
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～令和 3 年度 総合研究報告書

研究代表者 前川 純子

令和 4 (2022) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告

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. 高 pH 温泉、有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒-----	20
柳本恵太、泉山信司、森 康則、長岡宏美、山上隆也、植松香星、久田美子、望月映希、大森雄貴、赤池重宏、永井佑樹、田中慶郎、杉山寛治、茶山忠久、市村祐二、枝川亜希子、山本哲司、藤井 明、斎藤利明、小阪浩司	
2. モノクロラミン消毒下のバイオフィルムを対策する省力化洗浄方法の開発-----	37
森 康則、泉山信司、柳本恵太、長岡宏美、枝川亜希子、永井佑樹、大市真梨乃、佐藤大輝、小林章人、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、斎藤利明、小阪浩司	
3. 雑菌の増殖を抑える、オゾン消毒と酸性側モノクロラミン消毒の検討-----	48
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、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、茶山忠久、青木信和、山本哲司、細川賢人、田中孝典、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-----	59
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、下田貴宗、新道欣也、鳥井良太、斎藤利明、木村哲也、小森正人、杉山寛治、田中慶郎、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-----	97
淀谷雄亮、佐々木麻里、田栗利紹、柳本恵太、緒方喜久代、武藤千恵子、増輪文治、井原 基、湯澤栄子、田中奈緒美、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、比色系パルサー法の改良-----	106
佐々木麻里、高野真実、溝腰朗人、神田由子、成松浩志、江川英明、緒方喜久代	
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-----	116
金谷潤一、森本 洋、淀谷雄亮、中西典子、佐々木麻里、山口友美、武藤千恵子、磯部順子、枝川亜希子、中筋 愛、吉崎美和、小澤賢介、稲窪大治、塩崎晋啓、水谷幸仁、村尾拓哉、森中りえか	
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-----	131

黒木俊郎、佐々木麻里、森本 洋、金谷潤一、中西典子、田栗利紹、大森恵梨子、武藤千恵子、
大屋日登美、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、斉藤利明、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-----220

中西典子、野本竜平、小松頌子、水本嗣郎、高橋直人、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-----235

森本 洋、金谷潤一、佐々木麻里、中西典子、磯部順子、大森恵梨子、大屋日登美、陳内理生、
緒方喜久代、小川恵子、倉 文明、平塚貴大、三津橋和也、吉野修司

11. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果-----264

黒木俊郎、森川 茂

12. 入浴施設・医療機関のレジオネラ汚染実態調査および次世代シーケンサーを用いた

レジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討-----270

黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、陳内理生、中嶋直樹、島崎信夫、中村麻子

III. 研究成果の刊行に関する一覧-----289

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： 次亜塩素酸による消毒が困難な2施設の高pH温泉および1施設の有機物が含まれている温泉でモノクロロミン消毒が有効であることが確認できた。モノクロロ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ロ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ルム対策を徹底することの重要性が改めて示唆された。過炭酸ナトリウムに助剤を併用することで、薬剤の使用量が従来の3割ですむ新規の配管洗浄方法を開発した。洗浄効果が高く、洗浄後のすすぎの回数も減り、これまでより少ない労力で洗浄することができるようになったので、洗浄頻度が増えることで、有効なバイオフィルム対策となることが期待される。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。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。

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、5分で判定する迅速評価法を開発し、実証してきたが、モノクロロミン消毒の評価も行えるようになった。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。これまで得られた知見から、入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査のガイドラインを作成した。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。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、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70～73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
長岡宏美・静岡県環境衛生科学研究所部長
中西典子・神戸市環境保健研究所研究員
森 康則・三重県保健環境研究所主査研究員
森本 洋・北海道立衛生研究所主幹
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

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いかに記す。

1. 高pH温泉、有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

高pH温泉水を利用する2施設、有機物を含む温泉を利用する1施設の循環式浴槽につい

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

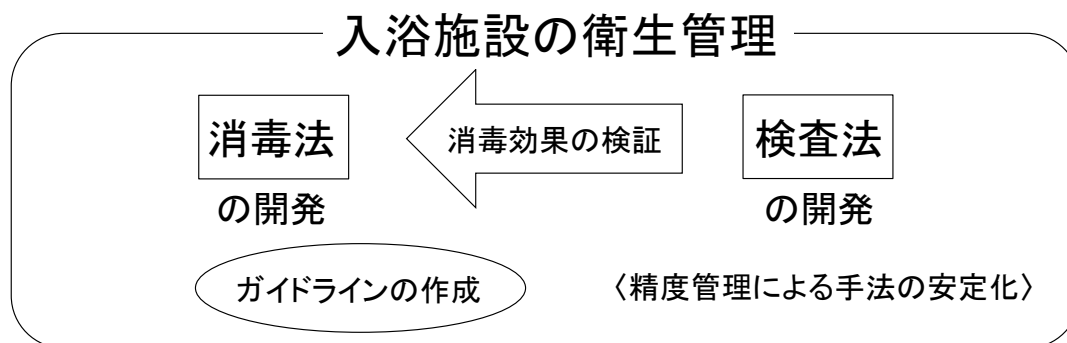


図1 本研究班の研究の流れ

表1

研究協力者一覧

赤地重宏	三重県保健環境研究所	小森正人	株式会社ヤマト	野本竜平	神戸市環境保健研究所
青木信和	ケイ・アイ化成株式会社	蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	花田祐一	アイデックスラボラトリーズ株式会社
縣 邦雄	アクアス株式会社	斎藤利明	株式会社ヤマト	久田美子	山梨県衛生環境研究所
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所	茶山忠久	ケイ・アイ化成株式会社	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
磯部順子	富山県衛生研究所	佐藤大輝	三重県保健環境研究所	藤井 明	株式会社ヘルスビューティー
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	塩崎晋啓	日本板硝子株式会社	藤江香予	愛媛県今治保健所
稲窪大治	日本板硝子株式会社	島崎信夫	国際親善総合病院	細川賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
井上浩章	アクアス株式会社	下田貴宗	シモダアメニティ株式会社	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
井原 基	長崎県環境保健研究センター	陳内理生	神奈川県衛生研究所	溝腰朗人	大分県衛生環境研究センター
植松香星	山梨県衛生環境研究所	新道欣也	株式会社お風呂のシンドー	水谷幸仁	日本板硝子株式会社
江川英明	大分県南部保健所	杉山寛治	株式会社マルマ	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	高野真実	大分県衛生環境研究センター	三津橋和也	北海道立衛生研究所
大市真梨乃	三重県保健環境研究所	高橋直人	静岡市環境保健研究所	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
大森恵梨子	仙台市衛生研究所	田中 忍	神戸市環境保健研究所	村尾拓哉	日本板硝子株式会社
大森雄貴	山梨県衛生環境研究所	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
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	田中奈緒美	アイデックスラボラトリーズ株式会社	森中えりか	株式会社ファスマック
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	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
小川恵子	北海道立衛生研究所	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
小澤賢介	デンカ株式会社	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
木村哲也	株式会社ヤマト	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
倉 文明	国立感染症研究所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	湯澤栄子	川崎市健康安全研究所
小坂浩司	国立保健医療科学院	中臣昌広	日本環境衛生センター	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
小林章人	三重県保健環境研究所	中村麻子	国際親善総合病院	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
小松頌子	神戸市環境保健研究所	成松浩志	大分県衛生環境研究センター		

て、モノクロラミン消毒の実証試験を実施した。モノクロラミン生成装置（クロラクター、ケイ・アイ化成）を用いて、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）により用時調製されたモノクロラミン溶液を、循環ろ過系統内に添加した。週 1 回、完全換水直前に高濃度モノクロラミンで配管を消毒した。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。有機物を含む温泉水については、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

アルカリ泉あるいは PBS に浴用水由来の *M. phlei* を添加し、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。消毒剤添加後 15 分、30 分、60 分、90 分の菌数を測定した。

3. 省力化洗浄方法の開発と営業施設における実地試験

過炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、酒石酸を混合して量比による洗浄効果の違いを試験管内で検討した。連続培養システム（アート科学社製）中に 15mm×20mm（厚さ 1.5mm）のステンレス製の試験片を設置し、某施設から採取した浴槽水を 40℃で 14 日間循環させてバイオフィルムを発生させた後、試験片を各種洗浄剤 5mL に浸漬し、バイオシェーカーで回転させて洗浄した。蒸留水ですすいだ試験片をクリスタルバイオレットで染色し、吸光度（波長 570 nm）を測定して、残存バイオフィルム量を求め、バイオフィルム除去率を求めた。

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

すすぎを繰り返した。

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

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

4. 酸性側モノクロラミン消毒の検討

営業 3 施設の協力を得て、人工炭酸泉の 4 浴槽 (pH はそれぞれ 5.6、5.1、5.0、5.2) で、モノクロラミン生成・注入装置を設置し、モノクロラミン濃度を 3 mg/L 以上に維持する消毒試験を行なった。週 1 回、モノクロラミン濃度 10 mg/L で 2 時間循環させ、配管消毒を実施後、換水した。消毒効果の確認用に浴槽水を換水日前日の夜間に採取した。1 施設の 2 浴槽水については、フローサイトメトリーにより全菌数を測定した。

5. オゾン消毒の検討

スーパー銭湯 1 施設の協力を得て、オゾン供給装置を設置し、毎日のろ過器逆洗前にろ過槽の有効容量分以上の電解オゾン水を自動注入した。週 1 回、オゾン供給前に浴槽水および逆洗水を採水した。

6. 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 μm 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。モノクロラミン消毒時のフローサイトメトリーの散布図は次亜塩素酸消毒時のものとは異なるため、独自の測定領域を設定し、モノクロラミン消毒効果の判定も行えるようにした。A 研究所において標準作業書とワークシートを作製し、10⁵、10⁴、10³ cells/mL オーダーの Lp NIB0058 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、モノクロラミン管理 28 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 (上記、5. オゾン消毒の検討) 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。

7. 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

基礎的検討として、BCYE α 寒天培地に塗布し増菌した *L. pneumophila* SGUT の菌株について、滅菌水で 10 倍ごとの希釈系列を作成し、平板培養法及びレジオラート/QT 法を行った。3

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。

公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 599 検体を対象として、レジオラート/QT 法を実施した。本法は飲料水用 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。レジオラート/QT 法で陽性と判定されたものの、ウェルの液体培地を塗布した GVPC α 寒天培地上でレジオネラ属菌が検出できなかった一部検体について、発育したコロニーから遺伝子を抽出し、16S rDNA により菌種を同定した。また、同定した菌についてレジオラート/QT 法で陽性を示すか確認した。

8. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法の評価、レジオラートを用いた定性試験法の検討、比色系パルサー法の改良

令和元年 5 月から令和 3 年 11 月に搬入された浴槽水および湯口水 75 施設分 144 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（令和 3 年採水分）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。

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

9. 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、プール水であった。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-1* 遺伝子を検出する PCR を施行した。迅速検査として、LAMP 法、LC EMA-qPCR 法、PALSAR 法、モバイル qPCR 法を実施した。Lp で感作した免疫磁気ビーズ（Lp-IMB）を用いた選択的濃縮法を実施した。

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。

10. 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の作成

研究班の分担研究者及び研究協力者で構成す

る2つのワーキンググループを形成し、検討した。

「入浴施設における衛生管理の手引き」の総合衛生管理のパートは、平成16～18年度厚生労働科学研究費補助金健康総合科学研究事業「循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」の分担研究報告書「HACCPシステムの導入を伴う循環式浴槽の管理について」並びに米国CDCが発行した”Toolkit: developing a water management program to reduce *Legionella* growth and spread in buildings”を参考にした。一般的衛生管理のパートは、「公衆浴場における衛生等管理要領」及び「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」に基づいて、衛生管理方法の検討を行い、その内容を記載した。

「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」は、大分県においてレジオネラ症に関する調査に用いられている対応要領を基に、腸管出血性大腸菌感染症等に対する調査マニュアルの調査手法を取り入れて、「入浴施設におけるレジオネラ症防止のための日常的な維持管理指針」（平成26年3月第2版発行；NPO法人入浴施設衛生管理推進協議会、大分県監修）、「レジオネラ症防止指針 第4版」（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター）等を参考に検討した。

両案を研究班の分担研究者及び研究協力者に配付するとともに、所属する自治体の環境衛生担当者や感染症担当者に提示し、項目・内容・使い勝手等に対する意見を求めた。ワーキンググループでは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た。

令和3年度は、「入浴施設における衛生管理の手引き（案）」については研究班の分担研究者及び研究協力者並びに全国の衛生研究所を有する自治体の環境衛生担当者に配付し、試験的に使用した感想や意見を募った。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（案）」については研究班の分担研究者及び研究協力者から意見を募

り、それらに基づいて修正した。

11. 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。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。全ゲノム解析は、QIAseqFX(QIAGEN)を用いてDNAライブラリを調製し、Miseq regent Kit v.3を用いてリードデータを取得した。A5-Miseqでアセンブリし、PROKKAでアノテーションを行った。全ゲノム配列による系統解析にはkSNP3を用いて解析した。完全長ゲノム配列は、MinION（Nanopore社）から得られたロングリードとMiseqのショートリードデータをUnicyclerによりHybrid assemblyして決定した。

12. 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）を使用する。令和3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。令和元年度161機関（延べ164試料配付）、令和2年度171機関（延べ180試料配付）、令和3年度184機関（延べ191試料配付）に対し実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所等が令和元年度73機関、令和2年度72機関、令和3年度70機関が参加した。配付試料を受け取った各機関は、50 mLの滅菌生理食塩水に懸濁混和した「非濃縮試料①」と、そこから試験用に1 mL分取した残りにさらに441 mLの滅菌生理食塩水を加え、混和した「非濃縮試料②」、さらに各機関が行なっているろ過濃縮、あるいは遠心濃縮を実施して得られる「濃縮試料」について、それ

ぞれレジオネラ分離培地 5 枚に 100 μ L ずつ塗布し、各試料中のレジオネラ菌数を算出した。目標回収率は 20%以上 100%未満とした。

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、令和 3 年度に計 10 機関で内部精度管理が実施された。

13. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

令和 2 年度は、低濃度の次亜塩素酸ナトリウムあるいはモノクロラミンの SARS-CoV-2 ウイルスと FeCoV-2 に対する効果を評価した。ウイルス液を PBS で 100 倍に希釈し、その 1 mL に予め決定しておいた 0.1~0.2 mg/L となるのに必要な量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えて 25°C あるいは 41°C で 1、5、10 及び 20 分間曝露した。モノクロラミンについては、結合塩素濃度が 1、3、6 mg/L になるように PBS で希釈したモノクロラミン液 1 mL に 10 μ L のウイルス液を加え、1、5 及び 10 分間曝露した。曝露後に直ちに 0.1M チオ硫酸ナトリウムで中和し、1% FCS 加 D-MEM 培地 (SARS-CoV-2) または 5% FCS 加 D-MEM 培地 (FeCoV-2) で 10 倍段階希釈し、感受性細胞 (SARS-CoV-2 は VeroE6/TMPRSS2 細胞 ; FeCoV-2 は fcfw-4 細胞) に接種し、5%CO₂ 下、37°C で 4 日間 (SARS-CoV-2) あるいは 2 日間 (FeCoV-2) 培養した。

令和 3 年度は、SARS-CoV-2 ウイルスを Vero E6/TMPRSS2 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) (富士フィルム和光純薬) 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、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°C 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。ウイルス液 100 μ L 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 μ L を加えて、25°C 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 μ L 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°C で 4 日間培養した。

各ウェルの細胞変性を観察し、TCID₅₀ (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量) を計算し、未処理群と比較し生存率を求め、100-生存率 (%) を不活化率として算出した。

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および次世代シーケンサーを用いたレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

緊急事態宣言により約 1 か月休業した神奈川県内の入浴施設において、2020 年 5 月の営業再開前日、再開後の 7 月、9 月、11 月に 2 つの浴室の浴槽水、湯口水、カラン並びにシャワーの温水及び地下タンクと高置タンクの温水を採取、10 月にはカランから給水系のみを採取した。2019 年と 2021 年には 9 月と 10 月のそれぞれ 1 回採取を行った。神奈川県内の 1 医療機関において、2019 年 9 月、2020 年 10 月、および 2021 年 7 月に、地下控室 1 か所、倉庫内 1 か所、病室洗面台 4 か所の洗面台等の蛇口水を放水直後及び 3L 流水後に採取し、その間に自動排水装置を設置した 4 か所については 2021 年 8 月および同 9 月にも採取した。採取した検水について、レジオネラ属菌分離培養・遺伝子検査、遊離残留塩素濃度の測定を行った。分離されたレジオネラ属菌は PCR 法およびレジオネラ免疫血清により同定した。

レジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した入浴施設から分離された Lp (SG1: 8 株、SG6: 5 株) 株および 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) 株を供試

して、DNA を抽出し、SBT 解析、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。入浴施設から分離された株に対するレファレンス配列は Philadelphia 1 (アクセッション番号: AE017354) とし、集団感染事例株については、Corby (アクセッション番号: CP000675) をレファレンス配列として、マッピングは Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>)を用いて、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。(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 高 pH 温泉、有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

いずれの施設とも、モノクロラミン濃度は安定に推移し、レジオネラ、自由生活アメーバ、大腸菌群は陰性であったが、従属栄養細菌数の増加が確認された。有機物を含む温泉における菌叢解析の結果は *Methylobacterium* 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 となった。アルカリ泉中では、モノクロラミンの *M. phlei* の 3-Log 不活化の CT 値はおおよそ 800 mg/L・min であったのに対し、

遊離塩素は 1-Log 不活化でも CT 値はおおよそ 2,000 mg/L・min が必要であった

3. 省力化洗浄方法の開発と営業施設における実地試験

試験管内で洗浄条件を検討した結果、過炭酸ナトリウムにアスコルビン酸と酒石酸をそれぞれ 0.1%となるよう等量で混合した場合、バイオフィルムの除去率は 80 ないし 90%程度と従来法を上回ることができた。薬剤の重量が従来法の 3 割となった。4 浴場施設で新規の洗浄方法を実施したところ、配管内部およびろ過器内部のふき取りにおいて、ATP 値、一般細菌数、従属栄養細菌数の減少が見られ、高い洗浄効果を示した。すすぎは 1-3 回で完了した。

4. 酸性側モノクロラミン消毒の検討

いずれの浴槽水も、全塩素濃度は試験期間を通じて 3mg/L 以上と安定して維持されており、レジオネラ属菌、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌群の検出はなかった。一部浴槽水についての消毒効果を判定するフローサイトメトリーによる全菌数測定結果は、1,000 counts/mL 未満となり、「清浄」と判定された。

5. オゾン消毒の検討

オゾン利用前は、浴槽水で 10~60 CFU/100 mL、逆流水で 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 日目の逆流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。この検出は、生物膜の塊を偶然に測定したと考えられた。逆流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。

6. 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障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。

モノクロラミン消毒下の 28 サンプルの浴槽水について、「清浄」と判定された 19 浴槽からは培養法においてもレジオネラ属菌は検出されなかった。「細菌増殖」と判定された 9 浴槽からも培養法でレジオネラ属菌は検出されず、レジオネラ属菌遺伝子と Lp 細胞数は「清浄」と判定された検体と有意差はなかったが、BCYE α 培地表面に中程度～大量の細菌が確認され、*Mycobacterium phlei* と同定された。

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, $p=0.004$)。

7. 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

L. pneumophila SGUT の菌株について、10 倍ごとの希釈系列を作成し、平板培養法及びレジオラート/QT 法を行ったところ、レジオラート/QT 法における検出菌量は、平板培養法とほぼ同等で、平板培養法と同様に概ね 10 倍ごと段階的に減少していった。精度管理品を用いた 3 検査施設間におけるレジオラート/QT 法の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。実検体 (N=599) 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 83.6 % と高かった。両法で陽性であった 136 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。頻回に観察して陽性となった日を記録した 80 検体 (7 日間培養) のうち、20 検体は培養 3 日目で

ウェルの変色を確認され、培養 5 日目までには 70 検体の変色を確認された。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 98 検体のうち 73 検体が、検出菌量が 30 MPN 又は CFU/100 mL 未満であった。

レジオラート/QT 法のみ陽性であった 37 検体中 17 検体でレジオラート培養液から *L. pneumophila* が検出された。*L. pneumophila* が検出されなかった 4 検体において、培地上で発育が見られたコロニーから遺伝子抽出し、16S rDNA の塩基配列により同定したところ、それぞれ *Brevundimonas naejangsanensis*、*Pseudomonas otitidis*、*Pseudomonas* sp.、*Aeromonas hydrophila* であった。これら単離した菌株をそれぞれ滅菌水に懸濁し、レジオラート/QT 法を実施したところ、茶色の発色を示し、陽性反応が見られた。

8. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法の評価、レジオラートを用いた定性試験法の検討、比色系パルサー法の改良

平板培養の結果は、大分法では 144 検体中 62 検体、標準法では 56 検体からレジオネラ属菌が検出された。3 検体は非濃縮検体のみからレジオネラ属菌が検出された。レジオネラ属菌数は、大分法と標準法でそれぞれ 5~44500、10~31500 (濃縮試料のみでは 10~16640) CFU/100mL であった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.8541$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8579$ 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。

比色系パルサー法については、使用したセルロース混合エステルフィルターの孔径が 0.45 μ m (14/17 検体が陽性) でも、0.22 μ m (12/17 検体

が陽性)と同等以上の結果となった。保健所で実施した4検体は2検体が陽性となった。

9. 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

318 検体中、78 検体 (24.5%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。10~99 CFU/100 ml が 52 検体 (16.4%)、100~999 CFU/100 ml が 19 検体 (6.0%)、1,000 CFU/100 ml 以上が 7 検体 (2.2%) であった。血清群別の結果、Lp6 が 38 検体から分離され、最も多かった。次に多かったのは、Lp1 (28 検体) であった。また、Lp 以外の菌種が 12 検体から分離された。

PALSAR 法において、シャワー・カラン水を対象とした場合、浴槽水などを対象とした場合と比較し、感度が低かったが、MWY 液体培地で一晚増菌する方法で、平板培養法に対する感度が 100%となった。

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 法と同等となった。カットオフ値を 40 に設定すると偽陽性検体を減らすことができた。LC EMA-qPCR 法は、Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を用いた場合、平板培養法に対する感度 (91.2%)、特異度 (78.3%)、陽性的中率 (55.4%)、陰性的中率 (96.8%)、一致率 (81.2%) の全てにおいて、NucleoSpin Tissue および Lysis Buffer for *Legionella* を用いた方法と比較し、最も高かった。平板培養法に加えて、Lp1 で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) 法を併用すると、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あった。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* 遺伝子陽性率も 0.3~4.4%と機関によって差があった。分離された Lp1 菌株に占める *lag-1* 遺伝子の陽性率 (*lag-1*/Lp1) も、7.7%~50.0%と機関によって差が

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。

また、これまで得られた知見から、入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査のガイドラインを作成し、研究班のホームページに掲載した (<https://sites.google.com/view/legionella-resgr/>)。

10. 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の作成

レジオネラ属菌による汚染を防ぐために衛生管理を計画的に実施し、その効果を評価して向上・改善する体制を確立するための総合衛生管理プログラムと、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。一般衛生管理のパートは、具体的な管理方法を記述し、図を多用した。

「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」は、本文に患者調査票、施設調査票、施設調査必要物品チェックリストを加えて構成した。また、レジオネラ症が弧発事例であっても集団発生であっても第一報からの調査方法に違いはなく、弧発事例であっても詳細な施設調査を行う場合もあるため、当初は、「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)」としていたものを「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」に名称変更し、研究班のホームページで公開した

(<https://sites.google.com/view/legionella-resgr/>)。

11. 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。

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

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 MLVA 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 MLVA 型であったが、もう 1 株は初めての MLVA 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。

12. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

外部精度管理に 7 年連続で参加した機関は 43 機関あった。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った。令和元年度には外部精度管理において不安定な結果を複数回報告していた 3 機関に対し技術指導を行い、一定の成果が得られた。令和 2-3 年度は、コロナ禍の影響により技術指導が行えなかった。

令和 3 年度に 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。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。

13. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

PBS 中での SARS-CoV-2 の次亜塩素酸ナトリウムとモノクロラミンによる消毒の効果を調べたところ、25℃で、次亜塩素酸ナトリウムの遊離塩素濃度が 0.1mg/L では 20 分後に検出限界未満（99.99%以上）まで不活化され、0.13mg/L では 1 分で検出限界未満（99.99%以上）まで不活化された。さらに、41℃では 0.10mg/L、0.11mg/L で 5 分後に検出限界未満（99.99%以上）まで不活化された。FeCoV-2 は、0.16mg/L で 5 分後に検出限界未満（98.89%以上）まで不活化された。

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 分程度の時間でほとんど不活化され

ることが示された。

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および次世代シーケンサーを用いたレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

2015年からレジオネラ属菌の汚染実態調査を継続している神奈川県内の1入浴施設において、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。この間に、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、2019年度の調査では、10～200 CFU/100 mLのレジオネラ属菌の検出となった。さらに、2020年度の新型コロナウイルス感染症に伴う緊急事態宣言に基づく休業期間における衛生管理を経て、2021年度には1カ所から20 CFU/100 mLの *L. pneumophila* SG6が検出されるのみとなった。

1医療機関を継続して調査しており、これまで塩素添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシング、一部蛇口においてはフラッシングを定期的に行う自動排水装置の導入などの対策を実施してきた。一部蛇口からレジオネラ属菌が検出されたものの20 CFU/100 mLと少ない菌数であった。

次世代シーケンサーによる分子疫学的解析法の検討として、入浴施設において分離されたレジオネラ属菌のSNPs解析および2015年に発生したレジオネラ症集団事例のSNPs解析を実施した。入浴施設分離株のSBT解析では同じSequence Type (ST) とされた複数の菌株において、SNPs解析でも同一もしくは数SNPsの違いであった。これらの菌株には、この施設において、一年以上にわたり検出されているものや、異なる浴室から検出されたものが含まれていた。集団事例の株を用いたSNPs解析では、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。

D. 考察

3年間の研究実施機関のうち、後ろ2年間は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、その一方で、入浴施設の長期休業がレジオネラ汚染に与えた影響の調査や、新型コロナウイルスへの消毒効果の確認等、新たに設定された研究を行うことができた。班会議や関連会議は滞りなくwebで行われた。

本研究期間を通じた実証試験により、令和元年に発出された「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」が定期的な水質検査に適した方法であることが確認できた。併せて実施するよう明記された非濃縮検体の検査の重要性も示された。

次亜塩素酸による消毒が困難な高pH温泉で有効であるモノクロアミン消毒実施例を積み重ねることができた。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、いずれの温泉でも、従属栄養細菌への対策は必要であると考えられた。従属栄養細菌対策の基礎データ取得のため、*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ア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。実地のモノクロアミン消毒下で *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、モノクロア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。モノクロアミン消毒で *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等のバイオフィーム対策を徹底することの必要性が改めて示唆された。ろ過器や配管は、ブラシを使った物理的な洗浄ができず、過酸化水素や過炭酸ナトリウムを使用した化学的な洗浄が行われている。これらの物質は劇物や危険物としての管理を要し、多量の薬剤を使った定期的かつ頻回の洗浄は容易ではない。そこで、使用する薬剤量の低減を目的として、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法を開発した。その結果、薬剤の使用量が重量にして従来の3割と低減し、9

割以上の微生物が除去される洗浄効果も確認された。洗浄後のすすぎの回数も多くなく、これまでより少ない労力で洗浄することが可能となった。この方法により、洗浄頻度と衛生状態の向上が期待される。

人工炭酸温泉において、モノクロミン消毒下でレジオネラ属菌、一般細菌数、大腸菌群数のみならず、従属栄養細菌の検出もみられなかった。これまでは酸性の浴槽水に対してモノクロミン消毒を積極的に応用することがなかったが、トリハロメタン等の消毒副生成物が生じず、アンモニア等の存在下でも濃度の制御がしやすく、塩素臭が抑えられるといった利点からも、アルカリに限らず酸性側の浴槽水においても、モノクロミン消毒の利用が有用と考えられた。人工炭酸泉に溶存している 1,000 mg/L を超える炭酸ガスと消毒剤の相乗効果が細菌増殖を抑制した可能性もあり、今後の検証が待たれる。

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。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、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やすくし、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。

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。モノクロミン消毒下で増殖する従属栄養細菌は本法で迅速に検知できることが明らかになった。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、検査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、技術の普及に努める。

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が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、培養温度を検討の結果、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。

研究班で作成した「入浴施設における衛生管理の手引き」が入浴施設の効果的な衛生管理に

活用され、また「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」が入浴施設関連レジオネラ症発生時の疫学・環境調査の実施時に活用されて迅速・的確に原因を究明して適切な措置することでレジオネラ属菌の増殖・定着を防ぐことができ、入浴施設関連レジオネラ症の減少につながることが期待される。

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。全ゲノム系統解析から、MLVA と SBT の結果は全ゲノム配列の傾向を十分に反映していると考えられた。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た。サンガー法で決定した配列でも利用可能となっており、迅速で有用な解析ツールと考えられた。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。

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。良好な結果を報告した機関は、安定した検査環境を継続すること、そうでなかっ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。また、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、10 機関で手順書に従った内部精度管理が実施された。その結果からは、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。

SARS-CoV-2 は遊離塩素に感受性が高く、これまでに報告があった SARS-CoV 同様、比較的短時間で不活化されることが示された。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ものの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、毎日フラッシングを実施しており、2021 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。少ない菌数のレジオネラ属菌が断続

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洗浄・消毒方法を開発した。過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の配管洗浄方法を開発した。高 pH 温泉だけでなく、人工炭酸泉や有機物が含まれている温泉でモノクロミン消毒が有効であることが確認できた。公衆浴場における適切な遊離塩素消毒で、SARS-CoV-2 は短時間に不活化されることが明らかとなった。

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水等について培養検査および迅速検査を行い、レジオネラ属菌による汚染実態を明らかにした。レジオ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。レジオネラ迅速検査のガイドラインを作成した。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、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

（１）健康危険情報

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

（２）情報源

Hospital Water Hygiene 研究会のホームページ

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

（３）情報に関する評価・コメント

グレード A 情報：重要情報

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

・情報源にリンクされている記事（ワシントン発ロイター通信、2020 年 4 月 24 日）によると、米国疾病対策予防センターが長時間閉鎖された建築物の給水システムを再開するためのガイダンスを出している（URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/building-water-system.html>、2020 年 5 月 7 日更新）。

・本邦に即した対応とするために、情報源中に「建物や施設の再開時の留意点（HWH 研究会からの提言）」が述べられている（URL: <https://fs.lck-cloud.jp/u13673/>）研究会からの提言・推奨）。閉鎖されている施設の再開にあたり、

給水・給湯系、冷却塔系について、洗浄・消毒による安全性の確保が必要である。本邦における特徴的な施設である、入浴施設の循環式浴槽系やシャワー系についても注意が必要である。諸施設の再開にあたっては本提言を参考にすることが望まれる。

(4) その他

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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jiang L*, Amemura-Maekawa J*, Ren H, Li Y, Sakata M, Zhou H, Murai M, Chang B, Ohnishi M, Qin T (*: contributed equally). Distribution of *lag-I* alleles, *ORF7*, and *ORF8* genes of lipopolysaccharide and sequence- based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates in Japan and China. *Front Cell Infect Microbiol.* 9:274. 2019.
- 2) 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ミン消毒の実地検証ー三重県津市の榊原温泉における検討ー. *温泉科学.* 69:90-102. 2019.
- 3) 磯部順子, 金谷潤一, 木全恵子, 内田 薫, 加藤智子, 綿引正則. 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況. *富山県衛生研究所年報.* 42:39-43. 2019.
- 4) Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine

Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. *Journal of Hot Spring Sciences,* 2020, 70, 50-60.

- 5) 森 康則, 赤地重宏, 永井佑樹, 吉村英基, 泉山信司. 温泉付随ガス分離設備におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策. *温泉科学,* 69, 192-201 (2020)
- 6) 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子, 紙上ミニシンポジウム I〜水の衛生管理〜3.貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況, *日本防菌防黴学会誌,* 2020, 48(8), 377-382.
- 7) Nakamura I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kobayashi T, Sato A, Watanabe H, Matsumoto T. Persistent *Legionella* contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan. *Int J Infect Dis.* 93:300-304. 2020.
- 8) 金谷潤一、磯部順子、山口友美、武藤千恵子、淀谷雄亮、飯高順子、佐々木麻里、田栗利紹、蔡 国喜、川野みどり、倉文明、前川純子. 環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価. *日本防菌防黴学会誌.* 2020, 48, 515-522.
- 9) Inoue H, Baba M, Tayama S. Evaluation of Legiolert for Quantification of *Legionella pneumophila* from Bath Water Samples. 2020. 25:179-182.
- 10) 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ミン消毒の有効性の検討, *日本防菌防黴学会誌,* 49, (2021), 261-267.
- 11) 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.

- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Morita M, Harada N, Shinohara Y, Murai M, Ishii N, Amemura-Maekawa J, Akeda Y. Complete Genomic Sequence of the Clinical Isolate *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strain 80-045 from Japan. Microbiol Resour Announc. 10: e0082221. 2021.
- 2) 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 8 浴槽のレジオネラ対策 1 浴槽のどこで、どのように増えるのか」、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 83-89.
- 3) 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 9 浴槽のレジオネラ対策 2 浴槽水の各種消毒方法の効果」、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 117-123.
- 4) 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 10 浴槽のレジオネラ対策 3 モノクロミンによる消毒方法について、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 159-166.
- 5) 倉 文明：給湯・給水系に潜むレジオネラ感染症. 感染症. 287:10-17. 2019.
- 6) 枝川亜希子、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 12 レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 229-232.
- 7) 井上浩章、枝川亜希子、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 13 アメーバ共培養法を用いたレジオネラ属菌の検出、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 273-277.
- 8) 倉 文明：special feature 知る・学ぶ・実践する 水回りの感染制御、水回りの環境調査の実践 — 検査の方法・対象・頻度とその活用術. 感染対策 ICT ジャーナル、15(4):301-5, 2020.
- 9) 倉 文明：IV. 感染症-22 レジオネラ症. 小児内科増刊号 52(653):925-30. 2020

3. 学会発表

2. 総説
- 1) 中植竜大、前川純子、村井美代：グラム陰性菌のリポ多糖の構造と合成経路の多様性ー*Legionella pneumophila* の遺伝子検査による血清群別に向けてー. 保健医療福祉科学. 8:40-47. 2019.
- 1) 中西典子、野本竜平、田中忍、岩本朋忠：冷却塔に定着する *L. pneumophila* が保有するプラスミドの遺伝的特徴. 第 14 回日

- 本ゲノム微生物学会年会. 2020 年 3 月、愛知.
- 2) 藤井明、松田宗大、小倉徹、小倉諒太、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、モノクロラミン管理下の循環浴槽におけるろ材付着バイオフィルムに対する各種消毒剤の効果、第 47 回建築物環境衛生管理全国大会、2020 年 1 月、東京都.
 - 3) Mori, Yasunori., Nagai, Yuki., Akachi, Shigehiro., Nishi, Tomohiro., Hamaguchi, Maho., Yoshimura, Hideki., Sugiyama, Kanji., Tanaka, Yoshirou., Sayama, Tadahisa., Izumiyama, Shinji. Field test of monochloramine disinfection for alkaline hot spring water that cannot sufficiently be disinfected with sodium hypochlorite because of its high pH - A case study in Sakakibara hot spring area of Tsu City, Mie Prefecture -. The 72th Annual Meeting of the Japanese Society of Hot Spring Sciences. Taichung, November 2019.
 - 4) 森中理慧馨、前川純子、金谷潤一、磯部順子、加藤尚之、大野章、高崎一人、原口浩幸、布藤聡、倉文明. 日本温泉科学会第 72 大会. レジオネラ属菌の迅速検出法として比色系パルサー法の有用性の評価について. 2019 年 11 月. 台中市.
 - 5) 森 康則、赤地重宏、永井佑樹、吉村英基、泉山信司、温泉付随ガス分離設備のレジオネラ属菌による汚染実態と対策、日本温泉科学会第 72 大会、2019 年 11 月、台中市
 - 6) 森本 洋、小川恵子、三津橋和也：レジオネラ症患者の喀痰からいかにしてレジオネラ属菌を検出するか、第 68 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2019 年 10 月、仙台.
 - 7) 淀谷雄亮、原 俊吉、湯澤栄子、本間幸子、前川純子、森田昌知、大西 真、岡部信彦. レジオネラ症患者から分離された菌株等における SBT 法による遺伝子型別に
ついて. 第 68 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2019 年 10 月. 仙台.
 - 8) 田栗利紹、蔡 国喜、新道欣也、下田貴宗、倉文明、前川純子. レジオネラニューモフィラの定量検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の有用性評価. 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会. 2019 年 9 月、大阪.
 - 9) 松田宗大、枝川亜希子、泉山信司、小倉徹、植園健一、松田尚子、藤井 明、循環式浴槽から分離された *Mycolicibacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果、日本防菌防黴学会第 46 回年次大会、2019 年 9 月、大阪.
 - 10) 小倉 徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、松田宗大、松田尚子、藤井 明、モノクロラミン管理下の浴槽循環ろ過装置内のろ材バイオフィルムに対する各種消毒剤の消毒効果の検討、日本防菌防黴学会第 46 回年次大会、2019 年 9 月、大阪.
 - 11) 前川純子. 「レジオネラ症発生事例について-作業環境を中心に-」. 第 29 回日本衛生産業学会全国協議会シンポジウム「生物学的ハザードと作業環境」. 2019 年 9 月. 仙台.
 - 12) Jun-ichi Kanatani, Masanori Watahiki, Keiko Kimata, Tomoko Kato, Kaoru Uchida, Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, and Junko Isobe. *Legionella* Species in Aerosols from Outdoor Sites near Asphalt Roads in Toyama Prefecture, Japan: Detection, Identification and Correlation with Precipitation. ESGLI 2019. Athens, Sep, 2019.
 - 13) 前川純子. 「*Legionella pneumophila* の遺伝子型別から分かること」. 第 92 回日本細菌学会総会ワークショップ「レジオネラをめぐる新展開」. 2019 年 4 月. 札幌.
 - 14) 前川純子. レジオネラ症の疫学. 第 94 回日本感染症学会総会・学術講演会シンポジウム 22. 2020 年 8 月. 東京.

- 15) 淀谷 雄亮、原 俊吉、小嶋 由香、本間 幸子、前川 純子、森田 昌知、大西 真、岡部 信彦：川崎市におけるレジオネラ症患者からのレジオネラ属菌の分離及び解析状況。第 32 回日本臨床微生物学会総会・学術集会。2021 年 1 月。Web 開催。
 - 16) 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。
 - 17) 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。
 - 18) 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。
 - 19) 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) 黒木俊郎：公衆浴場の衛生等管理要領の改正につながった研究成果について、厚生労働省 令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020 年 2 月、東京都。
 - 2) 森本 洋：公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について、厚生労働省 令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020 年 2 月、東京都。
 - 3) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、令和元年度環境監視員担当者会議、2019 年 6 月、大分。
 - 4) 佐々木麻里 他：レジオネラ症総論と培養法の注意点、レジオネラ web 研修会、2021 年 1 月、大分（web 開催）。
 - 5) 佐々木麻里 他：環境水等からのレジオネラ属菌の検査法について、レジオネラ実技研修会、2019 年 4 月、福岡。
 - 6) 倉 文明：レジオネラ症の最新の動向と ATP 測定を活用した衛生管理、第 123 回ルミテスターセミナー（web セミナー）、2020 年 6 月、東京都。
 - 7) 倉 文明：レジオネラについて（その正体、いかに対処するか）、第 78 回ウォーター研究会セミナー、機能水研究振興財団令和 2 年度第 1 回研修会、2020 年 6 月、東京都。
 - 8) 前川純子：新通知法に基づくレジオネラ属菌検査。専門研修「検査技術」。2020 年 10 月。東京都。
 - 9) 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。
 - 10) 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。
 - 11) 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。
 - 12) 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。
 - 13) 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

令和元年～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)

総合研究分担報告書

高 pH 温泉、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	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	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	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	赤地 重宏	三重県保健環境研究所 微生物研究課
研究協力者	永井 佑樹	三重県保健環境研究所 微生物研究課
研究協力者	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
研究協力者	枝川亜希子	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	山本 哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	藤井 明	株式会社ヘルスビューティー
研究協力者	斎藤 利明	株式会社ヤマト 温浴事業部
研究協力者	小坂 浩司	国立保健医療科学院 生活環境研究部

研究要旨

高 pH の温泉や有機物を多く含む温泉では、遊離塩素消毒の効果の減弱や、濃度の低下が知られている。そのような泉質でも、モノクロラミンは安定的にレジオネラを抑制できると期待されている。ただし、モノクロラミン消毒は浴用水中の従属栄養細菌数を増加させることがあり、また有機物を多く含む温泉水を利用した公衆浴場での実績に乏しい。そこで本研究では、そのような泉質の3営業施設の協力を得て、モノクロラミン消毒の実証試験を行った。高 pH の温泉施設では、全ての浴用水でレジオネラ、アメーバ、大腸菌群は陰性であったが、従属栄養細菌数は増加し、週1回、1時間の高濃度モノクロラミンを

用いた配管の消毒では抑制しきれなかった。高 pH の温泉であっても、モノクロラミン消毒はレジオネラの制御に有用だが、従属栄養細菌数が増加する問題が再現され、より強力な洗浄や対策が必要と考えられた。有機物を含む温泉施設でも、レジオネラは陰性と、モノクロラミンの消毒効果が得られたが、従属栄養細菌数が高かった。菌叢解析の結果、*Methylobacterium* 属菌、*Cloacibacterium* 属菌が優占菌種で、一見 *Mycobacterium phlei* はモノクロラミン消毒時に減少傾向にあったが、消えることはなかった。有機物が含まれている温泉においてもモノクロラミン消毒は有効であったが、繰り返し従属栄養細菌数増加への対策が必要と考えられた。

A. 研究目的

レジオネラ症発生防止のため、次亜塩素酸ナトリウム（遊離塩素）により公衆浴場浴用水の消毒が行われている。遊離塩素は、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、効果が減弱することが知られている。また、全有機体炭素（Total Organic Carbon、以下 TOC）が高い、有機物が多い温泉の場合、遊離塩素濃度が低下する。

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、様々な温泉において、レジオネラ属菌に対する有効性が確認されている¹⁾。試験管の中ではあるが、有機物を含む温泉であっても、モノクロラミンは消費量が少ないことが確認されており²⁾、濃度を維持しやすいと期待される。

ただし、モノクロラミン消毒下における従属栄養細菌数の増加が報告されており³⁾、また有機物を含む温泉を利用した公衆浴場での実証試験は経験不足であり、事例の蓄積と対策の検討が課題である。

そこで本研究では、高 pH および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実証試験を実施した。高 pH の温泉施設

では従属栄養細菌数の増加の再現性の確認と対策の検討、有機物を含む温泉施設では消毒効果、濃度の安定性、菌叢の変化について調査した。

B. 研究方法

施設 1 高 pH 温泉水を用いた大容量浴槽

(1) 対象施設

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

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

(2) モノクロラミンの濃度管理

モノクロラミン生成装置（クロラクター、ケイ・アイ化成）を用いて、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)により用時調製されたモノクロラミン溶液を、循環ろ過系統内に添加した。注入頻度は、浴用水のモノクロラミン濃度が、常時およそ 3~6 mg/L の範囲で推移することを意図して設定した。モノクロラミン濃度がこの管理濃度範囲に入らない場合は、手動操作によって追添加し、濃度を調整した。施設による濃度測定は、全塩素濃度を測定した。

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

(3) 各種測定

各種微生物試験は、定法に従い実施した。すなわち微生物試験用の水試料は、チオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に、休館日前日の営業中（モノクロラミン添加 3 時間以上経過後）に採水した。細菌培養用は冷蔵、アメーバ培養用は常温にて搬送・保存した。レジオネラ属菌は、0.20 µm フィルターでろ過濃縮した 100 倍濃縮液と、ふきとり検体は懸濁した原液の、それぞれを熱処理または酸処理し、GVPC 寒天培地で 36℃、7 日間培養した。大腸菌群は浴用水 100 mL を EC ブルー100P「ニッスイ」、一般細菌数は標準寒天培地を用いて 36℃、24 時間培養

した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 42℃、14 日間で求めた。アメーバは、浴用水原液および 1,000×g、5 分間で 50 倍に遠心濃縮した浴用水から、大腸菌塗布無栄養寒天培地を用いて、42℃で 14 日間培養した。

pH 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。アンモニア態窒素は、上記ポケットモノクロラミン・アンモニア計、あるいはインドフェノール法により波長 640 nm の吸光度(紫外可視分光光度計、SHIMADZU UV-2450)から測定した。

施設 2 週 3 回換水する高 pH 温泉水を用いた浴槽

(1) 対象施設

山梨県内の pH10 の源泉水(表 2)を有する、一日の入浴者数が 500~1000 人程度の施設において、男女の浴用水が同一系統の 15~20 m³ の内湯を対象とした。週に 3 回、浴用水の完全換水と、清掃が行われた。ろ過器の逆洗浄は、毎営業日の営業時間外に 10 分間程度行われた。実証試験期間は 7 週間とした。

(2) モノクロラミンの濃度管理

施設 1 と同様の方法でモノクロラミンの濃度管理を行った。週 1 回、完全換水直前に浴用水のモノクロラミン濃度を 15~20 mg/L に調整し、1 時間または一晩中消毒を行った(図 1)。

(3) 各種測定

各種微生物試験と塩素濃度測定は、施設 1 同様に、定法に従い実施した。浴用水の

採水は、試験期間直前に 1 回、期間中に週 1 回、汚れが蓄積していると思われる最終換水日から最も日数の経過した日の営業開始前（モノクロラミン添加 30 分間程度経過後）に、実施した（図 1）。

施設 3 有機物を含んだ温泉水を用いた浴槽

(1) 対象施設

山梨県内の 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 の温泉水（表 3）を使用する、約 22 m³ の内湯を対象とした。入浴者数は 1 日に 200~400 名程度で、浴用水の循環系統を有しており、1 週間に 3 回換水していた。ろ過器の逆洗浄は、毎営業日の営業時間外に 7 分間行われた。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（図 2）。

(2) モノクロラミンの濃度管理

施設 1 と同様の方法でモノクロラミンの濃度管理を行った。ただし、用時調製したモノクロラミン溶液は、概ね 3~5 mg/L の範囲となるように、全ての循環系統および貯湯槽に添加した。週 1 回、完全換水直前に浴用水の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、浴用水は全て排水し、浴槽を洗浄した。

(3) 各種測定

各種微生物試験は、施設 1 と同様に行った。ただし、採水は週に 1 回、浴用水に汚れが蓄積していると思われる最終換水日から最も日数の経過した日の営業開始前（モノクロラミン添加 2 時間程度経過後）に、実施した。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を比較し、t-検定で危険率 5%未満を有意差ありと判定した

（Microsoft Excel 2016）。

浴用水中の 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を行った（生物技研、神奈川県相模原市）。DNA 試料は、浴用水 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 遺伝子の定量値を比較し、前述の比較と同様に、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

施設 1 高 pH 温泉水を用いた大容量浴槽

浴用水中のモノクロラミン濃度は、ほぼ安定的に推移した（図 3）。入浴客の増加に伴って温泉水の足し湯をした場合に管理濃度範囲よりも若干低くなる傾向が見られたが、この場合も即座に手動操作によって追添加を行うことにより、短時間で管理濃度範囲に回復した。

6 週間の実証試験期間を通じて、レジオネラ属菌、一般細菌、大腸菌群はいずれも陰性であった（表 4）。モノクロラミン消毒は、レジオネラ属菌、一般細菌、大腸菌群の消毒に効果的であった。

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

施設 2 週 3 回換水する高 pH 温泉水を用いた浴槽

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

遊離塩素管理時および 7 週間の実地試験期間を通じて、レジオネラ属菌、アメーバ、大腸菌群はいずれも検出下限値未満または陰性であった (表 5)。モノクロラミン消毒はこれらに対して効果が期待できると考えられた。一方、従属栄養細菌数は施設 1 同様に増加し、遊離塩素管理時より多かった。15~20mg/L、1 時間の高濃度モノクロラミンによる消毒では増加を抑制できなかった。消毒時間を一晩に延長し、直後の第 5 週では 1/100 程度に減少したものの、第 6 週以降は再び同様のオーダーにまで増加した。一度増加してしまった従属栄養細菌の抑制は困難であった。

施設 2 では営業開始前の浴用水にモノクロラミンを添加し、管理濃度範囲で安定した直後に採水を行っていた。濃度管理を行わなかった夜間に従属栄養細菌が増加し、それに対する十分な消毒時間が得られなかった可能性が考えられた。モノクロラミン消毒を実施している浴用水においても、従来の衛生管理を省略できるものではなく、ろ過器や配管などに対する洗浄が重要であると考えられた。

施設 3 有機物を含んだ温泉水を用いた浴槽

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、浴用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 5)。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、アメーバ、大腸菌群はいずれも陰性であった (表 6)。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、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であると思われる結合塩素消毒が行われていた。従って遊離塩素消毒との比較にはならないが、有機物を含む温泉においても、モノクロラミンはレジオネラ属菌に対する安定的な消毒効果があると考えられた。

浴用水中の一般細菌数、従属栄養細菌数、16S rRNA 遺伝子の定量値について、結果を図 6 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。一見矛盾しているが、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。モノクロラミン導入以前は、配管消毒の際などに浴用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 の分解が生じていた可能性が考えられた⁴⁾。

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 *Methylomonas* 属菌と *Cloacibacterium normanense* が優占種であり、全体の 80~90%を占めていた（図 7）。*Methylomonas* 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懸念されることから、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。また、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であることが示唆された。ただし、従属栄養細菌数は多かったことから、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。

今回実証試験を行った 3 施設ではいずれも従属栄養細菌数の増加が確認されたが、定量値は施設 1、3 よりも施設 2 の方が 10 倍程度高かった。その要因として、ろ過器の

逆洗浄と採水前の浴用水のモノクロラミン消毒時間が考えられる。逆洗浄の時間は、施設 1 では毎日 30 分間に対して、施設 2、3 ではそれぞれ毎日 10 分間、7 分間であった。また、採水前の浴用水のモノクロラミン消毒時間は、施設 1、施設 3 では濃度安定後、それぞれ少なくとも 3 時間以上、1 時間以上経過してから採水していたのに対し、施設 2 ではモノクロラミン濃度安定直後に採水していた。これらの逆洗浄時間や消毒時間の長短が従属栄養細菌数に影響した可能性がある。定量値の比較には採水前の消毒時間の統一が必要と考えられた。

仮に上述の逆洗浄時間と採水前消毒時間に注意を払ったとしても、モノクロラミン消毒下に従属栄養細菌数が増加することは回避しきれていない。モノクロラミン消毒の適用に関わらず、今なお洗浄が重要であると考えられた。

D. 結論

3 箇所の温泉施設の協力を得て、4~7 週間にわたるモノクロラミン消毒の実証試験を行った。高 pH や有機物を含む温泉であっても、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の抑制が可能であった。高濃度モノクロラミンを用いた配管消毒により、一定の従属栄養細菌数を減少させることができたが、配管等のより強い洗浄が必要と考えられた。

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アミンの消毒効果, 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ア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:モノクロア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, 三宅酉作, 藤田正憲:汚染サイトから分離された *Methylobacterium* 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. 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アミン消毒の実地検証ー三重県津市の榊原温泉における検討ー、温泉科学、2019, 69, 90-102.
2. 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 8 浴槽のレジオネラ対策1 浴槽のどこで、どのように増えるのか」、防菌防黴、2019, 47, 83-89.
3. 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 9 浴槽のレジオネラ対策2 浴槽水の各種消毒方法の効果」、防菌防黴、2019, 47, 117-123.
4. 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 10 浴槽のレジオネラ対策3 モノクロアミンによる消毒方法について、防菌防黴、2019, 47, 159-166.
5. 枝川亜希子、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御12 レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ、防菌防黴、2019, 47, 229-232 (2019)
6. 井上浩章、枝川亜希子、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御13 アメーバ共培養法を用いたレジオネラ属菌の検出、防菌防黴、2019, 47, 273-277.
7. Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S,

Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. J. Hot Spring Sci., 2020, 70, 50-60.

