行う。）
- ・遊離残留塩素濃度の測定頻度（測定記録を確認する。）
- ・浴槽の清掃方法（ブラッシング、ジェット水流、雑巾がけなど）
- ・清掃に使用する洗浄剤や消毒剤の種類及び濃度
- ・換水・清掃・消毒の頻度（実施記録を確認する。）
- ・浴槽の形状（滞留しやすいかなど）や材質（タイル、木、石など）、状態（ひび割れなど）の確認、吐出口及び浴槽・浴室内の生物膜の発生状況の有無
- ・気泡発生装置、打たせ湯等のエアロゾル発生源の有無（有れば使用水の種類、間欠運転の有無）
- ・連通管の有無、循環配管や付帯設備（気泡発生装置、水位計等）の配管開口部の確認

②循環ろ過装置

- ・循環ろ過の有無
- ・ろ過装置の性能（ろ過能力 $\text{m}^3/\text{時間}$ ）、ろ過能力と浴槽容量の比較
- ・ろ過材の種類
- ・洗浄、消毒の頻度と方法（逆洗浄の実施頻度、連通管を経由した排水による消毒 等）
- ・ろ過材の交換の有無（頻繁に交換する必要はない。交換した理由がポイント。）

③消毒装置

- ・消毒剤の種類
- ・消毒剤注入口の位置
- ・装置の管理（薬液タンクの補充頻度、薬液注入ポンプの目詰まりの確認）

④循環配管

- ・状態の確認（腐食等による破損の有無、複雑・不要な配管による滞留水発生の有無 等）
- ・清掃する場所、配管消毒が行き届かない箇所の有無
- ・清掃、消毒の頻度と方法（消毒剤の濃度、消毒時間）、直近の実施日
- ・使用する消毒剤の種類及び濃度
- ・過酸化水素等による配管の定期洗浄を行っている場合は、頻度と方法、使用する消毒剤、直近の実施日、業者利用の有無、業者名、連絡先

⑤貯湯槽（源泉槽を含む）

- ・貯湯槽の有無
- ・外気との遮断構造の有無
- ・貯湯槽水の温度（変動も含めて）
- ・貯湯槽水の消毒の有無と消毒剤の種類及び濃度
- ・貯湯槽の清掃、消毒の頻度と方法
- ・分湯枡がある場合には、生物膜の付着状況、清掃消毒の頻度と方法及び雨水等が流入し易い構造かの確認

⑥ヘアキャッチャー（集毛器）

- ・ヘアキャッチャー内部の状態の確認（毛髪等のゴミ、ぬめりの付着状況）
- ・清掃、消毒の頻度と方法
- ・使用する消毒剤の種類及び濃度

⑦シャワー、打たせ湯

- ・シャワーヘッドまたは吐出口の汚れの有無
- ・使用水の種類
- ・調節箱の有無と清掃消毒状況（シャワーの場合）
- ・清掃、消毒の頻度と方法
- ・使用する消毒剤の種類及び濃度

⑧オーバーフロー回収槽またはオーバーフロー環水管

- ・オーバーフロー水の再利用の有無
- ・浴室排水が混入し易い構造かの確認
- ・湯水の滞留の有無
- ・オーバーフロー回収槽内の湯水の消毒の有無、消毒している場合は遊離残留塩素濃度の測定記録の確認
- ・回収槽の清掃、消毒の頻度と方法
- ・使用する消毒剤の種類及び濃度

⑨その他

(水位計、連通管、昇温循環装置、気泡発生装置、ジェット噴射装置など)

近年、入浴施設には様々な入浴設備や装置が付随している。こうした施設、装置における生物膜が形成されそうな箇所を推測して、配管等を含めたこれらの装置における衛生管理方法を確認する。

また、ミストサウナがある場合は、使用水の種類や給水系統、衛生管理方法等を確認する。

【ポイント】

- 1) 調査について施設に電話でアポイントメントを取る際に、施設側に次のような事前準備を依頼しておくことよ。
 - ・平面図、配管系統図等の図面
 - ・管理記録、浴槽水(必要に応じて原湯や上がり用湯)の水質検査記録、清掃消毒等の各種記録
 - ・過去2週間の施設利用者数、他の利用者からの体調不良等の相談の有無、従業員の健康状態等の把握
- 2) 調査に必要な物品を準備しておくことよ。調査に向かう際には「必要物品チェックリスト(別添 3)」を用いて、漏れの無いようにする。
- 3) 可能ならば、以下「5. 施設のレジオネラ属菌検査」の直前は洗浄、消毒をひかえるように施設に伝える。

注) ATP 簡易測定について

表面の拭き取りは 10cm 四方を拭き取る (これに依らない場合は、10cm 四方に換算してから下記の目安数値を参考にする)。ルシパック (キッコーマンバイオケミファ) を用いた清浄度の目安は表の通り。但し、測定値は環境や状況により変動する (水質によっては汚染がなくても高い数値を示す場合や、逆に阻害されて低い数値を示す場合がある) ので、数値は参考値とする。

場所	ルシパック Pen	ルシパック A3
浴槽壁 10cm 四方拭き取り	1,000RLU	1,600RLU
浴槽水	25RLU	40RLU

(参考) ビルメンテナンス・施設清掃 ルミテスター活用ハンドブック (キッコーマン)

https://biochemifa.kikkoman.co.jp/files/page/atp_portal/docu/building_maintenance_katu.pdf

5. 施設のレジオネラ属菌検査

▽目的

施設調査結果を基に当該施設におけるレジオネラ属菌の分布状況を推測する。また、発生源の疑いがある箇所を採水・採取し、患者から分離された菌株と環境から分離された菌株の

異同を調べる。

▽方法

公衆浴場等入浴施設を対象にした方法を示す。

5-1. 検体採取方法

浴槽水などの水は、滅菌採水容器に採水する（500mL以上採水することが望ましい）。塩素を含む検水には25%チオ硫酸ナトリウムを1/500量加えて中和する。採水に際しては、柄杓等を利用して採水容器に直接検水が触れないようにし、種類、採水部位、日時、設備の型式、水温、pH値、残留塩素濃度などを記録する（「病原体検出マニュアル『レジオネラ症』」を参照）。

シャワーヘッドなどの拭き取り試料は、滅菌スワブでよく拭いたものを滅菌生理食塩水等の入った滅菌管に採取する。市販の拭き取りキットを用いると便利である。

5-2. 採水箇所及び拭き取り試料の採取箇所

①浴槽

患者が利用した浴槽で重点的に採取する。浴槽水は1浴槽から1試料採取すればよいが、浴槽の形が複雑な場合や滞留が推測される場合は複数の試料を採取する。気泡発生装置やジェット噴射装置がある場合は、これらを作動させて配管内の滞留水と混和した状態を採水するのがよい。

浴槽壁の拭き取り試料を採取する。浴槽の壁の状態を丁寧に観察し（材質はタイルか、木製か、硬化樹脂製か、岩かなど。タイルや岩の目地にひびや欠けたところはないかなど）、木質部、ひびや欠けた箇所があれば、そこから重点的に採取する。

②吐出口

浴槽に設備（気泡発生装置、連通管、打たせ湯など）がある場合、採取が可能なら吐出口から出る湯を採取する。

吐出口の内側及び湯が流れている部位の拭き取り試料を採取する。

③原水、原湯

施設が利用している原水や原湯を採取する。貯湯槽がある場合は、貯湯槽水を採取する。

④シャワー

可能な範囲で複数のシャワーから水試料を採取する。例えば、第一に患者が使用したシャワー、第二に調節箱（湯栓やシャワーへ送る湯の温度を調節する箱）から最も遠いシャワーを優先的に採取するのがよい。シャワーヘッドやホースの中に湯が残っていれば、それを採取する。調節箱からも採取する。

シャワーヘッドやホース、調節箱の内側の拭き取り試料を採取する。

⑤給湯栓

給湯栓を開いて湯を採取する。

給湯栓の内側の拭き取り試料を採取する。

⑥ヘアキャッチャー

ヘアキャッチャー内にたまっている湯を採取する。

ヘアキャッチャーの内面及びカゴ・ネットの拭き取り試料を採取する。

ヘアキャッチャーにたまっているゴミを試料とすることもできる。

⑦気泡発生装置など

浴槽に気泡発生装置やジェット噴射装置、連通管または水位計配管があれば、それらの口の部位や内側の拭き取り試料を採取する。

⑧ろ過装置及び配管

可能であれば、ろ過装置内の湯を採取する。

可能であれば、ろ過装置やつながる配管の内側の拭き取り試料を採取する。

⑨その他の設備

生物膜の形成が推測される設備から湯を採取、あるいは拭き取り試料を採取する。

打たせ湯が使用されていれば、湯を採取する。また、打たせ湯の設備の拭き取り試料を採取する。

水位計、加熱器、オーバーフロー回収槽などの入浴設備に付随する設備や装置での生物膜の形成を推測し、その場所の水や拭き取り試料を採取する。

5-3. 検査

5-3-1 レジオネラ属菌の分離培養および迅速検査

菌種確認や血清群別、分子疫学解析を実施するためには菌を分離することが望まれる。レジオネラ属菌の有無を迅速に知りたい場合は、検体中のレジオネラ属菌由来の核酸(DNA、RNA)を直接検出する方法(リアルタイムPCR(qPCR)法、LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)法等)が利用できる。検査法については「病原体検出マニュアル『レジオネラ症』」を参照する。

5-3-2 分子疫学解析

患者および施設から同一種・血清群のレジオネラ属菌が分離された場合に行う。パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法、Sequence Based Typing(SBT)法、MLVA(multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis)法などがある。検査法については「病原体検出マニュアル『レジオネラ症』」を参照する。

【ポイント】

1) 保健所と地方衛生研究所等は、検体の採取から検査まで速やかに対応できるよう連絡体制や検査体制を確認しておく。検体の種類と量を予め検査担当に連絡しておく、スムーズに検査が開始できる。

2) 将来様々な目的で実施する可能性がある解析のために、分離株は衛生研究所において保存することが望ましい。保存法は「病原体検出マニュアル『レジオネラ症』」を参照する。

