
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 3 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 前川 純子

令和 4 (2022) 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. 有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒-----	15
柳本恵太、泉山信司、望月映希、大森雄貴、山上隆也、植松香星、久田美子、田中慶郎、杉山寛治、茶山忠久、市村祐二	
2. モノクロラミンと遊離塩素による <i>Mycobacterium phlei</i> の試験管内不活化試験-----	26
森 康則、泉山信司、永井佑樹、大市真梨乃、佐藤大輝、小林章人、枝川亜希子、藤井 明	
3. オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験-----	33
泉山信司、田栗利紹、柳本恵太、森 康則、長岡宏美、枝川亜希子、陳内理生、斎藤利明、木村哲也、小森正人、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、小阪浩司	
4. 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-----	52
田栗利紹、中西典子、泉山信司、平塚貴大、井上浩章、蔡 国喜、田中 忍、縣 邦雄、新道欣也、鳥井良太、斎藤利明、木村哲也、小森正人、倉 文明	
5. 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-----	87
淀谷雄亮、佐々木麻里、田栗利紹、柳本恵太、武藤千恵子、花田祐一	
6. 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-----	93
佐々木麻里、高野真実、溝腰朗人	
7. 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-----	99
金谷潤一、佐々木麻里、淀谷雄亮、中西典子、山口友美、武藤千恵子、磯部順子、枝川亜希子、森本 洋、中筋 愛、吉崎美和、小澤賢介、稲窪大治	
8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成-----	108
黒木俊郎、佐々木麻里、金谷潤一、中西典子、田栗利紹、森本 洋、大森恵梨子、武藤千恵子、陳内理生、中嶋直樹、磯部順子、枝川亜希子、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、斎藤利明、藤井 明、縣 邦雄、石森啓益	
9. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析-----	196
中西典子、野本竜平、小松頌子、平塚貴大、陳内理生、森本 洋、小川恵子、蔡 国喜	

10.	レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み-----	203
	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、陳内理生、 緒方喜久代、小川恵子、倉 文明、平塚貴大、吉野修司	
11.	入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引きの作成-----	235
	磯部順子、金谷潤一、中西典子、佐々木麻里、大森恵梨子、武藤千恵子、長岡宏美、 高橋直人、枝川亜希子、浅野由紀子、前川純子	
12.	新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果-----	244
	黒木俊郎、森川 茂	
13.	レジオネラ症集団事例における全ゲノム解析-----	249
	黒木俊郎、陳内理生、中嶋直樹	
14.	入浴施設及び医療機関のレジオネラ汚染実態調査-----	255
	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、島崎信夫、 中村麻子	
III.	研究成果の刊行に関する一覧-----	264

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： 有機物が含まれている温泉でモノクロアミン消毒が有効であることが確認できた。モノクロアミン消毒下での増殖が問題となっている *Mycobacterium phlei* に対する消毒剤の効果を試験管内で確認したところ、実際は遊離塩素よりモノクロアミンの方が有効であることが示され、高頻度の配管洗浄、高濃度の配管消毒等のバイオフィーム対策を徹底することの重要性が改めて示唆された。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。毎日のろ過器逆洗に電解オゾン水供給を組み合わせる方法は、浴槽水の消毒剤濃度を維持し易くし、継続して逆洗水のレジオネラ属菌を不検出とすることが可能であった。

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、本法の共同調査を4つの協力機関で実施して技術の標準化を図った。同法により、オゾンを用いた逆洗方法の有効性を確認した。

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。レジオネラ属菌の検出率および病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子の検出率は、地域によって差が認められた。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、3日以前に陽性となった場合、偽陽性である可能性が高いことが分かった。また、検水を加熱処理することで、定性試験も可能となった。モバイル型 qPCR 装置でのレジオネラ属菌の検出率は、プロトコルの改良で感度が LAMP 法と同等になったが、今後現場で活用できるように濃縮法のプロトコルを工夫する必要があると思われた。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。平板培養法と併用することで Lp1 の検出頻度が上昇した。

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ところ、検水の種類によって菌叢が異なっていた。菌叢の多様性が高い検水からレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい条件下でレジオネラ属菌も増殖しやすい可能性がある。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 Lp 株の SNPs 解析を行った。MLVA 法は施設から検出される菌株の同一性（定着性）や新規性を継続的に調べることができ、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。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「入浴施設における衛生管理の手引き」を作成した。「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の手引き」を作成し、研究班のホームページ上に公開した。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70機関が参加した。「レジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引き」を作成し、検証した。

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部長
 中西典子・神戸市環境保健研究所研究員
 森 康則・三重県保健環境研究所主査研究員
 柳本恵太・山梨県衛生環境研究所研究員
 淀谷雄亮・川崎市健康安全研究所技術職員

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）。

B. 研究方法

各研究項目は、1 から数名の研究分担者および研究協力者（表 1）が参加し、実施された。レジオネラ属菌平板培養は原則として「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）」に準じた各検査施設の方法で実施した。各研究項目の研究方法を以下に記す。

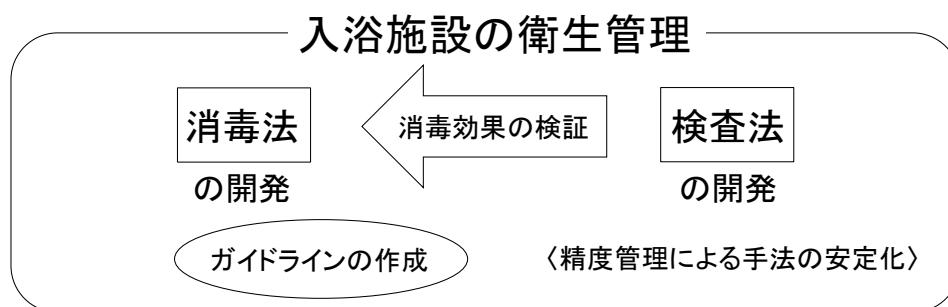


図1 本研究班の研究の流れ

表1

研究協力者一覧

縣 邦雄	アクアス株式会社	小森正人	株式会社ヤマト	中臣昌広	日本環境衛生センター
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所	蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	中村麻子	国際親善総合病院
磯部順子	富山県衛生研究所	斎藤利明	株式会社ヤマト	野本竜平	神戸市環境保健研究所
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	茶山忠久	ケイ・アイ化成株式会社	花田祐一	アイデックスラボトリーズ株式会社
稲窪大治	日本板硝子株式会社	佐藤大輝	三重県保健環境研究所	久田美子	山梨県衛生環境研究所
井上浩章	アクアス株式会社	島崎信夫	国際親善総合病院	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
井原 基	長崎県環境保健研究センター	陳内理生	神奈川衛生研究所	藤井 明	株式会社ヘルスビューティ
植松香星	山梨県衛生環境研究所	新道欣也	株式会社お風呂のシンドー	藤江香予	愛媛県今治保健所
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	杉山寛治	株式会社マルマ	細川賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
大市真梨乃	三重県保健環境研究所	鈴木美雪	神奈川衛生研究所	政岡智佳	神奈川衛生研究所
大森恵梨子	仙台市衛生研究所	高野真実	大分県衛生環境研究センター	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
大森雄貴	山梨県衛生環境研究所	高橋直人	静岡県環境保健研究所	溝腰朗人	大分県衛生環境研究センター
大屋日登美	神奈川衛生研究所	田中 忍	神戸市環境保健研究所	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	田中孝典	花王株式会社 ハウスホールド研究所	森川 茂	岡山理科大学
小川恵子	北海道立衛生研究所	田中奈緒美	アイデックスラボトリーズ株式会社	森本 洋	北海道立衛生研究所
小澤賢介	デンカ株式会社	田中慶郎	株式会社マルマ	望月映希	山梨県衛生環境研究所
木村哲也	株式会社ヤマト	鳥井良太	株式会社お風呂のシンドー	山上隆也	山梨県衛生環境研究所
倉 文明	国立感染症研究所	永井佑樹	三重県保健環境研究所	山口友美	宮城県保健環境センター
小坂浩司	国立保健医療科学院	長岡宏美	静岡県環境衛生科学研究所	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
小林章人	三重県保健環境研究所	中嶋直樹	神奈川衛生研究所	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
小松頌子	神戸市環境保健研究所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	吉野修司	宮城県衛生環境研究所

1. 有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

TOC が 9.2 mg/L、腐植質 0.2 mg/L、アンモニア態窒素 2.0 mg/L を含む、pH7.9 の源泉水を利用している入浴施設の約 22 m³ の内湯を対象とし、モノクロラミン消毒の実証試験を実施した。モノクロラミン導入前後 4 週間の計 8 週間を試験期間とした。2 台のモノクロラミン生成装置（クロラクター、ケイ・アイ化成）を設置し、浴槽水で概ね 3~5 mg/L の濃度となるように、モノクロラミンを循環系統および貯湯槽に添加した。週 1 回、営業終了後にモノクロラミン濃度を 20 mg/L 程度に上昇させ、翌朝まで約 9 時間の循環を行い、配管を消毒した。消毒後、浴槽水は全て排水し、浴槽を洗浄した。浴槽水の採水は週に 1 回、最終換水日から最も日数の経過した日の営業開始前に実施した。採水時に pH および遊離塩素、全塩素、モノクロラミン濃度を測定した。水試料の各種微生物試験は、定法に従い実施した。水試料 1L をろ過したフィルターから、DNeasy PowerSoil Pro kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の定量、同遺伝子の V3/V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンスによる菌叢解析、および菌叢の変化を比較する群間比較解析を行った（生物技研）。

2. モノクロラミンと遊離塩素による

Mycobacterium phlei の試験管内不活化試験

滅菌カップに 121℃、15 分間オートクレーブ処理したアルカリ泉あるいは PBS を 150 mL 入れ、浴用水由来の *M. phlei* を 10⁶~10⁷CFU/mL になるように添加し、モノクロラミンあるいは遊離塩素を低濃度（約 5 ppm）、中濃度（約 10 ppm）、高濃度（約 20 ppm）の 3 段階になるよう各々添加した。モノクロラミンは、次亜塩素酸ナトリウム溶液（ケイ・アイ化成、ケイミックス SP）と硫酸アンモニウム溶液（同社、レジサイド）を混合して用時調製した。菌数測定用検液と消毒濃度測定用検液は、消毒剤添加後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分に同一カップからサンプリングした。菌数測定用検液はチオ硫酸ナトリウム（関東化学）にて中和した後、適宜希釈してから、R2A 寒天培地（栄研化学）に混釈し、7 日間 37℃ で培養した。

モノクロラミン濃度は、ポケットモノクロラミン/遊離アンモニア計（HACH DR300 Pocket Colorimeter、インドフェノール法）、遊離塩素濃度は、ポケット残留塩素計（HACH Pocket Colorimeter II、DPD 法）で測定した。

3. オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

オゾンの生成方法、ろ過器への供給方法および対象施設を変え、RUN1~RUN3 の 3 条件で行った。

RUN1 (A 温泉旅館で気相オゾン) : 入館者数 30-100 人/日の弱アルカリ泉質の露天風呂系統（約 10 m³）の循環式ろ過器（砂ろ過槽、直径約 0.7 m×高さ約 0.3 m）に、ラインポンプ、オリフィス混合器、オゾン生成装置（CAP-10A、(株)石森製作所）等の洗浄・消毒用循環配管を接続した。週 1 回（合計 3 回）、主配管のバルブを閉め、当該循環配管のバルブを開けて、約 100 L/min で 120 分間循環しながら、無声放電により生成したオゾンガスを初回は 10 g、次の 2 回は 20 g 供給した。オゾンを供給している間、ろ過器通過前後の水中オゾン濃度を測定した。オゾン供給日の後に 1~3 日間隔で、浴槽水およびろ過水（ろ過器通過後）の水質を分析した。

RUN2 (A 温泉旅館で電解オゾン) : RUN1 と同じ循環式ろ過器に対して、オゾンガスに代えて、オゾン生成電極（オゾンバスター、オゾンマート）を使用して週 2 回電解オゾン水を供給した。2 分間の逆洗を行い、逆洗水採水後、電解オゾン水を 120 分間供給した。オゾン供給後は再度逆洗を行い、続いて 2 分間のすすぎ（捨水）を行った。

RUN3 (B スーパー銭湯で電解オゾン) : 入館者数が 1000-2000 人/日と多いことから、毎日のろ過器逆洗前に、ろ過槽の有効容量分（ろ材充填量）以上の電解オゾン水を自動注入するシステムを構築した。供給量は 10 L/min で 10 min（100 L）としたが、66 日目の施設側による配管洗浄（過酸化水素+塩素化イソシアヌル酸塩）を挟んで、77 日目より供給量を 10 L/min で 20 min（200 L）と倍に増やした。週 1 回オゾン供給前に、ろ過器をブローによりエアレーションし（約 200 L/min、約 5 分間）、ろ過器の汚れを含んだ逆洗水および

浴槽水を採水し、水質を分析した。オゾン生成に井水を用いており、陰極や電解槽内へのスケール付着が多いため、1 回/月の頻度で、100g/L クエン酸溶液による漬け置き洗浄を行った。

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

フローサイトメーターは、miniPOC（シスメックスパルテック社）を使用した。PI 染色により検水 1 mL の全細菌数 (Total Bacterial Counts, TBC)、および *Legionella pneumophila* (Lp) 抗体 (FL lp SG1 (V6051, Virostat) と FL ARK_lp (ARK resource) を Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) で標識し、等量を混合) 染色により、0.2 μ m 孔フィルターでろ過濃縮した検水の Lp 数を測定した。消毒効果の判定は、試料中の TBC が判定基準値 1000 counts/mL を越えた場合は「非清浄」とし、続く Lp 定量検査で Lp が検出された場合は生菌と判定した。TBC が 1000 counts/mL に満たない試料は「清浄」と判定し、Lp が検出された場合でも死菌と判定した。A 研究所において標準作業書とワークシートを作製し、 10^5 、 10^4 、 10^3 cells/mL オーダーの Lp NIIB0058 株菌液および市販品の IDEXX-QC *Legionella pneumophila* (98-0009287-00, IDEXX) を用いたグルタルアルデヒド固定模擬試料を作製した。B~D 研究所協力者の技術研修を行った後に、A 研究所で動作確認した機器、準備した模擬試料を配布した。添加回収試験は、500 倍希釈した Lp 模擬試料を標準作業書にしたがって処理し、Lp 数を測定した。

実検体の調査は、主に循環ろ過式浴槽水を対象とし、一部かけ流し式浴槽水、貯湯タンク水および水風呂が含まれた。A 研究所では遊離塩素管理の 93 検体、B 研究所は遊離塩素管理 29 検体、C 研究所は遊離塩素管理等（二酸化塩素管理含む）55 検体、モノクロアミン管理 6 検体、D 研究所では遊離塩素管理の 90 検体について、作業書に則ってフローサイトメーターで全菌数と Lp 数を測定した。Lp 培養は各研究所の方法で行った。

循環ろ過式浴槽のろ過器にオゾンを用いた逆洗消毒の有用性評価研究（前項の RUN3）において逆洗水の全細菌数（TBC）と Lp 数をフローサ

イトメーターで測定した。並行して、レジオネラ遺伝子検査 (CycleavePCR *Legionella* Detection Kit, CY240, Takara-bio)、レジオラート/QT (IDEXX) 検査、レジオネラ培養検査を実施した。

5. 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

3 施設において同一ロットの IDEXX-QC *Legionella pneumophila* を用いてレジオラート/QT 法及び平板培養法を実施し、得られた検出菌数を製品情報と比較するとともに検査室間の検出菌数を比較した。

5 地方衛生研究所に搬入された公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 290 検体を対象とした。レジオラート/QT 法は飲料水用 10 mL プロトコールに従い実施し、most probable number (MPN) 値を求めた。頻回に観察して、ウェルの液体培地が変色して陽性となった日を記録した。陽性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、分離菌はシステイン要求性又は免疫血清により同定を行った。同時に平板培養法にて検体よりレジオネラ属菌を分離し、LAMP 法又はリアルタイム PCR 法によりレジオネラ属菌の遺伝子検出を実施した。

6. 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 3 年 6 月から 11 月に搬入された浴槽水および湯口水 30 施設分 58 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た。レジオラート定性試験法として、非濃縮の 58 検体の各試料 10 mL を 50℃水浴中で 20 分間加熱処理して、レジオラート液（レジオラート 1 包（100 mL 用）を 80 mL の滅菌蒸留水に溶かした溶液）40mL が入ったベントフィルター付きフラスコ（CELLSTAR フラスコ Advanced TC、青 FT キャップ 250 mL 滅菌:Greiner Bio-One）に加え、36℃で 7 日間培養し、茶色化または濁りの一方か両方が見られたものを陽性とした。陽性のフラスコ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。

7. 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

8 か所の地方衛生研究所（機関 A～H）において、2016 年以降に公衆浴場などから採水した試料を用いた。試料は、浴槽水、シャワー水、カラン水、採暖槽水であった。平板培養を実施し、分離された *L. pneumophila* 血清群 1（Lp1）株については、*lag-I* 遺伝子を検出する PCR を施行した。遺伝子検査（LAMP、モバイル qPCR）は機関 D・F、Lp1 で感作した免疫磁気ビーズ（Lp1-IMB）を用いた選択的濃縮法は機関 A・E・F、16S アンプリコン解析には機関 F の試料を用いた。

モバイル qPCR には、Picogene PCR1100（日本板硝子）を使用した。検水 500 mL をフィルターろ過後（ポリカーボネート、0.2 μ m、47 mm）、核酸抽出試薬 500 μ L を添加した手もみ式簡易破碎容器に入れ、室温で 1 分間手もみして、得られた核酸抽出液 5 μ L を鋳型として用いた。

IMB による選択的濃縮法には、検水の 100 倍濃縮液または 5 倍希釈液を供試した。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 2 回洗浄した後、PBS 100 μ L に懸濁、混和して、GVPC 寒天培地（日水製薬）に塗布し、35℃で 7 日間培養した。

16S アンプリコン解析は、令和元年～2 年度に採水した浴槽水 59 検体およびシャワー水 34 検体について実施した。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）を用いて 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。

8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成

昨年度までに作成した「入浴施設における衛生管理ガイドライン（案）」を全国の衛生研究所を有する自治体に配付し、保健所の衛生指導に試験的に利用することを依頼し、本案の内容に対する

意見を求めた。

「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）」は当研究班メンバー及びメンバーが所属する自治体の感染症担当者、環境衛生担当者に提示して、項目・内容・使い勝手などに対して意見を求めた。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。

9. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

MLVA の primer 評価は Lp1 菌株 439 株を対象として、Sobral ら（AEM, 77:6899, 2011）によって報告された MLVA の 12 領域のうち 7 領域についてフラグメントが得られなかった菌株について、Pourcel ら（JCM, 45:1190, 2007）による primer を 2nd primer として MLVA 解析を行った。施設の衛生管理における MLVA の活用では、神戸市の 3 施設において平成 24 年から令和 2 年度に分離された Lp を解析対象とした。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。

10. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

2015 年から実施されている外部精度管理は、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・バイオメリュー社の BioBall（特注品）を使用し、今年度は全国 184 の検査機関（191 名）が参加した。今年度から供試菌株が *L. pneumophila* ACM 5197 から、*L. pneumophila* NCTC 11986 に変更された。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 600~15,000 CFU/100 mL と設定した。濃縮検体については、目標回収率を 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。研究班の協力機関として参加した地方衛生研究所等 70 機関については、サーベイ指定法に加え、日常業務で行う検査条件による結果も求め、独自に集計・解析を実施し、過去 6 年間の結果とも比較した。

11. 入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引きの作成

「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）」を参照し、浴用水やシャワー水などの環境水試料を濃縮し、レジオネラ属菌を検出する手順の内部精度管理のための手引きを作成した。研究班の構成メンバーに対し、手引きに従った内部精度管理の試行を依頼したところ、計 10 機関で内部精度管理が実施された。解析には、同じ施設で複数回実施したデータも使用した。

12. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

SARS-CoV-2 ウイルス (AI/I-004/202 株; 国立感染症研究所より分与) を Vero E6 細胞を用いて fetal calf serum (FCS) 非添加 D-MEM 培地 (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 L-グルタミンを添加した培地で 5 %CO₂ 下、37℃で CPE が 80%になるまで培養し、培養上清を 3,000 rpm, 10 min 遠心し、PD-10 脱塩カラム (Sigma-Aldrich) でゲルろ過して生理食塩水に置換したのちに -80℃に保存したものをウイルス液として用いた。関東、北陸、四国及び九州地区の温泉水を実験に用いた。温泉水の試料 9 mL に対してウイルス液 1 mL を加えた実験液に次亜塩素酸ナトリウム液を加え、所定の遊離残留塩素濃度 (0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L) となるのに必要な次亜塩素酸ナトリウム液の量を決めた。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりアクアブ AQ-201 (柴田科学) を用いて測定した。ウイルス液 100 µL に上記で決定した所定量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えた浴槽水 900 µL を加えて、25℃で 5 分間曝露した後、0.1M チオ硫

酸ナトリウムを加えて塩素を中和し、10 倍量の 1%FCS 加 D-MEM 培地で 10⁷ まで 10 倍段階希釈し、各希釈段階の液 40 µL を VeroE6/TMPRSS2 細胞を培養した 96 ウェルプレートの 4 ウェルずつに接種し、5%CO₂ 下、37℃で 4 日間培養した。各ウェルの細胞変性効果でウイルス増殖を確認し、Reed-Muench 法で TCID₅₀ (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量) を計算した。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。

13. レジオネラ症集団事例における全ゲノム解析

2015 年に神奈川県 の 1 入浴施設で発生したレジオネラ症集団事例 (患者 7 名) において、4 名の患者および 2 つの浴槽水から分離された Lp (SG1: 8 株、SG13: 3 株) を供試した。菌株から DNA を抽出し、SBT 解析、Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を行った。SNPs 解析については、QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) を用いてライブラリを調製し、iSeq100 System (illumina) によりリードデータを得た。Genbank に complete genome が公開されている代表的な 6 株の Lp1、すなわち Alcoy、Corby、Lens、Paris、Philadelphia 1 および 130b (各アクセッション番号: CP001828, CP000675, NC006369, NC006368, AE017354, FR687201) と供試菌株のリードデータを KmerID (<https://github.com/phe-bioinformatics/kmerid>) により比較し、供試菌株とゲノムの類似性が最も高い株をレファレンス配列とした。マッピングは Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) を用い、SNPs の抽出は Genome Analysis Toolkit (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) を用いた。抽出した SNPs を CLC Genomics Work-bench (QIAGEN) を用いてアライメントし、比較した。

14. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

神奈川県内の 1 入浴施設において、2021 年 10 月に試料を採取した。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水、地下タ

ンクおよび高置タンクの温水の計 14 試料を採取した。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。

神奈川県内の 1 医療機関において、令和 3 年 7 月に 6 ヶ所（地下控室 1 か所、倉庫内 1 ヶ所、病室洗面台 4 ヶ所）の洗面台等の蛇口水を放水直後及び 3L 流水後、合わせて 12 試料を採取した。この 6 ヶ所のうち自動排水装置を設置した 4 ヶ所については 2021 年 8 月および同 9 月にも同様に試料を採取した。

採取した試料を用いて、レジオネラ属菌の分離培養・遺伝子検査、従属栄養細菌数の測定、一般細菌数の測定、温度測定、pH 測定及び遊離残留塩素濃度の測定を実施した。試料は採取当日に検査を開始した。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがい、個人情報保護に十分に配慮して行われた。利益相反委員会の指導・管理に従って、研究協力関係にある企業等について、研究班内で情報共有を行った。開示すべき企業からの経済的利益は受けていない。

C. 研究結果

1. 有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

消毒の状況としては、モノクロラミン消毒導入前から結合塩素が確認されており、導入前後ともレジオネラ、自由生活アメーバ、大腸菌群は陰性であった。導入前には定量値が高かった従属栄養細菌数は減少し、一般細菌数に増減はなく、16S rRNA 遺伝子量は増加した。塩素の使用量は、導入後わずかに減少した。菌叢解析の結果、*Methylomonas* 属菌、*Cloacibacterium* 属菌が優占菌種で、*Mycobacterium phlei* はモノクロラミン消毒時に減少傾向にあった。

2. モノクロラミンと遊離塩素による

Mycobacterium phlei の試験管内不活化試験

PBS における *M. phlei* の 3-Log 不活化に必要な CT 値は、モノクロラミンではおよそ 500 mg/L・min だったのに対し、遊離塩素ではその

2.5 倍の 1,200 mg/L・min だった。アルカリ泉における *M. phlei* の 3-Log 不活化は、モノクロラミンは CT 値およそ 800 mg/L・min だったのに対し、遊離塩素は CT 値およそ 2,000 mg/L・min でも 1-Log 程度しか不活化されなかった。

3. オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

RUN1 (A 温泉旅館で気相オゾン)：初回のオゾン供給時、ろ過器通過前後のオゾン濃度はそれぞれ 0.6 mg/L、0.2 mg/L だった。供給量を倍増したところ、ろ過器通過前後のオゾン濃度はそれぞれ 1.4 mg/L、0.6 mg/L となった。入館者数が増える休日（土日祝日）の後に、レジオネラ属菌が検出されることがあったものの、オゾン供給後 5 日間程度は浴槽水およびろ過水からレジオネラ属菌は不検出となった。オゾン供給量を倍増してからは、0.1 mg/L で管理されていた浴槽水の残留遊離塩素は最大で 0.6 mg/L と増加傾向となり、一般細菌は概ね 10 CFU/mL 未満まで減少した。しかしながら、設置装置周辺でオゾン臭が微かに認められ、気相中のオゾン濃度は、作業環境基準 0.1 ppm 未満に対して、0.05～0.1 ppm になる場所があった。

RUN2 (A 温泉旅館で電解オゾン)：オゾンガスの代わりに 0.9 mg/L 程度の電解オゾン水を週 2 回ろ過器に供給した。作業環境中へのオゾン漏洩は認められなかった。電解オゾン水供給開始前は浴槽水・逆洗水から 10～60 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出されていた。供給開始後、レジオネラ属菌が継続して不検出となるまでに 3 週間を要した。一般細菌は、電解オゾン水供給開始後に浴槽水で減少傾向が伺えるものの、逆洗水では特に減少傾向は認められなかった。

RUN3 (B スーパー銭湯で電解オゾン)：オゾン利用前は、浴槽水で 10～60 CFU/100 mL、逆洗水で 30～330 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出されていた。水質測定開始後 56 日目のオゾン供給開始当初は、電解オゾン水の供給量を 10 L/min で 10 min (100 L) としたが、63 日目の逆洗水からレジオネラ属菌が 240 CFU/100 mL 検出されたため、66 日目の配管洗浄を挟んで、77 日目より電解オゾン水の供給量を 10 L/min で 20 min (200 L) と倍に増やした。それ以降は、91 日目に浴槽水のレジオネラ属菌 10

CFU/100 mL が検出された以外は、2 か月以上継続して不検出であった。91 日目の検出は、生物膜の塊を偶然に測定したと考えられた。逆洗水のレジオネラ属菌は、オゾン利用中の約 3 か月間不検出であった。浴槽中の残留塩素濃度は増加傾向となった。一般細菌は $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL から、 $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL 程度まで減少した。

4. 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

4 研究所で実施した添加回収実験の回収率は概ね 80-130%と良好だった。培養法と比較した実検体における消毒効果判定結果の感度と特異度は研究所間でばらつきがあったが、全体で感度 83.1%、特異度 79.6% (N=267) と一定の成果が認められた。レジオネラ以外の細菌が多いと推察される貯湯タンク水や水風呂等の検体では偽陽性が多かった。一部の検体では計測阻害と考えられる現象があり前処理（ビーズによる粉碎と超音波処理）による改善が認められた。

循環式浴槽のろ過器の配管洗浄かつオゾン強化の前後で TBC を比較したところ、処理前の平均値 ($\pm$ 標準偏差、試料数 N) は、446,163 ($\pm$ 306,659、N=10) counts/mL に対して、処理後が 71,693 ($\pm$ 137,891、N=16) counts/mL となり、有意差を認めた (t 検定, $p=0.004$)。

5. 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 法について精度管理品を用いた 3 検査施設間における検査精度の比較検討を実施したところ、全施設で許容範囲内の値が得られ、本法の安定性が確認できた。5 施設で実施した実検体 (N=290) におけるレジオラート/QT 法と平板培養法の結果一致率は 85.5 %と高く、検出菌量は強い相関が認められた。レジオラート/QT 法で陽性であった 80 検体 (7 日間培養) は、培養 3 日目まで 20 検体のウェルの変色を確認され、培養 5 日目までに 70 検体の変色を確認された。2 日目に変色が見られた 2 検体のレジオラート培養液からはレジオネラ属菌が検出されず、平板培養法不検出かつ LAMP 法陰性であったため、偽陽性と考えられた。レジオラート/QT 法及び平板培養法で結果が不一致で

あった 42 検体のうち 31 検体が、検出菌量が 30 MPN 又は CFU/100 mL 未満であった。

6. 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

平板培養の結果は、大分法では 58 検体中 18 検体、標準法では 16 検体からレジオネラ属菌がそれぞれ検出された。レジオネラ属菌数は、大分法と標準法でそれぞれ 5~2000、10~1500 (濃縮試料のみでは 10~890) CFU /100mL であった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.9184$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8185$ であった。検体を加熱処理後にレジオラート定性試験法を行ったところ、58 検体中 13 検体が陽性と判定された。うち、11 検体の培養液から Lp が分離された。レジオラート定性試験法と平板培養法の検出/不検出の一致率は大分法で 87.9% (10 以上検出された検体に限ると 93.1%)、標準法で 91.4%と高かった。

7. 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

モバイル型 qPCR 装置を使用した迅速検査法は、これまでのプロトコルを改良した結果、平板培養法に対する感度は LAMP 法と同等 (75%、3/4 検体) となった。平板培養法に加えて、Lp1 で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) 法を併用することで、検出率が 7.8% (18/230 検体) から 11.3% (26/230 検体) となった。

8 か所の地方衛生研究所において、2016~2020 年に浴槽水から分離されたレジオネラ属菌の検出状況を調査した結果、レジオネラ属菌の陽性率は 11.5~75.0%と機関によって差が認められた。同様に、Lp1 陽性率は 0~12.6%、Lp1 の病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子陽性率は 0.3~4.4%と、これらの値も機関によって差が認められた。分離された Lp1 菌株に占める *lag-1* 遺伝子の陽性率 (*lag-1*/Lp1) は最も低い機関は 7.7%であったのに対し、最も高い機関は 50.0%であった。

16S アンプリコン解析の結果、各検体に占める菌種別リード割合の平均値は、浴槽水検体では *Pseudomonas* (14.5%)、シャワー水検体では

Phreatobacter (15.1%) が最も高かった。レジオネラ属菌のリードの割合は、浴槽水検体では 0.8%、シャワー水検体では 0.1%であった。

8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成

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衛生管理ガイドライン案に対して研究班の構成メンバー並びに 17 自治体から 160 余りの意見が寄せられ、それらの意見を基にして衛生管理ガイドライン案を修正した。その名称を「入浴施設における衛生管理の手引き」に変更することとした。

疫学調査ガイドライン案は集められた意見を参考にしてワーキンググループで修正を加え、さらに本文に「別添 1 患者調査票」、「別添 2-1、別添 2-2 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。その名称を「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の手引き」とし、研究班のホームページ上に公開した (<https://sites.google.com/view/legionella-resgr/>)。

9. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

439 株の MLVA プロファイル中で、増幅されなかった領域が、のべ 115 あったが、2nd primer により、そのうち 79 領域が増幅され、MLVA 型が確定できる株が増えた。

昨年の緊急事態宣言後に営業再開した 3 施設において 10,000 CFU/100 mL 以上の Lp が検出された。MLVA 型別を行い、平成 24 年からの継続的なモニタリング検査で当該施設から分離されている菌株の MLVA 型と比較した。2 施設の菌株の MLVA 型は、過去にそれぞれの施設から分離されていた株の遺伝子型の 1 つと一致した。1 施設で分離された 2 株のうち、1 株は過去に分離されたものと同一遺伝子型であったが、もう 1 株は初めての遺伝子型であった。

ゲノムデータを利用した SBT の解析フローを構築した。リードデータのマッピングによる解析手法として SRST2 (<https://github.com/katholt/srst2>)

を、アセンブリしたドラフトゲノム配列から ST を決定する手法として Legsta (<https://github.com/tseemann/legsta>) を、更に mompS が正確に決定できなかった場合に利用するツール (<https://github.com/bioinfo-core-BGU/mompS>) の 3 種類を提案した。それぞれの SBT データベースを最新のものに更新し、特に SRST2 については SBT を解析するための条件を最適化し、ツールのインストール方法も含めた汎用的なマニュアルを作成して協力機関に提供した。

10. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

研究班で集計した地方衛生研究所等 70 機関のうち、69 機関が非濃縮検体における設定良好範囲内の菌数を報告した。濃縮検体は、本年度は全ての機関で検出された。過去の報告で、20% 以上 100% 未満の目標回収率を達成した機関の割合をみると、2018 年度は 74.3% だったのが、その後の 2 回は 50% 台となっていたのが、菌株変更が行われた今年度は、78.6% (55 機関) と多くの機関で良好となった。

11. 入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引きの作成

内部精度管理手引きとその検査手順フローチャートを作成した。概要は次の通りである。レジオネラ属菌を 30℃ 3 日間培養し、それを滅菌生理食塩水に懸濁し、接種菌液とする。これを希釈して、滅菌生理食塩水に接種し、試料水とする。同時に接種菌数を測定する (A)。その後、自施設の標準作業書に従い、濃縮検体のレジオネラ属菌数を測定する (B)。B/A の値に濃縮率を勘案し、最終的な回収率とする。

10 機関で内部精度管理が実施された。選択分離培地で測定した接種菌数は非選択分離培地で測定した接種菌数のおよそ 7 割となり、培地の種類 (メーカー) による大きな差は認められなかった。非選択培地で求めた接種菌数 (A) に対する、非選択分離培地における回収率 (B/A) は、10.8~151.6%、平均 64.8%、中央値 71.0% であった。これに対し、選択分離培地での回収率 (B/A) は、1.3~78.0%、平均 35.7%、中央値 31.9% と低くなった。いずれの分離培地でも添加菌数が多くなるに

つれ、回収率が高くなる傾向であった。1 機関で、BCYE α 寒天培地での回収率が 100%であったのに対し、GVPC 寒天培地での回収率は 1.3%と低かった。聞き取りしたところ、添加したレジオネラ属菌株は、濃縮前から選択分離培地での発育が良くない事実が認められた。

12. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

関東、北陸、四国及び九州地区の温泉水 5 検体のうち、3 検体（北陸地区由来 2 検体、九州地区由来 1 検体）は次亜塩素酸ナトリウムを用いて遊離残留塩素濃度を所定の濃度（0.4 mg/L、1.0 mg/L）に設定することができなかったため、関東及び四国地区の入浴施設の浴槽水を用いて次亜塩素酸ナトリウムによる残留塩素の SARS-CoV-2 ウイルスに対する効果を調べた。遊離残留塩素濃度が 0.4 mg/L と 1.0 mg/L の場合の不活化率は関東地区の入浴施設の浴槽水では 96.8%（不活化度 $10^{-1.5}$ ）及び>99.9%（不活化度 $<10^{-4.7}$ ；検出限界未満まで不活化）、四国地区の入浴施設の浴槽水では 99.5%（不活化度 $10^{-2.3}$ ）及び>99.9%（不活化度 $<10^{-4.0}$ ；検出限界未満まで不活化）であった。入浴施設の浴槽水の通常の遊離残留塩素濃度であれば、SARS-CoV-2 は 4 分程度の時間ではほとんど不活化されることが示された。

13. レジオネラ症集団事例における全ゲノム解析

神奈川県において 2015 年に発生したレジオネラ症集団事例の 11 株を用いて、SBT 解析および全ゲノム解析法の一つである SNPs 解析を実施した。SBT 解析の結果、*L. pneumophila* SG 1 (Lp1) の 7 株は ST2114、1 株は ST2121 だった。ST2114 と ST2121 は *neuA* 遺伝子の 1 塩基のみが異なっていた。*L. pneumophila* SG13 (Lp13) は 3 株すべてが ST2113 だった。供試した 11 株すべてが Corby 株とのゲノム類似性が最も高く（kmer similarity 89.9%~91.2%）、これをレファレンス配列としてマッピングした。SNPs 解析により、Lp1 は 4 株（うち患者由来株は 3 株）から成るクラスター A（株間の SNPs 数は 8~21）と同じく 4 株（うち患者由来株は 2 株）からなるクラスター B（株間の SNPs 数は 3~6）に分けられた。浴槽水由来の

ST2121 株はクラスター B に含まれた。クラスター A、B 間の SNPs は最大で 744 SNPs だった。Lp13 の 3 株（患者由来株 1 株、浴槽水由来株 2 株）間の SNPs は 16~21 SNPs だった。Lp1 と Lp13 の株間の SNPs は 1833~2562 SNPs だった。クラスター A に属する浴槽水由来 Lp1 株 1 株とクラスター B に属する浴槽水由来 Lp1 株 2 株は、それぞれ異なる浴槽から分離されていた。

14. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

神奈川県内の 1 入浴施設においてレジオネラ属菌の汚染実態調査を 2015 年度から継続してきた。2015~2018 年度には調査対象である 8 カ所中 5 カ所から最大 3,000 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出されていたが、不要配管の切除や次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置などの対策を実施した結果、2020 年度には最終的に 2 カ所から 60 CFU/100 mL が検出されるのみとなった。この調査ののち、配管内の温泉水の停滞を防ぐことを目的として常時くみ上げポンプを稼働させ、定休日前に原湯の貯蔵タンクに次亜塩素酸ナトリウムを添加する対策が追加された。この対策の評価を目的としてレジオネラ属菌汚染実態調査を実施した。その結果、8 カ所中 1 カ所のみから 20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 が検出された。

神奈川県内の 1 医療機関では、これまで次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシングなどの対策を実施してきた。今年度新たな対策として、フラッシングを定期的に行う自動排水装置が導入されたことから、その評価を目的としてレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した。6 箇所、3 回の検査で、20 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が 3 箇所の蛇口から 1 回ずつ検出された。

D. 考察

今年度も昨年度に引き続き新型コロナウイルス感染症蔓延下での研究遂行となり、現地調査、消毒実験、研修等の実施が一部困難となったが、班会議や関連会議は滞りなく web で行われた。全体的には、最終年度にふさわしい数々の研究成

果を得ることができた。以下に各研究項目についての考察を述べる。

モノクロラミン消毒は、有機物が含まれている温泉においてもレジオネラの抑制が可能であったが、従属栄養細菌への対策は必要であると考えられた。

M. phlei に対する消毒剤の効果を緩衝液中で試験したところ、遊離塩素よりモノクロラミンの方が有効であった。アルカリ泉ではその優位性がさらに顕著であった。実地のモノクロラミン消毒下で *M. phlei* が増加する理由を推測すると、*M. phlei* はバイオフィーム中にあることで、モノクロラミン消毒に対する抵抗性を発揮しているものと考えられた。モノクロラミン消毒で *M. phlei* を制御するには、こまめな浴槽清掃はもとより、配管洗浄、高頻度の高濃度消毒、オーバーナイト洗浄等のバイオフィーム対策を徹底することの必要性や重要性が改めて示唆された。

高い酸化力を有するオゾンによる温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験を実施した。コスト、労力および安全性等の観点から、オゾンガスより電解オゾン水の利用が望ましいと考えられた。週1-2回の高濃度塩素消毒に代わり、毎日のろ過器逆洗前に、電解オゾン水を自動注入するシステムを構築したところ、簡便で消毒効果が認められた。

オゾンによる逆洗の効果は、レジオネラ汚染の迅速検出法の一つとして開発したフローサイトメトリー法によっても確認することができた。また、本法を4機関で実施して技術の標準化を図ることができた。今後は、本法の迅速性を利用して、施設衛生管理者等との対話に活用するなど現地への適用方法を検討し、技術の普及に努めたい。

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と考えられる。検査精度試薬の使用はその確認に有用であった。平板培養法との結果一致率が高かったことから、本法は、日常の衛生管理に非常に有用な検査法と考えられた。本法は7日間培養して、液体培地の変色で

陽性を確認するが、培養3日目以前にウェルの変色を確認される場合は偽陽性である可能性が高いことが判明し、2日目までの検体の確認が偽陽性の低減に有効であることがわかった。また、検体を50℃で20分間加熱し、検討の結果、培養温度を36℃とすることで、定量検査のためには必要な高価な専用トレイとシーラーを使用しない定性検査法を確立することができた。

モバイル型 qPCR 装置を使用した迅速検査法の検討では、プロトコルを改良した結果、LAMP法と同等の感度となった。採水現場で濃縮・測定が実施できるように、より簡便な濃縮方法などについて検討し、プロトコルを更に改良することが望ましい。

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。IMBにより *Lp1* を選択的に濃縮分離する方法を平板培養法と併用することで *Lp1* の検出率を最も高くすることができた。感染源調査など *Lp1* の検出が求められる際には有用な方法であると考えられた。

浴槽水におけるレジオネラ属菌の検出率および病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子の検出率は、地域によって差が認められた。浴槽水のレジオネラ属菌汚染実態の地域による差異が、国内におけるレジオネラ症患者の罹患率の地域差の要因となっている可能性について、今後検証する必要がある。

16S アンプリコン解析では、検水の種類によって菌叢が異なっていた。菌叢の多様性が高い検水からレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい条件下でレジオネラ属菌も増殖しやすい可能性がある。

自治体から寄せられた多くの意見を基にして、「公衆浴場における衛生等管理要領」に基づく管理方法を具体的に実践するのに参考となる「入浴施設の衛生管理の手引き」を完成させた。Q&A、チェックリスト、記録簿の例を示してほしいといった要望もあり、それらは今後の課題としたい。

「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジ

オネラ症調査の手引き」を作成し、研究班のホームページ上に公開した。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。本手引きは、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。

MLVA 法は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増幅されなかった一部領域が、2nd primer の使用によりその多くが増幅され、大幅に改善することが明らかとなった。現状の MLVA プロトコルの改変も念頭に入れ、2nd primer をさらに評価、検討する必要がある。また、継続的にモニタリングしている施設において、増加した菌がもともと施設に定着している菌か、あるいは新規の株なのか、MLVA を用いて簡便に判断することができた。本法は、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。

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。

入浴施設の水環境におけるレジオネラ属菌検査の信頼性を担保するため、検査精度を確認し、検査担当者の技術水準を維持、向上させることを目的として、自施設で内部精度管理を実施するための手引きを作成した。10 機関で手順書に従った内部精度管理が実施された。その結果から、回収率の良好範囲を設定するのは困難であった。自施設で安定した回収率が継続できるよう、本手引きを基に標準作業書を作成し、内部精度管理を遂行することで、正しい検査結果が得られ、それに基づく衛生指導も適確になり、公衆浴場が適正に管理されるものと思われる。

関東と四国の入浴施設の浴槽水において次亜塩素酸ナトリウムによる遊離残留塩素濃度を 0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L として SARS-CoV-2 ウイルスの不活化を検討したところ、短時間に高い率で不活化されることが明らかとなった。一方で、温泉

を利用する浴槽水では遊離塩素濃度を設定値に安定させることが困難な場合があり、実際の入浴施設の現場において遊離残留塩素濃度の維持が新型コロナウイルス対策においても課題であることが推測された。

神奈川県において 2015 年に発生したレジオネラ症集団事例の株を用いた SNPs 解析により、この集団事例は遺伝的関連のある 2 タイプの *L. pneumophila* SG1 と 1 タイプの *L. pneumophila* SG13 によって引き起こされた可能性が明らかとなった。本事例を引き起こしたと推察されるこれら 3 タイプの株間内の SNPs の差は 21 SNPs 以内であった。このデータはレジオネラ症集団事例の SNPs 解析を行政検査として実施する上で、遺伝的関連性を判断する SNPs の値として一つの目安になると考えられた。行政検査としてレジオネラ症集団事例への全ゲノム解析の利用を検討するためには、本研究のような集団事例株の全ゲノム解析を実施し、データを蓄積していくことが必要である。

神奈川県内の入浴施設において、新たに導入された対策により、高い遊離残留塩素濃度が維持されたことでレジオネラ属菌数が減少したと考えられた。一方で入浴施設の温泉水が pH 8.0~8.3 であることから、次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が低くなっていると考えられた。*L. pneumophila* SG 6 が検出されたカランからは、2018~2020 年度も *L. pneumophila* SG 6 が検出されており、この入浴施設ではレジオネラ属菌の完全な排除には至っておらず、衛生管理方法によっては、再び増加する可能性がある。今後は配管の個別洗浄や消毒方法の変更などの対策を追加するとともに、モニタリングを継続することが重要と考えられた。

神奈川県内の協力医療機関では、これまでも毎日フラッシングを実施しており、今年度の調査でも遊離残留塩素濃度が 0.67 mg/L 以上と高く維持されていた。レジオネラ属菌は、自動排水装置設置後、一度不検出となり、その後、少ない菌数が断続的に異なる蛇口から検出されていることから、蛇口付近で定着しているのではなく、配管の深部に存在するレジオネラ属菌のバイオフィル

ムの一部が剥がれ落ちるなどしたものが検出されたと考えられた。

E. 結論

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

毎日のろ過器逆洗に電解オゾン水供給を組み合わせる方法は、オゾン漏洩のリスクがほとんど無く、ろ過器を清浄化させ、浴槽水の消毒剤濃度を維持し易くし、継続して逆洗水のレジオネラ属菌を不検出とすることが可能であった。有機物が含まれている温泉でモノクロラ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。レジオネラ属菌の検出率および病原性との関連が示唆されている *lag-I* 遺伝子の検出率は、地域によって差が認められた。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 装置のプロトコルの改良を行った。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。レジオネラ汚染の迅速検出法の一つであるフローサイトメトリー法の共同調査を 4 つの協力機関で実施して技術の標準化を図った。同法により、オゾンを用いた逆洗方法の有効性を確認した。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の SNPs 解析を行った。MLVA 法は施設から検出される菌株の同一性（定着性）や新規性を継続的に調べることができ、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染を調査した。

「入浴施設における衛生管理の手引き」および「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の手引き」を作成した。「レジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引き」を作成

し、検証した。

レジオネラ外部精度管理サーベ이를継続実施した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司: 山梨県のアルカリ性 (pH10 程度) 温泉におけるモノクロラミン消毒の有効性の検討, 日本防菌防黴学会誌, 49, (2021), 261-267.
- 2) Edagawa A, Matsuda N, Ogura T, Uezono K, Izumiyama S, Fujii A, Microbial Contamination of Rubber Ducks Floating in Bathtubs of Bathing Facilities, and an Evaluation of Their Washing Methods, Biocontrol Sci., 2021, **26**, 187-192.
- 3) 森 康則, 井上源喜, 日本の温泉の利用状況と経年変化—行政科学的アプローチを中心として, 2021, 地球化学, **55**, 43-56.
- 4) Kanatani JI, Watahiki M, Kimata K, Kato T, Uchida K, Kura F, Amemura-Maekawa J, Isobe J. Detection of *Legionella* species, the influence of precipitation on the amount of *Legionella* DNA, and bacterial microbiome in aerosols from outdoor sites near asphalt roads in Toyama Prefecture, Japan. BMC Microbiol. 2021, 21(1):215. doi: 10.1186/s12866-021-02275-2.
- 5) 小松頌子, 中西典子, 岩本朋忠. 市内温泉施設における緊急事態宣言後のレジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移. 神戸市健康科学研究所報 第 49 巻 39-42 頁 2021.
- 6) 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. 2021.
doi:10.7883/yoken.JJID.2020.815.
- 7) Nakaue R, Qin T, Morita M, Ren H, Chang B, Murai M, Amemura-Maekawa J, Ohnishi M. Development of a Multiplex-PCR Serotyping Assay for Characterizing *Legionella pneumophila* Serogroups Based on the Diversity of Lipopolysaccharide Biosynthetic Loci. J Clin Microbiol. 59: e0015721. 2021.
 - 8) Morita M, Harada N, Shinohara Y, Murai M, Ishii N, Amemura-Maekawa J, Aakeda Y. Complete Genomic Sequence of the Clinical Isolate *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strain 80-045 from Japan. Microbiol Resour Announc. 10: e0082221. 2021.
2. 学会発表
- 1) 森 康則, 温泉の利用状況と環境省「新・湯治」プロジェクトへの期待、第 58 回日本リハビリテーション医学会学術集会, 2021 年 6 月, 京都府.
 - 2) 森 康則, 井上源喜, 日本における単位面積・人口あたりの源泉数の経年変化と地域的特徴, 日本温泉科学会第 74 回大会, 2021 年 11 月, 群馬県.
 - 3) 淀谷雄亮, 佐々木麻里, 増輪文治, 井原基, 田栗利紹, 緒方喜久代, 武藤千恵子, 田中奈緒美, 湯澤栄子, 小嶋由香, 前川純子, 岡部信彦: 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. 日本防菌防黴学会第 48 回年次大会. 2021 年 9 月. Web 開催.
 - 4) 中臣昌広, 井上浩章: 令和元年度東日本台風 (台風 19 号) 被災地の泥から検出されたレジオネラ属菌について. 日本防菌防黴学会第 48 回年次大会. 2021 年 9 月. Web 開催.
3. 研修会
- 1) 森本 洋: レジオネラ属菌培養検査について、令和 3 年度 短期研修 新興再興感染症技術研修、2021 年 9 月、Web 対応.
 - 2) 前川純子: レジオネラ属菌の検査と対策、令和 3 年度 短期研修 環境衛生監視指導研修、2021 年 11 月、Web 対応.
 - 3) 前川純子: レジオネラ症とレジオネラ属菌検査法、令和 3 年度 レジオネラ属菌検査研修会、2021 年 12 月、静岡県.
 - 4) 前川純子: レジオネラ対策の基礎知識、第 7 回保健所環境衛生監視員講座、2021 年 11-12 月、e-ラーニング.
 - 5) 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班: 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、厚生労働省 令和 3 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020 年 2 月、web 対応.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) モノハロゲノアミン製造用組成物、特許、第 6875111 号、平成 28 年 12 月 1 日出願、令和 3 年 4 月 26 日登録、藤野敬介、泉山信司

令和3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

有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

研究分担者	柳本 恵太	山梨県衛生環境研究所 微生物部
研究分担者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	望月 映希	山梨県衛生環境研究所 生活科学部
研究協力者	大森 雄貴	山梨県衛生環境研究所 生活科学部
研究協力者	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所 微生物部
研究協力者	植松 香星	山梨県衛生環境研究所 微生物部
研究協力者	久田 美子	山梨県衛生環境研究所 微生物部
研究協力者	田中 慶郎	株式会社マルマ PC 営業部
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	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	市村 祐二	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部

研究要旨

全有機体炭素 (TOC : Total Organic Carbon)の濃度が高い温泉水では、有機物との酸化反応により遊離塩素が消費され、その濃度が低下する。モノクロラミンはこのような泉質でも濃度の低下が少ないと期待され、稼働中の公衆浴場での有効性について検討した。有機物を含む温泉施設の協力を得て、モノクロラミン消毒の効果、濃度の安定性、菌叢の変化について調査した。対象施設は、TOC が 9.2 mg/L とアンモニア態窒素を多く含んだ温泉水を、週に 3 回換水しながら、循環利用していた。モノクロラミン導入前後の 4 週間に、週に 1 回採水した。浴槽水のモノクロラミン濃度は 3 mg/L 以上とし、週に 1 回 20 mg/L、一晩の高濃度モノクロラミンによる配管消毒を行った。消毒の状況としては、モノクロラミン消毒導入前から結合塩素が確認されており、レジオネラ、自由生活アメーバ、大腸菌群は陰性であった。導入前後を比較すると、導入前定量値が高かった従属栄養細菌数は減少し、一般細菌数に増減はなく、16S rRNA 遺伝子量は増加した。塩素の使用量は、導入後わずかに減少した。菌叢解析の結果、*Methylobacter* 属菌、*Cloacibacterium* 属菌が優占菌種で、*Mycobacterium phlei* はモノクロラミン消毒時に減少傾向にあった。モノクロラミン消毒は、有機物が含まれている温泉においてもレジオネラの抑制が可能であったが、従属栄養細菌への対策は必要であると考えられた。

A. 研究目的

公衆浴場におけるレジオネラ症の発生防止のため、次亜塩素酸ナトリウム（遊離塩素）により浴槽水の消毒が行われている。遊離塩素消毒は有効であるが、アンモニア態窒素、鉄、マンガンを含む温泉や、高 pH の泉質の場合、効果の減弱が知られている。全有機体炭素 (Total Organic Carbon、以下 TOC) が高い、有機物の多い温泉においても、遊離塩素の濃度が低下する。

一方、遊離塩素とアンモニア態窒素の反応により生成される、結合塩素のモノクロラミンは、前述の条件下でも、レジオネラ属菌に対する有効性が確認されている¹⁾。有機物を含む温泉では遊離塩素消毒が困難となるが、モノクロラミンであれば消費量が少なく、濃度の維持が容易な可能性がある²⁾。このことは、試験管の中で確認されているものの、温泉施設での実証や事例の蓄積はこれからであった。

そこで、有機物を多く含む温泉を利用した公衆浴場において、モノクロラミン消毒の実証試験を計画した。具体的には消毒効果、濃度の安定性、菌叢に与える変化について調査した。

B. 研究方法

(1) 対象施設

対象施設は TOC が 9.2 mg/L、腐植質 0.2 mg/L、アンモニア態窒素 2.0 mg/L を含む、pH7.9 の源泉水を利用していた（表 1）。入浴者数は 1 日に 200~400 名程度で、浴槽水の循環系統を有しており、1 週間に 3 回換水していた。対象浴槽は約 22 m³ の内湯で、モノクロラミン導入前後 4 週間の計 8 週間を試験期間とした（図 1）。

(2) モノクロラミンの濃度管理

モノクロラミン生成装置（クロラクター、ケイ・アイ化成）を設置し、遊離塩素製剤（ケイミックス SP、ケイ・アイ化成）とアンモニウム製剤（レジサイド、ケイ・アイ化成）からモノクロラミン溶液を用時調製し、2 台のクロラクターを用いて施設内全ての循環系統および貯湯槽に添加した。浴槽水のモノクロラミン濃度として、概ね 3~5 mg/L の範囲となるように一定の注入量を設定した。試験期間中のモノクロラミン濃度の測定は、全残留塩素（全塩素）の測定で代替した。全塩素濃度が上記範囲に満たない場合は、手動操作によって追添加することで濃度管理を行った。

週 1 回の営業終了後に、循環配管を高濃度モノクロラミンで消毒した（図 1）。具体的には、モノクロラミン濃度を 20 mg/L 程度に上昇させ、翌朝まで約 9 時間の循環を行い、配管を消毒した。消毒後、浴槽水は全て排水し、浴槽を洗浄した。

源泉水における遊離塩素およびモノクロラミンの消費量を、事前に試験管内で比較した。また、モノクロラミン消毒導入前後における施設全体の薬剤使用量について、遊離塩素の使用量を比較した。

(3) 各種測定

各種微生物試験は、定法に従い実施した。水試料はチオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に採水し、ふきとり検体はヘアキャッチャー付近の配管から採取した。細菌培養用は冷蔵、アメーバ培養用の試料は常温にて、搬送・保存した。採水は週に 1 回、浴槽水に汚れが蓄積した、最終換水日から最も日数の経過した日の営業開始前に実施した。レジオネラ属菌は、0.20 μm メンブレンフィルター

(ADVANTEC)でろ過濃縮した 100 倍濃縮液を、ふきとり検体は懸濁した原液を、それぞれ熱処理または酸処理し、GVPC 寒天培地を用いて 35°C で 7 日間培養した。大腸菌群は浴槽水 100 mL を EC ブルー100P「ニッスイ」、一般細菌数は標準寒天培地を用いて、35°C で 24 時間培養した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 42°C の 14 日間で求めた。モノクロラミン消毒導入前後の一般細菌数および従属栄養細菌数の比較については、t-検定の危険率 5%未満を有意差ありと判定した (Microsoft Excel 2016)。自由生活アメーバは、浴槽水、および 1,000×g の 5 分間で 50 倍に遠心濃縮した濃縮試料から、各 1mL を大腸菌塗布無栄養寒天培地を用いて 42°C で 14 日間培養した。

採水時に pH および遊離塩素、全塩素、モノクロラミン濃度を測定した。pH はガラス電極式 pH メーター (堀場)、遊離塩素と全塩素は DPD 法によるポケット残留塩素計 (HACH)、モノクロラミンはインドフェノール法によるポケットモノクロラミン・アンモニア計 (HACH) により測定した。

浴槽水中の 16S rRNA 遺伝子の定量、同遺伝子の V3/V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンスによる菌叢解析、および菌叢の変化を比較する群間比較解析を行った (生物技研、神奈川県相模原市)。DNA 試料は、浴槽水 1L をろ過したフィルターから、腐植質を除去する目的で、DNeasy PowerSoil Pro kit (QIAGEN) を用いて抽出した。モノクロラミン消毒導入前後の 16S rRNA 遺伝子の定量値の比較は、前述の比較と同じ、t-検定の危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

C. 研究結果および考察

入浴客の増加によって源泉水から循環系統への補給が多くなった際に、浴槽水中の全塩素濃度は目標より低くなる傾向であったが、概ね安定的に推移していた (図 2)。濃度が下がっても手動操作を行い、追添加により、濃度は速やかに回復した。試験期間後半に、薬剤不足が発生した。これにより 2 日間にわたって全塩素が消失したが、このようなトラブルがなければ、多量な有機物を含む温泉においても、モノクロラミン消毒による管理は可能と考えられた。

モノクロラミン消毒導入の前後を通じて、レジオネラ属菌、自由生活アメーバ、大腸菌群はいずれも陰性であった (表 2)。

モノクロラミン消毒導入前の施設は、遊離塩素消毒が想定されていたが、源泉水に多量のアンモニア態窒素が含まれ、意図せずモノクロラミンが生じていると考えられた。実際、3 mg/L 前後の全塩素濃度が確認されており、仮に遊離塩素消毒を行うには、相当量の塩素添加を要したことが明らかであった。すなわち、モノクロラミン消毒を意図して導入する前から、モノクロラミンが主の結合塩素消毒が行われていたと考えられた。従って当該施設における遊離塩素消毒とモノクロラミン消毒の比較は困難であった。繰り返しになるが、有機物を含む温泉においてもモノクロラミン消毒によってレジオネラ属菌に対する安定的な消毒効果が得られ、良好な衛生状態を維持することが可能と考えられた。

浴槽水中の一般細菌数、従属栄養細菌数、16S rRNA 遺伝子の定量値について、結果を図 3 に示す。一般細菌数はモノクロラミン消毒導入後も 300 CFU/mL 前後であり、導入前と比較し定量値に大きな変化は確認さ

れなかった。一方、従属栄養細菌数は導入前よりも有意に減少し、16S rRNA 遺伝子のコピー数は導入後有意に増加した。

モノクロラミン消毒導入前後の大きな相違点として、導入前は高濃度遊離塩素、導入後は高濃度モノクロラミンによる配管消毒を実施したことが挙げられる。また、モノクロラミン消毒により増加する従属栄養細菌は *Mycobacterium phlei* が代表的であるが、同菌は試験管内の試験により、20 mg/L のモノクロラミン消毒の有効性が確認されている³⁾。これらのことから、今回の試験では高濃度モノクロラミンによる配管消毒により従属栄養細菌数が減少した可能性が考えられた。一方で、16S rRNA 遺伝子の定量値が増加したことは一見矛盾している。理由として考えられるのは2つあり、今回の培養条件で検出できない菌種が増加した可能性が1つ目である。2つ目は遊離塩素よりもモノクロラミンの方が浴槽水中の DNA を分解する能力が低く⁴⁾、残存した死菌由来の DNA が多く見えた可能性である。モノクロラミン導入以前は、浴槽水に次亜塩素酸ナトリウムが直接に添加されることで、DNA の直接的な不活化が生じていた可能性があり、どちらかといえば、後者である可能性が示唆された。

源泉水に対し、試験管内で行った遊離塩素およびモノクロラミンの消費量の比較では、後者のモノクロラミンの消費量が 1.25 mg/L 相当少なかった(図 4)。実際に、モノクロラミン消毒導入前後の薬剤使用量を比較すると、導入後は同等か、わずかに減少していた(図 5)。すなわち、モノクロラミン消毒の導入により、塩素の消費が増えることはなかった。

菌叢解析の結果、モノクロラミン消毒導入前、導入後ともに *Methylobacter* 属菌と

Cloacibacterium normanense が優占種であり、全体の 80~90%を占めていた(図 6)。*Methylobacter* 属菌は地下水⁵⁾から、*C. normanense* は下水⁶⁾から分離されたことがあり、水環境中に広く存在する細菌であると考えられる。消毒下に関わらず細菌が多く存在することは、バイオフィルムの増大とレジオネラ発生が心配されることから、こうした細菌への対応を検討することが重要になるかもしれない。モノクロラミン消毒下の増殖が疑われていた *M. phlei* については、モノクロラミン消毒導入後、経時的に減少傾向であった。この結果は、従属栄養細菌数の減少と関連していると考えられる。これらのことから考察すると、今回の施設で行っていた 20 mg/L、9 時間程度の高濃度モノクロラミンによる配管消毒は、*M. phlei* に対して有効な消毒方法と示唆された。ただし、従属栄養細菌数は多かったことから、減少させるよう、高濃度モノクロラミン消毒以外に、さらなるろ過器の洗浄等が必要と考えられた。

モノクロラミン消毒導入前後における菌叢の変化を比較するため、群間比較解析により系統ごとの増減を解析した。その結果、導入後に 14 系統が有意に減少し、75 系統が有意に増加した(図 7)。いずれも全体に占める割合は最大の系統でも 1~2%程度であり、菌叢に与える影響は限定的であると考えられた。増加した系統が多いことは、16S rRNA 遺伝子の定量値が増加したことで整合性があつたかもしれない。繰り返しになるが、死菌 DNA の残存が原因であると考えられた。

D. 結論

有機物を多く含む温泉を利用した公衆浴

場において、モノクロラミン消毒を導入した。レジオネラ属菌は安定的に抑制されていた。高濃度モノクロラミンを用いた配管消毒により、*M. phlei* を含んだ従属栄養細菌数も抑えることができたと考えられた。ただし、高い従属栄養細菌数に対しては、追加の対策が必要と考えられた。薬剤使用量については、同等かわずかに減少する程度であり、大きく増えることはなかった。本試験における浴槽水中の優占種は、菌叢解析の結果、*Methylomonas* 属菌と *C. normanense* であった。

E. 参考文献

1. 杉山寛治:環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御¹⁰⁾ 浴槽のレジオネラ対策③ モノクロラミンによる消毒方法について, 防菌防黴, 47, (2019), 159~166
2. 柳本恵太, 高村知成, 植松香星: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, (2015), 55~57
3. 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(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
4. 泉山信司, 藤井明, 松田宗大, 松田尚子, 枝川亜希子, 吉田光範, 星野仁彦:

モノクロラミン消毒の薬湯への応用、並びに雑菌への対応, 厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究 平成 30 年度分担研究報告書

5. 江口正浩, 明賀春樹, 佐々木正一, 三宅西作, 藤田正憲:汚染サイトから分離された *Methylomonas* sp. KSWⅢ株によるトリクロロエチレンの分解特性, 環境技術, 30, (2001), 65~72
6. Allen TD, Lawson PA, Collins MD, Falsen E, Tanner RS : *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family *Flavobacteriaceae* isolated from municipal wastewater, Int J Syst Evol Microbiol., 56, (2006), 1311~1316

F. 研究発表

誌上発表

1. 柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司:山梨県のアルカリ性 (pH10程度) 温泉におけるモノクロラミン消毒の有効性の検討, 日本防菌防黴学会誌, 49, (2021), 261-267,