8. 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、防菌防黴、2021, 49, 261-267.

口頭発表

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

日本温泉科学会、2019 年 11 月、台湾、台中市

3. 小倉 徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、松田宗大、松田尚子、藤井 明、モノクロラミン管理下の浴槽循環ろ過装置内のろ材バイオフィルムに対する各種消毒剤の消毒効果の検討、日本防菌防黴学会、2019 年 9 月、大阪府
4. 松田宗大、枝川亜希子、泉山信司、小倉徹、植園健一、松田尚子、藤井 明、循環式浴槽から分離された *Mycolicibacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果、日本防菌防黴学会、2019 年 9 月、大阪府
5. 藤井明、渡邊貴明、松田宗大、松田尚子、小倉徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、薬湯使用時におけるモノクロラミン消毒の有用性評価、第 46 回建築物環境衛生管理全国大会、2019 年 1 月、東京都
6. 藤井明、松田宗大、小倉徹、小倉諒太、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、モノクロラミン管理下の循環浴槽におけるろ材付着バイオフィルムに対する各種消毒剤の効果、第 47 回建築物環境衛生管理全国大会、2020 年 1 月、東京都

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. 施設 1 の温泉水質

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

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

表 2. 施設 2 の温泉水質

項目	分析値	項目	分析値
pH	10.2	硫黄	< 0.1 mg/L
ORP	-146 mV	総鉄イオン	< 0.1 mg/L
一般細菌数	100 CFU/mL	アンモニア態窒素	< 0.1 mg/L
Cl ⁻	1.2 mg/L	マンガンイオン	< 0.1 mg/L
Br ⁻	不検出		
I ⁻	不検出		
S ₂ O ₃ ²⁻	不検出		

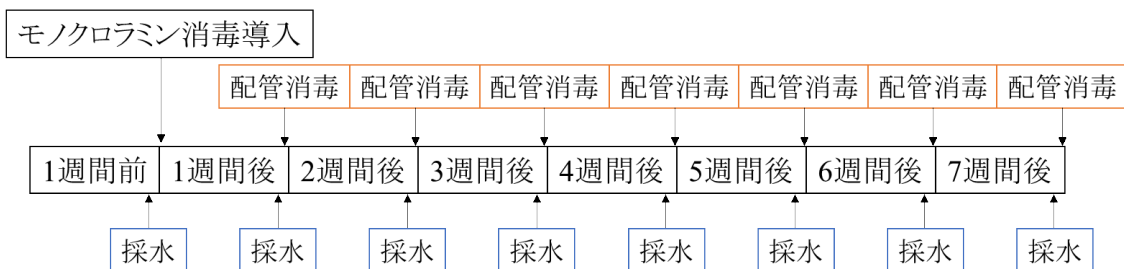


図 1. 施設 2 における試験期間前後の採水・高濃度モノクロラミン配管消毒状況

表 3. 施設 3 の温泉水質

項目	分析値	項目	分析値
pH	7.9	硫黄 [*]	<0.1 mg/L
ORP	+87 mV	総鉄イオン (鉄(Ⅱ)イオン)	0.7 mg/L (<0.1 mg/L)
一般細菌数	不検出	アンモニア態窒素	2.0 mg/L
Cl ⁻	412.3 mg/L	マンガンイオン	<0.1 mg/L
Br ⁻	0.9 mg/L	TOC	9.2 mg/L
I ⁻	不検出	腐植質	0.2 mg/L
S ₂ O ₃ ²⁻	不検出	全塩素	<0.1 mg/L

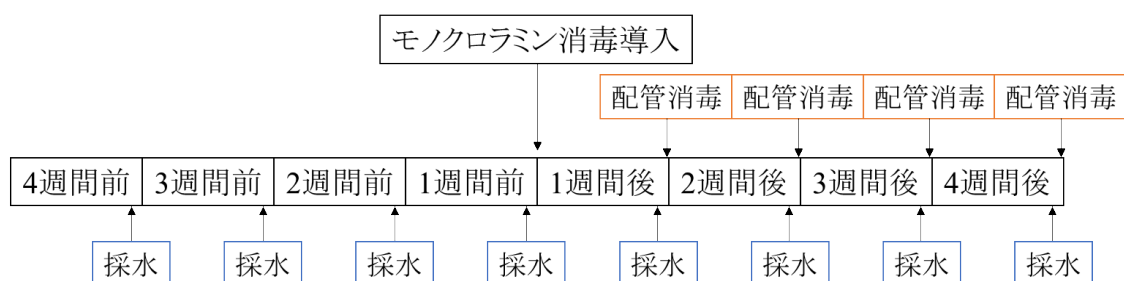


図 2. 施設 3 における試験期間前後の採水・高濃度モノクロラミン配管消毒状況

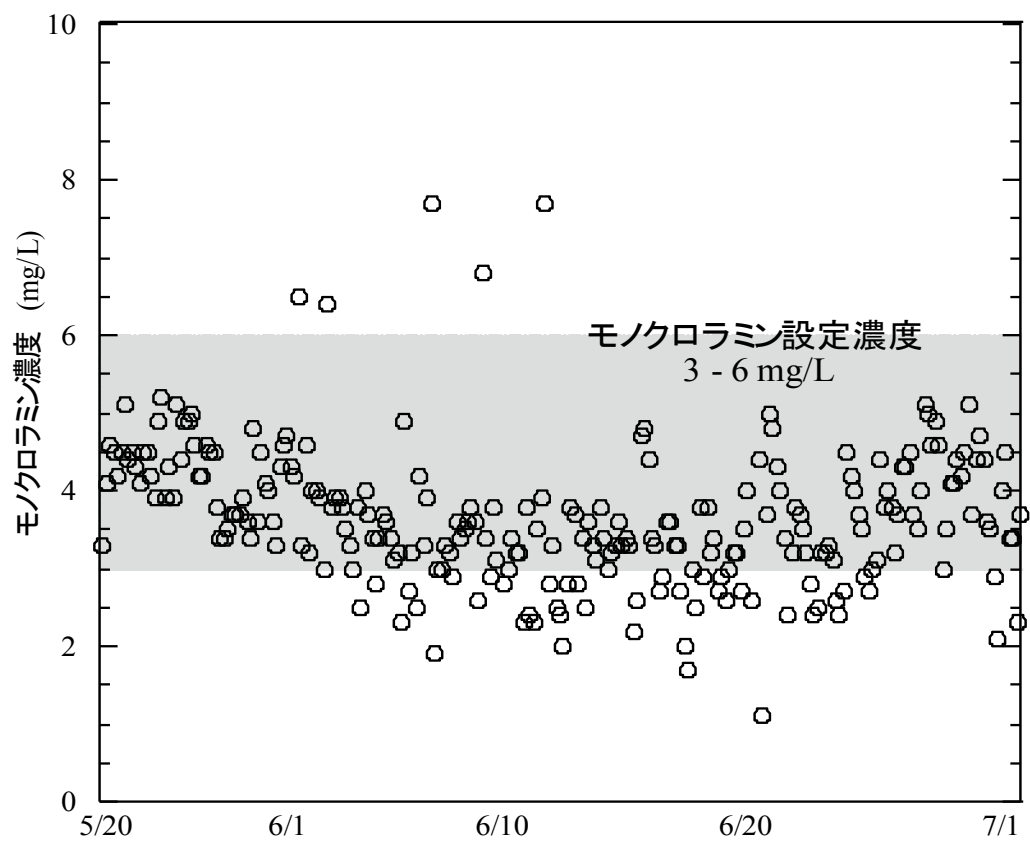


図 3. 施設 1 における浴用水中のモノクロラミン濃度の推移

表 4. 施設 1 における微生物検査の結果

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

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

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

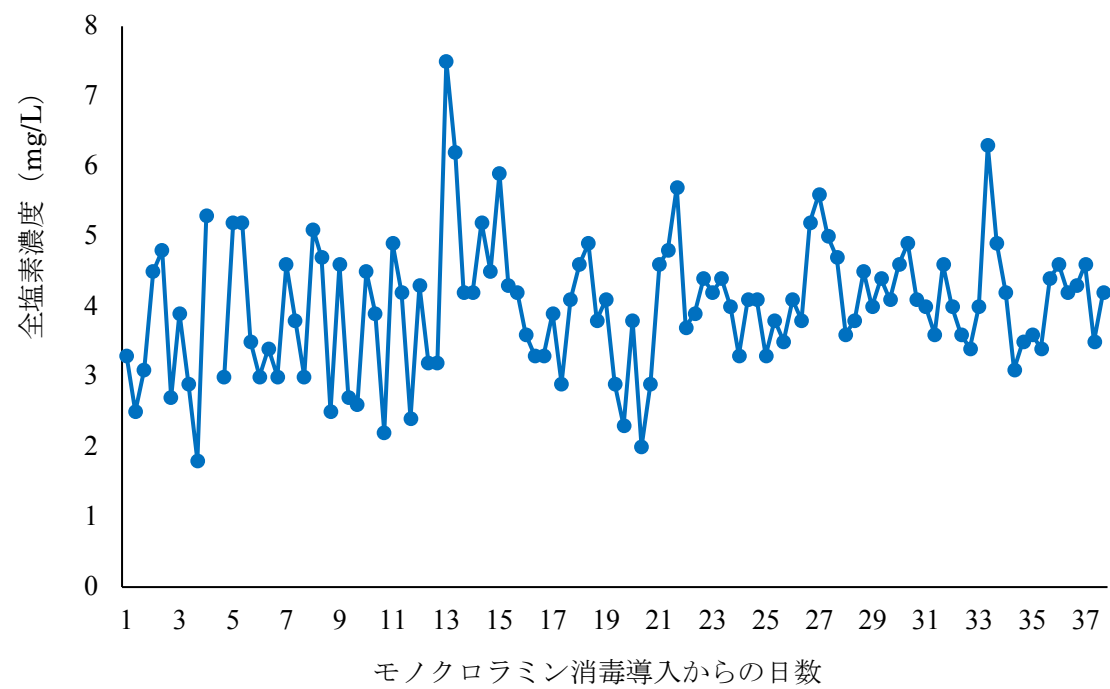


図 4. 施設 2 におけるモノクロラミン消毒導入後における浴用水の全塩素濃度

表 5. 施設 2 における浴用水等の微生物試験結果

採取日	レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	レジオネラ属菌 (ヘアキャッチャー配管ふきとり)	大腸菌群 (/ 100 mL)	アメーバ数 (/ 50 mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)
遊離塩素消毒時	<10	陰性	陰性	0	52	100
導入 1 週間後	<10	陰性	陰性	0	7	93
導入 2 週間後	<10	陰性	陰性	0	20	495,000
導入 3 週間後	<10	陰性	陰性	0	2	179,000
導入 4 週間後	<10	陰性	陰性	0	18	393,000
導入 5 週間後	<10	陰性	陰性	0	5	4,670
導入 6 週間後	<10	陰性	陰性	0	48	246,000
導入 7 週間後	<10	陰性	陰性	0	9	275,000

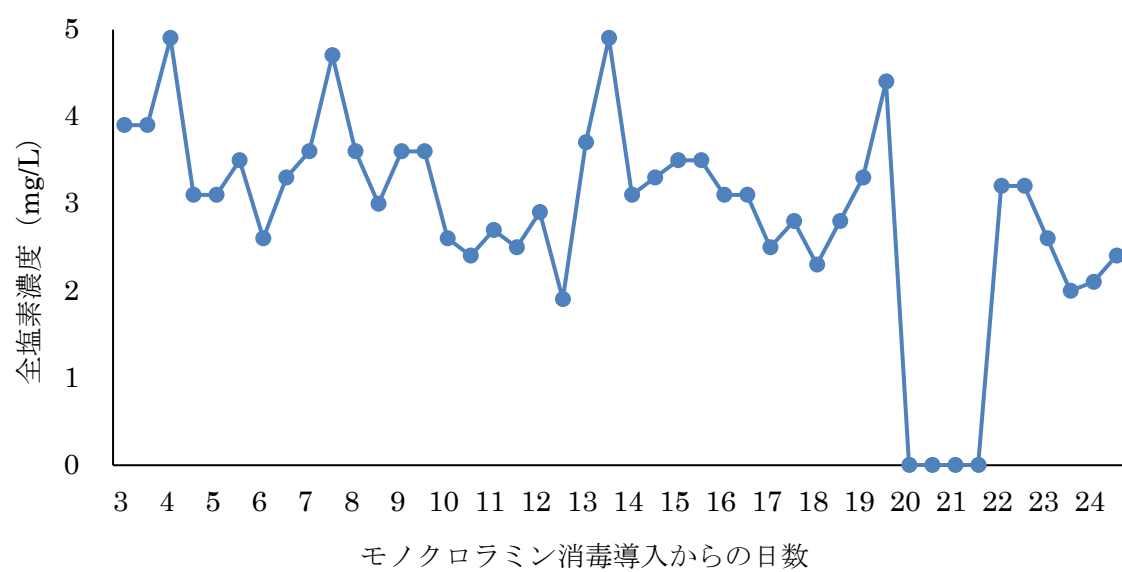


図 5. 施設 3 におけるモノクロラミン消毒導入後における浴用水の全塩素濃度

表 6. 施設 3 における浴用水等の微生物試験結果

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

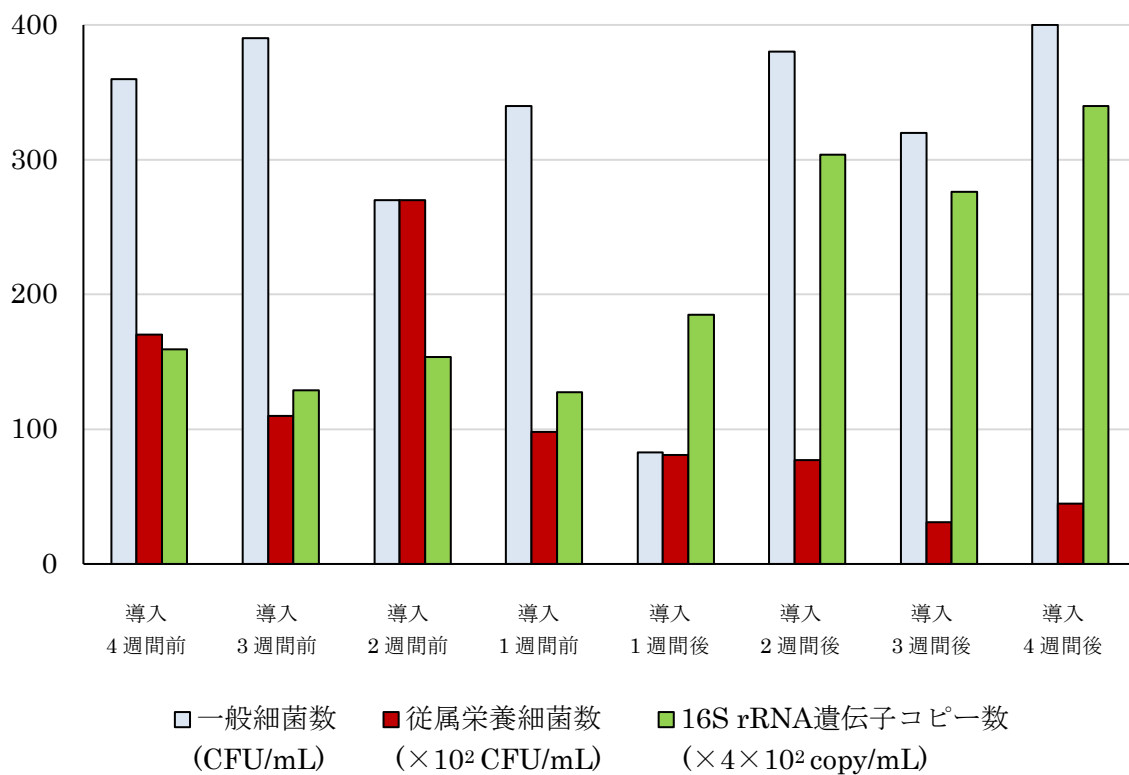


図 6. 施設 3 における浴用水の一般細菌数、従属栄養細菌数、16S rRNA 遺伝子コピー数の推移

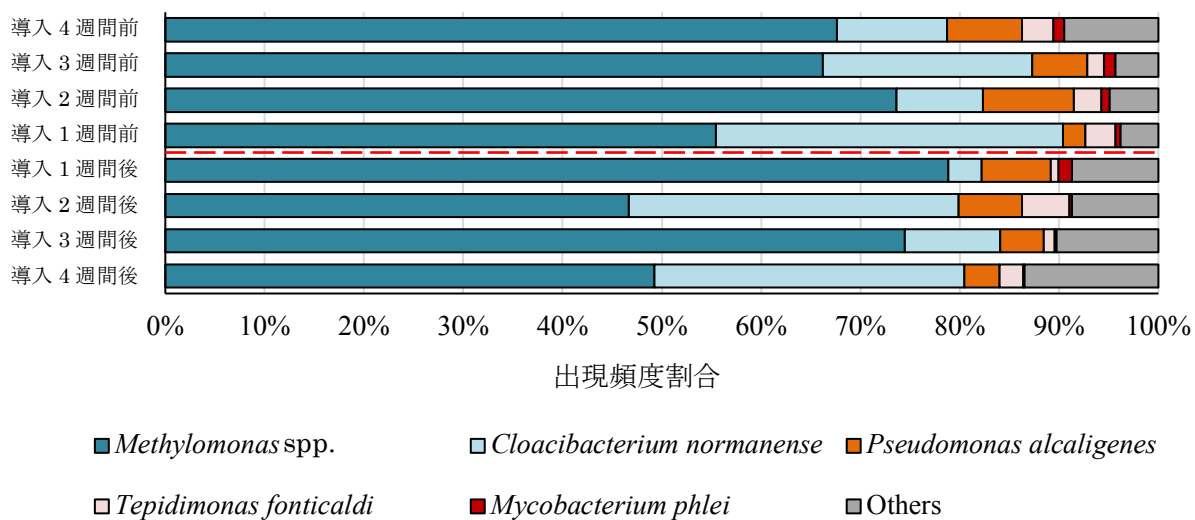


図 7. 菌種別出現頻度割合

令和元～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）

総合研究分担報告書

モノクロラミン消毒下のバイオフィルムを対策する省力化洗浄方法の開発

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	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	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	山本 哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	細川 賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	田中 孝典	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	杉山 寛治	株式会社マルマ 研究開発部
研究協力者	田中 慶郎	株式会社マルマ PC 営業部
研究協力者	市村 祐二	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
研究協力者	茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
研究協力者	藤井 明	株式会社ヘルスビューティー
研究協力者	斎藤 利明	株式会社ヤマト 温浴事業部
研究協力者	小坂 浩司	国立保健医療科学院 生活環境研究部

研究要旨

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き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。ところがモノクロラミンを連続的に使用していると、*Mycobacterium phlei* が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。そこで本研究では、*M. phlei* のモノクロラミン消毒に必要な Ct 値（濃度×時間、すなわち消毒の程度）を確認するとともに、対策のひとつとして新たな洗浄方法を検討した。

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、改めてアルカリ泉におけるモノクロラミン消毒の優位性が支持された。試験管内試験ではモノクロラミン消毒の方が消毒効果が高いにも関わらず、実地においてはモノクロラミンを連続使用している浴槽で *M. phlei* の増殖が観察されてきた。その理由として、浴槽水の連続使用にはやはり問題が有り、汚染の蓄積、例えば *M. phlei* がバイオフィーム中にあるといったことで、モノクロラミン消毒に対する抵抗性が生じるものと考えられた。消毒だけに依存せず、バイオフィーム除去を目的とした定期的な洗浄の必要性が改めて指摘された。

現状において、ろ過器や配管は、ブラシを使った物理的な洗浄ができず、過酸化水素や過炭酸ナトリウムを使用した化学的な洗浄が行われている。しかし、これらの物質は劇物や危険物としての管理を要し、多量の薬剤を使った定期的かつ頻回の洗浄は容易ではない。そこで、使用する薬剤量の低減を目的として、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法に着目した。まず、ステンレス製試験片上に生成したバイオフィームを効率よく除去できる洗浄条件を検討し、次に最適条件による実地試験を行った。その結果、薬剤の使用量が重量にして従来の 3 割と低減したにも関わらず、9 割以上の微生物が除去される洗浄効果が確認された。洗浄後のすすぎの回数も多くなく、これまでより少ない労力で洗浄することが可能となった。この方法により、洗浄頻度と衛生の向上が期待される。

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、アルカリ泉をはじめとする、遊離塩素消毒が阻害される一部の温泉では、必ずしも遊離塩素消毒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、アルカリ泉の温泉浴用水において *Legionella* spp. の抑制に効果的であることが明らかになっている²⁾。

Legionella spp. が抑制できた一方で、モノクロラミン消毒下の浴用水中に、*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)}。従属栄養細菌数が増加するということは、ろ過器や配管にはバイオフィーム等の汚れが生じており、洗浄の徹底が課題となる⁷⁾。すなわち、当然のことではあるが、浴槽水の消毒だけではなく、定期的な配管洗浄が必要となる。

上述の *M. phlei* は、非定型抗酸菌の一種と

して、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⁾があり、注意を要する。加えて、*Mycobacterium* spp. は、芽胞を作らない細菌だが、消毒への抵抗性が高いことが問題となる⁶⁾。そこで本研究における一つ目の課題として、モノクロラミン消毒下に蓄積する汚染の代表として、*M. phlei* に対するモノクロラミン消毒効果を検討した。

浴槽水の衛生状態を保つには、浴槽だけでなく循環ろ過装置全体の洗浄の徹底が課題となるが、ろ過器や配管にブラシを使うといった物理的な洗浄は不可能であり、洗浄剤を使った化学的な洗浄方法に頼ることになる⁸⁻¹¹⁾。現状の化学的な洗浄には、主に過酸化水素や過炭酸ナトリウムが用いられているが、これらの物質は劇物や危険物であることから専門業者への委託が主となり、浴場施設にとっての金銭的な負担が大きい。前者の過酸化水素では、薬剤の使用量も多く、原液 30~35%濃度を終濃度 3~3.5% の 10 倍希釈で使用する場合、例えば 10 m³ の浴槽水に対して 1 m³ もの

原液を使用する計算になる。実際の洗浄作業には水位を可能な限り下げて、濃度をもっと薄くするとしても、洗浄範囲と洗浄効果を保つには減らすにも限度がある。後者の過炭酸ナトリウムであっても、例えば 10 m³ の浴槽水に対して 1%の 100 kg を使用し、固体であっても少なくない。つまりいずれの方法を使うにしても、肉体的な作業負荷も大きく、さらに、洗浄後のすすぎにかかる労力も考慮すると、頻繁な洗浄には困難を要する。逆に、薬剤量や作業負荷が少ない洗浄方法があれば、頻回の洗浄が可能となる。

そこで、本研究における二つ目の課題として、薬剤量の低減を可能とする、新しい洗浄方法を検討した¹²⁾。水が循環する環境のバイオフィームには、鉄などの金属が蓄積している。このバイオフィーム中の金属を触媒として利用するフェントン反応により、薬剤が除去目標のバイオフィーム中で特異的に働く。結果として、少ない薬剤量でバイオフィームを除去できることが、その特長である。洗浄条件の検討および実地での洗浄試験を行った。

B. 研究方法

B1. モノクロラミンと遊離塩素による *M. phlei* の試験管内不活化試験

消毒試験の検液として、アルカリ泉(表 1)と PBS(表 2)を使用した。アルカリ泉は、先行研究³⁾で使用した温泉水を、121°C15 分間のオートクレーブ滅菌処理後に使用した。*M. phlei* は、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¹³⁾。モノクロラミン消毒液は、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。

滅菌カップに検液 150 mL を入れ、濁度により菌数を調整した *M. phlei* の菌液を、終濃度 10⁶ ~ 10⁷ CFU/mL となるように添加した。その滅菌カップに、モノクロラミンあるいは遊離塩素を、低濃度(5 mg/L)、中濃度(10 mg/L)、高濃度(20 mg/L)の 3 段階の濃度となるよう添加した。消毒

開始後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分の時点で、菌数測定用検液と消毒濃度測定用検液を分取した。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、7 日間 37°C 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に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、遊離塩素濃度にはポケット残留計(HACH Pocket Colorimeter II)による DPD 法を用いた。

試験結果から、縦軸を菌数(対数表示)、横軸を消毒濃度と接触時間の積である CT 値(線形表示)の相関図である不活化曲線を得た。不活化曲線の近似式は、消毒開始時の菌数を切片とした。

B2. 新規洗浄方法の試験管内試験と実地検証

循環水流の再現装置を用いて、バイオフィームの形成と洗浄後の残存バイオフィーム量の測定を行った¹⁴⁻¹⁵⁾。連続培養システム(アート科学社製)の中に 15 mm×20 mm(厚さ 1.5 mm)のステンレス製の試験片を設置し、(後述の施設 A から D とは異なる)とある施設から採取した浴槽水を 40°C で 14 日間循環させることで、試験片上にバイオフィームを発生させた。試験片を 6 ウェルプレートに移し、新旧の洗浄剤 5 mL に浸漬し、試験片を洗浄した。試験片から洗浄剤を除いて蒸留水 3 mL で 2 回すすいだ後に、0.1%クリスタルバイオレット 3 mL を加えて、30 分間バイオフィームを染色した。染色液を除いて蒸留水 5 mL で 2 回すすいだ後に、1 mL のエタノールを加えてバイオシェーカー(60rpm 回転)で 1 分間攪拌し、バイオフィームからクリスタルバイオレットを溶出した。溶出液の吸光度(波長 570 nm)を測定することで、クリスタルバイオレットの量、すなわち試験片上に残存したバイオフィーム量を測定した。

蒸留水による洗浄を基準として、他の洗浄条

件によるバイオフィルムの除去率を評価した。洗浄剤は、過炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、酒石酸を混合して用い、量比を検討した(表 3)。比較対象として、従来から用いられてきた過炭酸ナトリウムの単独⁸⁻¹¹⁾、および過炭酸ナトリウムとクエン酸を有効成分とする市販品(本報告では現状の販売に配慮して、具体的な製品名を表示しない)を用いた。

試験管内試験で得られた最適な条件を用い、4 箇所の入浴施設(施設 A~D、表 4)の協力を得て、実地の洗浄試験を行った。施設 A~C においては新規の洗浄方法を行い、施設 D においては 2 浴槽を用いて新旧の洗浄を並行して行った(新規方法 D1、従来方法 D2)。

新規の洗浄方法として具体的には、浴槽水 1 m³ あたり過炭酸ナトリウム 1 kg(終濃度 0.1%)にアスコルビン酸 1 kg と酒石酸 1 kg を助剤として使用し、過酸化水素による洗浄効果を発揮させた。浴槽水の量を循環可能な最低限に減らした後、上記の 3 化合物を同時に浴槽水に添加し、浴槽水を循環した。60 分後に、1 m³ あたり炭酸ナトリウム 0.5 kg 程を用いて排水可能な pH に調整し、すすぎの工程に移行した。

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

洗浄後の浴槽から洗浄剤を除去するため、すすぎを行った。浴槽水を排水したら、循環可能な水量まで給水し、一定時間循環後、排水する工程を繰り返した。循環する時間は、系全体での 1 循環に要する時間を目安とし、すすぎ時点の浴槽の水量(m³)をポンプ能力(m³/hr)で除して求めた。すすぎは、次亜塩素酸ナトリウムまたはモノクロラミンとの反応性が消失して、消毒剤の濃度が維持できるまで繰り返した。具体的には、す

すぎ水 10 mL に 1,000 mg/L 程度に調整した次亜塩素酸ナトリウムまたはモノクロラミンを 10 μL 添加し、DPD 法によって対照の精製水と同じ塩素濃度を示すまで、すすぎを繰り返した。なお、次亜塩素酸ナトリウムは、次亜塩素酸ナトリウム溶液を精製水で 0.1%に希釈したもの、モノクロラミンは 0.3%次亜塩素酸ナトリウム溶液と 0.4%塩化アンモニウム溶液を 1:2 で混合したものをそれぞれ用いた。

洗浄前後にヘアキャッチャー近傍の配管 2 か所(5 cm×5 cm)を拭き取り、ATP 検査および細菌検査を行った。施設 A においては、ろ過器内部からも拭き取り検査を実施した。ATP 検査には、UltraSnap (Hygiena)を使用した。細菌検査には、ふきふきチェック II (栄研化学)を用い、Voltex ミキサーを用いて拭き取り内容を付属の 10 mL リン酸緩衝液に懸濁した。懸濁液から、定法により一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌、レジオネラ属菌の検査を実施した。

C. 研究結果および考察

C1. モノクロラミンと遊離塩素による *M. 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)。近縁の *Mycobacterium* spp.は、以前より消毒への抵抗性が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 1-Log 不活化でも CT 値おおよそ 2,000 mg/L・min が必要であった(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¹⁶⁾。

以上のとおり、モノクロラミンと遊離塩素消毒の効果には明瞭な違いが認められた。意外だった

のは、*M. phlei* に対する遊離塩素消毒の効果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¹³⁾が再現された内容だった。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系統の配管、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¹⁷⁾。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。

なお、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、洗浄によるバイオフィルム対策の徹底が必要と考えられる。

C2. 新規洗浄方法の試験管内試験と実地検証

過炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、酒石酸の量比を変えた場合(6 通り)に、過炭酸ナトリウム

単独の場合と、市販の洗浄剤を使った条件を加えた計 8 通りでバイオフィルムの試験片を洗浄した(表 3)。その結果、従来の洗浄方法である過炭酸ナトリウムの単独(洗浄条件 7)あるいは市販品を使用した場合(洗浄条件 8)はいずれもバイオフィルムの除去率は 60%程度であった。市販品は説明書にしたがって洗浄時間を 90 分間と長くしたが、除去率の向上は見られなかった。

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

また、新規の洗浄方法に使用したアスコルビン酸を減らすと、除去率が低下した(洗浄条件 1, 2)。一方、助剤だけでは洗浄効果がなく、洗浄には過炭酸ナトリウムが必要であることを確認した(洗浄方法 6)。すなわち、バイオフィルム中の金属イオンがアスコルビン酸の還元剤の存在下で触媒として働き、フェントン反応が生じて、過炭酸ナトリウムによるバイオフィルムの除去・殺菌が効率よく働いたと考えられた¹²⁾。以上の結果を受けて、洗浄条件 3 の条件を最善と判断し、この方法で実地の洗浄試験を進めた。

実地試験の浴場施設の概要を表 5 に示す。施設 A の試験では、新規の洗浄方法の実施中に、浴槽水が白濁する様子が見られたが、従来の方法にあった激しい発泡は認められなかった。配管内部およびろ過器内部のふき取りにおいて、ATP 値、一般細菌数、従属栄養細菌数ともに減少が確認され、高い洗浄効果を示した。施設 B の試験では、新規方法による洗浄中に、バイオフィルム由来と思われる汚染が確認された。洗浄後は、ATP 値の減少、一般細菌数、従属栄養細菌数ともに減少が見られた。施設 C の試験では、

新規方法による洗浄中に浴槽水の濃褐色への変化が確認された。洗浄前の ATP 値が低値であり評価不能であったものの、一般細菌数、従属栄養細菌数が検出下限未満まで減少した。

施設 D の試験では、2 浴槽を用いて新規の洗浄方法と従来法を並行して行った。新規方法による洗浄では、浴槽水の褐色への変化が確認された。ATP 値の減少、一般細菌数、従属栄養細菌数ともに減少が見られ、高い洗浄効果が確認された。従来の洗浄法を実施した別の浴槽では、激しい発泡と共に浴槽水の褐色への変化が確認された。ATP と細菌数は洗浄前の測定値が低く、洗浄効果については評価不能であった。すすぎには 5 回を要し(表 5、表 6)、新規方法と比べて繰り返し回数を要する結果となった。

以上のとおり、新規の洗浄方法は、薬剤量を低減しつつ、汚染の低減が可能であった。浴槽水 1 m³あたり 6 kg ないし 10 kg の過炭酸ナトリウムが使われていた従来の方法⁸⁻¹¹⁾に比べて、新規の洗浄方法では 1 kg と量が大きく減少した。従来の方法では発泡して過炭酸ナトリウムが消費されていくのに対して、新規の方法ではほとんど発泡せず、有効な過炭酸ナトリウムの残留が長いこと、直接的にバイオフィルムに作用できることが減量できた理由と考えられた。助剤を含めて計算すると、10 kg から 3 kg へと 7 割の重量が削減され、新規の洗浄剤は従来に比べて取扱が相当に有利と考えられた。

実地試験でいずれの施設においても、洗浄効果が目視および細菌検査により確認された。一部の配管の拭き取りから検出限界付近のレジオネラの残存が見られたものの、このわずかな菌数から浴槽水への汚染の可能性は極めて低いものと考えられたため、繰り返しの洗浄には至らなかった。実際に、いずれの施設においても洗浄後の浴槽水はレジオネラ属菌が不検出であった。

例数は少ないが新旧の比較において、薬剤量が減少することで、肉体的な作業負担は明らかに低減した。すすぎ回数も 5 回から 2 回に削減できた(表 6)。対象施設のすすぎ工程は 1 回

につき 60~90 分間を要し、3 回のすすぎ工程の削減は、4 時間以上の短縮を実現した。洗浄時間の短縮は、洗浄頻度の高頻度化にも資するものであった。

D. 結論

モノクロミン消毒の実地試験で増殖した *M. phlei* の単離株に対して、モノクロ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、遊離塩素消毒よりモノクロミンの方が高かった。その傾向は、アルカリ泉で顕著であり、アルカリ泉におけるモノクロミン消毒の優位性を改めて確認した。しかし実地では *M. phlei* の増殖が見られており、消毒だけに依存せず、バイオフィルムを除去する定期的な洗浄の必要性が改めて指摘された。

洗浄の労力低下と頻度向上を狙って、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法に着目した。薬剤の使用量が重量にして従来の 3 割と低減し、作業負担が低減したたにも関わらず、9 割以上の微生物除去の洗浄効果が得られた。この方法の活用により、洗浄頻度の衛生の向上が期待される。

謝辞

本研究に御協力頂きました浴場施設の関係者の皆様、管轄保健所の皆様に深く感謝いたします。

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ー三重県津市の榊原温泉における検討ー, 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 *Mycolicibacterium 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. 泉山信司, 長岡宏美 他: モノクロラミン消毒を導入した循環式浴槽を洗浄する必要性、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究(研究代表者 前川純子)」より, 令和元年度分担研究報告書.
 8. 今関久和: 過炭酸ナトリウムを用いた洗浄と施設設備の衛生上の問題及びその解決策, 厚生労働省生活衛生課平成 30 年度生活衛生関係技術担当者研修会より, 平成 31 年 2 月 (<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/0/000483756.pdf>, 2022/3/30 現在) .
 9. 縣 邦雄, 配管洗浄の方法, 厚生労働省生活衛生課 平成 28 年度 生活衛生関係技術担当者研修会より, 平成 29 年 2 月 (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000194934.pdf>, 2022/3/30 現在)
 10. 林 宏美, 源田 健, 吉田裕行: 塩素管理の改善に奏功した過炭酸ソーダによる配管洗浄事例, 2017, 生活と環境, **62**(1), 43-45.
 11. 藤井明, 河合自立, 松田和也, 杉山寛治, 大畑克彦, 鈴木光彰, 加藤宏一: 循環ろ過式モデル浴槽系内におけるバイオフィルム形成とその洗浄・殺菌について, 2006, 生活と環境 **51**(2), 67-73.
 12. 特開 2020-186228.
 13. 松田宗大, 枝川亜希子, 泉山信司, 小倉徹, 植園健一, 松田尚子, 藤井 明: 循環式浴槽から分離された *Mycolicibacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果, 2019, 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会要旨集, p232.
 14. Garny, K., Horn, H. & Neu, T.R. Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors., 2008, Bioprocess Biosyst Eng **31**, 619-629.
 15. Wunder DB, Bosscher VA, Cok RC, Hozalski RM. Sorption of antibiotics to biofilm., 2011, Water Res. Mar; **45**(6), 2270-80.
 16. 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣 邦雄, 遠藤卓郎: モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策, 2010, 保健医療科学, **59**, 109-115.
 17. 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, 2021, Biocontrol Sci., **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, 地球化学, 2021, **55**, 43-56.
3. Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. Journal of Hot Spring Sciences, 2020, 70, 50-60.
4. 森 康則, 赤地重宏, 永井佑樹, 吉村英基, 泉山信司. 温泉付随ガス分離設備におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策, 2020, 温泉科学, **69**, 192-201.
5. 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子, 紙上ミニシンポジウム I〜水の衛生管理〜3. 貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況, 2020, 日本防菌防黴学会誌, **48**(8), 377-

382.

口頭発表

1. 藤井 明, 松田宗大, 小倉 徹, 小倉諒太, 植園健一, 枝川亜希子, 泉山信司:モノクロラミン管理下の循環浴槽におけるろ材付着バイオフィルムに対する各種消毒剤の効果, 第47回建築物環境衛生管理全国大会、2020年1月, 東京都.
2. 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.
3. 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

特開 2021-188884

実用新案登録、その他

なし

表 1. 試験管内不活化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. 試験管内不活化試験に用いた 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

表 3. 試験管内試験による洗浄条件とバイオフィーム除去率

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

※¹ 市販の洗浄剤を使用し、アスコルビン酸と酒石酸は 0% ※² 測定なし

表 4. 対象施設の概要

施設	A	B	C	D
泉質等	井水	アルカリ性単純温泉	Na・Ca-Cl 泉	Na-Cl 泉
消毒方法	モノクロラミン	モノクロラミン	モノクロラミン	遊離塩素
浴槽(循環系)の大きさ	約 7m ³	約 20m ³	約 5.2m ³	D1:約 8.3m ³ D2:約 4.7m ³
実施した洗浄方法	新規方法	新規方法	新規方法	D1:新規方法 D2:従来方法

表 5. 対象施設の洗浄試験結果

施設	採取 場所	洗浄 工程	ATP 値	一般 細菌数	従属栄養 細菌数	<i>L.spp.</i> 菌数	大腸 菌数	すすぎ 回数
A	配管部①	前	301	3.5×10^4	4.1×10^4	N.D.	-	2
		後	63	5.0×10^3	2.5×10^3	N.D.	-	
	配管部②	前	301	3.5×10^4	4.1×10^4	N.D.	-	
		後	63	5.0×10^3	2.5×10^3	N.D.	-	
	ろ過器内	前	1,723	1.3×10^5	7.1×10^4	N.D.	-	
		後	57	2.5×10^3	5.0×10^2	N.D.	-	
B	配管部①	前	9,237	2.7×10^6	1.9×10^6	N.D.	N.D.	3
		後	362	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	配管部②	前	3,598	1.7×10^7	4.5×10^6	N.D.	N.D.	
		後	118	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
C	配管部①	前	0	2.2×10^3	3.8×10^3	N.D.	N.D.	1
		後	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	配管部②	前	19	4.0×10^2	3.4×10^4	N.D.	N.D.	
		後	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
D1	配管部①	前	1,856	2.4×10^7	2.2×10^7	$>2.0 \times 10^4$	-	2
		後	46	3.0×10^2	4.4×10^4	N.D.	-	
	配管部②	前	19	4.0×10^2	3.4×10^4	$>2.0 \times 10^4$	-	
		後	3	N.D.	N.D.	140	-	
D2	配管部①	前	2	N.D.	N.D.	N.D.	-	5
		後	1	5.0×10^2	2.0×10^2	N.D.	-	
	配管部②	前	0	N.D.	2.0×10^2	N.D.	-	
		後	0	N.D.	3.0×10^2	N.D.	-	

※ATP(RLU/25 cm²) 菌数 (CFU/25 cm²)

※全ての施設で洗浄後の浴槽水のレジオネラ属菌が不検出であることを確認済

表 6. 新規方法と従来法の洗浄後のすすぎ回数の比較

すすぎ回数		1	2	3	4	5
塩素残留率 (%)	新規方法	63.8 ^{※1}	100	- ^{※2}	-	-
	従来方法	0	12.5	71.3	91.3	100

※1 塩素残留率は、100%になれば塩素消毒が消失せず、すすぎが完了したことを表し、0%は塩素消毒が全て消費されてしまい、すすぎが全く足りていないことを表す。

※2 測定なし。新規方法では塩素濃度が2回のすすぎだけで維持できるようになったため、3回目以降のすすぎは行っていない。

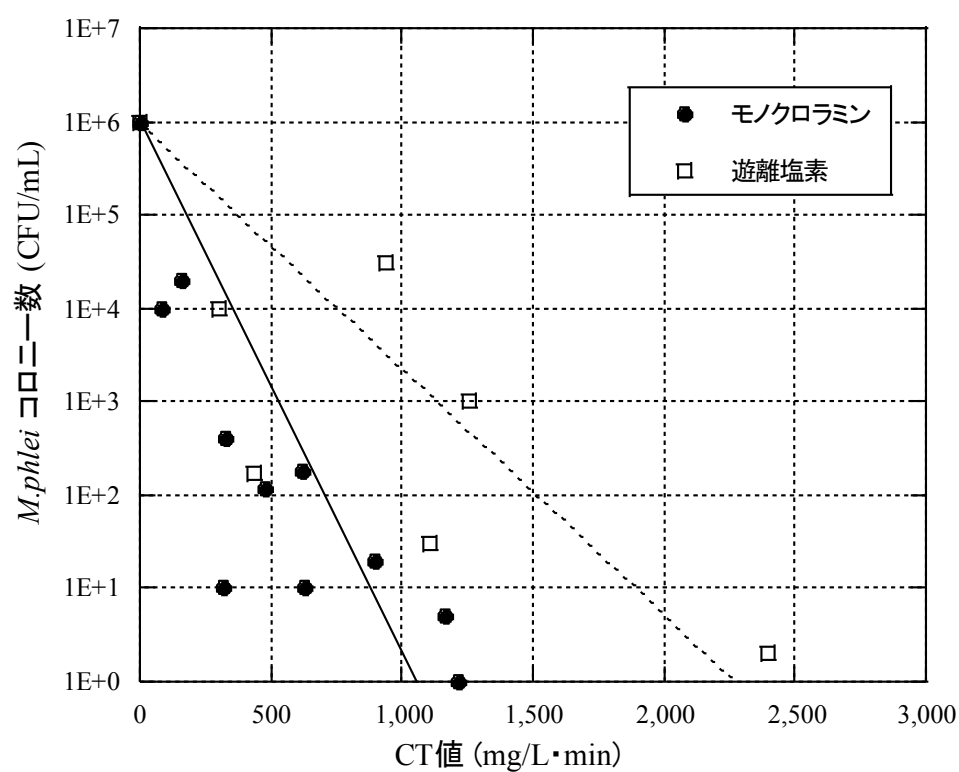


図 1. PBS を用いた *M. phlei* 試験管内不活化試験の結果

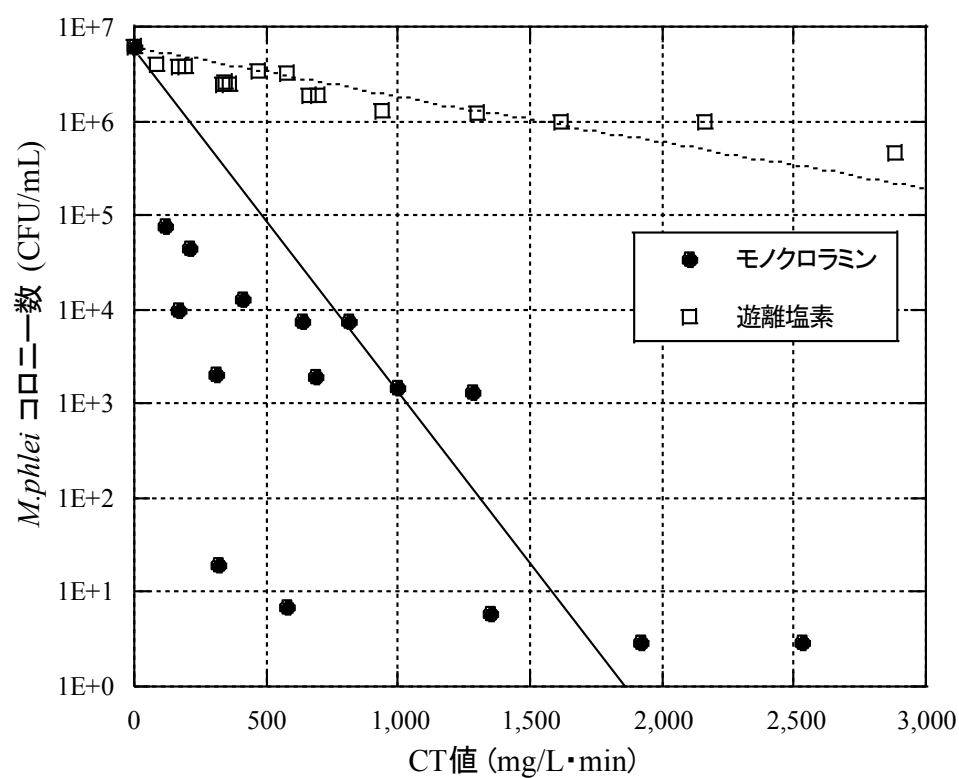


図 2. アルカリ水を用いた *M. phlei* 試験管内不活化試験の結果

令和元年～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)

総合分担研究報告書

雑菌の増殖を抑える、オゾン消毒と酸性側モノクロロミン消毒の検討

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
研究分担者	長岡 宏美	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
研究協力者	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	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	青木 信和	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
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	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の汚染源の1つであり、週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。アルカリ泉におけるモノクロロミン消毒は、レジオネラに効果的でも、従属栄養細菌数が高くなることもあり、ろ過器を高濃度モノクロロミンで消毒してもこれを抑えきれず、バイオフィルムの蓄積が疑われる。浴槽水でレジオネラ属菌が検出されなければよいということではなく、そもそもレジオネラの増殖を避けるよう、バイオ

フィルムの蓄積や雑菌の増殖を抑えたい。本研究では、ろ過器をオゾンで強く消毒する方法、消毒効果が高まると期待される酸性側 pH の浴槽水をモノクロラミンで消毒する方法の 2 つを検討した。毎日のろ過器逆洗に電解オゾン水を供給した結果、逆洗水に含まれていた雑菌は減少し、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。弱酸性の人工炭酸水をモノクロラミンで消毒した結果、数ヶ月以上継続して浴槽水中の雑菌の濃度は低く抑えられ、レジオネラも不検出だった。いずれの方法を用いても、雑菌とレジオネラを抑えることが可能であった。

A. 研究目的

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」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。高 pH でレジオネラに効果的なモノクロラミン消毒であっても、連用で雑菌が検出されるようになり、バイオフィルムの蓄積が疑われる¹³⁾。

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、有力な候補と考えられる⁶⁾。そこで、本研究では 1 つ目の方法としてオゾンに着目した。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⁷⁾。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。

モノクロラミンは、pH の酸性条件下で臭気のあるジクロラミンへ変化する可能性が心配されたことから、これまでのところアルカリ性や中性の泉質に適用され、酸性での適用事例がなかった^{8,9)}。pH7.5～9.0 程度が最適とされ、pH 値

5 未満でモノクロラミンからジクロラミンへの変換が報告されている^{10, 11)}。一方の遊離塩素消毒は pH5 程度の弱酸性、例えば人工炭酸泉に用いられており、同じ塩素系の消毒方法であるモノクロラミンは、同程度の弱酸性の範囲であれば適用できる可能性がある。そこで、本研究では 2 つ目の方法として、弱酸性条件下のモノクロラミン消毒に着目した。塩素消毒は高 pH で消毒効果が低下するのが問題であったが、反対に低 pH なら消毒効果が増すことになり、モノクロラミンの消毒効果が向上するかもしれない。

B. 方法

B1. スーパー銭湯のろ過器に電解オゾン

とあるスーパー銭湯の協力を得て、毎日のろ過器逆洗前に、ろ過槽の有効容量分(直径約 0.5 m×高さ約 1.0 m、図 1)以上の電解オゾン水を自動注入した。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それぞれ図 2、図 3、および図 4 に示した。オゾン生成電極外観、オゾン発生時の状況およびオゾン生成電極仕様をそれぞれ図 5、図 6、および表 1 に示した。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。当該スーパー銭湯では営業終了後に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無視できた。当

該施設では井水を循環利用しており、オゾン電極のスケール対策として、1 回/月の頻度で、100 g/L クエン酸溶液による漬け置き洗浄を行った。

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た。なお、採水時に限り、逆洗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)¹²⁾、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。本試験における分析項目と測定方法を表 2 に示した。レジオネラ属菌(検出限界 10 CFU/100 mL)の不検出は、図の中で 1 CFU/100 mL としてプロットした。

B2. 弱酸性の人工炭酸泉にモノクロラミン

営業 3 施設の協力を得て、人工炭酸泉の 4 浴槽で、モノクロラミン濃度を 3 mg/L 以上に維持する消毒試験を行なった。人工炭酸泉の原水には、3 施設いずれも井水を循環利用していた。モノクロラミンの生成、注入装置と人工炭酸泉製造装置の設置の概略を図 7 に示した。各施設では週一回の配管消毒と換水として、モノクロラミン濃度 10 mg/L、2 時間の循環を実施した。消毒効果の確認用に、浴槽水を換水日前日の夜間に採取した。本試験における分析項目と測定方法を表 3 に示した。

C. 結果および考察

C1. スーパー銭湯のろ過器に電解オゾン

当該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(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、当該施設全体で 1 日に約 1,200 人もの入館者数があった。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 8)。

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 8)、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 8)。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。浴槽水の ATP は 40RLU^{14, 15)} 近辺を推移しており、比較として測定した、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 9)。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 10)。

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。

C2. 弱酸性の人工炭酸泉にモノクロラミン

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

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

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

C 施設の炭酸風呂 2 浴槽の浴槽水の pH 値はそれぞれ 5.0 と 5.2 の弱酸性で、全塩素濃度は 3 mg/L 以上に維持され、レジオネラ属菌、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌群の検出はなかった。この 2 浴槽については、フローサイトメトリー(FCM)により全菌数を測定し、いずれの浴槽水とも、消毒効果を判断する閾値(1,000)未満と、菌数は低かった。

以上の通り、モノクロラミン消毒の長期利用時に増加が問題となった従属栄養細菌数¹³⁾は、複数施設、複数浴槽において、検出されなかった(表 4)。遊離塩素消毒は低 pH で消毒効果が高いが、同様に低 pH のモノクロラミン消毒も、アルカリ性や中性より消毒効果が高い可能性が示唆された。モノクロラミン消毒の利点の一つは、アルカリ条件下でもレジオネラ属菌を消毒できることにあり、これまでは酸性の浴槽水に対してモノクロラミン消毒を積極的に応用することがなかった。トリハロメタン等の消毒副生成物が生じないこと、アンモニア等の存在下でも濃度の制御がしやすいこと、塩素臭が抑えられること、といった利点も合わせて考えると、アルカリに限らず酸性側の浴槽水においても、モノク

ロラミン消毒の利用が有用と考えられた。

なお、人工炭酸泉に溶存している 1,000 mg/L を超える炭酸ガスとモノクロラミンとの相乗効果がレジオネラ属菌を抑制した可能性もあり、今後の丁寧な検証が待たれる。これらの浴槽水で塩素臭等の苦情はなく、塩素濃度は適切に維持され、ジクロラミンやトリクロラミンの発生はなかったと考えられた。

D. 結論

毎日のろ過器逆洗に電解オゾン水供給を組み合わせての方法は、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。

弱酸性(pH5 程度)の人工炭酸泉(3 施設 4 浴槽)に、モノクロラミン消毒は適用可能で、従属栄養細菌数の上昇がなく、レジオネラ属菌は不検出であった。

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. 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.
8. 杉山寛治：モノクロラミン消毒による浴槽水の衛生対策、ビルと環境、148 号、34-41 (2015)
9. 杉山寛治、長岡宏美、佐原啓二、神田隆、久保田 明、縣 邦雄、小坂浩司、前川純子、遠藤卓郎、倉 文明、八木田健司、泉山信司：モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策、防菌防黴、**45**, 6, 295-300 (2017)
10. Feher P. P., Purgel M., Lengyel A., Stirling A. and Fabian I., The mechanism of monochloramine disproportionation under acidic conditions, Dalton Trans., **48**, 16713-16721, 2019
11. Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*, Monochloramine in Drinking-water, https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/chloramine-background.pdf (2021.3.18 現在)
12. (社)日本水道協会：水道施設設計指針、pp.219-220、2000 年.
13. 長岡宏美、泉山信司、八木田健司、杉山寛治、小坂浩司、壁谷美加、土屋祐司、市村祐二、青木信和：社会福祉施設

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

14. (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.
15. 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.
3. Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S,

Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. *Journal of Hot Spring Sciences*, 2020, 70, 50-60.