6. 検査結果の解釈

6-1. 患者からも施設からも菌が分離された場合

患者および施設から同一種・血清群のレジオネラ属菌が分離された場合は、当該施設が感染源の可能性があるため、患者調査及び施設調査の結果（潜伏時間と施設利用の関係等）から総合的に判断する。

その際、分子疫学解析の結果を補完的に用いることができる。PFGE法、SBT法、MLVA法など複数種の解析方法を組み合わせることが望ましい。

患者由来株と施設由来株の菌種や血清群が異なる場合の解釈は、次項6-2.のとおり。

6-2. 施設からのみ菌が分離された場合

当該施設が感染源とは特定できないが、レジオネラ属菌は検出されているため、施設の消毒等の対策を施す必要がある。

施設からの菌の分離状況により、当該施設の衛生管理の状況を推測することができる。施設の聞き取りや記録との齟齬や施設内の欠陥、衛生管理上の問題点等を指摘し、レジオネラ属菌の増殖・蔓延への対応策を検討する。

6-3. 患者からのみ菌が分離された場合

施設からレジオネラ属菌が検出されていないため、当該施設が感染源とは特定できない。しかし、検査時点の検体は、患者利用時とは異なる状態であるため、レジオネラ属菌が検出されなくても、感染源ではないと完全否定もできない。患者の行動等の疫学調査の結果や施設調査で得た衛生管理状況を基に、感染源の推定や対策の必要性を判断する。

(別添1)

レジオネラ症患者調査票

調査日: 年 月 日() 調査担当(所属):

調査者:

届出受理日	平成 年 月 日() 時					病型	肺炎型・ポンティアック熱型				
患者	氏名	(男・女)				生年月日	年 月 日(歳)				
	住所	TEL									
	職業	(業務内容:)				職場等					
	基礎疾患	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()				入院	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有(/ ~ / 入院)				
発症日	月 日	月 日	月 日	月 日	月 日	月 日	月 日	月 日	月 日	月 日	
発熱 °C											
咳嗽											
呼吸困難											
腹痛											
下痢											
意識障害											
肺炎											
多臓器不全											
その他											
治療状況	抗菌薬の投与	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有(薬名:) (投与期間 年 月 日~ 年 月 日)									

行動調査

最近10日間以内の旅行歴	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有 国内()・海外() 旅行期間(年 月 日~ 年 月 日) <input type="checkbox"/> 個人 <input type="checkbox"/> グループ <input type="checkbox"/> 団体ツアー() 同行者(名)		
最近10日間以内の温泉等利用歴 (旅館、公衆浴場、プール等含む)	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有 (利用日: 月 日() 利用頻度: 回/週・月 利用施設名: 利用場所:) 同行者: <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有		
	月日	曜日	発症10日前~発症日までの行動 <small>外出(旅行、旅館・温泉、公衆浴場、地域の行事、ゴルフ場・文化スポーツ施設のプール・シャワー利用等)、歯科治療、除草・ガーデニング作業、洗車等</small>
発症日	月 日		
1日前	月 日		
2日前	月 日		
3日前	月 日		
4日前	月 日		
5日前	月 日		
6日前	月 日		
7日前	月 日		
8日前	月 日		
9日前	月 日		
10日前	月 日		

*レジオネラ肺炎の潜伏期間:2~10日

*ポンティアック熱型の潜伏期間:約1~2日

家族等構成(家族以外の同一行動者を含む)

氏名	続柄	年齢	性別	職業	症状	検査日	結果
			男・女		無・有()	/	
			男・女		無・有()	/	
			男・女		無・有()	/	
			男・女		無・有()	/	
			男・女		無・有()	/	

環境調査

住居形態	<input type="checkbox"/> 独立家屋 <input type="checkbox"/> 共同住宅(マンション、アパート、団地、寮) <input type="checkbox"/> その他()
介護保険施設利用の有無	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有(<input type="checkbox"/> ショート <input type="checkbox"/> デイサービス <input type="checkbox"/> 入所)※入所の場合、以下は施設の内容を調査
飲料水	使用水の種類 <input type="checkbox"/> 公共水道(名称:) <input type="checkbox"/> 井戸水 <input type="checkbox"/> ボーリング水 <input type="checkbox"/> 湧水 <input type="checkbox"/> その他()
	貯水槽の有無 <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
風呂	<input type="checkbox"/> 患者専用 <input type="checkbox"/> 家族と共同 <input type="checkbox"/> 他の世帯と共同
	<input type="checkbox"/> 入替式(一般型) 浴槽の湯の交換頻度(回/ 日)
	<input type="checkbox"/> シャワーのみ <input type="checkbox"/> 循環式(<input type="checkbox"/> 毎日 <input type="checkbox"/> 週2-3回 <input type="checkbox"/> 週1 <input type="checkbox"/> 無) 浴槽の湯の交換頻度(回/ 日)
	浴槽水塩素濃度(ppm) <input type="checkbox"/> その他()
蛇口付属品(浄水器)の有無	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有
加湿器使用の有無	<input type="checkbox"/> 加湿器 (<input type="checkbox"/> 超音波式 <input type="checkbox"/> 気化式 <input type="checkbox"/> 加熱式 <input type="checkbox"/> 集中管理型 <input type="checkbox"/> その他()) 水交換頻度(回/ 日) 水注ぎ足し(<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無) 清掃頻度(回/ 日) タンク内塩素濃度(ppm)
吸入器使用の有無	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有
空気清浄機使用の有無	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有 (加湿機能 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有 *有の場合、加湿器使用項目欄に記載すること。)
エアコン使用の有無	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有(冷却塔: <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有、加湿機能 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有)
エアロゾル発生環境	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有() ※噴水、自宅周囲の水たまり、池、室内の植木鉢、ミスト発生装置、クーリングタワー等
エアロゾル発生作業	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有() ※エアコン室外機の掃除や溝掃除、水槽掃除、歯科治療、洗車等
粉じん発生作業	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有 (<input type="checkbox"/> 農作業(草刈り) <input type="checkbox"/> 園芸・畑仕事など土いじり <input type="checkbox"/> 庭の水まき <input type="checkbox"/> その他())
車使用の有無	<input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有(カーエアコン使用: <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有)

その他 自由記載欄(経過等必要に応じ記入)

施設調査票

調査日時: 年 月 日 時		保健所名:		調査担当者:	
施設名称				所在地	
営業者氏名				電話番号	
管理責任者氏名				対応者	
営業の種類	公衆浴場・旅館・その他:				
管理体制	自主管理 ・ 委託管理(管理会社名: _____)				
営業状況	休業日			その他	
入浴者数	平日 平均	人/日	土・日・祝日 平均		人/日
	患者の利用日	年 月 日			人
他の健康被害情報	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり	体調不良者等	人	内容	
使用水の種類	温泉井戸 本数	本	用途		
	井戸 本数	本	用途		
	水道水	<input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし	用途		
浴槽の種類	<input type="checkbox"/> 非循環式浴槽	<input type="checkbox"/> 常時給湯しオーバーフローを行う、いわゆる掛け流し式			槽
		<input type="checkbox"/> いわゆる掛け流し式でないもの			槽
	<input type="checkbox"/> 循環式浴槽	<input type="checkbox"/> 浴槽水を毎日換水			槽
		<input type="checkbox"/> 浴槽水を塩素系薬剤を使用して消毒し、連日使用			槽
<input type="checkbox"/> 浴槽水を塩素系薬剤を使用しない方法で消毒し、連日使用			槽		
循環ろ過装置	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり	循環系統数	系統	A ~	

No.	管理状況	判定	備考																				
浴槽	1 浴槽の湯は、定期的にレジオネラ属菌の検査を実施しているか？ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>実施年月日</th> <th>浴槽名</th> <th>検査結果</th> <th>検査機関</th> </tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </table> 実施頻度: _____ (年1回以上・年2回以上・年4回以上)	実施年月日	浴槽名	検査結果	検査機関																	適・不適	
	実施年月日	浴槽名	検査結果	検査機関																			
2 浴槽の湯は常に満ちているか？	適・不適																						
3 浴槽は、毎日(または毎週1回以上)完全に換水して清掃しているか？	適・不適																						
4 浴槽の湯の遊離残留塩素濃度は、0.4mg/L程度を保っているか？	適・不適																						
5 浴槽の湯の遊離残留塩素濃度は、頻繁に測定しているか？ 実施頻度: _____	適・不適																						
6 浴槽にひび割れ等の破損箇所はないか？ 木風呂にカビや穴はないか？ 岩風呂に青コやヌメリは付いていないか？	適・不適																						
7 原湯の浴槽への供給は、浴槽への落とし込み式であるか？	適・不適・非該当																						
8 循環湯の吐出口は浴槽の水面下に設けてあるか？	適・不適・非該当																						
9 連通管がある場合、連通管の湯水を排出する構造になっているか？	適・不適・非該当																						
10 気泡発生装置等(エアゾル発生源)を設置している場合は、当該浴槽の浴槽水及び当該設備に必要な湯水には、連日使用浴槽水を使用していないか？	適・不適・非該当																						
貯湯槽	1 原湯や上がり湯の貯湯槽の湯の温度は60℃以上に保たれているか？ 60℃を保つことができない場合、貯湯槽水を消毒しているか？ 残留塩素濃度: _____	適・不適・非該当																					
	2 貯水槽及び貯湯槽内の清掃及び消毒をしているか？ ()基 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>用途</th> <th>水温(℃)</th> <th>清掃状況</th> <th>消毒状況</th> </tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </table>	用途	水温(℃)	清掃状況	消毒状況													適・不適・非該当					
	用途	水温(℃)	清掃状況	消毒状況																			
3 タンクに破損箇所はないか？ タンク内に雨水や土埃が入り込む構造になっていないか？ タンクの蓋は開けたままになっていないか？	適・不適・非該当																						
4 分湯枡がある場合、その清掃及び消毒を実施しているか？ 雨水が入り込み易い構造になっていないか？	適・不適・非該当																						

