

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  
公衆浴場の衛生管理の推進のための研究  
令和4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 泉山 信司

令和5（2023）年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
公衆浴場の衛生管理の推進のための研究-----	4
泉山 信司	
II. 分担研究報告	
1. モノクロラミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析-----	35
柳本 恵太、植松 香星、望月 映希、鶴田 芙美、山上 隆也、 久田 美子、田中 慶郎、杉山 寛治、茶山 忠久、市村 祐二	
2. <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> の 不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対する モノクロラミン消毒効果の有効性-----	49
森 康則、永井 佑樹、豊田 真由美、亀山 有貴、谷本 健吾、 佐藤 大輝、山本 哲司、細川 賢人	
3. 高 pH の遊離塩素によるレジオネラ消毒効果の低下-----	58
黒木 俊郎、陳内 理生、中嶋 直樹	
4. 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験-----	64
田栗 利紹、柳本 恵太、森 康則、枝川 亜希子、小坂 浩司、 陳内 理生、長岡 宏美、齋藤 利明、木村 哲也、小森 正人、 山本 哲司、細川 賢人、田中 孝典、杉山 寛治、田中 慶郎、 市村 祐二、茶山 忠久、藤井 明	
5. フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した 衛生管理の推進に関する研究-----	77
田栗 利紹、中西 典子、平塚 貴大、井上 浩章、縣 邦雄、 新道欣也、鳥井 良太、齋藤 利明、木村 哲也、小森 正人、 山本 哲司、細川 賢人、小田 康雅、下田 貴宗、蔡 国喜、 加藤 定男	
6. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発-----	90
金谷 潤一、磯部 順子、稲窪 大治	

7.	保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、 監視指導の実態-----	98
	小坂 浩司、黒木 俊郎	
8.	入浴施設の衛生管理の手引きの改定-----	105
	黒木 俊郎、小坂 浩司、金谷 潤一、中西 典子、田栗 利紹、 水戸 智文、大森 恵梨子、武藤 千恵子、大橋 美至、 陳内 理生、中嶋 直樹、磯部 順子、枝川 亜希子、井上 花音、 平塚 貴大、尾崎 淳朗、浅野 由紀子、尾崎 吉純、緒方 喜久代、 杉本 貴之、倉 文明、中臣 昌広、斉藤 利明、藤井 明、 縣 邦雄、石森 啓益	
9.	レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と 英国 FAPAS®への試験的参加-----	112
	枝川 亜希子、前川 純子、井上 浩章、縣 邦雄、杉山 順一、 安齋 博文、小池 真生子	
10.	レジオネラ属菌の新規検査法の検討-----	121
	淀谷 雄亮、武藤 千恵子、山口 友美、梅津 萌子、高久 靖弘、 西里 恵美莉、吉田 裕一	
11.	浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、 施設間での比較-----	125
	淀谷 雄亮、西里 恵美莉、吉田 裕一	
12.	<i>Legionella pneumophila</i> 血清型別のための multiplex-PCR 法の 実施と改良-----	129
	前川 純子、中西 典子、小松 頌子、田中 忍、森中 りえか	
13.	分子疫学解析法の活用と環境水における NGS を用いた網羅的解析-----	138
	中西 典子、前川 純子、野本 竜平、小松 頌子、田中 忍	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	146

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官

研究要旨

公衆浴場におけるレジオネラ属菌等の病原性微生物による汚染に対応し、衛生管理を推進するため、①消毒洗浄、②迅速検査、③保健所衛生部局との連携、④培養検査の向上、⑤分子疫学の高度化の研究を行った。