口頭発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

特許申請・実用新案登録、その他

なし

表 1. 源泉水の分析値

項目	分析値	項目	分析値
全塩素	<0.1 mg/L	Cl^-	412.3 mg/L
pH	7.9	Br^-	0.9 mg/L
ORP	+87 mV	I^-	不検出
一般細菌数	不検出	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	不検出
TOC	9.2 mg/L	硫黄 [*]	<0.1 mg/L
腐植質	0.2 mg/L	マンガンイオン	<0.1 mg/L
アンモニア態窒素	2.0 mg/L	総鉄イオン (鉄(Ⅱ)イオン)	0.7 mg/L (<0.1 mg/L)

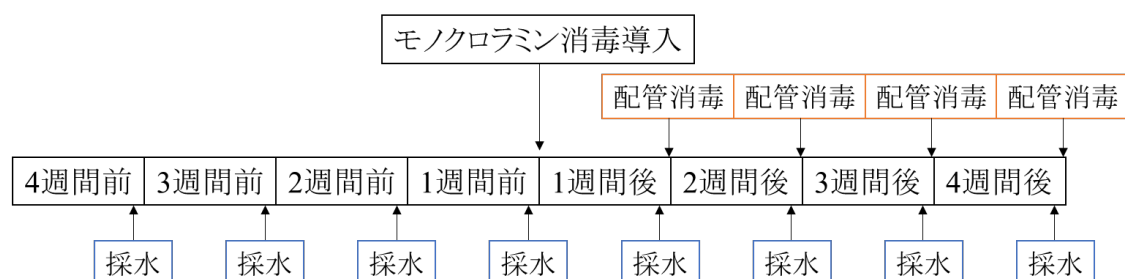


図 1. 試験期間中の採水・高濃度モノクロラミン配管消毒状況

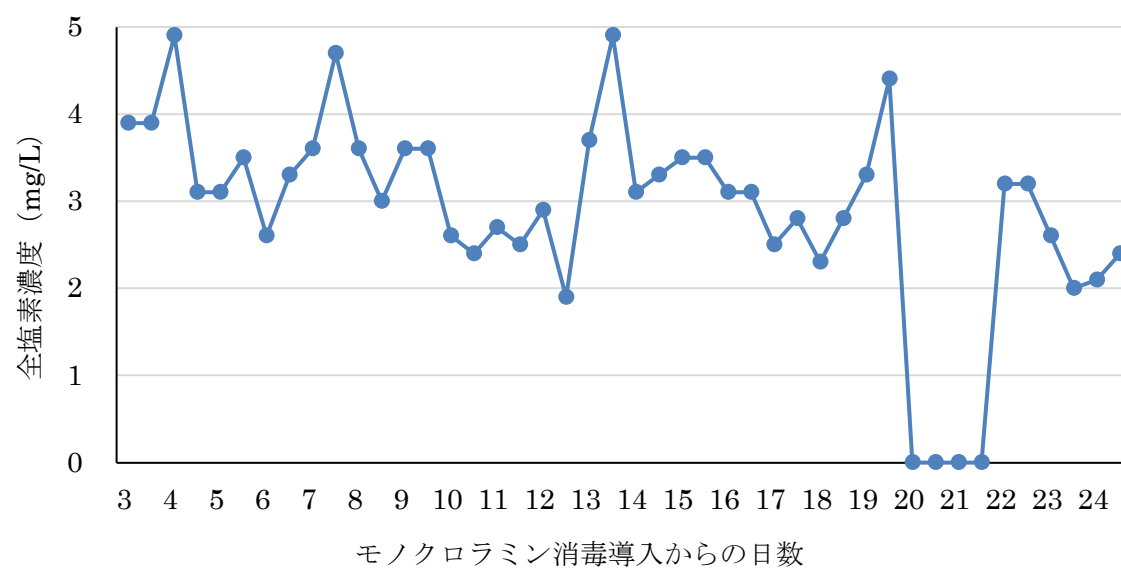


図 2. モノクロラミン消毒導入後における浴槽水の全塩素濃度

表 2. 浴槽水の微生物試験結果

検査項目	レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	レジオネラ属菌 (ヘアカッチャー配管ふきとり)	アメーバ数 (/ 50 mL)	大腸菌群 (/ 100 mL)	pH	遊離残留塩素 (mg/L)	全残留塩素 (mg/L)	モノクロラミン (mg/L)
導入 4 週間前	<10	—	0	陰性	8.1	0.1	2.9	—
導入 3 週間前	<10	陰性	0	陰性	8.1	0.2	2.1	—
導入 2 週間前	<10	陰性	0	陰性	8.2	0.3	3.2	3.5
導入 1 週間前	<10	陰性	0	陰性	8.1	0.3	3.2	—
導入 1 週間後	<10	陰性	0	陰性	8.2	0.1	3.3	3.8
導入 2 週間後	<10	陰性	0	陰性	8.2	0.1	2.9	3.1
導入 3 週間後	<10	陰性	0	陰性	8.2	0.1	3.4	3.6
導入 4 週間後	<10	陰性	0	陰性	8.3	0.2	3.2	3.1

—: 実施なし

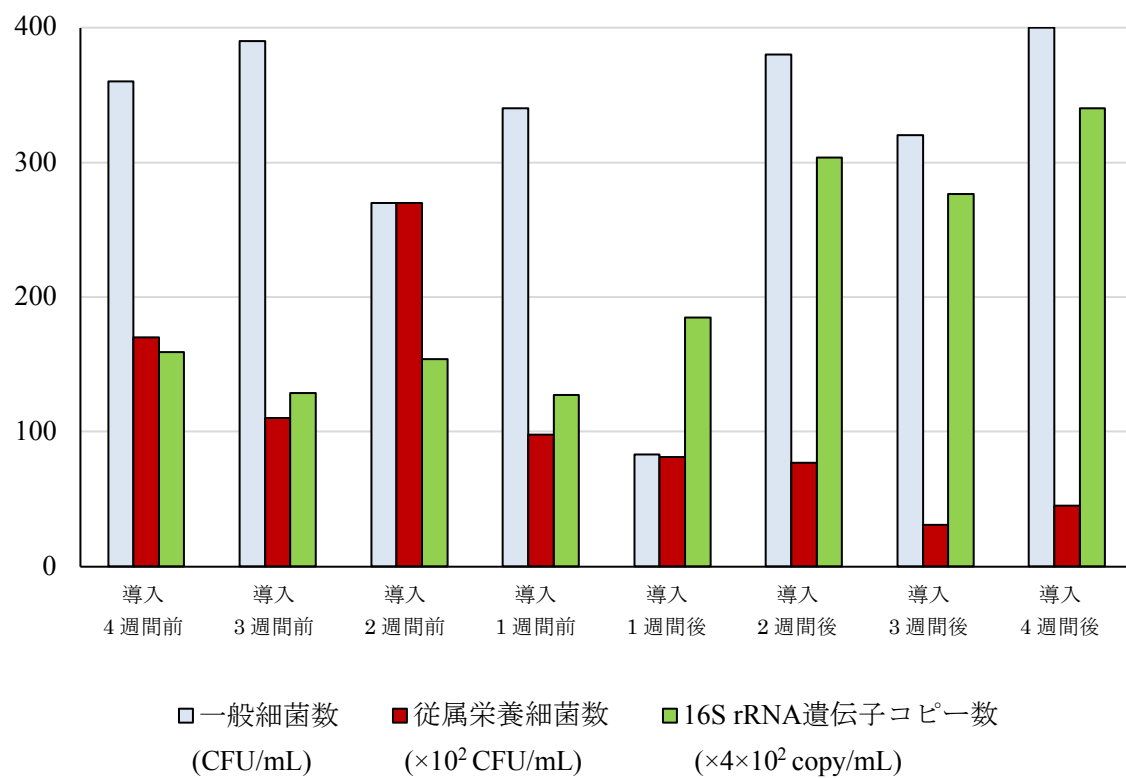


図 3. 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数、16S rRNA 遺伝子コピー数の推移

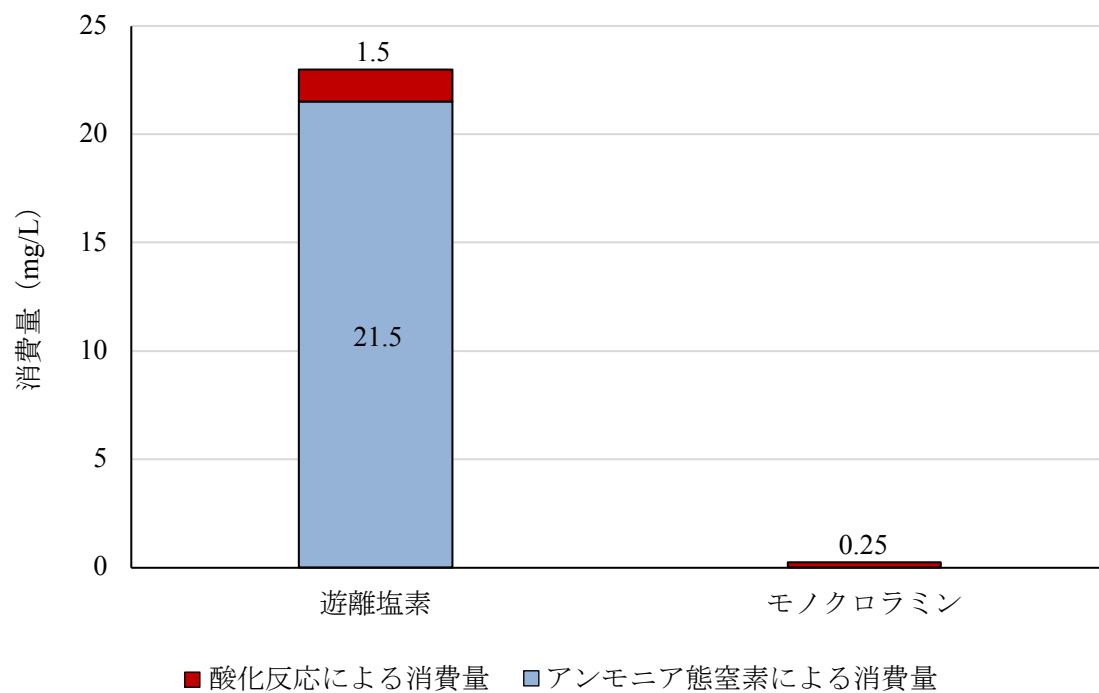


図 4. 源泉水に対する遊離塩素およびモノクロラミンの消費量

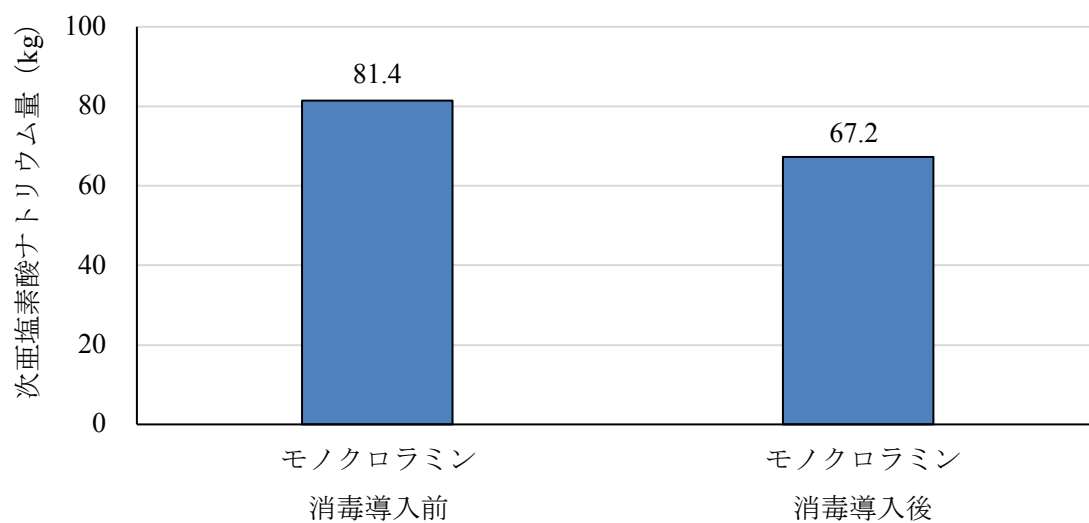


図 5. モノクロラミン消毒導入前後における次亜塩素酸ナトリウムの使用量
(4 週間、施設全体の使用量)

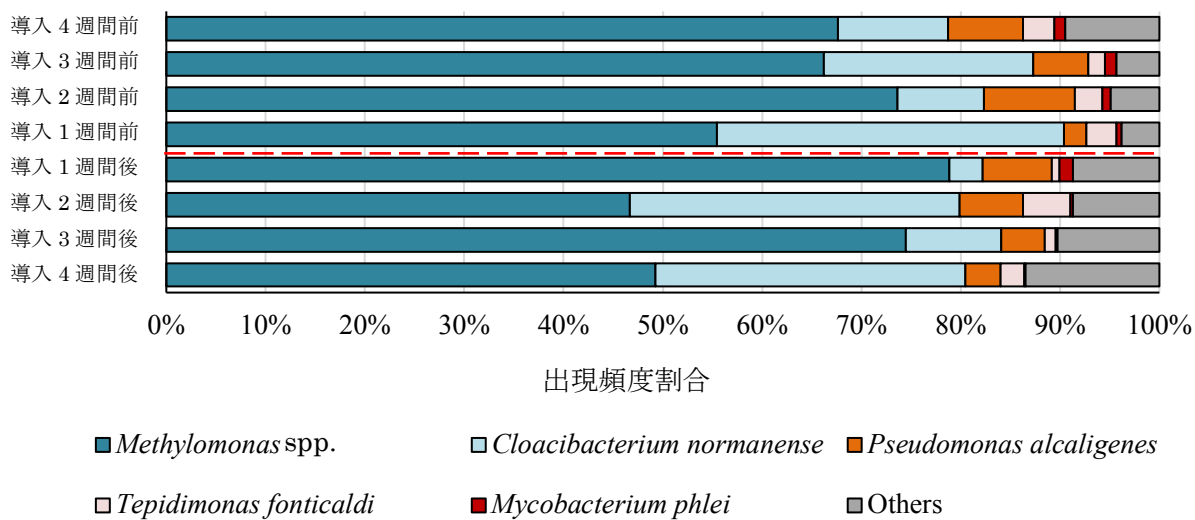


図 6. 菌種別出現頻度割合

■ モノクロロミン消毒導入前 ■ モノクロロミン消毒導入後

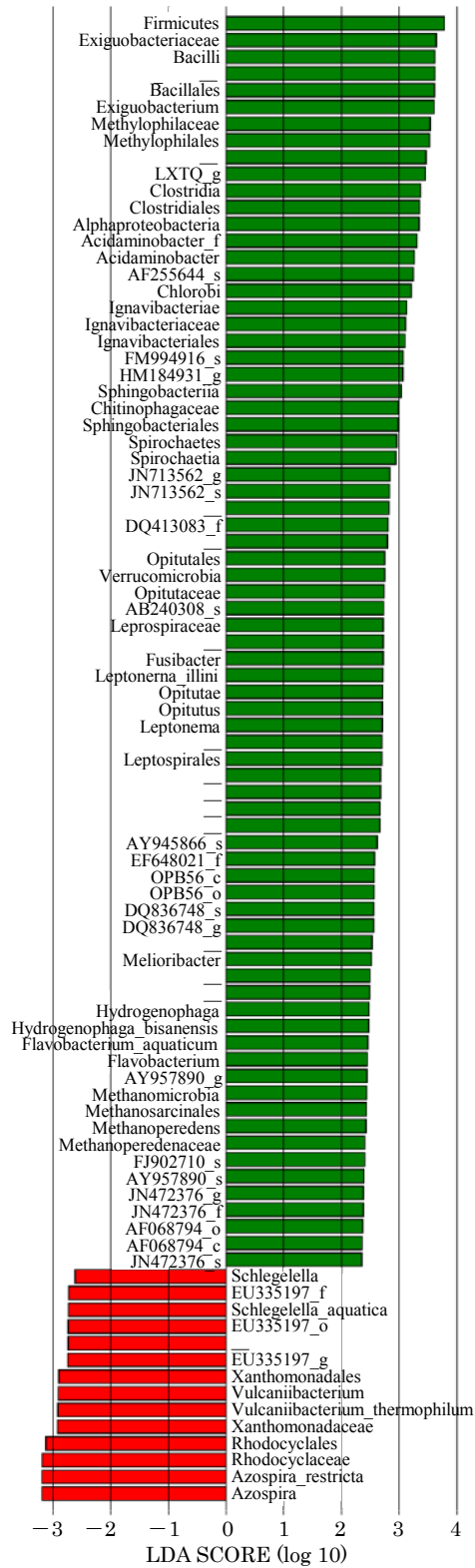


図 7. 群間比較解析結果

系統名末尾 c: Class, o: Order, f: Family, g: Genus, s: Species

令和3年度厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究
研究代表者 前川 純子(国立感染症研究所 細菌第一部)

分担研究報告書
モノクロラミンと遊離塩素による
Mycobacterium phlei の試験管内不活化試験

研究分担者	森 康則	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究分担者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	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	大市真梨乃	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究協力者	佐藤 大輝	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究協力者	小林 章人	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	藤井 明	株式会社ヘルスビューティー

研究要旨

アルカリ性の温泉では遊離塩素消毒の効果が低下し、レジオネラ属菌の増殖が抑えられず問題となることから、代替の方法としてモノクロラミン消毒が提案され、レジオネラをよく抑えられることが実地試験で確認されている。モノクロラミン消毒は遊離塩素消毒に比べれば穏やかな消毒方法であり、モノクロラミンを連続的に使用していると、*Mycobacterium phlei* が従属栄養細菌数測定用の R2A 培地で検出されるようになり、バイオフィルムの生成が懸念される場面があった。本研究では、モノクロラミン消毒における必要な消毒の程度や対策の検討を目的として、実地試験で増殖した *M. phlei* 単離株を用いて、遊離塩素とモノクロラミンによる不活化を試験管内で試験した。*M. phlei* に対する消毒効果は、得られた不活化曲線から同じ CT 値で比較した場合、遊離塩素よりモノクロラミンの方が高く、想定とは逆の傾向であった。当初意図していなかった結果ではあるが、アルカリ泉におけるモノクロラミン消毒の優位性が改めて支持された。モノクロラミンを連続使用している浴槽では、モノクロラミンに弱い *M. phlei* がどうして増加してしまうのか。一連の実験結果をふまえて実地における *M. phlei* の挙動を推測すると、*M. phlei* はバイオフィルム中にあることで、モノクロラミン消毒に対する抵抗性を発揮しているものと考えられた。モノクロラミン消毒で *M. phlei* を制御するには、こまめな浴槽清掃はもとより、配管洗浄、高頻度の高濃度消毒、オーバーナイト洗浄等のバイオフィルム対策を徹底することの必要性や重要性が改めて示唆された。

A. 研究目的

従来の温泉利用施設における浴用水の消毒方法には、その経済性や取扱の簡便さから、次亜塩素酸ナトリウムの添加による遊離塩素消毒が広く使用されてきた。しかし近年、高 pH 等、遊離塩素消毒が阻害される一部の温泉では、必ずしも遊離塩素が最適ではない場合があると指摘されてきた¹⁾。

代替のモノクロラミン消毒は、高 pH の温泉浴用水において *Legionella* spp. の制御に効果的であることが多くの事例報告で明らかになっている²⁾。その一方で、浴用水中に *Legionella* spp. は検出されなかったものの、*Mycobacterium phlei* (以下、*M. phlei*) をはじめとする、従属栄養細菌数の増加が複数の施設で報告された^{3,4)}。雑菌が増殖するということは、消毒の不足が懸念される場所であった。そこで本研究では、モノクロラミンによる *M. phlei* への消毒効果の確認を企図した。

なお *M. phlei* は、非定型抗酸菌の一種とであり、その病原性は低いと考えられているが、国内でも免疫機能の低下した患者における日和見感染等の報告⁵⁾があるなど、注意を要する。加えて、*Mycobacterium* spp. は、芽胞を作らない細菌だが、消毒への抵抗性の高いことが問題となる⁶⁾。

B. 研究方法

(1) 試験方法

本研究では消毒試験の検液として、アルカリ泉と PBS を使用した (表 1、2)。アルカリ泉は、以前実施したモノクロラミン消毒実地試験³⁾と同一の温泉水を用いた。検液は、試験前に 121℃15 分間のオートクレーブ滅菌処理を行った。

モノクロラミンの消毒液は、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (ケイ・アイ化成、ケイミックス SP) と硫酸アンモニウム溶液 (同社、レジサイド) を混合して用時調製した。

M. phlei は、先行研究⁷⁾で用いた浴用水由来の単離株を、16S rDNA 配列により菌種を確認したうえで使用した。

滅菌カップにそれぞれの検液 150 mL を入れ、濁度により菌数調整した *M. phlei* の菌液を、検液内でおおよそ $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL になるように添加した。それぞれの滅菌カップに、消毒液を所定の濃度になるよう混合した。対照試験として、遊離塩素消毒も行った。モノクロラミン、遊離塩素とも、低濃度 (約 5ppm)、中濃度 (約 10ppm)、高濃度 (約 20ppm) の 3 段階に濃度を調整した。

菌数測定用検液と消毒濃度測定用検液は、消毒剤添加後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分の時点で、それぞれ同一カップからサンプリングした。菌数測定用検液は適量のチオ硫酸ナトリウム (関東化学) にて中和した後、適宜希釈してから、R2A 寒天培地 (栄研化学) に混釈した。それぞれの R2A 培地は、7 日間 37℃ で培養した。

消毒濃度測定用検液は、それぞれモノクロラミン濃度および遊離塩素濃度を測定した。モノクロラミン濃度は、ポケットモノクロラミン・遊離アンモニア計 (HACH DR300 Pocket Colorimeter) によるインドフェノール法、遊離塩素濃度は、ポケット残留塩素計 (HACH Pocket Colorimeter II) による DPD 法を、それぞれ用いた。

(2) 不活化と消毒効果の評価

試験管内消毒試験で測定した消毒剤の濃度と、接触時間の積である、CT 値

(Concentration×Time value)を算出した。

縦軸をコロニー数(対数表示)、横軸をCT値(線形表示)の相関図として不活化曲線を得た。不活化曲線の近似式は、菌液添加直後のコロニー数を切片とした。

C. 研究結果および考察

PBSにおける *M. phlei* の 3-Log 不活化に必要な CT 値は、モノクロラミンがおおよそ 500 mg/L・min であるのに対し、遊離塩素はおおよそ 1,200 mg/L・min となり、おおよそ 2.5 倍となった(図1)。*Mycobacterium* 属は以前より消毒への抵抗性の高いことが知られており⁶⁾、本研究でも同様に高い抵抗性を示した。

アルカリ泉における *M. phlei* の 3-Log 不活化は、モノクロラミンが CT 値おおよそ 800 mg/L・min であるのに対し、遊離塩素は CT 値おおよそ 2,000 mg/L・min でも 1-Log 程度しか不活化されなかった(図2)。アルカリ泉に次亜塩素酸ナトリウムを添加した場合、高い殺菌効果が期待される次亜塩素酸(HClO)はほとんど生成されず、次亜塩素酸イオン(ClO⁻)にイオン化し、消毒力が減弱することが知られている⁸⁾。すなわち、アルカリ泉の遊離塩素は、次亜塩素酸イオンとして存在し、消毒効果が著しく低下したことが推測され、このことから、*M. phlei* に対する消毒効果が、PBS で高く、アルカリ泉で低い理由が説明できる。

以上の通り、モノクロラミンと遊離塩素消毒の效果に、明瞭な違いが認められた。意外だったのは、*M. phlei* に対する消毒効果が、一般的な遊離塩素消毒のほうが低かったことであった。消毒効果は、同じ CT 値で比較すると、遊離塩素消毒よりモノクロ

ラミンの方が高かった。さらに言い換えると、PBS とアルカリ泉のいずれの消毒試験においても、モノクロラミンの方が、より効果的であった。このことは、別施設で行った試験管内試験が再現された内容だった⁷⁾。一方で、これまでの実地試験³⁾に目を向けると、モノクロラミン消毒下の浴用水に *M. phlei* の増殖が観察されてきたことと、試験管内でのモノクロラミン消毒の効果が高いことは、整合的でないと思われた。

このような現象が起こった理由としては、実地試験と試験管内試験の *M. phlei* では、水中での存在状態が異なる可能性⁶⁾が考えられた。試験管内試験の *M. phlei* は基本的に浮遊性と考えられるが、実施設の浴用水中の *M. phlei* は必ずしも浮遊性であるとは限らないかもしれない。むしろ浴槽や循環ろ過システムの配管、ろ過器といった支持固体(担体)などに由来する、有機物や無機物が付着した状態にあるものが多いと考えられる。

一般に細菌は、いわゆるコンディショニングフィルムに対する可逆的付着状態を経て、細胞外多糖合成促進を伴う不可逆的付着状態に移行し、初期付着を完了する⁹⁾。その後、バイオフィルムの成熟が進むと、その消毒耐性は浮遊菌の数倍から数千倍に上昇する。*M. phlei* の初期付着やバイオフィルム形成過程のメカニズムの詳細はまだ明らかではないが、実地における *M. phlei* は初期付着前後で、モノクロラミン消毒に対する抵抗性を早期に獲得しているのではないかと推測される。

実地試験では、1週間に1回、10~20ppm程度の高濃度モノクロラミン消毒を実施したが、それでも *M. phlei* の増殖を完全には

制御しきれていなかった³⁾。いずれの理由やメカニズムがあるとしても、バイオフィルムが生じて、従属栄養細菌数が増加することは、衛生状態の低下につながり、何らかの対策を要することとなる。*M. phlei*を制御するためには、モノクロラミン消毒下においても、従来通りのこまめな浴槽清掃はもとより、過炭酸ナトリウム等の洗浄剤を用いた配管洗浄の必要性が改めて強調される。加えて、高頻度の高濃度消毒やオーバーナイト洗浄等、バイオフィルム対策を徹底することが必要と考えられる。

D. 結論

モノクロラミン消毒の実地試験で増殖した *M. phlei* 単離株に対して、モノクロラミンと遊離塩素による試験管内消毒試験を行った。消毒効果は、同じ CT 値で比較すると、遊離塩素消毒よりモノクロラミンの方が高かった。その傾向は、アルカリ泉で顕著であった。意図せず、アルカリ泉におけるモノクロラミン消毒の優位性を改めて確認した。それでも実地では *M. phlei* の増殖が見られており、従来どおりのこまめな浴槽清掃はもとより、配管洗浄、高濃度消毒、オーバーナイト洗浄の併用等の対策の重要性が合わせて確認された。

E. 参考文献

1. 泉山信司, 長岡宏美 他: 高 pH 浴槽水、薬湯、並びに水泳プールへの、モノクロラミン消毒の応用、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」(研究代表者 前川純子) より, 平成

28~30 年度総合研究報告書。

2. 柳本恵太, 高村知成, 植松香星: 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, 2015, **59**, 55-57.
3. 森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 西 智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司: 次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証—三重県津市の榊原温泉における検討—, 2019, 温泉科学, **69**, 90-102.
4. 渡邊貴明, 松田宗大, 小倉 徹, 植園健一, 松田尚子, 枝川亜希子, 泉山信司, 藤井 明: 循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について, 2018, 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会要旨集, p262.
5. Tanaka S, Hoshino Y, Sakagami T, Fukano H, Matsui Y, Hiranuma O. Pathogenicity of *Mycobacterium phlei*, a non-pathogenic nontuberculous mycobacterium in an immunocompetent host carrying anti-interferon gamma autoantibodies: a case report. BMC Infect Dis. 2019 May 22;19(1):454.
6. Oriani AS, Sierra F, Baldini MD. Effect of chlorine on *Mycobacterium gordonae* and *Mycobacterium chubuense* in planktonic and Biofilm State. Int J Mycobacteriol 2018;7:122-7.
7. 松田宗大, 枝川亜希子, 泉山信司, 小

倉 徹, 植園健一, 松田尚子, 藤井 明 :
循環式浴槽から分離された
*Mycobacterium phlei*に対するモノ
クロロミンの殺菌効果, 2019, 日本防
菌防黴学会第 46 回年次大会要旨集,
p232.

8. 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣 邦
雄, 遠藤卓郎: モノクロロミン消毒に
よる浴槽レジオネラ属菌の衛生対策,
2010, 保健医療科学, **59**, 109-115.
9. 松村吉信: バイオフィルムの構造と形
成過程, 「バイオフィルムの発生メカ
ニズムと評価・対策」より, 2020, 株式
会社 R&D 支援センター, 39-56..

F. 研究発表

誌上発表

1. Edagawa A, Matsuda N, Ogura T,
Uezono K, Izumiyama S, Fujii A,
Microbial Contamination of Rubber
Ducks Floating in Bathtubs of

Bathing Facilities, and an Evaluation
of Their Washing Methods, Biocontrol
Sci., 2021, **26**, 187-192.

2. 森 康則, 井上源喜, 日本の温泉の利用
状況と経年変化ー行政科学的アプロー
チを中心として, 2021, 地球化学, **55**,
43-56.

口頭発表

1. 森 康則, 温泉の利用状況と環境省「新・
湯治」プロジェクトへの期待、第 58 回日本
リハビリテーション医学会学術集会, 2021
年 6 月, 京都府.
2. 森 康則, 井上源喜, 日本における単位
面積・人口あたりの源泉数の経年変化と
地域的特徴, 日本温泉科学会第 74 回大
会, 2021 年 11 月, 群馬県.

知的所有権の取得状況

特許申請・実用新案登録、その他
なし

表 1. 試験管内試験に用いたアルカリ泉の主要化学組成

陽イオン	mg/kg	陰イオン	mg/kg	非解離成分	mg/kg
Na ⁺	91.8	F ⁻	1.2	H ₂ SiO ₃	57.9
K ⁺	1.0	Cl ⁻	14.8		
NH ₄ ⁺	<0.1	Br ⁻	0.1		
Mg ²⁺	<0.1	NO ₃ ⁻	0.8		
Ca ²⁺	0.7	HPO ₄ ²⁻	0.3		
		SO ₄ ²⁻	32.4		
		BO ₂ ⁻	3.7		

※ pH, 9.64; EC, 39.4 mS/m、オートクレーブ滅菌後

表 2. 試験管内試験に用いた PBS の主要化学組成

陽イオン	mg/kg	陰イオン	mg/kg	非解離成分	mg/kg
Na ⁺	3,879	F ⁻	<0.1	H ₂ SiO ₃	<0.1
K ⁺	164.4	Cl ⁻	5,046	HBO ₂	0.6
NH ₄ ⁺	<0.1	Br ⁻	<0.1		
Mg ²⁺	<0.1	NO ₃ ⁻	<0.1		
Ca ²⁺	<0.1	HPO ₄ ²⁻	965.2		
		SO ₄ ²⁻	<0.1		

※ pH, 7.64; EC, 1.62 S/m、オートクレーブ滅菌後

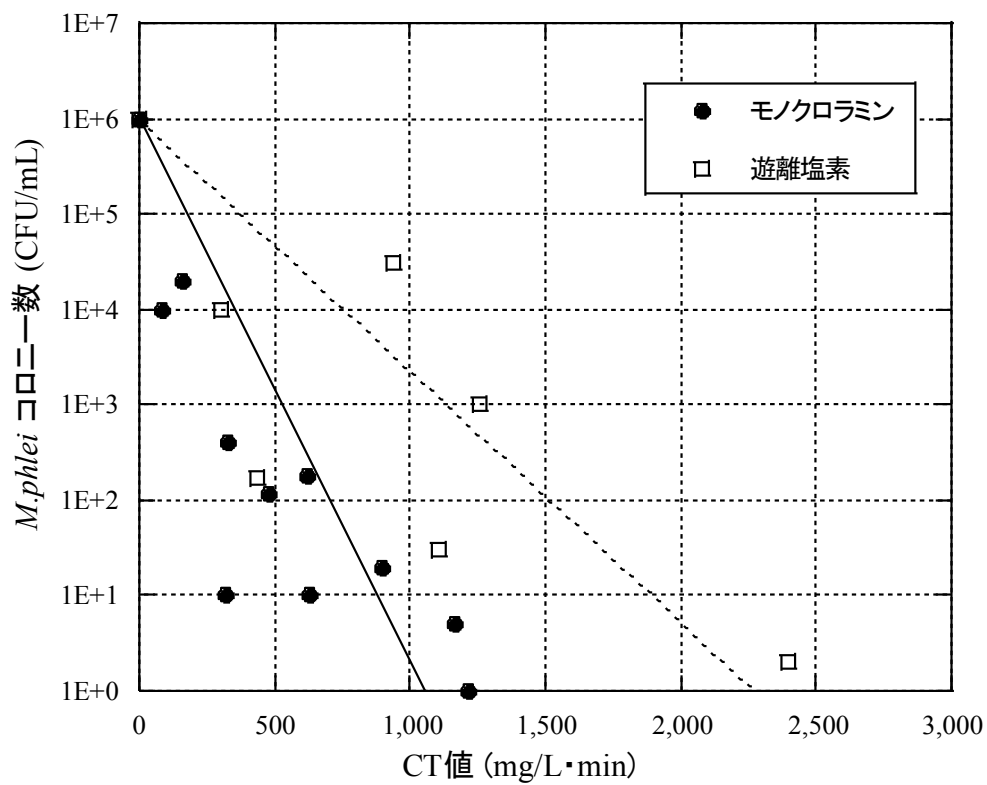


図1 PBS を用いた試験管内試験結果と不活化曲線

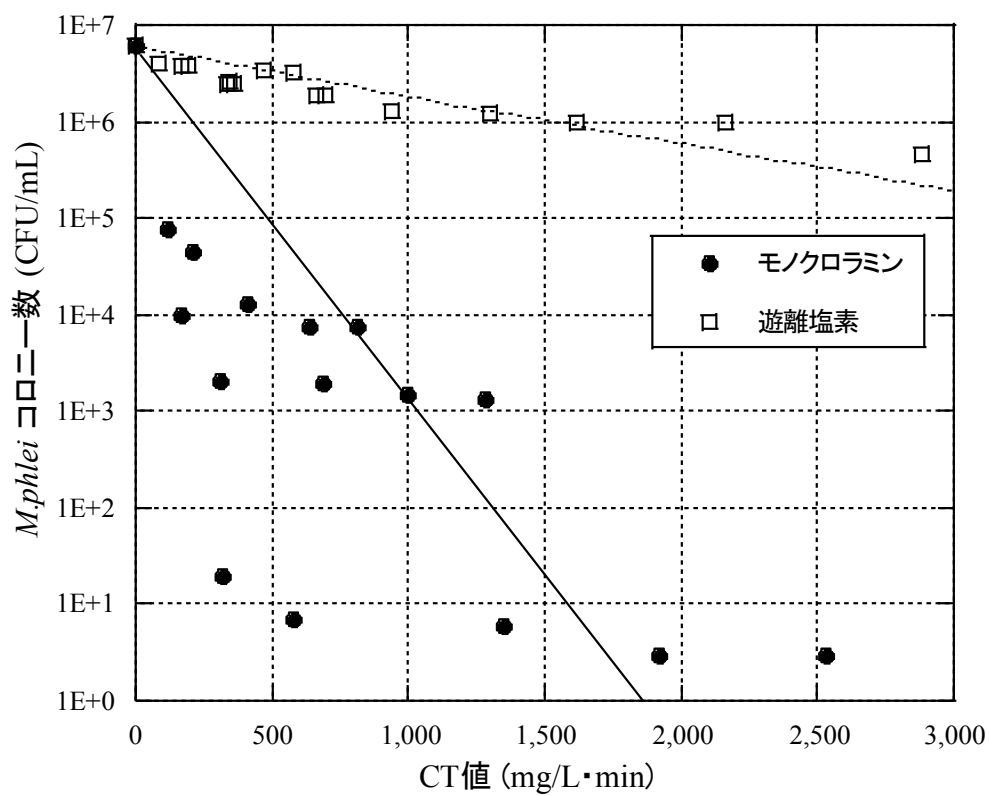


図2 アルカリ水を用いた試験管内試験結果と不活化曲線

令和3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

オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

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	田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター
研究分担者	柳本 恵太	山梨県衛生環境研究所 微生物部
研究分担者	森 康則	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究協力者	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	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	陳内 理生	神奈川県衛生研究所 微生物部
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	木村 哲也	株式会社ヤマト 温浴事業部
研究協力者	小森 正人	株式会社ヤマト 大和環境技術研究所
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	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循環式ろ過器はレジオネラ属菌による汚染源の1つであり、週に1回以上の頻度で高濃度塩素を用いた洗浄消毒が推奨されている。しかし、この方法は多量の薬液を必要とし、後処理も含め、多くの労力・コスト負担が避けられない。本試験では、これに代替する方法としてオゾンに着目し、2施設の協力を得て実地試験を行った。A温泉旅館において、バイパス循環配管を設けて洗浄できるようにしたろ過器に対して、初めに週1回の頻度でオゾンガスをオリフィス混合器から溶解供給し、その効果を検証した。オゾン供給により、5日間程度はろ過水中のレジオネラ属菌が不検出となったが、排オゾン処理と安全性の確保が重要であった。次

に、同じろ過器に対して、オゾンガスの代わりに、水の電気分解で生成する電解オゾン水を週 2 回の頻度で供給した。逆洗水中に検出されていたレジオネラ属菌が不検出となるまで 3 週間を要した。最後に、B スーパー銭湯において、毎日のろ過器逆洗に電解オゾン水を供給した。開始前に検出されていた逆洗水のレジオネラ属菌は、3 ヶ月以上継続して不検出となった。

A. 研究目的

公衆浴場等の入浴施設で衛生上の問題となっているレジオネラ属菌は、設備に付着する生物膜中で保護され、洗浄や消毒が困難なことが知られている¹⁾。つまり生物膜を除去し、その増殖を抑制することは、重要な管理の 1 つとなっている。特にろ過器を有する循環型浴槽はレジオネラ属菌に汚染されやすく、「公衆浴場における衛生等管理要領等について」において、「1 週間に 1 回以上、ろ過器を十分に逆洗浄して汚れを排出するとともに、ろ過器及び循環配管について、適切な方法で生物膜を除去、消毒」とされている²⁾。これを受けて「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、循環配管に 2~3%の過酸化水素や 5~10 mg/L の高濃度塩素を用いる方法が紹介されている³⁾。「レジオネラ症防止指針」では、ろ過器に対して、1 週間に 1 回以上の頻度で 5~10 mg/L の高濃度塩素を使用した逆流洗浄(以下、逆洗)が推奨されている⁴⁾。加えて、気泡装置等の汚染されやすい浴槽に対しては、毎日 1 回以上の頻度とされている。

しかし、これらのマニュアルや指針には、ろ過器の適切な生物膜の除去、消毒についての具体的方法や説明が不足しているかもしれない。例えば大容量のろ過器と配管に対応するための、多量の薬液と外付けタンク等を必要としたり、中和排水等の後処理が必要だったりして、多くの労力やコスト負担が避けられない。逆洗に用いる浴槽水がアルカリ性の場合には、

次亜塩素酸に比べて次亜塩素酸イオンの比率が高くなるため酸化力が低下し⁵⁾、消毒効果が不足する。

過酸化水素や塩素以外の方法として、前述のマニュアルや指針には、オゾン、紫外線、銀イオン、光触媒等の利用が挙げられている^{3),4)}。そのうちオゾンは、先進的な管理要領が高知県で制定されており、有力な候補の一つと考えられる⁶⁾。そこで、本試験ではオゾンに着目した。

オゾンは、空気(酸素)の無声放電⁷⁾や水の電気分解⁸⁾により必要量を現場で生成できて、多量の薬剤を搬入するための労力は不要となる。高 pH では、自己分解して酸化力の高いヒドロキシラジカルを生成し⁹⁾、pH の影響は無視できるか、むしろ消毒効果が高まる傾向を持つこともある¹⁰⁾。

オゾンは塩素消毒より高い酸化力を有し、消毒効果への疑問はない¹¹⁾。一方で気体のオゾンは高濃度になると人体に危険であり、厳重な注意を要する。日本産業衛生学会では、作業環境基準(1 日 8 時間労働)としてのオゾン許容濃度(健康上の影響がないと判断される濃度)を 0.1 ppm(0.2 mg/m³)と定めていた。なお、水溶液のオゾン水については、特段の基準値等はなかった。

B. 方法

オゾンの生成方法、ろ過器への供給方法および対象施設等を変え、RUN1~RUN3 の 3 条件で行った。それぞれの試験条件を表 1 に

示す。

B1. RUN1(A 温泉旅館で気相オゾン)

弱アルカリ泉質の A 温泉旅館における露天風呂系統(約 10 m³)の循環式ろ過器(砂ろ過槽、直径約 0.7 m×高さ約 0.3 m)に対して、ラインポンプ、オリフィス混合器、オゾン生成装置(CAP-10A、(株)石森製作所)等を有する洗浄・消毒用循環配管を別途接続した(図 1～5)。週 1 回の頻度で営業時間外 10:00～14:00 の間に、主配管のバルブを閉め、当該循環配管のバルブを開けて、ラインポンプにより約 100 L/min で循環しながら、オリフィス混合器を介して、無声放電により生成したオゾンガスを供給した。

オゾン供給は概ね週の初めに行い、試験期間は約 3 週間(オゾン注入は合計 3 回)とした。最初はオゾン生成量 5 g/h、次の 2 回はオゾン生成量 10 g/h とし、オゾンを供給している間、ろ過器通過前後の水中オゾン濃度を測定した。オゾン供給日の後に 1～3 日間隔で、浴槽水およびろ過水(ろ過器通過後)の水質を分析した。本試験における分析項目とその測定方法を表 2 に示す。

B2. RUN2(A 温泉旅館で電解オゾン)

RUN1 と同じ循環式ろ過器に対して、オゾンガスに代えて、電解オゾン水を供給した(図 6)。オゾン水の供給は、RUN1 同様、主配管のバルブを閉め、循環配管のバルブを開けて、ラインポンプにより約 100 L/min で循環しながら、ろ過器ドレン口より供給した(表 1、図 6)。

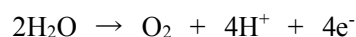
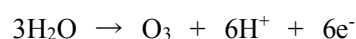
オゾン生成には、市販のオゾン生成電極を使用した(オゾンバスター、オゾンマート)。オゾン生成電極外観、オゾン供給装置外観およびオゾン生成電極仕様を図 7、図 8 および表 3

にそれぞれ示す。

オゾン供給頻度は、月曜日あるいは火曜日と、木曜日の週 2 回とした。通常の 2 分間の逆洗を行いながら、逆洗水を採水した後に電解オゾン水を供給した。オゾン供給後は再度逆洗を行い、続いて 2 分間のすすぎ(捨水)を行った。浴槽水の他、ろ過器の汚れ具合を調べるため、(ろ過水ではなく)逆洗水の水質を分析した。分析項目および分析方法は RUN1 と同様である(表 2)。

オゾン(O₃)は空気(酸素)を原料とする無声放電の他、SnO₂、PbO₂ あるいはダイヤモンド電極等の酸素生成過電圧の大きい電極を陽極に用いて水を電気分解することにより、次式のように生成することができる^{8),12)}。

陽極反応



陰極反応



水の電気分解によりオゾンを生成する際には、上式の通り、酸素(O₂)や水素(H₂)も同時に生成されている。すなわち、電解オゾン水は溶存オゾンの他に、溶存酸素や溶存水素、未溶解のオゾンガス、酸素ガス、水素ガス等が混在しており、特に分離工程等を経ない限り、電解オゾン水はこれらの気液二相混合流体となっている。本試験においても特段の分離処理を行わず、当該混合流体を電解オゾン水として用いた。

水の電気分解で生成したオゾン、酸素および水素等は、Fick の法則により、電極表面と液相との濃度勾配および生成した微細気泡表面と液相との濃度勾配によりそれぞれ液相へ移

動(溶解)する¹³⁾。水の電気分解でオゾンのみを大量に生成することは困難であり、生成量も多くないが、液相に移動しやすいことからオゾンの利用効率が高く、生成量の多寡は問題ではないと考えられた。加えて、排オゾン処理の必要性が大きく低減し、本試験の範囲では不要であった。

B3. RUN3(Bスーパー銭湯で電解オゾン)

B スーパー銭湯において、電解オゾン水を用いて試験した。本試験は、以下の理由により、RUN1・2 より効率的な洗浄・消毒操作方法が必要であった。施設全体の1日の入館者数は、先のA温泉旅館に比べ概ね約20倍と格段に多く(表1)、汚染の負荷が多いと考えられた。営業が終了し、洗浄可能となる時間が深夜(0:00～)であった。本来は専門的な人員の配置が望ましいのだが、管理業務は専門的な知識に乏しいパートやアルバイト等が担当していることが通例であり、とにかく簡易な操作が望まれた。実際、当該Bスーパー銭湯には、試験対象としている浴槽(井水、約1m³、図9)のろ過器(砂ろ過槽、直径約0.5m×高さ約1.0m、図10)以外にも、炭酸風呂、露天風呂およびジェット風呂等があり、複数のろ過器を制御盤にて自動逆洗していた。装置の設置に際しては、既存設備の改変を極力少なくすることが求められた。

以上のような観点から、オゾンによる消毒に重点を置いた。すなわち、毎日のろ過器逆洗前に、ろ過槽の有効容量分(ろ材充填量)以上の電解オゾン水を自動注入する単純なシステムとした。試験装置概略、オゾン供給装置およびオゾン供給装置設置状況を図11、図12および図13に示す。また、オゾン生成電極外観、電気分解時の状況およびオゾン生成電極

仕様を図14、図15および表4にそれぞれ示す。オゾン供給装置は、開始ボタンを一度押すだけで所定流量にてオゾン供給を開始し、タイマー制御により一定時間経過後オゾン供給を停止とした(図11～13)。前述の通り、Bスーパー銭湯は営業終了後に各ろ過器の自動逆洗を行っており、対象ろ過器の逆洗ボタンを押す前に、上記オゾン供給開始ボタンを押すよう施設担当者へ依頼した。これにより、当該ろ過器に対して電解オゾン水を毎日供給することが可能となった。Bスーパー銭湯ではオゾン生成に井水を用いており、陰極や電解槽内へのスケール付着が多いため、1回/月の頻度で、100g/L クエン酸溶液による漬け置き洗浄を行った。

当該方法は、電解オゾン水をろ過器へ供給してろ過器内を消毒した後、直ちに逆洗により汚れと共にろ過器外へ電解オゾン水を排出するものである。本試験では、この操作を毎日継続することにより、ろ過器内が徐々に清浄になることを期待した。なお、電解オゾン水は注入後、そのほとんどがろ過器内で消費されるか、わずかに残留しても逆洗により施設外へ排水されるため、作業空間中へのオゾン漏洩は実質ゼロに近いレベルとなる。

週1回の頻度(毎週土曜日)で、営業終了後のオゾン供給前に、各浴槽水および逆洗水を採水し、水質を分析した。なお、採水日のみ逆洗前にろ過器をブローによりエアレーションし(約200L/min、約5分間)¹⁴⁾、その後の逆洗水を採水することで、蓄積されていた汚れを狙って試験できるようにした。分析項目および分析方法はRUN1・2と同様である(表2)。

C. 結果および考察

レジオネラ属菌数、浴槽水残留薬品(塩素)

濃度、一般細菌数および ATP の測定結果を図 16 から図 27 にそれぞれ示す。なお、レジオネラ属菌数の 1 CFU/100 mL は不検出(検出限界 10 CFU/100 mL 未満)を示している。

C1. RUN1(A 温泉旅館で気相オゾン)

A 温泉旅館は薬品臭を極力抑制するため、臭素系錠剤(有効臭素 61%、有効塩素 28%)により浴槽水の消毒を行っており、オゾン供給前は DPD 試薬による遊離塩素相当で概ね残留濃度 0.1 mg/L で管理されていた(図 16)。この間レジオネラ属菌は浴槽中からは検出されていなかったが、ろ過器通過後のろ過水からは 10 CFU/100 mL や 20 CFU/100 mL で検出されることがあり(図 17)、ろ過器内のレジオネラ汚染が懸念された。

水質測定開始後 26 日目からオゾンガス洗浄を開始した。最初の週はオゾンガス生成量を 5 g/h としたところ、120 分間の循環中、水中オゾン濃度はろ過器通過前で 0.0 mg/L から 0.6 mg/L(表 1)へ、ろ過器通過後で 0.1 mg/L から 0.2 mg/L へ増加する傾向を認めたが、オゾン量としては不足だったかもしれない。そこで、次の週からは、オゾンガス生成量を 10 g/h としたところ、オゾン濃度は 20 分程ではば一定となり、ろ過器通過前で 1.2 mg/L から 1.4 mg/L(表 1)、ろ過器通過後で 0.42 mg/L から 0.6 mg/L となった。

40 日目と最終日 47 日目の、入館者数が増える休日(土日祝日)の後に、レジオネラ属菌が検出されることがあったものの、オゾン供給後 5 日間程度は浴槽水およびろ過水からレジオネラ属菌は不検出となった(図 17)。また、ATP は浴槽水のレジオネラ属菌検出率が 0.3%になるとされる 40RLU^{15),16)}を概ね下回る結果となった(図 18)。特にオゾン供給量を 10

g/h にしてからは、浴槽水の残留薬品濃度(遊離塩素相当)は最大で 0.6 mg/L となる等、明らかな増加傾向となり(図 16)、一般細菌は概ね 10 CFU/mL 未満にまで減少した(図 19)。

これらの結果から、オリフィス混合器を介してオゾンガスを供給しながら専用配管により一定時間ろ過器を循環洗浄する方法は、週 1 回以上の高濃度塩素洗浄に代替し得る、ろ過器の洗浄方法と言えた。

しかしながら、オゾン生成装置(図 5)や試験装置の周辺でオゾン臭が微かに認められることがあった。気相中のオゾン濃度は、作業環境基準 0.1 ppm 未満に対して、0.05~0.1 ppm になる場所があった(表 2)。RUN1 のろ過器(図 2)は、ろ材有効容量が約 120 L(直径約 0.7 m × 高さ約 0.3 m)と比較的小規模なものであった。一般に洗浄が必要なろ過器はこれより数倍大きくなることも珍しくはなく、その分、必要なオゾン量と、作業環境へのオゾン漏洩が大きくなると懸念された。労力および安全性等の観点から、次に電解オゾンに着目した。

C2. RUN2(A 温泉旅館で電解オゾン)

オゾンガスの代わりに電解オゾン水の供給を行った RUN2 では、ろ過器へのオゾン供給量は RUN1 の約 1/100 と極めて少なかった(表 1)。電解オゾン水のオゾン濃度は 0.9 mg/L 程度であったが、供給後にろ過器内で希釈されてしまうため、ろ過器通過前後のオゾン濃度は測定しなかった。作業環境中へのオゾン漏洩は認められず、狙い通り、安全性が高まったと考えられた。

電解オゾン使用前の浴槽水・逆洗水のレジオネラ属菌は、10~60 CFU/100 mL の間で検出されていた(図 20)。

水質測定開始後 29 日目から電解オゾン水

を週2回の頻度で供給したところ、浴槽水では一定の効果が伺えたものの、浴槽水・逆洗水共にレジオネラ属菌が継続して不検出となるまでに3週間を要した(図20)。

RUN1程ではないが、電解オゾン水供給により、浴槽中の残留薬品濃度(遊離塩素相当)は増加して残留傾向となり(図21)、ATPも浴槽水のレジオネラ属菌検出率が0.3%になるとされる40RLU^{15),16)}を概ね下回る結果となった(図22)。他方、一般細菌については、電解オゾン水供給の前後で浴槽水には減少傾向が僅かに伺えるものの、逆洗水には特に減少傾向は認められなかった(図23)。

電解オゾン水を供給しながら専用配管により一定時間ろ過器を循環させる方法は、ろ過器の洗浄方法として一定の効果を有していたかもしれない。しかし、効果が高いとは言えず、負荷の高いろ過器では困難な可能性、循環操作の必要性や供給頻度、操作の簡易化等々、検討すべき課題が多かった。電解オゾン水は、電解しながらの連続供給が使用方法として想定され、高くても1 mg/L程度がオゾン濃度の上限であった。

C3. RUN3(Bスーパー銭湯で電解オゾン)

Bスーパー銭湯は入館者数が多く、ろ過器への負荷が高いことから、逆洗前に毎日電解オゾン水を供給した。RUN3におけるオゾン供給量は、RUN2の2倍から5倍となった(表1)。2021年8月14日より浴槽水および逆洗水の水質測定を開始したが、コロナウイルス感染拡大による緊急事態宣言下(2021年8月20日～9月30日)にも関わらず、Bスーパー銭湯では、施設全体で1日に約1,200人もの入館者数があつた。オゾン利用前は、浴槽水で10～60 CFU/100 mL、逆洗水で30～330 CFU/100

mLの間でレジオネラ属菌が検出された(図24)。

水質測定開始後56日目のオゾン供給開始当初は、電解オゾン水の供給量を10 L/minで10 min(100 L)としたが、63日目の逆洗水からレジオネラ属菌が240 CFU/100 mL検出され(図24)、オゾンの不足が感じられた。試験対象としているろ過器の有効容量は約200 L(直径約0.5 m×高さ約1.0 m)であることから、66日目の施設側による配管洗浄(過酸化水素+塩素化イソシアヌル酸塩)を挟んで、77日目より電解オゾン水の供給量を10 L/minで20 min(200 L)と倍に増やした。

その77日目以降は、91日目に浴槽水のレジオネラ属菌10 CFU/100 mLが検出された以外は、2か月以上継続して不検出であった(図24)。この検出は、逆洗水からレジオネラ属菌が検出されていないこと、遊離残留塩素濃度が0.09 mg/Lと低かったこと、前後の測定は不検出が続いていたことから、生物膜の塊を偶然に測定したと考えられた。

逆洗水のレジオネラ属菌は、オゾン利用中の約3か月間不検出であった。浴槽中の残留塩素濃度は増加し、残留しやすい傾向となった(図25)。浴槽水のATPは40RLU^{15),16)}近辺を推移しており、オゾンを使用していない炭酸風呂、露天風呂およびジェット風呂等に比べて概ね低かった(図26)。一般細菌は $10^4 \sim 10^6$ CFU/mLだったものが、 $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL程度にまで、概ね3-Log減少した(図27)。

以上のBスーパー銭湯で行った、連日の逆洗にオゾンを使用する方法は、ろ過器の高濃度塩素処理を代替できると考えられた。多量の薬液、外付けタンク、中和の後処理が不要であった。

D. 結論

オゾンガスを用いたろ過器の循環洗浄は、高濃度薬品洗浄に代替し得るものではあるが、排オゾンガスの処理設備が必須となり、コスト、労力および安全性等の観点から、電解オゾンの利用がより好ましいと考えられた。

毎日のろ過器逆洗に電解オゾン水供給を組み合わせる方法は、オゾン漏洩のリスクがほとんど無く、ろ過器を清浄化させ、浴槽水の消毒剤濃度を維持し易くし、継続して逆洗水のレジオネラ属菌を不検出とすることが可能であった。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省:入浴施設におけるレジオネラ症防止対策、pp.2、2019年12月、(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000580777.pdf>)。
- 2) 厚生労働省:公衆浴場における衛生等管理要領等について、pp.13、2020年12月、(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000556111.pdf>)。
- 3) 厚生労働省:循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル、pp.22-23、2019年12月、(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000577571.pdf>)。
- 4) (公財)日本建築衛生管理教育センター:レジオネラ症防止指針(第4版)、pp.110、2017年7月。
- 5) 藤田賢二 監修:水道工学、pp.273、技報堂出版(株)、2006年10月
- 6) 高知県、オゾン殺菌方式による浴室等の衛生及び安全に関する管理要領 (<https://www.pref.kochi.lg.jp/soshiki/131901/h24-ozonikenkoubo-kekka.html>、2022/3/24時点)。
- 7) (特非)日本オゾン協会:オゾンハンドブック(改訂版)、pp.151-158、2016年10月。
- 8) Foller, P. C. and Tobias, C. W.: The anodic evolution of ozone, *Journal of The Electrochemical Society*, Vol. 129, No.3, pp.506-515, 1982.
- 9) Staehelin, J. and Hoigne, J.: Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions, *Environmental Science & Technology*, 19, pp.1206-1213, 1985.
- 10) 宮崎朋美、安田奏平、中川健斗、高鳥浩介、釜瀬幸広、黒松 久、櫻井美栄、白井淳資:オゾン水の殺糸状真菌(カビ)効果におけるpHの影響、家畜衛生学雑誌、44、pp.1-7、2018年。
- 11) 金子光美 著:水の消毒(初版)、pp.172-175、(財)日本環境整備教育センター、1997年8月。
- 12) 潮 俊希、榊原 豊、小森正人:オゾンの生成と還元を伴う電気化学的促進酸化処理法に関する基礎的研究、土木学会論文集 G(環境)、Vol.73、No.7、III_329-III_335、2017年。
- 13) 小森正人、榊原 豊:固体高分子電解質(SPE)膜電極を設置した固定床生物膜反応槽による合成地下水の高速水素利用脱窒処理、土木学会論文集 G、Vol.65、No.3、pp.153-163、2009年。
- 14) (社)日本水道協会:水道施設設計指針、pp.219-220、2000年。
- 15) (財)日本公衆衛生協会:平成22-23年度地域保健総合推進事業「保健所のレジオネラ対策における簡易迅速な検査法の

実用化と自主管理の推進に関する研究」
報告書、2011 年.

- 16) 千葉県山武健康福祉センター:入浴施設
におけるルシパック Pen 及びルシパック A3
surface の測定値の比較について、千葉県
公衆衛生学会分科会、2019 年.

F. 研究発表

紙上発表

1. Edagawa A, Matsuda N, Ogura T, Uezono K, Izumiyama S, Fujii A. Microbial Contamination of Rubber Ducks Floating in Bathtubs of Bathing Facilities, and an Evaluation of Their Washing Methods. Biocontrol Sci. 2021;26(4):187-192.
2. 柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司, 山梨県のアルカリ性 (pH10 程度) 温泉におけるモノクロラミン消毒の有効性の検討, 日本防菌防黴学会誌, 49(6), 261-267, 2021.