No.	管理状況	判定	備考											
ろ過装置	1 ろ過装置は1時間当たり浴槽の容量以上のろ過能力を有しているか？	適・不適・非該当												
	2 ろ過器は、毎週1回以上洗浄しているか？ 実施日： 洗浄方法：	適・不適・非該当												
	3 ろ過器は、毎週1回以上消毒実施しているか？ 実施日： 消毒方法：	適・不適・非該当												
	4 ろ材は、目視で汚れやかたまり具合を定期的に確認し、交換を行っているか？ 交換日： 交換理由：	適・不適・非該当												
	5 営業時間外に消毒措置を講じないままろ過装置を停止していないか？	適・不適・非該当												
消毒装置	1 浴槽水の消毒に用いる塩素系薬剤は、ろ過器の直前に投入しているか。	適・不適・非該当												
	2 消毒装置の維持管理は、適切か？	適・不適・非該当												
	3 塩素供給装置は正常に作動しているか？	適・不適・非該当												
	4 塩素濃度測定器は、正常に作動しているか？	適・不適・非該当												
循環配管	1 配管が腐食などで破損していないか？	適・不適・非該当												
	2 長い配管や複雑な配管構造により、滞留水が発生していないか？	適・不適・非該当												
	3 改修等により不要な配管が残ったままになっていないか？	適・不適・非該当												
	4 循環配管は、毎週1回以上消毒しているか？ 実施日： 消毒方法：	適・不適・非該当												
集毛器	1 集毛器は、毎日清掃しているか？	適・不適・非該当												
	2 集毛器は、毎週1回以上消毒実施しているか？ 実施日： 消毒方法：	適・不適・非該当												
オーバーフロー回収槽	1 オーバーフロー環水管を循環配管に直接接続していないか？	適・不適・非該当												
	オーバーフロー水を回収して浴用に供していないか？	適・不適・非該当												
	2 供する場合は、回収槽の湯水を消毒しているか？ 消毒方法： 残留塩素濃度：	適・不適・非該当												
	浴場床排水の混入はないか？	適・不適・非該当												
3 回収槽の清掃及び消毒を毎週1回以上(原則毎日)行っているか？ 実施日： 消毒方法：	適・不適・非該当													
シャワー	シャワーホース及びシャワーヘッドの維持管理は、適切か？	適・不適・非該当												
	1 <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td></td> <td>清掃状況</td> <td>消毒状況</td> <td>直近の交換日</td> </tr> <tr> <td>シャワーホース</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>シャワーヘッド</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>		清掃状況	消毒状況	直近の交換日	シャワーホース				シャワーヘッド				
		清掃状況	消毒状況	直近の交換日										
	シャワーホース													
シャワーヘッド														
2 調節箱がある場合、定期的に清掃しているか？	適・不適・非該当													
3 シャワーは毎営業終了後(又は週1回以上)内部の水が置き換わるように通水しているか？	適・不適・非該当													
その他	1 シャワー、ミストサウナ、打たせ湯には浴槽水を使用していないか？	適・不適・非該当												
	2 気泡発生装置等の空気取入口は、土ほこりが入らないようになっているか？	適・不適・非該当												
	3 内湯と露天風呂の湯は、配管等を通じて混じらないようになっているか？	適・不適・非該当												
	4 水質検査結果は3年間保管されているか？	適・不適												
	残留塩素濃度の測定結果は記録し、3年間保管されているか？	適・不適												
	その他管理状況について記録し、3年間保管されているか？	適・不適												

備考(その他付帯設備、浴用剤、修景設備 等)

(設備状況)

No.	系統名	ろ過器	ろ過方式	ろ過器の逆洗浄	集毛器	回収槽	浴槽名 (患者使用☑)	区分	使用水	換水状況	循環水の供給	エアロゾル発生装置	消毒	塩素剤連続注入装置		塩素剤投入	その他消毒	調査時 残留塩素濃度 (mg/L)	患者利用日 残留塩素濃度 (mg/L)	調査時 ATP値 (RLU)	備考		
								1白湯 2薬湯 3露天 4その他 ()	1水道水 2井戸水 3温泉 4混合 (+)	1毎日 2()日 に1回 3その他	患者利用 日 後の換 水日 1前 / 2後 /	1落とし込み 2浴槽底 部 3その他 ()	1有 2無	1ジェット噴 射 2気泡発生 装置 3その他	1実施 2未実施	1有 2無	<注入点> 1ろ過器 前 2ろ過器 後					薬剤名	1集毛器 2浴槽直接
(凡例)		1有 2無	1砂 2セラミック 3カートリッジ 4中空糸 5その他 ()	1有 2無 ※有の 場合、洗 浄頻度	1有 2無	1有 (材質・ 容量) 2無																	
1							<input type="checkbox"/>																
2							<input type="checkbox"/>																
3							<input type="checkbox"/>																
4							<input type="checkbox"/>																
5							<input type="checkbox"/>																
6							<input type="checkbox"/>																
7							<input type="checkbox"/>																
8							<input type="checkbox"/>																
9							<input type="checkbox"/>																
10							<input type="checkbox"/>																
							<input type="checkbox"/>																
							<input type="checkbox"/>																
							<input type="checkbox"/>																
							<input type="checkbox"/>																
							<input type="checkbox"/>																
							<input type="checkbox"/>																
							<input type="checkbox"/>																
							<input type="checkbox"/>																

(別添3)

施設調査必要物品チェックリスト

①調査、指導

- 施設調査票
- 患者調査抜粋(個人情報抜いたもの、施設の利用日時、利用箇所等)
- 用箋ばさみ
- 筆記用具、油性ペン(検体容器へ記入)
- 名刺、身分証明書
- 指導票
- ATP簡易測定キット
- デジカメ
- 懐中電灯
- 残留塩素測定器

②検体採取

- 採水容器とラベル
- 採水用具(ひしゃく、ひも付きバケツ等)
- 拭き取り検査キットと拭き取り検査場所記入用紙
- 水温計(ガラス製は割れると危険。デジタル表示のものが望ましい。)
- 残留塩素測定器
(残留塩素測定器を持って行けない場合は、残留塩素測定用の採水容器とラベル)
- 塩素中和剤
- 手指・容器等消毒剤(消毒用エタノールなど)
(器具消毒用にアルコール綿があると便利)
- ゴム手袋
- マスク
- チャック付ビニール袋
- 保冷ボックス
- 保冷・蓄冷剤
- ペーパータオル
- ゴミ袋

別添2 施設調査票			
調査日時:	年 月 日 時	保健所名:	調査担当者:
施設名称		所在地	
業者名		電話番号	
管理責任者氏名		対応者	
業種の種類	公衆浴場・旅館・その他:		
管理体制	自主管理・委託管理(管理会社名:)		
営業状況	休業日	その他	
入浴者数	平日 平均	人/日	休日 平均
他の健康被害情報	患者の利用日	年 月 日	人 内容
	□なし □あり	体調不良者等	
使用水の種類	温泉井戸 本数	本	用途
	井戸 本数	本	用途
	水道水	□あり □なし	用途
浴槽の種類	□非循環式浴槽	□常時給湯しオーバーフローを行う、いわゆる掛け流し式	槽
	□循環式浴槽	□しわゆる掛け流し式でないもの	槽
	□循環式浴槽	□浴槽水を毎日換水	槽
	□浴槽水を塩素系薬剤を使用して消毒し、連日使用		槽
	□浴槽水を塩素系薬剤を使用しない方法で消毒し、連日使用		槽
循環ろ過装置	□なし □あり	循環系統数	系統 A ~

印刷範囲外に項目の説明を追加

No.	管理状況	判定	備考
1	浴槽の湯は、定期的にレジオネラ属菌の検査を実施しているか？ 実施年月日 浴槽名 検査結果 検査機関 実施頻度: (年1回以上・年2回以上・年回以上)	適・不適	
2	浴槽の湯は常に満ちているか？	適・不適	
3	浴槽は、毎日(または毎週1回以上)完全に換水して清掃しているか？	適・不適	
4	浴槽の湯の遊離残留塩素濃度は、0.4mg/L程度を保っているか？	適・不適	
5	浴槽の湯の遊離残留塩素濃度は、頻りに測定しているか？	適・不適	
6	浴槽にひび割れ等の破損箇所はないか？ 木風呂にカビや穴はないか？ 岩風呂に青コブスリは付いていないか？	適・不適	
7	原湯の浴槽への供給は、浴槽への流し込み式であるか？	適・不適・非該当	
8	循環湯の吐出は浴槽の水面下に設けられているか？	適・不適・非該当	
9	連通管がある場合、連通管の湯水を排出する構造になっているか？	適・不適・非該当	
10	気泡発生装置等(エアロゾル発生源)を設置している場合は、当該浴槽の浴槽水及び当該設備に必要な湯水には、連日使用湯水を使用しているか？	適・不適・非該当	
貯湯槽	1 原湯や上り湯の貯湯槽の湯の温度は60℃以上に保たれているか？	適・不適・非該当	
2	60℃を保つことができない場合、貯湯槽水を消毒しているか？残留塩素濃度:	適・不適・非該当	
	貯水槽及び貯湯槽内の清掃及び消毒をしているか？	適・不適・非該当	
	()基 用途 水温(℃) 清掃状況 消毒状況		
ろ過装置	1 タンクに破損箇所はないか？	適・不適・非該当	
2	タンク内に雨水や土埃が入り込む構造になっていないか？	適・不適・非該当	
3	タンクの蓋は開けたままになっていないか？	適・不適・非該当	
4	分濾網がある場合、その清掃及び消毒を実施しているか？	適・不適・非該当	
5	雨水が入り込みやすい構造になっていないか？	適・不適・非該当	
ろ過装置	1 ろ過装置は1時間当たり浴槽の容量以上のろ過能力を有しているか？	適・不適・非該当	
2	ろ過網は、毎週1回以上洗浄しているか？ 実施日: 洗浄方法:	適・不適・非該当	
3	ろ過網は、毎週1回以上消毒実施しているか？ 実施日: 消毒方法:	適・不適・非該当	
4	ろ材は、目で汚れやかたまり具合を定期的に確認し、交換を行っているか？ 交換日: 交換理由:	適・不適・非該当	
5	営業時間外に消毒措置を講じないままろ過装置を停止していないか？	適・不適・非該当	
消毒装置	1 浴槽水の消毒に用いる塩素系薬剤は、ろ過器の直前に投入しているか？	適・不適・非該当	
2	消毒装置の維持管理は、適切か？	適・不適・非該当	
3	塩素供給装置は正常に作動しているか？	適・不適・非該当	
4	塩素濃度測定器は、正常に作動しているか？	適・不適・非該当	
循環ろ過装置	1 配管が腐食などで破損していないか？	適・不適・非該当	
2	長い配管や複雑な配管構造により、滞留水が発生していないか？	適・不適・非該当	
3	改修等により不要な配管が残ったままになっていないか？	適・不適・非該当	
4	循環配管は、毎週1回以上消毒しているか？ 実施日: 消毒方法:	適・不適・非該当	
集毛器	1 集毛器は、毎日清掃しているか？	適・不適・非該当	
2	集毛器は、毎週1回以上消毒実施しているか？ 実施日: 消毒方法:	適・不適・非該当	
オーバーフロー	1 オーバーフロー環水管を循環配管に直接接続していないか？	適・不適・非該当	
2	オーバーフロー水を回収して浴用に再利用しているか？ 消毒方法: 残留塩素濃度:	適・不適・非該当	
3	浴床排水の混入はないか？ 浴床排水の混入は、回収槽の湯水を消毒しているか？	適・不適・非該当	
シャワー	1 シャワーホース及びシャワーヘッドの維持管理は、適切か？ 清掃状況 消毒状況 最近の交換日 シャワーホース シャワーヘッド	適・不適・非該当	
2	調節箱がある場合、定期的に清掃しているか？	適・不適・非該当	
3	シャワーは毎営業終了後(又は週1回以上)内部の水が置き換わるように通水しているか？	適・不適・非該当	
その他	1 シャワー・ミストサウナ、打たせ湯には浴槽水を使用していないか？	適・不適・非該当	
2	気泡発生装置等の空気取入口は、土埃が入らないようになっているか？	適・不適・非該当	
3	内湯と露天風呂の湯は、配管等を通じて混ざらないようになっているか？	適・不適・非該当	
4	水質検査結果は3年間保管されているか？	適・不適	
5	残留塩素濃度の測定結果は記録し、3年間保管されているか？	適・不適	
6	その他管理状況について記録し、3年間保管されているか？	適・不適	