①消毒洗浄による対策に関して、大きく分けて以下1から4の成果を得た。1:有機物を含む温泉利用施設の協力を得て、モノクロアミン消毒を行った。レジオネラ属菌を抑制することができた一方で、従属栄養細菌数や、16S rRNA 遺伝子コピー数の増加が確認された。菌叢解析の結果、*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌の増加が確認された。バイオフィルム対策として、洗浄が必要と考えられた。2:高アルカリ温泉水(pH9.6)を用いて、遊離塩素とモノクロアミンの消毒下における消毒効果を比較した。*Mycobacterium phlei* と *Bacillus subtilis* の消毒耐性は、ほぼ同程度であった。これらの1-Log 不活化に必要なモノクロアミンのCT値(濃度×時間)がおよそ250 mg/L・min に対し、遊離塩素は2,000 mg/L・min となり、モノクロアミンの方が遊離塩素よりも消毒効果が高かった。3:遊離塩素によるレジオネラ不活化試験の結果、高pHで消毒効果が低いことを改めて確認した。汚染が検出された医療機関は水道水のpHが高く、塩素消毒の効果不足が示唆された。4:電解オゾン水(0.8mg/L)を循環式ろ過器の有効容量(200L)となるように供給し消毒した結果、逆洗水中のレジオネラは、途中1回検出された以外は、約10ヶ月間継続して不検出となった。逆洗前の循環式ろ過器へ電解オゾン水を毎日供給する方法は、設備が単純で操作が簡易であった。

②培養よりも迅速な検査について、以下の成果を得た。1:フローサイトメトリー法等の非培養検査の結果を、衛生管理に反映する方法を整備した。消毒が不完全と判定された循環系に省力化配管洗浄技術を適用し、洗浄後はレジオネラを不検出にできた。別の施設では丁寧な対話により汚染源を特定し、故障への対応、盲管の撤去など、営業施設自身による適切な判断と処置につなげることができた。2:迅速・簡便なモバイル型 qPCR 装置を使用した遺伝子検査法は、プロトコルを改善することで、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法と同等の感度・特異度を示した。

③保健所、衛生部局による監視指導の実態把握や連携と対応のさらなる向上を意図して、以下の検討を進めた。1:自治体(2県、1市)の衛生部局あるいは保健所職員を対象に、オンラインヒアリングを行った。立ち入り施設の検水がレジオネラ陽性になることがあり、その多くは低濃度であった。消毒や洗浄の不足といった問題に対して、徹底させる指導の方法が課題とされた。保健所職員や営業施設向けの研修、講習が実施されて、マニュアルも整備されていた。患者と施設の菌株の不一致、培養できないことも多くあった。保健所と衛生研究所との連携が取られていた。2:入浴施設の衛生管理の手引きの改

定を目的に、ワーキンググループ(WG)と検討会を立ち上げて検討を行った。WG では浴槽水の塩素濃度の測定における問題点等を検討し、関連する Q&A の質問の作成を試みた。検討会では入浴施設において保健所が行う監視指導時に利用する調査票(確認調査票及び記録調査票)の検討を行い、確認調査票案を作成した。

④レジオネラ培養検査の向上に以下を検討した。1:容易ではない培養検査の精度向上を目的に、外部精度管理の情報を整理した。英国 FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) に試験的に参加した結果、選択肢の 1 つになり得ると考えられた。2:レジオネラ属菌の新規検査法であるレジオラート法の前処理法として、酸処理 5 分間が適切との結果を得た。

⑤分子疫学の高度化について以下の成果を得た。1:全ゲノム解析を行い、各遺伝子型で組換え領域の割合や SNPs 数(一塩基多型、single nucleotide polymorphism)に差異を認めた。疫学的に関連のある事例を解析した結果、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株間の SNPs は 0~41 であった。2:浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌を施設間で比較し、施設へのレジオネラ属菌の定着を確認した。洗浄消毒により除染できておらず、より効果的な対応が必要と考えられた。検出頻度の高い遺伝子型(ST、Sequence-Based Typing)は、状況によっては、より解像度の高い SNPs 解析が推奨された。3:従来の免疫凝集法で判別不能だった菌株が、新しく開発した multiplex-PCR 法により、血清型別できるようになった。SG13(Serogroup)と SG14 の型別能力を向上させる改良を加えた。バンドサイズの判定を容易にするポジティブコントロールを用意した。配布用プロトコルを作成した。4:プライマーのミスマッチにより増幅されない MLVA 領域(反復配列多型解析、Multilocus variable-number tandem-repeat analysis)に修正対応した。レジオネラ感染事例の全ゲノム解析を行い、施設環境由来株と患者株間の SNPs は 4 個以下であった。