4. 森 康則, 赤地重宏, 永井佑樹, 吉村英基, 泉山信司. 温泉付随ガス分離設備におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策. *温泉科学*, 69, 192-201 (2020)
5. 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子, 紙上ミニシンポジウム I〜水の衛生管理〜3.貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況, 日本防菌防黴学会誌, 2020, 48(8), 377-382

口頭発表

1. 藤井 明, 松田宗大, 小倉 徹, 小倉諒太, 植園健一, 枝川亜希子, 泉山信司, モノクロラミン管理下の循環浴槽におけるろ材付着バイオフィルムに対する各種消毒剤の効果、第 47 回建築物環境衛生管理全国大会、2020 年 1 月、東京都

- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし



図1 循環ろ過器（ろ過器のオゾン消毒）
直径約 0.5 m×高さ約 1.0 m

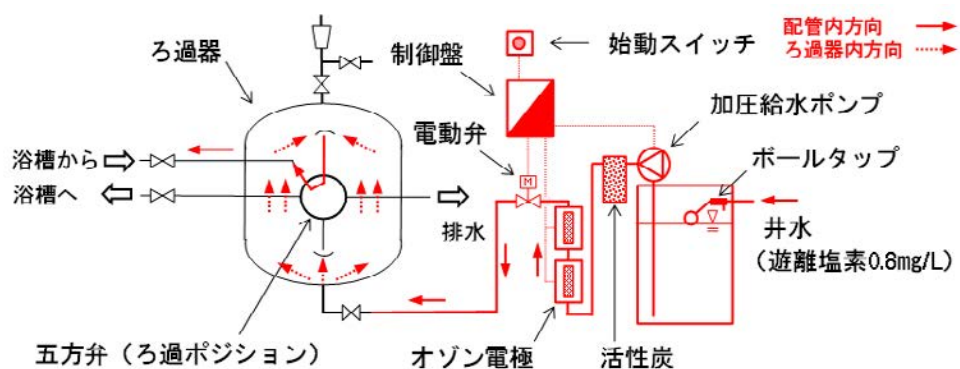


図2 試験装置概略図（ろ過器のオゾン消毒）

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3 オゾン供給装置
（ろ過器のオゾン消毒）



図4 オゾン供給装置設置状況
（ろ過器のオゾン消毒）



図5 オゾン生成電極
(ろ過器のオゾン消毒)

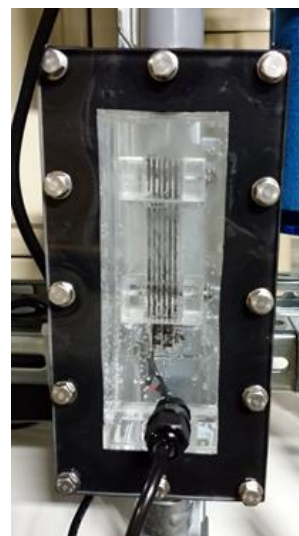


図6 オゾン発生時
(ろ過器のオゾン消毒)

表1 オゾン生成電極仕様 (ろ過器のオゾン消毒)

	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		

表2 分析項目および測定方法 (ろ過器のオゾン消毒)

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) アプリクス
一般細菌数	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 ^{14, 15)} 、 キッコーマンバイオケミファ (株)

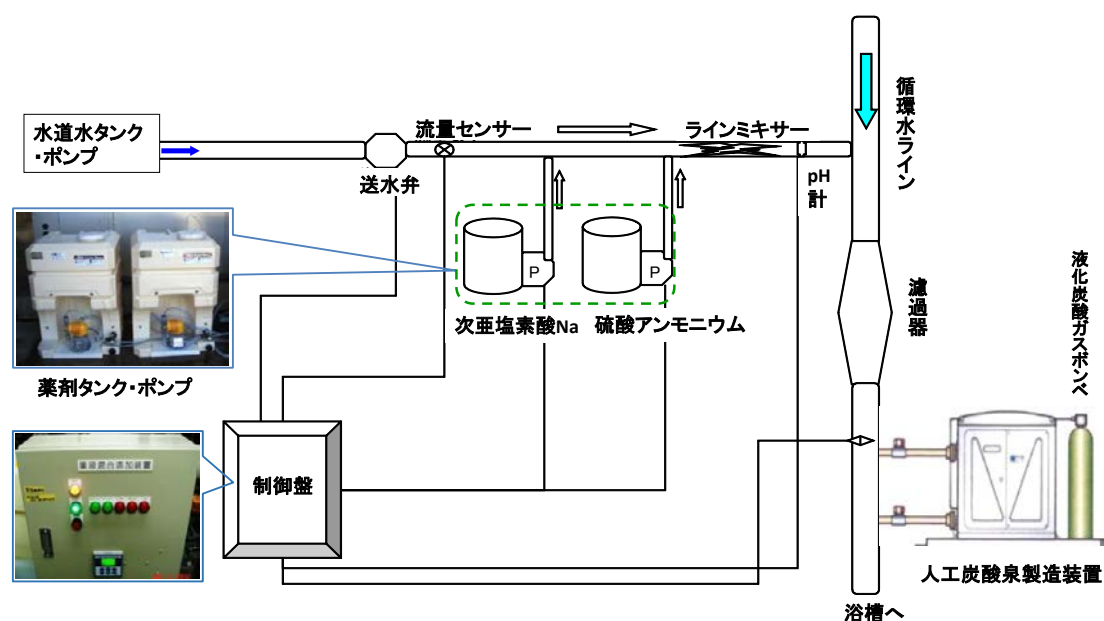


図 7 モノクロラミンの生成と人工炭酸泉製造装置の位置関係(弱酸性のモノクロラミン消毒)
pH が中性の水道水または井水に、次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)と硫酸アンモニウム($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)を適正な比率で混合することで、モノクロラミンを生成した($2\text{NaClO} + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{NH}_2\text{Cl} + \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$)。モノクロラミンが循環系統の途中で添加されて十分に希釈された後、液化炭酸ガスの注入により人工炭酸泉を製造した。

表 3 分析項目および測定方法(弱酸性のモノクロラミン消毒)

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	DPD法、MD100残留塩素計 (Lovibond社)
従属栄養細菌数	CFU/mL	R2A寒天培地法
一般細菌数	CFU/mL	標準寒天培地法
大腸菌群	CFU/mL	デゾキシコレート培地法
pH	pH値	LAQUAtwin<pH-22B> (堀場アドバンスドテクノ)
全菌数	閾値 (1,000粒子) 以上/未満	フローサイトメトリー法

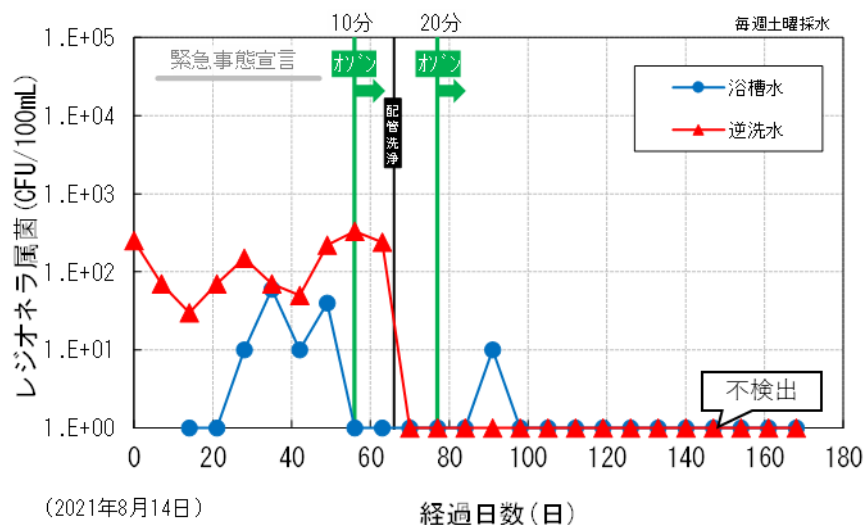


図8 レジオネラ属菌測定結果（ろ過器のオゾン消毒）

56日目からオゾンを開始したが、不足が感じられたので66日目の配管洗浄を挟んで、77日目よりオゾンの供給量を倍に増やしている。
グラフ上、レジオネラ属菌 1 CFU/mL は不検出を意味する。

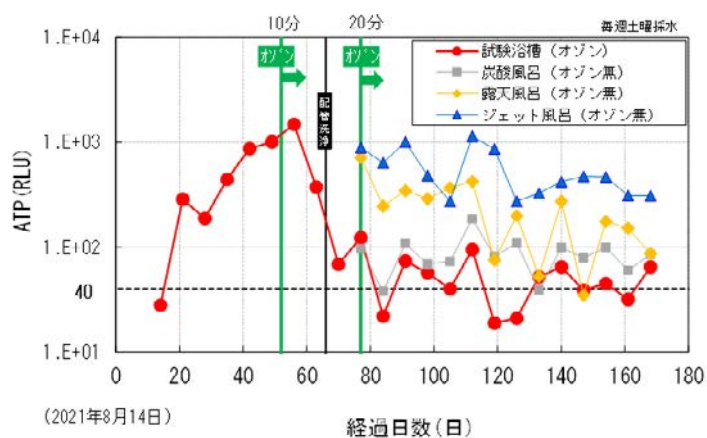


図9 ATPの経時変化
（ろ過器のオゾン消毒）

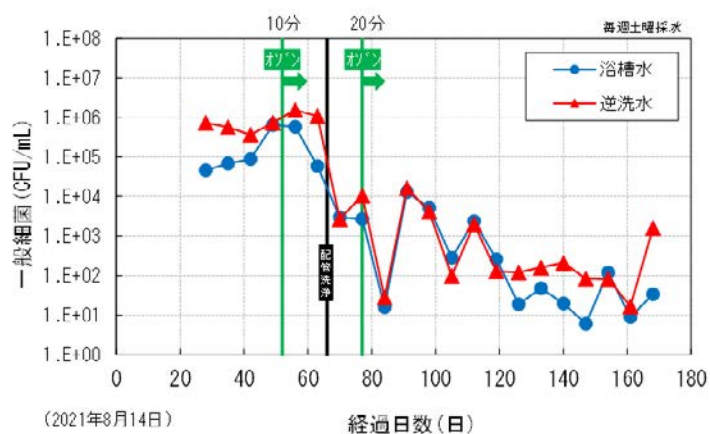


図10 一般細菌数の経時変化
（ろ過器のオゾン消毒）

表 4 弱酸性人工炭酸泉(3 施設、計 4 浴槽水)におけるモノクロラミン消毒の効果
(弱酸性のモノクロラミン消毒)

A施設の炭酸風呂

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

浴槽水のpH値: 5.6

C施設の男子炭酸風呂

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

浴槽水のpH値: 5.0、NT: 検査せず

B施設の炭酸風呂

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

浴槽水のpH値: 5.1、NT: 検査せず

C施設の女子炭酸風呂

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

浴槽水のpH値: 5.2、NT: 検査せず

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
令和元～3 年度総合研究報告書

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： 下田 貴宗 シモダアメニティ株式会社
研究協力者： 新道 欣也 株式会社 お風呂のシンドー
研究協力者： 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： 杉山 寛治 株式会社マルマ
研究協力者： 田中 慶郎 株式会社マルマ
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

循環浴槽水系内で再発を繰り返すレジオネラ汚染の迅速検出法（フローサイトメトリー法： FCM 法）を開発し、技術標準化と普及のための共同調査研究を実施した。本技術の特徴は、塩素消毒の酸化作用により発現すると思われる細菌数の変化を細胞単位で正確に計測できるフローサイトメトリーにより解析し、レジオネラ汚染率と強く関連づけられる一定の閾値により、検水の清浄度を簡便迅速に判定することにある。その結果、「清浄」と判定された検水からレジオネラは培養法により検出されず、「非清浄」と判定された検水中からは高い確率でレジオネラ生菌が検出される。地方衛生研究所 3 機関と民間企業研究所の 1 機関が共同調査に参加し、当該技術の開発機関から他の参加機関に対して精度管理を含めた技術研修を実施し、関連するプロトコル、*Legionella pneumophila* (LP) 標準株を用いて自家調製した模擬試料、必要試薬および装置を配布した。模擬試料による添加回収実験では全ての研究所で 80~130%と良好な成績を示し、市販レジオネラ材料で調製した模擬試料でも同等の成績が得られることを確認した。施設調査においてレジオネラ培養検査結果に対する感度と特異度を比較したところ、全体で感度 83.1%、特異度 79.6%（N=267）を示した。研究所ごとにみると、感度 91.7%、

特異度 95.3% (N=55) から感度 55.6%、特異度 75.3% (N=90) とばらつきが認められた。原因として、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との相関を見たところ、培養法の定量下限近くで 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 ($y = 32.547x^{0.2577}$ 、 $R^2 = 0.2091$)。供試フローサイトメーターを用いた特異蛍光染色法の検討では、当該装置により、LP SG1、LP non-SG1、腸管出血性大腸菌 O157 および浴槽水から分離した *Mycobacterium phlei* 株を検出できることを確認し、実試料用の LP 検出混合試薬を作製した。

FCM 法をモノクロアミン (Mch) 消毒に適用したとき、実用濃度の約 5 倍の Mch を用いることで、遊離塩素と同様な清浄エリアを設定できた。Mch 消毒施設の調査 (N=34) において、FCM 法により「清浄」と決定された検体 (N=24) からは、レジオネラは培養法でもレジオラート法でも検出されず、リアルタイム PCR および FCM 法によって検出された LP は死菌と判定された。FCM 法により「非清浄」と判定された検体 (N=10) からは、培養法で 1 検体からレジオネラが検出されたが、他の全ての検体からは *M. phlei* が検出された。循環ろ過器の逆洗浄にオゾン曝気処理を適用した施設調査に FCM 法を適用したところ、FCM 法により得られた全細菌数が処理の前後で有意に減少する ($p < 0.01$) ことが明らかとなり、本処理法の有効性証明に活用できた。

FCM 法は遊離塩素消毒や Mch 消毒の違いに関わらず、浴槽水の清浄度を担保する一定の閾値を決定でき、FCM 法の標準化に基づく研究所間の技術伝達是一定の成果が認められた。

A. 研究目的

公衆浴場等の循環系を含む建築物の配管設備により供給される水環境では、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*, LP) を含む日和見病原体が様々な水関連微生物と共存しながら、生物膜内で消長を繰り返している¹⁾。レジオネラ属菌は 25°C 以上の水に生息するが、バイオフィームやアメーバに保護されて加熱や塩素の殺傷力から回避できることが知られており²⁾、一旦定着した配管系のレジオネラは長く汚染源となりうることを示されている³⁾。従って、適切な衛生管理ができていない循環ろ過式入浴施設では、浴槽水においてレジオネラ属菌が繰り返し検出されることは容易に予測できる。

このような施設において塩素消毒を行う場合、塩素の阻害物質として働くと思われる温泉成分、入浴者の皮垢やバイオフィームの存在を念頭に置いて、浴槽水を安定的かつ効果的に消毒する必要がある。我々は、これまでに浴槽水中レジオネラリスクの迅速評価法 (FCM 法) を独自に開発してきた^{4,5)}。本方法は、配管系統内で再発を繰り返すレジオネラリスクの迅速評価方法として開発され、遊離

塩素の消毒効果を迅速に判定することができ (約 5 分間)。ここで、我々は遊離塩素により浴槽水が十分に消毒された細菌の状態がフローサイトメトリーで作られる散布図内で一様な像として検出されることに着目し、この状態を満たすか満たさないかで「清浄」か「非清浄」かを判定する技術を開発した⁴⁾。驚くべきことに、遊離塩素消毒の場合、FCM 法の判定結果はレジオネラ培養検査の定性結果と同等であり、このことがモデル実験や施設調査で実証された^{4,5)}。

本研究の目的は、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。各機関あてに装置と精度管理用の模擬試料を送付して、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施設調査成績を比較して、FCM 法の実用性を評価した。次に、いくつかのレジオネラ属菌に対する抗体を委託や市販品購入によ

り入手して FCM 法に適用できるかどうかを調べた。最後に、FCM 法のモノクロラミン (Mch) 消毒への適用を目的として、適切な測定条件を決定した後で施設調査を行った。循環ろ過器の定期洗浄にオゾン曝気処理を施した施設の調査に FCM 法を適用して、その実用性を検討した。

B. 材料と方法

1. 共同比較実験

1.1. 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、別紙 1~2 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。その後、A 研究所で動作確認した機器と作製した模擬試料を B~D 研究所に配布した。FCM 法については標準作業書に則って行われ、培養法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。LP 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°C 保存の LP NIIB0058 を BCYE α 培地に復元後、増菌培地 (Legionella LC Medium Base, 9016, TAKARA) に小コロニー 1~数個を接種して、恒温水槽で $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18~24 時間培養した後の懸濁液を PBS (pH7.2) で 10^7 cells/mL オーダーとなるように希釈して原液とした。原液とそれを希釈した 10^6 および 10^5 cells/mL オーダーの懸濁液を 100 倍希釈してそれぞれ 10^5 、 10^4 および 10^3 cells/mL オー

ダーの模擬試料とした。各試料の生菌数を計測した後、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°C で 3 時間保温後に冷蔵保存した。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 10^5 、 10^4 および 10^3 cells/mL オーダーの模擬試料を調製した。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°C 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 BCYE α 培地に塗抹して、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、72~96 時間培養して生菌数を計測した。調製済み模擬試料の生菌数は FCM 実測値 ($4,573 \pm 467$ CFU/mL) の 1/10 量程度 (390 ± 102 CFU/mL) であった。残りの菌懸濁液に終濃度 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°C で 3 時間培養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⁵⁾に準拠して、試料 1 mL と 0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB) を含む希釈液 1 mL を混合し、0.1% propidium iodide (PI) を 10 μL 加えたのち、3 分間静置させ、フローサイトメーターにより予め設定した特異領域中の細胞を計測した数値を 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) を用いて、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⁵⁾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していることである。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される。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、miniPOC にセットして計測した。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

レジオネラの菌数測定に際して、 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、巡回振とうさせ、miniPOC で計測した数値に装置独自の補正值 (換算比 : 2000/42) を掛け合せて添加菌量とした。回収実験では、PBS を用いて 前述の各 LP 模擬試料を 500 倍希釈しておよそ 10^0 、 10^1 および 10^2 cells/mL オーダーの希釈液を作製した。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、フィルター表面を 0.05%BSA 加 PBS で

洗い出すことにより回収した (約 500 倍濃縮)。同じことを繰り返し、これら 2 回の回収液を FL Ip mix で染色し、30 分間反応後に miniPOC で測定した。この測定値に装置独自の補正值と回収時に発生する誤差(容量比 : 1.1)を補正した後、回収菌量を計算した。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 N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD, Hach) 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 を越えた場合は「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⁵⁾。

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 μ m 孔フィルターで吸引ろ過した後、ろ過後のフィルターを 55 mm シャーレに貼付け、MF 表面を 0.05%BSA 加 PBS で洗い出した。次いで、前述と同じ操作を繰り返し 2 回目の回収液とした。各回収液を染色試薬 FL Ip mix で、30 分間染色したのち、miniPOC で測定した。この時、装置独自の補正值 (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。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⁶⁾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 (ピオメリュー) 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、モノクロラミン管理 28 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 (二酸化塩素管理施設含む) 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。検体には遊離塩素とモノクロラミンや二酸化塩素による消毒を行っている浴槽水が含まれており、遊離塩素等とモノクロラミンに分けて解析した。

A 施設で実施したモノクロラミン管理の 28 検体と C 研究所で実施したモノクロラミン管理の 6 検体については第 3 項で記述する。

2. レジオネラ属菌用染色試薬の作製

2.1. 抗体の作製

レジオネラ属菌として *Legionella bozemanii*、*Legionella micdadei*、LP SG1、LP non-SG1 および *E. coli* O6 を選定して、ホルマリン懸濁液を調製し、ウサギ免疫ポリクローナル抗体を ARK-resource に製造委託した。ELISA 法により高力価が確認された製造品を、Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) で標識して試験に供した。市販されている抗 *Legionella* 抗体 (Virostat,

6051)、抗 *Escherichia coli* 抗体 (Virostat, 1001)、および抗 *Mycobacterium tuberculosis* 抗体 (Virostat, 4601) を購入して、Alexa fluor 532 で標識した。

対象とする細菌株は約 10^5 CFU/mL に調製し、FL Ip mix で染色して miniPOC で計測した。抗 *M. tuberculosis* 抗体は結核菌を対象とするのではなく後述するモノクロラミン消毒施設から検出された *Mycobacterium phlei* を検出するために準備した。

3. モノクロラミン (Mch) 消毒施設の調査

3.1. Mch 消毒を満たす FCM 特異領域の設定

Mch により十分に消毒されたサンプルを識別しうる FCM の特定条件設定のためのモデル実験を実施した。最初に、田栗ら⁵⁾に従って、最終濃度 10^4 cells/mL となるように *E. coli* 懸濁液を 42°C、24L の温水に添加した後、次亜塩素酸ナトリウムで 10 mg/L に維持し、PI 染色により大腸菌を染色して miniPOC で TBC を測定した。次に、Mch については同様の手技で実験を行い、実用濃度 (3.0~4.0 mg/L) と高濃度条件 (15~25 mg/L) で大腸菌細胞の推移を観察した。PI 染色は 1mL 未濃縮サンプルと 1mL 0.1%MTAB 溶液を混合した後、10 μ L の 0.1%PI 溶液を添加し、サンプル中の TBC を miniPOC で測定した。現地調査では、温泉 (pH 5.5~7.4) 中の Mch 処理水の 34 サンプルを調査した (表 1)。DPD によって全塩素濃度 (Total Chlorine Concentration, TCC) を決定した後、チオ硫酸ナトリウムによって中和されたサンプルは 1 週間以内に試験に供した。並行して、生死判別を伴う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。

4. オゾン処理施設の調査

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曝気式オゾン消毒の有用性評価研究 (本分担研究とは別途報告) のサンプルを提供してもらい、FCM 法で評価し

た。非濃縮排水の TBC を遊離塩素用の測定領域により測定し、1000 倍濃縮水の抗レジオネラ抗体染色による定量を行った。並行して、レジオネラ遺伝子検査、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 10^4 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 10^3 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⁷⁾。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。本模擬試料の調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。一部の偽陽性検体において、平板培養法で陰性

を示した検体 (偽陽性結果: FCM 法で汚染判定) がレジオラートで陽性を示し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、携帯型である当該装置にどこまでの精度と正確性を求めるかが今後の課題となる。

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 ($y = 32.547x^{0.2577}$ 、 $R^2 = 0.2091$) (図 1)。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 と比較的低値であり、このようなケースでは、配管やろ過器内に繁茂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. レジオネラ属菌染色液の作製

miniPOC により、抗 *L. pneumophila* SG1 染色液、抗 *L. pneumophila* non-SG1 染色液、抗 *E. coli* 染色液、抗 *M. tuberculosis* 染色液および抗 LP 混合染色試薬は、それぞれ LpSG1、Lp non-SG1、EHEC O157、*M. phlei* および *L. pneumophila* を検出できたが、抗 *L. bozemanae* 抗体と抗 *L. micdadei* 抗体は対象とする菌を検出できなかった。それぞれの抗体の特異性は ELISA により確認されているために考えられる理由の一つは白血球用に製造された装置の解像度が低いために細菌を検出できなかった可能性がある。しかし、準備する菌の凝集、抗体と蛍光色素の結合度、蛍光色素の種類など、様々な要因を完全に払しょくすることはできず、本装置の保持する単一波長レーザー分析による実験系にも限界があるため、現段階でははっきりしたことは言えない。

3. モノクロラミン消毒施設の調査

Mch の実用濃度下で *E. coli* 細胞に有意な変化は観察されなかったが、 21.54 ± 7.19 mg/L の Mch を 3 日間維持すると、*E. coli* 細胞は FCM のゲートから消失した (図 2)。遊離塩素消毒と同様に、良好な Mch 条件の水を FCM で測定した場合には、細胞はノイズ粒子と重ならない特定画像を示した (図 2)。現地調査では、非濃縮サンプルの消毒効果を識別した後、濃縮サンプルをレジオネラ培養法と FCM で検査した。Legiolert キットと生/死細胞識別リアルタイム PCR を補助的に実行した。FCM によって「清浄」と判定された 24 検体の TBC は 239.4 ± 122.6 (平均 $\pm$ 標準偏差) counts/mL だったが、「非清浄」と判定された 10 検体は $45,894.4 \pm 75,700.6$ counts/mL を示し、両グループの間には有意差が認められた (マンホイットニー検定: $p < 0.0001$ 、表 2)。

FCM によって清浄と判定された全ての検体から、レジオネラは培養によってもレジオラートによっても検出されず、リアルタイム PCR および FCM によって検出された LP は死菌と判定された。FCM で非清浄と判定された 10 検体のうちレジオネラは 1 検体 (LP SG6) からのみ検出された。しかし、他の 9 サンプルからは同一の微小液滴様細菌が大量に検出された。この細菌は、バクテリア 16S rDNA PCR キット (タカラバイオ) を用いた PCR により、*M. phlei* と同定された。本菌はアンモニアを栄養源とする硝化菌に分類される。

Mch は、温泉でのレジオネラ菌のリスクを管理する手段として有用な消毒剤であると考えられる。しかし、今回十分な Mch 条件下であっても、無視できない数の硝化菌が増殖し、それらが FCM により迅速に検知されることが明らかとなった。モノクロラミン消毒施設における *M. phlei* の存在は既に報告されており⁸⁾、レジオネラ汚染との関連や病原学的な意義については未だ不明であるが、硝化菌であることからアンモニアの安定性に影響する可能性があると考えられた。

4. 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 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 (図 3)、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、参加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。

特異蛍光染色法の検討では、供試装置により、Mch 消毒と関連が疑われる *M. phlei* を直接検出できること、並びに FCM 法における Mch 消毒やオゾン消毒管理施設の浴槽水の消毒効果判定も可能であることが確認された。

以上のことから、FCM 法の標準化に基づき研究所間の技術伝達は一定の成果が認められた。また、遊離塩素消毒だけでなく Mch 消毒やオゾン逆洗水の評価に有用であることも証明された。

References

1. Buse, H.Y, Morris, B.J., Struewing, I.T., Szabo, J.G., 2019. Chlorine and monochloramine disinfection of *Legionella pneumophila* colonizing copper and polyvinyl chloride drinking water biofilms, Appl. Environ. Microbiol., 85, e02956-18
2. Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D.E. and Guyard, C. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. Int J Mol Sci. 2013 Oct 31;14(11):21660-75. doi: 10.3390/ijms141121660.

3. Steinert, M., G. Ockert, C. Luck, and J. Hacker. 1998. Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. Zentralbl. Bakteriol. 288:331-342.
4. 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.
5. 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.
6. 森本 洋ら, レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 24 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 倉 文明, 93-130, 2012.
7. 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/
8. 長岡宏美ら, 社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 13-22, 2016.

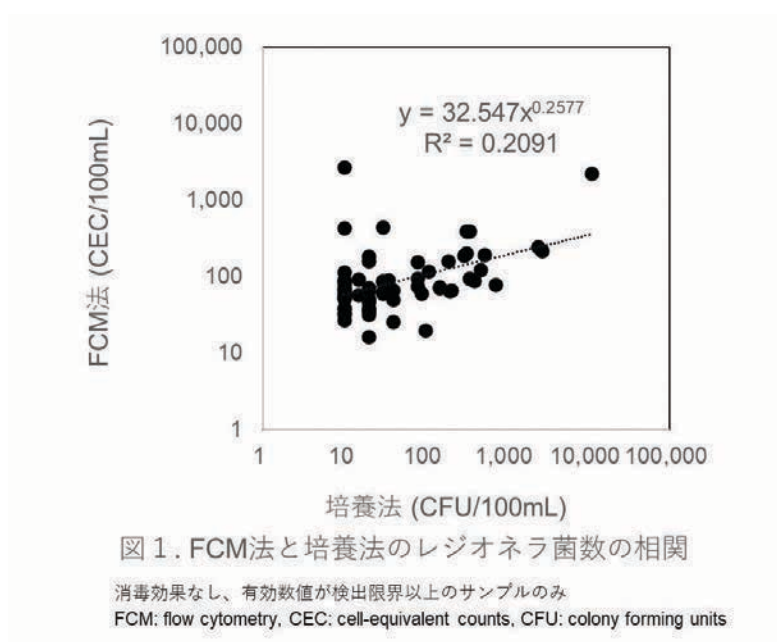
表1. 3段階の模擬試料と市販材料を用いた添加回収試験結果

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	—	67.9%	67.9%	28
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	100.0%	72.7%	73.5%	34



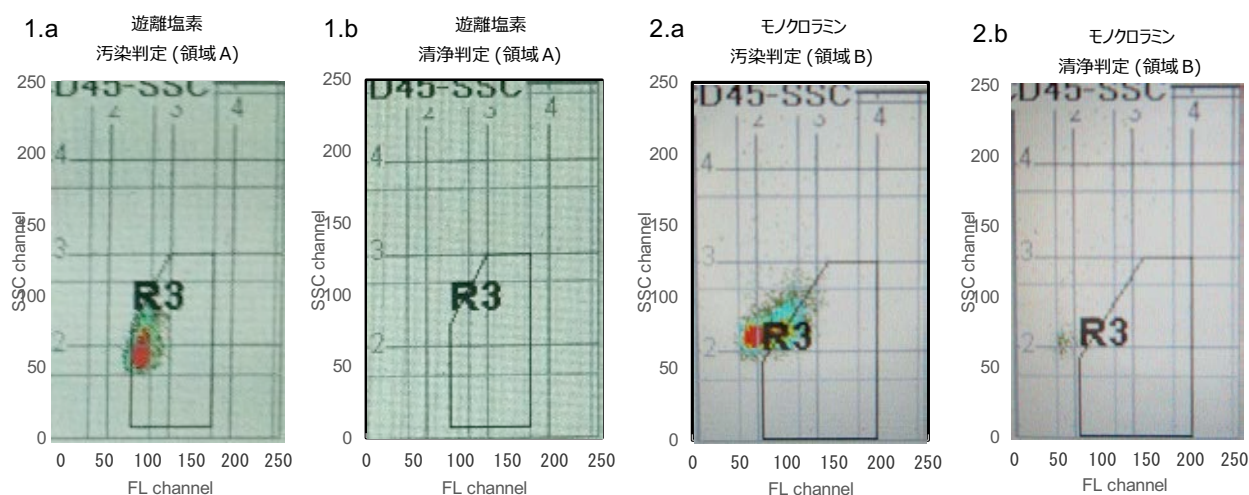


図2. 10^4 CFU/mLの大腸菌を用いたフローサイトメトリーの測定領域

No1とNo2はそれぞれ遊離塩素消毒とモノクロアミン消毒により作製されたフローサイトメトリー法の散布図を示す。1aと2aは共に非清浄状態を、1bと2bは共に清浄状態を示す。

遊離塩素濃度: 1a:0 mg/L, 1b:10 mg/L、モノクロアミン濃度: 2a:0 mg/L, 2b:15~25 mg/L; CFU: Colony forming units.

表3. モノクロアミン消毒を導入している施設のレジオネラ等検査結果の比較

		全細菌数 (counts/mL)		レジオネラ属菌検査 (CFU [※] /100 mL)		RDM 法によるレジオネラ数 (CEC [※] /100 mL)		死菌レジオネラ遺伝子コピー数 (CGC [※] /100 mL)	
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
地下水 (N=7)	≥ 3.0 Mch [※]	179.1	129.2	< 10	—	73.6	29.6	1,397.7	405.1
	< 3.0 Mch	—	—	—	—	—	—	—	—
炭酸水素塩泉 (N=2)	≥ 3.0 Mch	325.4	78.6	< 10	—	355.0	392.7	2,576.1	3,428.3
	< 3.0 Mch	—	—	—	—	—	—	—	—
塩化物泉 (N=19)	≥ 3.0 Mch	24,195.5	58,458.6	< 10	—	233.3	183.9	2,547.1	2,643.1
	< 3.0 Mch	—	—	—	—	—	—	—	—
含鉄塩化物泉 (N=6)	≥ 3.0 Mch [※]	311.1	95.6	< 10	—	63.9	41.9	ND	
	< 3.0 Mch [※]	1,595.2	—	20	—	30	—		
	(N=1)	—	—	—	—	—	—		
合計 (N=34)	≥ 3.0 Mch	14,033.2	45,462.5	—	—	192.4	167.8	2,261.5	2,292.8
	< 3.0 Mch	1,595.2	—	—	—	—	—	—	—

[※]Mch: monochloramine, CFU: colony forming unit, CEC: cell-equivalent counts, CGC: cell-equivalent gene copies, MPN: most probable number.

表 4. FCM の消毒効果判定に基づく各種検査結果の比較 (モノクロアミン消毒)

	全細菌数 (counts/mL)		FCM によるレジオネラ数 (CEC [※] /100 mL)		死菌レジオネラ遺伝子コピー数 (CGC [※] /100 mL)		検出された細菌 (検体数)
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
清浄 (N=24)	239.4	122.6	139.3	136.2	705.4	544.4	ND (24)
非清浄 (N=10)	45,894.4	75,700.6	217.5	200.0	1,569.8	1,454.9	<i>Legionella pneumophila</i> SG6 (1) <i>Mycobacterium phlei</i> (9)

[※]CEC: cell-equivalent counts, CGC: cell-equivalent gene copies, ND: not detected

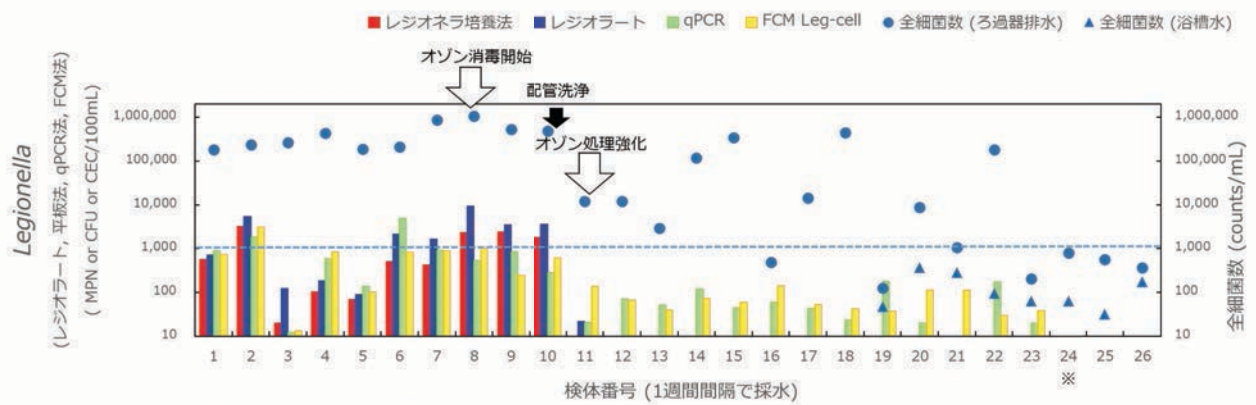


図3. オゾン消毒によるろ過器排水中のレジオネラ数の推移

※No24~26のqPCRとFCM Leg-cellは未実施, 青破線 (1000 counts/mL) はFCM法の消毒効果判定閾値

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 ～ 数個程度を接種して、恒温水槽で 36 ± 1 、18 ～ 24 時間培養した後の懸濁液の上清 0.5 mL を 4.5 mL PBS (pH7.2) に接種して原液とする。この時の原液は、これまでの実績から約 $1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/mL と推定される。予め 9 mL PBS (pH7.2) を入れた中試験管を必要分調製して、4 段階で 10 倍段階希釈列を作製した後、 10^2 および 10^3 cells/mL と予測される試料の 0.1 mL を各 2 枚の BCYE 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（ $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ）
 - 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

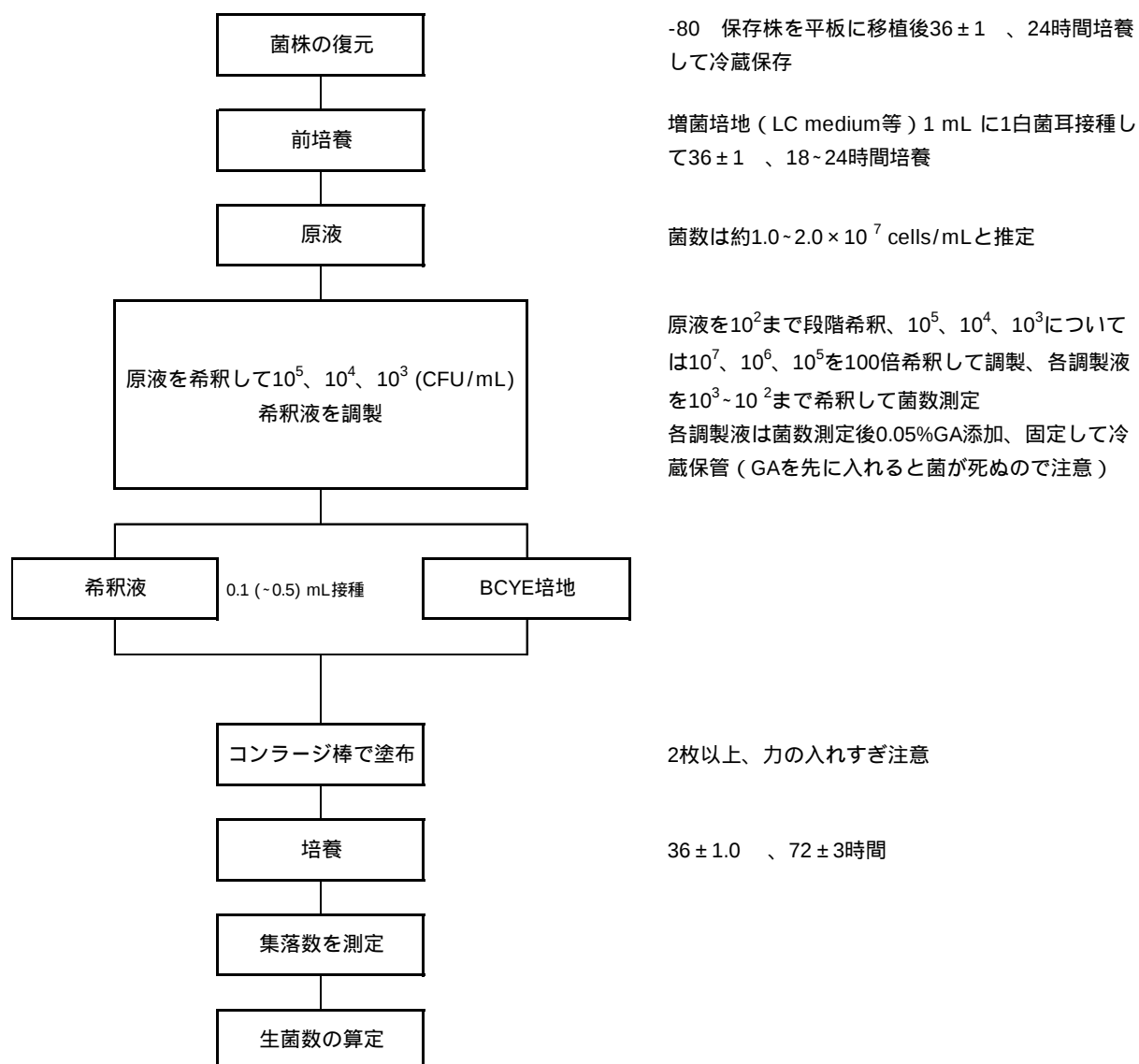
グルタルアルデヒドの 50%溶液、20%溶液、和光純薬製または同等品を用いる。市販品を適切に希釈して5%液を調製、0.2 μm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。最終濃度が 0.05% となるように試験液に注入する。

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



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。

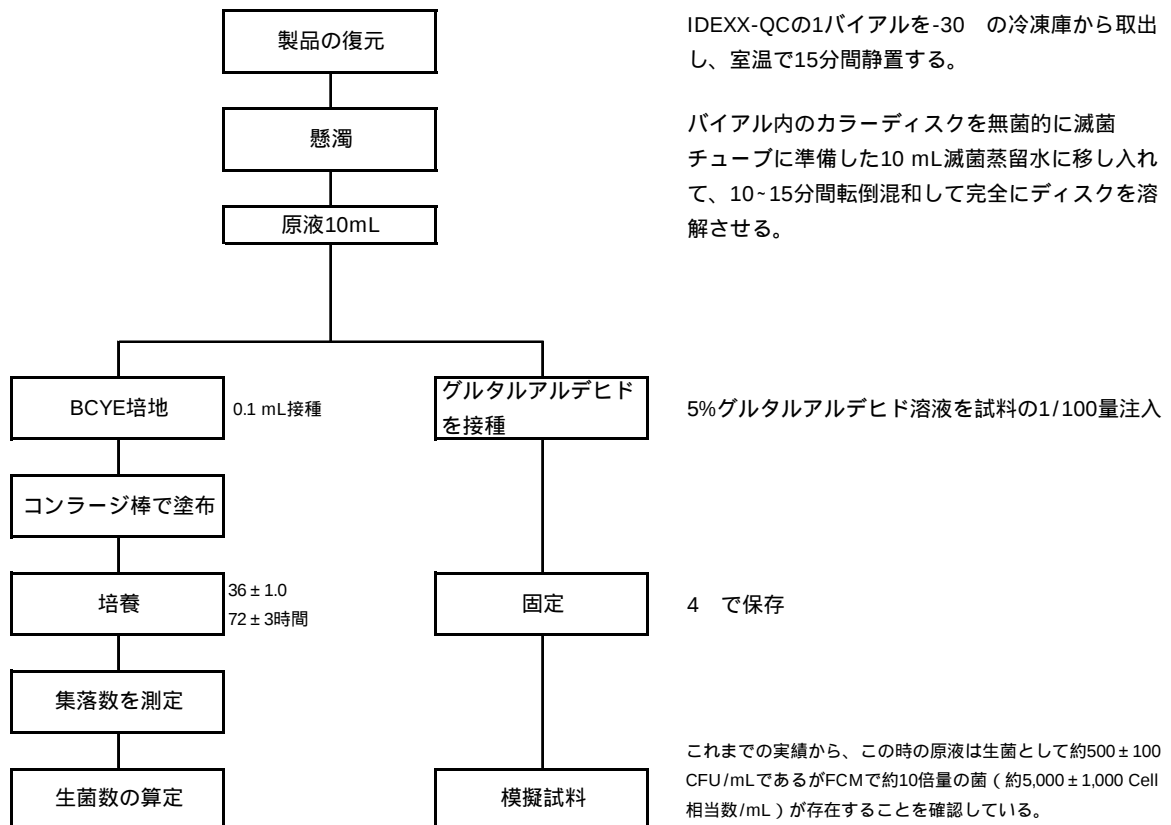
2) 培地

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計測する

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

2) 菌数の記載

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

検査実施標準作業書

SOP No.	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)