口頭発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

表 1 試験条件

	オゾン 生成方式	オゾン濃度	オゾン供給流量		供給時間	頻度	オゾン供給量	試験施設
		mg/L	g / h	L/min	min	回/週	g/週	
RUN1	無声放電	0.6～1.4	5、又は10 ^{※1}	-	120	1	10、又は20	A温泉旅館 入館者数：30～100人/日 試験浴槽 pH：7.6～7.9
RUN2	水電解 (水道水)	0.9	-	1	120	2	0.22	
RUN3	水電解 (井水)	0.8	-	10	10、又は20	7	0.56、又は1.12	Bスーパー銭湯 入館者数：1000～2000人/日 試験浴槽 pH：7.0～7.6

※1 オゾンガス



図 1 露天風呂 (RUN1、RUN2)



図 2 循環ろ過器 (RUN 1、RUN 2)

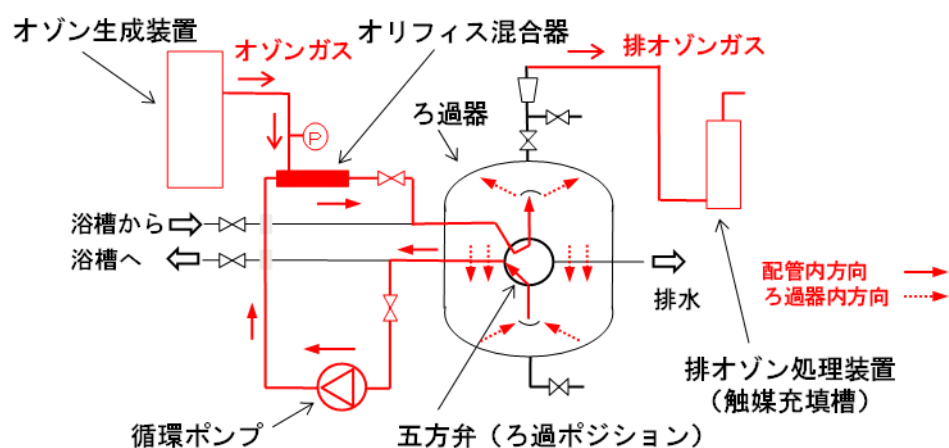


図 3 試験装置概略図 (RUN 1)

実線矢印および破線矢印は、それぞれ洗浄中の配管内オゾン水通水方向およびろ過器内オゾン水通水方向を示している。

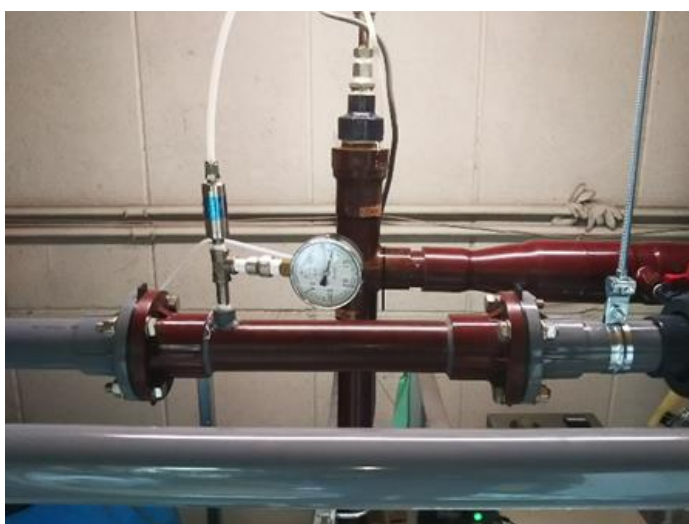


図 4 オリフィス混合器



図 5 オゾン生成装置

表 2 分析項目および測定方法

項 目	単 位	測 定 方 法
レジオネラ属菌	CFU/100mL	平板培養法
残留塩素濃度	mg/L	デジタル比色計DP-3F、笠原理化工業(株)
水中オゾン濃度	mg/L	デジタル比色計O3-3F、笠原理化工業(株)
気相中オゾン濃度	ppm	オゾンチェッカー OC-300、(有)オゾンテクニカ オゾンガスモニタ OZG-EM-010K、(株)アプリアス
一般細菌	CFU/mL	標準寒天培地法
ATP	RLU (Relative Light Unit)	ルミテスター・ルシパックA3法 ^{15),16)} 、 キッコーマンバイオケミファ(株)

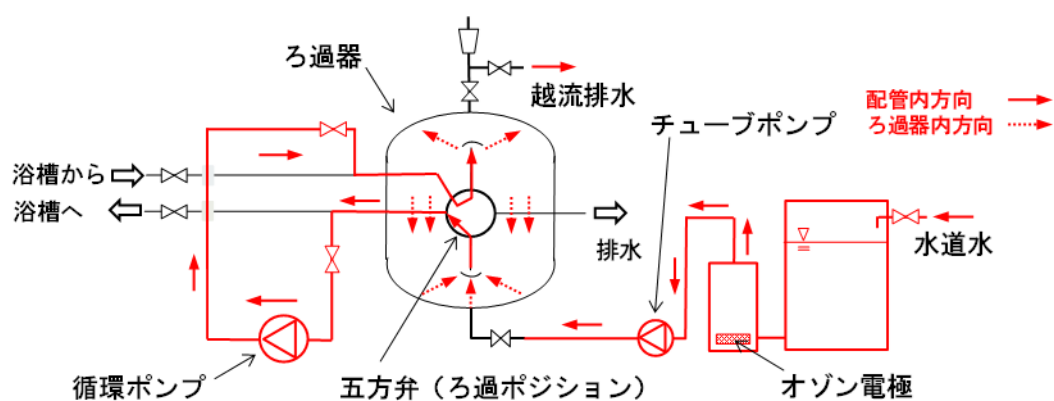


図 6 試験装置概略図 (RUN 2)

実線矢印および破線矢印は、それぞれ洗浄中の配管内オゾン水通水方向およびろ過器内オゾン水通水方向を示している。



図 7 オゾン生成電極 (RUN2)



図 8 オゾン供給装置 (RUN2)

表 3 オゾン生成電極仕様 (RUN2)

	寸法	枚数	定格電力	使用数
	cm	枚	W	個
オゾン生成陽極	5 W × 5 L × 0.1 t	3	60 (AC100V)	1
陰極		4		



図 9 浴槽 (RUN 3)



図 10 循環ろ過器 (RUN 3)

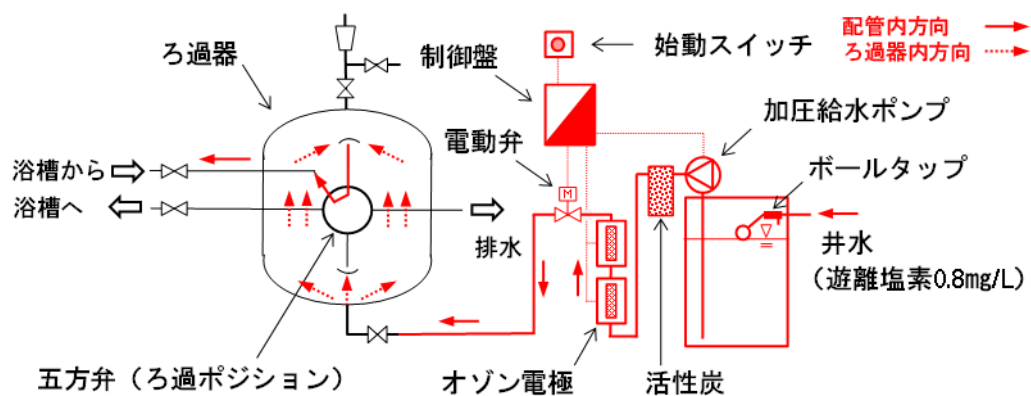


図 11 試験装置概略図 (RUN 3)

実線矢印および破線矢印は、それぞれ洗浄中の配管内オゾン水通水方向およびろ過器内オゾン水通水方向を示している。



図 12 オゾン供給装置 (RUN3)



図 13 オゾン供給装置設置状況 (RUN3)



図 14 オゾン生成電極 (RUN3)



図 15 電気分解時の状況 (RUN3)

表 4 オゾン生成電極仕様(RUN3)

	寸法	枚数	定格電力	使用数
	cm	枚	W	個
オゾン生成陽極	5 W × 10 L × 0.1 t	3	120 (AC100V)	2
陰極		4		

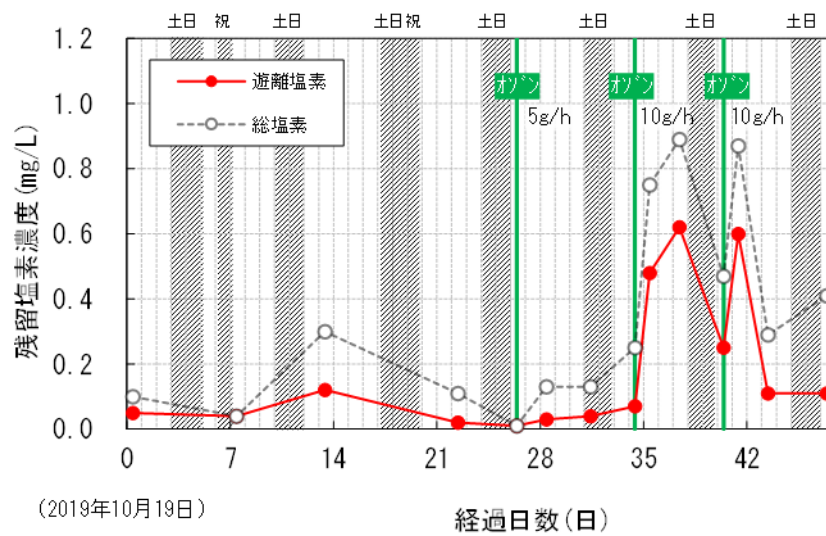


図 16 残留塩素経日変化(RUN1)

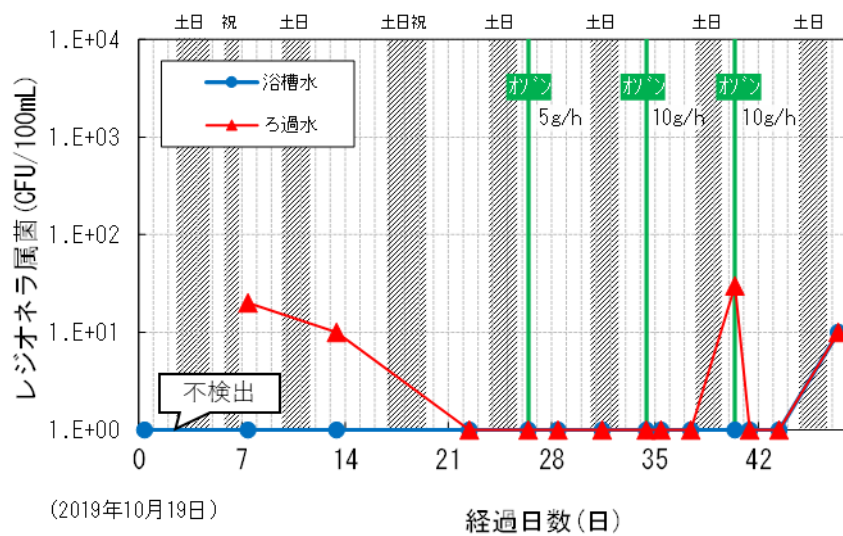


図 17 レジオネラ属菌経日変化(RUN1)

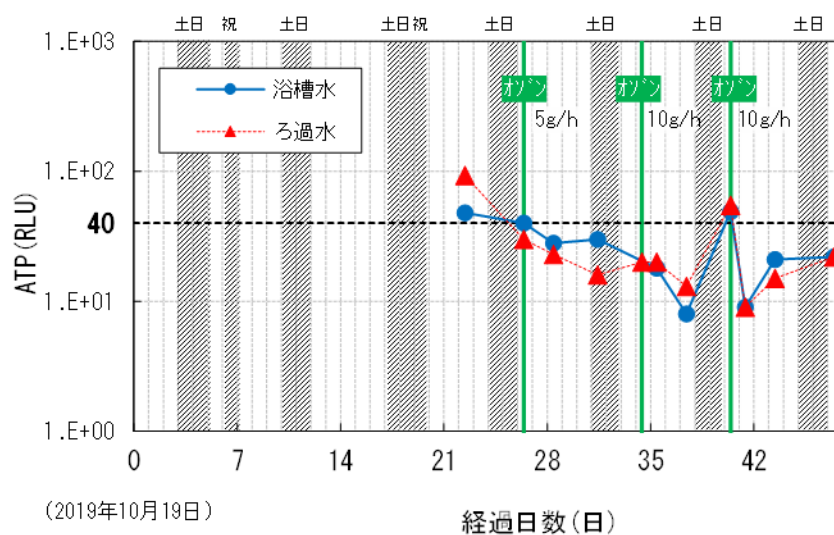


図 18 ATP 経日変化(RUN1)

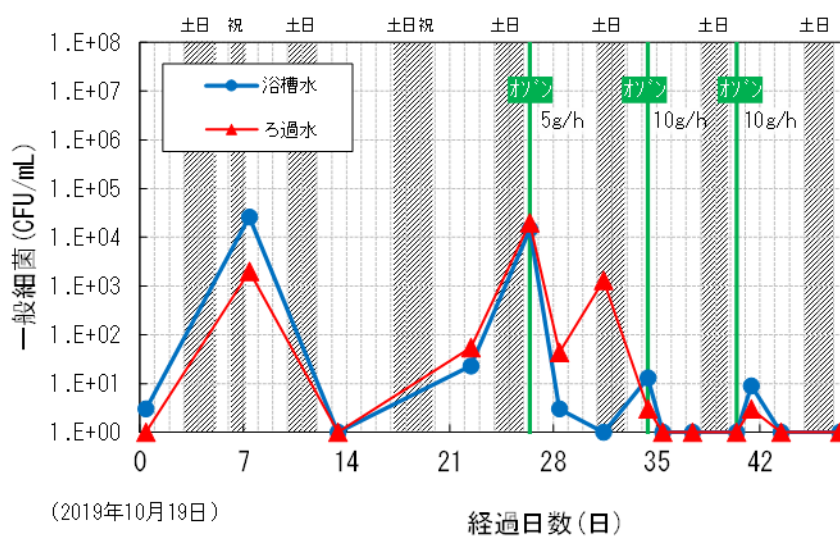


図 19 一般細菌経日変化(RUN1)

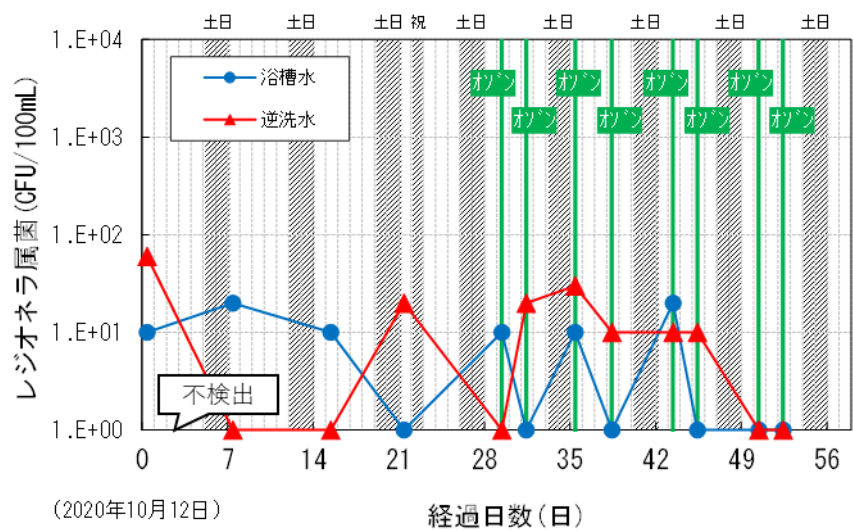


図 20 レジオネラ属菌経日変化 (RUN2)

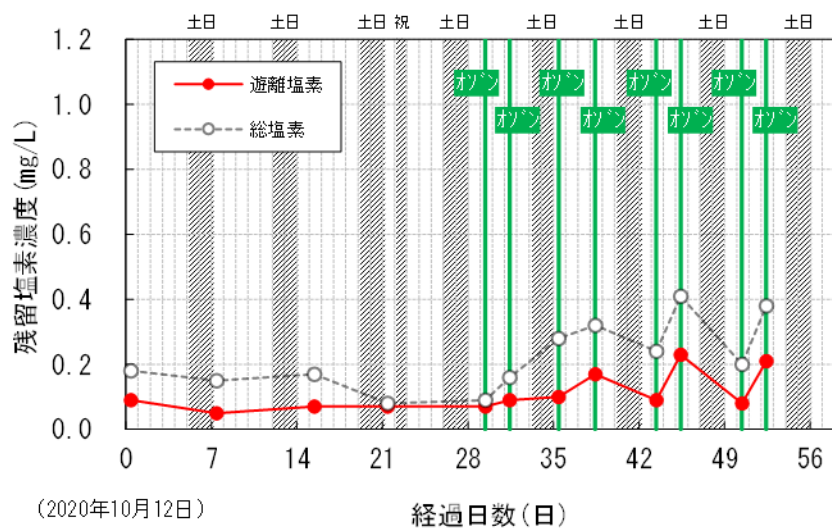
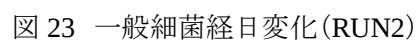
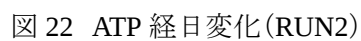


図 21 残留塩素経日変化 (RUN2)



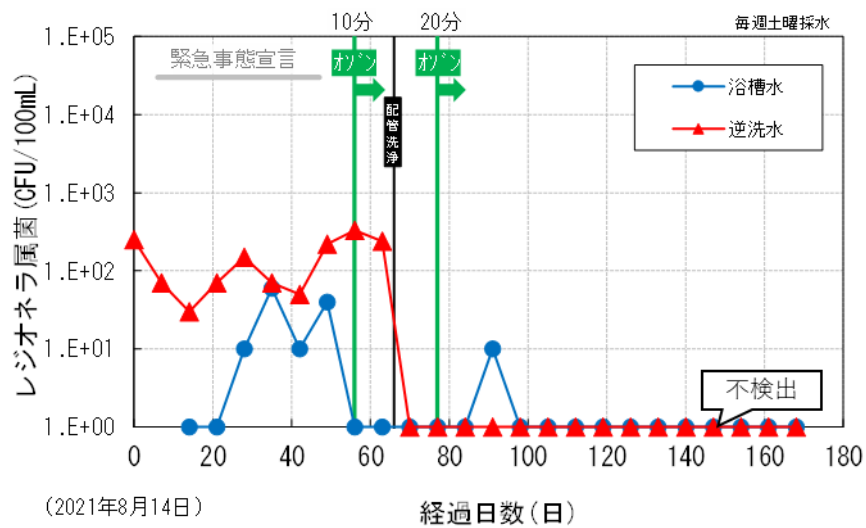


図 24 レジオネラ属菌経日変化(RUN3)

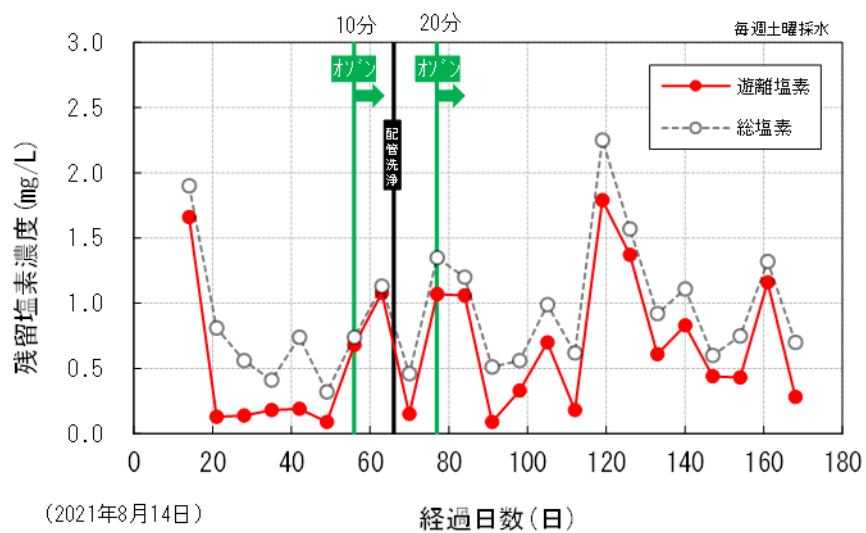


図 25 残留塩素経日変化(RUN3)

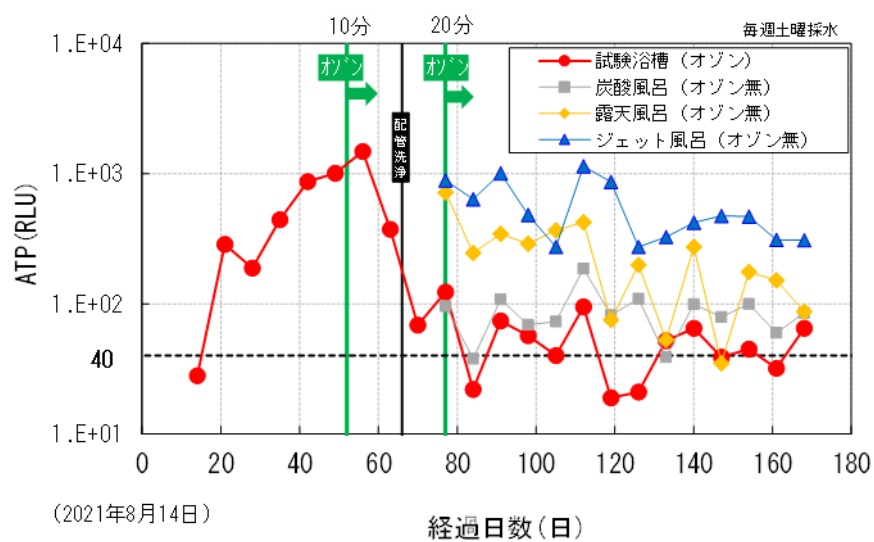


図 26 ATP 経日変化(RUN3)

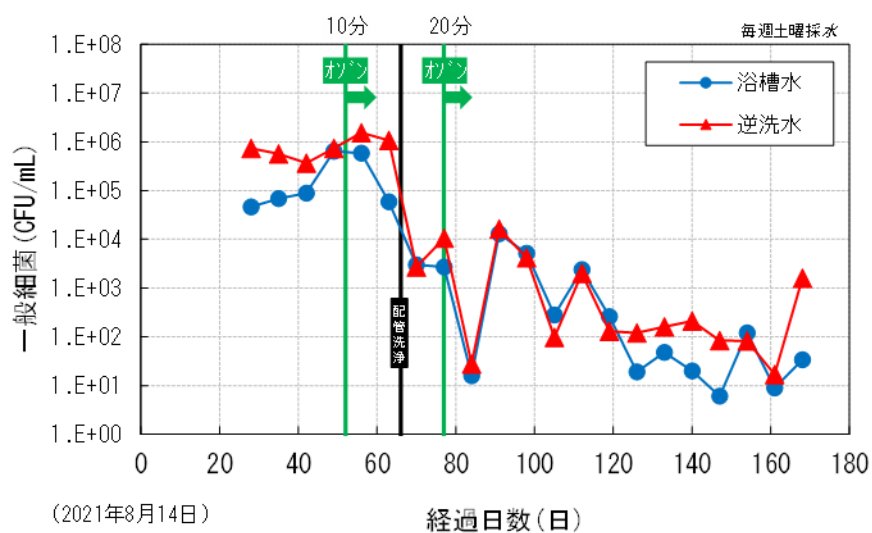


図 27 一般細菌経日変化(RUN3)

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3年度 総括分担研究報告書

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

研究代表者： 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部

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

研究分担者： 田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター
研究分担者： 中西 典子 神戸市健康科学研究所
研究分担者： 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者： 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： 蔡 国喜 長崎県環境保健研究センター
研究協力者： 田中 忍 神戸市環境保健研究所
研究協力者： 縣 邦雄 アクアス株式会社
研究協力者： 新道 欣也 株式会社 お風呂のシンドー
研究協力者： 鳥井 良太 株式会社 お風呂のシンドー
研究協力者： 齋藤 利明 株式会社ヤマト
研究協力者： 木村 哲也 株式会社ヤマト
研究協力者： 小森 正人 株式会社ヤマト
研究協力者： 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨

循環浴槽で再発を繰り返すレジオネラ汚染の迅速検出法の一つとして、フローサイトメトリー法（FCM 法）を開発し、その技術の標準化と普及を目的に共同調査を実施した。地方衛生研究所の3機関と民間企業の1機関が共同調査に参画した。当該技術の開発機関から参加機関に対して技術研修を実施し、*Legionella pneumophila* の模擬試料、試薬、使用するプロトコルおよび装置を配布した。自家調製した模擬試料の添加回収実験は、全参加機関で回収率 80~130%と良好な成績を示し、市販の模擬試料でも同等の成績が得られた。営業入浴施設の調査における、レジオネラ培養検査結果に対する FCM 法の感度と特異度は、全試料(N=267)で感度 83.1%、特異度 79.6%を示した。機関ごとでは感度 91.7%、特異度 95.3% (N=55) から感度 55.6%、特異度 75.3% (N=90)とばらつきがあり、検体輸送の影響や装置の器差ならびに研修時間の不足が考えられた。レジオネラ定量値と生菌数にはやや相関が認められ ($y = 32.547x^{0.2577}$ 、 $R^2 = 0.2091$)、培養法の定量下限近くで FCM 値が高い値を示す傾向にあった。オゾンで逆洗処理した、循環ろ過器の逆洗液に FCM 法を適用したところ、全細菌数が逆洗前後で有意に減少し ($p<0.01$)、オゾンを用いた逆洗方法の有効性を確認した。

A. 研究目的

本研究の目的は、Taguri *et al.* の報告¹⁾に基

づいてフローサイトメトリー法（FCM 法）の
共同比較実験を行って精度と信頼性を証明す

ることにより、レジオネラ汚染の迅速探知を目的とする同法の普及と、公衆浴場におけるレジオネラ汚染対策の向上に資することである。最初に、同法について精度管理に基づく標準作業書を作成するとともに4つの研究機関の協力者向け技術研修を実施した。各機関向けに装置と精度管理用の標準試料を送付して、各機関で添加回収試験の結果を比較した。最終的に各機関において実試料を用いて実施した成績を比較して、FCM法の実用性を評価した。また循環ろ過器にオゾン曝気方式による洗浄処理を実施している施設水の評価にFCM法を適用できるか検討した。

B. 材料と方法

1. 共同比較実験

1.1. 共同比較実験の参加機関

共同研究には、地方衛生研究所3機関（以下A~C研究所という）と民間企業研究所の1機関（以下D研究所という）が参加した。基盤技術の開発機関であるA研究所において、下記のとおり、標準作業書と模擬試料を準備して、B~D研究所協力者の技術研修を行った。予めA研究所で機器の動作確認と模擬試料の作製等を行って、各協力機関に配布した。FCM法については田栗らの報告²⁾に基づいて標準作業書に則って行われたが、培養法については各研究所の方法に準じた。

1.2. 標準作業書とワークシートの作成

本FCM法は、本来、HIV/AIDSの臨床検査用のフローサイトメーターを用いており、細菌に適用するには適切な模擬試料の作製と添加回収実験による技術の検証が必要である。*Legionella pneumophila*（以下LPと略）標準菌株による模擬試料の作製方法、FCM法による模擬試料の添加回収実験の方法およびFCM法による実試料（浴槽水）の検査方法について、標準作業書と作業用ワークシートを作成した（別紙1、2）。

1.3. 模擬試料の作製方法

-80℃保存のLP NIIB0058をBCYEα培地

に復元後、増菌培地（*Legionella* LC Medium Base, 9016, TAKARA）1 mL 入り 1.5 mL マイクロチューブに小コロニー1~数個を接種して、恒温水槽で36±1℃、18~24時間培養した後の懸濁液の上清0.5 mLを4.5 mL PBS（pH7.2）に接種して原液とした。この時の原液は、約1.0~2.0×10⁷ cells/mLと推定される。原液、10⁶ および 10⁵ cells/mL オーダーの懸濁液を100倍希釈して、それぞれ10⁵、10⁴ および 10³ cells/mL オーダーの模擬試料とした。各試料を適切に希釈してBCYEα培地に接種し、36±1℃、72~96時間培養してレジオネラの生菌数を計測した。模擬試料は終濃度0.05%グルタルアルデヒドと0.1%アジ化ナトリウムを加えて固定し、36℃で3時間保温後に冷蔵保存してFCM法に供した。固定後の模擬試料は死菌であることを確認した。消毒効果判定に用いる全細菌数（Total bacterial counts）の測定には*Escherichia coli*の10⁵、10⁴ および 10³ cells/mL オーダーの希釈液を調製した。増菌培地にTSB、平板培地にTSAを用いて平板法培養時間を48時間に短縮する以外は上記と同様に調製した。

1.4. 市販品を用いたレジオネラ検出用模擬試料の作製方法

IDEXX-QC *Legionella pneumophila* (98-0009287-00, IDEXX) を取扱説明書どおりに処理した。即ち、1バイアルを-30℃の冷凍庫から取出し、室温15分間静置後に、バイアル内のカラーディスクを無菌的に10 mL 滅菌蒸留水に移し入れて、10~15分間転倒混和して完全にディスクを溶解させた。調製菌液の100 μLを5枚のBCYEα培地に塗抹して、36±1℃、72~96時間培養した後の生菌数を計測した。調製済み模擬試料の生菌数はFCM実測値（4,573 ± 467 CFU/mL）の1/10量程度（390 ± 102 CFU/mL）であった。残りの調製菌液に終濃度0.05%グルタルアルデヒドと0.1%アジ化ナトリウムを加えて固定し、36℃で3時間保温後に冷蔵保存して試験に供した。

1.5. フローサイトメトリー用染色試薬

全細菌数(Total Bacterial Counts, TBC)の測定に際しては、田栗らの方法²⁾に準拠して、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 μ L 加えたのち、5 分間静置させ、フローサイトメーターにより計測した数値を TBC とした。LP 染色用には、レジオネラ特異性が異なる抗 LP 抗体 FL Ip SG1 (V6051, Virostat) と FL ARK_Ip (ARK resource) を Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) で標識し、等量を混合して FL Ip mix として使用した。試薬は抗体量として約 1 mg/mL の抗 LP 抗体を含む濃度となるように調製した。

1.6. フローサイトメトリー

フローサイトメーターは、田栗らの方法²⁾に準拠して miniPOC (シスメックスパルテック社) を使用した。本機はもともと HIV/AIDS 患者の血液細胞モニタリング用に市販されているものであるが、本体重量が 6.5kg、測定時間は約 5 分間と可搬性と利便性に優れているために本研究で採用した。その光学的特長は励起/蛍光波長が 532 nm/570 nm、610 nm の半導体レーザーを搭載することにより、標的細胞へのレーザー照射で得られる側方散乱光と蛍光強度をフォトマルチプライヤー (光電子増幅管) により探知して、内蔵の解析装置で細胞数として数値化する。本装置で自動的に表記される細胞数 (cells/ μ L) は人白血球用キットに最適化されているために、ここでは細菌用に換算する必要がある。測定に際しては、試料を所定の染色液を注入して反応させたのち、2 mL プラスチックシリンジで吸引後にシリンジごと miniPOC にセットした。この時、あらかじめ染色試薬用の測定最適条件と試薬由来ノイズを検出しない散布図に特定領域を設定して、細菌細胞から得られる側方散乱光強度 (SSC) と蛍光強度 (FL) を 2 つの指標として特定領域内の細胞を計数した。

1.7. 添加回収試験

レジオネラ菌数測定に際して、 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mL オーダーの LP 模擬試料を使用した。各試料 1 mL に等量の 0.1%BSA 加 PBS を加えたのちに FL Ip mix の 3 mL を追加して、常温で 30 分間、旋回振とうさせ、miniPOC で計測した数値に装置独自の補正值 (2000/42) を掛け合せて添加菌量とした。回収実験では、 10^3 、 10^4 および 10^5 cells/mL オーダーの LP 模擬試料の各 1 mL を 500 mL PBS に接種して希釈液を作製した。0.2 μ m 孔フィルターでろ過濃縮したのち、フィルターを 55 mm シャーレに貼付け、0.6 mL PBS と 0.6 mL 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すことにより回収した。同じことを繰り返した 2 回収液を FL Ip mix で染色し、30 分間反応後に miniPOC で測定した値に装置独自の補正值を掛け合せて回収菌量とした。添加菌量と回収菌量により回収率を求めた。市販品を用いたレジオネラ検出用模擬試料でも同様に処理して回収率を比較した。

1.8. 実試料の測定

1.8.1. 採水

試料は DPD により塩素濃度を測定したのちに、終濃度 50 mg/L となるようにチオ硫酸ナトリウムを入れた 1 L の滅菌済み PP プラスティック容器に採水した。採水後の試料は冷蔵保存して遅くとも 1 週間以内に試験に供した。

1.8.2. 消毒効果判定

最初に miniPOC を用いて非濃縮浴槽水中の塩素消毒効果を判定した。即ち、検体 1 mL と等量の 0.1% MTAB 希釈液 1 mL とを混合し、0.1% PI 10 μ L を加えた後、miniPOC にセットして TBC を測定した。測定値に装置独自の補正值を掛け合せて細菌数とした。この時、試料中の TBC が判定基準値 1000 counts/mL を越した場合は「非清浄」と判定し、続く LP 定量検査で LP が検出された場合は生菌と判定した。TBC が 1000 counts/mL に満たない試料は「清浄」と判定し、LP が検出された場合

でも死菌と判定した²⁾。

1.8.3. LP の特異的定量

浴槽水の LP 定量用蛍光染色試薬は、FL Ip mix を用いた。検水 500 mL を 0.2 µm 孔フィルターで吸引ろ過した後、フィルターを 55 mm シャーレに貼付け、0.6 mL PBS に等量の 0.1%BSA 加 PBS を加えて、MF 表面をピペティングで洗い出した液を回収した。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 1 mL に染色試薬 FL Ip mix 1.5 mL を加えて、30 分間回転振盪させたのち、miniPOC で測定した。この時、装置由来の誤差 (換算比 : 2000/42) と回収時に発生する誤差 (容量比 : 1.1) により補正したのち、予め作成した検量線により濃度換算して LP 数とした²⁾。D 研究所は 250 mL の検水を用いて同様に処理した。

1.8.4. 平板培養法

レジオネラ属菌検査は各研究所の方法で実施した。即ち、A~C 研究所では森本らの方法³⁾でろ過濃縮法を行ったが、D 研究所は遠心沈殿法を用いた。培地は GVPCα 培地 (バイオメリュー) を使用し、100 倍ろ過濃縮した検水を塗抹後 36°C で 3~7 日間培養し、システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。

1.8.5. 現地調査

主に循環ろ過式浴槽水を対象として調査したが、一部かけ流し式浴槽水、貯湯タンク水および水風呂が含まれていた。A 研究所では遊離塩素管理の 93 検体、B 研究所は遊離塩素管理 29 検体、C 研究所は遊離塩素管理等 (二酸化塩素管理含む) 55 検体、モノクロラミン管理 6 検体、D 研究所では遊離塩素管理の 90 検体を処理した。採水後の検体は冷蔵保存して遅くとも 1 週間以内に試験に供した。

2. オゾン逆洗の調査

2021 年 8 月から 2022 年 3 月にかけて、循環ろ過式浴槽のろ過器にオゾンを用いた逆洗消毒の有用性評価研究 (本分担研究とは別途

報告) のサンプルを、FCM 法で評価した。非濃縮逆洗水の全細菌数 (TBC) を、遊離塩素消毒された浴槽水と同様に測定し、1,000 倍濃縮後に抗レジオネラ抗体染色を用いてレジオネラを測定した。並行して、レジオネラ遺伝子検査 (CycleavePCR Legionella Detection Kit, CY240, Takara-bio) 、レジオラート検査、レジオネラ培養検査を実施した。

C. 結果および考察

1. 共同比較実験

1.1. 添加回収実験

表 1 に今回自家調製した模擬試料と市販材料を用いた回収率の比較を示した。回収率が最も低値を示したのは B 研究所の 10⁴ オーダーの模擬試料で、最も高値を示したのが C 研究所の 10³ オーダーの模擬試料だった。平均回収率は概ね 80%~130%であり、一般生菌数について、Xbar 管理図における管理限界線の指標とされる 30%~300%と比べると良好な成績と考えられた⁴⁾。今回供試した 3 段階のレジオネラの模擬試料において、研究所間に差は認められなかった。

市販品を用いて作製した模擬試料による添加回収実験の結果は A 研究所で 94.3%、D 研究所で 96.5%であった。市販品をもちいたことから模擬試料作製作業は比較的簡単であり、FCM の回収実験として問題なく適用できると考えられた。

1.2. 施設調査

表 2 に共同調査研究における施設調査のまとめを記載した。施設調査において、培養法と比較した消毒効果判定結果の感度と特異度は研究所間で大きく異なった。最も良好な成績を示したのは C 研究所であった (感度 91.7%、特異度 95.3%)。該研究所は 2 回目の共同調査実施で成績は 1 回目参加時よりも改善しており、スキル向上が考えられた。A 研究所は開発機関であることから高い感度を示したが、特異度が低かった (感度 96.9%、特異度 73.8%)。これは偽陽性が多かったことを示す

が、検体の中にレジオネラ以外の細菌増殖が多いと推察される貯湯タンク水や水風呂が多く含まれていたことが要因と考えられた。これらの検体について並行実施したレジオラートの結果において、平板培養法が陰性であった検体（偽陽性結果：FCM 法で汚染判定）が陽性を示していたことからこのことは支持される（データ省略）。B 研究所と D 研究所において、偽陰性も偽陽性も多く検出された。その理由として、第一に検体の中和や輸送条件、並びに装置の感度が異なっていたために、検体輸送の影響や装置の器差による要因が考えられた。しかし、本技術が一般的に普及していなかったことやこれらの研究所が初めての参加であったこと、さらにはコロナパンデミックによりヒトの往来が制限されたことが要因として挙げられ、より丁寧な技術研修の必要性があったとも考えられた。一部の検体では計測阻害と考えられる現象があり前処理（ビーズによる粉碎と超音波処理）による改善が認められたが、時間と手技の複雑さが障害となるために、低スペックの当該装置にどこまでの精度と正確性を求めるかが争点となる。モノクロラミン管理施設の調査成績も良好であった（表 2）。

1.3. 施設調査におけるレジオネラの定量性

今回実施した共同調査研究の施設調査のうち、FCM で非清浄と判定されたサンプルのレジオネラ定量値（カットオフ値 10 CEC/100 mL）と生菌数（カットオフ値 10 CFU/100 mL）との相関を見たところ、培養法のカットオフ値近くで FCM 値が高い値を示す傾向があったものの、弱い相関が認められた（ $y = 32.547x + 0.2577$ 、 $R^2 = 0.2091$ ）。最大の矛盾が見られたのが、生菌数 10 CFU/100 mL に対して、FCM が 2,712 CEC/100 mL を示した例であった。本検体の遊離塩素濃度は 2.0 mg/L 以上を示しており、高濃度塩素の存在にもかかわらず、微量の生菌と死菌や VBNC 状態のレジオネラが共存した状態と考えられた。TBC は基準値を超えていたものの 1,548

counts/mL と比較的 low 値であり、このようなケースでは、配管やろ過器内に繁殖する生物膜由来の細菌群の影響による塩素の不完全な消毒状態が想像されたため、配管洗浄を必要とするケースと考えられた。実際に、筆者らが経験した塩素濃度が 2.0 mg/L 以上で最少のレジオネラが検出された事例では、浴槽水の TBC は少なかったがろ過器排水から大量の細菌が検出されて、配管洗浄により劇的に消毒環境が改善し、レジオネラも検出されなくなった（データ省略）。

2. オゾン逆洗の調査

詳細は別の報告書に譲り、本報告では FCM 法の結果に集中して記載する。オゾン逆洗から回収した逆洗水に FCM 法を適用した（図 3）。ろ過器へのオゾン処理の開始直後は、TBC 等にはほぼ変化がなかったが、配管洗浄（ハイライト SPA-FC3, 日産化学）を実施し、かつオゾン量を 2 倍にしたところ、TBC が激減した。その後しばらく TBC の変動が認められたが、特に No.23 以降は低く抑えられていた。レジオネラ生菌は培養法でもレジオラートでも、逆洗水から継続して検出されなかった。配管洗浄かつオゾン強化の前後で TBC を比較したところ、処理前の平均値（ $\pm$ 標準偏差、試料数 N）は、446,163（ $\pm 306,659$ 、N=10）counts/mL に対して、処理後が 71,693（ $\pm 137,891$ 、N=16）counts/mL となり、この間に有意差を認めた（t 検定、 $p=0.004$ ）。このことは、ろ過器のオゾン逆洗の有効性を示すと考えられた。なお、閾値（1,000 counts/mL）は浴槽水における判定基準であり、ろ過器逆洗水の判定基準ではないので、閾値の超過はここでは問題ではない。それでも、試験 16 週以降、「清浄」判定された浴槽水が少しずつ認められる傾向にあり、オゾン逆洗によりろ過器は清浄化の方向にあると考えられた。

D. 結論

共同調査研究において、参画研究所における模擬試料を用いた FCM 法の添加回収実験

は 80~130%と良好な成績を示し、施設調査における感度と特異度を比較したところ、研究所ごとのばらつきが認められたものの、全体で感度 83.1%、特異度 79.6% (N=267) と一定の成果が認められた。

オゾン逆洗の逆洗水に FCM 法を適用した。TBC の減少、すなわちオゾン逆洗の有効性を認めた。FCM 法は、このような各種対策における有効性の検証に貢献できると考えられた。

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.

4. 作者不詳，外部精度管理調査の概要，一般財団法人食品薬品安全センターホームページ, 20220311 アクセス

http://www.fdsc.or.jp/Food%20hygiene_QC/

References

1. 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.
2. 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.
3. 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

表1. 3段階の模擬試料と市販材料を用いた添加回収試験結果

使用菌株: <i>Legionella pneumophila</i> N IIB0058					ID EXX-QC
	10 ⁵ (CFU/mL)	10 ⁴ (CFU/mL)	10 ³ (CFU/mL)	10 ² (CFU/mL)	
A研究所	99.9%	108.3%	119.6%	94.3%	
B研究所	141.1%	69.1%	82.3%		
C研究所	125.1%	90.3%	252.0%		
D研究所	156.9%	78.8%	90.7%	96.5%	
全体	130.8%	86.6%	136.1%		

CFU: colony forming unit

表2. 共同比較研究における施設調査結果の比較

	遊離塩素消毒				モノクロラミン等消毒			
	感度	特異度	有効性	試験数	感度	特異度	有効性	試験数
A研究所	96.9%	73.8%	81.7%	93				
B研究所	66.7%	81.8%	72.4%	29				
C研究所	91.7%	95.3%	94.5%	55	100.0%	100.0%	100.0%	6
D研究所	55.6%	75.3%	73.3%	90				
全体	83.1%	79.6%	80.5%	267				

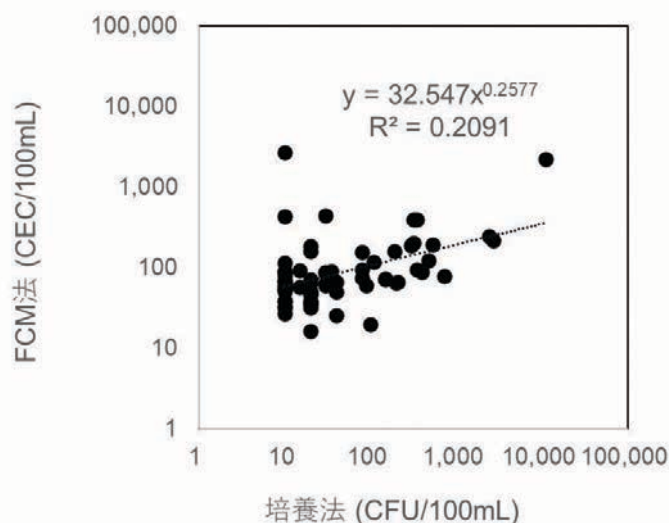


図1. FCM法と培養法のレジオネラ菌数の相関

消毒効果なし、有効数値が検出限界以上のサンプルのみ

FCM: flow cytometry, CEC: cell-equivalent counts, CFU: colony forming units

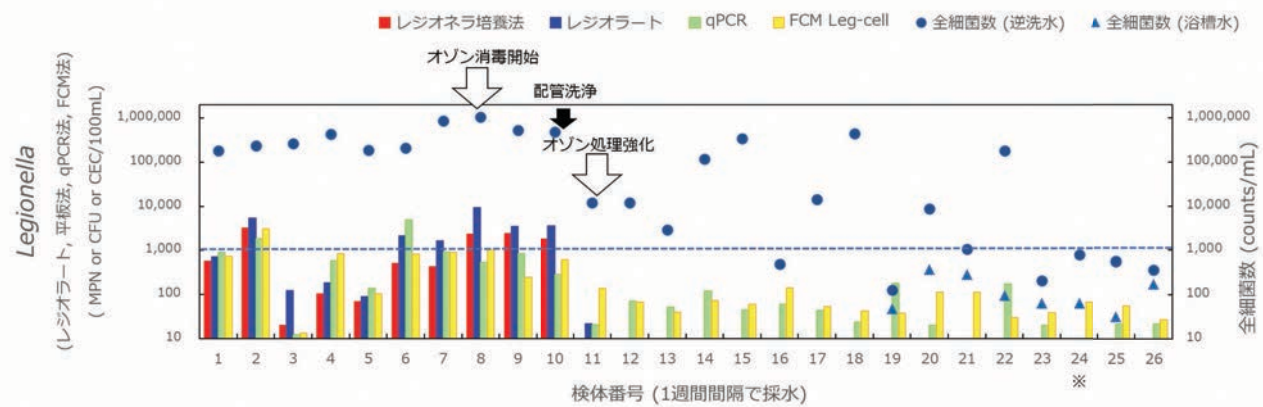


図3. オゾン消毒によるろ過器排水中のレジオネラ数の推移

破線 (1000 counts/mL) はFCM法による浴槽水の消毒効果に対する判定閾値 (逆洗水は対象外)で ▲全細菌数 (浴槽水) に適用する
 MPN: most probable number, CFU: colony forming unit, CEC: cell-equivalent counts

検査実施標準作業書

SOP No.	1-1
作成年月日	令和元年 5 月 8 日
改訂年月日	令和 3 年 12 月 10 日

作成者
田栗

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

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

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

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1 L として、φ0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験ではフィルターろ過は2回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

グルタルアルデヒド溶液

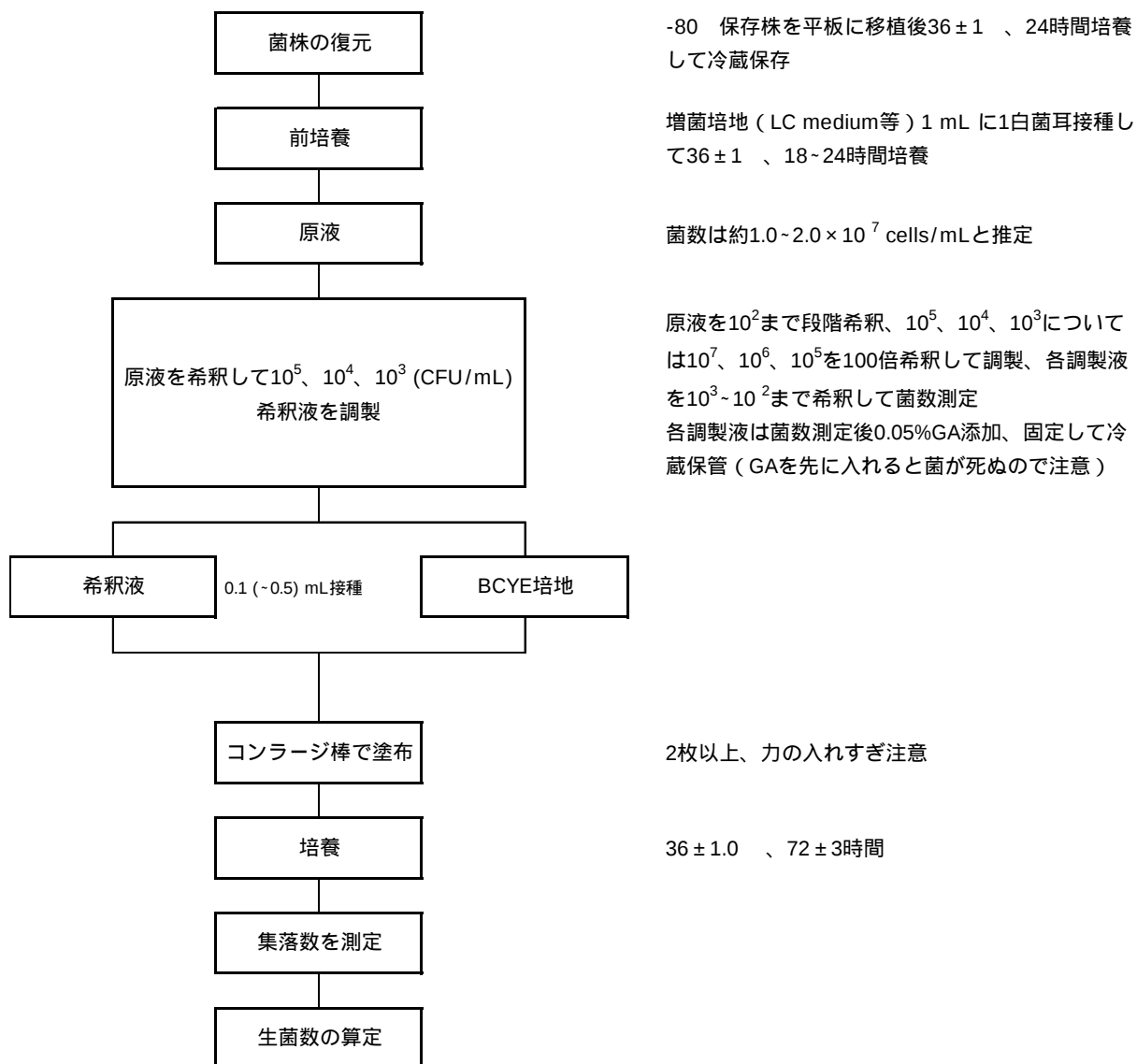
グルタルアルデヒドの 50%溶液、20%溶液、和光純薬製または同等品を用いる。市販品を適切に希釈して5%液を調製、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。最終濃度が 0.05% となるように試験液に注入する。

2) 培地

BCYE α 培地 (市販の生培地; ビオメリューなど)

使用前に常温に戻して試験に供す。ふらん器での乾燥は行わない。

6. 製品検査の方法



7. 製品検査にあたっての注意事項

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

8. 製品検査の結果の処理

1) 集落数の算定

1 平板に 30 ~ 300 個の集落数がある場合

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

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

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

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

A, B : 低希釈の集落数

C, D : 高希釈の集落数

d₁ : 希釈が低いほうの希釈倍率

d₂ : 希釈が高いほうの希釈倍率

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

全平板が 300 個を超えた集落数である場合

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

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

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

全平板が 30 個未満の場合

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

拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分を実測する

- a) 他の集落がよく分散していて、拡散集落があっても計測に支障のないもの。
- b) 拡散集落の部分が平板の 1/2 以下の場合。

2) 菌数の記載

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

検査実施標準作業書

SOP No.	1-2
作成年月日	令和 3 年 12 月 10 日
改訂年月日	令和 年 月 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：レジオネラニューモフィラ検出
2. 試験の種類：市販品を用いたレジオネラ検出用模擬試料の作製
3. 検体の採取および試料の調製：IDEXX-QC Legionella pneumophila (98-0009287-00, IDEXX) の 1 バイアルを取扱説明書どおりに調製する。即ち、バイアルを-30 の冷凍庫から取出し、室温で 15 分間静置する。バイアル内のカラーディスクを無菌的に滅菌チューブに準備した 10 mL 滅菌蒸留水に移し入れて、10～15 分間転倒混和して完全にディスクを溶解させる。調製した 10 mL 菌液の 0.1 mL を 5 枚の BCYE α 培地に接種してコンラージ棒で塗抹する。残りの菌懸濁液には 100 μ L の 5% を接種して冷蔵保存し、模擬試料として使用する。平板は 36 ± 1 、72～96 時間培養した後、1 平板に 30～300 の集落がえられたものを生菌数として計測する。

これまでの実績から、この時の原液は生菌として約 500 ± 100 CFU/mL であるが約 10 倍の菌(約 $5,000 \pm 1,000$ Cell 相当数/mL) が存在することを確認している。

4. 使用する機械器具の選択
 - 高圧蒸気滅菌器
 - 滅菌採取器具 (葉さじ、はさみ、ピンセット等)
 - 滅菌採取ピン
 - 滅菌シャーレ (直径9～10 cm、深さ2.0 cm)
 - 中試験管
 - 滅菌ピペット (1 mL、10 mL)
 - マイクロピペット (1 mL)
 - マイクロチップ (1 mL)
 - ふ卵器 ($36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$)
 - 恒温水槽
 - 電子天秤
 - メスシリンダー
 - 三角フラスコ
 - ストマッカー
 - ステリカップフィルターユニット

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

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

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1 L として、φ0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験ではフィルターろ過は2回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

グルタルアルデヒド溶液

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

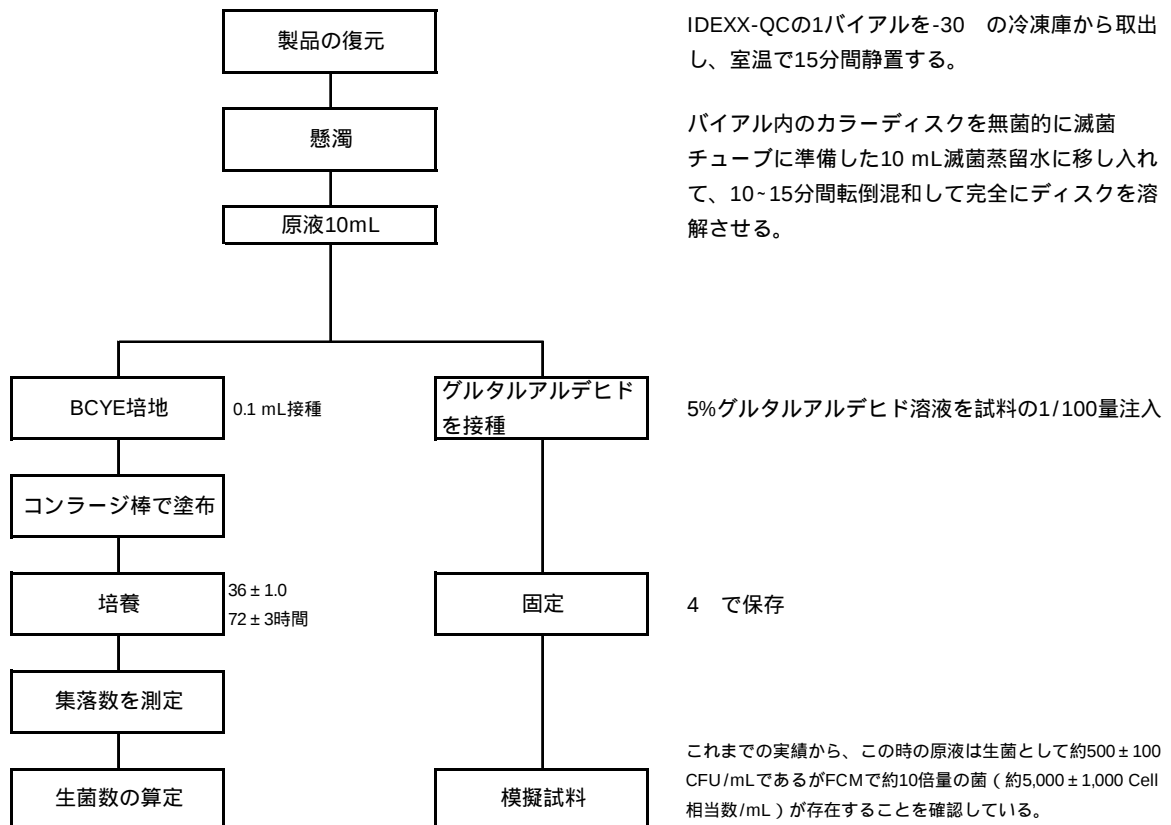
2) 培地

BCYE α 培地 (市販の生培地; ビオメリューなど)

使用前に常温に戻して試験に供す。ふらん器での乾燥は行わない。

6. 製品検査の方法

製品の名称 IDEXX-QC Legionella pneumophila (98-0009287-00, IDEXX)



7. 製品検査にあたっての注意事項

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

8. 製品検査の結果の処理

1) 集落数の算定

1 平板に 30 ~ 300 個の集落数がある場合

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

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

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

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

A, B : 低希釈の集落数

C, D : 高希釈の集落数

d₁ : 希釈が低いほうの希釈倍率

d₂ : 希釈が高いほうの希釈倍率

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

全平板が 300 個を超えた集落数である場合

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

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

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

全平板が 30 個未満の場合

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

拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分を実測する

- a) 他の集落がよく分散していて、拡散集落があっても計測に支障のないもの。
- b) 拡散集落の部分が平板の 1/2 以下の場合。

2) 菌数の記載

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

検査実施標準作業書

SOP No.	2-1
作成年月日	令和元年 5 月 8 日
改訂年月日	令和 3 年 4 月 19 日

作成者
田栗

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

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

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

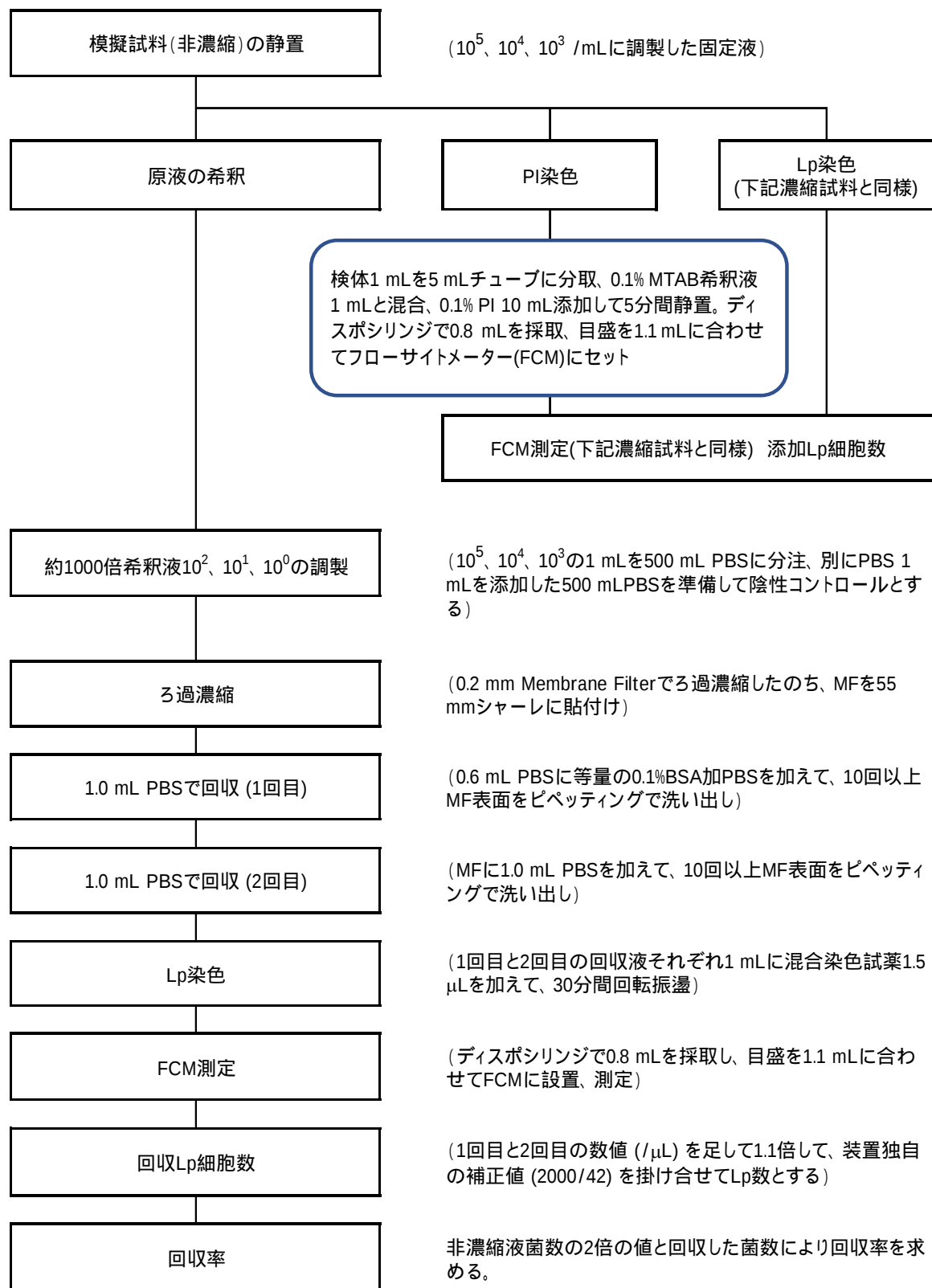
Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

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

フローサイトメトリー用染色試薬

- 0.1% propidium iodide (全菌数測定用)
- Lp 血清群 1 用染色試薬 (FL Lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (V6051, virostat 社) の 2 mg/L $\times$ 0.5 mL をキット取説に沿って標識する。
- 2 mg/L Lp 非血清群 1 染色試薬 (FL non_lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (アークリソース社) の 2 mg/L $\times$ 0.5 mL をキット取説に沿って標識する。
- FL Lp SG1 と FL non_lp SG1 を等量混合して FL Lp mix とし、40 μ L ずつ小分けして-30 $^{\circ}$ C で冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)
- 0.1% BSA 入り PBS: で作製した PBS500 mL $\sim$ 100mL に 0.1% となるように 10%BSA (ミリテニーバイオテク社) を加えて調製する。

6. 製品検査の方法



検査実施標準作業書

SOP No.	3-1
作成年月日	令和元年 11 月 28 日
改訂年月日	令和元年 月 日

作成者
田栗

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

3. 検体の採取および試料の調製：

(消毒効果判定) 試料は終濃度 500 mg/L (望ましくは 50 mg/L) となるようにチオ硫酸ナトリウムを入れた 500 mL あるいは 1 L の滅菌済み PP プラスチック容器に採水する。採水後の試料は冷蔵保存して遅くとも 1 週間以内に試験に供する。最初にフローサイトメーター (FCM) を用いて非濃縮浴槽水中の塩素消毒効果を判定する。即ち、検体 1 mL を 5 mL チューブに分取し、0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) を含む希釈液 1 mL と混合し、0.1%の蛍光色素 propidium iodide (PI) 10 μ L を加えた後、FCM にセットして全細菌数 (TBC) を測定する。予め測定ノイズを除いた特定エリアを設定し、細菌細胞から得られる側方散乱光強度 (SSC) と蛍光強度 (FL) を 2 つの指標としてエリア内の細胞を計数し、装置独自の補正値を掛け合せて細菌数とする。この時、試料中の TBC が判定基準値 1000 counts/mL を越した場合は「消毒効果なし」と判定して、続くレジオネラニューモフィラ (Lp) 特異検査で Lp が検出された場合は生菌と判断する。一方で、1000 counts/mL に満たない試料は「消毒効果有り」と判定し、Lp が検出された場合でも死菌と判定する。

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

4. 使用する機械器具の選択

- 高圧蒸気滅菌器
- 滅菌採取器具 (薬さじ、ピンセット等)
- 電子天秤
- りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2, Wako chemicals)
- ポリカーボネート製ポリ瓶 (1 L、12本、洗浄後からの状態で予め滅菌しておく)
- ステリカップフィルターユニット (1 L用)
- フローサイトメーター (miniPOC; Sysmex)
- 染色試薬 (0.1% propidium Iodide (PI)、2 mg/L LP血清群1用染色試薬 (FL Lp SG1)、2 mg/L

Lp非血清群1染色試薬 (FL non_Lp SG1))

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

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

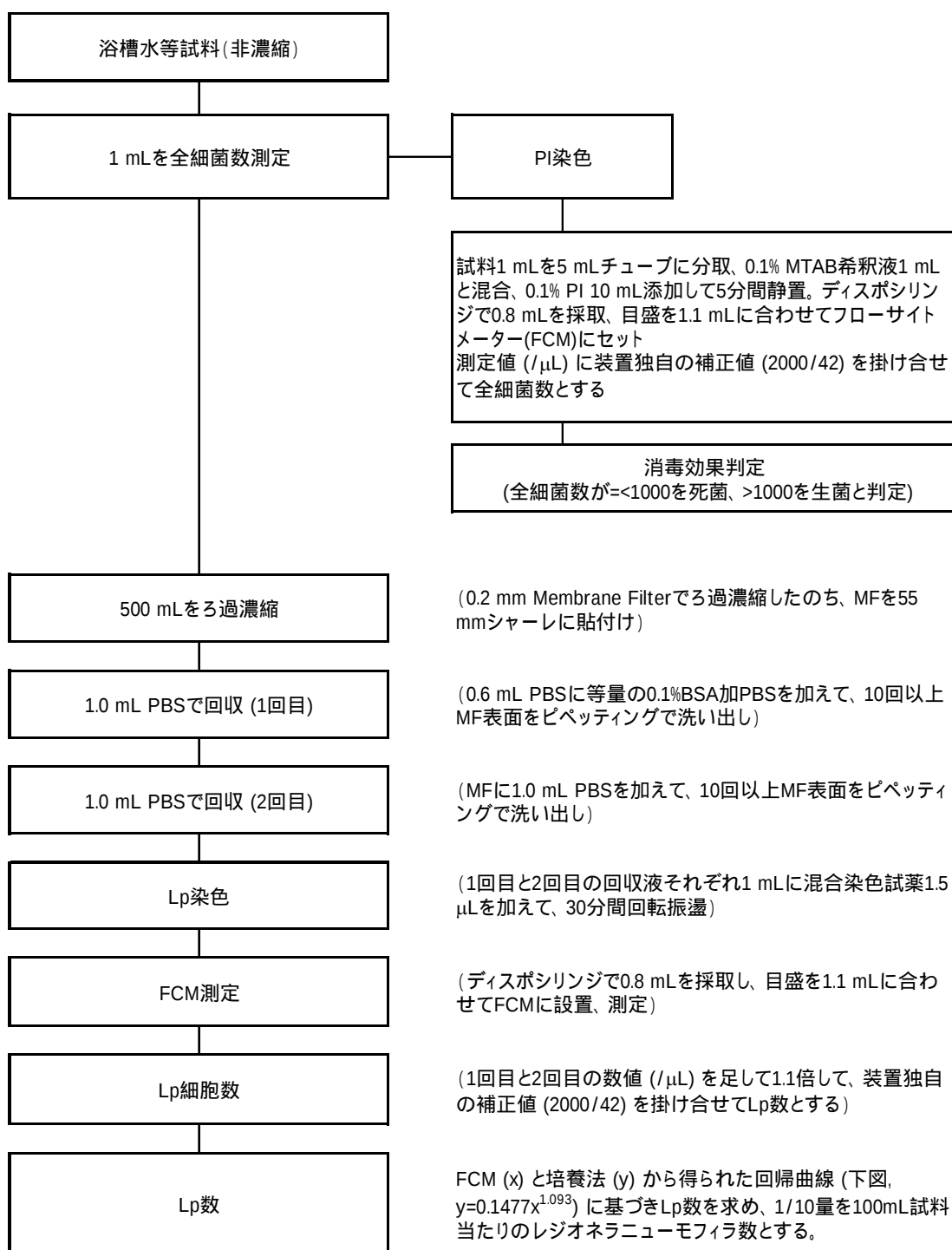
Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、φ0.2 µm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験であるのでフィルターろ過は2回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

フローサイトメトリー用染色試薬

- 0.1% propidium iodide (全菌数測定用)
- Lp 血清群 1 用染色試薬 (FL Lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (V6051, virostat 社) の 2 mg/L × 0.5 mL をキット取説に沿って標識する。
- 2 mg/L Lp 非血清群 1 染色試薬 (FL non_lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗 Lp 抗体 (アークリソース社) の 2 mg/L×0.5 mL をキット取説に沿って標識する。
- FL Lp SG1 と FL non_lp SG1 を等量混合して FL Lp mix とし、40 µL ずつ小分けして-30 °C で冷凍保管。使用時は最低 1 時間常温に放置か 24 時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)
- 0.1% BSA 入り PBS : 作製した PBS500 mL ~ 100 mL に 0.1% となるように 10%BSA (ミルテニーバイオテク社) を加えて調製する。

6. 製品検査の方法



検査実施標準作業書

SOP No.	3-2
作成年月日	令和 3 年 12 月 10 日
改訂年月日	令和 年 月 日

作成者
田栗

1. 製品検査の項目：レジオネラニューモフィラ定量

2. 試験の種類：フローサイトメトリーによる冷却塔水（実試料）の検査

3. 検体の採取および試料の調製：

（消毒効果判定）試料は終濃度 500 mg/L（望ましくは 50 mg/L）となるようにチオ硫酸ナトリウムを入れた 500 mL あるいは 1 L の滅菌済み PP プラスティック容器に採水する。採水後の試料は冷蔵保存して遅くとも 1 週間以内に試験に供する。最初にフローサイトメーター（FCM）を用いて非濃縮浴槽水中の塩素消毒効果を判定する。即ち、検体 1 mL を 5 mL チューブに分取し、0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) を含む希釈液 1 mL と混合し、0.1%の蛍光色素 propidium iodide (PI) 10 μ L を加えた後、FCM にセットして全細菌数 (TBC) を測定する。予め測定ノイズを除いた特定エリアを設定し、細菌細胞から得られる側方散乱光強度 (SSC) と蛍光強度 (FL) を 2 つの指標としてエリア内の細胞を計数し、装置独自の補正値を掛け合せて細菌数とする。この時、試料中の TBC が判定基準値 1000 counts/mL を越した場合は「消毒効果なし」と判定して、続くレジオネラニューモフィラ (Lp) 特異検査で Lp が検出された場合は生菌と判断する。一方で、1000 counts/mL に満たない試料は「消毒効果有り」と判定し、Lp が検出された場合でも死菌と判定する。