説明(印刷範囲外)

毎日完全換水型年1回以上、連日使用型年2回以上(浴槽水の消毒が塩素消毒で無い場合、年4回以上)常に満水状態とし、溢水により浮遊物を除去する。

原則毎日。循環式浴槽で毎日完全に換水しないもの又は常に原湯を供給し、浴槽水をあふれさせる浴槽は毎週1回以上0.4mg/L程度をもち、1mg/Lを超えない。2019.9.19改

2~3時間ごとに測定することが望ましい。入浴者が増加すると塩素濃度が下がる。

洗浄・消毒が難しく、生物膜が形成され、レジオネラ属菌増殖の原因となる。

浴槽の湯が給湯・給水配管に逆流しないように浴槽内の湯が部分的に滞留しないように配置。浴槽の出口からは、新しい温泉水や湯、水以外は流さないようにする。浴槽水を抜いても水が残るやすい。生物膜が蓄積しやすくレジオネラ属菌が繁殖しやすくなる。

最大使用時でも55℃以上に保つこと。

少なくとも年1回は貯湯槽水を完全排水して内部の清掃と消毒を行う。

蓋の中に入り込む原因となる

1.5~2倍以上が望ましい。毎日逆洗浄を行うことが望ましい。

年1回は状態を確認し、劣化が始まっていれば交換する。

砂ろ過: 2~3年(温泉水や大量入浴者がある施設では交換頻度を短く)

ろ過装置内に菌が侵入し増殖することを防止するため。ろ過器後の再消毒を否定するものではない。また、科学的データの裏付けをもって、ろ過器以後で消毒効果を発揮できる場合、適用ホース内にガスが滞留してないか、ホースが外れたりしてないか毎日点検する。薬液量は、使用量と残量を日常的に点検し、薬液不足にならないように。注入弁のノズルが詰まったり空気をかんだりして送液が停止している例がよくある

蓋の中に入り込む原因となる

洗浄・消毒が難しく、生物膜が形成され、レジオネラ属菌増殖の原因となる。

汚れやすいので毎日清掃する。

回収槽の水は原則として浴用に再利用しない。再利用する場合は必ず回収槽を設けて消毒する。

回収槽の水は原則として浴用に再利用しない

やむを得ず使用する場合は、徹底した清掃と消毒を行う。塩素剤を循環系とは別途添加する。

常時、遊離残留塩素濃度を0.4~1.0mg/Lに維持する。

回収槽の水を再利用する場合、浴槽からのオーバーフローだけを回収し、浴床床の排水が混ざってはいけない。

浴槽の浮遊物が混入するので汚れやすい。頻りに清掃、消毒する。

内部に生物膜が形成されやすいので、年2回程度は取り外して消毒することが望ましい。

湯温がレジオネラ属菌増殖に適しているため、清掃し生物膜を取り除く。

シャワー内の残留塩素濃度を保つため。

砂塵の侵入を防止するため目の細かい防虫網を設ける

図1 施設調査票中調査項目の説明

令和2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
分担研究報告書

「新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果」

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 黒木俊郎 岡山理科大学獣医学部
研究協力者 森川 茂 岡山理科大学獣医学部

新型コロナウイルス感染症は令和元年に中国で初めて発見され、令和2年に世界中に感染が拡大した。令和2年1月16日にわが国においても初めて報告され、その後全国に感染が拡大した。新型コロナウイルスは感染して発症する2～3日前からウイルスを排出するとされており、感染者が公衆浴場を利用する可能性がある。そこで、次亜塩素酸ナトリウムあるいはモノクロラミンによる消毒を想定し、低濃度における塩素系消毒剤の新型コロナウイルスに対する効果を TCID₅₀ (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量)により評価した。新型コロナウイルスは遊離塩素による消毒に感受性を示し、濃度が0.16mg/Lで25°Cでの1分後の不活化率は99.99%以上となり、0.11mg/L、41°Cでは5分後の不活化率が99.99%以上であった。モノクロラミンは遊離塩素と比較して相対的に効果が低く、6mg/Lでも25°Cで10分後の不活化率は98%であった。公衆浴場の浴槽で維持すべき遊離塩素濃度(0.4～1.0mg/L)であれば、SARS-CoV-2は短時間で不活化される結果が得られた。

A. はじめに

新型コロナウイルス感染症が世界的に流行し、国内でも多数の患者が発生している。また、当該感染症では高い割合で無症候性感染者が存在することが報告されている。無症候性感染者が入浴施設を利用し、身体に付着したあるいは会話等により飛散したウイルスが浴槽水に浮遊することが想定される。公衆浴場を塩素で消毒する場合は遊離残留塩素を0.4～1.0mg/L、モノクロラミンでは3.0mg/Lを保つことが求められてお

り、この濃度での新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に対する有効性に関するデータがない。本研究は、公衆浴場の浴槽水に浮遊する新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果を評価することを目的とした。

B. 材料と方法

1. ウイルス株

今回の評価では、SARS-CoV-2 ウイルス(AI/I-004/202株；国立感染症研究所より

分与)と FeCoV (M91-26 株; 国立感染症研究所・前田健部長より分与)を用いた。ウイルスの培養には SARS-CoV-2 ウイルスは Vero E6 細胞を用いて 1% fetal calf serum (FCS)加 D-MEM 培地 (D-MEM (高グルコース) (L-グルタミン、フェノールレッド不含) 富士フイルム和光純薬) に行い、FeCoV-2 ウイルスは fcwf-4 細胞を用いて 5%FCS 加 D-MEM 培地で 5%CO₂ 下、37°C で CPE が 80%になるまで培養した。ウイルス液は培養上清を 3,000 rpm, 10min 遠心して -80°C に保存した。

2. 塩素液の調製

次亜塩素酸ナトリウム溶液 (ナカライテスク) を PBS (pH 7.5) で 100 倍に希釈した液を作成し、これを次亜塩素酸ナトリウム液とした。

PBS 50ml に 0.5M 塩化アンモニウム液 243 μL と 5%相当の次亜塩素酸ナトリウム溶液 65 μL を混合し、これをモノクロラミン液とした。

3. 実験液の調製

1%FCS 加 D-MEM 培地及び 5%FCS 加 D-MEM 培地を PBS で 100 倍に希釈し、これらの希釈液の遊離残留塩素濃度を 0.1~0.2 mg/L に調製するのに必要な次亜塩素酸ナトリウム液の量を定めることとした。

上記の必要量を定めるために、1%FCS 加 D-MEM 培地あるいは 5%FCS 加 D-MEM 培地の 100 倍希釈液 10ml に次亜塩素酸ナトリウム液あるいはモノクロラミン液を加えた直後に、遊離残留塩素濃度は DPD 法によりアクアブ AQ-201 (柴田科学) を用いて、モノクロラミン液を加えた場合の結合

塩素濃度はヨード法によりアクアブ AQ-202 (柴田科学) を用いて測定した。

4. TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose, 50%感染量)の測定

上記 1 で調製したウイルス液を PBS で 100 倍に希釈し、その 1ml に上記 3 で決定した所定量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えて実験時の遊離残留塩素濃度とし、25°C あるいは 41°C で 1、5、10 及び 20 分間曝露した。モノクロラミンにおける TCID₅₀ を測定する場合は、結合塩素濃度が 1、3、6mg/L になるように PBS で希釈したモノクロラミン液 1mL に 10μL のウイルス液を加え、1、5 及び 10 分間曝露した。曝露後に直ちに 0.1M チオ硫酸ナトリウムを加えて塩素を中和した。中和後、10 倍量の 1%FCS 加 D-MEM 培地 (SARS-CoV-2) または 5%FCS 加 D-MEM 培地 (FeCoV-2) で 10⁷ まで 10 倍段階希釈し、各希釈段階の液の 40μL を感受性細胞 (SARS-CoV-2 は VeroE6/TMPRSS2 細胞; FeCoV-2 は fcwf-4 細胞) を培養した 96 ウェルプレートの 6 ウェルずつ接種し、5%CO₂ 下、37°C で 4 日間 (SARS-CoV-2) あるいは 2 日間 (FeCoV-2) 培養した。各ウェルの細胞変性を観察し、Reed-Muench 法¹⁾を用いて TCID₅₀ を計算した。さらに、未処理群と比較した処理群の TCID₅₀ に基づいてウイルスの生存率を求め、100-生存率 (%) を不活化率として算出した。