研究分担者氏名・所属研究機関名、及び職名

枝川 亜希子・大阪健康安全基盤研究所

主任研究員

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

小坂 浩司・国立保健医療科学院

上席主任研究官

田栗 利紹・長崎県環境保健研究センター 次長

中西 典子・神戸市健康科学研究所 副部長

前川 純子・国立感染症研究所 主任研究官

森 康則・三重県保健環境研究所 主査研究員

柳本 恵太・山梨県衛生環境研究所 研究員

淀谷 雄亮・川崎市健康安全研究所 技術職員

#### A. 研究目的

公衆浴場は、適温の湯でレジオネラ等病原性微生物が増殖し、レジオネラ集団感染が繰り返された。衛生向上を目的とする公衆浴場において、衛生低下の問題が生じた(2002年 宮崎県他)。浴場施設の塩素消毒が緊急避難的に導入されたが、高 pH(8~)での消毒効果の不足や、塩素臭の敬遠から消毒が不徹底等に陥る(2022年 福岡県)。未だに感染事故がある(2021年 広島県、2022年 兵庫県)。

先の研究班の成果として、一般的な遊離塩素ではなく、結合塩素(モノクロアミン)の消毒によって、消毒の不足や塩素臭の回避が可能となった。

成果は厚労省通知「公衆浴場における衛生等管理要領等について(令和元年 9 月 19 日生食発 0919 第 8 号)」となり、自治体条例への反映が始まった。本研究は浴場施設の衛生向上と推進、さらに他の管理や対策方法の選択肢を増やすことを目的とする(図 0)。

以降、1 から 13 まである課題内容別に、目的、方法、成果等を記載した。この数字は分担研究報告書の順番に対応しており、図表の番号もこれに対応させた。

#### A1. モノクロミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

公衆浴場はもっぱら遊離塩素消毒が行われるが、遊離塩素とアンモニアの反応により生成される結合塩素のモノクロミンはレジオネラ属菌に対する有効性が確認されている。ただしモノクロミンの連用により、*Mycobacterium phlei* 等の雑菌の増加が報告される。アンモニア態窒素濃度が比較的低い温泉を利用した公衆浴場において、モノクロミン消毒の実証試験を行い、消毒効果、濃度の安定性、並びに菌叢の変化を検討した。

#### A2. *Mycobacterium phlei* 他の不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対するモノクロミン消毒効果の有効性

モノクロミン消毒の連用により生じる *M. phlei* の消毒抵抗性をより詳細に、客観的に評価するには、他の細菌の消毒と比較する方法が考えられる。当該研究では塩素消毒に弱いとされるグラム陰性菌の大腸菌と、強いとされるグラム陽性菌の枯草菌を比較対象とした。pH9.6 の高アルカリの温泉水を用いて試験管内での消毒試験を行った。

#### A3. 高 pH の遊離塩素によるレジオネラ消毒効果

の低下

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ属菌の汚染は、院内感染の原因となることから<sup>1)</sup>、衛生管理が重要となる。複数の蛇口からレジオネラ属菌を検出したことから、自動塩素添加装置を設置し、水道水の遊離塩素濃度を高く(約 1.0 mg/L)維持する対策を講じた。対策により、不検出または減少の結果が得られたが、完全な清浄化には至っていない。要因として考えられたのが、水道水の pH が高値(7.9~8.6)であることだった。消毒効果の低下を確認する目的で、その水道水を使用して、そこから分離された菌の消毒実験を試験管内で行うこととした。

#### A4. 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

ろ過器を有する循環式浴槽はレジオネラ属菌に汚染されやすく、「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」するとされている<sup>2)</sup>。これを受けて、過酸化水素や高濃度塩素を用いる方法等が紹介されている<sup>3,4)</sup>。しかし、大容量のろ過器には、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。過酸化水素や塩素以外の方法として、オゾンに着目した。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/m<sup>3</sup>)と定めている<sup>5)</sup>ものの、水溶液のオゾン水については特段の基準値等は定められていない。水の電気分解により生成するオゾンは、相対的に生成量が少なく、安全上の問題が少ないと考えられた。本試験では、電解生成オゾンを用いたろ過器の消毒・洗浄方法について検討した。