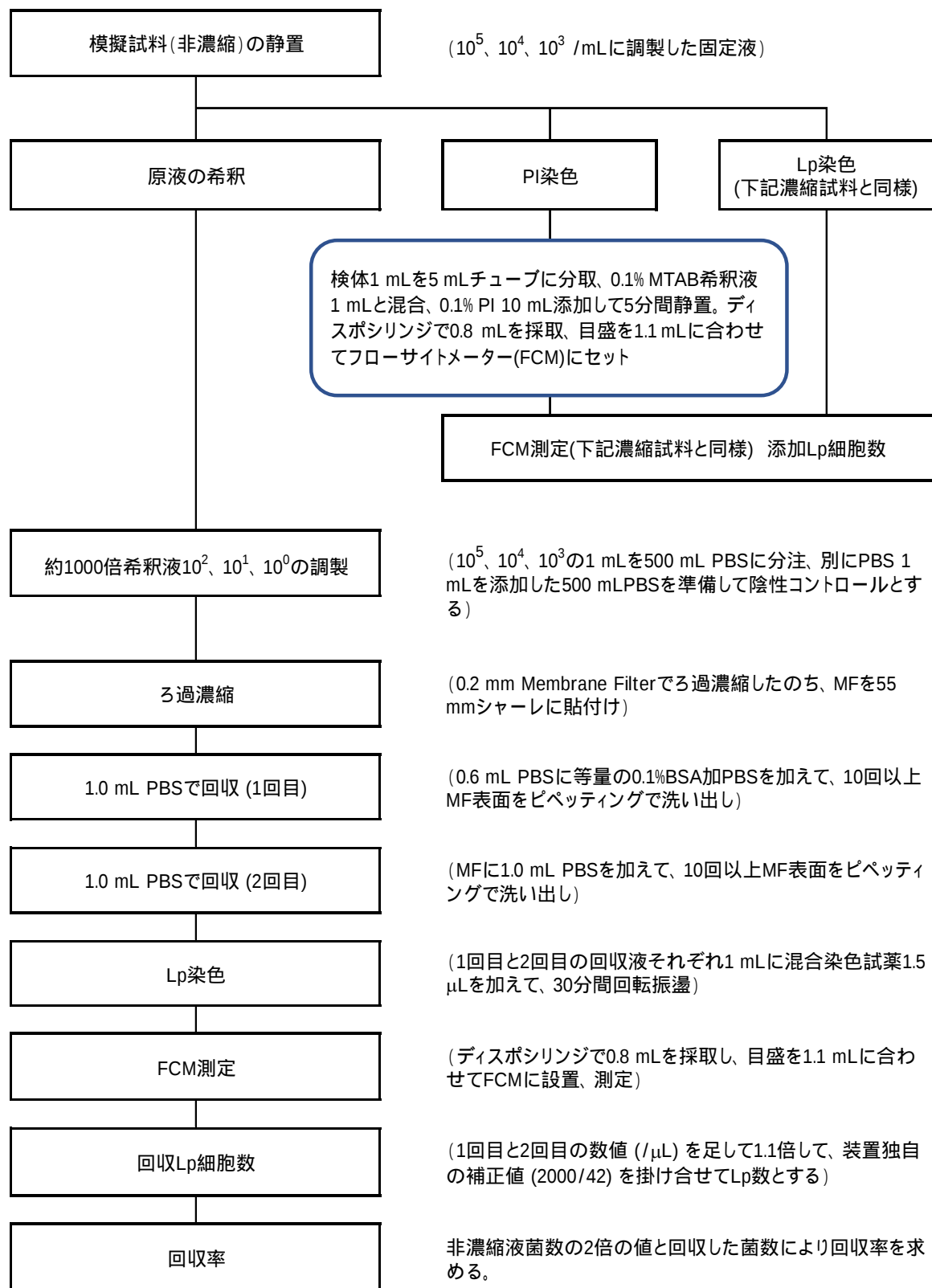
Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

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を過す。フローサイトメトリー用実験であるのでフィルターを過すは 2 回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

フローサイトメトリー用染色試薬

- 0.1% propidium iodide (全菌数測定用)
- 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: ϕ 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TERICAP フィルターユニット (1 L用)
- フローサイトメーター (miniPOC; Sysmex)
- 染色試薬 (0.1% propidium Iodide (PI)、2 mg/L LP血清群1用染色試薬 (FL Lp SG1)、2 mg/L

Lp非血清群1染色試薬 (FL non_Lp SG1))

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

5. 試薬・培地の調製

1) 試薬

滅菌リン酸緩衝水 (pH7.2)

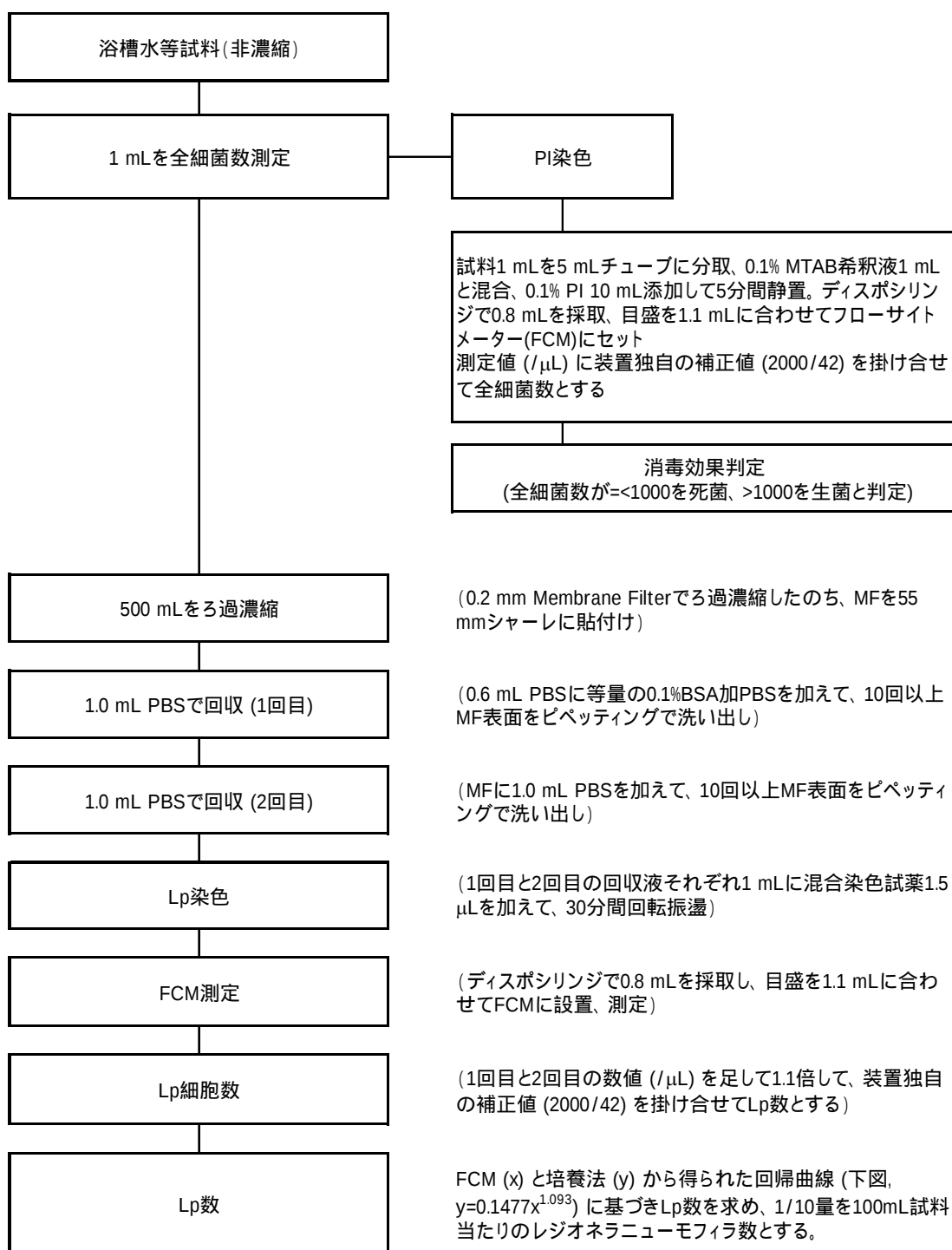
Na ₂ HPO ₄ (無水)	6.6 g
KH ₂ PO ₄ (無水)	2.7 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 mL

りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、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 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 (ミルテニーバイオテク社) を加えて調製する。

6. 製品検査の方法



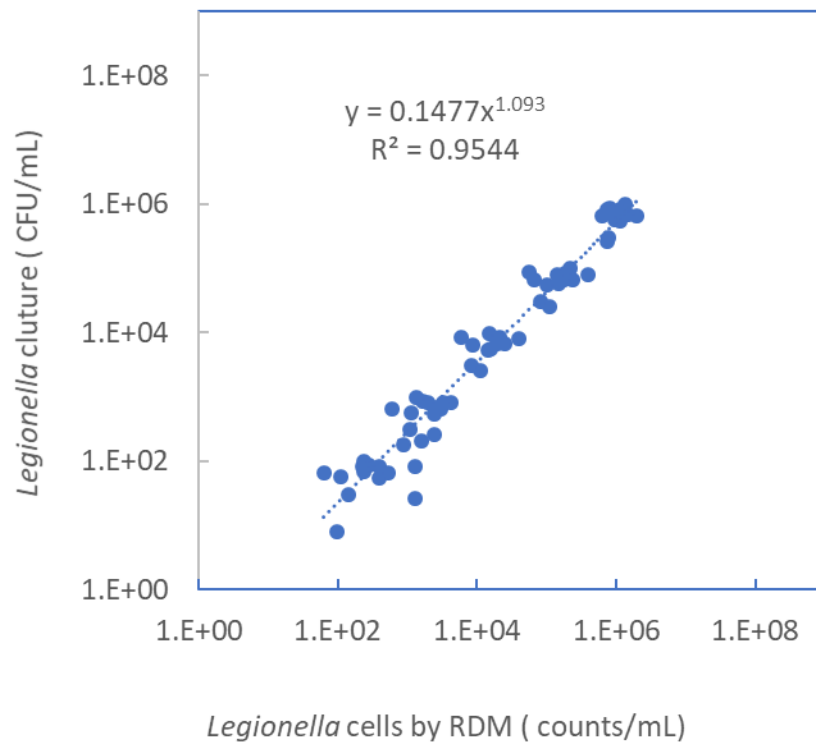


Fig. Correlation between culture method and RDM (11 strains of *Legionella pneumophila*)

検査実施標準作業書

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)
- ディスポシリンジ (3 µm)
- プラスチックシリンジ (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

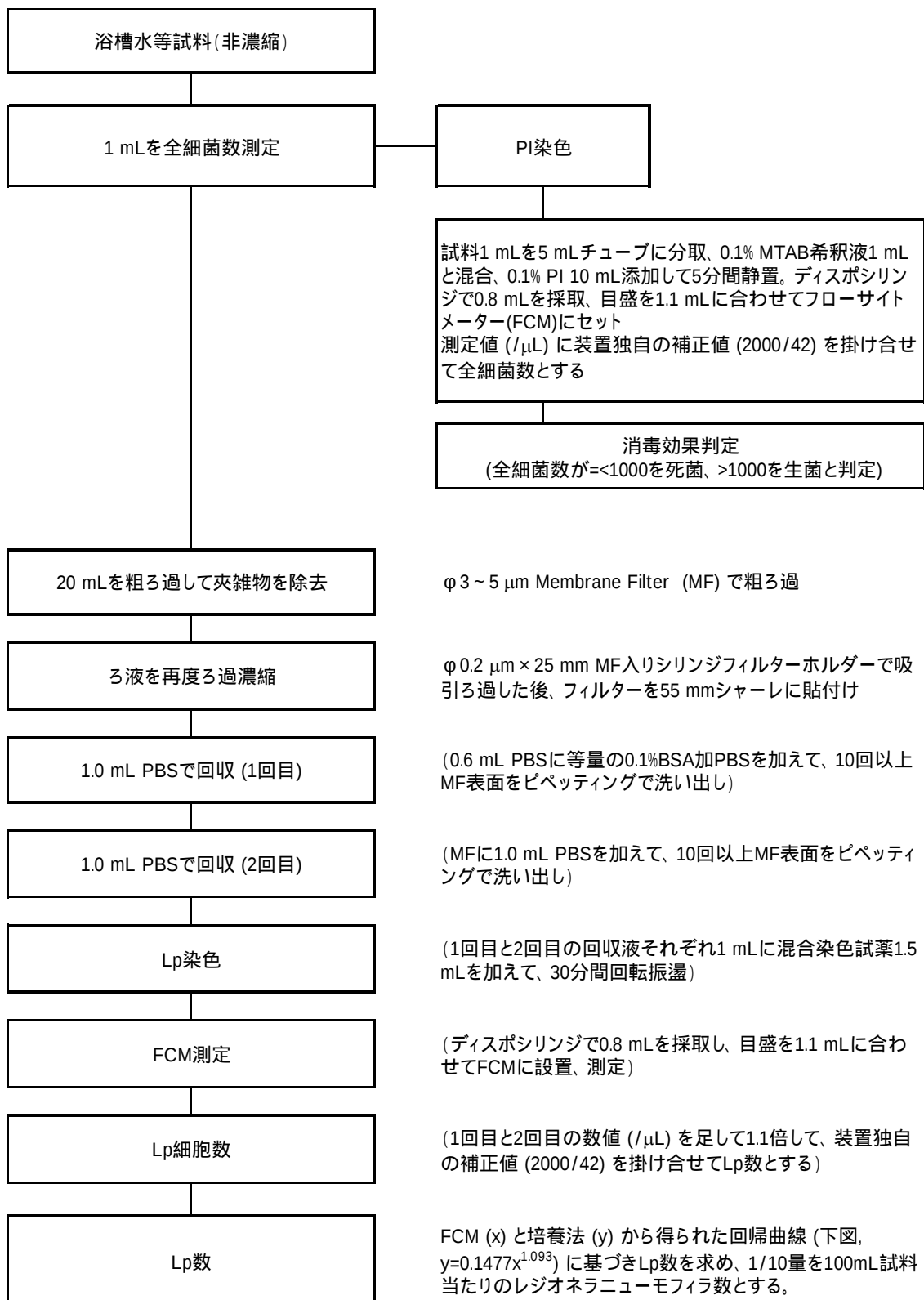
りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.2) を RO 水 (フローサイトメトリー用実験の場合は MilliQ 水を使用) に融解させ、NaCl を加えた後 1L として、φ 0.2 µm ボトルトップフィルターでフィルターろ過する。フローサイトメトリー用実験であるのでフィルターろ過は 2 回繰り返すことが望ましい。リン酸緩衝剤は、市販の粉末培地を使用し、処方に従って調製してもよい。

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



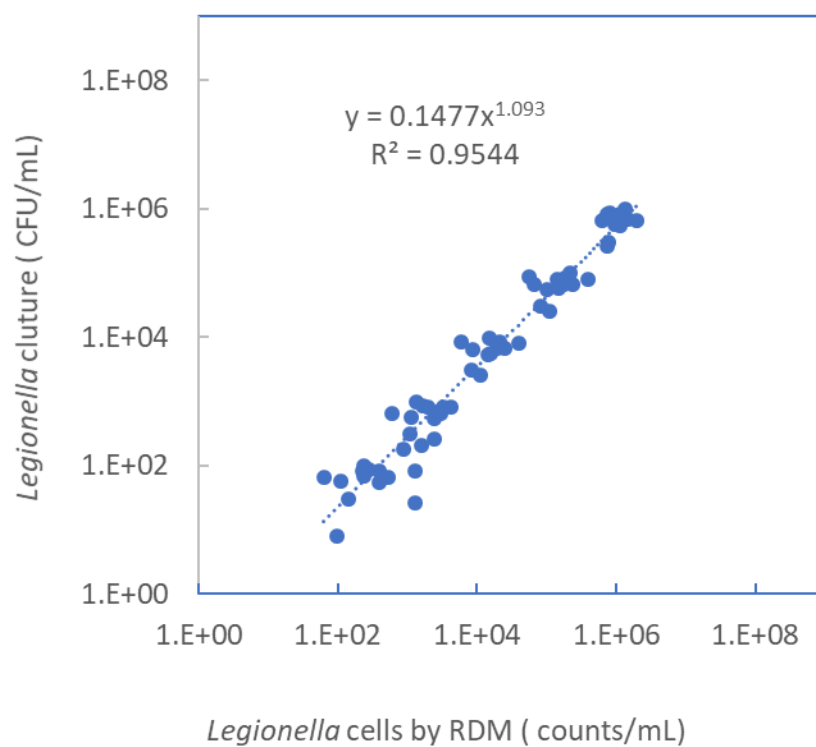


Fig. Correration between culture method and RDM (11 strains of *Legionella pneumophila*)

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 10³、10⁴および10⁵ 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分間高圧滅菌処理）（ ）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分間高圧滅菌処理）
（ ）mL （ ）本）作製

(2) 作製月日： 月 日

☐ 滅菌リン酸緩衝水
(PBS (pH7.2) 1包/ L、NaCl 8.5g / L、0.2 μ m steri-cup filter unit ろ過（ ）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）

↓

☐ 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表面をピペッティングで洗い出し、1 mLを1回目測定試料とする。

↓

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

↓

□上記1回目および2回目測定試料1 mLに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）

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	緒方喜久代	公益社団法人大分県薬剤師会 検査センター
研究協力者	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
研究協力者	井原基	長崎県環境保健研究センター
研究協力者	湯澤栄子	川崎市健康安全研究所
研究協力者	田中奈緒美	アイデックスラボトリーズ株式会社
研究協力者	花田祐一	アイデックスラボトリーズ株式会社

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、実検体を使用して平板培養法と比較検討した。既存菌株を用いた検討においてレジオラート/QT 法は平板培養法と同等の性能であることが示された。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 83.6 % と高い一致率を示し、検出菌量を比較した結果、回帰直線の R^2 は 0.748 となり、強い相関が認められた。不一致であった検体の 74.5 % が 30 MPN 又は CFU/100mL 未満の検出限界に近い菌量での不一致であった。ウェルの液体培地を培養したところ、レジオラート/QT 法で偽陽性を示す菌種が確認された。

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。本研究ではレジオラート/QT 法の有用性を確認するため、基礎的な検討とともに実検体を用いて従来法である平板培養法と比較検討した。

B. 研究方法

1. 基礎的検討

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

方法としては、*L. pneumophila* の菌株を BCYE α 寒天培地で 2~4 日間培養し、発育したコロニーを滅菌水に懸濁し、希釈系列を 10 倍ごと 4 段階作成したものを用いて比較実験を実施した。BCYE α 寒天培地に各希釈段階の菌懸濁液 0.1 mL を添加し湿潤環境で 36℃で 7 日間培養した。並行して、レジオラートを溶解した滅菌水 100 mL に各希釈段階の菌懸濁液 0.1 mL を添加し混和した後、Quanti-Tray/legiolert にシーラーPLUS を用いて封入し、湿潤環境で 36℃で 7 日間培養した。本培養温度はレジオネラ症防止指針第 4 版に準拠している。培養後、茶色ま

たは濁りの生じたウェル数を陽性とし、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。上記の実験を 3 回繰り返した。

2. 検査室間の比較

3 機関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、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。また、検体をろ過濃縮法にて濃縮した後、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。

3. 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

各施設に搬入された公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 599 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。

レジオラート/QT 法で陽性と判定されたものの、ウェルの液体培地からレジオネラ属菌が検出できなかった一部検体について、GVPC α 寒天培地で発育したコロニーから遺伝子を抽出し、16S rDNA により菌種を同定した。また、同定した菌についてレジオラート/QT 法で陽性を示すか確認するため、単離菌を滅菌水 100 mL に加え、レジオラートを混和した後、専用の Quanti-Tray/legiolert にシーラーPLUS を用いて封入し、湿潤環境で 39℃で 7 日間培養し、茶色または濁りが生じるか確認した。

同時に平板培養法にてレジオネラ属菌の分離と遺伝子検出法にてレジオネラ属菌の遺伝子検出を実施した。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）」に準じた各検査機関の方法で実施し、ろ過濃縮法にてレジオネラ属菌の分離を行い、システイン要求性又は免疫血清により検出菌の同定及び検出菌量を算出し、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。

4. 偽陽性菌株におけるレジオラート/QT 法の反応性

本検討で検出された *Aeromonas hydrophila* 菌株 A 及び環境から分離された *A. hydrophila* 菌株 B の 2 菌株を用いてレジオラート/QT 法が陽性になる菌量を検討した。各菌株を $10^5 \sim 10^1$ CFU/mL に希釈し、各 10 mL ずつレジオラートに添加し、39℃で 7 日間培養した後、陽性となったセル数をカウントした。

C. 結果

1. 基礎的検討

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

2. 検査室間の比較

3 機関で実施した結果、3 機関ともに使用 lot の Acceptable Range の範囲内となった（表 2）。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。

3. 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

各検査機関で計 599 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 136 検

体、両方法で陰性となったものは 365 検体であった（表 3）。平板培養法と比較したレジオラート/QT 法の感度は 69.0 %、特異度は 90.8 %であり、結果一致率は 83.6 %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 136 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 R² 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 98 検体中 73 検体で 10-29 CFU 若しくは MPN/100mL であった（図 3）。検出菌量が 10-29 CFU 若しくは MPN/100mL で遺伝子検査法を実施した 35 検体中 7 検体で遺伝子検査が陰性であった。

レジオラート/QT 法のみ陽性であった 37 検体中 17 検体でレジオラート培養液から *L. pneumophila* が検出された。*L. pneumophila* が検出されなかった 4 検体において、レジオラート培養液を培養した培地上で発育が見られたコロニーから遺伝子抽出し、16S rDNA の塩基配列により同定したところ、それぞれ *Brevundimonas naejangsanensis*、*Pseudomonas otitidis*、*Pseudomonas* sp.、*Aeromonas hydrophila* であった。これら単離した菌株をそれぞれ滅菌水に懸濁し、レジ

オラート/QT 法を実施したところ、茶色の発色を示し、陽性反応が見られた。

4. 偽陽性菌株におけるレジオラート/QT 法の反応性

レジオラート/QT 法で陽性反応を示した菌株のうち *A. hydrophila* について、偽陽性となる菌量を検討するため、希釈系列を用いた検討を行った。浴槽水由来株 A は 10¹ から陽性となったが、環境由来株 B は 10³ から陽性と菌株によって大きい差がみられたが、少量の菌量でも陽性反応を示した（表 4）。また、レジオネラ属菌が陽性となる検体ではおおよそ 5 日目ごろから陽性となるのに対し、本菌株による陽性反応は 2 日目から 3 日目と比較的早期に見られた。

D. 考察

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

同一 lot 試薬を用いて検査室間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 施設のみ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 83.6 %と高い一致率を示した。特に特異度は 90.8 %と高い値であった。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 日目に変色が認められた 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。本検討からレジオラート/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ることが示唆された。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可能性が示唆され、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、レジオネラ属菌を定量的に検出することが確認された。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ものの、不一致であった検体の 74.5 %が 30 MPN 又は CFU/100mL 未満の検出限界に近い菌

量での不一致であった。また、レジオラート/QT 法の陽性であった 17 検体についてはレジオラート培養液からレジオネラ属菌が検出されたことから同検体は平板培養法より感度よくレジオネラ属菌が検出できた。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。より高い精度での検出を実施する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。

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

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、平板培養法と同等の検査法である。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 レジオラート/QT 法の基礎的検討結果

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

表 2 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 3 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	136	37	173
	陰性	61	365	426
	計	197	402	599

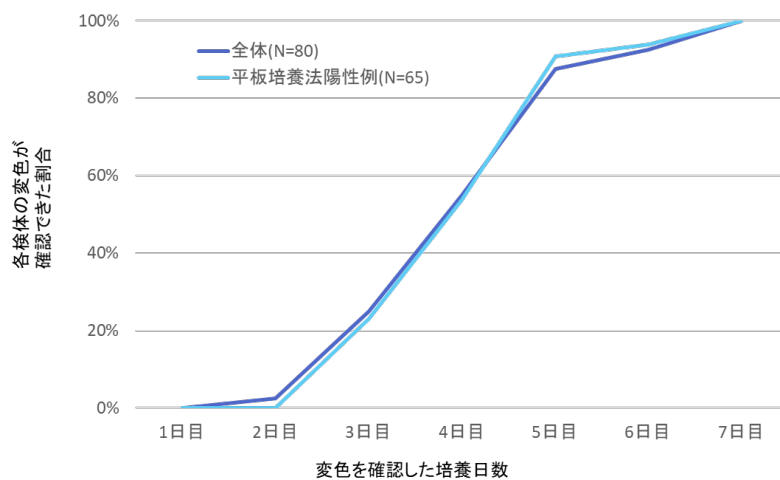


図1 レジオラート/QT法における変色を確認した培養経過日数

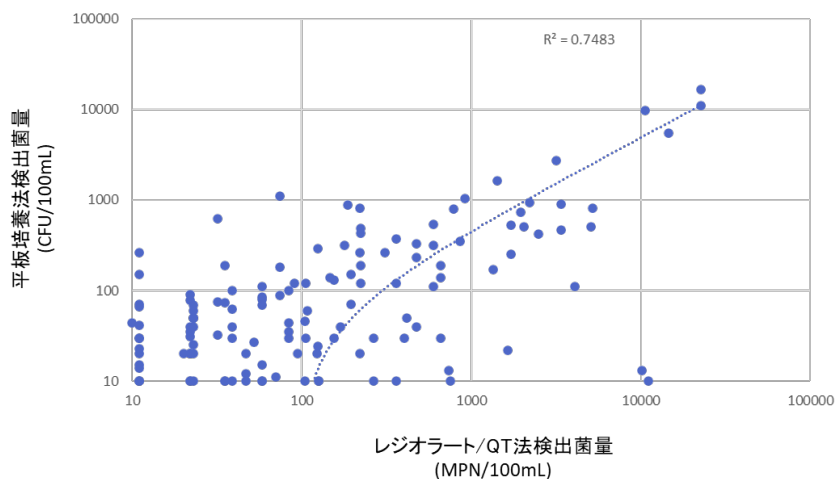


図2 平板培養法とレジオラート/QT法の検出菌量の比較(n=136)

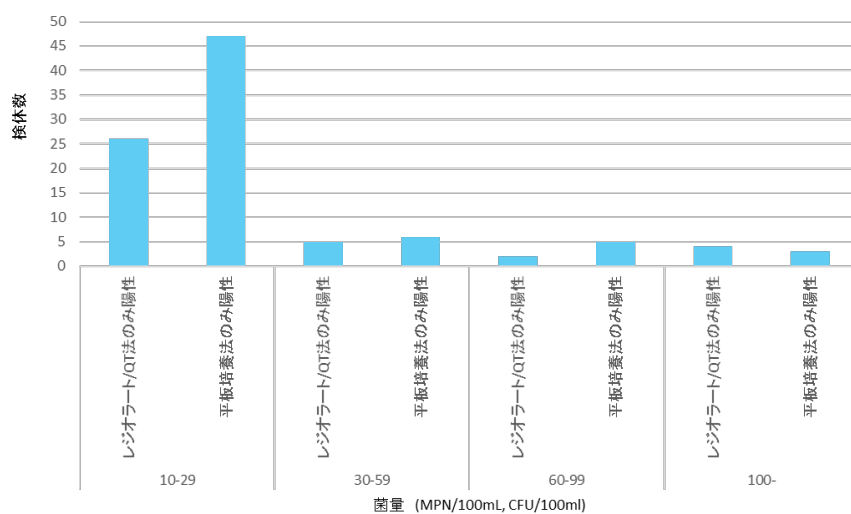


図3 不一致であった検体の検出菌量

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

表 4-1 浴槽水から分離された *A. hydrophila* の結果

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

表 4-2 環境から分離された *A. hydrophila* の結果

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

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」

総合研究報告書

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、比色系パルサー法の改良

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、溝腰 朗人、神田 由子、成松 浩志
大分県衛生環境研究センター
研究協力者 江川 英明 大分県南部保健所
研究協力者 緒方 喜久代 公益社団法人大分県薬剤師会検査センター
(所属は研究協力当時)

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。比色系パルサー法は、特殊な機器を必要としないため保健所等監視指導機関等での活用が期待できる。溶菌液調製に用いるセルロース製フィルターの孔径を 0.45 μm に大きくすることでろ過の時間が短縮され、なおかつ孔径 0.22 μm と同等の結果が得られた。

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。時間を要する培養法等に加えて、

迅速検査法として比色系パルサー法について検討を行った。比色系パルサー法は、レジオネラ属菌特異的 16S rRNA に自己集合体を結合させることで、標的遺伝子を増幅させずに目視で検知する検査法である。測定に特殊な機器を必要としないことから、試験検査機関のみならず監視指導機関等での活用が期待される。平成 30 年度に、保健所においてパルサー法によるレジオネラ属菌検査を実施したところ、平板培養法ではレジオネラ属菌が検出されたが、パルサー法では陰性の結果となった³⁾。そこで濃縮工程を見直し、フィルター孔径を大きくすることで検体濃縮時間の短縮を図った。

B. 研究方法

1. 試料および調製法

令和元年5月から令和3年11月に搬入された浴槽水および湯口水75施設分144検体を対象とした。

濃縮と前処理の方法は標準法に準じて実施した。すなわち、検体1200mLをメンブランフィルター（直径47mm、孔径0.2 μ m、ADVANTEC社、POLYCARBONATE）で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水12mL入りの滅菌コニカルビーカー（100mL容量）に移し、ボルテックスミキサーにて1分間洗い出しをした。ろ過濃縮後の濃縮試料（100倍濃縮）について、50℃で20分加熱後急冷したもの（以下、熱処理試料）、濃縮試料に等量の0.2M HCl・KCl液 pH2.2 $\pm$ 0.2（武藤化学又は関東化学）を加え混和し室温で5分間静置したもの（以下、酸処理試料）、熱や酸による前処理を行わないもの（以下、未処理試料）を調製した。

2. 平板培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYO α 寒天培地（栄研化学）、GVPC 寒天培地（日研生物）および MWY 寒天培地（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℃で培養した。検出限界は大分法では5cfu/100mL、標準法では10cfu/100mL（非濃縮検体では500cfu/100mL）である（表1）。

標準法に採用され、大分法においても従前より実施していた斜光法⁴⁾にて、培養3

日後に各分離培地を観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYE α 寒天培地（自家製；Oxoid）および血液寒天培地（ウマ血、自家製）に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認した。BCYE α 寒天で発育し、血液寒天では発育しなかったコロニーについて、PCR法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は36℃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144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、*Lp* 菌数を最確数法で定量する方法である。測定に使用した検体量は10mLで、滅菌蒸留水90mLを加えて100mLとし、39℃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（令和元年に採水された検体を除く）。

4. レジオラート定性試験法

4-1. 保存菌株による検討

浴槽水から分離された *Lp* 菌株2種類（血清群1と血清群2）を用いてそれぞれ希釈系列を調製し、QT法及び下記のフラスコを用いた定性試験法を実施し、比較した。具体的には、*Lp* 菌株を BCYE α 寒天培地で2日間培養し、発育した菌を PBS(-)に懸濁、10倍階段希釈し、各希釈段階の菌液0.1mLを、予めレジオラートを溶解させた100mLの滅菌蒸留水に混和した後、上記3.及び下記4-2.の方法で培養した（培養温度は36℃）。平行して、各希釈段階の菌液0.1mLを BCYE α 寒天培地に塗布し、36℃で7日間培養して菌数を測定した。

4-2. 実検体による検討

令和2年に採水された41検体のうち上記3.で10MPN/100mL以上検出された12検体について、それぞれ10mLを、予めレジオラートを溶解させた90mLの滅菌蒸留水に加え、ベントフィルター付きのフラスコ（CELLSTAR フラスコ SC、白 FT キャップ 650mL 滅菌：Greiner Bio-One）に入れて39℃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。

4-3. 実検体による熱処理後36℃培養の検討
非濃縮の58検体（令和3年採水分）について、50℃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℃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。

5. 比色系パルサー法

非濃縮検体17検体（令和元年8月採水分）について、レジオネラ属菌迅速検査キット（ファスマック）を用いた。検体をろ過したフィルターに直接変性液を加える溶菌法（下記記載の方法①または方法②）で、1検体につき孔径の異なる2種類のフィルター（0.22μm、0.45μm）でそれぞれろ過後に溶菌液を調製し、添付の取扱説明書に従って測定した。即日測定できなかった溶菌液については、測定するまで1～4日間、-30℃で冷凍保存した。

上記1に示した検体とは別に採水した浴槽水および湯口水4検体について、保健所で環境衛生監視員が測定した。保健所では孔径0.45μmのフィルターを用いた方法①で溶菌液を調製後すぐに-30℃で冷凍保存し、測定は5日後に実施した。平板培養法によるレジオネラ属菌数の測定は、当所で大分法にて実施した。

方法①：検水100mLを注射筒に入れて直径13mmのメンブランフィルター（孔径0.22μmまたは0.45μm、Merck社、セルロース混合エステル）に押出または吸引してろ過し、ろ過後のフィルターを2mLチューブに移し、100/30倍に希釈した変性液100μLを加えてボルテックスミキサーで1分間混合後、フィルターを下にした状態で37℃15分間静置し、その後10μLの中和液を加えて溶菌液を調製した。測定にはこの溶菌液の全量110μLを用いた。

方法②：検水200mLを注射筒に入れて直径25mmのメンブランフィルター（孔径0.22μmまたは0.45μm、Merck社、セルロース混合エステル）に押出または吸引してろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌したピンセットで折り畳んで2mLチューブに移し、100/30倍に希釈した変性液をろ紙が漬かる量の200μL加えてボルテックスミキサーで1分間混合後、フィルターを下にした状態で37℃15分間静置し、その後20μLの中和液を加えて溶菌液を調製した。測定には、検水100mL分に相当する半量110μLの溶菌液を用いた。

C. 研究結果

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

144検体中、大分法では62検体、標準法では56検体からレジオネラ属菌が検出された（表2）。標準法のうち1検体については、濃縮試料を塗抹した培地は夾雑菌が多く発育したためにレジオネラ属菌検出不能であったが、非濃縮検体からはレジオネラ属菌が検出された。この1検体を含む3検体は非濃縮検体のみからレジオネラ属菌が検出され、標準法の濃縮試料からは検出されなかった。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 5~44500、10~31500 (濃縮試料のみでは 10~16640) であった。大分法でのみ検出された 8 検体の菌数は 5 が 6 検体、20 と 50 が各 1 検体で、*Lp* が検出された。標準法でのみ検出された検体は 2 検体で、その菌数はともに 10 であった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.8541$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8579$ であった (図 1)。

2. レジオラート/QT 法

144 検体中 44 検体から *Lp* が検出され、そのうち 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 22 検体 (菌数が 10 以上検出された検体に限ると 11 検体)、標準法で 17 検体、平板培養法 (-) QT 法 (+) の結果となった検体は、大分法では 4 検体 (MPN/100mL は 11,23,58,>22726)、標準法では 5 検体 (4 検体は大分法と同一検体、もう 1 検体の MPN/100mL は 10) 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 81.9%、標準法で 84.7%、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 $R^2=0.7577$ 、標準法で $R^2=0.7425$ (濃縮試料のみ (検出不能 1 検体除く) で $R^2=0.7626$) であった (図 2)。QT 法陽性 44 検体のうち 27 検体の陽性ウエルから採取した培養液からレジオネラ属菌の分離同定を行ったところ、21 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、1342MPN/100mL の 2 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なかった。

3. レジオラート定性試験法

3-1. 保存菌株による検討

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

3-2. 実検体による検討

結果を表 5 に示す。12 検体中 6 検体が定性法陽性と判定された。平板培養法及び QT 法でレジオネラ属菌数の多い検体が陽性となる傾向が見られたが、上記 2. で QT 法培養液からレジオネラ属菌が検出されなかった 1 検体 (検体 No.10 : 1342MPN/100mL) については、菌数が多いにもかかわらず定性法は陰性であった。

3-3. 実検体による熱処理後 36℃培養の検討

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、令和 3 年採水 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 6a、6b 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。

4. 比色系パルサー法

17 検体の結果を表 7a、7b、7c に示す。ろ過フィルター孔径を 0.45 μ m にしても 0.22 μ m と同等以上の結果となった。平板培養法 (+) パルサー法 (-) の不一致の結果となったのは 2 検体で、*Lp* が分離され、菌

数は 5 と 50 であった。なお、この 2 検体は標準法ではレジオネラ属菌が検出されなかった。

保健所で実施した 4 検体のうち、平板培養法 (+) パルサー法 (+) となった 1 検体の菌数は 45、平板培養法 (+) でパルサー法 (-) となった 1 検体の菌数は 25 で、ともに *Lp* が検出された (表 8)。なお、これら 2 検体は、過去の検討で共に菌数 85 のレジオネラ属菌が検出されたがパルサー法 (-) であった 2 検体³⁾と同一施設の検体であった。

D. 考察

平板培養法について、使用する培地枚数は 1 種類につき標準法で 3 枚、大分法で 6 枚である。単純に培地枚数の多い方が検出確率は上がるが、枚数の少ない標準法で大分法と同等の結果が得られた。大分法または標準法の一法のみでレジオネラ属菌が検出された検体もあったが、5cfu/100mL の検体を含むいずれも菌数の少ない検体であったため、ばらつきが生じたと考えられる。指針¹⁾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。ただし、標準法において濃縮試料では検出できない検体があったことから、濃縮試料のみでなく非濃縮検体についても併せて検査を実施することが重要と考える。また、今回非濃縮検体の塗抹量を 100 μ L でなく 200 μ L としたが、夾雑菌の増加による平板観察の困難さは感じなかった。さらに、非濃縮検体のみ (+) となった 3 検体から分離されたレジオネラ属菌は、いずれも平板上に 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 144 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、強い相関が見られた。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える。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もので、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、ヒトから検出されるレジオネラ属菌のほとんどを占め公衆衛生上重要な菌種である *Lp*⁵⁾ の検査が簡便に行える QT 法は、日常の衛生管理には非常に有用な検査法と考える。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。予試験において、空気の量が少ないと検出できないことが示唆された (データ非掲載) ため、培養容器としてベントフィルターが付いた大きめのフラスコ (容量 650mL) を用いたところ、保存菌株による検討ではフラスコ内に入った *Lp* 菌数が数個であっても検出可能という結果が得られた一方、実検体を用いた場合には一桁多い菌数が必要であった。保存菌株を用いた場合、実検体と同じ 39 $^{\circ}$ C 培養では QT 法で発育抑制が見られたため 36 $^{\circ}$ C 培養としたが、その温度差が検出可能菌量の差となった可能性が考えられた。また、大きめのフラスコは孵卵器内で幅をとり、扱いづらかった。そこで、検体量は減らさずにレジオラートを含む全体の液量を半分にし、ベントフィルター付きフラスコ容量を小さく (容量 250mL) した上で、実検体においても 36 $^{\circ}$ C 培養としたが、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 $^{\circ}$ C 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。培養温度を下げても、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。一方で 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。

比色系パルサー法については、過去に保健所で実施した結果³⁾から、改善のために濃縮工程の時間短縮を図った。フィルターの孔径を 0.45 μ m に大きくしたところ、ろ過の時間が 1 検体当たり約 20 分から約 5 分に短縮され、なおかつ孔径 0.22 μ m フィルターと同等の結果が得られた。第 4 版レジオネラ症防止指針 (公益財団法人日本建築衛生管理教育センター発行) によるとレジオネラ属菌の菌体サイズは 0.3～0.9 $\times$ 2～20 μ m である。培養法のろ過濃縮工程においては、洗い出し操作で菌がフィルターから剥がれやすいように均一な表示径の円筒状孔を持つポリカーボネート製メンブランフィルターを用いるので、レジオネラ属菌が 0.45 μ m の孔を通過してしまう可能性がある。しかし、パルサー法に用いたセルロース製フィルターは網目構造のため、膜の内部に菌が入り込んで残りやすく、フィルターごと溶菌処理することでロスが少なかったと考えられる。保健所で実施したパルサー法について、過去に孔径 0.22 μ m のフィルターを用いて (－) であった施設の検体が、今回孔径 0.45 μ m のフィルターを用いて (+) となった。今回はレジオネラ菌数が少ないにも関わらず (+) となったことからパルサー法に使用するフィルターの孔径は 0.45 μ m がよいと言える。

E. 結論

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

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

一方、機器の揃った検査機関以外でもレジオネラ属菌の検査が可能になることは公衆浴場等の衛生管理の一助となる。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。また、迅速検査法として、検体をろ過した孔径 0.45 μ m のセルロース製フィルターに直接変性液を加える溶菌法を用いたパルサー法が活用できる可能性がある。

参考文献・通知

- 1) 「公衆浴場における水質基準等に関する指針」(平成 12 年 12 月 15 日生衛第 1811 号厚生省生活衛生局長通知 令和元年 9 月 19 日一部改正)
- 2) 「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」(令和元年 9 月 19 日付け薬生衛発 0919 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)
- 3) 佐々木麻里 他: 斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査および実検体を用いた LAMP 法と比色系パルサー法の検討. 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆衛生等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 30 年度総括・分担研究報告書: 23-30
- 4) 森本 洋: 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 日本環境感染学会誌, 2010. 25 (1): 8-14
- 5) Junko Amemura-Maekawa et al.: *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan

between 2008 and 2016. Appl Environ
Microbiol 84:e00721-18 (2018)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

F. 研究発表
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	5cfu/100mL
標準法	濃縮試料	熱処理	1 倍	100μL	10cfu/100mL
		酸処理	1 倍	200μL	10cfu/100mL
	非濃縮検体		1 倍	200μL*	500cfu/100mL

表 2. 標準法と大分法の比較 (n=144)

*通知に記載されている塗抹量は「100μL」

標準法		計	
≥ 10cfu/100mL			
+			
大分法	+	54	8
	−	4	78
計		58	86

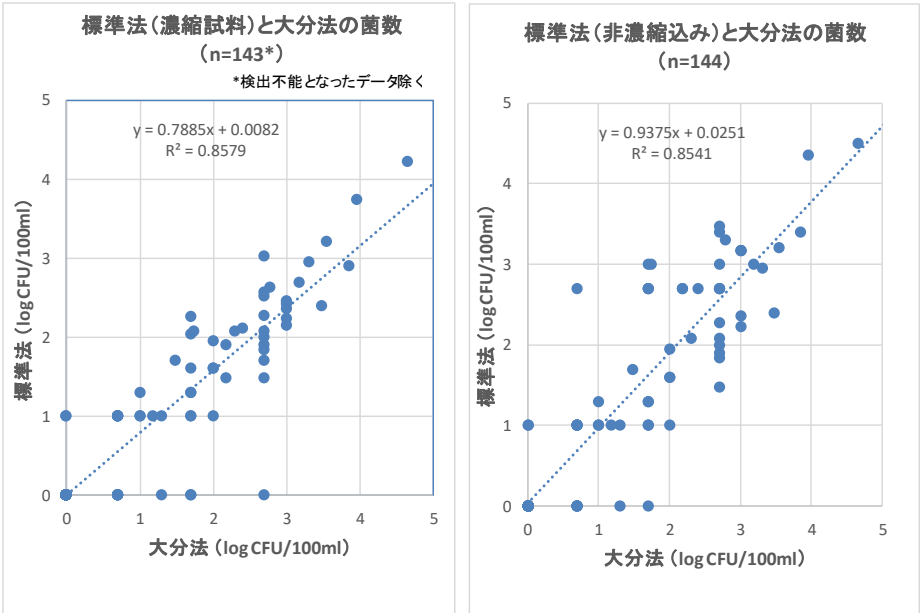


図1. 標準法と大分法の相関

表 3a. レジオラート/QT 法と大分法の比較 (n=144) 表 3b. レジオラート/QT と標準法の比較 (n=144)

		レジオラート		計
		≧10cfu/100mL		
		+	－	
大分法	+	40	22	62
≧5cfu/100mL	－	4	78	82
計		44	100	144

		レジオラート		計
		≥10cfu/100mL		
		+	－	
標準法	+	39	17	56
≥10cfu/100mL	－	5	83	88
計		44	100	144

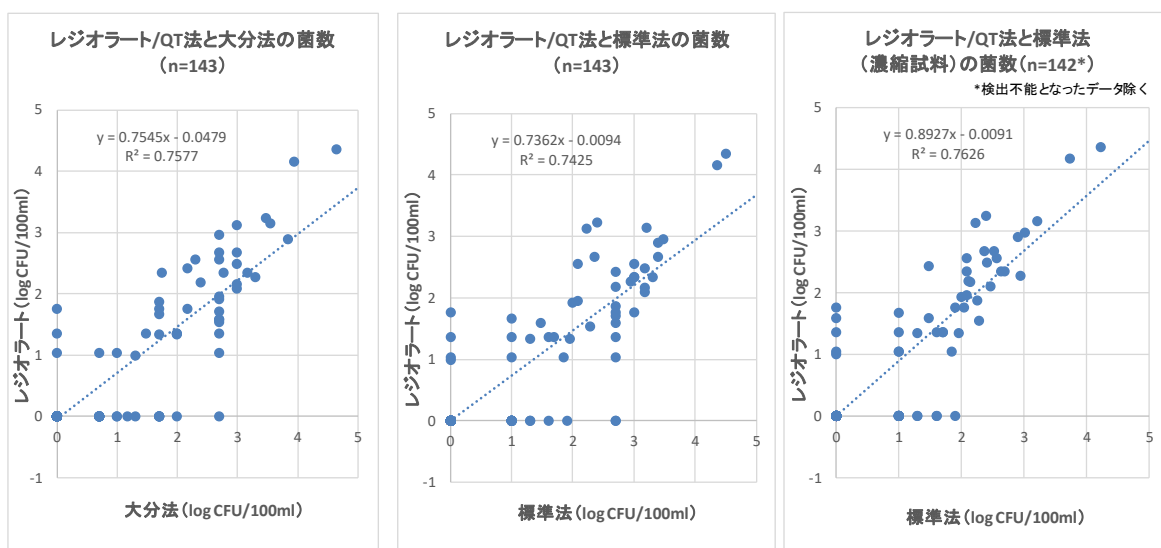


図2. レジオラート/QT法と平板培養法の相関(測定上限を超えた1検体除く)

表 4. 保存菌株を用いたレジオラート定性試験法の結果

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

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

表 5. 実検体を用いたレジオラート定性試験法の結果

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

注)＋：陽性 ー：陰性 *Lp* : *L.pneumophila*

表 6a. 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
		≧10cfu/100mL		
		+	－	
大分法	+	12	6	18
≧5cfu/100mL	－	1	39	40
計		13	45	58

表 6b. 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

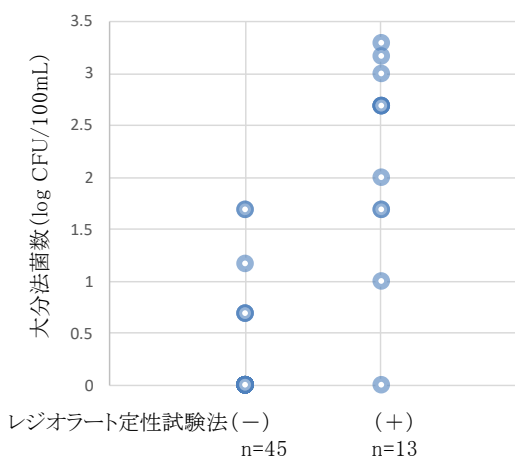


図3a. レジオラート定性試験法 (加熱) と大分法菌数

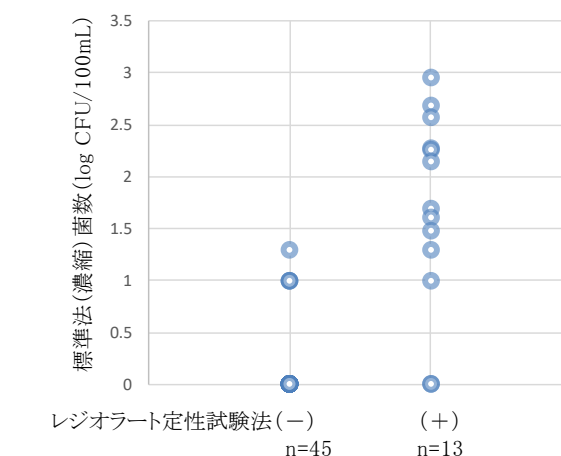


図3b. レジオラート定性試験法 (加熱) と標準法 (濃縮試料) 菌数

表 7a. パルサー法（孔径 0.22 μ m）と
平板培養法の比較（n=17）

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

*平板培養法は大分法

表 7b. パルサー法（孔径 0.45 μ m）と
平板培養法の比較（n=17）

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

*平板培養法は大分法

表 7c. パルサー法フィルター孔径の比較（n=17）

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

表 8. 保健所実施パルサー法結果

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

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	森本 洋	北海道立衛生研究所
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
佐々木 麻里	大分県衛生環境研究センター		