C. 結果及び考察

1%FCS 加 D-MEM 培地及び 5%FCS 加 D-MEM 培地のそれぞれ 10ml に次亜塩素酸ナトリウム液の 100μl、105μl、110μl を加えたところ、遊離残留塩素濃度は 0.09mg/L、

0.10mg/L、0.13mg/L 及び 0.11mg/L、0.13mg/L、0.16mg/L となった。そこで、TCID₅₀ の実験時にウイルス液に対してこの割合で次亜塩素酸ナトリウム液を加えることとした。FCS が添加された状態なので、結合塩素も生じている恐れはあったが、実際の浴槽水は入浴者の落とす垢があることで、同様に結合塩素が生じており、ここでは実際の消毒条件に近いとみなした。

SARS-CoV-2 の次亜塩素酸ナトリウムとモノクロラミンによる消毒の効果を調べたところ、次亜塩素酸ナトリウムの遊離塩素濃度が 0.1mg/L では 20 分後に検出限界未満（99.99%以上）まで不活化され、0.13mg/L では 1 分で検出限界未満（99.99%以上）まで不活化された（表1）。さらに、41°Cでは 0.10mg/L、0.11mg/L で 5 分で検出限界未満（99.99%以上）まで不活化された（表2）。FeCoV-2 では、0.16mg/L で 5 分後で検出限界未満（98.89%以上）まで不活化された（表3）。FeCoV-2 の方が消毒前の感染力価が低かったため、検出限界未満での不活化率が見かけ上、低く計算される。

SARS-CoV-2 と FeCoV-2 は遊離塩素に感受性が高く、低濃度であっても比較的短時間で不活化されることが示された。この結果は、SARS-CoV-2 に近縁の SARS-CoV が汚水において 0.4mg/L の遊離残留塩素に 10 分で 100%不活化されたという報告と同様の結果となった²⁾。これは同報告において比較した大腸菌よりも感受性が高かった。

モノクロラミンの SARS-CoV-2 に対する効果は、25°Cにおいて 1mg/L では 10 分後では 75.9%、6mg/L では 10 分後に不活化率は 97.9%であり、次亜塩素酸ナトリウム

に比べて不活化率が低かった（表4）。ウイルスはモノクロラミンに対して比較的抵抗性を示すとされており、pH7 の条件下での 3logCt 値（99.9%不活化に要する濃度（mg/L）x 時間（分））はマウスノロウイルスは 26、コクサッキーウイルスは 390-710、アデノウイルスは 190-1,000 と報告されている³⁾。

以上の結果から、公衆浴場の浴槽で維持すべきとされている遊離残留塩素濃度（0.4～1.0mg/L）であれば、SARS-CoV-2 は短時間に不活化されることが明らかとなった。モノクロラミンは一般的にウイルスに対する効果は遊離塩素よりも低く、SARS-CoV-2 に対しても同様であるとの結果が得られた。

D. まとめ

次亜塩素酸ナトリウムとモノクロラミンの実験条件下での新型コロナウイルスに対する消毒効果を調べたところ、0.11mg/L、41°Cでは 5 分後の不活化率が 99.99%以上と、低濃度の遊離塩素濃度であっても新型コロナウイルスが高率に不活化された。

E. 参考文献

1. Reed, L. J., Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27, 493-497, 1938.
2. Wag, X. et al.: Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J. Virological Methods*, 126, 171-177, 2005.
3. Cromeans, T. L., Kahier, A. M., Hill, V. R.: Inactivation of adenoviruses,

enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1028-1033, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

F. 研究発表
該当なし

表1 次亜塩素酸ナトリウム曝露時の SARS-CoV-2 の不活化率 (%) (25°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
0.09	0	99.84	99.94	99.96	99.84
0.10	0	99.98	99.95	99.94	> 99.99
0.13	0	> 99.99	> 99.99	> 99.99	> 99.99

ND: 実施せず

表2 次亜塩素酸ナトリウム曝露時の SARS-CoV-2 の不活化率 (%) (41°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
0.10	0	> 99.99	> 99.99	> 99.99	ND
0.11	0	99.98	> 99.99	> 99.99	ND
0.18	0	> 99.99	> 99.99	> 99.99	ND

ND: 実施せず

表3 次亜塩素酸ナトリウム曝露時の FeCoV-2 の不活化率 (%) (25°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
0.11	0	99.81	99.87	99.87	> 99.89
0.13	0	> 99.89	> 99.87	> 99.87	> 99.89
0.16	0	> 99.87	> 99.89	> 99.89	> 99.89

表4 モノクロラミン曝露時の SARS-CoV-2 の不活化率 (%) (25°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
1	0	82.68	85.21	75.94	ND
3	0	63.95	85.21	79.73	ND
6	0	91.26	90.26	97.85	ND

ND: 実施せず

令和2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2年度分担研究報告書

「入浴施設及び医療機関のレジオネラ汚染実態調査」

	研究代表者	前川純子	国立感染症研究所
○	研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学
	研究分担者	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	中嶋直樹	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

新型コロナウイルス感染症の拡大を原因とした緊急事態宣言に伴う休業が入浴施設におけるレジオネラ汚染に与えた影響を評価することを目的として調査を行った。2015年からレジオネラ属菌の汚染実態調査と対策を継続してきた神奈川県内の1入浴施設において、営業再開前日及び再開後約1、3、5カ月にそれぞれ調査を実施した。前年度では3つの採水箇所において、10~200 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されていたものが、営業再開前日には1カ所から80 CFU/100 mLが、再開の1ヶ月後には同じ採水箇所において10 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されるのみとなった。これは、休業期間中に定期的に配管内の原湯を入れ替え、循環させるとともに遊離残留塩素濃度を0.8~2.0 mg/Lと高濃度に保ったことによるものと考えられた。しかし、完全な排除には至らず、その後の調査においてレジオネラ属菌が増加している傾向が認められた。このため、今後も調査を継続するとともに新たなレジオネラ属菌対策を実施する必要があると考えられた。

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染は、レジオネラ感染症の院内感染の原因となりうることから、病院内の環境管理の重要な課題となっている。本研究ではレジオネラ属菌と合わせて一般細菌数と従属栄養細菌数を調査し、レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌と一般細菌の指標性を検討した。一般細菌は蛇口水の試料から全く検出されないことから、レジオネラ汚染に関して指標にはならないと考えられた。従属栄養細菌数は、レジオネラ属菌陽性試料で検出される傾向があるとしても、1:1の相関はしなかった。レジオネラ汚染の検討が必要な状況では、指標ではなく、レジオネラそのものを測定することが重要と考えられた。

A. 研究目的

1) 入浴施設におけるレジオネラ汚染実態調査

本研究は、入浴施設におけるレジオネラ汚染を調査し、汚染予防対策ならびに感染症予防対策を策定するための基礎的情報を得ることを目的として 2015 年から継続してレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施してきた。

調査を開始して以降、この施設では、カラン及びシャワーの交換や塩素添加装置の設置、不要な配管の切除等のレジオネラ対策を実施した。その結果、調査開始当初の 2015 年には検査対象とした 8 か所中 5 か所からレジオネラ属菌が分離されていたが、2019 年の調査では 3 か所まで減少した。分離菌数においても、最大 3,000 CFU/100 mL であったものが、2019 年には 10~300 CFU/100 mL となり、レジオネラ属菌による汚染が減少している傾向が認められた。

本年度、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言が出され、様々な施設が休業した。調査対象の入浴施設においても、4 月から 5 月の約 1 か月間、休業した。このため、この休業期間に、調査対象の入浴施設においてレジオネラ属菌の動態がどのように変化したのかを調べることを目的として調査を実施した。

2) 医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染の指標に関する検討

医療機関の給水・給湯系でのレジオネラ汚染は、レジオネラ感染症の院内感染の原因となりうることから、病院内の環境管理の重要な課題となっている¹⁾。しかし、レジオネラの培養試験は一般的ではなく、よ

り簡便な細菌検査が指標となることに期待が寄せられることがある。そこで本研究は、一般細菌数と従属栄養細菌数がレジオネラ汚染に対する指標性、有効性の検討を目的とした。

一般細菌数は、ろ過処理や塩素消毒の確認、配水系統での細菌汚染の確認に実施されてきた²⁾。従属栄養細菌数も同様の指標となり、一般細菌数よりも高感度に検出することができるが、培養には長期間（7 日~14 日程度）を要する。これら細菌数の増加は、水の滞留、バイオフィルムの形成といった衛生状態の低下を意味するが、病原細菌の数量と直接の相関をするものではない^{2, 3)}。レジオネラ属菌は水中に形成されたバイオフィルム中の原生動物（アメーバ等）を宿主として増殖する菌なので、バイオフィルムの存在、すなわち細菌指標がレジオネラ汚染の可能性を間接的に意味すると期待された。

B. 研究方法

1) 試料の採取

(1) 入浴施設

調査対象は、神奈川県内の 1 入浴施設とした。調査の試料は水試料とした。

試料は 5 月の営業再開前日、再開後約 1 ヶ月後の 7 月、約 3 カ月後の 9 月、約 5 カ月後として 10 月、11 月の 2 回の計 5 回採水した。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。ただし、10 月の採水については、上記の採水箇所のうち 2 つの浴室のカラン計 4 カ所において給水系のみを採水し