（Lp の特異的定量）施設調査における Lp 定量は、Lp SG 用染色試薬 (FL Lp mix) を用いる。検水 20 mL を 20 mL ディスポシリンジに吸引して、 ϕ 3 ~ 5 μ m Membrane Filter (MF) で粗ろ過後、ろ液を新しいビーカー等に回収する。20 mL ディスポシリンジに再度ろ液を吸引して、 ϕ 0.2 μ m $\times$ 25 mm MF 入りシリンジフィルターホルダー（スウィネクス 37: SX0002500, メルクミリポア）で吸引ろ過した後、MF を取り出して 55 mm シャーレに貼付け、0.6 mL PBS に等量の 0.1%BSA 加 PBS を加えて、10 回以上 MF 表面をピペティングで洗い出すことにより回収する。次いで、回収後のシャーレに 1 mL 0.1%BSA 加 PBS を加えて前述と同じ操作を繰り返し 2 回目の回収液とする。各回収液 1 mL に染色試薬 FL Lp mix 1.5 μ L を加えて、30 分間回転振盪させたのち、ディスポシリンジで全量を採取し、目盛を 1.1 mL に合わせて FCM に設置して測定する。この時、Lp 特異染色試薬由来の測定ノイズを除くように予め設定した特定エリア内の細菌数 (μ L: 装置に表示される) を計数し、装置由来の誤差 (2000/42) と回収時に発生する誤差 (容量比: 1.1) を補正したのち、予め作成した検量線により濃度換算して Lp 数とする。

4. 使用する機械器具の選択

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

- スTERILカップフィルターユニット (1 L用)
- フローサイトメーター (miniPOC; Sysmex)
- 染色試薬 (0.1% propidium Iodide (PI)、2 mg/L Lp血清群1用染色試薬 (FL Lp SG1)、2 mg/L Lp非血清群1染色試薬 (FL non_Lp SG1))
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) (核酸染色用緩衝液)
- 0.1% BSA入りPBS (特異抗体染色用緩衝液)
- 小形滅菌シャーレ (直径60 mm、深さ10 mm)
- 中試験管またはディスボリチューブ
- 滅菌ピペット (1 mL、10 mL)
- マイクロピペット (1 mL)
- マイクロチップ (1 mL用、10 µL用)
- マイクロチューブ (5 mL)
- オールプラスチックシリンジ (2 mL)
- ディスボシリンジ (3 µm)
- プラスティックシリンジ (20 mL)
- シリンジフィルターホルダー (25 mm)
- メンブレンフィルター (0.2 µm × 25 mm)
- ふ卵器 (36 ± 1)
- 恒温水槽
- メスシリンダー
- 三角フラスコ
- ビーカー
- ストマッカー

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

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

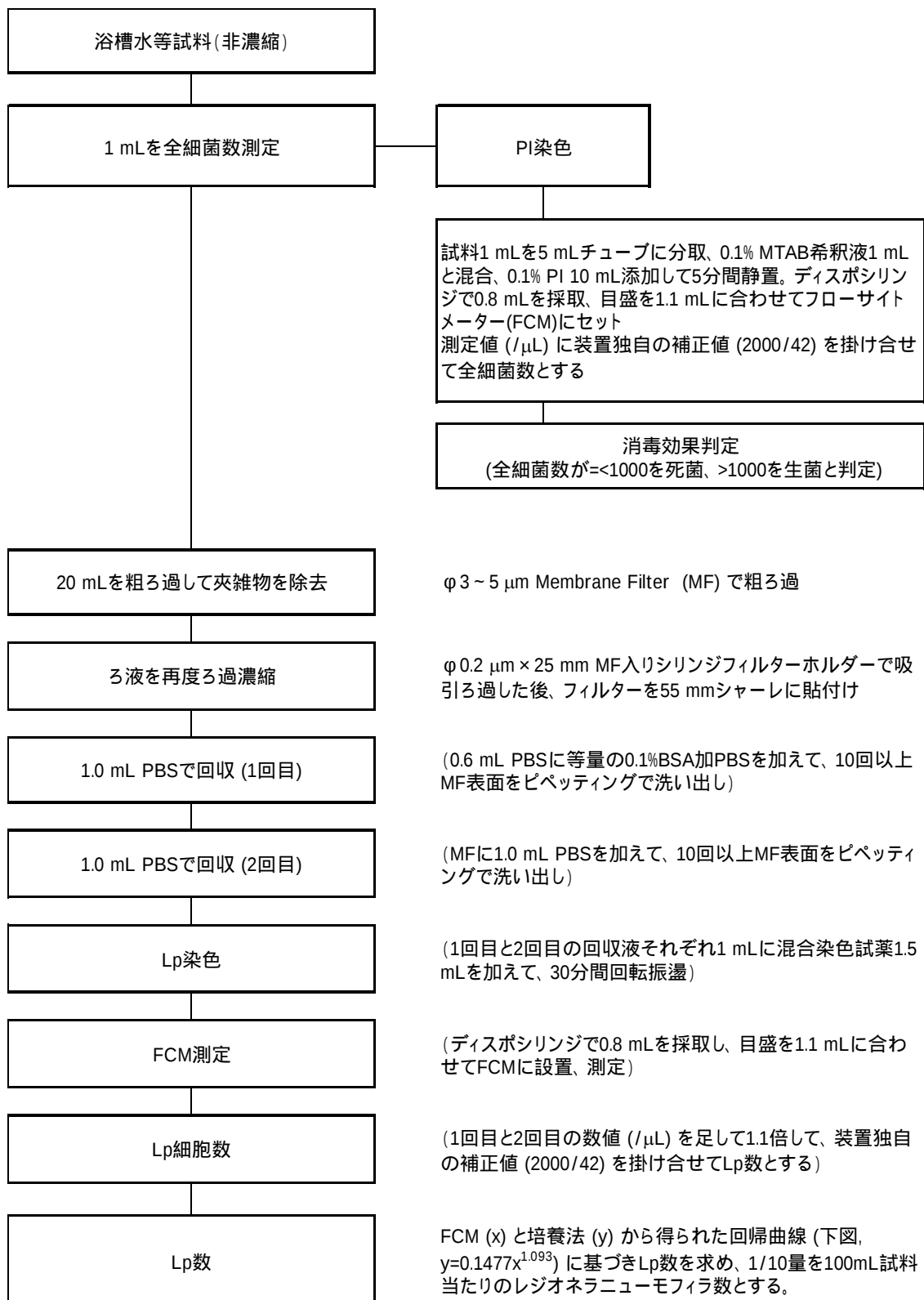
りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、φ0.2 µm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験であるのでフィルターろ過は2回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

フローサイトメトリー用染色試薬

- 0.1% propidium iodide (全菌数測定用)
- Lp血清群1用染色試薬 (FL Lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗Lp抗体 (V6051, virostat社) の2 mg/L × 0.5 mLをキット取説に沿って標識する。
- 2 mg/L Lp非血清群1染色試薬 (FL non_lp SG1) : Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を用いて抗Lp抗体 (アークリソース社) の2 mg/L × 0.5 mLをキット取説に沿って標識する。

- FL Lp SG1とFL non_lp SG1を等量混合してFL Lp mixとし、40 μ Lずつ小分けして-30 で冷凍保管。使用時は最低1時間常温に放置か24時間冷蔵庫に放置して使用する。
- 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)
- 0.1% BSA入りPBS： で作製したPBS500 mL ~ 100 mLに0.1% となるように10%BSA（ミリテニーバイオテク社）を加えて調製する。

6. 製品検査の方法



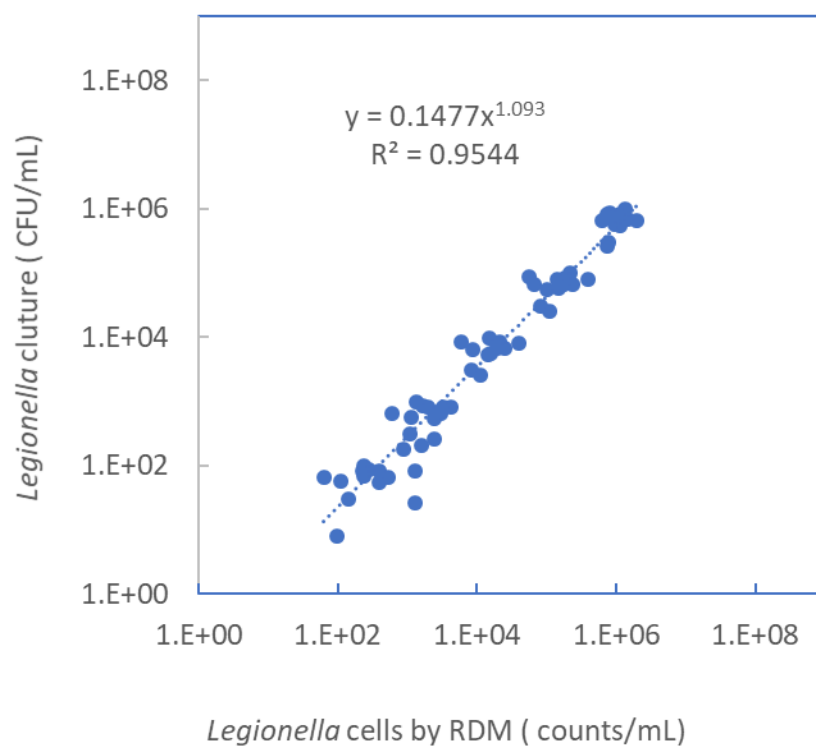


Fig. Correration between culture method and RDM (11 strains of *Legionella pneumophila*)

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日 ~ 年 月 日

[検体数：]

担当者

2021.4.19作成

田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ数

2. 製品の種類：標準菌株を用いた模擬試料作製方法

3. 培地の作製

(1) 作製月日： 月 日

☐ 滅菌リン酸緩衝水

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

99 ml (本)、9 ml (本) 作製

(2) 処理月日： 月 日

☐ BCYE α 培地【メーカー： , Lot： 】

購入日 ()

4. 生菌数の試験

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

↓

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

↓

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

↓

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

↓

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

↓

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

↓

☐ 各希釈液の分注 滅菌シャーレに0.1 mL分注 (各希釈段階で2枚以上)

↓

☐ 培養 36 ± 1 、 72 ± 3 時間

↓

☐ 集落数の測定

↓

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

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

↓

□ 生菌数の算定

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日 ~ 年 月 日

[検体数：]

担当者
2021.12.10作成 田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ検出

2. 製品の種類：市販品を用いたレジオネラ検出用模擬試料の作製

3. 培地の作製

(1) 作製月日： 月 日

☐ 滅菌リン酸緩衝水

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

99 ml (本)、9 ml (本) 作製

(2) 処理月日： 月 日

☐ BCYE α 培地【メーカー： , Lot： 】

購入日 ()

(3) 処理月日： 月 日

☐ IDEXX-QC Legionella pneumophila【メーカー： IDEXX , Lot： 】

製品分析証明書の定量値

() MPN/100 mL with Quanti-Tray*/Legiolert*

Verified by Quanti-Tray/Legiolert with n=25; Acceptable Range =(-)

4. 生菌数の試験

☐ 菌株の復元 IDEXX-QCの1バイアルを-30 の冷凍庫から取出し、室温で15分間静置

↓

☐ 懸濁 バイアル内のカラーディスクを無菌的に滅菌チューブに準備した10 mL滅菌蒸留水に移し入れて、10～15分間転倒混和して完全にディスクを溶解させる。

↓

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

（注意）これまでの実績から、この時の原液は生菌として約 500 ± 100 CFU/mLであるが約10倍の菌（約 $5,000 \pm 1,000$ Cell相当数/mL）が存在することを確認している。

☐ フローサイトメトリー Lp特異染色により菌数を計算（SOP 2-1 参照）

↓

以下はあくまで参考で必須でなくてよい

☐ 生菌数測定 原液100 μ L をBCYE培地5枚に接種（500 CFU/mL相当）

↓

☐ 培養 BCYE培地を 36 ± 1 、 72 ± 3 時間

↓

☐ 生菌数の算定

検体番号	フローサイトメトリー測定値 (μL)				
	1	2	3	4	5
原液					

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日 ~ 年 月 日

[検体数：]

担当者
2021.04.19改版
田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ（Lp）定量

2. 製品の種類：フローサイトメトリーによる模擬試料の添加回収実験

3. 器具・試薬の作製

(1) 処理月日： 月 日

☐ 滅菌ろ過器 （115 , 15分間高压滅菌処理）（ ）mL （ ）本）作製
0.2 μm Membrane Filter 【メーカー： , Lot： 】

☐ 滅菌PPポリ容器 （121 , 15分間高压滅菌処理）
（ ）mL （ ）本）作製

(2) 作製月日： 月 日

☐ 滅菌リン酸緩衝水
（PBS(pH7.2)1包/ L、NaCl 8.5g / L、0.2 μm steri-cup filter unit る過（ ）回）
（ ）mL （ ）本）作製

(3) フローサイトメーター関連試薬

- ☐ 0.1% propidium Iodide (PI) 【試薬作製日（ 年 月 日）、保管状態（冷蔵、冷凍）】
- ☐ LpSG1用染色試薬【試薬作製日（ 年 月 日）、保管状態（冷蔵、冷凍）】
- ☐ Lp non-SG1用染色試薬【試薬作製日（ 年 月 日）、保管状態（冷蔵、冷凍）】
- ☐ Lp mix用染色試薬【試薬作製日（ 年 月 日）、保管状態（冷蔵、冷凍）】
- ☐ 0.1% MTAB【試薬作製日（ 年 月 日）、保管状態（冷蔵、冷凍）】
- ☐ 0.1% BSA入りPBS【試薬作製日（ 年 月 日）、保管状態（冷蔵、冷凍）】

4. フローサイトメトリー

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

↓

☐ 非濃縮液の細菌数計測

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

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

↓

☐ 非濃縮液のLp数計測

検体1 mLを5 mLチューブに分取、等量の0.1%BSAと混合、3 μL FL Lp mix添加
常温で30分間、回転振とう

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

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

↓

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

↓

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

↓

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

↓

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

↓

□上記1回目および2回目回収試料1 mLに1.5 μ L FL Lp mix添加

常温で30分間、回転振とう

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

FCMからMethod Leg areaを呼び込み測定スイッチオン

↓

□装置に表示される数値 (/ μ L) を1.2倍して、装置独自の補正值 (2000/42) を掛け合せてLp数とする

注) 洗い出しがうまくいっていれば上記2回目が1回目の1/5 ~ 1/10量程度となる。

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

検査シート

機関名：長崎県環境保健研究センター

検査場所：細菌 実験室

試験日： 年 月 日 ~ 年 月 日

[検体数：]

担当者

2021.4.19版

田栗

1. 試験項目：レジオネラニューモフィラ (Lp) 定量

2. 製品の種類：フローサイトメトリーによる実試料の検査

3. 器具・試薬の作製

(1) 処理月日： 月 日

☐ 滅菌ろ過器 (115 , 15分間高压滅菌処理) () mL (本) 作製

0.2 μ m Membrane Filter (MF) 【メーカー： , Lot： 】

☐ 滅菌PPポリ容器 (121 , 15分間高压滅菌処理)

() mL (本) 作製

(2) 作製月日： 月 日

☐ 滅菌リン酸緩衝水

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

() mL (本) 作製

(3) フローサイトメーター (FCM) 関連試薬

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

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

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

☐ Lp mix染色試薬【試薬作製日 (年 月 日)、保管状態 (冷蔵、冷凍)】

☐ 0.1% MTAB【試薬作製日 (年 月 日)、保管状態 (冷蔵、冷凍)】

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

4. フローサイトメトリー

☐ 非濃縮液の細菌数計測

検体1 mLを5 mLチューブに分取、0.1% MTAB希釈液1 mLと混合、0.1% PI 10 μ L添加して5分間静置。ディスポシリンジで約0.8 mLを分取、シリンジ目盛を1.1 mLに合わせてFCM にセット
FCMからMethod Leg areaを呼び込み測定スイッチオン (連続して2回以上測定する)

↓

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

↓

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

↓

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

↓

□上記1回目および2回目測定試料1 mLに1.5 μL FL Lp mix添加

常温で30分間、回転振とう

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

FCMからMethod Leg areaを呼び込み測定スイッチオン

↓

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

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

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3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
研究分担者	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
研究分担者	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
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	花田祐一	アイデックスラボラトリーズ株式会社

研究要旨

本研究では、レジオラート/QT法の有用性を確認するため、検査室間における検査精度の比較検討を実施するとともに、実検体を使用した平板培養法及び遺伝子検査法と比較検討した。3施設において検査室間における検査精度の比較検討を実施したところ、各施設でlotの許容範囲内の値を得ることができ、レジオラート/QT法の試験法の安定性が確認できた。実検体におけるレジオラート/QT法と平板培養法の結果一致率は85.5%と高い一致率を示し、検出菌量は強い相関が認められた。また、レジオラート/QT法の培養3日目以前にウェルの変色を確認される検体は偽陽性であることが示唆された。不一致であった42検体中31検体で検出菌量が30 MPN 又は CFU/100mL 未満であった。このうち6検体が遺伝子検査法陰性であり、レジオラート/QT法及び平板培養法いずれの方法においても不一致が生じた。

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 *Legionella 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、レジオラート/QT法の有用性を確認するため、検査室間における検査精度の比較検討を実施するとともに、引続き実検体を使用した平板培養法及び遺伝子検査法と比較検討した。

B. 研究方法

1. 検査室間の比較

3 施設においてそれぞれ同一ロットの IDEXX-QC LEGIONELLA PNEUMOPHILA を用いてレジオラート/QT 法及び平板培養法を実施し、得られた検出菌数を製品情報と比較するとともに検査室間の検出菌数を比較した。

同一ロットの IDEXX-QC LEGIONELLA PNEUMOPHILA 3 本を滅菌水 40 mL に溶解させ、対象検体とした。検体を 10 mL 及び 2 mL 分取し滅菌水で 100 mL にメスアップしたものをそれぞれ 2 つ調製し、レジオラート/QT 法に従って 7 日間培養した後、菌数を測定した。また、検体を BCYE α 寒天培地 5 枚に 200 μ L ずつ塗布し 7 日間培養し、菌数を測定し平均値を算出した。さらに、検体 15 mL に滅菌水 485 mL を加え 500 mL とし、全量をろ過濃縮法にて濃縮した後、5 mL の滅菌水で溶解した。BCYE α 寒天培地 5 枚に 200 μ L ずつ塗布し 7 日間培養し、菌数を測定し平均値を算出した。使用した lot について製品情報から菌量及び Acceptable Range を使用した濃度に換算して算出し、結果を比較した。

2. 実検体を使用したレジオラート/QT 法と平板培養法の比較検討

5 カ所の各地方衛生研究所に搬入された公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 290 検体を対象とした。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、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。また、培地の観察を頻回に実施し、ウェルの液体培地の変色を確認した培養経過日数を測定した。

陽性となったウェルの液体培地を GVPC α 寒天培地等レジオネラ属菌選択分離培地に塗抹し、レジオネラ属菌の分離を行い、システイン要求性又は免疫血清により検出菌の同定を行った。

同時に平板培養法にてレジオネラ属菌の分離を、遺伝子検出法にてレジオネラ属菌の検出を実施した。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）」に準じた各検査施設の方法で実施し、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、10 CFU/100mL 以上を陽性とした。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。遺伝子検出法は LAMP 法又はリアルタイム PCR 法によりレジオネラ属菌の遺伝子検出を行った。

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。

C. 結果

1. 検査室間の比較

3 施設で実施した結果 3 施設ともに使用 lot の Acceptable Range の範囲内となった(表 1)。特に 2 mL で実施したレジオラート/QT 法については 23140-34450 MPN/100mL の範囲となった。同時に実施した平板培養法では非濃縮で 23800-36800 CFU/100mL であり、濃縮法では 2333-5470 CFU/100mL であった。

2. 実検体を使用したレジオラート/QT 法と平板培養法の比較検討

5 施設で計 290 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 65 検体、両方法で陰性となったものは 183 検体であった(表 2)。平板培養法と比較したレジオラート/QT 法の感度は 70.7%、特異度は 92.4% であり、結果一致率は 85.5% であった。

レジオラート/QT 法で陽性であった 80 検体におけるウェルの変色を確認した培養経過日数を確認したところ、培養 3 日目から 20 検体で変色を確認され、培養 5 日目で 70 検体の変色を確認された(図 1)。2 日目で変色が見られた 2 検体のレジオラート培養液からはレジオネラ属菌が検出されず、平板培養法不検出かつ LAMP 法陰性の検体であった。

レジオラート/QT 法及び平板培養法ともに陽性であった検体の検出菌量について相関を検討したところ、回帰直線の R^2 は 0.748 となり、強い相関が認められた(図 2)。

レジオラート/QT 法と平板培養法が不一致であった検体の検出菌量は 42 検体中 31 検体で 10-29 CFU 若しくは MPN/100mL であった(図 3)。レジオラート/QT 法のみ陽

性であった 15 検体中 4 検体でレジオラート培養液からレジオネラ属菌が検出された。検出菌量が 10-29 CFU 若しくは MPN/100mL であった 31 検体のうち、遺伝子検査法を実施した 22 検体中 6 検体で遺伝子検査が陰性であった。

D. 考察

同一 lot 試薬を用いて検査室間での検出状況の比較を行ったところ、各施設で lot の許容範囲内の値を得ることができ、レジオラート/QT 法の試験法の安定性が確認できた。同時に実施した平板培養法での検出菌量はレジオラート/QT 法の検出菌量と比較し高い値となった。この原因として、レジオラート/QT 法の液体培養液には抗生物質が含まれているため、培養が抑制されたことが考えられる。濃縮工程を実施した結果、非濃縮の検体と比較し 85.1% から 90.7% 減少し、検査室間のばらつきが大きくなった。この原因として、菌体がろ過工程により喪失または損傷を受けたことが考えられる。本検討は 3 施設のための検討であり実施数が不十分ではあるが、レジオラート/QT 法は平板培養法と比較し操作工程が少ないことから操作者の手技による結果の差が出にくく、検査精度の担保がしやすい検査であると考えられる。

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、平板培養法の結果一致率は 85.5% と過去の検討と同等程度の高い一致率を示した。特異度は 92.4% と過去の検討と同等の高い値であり、感度は過去の検討と比較するとばらつきが確認された。本検討は実検体を用いた検討であること、実施施設が異なることが影響したもの

と考えられる。レジオラート/QT 法におけるウェルの変色が認められる培養経過日数は培養 2 日目から確認され、培養 5 日目までで 90% の検体で変色が認められた。このうち培養 2 日目で変色が認められた 2 検体は平板培養法で不検出であり、また、遺伝子検査法である LAMP 法においても陰性であったことから偽陽性であると考えられた。本検討ではレジオラート/QT 法ではレジオネラ陽性の検体は培養 3 日目以降にウェルの変色が確認された。従って、培養 3 日目以前にウェルの変色が確認される検体は偽陽性であることが示唆され、レジオラート/QT 法における一部の偽陽性検体を除外することが可能になると考えられる。

本検討においてはレジオラート/QT 法及び平板培養法の検出菌量に強い相関が確認された。過去の検討においても一定程度の相関は確認されており同様の結果となった。一方で検出菌量が 30 MPN 又は CFU/100mL 未満の菌数の検体においてはレジオラート/QT 法及び平板培養法の不一致が確認された。検出菌量が 30 CFU/100mL 未満の不一致検体 31 検体中 6 検体が遺伝子検査法陰性であり、菌量の少ない検体におけるレジオネラ属菌の検出はレジオラート/QT 法及び平板培養法いずれの方法においても不一致が生じた。レジオネラ属菌の分離培養には通常 3-6 日必要であること、夾雑菌に影響されレジオネラ属菌の発育が阻害され分離が困難となることが多いため不一致になったと示唆される。より高い精度が求められる場合には複数の検査法を組み合わせる必要があることが示唆された。

本検討において実検体におけるレジオラート/QT 法の有用性が確認でき、検出菌数

も平板培養法に強い相関があることが示された。また、偽陽性である一部検体についてはウェルが変色するまでに日数を記録することで除外できると考えられた。一部検体で偽陽性を示すことが判明していることから、偽陽性を示す検体の性質の把握や偽陽性を低減させる手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

淀谷雄亮、佐々木麻里、増輪文治、井原基、田栗利紹、緒方喜久代、武藤千恵子、田中奈緒美、湯澤栄子、小嶋由香、前川純子、岡部信彦：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。日本防菌防黴学会第 48 回年次大会。2021 年 9 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 検査室間での検出状況の比較

実施機関	レジオラート/QT法 (10 ml) MPN/100mL	レジオラート/QT法 (2ml) MPN/100mL	平板培養法 (非濃縮) CFU/100mL	平板培養法 (濃縮) CFU/100mL
A	22726	27615	36800	5470
	>22726	30405		
B	22726	23140	23800	3067
	19226	24580		
C	>22726	27745	25200	2333
	>22726	34450		

使用 lot の換算値は 15900 MPN/100mL であり、Acceptable Range は 1590-40312 MPN/100mL であった。

表 2 実検体におけるレジオラート/QT 法と平板培養法の比較

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート/QT法	陽性	65	15	80
	陰性	27	183	210
	計	92	198	290

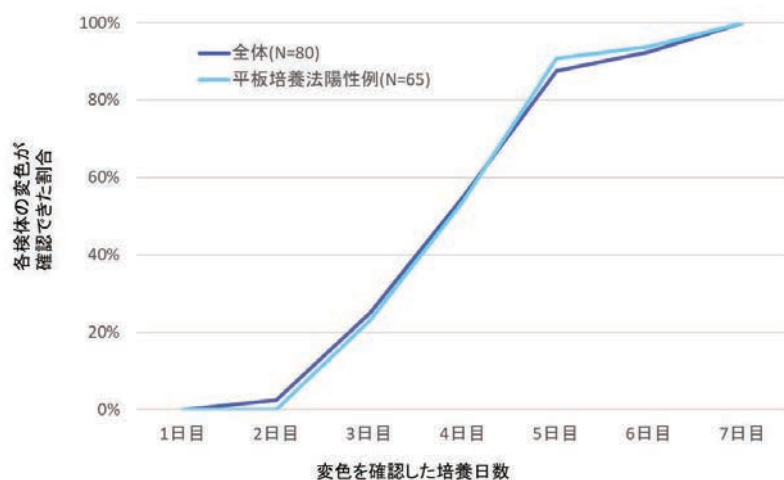


図 1 レジオラート/QT 法における変色を確認した培養経過日数

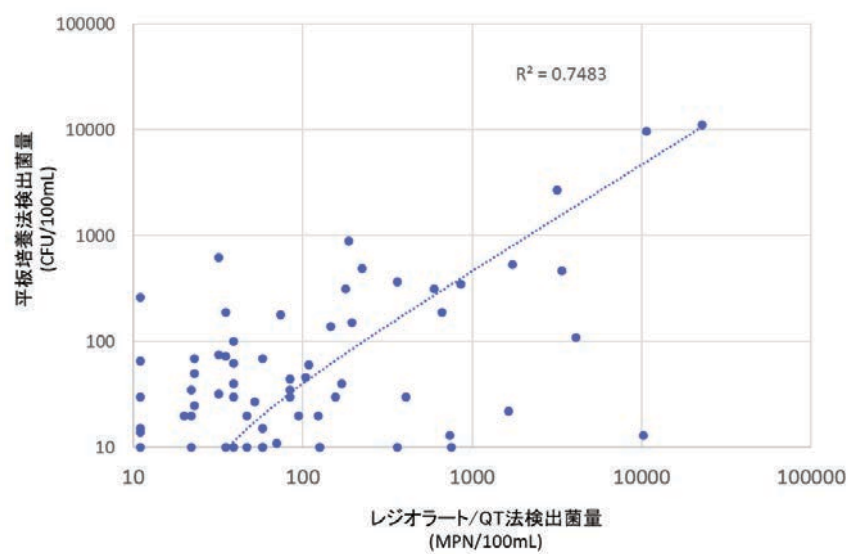


図2 平板培養法とレジオラート/QT法の検出菌量の比較(n=65)

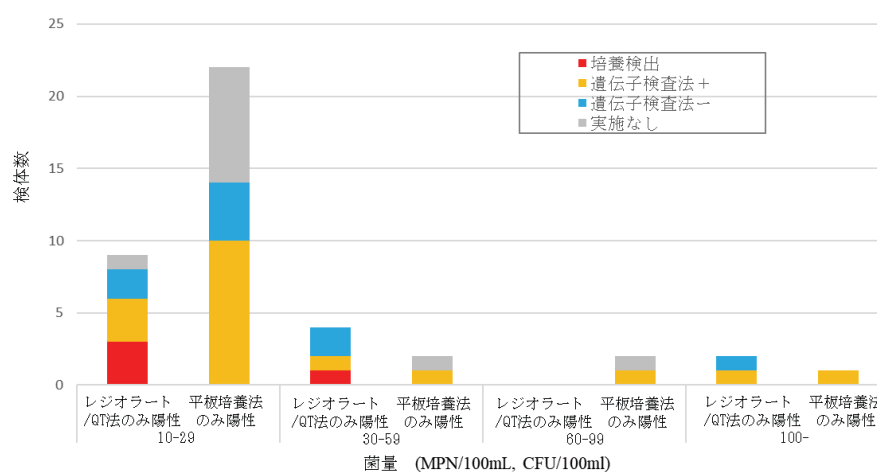


図3 不一致であった検体の検出菌量と遺伝子検査との関連

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3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相関が見られた。また、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、加熱処理した検体をQT法より低い温度で培養することにより、可能となった。

A. 研究目的

公衆浴場において問題となるレジオネラ属菌への対応として、厚生労働省の指針¹⁾により定期的に水質検査を行うこととされており、そのレジオネラ属菌検査方法の平準化を目的として検査法²⁾（ここでは、標準法と称する。）が通知された。この標準法について、多様な泉質を有する大分県の実検体を用いて評価した。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3年6月から11月に搬入された浴槽水および湯口水30施設分58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0.2μm、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±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WYOα寒天培地（栄研化学）、GVPC寒天培地（日研生物）およびMWY寒天培地（関東化学又は自家製；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 58 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、茶色化または濁りの一方か両方が生じたら陽性とし、陽性ウエル数の組み合わせから、 L_p 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

非濃縮の 58 検体について、50 $^{\circ}$ C 水浴中 20 分間加熱して試料 (加熱) とした。なお、58 検体中 19 検体については、その一部を加熱しないまま試料 (未加熱) として比較検討した。各試料 10mL を、ベントフィルター付きのフラスコ (CELLSTAR フラスコ Advanced TC、青 FT キャップ 250mL 滅菌: Greiner Bio-One) に入れたレジオラート液 (レジオラート 1 包 (100mL 用) を 80mL の滅菌蒸留水に溶かした溶液) 40mL に加え、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養し、茶色化または濁りの一方か両方が見られたものを陽性とした。陽性のフラスコ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。

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

58 検体中、大分法では 18 検体、標準法では 16 検体からレジオネラ属菌が検出された (表 2)。標準法 16 検体のうち 1 検体は、濃縮試料ではレジオネラ属菌が検出されず、非濃縮検体のみで検出された。レジオネラ属菌数 (以下「菌数」という、単位は CFU/100mL) は、大分法と標準法でそれぞれ 5～2000、10～1500 (濃縮試料のみでは 10～890) であった。大分法でのみ検出された 2 検体の菌数はともに 5 で、 L_p が検出された。標準法でのみ検出された検体はなかった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.9184$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8185$ であった (図 1)。

2. レジオラート/QT 法

58 検体中 14 検体から 11～361MPN/100mL

の、1 検体から測定上限値 22726MPN/100mL を超える *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(菌数は、10 以上検出された検体に限ると 4 検体で、10、15、50 及び 100 各 1 検体)、標準法で 5 検体(菌数は 10 が 3 検体、20 と 40 が各 1 検体)、平板培養法(−) QT 法(+)の結果となった検体は、大分法と標準法のどちらも同じ検体で 4 検体(MPN/100mL は 11,23,58,>22726)であった(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 81.0%、標準法で 84.5%、菌数の相関は、QT 法で測定上限を超えた 1 検体を除くと、大分法で $R^2=0.6443$ 、標準法で $R^2=0.6717$ (濃縮試料のみで $R^2=0.5891$)であった(図 2)。15 検体中 10 検体の培養液からは *Lp* が分離されたが、平板培養法(−) QT 法(+)の 4 検体と 39MPN/100mL の 1 検体からはレジオネラ属菌は分離されなかった。測定上限を超えた 1 検体については、GVPC 寒天培地上に発育した菌は無かった。

3. レジオラート定性試験法

未加熱の非濃縮検体 19 検体中 7 検体が陽性と判定された。その 7 検体中 1 検体の培養液からは *Lp* が分離されたが、6 検体の培養液からはレジオネラ属菌は分離されず、それ以外の菌のみが GVPC 寒天培地上に発育した。一方、同 19 検体を加熱したものについては、8 検体が陽性と判定され、そのうち 7 検体の培養液から *Lp* が分離された。

以上の成績から加熱処理が有効と判断し、2.1 の 58 検体全て(上記 19 検体含む)について、加熱処理後にレジオネラ定性試験法(以下、定性法)を試み、13 検体が陽性と判定された。陽性検体中 2 検体の培養液からレジオネラ属菌は分離されなかったが、11 検体の培養液から *Lp* が分離された。

平板培養法との関係を表 4a、4b 及び図 3a、3b にまとめた。平板培養法(+)定性法(−)の結果となったのは、大分法で 6 検体(菌数は、10 以上検出された検体に限ると 3 検体で、15 及び 50 が 2 検体)、標準法で 4 検体(菌数は 3 検体が 10、1 検体が 20)、平板培養法(−)定性法(+)の結果となった検

体は、大分法と標準法のどちらも同じ検体で 1 検体(培養液からレジオネラ属菌は分離されず)であった。この 1 検体は QT 法でも陽性(23MPN/100mL)であったが、定性法でも培養液からレジオネラ属菌は分離されなかった。

D. 考察

平板培養法について、過去 2 年間^{4,5)}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。大分法のみでレジオネラ属菌が検出された検体は、標準法の検出下限値未満(菌数 5)の検体であった。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、標準法は指針に基づく定期的な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。さらに、非濃縮検体のみ(+)となった検体から分離されたレジオネラ属菌は、平板上に 1 コロニー(500CFU/100mL に相当)であったことから、検出率を上げるためには、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 58 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、過去 2 年間 3、4)の結果ほどではないが相関が見られた。一方で、平板培養法(−)でも QT 法(+)と判定された 4 検体は、QT 法培養液からも *Lp* が分離されず、検水濃縮試料の遺伝子検査法(LAMP 法)も(−)であった(データ非掲載)ことから、偽陽性と考えられた。これはレジオネラ属菌以外の夾雑菌によるものと考えられる。QT 法培養液を塗抹した GVPC 寒天培地に菌が発育しなかった検体についても、同一施設の別検体では発色しなかったので、温泉成分等水質による影響ではないと推察される。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、*Lp* 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。また、メー

カーからは新たに夾雑菌低減用に前処理剤の販売が開始されており、その有効性を期待したい。

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的な試験法について検討した。昨年度⁵⁾の検討において、QT法と同じ39℃培養では*Lp*の発育が抑制されたため36℃培養としたところ、夾雑菌の発育が抑制できず、陽性培養液の多くからレジオネラ属菌が分離されなかった。平板培養法の前処理の1つである熱処理(50℃で20分間加熱)を実施した検水を使用したところ、陽性培養液の多くからレジオネラ属菌が純培養状に分離された。培養温度を下げて、夾雑菌を抑制するための前処理を加えることで*Lp*を検出することが可能となった。定性法を平板培養法と比較すると、大分法の菌数で10～50、標準法の菌数で10～20の検体で結果にバラツキが生じた。標準法で菌数30以上の検体では定性法は全て陽性となった。QT法と同様、偽陽性と考えられる検体もあった。平板培養法でも発育した夾雑菌が多かったため、熱処理で十分に抑制できなかったと考えられる。定性法は、平板培養法と比べて検出可能下限の菌数が若干劣るものの、検出/不検出の一致率は大分法で87.9%(10以上検出された検体に限ると93.1%)、標準法で91.4%と高く、簡便な検査法の1つとして使用できると考える。

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：27-32
- 5) 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、レジオラートを用いた定性試験法の検討. 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2年度総括・分担研究報告書：52-57

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 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200μL	5cfu/100mL
		未処理	1倍、10倍、100倍	各200μL	
標準法	濃縮試料	熱処理	1倍	100μL	10cfu/100mL
		酸処理	1倍	200μL	
	非濃縮検体		1倍	200μL*	500cfu/100mL

*通知に記載されている塗抹量は「100μL」

表 2. 標準法と大分法の比較 (n=58)

		標準法		計
		≥10cfu/100mL		
		+	—	
大分法	+	16	2	18
≥5cfu/100mL	—	0	40	40
計		16	42	58

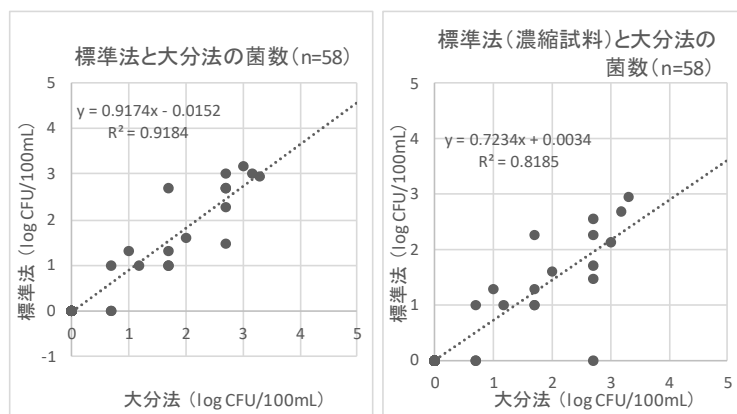


図1. 標準法と大分法の相関

表 3a. レジオラート/QT 法と大分法の比較 (n=58)

		レジオラート		計
		≥10cfu/100mL		
		+	−	
大分法	+	11	7	18
≥5cfu/100mL	−	4	36	40
計		15	43	58

表 3b. レジオラート/QT と標準法の比較 (n=58)

		レジオラート		計
		≧10cfu/100mL		
		+	－	
標準法	+	11	5	16
≧10cfu/100mL	－	4	38	42
計		15	43	58

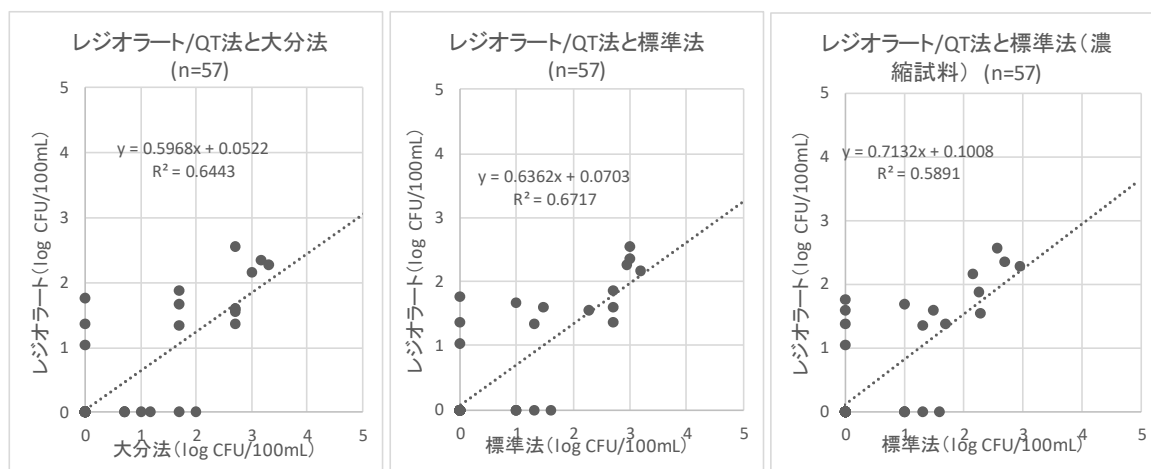


図2. レジオラート/QT法と平板培養法との相関

表 4a. レジオラート定性試験法（加熱）と大分法の比較（n=58）

		定性試験法		計
		$\geq 10\text{cfu}/100\text{mL}$		
		+	－	
大分法	+	12	6	18
$\geq 5\text{cfu}/100\text{mL}$	－	1	39	40
計		13	45	58

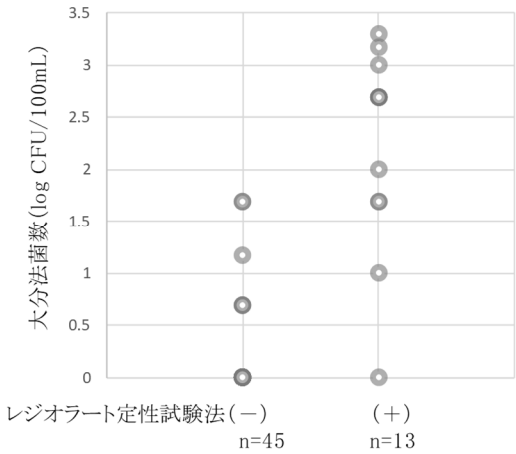


図3a. レジオラート定性試験法（加熱）と大分法菌数

表 4b. レジオラート定性試験法（加熱）と標準法の比較（n=58）

		定性試験法		計
		≥ 10cfu/100mL		
		+	－	
標準法	+	12	4	16
≥ 10cfu/100mL	－	1	41	42
計		13	45	58

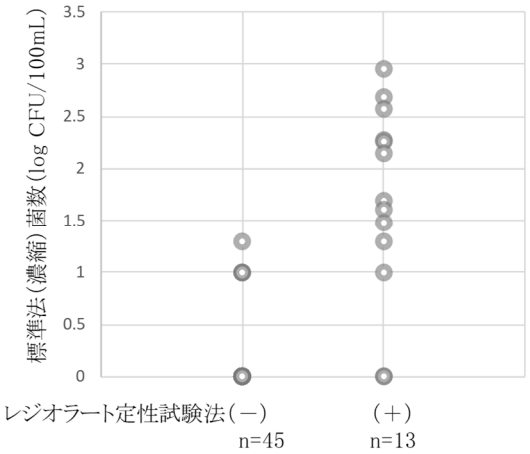


図3b. レジオラート定性試験法（加熱）と標準法（濃縮試料）菌数

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	佐々木 麻里	大分県衛生環境研究センター
淀谷 雄亮	川崎市健康安全研究所	中西 典子	神戸市健康科学研究所

研究協力者

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
磯部 順子	富山県衛生研究所	枝川 亜希子	地方独立行政法人
森本 洋	北海道立衛生研究所		大阪健康安全基盤研究所
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
小澤 賢介	デンカ株式会社	稲窪 大治	日本板硝子株式会社

研究要旨

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

モバイル型 qPCR 装置（Picogene PCR1100、日本板硝子）を使用した迅速検査法では、これまでのプロトコルを改良した結果、平板培養法に対する感度は LAMP 法と同等（75%、3/4 検体）となった。

平板培養法に加えて、レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1（Lp1）で感作した免疫磁気ビーズ（Lp1-IMB）法を併用することによって、Lp1 の検出率が 7.8%（18/230 検体）から 11.3%（26/230 検体）となったため、感染源調査など Lp1 の検出が求められる際には有用な方法であると考えられた。

8 か所の地方衛生研究所において、2016～2020 年に浴槽水から分離されたレジオネラ属菌の検出状況を調査した結果、レジオネラ属菌の陽性率は 11.5～75.0%と機関によって差が認められた。同様に、Lp1 陽性率は 0～12.6%、Lp1 の病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子陽性率は 0.3～4.4%と、これらの値も機関によって差が認められた。加えて、分離された Lp1 菌株に占める *lag-1* 遺伝子の陽性率（*lag-1*/Lp1）も、最も低い機関は 7.7%であったのに対し、最も高い機関は 50.0%であった。

16S アンプリコン解析の結果、各検体に占める菌種別リード割合の平均値は、浴槽水検体では *Pseudomonas*（14.5%）、シャワー水検体では *Phreatobacter*（15.1%）が最も高かった。レジオネラ属菌のリードの割合は、浴槽水検体では 0.8%、シャワー水検体では 0.1%であった。シャワー水については、菌叢の多様性が高い検体の多くから平板培養法でレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい豊富な栄養条件でレジオネラ属菌も増殖した可能性が考えられた。

A 研究目的

2021 年の国内におけるレジオネラ症患者報告数は、2,112 件（暫定値）であり、前年比 103%であった^{1,2)}。レジオネラ症対策として、感染源のおよそ 4 割を占める入浴施設の衛生管理の向上は重要である。したがって、入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握し、新たな検査法を確立・普及することを目的とし、1. 迅速な検査法の開発、2. 感染源特定のための検査法の確立、3. 公衆浴場における水系の総合的な汚染実態の解明を行う。

現在、浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに 7～10 日を要する。このような培養法に替わる迅速検査法に対して、監視指導のためにリアルタイムに結果を提供すること、営業再開の時期を早めることなどの理由により、行政・業者双方からの要望があり、必要性は高い。近年、モバイル型 qPCR 装置が市販されており、採水現場で遺伝子検査が実施できる状況となっている。したがって本研究では、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、平板培養法や他の迅速検査である LAMP 法と相関が取れるよう、これまで構築してきたプロトコルを改良し、比較検討した。

国内における患者由来株の 87%は *Legionella pneumophila* 血清群 1 (Lp1) であるため³⁾、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ことが求められる。したがって、これまで検討してきた Lp1 で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) を用いた選択的濃縮法について、複数の機関で実施し、その有用性を評価した。また、Lp1 の中でもリポ多糖修飾のための O-アセチルトランスフェラーゼをコードしている *lag-1* 遺伝子は、患者由来株の 75%から検出され、病原性との関連も示唆されているため^{4,5)}。そこで、本年

度は浴槽水由来株の *lag-1* 遺伝子保有率を調査した。

公衆浴場の水系の総合的な汚染実態を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いた 16S アンプリコン解析を行った。対象は、浴槽水に加え、近年、レジオネラ症の感染源として報告された公衆浴場のシャワー水とし⁶⁾、入浴施設の衛生管理に資する基盤となる知見とする。

B 材料と方法

1 検査材料

8か所の地方衛生研究所(機関A～H)において、2016年以降に公衆浴場などから採水した試料を用いた。試料は、浴槽水、シャワー水、カラン水、採暖槽水であった。遺伝子検査には機関D・F、Lp1-IMB 検査には機関A・E・F、16S アンプリコン解析には機関Fの試料を用いた。

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 500 mL をフィルターろ過後 (ポリカーボネート、0.2 μ m、47 mm)、核酸抽出試薬 500 μ L を添加した手もみ式簡易破碎容器に入れ、室温で 1 分間手もみした。核酸抽出液 5 μ L を鋳型として、マスターミックス 17 μ L と混ぜ、qPCR 反応を実施した。マスターミックスには、レジオネラ属菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子配列を標的としたプライマー、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、Taq と共に添加した。qPCR 反応には、Picogene PCR1100（日本板硝子）を用いた。

5 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）とした抗体を磁気ビーズに感作し、免疫磁気ビーズとした。

2) qPCR 法による Lp1 スクリーニング (Lp1-qPCR)

LAMP 法の際に抽出した DNA を鋳型として用いた。既報に従い、Lp1 特異的な qPCR 反応を実施した⁷⁾。

3) Lp1 の選択的濃縮分離

IMB による選択的濃縮法には、検水の 100 倍濃縮液または 5 倍希釈液を供試した。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。この洗浄操作を 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。

6 *lag-1* 遺伝子の検出

浴槽水から分離された Lp1 菌株から DNA を抽出し、Kozak らの方法⁴⁾に従って PCR により *lag-1* 遺伝子を検出した。

7 16S アンプリコン解析

令和元年～2 年度に採水した浴槽水 59 検体およびシャワー水 34 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）を用いて 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 LAMP 法およびモバイル qPCR 法の結果

LAMP 法と平板培養法の相関は表 1A に示した。LAMP 法の平板培養法に対する感度は 75.0%（3/4 検体）であった。モバイル qPCR 法については、Ct 値のカットオフ値を 40、45、50 に設定し、平板培養法との相関を示した（表 1B～D）。モバイル qPCR 法の平板培養法に対する感度は、いずれのカットオフ値においても 75.0%（3/4 検体）であった。また、カットオフ値を 40 に設定した場合、偽陽性検体（平板培養は陰性であるが迅速検査法が陽性となった検体）を 33 から 8 まで減らすことができ、LAMP 法の 16 よりも低かった。

2 Lp1-IMB 法の結果

Lp1-qPCR 法を実施した結果、23.1%（40/352 検体）が陽性となり、平板培養法（14.7%、20/352 検体）および Lp1-IMB 法（6.2%、14/230 検体）の陽性率よりも高かった（表 2A）。しかしながら、平板培養法および Lp1-IMB 法で陽性となった検体のうち、7 および 6 検体は Lp1-qPCR 法が陰性であった。平板培養法と Lp1-IMB 法の相関を見ると、6 検体はどちらの方法でも陽性となったが、20 検体はいずれかの方法でのみ陽性となった（表 2B）。平板培養法に加えて Lp1-IMB 法を併用することによって、Lp1 の検出率が 7.8%（18/230 検体）から 11.3%（26/230 検体）となった。

3 浴槽水におけるレジオネラ属菌の *lag-1* 遺伝子の検出

8 か所の地方衛生研究所において、2016～2020

年に浴槽水から分離されたレジオネラ属菌の検出結果を示した(表3)。レジオネラ属菌の陽性率は、11.5～75.0%と機関によって差が認められた。同様に、Lp1 陽性率は0～12.6%、*lag-1* 遺伝子陽性率は0.3～4.4%と、これらの値も機関によって差が認められた。加えて、分離された Lp1 菌株に占める *lag-1* 遺伝子陽性率 (*lag-1*/Lp1) も、最も低い機関は7.7%であったのに対し、最も高い機関は 50.0%であった。

4 16S アンプリコン解析

16S アンプリコン解析で取得したリード数は、浴槽水検体で中央値 85,333 (14,125～201,261)、シャワー水で中央値 87,243 (20,774～187,709) であった。

各検体に占める菌種別リード割合の平均値は、上位 10 菌種のうち、浴槽水検体では *Pseudomonas* (14.5%)、シャワー水検体では *Phreatobacter* (15.1%) が最も高かった(表4)。3 菌種 (*Methylobacterium-Methylorubrum*、*Obscuribacteraceae*、*Mycobacterium*) は、両方の検体から検出された。*Legionella* は、浴槽水検体の 0.8%、シャワー水検体の 0.1%であった。

浴槽水検体とシャワー水検体では、種の多様性を示す α 多様性 (Faith の系統的多様性) は差が認められなかったが、種の相違度を示す β 多様性 (Weighted Unifrac 距離) は異なる傾向であった(図1A, 1B)。シャワー水の水源別に見ると、井戸水の方が水道水より α 多様性が高く、 β 多様性も異なる傾向であった(図1C, 1D)。

各検体の菌叢を見ると、水道水を使用しているシャワー水検体では Alphaproteobacteria の割合が高かった(図2)。一方、井戸水を使用している検体においては菌叢が多様であり、それらの検体の多くからレジオネラ属菌が分離された。

D 考 察

モバイル型 qPCR 装置を使用した迅速検査法の

検討では、これまでのプロトコルを改良した結果、LAMP 法と同等の感度となった。更に、カットオフ値を 40 に設定することで、平板培養陰・迅速検査法陽性の検体を LAMP 法より少なくでき、平板培養法と相関する方法であった。ただし、今年度の検体では平板培養陽性が 4 検体と少なかったため、モバイル qPCR 法の感度を確認するためには、より多くの平板培養陽性検体を用いた検討が必要である。また、本プロトコルでは、ポアサイズ 0.2 μm のポリカーボネートフィルターで検水を 500 mL 濃縮する必要がある。採水現場での濃縮・測定を実施する場合、より簡便な濃縮方法などについて検討し、プロトコルを更に改良することが望ましい。

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⁸⁾。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。Lp1-qPCR 法は、平板培養法や Lp1-IMB 法と比較し陽性率が高いため、Lp1 のスクリーニング法として有用である。ただし、検出下限値付近の検体などにおいては、平板培養法や Lp1-IMB 法で Lp1 が分離されても、Lp1-qPCR 法が陰性となる場合があることに留意する必要がある。平板培養法と Lp1-IMB 法を比較すると、平板培養法で Lp1 を分離できない検体の一部から Lp1-IMB 法で Lp1 を分離できた一方、Lp1-IMB 法で Lp1 を分離できなかった検体の一部から平板培養法で Lp1 を分離できた。夾雑菌や Lp1 以外のレジオネラ属菌が多い検体などにおいては、IMB の効果が低下すると考えられるため、平板培養法と Lp1-IMB 法を併用することで Lp1 の検出率を最も高くできる。感染源調査など Lp1 の検出が求められる際には有用な方法であると考えられた。

浴槽水におけるレジオネラ属菌の検出率は、地

域によって差が認められた。とりわけ病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子の検出率は、最も高い検査機関では半数の Lp1 から検出された。国内におけるレジオネラ症患者の罹患率は都道府県によって異なるため⁹⁾、地域における浴槽水のレジオネラ属菌汚染実態の差異がその要因となっている可能性について、今後検証する必要がある。

16S アンプリコン解析では、検体種（浴槽水とシャワー水）やシャワー水の水源（井戸水と水道水）によって菌叢が異なっていた。検体ごとに見ると、シャワー水については、菌叢の多様性が高い検体の多くから平板培養法でレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい豊富な栄養条件でレジオネラ属菌も増殖した可能性がある。また、アメーバなどの存在によって共培養された可能性も考えられたため、18S アンプリコン解析なども用いて検水の菌叢とレジオネラ属菌の検出状況についてより詳細に解析する必要がある。

E 結 論

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、これまでのプロトコルを改良した結果、LAMP 法と同等の感度となった。平板培養法と Lp1-IMB 法を併用することで Lp1 の検出率を最も高くでき、感染源調査など Lp1 の検出が求められる際には有用な方法であると考えられた。病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子の検出率は、最も高い検査機関では半数の Lp1 から検出された。16S アンプリコン解析の結果、シャワー水については、菌叢の多様性が高い検体の多くから平板培養法でレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい豊富な栄養条件でレジオネラ属菌も増殖した可能性がある。

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 2021 年第 52 週。
[https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/10886-idwr-](https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/10886-idwr-sokuho-data-j-2152.html)

[sokuho-data-j-2152.html](https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10411-report-ja2020-20.html)

- 2) 国立感染症研究所発生動向調査年別報告数一覧（全数把握）
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10411-report-ja2020-20.html>
- 3) Amemura-Mackawa J et al. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84(18), pii: e00721-18.
- 4) Kozak NA et al. Distribution of *lag-1* alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J Clin Microbiol.* 2009, 47(8), 2525-2535.
- 5) Wee BA, et al. Population analysis of *Legionella pneumophila* reveals a basis for resistance to complement-mediated killing. *Nat Commun.* 2021. 12(1), doi: 10.1038/s41467-021-27478-z.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) レジオネラ症 2008.1~2012.12. 病原微生物検出情報 (IASR). 2013, 34, 155-156.

F 研究発表

- 1) Kanatani J et al. Detection of *Legionella* species, the influence of precipitation on the amount of *Legionella* DNA, and bacterial microbiome in aerosols from outdoor sites near asphalt roads in Toyama Prefecture, Japan. *BMC Microbiol.* 2021, 21(1):215. doi: 10.1186/s12866-021-02275-2.