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 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
塩崎 晋啓	日本板硝子株式会社	水谷 幸仁	日本板硝子株式会社
村尾 拓哉	日本板硝子株式会社	森中 りえか	株式会社ファスマック

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。

LCEMA-qPCR 法、PALSAR 法、モバイル qPCR 法（Picogene PCR1100 使用）では、これまでのプロトコルを改良した結果、より平板培養法と相関する方法となった。

平板培養法に加えて免疫磁気ビーズ（Lp-IMB）法を併用することによって、特定の血清群の菌検出率が向上したため、感染源調査などの際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%、*lag-1* 遺伝子陽性率は 0.3～4.4%、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 7.7～50.0%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。現在、死菌由来 DNA の PCR 増幅を阻害する Ethidium monoazide (EMA) と液体培地による前培養を組み合わせた「生菌迅速検査法 (LC EMA-qPCR 法)」が開発され³⁾、試薬が市販されているが、本研究ではカラムを使用した簡易抽出法による LC EMA-qPCR 法について検討した。また、レジオネラ属菌特異的 16S rRNA を標的とし、プレート上の DNA プローブに結合させて検出する PALSAR 法については、シャワー・カラン水を対象とした検査において感度を上げるため、プロトコルを改良し、検討した。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、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プロトコルを構築し、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⁴⁾、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、レジオネラ・ニューモフィラで感作した免疫磁気ビーズ (Lp-IMB) を用いた選択的濃縮法について検討し、その有用性を評価した。また、レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1 (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^{5,6)}、複数の検査機関において浴槽水由来株の *lag-1* 遺伝子保有率を調査した。

近年、公衆浴場のシャワー水を原因としたレジオネラ症感染事例が報告されている⁷⁾。そこで、浴槽水だけでなくシャワー・カラン水も対象とし、培養検査のみならず、16S アンプリコン解析による結果も踏まえて公衆浴場の水系の総合的な汚染実態を明らかにし、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、主に浴槽水、シャワー水、カラン水、採暖槽水であったが、一部プール水なども用いた。遺伝子検査には機関A・B・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 LC EMA-qPCR 法

LC EMA-qPCR 法は、使用する各種試薬の取扱説明書に従い実施した。1 検体につき、3 種類の方法で DNA を抽出した。Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ)、NucleoSpin Tissue (タカラバイオ)、Lysis Buffer for *Legionella* Type2 (カラム抽出、タカラバイオ) を用いてそれぞれ DNA を抽出後、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を用いて qPCR 反応を実施した。反応後、添付の取扱説明書に記載された方法で、16S rRNA 遺伝子のコピー数を CFU 相当値に換算し、定量値 1 CFU 相当/100 ml 以上を陽性と判定した。また、平板培養法の菌数との散布図を作成した。ただし、平板培養法における 10 CFU/100 ml 未満、qPCR における CFU 相当値 1 未満はそれぞれ log 値 0 にプロットした。

5 PALSAR 法

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

6 モバイル qPCR 法

1) qPCR 反応系の確認

1 検体につき、2 種類の方法で DNA を抽出した。検水の 100 倍濃縮液 1 ml および 2 ml について、それぞれ Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) および Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) に付属のアルカリ熱抽出試薬を用いて、取扱説明書に従い DNA を抽出した。同時に、検水の 100 倍濃縮液 1 ml を 15,000 rpm で 5 分間遠心

後、上清を除去し、滅菌水 50 µl に懸濁したものも鋳型とした。レジオネラ属菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子配列を標的として、プライマー、プローブおよび内部コントロール用プラスミドを作製し、Taq と共に qPCR 反応を実施した。qPCR 反応には、モバイル qPCR 装置 Picogene PCR1100 (日本板硝子) を用いた。

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

また、TP900 を用いた qPCR 法および Picogene PCR1100 を用いたモバイル qPCR 法における 16S rRNA 遺伝子のコピー数から散布図を作成した。ただし、コピー数 1 未満は log 値 0 にプロットした。

2) 実検体での検討

検水 500 ml をフィルターろ過後 (ポリカーボネート、0.2 µm、47 mm)、核酸抽出試薬 500 µl 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 µl を鋳型として、マスターミックス 17 µl と混ぜ、qPCR 反応を実施した。

7 Lp-IMB 法

1) Lp-IMB 作製方法

対象を Lp1、2、3 の 3 血清群とし、IMB は自家調製 IMB と D 社調製 IMB の 2 種類を用いた。自家調製 IMB は、市販されているビーズ粒子 (Dynabeads™ M-280 Sheep anti-Rabbit IgG) をレジオネラ免疫血清で感作した。方法は国立感染症研究所の病原体検出マニュアルの中の「腸管出血性大腸菌検査検出診断マニュアル」に準拠した⁸⁾。D 社調製 IMB は、目的以外の血清群に対する交差反応を吸収後、硫酸分画にて粗精製し、至適感作濃度 (ビーズに結合しやすい抗体の濃度) とした抗体を磁気ビーズに感作し、免疫磁気ビーズとした。

2) Lp-IMB による回収率の比較

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

3) 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⁹⁾。

4) 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℃で 7 日間培養した。

8 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⁵⁾に従って PCR により lag-1 遺伝子を検出した。

9 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 平板培養法による結果

318 検体中、78 検体（24.5%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された（表 1）。菌数別に見ると、10～99 CFU/100 ml が 52 検体（16.4%）、100～999 CFU/100 ml が 19 検体（6.0%）、1,000 CFU/100 ml 以上が 7 検体（2.2%）であった。分離菌の血清群別の結果、Lp6 が 38 検体から分離され、最も多かった（表 2）。次に多かったのは、Lp1（28 検体）であった。また、Lp 以外の菌種が 12 検体から分離された。

2 LC EMA-qPCR 法による結果

各抽出法における、平板培養法に対する相関は表 3 に示した。Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を用いた場合、平板培養法に対する感度（91.2%）・特異度（78.3%）・陽性的中率（55.4%）・陰性的中率（96.8%）・一致率（81.2%）全てにおいて、他の 2 つの方法と比較し最も高かった。とりわけ、感度および陰性的中率は、NucleoSpin Tissue を用いた場合よりも有意に高かった（ $P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるカイ二乗検定）。Lysis Buffer for *Legionella* と Lysis Buffer for *Legionella* Type2 を用いた場合では、感度などに有意な差はなかった。

各抽出法を用いた LC EMA-qPCR 法の定量値

(CFU 相当値) と平板培養法の菌数との相関は、それぞれ $r = 0.4172$ (Lysis Buffer for *Legionella*)、 $r = 0.522$ (Lysis Buffer for *Legionella* Type2)、 $r = 0.1931$ (NucleoSpin Tissue) であった (図 1)。

3 PALSAR 法による結果

35 検体のシャワー・カラン水について検討した結果、平板培養法に対する感度は 100%、特異度は 60.7%、陽性的中率は 38.9%、陰性的中率は 100%、一致率は 68.6% であった (表 4)。

4 モバイル qPCR 法における qPCR 反応系の確認

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

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

5 実検体を用いたモバイル qPCR 法の結果

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 (表 6A)。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 6B~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。

6 Lp-IMB の回収率の比較

Lp1 の回収率の結果を表 7 に示した。自家調製 IMB による Lp1 の回収率は 0.0~1.5%、平均 0.33% であった。これに対し、D 社調製 IMB を用いた場合の回収率は 50.6~113.3%、平均 80.6% と、自家調製 IMB に比べ高かった。ただし、D 社調製 IMB による添加回収実験では、 10^3 CFU/mL 以上を添加した場合、回収された菌が多く、計測不能として平均値には加えなかった。

Lp2、3 の 2 血清群を対象とした添加回収の結果を表 8 に示した。Lp1 と同様に発育菌が多く、菌数測定ができなかった場合、その回収率は解析から外した。自家調製 IMB による回収率は 0.0~0.4%、平均 0.1% であった。これに対し、D 社調製 IMB による回収率は 8.3~100.0%、平均 48.2% と、Lp1 の場合と同様、D 社調製 IMB で高かった。

7 実検体を用いた Lp1-qPCR 法および 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 9A)。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 9B)。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。

8 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 10)。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。

9 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 菌種を見ると、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 11)。3 菌種 (*Methylobacterium-Methylobacterium*、*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) において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 3)。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。

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 4)。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

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

PALSAR 法におけるこれまでの検討では、シャワー・カラン水を対象とした場合、浴槽水などを対象とした場合と比較し、感度が低かった¹⁰⁾。しかしながら、MWY 液体培地で一晩増菌する方法では、平板培養法に対する感度は 100%であったため、これらの検体では増菌培養を実施することが

望ましい。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、Lysis Buffer for *Legionella* またはアルカリ抽出液で抽出した DNA を用いた場合、平板培養法との相関は既存の機器を使用した LAMP 法 (LA-320C) および qPCR 法 (TP900) と同等の結果であった。qPCR 法との定量値の比較においても、概ね関連していた。ただし、1 検体については、アルカリ熱抽出した DNA を用いたモバイル qPCR 法でのみ反応阻害が確認され、陰性となった。遺伝子検査法においては、反応阻害などにより偽陰性となることを防ぐため、内部コントロールにより反応阻害を確認することは重要である。DNA を抽出せず、濃縮液をそのまま qPCR 反応に使用した検討では、平板培養法に対する感度 (33.3%) は、Lysis Buffer for *Legionella* またはアルカリ抽出液で抽出した DNA を用いた場合よりも、有意に低かった。採水現場で測定することを想定した場合、検査機器、工程はできる限り簡略化することが求められるため、濃縮液を直接鋳型とすることを検討したが、感度は低かった。

そこで、新たな核酸抽出試薬を検討した結果、実検体を用いた検討において 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、平板培養法と関連する方法であった。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¹¹⁾。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¹²⁾、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

LC EMA-qPCR 法、PALSAR 法、モバイル qPCR 法 (Picogene PCR1100 使用) では、これまでのプロトコルを改良した結果、より平板培養法と関連する方法となった。平板培養法に加えて免疫磁気ビーズ (Lp-IMB) 法を併用することによって、特定の血清群の菌検出率が向上したため、感染源調査などの際は有用な方法であると考えられた。レジオネラ属菌の陽性率、Lp1 陽性率、*lag-1* 遺伝子陽性率、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、地域によって差が認められた。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-sokuho-data-j-2152.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) 烏谷 竜哉 他、液体培養 (Liquid Culture) EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討、公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究、厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業 平成 24 年度分担研究報告書, 71-84.
- 4) Amemura-Maekawa J et al. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84(18), pii: e00721-18.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 腸管出血性大腸菌感染症 2019 年 9 月版. 病原体検出マニュアル.
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC20190920.pdf>
- 9) 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.
- 10) 磯部順子 他. レジオネラ属菌迅速検査法の評価. 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28～30 年度総合研究報告書, 19-33, 2019.
- 11) 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.
- 12) 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) 金谷潤一 他. 環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価. 日本防菌防黴学会誌. 2020, 48, 515-522.
- 2) 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. 平板培養法の結果

菌数(CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	240	(75.5)
10-99	52	(16.4)
100-999	19	(6.0)
1,000以上	7	(2.2)
計	318	(100)

表 2. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 1	28
SG 2	1
SG 3	10
SG 4	5
SG 5	15
SG 6	38
SG 8	7
SG 9	5
SG 12	1
SG 13	1
SG 14	1
UT	9
<i>Legionella</i> spp.	12

表 3. LC EMA-qPCR 法における平板培養法との相関 (149 検体、平板培養陽性 34 検体)

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

* $P < 0.05$ 、ボンフェローニ補正によるカイ二乗検定

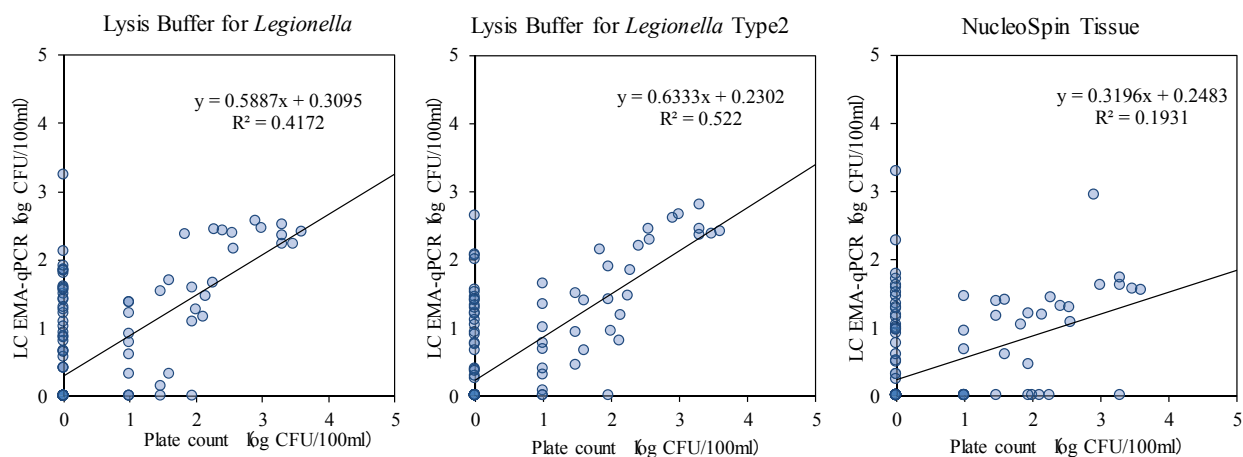


図 1 LC EMA-qPCR 法と平板培養法との定量値の相関

表 4. シャワー・カラン水における PALSAR 法の結果

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

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

表 5. 迅速検査法と平板培養法との相関（24 検体、平板培養陽性 15 検体）

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

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

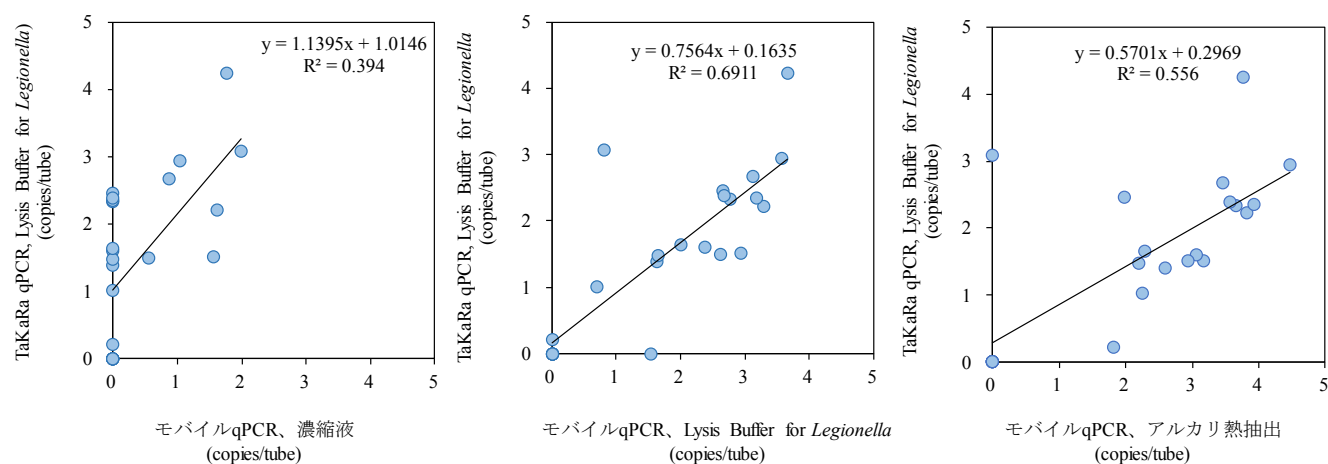


図 2 qPCR 法とモバイル qPCR 法との定量値の相関

表 6. 実検体を用いたモバイル qPCR 法の結果

A)

		培養		計
		+	-	
LAMP	+	3	16	19
	-	1	60	61
		4	76	80

B)

		培養		計
		+	-	
モバイルqPCR	+	3	33	36
Ct 値 ≤ 50	-	1	32	33
		4	65	69

C)

		培養		計
		+	-	
モバイルqPCR	+	3	33	36
Ct 値 ≤ 45	-	1	32	33
		4	65	69

D)

		培養		計
		+	-	
モバイルqPCR	+	3	8	11
Ct 値 ≤ 40	-	1	57	58
		4	65	69

表 7. Lp1-IMB による添加回収の結果

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

表 8. Lp2、Lp3-IMB による添加回収の結果

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

表 9. 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 10. 2016～2020 年に採水された浴槽水のレジオネラ属菌検出結果

機関	検体数（延べ）				
	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 11. 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>	14.5	<i>Phreatobacter</i>	15.1
2	Unknown	7.6	<i>Sphingomonas</i>	9.4
3	<i>Staphylococcus</i>	7.2	DSSF69	8.3
4	<i>Candidatus_Obscuribacter</i>	6.1	<i>Novosphingobium</i>	6.8
5	Uncultured	4.6	<i>Mycobacterium</i>	3.4
6	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	2.5	<i>Obscuribacteraceae</i>	3.4
7	<i>Obscuribacteraceae</i>	2.4	<i>Blastomonas</i>	3.1
8	Unknown	2.3	SM2D12	3
9	<i>Cutibacterium</i>	2.3	<i>Bradyrhizobium</i>	2.9
10	<i>Mycobacterium</i>	2.2	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	2.9
	<i>Legionella</i>	0.8	<i>Legionella</i>	0.1

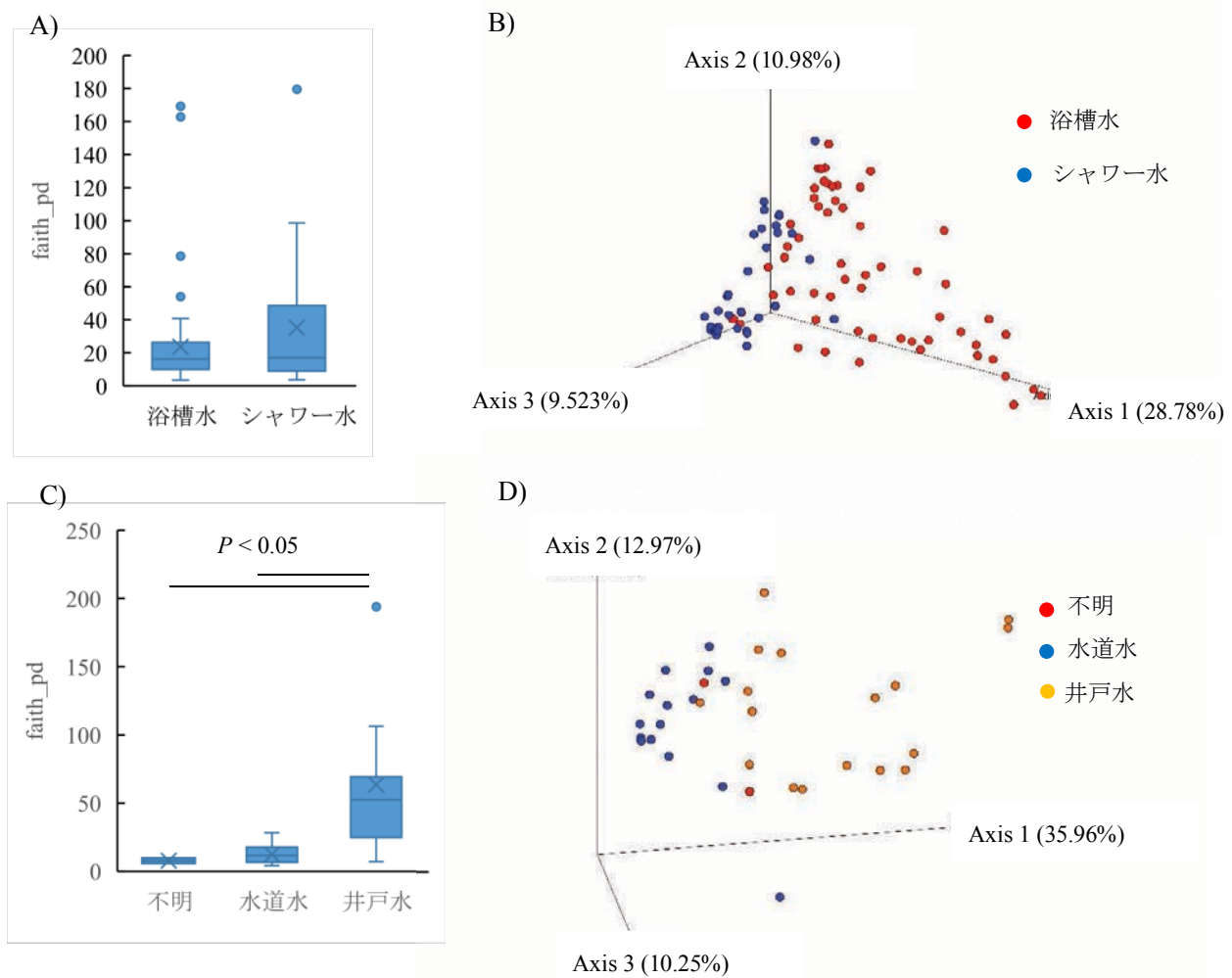


図 3. 16S アンプリコン解析による α および β 多様性

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

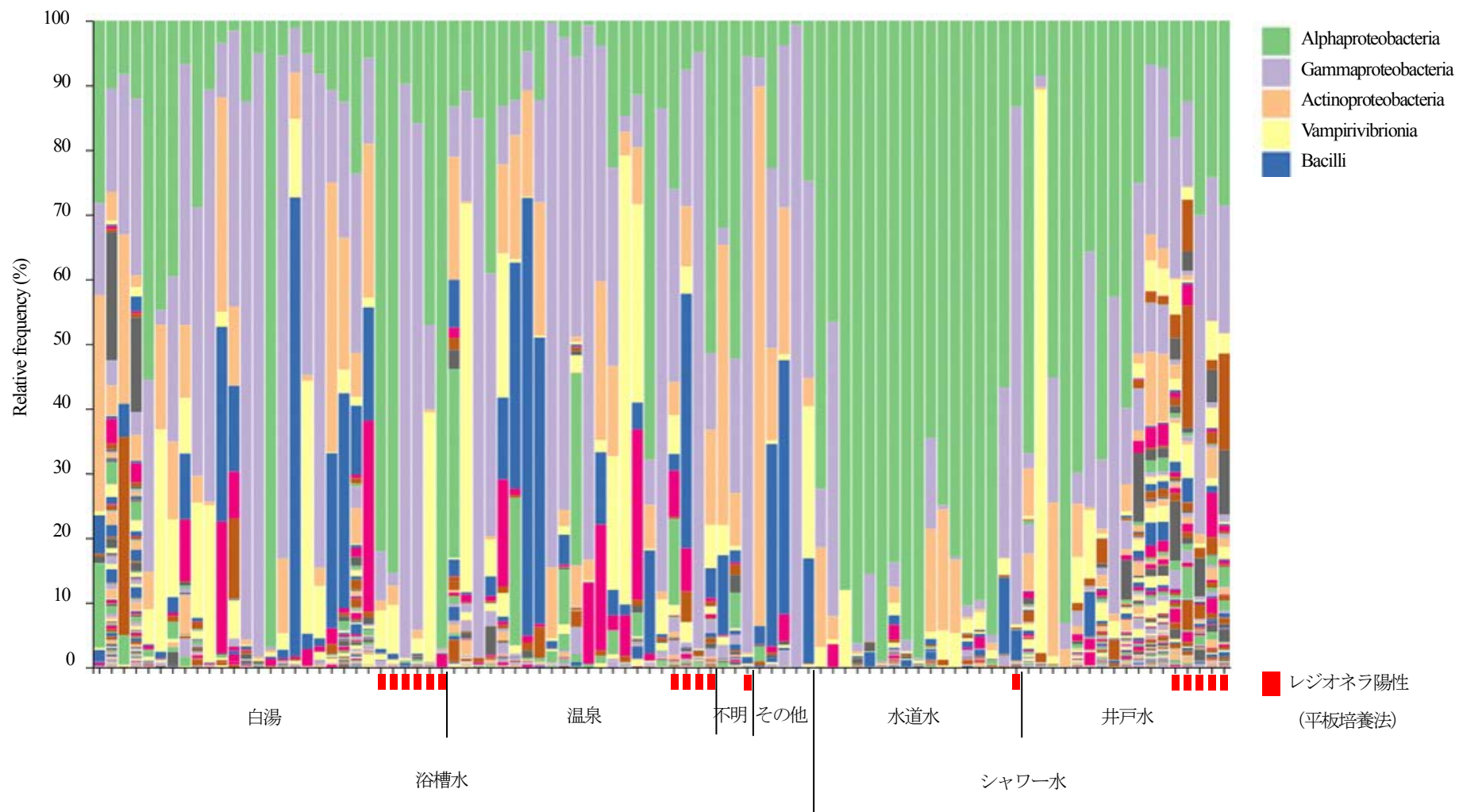


図4. 16S アンプリコン解析による各検水の菌叢 (Class level)

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」
令和元～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	森本 洋	北海道立衛生研究所
	研究分担者	金谷潤一	富山県衛生研究所
	研究分担者	中西典子	神戸市環境保健研究所
	研究分担者	田栗利紹	長崎県環境保健研究センター
	研究協力者	大森恵梨子	仙台市衛生研究所
	研究協力者	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
	研究協力者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	陳内理生	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	磯部順子	富山県衛生研究所
	研究協力者	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

公衆浴場や旅館等の入浴施設の衛生管理に関する指導は「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」を参考にして行われ、入浴施設においては指導に基づいて施設の衛生管理を実施している。これらの管理要領等には日常の衛生管理の具体的な記載が少ないため、具体的で実践的な管理方法を示

してほしいとの要望があった。一方で入浴施設が関連するレジオネラ症の集団感染事例は毎年のように発生している。感染事例の原因の解明には患者調査と環境調査が不可欠であり、調査を進める際に参照できるガイドラインは的確な調査の実施をサポートすることが期待された。そこで、令和元年度に検討のためのワーキンググループを立ち上げて入浴施設における衛生管理ガイドライン及び公衆浴場等入浴施設を原因とするレジオネラ症集団発生時調査ガイドラインの内容を検討して作成した。令和2年度には研究班の分担研究者及び研究協力者から意見を求めるとともに、所属する自治体の環境衛生担当者や感染症担当者に提示して意見を求めた。令和3年度には浴施設における衛生管理ガイドラインを入浴施設における衛生管理の手引きに名称を変更し、衛生研究所を有する全国の自治体の環境衛生担当部門に配付して内容に対する意見を求め、寄せられた意見を参考にして加筆・修正した。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は名称を疫学調査の手引きに変更し、ワーキンググループ内でさらに内容の検討を行った。

A. はじめに

わが国で発生するレジオネラ症が関連する疫学的要因として、入浴が重要視されている。その背景には入浴施設におけるレジオネラ属菌の増殖と定着がある。入浴施設の衛生管理を適切に行うことにより増殖・定着を防ぐことが求められ、「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」が厚生労働省から発出されている。これらの管理要領、マニュアルあるいは指針には衛生管理に関する具体的な記述が少ない。自治体の指導の現場では、入浴施設の設備の概要や洗浄・消毒といった管理手法が具体的で実践的な内容が記載されたガイドラインやマニュアルが求められていた。

レジオネラ症が発生した際には関連施設として入浴施設の疫学・環境調査が高い頻度で行われる。その調査を迅速・的確に行うことで感染症発生の原因を究明し、感染の

拡大を食い止めることが可能となる。しかし、こうした調査にはレジオネラ症に関する知識や情報とともに、調査に適した手法が求められる。

本研究では、これまでの本研究班の成果の蓄積を活かして、入浴施設の衛生管理方法やレジオネラ症発生時の疫学・環境調査の手法を提案するために、手引きを作成することとした。

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2つのワーキンググループを形成した。各ガイドラインの内容はそれぞれのワーキンググループで検討した。令和元年度では、衛生管理ガイドライン案のうち総合衛生管理のパートは、平

成 16～18 年度厚生労働科学研究費補助金健康総合科学研究事業「循環式浴槽における浴水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」の分担研究報告書「HACCP システムの導入を伴う循環式浴槽の管理について」並びに米国 CDC が発行した” Toolkit: developing a water management program to reduce *Legionella* growth and spread in buildings”を参考にした。一般的衛生管理のパートでは、「公衆浴場における衛生等管理要領」及び「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」に基づいて、入浴施設の各設備の衛生管理方法の検討を行い、その内容を記載した。

疫学調査ガイドライン案は、大分県においてレジオネラ症に関する調査に用いられている対応要領等（下記 1, 2）を基に、腸管出血性大腸菌感染症等に対する調査マニュアル（下記 3）の調査手法を取り入れて作成した。入浴施設の調査項目については、下記 4 および 5 の資料を参考にした。

- 1) 「入浴施設に関連するレジオネラ症発生時の対応要領」（平成 29 年 4 月 1 日改正）
- 2) 「レジオネラ症疫学調査票について」（平成 30 年 3 月 12 日付け健康第 4007 号大分県健康づくり支援課長通知）
- 3) 「大分県健康危機管理チームマニュアル（感染症編）」（平成 22 年 3 月発行）
- 4) 「入浴施設におけるレジオネラ症防止のための日常的な維持管理指針」（平成 26 年 3 月第 2 版発行；NPO 法人入浴施設衛生管理推進協議会、大分県監修）

- 5) 「レジオネラ症防止指針 第 4 版」（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター）

令和 2 年度では、衛生管理ガイドライン案と疫学調査ガイドライン案については研究班の分担研究者及び研究協力者に配付するとともに、所属する自治体の環境衛生担当者や感染症担当者に提示し、項目・内容・使い勝手等に対する意見を求めた。ワーキンググループでは寄せられた意見に基づいてガイドライン案の内容を修正し、さらに修正案をワーキンググループに諮り、修正を加えた。

令和 3 年度では、衛生管理ガイドライン案については研究班の分担研究者及び研究協力者並びに全国の衛生研究所を有する自治体の環境衛生担当者に配付し、試験的に使用した感想や意見を募った。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した。疫学調査ガイドライン案については研究班の分担研究者及び研究協力者から意見を募り、それらに基づいて修正した。

C. 結果および考察

令和元年度では、ガイドラインを検討するためのワーキンググループを研究班内に立ち上げ、総合衛生管理と一般的衛生管理の 2 つのパートで構成される衛生管理ガイドライン案並びにガイドライン本文とレジオネラ患者調査票、施設調査票及び施設調査必要物品チェックリストから構成される疫学調査ガイドラインを作成した。レジオネラ症の集団発生であっても第一報は散発例と区別できないことが多いため、疫学調査ガイドライン案は感染症法に基づく届出の受理から開始し、患者の調査方法につい

でも記述することにした。

令和 2 年度では、衛生管理ガイドライン案については総合衛生管理プログラムのパートでは、レジオネラ属菌による汚染を防ぐために衛生管理を計画的に実施し、その効果を評価して向上・改善する体制を確立する試みとして、衛生管理プログラムを提案した。一般衛生管理のパートは、「衛生等管理要領」並びに「対策マニュアル」を基にして、より具体的な管理方法を記述することに注力するとともに、図を多用してわかりやすいガイドラインの作成を行った。疫学調査ガイドライン案については、寄せられた意見を参考にして疫学調査ガイドライン案の本文、患者調査票、施設調査票及び施設調査必要物品チェックリストを修正した。

施設調査票については、調査項目を列挙するのではなく、文章で記載するという方式に改めた。この方式を採用していた富山県の調査票を基にして作成した。また、調査項目の説明を調査票の印刷範囲外に記載し、調査の一助となるよう工夫した。(図 1)

また、レジオネラ症が弧発事例であっても集団発生であっても第一報からの調査方法に違いはなく、弧発事例であっても詳細な施設調査を行う場合もあるため、「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)」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ガイドライン(案)」に変更した。

令和 3 年度では、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及び 17 自治体から 160 余りの意見が寄せられ、これらを参考にして修正した。疫学調査ガイドライン案についても寄せられた意見を参考にして修正を行った。また、衛生管理ガイ

ドラインは「入浴施設の衛生管理の手引き」(衛生管理の手引き)に、疫学調査ガイドラインは「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」に名称を変更した。疫学調査の手引きは当研究班のホームページで公開した。(別添 資料 1、資料 2)

衛生管理の手引きが入浴施設の効果的な衛生管理に活用され、また疫学調査の手引きが入浴施設関連レジオネラ症発生時の疫学・環境調査の実施時に活用されて迅速・的確に原因を究明して適切な措置することでレジオネラ属菌の増殖・定着を防ぐことができ、入浴施設関連レジオネラ症の減少につながることを期待される。

D. まとめ

入浴施設における衛生管理の指導あるいは入浴施設での衛生管理実施に寄与するために、具体的な衛生管理方法を提案するための手引き、並びに入浴施設が関連するレジオネラ症の疫学・環境調査実施の支援をするための手引きを作成することを目的として研究班内にワーキンググループを立ち上げ、3 年間の研究期間内に「入浴施設の衛生管理の手引き」及び「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。

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。

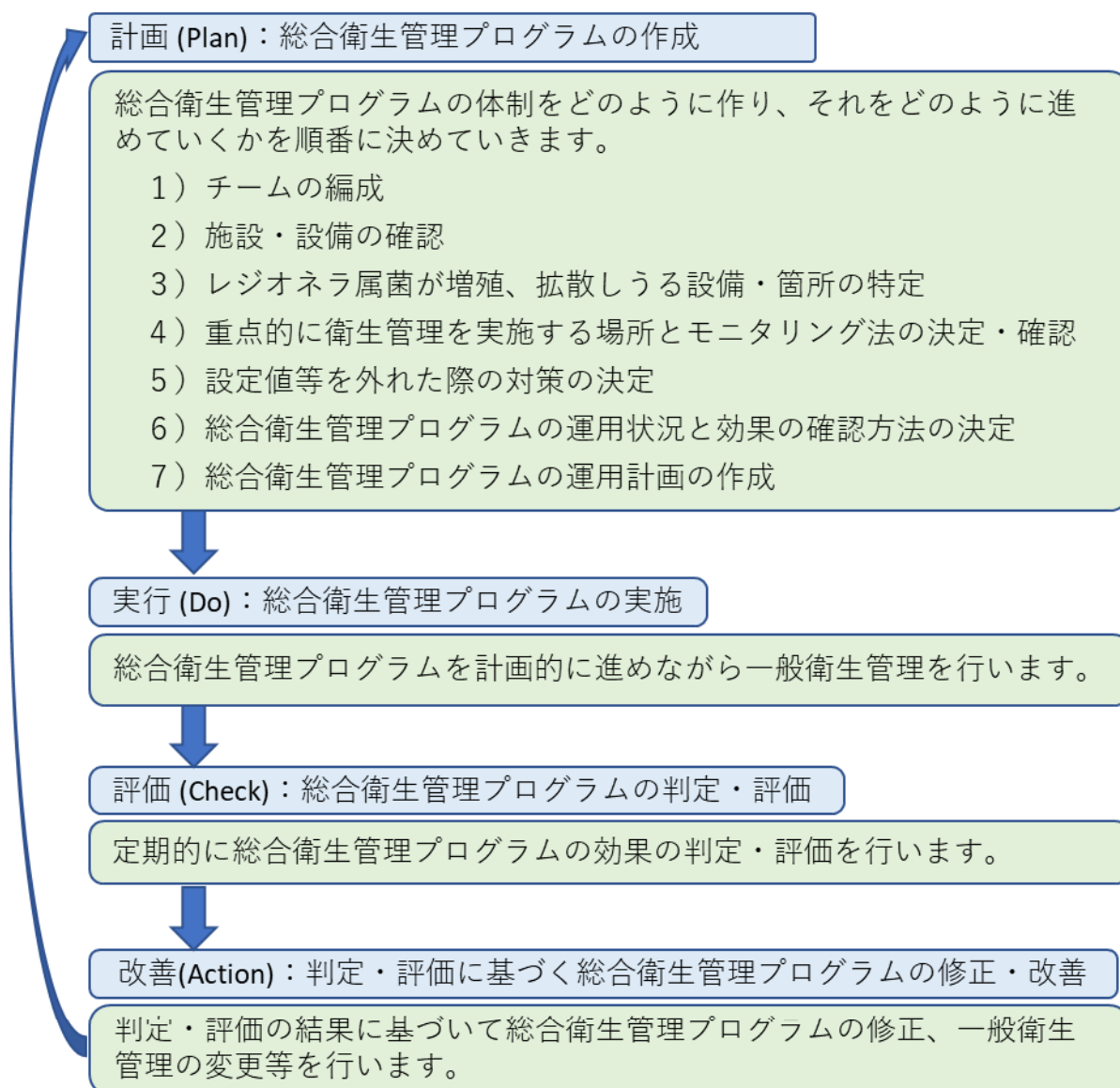
総合衛生管理プログラムは計画(Plan)、実行(Do)、評価(Check)、改善(Action)の4つの段階を回して進めていきます（次頁の図を参照）。ここで紹介する総合衛生管理プログラムは参考資料¹⁾を参考にしています。

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)}

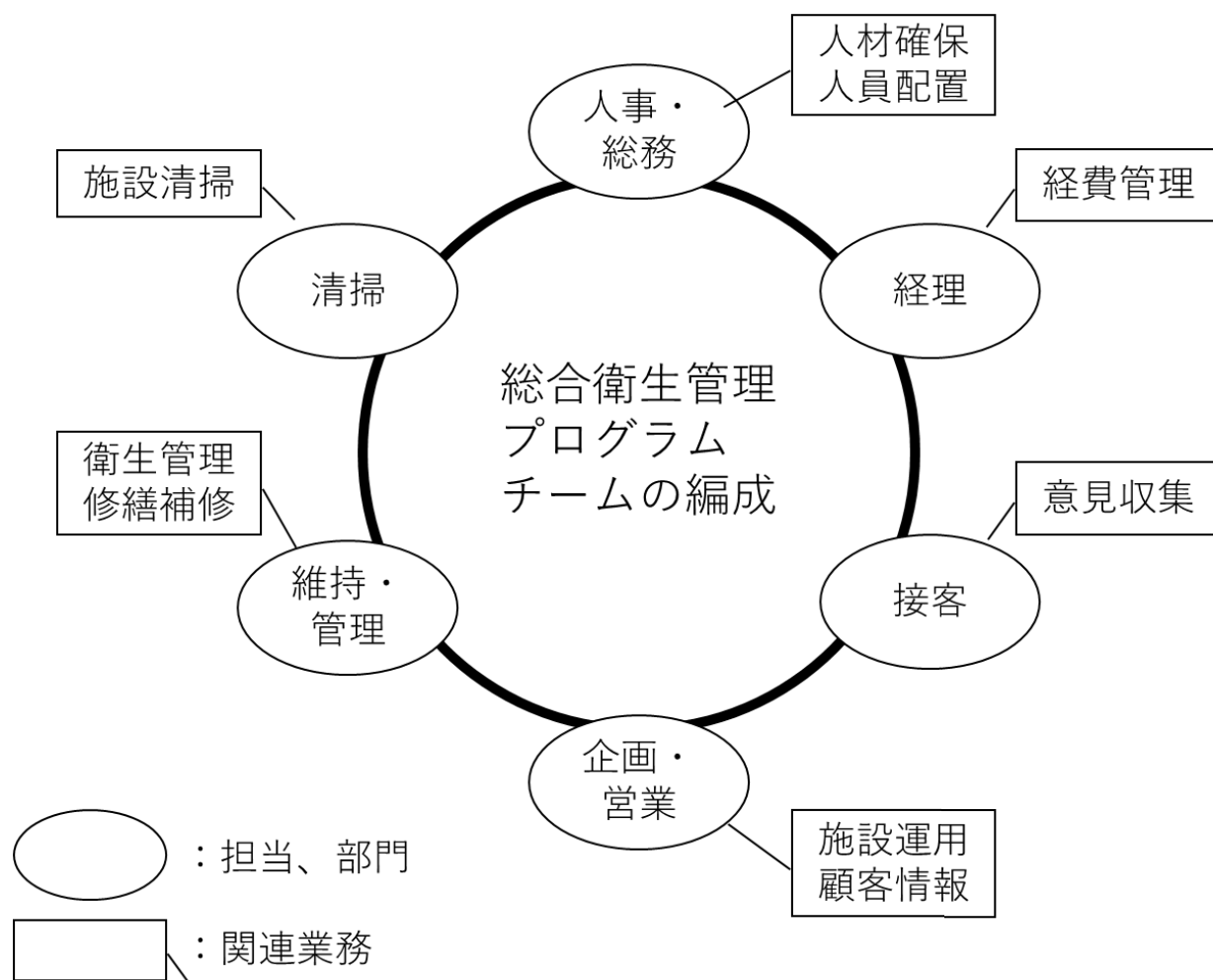
チームのメンバーが決まったら、各メンバーの役割を明確に決め、あるいは再確認を行い、記録しておきます。

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。

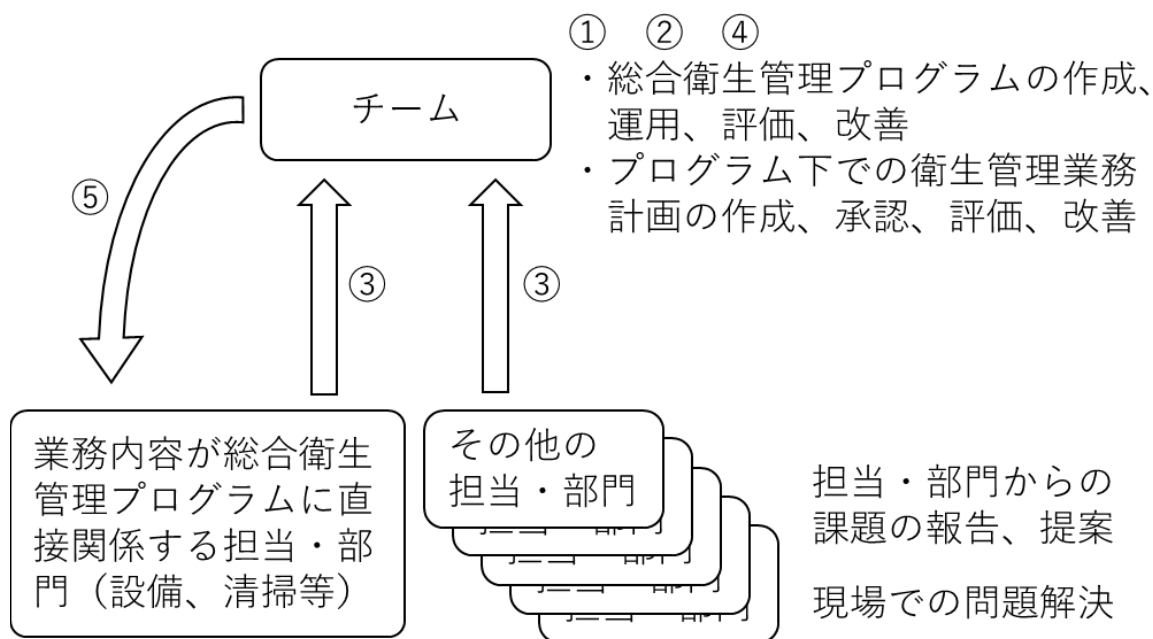
1) チームの編成



- ・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)}

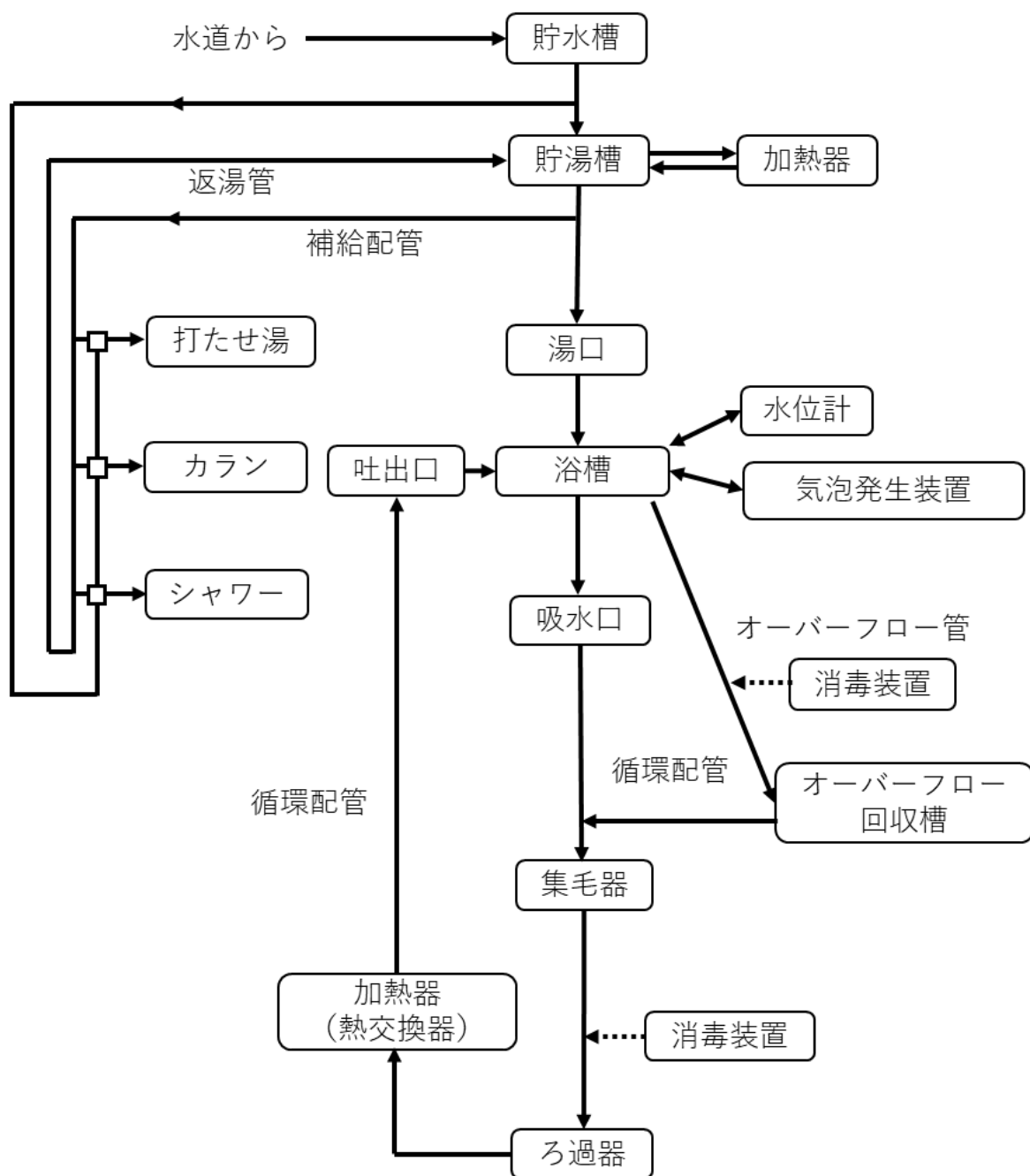
図面や現場での確認は、設備の構造を確認するために重要な工程になります。これにより、
3) レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定で衛生管理の方法を決めることや、
レジオネラ属菌が増えやすい場所を特定することができます。

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。

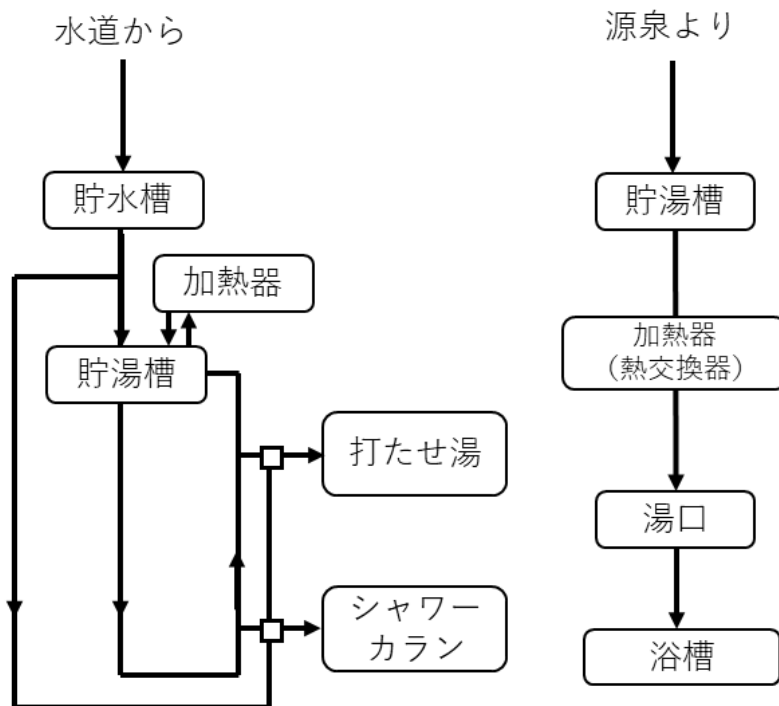
注1：貯湯槽、調節箱、シャワー、カラン、集毛器、ろ過器、消毒装置、気泡発生装置などの付帯設備や配管の状況等もすべて確認します。レジオネラ属菌の生息に関連する施設周辺の状況（源泉、冷却塔、水景施設、植栽など）及び設備の衛生管理状況も合わせて確認することが推奨されます。また、温泉であれば泉質と湯量、原水との混合状況なども確認します。合わせて、利用客の利用状況（入浴者数の日・季節変動など）を確認します。入浴施設の概要図はこの手引きの一般衛生管理編を参照してください。