た。

レジオネラ属菌用水試料は、25%チオ硫酸ナトリウム 1.0ml を添加した滅菌容器に 500ml を採取した。シャワーやカランからの水は放水直後に採取するとともに一部のカランについては放水 3 分後にも採取した。水試料は温度を採取時に、pH を実験室に搬入時にガラス電極法で測定した。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりハンディ水質計“アクアブ”AQ-101 型（柴田科学）を用いて実験室搬入時に測定した。各試料は採水当日に検査を開始した。

(2) 医療機関

医療機関の給水・給湯系を対象とした調査は、「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究（研究代表者：松井佳彦）」と共同で実施した。

調査に協力いただいている神奈川県内の 1 か所の総合病院を対象とした。令和 2 年 10 月 26 日に 7 か所（地下控室 1 か所、倉庫内 1 か所、病室洗面台 4 か所、授乳室 1 か所）の洗面台等の蛇口水を放水直後及び 3L 流水後に採取し、合わせて 16 試料を今年度に試験した。

レジオネラ属菌、従属栄養細菌及び一般細菌検査用の水試料は、25 %チオ硫酸ナトリウム 1.0 ml を添加した滅菌容器に 500 ml を採取し、微生物検査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。pH 及び遊離残留塩素濃度測定用水試料は 50ml 滅菌遠沈管に採取し、冷蔵にて実験室に搬入して、pH をガラス電極法、遊離残留塩素濃度を DPD 法（ハンディ水質計“アクアブ”AQ-101 型、柴田科学）を用いて測定した。水試料の温度はデジタル

温度計を用いて現場で測定した。

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レ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 倍希釈し、原液と 10 倍及び 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（日研生物医学研究所）に塗抹し、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。レジオネラ属菌を疑う集落を 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。水試料を 5ml に濃縮した試料及びスワブ試料を 50 倍希釈 PBS に浮遊させた試料に対して、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) 及び Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) のプライマーを用いた PCR^{7, 8)} によりレジオネラ属菌と *L. pneumophila* であることを決定した。さらに、型別用血清（デンカ生研）及び自発蛍光の有無により種の鑑別を行った。

5) 従属栄養細菌数

微生物検査試料を PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の 1 ml を R2A 寒天培地 (BD) に接種し、混釈培養法により 20 °C 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

微生物検査試料を PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の 1 ml を標準寒天培地 (日水製薬) に接種し、混釈培養法により 36 °C で 24 時間培養した。培養後、集落数を計数した。

C. 結果及び考察

1) 入浴施設におけるレジオネラ汚染実態調査

調査対象とした入浴施設は、2015 年 11 月 17 日から継続的に汚染実態調査を実施してきた。この入浴施設は地下タンクに原湯を引き込み、汲み上げポンプにより高置タンクへと送ったのち、高置タンクからカラン、シャワー及び浴槽水など施設全体に原湯を供給する構造となっている。また、塩素添加装置は地下タンクと高置タンクの間設置されている。今年度の緊急事態宣言に基づく休業期間中は、3 日に一回程度、汲み上げポンプを稼働させ、新たな原湯を地下タンクに引き込むとともに、施設配管内を循環させ、浴槽水の一部を交換した。ポンプ稼働時はカランのフラッシングを 30 分程度実施するとともに、塩素添加装置を稼働させた。4~5 日に 1 回カラン、シャワー及び浴槽水の遊離残留塩素濃度を測定し、

0.8~2.0 mg/mL に維持されていることを確認した。加えて、浴槽水に別途次亜塩素酸ナトリウムを追加するとともに、地下タンクにも添加した。また、ろ過機の逆洗浄を週 1~2 回実施した。

本研究において、レジオネラ属菌は浴室 A 及び浴室 B のそれぞれ 2 つのカランから検出された。2019 年の調査の際には浴室 A のカラン 2 カ所及び浴室 B のカラン 1 カ所から 10~200 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG1、6、9 及び *Legionella* sp. が検出された。本年度の調査では、営業再開前日には、1 カ所において 80 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 及び *Legionella* sp. が、約 1 カ月後の 7 月には同じ採水箇所から 10 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 が検出されるのみとなった。しかし、営業再開後から約 3 か月後の 9 月の調査では 3 カ所から 10~20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6、9 及び *Legionella* sp. が検出され、約 5 か月後の 11 月の調査では 2 カ所から、それぞれ 60 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 及び 9 が検出された (表 1)。本調査により採取したカラン、シャワー及び湯口からの採水試料は、pH 8.0~8.2 であった。遊離残留塩素濃度は、2019 年度は 0.2~0.4 mg/L であったが、2020 年度は営業再開前日の調査では 1.3~1.9 mg/L で、7 月は 0.1~0.9 mg/L、9 月は 0.5~1.7 mg/L、11 月は 0.4~0.7 mg/L であった。

この入浴施設では緊急事態宣言に伴う休業期間内に、遊離残留塩素濃度を高く保ち、定期的に配管内の原湯を入れ替え、循環させていたことから、レジオネラ属菌が大きく減少したものと考えられた。しかし、レジオネラ属菌の完全な排除には至らず、そ

の後、増加している傾向が認められた。

2020年10月23日に実施した給水系を対象とした調査では浴室Aの2カ所のカランから10~20 CFU/100 mLの*L. pneumophila* SG9及び*Legionella* sp.が検出された(表1)。これらの水試料はpH 7.8~8.1で、遊離残留塩素濃度は、0.3~0.5 mg/Lであった。レジオネラ属菌が検出されたものの、これらのカランは混合栓であることから、ただちに給水系が汚染されているものとは言えず、今後も調査が必要と考えられた。

浴槽水、高置タンクについてはいずれの調査でも分離培養、LAMPともに陰性であった。地下タンクについては2019年までは分離培養及びLAMPのいずれでも陰性であった。しかし、本年度はいずれの調査においても、分離培養は陰性であるもの、LAMPは陽性であった。地下タンク及び高置タンクは、営業開始前日はそれぞれ50.0及び49.6°Cであったものの、その前後の調査では54.9°C以上であった。これらのことから、緊急事態宣言時に原湯を引き込む頻度と量が低下し、温度が低下したことにより、地下タンクに侵入した新たなレジオネラ属菌が定着したのと考えられた。一方で、地下タンクと高置タンクの間塩素添加装置が設置されていること、営業再開後の調査で、地下及び高置タンクの温度が54.9°C以上となっていること、高置タンクからはレジオネラ属菌が検出されていないことから、現在までのところ、地下タンクに定着したレジオネラ属菌が高置タンク以降の配管内で定着している可能性は低いものと考えられた。

本研究において、この入浴施設では休業中の管理によって、レジオネラ属菌が大幅

に減少したものの、排除しきれなかったレジオネラ属菌が再び増加している可能性が示された。このため、今後も汚染実態調査を継続するとともに、新たなレジオネラ対策の実施が必要と考えられた。

2) 医療機関でのレジオネラ汚染の指標の検討

調査した16試料中、2病室の洗面用蛇口3試料から、*L. pneumophila* SG1が検出され、菌数は10~20 CFU/100 mlであった(表2)。一般細菌数はいずれの試料でも不検出であった。一般細菌数は塩素消毒がされていれば滅多に出るものではなく、実際にその通りであった。

従属栄養細菌は8カ所の蛇口のうち7カ所から採取した11試料で発育を認めた。この7カ所のうち給水系の6カ所の蛇口では、初流水と3L流水後の前後で最大2-log(100倍)の菌数の差がみられた。給湯系蛇口では初流水試料と3L流水後のいずれも低い値であったが、水温が56~58°Cと高く、増殖困難な状況と推測された。

この医療機関では給水・給湯系でのレジオネラ属菌の増殖・定着を排除するために水道水の遊離残留塩素濃度を上げ、各蛇口のフラッシングを毎日実施していた¹⁾。これまでに実施した調査での、各病室の汚染状況の推移は以下の通りであった(表3)。

病室1の蛇口水は2017年からレジオネラが継続的に検出されている。フラッシングの効果により従属栄養細菌数が大きく減少したが、それでも2019年度にレジオネラがわずかに検出されている。

病室2では、従属栄養細菌数が多かったが、レジオネラは検出されていない。

病室3では、レジオネラが断続的に検出された。従属栄養細菌数は低い傾向にあった。病室4は病室3と同様であった。

上記の結果の範囲では、従属栄養細菌が検出される場合に *L. pneumophila* が検出されることにはならなかった(オッズ比 1.077、95%信頼区間 0.248-4.592)。*L. pneumophila* が検出されても従属栄養細菌がほとんどあるいは全く検出されない試料もあり、バイオフィームに守られたレジオネラが検出されたり、蛇口から少し離れた配管内で増殖したものが検出されたり、温度の高い環境ではレジオネラが優先して生残したことが想像された。

従属栄養細菌数は、遊離残留塩素濃度が低い蛇口から特に多かった。一方、レジオネラは必ずしもそうではなく、アメーバやバイオフィーム中で守られていることで、塩素濃度との相関が得られていない様子であった。結果には示さないが、レジオネラ菌数と従属栄養細菌数の相関図を作成しても、相関を示唆するような図にはならなかった。もしレジオネラ汚染の検討が必要な状況であれば、指標ではなく、レジオネラそのものを測定することが必要と考えられた。

一般細菌は蛇口水の試料から全く検出されないことから、レジオネラ汚染に関して指標にはならないと考えられた。

D. 参考文献

1. 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、「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」、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)」より、令和元年度分担研究報告書

2. 日本水道協会、I 総説編 6. 微生物試験。上水試験方法 2011 年版より、日本水道協会、東京、51-52, 2011.
3. WHO, Guidelines for drinking-water quality, fourth edition, ISBN 978 92 4 154815 1, 2011, p. 298.
4. 日帰り温泉施設におけるレジオネラ症集団発生事例ー埼玉県 (IASR Vol. 34 p. 157-158: 2013 年 6 月号)
5. 日帰り入浴施設におけるレジオネラ症集団発生事例と衛生管理上の対策ー神奈川県 (IASR Vol. 37 p. 140-141: 2016 年 7 月号)
6. レジオネラ症 2008.1~2012.12 (IASR Vol. 34 p. 155-157: 2013 年 6 月号)
7. 山本啓之: PCR 法による *Legionella* 属細菌の検出・同定. 日本臨床, 50 特別号: 394-399, 1992.
8. Mahbubani MH, et al.: Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular Probes, 4: 175-187, 1990.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 レジオネラ属菌の検出結果