G 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 迅速検査法の結果

A)					B)				
		培養					培養		
		+	-	計			+	-	計
LAMP	+	3	16	19	モバイルqPCR	+	3	33	36
	-	1	60	61	Ct 値 ≤ 50	-	1	32	33
		4	76	80			4	65	69

C)					D)				
		培養					培養		
		+	-	計			+	-	計
モバイルqPCR	+	3	33	36	モバイルqPCR	+	3	8	11
Ct 値 ≤ 45	-	1	32	33	Ct 値 ≤ 40	-	1	57	58
		4	65	69			4	65	69

表 2. 2018～2021 年に採水された検水における Lp1 の検出結果

A)				
Lp1陽性率	検体数	陽性数	%	備考
Lp1-qPCR	352	40	23.1	
平板培養	352	20	14.7	7検体はLp1-qPCR陰性
Lp1-IMB	230	14	6.2	6検体はLp1-qPCR陰性

B)				
		Lp1-IMB		
		+	-	計
平板培養	+	6	12	18
	-	8	204	212
	計	14	216	230

表 3. 2016～2020 年に採水された浴槽水のレジオネラ属菌検出結果

検体数（延べ）					
機関	N	L. spp 陽性 N (%)	Lp1 陽性 N (%)	lag-1 陽性 N (%)	lag-1 /Lp1 (%)
A	623	159 (25.5)	26 (4.2)	2 (0.3)	7.7
B	604	88 (14.6)	35 (5.8)	5 (0.8)	14.3
C	590	185 (31.4)	67 (11.4)	26 (4.4)	38.8
D	287	33 (11.5)	7 (2.4)	NT	NT
E	222	103 (46.4)	28 (12.6)	4 (1.8)	14.3
F	205	38 (18.5)	18 (8.8)	9 (4.4)	50.0
G	78	19 (24.4)	7 (9.0)	NT	NT
H	4	3 (75.0)	0 (0)	NT	NT

表 4. 16S アンプリコン解析で検出された主な菌種 (Genus level)

Source	Bath water	Shower water
No. of samples	59	34
Amplicon Sequence Variants	1568	1043
Top10		
1	<i>Pseudomonas</i>	<i>Phreatobacter</i>
2	Unknown	<i>Sphingomonas</i>
3	<i>Staphylococcus</i>	DSSF69
4	<i>Candidatus_Obscuribacter</i>	<i>Novosphingobium</i>
5	Uncultured	<i>Mycobacterium</i>
6	<i>Methylobacterium-Methylobacterium</i>	<i>Obscuribacteraceae</i>
7	<i>Obscuribacteraceae</i>	<i>Blastomonas</i>
8	Unknown	SM2D12
9	<i>Cutibacterium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
10	<i>Mycobacterium</i>	<i>Methylobacterium-Methylobacterium</i>
	<i>Legionella</i>	<i>Legionella</i>

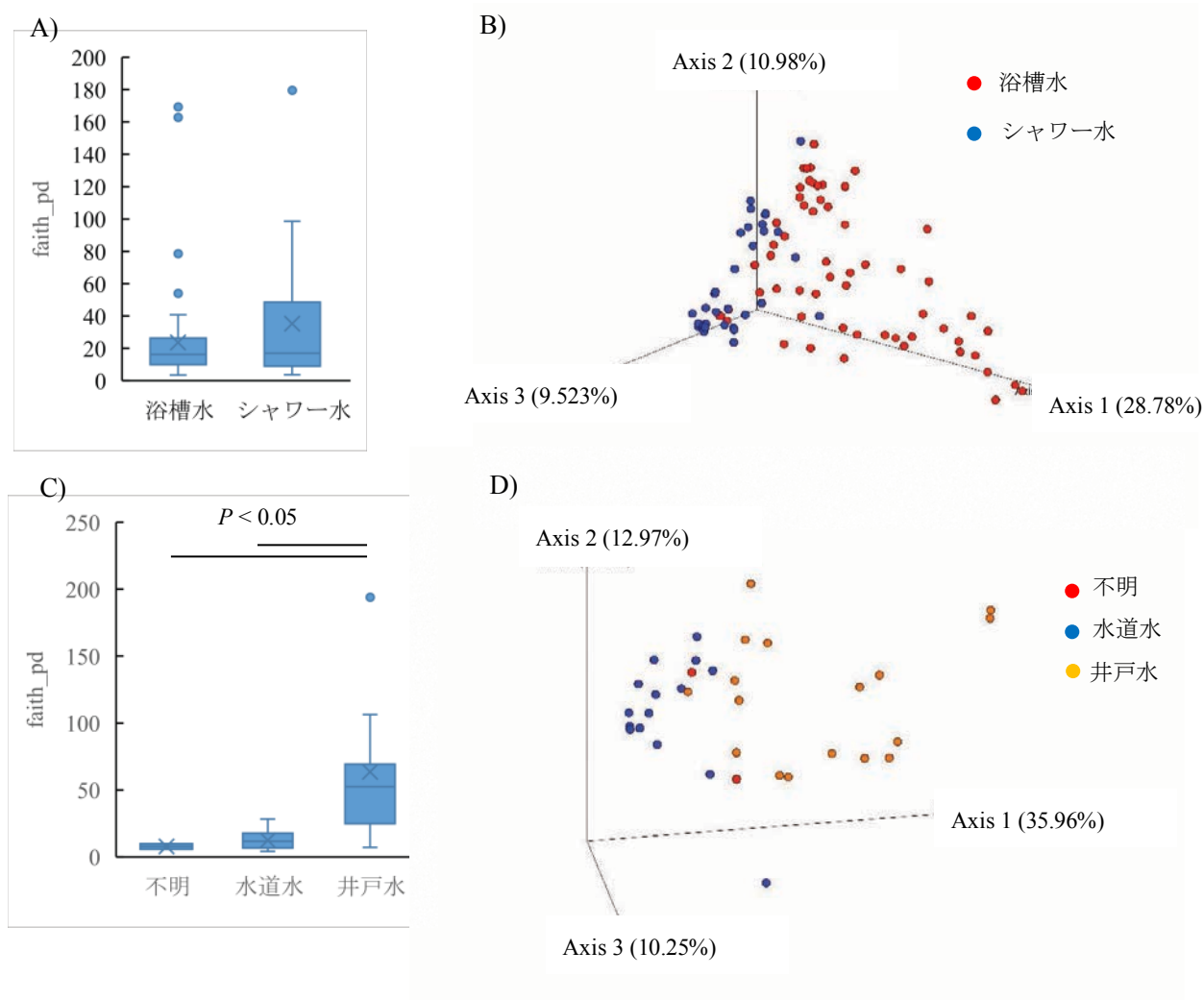


図 1. 16S アンプリコン解析による α および β 多様性

A) 検体種別の α 多様性 B) 検体種別の β 多様性

C) シャワー水の水源別 α 多様性 D) シャワー水の水源別 α 多様性

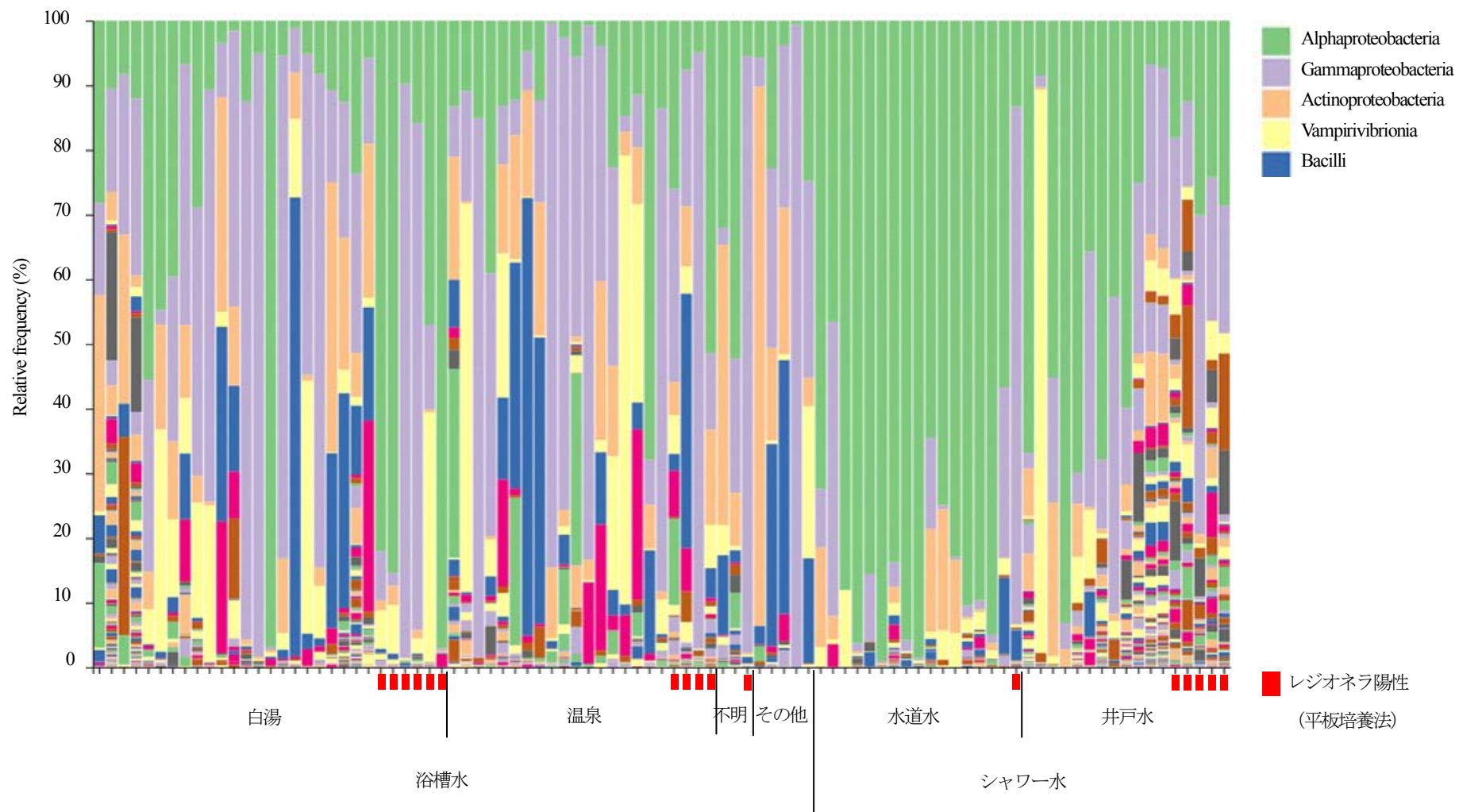


図2. 16S アンプリコン解析による各検水の菌叢 (Class level)

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３年度分担研究報告書

「入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成」

	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	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	森本 洋	北海道立衛生研究所
	研究協力者	大森恵梨子	仙台市衛生研究所
	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	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	枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所
	研究協力者	平塚貴大	広島県衛生研究所
	研究協力者	藤江香予	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
	研究協力者	石森啓益	柴田科学株式会社

「入浴施設における衛生管理ガイドライン（案）」は名称を「入浴施設の衛生管理の手引き（案）」に修正したうえで、これを全国の保健所を有する自治体に配付し、現場にて試験的に利用することを含めて手引き（案）に対する意見を募集した。寄せられた意見を参考にして修正を行った。令和元年度から検討を重ねてきた「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）」はワーキンググループから意見を求めて修正を行い、さらに名称を「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の手引き（案）」に変更した。

A. はじめに

入浴施設はレジオネラ症の発生に関連する重要な施設の 1 つであり、しばしば集団発生事例もみられる。そこで、入浴施設はレジオネラ属菌の増殖・定着を防ぐための衛生管理を徹底することが求められている。厚生労働省は「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」、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」並びに「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」を発出し、入浴施設の衛生管理の技術的助言を提供しており、これらを参考にして保健所による入浴施設の衛生指導や入浴施設での衛生管理が行われている。

上述の要領やマニュアルは管理方法の具体的な記述が少ないため、指導や衛生管理の現場から具体的な管理方法の要望があった。そこで、当研究班で具体的な管理方法を紹介することを目的とした手引きを作成することとした。

レジオネラ症は平成 30 年以降は毎年 2,000 症例を超える患者が感染症法に基づいて報告されているが、入浴施設は当該感染症発生の重要な関連施設となっている。症例の発生時には患者と感染症発生関連施設の疫学・環境調査が実施され、発生に関与する要因が解明することで感染症の予防に役立てられる。しかし、疫学・環境調査にはレジオネラ属菌に関する専門的知識や経験が必要となる。そこで、調査担当者を支援するために調査ガイドライン案の作成を試みた。

B. 方法

本研究では、「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、疫学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。各ガイドライン案の内容はワーキンググループで検討した。

今年度は昨年度までに作成した衛生管理ガイドライン案を研究班の構成メンバーに配付するとともに、全国の衛生研究所を有する自治体に配付し、保健所の衛生指導に試験的に利用することを依頼し、衛生管理ガイドライン案に記述されている内容に対する意見を求めた。

令和元年度から作成した疫学調査ガイドライン案は、当研究班メンバー及びメンバーが所属する自治体の感染症担当者、環境衛生担当者に提示して、項目・内容・使い勝手などに対して出された意見を基に改良した。改良後の案をワーキンググループ会議に諮り、変更を加えた。

C. 結果および考察

衛生管理ガイドライン案に対して研究班の構成メンバー並びに 17 自治体から 160 余りの意見が寄せられた。いただいた意見を基にして衛生管理ガイドライン案を修正した（別添 資料 1：入浴施設の衛生管理の手引き）。

意見の中には Q&A の作成を求めるものや管理のチェックリスト、記録簿の具体的

な事例を示してほしいといった要望があった。これらの要望に応える内容を検討する時間が必要であることから、今年度の報告書では作成しないこととした。衛生管理ガイドライン案は名称を「入浴施設における衛生管理の手引き」（衛生管理の手引き）に変更することとした。

疫学調査ガイドライン案は集められた意見を参考にしてワーキンググループで修正を加え、さらに本文に「別添 1 患者調査票」、「別添 2-1、別添 2-2 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。当初は「ガイドライン」という名称で作成を始めたが、行政的に縛りのある文書と受け取られかねないため、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の手引き」（レジオネラ症調査の手引き）とし、研究班のホームページ上に公開した。公開したレジオネラ症調査の手引きは別添のとおりである（別添 資料 2：レジオネラ症調査の手引き）。

レジオネラ症調査の手引き本文については、項目番号等軽微な修正を行った。施設調査票については 2020 年度に大幅に変更したために不足していた項目を追加し、紙に印刷して持ち歩けるよう体裁を整えた。本手引き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とし、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。

これら手引き本文と調査票を、研究班ホームページに一般の人がアクセスできない状態で掲載し、ワーキンググループの確認

を経て、公開した (<https://sites.google.com/view/legionella-resgr/>)。公開にあたって、調査票については使用者がダウンロードして自由に書き換えられるよう、Microsoft Word ファイルまたは Microsoft Excel ファイルで添付した。

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。本手引きは、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。

D. まとめ

令和 3 年度の活動では、衛生管理ガイドライン案を研究班の構成メンバーと全国の衛生研究所を有する自治体に配付して内容に対する意見を求め、集められた意見を参考にして修正を行った。さらに衛生管理ガイドライン案の名称を衛生管理の手引きに変更した。疫学調査ガイドライン案は研究班メンバー及びメンバーが所属する自治体の感染症担当者、環境衛生担当者に提示して意見を求め、収集した意見に基づいて疫学調査ガイドライン案を修正した。さらに疫学調査ガイドライン案の名称を疫学調査の手引きに変更し、それを研究班のホームページで公開した。

E. 研究発表

該当なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

入浴施設の衛生管理の手引き



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

入浴施設の衛生管理の手引き

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
衛生管理手法のための研究」

入浴施設の衛生管理の手引き

はじめに

入浴施設の衛生管理は、現行の「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」、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」並びに「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」といった技術的助言を参考にして行われています。これらを基にした具体的な管理をわかりやすく解説するとともに実践的方法を紹介することを目的として本手引きを作成しました。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できる資料となることを目指しています。本手引きは厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「公衆浴場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ための研究」の研究活動の一環として作成しています。記載している具体的な管理方法は提案であり、規定するものではありません。

この手引きは、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参考となる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。

目 次

I. 総合衛生管理プログラム	1
I-1. 総合衛生管理プログラムとは	1
I-2. 計画(Plan)：総合衛生管理プログラムの作成	3
1) チームの編成	3
2) 施設・設備の確認	7
3) レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定	10
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	13
5) 設定値等を外れた際の対策の決定	17
6) 総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認方法の決定	21
7) 総合衛生管理プログラムの運用計画の作成	23
I-3. 実行(Do)：総合衛生管理プログラムの実施	24
I-4. 評価(Check)：総合衛生管理プログラムの判定・評価	24
I-5. 改善(Action)：判定・評価に基づく総合衛生管理プログラムの修正・改善	25
I-6. 総合衛生管理プログラムの運用計画の修正	25
参考資料	26
II. 一般衛生管理	27
II-1. 全般	27
II-2. 貯湯槽	29
II-3. 補給配管	32
II-4. 湯口	33
II-5. 浴槽	35
II-6. 循環配管	40
II-7. ろ過器	43
II-8. 集毛器	46
II-9. 熱交換器	46
II-10. 消毒装置	47
II-11. 気泡発生装置等	47
II-12. 水位計及び水位計配管	49
II-13. 連通管	50
II-14. オーバーフロー回収槽	51
II-15. 調節箱	53

II-16. シャワー、打たせ湯	-----	54
II-17. 原水、原湯の管理	-----	56
II-18. 上がり用湯、上がり用水の管理	-----	56
II-19. 排水	-----	57

用 語

この手引きで使用する用語は、現行の公衆浴場における衛生等管理要領に準じています。本要領で定義を示されていない用語も併せて本手引きで使用する用語を以下で説明します。

「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、原湯及び上がり用湯を貯留する槽（タンク）を指します。

「源泉槽」とは、貯湯槽のうち温泉水を貯留する槽（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、原湯と原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等の目的で、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る口を指します。公衆浴場における衛生等管理要領及び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では注入口としています。

「水位計」とは、浴槽水の水位を計測する装置を指します。

「消毒装置」とは、消毒剤を注入するための装置を指し、貯湯槽、源泉槽、循環配管、オーバーフロー回収槽等の設備に接続します。

「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（廃熱）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、再利用するための槽（タンク）を指します。

「気泡発生装置等」とは、浴槽で気泡や水流を発生させるための装置を指します。

「連通管」とは、浴槽の水位調節のために浴槽間をつなぐ配管を指します。

「生物膜」とは固相の表面に形成される微生物の集合体を指します。

「エアロゾル」とは空中を浮遊する微細な液体の粒子を指します。

レジオネラ属菌とレジオネラ感染症

レジオネラ属菌は湖や河川などの淡水や土壌の自然環境に生息しています。川で溺れて水を吸い込み、あるいは腐葉土の粉じんを吸引することで感染した例があります。人工の水環境（噴水等の水景施設、ビル屋上に立つ冷却塔、浴槽、ジャグジー、加湿器など）にもレジオネラ属菌は生息して盛んに増殖し、エアロゾルに含まれて漂っている菌を吸い込むことによって肺炎などの健康上の問題を起こします。

レジオネラ属菌の増殖に適した温度は 20～45℃とされており、生物膜中に生息するアメーバの体内で大量に増殖します。そのため、生物膜が形成される湿潤環境あるいは水中環境にはレジオネラ属菌が生息している可能性があります。さらに、レジオネラ属菌は生物膜により消毒剤から保護されています。レジオネラ属菌の増殖や定着を防ぐには生物膜を除去することと増殖に適さない温度に保つことが重要です。

レジオネラ属菌により起きるレジオネラ症にはレジオネラ肺炎とポンティアック熱があります。レジオネラ肺炎は重症化して死に至ることがあります。ポンティアック熱は発熱、悪寒、筋肉痛といった風邪様症状が一過性に顕れて自然に治ります。

レジオネラ属菌による感染症が起きないようにするためには、レジオネラ属菌の生息・増殖を防ぐことと、たとえレジオネラ属菌に汚染されてもエアロゾルの発生を抑制することで感染が起きる危険性を低くすることが必要です。

レジオネラ属菌は生物膜に包まれて生息するため消毒剤から保護されており、浴槽の清掃と浴槽水の消毒だけでは十分ではありません。レジオネラ属菌の発生を抑えるには生物膜の形成をできるだけ抑え、形成された生物膜を除去することが重要です。

I. 総合衛生管理プログラム

I-1. 総合衛生管理プログラムとは

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。

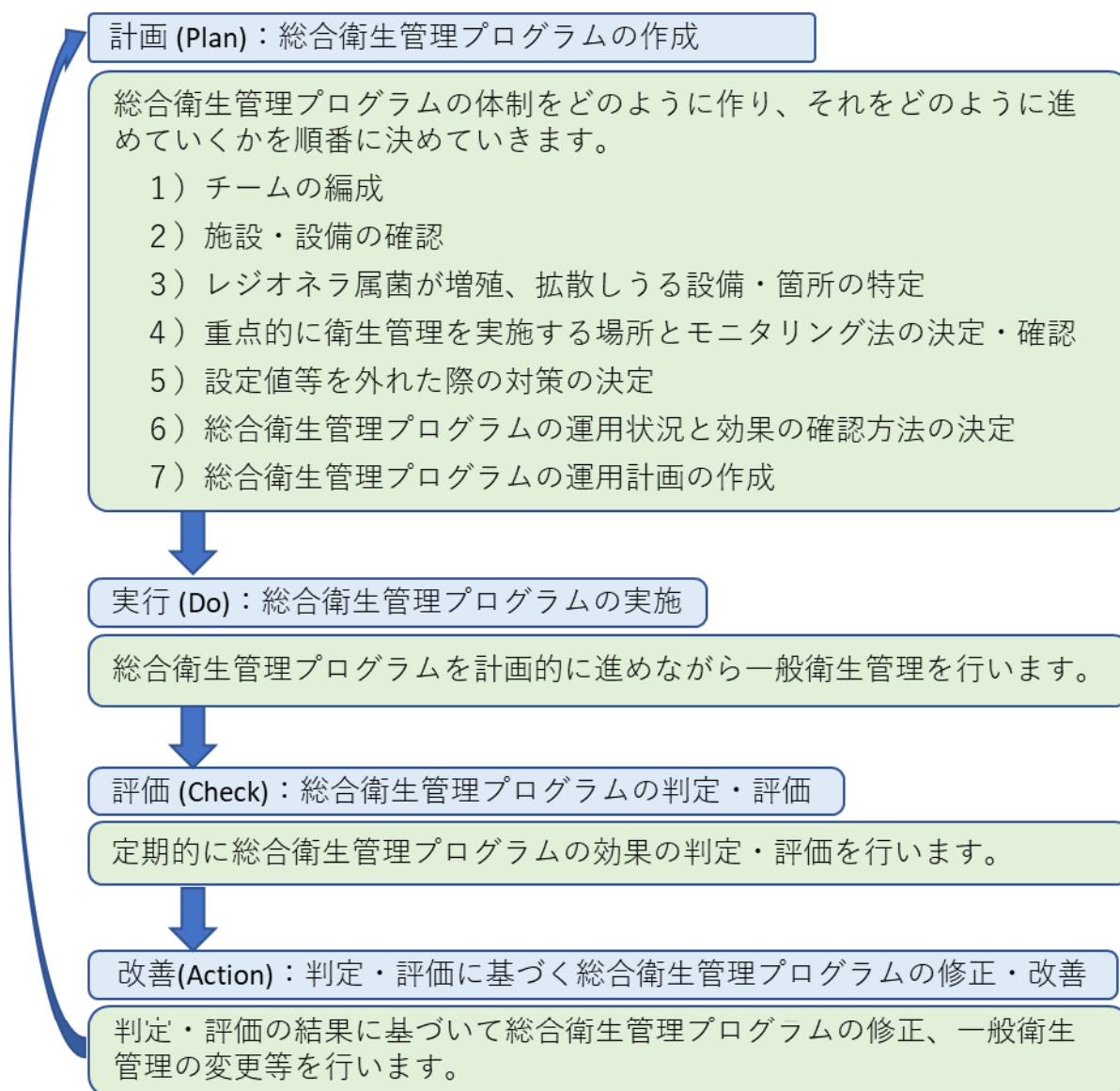
総合衛生管理プログラムは計画(Plan)、実行(Do)、評価(Check)、改善(Action)の4つの段階を回して進めていきます（次頁の図を参照）。ここで紹介する総合衛生管理プログラムは参考資料¹⁾を参考にしています。

入浴施設において衛生管理を行う中で、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 問題発生時の責任の所在があいまいになる（役割分担や担当者がわからない）、④ 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かわからない）、⑤ 課題があっても改善されない、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、健康被害）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衛生管理に関する情報を共有し、体制を構築することで責任の所在を明らかにすることができる。
- ② チームにおいて管理方法を様々な観点から検討して決めることで入浴施設全体で衛生管理に取り組む体制が構築され、衛生管理のスムーズな運用が期待される。
- 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（目視点検や検査、測定等）による監視を行うことで異常を迅速に探知し、対応することができる。
- ⑥ プログラムの評価と改善を行うことで管理状態を維持・向上することができる。

総合衛生管理プログラムの流れ



まず始めに計画 (Plan) として総合衛生管理プログラムを構築して運用計画を作成し、次に実行 (Do) として運用を始め、評価 (Check)、改善 (Action) と進めていきます。計画 (Plan) に戻って運用計画を修正・改善して新たな計画の下に進めていきます。

I-2. 計画(Plan)：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一般衛生管理だけでは十分とは言えません。安全で安心して利用できる入浴施設を運営するためには、総合衛生管理プログラムを作成して衛生管理の体制を構築し、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。

1) チームの編成

入浴施設の総合衛生管理プログラムはチームを編成して行うことが非常に効果的です。チームというのは部門を横断して管理者や担当者を招集して構成されるグループを指しています。チームの役割は、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。

チームのメンバーは役割分担をします。メンバー全員が衛生管理手法やレジオネラ属菌に関する専門知識を持っている必要はありません。

チーム編成の1例

チーム責任者（施設管理責任者等）：総括、取りまとめ

清掃担当責任者：施設の清掃などに関する事項

施設維持管理担当責任者：施設の衛生管理、修繕補修などに関する事項

人事・総務担当責任者：人材確保、人員配置、機器材調達などに関する事項

経理担当責任者：衛生管理に関する経費の管理などに関する事項

接客担当責任者：施設の評判、客からの意見の収集などに関する事項

企画・営業担当責任者：施設の方針決定、宣伝、顧客情報などに関する事項

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）

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、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1,2)}

入浴設備の衛生管理や設備の管理、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を防ぐ人員体制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れば、そのスタッフも加えます。清掃や維持管理を業者に委託している場合は委託業者がチームに加わることも検討します。

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して利用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・確認し、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、規定値等の逸脱とその後の対応などです。^{注3)}

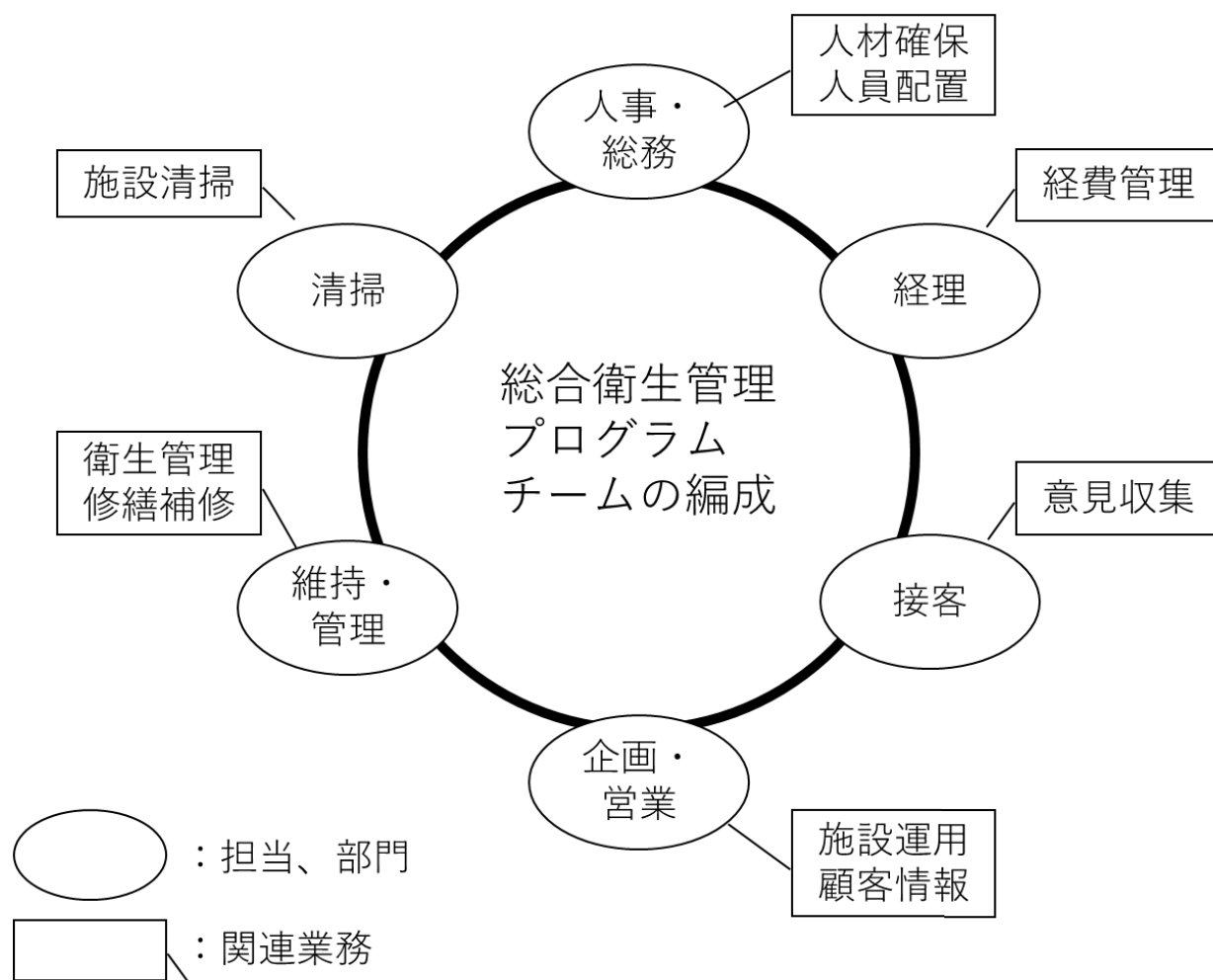
チームのメンバーが決まったら、各メンバーの役割を明確に決め、あるいは再確認を行い、記録しておきます。

注1：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2：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人以下ほどの小規模施設ではチームを作るのではなく、全員で役割分担して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3：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だけではなく、現場の意見を取り上げてボトムアップにより進めることになります。

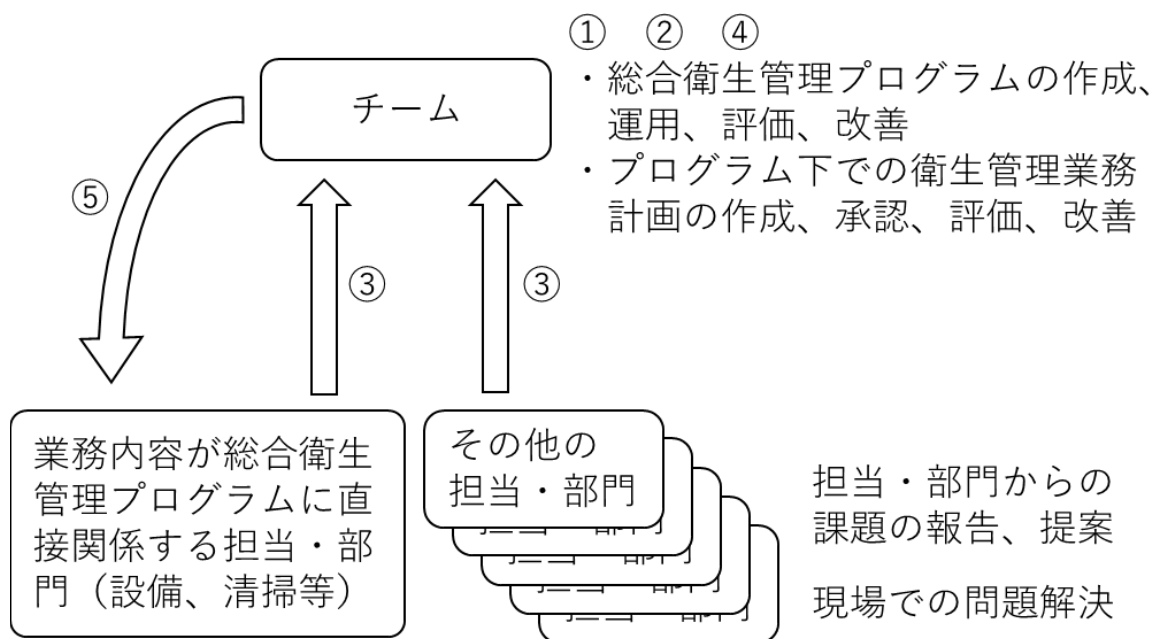
1) チームの編成



- ・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人以下程度などの小規模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して利用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。

1) 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。

2) 施設・設備の確認

施設における源泉、水源を含む原水・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)}

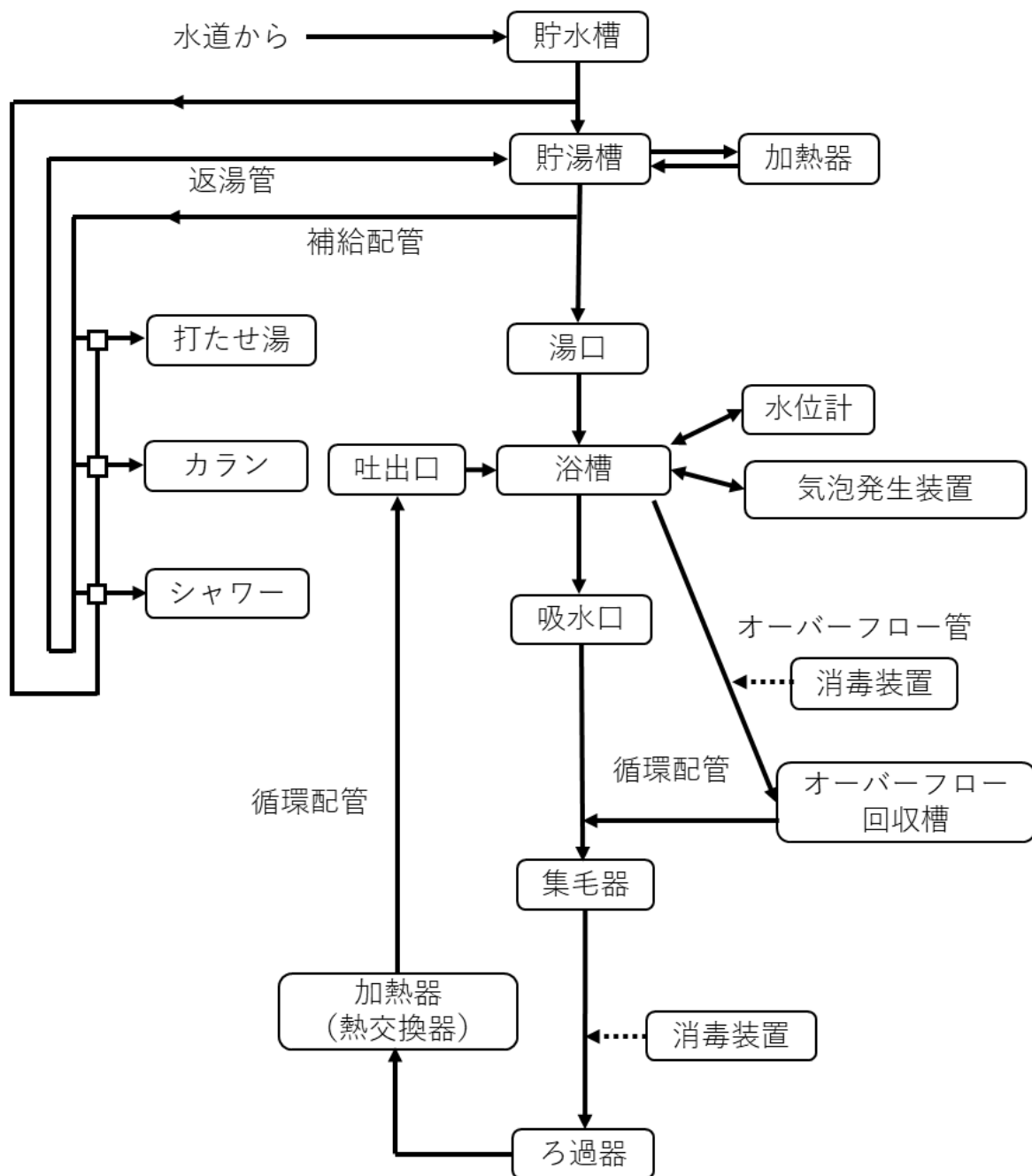
図面や現場での確認は、設備の構造を確認するために重要な工程になります。これにより、
3) レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定で衛生管理の方法を決めることや、
レジオネラ属菌が増えやすい場所を特定することができます。

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ります。そこで、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。次頁に例を示します。流れ図には設備と配管の状況が把握しやすい、レジオネラ属菌の増殖・定着場所を特定しやすい、重点管理場所やモニタリング場所を設定しやすいといった利点があり、施設や設備の状況を確認する作業を効率的に行うことができます。

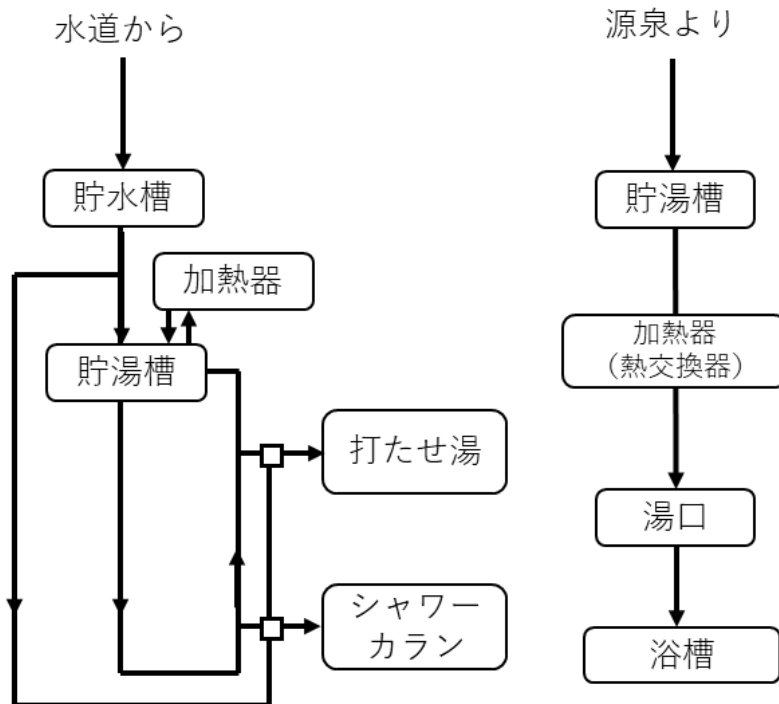
注1：貯湯槽、調節箱、シャワー、カラン、集毛器、ろ過器、消毒装置、気泡発生装置などの付帯設備や配管の状況等もすべて確認します。レジオネラ属菌の生息に関連する施設周辺の状況（源泉、冷却塔、水景施設、植栽など）及び設備の衛生管理状況も合わせて確認することが推奨されます。また、温泉であれば泉質と湯量、原水との混合状況なども確認します。合わせて、利用客の利用状況（入浴者数の日・季節変動など）を確認します。入浴施設の概要図はこの手引きの一般衛生管理編を参照してください。

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った場合は、レジオネラ属菌が増殖する可能性を勘案して改修するなどの措置を検討します。

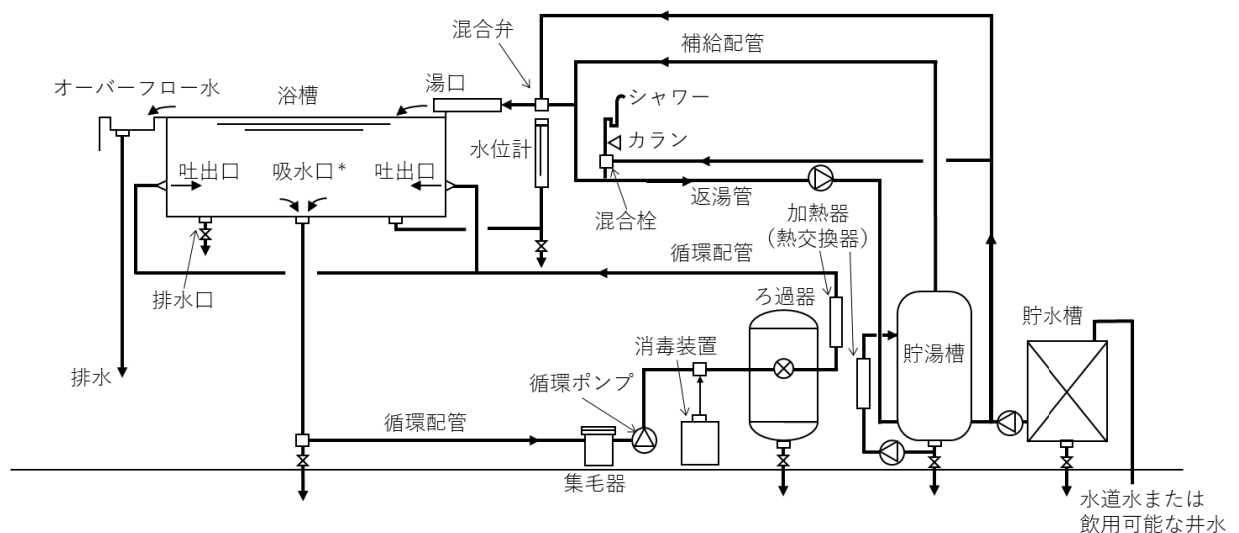
2) 施設・設備の確認



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、3) レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定制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。ここで示す図は書き方の例ですので、それぞれの入浴施設の設備の設置状況に合わせて図を作成してください。



この図ではかけ流し式浴槽の簡略図（流れ図）の例を示しています。加熱装置を除く、消毒装置を書き加えるなど、施設の状況により図を作成します。



これは循環式浴槽の概要図の 1 例ですが、流れ図に代えてこのような図を用いることもできます。

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入りやすい場所、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れば、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。

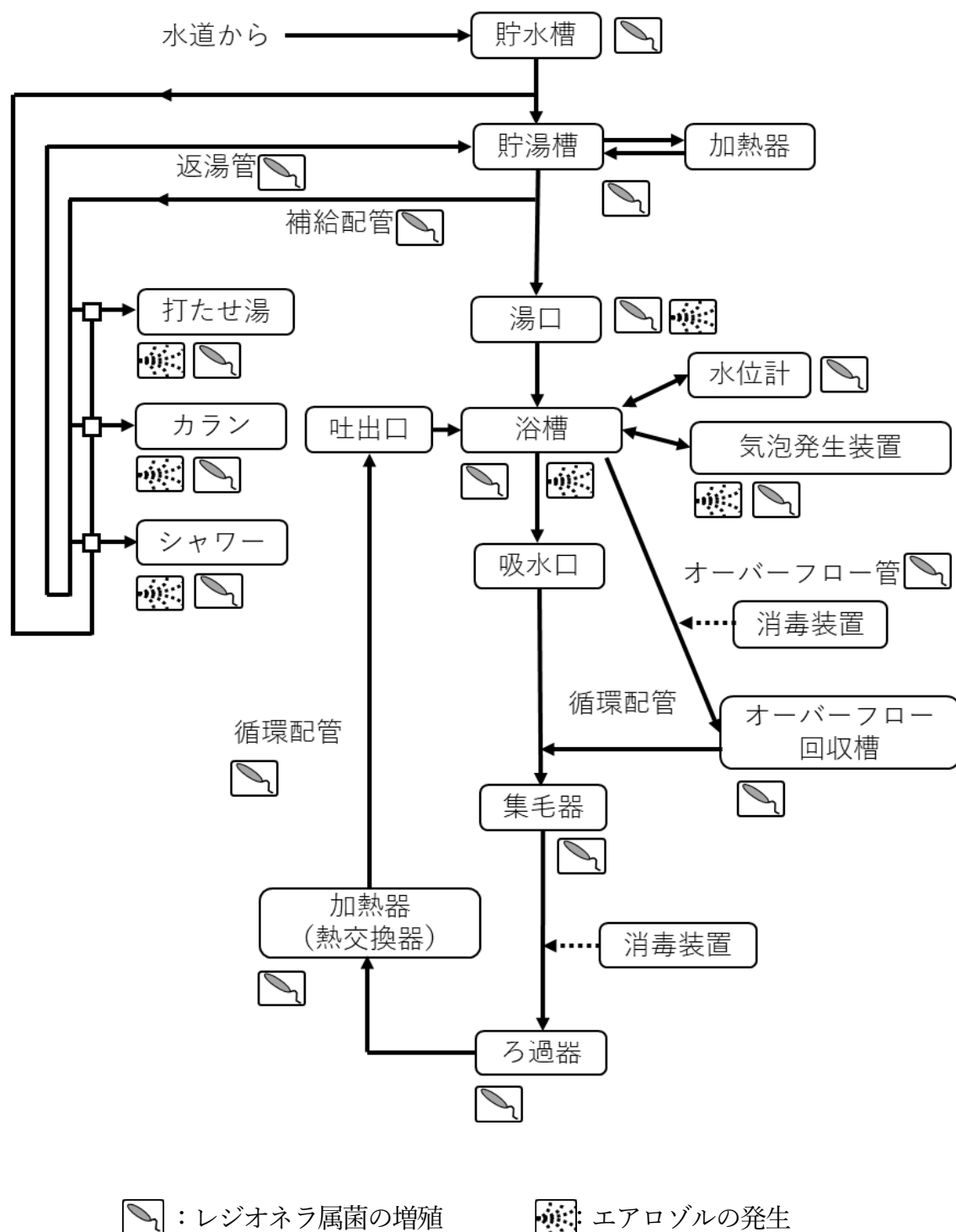
各設備の衛生管理の方法を決め、手順書・作業書及び自主管理点検表等を作成します。衛生管理の方法は公衆浴場における衛生等管理要領や本手引きのⅡ．一般衛生管理などを参考にします。既に手順書・作業書が作成されている場合はその内容を確認し、必要に応じて修正します。

注1：レジオネラ属菌が増えやすい場所としては、貯湯槽、源泉槽、浴槽、ろ過器、配管、湯口、シャワーヘッド、気泡発生装置（ジェットバス、ジャグジー、バイブラバス）、集毛器、連通管、調節箱、熱交換器、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、水位計などがあります。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。設置されているバルブや弁の構造内に生物膜が形成されやすい材質が使用され、あるいは塩素剤が届きにくい構造があるために生物膜の形成やレジオネラ属菌の増殖が起きることもあります。

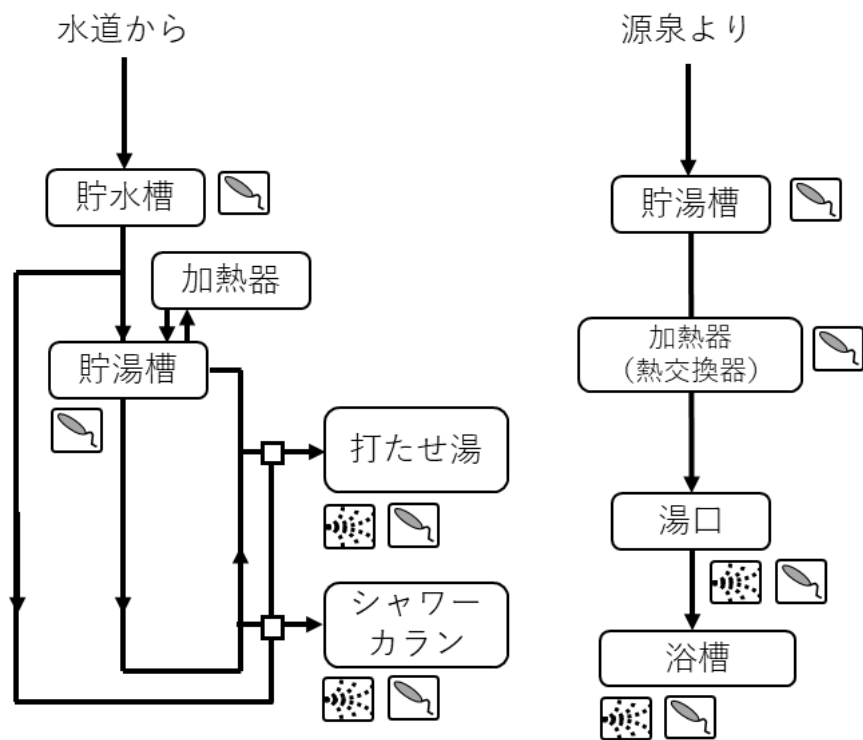
レジオネラ属菌が増えやすく、洗浄・消毒が難しい材質として木や岩があり、洗浄・消毒が難しい場所・設備として、タイルの目地の破損部分、気泡発生装置、シャワー、カランがあります。

注2：感染の危険性がある設備は、入浴者がエアロゾル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、気泡発生装置（ジェットバス、ジャグジー、バイブラバス）、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。

3) レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定



2) 施設・設備の確認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例を示しています。

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・確認

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）や設定水温を決定あるいは確認します。^{注1,2)}

レジオネラ属菌は施設の様々な場所で増殖する可能性があるため、高温による温度管理と塩素系消毒剤の濃度管理を行う場所を重点的に管理する場所として、温度あるいは塩素濃度を常時モニタリングします。それ以外のレジオネラ属菌が増殖する可能性がある設備や場所は後述の一般衛生管理により生物膜の形成を防ぎ、あるいは生物膜を除去します。

レジオネラ属菌の増殖と生物膜の形成を抑えるには、浴槽水や配管水の塩素系消毒剤での消毒と貯湯槽等の高温の維持だけではなく、生物膜除去のための設備の洗浄と消毒が重要です。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、一般衛生管理業務について作業書等の内容を確認することも必要です。

消毒剤の設定濃度や貯湯槽の設定温度が維持されているかを確認するための測定方法と頻度ならびに記録方法を決定し、あるいは既に実施している場合は手順書・作業書と記録簿等を確認します。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ので、生物膜形成のモニタリングの実施方法と頻度を決めます。^{注3)}

通常の測定結果は測定担当者が担当責任者に毎日報告し、定期的にチームに報告することなど、モニタリング結果の報告に仕方も決めておきます。

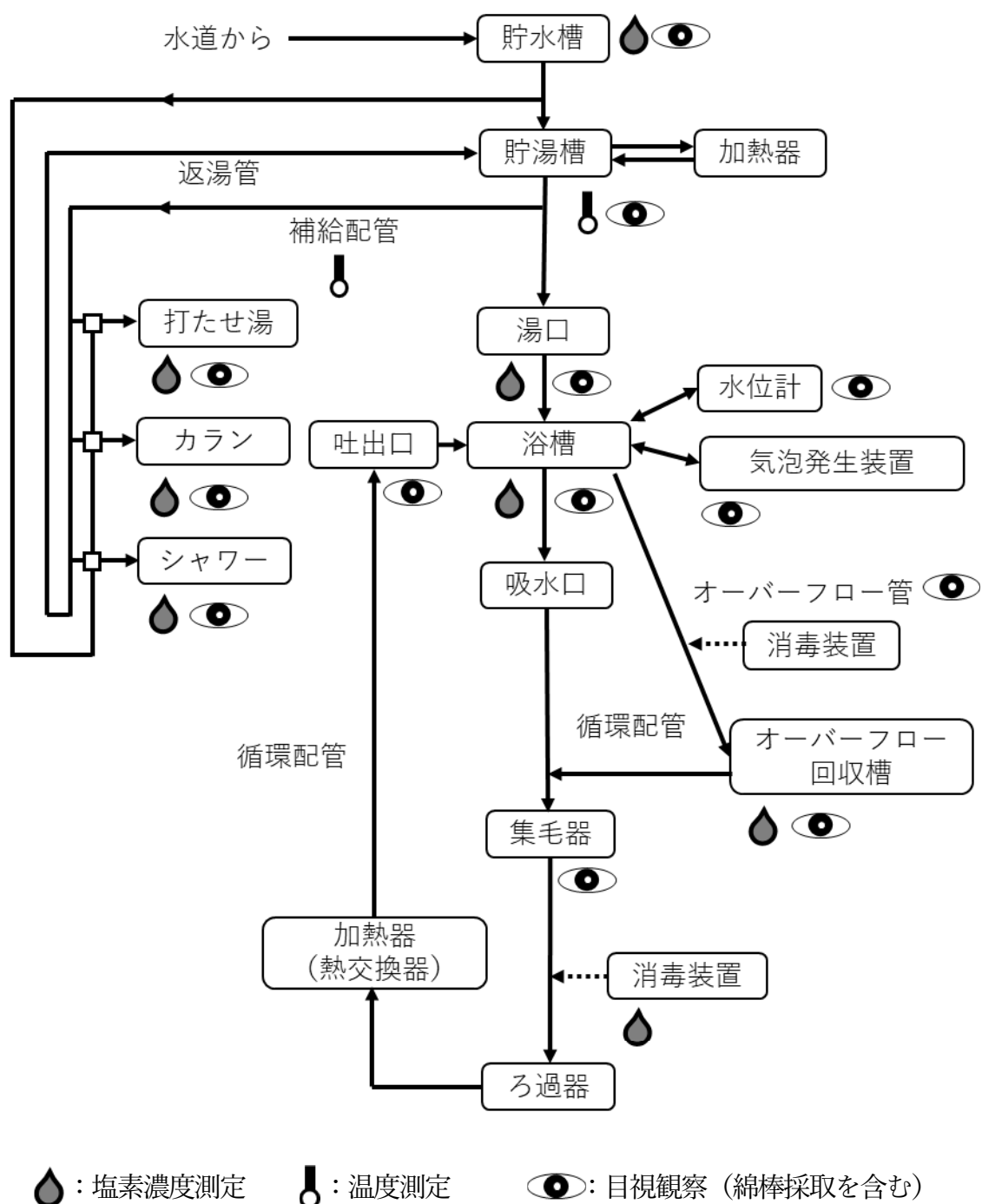
注1：レジオネラ属菌を増やさない管理をするためには、塩素系消毒剤の濃度あるいは 60℃ 以上（最大使用時でも 55℃ 以上）の温度（貯湯槽水の温度）が重点的に管理する項目となります。（泉質によっては pH5.0 未満の低 pH もレジオネラ属菌の増殖を抑えますが、pH3.0～5.0 では完全に死滅するわけではありません）

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。

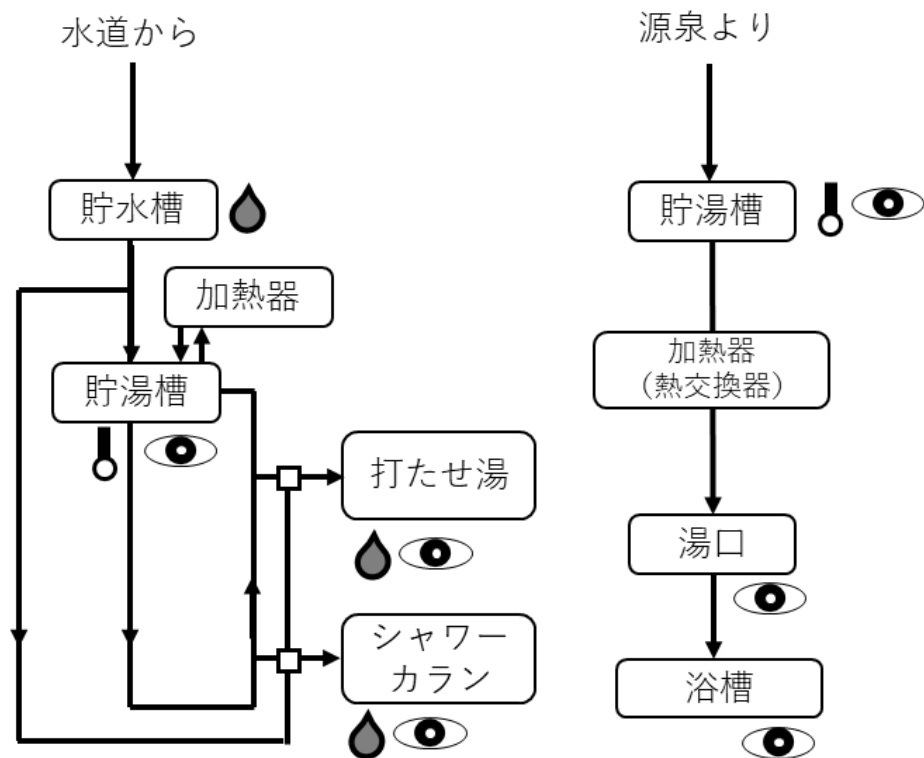
注3：生物膜ができた状況の確認方法、設備の洗浄・消毒方法を決めて、手順書・作業書を作成し、あるいは手順書・作業書があれば内容を確認します。生物膜を調べる方法の1つとして、簡易測定装置を使った ATP 値の測定があります。生物膜の形成を調べる場所として適しているのは、3) レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定の注1にある貯湯槽、浴槽、配管内面、湯口、気泡発生装置、集毛器、連通管、調節箱、オーバーフロー回収側溝、オーバーフロー管、オーバーフロー回収槽、水位計が挙げられます。ATP 測定用キットの綿棒を用い、浴槽や貯湯槽の壁面や床などの広く平らな面で

は 10 x 10 cm 程度を拭い、それ以外の場所では綿棒全体で可能な範囲の表面を拭い取り、ATP 値を計測します。洗浄・消毒後に 1,000 RLU 以下となることが推奨されています。II-5. 浴槽 管理 (37 ページ) を参照してください。

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



各施設の状況に置合わせて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。

5) 設定値等を外れた際の対策の決定

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・確認で決めた設定濃度や温度から外れたとき、あるいは異常を発見したとき等に正常範囲に戻すための措置を可能な範囲で決めておきます。さらに決まった内容は表形式に整理しておくことで逸脱の発生時にすぐに参照することができ、迅速に対応できます。重要なことは、決められた温度や濃度からの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です。

施設においてレジオネラ属菌が検出された場合及び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をここで決めておきます。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0.4 mg/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担当責任者に報告する。
- ② 測定記録簿から、いつから濃度が不十分であるかを担当責任者と確認する。
- ③ 測定方法や測定時の状況を担当責任者と確認する。
- ④ 消毒装置を点検する。必要に応じて修理する。
- ⑤ 必要に応じて高濃度塩素消毒を実施する。
- ⑥ 必要に応じてレジオネラ属菌の検査を実施する。
- ⑦ 対応内容を記録する。

具体例2：貯湯槽水の温度が45℃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℃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担当責任者と確認する。
- ③ 温度計の故障の有無を担当責任者と確認する。
- ④ 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。
- ⑤ 2日以上設定温度よりも低下していれば、高濃度塩素消毒を実施する。
- ⑥ 浴槽水の遊離残留塩素濃度が0.4 mg/L以上であることを確認する。
- ⑦ 対応の内容を記録する。

具体例3：綿棒での採取により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塩素消毒を行い、通常の洗浄・消毒方法や頻度を検討します。

- 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 高濃度塩素消毒・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：直ちに健康被害の確認と保健所等への連絡を行い、対応措置を取って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 保健所に連絡し、その指示に従う。
- ③ 上流へのさかのぼり検査により問題点を明確になる可能性があるため、補給湯（浴槽への注ぎ湯など）や水（加水している場合）等の検査を実施していない水の検査を必要に応じて専門業者を交えて行う。
- ④ 採水後、直ちに高濃度塩素等により消毒する。
- ⑤ 消毒後、再度検査を行い、レジオネラ属菌が検出されないことを確認する。
レジオネラ属菌が再検出される場合は専門業者に依頼するなどして不検出としない原因を調査することを検討する。
- ⑥ 洗浄・消毒方法の見直し、浴槽水等の設定塩素濃度の確認、浴槽壁等の損傷の有無の確認、露天風呂等でのレジオネラ属菌混入の可能性の確認、付帯設備の確認、記録簿による塩素濃度の確認、消毒装置の点検などにより原因の究明を行い、衛生管理の問題点を明らかにして、改善する。
- ⑦ 営業の自粛や結果の公表を検討し、実施する。
- ⑧ 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。

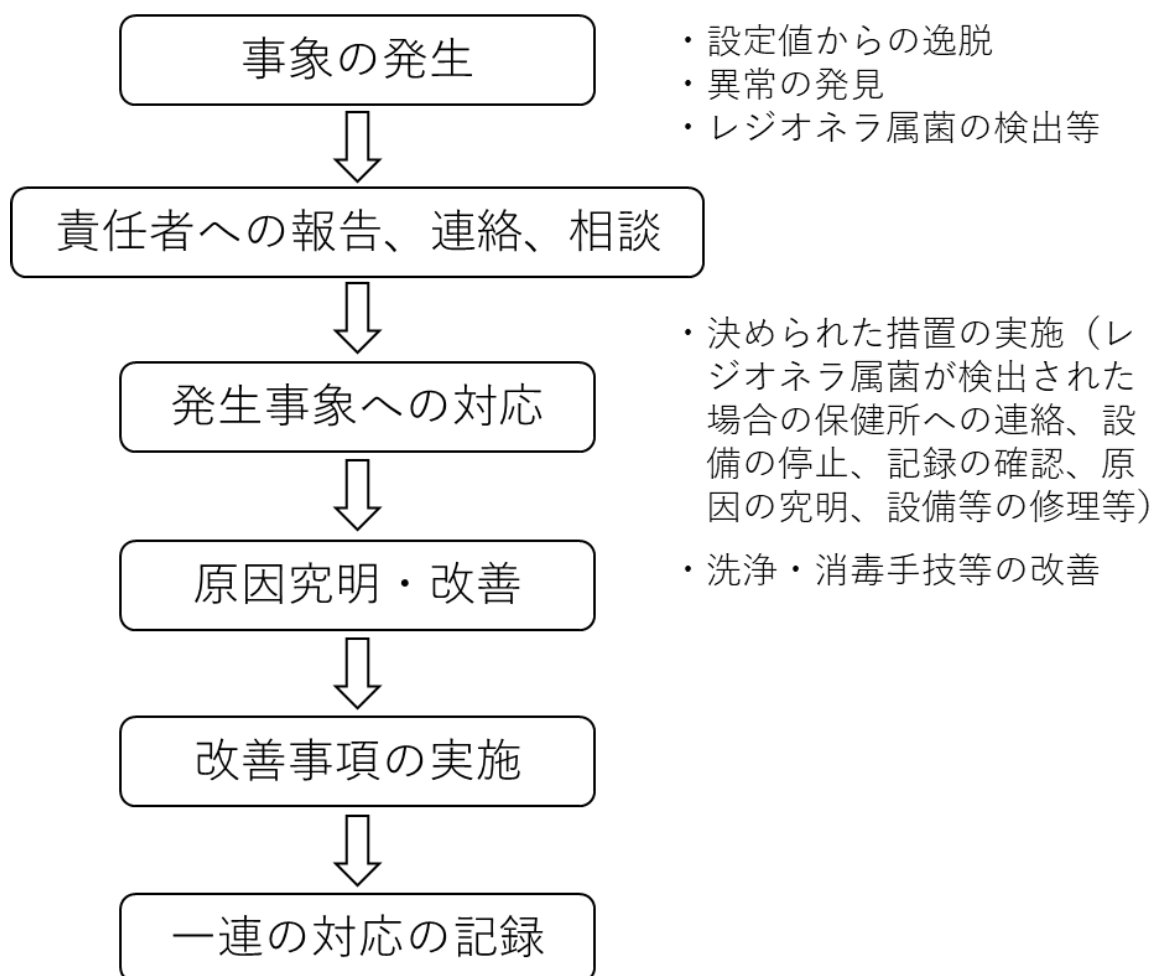
対応：施設利用者にレジオネラ症患者あるいはその疑いがある患者が発生した場合、次の点に注意して対応します。

- 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ころに、直ちに保健所に連絡する。
- ② 保健所から患者発生の連絡を受けた場合は、直ちに施設責任者に報告するところ

もに保健所の指示に従う。

- ③ 施設内で協議し、あるいは保健所の指示に従って施設の利用を直ちに中止する。
- ④ 消毒や洗浄は行わず、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た場合は、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。

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、あるいは生物膜が形成された、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。

6) 総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認方法の決定

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開催方法、内容、時期や開催頻度などを決めておきます。

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、消毒剤の濃度や貯湯槽等の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での実施状況や記録の確認も行いますので、その方法と頻度も決めます。

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)} 生物膜形成のモニタリング記録の確認方法を決めておきます。

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。(I-2. 計画(Plan): 総合衛生管理プログラムの作成 1) 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。こうした情報はチームメンバーから得られます。

注1: モニタリングの対象である遊離残留塩素濃度の測定に使用するキットや温度計等の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における衛生等管理要領で定められています。一般衛生管理のII-5. 浴槽 2) 浴槽水 (1) 水質検査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値で調べることで、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・確認の項の注3を参照してください。

6) 総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認方法の決定

チームによる検討会

- ・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
- ・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・作業書ど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
- ・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方の決定

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判定・評価します。6) 総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認方法の決定では、総合衛生管理プログラムの効果判定のためのレジオネラ属菌検査の方法と頻度を決めるとともに、検討会の開催方法と開催頻度や上に示すような検討会での検討内容を決めておきます。

7) 総合衛生管理プログラムの運用計画の作成

6) 総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認方法の決定まで検討することで総合衛生管理プログラムの進め方が決まります。そこで、総合衛生管理プログラムを運用するための計画を作成します。

計画には総合衛生管理プログラムを導入する理由などに基づいて設定した目標を盛り込みます。既に目標が設定されていれば、それを確認します。

以下の内容を文書化して総合衛生管理プログラムの運用計画を作成します。

- ・総合衛生管理プログラムの目標
- ・チームメンバー（氏名、部署、連絡先、チームでの担当等）
- ・チームによる会合や検討会の開催頻度、開催方法
- ・施設の概要（施設が複数ある場合の場所、築年数、施設・設備の劣化状況、補修状況、入浴者数等）
- ・入浴設備関連の概要（配管図、流れ図、浴槽数等）
- ・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
- ・重点的に衛生管理を実施する箇所
- ・モニタリング方法と基準（設定値）
- ・設定値等を外れた際の対策
- ・総合衛生管理プログラムの運用状況の確認手順
- ・レジオネラ属菌検査を含む水質検査実施のスケジュール、実施方法、実施検査機関等
- ・総合衛生管理プログラムの判定・評価の手順と評価に基づく総合衛生管理プログラム等の修正・改善
- ・スタッフの衛生教育の必要性和衛生教育の実施計画
- ・総合衛生管理プログラムの計画の見直し

I-3. 実行(Do)：総合衛生管理プログラムの実施

実行(Do)の段階として、一般衛生管理業務及び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・確認で決めたモニタリングを手順書・作業書に従って行い、施設の衛生管理を実施します。さらに6) 総合衛生管理プログラムの運用状況と効果の確認方法の決定で決めた方法と頻度でレジオネラ属菌増殖の有無の検査を実施します。

I-4. 評価(Check)：総合衛生管理プログラムの判定・評価

評価(Check)の段階として、総合衛生管理プログラムの導入後に、決められた頻度でチームメンバーによるプログラムの運用状況の確認や情報交換のための会合を例えば月に1～2回開催したり、プログラムの判定・評価の検討会を年1～2回開催するなど、それぞれの施設の状況に合わせて開催し、その中で総合衛生管理プログラムの効果の判定や評価を行います。

総合衛生管理プログラムを評価するために、レジオネラ属菌検査の結果や生物膜形成モニタリング、消毒剤の濃度や貯湯槽の温度のモニタリング結果の確認を行います。レジオネラ属菌が検出された場合や生物膜の形成が観察された場合は原因の究明を徹底的に行い、明らかになった原因の確認とその対処の妥当性の検討、一般衛生管理の内容や重点管理箇所あるいはモニタリング方法の見直しと変更・改善の検討と決定を行います。

レジオネラ属菌が検出されず生物膜形成も観察されず、設定値の逸脱もない場合は、既定の管理を継続することを確認します。ただし、新しい消毒法や貯湯技術、洗浄技術などの新しい情報を常に収集し、必要に応じてプログラムの改善や一般衛生管理の手法の刷新を行うことも重要です。

モニタリングの対象としている消毒剤の濃度や貯湯槽等の温度が規定値から逸脱した例がある場合は逸脱の原因を確認し、実施された対策や解決方法の妥当性を話し合い、必要に応じて逸脱した際の対策を変更します。

総合衛生管理プログラムの評価の際には、一般衛生管理やモニタリングが手順書・作業書どおりに行われているかを現場の作業や日誌等の記録から確認することも重要です。手順書・作業書に不備がある場合や手順書・作業書に従った作業が行われていない場合はその原因を明らかにし、手順書・作業書の修正、あるいは作業の見直しと修正を行います。

会合や検討会で確認、検討・決定した具体的な内容（開催日時・場所、出席者、議題、協議・決定内容など）はすべて記録して残します。

I-5. 改善(Action)：判定・評価に基づく総合衛生管理プログラムの修正・改善

評価(Check)の段階において行った判定・評価に基づく検討や決定を受けて、改善(Action)の段階として手順書・作業書の修正も含め、総合衛生管理プログラムの必要な修正並びに必要な応じて一般衛生管理の実施内容の修正を行います。

チームによる会合や検討会では、施設・設備の変更（改修・改築、入れ替え、修理・修繕など）があれば内容を確認し、それに伴って重点的に衛生管理を実施する場所の見直しや変更、モニタリング方法の変更を検討し、決定します。

施設によってはチームメンバーが異動することなどによる変更がありますので、メンバーの交代などの確認を行います。

チームには幅広い部署からのメンバーが参加しますので、入浴客からのクレームや評判、衛生管理に関連する経費、安心安全な入浴施設を提供することの営業上のメリット、洗浄や消毒実施時の工夫など、それぞれの部署からの情報の交換を行い、様々な観点から衛生管理を考察し、総合衛生管理プログラムと一般衛生管理を進めることが重要です。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、プログラムの運用やモニタリングの実施、一般衛生管理業務の修正・改善に活かします。話し合った内容や修正・改善した内容を記録に残します。^{注)}

チームの活動内容はその都度記録として残し、その後のプログラムの運用に活用します。

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ます。チームに参加して衛生管理に関する業務の改善や効率化を提案し、それが実践され、レジオネラ属菌が検出されない安全な状態を維持することを評価されることがモチベーションの維持にも役立ちます。

I-6. 総合衛生管理プログラムの運用計画の修正

改善(Action)の段階で総合衛生管理プログラムや一般衛生管理等の内容を修正・改善しましたので、計画(Plan)の段階に戻って総合衛生管理プログラムの運用計画を見直して修正します。引き続いて新しい計画に従ってプログラムを運用します。評価(Check)の段階においてプログラムの効果の判定・評価を行った結果、修正・改善の必要がない場合はこれまでの総合衛生管理プログラムの運用を続けます。

定期的に総合衛生管理プログラムの効果の判定・評価を行い、その結果に基づいて総合衛生管理プログラムを修正・改善し、衛生管理の状態を維持・向上することにより、安心・安全な入浴施設を提供することが重要です。