A5. フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

レジオネラ属菌は培養検査が標準検査法として用いられるが、7~10 日間を必要とする専門性の高い検査であるために、現場の日常的な指標として衛生管理に反映させるにはかなりの努力を要する。迅速な検査法として、フローサイトメトリー法 (FCM) <sup>6)</sup>、遺伝子検査法 <sup>7)</sup> および ATP 法 <sup>8)</sup> 等の非培養検査法を検討してきた。検査の結果を施設衛生管理者と共有し、対話により消毒や細菌汚染による衛生状態等への施設の理解を促すことで、公衆浴場の衛生管理の向上に繋がれることを期待している。

A6. 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

新たなレジオネラ検査法を確立・普及することを目的に、1. モバイル型装置を用いた迅速な検査法の開発、2. 患者および地域流行株の解析によるその特徴の解明、3. 患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株のゲノム SNPs (一塩基多型、single nucleotide polymorphism) 解析を行った。近年に普及し始めたモバイル型のリアルタイム PCR 装置であれば、採水現場で直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出できる。平板培養法や他の遺伝子検査である LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法と相関が取れるよう、プロトコルの改良を検討した。レジオネラ症患者から検出される遺伝子型 (ST、Sequence-Based Typing) の偏りや、患者に感染・定着しやすい菌株の解明も企図した。

A7. 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態

保健所、衛生部局は、公衆浴場の事業者に対して、衛生管理に係る監視指導を行う立場を担っている。公衆浴場の衛生管理の向上には、消毒や検出法だけでなく、事業者への適切な監視指導等も重要と言える。地方自治体における公衆浴場の監視指導業務の担当職員を対象に、ヒアリングを行い、レジオネラ症発生防止や発生時の対応に係る監視指導の実態や課題を整理した。

A8. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

厚生労働省から技術的助言として発出されている管理要領やマニュアルには管理方法等の具体的な記述が少ないため、具体的な内容提示が保健所等から求められ、手引が整備された。これらの改定を継続し、内容不足の解消や新規の追加を行う。

A9. レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS<sup>®</sup>への試験的参加

浴槽水を対象としたレジオネラ検査は、行政指導の根拠となることに加え、日常的な衛生管理を行う上での重要なデータであることから、高い精度が求められる。一方、培養検査法に複数の方法、選択肢があり (濃縮方法として過濃縮法または遠心濃縮法、前処理として酸処理または熱処理、選択培地は GVPC  $\alpha$  寒天培地、WYO  $\alpha$  寒天培地など)、検査精度にばらつきが出やすい要因となっている。各検査機関は検査精度の確認を行っているが、従来参加していた外部精度管理は、検査方法が指定され、各施設の日常的な検査方法を使っていなかった。各施設の方法で試験に参加できるよう、FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) 他の外部精度管理の選択肢を整理紹介することとした。

#### A10. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

レジオネラ属菌の検査に平板培養法が用いられるが、前述の通り検体の濃縮方法、分離培地の種類、コロニーの鑑別法等が複雑にあり、精度が課題となる。近年の水質管理に開発されたレジオラート/Quanti-Tray 法は、専用の粉末培地と検体を専用トレイに入れて培養するので、複雑な手順が不要である。しかし稀ではあるものの、一部検体において交雑菌による偽陽性が生じるので、検体の培養前に酸処理を加えた改良プロトコルの有効性を検討する。

#### A11. 浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

公衆浴場法等でレジオネラ属菌が検出された場合、通常、施設では清掃消毒等が行われ、陰性が確認される。しかし、継続的に同じ血清群が検出される施設が散見され、菌の定着が疑われる。分子疫学により、施設への定着状況について検討することとした。

#### A12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良

レジオネラ症の診断の 95%は、尿中抗原の検出によって行われている。従来は SG1 (Serogroup, 血清群)の検出が主であったところを、2019 年より他の血清群による感染も診断可能な尿中抗原キットが販売され、2 から 15 の群別の必要性が高まりつつある。一方、培養の時間をかけず少量の菌体から血清群を型別できる方が、感染源の特定に有利である。当該研究では、血清群別を微量な試料から行うことの出来る multiplex-PCR (M-PCR) 法を開発した<sup>9)</sup>。免疫血清では群別不能だった菌株の型別に応用し、SG13 と 14 の検出の改良も行い、レジオネラ・レファレンスセンターを通じるなどして、普及を目指している。