	2019年						2020年						
	9月20日		5月28日		7月2日		9月4日		10月23日		11月5日		
	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	
浴室A	湯口	-	-	-	-	-	-	-	-	未実施	未実施	-	-
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	-	未実施	未実施	-	-
	カラン1	-	L. p. SG9 10	-	-	-	-	-	L. p. SG9 10	-	L. p. SG9 10	-	L. p. SG9 60
	カラン2	-	L. p. SG1 L. p. SG6 L. sp. 200	+	L. p. SG6 L. sp. 80	-	L. p. SG6 10	-	L. p. SG6 L. sp. 20	-	L.sp. 20	+	L. p. SG6 60
浴室B	湯口	-	-	-	-	-	-	-	-	未実施	未実施	-	-
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	-	未実施	未実施	-	-
	カラン1	-	-	-	-	-	-	-	L. sp. 10	-	-	+	-
	カラン2	-	L. p. SG1 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L. p. : *L. pneumophila*、L sp. : *Legionella* sp.、+: 陽性、-: 陰性、菌数: CFU/100m L

※2020年10月23日は給水系の試料水を採取した。

表2 医療機関蛇口における菌の検出状況

検体名	水系	種類	温度 (°C)	pH	遊離残留 塩素 (mg/L)	レジオネ ラ属菌	一般 細菌数	従属栄養 細菌数
						CFU/ 100mL	CFU/ mL	CFU/ mL
控室 (水栓)	給水	初流水	23.9	7.3	0.60	0*1	0*2	1.0×10 ³
	給水	3L 流水後	23.5	7.4	1.09	0	0	5.4×10
倉庫内 (水栓)	給水	初流水	23.0	7.3	0.67	0	0	5.6×10
	給水	3L 流水後	23.1	7.3	0.96	0	0	2.0
病室 1	給水	初流水	21.3	7.5	1.06	0	0	0*2
	給水	3L 流水後	20.2	7.6	1.11	0	0	0
病室 2	給水	初流水	23.6	7.5	0.78	0	0	2.9×10
	給水	3L 流水後	19.2	7.5	1.15	0	0	0
病室 3	給水	初流水	22.0	7.5	0.51	10*3	0	5.0
	給水	3L 流水後	20.8	7.6	1.11	20*3	0	0
病室 4	給水	初流水	23.0	7.7	1.08	20*3	0	2.0
	給水	3L 流水後	21.3	7.7	1.11	0	0	0
給湯器	給湯	初流水	56.0	7.4	0.02	0	0	6.0
	給湯	1L 流水後	58.1	7.5	0.01	0	0	9.0
授乳室 蛇口	給水	初流水	31.9	7.6	0.88	0	0	1.5×10 ²
	給水	3L 流水後	31.8	7.7	0.88	0	0	5.0

*1 : <10CFU/100mL *2 : <1CFU/mL

*3 : 検出されたレジオネラは全て *L. pneumophila* SG1

表3 レジオネラ属菌と従属栄養細菌の検出状況

検体名	年度	水系	種類	温度(°C)	pH	遊離残留塩素(mg/L)	レジオネラ属菌	従属栄養細菌
							CFU/100mL	CFU/mL
病室1	2017	給水	初流水	24.8	7.3	0.05	100*1	13400
			3L 流水後	23.7	7.3	1.3	10	166
	2018	給水	初流水	23.8	7.0	1.12	0*2	2
			3L 流水後	22.7	7.1	1.26	0	0*3
	2019	給水	初流水	23.6	7.4	0.85	20	1
			3L 流水後	22.4	7.4	1.13	20	0
2020	給水	初流水	21.3	7.5	1.06	0	0	
		3L 流水後	20.2	7.6	1.11	0	0	
病室2	2017	給水	初流水	25.9	7.3	0.05	0	5800
			3L 流水後	22.6	7.3	1.2	0	3
	2018	給水	初流水	25.0	7.0	1.14	0	102
			3L 流水後	23.9	7.1	1.16	0	19
	2019	給水	初流水	24.5	7.4	0.01	0	2600
			3L 流水後	22.3	7.4	1.10	0	9
2020	給水	初流水	23.6	7.5	0.78	0	290	
		3L 流水後	19.2	7.5	1.15	0	0	
病室3	2017	給水	初流水	25.1	7.2	1.0	10	24
			3L 流水後	25.7	7.3	1.3	0	2
	2018	給水	初流水	24.8	7.1	0.98	10	0
			3L 流水後	23.5	7.1	1.26	10	0
	2019	給水	初流水	23.1	7.4	1.08	0	4
			3L 流水後	22.0	7.4	1.16	0	3
2020	給水	初流水	22.0	7.5	0.51	10	5	
		3L 流水後	20.8	7.6	1.11	20	0	
病室4	2017	給水	初流水	25.5	7.3	0.8	0	1
			3L 流水後	23.9	7.3	1.3	0	4
	2018	給水	初流水	24.8	7.1	1.13	0	0
			3L 流水後	23.5	7.1	1.29	0	0
	2019	給水	初流水	26.1	7.4	0.81	10	67
			3L 流水後	24.0	7.3	1.12	20	7
2020	給水	初流水	23.0	7.7	1.08	20	2	
		3L 流水後	21.3	7.7	1.11	0	0	

*1：検出されたレジオネラは全て *L. pneumophila* SG1

*2：<10CFU/100mL *3：<1CFU/mL

令和2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2年度分担研究報告書

「レジオネラ属菌を対象とした次世代シーケンス解析」

	研究代表者	前川純子	国立感染症研究所
○	研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学
	研究協力者	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	中嶋直樹	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

近年、次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されている。しかし、行政検査での利用はあまり進んでおらず、レジオネラ属菌の集団発生事例や入浴施設の管理への応用など、その利用法には検討の余地がある。そこで我々は、利用法の検討のひとつとして、これまで2015年から調査を継続してきた神奈川県内の入浴施設で検出されたレジオネラ属菌を用いて、サンガー法による Sequence-Based Typing (SBT) 解析、および次世代シーケンサーによる Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施した。SBT 解析では同じ遺伝子型とされた複数の菌株において、SNPs 解析でも同一もしくは数塩基違いであったことから同一のクローンを起源とする菌株が継続して検出されている可能性が示唆された。これらの菌株には、この施設において、一年以上にわたり検出されているものや、異なる浴室から検出されたものが含まれていた。このため、この入浴施設内にレジオネラ属菌の供給源があるものと推察された。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は日本ではその感染源の一つとして入浴施設が知られており、しばしば集団発生を引き起こす^{1, 2)}。ヒト-ヒト感染はおこらないことから³⁾、感染源となる環境におけるレジオネラ属菌の制御が重要となる。また、近年になって急速に次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研

究所でも使用されている。しかし、次世代シーケンスデータの行政検査の利用はあまりなされておらず、レジオネラ属菌の集団発生事例や入浴施設の管理への応用など、その利用方法は検討の余地がある。

一方で、我々はこれまで2015年から神奈川県内のある入浴施設 A において、レジオネラ属菌のモニタリングを実施してきた。

加えて、この施設ではモニタリングを開始して以降、カラン及びシャワーの交換や塩素添加装置の設置、不要な配管の切除等のレジオネラ属菌対策を実施してきた。その結果、調査開始当初の2015年には検査対象とした8カ所中5カ所からレジオネラ属菌が分離されていたが、2019年の調査では3カ所まで減少した。分離菌数においても、最大3000 CFU/mlであったものが、2019年には10~300 CFU/mlとなり、レジオネラ属菌が減少している傾向が認められた。さらに、この施設はコロナ感染症拡大に基づく緊急事態宣言により、2020年4月から約1カ月間、休業した。この休業期間中は、3日に一回、くみ上げポンプを稼働させ、施設の配管内の温泉水を循環させるとともに、浴槽水の一部を入れ替えた。この際、カラン、シャワーのフラッシングを30分間実施した。ポンプ稼働時には塩素添加装置も稼働させるとともに、貯湯槽、浴槽水にも別途次亜塩素酸ナトリウムを添加し、カラン、シャワーおよび浴槽水において遊離残留塩素濃度を0.8~2.0 mg/Lに維持した。これらの対策を実施した結果、営業再開前日には、1カ所から80 CFU/mLの*Legionella pneumophila* 血清群 (SG) 6 が検出されるのみとなった。しかしながら、その後の約1ヶ月ごとに4回の調査を継続したところ、2カ所から10~60 CFU/mLのSG6、SG9および*Legionella* sp.が検出されており、完全な排除には至っていない。

そこで本研究では、レジオネラ属菌への次世代シーケンス解析の利用法の検討の一つとして、この入浴施設内のどこでレジオネラ属菌が定着しているか、新たなレジオネラ属菌が侵入しているのかなど、この

入浴施設におけるレジオネラ属菌の動態の解析を目的とした。具体的には、サンガー法による Sequence-Based Typing (SBT) 解析、および次世代シーケンサーによる Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施した。

B. 研究方法

1) 使用菌株

神奈川県内の入浴施設 A において、2018年1月から2020年10月までに検出された*Legionella pneumophila*のうち、緊急事態宣言による休業後に検出された株を含むSG18株、SG6 5株、SG9 5株について供試した(表1)。

8) SBT 解析

菌株からのDNA抽出はアルカリ熱抽出により実施した。抽出したDNAを用いて、<http://www.ewgli.org/>の方法に従い、7つの遺伝子(*flaA*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*)をPCRにより増幅し、サンガー法により、その塩基配列を決定した。決定した塩基配列をデータベースと比較し、各遺伝子のアレル番号とST型を決定した。