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

一般衛生管理のパートでは公衆浴場の衛生等管理要領、循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル及び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の内容を補足・解説するとともに、具体的な管理方法等を紹介しています。

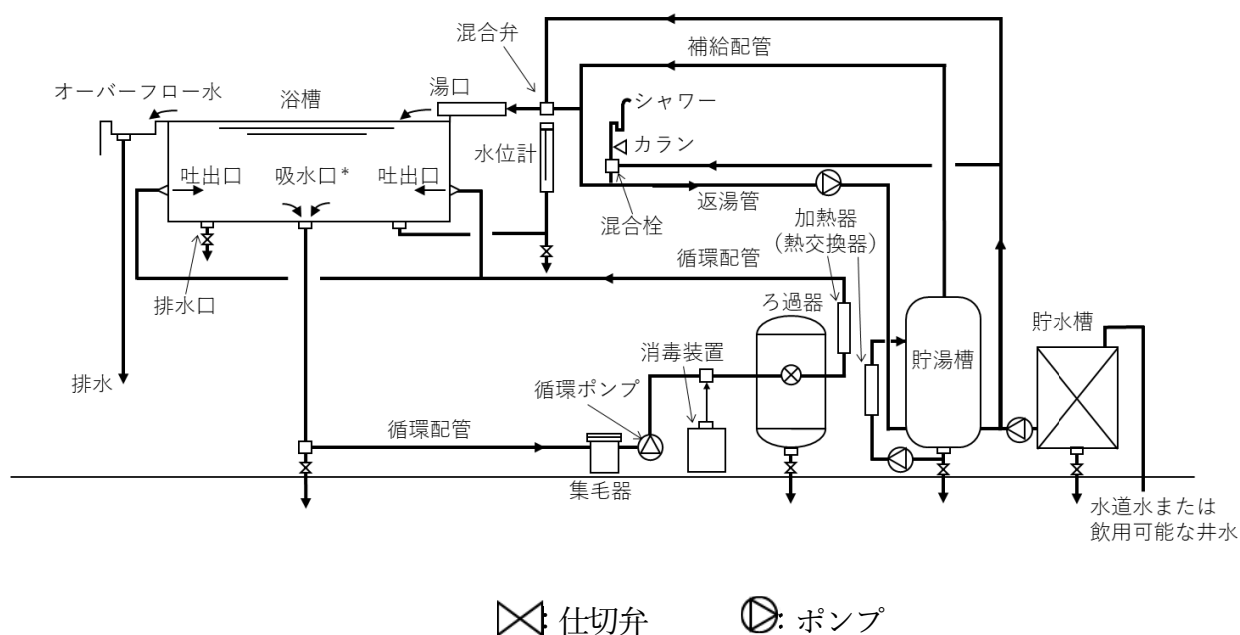
入浴施設の状況は規模、設置設備、原湯・原水の種類などにより様々です。そのため、ここで示している具体的な管理方法がすべての入浴施設に適用できるわけではありません。入浴施設におけるレジオネラ対策のための衛生管理の参考にしてください。

II-1. 全般

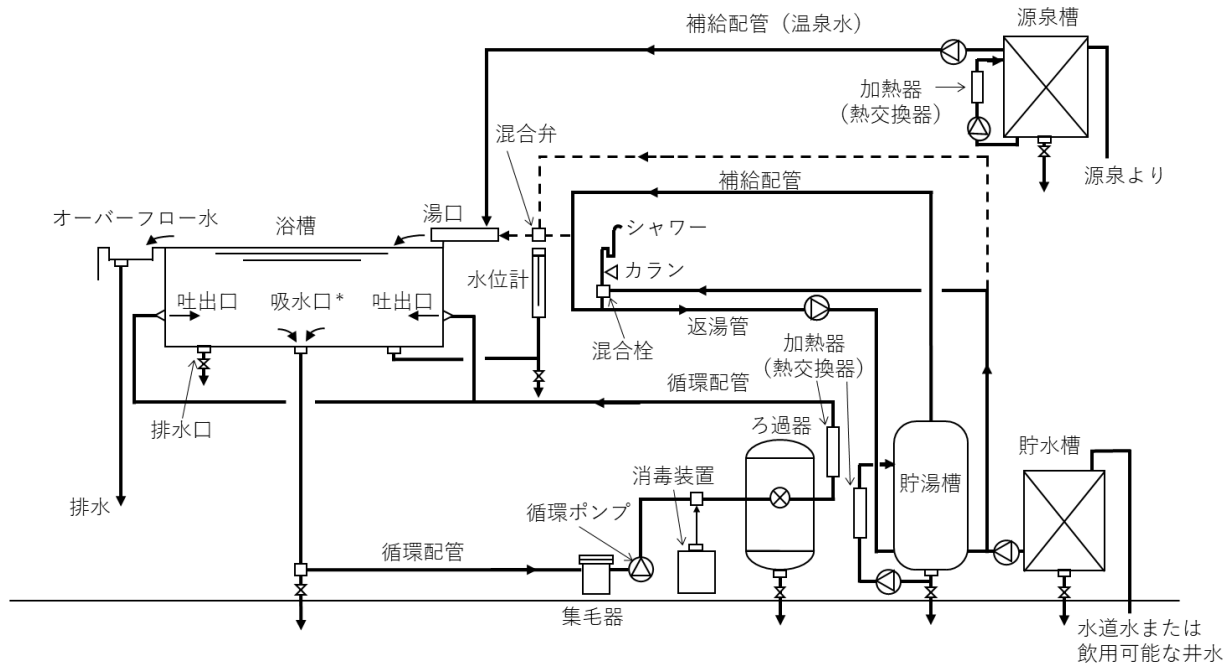
施設の各設備の洗浄方法並びに消毒方法等の具体的な手順、頻度、ポイントを定め、作業書・手順書を作成し、これに従って作業を行います。

浴槽の設備の概要の例を以下に示します。

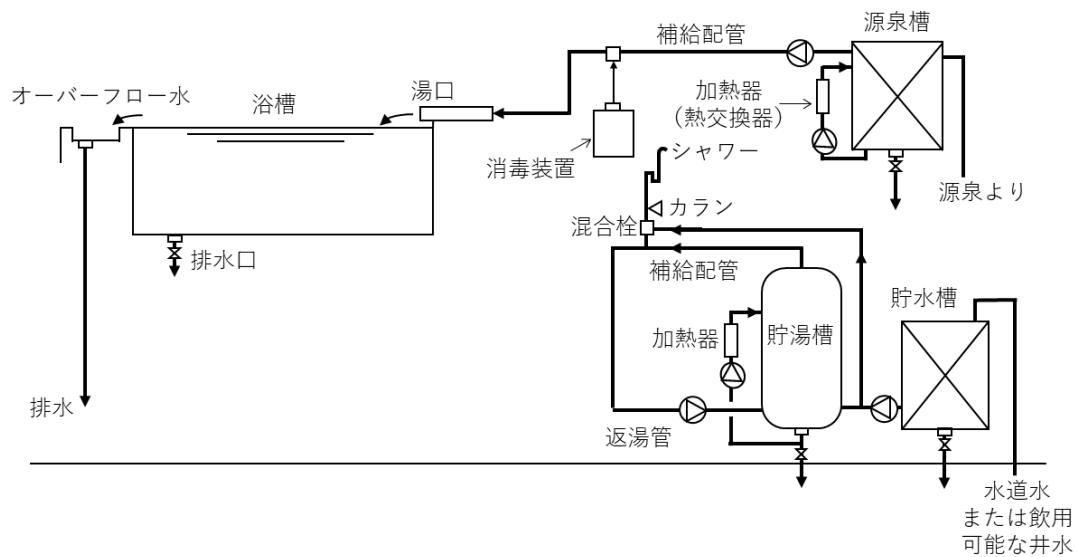
この図は水道水または井水を原水とする循環式浴槽施設の概要の例です。



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。



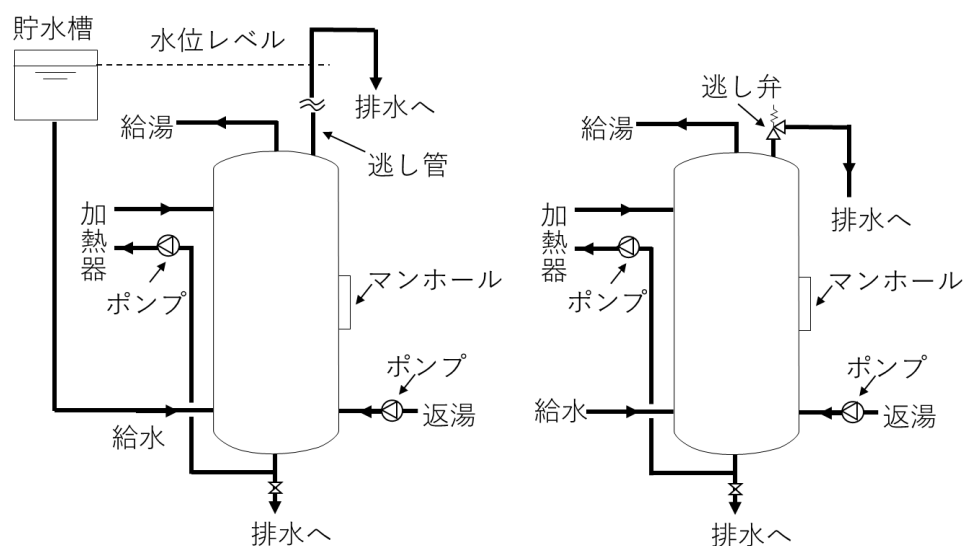
II-2. 貯湯槽

構造

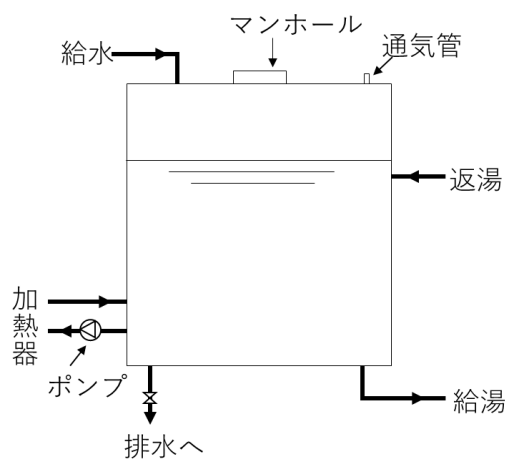
現行の公衆浴場における衛生等管理要領では貯湯槽は通常の使用状態において、湯の補給口、底部等に至るまで60℃以上に保ち、かつ、最大使用時においても55℃以上に保つ能力を有する加温装置を設置すること。それにより難い場合には、レジオネラ属菌が繁殖しないように貯湯槽水の消毒設備が備えられていること。貯湯槽は完全に排水できる構造とすることとしています。

貯湯槽には密閉式と開放式があります。密閉式貯湯槽は容器が密閉されて常に湯で満たされています。開放式貯湯槽は槽の上部に開口部があり槽内に空気が出入りする構造になっています。

密閉式貯湯槽



開放式貯湯槽



貯湯槽（源泉槽を含む）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することが推奨されます。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。

いずれのタイプの貯湯槽でも貯留する原湯はいつも 60℃以上に保ち、最大使用時であっても末端給水栓で 55℃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・湯栓（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、生物膜の形成を防ぐために系全体が 60℃以上に保たれることが推奨されます。

貯湯槽水を 60℃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 0.4 mg/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。消毒装置を設置しない場合は、一定時間ごとに所要量の塩素注入を行って遊離残留塩素濃度を保ちます。

設置例は少ないが、水道水や井水を原水とする開放式貯湯槽では水は給水用配管から供給され、加熱用配管から加熱器（ボイラー）を循環して加熱した温水が戻り、貯湯水を 60℃以上に保ちます。循環ポンプを設置する、湯が滞留しないように給水用・加熱用・返湯用配管を設置するといった構造にして、貯湯水の温度を均一にすることが推奨されます。

水道水や井水を 60℃以上に加熱して保つ密閉式貯湯槽では、温度の上昇により水は膨張して内部の圧が上がるので、圧力の上昇を防ぐために逃し管（または膨張管）あるいは逃し弁や密閉式膨張水槽を設置します。

管理

一般的管理として、外観での異常の確認（損傷、錆、腐食、漏れ等の有無）と温度計や圧力計の性能の確認などを定期的に行います。

貯湯槽の清掃方法は、現行の建築物環境衛生維持管理要領に準じて実施します。洗浄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。高圧洗浄では生物膜が残ることがあるので、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ための適したマスクの着用、換気の徹底、複数人による作業などに留意します。洗浄・消毒は上記の密閉式貯湯槽と同様にブラッシングで生物膜を取り除き、次亜塩素酸ナトリウム等で消毒します。

1) 密閉式貯湯槽

密閉式貯湯槽の管理方法として、60℃以上を保つことで生物膜形成やレジオネラ属菌の増殖を防ぎます。1年に1回以上完全に排水し、マンホールを開けて内部の付着物を取り除きます。

貯湯槽の底部は低温になりやすいので、温度が下がらないように管理する必要があります。

逃し管は長さが長いうえに末端が開放されているので、温度が下がりレジオネラ属菌が増えるリスクがあります。逃し弁は温度が下がりやすいために弁の内部に生物膜が形成されてレジオネラ属菌が増殖することがあります。貯湯槽内を 60℃以上に常時保つとともに、定期点検時に生物膜が形成されていないかを確認し、洗浄・消毒することが推奨されます。

2) 源泉槽や開放式貯湯槽

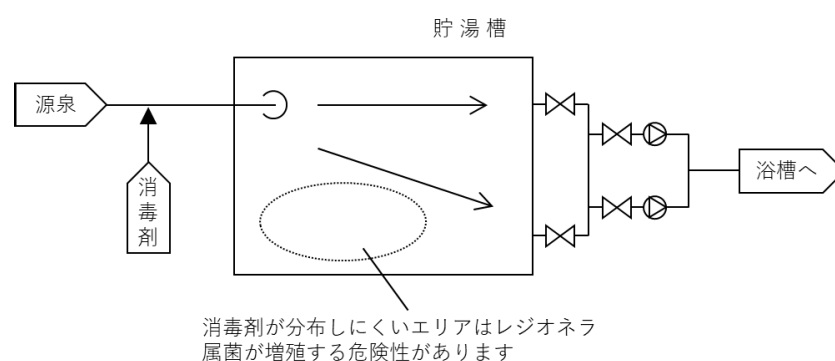
貯湯槽の湯の補給口から底に至るまでを 60℃以上に保つようにします。60℃以上に加温せず、40℃前後の水温で保つ場合は消毒剤を注入して生物膜が形成されないようにします。いずれの場合でも、水面と空気の境界あたりに生物膜が形成されやすいため、注意が必要です。槽内側の壁面等に生物膜ができていないかを目視、布や脱脂綿等によるふき取り、手触りやぬめりの有無などで観察し、少なくとも年 1 回は貯湯槽水を完全に排水して、内部の洗浄と消毒を行います。

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、通気管やオーバーフロー管の防虫網が破損するなどしていないか、マンホールの蓋がきちんと閉まっているかなどを月に 1 回など定期的に確認します。

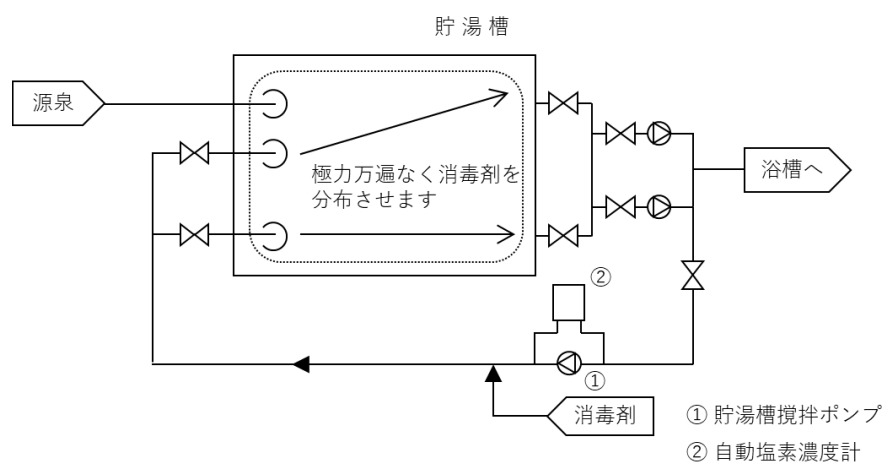
貯湯槽の底部は湯が停滞しやすく、上部よりも低温になったり、ごみが蓄積しやすいので、ドレインから底部の湯を排水したり、攪拌により槽内で湯を均等にすることが推奨されます。
(前項：構造を参照してください)

管理方法の事例紹介

消毒剤の注入方法によっては消毒剤が不均一に分布することがあります。次の 2 図では消毒剤の分布が不均一になりやすい例と、貯湯槽に消毒剤を投入する場合の改善例を示します。滴下注入するだけでは消毒剤が均等に分布せず、滞留により濃度が低下することがありますが、攪拌することにより均等にすることができます。



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。

II-3. 補給配管

構造

浴槽に補給する原湯や原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殖する可能性があり、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。

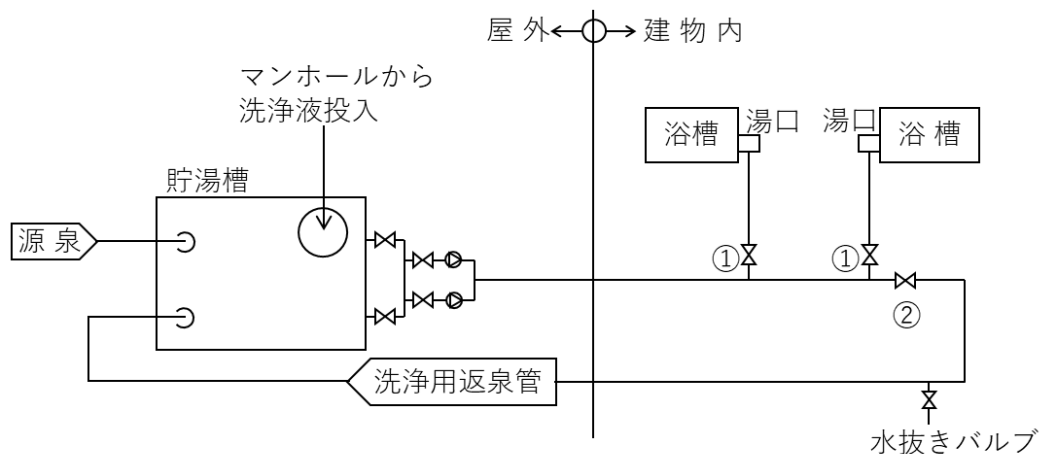
60℃以上の湯を貯めた貯湯槽から各施設への配湯管は、高温でも劣化せず、かつ配管内の湯の温度が下がりにくい材質のもの（耐熱性硬質ポリ塩化ビニル管など）を使用することが推奨されます。

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。

管理方法の事例紹介

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

II-4. 湯口

構造

現行の公衆浴場における衛生等管理要領では、浴槽における原水又は原湯の注入口は、循環配管に接続せず、浴槽水面上部から浴槽に落とし込む構造とすること。さらに循環してろ過された湯水は浴槽の底部に近い部分から補給される構造とし、当該湯水の誤飲及びエアロゾルの発生を防止することとしています。

湯口を水面よりも上に設置することで浴槽水が湯口から逆流することを防ぎます。また、循環水はレジオネラ属菌に汚染される危険性があるため、循環水が湯口から出ることがないようにすることでレジオネラ症患者の発生を防ぎます^注。

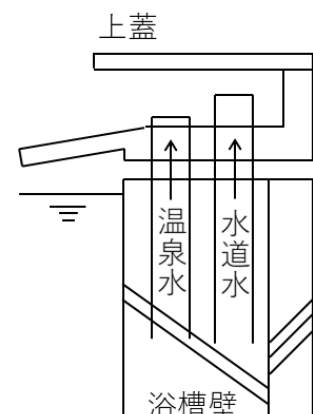
注：循環水を湯口から注入している浴槽では、ろ過器と循環配管の徹底した管理が必要です。

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。

管理方法の事例紹介

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、レジオネラ属菌が増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は、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



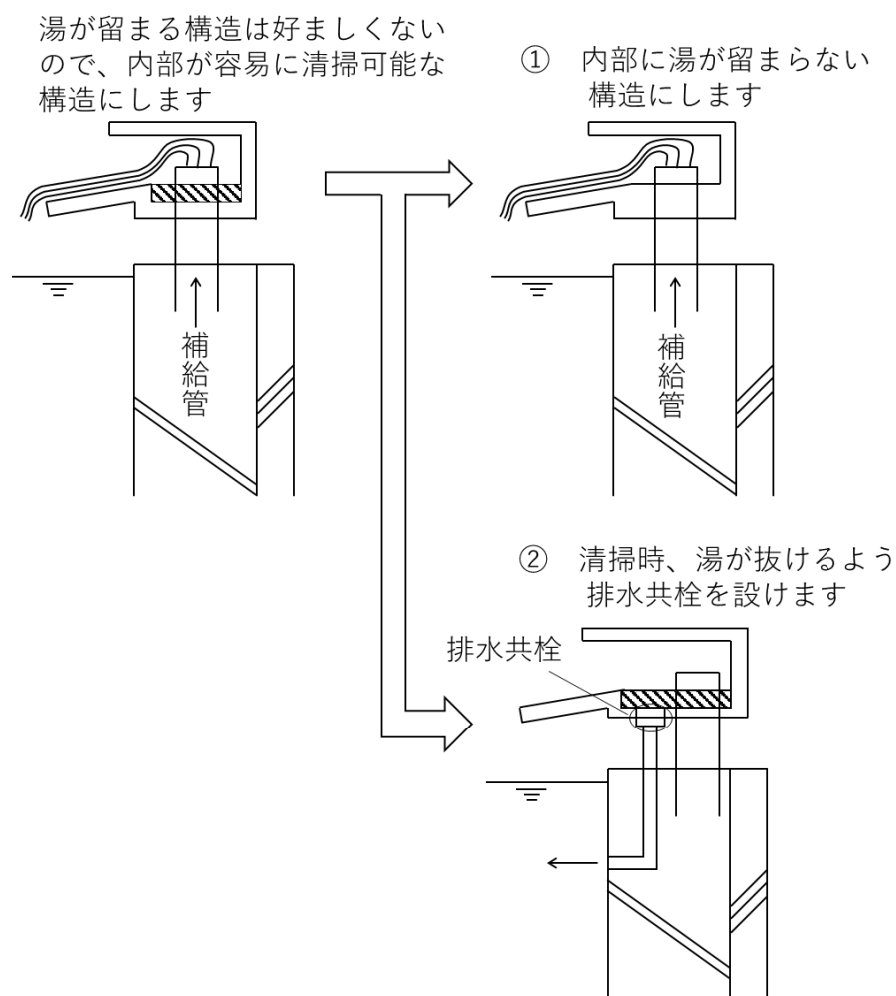
ように湯口内に別々の配管とし、水道水を上流側にします。内部は上蓋を外して洗浄・消毒します。

管理

湯口はレジオネラ属菌が増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て塩素系消毒剤で消毒することが生物膜やレジオネラ属菌を除くのに有効です。上蓋を開ける構造であれば内部を容易に洗浄・消毒することができます。

管理方法の事例紹介

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。



II-5. 浴槽

構造

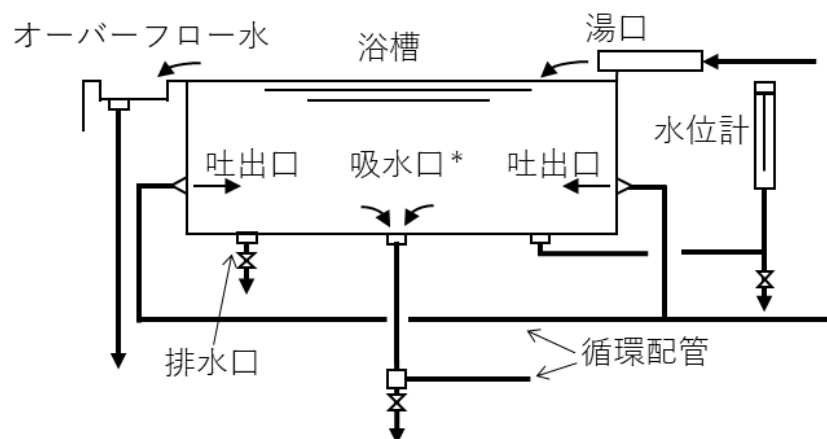
現行の公衆浴場における衛生等管理要領では、循環してろ過された湯水は浴槽の底部に近い部分から補給される構造とし、当該湯水の誤飲及びエアロゾルの発生を防止すること。さらに、内湯と露天風呂の間は、配管等を通じて、露天風呂の湯が内湯に混じることのない構造であることとしています。

循環式浴槽では、循環水の吐出口を浴槽の底部に近い部分に設置することで循環水からのエアロゾルの発生を防ぎます。また、露天風呂は土ぼこりが入りやすく、レジオネラ属菌の増殖の危険性が高いので、内湯と露天風呂を配管で接続しないことで配管を通じて露天風呂の湯が内湯に混じることを防ぎます。

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。

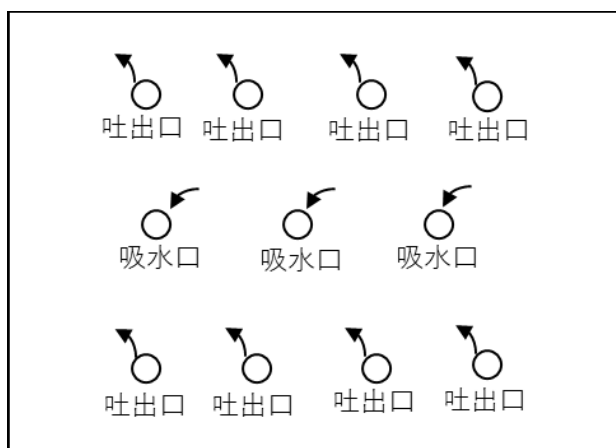
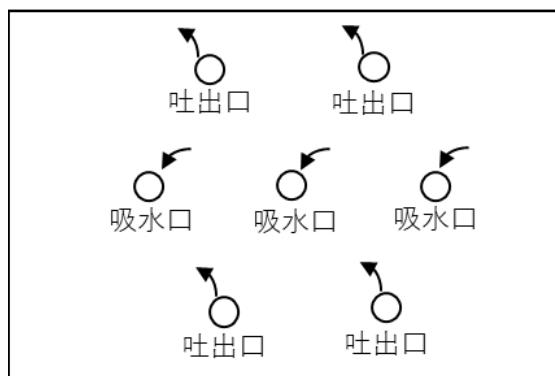
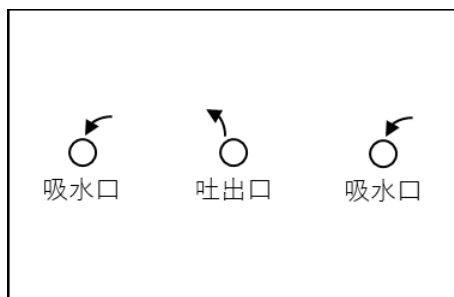
循環式浴槽の基本的な構造を示します。



設置に関する事例紹介

新たに浴槽を設置する場合には、循環水が浴槽内で部分的に滞留して消毒剤の濃度が低下することがないように浴槽水の流れを考慮して吐出口と吸水口を配置することがレジオネラ対策になります。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水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、ろ過器の能力、入浴客による吸水の妨害の有無などにより増減します。



管理

1) 浴槽

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では、浴槽の湯を適温に保ち常に満水状態とし、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。さらに、毎日完全に換水して浴槽を清掃する。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するとしています。

洗浄するだけでは生物膜を取りきれませんので、必ず消毒も行います。循環式浴槽では浴槽とろ過器及び循環配管を同時に洗浄・消毒しますので、消毒方法の例をⅡ-6. 循環配管の項で示します。

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に洗浄・消毒を行い、生物膜の形成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濃度の維持が困難な場合などが挙げられます。

日常の洗浄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Ⅱ-6. 循環配管の項の注を参照してください。

現行の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、浴槽の清掃・消毒の効果を確認する方法として ATP 拭き取り検査を紹介していますので、ここに引用します。

Q：浴槽の清掃・消毒の効果を確認する方法はありますか。

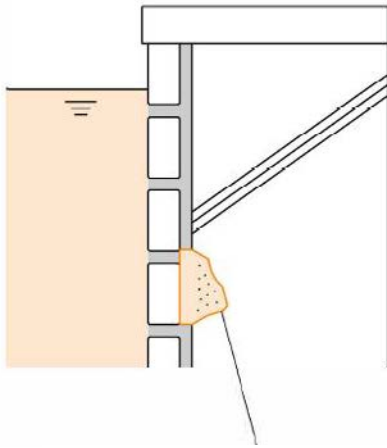
A：ATP 拭き取り検査を行うことにより、浴槽壁等の生物膜の残存量を現場で迅速に確認できます。厚生労働科学研究により、浴槽壁等の 10cm 四方を専用綿棒で拭き取った時の清浄度基準値（1,000 RLU）が提案されており、この値以上であれば拭き取り試料中のレジオネラの検出率が有意に増加します。この方法を利用すると、汚染場所が特定でき、洗浄効果が確認できるため、洗浄方法の最適化が可能となります。ちなみに、高圧洗浄に頼るよりもブラシ主体の洗浄が効果的で、さらにブラシ後の高濃度塩素消毒が有効であり、目地は洗浄しにくいというデータが得られています。

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洗浄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。



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



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

2) 浴槽水

浴槽水の消毒は、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を 0.4 mg/L 程度を維持し、1 mg/L を超えないようにし、モノクロアミンで行う場合は、結合残留塩素濃度 3 mg/L 程度を維持するとされています（公衆浴場の衛生等管理要領）。

遊離残留塩素濃度の測定方法には、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。モノクロアミンを使用している場合は結合残留塩素濃度を測定します。

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。

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

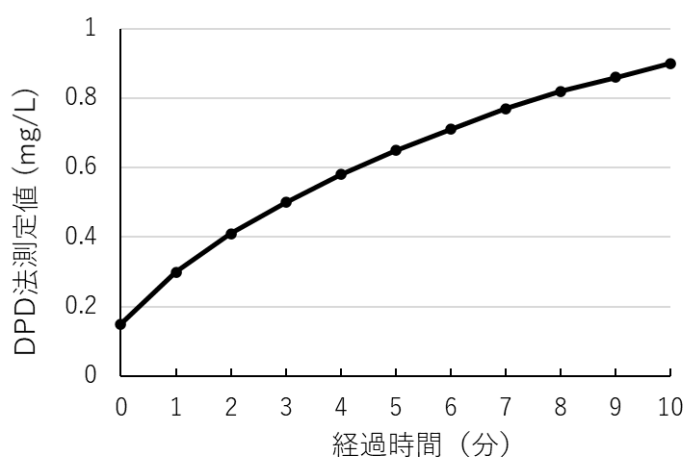
注：消毒剤として塩素化イソシアヌル酸またはその塩を使用している場合、有機物は全有機炭素 (TOC) 量ではなく、過マンガン酸カリウム消費量を測定します。全有機炭素 (TOC) は、塩素化イソシアヌル酸またはその塩由来の炭素も合わせて有機物量として測定するため、測定値が有機物汚れの有機物量よりも高くなることがわかっています。

(2) 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。塩素系消毒剤の注入、遊離残留塩素の消失、溢水や加水、入浴者数などの要因により濃度が容易に変化します。基準値を下回ると生物膜が形成され、レジオネラ属菌が増殖する可能性がありますので、頻繁に濃度を測定して低ければ上げるようにする必要があります。濃度が低い状態が頻繁に発生すると徐々に生物膜が形成され、その除去に余計な作業や経費が発生する可能性があります。測定方法や採水場所、採水方法、測定頻度などを細かく定めた作業書・手順書を作成し、それを守ることが非常に重要です。

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、右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。

II-6. 循環配管

構造

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では循環してろ過された湯水は浴槽の底部に近い部分から補給されるようにし、また配管内の浴槽水が完全に排水できるような構造とすること、さらに図面等により、配管の状況を正確に把握し、不要な配管を除去することとしています。

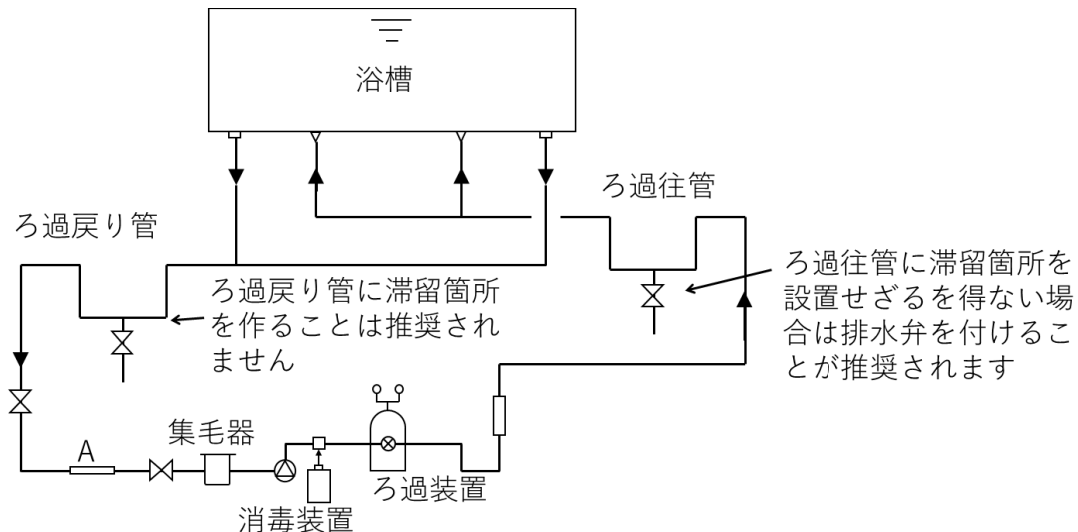
補給配管の項で説明しているように、逆流並びに汚染防止のために、循環配管に給湯配管あるいは給水配管を直接接続しないこととされています。循環配管及びそれに接続されているろ過器は、レジオネラ属菌が増殖する可能性が他の設備よりも高いため、汚染菌が給湯配管や給水配管に逆流して汚染しないようにします。

管理方法の事例紹介

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殖す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（次頁の図の 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生物膜やスケールの拭き取り検査が可能になります。

管理

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では 1 週間に 1 回以上、ろ過器を十分に逆洗浄して汚れを排出するとともに、ろ過器及び循環配管について、適切な方法で生物膜を除去、消毒することとしています。そこで、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



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5～10 mg/L の遊離残留塩素濃度^{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遊離残留塩素濃度を下げて排水します。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。循環配管洗浄の際は、水位計配管や連通管も同時に行うようにしてください。詳細はⅡ-1 2. 水位計及び水位計配管及びⅡ-1 3. 連通管の項を参照ください。

注：現行の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あるいは循環時間を短くしたい場合は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）

管理方法の事例紹介

ろ過器と循環配管の日常の高濃度塩素消毒の操作の1例を紹介します。これは日常の残留塩素濃度の常時維持と週に1回以上の高濃度塩素洗浄を行って生物膜の形成を防ぐことを基本にしています。日常的な高濃度塩素による洗浄を行わずに1年に数回の生物膜を除去するための大がかりな洗浄を行うやり方では、生物膜が形成されてレジオネラ属菌が増殖する危

険性があります。これを防ぐために日ごろから生物膜を生成させない維持管理が求められます。これを行うことで 1 年に数回行う大がかりな生物膜を除去するための洗浄の回数を減らすことが可能です。ただし、温泉水などで無機質のスラッジやスケールが生成する場合は、それらを除去するための洗浄を行います。

浴槽水の全換水の時に行うのが一般的ですが、汚れ具合や生物膜の形成状況により回数を増やし、集毛器に生物膜が出るようであれば毎日実施することを検討します。

- ① 浴槽の水位を下げるとともに（同時にろ過器の逆洗）、薬品（塩素剤、中和剤）を準備します。
- ② 循環しつつ浴槽に塩素剤の計算量（有効塩素 20g 相当分×水量（ m^3 ））を投入します。
ここでは遊離塩素濃度 20mg/L での実施として計算しています。塩素剤には次亜塩素酸ナトリウムやジクロロイソシアヌル酸ナトリウムなどを使用します。
- ③ 浴槽配管系（ろ過器を含む）を 1 時間程度循環させます。
普段、流れの悪い箇所（出来れば水位計配管、連通管）も循環します。遊離塩素濃度を測定し（この場合は試験紙でよい）、濃度が低下していれば塩素剤を追加投入します。
発泡が少なければ汚れが少なく、多ければ汚れが溜まり、生物膜が形成されていることを推測することができます。
- ④ 中和を必要に応じて実施します。下水放流の場合は中和しないやり方もあります。
- ⑤ 排水します。（同時にろ過器の逆洗）
- ⑥ 浴槽内の物理的清掃を行います。

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、徹底的な洗浄・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、過酸化水素水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、汚れが酷ければ実施の頻度を増やす、汚れが少なければ頻度を減らす等の対策が望めます。日常的に週に複数回の高濃度塩素消毒を行うことにより生物膜形成が抑えられれば、専門的知識を要する徹底的な洗浄・消毒の頻度を減らすことができます。

温泉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めます。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。

ろ過器は設置されておらず、浴槽水を加温したり温度を均一にするためにポンプで循環し

ている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（過マンガン酸カリウム消費量、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。

管理方法の事例紹介

泉質の影響を配慮した浴槽水と循環水の消毒方法の例を紹介します。

泉質	発生する現象	対応
・水道水を使用する ・中性で温泉の含有成分（鉄、マンガン、アンモニウムイオン、過マンガン酸カリウム消費量）が少ない		・次亜塩素酸ナトリウム等の塩素系消毒剤を使用する ・遊離塩素濃度を 0.4～1.0mg/L として管理する
・弱アルカリ性～アルカリ性（pH 9 以上）	・遊離塩素の効果が低下する	・高めの遊離塩素濃度で管理する ・モノクロアミン、臭素剤、二酸化塩素を使用する
・硬度成分が多い	・次亜塩素酸ナトリウムでは注入弁がスケールで詰まりやすい	・次亜塩素酸ナトリウムを使用する場合は消毒剤注入弁を定期的に洗浄する、あるいはスケール対策をした注入弁を使用する ・次亜塩素酸ナトリウムに替えて塩素化イソシアヌル酸消毒剤などを使用する
・鉄、マンガニオンが多い	・遊離塩素が消費される ・湯や浴槽壁面の着色 ・沈殿物（スラッジ）ができる	・マンガン対策としてはモノクロアミンを使用することで緩和されることがある
・硫化水素、硫黄成分が多い ・過マンガン酸カリウム消費量成分（例えば腐植質）が多い	・残留塩素が消費される	・過マンガン酸カリウム消費量成分による残留塩素の消費の場合、モノクロアミン使用で消費量が緩和されることがある ・非塩素系消毒剤（カチオン系など）を使用する ・かけ流し式浴槽として、源泉から浴槽の清掃を徹底する
・アンモニウムイオンが存在する	・遊離塩素が消費される ・結合塩素生成により刺激臭が発生する	・モノクロアミンや二酸化塩素を使用する

II-7. ろ過器

構造

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では、ろ過器は浴槽ごとに設置することが望ましく、1 時間当たり浴槽の容量以上（配管やろ過器等の容量も考慮）のろ過能力を有し、かつ、逆洗浄等の適切な方法でろ過器内のごみ、汚泥等を排出することができる構造であることとしていま

す。

浴槽ごとにろ過器を設置するのは、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。

ろ過方式等は現行の循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルを参照してください。

管理

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では1週間に1回以上、ろ過器を十分に逆洗浄して汚れを排出するとともに、ろ過器及び循環配管について、適切な方法で生物膜を除去、消毒としています。

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残留塩素濃度が低下し、生物膜が形成されやすくなります。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。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。

管理方法の事例紹介

泉質が酸性である入浴施設ではろ過器と循環配管の内部を洗浄・消毒するために塩素剤を高濃度で投入すると pH 等の条件によっては塩素ガスが発生する危険性があります。このような危険性がある場合はろ過器と循環配管内の湯水を水道水に置き換えて高濃度塩素消毒を実施する方法があります。pH6未満の酸性泉ではレジオネラ属菌をはじめとする微生物汚染の程度が少ないという報告^{文献)}がありますので、汚染程度を勘案のうえ高濃度塩素消毒の頻度を設定します。

文献：烏谷竜哉、ほか：厚生労働科学研究費補助金、地域健康危機管理研究事業、掛け流し

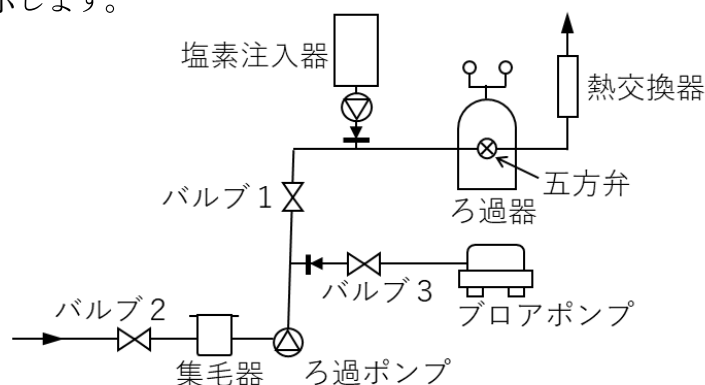
式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究「掛け流し式温泉における病原微生物汚染の実態調査、微生物汚染に影響を及ぼすリスク要因」、平成 18 年度総括・分担研究報告書、pp99-141

管理方法の事例紹介

アルカリ性温泉水の場合には、日常の消毒を遊離塩素で行っているのであれば、水道水で置き換えずに高濃度塩素による消毒を実施することができます。モノクロアミンで消毒しているのであれば、高濃度のモノクロアミンで消毒します。また、過酸化水素水による配管洗浄も行うことができ、アルカリ性温泉水では発泡が強く起こります。

管理方法の事例紹介

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浄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底部から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ーをろ過器底部から吹き込み、30 分程度攪拌した後、ブロアポンプを停止します。攪拌することでろ材から生物膜が剥離して生物膜の除去とろ材の洗浄の効果が上がり、さらに生物膜中に

潜むレジオネラ属菌と塩素の接触を促進します。

- ⑩ バルブ 2 を開けて通常の逆洗・洗浄を行います。

II-8. 集毛器

構造

現行の公衆浴場の衛生等管理要領ではろ過器に毛髪等が混入しないようろ過器の前に集毛器を設けることとしています。

集毛器はろ過器の前に設置しなければなりません。毎日洗浄・消毒する必要があるため、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が推奨されます。

管理

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では集毛器の清掃洗浄・消毒は毎日行うとしています。

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と効率的です。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 II-6. 循環配管の管理の注（41 ページ）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。集毛器の内部も洗浄し、消毒剤で消毒します。

II-9. 熱交換器

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（廃熱）と補給水を熱交換する装置の 2 種類があります。II-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。熱交換器の 2 次水（熱交換器で温められて出ていく水）が 42℃前後の場合はレジオネ

ラ属菌が増殖する危険性がありますので、生物膜やスケールの除去を確実に行うことが推奨されます。スケールやスライムは熱伝導率が小さく、熱交換器の効率を低下させること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。

II-10. 消毒装置

構造

現行の公衆浴場における衛生等管理要領ではろ過器内は生物膜が形成されやすくレジオネラ属菌が増殖する可能性が高いため、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することとしています。

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、塩素系消毒剤の場合は残留塩素濃度の変化を測定しながら添加量を調整します。装置の故障による異常な濃度の発生、浴槽の形状などによる残留塩素濃度の不均一な分布などがあるため、残留塩素濃度測定機能がある消毒装置であっても、個別に浴槽水の遊離残留塩素濃度を測定することが推奨されます。測定方法はII-5. 浴槽 管理 2) 浴槽水を参照してください。

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ので使用を避けます。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いかなど、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。注入弁は定期的に洗浄し、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。

II-11. 気泡発生装置等

構造

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では気泡発生装置等を設置する場合には、連日使用している浴槽水を用いる構造でないこと。また、点検、清掃及び排水が容易に行うことができ、空気取入口から土ぼこりや浴槽水等が入らないような構造であることとしています。

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。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、洗浄・消毒や排水が容易にできる構造にすることが推奨されます。

管理

エアロゾルを発生させる装置であるため、現行の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することを推奨しています。

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洗浄と消毒を行います。気泡発生装置やジェット噴射装置は高濃度塩素あるいは過酸化水素水での洗浄・消毒時に装置稼働させることで内部を洗浄することができます。気泡発生装置は浴槽水換水の都度、気泡板を取り外し、内部を洗浄後、完全に排水します。ジェット噴射装置は浴槽水換水の都度、ジェット配管内部の高濃度塩素洗浄を行います。

管理方法の事例紹介

気泡発生装置のエア吸引込み配管の洗浄方法の例を示します。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引込みやすく、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。



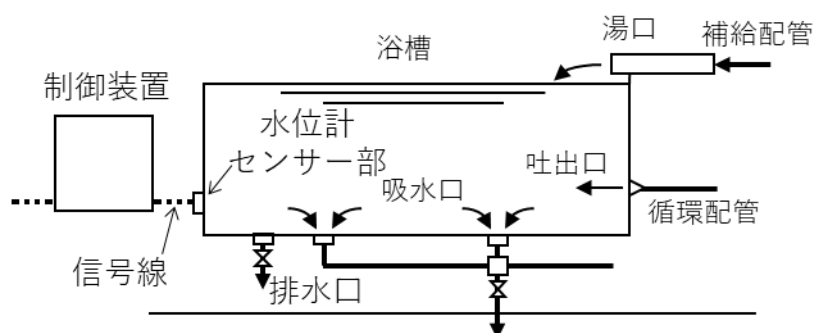
ホースや中央の写真のパイプを用いると
水が吸引され洗浄されます

II-12. 水位計及び水位計配管

構造

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では水位計の設置は、配管内を洗浄・消毒できる構造、あるいは配管等を要しないセンサー方式であることとしています。

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、レジオネラ属菌が増殖し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を使用することはレジオネラ属菌の発生の危険性を低くすることになります。



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、循環系と水位計配管を一時的に繋ぐバイパス配管を設けて循環系の洗浄・消毒時に水位計配管内を定期的に洗浄できる構造とし、さらに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することで、配管内部での生物膜の形成を防ぐことができます。

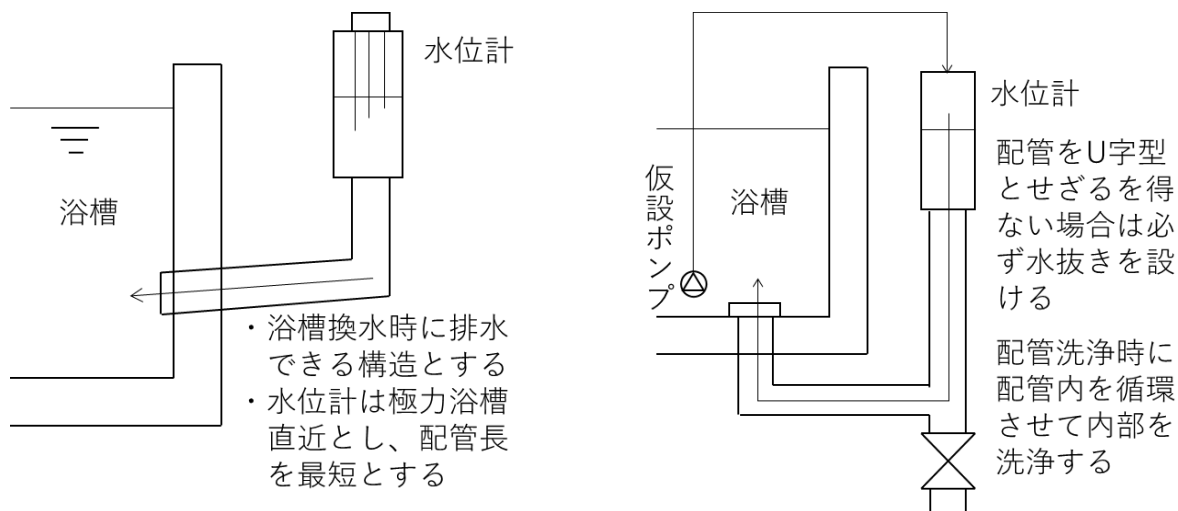
管理

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では少なくとも週に1回、適切な消毒方法で生物膜を除去することとしています。

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水等で洗浄・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、それに応じて内部の生物膜を取り除きます。必要に応じて分解・洗浄します。

管理方法の事例紹介

仮設水中ポンプで強制的に消毒剤を流すことで生物膜を除去しやすくなります。また、喫水部と電極部をよく洗浄します。終了後はきれいな水で内部を洗います。



II-13. 連通管

構造

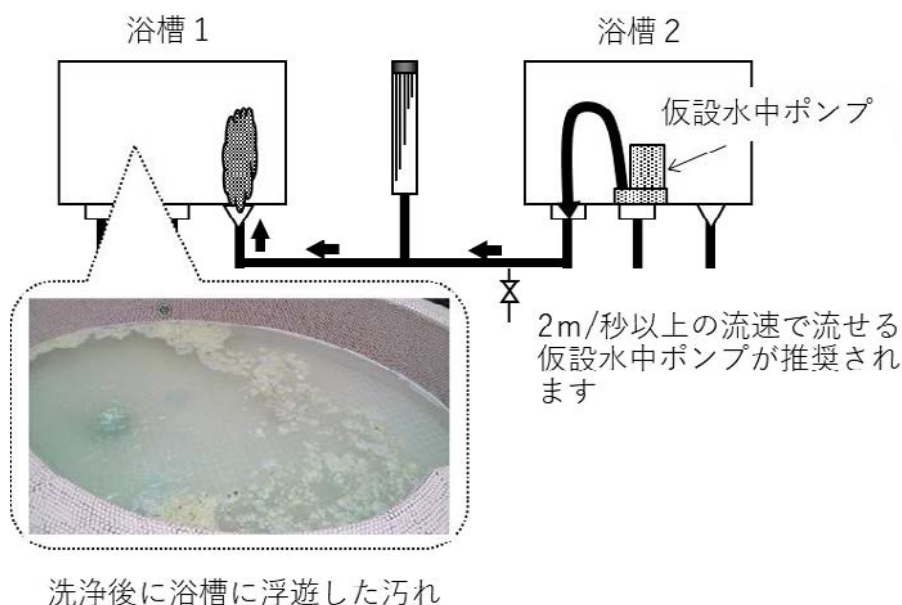
1台のろ過器で複数からの浴槽の浴槽水を処理する場合、浴槽水位を調整するため、複数の浴槽を繋ぐ配管を設けることがあります。生物膜が蓄積しやすく、レジオネラ属菌が増殖しやすい場所の一つです。そのため、ろ過器を浴槽ごとに設置することが推奨される理由の1つになっています。

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。

管理方法の事例紹介

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 2 m/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。



II-14. オーバーフロー回収槽

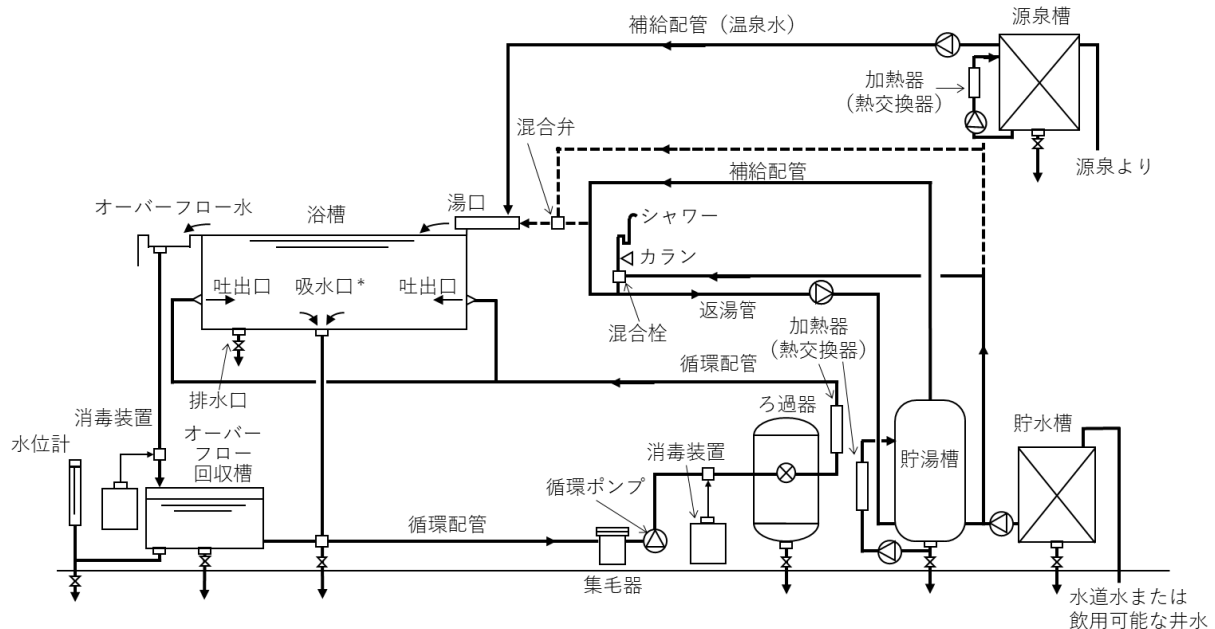
オーバーフロー回収槽はレジオネラ属菌の増殖が起きやすいことから、現行の公衆浴場の衛生等管理要領ではオーバーフロー水及びオーバーフロー回収槽（以下「回収槽」という。）内の水を浴用に供する構造になっていないこと。ただし、これにより難しい場合には、オーバーフロー還水管を直接循環配管に接続せず、回収槽は、地下埋設を避け、内部の清掃が容易に行える位置又は構造になっているとともに、レジオネラ属菌が繁殖しないように、回収槽内の水が消毒できる設備が設けられていることとしています。

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、内部の洗浄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

現行の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オーバーフロー回収槽内部は常に清浄な状態を保つために回収槽の壁面の清掃及び消毒を頻繁に行い、レジオネラ属菌が繁殖しないように、別途、回収槽の水を塩素系薬剤等で消毒する等の衛生管理を適切に行う必要があります。(常時遊離残留塩素濃度を 0.4～ 1.0mg/L に維持するとともに、1 週間に 1 回以上完全に排水して回収槽の壁面の清掃及び消毒を行い、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しい。) としています。

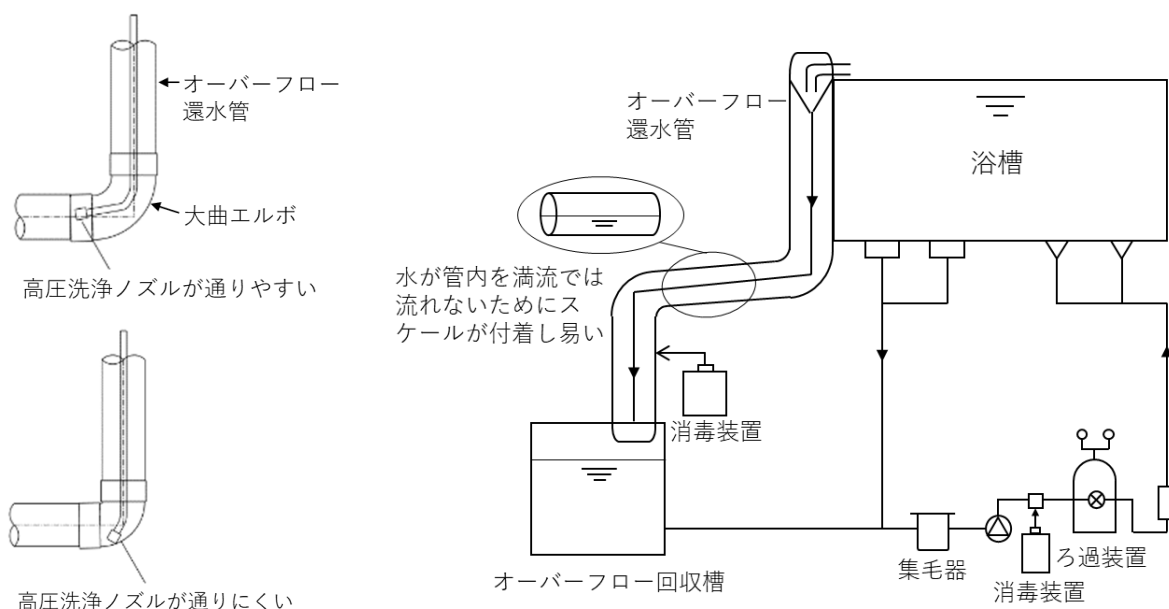
レジオネラ属菌が増殖しないように別途回収槽の水を塩素系薬剤等で消毒します。遊離残留塩素濃度を 0.4～1.0 mg/L に維持します。

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洗浄し、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。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しいとされています。

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。

管理方法の事例紹介

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。オーバーフロー還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。オーバーフロー還水管の曲部には大曲エルボ（配管の屈曲部で用いる緩やかに曲がる継手管）を使用すると高圧洗浄ノズルが通りやすいというメリットがあります。

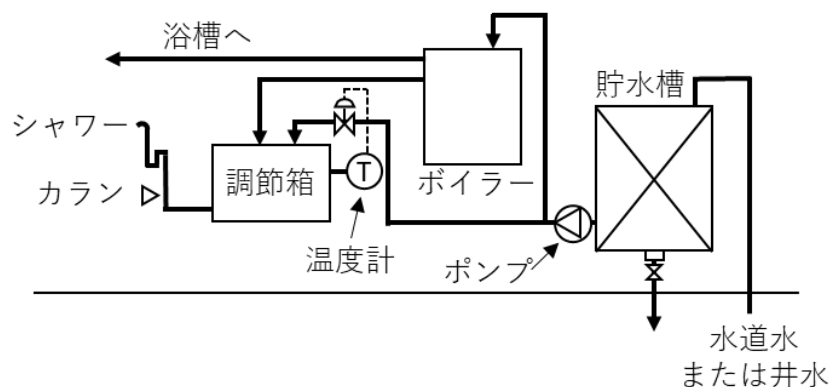


II-15. 調節箱

構造

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では調節箱を設置する場合は清掃しやすい構造とし、レジオネラ属菌が増殖しないように、薬剤注入口を設けるなど塩素消毒等が行えるようにすることとしています。

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、貯留する槽です。1 例としては、幅 1 m、奥行き 60 cm、高さ 60 cm 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、約 80℃ ほどの沸かし湯と貯水槽からの水とを混ぜて 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

現行の公衆浴場の衛生等管理要領では生物膜の状況を監視し、必要に応じて清掃及び消毒することとされています。

水道水を原水とする場合は沸かし湯と混ぜるために遊離塩素濃度が足りず、地下水の場合は遊離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0.4～1.0 mg/Lに保たれるように調節箱に塩素剤を注入できる装置を設置する必要があります。さらに定期的に（毎日が推奨されます）洗浄して常に生物膜がない状態を保ちます。

管理方法の事例紹介

ひと月に1回程度、調節箱を空にして内部をブラッシング等により洗浄し、内部を消毒するとともに高濃度塩素消毒剤で湯栓（カラン）とシャワーの末端までを満たして消毒する方法があります。消毒方法はⅡ-16. シャワー、打たせ湯を参照してください。

Ⅱ-16. 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、レジオネラ属菌を含む危険性がある循環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、レジオネラ属菌が増殖しやすくなります。

管理

現行の公衆浴場における衛生等管理要領では、できるだけシャワー内部に水が滞留しない

ように少なくとも週に 1 回、内部の水が置き換わるように通水するとともに、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、消毒するなどの対策を行うこととしています。

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。シャワーや湯栓（カラン）の給水・給湯に井水等の塩素消毒していない水を用いる場合は、補給配管の経路に消毒装置を設置することが望ましいです。

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)}

管理方法の事例紹介

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 10～50 mg/L の液に 1～3 時間漬けて置いて消毒します。濃度と時間は生物膜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。洗浄と消毒の効果は洗浄前あるいは漬けて置きの前と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。漬けて置きの後の ATP 値が 0 に近い値であれば効果ありとなります。また、洗浄または漬けて置きの 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。

管理方法の事例紹介

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^{注)}。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 500 mg/L 程度）、12%次亜塩素酸ナトリウムの 200 倍希釈液（塩素濃度 600 mg/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 600 mg/L 溶液（水 1 L に顆粒 1 g 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増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。給水・給湯配管や貯湯槽、調節箱等の上流の設備の調査も必要です。

II-17. 原水、原湯の管理

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。水質等は現行の「公衆浴場における水質基準等に関する指針」を参照してください。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水質基準の適用が除外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（10cfu/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の有機物の測定はII-5. 浴槽 管理 2) 浴槽水 (1) 水質検査の項の注を参照してください。

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10mLに陽性検体100μLを接種し、44.5℃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。

II-18. 上がり用湯、上がり用水の管理

上がり用湯、上がり用水も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。水質基準は原水、原湯と同じです。

II-19. 排水

公衆浴場の衛生等管理要領では浴室内の排水口を適宜清掃、汚水を適切に排水すること、排水設備（排水溝、排水管、汚水ます、温水器（排湯熱交換器）等）は適宜清掃し、防臭に努め、常に流通を良好に保ち、1か月に1回以上消毒することとしています。

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。例えば、高濃度塩素洗淨の実施後に公共用水域に排水する場合は残留塩素の中和処理を行うなど、環境保全のために必要な処理を行います。