#### A13. 分子疫学解析法の活用と環境水における NGS を用いた網羅的解析

感染源の特定には、患者分離株と、推定感染源とされる環境分離株の一致を確認する。この分子疫学の方法として、パルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE 法、製造中止が決定)、塩基配列の多型解析 (Sequence based typing, SBT 法)、反復配列多型解析法 (Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA 法)があり、新しく提案した MLVA 法の普及が進んでいる<sup>10)</sup>。方法間で結果に相違が生じることもあり、塩基配列の確認やプライマーの修正といった丁寧な対応で、信頼性の維持向上に務めることとなる。本研究では、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列の解析 (Next-generation sequencing, NGS 法)を取り入れて、従来の型別法の妥当性を評価し、最適化することを企図している。従来法の解像度の不足には、全ゲノム解析による分子疫学を行い、解析法の確立と基礎データの蓄積を目指している。

MLVA 法は、増幅されない MLVA 領域があったことから、ゲノム解析で判明したプライマーのミスマッチ部分を修正し、新たなプライマーを用いた Multiplex PCR の系の構築を目指した。あるレジオネラ感染事例は患者分離株が 1 名分しかなく、SBT 法の解像度が不足したことから、全ゲノム解析による汚染源の推定を行うこととした。

#### B. 研究方法

研究班を①消毒洗浄、②迅速検査法、③保健所衛生部局との連携、④培養検査の向上、⑤分子疫学の大きく分けて 5 分野に編成し、これらの成果により直接あるいは間接的に衛生管理の向上と推進が得られることを目指した。研究分担者 10 名、研究協力者多数の参画を得て、研究を遂

行した(図0、表0)。地衛研・保健所や民間企業を通じて、現場施設の支援、協力や参加を得た。感染研と地衛研で形成するレファレンスセンターの協力を得て、患者株や環境株の収集解析を行った。

#### B1. モノクロロミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

アンモニア態窒素 0.2 mg/L を含む、pH7.5 の源泉水を利用する入浴施設の協力を得た。入浴者数は1日に400~800名程度で、浴槽水の循環ろ過システムを有しており、毎日換水・清掃していた。試験対象浴槽は約 45 m<sup>3</sup> の内湯とした。モノクロロミン生成装置を設置し、概ね 3~6 mg/L の範囲で循環システムに添加した。各種測定は定法に従い、モノクロロミン導入前の4週間と導入後の4週間、週に1回、営業終了後に実施した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 42°C の 14 日間で求めた。浴槽水中の 16S rRNA 遺伝子コピー数の定量、同遺伝子の V3/V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンスによる菌叢解析、および菌叢の変化を比較する群間比較解析を行った(生物技研)。

#### B2. *Mycobacterium phlei* 他の不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対するモノクロロミン消毒効果の有効性

先の *M. phlei* の不活化試験<sup>11, 12)</sup>の方法に準拠して行った。検液として、pH9.6、電気伝導度 EC = 39 mS/m のアルカリ泉を使用した。菌株は大腸菌 (*Escherichia coli* ATCC25922) と枯草菌 (*Bacillus subtilis* NBRC3134) を用いた。濃度調整した菌に、モノクロロミンと遊離塩素を、それぞれ低濃度(約 5ppm)、中濃度(約 10ppm)、高濃度(約 20ppm)の3段階の濃度となるように添加した。消毒剤の濃度(C)と、接触時間(T)

の積として CT 値 (Concentration×Time value)<sup>13)</sup> を算出した。消毒前後の菌数から消毒された菌の割合(不活化割合、生残率)を求めた。