9) SNPs 解析

菌株からのDNA抽出はQIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。抽出したDNAを用いてCollibri™ PCR-free ES DNA Library Prep Kit (Thermo Fisher Scientific)によりライブラリを調整し、iSeq100 System (illumina)により、リードデータを得た。得られたリードデータは*L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia (アクセッション番号: AE017354)をリファレンス配列と

して、Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) によりマッピングを実施したのち、Genome Analysis Toolkit(<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) を用い、SNP を得た。得られた SNPs を CLC Genomics Work-bench (QIAGEN) を用いてアライメントし、比較した。

C. 結果及び考察

SBT 解析において、SG 1 は KL2064 のみが ST1 であり、その他はすべて ST552 であった。SG6 は 5 株すべてが ST191 であった。SG9 はすべて ST2693 であった。(表 2)。

SNPs 解析は *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia をリファレンス配列として、血清型ごとに実施した。SG1 では 11,489 の SNPs が得られた。全 8 株中、KL2064 を除く 7 株の SNPs は全て一致した。KL2064 の SNPs は、7,176 の SNPs が他の株と異なっていた (表 3)。SG6 では 36,119 の SNPs を得られた。SG6 であった株は SBT 解析ではすべて同じ遺伝子型であったものの、SNPs 解析では 1~4 つの SNPs が異なる 3 つの遺伝子型に分けられた (表 4)。SG9 では 87,741 の SNPs を得た。SG9 であった株は SBT 解析ではすべて同じ遺伝子型であったものの、SNPs 解析では 1~2 つの SNPs が異なる 3 つの遺伝子型に分けられた (表 5)。

SBT 解析において同じ遺伝子型であった菌株は、SG1 では SNPs 解析でも全て一致しており、SG6 および SG9 では数塩基異なるのみであった (表 3、4、5)。SNPs 解析は SBT 解析よりも分解能が高いとされていることに加え⁴⁾、Raphael らはニューヨーク州におけるアウトブレイクを起こした SG 1

の解析において、特定のアウトブレイクに関連した分離株は、コア SNPs の違いが 5 つ以下であったことを報告している⁵⁾。これらのことから、本研究において SBT 解析により遺伝子型が一致した菌株については同じクローンを起源としている可能性が高いと考えられた。2018 年 1 月に検出された SG1 である KL1997 と同じ遺伝子型であった菌株は、2018 年 10 月および 2019 年 9 月においても検出された (表 1、3)。加えて、この遺伝子型の SG1 は、浴室 A のカランから KL1997 を含む 6 株が、浴室 B から KL2104 が検出されていることから (表 1、3)、この遺伝子型の SG1 は配管の末端で維持されているものではなく、これら浴室の共通部分に供給源があると考えられた。2020 年 5 月以降、SG1 は検出されていないため (令和 2 年度分担研究報告書「入浴施設及び医療機関のレジオネラ汚染実態調査」表 2 参照)、この遺伝子型の排除に成功した可能性があるが、引き続き注視する必要があると考えられた。

本年度に実施した 5 回の調査うち、4 回目までに検出された SG6 及び 9 のすべてを次世代シーケンス解析に供試した。その結果、本年度に検出された菌株は 2019 年度以前から検出されていた菌株と同じ遺伝子型もしくは近縁株であり、休業期間中に新たに SG6 および 9 が侵入した可能性は低いと考えられた。このことからこの入浴施設内のどこかにこれらレジオネラ属菌の供給源があり、排除できていないものと考えられた。

本研究においては SBT よりも高い分解能を持つとされる SNPs 解析により、同一のクローン由来と考えられるレジオネラ属菌が

継続してこの入浴施設から検出されていることが明らかとなった。今回解析した菌株はこれまでこの入浴施設から検出された菌株のごく一部であり、今後さらに供試菌株を増やすことで、これまでに実施したレジオネラ属菌の対策の前後でどのように菌叢が変化するかを解析することが可能と考えられた。さらには、次世代シーケンサー解析の利用法として、集団感染時における分子疫学的解析が注目されている。そこで、次年度はこの入浴施設における解析を継続するとともに、神奈川県におけるレジオネラ属菌の集団発生事例の菌株を利用した解析を実施する予定である。

D. 参考文献

1. 日帰り温泉施設におけるレジオネラ症集団発生事例－埼玉県 (IASR Vol. 34 p. 157-158: 2013 年 6 月号)
2. 日帰り入浴施設におけるレジオネラ症集団発生事例と衛生管理上の対策－神奈川県(IASR Vol. 37 p. 140-141: 2016 年 7 月号)
3. レジオネラ症 2008.1～2012.12 (IASR Vol. 34 p. 155-157: 2013 年 6 月号)

4. David, S. et al.: Evaluation of an Optimal Epidemiological Typing Scheme for *Legionella pneumophila* with Whole-Genome Sequence Data Using Validation Guidelines. J Clin Microbiol, 2016, Vol 54, p. 2135-2148.
5. Raphael, B.H. et al.: Genomic resolution of outbreak-associated *Legionella pneumophila* sero-group 1 isolates from New York State. Appl. Environ. Microbiol., 2016, 82, 3582–3590.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 解析に使用した菌株

採水場所	菌種	血清型	採水年月	菌株番号
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2064
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2018年10月	KL2065
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2019年9月	KL2106
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2020年9月	KL2162
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2020年10月	KL2170
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年1月	KL1997
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年1月	KL2000
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2066
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2069
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2108
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2112
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2018年10月	KL2071
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2019年9月	KL2110
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年5月	KL2155
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年7月	KL2160
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年9月	KL2166
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	9	2018年10月	KL2068
浴室Bカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2104

表2 SBT解析

血清型	菌株番号	SBT								採水場所	採水年月
		ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>		
1	KL2064	1	1	4	3	1	1	1	1	浴室Aカラン1	2018年10月
1	KL1997	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2018年1月
1	KL2000	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2018年1月
1	KL2066	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2018年10月
1	KL2069	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2018年10月
1	KL2108	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2019年9月
1	KL2112	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2019年9月
1	KL2104	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Bカラン2	2019年9月
6	KL2071	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2018年10月
6	KL2110	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2019年9月
6	KL2155	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2020年5月
6	KL2160	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2020年7月
6	KL2166	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2020年9月
9	KL2065	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン1	2018年10月
9	KL2106	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン1	2019年9月
9	KL2162	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン1	2020年9月
9	KL2170	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン1	2020年10月
9	KL2068	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン2	2018年10月

表3 *Legionella pneumophila* SG1 SNPs解析

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2064	KL1997	KL2000	KL2066	KL2069	KL2104	KL2108	KL2112
浴室Aカラン1	2018年10月	KL2064		7176	7176	7176	7176	7176	7176	7176
浴室Aカラン2	2018年1月	KL1997			0	0	0	0	0	0
浴室Aカラン2	2018年1月	KL2000				0	0	0	0	0
浴室Aカラン2	2018年10月	KL2066					0	0	0	0
浴室Aカラン2	2018年10月	KL2069						0	0	0
浴室Aカラン2	2019年9月	KL2104							0	0
浴室Aカラン2	2019年9月	KL2108								0
浴室Bカラン2	2019年9月	KL2112								

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

表4 *Legionella pneumophila* SG6 SNPs解析

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2071	KL2110	KL2155	KL2160	KL2166
浴室Aカラン2	2018年10月	KL2071		0	4	3	3
浴室Aカラン2	2019年9月	KL2110			4	3	3
浴室Aカラン2	2020年5月	KL2155				1	1
浴室Aカラン2	2020年7月	KL2160					0
浴室Aカラン2	2020年9月	KL2166					

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

表5 *Legionella pneumophila* SG9 の SNPs 解析

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2065	KL2106	KL2162	KL2170	KL2068
浴室Aカラン1	2018年10月	KL2065		1	1	1	2
浴室Aカラン1	2019年9月	KL2106			0	0	1
浴室Aカラン1	2020年9月	KL2162				0	1
浴室Aカラン1	2020年10月	KL2170					1
浴室Aカラン2	2018年10月	KL2068					

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
金谷潤一、磯部順子、山口友美、武藤千恵子、淀谷雄亮、飯高順子、佐々木麻里、田栗利紹、蔡国喜、川野みどり、倉文明、前川純子	環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価	日本防菌防黴学会誌	48	515-522	2020
Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S.	Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy.	Journal of Hot Spring Sciences	70	50-60	2020
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におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策.	温泉科学	69	192-201	2020
大河内由美子, 泉山信司, 前川純子	紙上ミニシンポジウム I～水の衛生管理～3.貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況	日本防菌防黴学会誌	48	377-382	2020
Seto J, Amemura-Maekawa J, Sampei M, Araki K, Endo M, Kura F, Ikeda T, Kato T, Ohnishi M, Mizuta K.	Investigation of a Legionnaires' disease outbreak using direct sequence-based typing in Yamagata City, Japan, 2019.	Jpn J Infect Dis		doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.815.	2021
Nakamura I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kobayashi T, Sao A, Watabane H, Matsumoto T.	Persistent Legionella contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan	Int J Infect Dis	93	300-304	2020

Inoue H, Baba M, Tayama S.	Evaluation of Legiolert for Quantification of Legionella pneumophila from Bath Water Samples	Biocontrol Sci	25	179-182	2020
倉 文明	special feature 知る・学ぶ・実践する 水回りの感染制御、水回りの環境調査の実践 — 検査の方法・対象・頻度とその活用術.	感染対策 ICTジャーナル	15	301-305	2020
倉 文明	IV. 感染症-22 レジオネラ症	小児内科	増刊号 52	925-930	2020

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の令和2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・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3年4月13日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の令和2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・職名) 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。

令和3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 竹内 徳男



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) 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) ・該当する口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 3年 3月 22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 梶原 浩



次の職員の令和2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 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3年4月1日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 岡山理科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 柳澤 康信



次の職員の令和2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) 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3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2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 3 年 4 月 13 日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 神戸市健康科学研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 飯島 義雄



次の職員の令和2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3年3月31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2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3年3月22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2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) 微生物部・微生物部長 長岡宏美
(氏名・フリガナ) 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 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。