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。

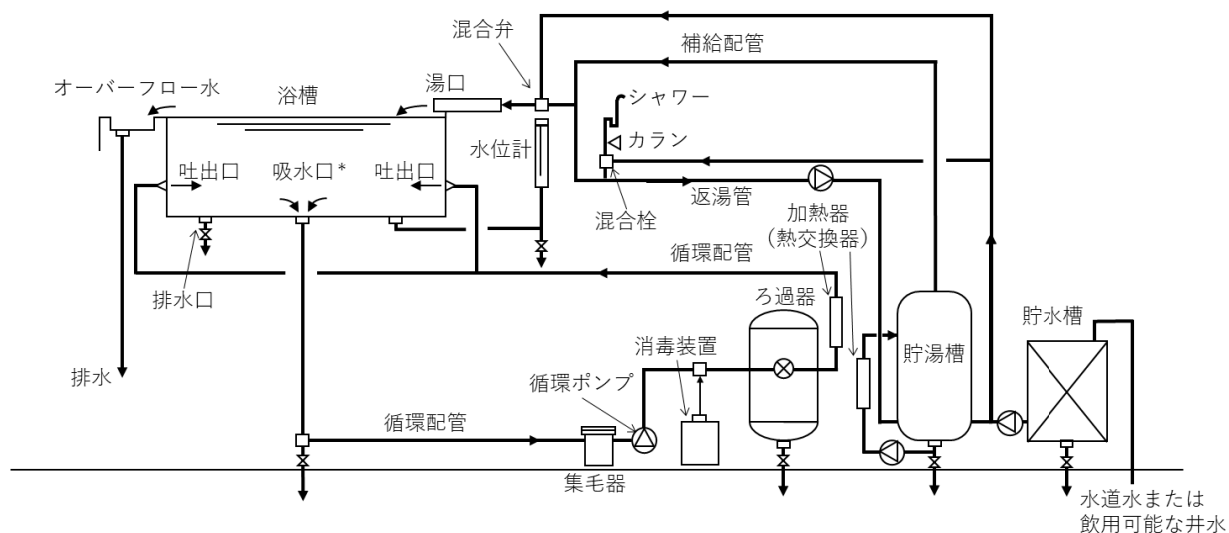
2) 施設・設備の確認



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・箇所の特定制以降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。

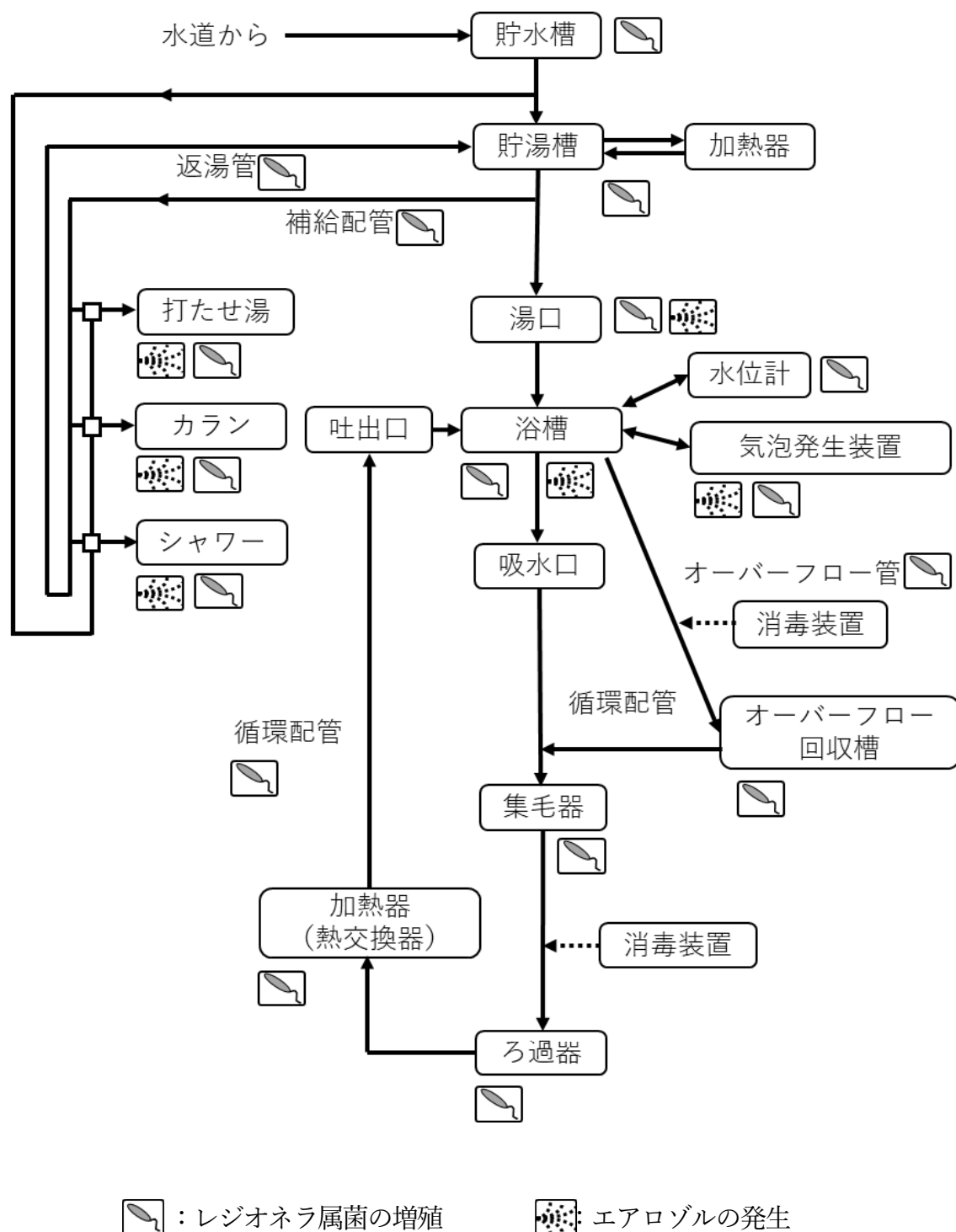
各設備の衛生管理の方法を決め、手順書・作業書及び自主管理点検表等を作成します。衛生管理の方法は公衆浴場における衛生等管理要領や本手引きのⅡ．一般衛生管理などを参考にします。既に手順書・作業書が作成されている場合はその内容を確認し、必要に応じて修正します。

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。

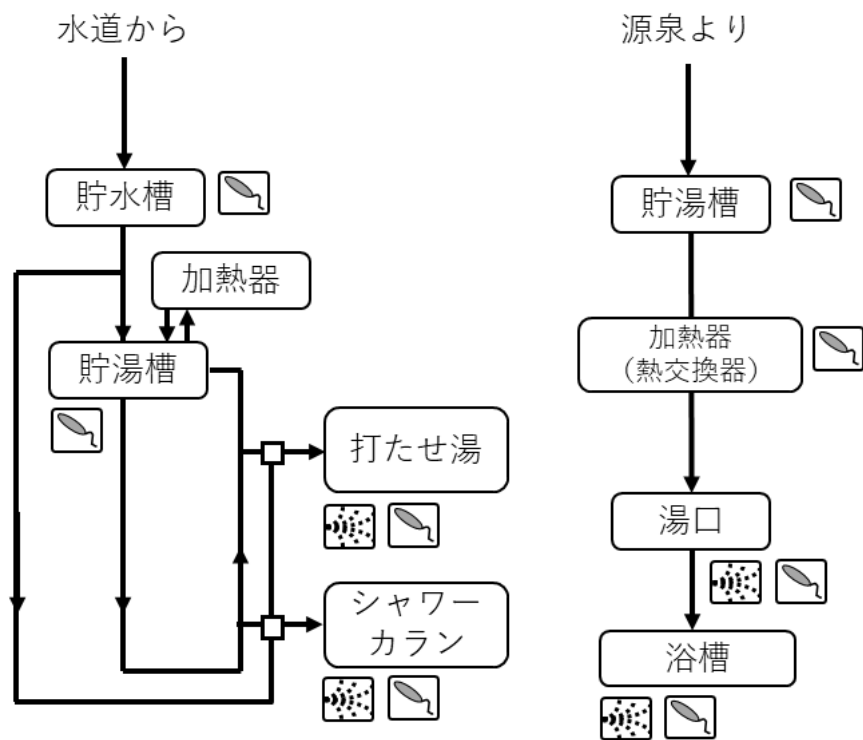
レジオネラ属菌が増えやすく、洗浄・消毒が難しい材質として木や岩があり、洗浄・消毒が難しい場所・設備として、タイルの目地の破損部分、気泡発生装置、シャワー、カランがあります。

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。

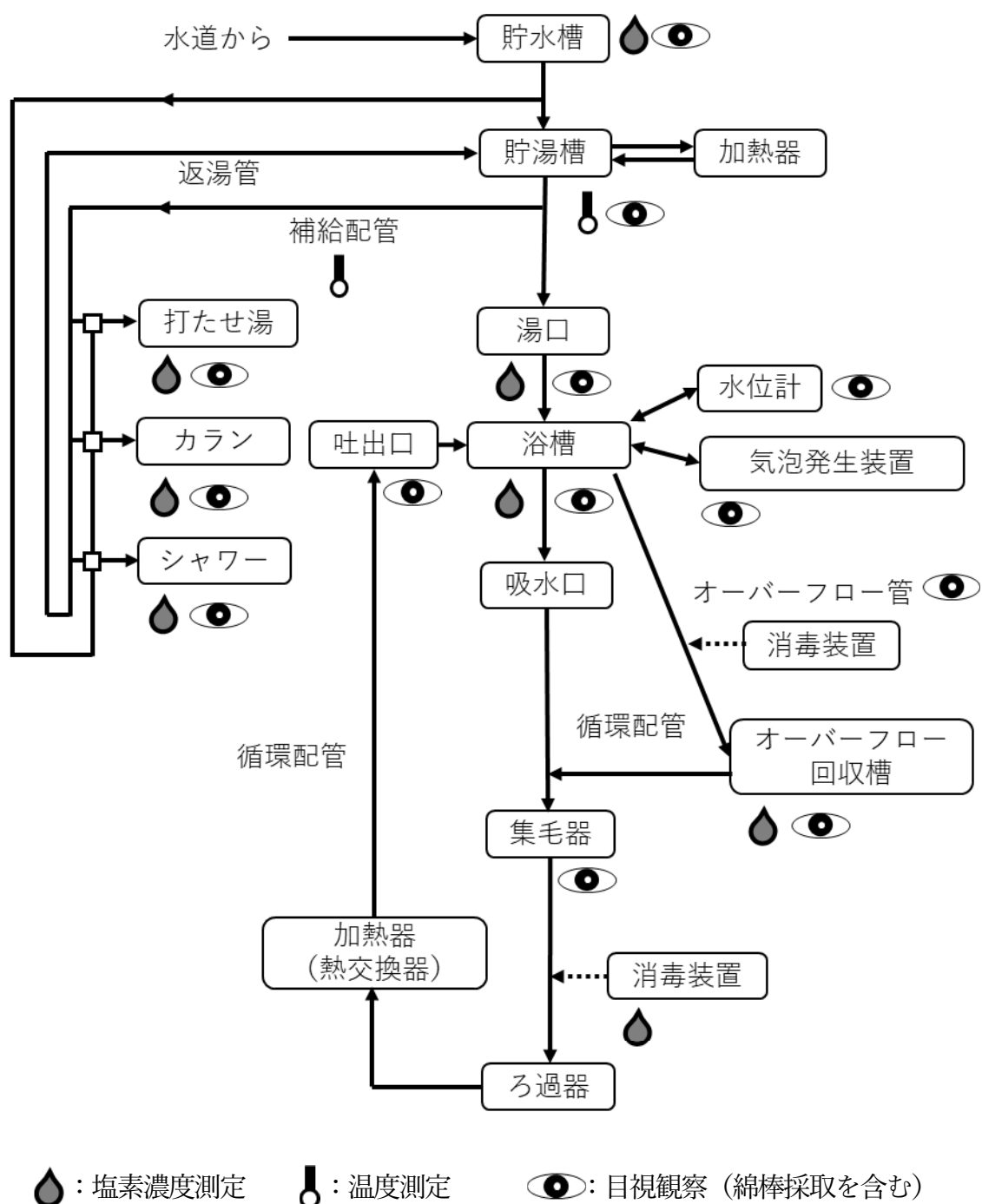
注1：レジオネラ属菌を増やさない管理をするためには、塩素系消毒剤の濃度あるいは 60℃ 以上（最大使用時でも 55℃以上）の温度（貯湯槽水の温度）が重点的に管理する項目となります。（泉質によっては pH5.0 未満の低 pH もレジオネラ属菌の増殖を抑えますが、pH3.0～5.0 では完全に死滅するわけではありません）

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。

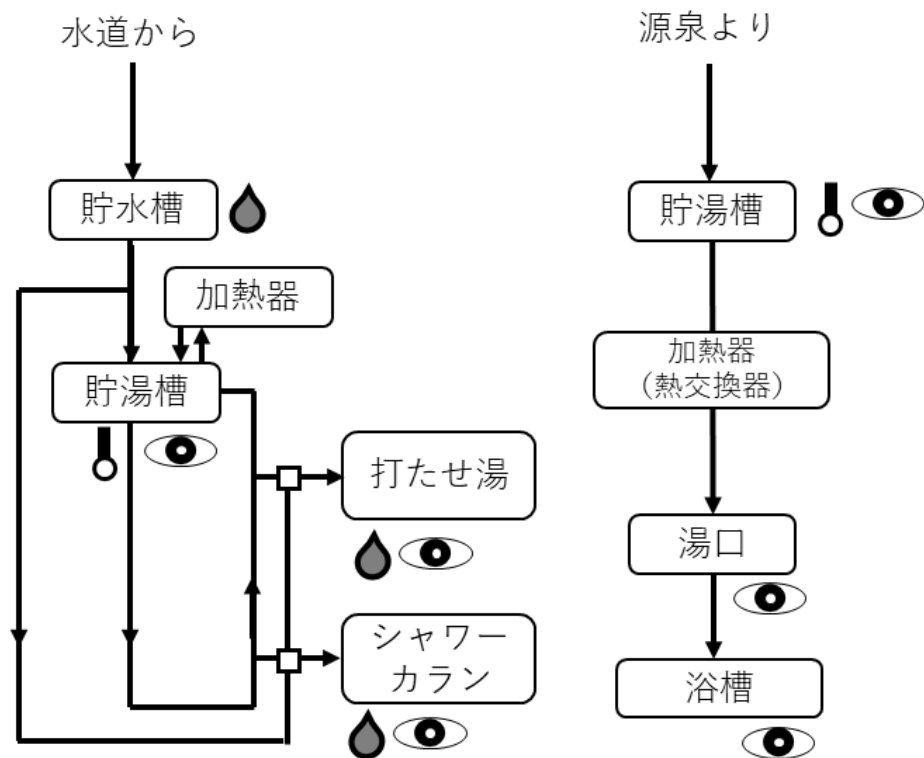
注3：生物膜ができた状況の確認方法、設備の洗浄・消毒方法を決めて、手順書・作業書を作成し、あるいは手順書・作業書があれば内容を確認します。生物膜を調べる方法の1つとして、簡易測定装置を使った ATP 値の測定があります。生物膜の形成を調べる場所として適しているのは、3) レジオネラ属菌が増殖、拡散しうる設備・箇所の特定の注1にある貯湯槽、浴槽、配管内面、湯口、気泡発生装置、集毛器、連通管、調節箱、オーバーフロー回収側溝、オーバーフロー管、オーバーフロー回収槽、水位計が挙げられます。ATP 測定用キットの綿棒を用い、浴槽や貯湯槽の壁面や床などの広く平らな面で

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。

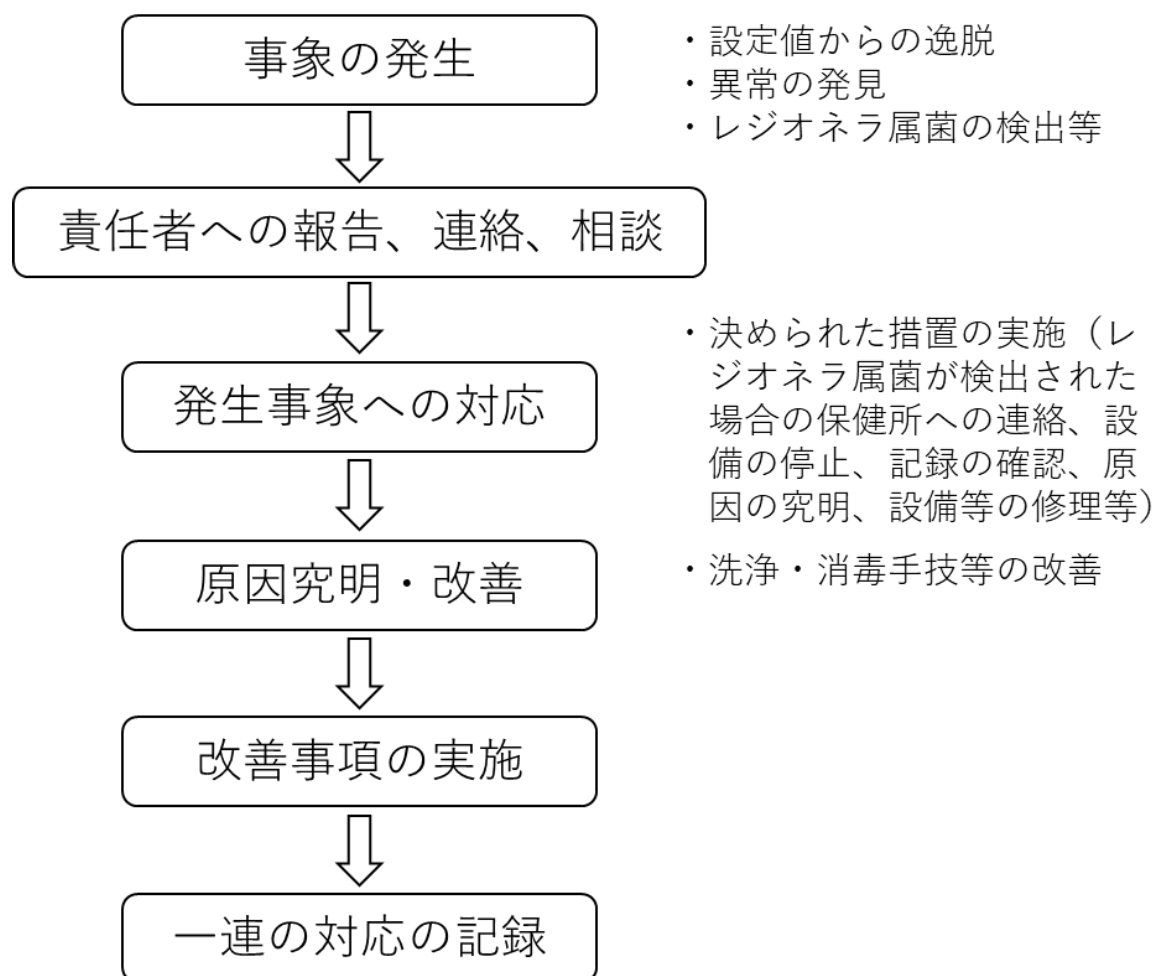
対応：施設利用者にレジオネラ症患者あるいはその疑いがある患者が発生した場合、次の点に注意して対応します。

- 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

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に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。

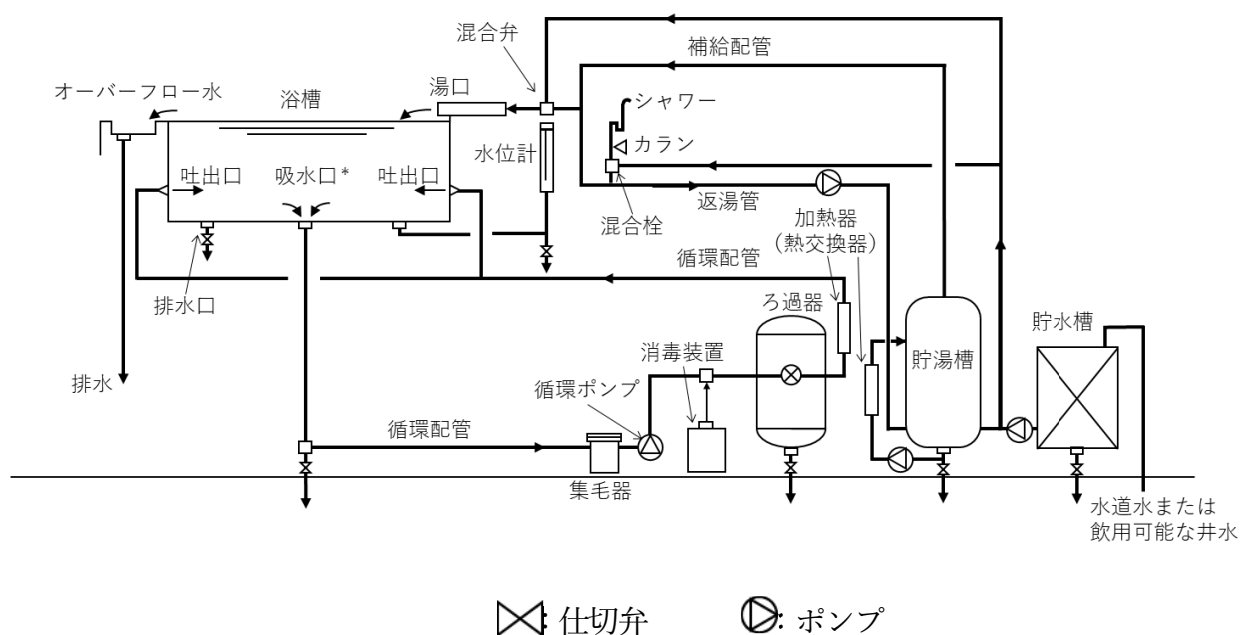
入浴施設の状況は規模、設置設備、原湯・原水の種類などにより様々です。そのため、ここで示している具体的な管理方法がすべての入浴施設に適用できるわけではありません。入浴施設におけるレジオネラ対策のための衛生管理の参考にしてください。

II-1. 全般

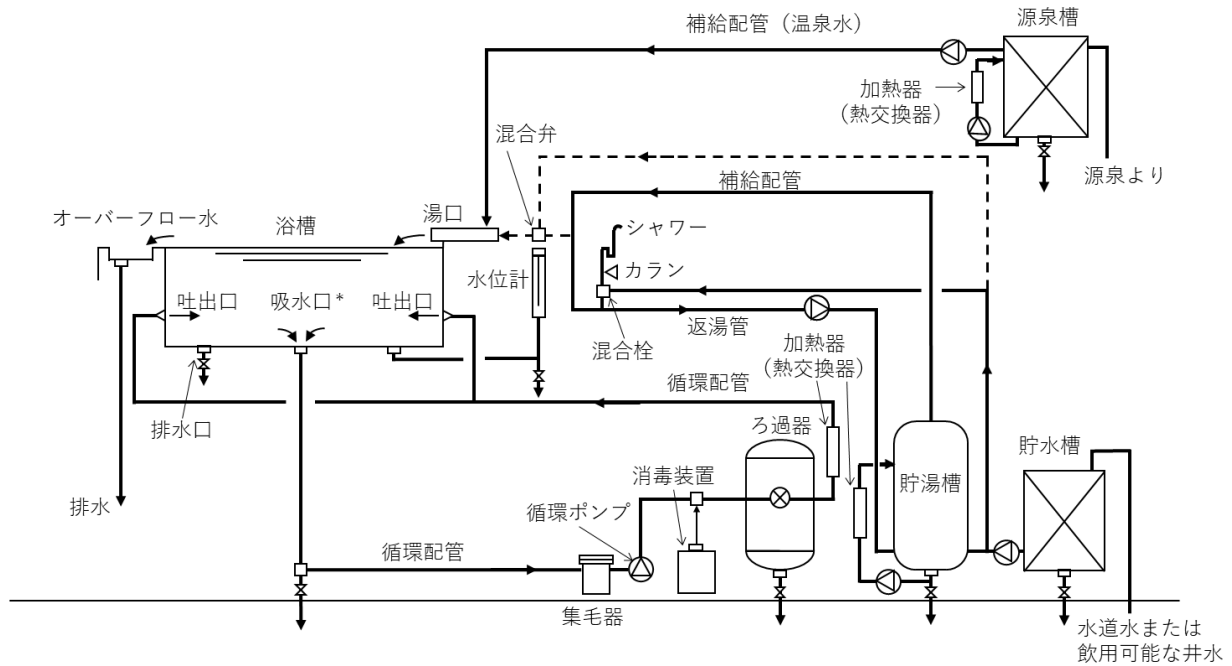
施設の各設備の洗浄方法並びに消毒方法等の具体的な手順、頻度、ポイントを定め、作業書・手順書を作成し、これに従って作業を行います。

浴槽の設備の概要の例を以下に示します。

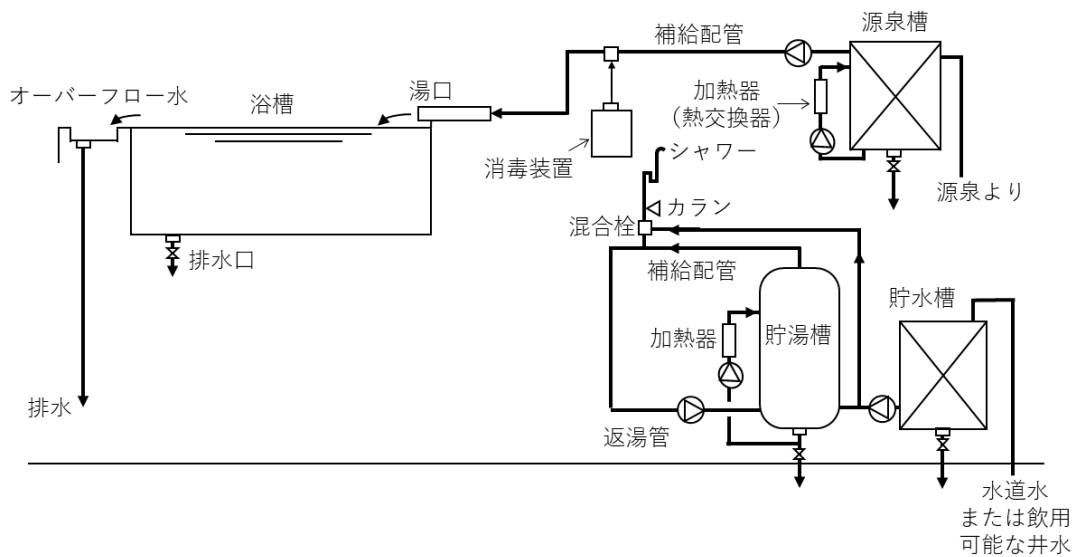
この図は水道水または井水を原水とする循環式浴槽施設の概要の例です。



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。



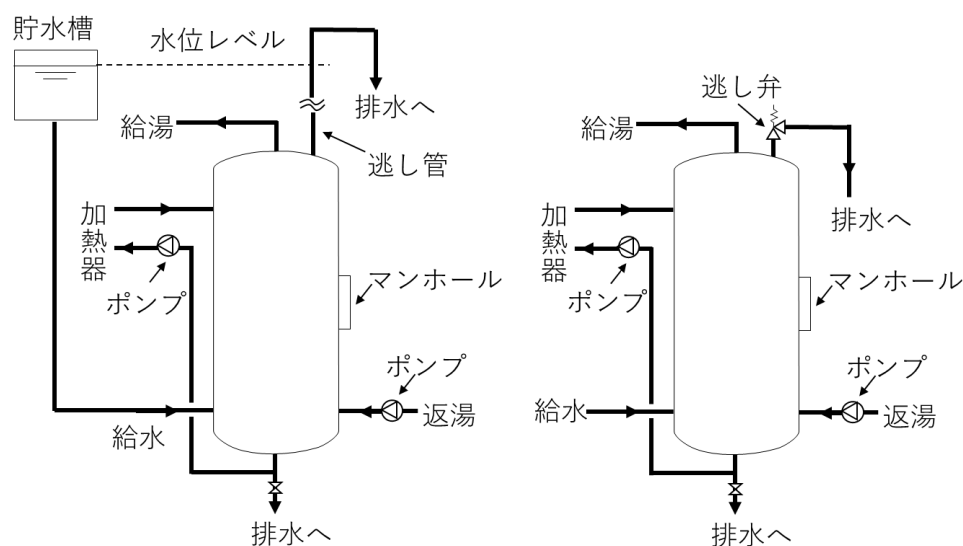
II-2. 貯湯槽

構造

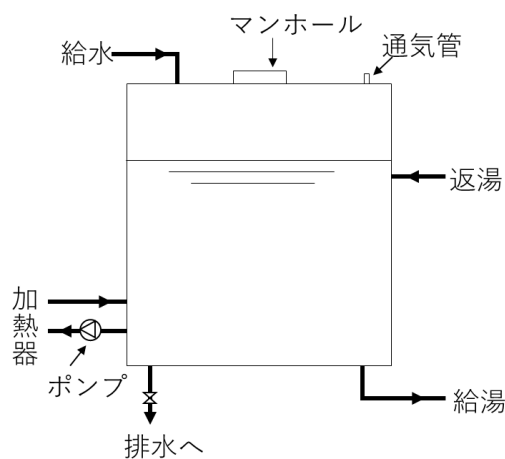
現行の公衆浴場における衛生等管理要領では貯湯槽は通常の使用状態において、湯の補給口、底部等に至るまで60℃以上に保ち、かつ、最大使用時においても55℃以上に保つ能力を有する加温装置を設置すること。それにより難い場合には、レジオネラ属菌が繁殖しないように貯湯槽水の消毒設備が備えられていること。貯湯槽は完全に排水できる構造とすることとしています。

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

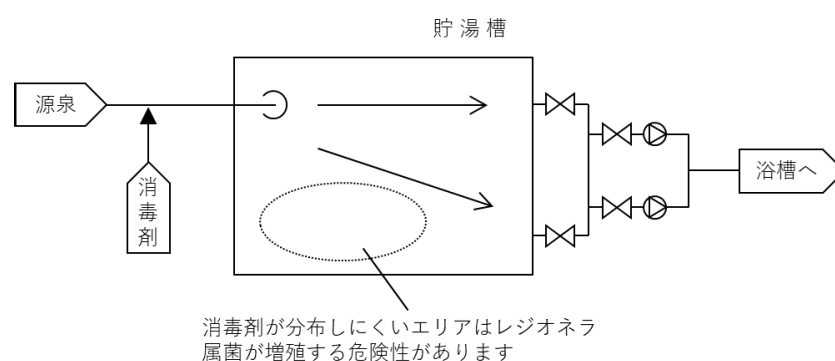
貯湯槽の湯の補給口から底に至るまでを 60℃以上に保つようにします。60℃以上に加温せず、40℃前後の水温で保つ場合は消毒剤を注入して生物膜が形成されないようにします。いずれの場合でも、水面と空気の境界あたりに生物膜が形成されやすいため、注意が必要です。槽内側の壁面等に生物膜ができていないかを目視、布や脱脂綿等によるふき取り、手触りやぬめりの有無などで観察し、少なくとも年 1 回は貯湯槽水を完全に排水して、内部の洗浄と消毒を行います。

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。

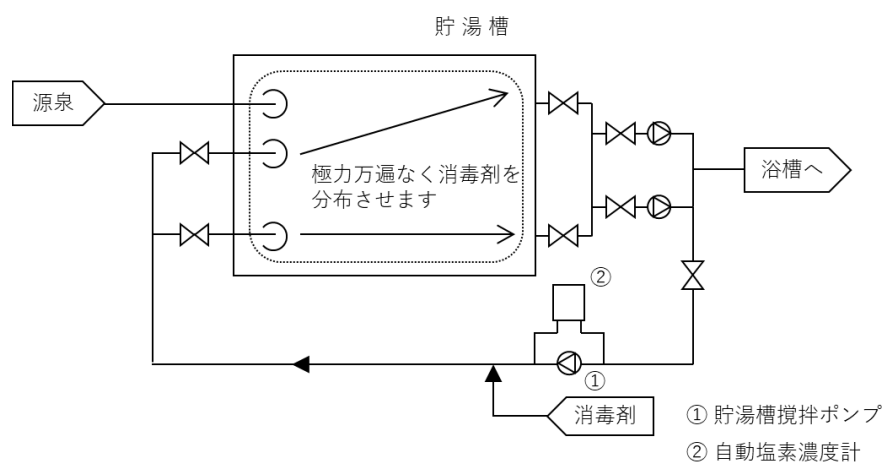
貯湯槽の底部は湯が停滞しやすく、上部よりも低温になったり、ごみが蓄積しやすいので、ドレインから底部の湯を排水したり、攪拌により槽内で湯を均等にすることが推奨されます。
(前項：構造を参照してください)

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。

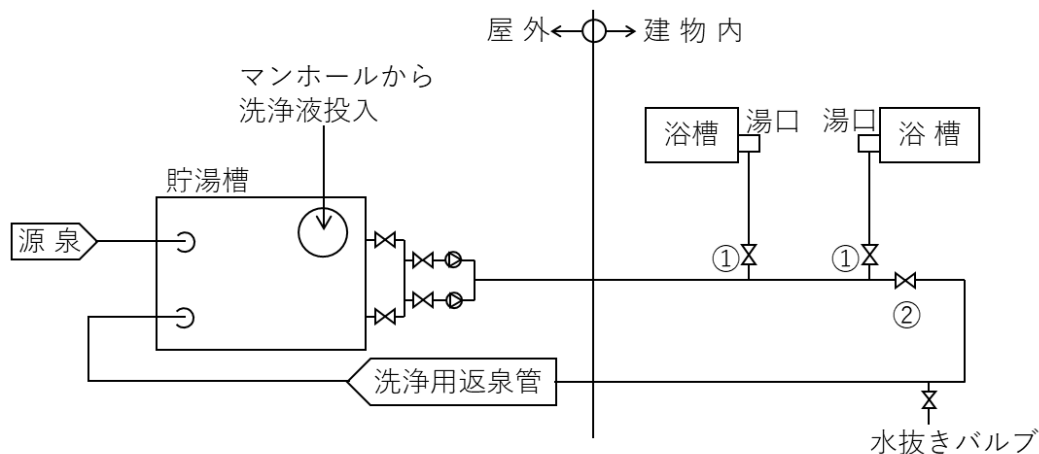
60℃以上の湯を貯めた貯湯槽から各施設への配湯管は、高温でも劣化せず、かつ配管内の湯の温度が下がりにくい材質のもの（耐熱性硬質ポリ塩化ビニル管など）を使用することが推奨されます。

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。

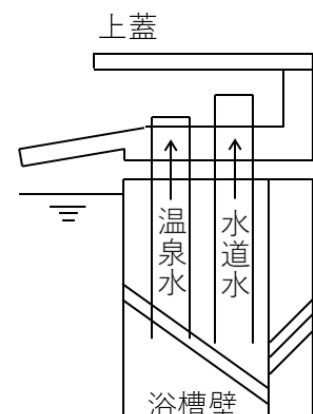
注：循環水を湯口から注入している浴槽では、ろ過器と循環配管の徹底した管理が必要です。

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



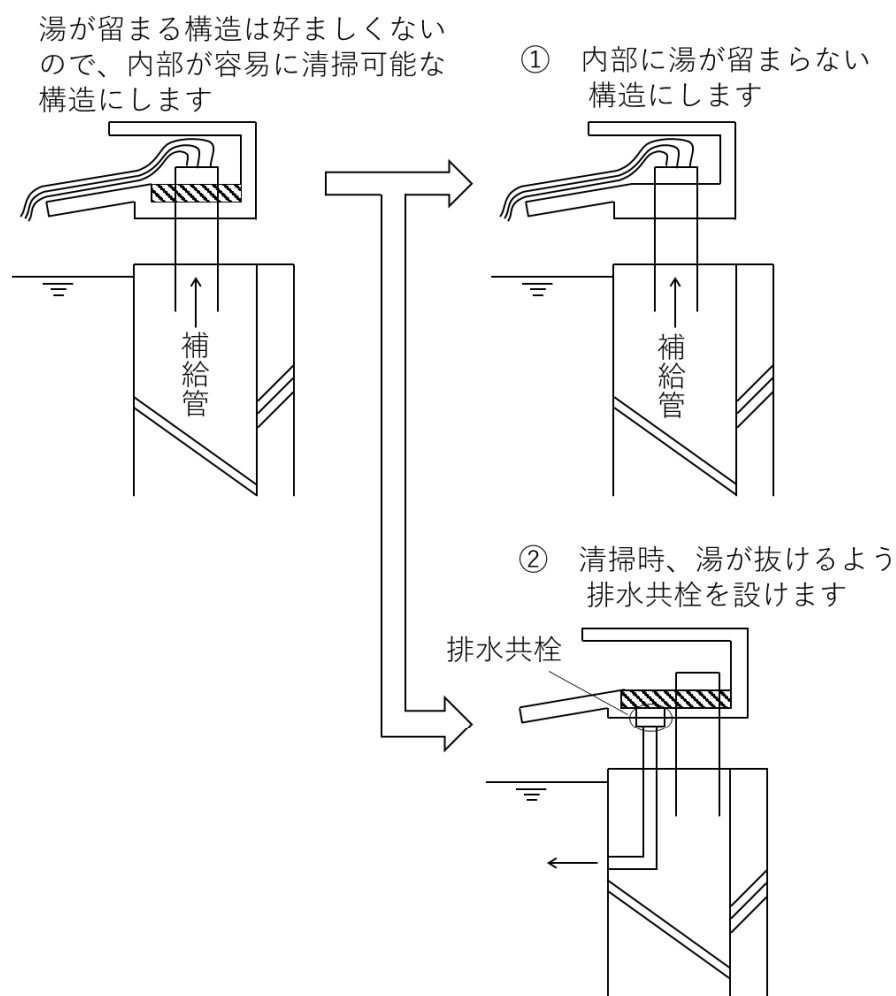
ように湯口内に別々の配管とし、水道水を上流側にします。内部は上蓋を外して洗浄・消毒します。

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

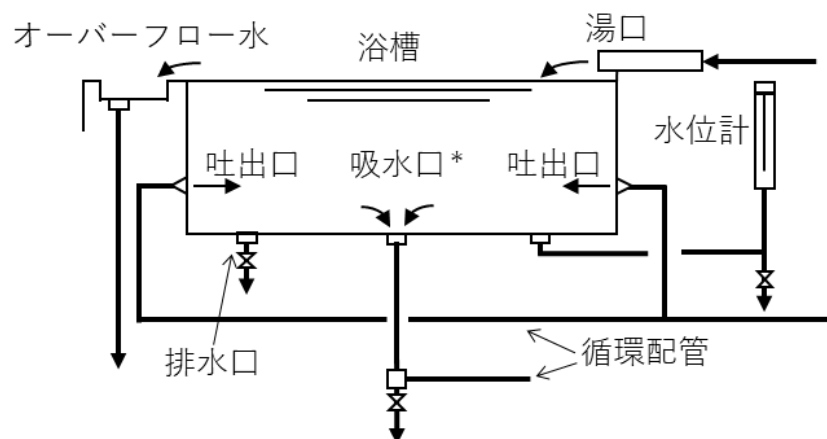
現行の公衆浴場における衛生等管理要領では、循環してろ過された湯水は浴槽の底部に近い部分から補給される構造とし、当該湯水の誤飲及びエアロゾルの発生を防止すること。さらに、内湯と露天風呂の間は、配管等を通じて、露天風呂の湯が内湯に混じることのない構造であることとしています。

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。

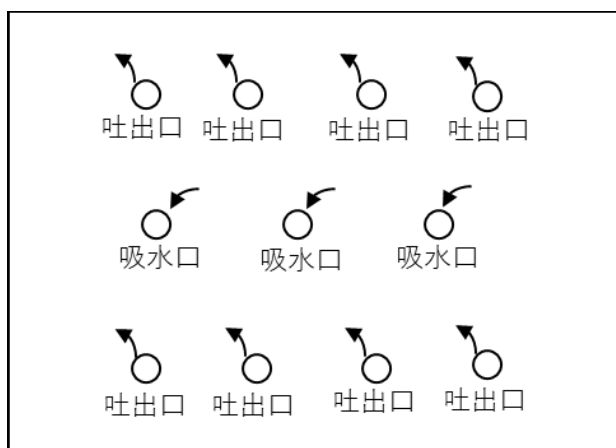
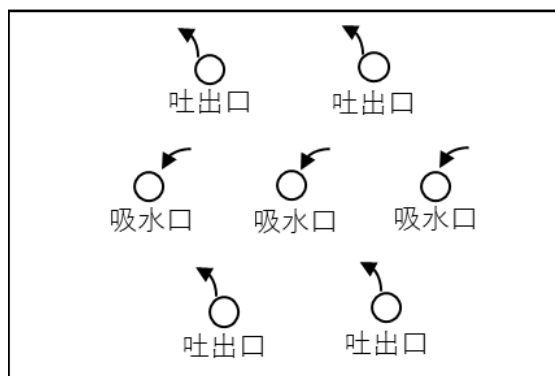
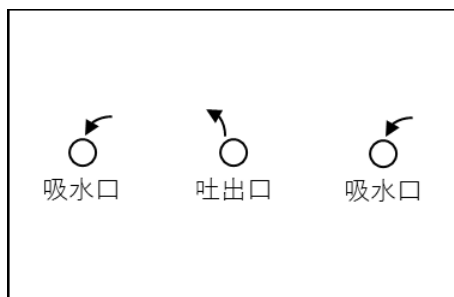
循環式浴槽の基本的な構造を示します。



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。

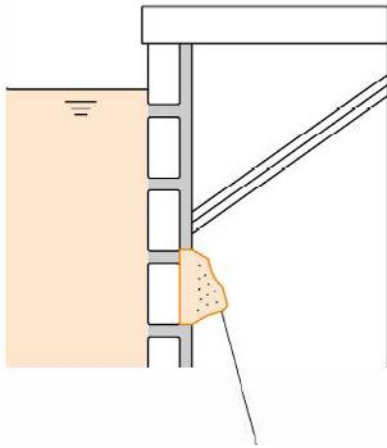
A：ATP 拭き取り検査を行うことにより、浴槽壁等の生物膜の残存量を現場で迅速に確認できます。厚生労働科学研究により、浴槽壁等の 10cm 四方を専用綿棒で拭き取った時の清浄度基準値（1,000 RLU）が提案されており、この値以上であれば拭き取り試料中のレジオネラの検出率が有意に増加します。この方法を利用すると、汚染場所が特定でき、洗浄効果が確認できるため、洗浄方法の最適化が可能となります。ちなみに、高圧洗浄に頼るよりもブラシ主体の洗浄が効果的で、さらにブラシ後の高濃度塩素消毒が有効であり、目地は洗浄しにくいというデータが得られています。

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）。

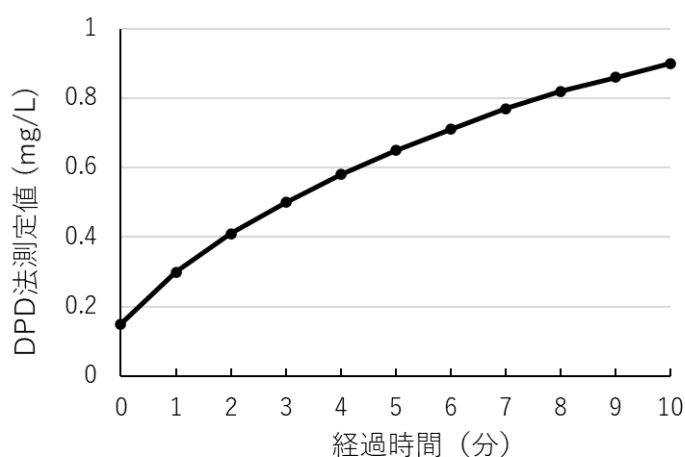
注：消毒剤として塩素化イソシアヌル酸またはその塩を使用している場合、有機物は全有機炭素 (TOC) 量ではなく、過マンガン酸カリウム消費量を測定します。全有機炭素 (TOC) は、塩素化イソシアヌル酸またはその塩由来の炭素も合わせて有機物量として測定するため、測定値が有機物汚れの有機物量よりも高くなることがわかっています。

(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。

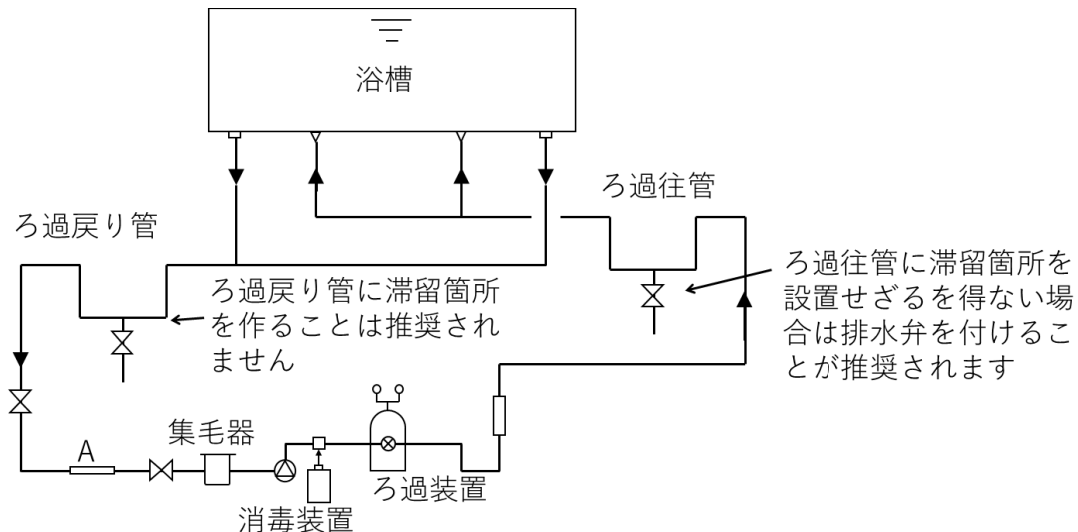
補給配管の項で説明しているように、逆流並びに汚染防止のために、循環配管に給湯配管あるいは給水配管を直接接続しないこととされています。循環配管及びそれに接続されているろ過器は、レジオネラ属菌が増殖する可能性が他の設備よりも高いため、汚染菌が給湯配管や給水配管に逆流して汚染しないようにします。

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

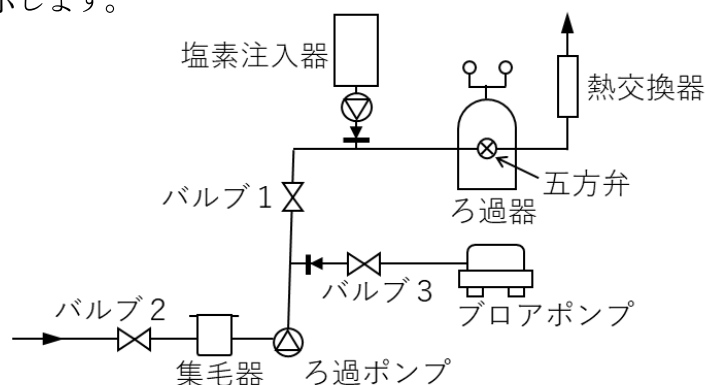
式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究「掛け流し式温泉における病原微生物汚染の実態調査、微生物汚染に影響を及ぼすリスク要因」、平成 18 年度総括・分担研究報告書、pp99-141

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 ブローアポンプをバルブ 3 の接続口に接続します。
- ⑨ ブロー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 分程度攪拌した後にブロー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かったりなど、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。