#### B3. 高 pH の遊離塩素によるレジオネラ消毒効果の低下

当該医療機関の水道水から分離した *L. pneumophila* SG1 を使用した。医療機関の受水槽から採水して濾過滅菌した水道水(pH7.9、pH 未調整)と、ここから HCl 水溶液を用いて pH 7.0 に調整した水道水を使用した。その遊離塩素濃度は 0.69~0.76 mg/L であったのを、0.25 mg/L になるように、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液および 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を用いて調整した。遊離塩素濃度が 0.25 mg/L になるように 5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加した PBS(pH 8.3 および pH 7.0)を比較に使用した。消毒試験中の試験液は 20°C の水浴中に静置した。分取した試験液 1 mL 中の塩素は 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液 2 μL を添加することで中和し、BCYE $\alpha$  寒天培地で菌数を測定した。レジオネラ属菌の生存割合と、遊離塩素濃度(C)と経過時間(T)を乗じた CT 値から不活化曲線を求めた。

#### B4. 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

某スーパー銭湯における小規模なアトラクション浴槽(井水、約 1 m<sup>3</sup>)の循環システムを試験対象とし、営業終了後、逆洗前のろ過器に対して、電解オゾン水を毎日供給した。この検討は令和 3 年度より開始して当初の成果を一部報告したところで、さらに年余にわたって継続することで本結果を得ている。電解オゾン水は、施設で使用している井水を市販のオゾン生成電極(オゾンバスターPRO、オゾンマート製)で電気分解することにより生成した。試験対象ろ過器の清浄化を確認するために、週 1

回の頻度で、営業終了後のオゾン供給前に、逆洗水の水質を分析した。逆洗水の採水は、ろ過器をブローによりエアレーション(約 200 L/min、約 5 分間)<sup>14)</sup>した後に行った。これにより、ろ材に残存する汚れを分析評価できるようにした。

#### B5. フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

循環ろ過式と掛け流し式の2つの入浴施設の協力を得た。民間事業者等と連携して、現場施設を調査、予防・改善の実施例を蓄積する。省力化配管洗浄による生物膜対策を、施設衛生管理者が実体験する機会も用意した。掛け流し式では、源泉ポンプ付近の汚染状況を調査した。

#### B6. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

公衆浴場などから得たレジオネラ属菌を用いた。モバイル qPCR 法 (PicoGene<sup>®</sup> *Legionella* spp. Kit および PicoGene<sup>®</sup> PCR1100 (日本板硝子)) は、核酸抽出に新規の活性炭を含む吸収剤を追加した。レジオネラ症患者から高頻度に検出された 4 つの遺伝子型 (ST23、ST120、ST502、ST505) の菌株について、SNPs 解析を実施した。イルミナ社のプロトコルに従い、Nextera XT DNA Library Preparation Kit、Nextera XT Index Kit および MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いてライブラリーを作製後、RUN を実施した。遺伝子型ごとに BactSNP で pseudogenome を作成後、Gubbins を用いて組換え領域を除去し、SNPs を比較した<sup>15)</sup>。

#### B7. 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態

3 自治体(A~C 自治体)の保健所・衛生部局を対象に、オンラインでヒアリングを行った。A、B 自

治体は県保健所、C 自治体は市保健所であった。質問票は、事前に送付した。質問内容は以下のとおりであった。・レジオネラ症関係に対応する組織、対象とする施設 ・レジオネラ症発生状況 ・レジオネラ症対応で実施していること ・現状の課題の有無とその程度 他。

#### B8. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

ワーキンググループ(以下 WG)と入浴施設の衛生管理の手引き検討会(以下検討会)を立ち上げた。WG のメンバーは研究班に所属する研究分担者と研究協力者の一部とした。検討会のメンバーは、自治体の本庁あるいは保健所の環境衛生部署に所属し、入浴施設の監視指導に当たっている自治体職員とし、入浴施設の現場における監視指導の経験を活かした内容を手引きに盛り込むことを目指した。