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
衛生管理手法のための研究」

研究代表者 国立感染症研究所 前川純子

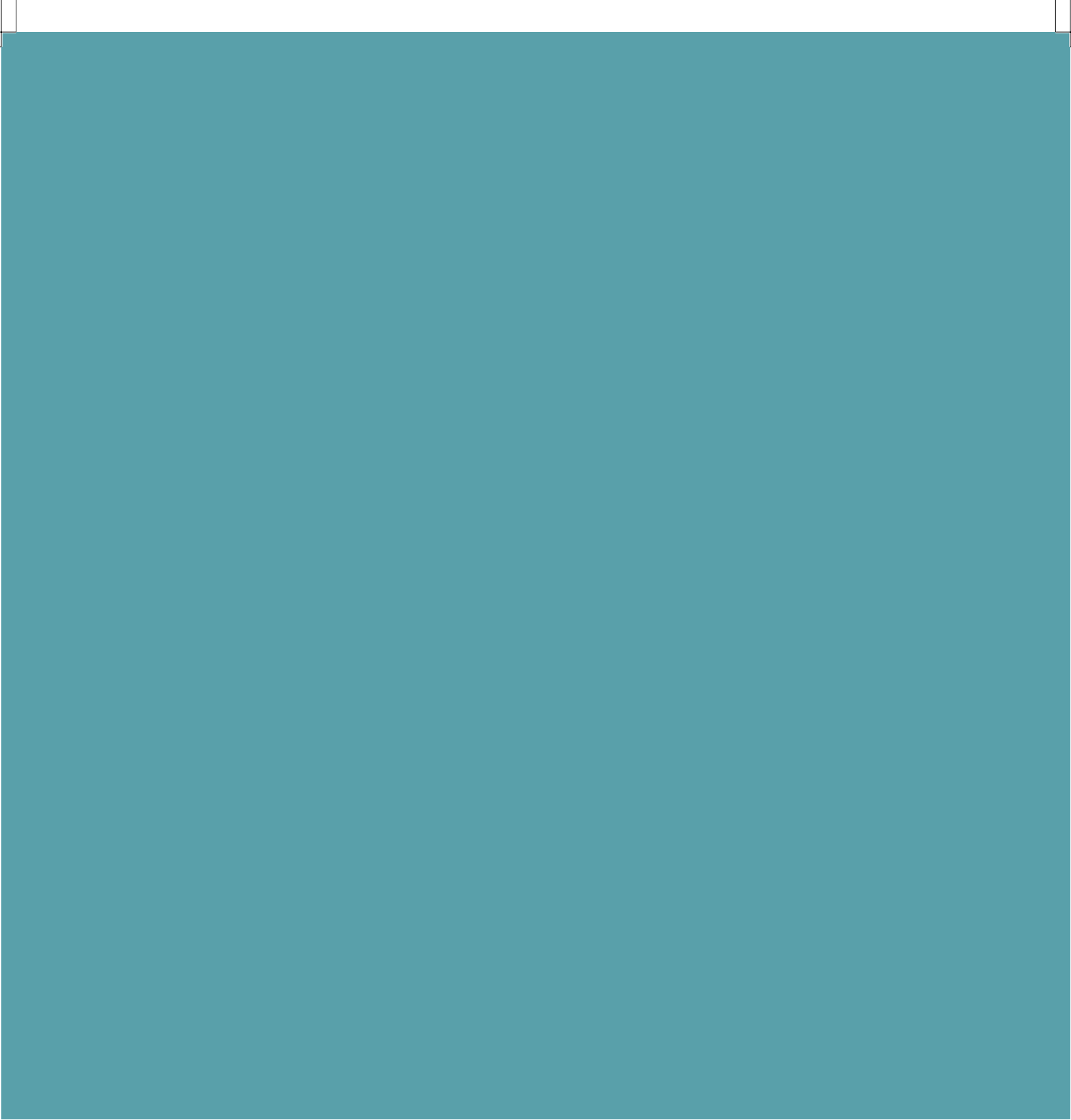
研究課題

「入浴施設の衛生管理及び疫学調査ガイドラインの作成」

入浴施設の衛生管理の手引き

作成ワーキンググループ

代表	研究分担者	岡山理科大学	黒木俊郎
	研究分担者	北海道立衛生研究所	森本 洋
	研究分担者	富山県衛生研究所	金谷潤一
	研究分担者	神戸市環境保健研究所	中西典子
	研究分担者	長崎県環境保健研究センター	田栗利紹
	研究分担者	大分県衛生環境研究センター	佐々木麻里
	研究協力者	仙台市衛生研究所	大森恵梨子
	研究協力者	東京都健康安全研究センター	武藤千恵子
	研究協力者	神奈川県衛生研究所	大屋日登美
	研究協力者	神奈川県衛生研究所	陳内理生
	研究協力者	神奈川県衛生研究所	中嶋直樹
	研究協力者	富山県衛生研究所	磯部順子
	研究協力者	大阪健康安全基盤研究所	枝川亜希子
	研究協力者	広島県衛生研究所	平塚貴大
	研究協力者	愛媛県今治保健所	藤江香予
	研究協力者	愛媛県立衛生環境研究所	浅野由紀子
	研究協力者	大分県薬剤師会検査センター	緒方喜久代
	研究協力者	国立感染症研究所	倉 文明
	研究協力者	一般財団法人日本環境衛生センター	中臣昌広
	研究協力者	株式会社ヤマト	斉藤利明
	研究協力者	株式会社ヘルスビューティー	藤井 明
	研究協力者	アクアス株式会社	縣 邦雄
	研究協力者	柴田科学株式会社	石森啓益



公衆浴場等入浴施設が原因と疑われる レジオネラ症調査の手引き

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



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の手引き

1. 手引き作成の趣旨

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。この手引きは、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。本手引き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。

2. 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（患者発生が散發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。

3. 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）を基に患者（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 10 日以内に、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、調査票等を用い、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、「4. 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「5. 施設の調査」を参考に施設の調査を行い、必要に応じて「6. 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。

4. 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

4-1. 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う、又は受取に行く。送付してもらう場合、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。

4-2. 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) 喀痰等で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方衛生研究所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ので）。

5. 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、調査者はマスクや手袋を着用する、消毒用アルコールを携帯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 2-1、別添 2-2）を基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（下記 注）ATP 簡易測定について を参照）。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。

入浴施設において調査する内容は以下の通り。

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

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
- ・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にくい構造かの確認

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
- ・浴室排水が混入しにくい構造かの確認

- ・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、岩盤浴など)

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といふ。
 - ・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、他の利用客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といふ。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

なお、ATP 量はレジオネラ属菌増殖と必ずしも相関せず、ATP 量が少なくてもレジオネラ属菌が検出されることがある。

6. 施設のレジオネラ属菌検査

レジオネラ属菌の発生源となりうる箇所の採水等にあたっては、マスクや手袋を着用する、消毒用アルコールを携帯するなど感染防止対策をとる。

▽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。

6-1. 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。

6-2. 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

給湯栓を開いてすぐに必要量の湯を採取する。

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。

6-3. 検査

6-3-1 レジオネラ属菌の分離培養及び迅速検査

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。

6-3-2 分子疫学解析

患者及び施設から同一種・血清群のレジオネラ属菌が分離された場合に行う。当該施設が感染源であると判断するためには、分子疫学解析を実施することが望ましい。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、分離株は地方衛生研究所等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。

7. 検査結果の解釈

7-1. 患者からも施設からも菌が分離された場合

患者及び施設から同一種・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ので、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 7-2.と同様。

7-2. 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。

7-3. 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	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	☐ 無 ☐ 有()				入院	☐ 無 ☐ 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	☐ 無 ☐ 有(薬名:) (投与期間 年 月 日～ 年 月 日)									

行動調査

発症前 10 日以内 の旅行歴	☐ 無 ☐ 有 国内()・海外()		
	旅行期間(年 月 日～ 年 月 日) ☐ 個人 ☐ グループ ☐ 団体ツアー() 同行者(名)		
発症前 10 日以内 の温泉等利用歴 (旅館、公衆浴場、プール等含む)	☐ 無 ☐ 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: ☐ 無 ☐ 有		
	月 日	曜日	発症 10 日前～発症日までの行動 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
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		

*レジオネラ肺炎型の潜伏期間: 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	☐ 独立家屋 ☐ 共同住宅(マンション、アパート、団地、寮) ☐ その他()		
介護保険施設 利用の有無	☐ 無 ☐ 有(☐ ショート ☐ デイサービス ☐ 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	☐ 公共水道(名称:) ☐ 井戸水 ☐ ボーリング水 ☐ 湧水 ☐ その他()	
	貯水槽の有無	☐ 有 ☐ 無	
風呂	☐ 患者専用 ☐ 家族と共同 ☐ 他の世帯と共同		
	☐ 入替式(一般型) 浴槽の湯の交換頻度(回/ 日)		
	☐ シャワーのみ		
	☐ 循環式(☐ 毎日 ☐ 週2-3回 ☐ 週1 ☐ 無) 浴槽の湯の交換頻度(回/ 日)		
	浴槽水塩素濃度(ppm) ☐ その他()		
蛇口付属品 (浄水器)の有無	☐ 無 ☐ 有		
加湿器使用の有無	☐ 加湿器 (☐ 超音波式 ☐ 気化式 ☐ 加熱式 ☐ 集中管理型 ☐ その他()) 水交換頻度(回/ 日) 水注ぎ足し(☐ 有 ☐ 無) 清掃頻度(回/ 日) タンク内塩素濃度(ppm)		
吸入器使用の有無	☐ 無 ☐ 有		
空気清浄機 使用の有無	☐ 無 ☐ 有 (加湿機能 ☐ 無 ☐ 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	☐ 無 ☐ 有(冷却塔: ☐ 無 ☐ 有、 加湿機能 ☐ 無 ☐ 有))		
エアロゾル発生環境	☐ 無 ☐ 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	☐ 無 ☐ 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	☐ 無 ☐ 有 (☐ 農作業(草刈り) ☐ 園芸・畑仕事など土いじり ☐ 庭の水まき ☐ その他())		
車使用の有無	☐ 無 ☐ 有(カーエアコン使用: ☐ 無 ☐ 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	☐ なし ☐ 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			
	泉質					
	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
		☐ い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
循環ろ過装置	☐ なし ☐ あり	循環系統数		系統	A ~	ろ材の種類

No.	管理状況	判定	備考																				
浴槽	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？	適・不適																					
	<table border="1"> <thead> <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> </thead> <tbody> <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> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>			実施年月日	浴槽名	検査結果	検査機関																
	実施年月日			浴槽名	検査結果	検査機関																	
1	実施頻度： (年1回以上・年2回以上・年4回以上)																						
2	浴槽の湯は常に満ちているか？																						
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？																						
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？																						
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？	適・不適																					
6	実施頻度： 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？	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																				
	3	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																				
	4	<table border="1"> <thead> <tr> <th>()基</th><th>用途</th><th>水温(℃)</th><th>清掃状況</th><th>消毒状況</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>	()基	用途	水温(℃)	清掃状況	消毒状況																
	()基	用途	水温(℃)	清掃状況	消毒状況																		
5	タンクに破損箇所はないか？	適・不適・非該当																					
6	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																					
7	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																					
8	分湯枡がある場合、その清掃及び消毒を実施しているか？	適・不適・非該当																					
9	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																					

(設備状況)

[illegible]

※	洗浄剤	①	種類		濃度		②	種類		濃度		③	種類		濃度	
	消毒剤	④	種類		濃度		⑤	種類		濃度		⑥	種類		濃度	
備考																

(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
- ☐pH 測定器

②検体採取

- ☐採水容器とラベル
- ☐採水用具(柄杓、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:	所在地	調査担当者:
施設名称			電話番号	
営業者氏名			対応者	
管理責任者氏名				
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 休業日 平日 平均 人/日 土・日・祝日 平均 人/日			
入浴者数	患者の利用日 年 月 日 人			
他の健康被害情報	□なし □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 □あり □なし 用途			
浴槽の種類	□非循環式浴槽 □いわゆる掛け流し式でないもの			
	□浴槽水を毎日排水			
	□循環式浴槽 □浴槽水を塩素系薬剤を使用して消毒し、連日使用			
	□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			
循環ろ過装置	□なし □あり 循環系統数 系統 A ~ ろ材の種類			

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	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？ 実施頻度: (年1回以上・年2回以上・年4回以上)	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？ 岩風呂に苔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、浴槽への差込み式であるか？	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(エアロソル発生源)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	
11	原湯やがり湯の貯湯槽の湯の温度は60℃以上で保たれているか？ 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	
12	貯水槽及び貯湯槽内の清掃及び消毒をしているか？ ()基 用途 水温(℃) 清掃状況 消毒状況	適・不適・非該当	
13	タンクに破損箇所はないか？	適・不適・非該当	
14	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	
15	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	
16	分濾材がある場合、その清掃及び消毒を実施しているか？	適・不適・非該当	
17	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
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	
6	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	
7	消毒装置の維持管理は、適切か？	適・不適・非該当	
8	塩素供給装置は正常に作動しているか？	適・不適・非該当	
9	塩素濃度測定器は、正常に作動しているか？	適・不適・非該当	
10	配管が腐食などで破損していないか？	適・不適・非該当	
11	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	
12	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	
13	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	
14	集毛器は、毎日清掃しているか？	適・不適・非該当	
15	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	
16	オーバーフロー排水管を循環配管に直接接続していないか？	適・不適・非該当	
17	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	
18	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	
19	浴床排水の混入はないか？	適・不適・非該当	
20	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	
21	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 直近の交換日	適・不適・非該当	
22	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	
23	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	
24	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	
25	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	
26	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	
27	水質検査結果は3年間保管されているか？	適・不適	
28	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	
29	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)

※ 設備状況調査票は別紙

図1 施設調査票中調査項目の説明

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3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	神戸市健康科学研究所 感染症部
研究協力者	野本竜平	神戸市健康科学研究所 感染症部
研究協力者	小松頌子	神戸市健康科学研究所 感染症部
研究協力者	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
研究協力者	陳内理生	神奈川県衛生研究所
研究協力者	森本 洋	北海道立衛生研究所
研究協力者	小川恵子	北海道立衛生研究所
研究協力者	蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター

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、フラグメントが検出されない MLVA 領域について、新たに primer を検討した。特に Lpms01, Lpms13, Lpms31 の MLVA 領域で大きく改善され、より正確な MLVA 型別が可能となった。新たな primer を用いた Multiplex PCR のプロトコルを確立した。MLVA を活用に関しては、昨年の緊急事態宣言後に営業再開した施設の菌数増加について、菌株の定着性を明らかにし、施設の衛生指導に役立てた。

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、ST のデータベースを 2021.7.12 時点のもの（3,010 profiles）に更新した。また、解析フローを作成し、複数の連携機関に提供した。

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。本研究の目的は、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指すことである。

今年度はprimerのミスマッチにより増幅されないMLVA領域について、primerの検討および評価を行った。また、MLVAの活用促進のために複数の協力機関に協力してもらい、集団事例や施設の衛生管理でのMLVAの有効性を検証した。さらに、ゲノムデータを利用した*L. pneumophila*のSBT解析フローを考案し、複数の協力機関に活用してもらい有用性を評価した。

B. 研究方法

①菌株：MLVA の primer 評価には *L. pneumophila* SG1 の菌株 439 株を対象とした¹⁾。

施設の衛生管理における MLVA の活用では、神戸市の 3 施設において平成 24 年から令和 2 年度に分離された *L. pneumophila* を解析対象とした。

②MLVA：Sobral ら²⁾ 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。

また、新たな primer として、Pourcel らによって報告された primer^{3) 4)}を 2nd primer として用いて、上記の方法でフラグメント解析を行った (表 1)。

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。

③ゲノムデータを利用した SBT の解析フ

ロー：リードデータのマッピングによる解析手法として SRST2 (<https://github.com/katholt/srst2>) を、アセンブリしたドラフトゲノム配列から ST を決定する手法として Legsta (<https://github.com/tseemann/legsta>) を、更に mompS が正確に決定できなかった場合に利用するツール (<https://github.com/bioinfo-core-BGU/mompS>) の 3 種類を提案した。それぞれの SBT データベースを最新のものに更新し、特に SRS T2 については SBT を解析するための条件を最適化し、ツールのインストール方法も含めた汎用的なマニュアルを作成して協力機関に提供した。

C. 研究結果

(1) ゲノムデータを利用した *L. pneumophila* の SBT 解析フロー

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。今年度は解析フローを作成した (図 1)。複数の研究機関に Web での研修を複数回行い、解析に必要なソフト等の環境を整えてもらった。実際に、7 株のリードデータ及びドラフトゲノムデータ提供し、実際に解析フローを基に

ST を決定してもらったところ、当所の結果と一致した良好な結果を得ることができた。したがって、他の研究機関にも提供できる解析ツールを提示できることが可能となった。

また、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にも有用な解析ツールとなっている。

(2) MLVA 領域における primer の検討

昨年度、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。そこで、以前解析した *L. pneumophila* SG1 439 株の MLVA プロファイル中で、MLVA 領域ごとに増幅されなかった株 (“null”株) の存在を調べた (表 2)。Lpms13 と Lpms01 はそれぞれ 39 株 (8.9%)、31 株 (7.1%) で増幅されていないことがわかった。

Pourcel ら^{3) 4)}によって報告された MLVA 領域は Sobral²⁾と同じ MLVA 領域を用いているが、primer が異なる。そこで、Pourcel らによって報告された primer (2nd primer とする)を用いて増幅されなかった株について検討した。その結果、Lpms01、Lpms13、Lpms31 の MLVA 領域において大きく改善された (表 2)。

また、Lmps01 と Lmps13 の MLVA 領域が増幅しない株が存在していた ST23、ST384、ST550 の株では、2nd primer により増幅され、MLVA 型が確定できる株が増えたことで、より正確な MLVA 型別が可能となった。

(3) MLVA の活用

①施設の衛生管理における活用

昨年の緊急事態宣言後に営業再開した3施設において10,000 CFU/100 mL以上の菌数が検出された。その施設における菌数増加について、MLVAを用いた菌の定着性を調べた。平成24年から継続的なモニタリング検査で分離された菌株のMLVA型と緊急事態宣言後（令和2年度）に分離されたMLVA型を比較した。その結果、B,C施設では、R2年度に分離された株と同じ遺伝子型の株が、過去にも分離されていた。D施設で分離された2株のうち、一方は宣言前の期間に分離されたものと同一遺伝子型であったが、もう一方はR2年度に初めて分離された（図2）。

②複数の協力機関との連携

今年度は複数の自治体の集団事例において、MLVAを実施してもらった結果、PFGE、SBT、MLVAは概ね関連した結果となった。

D. 考察

primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域は、Pourcel らが報告した primer を用いることで、大幅に改善することが明らかとなった。MLVA 領域自体は Sobral らと同じ領域を解析していることになるので、型別には問題ないと考えられる。“null”の株をより正確に型別したい場合は、2nd primer を用いることが望ましいと考える。さらに、“null”の株が

比較的多数存在している ST は、2nd primer を用いることでより正確な MLVA 型を決定することができた。今後は primer を変えることで大きく改善した Lpms01, Lpms13, Lpms31 については、最初から 2nd primer に変更し、現状の MLVA のプロトコルを改変することも検討する必要がある。そのためには、2nd primer で “null” になる株があるかの評価を行う必要がある。

継続的にモニタリングしている施設において、増加した菌がもともと施設に定着している菌か、あるいは新規の株なのか、簡便な MLVA を用いることで判断することができた。このように、菌株の同一性（定着性）を継続的に調べる解析ツールとして MLVA は有用であり、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。また、今回、複数の自治体で MLVA を導入することができ、集団事例への検証を進めることができた。

さらに、Miseq リードデータやコンティグ配列から ST を決める方法確立し、ST のデータベースを 3,010 profiles に更新した。また、解析フローを作成し、複数の連携機関に提供し、実際の Web 研修で解析できるような環境を構築することができた。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ている。

E. 結論

primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域は primer を変えることで、大幅に改善され、より正確な MLVA 型別が可能となった。

施設の衛生管理における汚染源調査において、簡便な MLVA を用いることで、菌株の同一性（定着性）や新規性を継続的に調べることができ、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。

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解析フローを提示した。

F. 参考文献

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) MLVA net support site

(<http://mlva.i2bc.paris-saclay.fr/MLVAnet/spip.php?rubrique44>)

- 4) Pourcel C, Visca P, Afshar B, D'Arezzo S, Vergnaud G, Fry NK. 2007. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. J Clin Microbiol. 45:1190-1199.

G. 研究発表

- 1) 小松頌子、中西典子、岩本朋忠. 市内温泉施設における緊急事態宣言後のレジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移. 神戸市健康科学研究所報 第 49 巻 39-42 頁 2021

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表 1. 解析したMLVA領域とプライマー配列

MLVA locus	primer	Sequence (5'→3') (Labeling)
Lpms01-2nd	Lpms01F_2nd	(NED)-ACGRGCATATGACAAAGCCTTG
	Lpms01R_2nd	CGGATCATCAGGTATTAATCGC
Lpms03-2nd	Lpms03F_2nd	(VIC)-CAACCAATGAAGCAAAAGCA
	Lpms03R_2nd	R GGG S TTGATGGTCTCAATG
Lpms13-2nd	Lpms13F_2nd	(NED)-CAAT W GCATCGGACTGAGYA
	Lpms13R_2nd	TGCCTGTGTATCTGG R A R GC
Lpms19-2nd	Lpms19F_2nd	(PET)-GAACTATCAGAAGGAGGCGAT
	Lpms19R_2nd	GGAGTTTGACTYGGCTCAGG
Lpms31-2nd	Lpms31F_2nd	(FAM)-GCAATCCGGCCTCGCAAGCC
	Lpms31R_2nd	CAGGCACACCTTGGCCCGTCA
Lpms34 -2nd	Lpms34F_2nd	(FAM)-GAAAAGGAATAAGGCGCAGCAC
	Lpms34R_2nd	AAACCTCGTTGGCCCCCTCGCTT
Lpms35-2nd	Lpms35F_2nd	(PET)-CTGAAACAGTTGAGGATGYGA
	Lpms35R_2nd	TTATCAACCTCATCATCCCTG

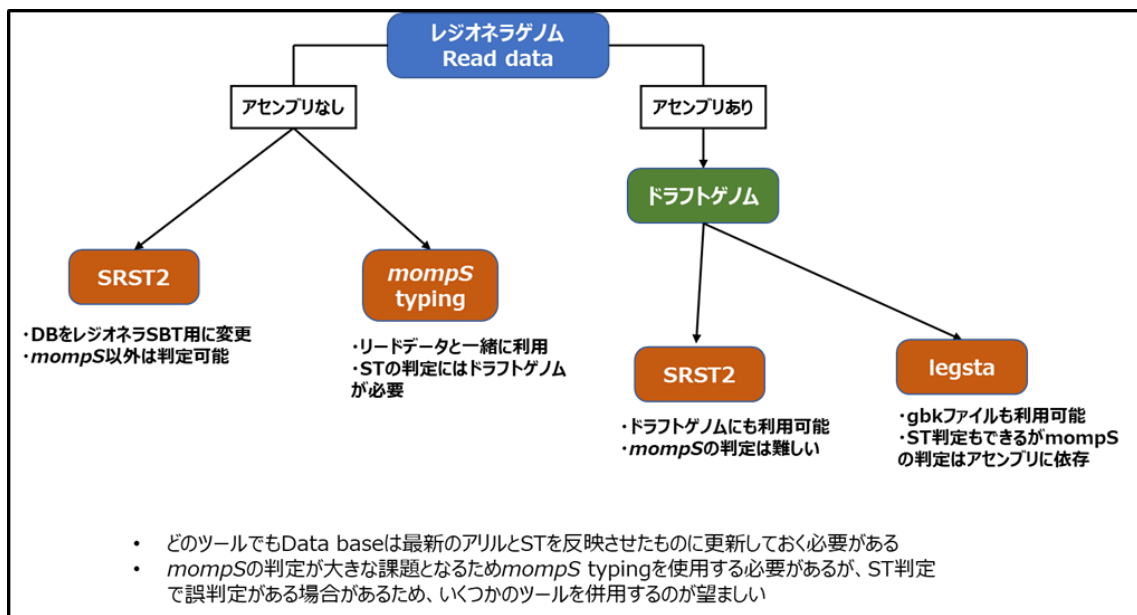
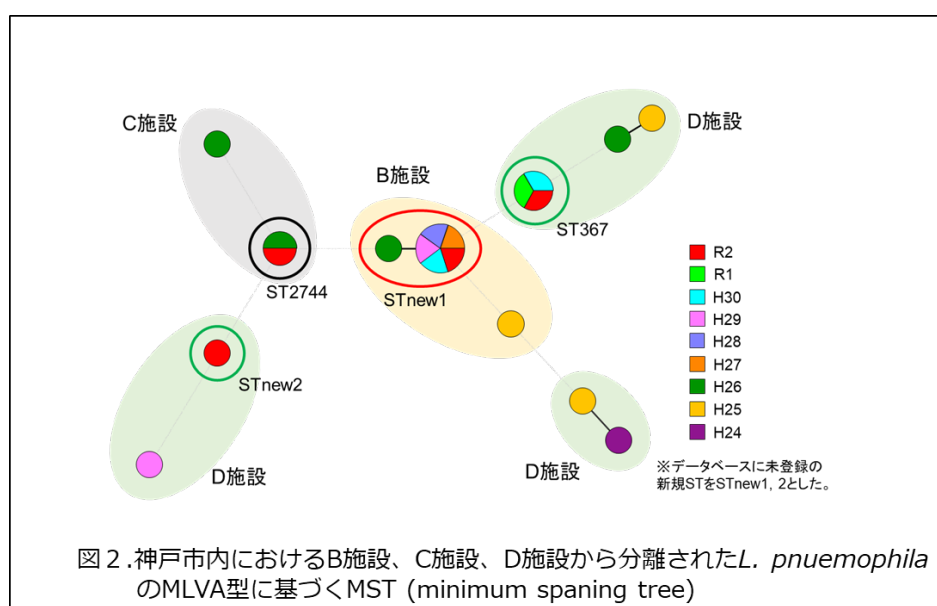


図 1. ゲノムデータを利用した *Legionella pneumophila* の SBT 解析フロー

表2. *L. pneumophila* SG1 439 株における各MLVA領域の増幅

M LVA locus	"null"の株数	2nd primerで 増幅した株数
Lpm s01	31 (7.1%)	→ 22
Lpm s03	3 (0.6%)	→ 3
Lpm s13	39 (8.9%)	→ 37
Lpm s19	10 (2.3%)	→ 4
Lpm s31	13 (3.0%)	→ 11
Lpm s34	13 (3.0%)	→ 1
Lpm s35	6 (1.4%)	→ 1



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3年度協力研究報告書

レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

研究代表者	前川 純子	国立感染症研究所
研究分担者	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	○森本 洋	北海道立衛生研究所
	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
	陣内 理生	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
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所

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、本年度は外部精度管理のさらなる検討を行った。

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、2021年度は公的、民間を問わず全国184の検査機関、191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70機関については、独自に集計・解析を実施し、過去6年間の結果とも比較した。7年連続参加した機関は43機関あった。本年度は、配付試料製造元からこれまでの菌株を変更する旨の連絡があり、新たな供試菌株によるスタートとなった。これを受け、回収率良好範囲を再設定した。また研究班から参加した機関には、サーベイ指定法に加え、日常業務で行う検査条件による結果も求めた。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。これら特定の機関は毎年又は高頻度に良好範囲から外れる傾向にあり、検査工程を見直す必要がある。供試菌株変更に伴い、熱や酸による前処理や選択分離培地による供試菌への影響を調

査したが、これまでの供試菌株同様これら夾雑菌を抑制するための検査条件は、供試菌株の発育を大きく抑制し、サーベイ指定法以外の結果からは、外部精度管理の目的を達成することは出来なかった。本外部精度管理は、サーベイ指定法により、濃縮操作や培地接種操作などの基本操作の精度確認に主眼を置いている。ここから導き出された各機関の結果における全国での位置付けも、実施母体からの報告書内で確認することが出来る。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すべきと考える。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、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、継続的かつ安定した外部精度管理調査システムの構築を目指すことを目的とした。

B. 研究方法

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 2021 年 9 月下旬に日水製薬より「参加募集案内文、参加要件、指定法」(別紙参照)が示され参加募集が行われ、11 月 5 日(金)に締め切られた。その後、12 月 6 日(月)に試料、試料送付案内、試料取扱遵守事項、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 2022 年 1 月 21 日(金)17 時、結果閲覧開始を 3 月下旬とした。結果については、3 月 30 日(水)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 184 の検査機関、191 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 70 機関が参加した。

<配付試料>

信頼性においてメーカーにより品質と多施設への発送が保証されることから、例年通りバイオメリュー社の BioBall(特注品)を使用した。なお、本年度はバイオメリュー社より、これまでの菌株を変更する旨の連絡があり、昨年度まで使用されていた製造メーカーが保有する *Legionella pneumophila* ACM 5197 から、新たな供試菌株 *Legionella pneumophila* NCTC 11986 により配付試料が製造された。

<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)。また、菌株変更を受け、研究班から参加した機関には、サーベイ指定法に加え、日常業務で行う検査条件による結果も求めた。なお、日常業務で行う検査条件とは、検査対象となる実検体においては様々な夾雑菌が混入している場合もあり、それら夾雑菌の培地上での発育を抑制するために、各種選択分離培地の使用に加え熱処理、酸処理、熱処理後酸処理等の前処理を併せて実施する検査工程を指す。

<結果集計と解析>

全参加機関に対する集計・解析は日水製薬が実施した。地方衛生研究所等 70 機関については、独自に集計・解析を実施し、過去 6 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 10,748.9 cfu/Ball、上限値 21,403.1 cfu/Ball) をレジオネラ属菌検査で使用される、検体 100 mL 中の cfu (colony forming unit) に換算すると、下限値 2,149.78、上限値 4,280.62 cfu/100 mL 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 1,000 cfu/100 mL と換算することから、結果は 1,000 cfu の整数倍となる。このことを勘案し、前述の 100 mL 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 ~ 5,000 cfu/100 mL と補正した。さらにこの範囲に対し、国内における食品衛生外部精度管理で実績のある一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が統計処理で行っている「Xbar 管理図における管理線を理化学調査では添加量の 70% および 120%、微生物学調査では全体の平均値の 30% および 300%」という考え方を参考に、本外部精度管理では、「メーカー保証されている菌数をベースに補正した範囲に対し、その下限値の 30% および上限値の 300%」という考え方を導入することとした。その結果、本外部精度管理

においては、目標良好範囲を 600 ~ 15,000 cfu/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、菌株変更に伴い再設定をした。設定は以下の通り。本年度の外部精度管理で報告を求めたすべての検体(非選択分離培地による非濃縮①、②、濃縮の検査結果)において目標良好範囲を報告した機関の 94% が達成していた 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、2022 年 3 月 30 日(水)、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。

C. 研究結果及び考察

本年度の配付試料について、日水製薬及び北海道立衛生研究所でサーベイ指定法による確認実験を行ったが、品質に問題は認められなかった。

研究班で集計した地方衛生研究所等 70 機関の報告菌数を表 1 に示した。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(2016-21 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 70 機関中 69 機関(約 99%)であり、非常に良い結果となった。例年 90% 以上の機関が良好な結果を報告し、事業開始以来安定した外部精度管理となっているが、過去 5 年間と比較しても最も良い結果であった。また、例年であれば、非濃縮検体①、②共に目標良好範囲外の報告をする機関があったが、今年度はそのような機関は無く、非濃縮検体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機関であった(非濃縮検体①:機関No.5、非濃縮検体②:機関No.58)。このうち機関No.58では、唯一報告菌数が0となっており、レジオネラ属菌不検出となっていた。これら2機関は、試料作製工程の確認、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、昨年度同様に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く、非濃縮検体②の平均値と比較し、ろ過濃縮、遠心濃縮検体の平均値はそれぞれ約59%、約85%低い結果となった。遠心濃縮を実施したのは3機関と少なかったが、その平均値は例年同様ろ過濃縮検体の結果を大きく下回る結果となっていた。一方、例年では濃縮結果でレジオネラ属菌不検出を報告する機関も散見されていたが、本年度は全ての機関で検出されていた。

参考値として報告を求めた選択分離培地による結果では、過去のサーベイ同様非選択分離培地と比べ報告菌数の値が低く、非選択分離培地の平均値と比較し約47%低い結果となった。一方で、検査を実施した70機関中64機関(約91%)が目標良好範囲の菌数を報告していた。良好範囲を報告した機関数は、2016~18年度までは90%前後と高い値で推移していたが、2019年度は約77%、2020年度は約62%と減少傾向にあった。この要因の一つとして、2019、20年度は、供試菌株に対する培地の選択剤への感受性が高まっている可能性も考えられていた^{2, 3)}。しかしながら、本年度より新たな供試菌株となったことからこの影響

が解消され2016~18年度同様の結果になったと考えられた。

表3に回収率を示した。本外部精度管理では、非濃縮検体②が100倍濃縮のスタート検体であることから、非濃縮検体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検体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、非濃縮検体②を分母とした場合、70機関中55機関(約78.6%)であった。非濃縮検体①を分母とした場合では、70機関中57機関(約81.4%)であった。どちらも80%前後の参加機関が目標回収率を達成する報告をしており、良好な結果だったと思われる。また、どちらの試料を分母にしても目標回収率を達成していたのは、70機関中54機関(約77.1%)であった。これは非濃縮検体②を分母とした場合に目標回収率を達成していた55機関のうち1機関を除く機関が該当しており、一連の基本検査工程が安定している機関であると思われた。一方、どちらの試料を分母にしても目標回収率を達成できなかったのは、70機関中12機関(約17.1%)であった。これは非濃縮検体①を分母とした場合に目標回収率を達成できなかった13機関のうち1機関を除く機関に該当し、基本の濃縮検査工程が不安定な機関であると思われた。

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⁴⁾、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2021年度までの回収率の比較(分母:非濃縮検体②)を表4と図1に示した。過去4年間を見ると、2018年度は良好機関が

74.3%、その他の年度は 50%台と、2018 年度が特別な状況に見えていた。しかしながら、今年度の結果は全体的に 2018 年度に近い傾向となり、良好な結果だと考えられた。今年度は、菌株変更に伴い良好範囲設定の定義を見直しているが、より多くの参加機関で良好な報告が多かったと言えるだろう。2018 年度の良好範囲占有率の増加に繋がった背景として、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%未満の機関割合が前年度(2017 年度)では 23.9%と高かったことが一因と考えられていた。昨年度報告書においては、2020 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、と報告していた。今回 2018 年度と同様の傾向があったのではないかと考えられた。

表 5 に本年度参加機関における、2015～21 年度の結果判定一覧を示した。ここでは、過去 7 年間の比較をしやすくするために、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。7 年連続で参加した機関は 43 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 15 機関あった。このうち回収率判定を実施している 2017 年度から 5 年連続で良好範囲外を報告していた機関が 1 機関(機関No.5)、3 年連続が 4 機関(機関No.4、10、11、28)、2 年連続が 1 機関(機関No.63)あった。一方、濃縮検体についても 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 11 機関あった。このうち本サーベイ開始以来 7 年連続で良好範囲外を報告していた機関が 1 機関(機関No.58)、6 年連続が 1 機関(機関No.5)、4 年連続が 1 機関(機関No.30)、3 年

連続が 3 機関(機関No.2、23、28)あった。この中には、回収率は良好結果を報告していたが、過去の参加において高頻度に少ない菌数を報告している機関もあった(機関No.23)。また、今年度は良好菌数を報告していたがこれまでに高頻度に少ない菌数を報告している機関、菌数は良好範囲内であったが、回収率では良好範囲外を報告した機関もあった。このように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ると思われる、注意が必要である。これまでも報告してきたが、菌数、回収率ともに良好範囲外を報告している機関は、特定の機関に偏る傾向があり、該当機関は十分に検査工程の見直しが必要である。特に、非濃縮①で唯一良好範囲外の菌数を報告した機関No.5 は、回収率では 5 年連続、菌数では濃縮検体で 6 年連続良好範囲外を報告している。また、非濃縮②で唯一供試菌の発育が認められなかった機関No.58 は、本サーベイ開始以来 7 年連続で菌数に対し良好範囲外を報告している。これら両機関を含め、本サーベイで気になる結果が認められた機関は、改めて自機関の検査工程、検査体制を見直し、例えば担当者が変わっても安定した基本操作ができるよう研鑽が必要である。

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、または安定傾向にある機関として、表 5 にある全項目に対し 7 年連続良好な結果を報告している機関が 6 機関、6 年連続が 3 機関、5 年連続が 2 機関、4 年連続が 4 機関、3 年連続が 4 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、培地への接種量が安定していたか、塗抹の力加減、濃縮操作等、改めて検査工程を見直し検証する必要があると思われる。不安定となる要因は、各検査機関で異なると考えられ、内部精度管理により自機関の実態把握に努めることが肝要である。

研究班では、これまでに日水製薬の実施するセミナーで検査の基本的な考え方を伝え、また検査に不安を抱えている機関に出向き指導を行ってきたが、コロナ禍の影響を受け 2 年以上実施できていない。また、検査技術研修会の構築も進めてきていたが、コロナ禍の影響で中断となっている。今後は状況を見極め、検査技術の安定に向け対応したいと考える。

さて、本年度は菌株変更を受け、研究班から参加した機関には、サーベイ指定法に加え、日常業務で行う検査条件による結果も求めた。改めて記載するが、日常検査で行う条件とは、検査対象となる実検体においては様々な夾雑菌が混入している場合もあり、それら夾雑菌の培地上での発育を抑制するために、各種選択

分離培地の使用に加え熱処理、酸処理、熱処理後酸処理等の前処理を併せて実施する検査工程を指す。本サーベイでは、配付試料はレジオネラ属菌のみで夾雑菌は含まれていないこと、過去の検証で昨年度まで使用していた供試菌株に対する選択分離培地の使用さらに前処理との併用は、供試菌の発育を大きく抑制することが分かっており^{1, 4)}、外部精度管理の目的を達成することが出来ないためサーベイ指定法として位置づけていなかった経緯がある。

本年度の新たな供試菌株に対する異なる条件下での検査結果の比較を、表 6、表 7 に示した。まず、表 6 に非濃縮検体②に対する結果を示した。ここでは 1 平板当たり数コロニーのレジオネラ属菌を発育させ、かつそこから求められる菌数が目標良好範囲内に入る技術を持ち合わせる必要がある。先にも記載したが、サーベイ指定法では非常に良い結果となり、適切な評価を行うことが出来た。一方、選択分離培地の使用は、例え前処理を行わなかった(未処理)としても確認される菌数がほぼ半減し、良好回答数の減少、不検出回答数の増加が認められた。さらに各前処理を併用した場合には、例え非選択分離培地である BCYE α の使用であっても確認される菌数が大幅に減少し、良好回答数の大幅な減少、不検出回答数の大幅な増加が認められた。選択分離培地と各前処理の併用ではさらに影響が大きく、ほとんどの条件下で供試菌の発育が認められず、不検出回答数がほぼ 100%であった。

表 7 に濃縮検体に対する結果を示した。本結果は、回収率ではなく表 5 でも評価した 2016 年度までの報告菌数から見た判定を当てはめ、表 6 同様に供試菌の発育状況から比較を行った。全体的に表 6 同様の結果であった。

サーベイ指定法では過去のサーベイ同様に適切な評価を行うことができる回答が得られていた一方、選択分離培地の使用、各前処理の実施、それらの併用は、供試菌の発育を大きく抑制し、良好な回答がほぼ得られなかった。これらの結果、本年度から採用された供試菌株においても、昨年度まで使用していた供試菌株同様に選択分離培地の使用さらに前処理との併用は、その発育を大きく抑制することが確認された。

これらのことから、現状の BioBall を配付試料とした外部精度管理においてサーベイ指定法以外の方法で検査をした場合には、適切な検査技術を持つ機関が、選択分離培地と前処理の影響で良好外機関と判定されることに繋がることが懸念された。そもそも供試菌の発育が大幅に抑制され、条件によってはほぼ発育が認められない検査方法による外部精度管理は成り立たない。これまでも報告してきたが、外部精度管理を実施する際には、配付試料の性能を熟知し、その性能が十分に担保される展開で、検査法のどの部分に重点を置いたものにするかを検討し対応すべきと思われた。もしサーベイ指定法と比べ選択分離培地の使用や前処理によって供試菌の発育が 10%程度しか抑制されなかったとしても、その結果はサーベイ指定法より評価を難しくすることに他ならない。今後、新たに外部精度管理の幅を広げるべくその方法を模索する場合は、十分な予備実験を踏まえ、実施母体である民間企業がスムーズに対応出来るよう検討が必要である。

なお、現在実施している外部精度管理は、様々な検証のもと、研究班のワーキンググループ内で協議され実現したことを申し添える。

D. 結論

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、検査結果が安定している、もしくは安定する方向に向かっている機関もあるが、いくつかの特定の機関については不安定、もしくは高頻度に良好範囲外となる報告をしている。これら注意を要する機関は、特に検査手技の再確認が必要である。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。良好範囲報告機関割合を上げるためには、各機関においてレジオネラ属菌の性質を理解し、それに適した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。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。また、特に検査結果が不安定な機関や高頻度に良好範囲外を報告する機関に対し、適切なフォローアップができるよう、コロナ禍で中断している検査技術研修会の構築や研究班が直接検査工程を確認する機会を作る必要があると考える。

E. 参考文献

- 1) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 25 年度総括・分担研究報告書 pp.105-132.
- 2) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み: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」令和元年度総合研究報告書 p.118.
- 3) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み: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 年度総合研究報告書 p.87.
- 4) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「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

研修会

- 1) 森本 洋:レジオネラ属菌培養検査について、令和 3 年度 短期研修 新興再興感染症技術研修、2021 年 9 月、Web 対応

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

2021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「2021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.「2021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ご施設様

■実施概要

検査試料	レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料（凍結乾燥品、-18～-33℃保存） 同封書類：①試料送付のご案内、②試料の使用方法・操作手順、③結果記入用メモ、④試料受領書兼承諾書
実施方法について	「2021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）。 2021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 38,500 円（消費税込）
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）

10月1日(金)	参加募集開始 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)の2021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。
11月5日(金)	参加募集締切 ● 〆切日前でも募集数に達し次第、参加申込を締め切らせていただきます。
12月6日(月)	試料発送 ● 検査試料到着後は直ちに-18～-33℃で保管願います。
12月7日(火)～	検査実施 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)にてIDとパスワードでログイン後、結果を入力していただきます。 ● 成績入力方法は検査試料に同封の資料を参照してください。
12月21日(火)	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。
1月21日(金)17時	回答締切
1月21日(金)	参加費お支払い期限 ● 振込用紙をご利用いただくか、弊社指定の口座にお振り込みいただきます。なお、振込手数料は貴施設ご負担でお願い致します。銀行振り込みの控えをもって領収書とさせていただきます。
3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 : 03-5846-5534 FAX:03-5846-5629

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



日水製薬株式会社

参加要件

2021 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しての感染被害などの健康影響に基づき、BSL が規定されています。この BSL にも基づき、最も低リスクの病原体を扱うリスク群を BSL1 として、BSL4 までのリスク群を規定しています。

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

2) 施設要件

1. 実験室内に、適切に管理された微生物試験を行う管理区域を有すること。管理区域の出入口にはバイオハザードマークを標示すること。
2. 管理区域の出入口及び病原体保管庫は施錠が出来る構造であること。保管設備にはバイオハザードマークを標示すること。
3. 消毒用の薬剤が常備されており、壁・床等の消毒が可能であること。
4. 管理区域内もしくは実験施設内に、高圧蒸気滅菌装置、もしくはそれに準ずる滅菌設備を有すること。

5. 本サーベイでは、検査工程上エアロゾル発生の危険があることから、生物学用安全キャビネットが必要です。

3) 作業従事者要件

作業従事者に求められる基本的な要件について以下に記載します。

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

2. 精度管理サーベイ試料の使用承諾

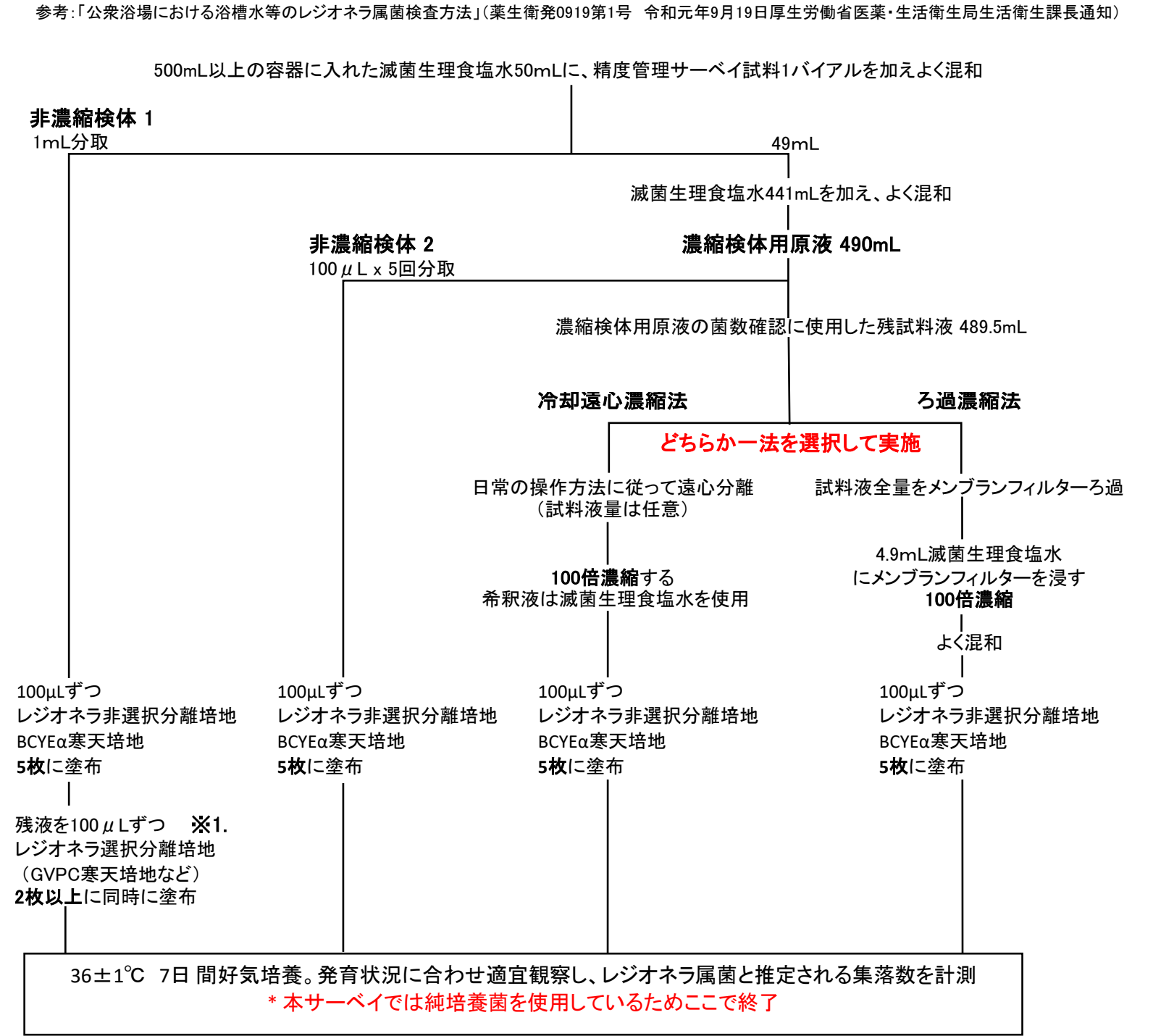
1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

3. 注意事項

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

以上

2021 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法



- 2021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。
- 2021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BCYE α 寒天培地から得られた集落数から算出し、報告してください。
- ※1. 日常の試験にレジオネラ選択分離培地を使用している施設におきましては、参考値として、同培地における集落数も計測してください。なお、レジオネラ研究事業において、レジオネラ選択分離培地における集落数は、組成中の選択剤による影響等により、レジオネラ非選択分離培地における集落数に比べ減少することが報告されています。

外部精度管理用試料使用に際しての取扱遵守事項

日水製薬株式会社
診 断 薬 営 業 部

外部精度管理用試料（以下試料）の使用に際しては、バイオハザード防止のために以下の遵守事項に従って使用してください。

1. バイオセーフティ

「バイオセーフティ biosafety」とは、生物を表す接頭語 bio と safety（安全）を組み合わせた言葉で、「生物または生物由来の材料の取扱いがヒトに病気を引き起こす危険すなわち‘バイオハザード’がある場合にとられる安全対策」を意味します。精度管理用に提供される試料は非病原性菌ですが、試料の取扱いに際しては、公衆衛生の観点からバイオセーフティを考え、実行してください。

2. 使用目的

試料の使用目的は、細菌検査の精度管理のみに限定し、それ以外の目的には使用しないでください。

3. 試料の受取

配達された試料は直ちにフリーザー（－20℃以下）に保管してください。外装に破損等が認められた場合は、直ちに日水製薬㈱担当者に連絡の上で試料は開梱することなく滅菌して廃棄してください。

4. 取扱い施設

以下の環境が整った施設で使用してください。

- ①独立した試験室を有し、部屋の入口は施錠できる構造であること。
- ②バイオセーフティについて教育を受け、取扱い菌株について一定の知識を有する監督者（検査員）が管理・監督すること。
- ③試験室への昆虫やネズミ等の侵入阻止に万全を期し、必要に応じて駆除を行うこと。
- ④滅菌のためのオートクレーブが同一室内に設置されていること。
- ⑤適切な消毒薬を常備し、いつでも使用できる状態を維持すること。
- ⑥保管のためのフリーザー（－20℃以下）が同一室内に設置されていること。

5. 取扱い方法

以下の使用方法に従って使用してください。

- ①試験室外へは持ち出さないこと。
- ②試験室内専用の作業着を着用して検査を行い、作業着着用のまま室外へ出ないこと。
- ③第三者への分与は絶対に行わないこと。
- ④試料を用いたデータを学会、雑誌等で公表する場合は、事前に日水製薬㈱に連絡し協議すること。
- ⑤保管・使用記録を必ず残し、紛失、盗難のないよう管理すること。
- ⑥その他、バイオハザード防止に必要な一般的な事項を遵守すること。

6. 使用後の廃棄

使用後の空容器および試料に触れたすべてのものと培養後の菌（培地）は直ちに滅菌してから廃棄し、放置、保存はしないでください。

7. 試料の保管

試料を使用するまでの間は、フリーザーに保管してください。

以 上

2021年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試験概要

1. レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試験項目

試料名	試験項目
精度管理サーベイ試料A（1本）	レジオネラ属菌

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

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

2. 精度管理サーベイ試料Aの使用方法・操作手順

非濃縮検体 1		非濃縮検体 2	
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（2021 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法）は、本制度管理サーベイ用のみの検査方法であり、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 : $100\text{mL あたりの菌数} = \text{平均値} \times 1000$

■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 : $100\text{mL あたりの菌数} = \text{平均値} \times 1000$

■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 : $100\text{mL あたりの菌数} = \text{平均値} \times 10000$

□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 $0.3\sim0.9\times2\sim20\mu\text{m}$ 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) $36\pm1^{\circ}\text{C}$ 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： $100\text{mL あたりの菌数} = \text{平均値} \times 100$

■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、 $15\sim25^{\circ}\text{C}$ 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)= $1,118\times\text{回転半径}(\text{cm})\times\text{回転速度}^2(\text{rpm})\times10^{-8}$

- (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

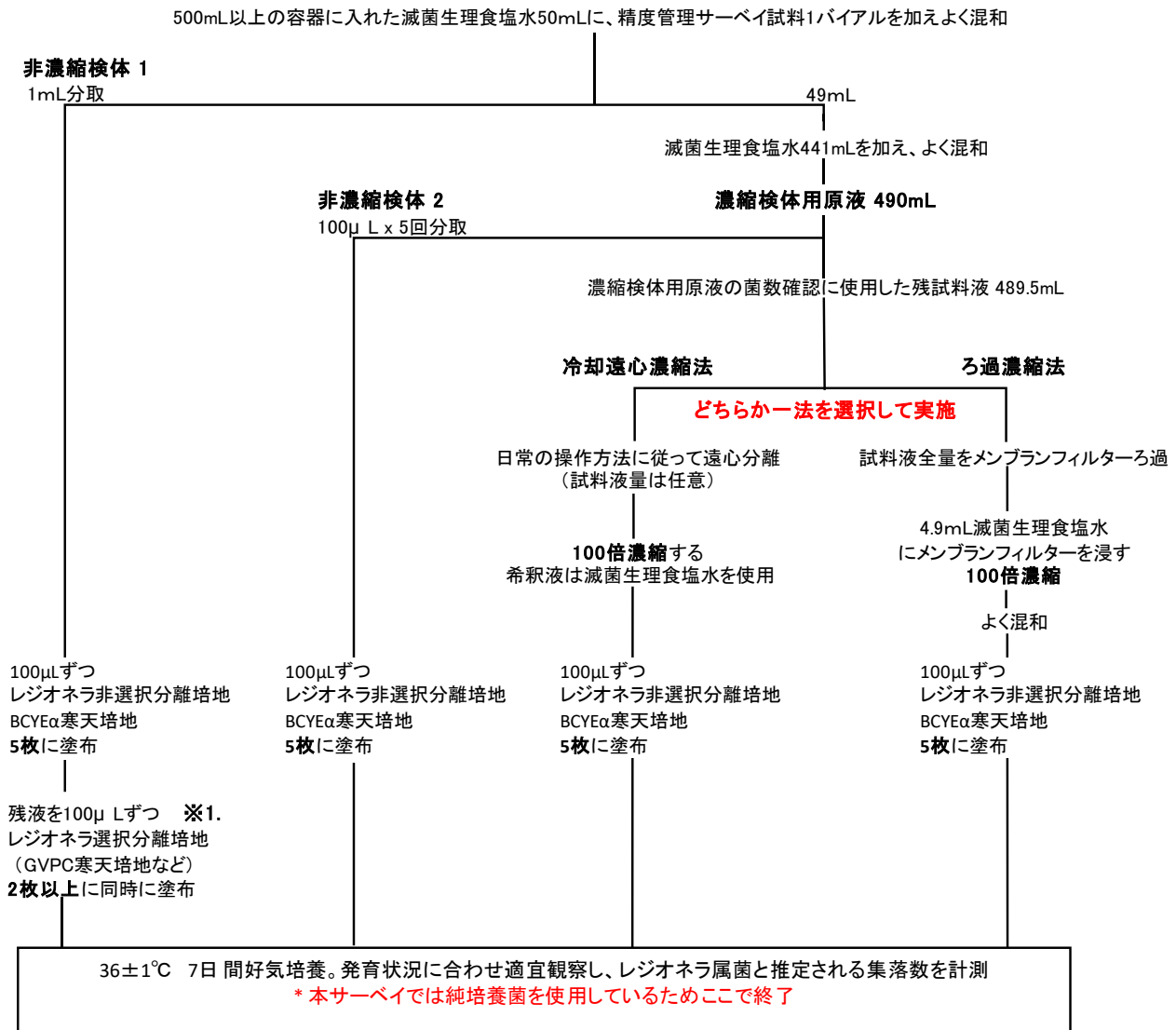
- (1) 結果の記入は、コスモ会HP (<https://cosmokai.com/>) より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPW (別送ハガキ参照) を入力してログインしてください。
- (2) 登録画面が表示されますので、ご登録内容をご確認ください。ご確認後は、ページの下にあります【変更なし データ入力画面へ進む】をクリックしてください。
- (3) データ入力画面に進み結果の入力が完了したら、ページの下にあります【入力内容を確認】をクリックし入力内容を確認してください。入力に間違いがなければ、ページの下にあります【送信】をクリックしてください。

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。



2021 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)



■ 2021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。

■ 2021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。

2021 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

■2021 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 = $\frac{\text{平均値}}{1000}$)

(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 = $\frac{\text{平均値}}{1000}$)

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

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

(3) 使用した培地は何ですか。

☐ GVPC 寒天培地 ☐ WY0 α 寒天培地 ☐ MWY 寒天培地 ☐ CCVC 寒天培地 ☐ PAC (BMPA α) 寒天培地

☐ PAV 寒天培地 ☐ その他

(4) 培地メーカーはどちらですか。

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

☐ ビオメリュー・ジャパン ☐ 極東製薬工業 ☐ メルク ☐ その他

■非濃縮検体 2

(1) 100mLあたりの菌数をご記入ください。

CFU/100mL （本サーベイ用計算式 = $\frac{\text{平均値}}{10000}$ ）

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

□濃縮検体

【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 = $\frac{\text{平均値}}{100}$ ）

(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。
☐ 日本製薬 ☐ 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 μ m ですか。 μ m

(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 = 平均値 × 100 ）

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

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

(3) 使用した培地は何ですか。 ☐BCYE α 寒天培地 ☐その他

(4) 培地メーカーはどちらですか。
☐ 日本製薬 ☐ 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) 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。 ℃
以上

2021 年 12 月 吉日

日水製薬株式会社

2021 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試料受領書兼承諾書

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

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 21 日(金)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： 年 月 日

貴 施 設 名
ご所属部署
ご担当者名
ID 番号 注

注:弊社より、別途送付したはがきに記載した ID 番号をご記入ください。

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

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

以 上

表1 全参加機関報告菌数 cfu/100 mL

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	2780	1300	3400	1672		39	2220	300	2000	1250	
2	2640	1140	2800	504		40	3620	1080	4800	1386	
3	4950	2350	5400		674	41	2820	1360	5800	1646	
4	5580	2450	5200	682		42	4260	1200	2800	436	
5	400	0	11000	20		43	8060	4430	9000	4736	
6	6660	3500	4800	2916		44	4040	1650	2600	894	
7	4940	2080	4800	1866		45	2540	1230	1800	650	
8	4180	1630	3800	1054		46	7460	3000	8200	346	
9	2900	2570	1600	1984		47	3860	2330	5400	2008	
10	3160	4350	6800	1122		48	3120	870	2600	1888	
11	3740	3350	5400		646	49	4260	2050	5200	2008	
12	6900	3250	5200	3828		50	3260	1250	2600	1950	
13	3500	1330	3000	1028		51	2800	1600	3600	2382	
14	6760	3780	6800	4720		52	5060	3350	3400	2436	
15	2740	2450	4200	1646		53	2480	1300	2400	1972	
16	5600	1930	4800	2340		54	6400	4850	6600	1868	
17	3580	2000	3000	2322		55	4900	2900	5400	1640	
18	4580	3850	5000	3106		56	2020	250	3600	484	
19	3320	1800	2200	1584		57	4500	3300	4800	3116	
20	3320	1900	4000	1420		58	3080	500	0	424	
21	4000	1200	2000	1108		59	6100	2840	5600	1680	
22	3260	2400	3400	1694		60	3660	950	3000		592
23	680	300	600	204		61	4760	1820	4200	2884	
24	4120	2070	4000	2548		62	3520	1500	6000	1610	
25	6100	4130	5600	3382		63	740	260	600	100	
26	3980	2000	3200	1324		64	1720	1100	2600	1358	
27	4500	1650	7200	1834		65	4360	2240	5600	1288	
28	2460	1200	2000	318		66	4940	3450	4800	2508	
29	7240	4700	7400	3372		67	3420	1300	3200	2278	
30	7420	5180	4600	88		68	4200	850	4400	2228	
31	3240	3125	3000	794		69	6460	7130	7600	1976	
32	6080	2000	6800	2786		70	5740	3380	6200	3136	
33	6460	2600	3000	692		平均値	4206	2242	4320	1790	637
34	6300	4600	6400	2216		最大値	8060	7130	11000	4736	674
35	3380	1550	2800	2358		最小値	400	0	0	20	592
36	5700	2080	3800	3342		中央値	4000	2000	4100	1694	646
37	2880	1400	3000	1102		対象機関	70	70	70	67	3
38	4000	2150	4000	2414		良好機関	69(99%)	64(91%)	69(99%)		

* 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(2016-21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%
2021**	70	99%	91%	99%

* 各項目で非回答の施設有り

** 2016～2020年度と菌株が異なる

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	60.1	49.2	27	40.8	25.5	53	79.5	82.2
2	19.1	18	28	12.9	15.9	54	29.2	28.3
3	13.6	12.5	29	46.6	45.6	55	33.5	30.4
4	12.2	13.1	30	1.2	1.9	56	24	13.4
5	5	0.2	31	24.5	26.5	57	69.2	64.9
6	43.8	60.8	32	45.8	41	58	13.8	—**
7	37.8	38.9	33	10.7	23.1	59	27.5	30
8	25.2	27.7	34	35.2	34.6	60	16.2	19.7
9	68.4	124	35	69.8	84.2	61	60.6	68.7
10	35.5	16.5	36	58.6	87.9	62	45.7	26.8
11	17.3	12	37	38.3	36.7	63	13.5	16.7
12	55.5	73.6	38	60.4	60.4	64	79	52.2
13	29.4	34.3	39	56.3	62.5	65	29.5	23
14	69.8	69.4	40	38.3	28.9	66	50.8	52.3
15	60.1	39.2	41	58.4	28.4	67	66.6	71.2
16	41.8	48.8	42	10.2	15.6	68	53	50.6
17	64.9	77.4	43	58.8	52.6	69	30.6	26
18	67.8	62.1	44	22.1	34.4	70	54.6	50.6
19	47.7	72	45	25.6	36.1			
20	42.8	35.5	46	4.6	4.2			
21	27.7	55.4	47	52	37.2	平均値	41.8	43.5
22	52	49.8	48	60.5	72.6	最大値	85.1	124
23	30	34	49	47.1	38.6	最小値	1.2	0.2
24	61.8	63.7	50	59.8	75	中央値	43.3	38.9
25	55.4	60.4	51	85.1	66.2	良好機関	57(81.4%)	55(78.6%)
26	33.3	41.4	52	48.1	71.6			

* 参考

* * 分母が0

表4 回収率の比較(分母:非濃縮②、2017-21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	52.1	32.9	42.4	96	20	39.9	10.9
2018	74.3	47.8	47.6	94.5	20.2	43.1	12.1
2019	56.2	22.5	34	67.2	20.3	34.1	6.7
2020	54.2	25.1	35.8	69.9	20.2	32.3	9.5
2021*	78.6	43.5	49.5	87.9	23	49.2	12.3

* * 2017～2020年度と菌株が異なる

図1 回収率の比較(分母:非濃縮②)

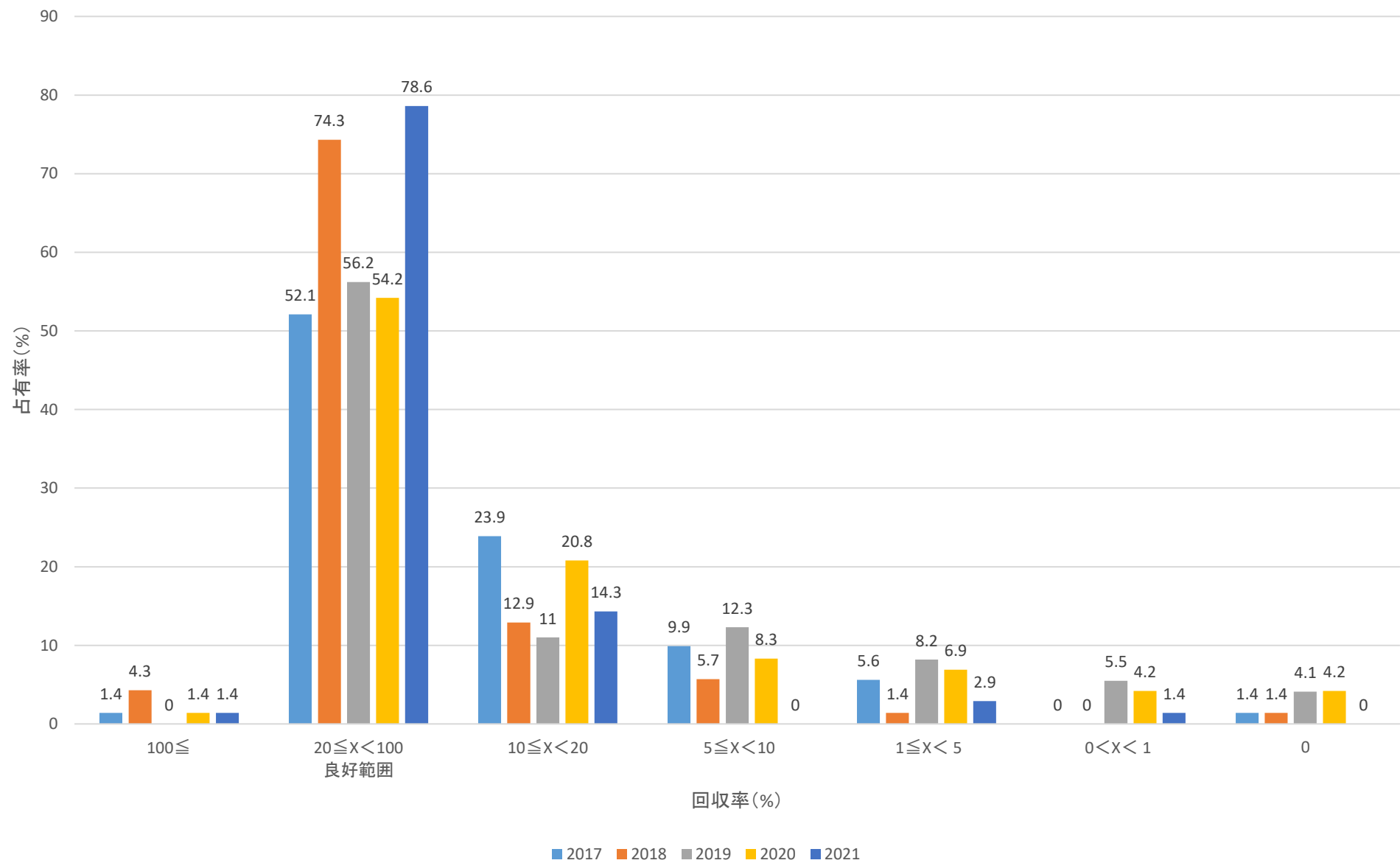


表5 2015～2021年度結果概略(2015/16/17/18/19/20/21、良好範囲(菌数○、回収率(分母非濃縮② 2017～)黒字)、範囲外(菌数*、回収率(2017～)赤字、検査項目外又は不参加ー)