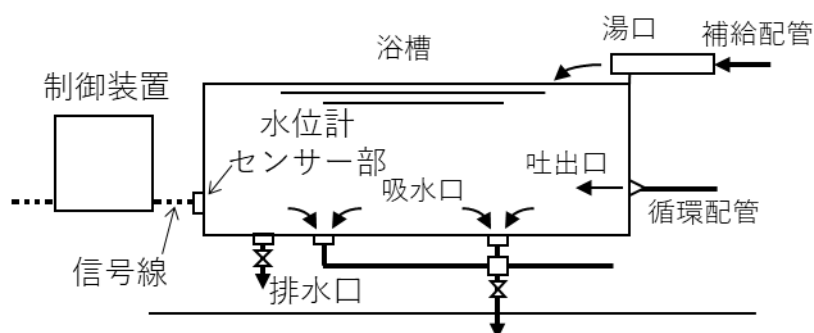
ホースや中央の写真のパイプを用いると
水が吸引され洗浄されます

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。

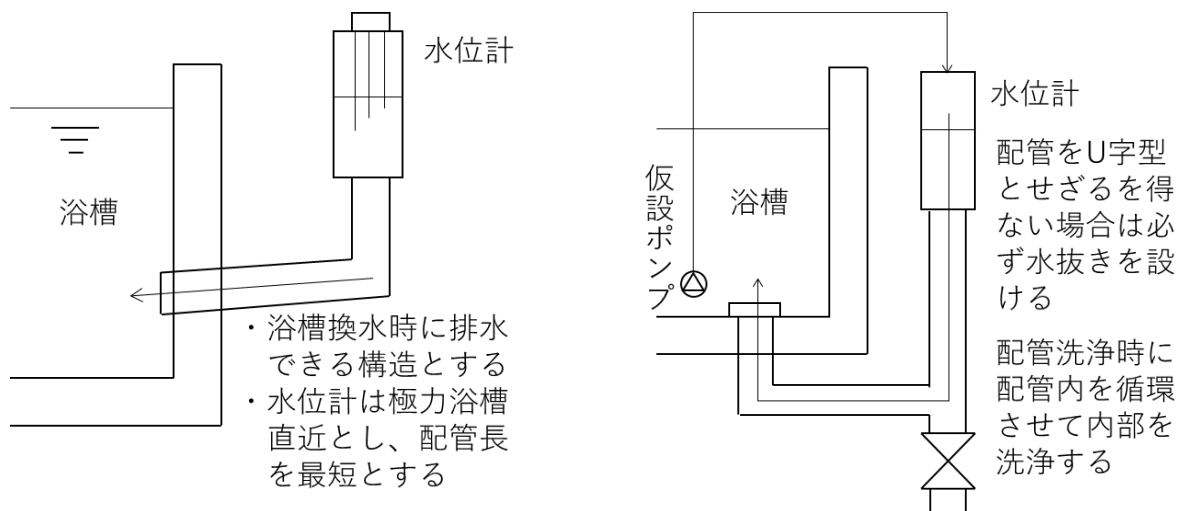
管理

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

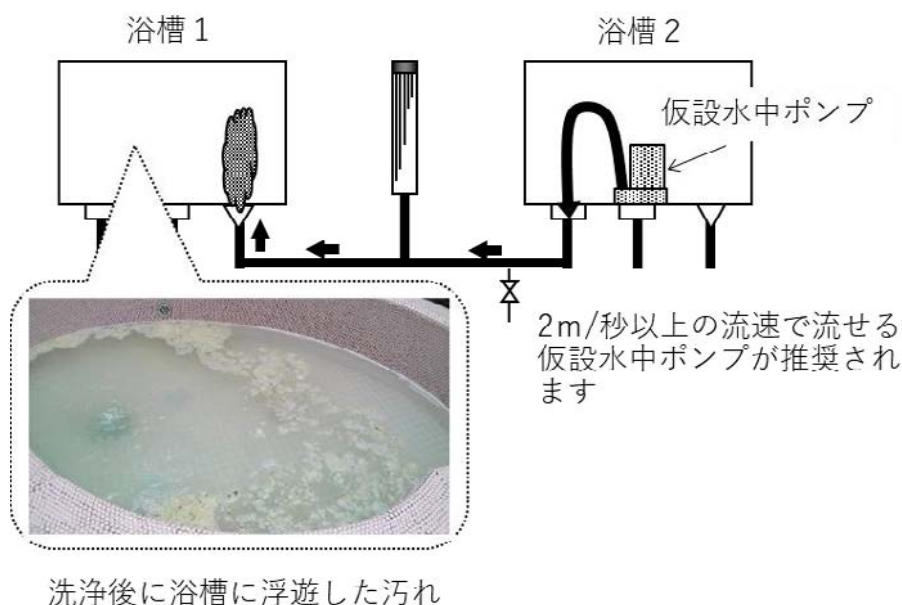
1台のろ過器で複数からの浴槽の浴槽水を処理する場合、浴槽水位を調整するため、複数の浴槽を繋ぐ配管を設けることがあります。生物膜が蓄積しやすく、レジオネラ属菌が増殖しやすい場所の一つです。そのため、ろ過器を浴槽ごとに設置することが推奨される理由の1つになっています。

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

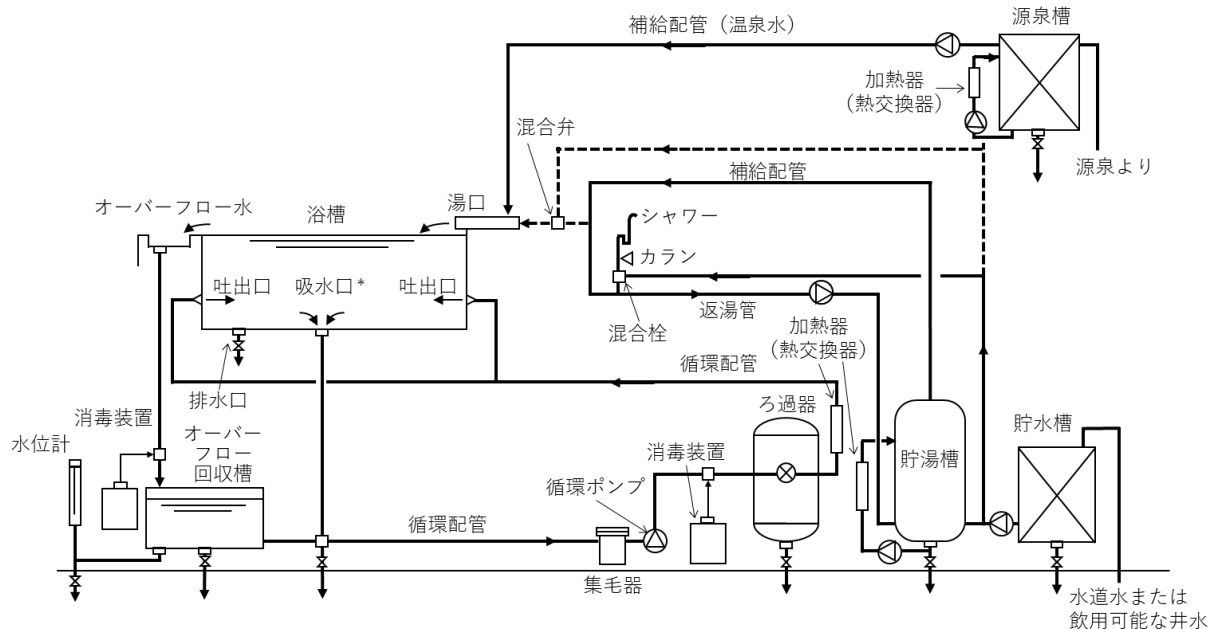
オーバーフロー回収槽はレジオネラ属菌の増殖が起きやすいことから、現行の公衆浴場の衛生等管理要領ではオーバーフロー水及びオーバーフロー回収槽（以下「回収槽」という。）内の水を浴用に供する構造になっていないこと。ただし、これにより難しい場合には、オーバーフロー還水管を直接循環配管に接続せず、回収槽は、地下埋設を避け、内部の清掃が容易に行える位置又は構造になっているとともに、レジオネラ属菌が繁殖しないように、回収槽内の水が消毒できる設備が設けられていることとしています。

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。

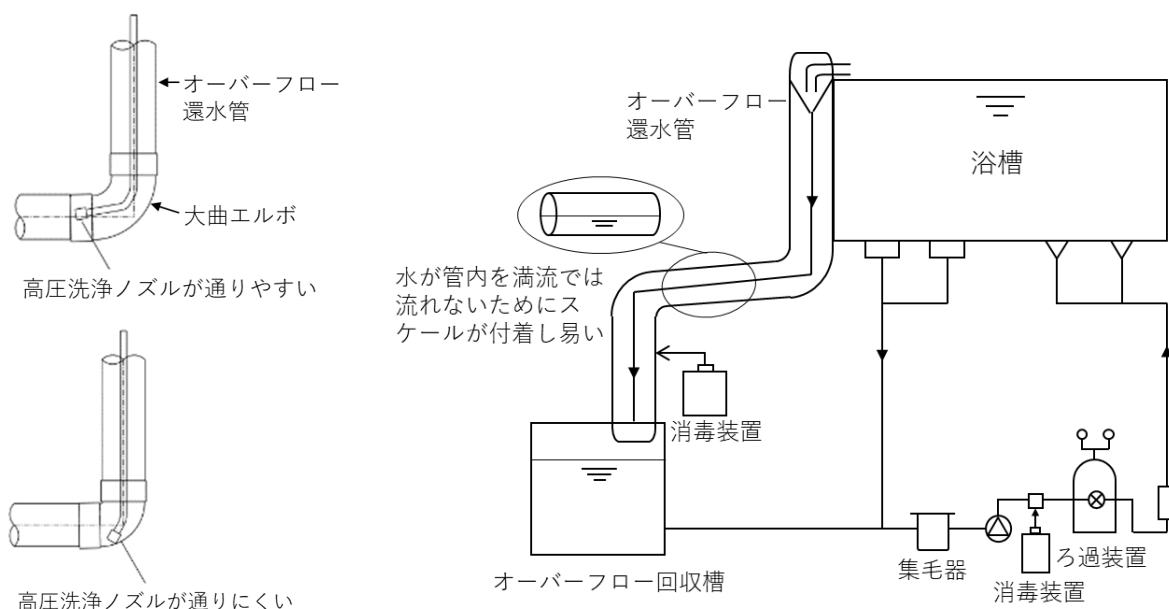
レジオネラ属菌が増殖しないように別途回収槽の水を塩素系薬剤等で消毒します。遊離残留塩素濃度を 0.4～1.0 mg/L に維持します。

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。

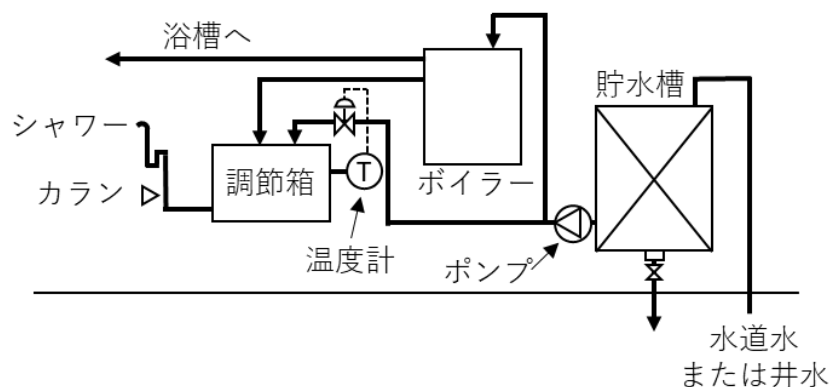


II-15. 調節箱

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

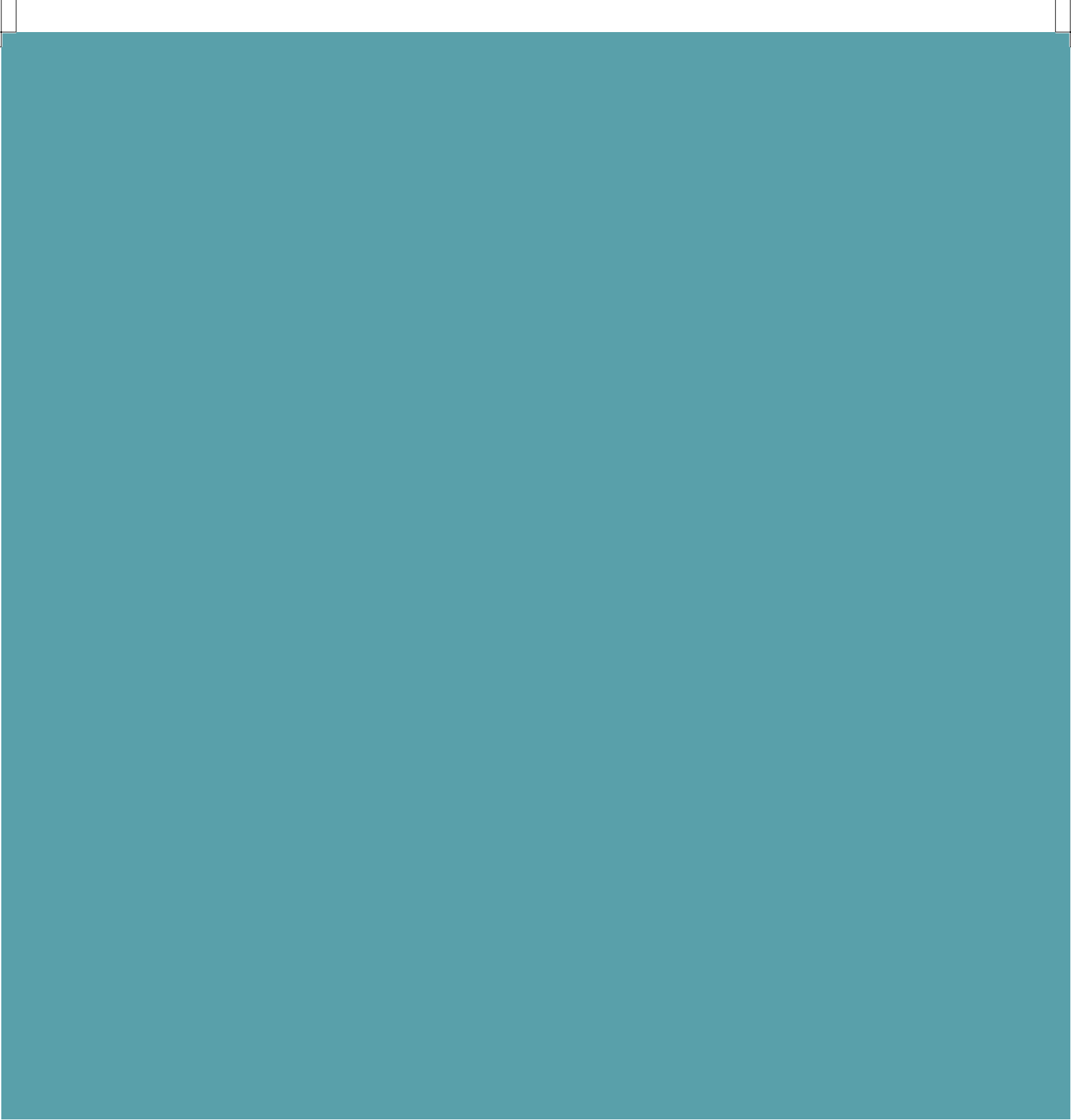
研究課題

「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（患者発生が散発的か集団的か判断の参考にするため）。

【ポイント】

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

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				
	実施年月日			浴槽名	検査結果	検査機関
	実施頻度： (年1回以上・年2回以上・年4回以上)					
2	浴槽の湯は常に満ちているか？	適・不適				
3	浴槽は、毎日(または毎週1回以上)完全に換水して清掃しているか？	適・不適				
4	浴槽の湯の遊離残留塩素濃度は、0.4mg/L程度を保っているか？	適・不適				
5	浴槽の湯の遊離残留塩素濃度は、頻繁に測定しているか？	適・不適				
	実施頻度：					
6	浴槽にひび割れ等の破損箇所はないか？ 木風呂にカビや穴はないか？ 岩風呂に青コやヌメリは付いていないか？	適・不適				
7	原湯の浴槽への供給は、浴槽への落とし込み式であるか？	適・不適・非該当				
8	循環湯の吐出口は浴槽の水面下に設けてあるか？	適・不適・非該当				
9	連通管がある場合、連通管の湯水を排出する構造になっているか？	適・不適・非該当				
10	気泡発生装置等(エアロゾル発生源)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				
	60℃を保つことができない場合、貯湯槽水を消毒しているか？残留塩素濃度：	適・不適・非該当				
	貯水槽及び貯湯槽内の清掃及び消毒をしているか？	適・不適・非該当				
	()基					
	用途			水温(℃)	清掃状況	消毒状況
2						
	タンクに破損箇所はないか？	適・不適・非該当				
3	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				
	タンクの蓋は開けたままになっていないか？	適・不適・非該当				
4	分湯枡がある場合、その清掃及び消毒を実施しているか？	適・不適・非該当				
	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.	系統名	ろ過器	ろ過方式	ろ過器の逆洗浄	集毛器	回収槽	浴槽名 (患者使用☑)	区分	使用水	換水状況	浴槽清掃状況	循環水の供給	エアロゾル発生装置	浴槽水消毒	塩素剤連続注入装置	塩素剤投入	その他消毒	調査時 残留塩素濃度 (mg/L) □遊離 □全	患者利用日 残留塩素濃度 (mg/L) □遊離 □全	調査時 ATP値 (RLU)	備考							
(凡例)	1有 2無	1砂 2セラミック 3カートリッジ 4中空糸 5その他 ()	1有 2無 ※有の場合、洗浄頻度	1有 2無	1有 (材質・容量) 2無		1白湯 2薬湯 3露天 4その他 ()	1水道水 2井戸水 3温泉 4混合 (+)	浴槽の温度・pH	＜頻度＞ 1毎日 2()日 に1回 3その他	患者利用 日前後の 換水日 1前 / 2後 /	＜頻度＞ 1毎日 2()日 に1回 3その他	＜方法＞ 1フライング 2ジェット水流 3雑巾がけ 4その他	洗浄剤・消毒剤の種類及び濃度※	1落とし込み 2浴槽底部 3その他 ()	1有 2無	1ジェット噴射 2気泡発生装置 3その他	1実施 2未実施	1有 2無	＜注入点＞ 1ろ過器前 2ろ過器後	薬剤名	1集毛器 2浴槽直接	1オゾン 2紫外線 3その他 ()					
1							□																					
2							□																					
3							□																					
4							□																					
5							□																					
6							□																					
7							□																					
8							□																					
9							□																					
10							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					
							□																					

※	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	対応者
営業者氏名				
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: 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	実施頻度: (年1回以上・年2回以上・年4回以上)		
3	浴槽の湯は常に満ちているか?	適・不適	
4	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	
5	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	
6	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	
7	浴槽にひび割れ等の破損箇所はないか?	適・不適	
8	木風呂にカビや穴はないか?	適・不適	
9	岩風呂に苔やヌメリは付いていないか?	適・不適	
10	原湯の浴槽への供給は、浴槽への差し込み式であるか?	適・不適・非該当	
11	循環湯の吐出口は浴槽の水面下に設けられているか?	適・不適・非該当	
12	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	
13	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	
14	原湯やがり湯の貯湯槽の湯の温度は60℃以上を保たれているか?	適・不適・非該当	
15	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	
16	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	
17	()基 用途 水温(℃) 清掃状況 消毒状況		
18	タンクに破損箇所はないか?	適・不適・非該当	
19	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	
20	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	
21	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	
22	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
23	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	
24	ろ過器は、毎週1回以上洗浄しているか?	適・不適・非該当	
25	実施日: 洗浄方法:		
26	ろ過器は、毎週1回以上消毒実施しているか?	適・不適・非該当	
27	実施日: 消毒方法:		
28	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?	適・不適・非該当	
29	交換日: 交換理由:		
30	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	
31	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	
32	消毒装置の維持管理は、適切か?	適・不適・非該当	
33	塩素供給装置は正常に作動しているか?	適・不適・非該当	
34	塩素濃度測定器は、正常に作動しているか?	適・不適・非該当	
35	配管が腐食などで破損していないか?	適・不適・非該当	
36	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	
37	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	
38	循環配管は、毎週1回以上消毒しているか?	適・不適・非該当	
39	実施日: 消毒方法:		
40	集毛器は、毎日清掃しているか?	適・不適・非該当	
41	集毛器は、毎週1回以上消毒実施しているか?	適・不適・非該当	
42	実施日: 消毒方法:		
43	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	
44	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	
45	供する場合は、回収槽の湯水を消毒しているか?	適・不適・非該当	
46	消毒方法: 残留塩素濃度:		
47	浴床排水の混入はないか?	適・不適・非該当	
48	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?	適・不適・非該当	
49	実施日: 消毒方法:		
50	シャワーホース及びシャワーヘッドの維持管理は、適切か?	適・不適・非該当	
51	シャワーホース 清掃状況 消毒状況 直近の交換日		
52	シャワーヘッド 清掃状況 消毒状況 直近の交換日		
53	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	
54	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	
55	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	
56	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	
57	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	
58	水質検査結果は3年間保管されているか?	適・不適	
59	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	
60	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
令和元年度～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	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所
研究協力者	高橋直人	静岡市環境保健研究所
研究協力者	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 領域の検討を行い、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。

Miseq および MinION を用いて、12 株の完全長配列を決定し、計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 領域やフラグメントが検出されない MLVA 領域について詳細に解析した。リピート領域は存在しているが、primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域の存在が明らかになり、新たに primer を検討したところ、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。一方で、Intermediate-size として扱っていた MLVA 領域は、リピート領域が始まる上流の長さが短くなっていること、最後のリピートの長さも短くなっていることが明らかとなった。

各分子疫学解析手法の比較では、ST が一致で MLVA 型が異なる例、MLVA 型が一致で ST 型が異なる例について計 28 株のゲノム配列を決定し、ゲノム系統解析の結果と各分子疫学解析手法の解析結果との比較検討を行った。その結果、それぞれの例において、分子疫学的手法としての MLVA と SBT は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられた。ただし、それぞれの手法だけでは、菌株識別できない場合も

存在するので、双方の手法を併用するのが望ましいと考えられた。さらに、PFGE、MLVA、SBT の相違点が見いだされた集団事例についても同様の検討を行った結果、PFGE、SBT、MLVA のタイピングでは、すべての株が相同性の高い株として認識されるが、コアゲノム SNPs 解析ではそれぞれの手法の結果を反映した系統樹となった。

MLVA を活用に関しては、複数の自治体にプロトコルを提供し、集団事例での検討や施設の衛生指導にも活用した。

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、解析フローを作成した。

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。その一方で、遺伝子型別の手法間の相違点も見出された。また、他自治体間との比較の際にも、フラグメントの大きさがずれる点やMLVA領域によってリポート数換算の際

に判断に迷う点等いくつかの課題が見出され、汎用性の高いタイピングとしてのMLVAを確立するためには、プロトコル整備の必要性が示唆された。

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した。

B. 研究方法

①菌株：

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

(2) ST が一致で MLVA 型が異なる例として ST507 の 9 株を用いた (表 2)

(3) MLVA 型が一致で ST 型が異なる例として 20 株を用いた (表 3)。

(3) 集団事例 A で用いた菌株は、表 4 の通りである。

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

(5) 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5)。

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 ゲノム解析 : QIAseqFX(QIAGEN)を用いて DNA ライブラリを調製し、Miseq reagent Kit v.3 を用いてリードデータを取得した。A5-Miseq でアセンブリし、PROKKA でアノテーションを行った。全ゲノム配列による系統解析には kSNP3 を用いて解析した^{5,6)}。完全長ゲノム配列は、MinION (Nanopore 社) から得られたロングリードと Miseq のショートリードデータを Unicycler により Hybrid assembly して決定した。

④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 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。

C. 研究結果

(1) MLVA 領域の検討

計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 型を示した菌株の完全長ゲノム配列を取得し、MLVA 領域周辺構造を解析した。その結果、Intermediate-size として扱っていた MLVA 領域 (Lmps31) は、リピート領域が始まる上流の長さが Philadelphia 株と比較して短くなっていた。さらに、最後のリピートの長さも短くなっていた。

フラグメントが検出されない菌株の中には、リピート領域は存在しているが、primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域 (Lmps31、Lmps01、Lmps13、Lmps39) 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 6)。Lmps13 と Lmps01 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⁾らと同じ MLVA 領域を用いているが、primer が異なることから、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、Lmps01、Lmps13、Lmps31 の MLVA 領域において大きく改善された (表 6)。

また、増幅しない株が多かった ST23、ST384、ST550 に着目すると、増幅されなかった領域が 2nd primer により増幅され、同一 MLVA 型となる株が増えた。従って、同一 ST 内において、より正確な MLVA

型別が可能となった。

(2) ゲノム分子疫学における MLVA, SBT の遺伝子型別の比較

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

① ST が一致で MLVA 型が異なる例

ST507 の 9 株の MLVA 型は 5 種類に分類された。そのうち、1 株だけが、Clonal Complex (CC) から外れた MLVA 型を示した (表 2 と図 1(A))。9 株のコアゲノム SNPs の系統解析を行った。その結果、CC から外れた菌株は、コアゲノム系統樹でも、他の菌株とは系統的に離れた位置にカテゴライズされており、MLVA の MST の近縁関係を反映していた (図 1(B))。

② MLVA 型が一致で ST 型が異なる例

同一 MLVA 型を示した 20 株の ST は、11 種類含まれており (表 3)、ST に基づく菌株間の関連性を図 2 (A) に示した。ST2311 と ST622 は CC から外れた。これらの株のコアゲノム SNPs の系統解析を行った結果、コアゲノム SNPs の系統樹が ST の MST の近縁関係を反映していた (図 2 (B))。

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

比較

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

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

PFGE を実施した SG1 の 13 菌株の ST は、ST59 と ST2592 の 2 種類に分かれ、それらは *neuA* の 1 遺伝子違いであった。ST59 を示した 2 株は同じ浴槽の浴槽水と拭き取り由来であった。MLVA 型は、ST59 の 1 株が 1 領域違いであったが、他の 12 株の MLVA 型は一致した。

F9-2、F20-2 の ST、MLVA 型は他の菌株とは異なっていた (表 4)。

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

SBT の結果を反映した系統樹となった。

(3) MLVA 法の活用

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 4)。

③ 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。

(4) 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し、解析フローを作成した（図 5）。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す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。

D. 考察

MLVA 周辺構造の解析から、フラグメントが増幅されない菌株の中には、リピート領域は存在しているが、primer のミスマッチにより MLVA 領域が増幅されていないことが明らかとなった。このような 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。一方で、MLVA 領域の中には、Intermediate-size として扱っていた MLVA 領域があったが、リピート領域前の flanking region の長さが異なっていることや最後のリピートの長さが中途半端な長さであった。このような株は、計算通りのリピート数をとる菌株とは区別する必要があると考えられた。

全ゲノム系統解析から、SBT, MLVA の手法間の相違点について比較した。ST が一致で MLVA 型が異なる例では MLVA 型の MST が、MLVA 型が一致で ST が異なる例においては ST の MST が、それぞれ全ゲノム系統解析の傾向を反映していた。従って、MLVA と SBT はレジオネラの全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられる。しかし、大まかな系統的位置は一致するものの、片方の手法で細分化されているクラスターが、もう片方の手法では遺伝子型が一致するというケースが存在することも明らかとなった。

集団事例におけるコアゲノム SNPs 解析では、SBT、PFGE それぞれの手法の結果を反映した系統樹となっていたが、全ゲノム系統解析から、患者由来株と近縁な 2 株（SNP 数が 20 個以内）は同一の浴槽の拭き取りから分離されており、その浴槽が直接の感染源となっていた可能性

が考えられた。また、PFGE、SBT、MLVA のタイピングでは SNP 数 300 個程度の菌株間を clonal complex として認識されていると考えられた。このように、集団発生事例等個々の菌株の同一性を詳細に確定させたい場合は、可能であればゲノム解析を実施することが望ましいが、コスト等の面で難しい場合は MLVA と SBT を併用して分子疫学解析を実施することが必要であるかもしれない。今後も引き続き、レジオネラ症事例におけるゲノム解析を行い、検討を重ねる必要がある。

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。

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た。サンガー法で決定した配列でも利用可能となっており、迅速で有用な解析ツールと考えられた。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。

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。

分子疫学的手法としての MLVA と SBT は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられた。MLVA を菌株のスクリーニング（SBT の代替）に用いることは、有用である。ただし、それぞれの手法だけでは、菌株識別できない場合も存在するので、双方の手法を併用するのが望ましい。集団発生事例等個々の菌株の同一性を詳細に確定させたい場合は、可能であればゲノム解析を実施することが望ましいが、集団事例でのゲノム解析事例を増やし検討を重ねていく必要がある。

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。

さらに、Miseq リードデータやコンティグ配列から ST を決める方法を確立し解析フローを提示した。

謝辞

今回解析した分離株を分与くださった内田順子（香川県環境保健研究センター）、川上慶子（石川県保健環境センター）、磯部順子・金谷潤一（富山県衛生研究所）、岩渕香織（岩手県環境保健研究センター）、奥野ルミ（東京都健康安全研究センター）、笠原ひとみ（長野県環境保全研究所）、勝川千尋

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

F. 参考文献

- 1) 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.parisaclay.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.
- 5) Raphael BH, Baker DJ, Nazarian E, Lapierre P, Bopp D, Kozak-Muiznieks NA, Morrison SS, Lucas CE, Mercante JW, Musser KA, Winchell JM., 2016.

- Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from New York State. Appl Environ Microbiol. 82:3582-3590.
- 6) Nakanishi N, Nomoto R, Tanaka S, Arikawa K, Iwamoto T., 2019. Analysis of Genetic Characterization and Clonality of *Legionella pneumophila* Isolated from Cooling Towers in Japan. Int J Environ Res Public Health.16. doi: 10.3390/ijerph16091664.
- G. 研究発表
- 1) 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: 完全長配列決定の菌株

strain ID	SG	ST	Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33
KL06-287	1	1	9.5	7	17	4
KL10-682	1	1008	9.5	7	17	4
KL05-209	13	2603	6.5	7	3	2
KL10-685	UT	2603	6.5	7	3	2
KL09-603	1	154	0	0	8	2
KL12-819	7	1422	9.5	7	17	4
KL09-578	13	2603	6.5	7	3	2
KL09-548	1	598	0	8	8	2
KL10-679	1	1334	0	0	11	1
NIIB3710	1	507	13.5	7	25	4
NIIB3758	1	507	16.5	7	25	4
NIIB3150	1	22	15.5	8	26	5

表 2 : ST507 の MLVA 型

ID	Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13
NIIB2532	13.5	7	25	4	3	5
NIIB2630	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3309	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3758	16.5	7	25	4	3	5
NIIB3280	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3637	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3710	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3261	13.5	7	25	4	2	4
NIIB3204	13.5	8	27	4	3	11

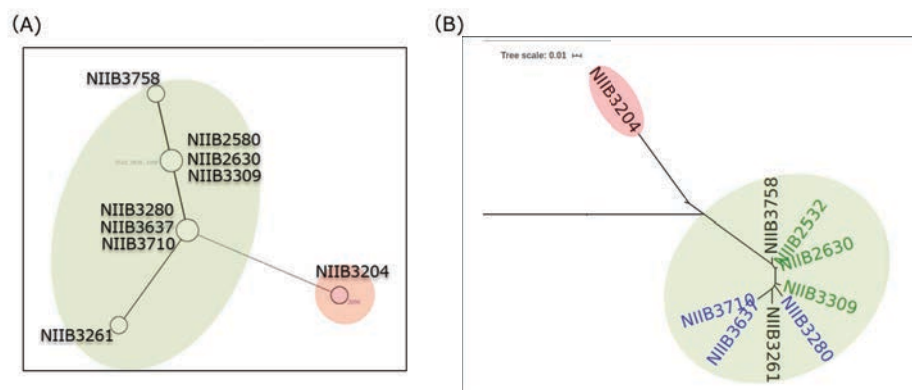


図1. ST507でMLVA型が異なる菌株の全ゲノム系統解析

(A) MLVAに基づくMST (B) コアゲノムSNPsに基づいた系統樹

表 3：同一 MLVA 型を示した菌株の ST

ID	SG	ST	flaA	piE	asd	m ip	m om pS	proA	neuA
N IIB1349	6	68	3	13	1	28	14	9	3
N IIB1759									
N IIB2843									
N IIB2552	12								
N IIB0815	6	114	3	6	1	6	14	11	9
N IIB1786									
N IIB1794									
N IIB3815	12								
N IIB2603	15	392	3	13	1	6	14	9	11
N IIB2487	6	537	3	13	1	28	12	9	3
N IIB2634									
N IIB3660	1	553	3	6	1	3	14	11	9
N IIB3914									
N IIB3410	1	561	3	6	1	6	14	11	1
N IIB2581	1	609	3	13	1	1	14	9	1
N IIB3464									
N IIB3645	1	622	3	13	1	3	9	9	9
N IIB3811	1	1077	3	6	1	1	14	11	1
N IIB0850	6	1992	3	6	1	6	11	11	9
N IIB3741	1	2311	3	7	1	3	5	11	11

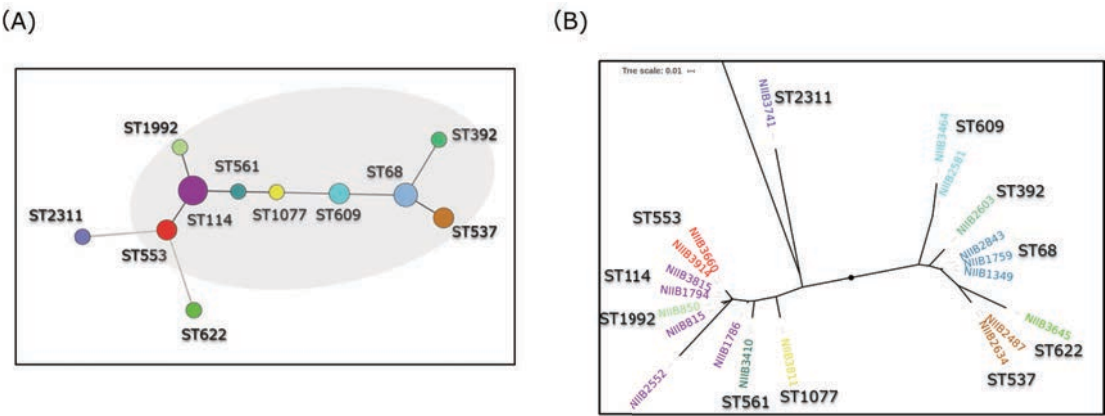


図2. MLVA型が一致でST型が異なる例。
(A) STに基づくMST (B) コアゲノムSNPsに基づいた系統樹

表4：集団事例Aにおける菌株のSTとMLVA型

菌株番号	分離場所	SG	PFGE	ST	allele番号							MLVA型											
					flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	Lpm31	Lpm01	Lpm35	Lpm33	Lpm34	Lpm13	Lpm19	Lpm03	Lpm40	Lpm38	Lpm39	Lpm44
B69	男2浴槽水	SG1	①	59	7	6	17	3	13	11	11	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
F9-1	男4-1ふき取り	SG1	②	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
F9-2	男4-1ふき取り	SG5	-	1417	8	6	34	9	2	8	209	15	8	8	3	1	8	0	7	4	0	10	0
F10	男4-2ふき取り	SG1	③	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
F14	女4ふき取り	SG1	④	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
F19	男2ふき取り	SG1	⑤	59	7	6	17	3	13	11	11	15	8	13	4	1	7	5	8	4	3	10	9
F20-1	男1ふき取り	SG1	⑥	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
F20-2	男1ふき取り	SG8	-	-	2	3	9	10	2	1	-	17.5	7	18	4	3	10	4	7	5	0	22	7
F25	男8ふき取り	SG1	⑦	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
SK1	患者2	SG1	⑧	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
SK2	患者3	SG1	⑨	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
S1ぬ	患者1	SG1	⑩	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
S5ぬ	患者4	SG1	⑪	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
S6ぬ	患者5	SG1	⑫	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9
S9ぬ	患者7	SG1	⑬	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9

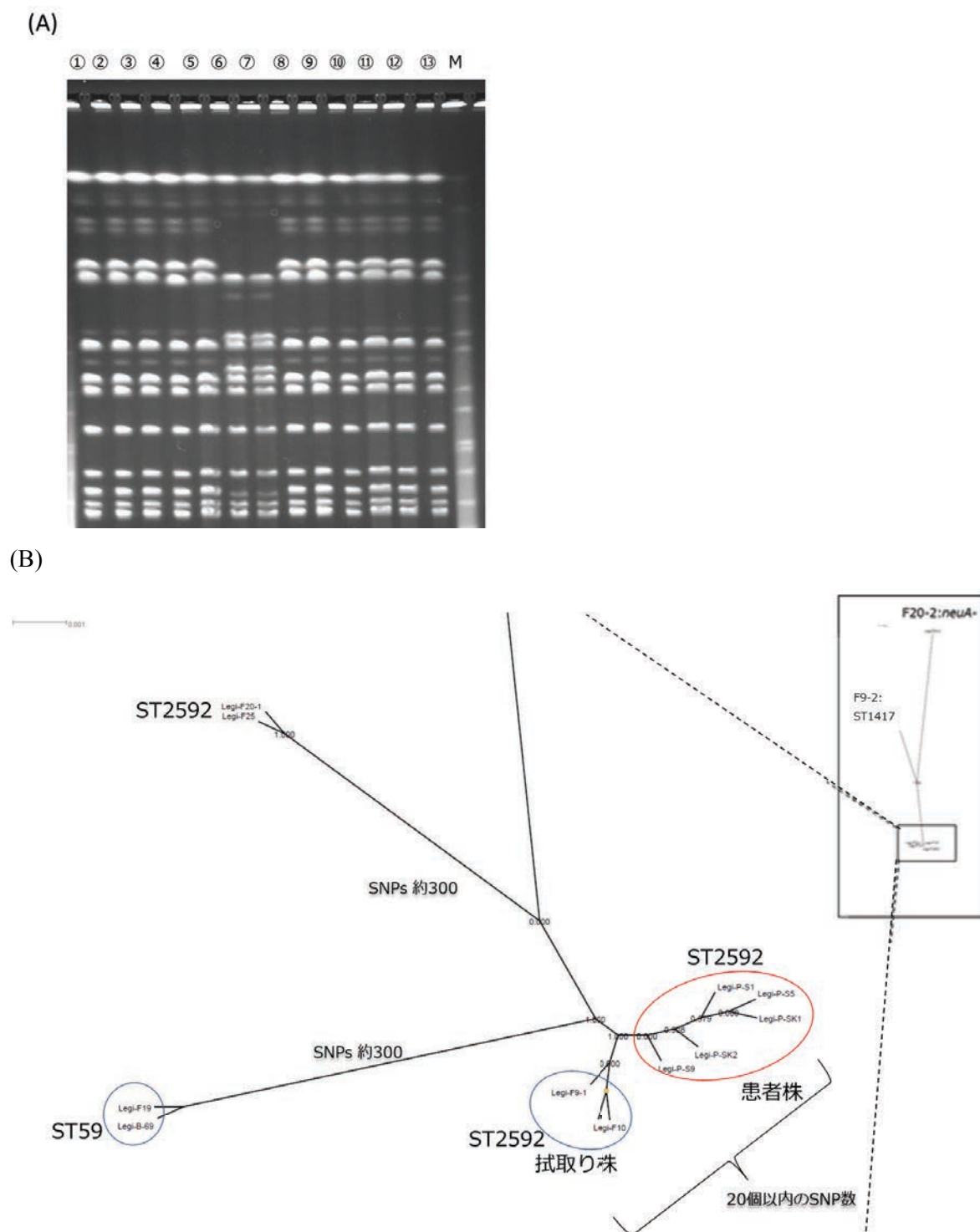


図 3 (A) 集団事例 A の PFGE。 (B) コアゲノム SNPs に基づいた系統樹

表5. 解析したMLVA領域と2nd primer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	CAGGCACACCTTGCCGCTCA
Lpms34 -2nd	Lpms34F_2nd	(FAM)-GAAAAGGAATAAGGCGCAGCAC
	Lpms34R_2nd	AAACCTCGTTGGCCCTCGCTT
Lpms35-2nd	Lpms35F_2nd	(PET)-CTGAAACAGTTGAGGATGYGA
	Lpms35R_2nd	TTATCAACCTCATCATCCCTG

表6. *L. pneumophila* SG1 439 株における各MLVA領域の増幅

MLVA 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

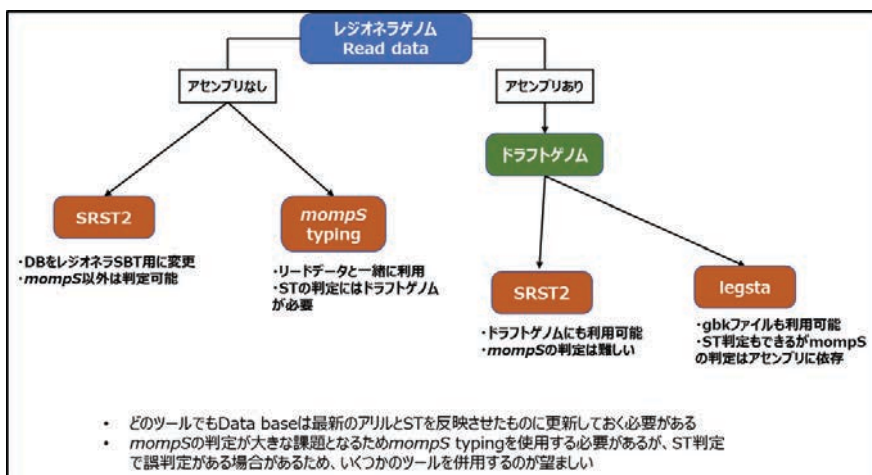
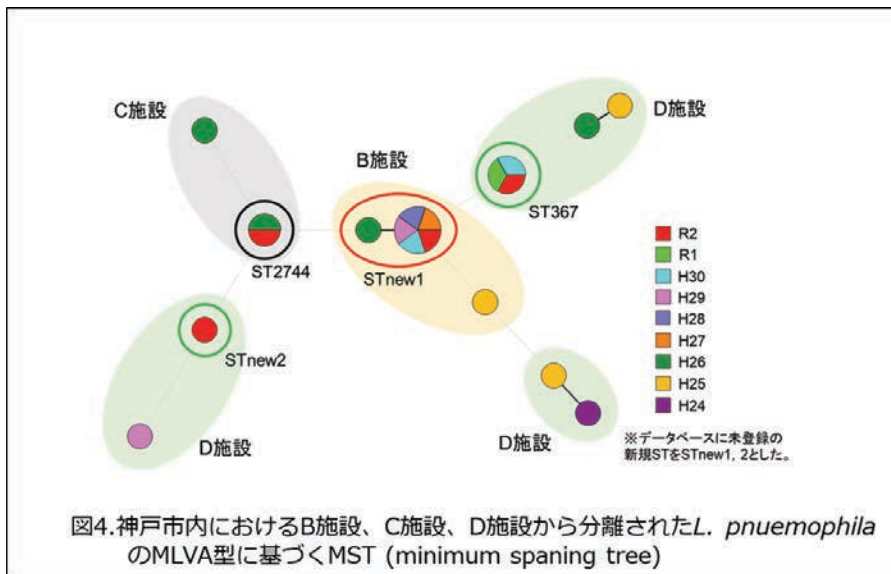


図 5:ゲノムデータを利用した *L.pneumophila* の SBT 解析フロー

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-3 年度総括・分担等研究報告書

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
	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
	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
	三津橋和也	北海道立衛生研究所
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所

研究要旨

1) 外部精度管理、2) 2018 年度外部精度管理に係るアンケート調査及び検査法技術指導(2019 年度)、3) 検査研修システムについて(2019 年度)について地方衛生研究所のレジオネラレファレンスセンター担当者を中心に検討を行った。

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 7 年連続で行われてきた。検査法については、配付試料がより安定した性能を維持できる範囲内で、検査工程のどの部分に重きを置くかの定義付けを行い、一部指定した。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所等については、独自に集計・解析を実施し結果の比較を行った。2021 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、新たな供試菌によるスタートとなった。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、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、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、今後も実施主体となる民間会社との連携が必要である。

アンケート調査からは、各検査機関の現状把握ができた一方で、検査が不安定な施設への対応が求められた。技術指導を行った施設においては、結果改善が認められ、引き続き直接技術指導を行う予定であったがコロナ禍で中断となっている。検査研修システムについては、民間企業と連携し規模を調整することで一定の基盤が整いつつあっ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。

A. 研究目的

レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組みとして、1) 外部精度管理、2) 2018 年度外部精度管理に係るアンケート調査及び検査法技術指導(2019 年度)、3) 研修システムについて(2019 年度)、検討を行った。

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)が参加者に向け発送された。解析結果は毎年度末に、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ることが案内で示された。

〈参加機関〉

2019 年度 161 機関(延べ 164 試料配付)、2020 年度 171 機関(延べ 180 試料配付)、2021 年度 184 機関(延べ 191 試料配付)に対し実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所等が2019年度 73機関、2020年度 72 機関、2021 年度 70 機関が参加した。

〈配付試料〉

信頼性においてメーカーにより品質と多施設への発送が保証されることから、例年通りビオメリュー社の BioBall(特注品)を使用した。なお、2021 年度はビオメリュー社より、これまでの菌

B. 研究方法

1) 外部精度管理

外部精度管理の実施

〈実施概要〉

2015 年度以降、実施母体を日水製薬株式会社(以下、日水製薬)とし、公的、民間を問わず全国の検査機関に案内を発信し外部精度管理が実施された。

まず日水製薬より「参加募集案内文、参加要件、指定法」(別紙(2021 年度実施分)参照)が示され参加募集が行われた。その後、試料、

株を変更する旨の連絡があり、2020 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(2021 年度実施分)参照)。また、2021 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。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。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所等については、独自に集計・解析を実施し、過去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%予測区間の数値に対し、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)に換算し、下限値、上限値を計算した。次に、実検体の非濃縮検体においては、分離平板上の1集落を 1000 cfu/100 mL と換算することから、結果は 1000 cfu の整数倍となる。このことを勘案し、前述計算した下限値については 100 の位を切り捨て、上限値については切り上げ補正した。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し、目標良好範囲を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、配付試料である BioBall の性能と参加機関の結果を鑑み 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、毎年度末に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システムとなっている。

2) 2018 年度外部精度管理に係るアンケート調査及び検査法技術指導(2019 年度)

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

これまでの外部精度管理において不安定な結果を複数回報告していた機関のうち、3 機関

に対し研究班員が訪問し検査工程の確認を行い、その場で検討会を行った。

3) 検査研修システムについて(2019 年度)

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

C. 研究結果及び考察

1) 外部精度管理

表 1 に 2021 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いするために、2016 年度までの報告菌数から見た判定による結果も記載した。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、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、その結果を次に生かすためのものである。目標良好範囲を報告した機関は、安定した検査環境を継続すること、目標良好範囲外の結果を報告した機関は検査法の再確認を行うこと等、それぞれの結果に応じた認識の共有と対応が必要である。特に複数年連続して目標良好範囲外の結果を報告している機関は、改めて検査手技を再確認する必要があると思われた。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。

2021 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、供試菌株の発育を大きく抑制することが分かっており^{1, 2)}、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 2、表 3 に示した。まず、表 2 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。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、例えば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、例えば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 3 に濃縮検体に対する結果を示した。本結果は、報告菌数から見た判定を当てはめ、供試菌の発育状況から比較を行った。全体的に表 2 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。

2) 2018 年度外部精度管理に係るアンケート調査及び検査法技術指導 (2019 年度)

アンケート調査で収集したコメントを表 4 に示した。良好範囲外の結果から改善したという機関のコメントを集約すると、

- ①濃縮をろ過濃縮法へ変更。
- ②ろ過フィルターをポリカーボネート製(ポアサイズ 0.2 μL)へ変更。
- ③ファネルの洗い出し工程を追加。
- ④培地への塗布方法を改善し、コンラージ棒によるソフトタッチな塗抹を意識した。
- ⑤培地の検討(種類、乾燥度合い)
- ⑥濃縮工程全体を見直し、ミスを改善。
- ⑦報告値の記載ミスがあったため、検査チェックシートを改善。
- ⑧レジオネラ属菌検査セミナー(日水製薬主催)に派遣して、改めて検査工程を確認。

一方、上手く改善が進んでいない機関のコメントを集約すると、

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

という内容になると思われた。改善点が明確で上手く対応できた機関がある反面、明確な改善点が見つからず苦慮している機関もあった。後者は、今回直接技術指導を行った 3 機関のうち 2 機関も同様の状況であった。現地で機材確認や検査担当者からも状況説明を受けたが、明確な問題点は見つからなかった。研究班からは、培地の取扱い、ろ過フィルターの洗い出し、培地塗布時のコンラージ棒によるソフトタッチな塗抹等を中心に、これまでの研究報告同様の説明をし、改めて検査全体を丁寧に実施することを心がけるよう求めた。これら 2 機関では、技術指導直後の外部精度管理において良好な結果報告がなされていた。このことから、研究班の確認により、機材や検査工程で問題がなければ、明確な改善ポイントが不明だった場合において、検査工程全体に対し改めて注意を払い、一つ一つの作業を丁寧に対応することが、改善に繋がる要素の一つと考えられた。一方、残る 1 機関は年間を通じて検査機会が少ない状況にあった。技術指導直後の外部精度管理においても良好な結果が得られなかったが、過去 3 年間の検査工程等に問題があったことが明確となり、改善に向け対応した結果、あと少しの検査工程の見直しにより、良好範囲に入る可能性の高い回収率 10%以上 20%未満の範囲での報告値となっていた。今後ポイントを押さえればより改善に向かうと思われた。今回、直接技術指導を行った機関では、いず