#### B9. レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS<sup>®</sup>への試験的参加

国内外における外部精度管理の情報を収集し、選択肢の一つとして英国 FAPAS に参加した。

令和 4 年 10 月実施された FAPAS レジオネラ外部精度管理 (LG0119) に、国立感染症研究所、大阪健康安全基盤研究所、アクアス株式会社、日本建築衛生管理教育センター、大阪府茨木保健所、大阪府藤井寺保健所、大阪府泉佐野保健所の計 7 機関が参加した。非選択培地 (BCYE  $\alpha$  寒天培地) が基本とされたが、選択培地で参加も可能との回答を得た。ただし、その場合は選択培地を用いた参加機関のみで解析を行うとのことであったため、最大限の情報が得られるよう、非選択培地と選択培地の両方の検査を実施した。

#### B10. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

公衆浴場の温泉水、浴槽水等の計 90 検体を検査対象とした。レジオラート (IDEXX) の未処理は飲料水用 10 mL プロトコルで実施した。これに追加する酸処理として、検体 10 mL に×20 前処理剤 (IDEXX Pre-treatment reagent) を 0.5 mL 加えて 5 分又は 10 分後、15 % KOH を 0.3 mL 加えた。レジオラート粉末を滅菌水 90 mL で溶解し、検体全量を加えよく攪拌した後、専用トレイに封入し 37°C で 7 日間培養した。レジオラート法 MPN 値 (Most probable number) と平板培養法 CFU 値 (Colony forming unit) を比較した。なお、平板培養法はいずれかの方法で検出された結果を採用しており、前処理条件が同一ではないので、単純比較ではない。遺伝子検出 (LAMP 法) も行った。

#### B11. 浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

同一施設から異なる時期に採取された同一血清群のレジオネラ属菌を検討対象とした。すなわち、18 施設から分離された *Legionella pneumophila* の保存株 99 株を対象とし、SBT 法、MLVA 法を実施した。一部 19 株は iseq100 を用いて全ゲノム配列を解読し、Philadelphia1 (NC\_002942) を参照株として、BioNumerics を用いて SNPs 解析を行い、相同性を検討した。

#### B12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良

レジオネラ免疫血清「生研」(デンカ株式会社) を用いて判定不能 (SGUT, serogroup untyped) とされた *L. pneumophila* 41 株を使用した。基準株として、日本国内で環境から分離された SG1 から 15 の 15 株を使用した。M-PCR 法による SGg (SG-genotypes) の決定は、Nakaue らの方法<sup>9)</sup>にしたがった。混合 DNA の作製には、DNA Blood & Tissue

Kit (QIAGEN) で抽出した精製 DNA を用いた。

#### B13. 分子疫学解析法の活用と環境水における NGS を用いた網羅的解析

MLVA 法の評価は *L. pneumophila* SG1 の 439 株を対象とした<sup>10)</sup>。レジオネラ感染事例における全ゲノム解析では、同一患者の喀痰に由来する 14 株と、施設環境から分離の 18 株 (浴槽水由来 5 株、ヘアーキャッチャー由来 5 株、ろ過器由来 8 株)、および 2013 年に同一施設の浴槽水から分離の 1 株を用いた。

MLVA 法の改良は、Sobral ら<sup>16)</sup>によって報告された 12 領域のうち、Lmps01、Lmps13、Lmps31 の 3 領域を、Pourcel らのプライマー<sup>17,18)</sup>に変更し、増幅産物を得られるようにした。増幅産物のフラグメントサイズは、AB3500 Genetic Analyzer を測定に使用した。株間の類縁関係を明らかにするために、Minimum spanning tree (MST) を作成した (BioNumerics)。

全ゲノム解析は、MiSeq (Illumina) を用いてリードデータを取得した。SNPs 解析には BactSNP を用いて pseudogenome を作成し<sup>19)</sup>、組換え領域の除去に Gubbins を用いた<sup>15)</sup>。リファレンスに、*L. pneumophila* str. Paris 株 (Accession no.; CR628336.1) のゲノム配列を用いた。

#### (倫理面への配慮)

病原体の取り扱い、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがった。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. 結果および考察