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

表6 非濃縮検体2における異なる条件下での検査結果の比較 (値:cfu/100 mL)

	未処理		熱処理		酸処理		熱処理後酸処理	
	BCYE α	選択分離培地	BCYE α	選択分離培地	BCYE α	選択分離培地	BCYE α	選択分離培地
平 均 値	4320	2158	125	38	429	0	0	0
最 大 値	11000	5000	1000	500	1000	0	0	0
最 小 値	0	0	0	0	0	0	0	0
中 央 値	4100	2000	0	0	0	0	0	0
最 頻 値	4800	1000	0	0	0	0	0	0
回答機関数	70	31	8	10	7	9	3	2
総 回 答 数	70	38	8	13	7	13	3	3
良好回答数	69 (98.6%)	33 (86.8%)	1 (12.5%)	0 (0%)	3 (42.9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
不検出回答数	1 (1.4%)	5 (13.2%)	7 (87.5%)	12 (92.3%)	4 (57.1%)	13 (100%)	3 (100%)	3 (100%)

BCYE α :非選択分離培地

:サーベイ指定法

表7 濃縮検体における異なる条件下での検査結果の比較 (値: cfu/100 mL)

	未処理		熱処理		酸処理		熱処理後酸処理	
	BCYE α	選択分離培地	BCYE α	選択分離培地	BCYE α	選択分離培地	BCYE α	選択分離培地
平均値	1741	940	29	22	254	172	20	4
最大値	4736	2480	160	110	780	1240	50	10
最小値	20	0	0	0	5	0	0	0
中央値	1676	797	15	10	215	115	15	0
最頻値	1646	530	0	0	10	0	0	0
回答機関数	70	25	12	36	13	44	4	4
総回答数	70	32	12	46	13	57	4	5
良好回答数	59 (84.3%)	20 (62.5%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (15.4%)	2 (3.5%)	0 (0%)	0 (0%)
不検出回答数	0 (0%)	1 (3.1%)	5 (41.7%)	13 (28.3%)	0 (0%)	4 (7.0%)	2 (50.0%)	3 (60.0%)
BCYE α : 非選択分離培地								
: サーベイ指定法								

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属菌検査の内部精度管理のための手引きの作成

研究分担者

金谷 潤一 富山県衛生研究所 中西 典子 神戸市健康科学研究所
佐々木 麻里 大分県衛生環境研究センター

研究協力者

大森 恵梨子 仙台市衛生研究所 武藤 千恵子 東京都健康安全研究センター
長岡 宏美 静岡県環境衛生科学研究所 高橋 直人 静岡市環境保健研究所
○磯部 順子 富山県衛生研究所 枝川 亜希子 地方独立行政法人
大阪健康安全基盤研究所
浅野由紀子 愛媛県立衛生環境研究所

研究要旨

本研究では、入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の信頼性を担保するため、検査精度を確認し、検査担当者の技術水準を維持、向上させることを目的として、自施設で内部精度管理を実施するための手引きを作成した。研究班の構成メンバーに対し、手順書に従った内部精度管理の試行を依頼したところ、計 10 機関で内部精度管理が実施された。

非選択培地で求めた添加菌数に対して、非選択培地における回収率は、10.8~151.6%、平均 64.8%、中央値 71.0%であった。これに対し、選択分離培地での回収率は、1.3~78.0%、平均 35.7%、中央値 31.9%と、非選択分離培地に比べ、低かった。選択分離培地における発育菌数は添加菌数と比較すると非選択分離培地のおよそ 7 割で、培地の種類（メーカー）による大きな差は認められなかった。

本研究での検討結果から、回収率の良好範囲を設定するのは困難であると思われたが、自施設で安定した回収率が継続できるよう、内部精度管理を遂行することが大事であると思われた。内部精度管理手順書を基に標準作業書を作成、実施することで、正しく検査されるようになれば、それに基づく衛生指導も適確になり、公衆浴場が適正に管理されるものと思われる。

A 研究目的

環境水中のレジオネラ属菌を計測する方法として、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の別添「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」が示された¹⁾。その中に、検査には「信頼性確保のため、精度管理を実施することが求められている」と記載されている。また、内部精度管理の一例として回収率の確認方法について示されている。

そこで、本研究では、入浴施設的环境水におけるレジオネラ属菌検査の信頼性を担保するため、検査精度を確認し、検査担当者の技術水準を維持、向上させることを目的として、自施設でレジオネラ属菌検査の内部精度管理を実施するための手引きを作成した。レジオネラ属菌を添加した精度管理用試料水（以下、試料水）について、レジオネラ属菌検査（培養定量）を自施設の検査標準作業書に従って行い、検査結果と添加菌数から回収率を算出して評価する内容とした。この手引きを参考にして、自施設で内部精度管理標準作業書等を作成し、精度管理を遂行することが肝要である。

B 方法

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 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）を参照し、浴用水やシャワー水などの環境水試料を濃縮し、レジオネラ属菌を検出する手順のための手引きを検討した。

1 手引きの概要

培養したレジオネラ属菌を接種し、試料水を作製し、自施設の検査法に従い、検査を実施するという内容とした。

始めに、レジオネラ属菌を30℃3日間培養し、それを滅菌生理食塩水に懸濁し、接種菌液とする。これを希釈して、滅菌生理食塩水に接種し、試料水とする。同時に接種菌数を測定する（A）。

その後、自施設の標準作業書に従い、濃縮検体のレジオネラ属菌数を測定する（B）。

B/Aの値に濃縮率を勘案し、最終的な回収率とする。

また、作業手順に従いフローチャートを作成した。

2 手引き書による内部精度管理の試行

研究班の構成メンバーに対し、手引きに従った内部精度管理の試行を依頼したところ、計10機関で内部精度管理が実施された。

（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 手引きの作成

内部精度管理手引き（別添資料1）とその検査手順フローチャート（別添資料2）を作成した。

2 回収率

解析には、同じ施設で複数回実施したデータも同様に加えた。一部の機関では、選択分離培地、非選択分離培地どちらか一方でのみ菌数を測定した。

非選択培地で求めた添加菌数に対して、非選択分離培地における回収率は、10.8～151.6%、平均64.8%、中央値71.0%であった。これに対し、選択分離培地での回収率は、1.3～78.0%、平均35.7%、中央値31.9%と、非選択分離培地に比べ低かった（図1）。一方、選択分離培地について、同じ培地で算出した添加菌数に対する回収率は、3.1～97.0%、平均52.3%、中央値57.9%であった（図2）。1機関で、BCYE α 寒天培地での回収率が100%であったのに対し、GVPC寒天培地での回収率は1.3%と低かった。

3 接種菌数と回収率

添加菌数と回収率の関係について、同一試料水を選択分離培地、非選択分離培地の両方を用いて同時に測定した場合の回収率を添加菌数別に比較した（図3）。選択分離培地における発育菌数は添加菌数で比較すると非選択分離培地のおよそ7割で、培地の種類（メーカー）による大きな差は認められなかった。近似曲線により添加菌数から得られる濃縮後の菌数を計算すると、菌数が多くなるにつれ、回収率が高くなる傾向で

あった。

4 使用菌株

10 機関で内部精度管理に使用した菌は、ATCC33152 (*Legionella pneumophila* Sero group1: Lp1)、NIID0058 (感染研保有株 Lp1)、外部精度管理配布株 (Lp9)、自施設分離株 (Lp3) であった。1 機関では、外部精度管理株を使用した場合の回収率 (24.9%、37.2%) と自施設で分離、保管していた株の回収率 (87.8%) に大きな差異が認められた。しかしながら、同様に外部精度管理株を使用した他の機関では、65.6~151.6%の回収率となっていることから、外部精度管理株を使用することに課題があるか否かは明らかではない。「回収率」で触れたように、BCYE α 寒天培地での回収率が 100%であったのに対し、GVPC 寒天培地での回収率が 1.3%と低かった例では、聞き取りしたところ、添加したレジオネラ属菌は、自施設分離株で、濃縮前から選択分離培地での発育が良くない事実が認められた。

D 考 察

全国におけるレジオネラ症の原因のおよそ 4 割は公衆浴場に関連すると報告されている。従って、患者が報告された場合の感染源調査はもとより、公衆浴場に関連する衛生管理状況の把握のためにも、とりわけ環境水のレジオネラ属菌検査は必要である。浴用水については明確な管理基準が示されており、令和元年に厚生労働省から標準的検査法が示された。検査機関では、それらの検査法を基に正確な結果を示すことが重要である。そのためには、内部精度管理と外部精度管理の両方で、検査精度を担保していくことが必要となる。

本研究では、自施設で内部精度管理を実施するための手順について検討した。10 機関で実際にこの手順のための手引きに従って内部精度管理を実施したところ、手順について概ね理解が得られた。ただし、レジオネラ属菌の回収率には大きな差が認められ、これらの結果から回収率の良好範囲を示すことは困難であると判断した。その理由の一つは、回収率の低い原因が明らかにならなかったことにある。使用した菌株、培地など比較したが、その原因は特定できなかった。回収率

は、非選択分離培地と選択分離培地では明らかに非選択培地で高かった。しかし、これは選択分離培地の抑制力のためであり、添加菌数も同じ選択分離培地を使うと同等の回収率が得られる。ただし、1 機関で選択分離培地での菌の発育が大きく抑制されたこともあり、このような結果を回避し、確実に技術の検証を行うために、非選択分離培地で回収率を求める必要があると思われた。しかしながら、選択分離培地での抑制力を把握しておくことは重要であることから、できる限り選択分離培地を併用するべきである。いずれの場合でも、自施設において安定した回収率を維持することがもっとも重要である。そのためには、精度管理を実施する前に、培地における使用菌株の発育状況を確認することや、コンラージ棒での塗抹により安定した菌数が得られるなど、基本操作の習得が必要であろう。

本手順書では添加菌数を MacFaland2.0 の濁度の菌液から 10^3 CFU/100 μ l の添加菌液を作製した。添加菌数が多いほど回収率が高い傾向であったが、1 平板に 200 前後のコロニーが発育している場合が数えやすく、添加菌の作製方法 (希釈率など) 工夫が必要かもしれない。平板上の発育菌数が多くなりすぎるのを避けるために添加菌を希釈して塗抹、計測した機関もあったが、希釈の操作により誤差が生じる可能性があることは否定できない。1 機関では希釈して塗抹した場合、希釈しないで塗抹した濃縮水のおよそ 1.25 倍の菌数となった。希釈による誤差であるのか、菌数が多い場合に発育が抑制されるのか、原因は不明である。逆に、回収率が低い機関では、添加菌を少なくすると濃縮後に菌の発育を確認できなくなる可能性が考えられるので、添加菌数はそれぞれの機関で設定する必要がある。

実際の環境水にはレジオネラ属菌だけでなく、夾雑菌に加え、複数の菌種や血清型のレジオネラ属菌が含まれていることがほとんどである。そのため、レジオネラ属菌は選択分離培地でより検出される場合が多い。内部精度管理手順で安定した結果が得られるようになれば、夾雑菌を混合接種するなどして、より実際の検体に近い検水で精度管理を行うことも必要かもしれない。

E 結 論

本研究で示した内部精度管理手順書を基本として、自施設にあった標準作業書を作成し、内部精度管理を遂行することにより、検査精度を担保することが望ましい。回収率の良好範囲を設定するのは困難であると思われた。自施設で安定した回収率が継続できるよう、内部精度管理を遂行することが大事である。正しく検査されるようになれば、それに基づく衛生指導も適確になり、公衆浴場が適正に管理されるものと思われる。

F 研究発表

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

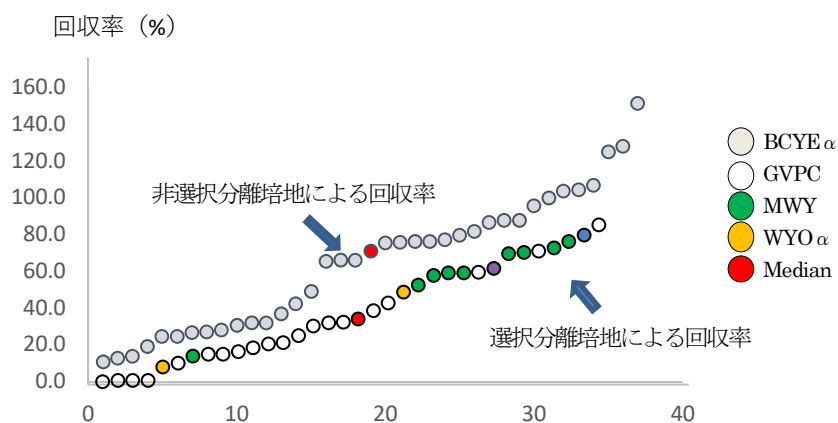


図 1. レジオネラ属菌添加試料水の濃縮後の回収率
(非選択分離培地で求めた添加菌数に対する回収率)

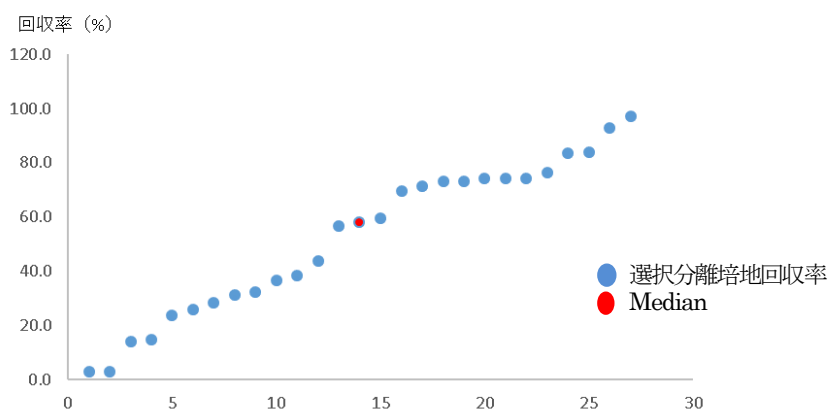


図 2. レジオネラ属菌添加試料水の濃縮後の回収率
(選択分離培地で求めた添加菌数に対する選択分離培地での回収率)

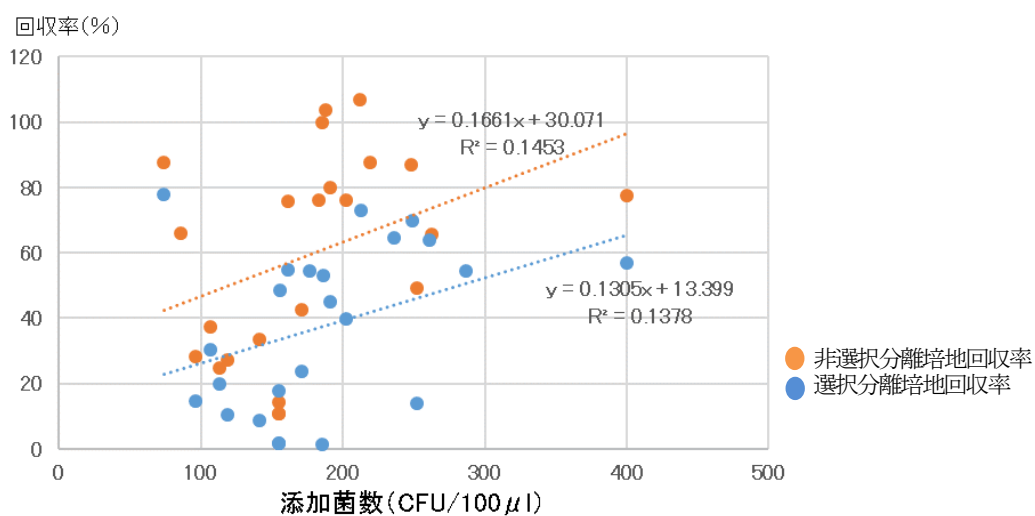


図 3. 選択分離培地、非選択分離培地同時測定による添加菌数別
回収率の比較

入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引き

環境水中のレジオネラ属菌を計測する方法として、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の別添「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」が示された。その中に、検査には「信頼性確保のため、精度管理を実施することが求められている」と記載されている。また、内部精度管理の一例として回収率の確認方法について示されている。この手引きではその確認方法を具体的に示した。この手引きを参考にして、自施設で内部精度管理標準作業書等を作成し、精度管理を遂行することが望ましい。

1. 目的

入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の信頼性を担保するため、検査精度を確認し、検査担当者の技術水準を維持、向上させることを目的とする。

2. 概要

レジオネラ属菌を添加した内部精度管理用試料水（以下、試料水）について、レジオネラ属菌検査（培養定量）を自施設の検査標準作業書に従って行い、検査結果と添加菌数から回収率を算出して評価する。合わせて、検査手技の安定性を確認する。

3. 内部精度管理手順

（1）準備する試薬・器具等

自施設のレジオネラ属菌の検査標準作業手順に必要な器具、試薬、培地に加え、次に示す内部精度管理のために必要な品目を準備する。

① 滅菌した蒸留水、生理食塩水、PBS など 1000 mL。

② レジオネラ属菌

例えば、*Legionella pneumophila* Serogroup 1

（Serogroup 1 である必要はないが、BCYE α 寒天培地に十分に発育する *L. pneumophila* を使用すること）

（2）添加菌液および試料水の調製

培養したレジオネラ属菌を接種し、試料水を作製する。

① 添加菌液の調製

レジオネラ属菌を BCYE α 寒天培地に画線し、 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ で 3 日間培養する^{注1}。この発育菌を滅菌生理食塩水に懸濁し、MacFaland 2.0 もしくは吸光度 0.320 程度（波長 625nm）に調整する（レジオネラ属菌数はおよそ 10^9 CFU/mL：添加菌原液）。これを滅菌生理食塩水にて 10^5 倍希釈し（ 10^4 CFU/mL：添加菌希釈液）、よく混和したのち、2 mL を 9 mL の滅菌生理食塩水に接種しよく混和する（添加菌液）。

注1 添加するレジオネラ属菌は $30 \pm 1^\circ\text{C}$ で 3 日間培養して使用するのが基本であるが、BCYE α 寒天培地上のコロニーの大きさなどにより、発育不十分と判断した場合は再度 BCYE α 寒天培地に画線し、

30±1℃で3日間培養した菌を使用する。

② 添加菌数の測定

この添加菌液から1 mLを分取し、その100 µLをBCYE α 寒天培地^{注2}（2枚以上）に接種後、直ちにコンラージ棒を用いてソフトタッチで均等に広げ、試料が吸収されるまで静置する。その培地を36±1℃4～7日間培養後^{*注3}、菌数を数える。この菌数を添加菌数(A)^{注4,5}として回収率の算出に用いる。

注2 同様の操作を自施設で使用している選択分離培地でも実施し、使用培地の選択性について把握することが望ましい。

注3 菌数、コロニーの大きさなどにより、7日間培養すると菌数測定が困難になる場合があることから、自施設の培地でのコロニーの発育状況を観察し、培養3日目以降毎日菌数を測定することが望ましい。

注4 回収率を計算する場合の基本となる「添加菌液」の菌数について、自施設内で一定の範囲内に収まることがポイントとなる。この菌数が平板によってばらつく時は、コンラージによる試料の塗抹技術の検証が必要となる。一定の範囲に収まるようになるまで、塗抹する平板数を増やしてCVやZスコアなどで管理状況を判断する。

注5 添加菌の菌数は培養平板上に200 CFU前後となるように菌液を調整することが望ましい。菌懸濁液の濁度は、目視で標準液の濁度に合わせる場合だけでなく、濁度計で調整してもその菌数にはある程度の多少が生じる。必要に応じ、自施設で菌懸濁液の濁度を調整（設定）する。

③ 試料水の調製

滅菌した採水容器に滅菌生理食塩水等を990 mL採取し、①の添加菌液10 mLを接種後、よく混和して試料水（レジオネラ属菌はおおよそ 2×10^3 CFU/100 mL）とする。

(3) レジオネラ属菌検査

3(2)③で作製した試料水を用いて、レジオネラ属菌検査を行う。検査方法は、自施設の検査標準作業書に従い、レジオネラ属菌数を測定する(B)。検査標準作業書の中で、選択培地のみ使用する場合は、BCYE α 寒天培地を用いたレジオネラ属菌数を測定することで選択培地によるレジオネラ属菌の発育抑制を除外した手技の確認ができる^{注6}。

注6 BCYE α 寒天培地を併用した場合、選択分離培地に比べ高い回収率となることが推測されるが、本手順では夾雑菌のない検体を用いていることから、実際の水検体におけるレジオネラ属菌の検出率と関連しない。

4. 評価方法

(1) レジオネラ属菌定量検査 回収率の確認

レジオネラ属菌を添加した試料水について、検査標準作業書に基づく検査を実施し、回収率を算出する^{注7}。

自施設の検査標準作業書において100倍濃縮する場合の計算式

$$\text{回収率 (\%)} = B/A \times 100$$

注7 ここで求められる回収率は施設内で安定的であることが望ましい。複数でレジオネラ検査を担当する場合、担当者間においても安定した回収率となることが肝要である。

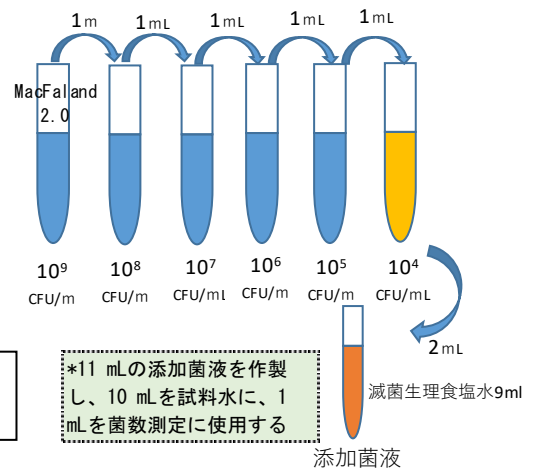
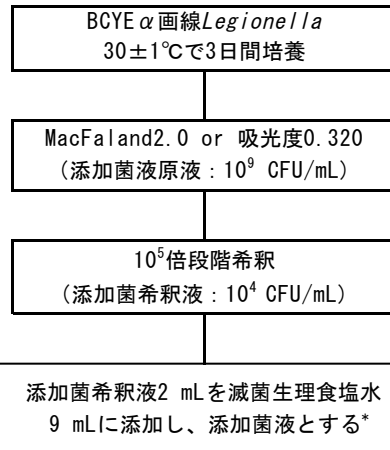
(2) 手技の安定性の確認

添加菌数 (A) 、菌数 (B) の平均値、標準偏差及びzスコアなどにより平板培養時の手技のばらつき度合を確認する。

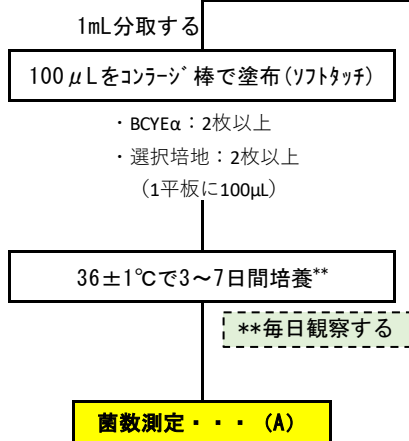
レジオネラ検査 内部精度管理手順 フローチャート

別添資料 2

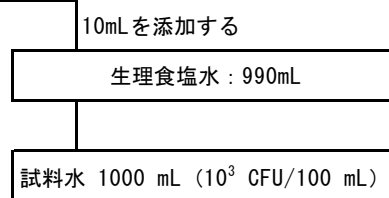
3. (2) ①添加菌液の調整



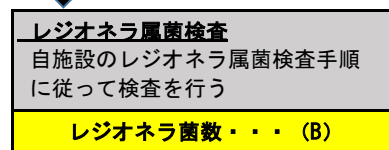
3. (2) ②添加菌数の測定



3. (2) ③試料水の調整



3. (3) レジオネラ属菌検査



$$\text{回収率 (\%)}^{***} = (B) / (A) \times 100$$

***試料水を100倍濃縮した場合

令和3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、わが国を含め世界中に感染が拡大した。新型コロナウイルス感染者が公衆浴場を利用する可能性があるため、昨年度は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感染価の低下の程度により評価した。今年度は実際の入浴施設の浴槽水における次亜塩素酸ナトリウムの効果を評価したところ、新型コロナウイルスの次亜塩素酸ナトリウムに対する高い感受性が示された。一方で、温泉を利用する浴槽水では遊離塩素濃度を設定値に安定させることが困難な場合があり、実際の入浴施設の現場において遊離残留塩素濃度の維持が新型コロナウイルス対策において課題であることが推測された。

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や感染者が発症する前に感染性を有することが報告されている。そのため、入浴施設を利用する無症候性感染者に由来する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、実際の浴槽水において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実施の浴槽水を用いて評価した。

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）を用いた。ウイルスの培養には Vero E6 細胞を用いて fetal calf serum (FCS) 非添加 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 L-グルタミンを

添加した培地で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、PD-10 脱塩カラム (Sigma-Aldrich) を用いたゲルろ過により培地に含まれるアミノ酸などの低分子量の成分を取り除いて生理食塩水に置換したのちに-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製し、これを次亜塩素酸ナトリウム液とした。

3. 入浴施設の浴槽水

関東、北陸、四国及び九州地区の温泉水を原水として用いている入浴施設の浴槽水を実験に用いた。各試料は浴槽から採取後に冷凍あるいは冷蔵で実験室に搬送し、実験に用いるまで冷凍で保管した。実験時には室温で解凍し、室温にしてから pH を測定した。

4. 実験液の調製

浴槽水の試料 9ml に対してウイルス調製液 1ml を加えた実験液に次亜塩素酸ナトリウム液を加え、所定の遊離残留塩素濃度 (0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L) にするのに必要な次亜塩素酸ナトリウム液の量を決めた。ウイルス調製液とは、ウイルス培養に用いた培地を PD-10 脱塩カラムにより培地に含まれるアミノ酸などの低分子量の成分を取り除いて生理食塩水に置換した液である。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりアクアブ AQ-201 (柴田科学) を用いて測定した。

5. SARS-CoV-2 の感染価 (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 100µL に、上記 4 で決定した所定量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えた浴槽水 900µL を加えて実験時の遊離残留塩素濃度とし、25°Cで5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) で 10⁷ まで 10 倍段階希釈し、各希釈段階の液の 40µL を VeroE6/TMPRSS2 細胞を培養した 96 ウェルプレートに 4 ウェルずつ接種し、5%CO₂ 下、37°Cで4日間培養した。各ウェルの細胞変性効果を観察してウイルス増殖を確認し、Reed-Muench 法¹⁾を用いて TCID₅₀ (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量)を計算した。さらに、次亜塩素酸ナトリウム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

関東、北陸、四国及び九州地区の温泉水を原水として用いている入浴施設の浴槽水 5 検体を実験に用いた。5 検体のうち、3 検体 (北陸地区由来 2 検体、九州地区由来 1 検体) は次亜塩素酸ナトリウムを用いて遊離残留塩素濃度を所定の濃度 (0.4 mg/L、1.0 mg/L) に設定することができなかった。そのため、実験を行うことができなかった。

関東及び四国地区の入浴施設の浴槽水を用いて次亜塩素酸ナトリウムによる残留塩素の SARS-CoV-2 ウイルスに対する効果を

調べたところ、遊離残留塩素濃度が 0.4 mg/L と 1.0 mg/L の場合の不活化率は関東地区の入浴施設の浴槽水では 96.8% (不活化度 $10^{-1.5}$) 及び >99.9% (不活化度 $<10^{-4.7}$; 検出限界未満まで不活化)、四国地区の入浴施設の浴槽水では 99.5% (不活化度 $10^{-2.3}$) 及び >99.9% (不活化度 $<10^{-4.0}$; 検出限界未満まで不活化) であった (表 1)。

遊離残留塩素濃度が 0.4 mg/L と 1.0 mg/L のいずれの場合でも不活化率は非常に高かった。入浴施設の浴槽水の通常遊離残留塩素濃度であれば、SARS-CoV-2 は 4 分程度の時間でほとんど不活化されることが示された。

令和 2 年度と令和 3 年度に浴槽水に浮遊する SARS-CoV-2 を想定して次亜塩素酸ナトリウムの効果を検討する実験を行ったが、次に挙げる課題が示された。

1. 少量 (1ml) の試験液を所定の塩素濃度に設定することが難しかった。

実験に使用する試験液の容量が 1ml と非常に少なく、それを 0.4 mg/L といった低濃度に設定することが難しかった。ウイルスが浮遊する試験液の塩素濃度を測定することはできないためにウイルスを含まない試験液を作製し、それを用いて所定の濃度になるように試験液に加える次亜塩素酸ナトリウム溶液の量を決める方法を採用した。

2. ウイルス培養液にアルブミンや血清等が含まれており、有機物質が残留塩素を消費するため、所定の塩素濃度にすることが難しかった。

ウイルス培養液から有機成分を取り除くためにカラム処理を行うことができるが、

この操作によりウイルスの活性が低下することが懸念された。したがって過度の有機成分の除去操作を行うことができなかった。そのためウイルス浮遊液に有機成分が残り、次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えた際に有機成分により塩素が消費されてしまうため、消費分を勘案して次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えて所定の濃度にする必要があった。

3. 塩素濃度に影響を与える化学物質を含む温泉水での消毒効果を評価する場合、所定の塩素濃度にすることが非常に難しかった。

鉄、マンガン、硫化水素などの硫黄成分、有機物質、アンモニウムイオン等が残留塩素を消費してしまう。今回の解析では浴槽水の 5 試料のうち 3 試料は所定の遊離残留塩素濃度にすることができなかったために実験に用いることができなかった。これらの浴槽水の含有成分を確認することはしなかったが、残留塩素を消費してしまう何らかの成分により塩素が消費された可能性があることが推測された。

塩素が消費される泉質の温泉水を原水として用いている場合は、遊離残留塩素濃度を一定に保つことは容易ではないことが推測される。このような入浴施設では常時遊離残留塩素を測定し、塩素剤の注入を調整して濃度を維持しなければならないと思われる。今回の実験では遊離残留塩素濃度を 0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L に設定して消毒効果を評価することとしていたが、入浴施設において実際の浴槽水での塩素濃度は 1 ポイントの濃度に設定するのではなく、範囲 (0.4~1.0 mg) で管理していると推測される。そのようなやり方により濃度の管理を

相対的に容易にしていると思われる。

4. 実験の対象とする試験液の性状によってはウイルスの不活化効果を評価することができない場合があった。

ウイルスの不活化効果は、ウイルスを対象の試験液に曝露した後に培養細胞でのウイルスの増殖で判定しているため、試験液に培養細胞の増殖を抑制したり、培養細胞を死滅させる作用があれば消毒剤のウイルスの不活化効果を判定することができなかった。

5. P3 レベル実験室で実験を実施するため、限られた機器材と空間を使って実験を実施することによる困難が伴った。

SARS-CoV-2 ウイルスの取扱いは BSL3 実験室で行うことが決められている。そのため、次亜塩素酸ナトリウムの効果の評価実験も BSL3 実験室の安全キャビネット内で実施しなければならなかった。非常に狭い空間での取扱いとなるため、大きな実験設備を用いることはできず、容量を増やして実験を行うことが困難であるなど、実験

の規模が制限された。

D. まとめ

令和 3 年度は入浴施設の浴槽水における次亜塩素酸ナトリウムの SARS-CoV-2 ウイルスに対する効果を検討した。関東と四国の入浴施設の浴槽水において遊離残留塩素濃度を 0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L としてウイルスの不活化を検討したところ、短時間に高い率で不活化されることが明らかとなった。

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.

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 入浴施設の浴槽水における次亜塩素酸ナトリウムの SARS-Cov-2 への効果

試料	採取地域	pH	遊離残留塩素濃度 (mg/L)	不活化率 (%)
1	関東	7.4	0.4	96.8
			1	> 99.9
2	四国	7.0	0.4	99.5
			1	>99.9
3	北陸	7.4	0.4	ND
			1	ND
4	北陸	6.5	0.4	ND
			1	ND
5	九州	8.7	0.4	ND
			1	ND

ND：実施せず

令和3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3年度分担研究報告書

「レジオネラ症集団事例における全ゲノム解析」

	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	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

分子疫学解析の手法として次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析が注目されている。全国の衛生研究所でも使用されているが、レジオネラ症集団事例における全ゲノム解析の利用はあまり事例がない。そこで本研究では、神奈川県において2015年に発生したレジオネラ症集団事例の株を用いて、全ゲノム解析法の一つである Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施してその有用性を検討した。SNPs 解析により、この集団事例は遺伝的関連のある2タイプの *L. pneumophila* SG1 と1タイプの *L. pneumophila* SG13 によって引き起こされた可能性が明らかとなった。さらに SNPs 解析では *L. pneumophila* ST2114 の7株をそれぞれが遺伝的に関連のある2種類のクラスターに区別することができた。ST2114 をより細かく型別でき、高い解析精度を示したことから、本事例において SNPs 解析を利用することは有用と考えられた。本事例を引き起こしたと推察されるこれら3タイプの *L. pneumophila* は、いずれも株間の SNPs の差は21 SNPs 以内であった。このデータは集団事例の SNPs 解析を行政検査として実施する上で、遺伝的関連性を判断する SNPs の値として一つの目安になるものと考えられた。

A. 研究目的

日本においてしばしば発生するレジオネラ症の集団事例^{1,2)}において、原因施設の多くは入浴施設であり、不特定多数の人々に感染を引き起こす。感染拡大防止のため、集団事例の際には、感染源の特定が重要となる。その際、患者および感染源と疑う環境中から分離した菌株を分子疫学手法で比較

することは有用であり、行政判断の一助となる。分子疫学手法として、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) や sequence-based typing (SBT) が広く利用されている。しかし、これらの手法の分解能には限界があり、より高い分解能を有する手法として次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析が注目されている。近年になって急速に次世代シ

ークエンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されているが、レジオネラ属菌に関する全ゲノム解析の利用はあまり事例がない。海外では集団事例の調査に全ゲノム解析を用いた報告^{3, 4)}があり、地衛研においても行政検査として集団事例に全ゲノム解析を用いることは有用と考えられ、その利用を検討する必要がある。

神奈川県において 2015 年に発生したレジオネラ症集団事例²⁾において、Kuroki らは SBT 解析および core-genome multilocus sequence typing (cgMLST) 解析を実施した⁵⁾。

そこで本研究では集団事例における全ゲノム解析の有用性を検討することを目的とし、この報告の株の一部を用いて全ゲノム解析の一つである Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施した。

B. 研究方法

1) 供試菌株

2015 年に神奈川県の 1 入浴施設で発生したレジオネラ症集団事例(患者 7 名)において、4 名の患者(1~4)および 2 つの浴槽水(1, 2)から分離された *Legionella pneumophila* (SG1: 8 株, SG13: 3 株)を供試した(表 1)。

2) 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*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) を PCR により増幅し、サンガー法により、それぞれ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 Allele 番号と sequence type (ST) を決定した。

3) SNPs 解析

菌株からの DNA 抽出は QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた。抽出した DNA から QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) を用いてライブラリを調整し、iSeq100 System (illumina) によりリードデータを得た。マッピングに用いるレファレンス配列を決定するため、Genbank に complete genome が公開されている代表的な 6 株の *L. pneumophila* SG1、すなわち Alcoy、Corby、Lens、Paris、Philadelphia および 130b (各アクセッション番号: CP001828, CP000675, NC006369, NC006368, AE017354, FR687201) と供試菌株のリードデータを KmerID (<https://github.com/phe-bioinformatics/kmerid>) により比較した。供試菌株と kmer に基づくゲノムの類似性が最も高い株をレファレンス配列とした。

マッピングは Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) を用い、SNPs の抽出は Genome Analysis Toolkit (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) を用いた。抽出した SNPs を *L. pneumophila* SG1 の 8 株および *L. pneumophila* SG13 の 3 株それぞれで 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 解析により、*L. pneumophila* SG1 は 7 株が ST2114、1 株が ST2121 だった(表 2)。ST2114 と ST2121 は *neuA* 遺伝子の Allele のみが異なり、その塩基配列の差は 1 塩基のみだった。*L. pneumophila* SG13 は 3 株すべてが ST2113 だった。これらの結果は Kuroki らの解析結果と一致していた。

SNPs 解析において、供試した 11 株と kmer に基づくゲノムの類似性が最も高かった株はすべて Corby 株 (kmer similarity 89.9%~91.2%)であり、これをレファレンス配列としてマッピングした。

SNPs 解析により、*L. pneumophila* SG1 の 8 株はクラスターA (KLH24, KLH31, KLH33, KL1528)とクラスターB (KLH22, KLH32, KL1523, KL1524)に分けられた(表 3(1))。クラスターA における株間の SNPs の差は 8~21 SNPs であり、ST2114 の 4 株で構成された。クラスターB における株間の SNPs の差は 3~6 SNPs であり、ST2114 の 3 株および ST2121 の 1 株で構成された。クラスターA および B の株間の SNPs の差は最大で 744 SNPs だった。*L. pneumophila* SG13 の 3 株については、株間の SNPs の差は 16~21 SNPs だった(表 3(2))。

Reuter ら³⁾は、レジオネラ症集団事例の分離株の SNPs 解析において、5 株(患者由来 2 株および環境由来 3 株)が遺伝的に関連のあるクラスターを形成し、その SNPs の差は 15 SNPs 以内だったと報告している。また、Graham ら⁴⁾は、レジオネラ症患者由来 3 株と感染源と疑う病院の給湯由来 1 株の SNPs 解析において、遺伝的関連のあるクラスターを形成し、最大 20 SNPs の差を認めたと報告している。本研究においても、*L. pneumophila* SG1 のクラスターA は株間の差が 8~21 SNPs、クラスターB は株間の差が 3~6 SNPs であり、前述の報告の SNPs とほぼ同じであることから、クラスター内の株は遺伝的に関連していると考えられた。*L. pneumophila* SG13 においても同様に、株間の差が 16~21 SNPs であり、遺伝的に関連が示唆された。なお、*L. pneumophila* SG1 と *L.*

pneumophila SG13 の株間は 1833~2562 SNPs の差を認めた(表 3 に記載なし)。

本研究で解析した集団事例において、レジオネラ属菌が分離された浴槽水は、浴槽水 1, 2 のみであった。クラスターA に属する浴槽水 2 由来株(KL1528)およびクラスターB に属する浴槽水 1 由来株(KL1523, KL1524)は、それぞれ分離された浴槽水のみから分離された。解析した株数が少ないため断定はできないが、クラスターA に属する株は浴槽水 2 を感染源とする株であり、クラスターB に属する株は浴槽水 1 を感染源とする株であると推察された。*L. pneumophila* SG13 についても同様に、浴槽水 1 および浴槽水 2 が感染源と推察された。

L. pneumophila の分子疫学解析における分解能は SNPs 解析、cgMLST 解析、SBT 解析の順に高いとされている⁶⁾。Kuroki らが実施した cgMLST 解析では、ST2114 を 2 つの cgMLST プロファイルに分けることができたが、その差はわずか 1 塩基であった。一方、本研究の SNPs 解析では同じ ST2114 の 7 株をそれぞれが遺伝的に関連のある 2 種類のクラスターA, B に区別することができた。ST2114 をより細かく型別でき、高い解析精度を示したことから、本事例において SNPs 解析を利用することは有用と考えられた。

本事例で分離された *L. pneumophila* SG1 は、各遺伝子(Allele)の塩基配列が非常に近い 2 種類の ST (ST2114 と ST2121 は 1 塩基の差)だったため、合わせて SNPs 解析を実施したところ、2 種類の ST が同じクラスターB を形成した。このことから、SNPs 解析を実施するにあたり、SBT 解析において ST が同じである株に加え、塩基配列の近い株に

についても合わせて SNPs 解析を実施する必要があることが示された。

本研究の SNPs 解析により、本事例は 3 タイプ(2 タイプの *L. pneumophila* SG1 および 1 タイプの *L. pneumophila* SG13)のレジオネラ属菌によって引き起こしたと推察され、いずれも株間の SNPs の差は 21 SNPs 以内であった。このデータはレジオネラ症集団事例の SNPs 解析を行政検査として実施する上で、遺伝的関連性を判断する SNPs の値として一つの目安になると考えられた。行政検査としてレジオネラ症集団事例への全ゲノム解析の利用を検討するためには、本研究のような集団事例株の全ゲノム解析を実施し、データを蓄積していくことが必要であると考えられた。

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. Reuter S, et al.: A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. BMJ Open, 2014, 33(1), e002175.
4. Graham RMA,; Real-time investigation of a *Legionella pneumophila* outbreak using whole genome sequencing. Epidemiol Infect, 2014, 142, 2347–2351.
5. Kuroki T, et al.: Outbreak of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella pneumophila* Serogroups 1 and 13. Emerg.

Infect. Dis, 2017, 23, 349–351.

6. 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, 54, 2135–48.

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 供試菌株

菌株番号	菌種	血清型	分離由来
KLH22	<i>L. pneumophila</i>	1	患者1
KLH24	<i>L. pneumophila</i>	1	患者2
KLH25	<i>L. pneumophila</i>	13	患者2
KLH31	<i>L. pneumophila</i>	1	患者3
KLH32	<i>L. pneumophila</i>	1	患者4
KLH33	<i>L. pneumophila</i>	1	患者4
KL1519	<i>L. pneumophila</i>	13	浴槽水1
KL1523	<i>L. pneumophila</i>	1	浴槽水1
KL1524	<i>L. pneumophila</i>	1	浴槽水1
KL1528	<i>L. pneumophila</i>	1	浴槽水2
KL1532	<i>L. pneumophila</i>	13	浴槽水2

表 2 SBT 解析

Serogroup	菌株番号	SBT								分離由来
		ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	
1	KLH22	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者1
1	KLH24	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者2
1	KLH31	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者3
1	KLH32	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者4
1	KLH33	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者4
1	KL1524	2114	6	10	21	3	17	14	9	浴槽水1
1	KL1528	2114	6	10	21	3	17	14	9	浴槽水2
1	KL1523	2121	6	10	21	3	17	14	57	浴槽水1
13	KLH25	2113	6	10	21	10	17	14	209	患者2
13	KL1519	2113	6	10	21	10	17	14	209	浴槽水1
13	KL1532	2113	6	10	21	10	17	14	209	浴槽水2

表 3 SNPs 解析

(1) *Legionella pneumophila* SG1

クラスター	ST	菌株番号	KLH24	KLH31	KLH33	KL1528	KLH22	KLH32	KL1524	KL1523	分離由来
A	2114	KLH24		5	3	5	740	743	738	742	患者2
	2114	KLH31			4	6	741	744	739	743	患者3
	2114	KLH33				4	739	742	737	741	患者4
	2114	KL1528					741	744	739	743	浴槽水2
B	2114	KLH22						19	14	8	患者1
	2114	KLH32							17	21	患者4
	2114	KL1524								16	浴槽水1
	2121	KL1523									浴槽水1

※表中の数字は株間の SNPs の差(青背景：クラスターA、赤背景：クラスターB)

(2) *Legionella pneumophila* SG13

ST	菌株番号	KLH25	KL1519	KL1532	分離由来
2113	KLH25		16	19	患者2
2113	KL1519			21	浴槽水1
2113	KL1532				浴槽水2

※表中の数字は株間の SNPs の差

令和 3 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 3 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
	研究協力者	島崎信夫	国際親善総合病院
	研究協力者	中村麻子	国際親善総合病院

本研究では神奈川県内の 1 入浴施設においてレジオネラ属菌の汚染実態調査を 2015 年度から継続してきた。当該施設において、不要配管の切除や次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置などの対策を実施した結果、2015～2018 年度には調査対象である 8 カ所中 5 カ所から最大 3,000 CFU/ 100 mL のレジオネラ属菌が検出されていたが、2020 年度には最終的に 2 カ所から 60 CFU/ 100 mL が検出されるのみとなった。この調査ののち、配管内の温泉水の停滞を防ぐことを目的として常時くみ上げポンプを稼働させ、定休日前に原湯の貯蔵タンクに次亜塩素酸ナトリウムを添加する対策が追加された。この対策の評価を目的としてレジオネラ属菌汚染実態調査を実施した。その結果、8 カ所中 1 カ所から 20 CFU/100 mL の *Legionella pneumophila* SG 6 が検出された。この入浴施設において、レジオネラ属菌は減少したと考えられるものの、完全な排除には至っておらず、配管の洗浄法の変更などさらなる対策が必要と考えられた。

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染は、病院内の環境管理の重要な課題となっている。調査対象の 1 医療機関では、これまで次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシングなどの対策を実施してきた。今年度新たな対策として、フラッシングを定期的に行う自動排水装置が導入されたことから、その評価を目的としてレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した。その結果、自動排水装置設置後もレジオネラ属菌が検出された。しかし、20 CFU/100 mL と少ない菌数が、計 3 回の調査において断続的に検出されたことから、蛇口付近で定着しているのではなく、深部配管のバイオフィームからレジオネラ属菌が供給されているものと考えられた。

A. 研究目的

1) 入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査

本研究では、入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染予防対策のための基礎的情報を得ることを目的として、汚染実態調査を継続してきた。

調査対象の入浴施設では、2015 年度の調査開始以降、カラン及びシャワーの交換や次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置、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、2015～2018 年度には試験した 8 ヶ所中 5 ヶ所から最大 3,000 CFU/ 100 mL のレジオネラ属菌が検出されていたものが、2019 年度の調査では 3 ヶ所において 10～300 CFU/ 100 mL となった。2020 年度には、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言により、この入浴施設においても 1 ヶ月程度の休業を余儀なくされた。この休業期間中の衛生管理により、営業再開約 1 ヶ月後には、1 ヶ所から 10 CFU/ 100 mL のレジオネラ属菌が検出されるのみとなったものの、約 5 ヶ月後には 2 ヶ所から 60 CFU/ 100 mL のレジオネラ属菌が検出された。昨年度の調査以降、この入浴施設においてさらにレジオネラ属菌対策が追加されたことから、その評価を目的として、レジオネラ属菌汚染実態調査を実施した。

2) 医療機関におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査

医療機関でのレジオネラ属菌の汚染は、レジオネラ感染症の院内感染の原因となることから、病院内の環境管理の重要な課題となっている¹⁾。このため、レジオネラ

属菌汚染の対策の一環として、本研究では 2015 年度より、医療機関におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査を継続してきた。その対象である神奈川県内の 1 医療機関では、これまで、次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシングなどの対策が実施されてきた。今年度新たな対策として、フラッシングを定期的に行う自動排水装置が導入されたことから、その評価を目的としてレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した。

B. 研究方法

1) 調査対象および測定項目

(1) 入浴施設

調査対象は、神奈川県内の 1 入浴施設において、2021 年 10 月に試料を採取した。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水、地下タンクおよび高置タンクの温水の計 14 試料を採取した。

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。

採取した試料を用いて、レジオネラ属菌の分離培養・遺伝子検査、温度測定、pH 測定および遊離残留塩素濃度の測定を実施した。試料は採取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。

神奈川県内の 1 医療機関において、令和 3 年 7 月に 6 ヶ所(地下控室 1 か所、倉庫内 1 ヶ所、病室洗面台 4 ヶ所)の洗面台等

の蛇口水を放水直後及び 3L 流水後、合わせて 12 試料を採取した。この 6 ヶ所のうち自動排水装置を設置した病室洗面台 4 ヶ所について 2021 年 8 月および同 9 月にも同様に試料を採取した。

採取した試料を用いて、レジオネラ属菌の分離培養・遺伝子検査、従属栄養細菌数の測定、一般細菌数の測定、温度測定、pH 測定及び遊離残留塩素濃度の測定を実施した。試料は採取当日に検査を開始した。

2) 試料の採取、温度測定、pH 測定および遊離残留塩素濃度の測定

水試料は 25 % チオ硫酸ナトリウム 1.0 mL を添加した 500 mL の滅菌容器に採取した。温度は、試料採取時にデジタル温度計を用いて測定した。pH および遊離残留塩素濃度測定用試料は 50 mL 遠沈管に採取した。実験室搬入時に、pH はガラス電極法を用いて、遊離残留塩素濃度は DPD 法による吸光度法として、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。

3) レジオネラ属菌の分離

試料 500 mL を、直径 47 mm、孔径 0.2 μ m のポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、5 mL の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した（以下、濃縮試料とする）。濃縮試料 0.5 mL について、50℃、20 分の加熱処理を行った。別の 0.5 mL に同量の pH2.2 緩衝液を加え、4 分間酸処理した。未処理及び処理後の濃縮試料を 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（日水製薬）に塗抹し、

36℃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（日研生物）に転培し、性状により鑑別を行った。

4) 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。3) の濃縮試料 1.5 mL を用いて、キット添付の説明書に従って実施した。

5) レジオネラ属菌の同定

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^{2,3)}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。

6) 従属栄養細菌数

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℃で 7 日間培養した。培養後、集落数を計数した。

7) 一般細菌数

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℃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 1 入浴施設では、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、次亜塩素酸ナトリウム添加装置は地下タンクと高置タンクの上に設置されている。聞き取りの結果、2020 年度において重点的に実施する衛生管理として以下の 7 点を行っていた。1) 営業日に比色法(DPD 法)により遊離残留塩素濃度を測定し、カラン、シャワーおよび浴槽水で、0.8~2.0 mg/L を維持した。浴槽については、測定時に濃度不足の場合、次亜塩素酸ナトリウムを直接添加した。2) 営業終了時に浴槽の湯を抜き、清掃、その日のうちに湯を満たした。3) ろ過器の逆流洗浄を週 1~2 回実施した。4) 営業日の朝、営業開始前にカランとシャワーのフラッシングを実施した。5) 定休日前日の営業終了後は、次亜塩素酸ナトリウムを浴槽に追加(濃度測定無)し、ろ過器を浴槽の間で 30 分間循環したのち、停止した。6) 定休日には清掃業者による清掃を実施した。7) 年 1~2 回の高濃度塩素洗浄を実施した。

2020 年度の調査結果を踏まえて、以下の対策を追加した。8) 定休日中の遊離残留塩素濃度を高く維持することを目的として、定休日前日の営業終了後、地下タンクに次亜塩素酸ナトリウムを添加した。9) 配管内の温泉水の停滞を防止することを目的として、温泉水の汲み上げポンプを夜間も継続して稼働させ、浴室の各系統につき一つの蛇口を開けた。8)、9) の対策を実施して以降、定休日明けにおいてもカラン等の末端

で遊離残留塩素濃度 1.0~2.0 mg/L を維持していた。

本調査での採水試料は、pH 8.0~8.3 であった。遊離残留塩素濃度については、地下タンクで 0.01 mg/L、浴室 A 浴槽水で 0.1 mg/L、浴室 A の湯口で 0.4 mg/L であったのを除き、0.6~1.3 mg/L であった。水温は地下タンクが 57.3 °C、高置タンクが 55.3°C、その他は 32.7~47.2°C であった。分離試験では、浴室 A のカラン 2 から *L. pneumophila* SG 6 が 20 CFU/100 mL 検出されたのみであった(表 1)。2019 年度の調査では、浴室 A のカラン 1 及び 2、浴室 B のカラン 2 から 10~200 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG1、6、9 及び *Legionella* sp. が検出されており、2020 年度の調査では、営業再開約 5 ヶ月後に浴室 A の 2 カ所のカランから、それぞれ 60 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6、9 及び *Legionella* sp. が検出されていた。本年度の調査において、レジオネラ属菌が検出されたカランの数および菌数が減少していることから、この施設におけるレジオネラ属菌が減少した可能性があると考えられた。これは、2020 年度の調査以降に新たに導入された対策により、配管内の温泉水の停滞が防がれたために高い遊離残留塩素濃度が維持されたことが影響しているものと考えられた。加えて、定休日前に地下タンクに次亜塩素酸ナトリウムを添加することも遊離残留塩素濃度の維持に役立っているものと考えられた。一方で、次亜塩素酸ナトリウム水溶液は pH がアルカリ側の場合、次亜塩素酸イオンの割合が高くなることから、pH が酸側の場合と比較して、微生物に対する効果は低くなるとされている。我々の室内実験においても、pH8.0 の場合に pH7.0 の場合よ

りもレジオネラ属菌に対する消毒効果が低くなることが確認された⁴⁾。また、2019年度の医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査では、pHが7.9～8.6と高い値を示した医療機関において、遊離残留塩素濃度が0.93 mg/Lと高い値であっても、400 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出された¹⁾。本研究において調査した入浴施設の温泉水もpH 8.0～8.3であることから、次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が低くなっていると考えられた。しかし、定期的な配管の高塩素濃度洗浄やろ過器の逆流洗浄といった対策に加えて、フラッシングやポンプ稼働による配管内の温泉水の停滞防止といった、遊離残留塩素濃度を維持するための対策を実施することで、レジオネラ属菌の抑制に一定の効果を示しているものと考えられた。

各浴室の浴槽水および高置タンクについてはこれまで同様、レジオネラ属菌の分離培養、LAMPともに陰性であった。地下タンクについては2019年度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、2020年度の調査に引き続き、今年度も分離培養は陰性であるもの、LAMPは陽性であった。2020年度の休業期間中に地下タンクに侵入・定着したレジオネラ属菌が排除されていないものと考えられた。しかし、地下タンクと高置タンクの間に次亜塩素酸ナトリウム添加装置が設置されていること、2020年度の営業再開後の調査で、地下及び高置タンクの温度が54.9℃以上となっており、今年度の調査でも55.7℃以上と高温が保たれていること、および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、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。

今年度の調査から、この入浴施設においてレジオネラ属菌が減少している可能性が示されたものの、浴室Aのカラン2からは継続して、*L. pneumophila* SG 6が検出された。2018年度から2020年度までにこのカランから検出された*L. pneumophila* SG 6を用いて、次世代シーケンサーによるSingle Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施したところ、最大で4 SNPsの違いしかなく、非常に近縁であり、同一のクローンを起源とする*L. pneumophila* SG 6が継続して検出されているものと考えられた⁵⁾。今年度検出された*L. pneumophila* SG 6について、SNPs解析は実施していないものの、同じ*L. pneumophila* SG 6が継続して検出された可能性がある。

この入浴施設ではレジオネラ属菌の完全な排除には至っておらず、衛生管理方法によっては、再び増加する可能性がある。今後は配管の個別洗浄や消毒方法の変更などさらなる対策を追加するとともに、汚染実態調査によるモニタリングを継続することが重要と考えられた。

2) 医療機関でのレジオネラ属菌の汚染実態調査

2021年7月の試験では、調査した12試料全てにおいてLAMPおよび分離培養のいずれにおいてもレジオネラ属菌は陰性であった(表2)。このうち、倉庫については、2019年11月に、残り3ヵ所については2021年3月に自動排水装置が設置されていた。1ヶ月後の8月の試験では、自動排水装置が設置された4ヵ所中、1病室1試料から

20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG1 (LAMP 陰性) が検出された。この結果を受けて、自動排水装置をそれまでは 3 時間に 1 分間稼働し、フラッシングしていたのを 1 時間に 1 分間稼働するように変更した。この変更後 12 日目に 3 回目となる 9 月の試験を実施した。その結果、2 病室 2 試料から 20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG1 (ともに LAMP 陽性) が検出された。

従属栄養細菌は 7 月の試験では 6 ヶ所 12 試料すべてで、 $1.0 \sim 6.8 \times 10^3$ CFU/mL の発育を認めた。8 月、9 月の試験においても調査した 4 ヶ所 8 試料すべてにおいて、 $2.0 \sim 8.9 \times 10$ CFU/mL の発育を認めた (表 2)。遊離残留塩素濃度は今年度の調査に使用したすべての試料で、0.67 mg/L 以上を示し、pH は 7.3~7.8、水温は 20.6~24.8°C であった。

従属栄養細菌は控室の試料において、最大を示し、 6.8×10^3 CFU/mL まで発育しているものの、この場所からはレジオネラ属菌は検出されなかった。倉庫においては、自動排水装置設置前の 2019 年度の調査では、 1.8×10^4 および 1.5×10^3 CFU/mL であったのが、設置後は $2.0 \sim 6.9 \times 10$ CFU/mL と減少した。しかし、その他の自動排水装置を設置した場所では、設置前から従属栄養細菌数が $0 \sim 6.7 \times 10$ CFU/mL と低く抑えられており、変化は認められなかった。

協力医療機関ではこれまでも毎日フラッシングを実施しており、今年度の調査でも遊離残留塩素濃度が 0.67 mg/L 以上と高く維持されていた。加えて、レジオネラ属菌は、自動排水装置設置後、一度不検出となり、その後、20 CFU/100 mL と少ない菌数が断続的に異なる蛇口から検出されていることから、蛇口付近で定着しているのではな

く、配管の深部に存在するレジオネラ属菌のバイオフィルムの一部が剥がれ落ちるなどしたものが検出されたものと考えられた。

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)、令和元年度分担研究報告書より
2. 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.
3. Mahbubani MH, et al.: Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular Probes, 4: 175-187, 1990.
4. 泉山信司、黒木俊郎、中嶋直樹「レジオネラの塩素消毒に対する水道水の pH の影響」、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「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) 令和 2 年度協力研究報告書より
5. 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）」令和２年度分担研究報
告書より

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

E. 健康危険情報

なし

表1 入浴施設におけるレジオネラ属菌の検出結果

		2019年						2020年						2021年	
		9月		5月(営業再開前日)		7月		9月		10月		11月		10月	
		LAMP	培養	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)
浴室A	湯口	-	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-
	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 L. sp. 60	+	L. p. SG6 20
浴室B	湯口	-	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-
	カラン1	-	-	-	-	-	-	-	L. sp. 10	-	-	+	-	-	-
	カラン2	-	L. p. SG1 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
地下タンク		-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

L. p. : *L. pneumophila*、L. sp. : *Legionella* sp.、+ : 陽性、- : 陰性、N. T. : not tested※2020年10月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レジオネラ属菌の検出状況

			2019年			2020年			2021年								
			9月			10月			7月			8月			9月		
			LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL
控室	給水	初流水	-	-	1.7×10 ²	-	-	1.0×10 ³	-	-	6.8×10 ³	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
	給水	3L流水後	-	-	1.5×10	-	-	5.4×10	-	-	3.9×10	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
倉庫 (自動排水装置： 2019年11月設置)	給水	初流水	+	-	1.8×10 ⁴	-	-	5.6×10	-	-	9.0	-	-	3.1×10	-	-	6.9×10 ¹
	給水	3L流水後	-	-	1.5×10 ³	-	-	2.0	-	-	1.7×10	-	-	3.3×10	-	-	2.5×10 ¹
A病棟病室1 (自動排水装置： 2021年3月設置)	給水	初流水	+	<i>L. p</i> SG1 20	1.0	-	-	0	-	-	4.0	-	-	2.0×10	-	-	1.1×10 ¹
	給水	3L流水後	+	<i>L. p</i> SG1 20	0	+	-	0	-	-	1.0	-	-	5.2×10	+	<i>L. p</i> SG1 20	9.5
A病棟病室2	加温装置	初流水	-	-	2.6×10 ³	-	-	2.9×10	-	-	5.3×10 ³	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
	加温装置	3L流水後	-	-	9.0	-	-	0	-	-	1.2×10 ²	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
B病棟病室1 (自動排水装置： 2021年3月設置)	給水	初流水	-	-	4.0	-	<i>L. p</i> SG1 10	5.0	-	-	3.6×10	-	-	1.1×10 ²	+	<i>L. p</i> SG1 20	8.9×10 ¹
	給水	3L流水後	-	-	3.0	-	<i>L. p</i> SG1 20	0	-	-	1.2×10	-	-	3.8×10	-	-	1.1×10 ¹
B病棟病室2 (自動排水装置： 2021年3月設置)	給水	初流水	-	<i>L. p</i> SG1 10	6.7×10	-	<i>L. p</i> SG1 20	2.0	-	-	4.1×10	-	<i>L. p</i> SG1 20	4.9×10	-	-	5.0
	給水	3L流水後	-	<i>L. p</i> SG1 20	7.0	+	-	0	-	-	2.1×10	-	-	1.8×10	-	-	2.0

L. p. : *L. pneumophila*、*L. sp.* : *Legionella* sp.、+ : 陽性、- : 陰性、N. T. : not tested

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kanatani JI, Watahiki M, Kimata K, Kato T, Uchida K, Kura F, Amemura-Maekawa J, Isobe J.	Detection of <i>Legionella</i> species, the influence of precipitation on the amount of <i>Legionella</i> DNA, and bacterial microbiome in aerosols from outdoor sites near asphalt roads in Toyama Prefecture, Japan	BMC Microbiology	21(1)	215	2021
Edagawa A, Matsuda N, Ogura T, Uezono K, Izumiyama S, Fujii A	Microbial Contamination of Rubber Ducks Floating in Bathtubs of Bathing Facilities, and an Evaluation of Their Washing Methods	Biocontrol Sci.	26	187-192.	2021
森 康則, 井上源喜	日本の温泉の利用状況と経年変化—行政科学的アプローチを中心として	地球化学	55	43-56.	2021
柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司	山梨県のアルカリ性 (pH10 程度) 温泉におけるモノクロラミン消毒の有効性の検討	日本防菌防黴学会誌	49(6)	261-267	2021
小松頌子, 中西典子, 岩本朋忠	市内温泉施設における緊急事態宣言後のレジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移	神戸市健康科学研究所報	49	39-42	2021
Morita M, Harada N, Shinohara Y, Murai M, Ishii N, Amemura-Maekawa J, Akeda Y.	Complete Genomic Sequence of the Clinical Isolate <i>Legionella pneumophila</i> Serogroup 1 Strain 80-045 from Japan.	Microbiol Resour Announc.	10	e0082221	2021

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.	74	491-494	2021
Nakaue R, Qin T, Morita M, Ren H, Chang B, Murai M, Amemura-Maekawa J, Ohnishi M. Development of a Multiplex-PCR Serotyping Assay for Characterizing <i>Legionella pneumophila</i> Serogroups Based on the Diversity of Lipopolysaccharide Biosynthetic Loci.	Development of a Multiplex-PCR Serotyping Assay for Characterizing <i>Legionella pneumophila</i> Serogroups Based on the Diversity of Lipopolysaccharide Biosynthetic Loci.	J Clin Microbiol.	59	e0015721	2021

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3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年4月1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3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4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3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 (所属部署・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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

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 都甲 一朗

次の職員の令和3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☐ 無 ☒ (無の場合はその理由: 研究管理に対する人的、予算的措置が無く、体制整備が遅れているため。)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☐ 無 ☒ (無の場合は委託先機関: 国立感染症研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 山梨県衛生環境研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 小林 早苗

次の職員の令和3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 (所属部署・職名) 微生物部・研究員
- (氏名・フリガナ) 柳本 恵太・ヤナギモト ケイタ

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☐ 無 ☒ (無の場合はその理由: COIの管理体制整備が遅れているため)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☐ 無 ☒ (無の場合は委託先機関: 国立感染症研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 三重県保健環境研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 中井 康博

次の職員の令和3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 (所属部署・職名) 衛生研究室 主査研究員
(氏名・フリガナ) 森 康則・モリ ヤスノリ

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☐ 無 ☒ (無の場合はその理由：過去に必要な事例がなかったため)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☐ 無 ☒ (無の場合は委託先機関：本研究に関しては国立感染症研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容：)

(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。

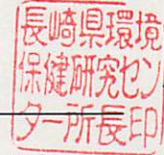
令和4年3月31日

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 本多 雅幸



次の職員の令和3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 (所属部署・職名) 保健衛生研究部 部長

(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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 4年 3月 31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3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 (所属部署・職名) 神戸市健康科学研究所感染症部・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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 川崎市健康福祉局健康安全研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 岡部 信彦

次の職員の令和3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 (所属部署・職名) 呼吸器・環境細菌担当 主任
(氏名・フリガナ) 淀谷 雄亮・ヨドタニ ユウスケ

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

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 平野 博之

次の職員の令和3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

- (※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
- (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。