れも改善方向に進んでいると思われた。直接現場で検討会を行うことで、改善に向かう機関は他にもあると思われる。各検査機関で使用機材が異なること、検査の考え方や検査頻度等に違いもあるため、簡単ではない部分もあるが、今後も直接現場に出向き確認作業を行いたいと考える。2020、21年度は、コロナ禍の影響により技術指導は中断となっているが、状況を見極め対応したいと考える。

3) 検査研修システムについて(2019年度)

これまで継続的な研修という意味合いでは、2014、16、18年度(21年度も開催された)に、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修 新興再興感染症技術研修」内で、研究班推奨法に沿った実習を伴ったレジオネラ検査研修会がある。内容的には、充実したものであったが、その反面、規模が大きく、準備、調整には大きな労力と時間を要すること、今後継続できるかは不明であること、行政機関のみを対象にした研修会であったこと等が問題点として挙げられていた。一方、座学による研修会として、日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナーが毎年開催されている。しかしながら、座学のみであることから、毎年実習を伴った研修会についての要望を耳にしている。これまでも、公的、民間等対象となる検査機関を区別することなく、実習を伴った研修会を開催するための検討が研究班内でなされているが、主催者、場所、条件、予算、講師の養成等達成すべき課題が多く、難航していた。そこで2013年8月、2019年4月に、民間機関として実習を伴ったレジオネラ属菌検査研修実績のある関東化学株式会社に打診し、研究班との間で継続的な研修会実施に係る協議を行った。

その結果、規模を調整することで一定の基盤が整いつつあり、2020年度試行的に開催できるよう準備を進めていたところである。しかしながら、2020、21年度はコロナ禍の影響で中断となっている。直接の技術指導同様、状況を見極め対応したいと考える。

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、その結果を次に生かすためのものである。目標良好範囲を報告した機関は、安定した検査環境を継続すること、目標良好範囲外の結果を報告した機関は検査法の再確認を行うこと等、それぞれの結果に応じた認識の共有と対応が必要である。良好範囲報告機関割合を上げるためには、各機関において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

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

研修会

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

2020 年 2 月、東京都

- 3) 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

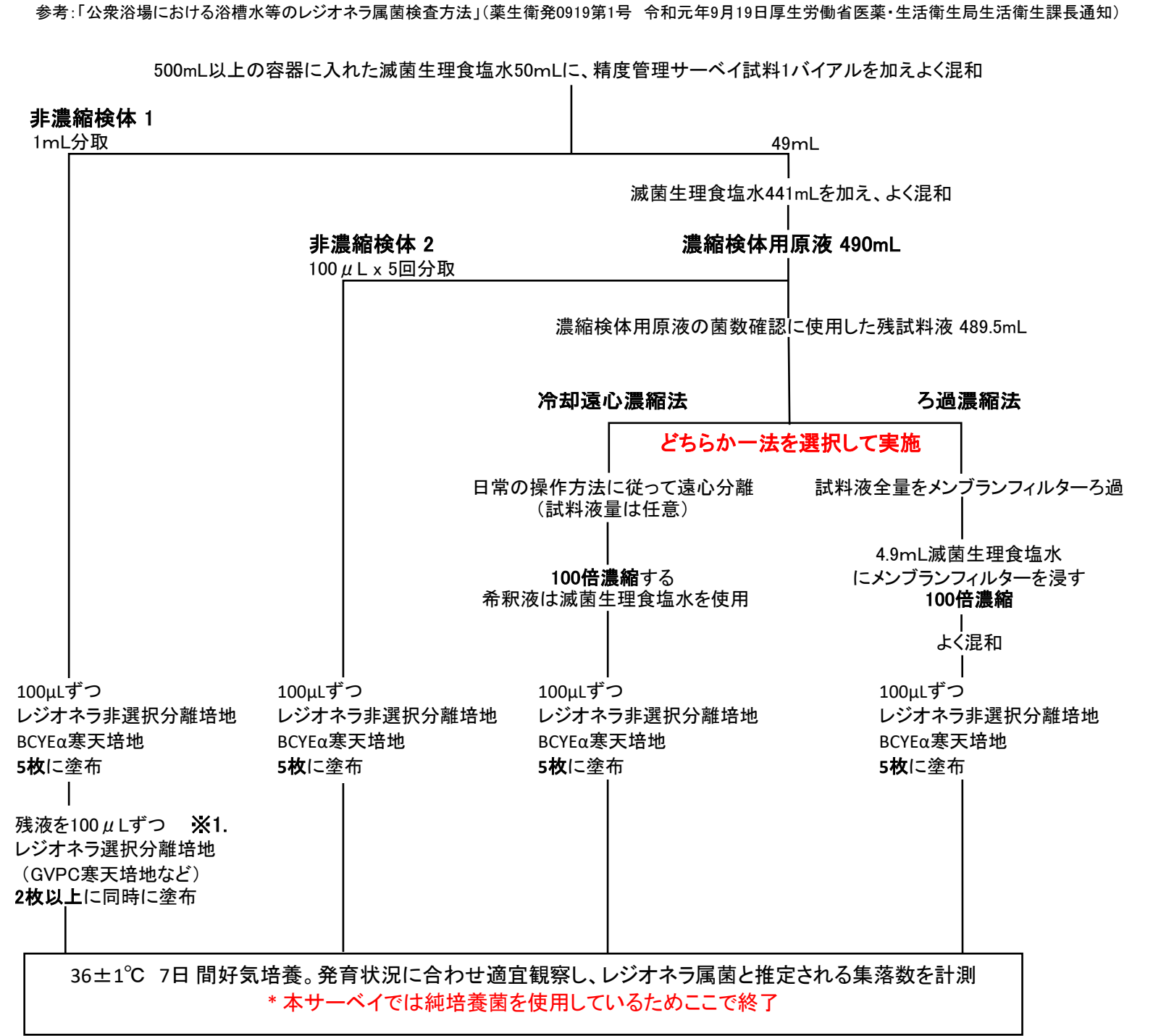
1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

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。

2021年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試料送付のご案内

謹啓 日頃は弊社製品をご愛顧賜り厚く御礼申しあげます。

この度は、2021年度レジオネラ属菌細菌検査精度管理サーベイにお申し込み頂きましてありがとうございます。精度管理サーベイ試料を送付させていただきますのでご査収のほど、よろしくお願い申しあげます。

謹白

記

1. 送付内容一覧

- ・ 試料送付のご案内（本案内状）
- ・ 試験概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6枚
- ・ 結果記入用メモ（Web入力する際にご活用ください）・・・・・・・・・・・・ 5枚
- ・ 試料受諾書兼承諾書・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1枚
- ・ 精度管理サーベイ試料A（瓶ラベルに「A」と記載）・・・・・・・・・・・・・・ 1本

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

2. 結果入力手順

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

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

3. スケジュール

期 日	内 容
2022年1月21日(金) 17時	■ 回答締切 検査を実施し、上記結果入力手順にそって結果の入力をお願いいたします。 回答期限を1/21（金）17時とさせていただきます。
2022年3月下旬	■ 解析結果開示 解析結果はコスモ会HP（ https://cosmokai.com/ ）より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPWを入力後、試験実施者様の画面にて解析結果の閲覧・印刷ができます。

4. お問い合わせ先

日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局
TEL：03-5846-5534 FAX：03-5846-5629 E-mail：legi-srvy@nissui-pharm.jp

以上

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

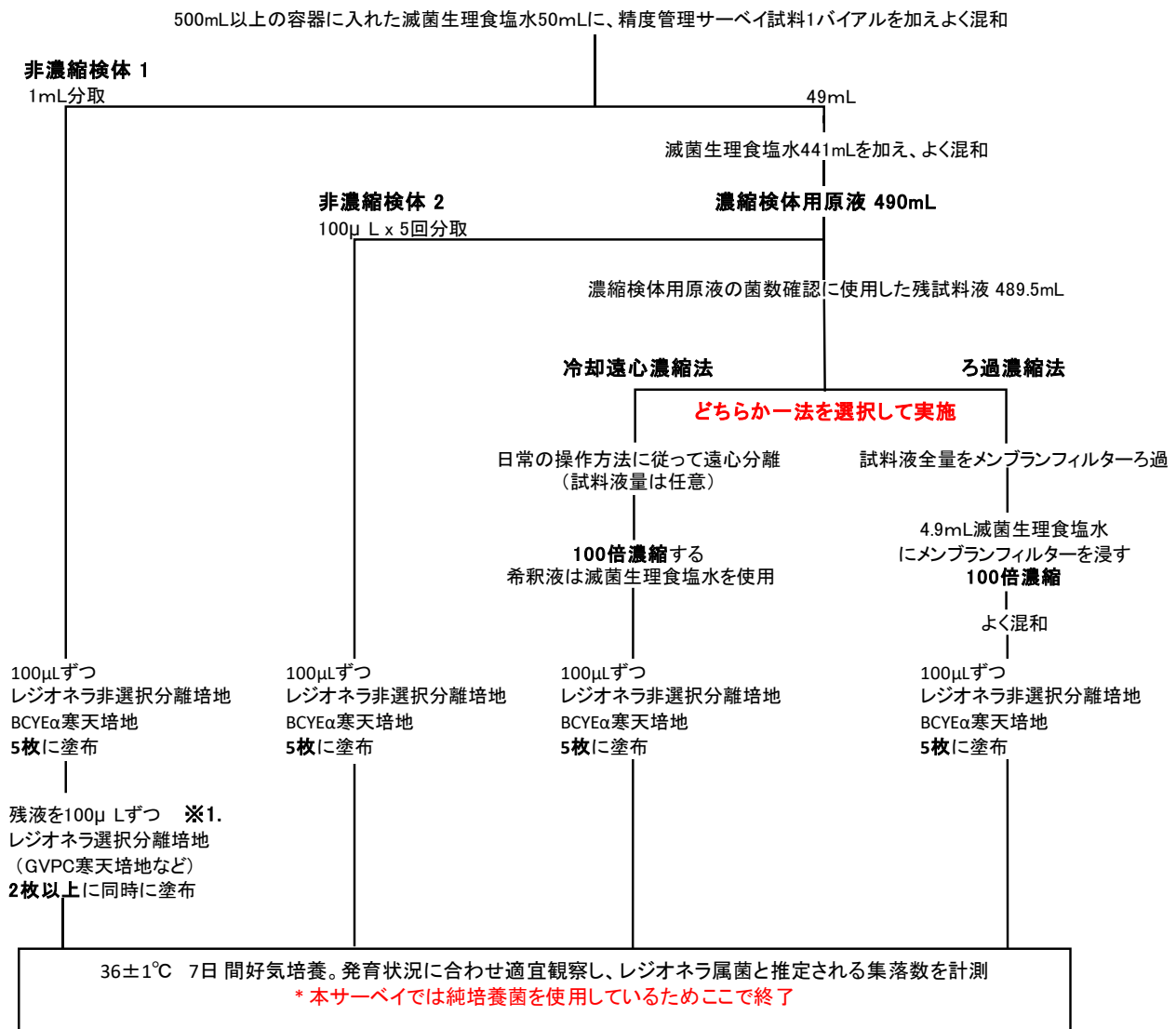
- (1) 結果の記入は、コスモ会HP (<https://cosmokai.com/>) より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPW (別送ハガキ参照) を入力してログインしてください。
- (2) 登録画面が表示されますので、ご登録内容をご確認ください。ご確認後は、ページの下にあります【変更なし データ入力画面へ進む】をクリックしてください。
- (3) データ入力画面に進み結果の入力が完了したら、ページの下にあります【入力内容を確認】をクリックし入力内容を確認してください。入力に間違いがなければ、ページの下にあります【送信】をクリックしてください。

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。

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

(5) 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、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料受領書兼承諾書を以て、サーベイ試料受領と菌株取扱いに関する承諾の確認とさせていただきます。

精度管理サーベイ試料の内容をご確認いただき、下記サーベイ試料受領書兼承諾書に必要事項をご記入のうえ、**1 月 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 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－）

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2 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
回答機能数	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3 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								

表4 アンケート調査コメント一覧

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

設問		
1: 機関名	全国集計	
2: 担当者名		
3: メールアドレス		
	選択番号	詳細コメント
4: 昨年度(2018年度)の自施設の外部精度管理の結果について		
1. 良好範囲 2. 良好範囲外 (1. の場合は8へ)	1: 52、2: 17	
* 4: で 2と回答した施設にお尋ねします。(5,6)		
5: 良好範囲外だったのは以下のどの結果でしたか？		
1. 菌数 2. 回収率 3. 両方	1: 0、2: 15、3: 2	A:濃縮検体について下限良好範囲外
6: 良好範囲外の結果を受け、何か改善を試みましたか？		
1. 試みた(その内容を記載下さい) 2. 試みなかった(理由等記載下さい)	1: 13、2: 4	1 A: 原因を推測し、改善措置および再発防止策として、以下の2点を行った。・ボルテックス操作の改善 ・検査担当者をレジオネラ属菌検査セミナーに派遣。 B: ろ過濃縮の手順を確認した。 C: 検査法を冷却遠心法からろ過濃縮法に変更した。 D: 保存菌株を用いて同様に試験を実施したが、菌数・回収率ともに問題はなかったため、原因がわからず苦慮している。 E: フィルターホルダーの洗い方を変えた。 F: ろ過濃縮の工程で、ろ過した後にホルダーをよく洗うこととした。 G: ボルテックスをかける時間を長くした。他自治体から情報収集を行っている。 H: 塗抹法の改善(濃縮検体の回収率が低かった。濃縮検体についてソフトタッチの塗抹を実施、培地辺縁に菌集落ができたが、単独コロニーでないため菌数算定から除外したことが原因と考えられた) I: 内部精度管理を実施し、全検査工程を確認した。その際に、フィルターや培地等の検討も行った。 J: 非濃縮検体の菌数は、良好範囲内なので、ろ過濃縮時に問題があると思われる。そのため、ろ過の工程を確認したが、不明な点等が多く苦慮している。 K: 全行程の振り返り検証を行ったが、改善箇所は判明しなかった。 L: 全検査工程の確認(試薬、フィルター等の器具機材、ワークシート)の確認を実施した。 M: 培地塗布数日後に生えたコロニーについて、遺伝子検査の結果、レジオネラ属菌陰性と判定した。さらに数日後に生えたコロニーについても同様の形態で陰性で見做したため、下限良好範囲外となった可能性があった。別日に生えたコロニーについても遺伝子検査するようにした。
* 6: で 1と回答した施設にお尋ねします。(7)		
7: 改善を試みた結果		
1. 改善箇所が判明した(具体的な改善策を記載下さい) 2. 改善箇所が判明しなかった(理由等記載下さい)	1: 4、2: 9	1 B: ろ過濃縮に使用した C: フィルターホルダーの使用方法を誤っていたことが分かった。 ろ過濃縮法に変更し、回収率が改善した。 H: 塗抹法の改善(菌液がある程度、培地に浸透するまで、ソフトタッチで塗布を行うこととした) I: BCYE α 培地の培地メーカーによる回収率に差があった。回収率がよく、コロニー形態も見やすい関東化学社のBCYE α 培地を用いることとした。また、ろ過濃縮後に壁面を200m L で洗い出したことで、回収率が良くなった。 2 A: 検証方法がないため。 F: 業務としては、喀痰検査は実施しているが、浴槽水検査を実施していないため。 G: 検査工程を確認してみたが、改善箇所を見つけることができていない。 J: ろ過工程のどこの段階で菌数が減少しているか、見つけることができていない。
8: 過去のサーベイの結果について		
1. 良好範囲外があった 2. 良好範囲外は無かった 3. 参加していない	1: 28、2: 36、3: 4、その他: 不明 1	1 参加、H28濃縮検体下限良好範囲外。 M: 2017及び2015年度は良好範囲外は無かった。2016年度は濃縮検体ろ過濃縮法が「下限良好範囲外」であった。 2015,2016年度のろ過濃縮法のみ下限良好範囲外。 N: 不明。 A: H29不 R: その他

表4 アンケート調査コメント一覧

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

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

ご協力ありがとうございました。

令和2-3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、令和2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TCID₅₀ (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量)より評価した。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効果を感染価の低下の程度により実験室レベルで評価したところ、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。これらの結果から、新型コロナウイルスは次亜塩素酸ナトリウムに高い感受性を示し、入浴施設の浴槽水の消毒に使用される0.4~1.0 mg/Lの濃度により短時間で不活化されることが明らかとなった。モノクロラミンはウイルスに対して次亜塩素酸ナトリウムよりも効果が低いことが知られており、新型コロナウイルスに対しても同様の結果が得られた。一方、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令和元年に発生し、世界的に感染が広がっている。わが国では令和2年に最初の感染者が報告され、その後多数の患者が発生している。当該ウイルスに感染すると高い割合で無症候性感染者が存在することが知られている。また、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、無症候性感染

者が入浴施設を利用した場合に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評価した。

B. 材料と方法

1. ウイルス株

評価には、SARS-CoV-2 ウイルス (AI/I-004/202 株; 国立感染症研究所より分与) と FeCoV (M91-26 株; 国立感染症研究所・前田健部長より分与) を用いた。ウイルスの培養には SARS-CoV-2 ウイルスは Vero E6 細胞を用いて、令和 2 年度は 1% fetal calf serum (FCS) 加 D-MEM 培地 (D-MEM (高グルコース) (L-グルタミン、フェノールレッド不含) 富士フイルム和光純薬) にて、令和 3 年度は 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にて、令和 2 年度のみ用いた FeCoV-2 ウイルスは fcwf-4 細胞を用いて 5%FCS 加 D-MEM 培地で 5%CO₂ 下、37°C で CPE が 80% になるまで培養した。ウイルス液は令和 2 年度は培養上清を 3,000 rpm, 10min 遠心して -80°C に保存した。令和 3 年度は培養上清を 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。

PBS 50ml に 0.5M 塩化アンモニウム液 243 μ L と 5% 相当の次亜塩素酸ナトリウム

溶液 65 μ L を混合し、これをモノクロラミン液とした。

3. 入浴施設の浴槽水

令和 3 年度に関東、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

令和 2 年度は 1%FCS 加 D-MEM 培地及び 5%FCS 加 D-MEM 培地を PBS で 100 倍に希釈し、これらの希釈液の遊離残留塩素濃度を 0.1~0.2 mg/L に調整するのに必要な次亜塩素酸ナトリウム液の量を定めることとした。

上記の必要量を定めるために、1%FCS 加 D-MEM 培地あるいは 5%FCS 加 D-MEM 培地の 100 倍希釈液 10ml に次亜塩素酸ナトリウム液あるいはモノクロラミン液を加えた直後に、遊離残留塩素濃度は DPD 法によりアクアブ AQ-201 (柴田科学) を用いて、モノクロラミン液を加えた場合の結合塩素濃度はヨード法によりアクアブ AQ-202 (柴田科学) を用いて測定した。

令和 3 年度は浴槽水の試料 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. TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose, 50%感染量)の測定

令和 2 年度は上記 1 で調製したウイルス液を PBS で 100 倍に希釈し、その 1ml に上記 4 で決定した所定量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えて実験時の遊離残留塩素濃度とし、25℃あるいは 41℃で 1、5、10 及び 20 分間曝露した。モノクロラミンにおける TCID₅₀ を測定する場合は、結合塩素濃度が 1、3、6mg/L になるように PBS で希釈したモノクロラミン液 1mL に 10μL のウイルス液を加え、1、5 及び 10 分間曝露した。曝露後に直ちに 0.1M チオ硫酸ナトリウムを加えて塩素を中和した。中和後、10 倍量の 1%FCS 加 D-MEM 培地 (SARS-CoV-2) または 5%FCS 加 D-MEM 培地 (FeCoV-2) で 10⁷ まで 10 倍段階希釈し、各希釈段階の液の 40μL を感受性細胞 (SARS-CoV-2 は VeroE6/TMPRSS2 細胞 ; FeCoV-2 は fcwf-4 細胞) を培養した 96 ウェルプレート の 6 ウェルずつ接種し、5%CO₂ 下、37℃で 4 日間 (SARS-CoV-2) あるいは 2 日間 (FeCoV-2) 培養した。各ウェルの細胞変性を観察し、Reed-Muench 法¹⁾ を用いて TCID₅₀ を計算した。さらに、未処理群と比較した処理群の TCID₅₀ に基づいてウイルスの生存率を求め、100-生存率 (%) を不活化率として算出した。

令和 3 年度は上記 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℃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 ウェルプレートの 4 ウェルずつ接種し、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

令和 2 年度に SARS-CoV-2 の次亜塩素酸ナトリウムとモノクロラミンによる消毒の効果を調べたところ、次亜塩素酸ナトリウムの遊離塩素濃度が 0.1mg/L では 20 分後に検出限界未満 (99.99%以上) まで不活化され、0.13mg/L では 1 分で検出限界未満 (99.99%以上) まで不活化された (表 1)。さらに、41℃では 0.10mg/L、0.11mg/L で 5 分で検出限界未満 (99.99%以上) まで不活化された (表 2)。FeCoV-2 では、0.16mg/L で 5 分後で検出限界未満 (98.89%以上) まで不活化された (表 3)。FeCoV-2 の方が消毒前の感染力価が低かったため、検出限界未満での不活化率が見かけ上、低く計算される。

SARS-CoV-2 と FeCoV-2 は遊離塩素に感受性が高く、低濃度であっても比較的短

時間で不活化されることが示された。この結果は、SARS-CoV-2 に近縁の SARS-CoV が汚水において 0.4mg/L の遊離残留塩素に 10 分で 100%不活化されたという報告と同様の結果となった²⁾。これは同報告において比較した大腸菌よりも感受性が高かった。

モノクロラミンの SARS-CoV-2 に対する効果は、25°Cにおいて 1mg/L では 10 分後では 75.9%、6mg/L では 10 分後に不活化率は 97.9%であり、次亜塩素酸ナトリウムに比べて不活化率が低かった(表4)。ウイルスはモノクロラミンに対して比較的抵抗性を示すとされており、pH7 の条件下での 3logCt 値はマウスノロウイルスは 26、コクサッキーウイルスは 390-710、アデノウイルスは 190-1,000 と報告されている³⁾。

令和 3 年度に関東、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5)。

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

温泉水の泉質によっては遊離残留塩素濃度を所定の濃度に維持することが難しい場合がある。このような場合は浴槽水における遊離残留塩素濃度を所定の濃度に維持する管理ではなく、範囲で管理している。新型コロナウイルスに対しては、浴槽水の遊離残留塩素濃度を 0.4~1.0 mg/L の範囲内で維持されていれば、短時間でウイルスを不活化することができることが今回の解析で明らかとなっている。レジオネラ対策のみならず、新型コロナウイルス対策として遊離残留塩素濃度を適切に維持することが重要である。

D. まとめ

次亜塩素酸ナトリウムとモノクロラミンの実験条件下での新型コロナウイルスに対する消毒効果を調べたところ、0.11mg/L、41°Cでは 5 分後の不活化率が 99.99%以上と、低濃度の遊離塩素濃度であっても新型コロナウイルスが高率に不活化された。

E. 参考文献

1. Reed, L. J., Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg.,27. 493-497, 1938.
2. Wag, X. et al.: Study on the resistance of

severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. J. Virological Methods, 126, 171-177, 2005.

3. Cromeans, T. L., Kahier, A. M., Hill, V. R.: Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1028-1033, 2010.

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 次亜塩素酸ナトリウム曝露時の SARS-CoV-2 の不活化率 (%) (25°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
0.09	0	99.84	99.94	99.96	99.84
0.10	0	99.98	99.95	99.94	> 99.99
0.13	0	> 99.99	> 99.99	> 99.99	> 99.99

ND: 実施せず

表2 次亜塩素酸ナトリウム曝露時の SARS-CoV-2 の不活化率 (%) (41°C)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
0.10	0	> 99.99	> 99.99	> 99.99	ND
0.11	0	99.98	> 99.99	> 99.99	ND
0.18	0	> 99.99	> 99.99	> 99.99	ND

ND: 実施せず

表3 次亜塩素酸ナトリウム曝露時の FeCoV-2 の不活化率 (%) (25℃)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
0.11	0	99.81	99.87	99.87	> 99.89
0.13	0	> 99.89	> 99.87	> 99.87	> 99.89
0.16	0	> 99.87	> 99.89	> 99.89	> 99.89

表4 モノクロラミン曝露時の SARS-CoV-2 の不活化率 (%) (25℃)

濃度(mg/L)	曝露時間 (分)				
	0	1	5	10	20
1	0	82.68	85.21	75.94	ND
3	0	63.95	85.21	79.73	ND
6	0	91.26	90.26	97.85	ND

ND: 実施せず

表5 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

令和元年度～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」
分担研究報告書

「入浴施設・医療機関のレジオネラ汚染実態調査
および
次世代シーケンサーを用いたレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討」

	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

入浴施設はしばしばレジオネラ属菌により汚染され、集団事例の原因となることがある。また医療機関においてはレジオネラ属菌による汚染が明らかとなっており、重要な課題となっている。そこで、本研究では入浴施設および医療機関においてレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施してきた。

2015年からレジオネラ属菌の汚染実態調査を継続している神奈川県内の1入浴施設において、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。この間に、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、2019年度の調査では、10～200 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出された。さらに、2020年度の新型コロナウイルス感染症に伴う緊急事態宣言に基づく休業期間における衛生管理を経て、2021年度には1カ所から20 CFU/100 mLの *Legionella pneumophila* SG 6 が検出されるのみとなった。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。

医療機関における汚染実態調査では1医療機関を継続して調査しており、これまで塩素添加装置の設置、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。一部蛇口において、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もの

の、レジオネラ属菌が検出された。しかし、20 CFU/100 mL と少ない菌数であり、複数回の調査において断続的に検出されたことから、レジオネラ属菌の増殖は抑制されているものの、完全に排除されきらず深部配管のバイオフィームから供給されているものと考えられた。

次世代シーケンサーによる分子疫学的解析法の検討として、入浴施設において分離されたレジオネラ属菌の SNPs 解析および神奈川県において 2015 年に発生したレジオネラ属菌の集団事例の SNPs 解析を実施した。近年、次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されている。しかし、行政検査での利用はあまり進んでおらず、レジオネラ属菌の集団発生事例や入浴施設の管理への応用など、その利用法には検討の余地がある。そこで我々は、これまで 2015 年から調査を継続してきた神奈川県内の入浴施設で検出されたレジオネラ属菌を用いて、サンガー法による Sequence-Based Typing (SBT) 解析、および次世代シーケンサーによる Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施した。SBT 解析では同じ Sequence Type (ST) とされた複数の菌株において、SNPs 解析でも同一もしくは数 SNPs の違いであったことから同一のクローンを起源とする菌株が継続して検出されている可能性が示唆された。これらの菌株には、この施設において、一年以上にわたり検出されているものや、異なる浴室から検出されたものが含まれていた。このため、この入浴施設内にレジオネラ属菌の供給源があるものと推察された。集団事例の株を用いた SNPs 解析では、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

1) 入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査

日本ではレジオネラ属菌の感染源の一つとして入浴施設が知られており、しばしば集団発生を引き起こす^{1, 2, 3)}。ヒト-ヒト感染はおこらないことから⁴⁾、感染源とな

る環境におけるレジオネラ属菌の制御が重要となる。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、汚染実態調査を実施した。

調査対象とした入浴施設では、2015 年度から継続して、カランやシャワー等 8 ヲ所

の採取を実施してきた。2017 年度までに、毎日のフラッシングの導入、カランとシャワーの交換、配管の高濃度塩素消毒を実施した。高濃度塩素消毒を実施した直後の調査では、レジオネラ属菌の DNA は検出されたものの、全ての検体においてレジオネラ属菌の培養は不検出となった。しかし、その後の調査において、最大 3,000 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出された。このため、次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置した。しかし、その後の 2018 年度の 2 回の調査において、計 5 か所から 10~400 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出された。また、これらの対策に加えて、実施時期は不明ではあるものの、不要な配管の切除もおこなっていた。

この入浴施設では、2018 年度以降にも新たに対策を追加したことに加えて、2020 年度には 4 月~5 月にかけて、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言（以下、緊急事態宣言）により休業し、その期間に配管内の遊離残留塩素濃度を高く維持していた。これらの対策の評価を目的として、2019~2021 年度においても調査を継続した。

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が、病院内の環境管理の重要な課題となっている⁵⁾。このため、レジオネラ属菌汚染の対策の一環として、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。

調査対象である 1 医療機関ではこれまで

塩素添加装置の設置、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。この医療機関では、本研究の途中過程において、一部蛇口に設定時間ごとに自動でフラッシングを行う自動排水装置を導入しており、その評価も含めて汚染実態調査を行った。

3) 次世代シーケンサーによるレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

近年になって急速に次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されている。しかし、レジオネラ属菌において利用されている例は少なく、集団発生事例や入浴施設の管理への応用など、その利用方法は検討の余地がある。

そこで本研究では入浴施設でのレジオネラ属菌の動態解析および集団発生事例におけるレジオネラ属菌における全ゲノム解析の有用性の検討を目的として、上記の入浴施設の汚染実態調査において分離された株および神奈川県において 2015 年に発生したレジオネラ症集団事例^{2, 3)}において分離された菌株を用いて、サンガー法による Sequence-Based Typing (SBT) 解析および次世代シーケンサーによる Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施し、比較した。

B. 研究方法

1) 入浴施設および医療機関におけるレジオネラ属菌汚染実態調査

1-1) 調査対象および測定項目

(1) 入浴施設

神奈川県内の 1 入浴施設において、2019 年度は 9 月に 1 回、2020 年度は緊急事態宣

言による休業からの営業再開前日（5月）、再開後約1ヶ月後の7月、約3ヶ月後の9月、約5ヶ月後として10月、11月の計5回採取した。2021年度は10月に1回採取した。これらの調査において、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。ただし、2020年度の10月の採取については、上記の採取箇所のうち2つの浴室のカラン計4ヵ所において給水系のみを採取した。

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医療機関を対象とし、洗面台等の蛇口水は、放水直後及び3L流水後について、さらには給水系および給湯系を分けられる場合には分けて採取した。6ヵ所(地下控室1ヵ所、倉庫内1ヵ所、病室洗面台4ヵ所)から、計12試料を、2019年9月、2020年10月、および2021年7月に採取した。さらに、採取した6ヵ所のうち自動排水装置を設置した病室洗面台4ヵ所について2021年8月および同9月にも採取した。

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、従属栄養細菌数の

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。

1-2) 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1.0mLを添加した500mL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50mL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。

1-3) レジオネラ属菌の分離

試料500mLを、直径47mm、孔径0.2μmのポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、5mLの50倍希釈PBSで再浮遊した(以下、濃縮試料とする)。濃縮試料0.5mLについて、50℃、20分の加熱処理を行った。別の0.5mLに同量のpH2.2緩衝液を加え、4分間酸処理した。未処理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100μLをMWY寒天平板培地(Oxoid)及びGVPC寒天平板培地(日水製薬)に塗抹し、36℃で7日間培養した。レジオネラ属菌を疑う集落をBCYEα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。

1-4) Loop-Mediated Isothermal Amplification (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。1-3) 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。

1-5) 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^{6,7)} 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。

1-6) 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 °C で 7 日間培養した。培養後、集落数を計数した。

2) 次世代シーケンサーによるレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

2-1) 使用菌株

(1) 入浴施設

本研究においてレジオネラ属菌汚染実態調査を実施している入浴施設において、2018 年 1 月から 2020 年 10 月までに検出された *Legionella pneumophila* (SG1: 8 株, SG6: 5 株, SG9: 5 株) について供試した (表 1(1))。

(2) 集団事例

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))。

2-2) 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*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) を PCR により増幅し、サンガー法により、その塩基配列を決定した。決定した塩基配列をデータベースと比較し、各遺伝子のアレル番号と ST 型を決定した。

2-3) SNPs 解析

菌株からの DNA 抽出は QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出した DNA を用いて Colibri™ PCR-free ES DNA Library Prep Kit (Thermo Fisher Scientific) または QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) によりライブラリを調整し、iSeq100 System (illumina) により、リードデータを得た。

本研究における汚染実態調査の対象である入浴施設から分離された菌株のリードデータのマッピングに用いるリファレンス配列は、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia (アクセッション番号: AE017354) とした。集団発生事例の分離株のリードデータのマッピングに用いるリファレンス配列は、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) のうち、供試菌株と kmer に基づくゲノムの

類似性が最も高い株の配列とした。kmer は供試菌株のリードデータを KmerID (<https://github.com/phe-bioinformatics/kmerid>) により比較することにより得た。

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 Workbench (QIAGEN) を用いてアライメントし、比較した。

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間に設置されている。

2019 年 9 月の調査ではレジオネラ属菌は浴室 A の 2 つのカラン並びに浴室 B のカランから検出された。浴室 A の 1 つのカランから *L. pneumophila* SG9 が 10 CFU/100 mL 検出された(表 2)。もう一方のカランでは、*L. pneumophila* SG1、6 及び *Legionella* sp. が 200 CFU/100 mL 検出された。pH は 8.0~8.4 であり、地下タンクの遊離残留塩素濃度は 0.01 mg/L であった。それ以外の遊離残留塩素濃度は、浴室 A の浴槽水で 3.45 mg/L、浴室 B の浴槽水で 3.35 mg/L と高いものの、その他は 0.15~0.37 mg/L と全体的に低く、レジオネラ属菌の増殖が充分抑えられてい

ないものと考えられた。また、温度は地下タンクおよび高置タンクでそれぞれ 56.9°C および 55.3°C と 55°C 以上を示しており、その他は、33.0~41.5°C であった。

2020 年度において聞き取りをした結果、緊急事態宣言に基づく休業期間中は、以下の 4 点の対策を実施していた。1) 3 日に一回程度、汲み上げポンプを稼働させたうえで、次亜塩素酸ナトリウム添加装置を稼働し、カランのフラッシングを 30 分程度実施した。2) 4~5 日に 1 回カラン、シャワー及び浴槽水の遊離残留塩素濃度を比色法 (DPD 法) により測定し、0.8~2.0 mg/mL に維持されていることを確認した。3) 加えて、浴槽水に別途次亜塩素酸ナトリウムを追加するとともに、地下タンクにも添加した。4) ろ過装置の逆洗浄を週 1~2 回実施した。

緊急事態宣言による休業からの再開前は、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 年度の調査における 5 月の営業再開

前日には、1 ヵ所から 80 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 及び *Legionella* sp.が、約 1 カ月後の 7 月には同じ採取箇所から 10 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 が検出されるのみとなった。しかし、営業再開後から約 3 カ月後の 9 月の調査では 3 ヵ所から 10~20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6、9 及び *Legionella* sp.が検出され、約 5 カ月後の 11 月の調査では 2 ヵ所から、それぞれ 60 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 及び 9 が検出された（表 2）。本調査により採取したカラン、シャワー及び湯口からの採取試料は、pH 8.0~8.2 であった。遊離残留塩素濃度は、営業再開前日の調査では 1.3~1.9 mg/L で、7 月は 0.1~0.9 mg/L、9 月は 0.5~1.7 mg/L、11 月は 0.4~0.7 mg/L であった。5 月の営業再開前日の調査では地下タンクが 50.0℃、高置タンクが 45.4℃で、その他は 29.2~42.2℃であった。これは、地下タンクおよび高置タンクともに休業期間中の原湯の引き込み量の低下に伴い、温度が低下したものと考えられた。7 月、9 月、11 月の調査では、地下タンクは 54.9℃以上、高置タンクは 55.3℃以上で、その他は 30.9~50.2℃であった。

2020 年度の調査結果を踏まえて、上記 1)~7) の対策に加えて、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、施設管理者の点検において、定休日明けであって

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。

2021 年度調査において分離試験では、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 2）。また、pH は 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℃、高置タンクが 55.3℃、その他は 32.7~47.2℃であった。

年度を経るに従い、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たことから、この施設において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 年の休業期間中の衛生管理により、大幅にレジオネラ属菌が減少し、その後、配管内の温泉水の停滞防止といった遊離残留塩素を保つために実施した対策が効果を示したことによ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 2015 年の調査開始以来、レジオネラ属菌の分離培養、LAMP とともに陰性であり、今回のいずれの調査でも同様であった。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、2021 年度も分離培養は陰性であるものの、LAMP は陽性であった。これは、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塩素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、2021 年度の調査でも 55.7 °C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。

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

調査対象の1医療機関における2019年の調査時には、病室の2カ所から採取した4試料から、*L. pneumophila* SG1が検出され、菌数は10~20 CFU/100mLであった(表3)。*L. pneumophila* SG1が検出された試料の遊離残留塩素濃度は0.8~1.2 mg/Lであった。一方で、従属栄養細菌数の高かった、倉庫給水系初流水および3L 流水後ならびにA病棟病室2 初流水は、遊離残留塩素濃度が検出限界付近であり、ほとんど塩素が消失していたが、レジオネラ属菌は分離されなかった。

2020年の調査では、1カ所から採取した2試料から*L. pneumophila* SG1が検出された。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。このうち、倉庫については、2019年11月に、残り3カ所については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カ所中、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カ所12試料すべてで、 $1.0\sim6.8\times10^3$ 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カ所8試料すべてにおいて、 $2.0\sim8.9\times10$ CFU/mLの発育を認めた。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 $2.0\sim6.9\times10$ 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 $0\sim6.7\times10$ CFU/mLと低く抑えられており、変化は認められなかった。

2021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おり、毎日実施していたフラッシングの効果と考えられた。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と考えられた。

3) 次世代シーケンサーによるレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

3-1) 入浴施設における次世代シーケンサーを用いたレジオネラ属菌の動態解析

本研究において、レジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した入浴施設から分離された菌株の SBT 解析において、SG 1 は KL2064 のみが Sequence Type (ST) 1 であり、その他はすべて ST552 であった。SG6 は 5 株すべてが ST191 であった。SG9 はすべて ST2693 であった。(表 4)。

SNPs 解析は *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia をリファレンス配列として、血清型ごとに実施した。SG1 では 11,489 の SNPs が得られた。全 8 株中、KL2064 を除く 7 株の SNPs は全て一致した。KL2064 の SNPs は、7,176 の SNPs が他の株と異なっていた(表 5 (1))。SG6 では 36,119 の SNPs を得られた。SG6 であった株は SBT 解析ではすべて同じ ST であったものの、SNPs 解析では 1~4 つの SNPs が異なる 3 つの遺伝子型に分けられた(表 5 (2))。SG9 では 87,741 の SNPs を得た。SG9 であった株は SBT 解析ではすべて同じ ST であったものの、SNPs 解析では 1~2 つの SNPs が異なる 3 つの遺伝子型に分けられた(表 5 (3))。

SBT 解析において同じ S であった菌株は、SG1 では SNPs 解析でも全て一致しており、SG6 および SG9 では数塩基異なるのみであ

った(表 5 (1)、(2)、(3))。SNPs 解析は SBT 解析よりも分解能が高いとされていることに加え⁸⁾、Raphael らはニューヨーク州におけるアウトブレイクを起こした SG 1 の解析において、特定のアウトブレイクに関連した分離株は、コア SNPs の違いが 5 つ以下であったことを報告している⁹⁾。これらのことから、本研究において SBT 解析により ST が一致した菌株については同じクローンを起源としている可能性が高いと考えられた。2018 年 1 月に検出された SG1 である KL1997 と同じ遺伝子型であった菌株は、2018 年 10 月および 2019 年 9 月においても検出された(表 1、5 (1))。加えて、この遺伝子型の SG1 は、浴室 A のカランから KL1997 を含む 6 株が、浴室 B から KL2104 が検出されていることから(表 1、5 (1))、この遺伝子型の SG1 は配管の末端で維持されているものではなく、これら浴室の共通部分に供給源があると考えられた。2020 年 5 月以降、SG1 は検出されていないため(表 2)、この遺伝子型の排除に成功した可能性があるが、引き続き注視する必要があると考えられた。

2020 年度に実施した 5 回の汚染実態調査うち、4 回目までに検出された SG6 及び 9 のすべてを次世代シーケンス解析に供試した。その結果、2020 年度に検出された菌株は 2019 年度以前から検出されていた菌株と同じ遺伝子型もしくは近縁株であり、休業期間中に新たに SG6 および 9 が侵入した可能性は低いと考えられた。このことからこの入浴施設内のどこかにこれらレジオネラ属菌の供給源があり、排除できていないものと考えられた。

本研究においては SBT よりも高い分解能

を持つとされる SNPs 解析により、同一のクローン由来と考えられるレジオネラ属菌が継続してこの入浴施設から検出されていることが明らかとなった。今回解析した菌株はこれまでこの入浴施設から検出された菌株のごく一部であり、今後さらに供試菌株を増やすことで、これまでに実施したレジオネラ属菌の対策の前後でどのように菌叢が変化するかを解析することが可能と考えられた。

3-2) レジオネラ属菌の集団事例における全ゲノム解析の検討

SBT 解析の結果、*L. pneumophila* SG 1 は 7 株が ST2114、1 株が ST2121 だった(表 6)。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^{2, 3)}。

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 7(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 7(2))。

Reuter ら¹⁰⁾ 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¹¹⁾ 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 7 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⁸⁾。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³⁾。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ー埼玉県 (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ー神奈川県(IASR Vol. 37 p. 140-141: 2016 年 7 月号)
3. Kuroki T, et al.: Outbreak of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella pneumophila* Serogroups 1 and 13. *Emerg. Infect. Dis.*, 2017, 23, 349–351.
4. レジオネラ症 2008.1~2012.12 (IASR Vol. 34 p. 155-157: 2013 年 6 月号)
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)、令和元年度分担研究報告書より
6. 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.
7. Mahbubani MH, et al.: Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Molecular and Cellular Probes*, 4: 175-187, 1990.
8. David, S. et al.: Evaluation of an Optimal Epidemiological Typing Scheme for *Legionella pneumophila* with Whole-Genome Sequence Data Using Validation Guidelines. *J Clin Microbiol*, 2016, Vol 54,

- p. 2135-2148.
9. Raphael, B.H. et al.: Genomic resolution of outbreak-associated *Legionella pneumophila* sero-group 1 isolates from New York State. Appl. Environ. Microbiol., 2016, 82, 3582–3590.
10. 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.
11. Graham RMA,: Real-time investigation of a *Legionella pneumophila* outbreak using whole genome sequencing. Epidemiol Infect, 2014, 142, 2347–2351.
- 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 全ゲノム解析に供試した菌株

(1) 入浴施設

採水場所	菌種	血清型	採水年月	菌株番号
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2064
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2018年10月	KL2065
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2019年9月	KL2106
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2020年9月	KL2162
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2020年10月	KL2170
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年1月	KL1997
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年1月	KL2000
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2066
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2069
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2108
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2112
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2018年10月	KL2071
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2019年9月	KL2110
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年5月	KL2155
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年7月	KL2160
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年9月	KL2166
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	9	2018年10月	KL2068
浴室Bカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2104

(2) 集団感染事例

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 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3 医療機関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

表 4 入浴施設から分離されたレジオネラ属菌の SBT 解析

血清型	菌株番号	SBT								採水場所	採水年月
		ST	<i>flaA</i>	<i>piE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>		
1	KL2064	1	1	4	3	1	1	1	1	浴室A カラン1	2018年10月
1	KL1997	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室A カラン2	2018年1月
1	KL2000	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室A カラン2	2018年1月
1	KL2066	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室A カラン2	2018年10月
1	KL2069	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室A カラン2	2018年10月
1	KL2108	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室A カラン2	2019年9月
1	KL2112	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室A カラン2	2019年9月
1	KL2104	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室B カラン2	2019年9月
6	KL2071	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室A カラン2	2018年10月
6	KL2110	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室A カラン2	2019年9月
6	KL2155	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室A カラン2	2020年5月
6	KL2160	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室A カラン2	2020年7月
6	KL2166	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室A カラン2	2020年9月
9	KL2065	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室A カラン1	2018年10月
9	KL2106	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室A カラン1	2019年9月
9	KL2162	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室A カラン1	2020年9月
9	KL2170	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室A カラン1	2020年10月
9	KL2068	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室A カラン2	2018年10月

表 5 入浴施設から分離されたレジオネラ属菌の SNPs 解析

(1) *Legionella pneumophila* SG1

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2064	KL1997	KL2000	KL2066	KL2069	KL2104	KL2108	KL2112
浴室A カラン1	2018年10月	KL2064		7176	7176	7176	7176	7176	7176	7176
浴室A カラン2	2018年1月	KL1997			0	0	0	0	0	0
浴室A カラン2	2018年1月	KL2000				0	0	0	0	0
浴室A カラン2	2018年10月	KL2066					0	0	0	0
浴室A カラン2	2018年10月	KL2069						0	0	0
浴室A カラン2	2019年9月	KL2104							0	0
浴室A カラン2	2019年9月	KL2108								0
浴室B カラン2	2019年9月	KL2112								

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

(2) *Legionella pneumophila* SG6

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2071	KL2110	KL2155	KL2160	KL2166
浴室A カラン2	2018年10月	KL2071		0	4	3	3
浴室A カラン2	2019年9月	KL2110			4	3	3
浴室A カラン2	2020年5月	KL2155				1	1
浴室A カラン2	2020年7月	KL2160					0
浴室A カラン2	2020年9月	KL2166					

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

(3) *Legionella pneumophila* SG9

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2065	KL2106	KL2162	KL2170	KL2068
浴室A カラン1	2018年10月	KL2065		1	1	1	2
浴室A カラン1	2019年9月	KL2106			0	0	1
浴室A カラン1	2020年9月	KL2162				0	1
浴室A カラン1	2020年10月	KL2170					1
浴室A カラン2	2018年10月	KL2068					

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

表 6 集団発生事例におけるレジオネラ属菌の 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 7 集団発生事例におけるレジオネラ属菌の 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

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

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.	J Clin Microbiol.	59	e0015721	2021
金谷潤一、磯部順子、山口友美、武藤千恵子、淀谷雄亮、飯高順子、佐々木麻里、田栗利紹、蔡 国喜、川野みどり、倉文明、前川純子	環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価	日本防菌防黴学会誌	48	515-522	2020
Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S.	Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy.	Journal of Hot Spring Sciences	70	50-60	2020
森 康則、赤地重宏、永井佑樹、吉村英基、泉山信司	温泉付随ガス分離設備におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策.	温泉科学	69	192-201	2020
大河内由美子、泉山信司、前川純子	紙上ミニシンポジウムI～水の衛生管理～3.貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況	日本防菌防黴学会誌	48	377-382	2020

Nakamura I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kobayashi T, Sao A, Watabane H, Matsumoto T.	Persistent Legionella contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan	Int J Infect Dis	93	300-304	2020
Inoue H, Baba M, Tayama S.	Evaluation of Legiolert for Quantification of Legionella pneumophila from Bath Water Samples	Biocontrol Sci	25	179-182	2020
倉 文明	Special feature 知る・学ぶ・実践する 水回りの感染制御、水回りの環境調査の実践 — 検査の方法・対象・頻度とその活用術.	感染対策 ICT ジャーナル	15	301-305	2020
倉 文明	IV. 感染症-22 レジオネラ症	小児内科	増刊号 52	925-930	2020
Jiang L*, Amemura-Maekawa J*, Ren H, Li Y, Sakata M, Zhou H, Murai M, Chang B, Ohnishi M, Qin T (*: contributed equally)	Distribution of lag-1 Alleles, ORF7, and ORF8 Genes of Lipopolysaccharide and Sequence-Based Types Among <i>Legionella pneumophila</i> Serogroup 1 Isolates in Japan and China.	Front Cell Infect Microbiol	9	274	2019
森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛治, 田中慶一郎, 茶山忠久, 西智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司	次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証—三重県津市の榊原温泉における検討—	温泉科学	69	90-102	2019
杉山寛治	「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アムニバ検出とその制御 8 浴槽のレジオネラ対策 1 浴槽のどこで、どのように増えるのか」	日本防菌防黴学会誌	47	83-89	2019
杉山寛治	「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アムニバ検出とその制御 9 浴槽のレジオネラ対策 2 浴槽水の各種消毒方法の効果」	日本防菌防黴学会誌	47	117-123	2019

杉山寛治	「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御10 浴槽のレジオネラ対策3 モノクロラミンによる消毒方法について」	日本防菌防黴学会誌	47	159-166	2019
倉 文明	給湯・給水系に潜むレジオネラ感染症	感染症	287	10-17	2019
磯部順子, 金谷潤一, 木全恵子, 内田 薫, 加藤智子, 綿引正則	富山県における浴用水中 <i>Legionella</i> 属菌の分離状況	富山県衛生研究所年報	42	39-43	2019
中植竜大, 前川純子, 村井美代	グラム陰性菌のリポ多糖の構造と合成経路の多様性－ <i>Legionella pneumophila</i> の遺伝子検査による血清群別に向けて－	保健医療福祉科学	8	40-47	2019