#### C1. モノクロラミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

浴槽水のレジオネラ属菌は、モノクロラミン導入前の1検体から検出され、他は全て検出下限値未満で、モノクロラミンは有機物を含む泉質においてもレジオネラ属菌を安定的に抑制できていた。一般細菌数はいずれも40 CFU/mL未満であり、モノクロラミン消毒導入前後で定量値に大きな変化は確認されなかった(図1-1)。一方、導入後の従属栄養細菌数は1,000~4,000 CFU/mLと導入前よりも100倍程度に有意に増加した。浴槽水中の16S rRNA遺伝子のコピー数は導入後、100倍から1,000倍程度に有意に増加した。増加した従属栄養細菌の16S rRNA遺伝子は、解析した7株全てが*M. phlei*と100%(446 bp/446 bp)一致していた。現在までのところ、pHによる消毒効果の強弱と、入浴者による汚染の負荷量に、従属栄養細菌数の増加との関連性が示唆された。

菌叢解析(図1-2)の群間比較解析により細菌の系統ごとの増減を解析した結果、モノクロラミン導入により*Staphylococcus*属菌、*Aquidulcibacter*属菌などの111系統が有意に減少した。*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus*属菌、*Immundisolibacter*属菌など152系統が有意に増加したが、いずれも環境中に存在する細菌であり<sup>22-24)</sup>、病原性の報告はなかった。レジオネラ属菌や、R2A培地で増加を確認した*M. phlei*は、いずれも有意な増減はなかった。

#### C2. *Mycobacterium phlei* 他の不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒効果の有効性

検液中のモノクロラミン、遊離塩素とも、菌の添加から実験終了まで、少なくとも8割前後の濃度を維持しており、消毒に問題はなかった。*M. phlei*と*B. subtilis*の不活化は同程度で、これ

らの1-Log不活化にはモノクロラミンがCT値およそ250 mg/L・minに対し、遊離塩素はCT値およそ2,000 mg/L・minであった(図2-1、2-2)。モノクロラミンによるこれらの3-Log不活化はCT値750~800 mg/L・minと測定できたが、遊離塩素では3-Logに達しなかった。すなわち、高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の有用性を改めて確認した。*M. phlei*の消毒耐性の強さはこれまでも示唆されていたものの、*B. subtilis*に匹敵する耐性を有することが明らかになった。本実験においては消毒効果が認められたものの、実地試験ではモノクロラミン消毒を連用中に*M. phlei*が多く検出されており、増殖の場や消毒を回避する仕掛けになお一層の興味を持たれる結果であった。

#### C3. 高pHの遊離塩素によるレジオネラ消毒効果の低下

試験中の遊離塩素濃度はおよそ維持できており、開始前に0.20~0.27 mg/L、30~90分後にその50%以下であった。pHはほとんど変動がなかった。水道水における99%不活化CT値は、pH 7.9未調整で0.89、pH 7.0で0.31となり、pH 7.9未調整水道水の方が約2.9倍大きかった(図3)。比較に行ったPBSにおける99%不活化CT値は、pH 8.3で1.40、pH 7.0で0.36となり、pH 8.3の方が約3.9倍大きく、水道水の結果と同様にpHの影響があった。水道水のpHが高いことで、レジオネラ属菌に対する塩素の消毒効果が低いことを、実験的に確認した。蛇口からレジオネラの検出が続いている以上は、消毒が不十分である可能性が示唆された。

#### C4. 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

当該スーパー銭湯は入館者数が多く、ろ過器

に汚れが蓄積していることが疑われた。逆洗水のレジオネラ属菌は、オゾン供給前は 30～330 CFU/100 mL の間で検出されていたが、ろ過器の有効容量(200L)となるようにオゾン供給を開始した試験 77 日目から継続して不検出となった(図 4)。浴槽水のレジオネラ属菌は、91 日目に 10 CFU/100 mL で検出された以外は継続して不検出であった。オゾン供給を一時停止した 186 日目から 245 日目までの間、レジオネラ属菌は不検出だったものの、遊離塩素は減少傾向、一般細菌数と ATP が増加傾向であった。オゾン供給を再開した 245 日目からは、電解槽からの極少量の漏水が突発的に発生しており、オゾン供給の不足が懸念された。322 日目からは、2 個あったオゾン電極の 1 個が停止し、オゾン濃度が 0.8 mg/L から 0.4 mg/L へと減少した。レジオネラ属菌は 364 日目まで浴槽水と逆洗水ともに不検出であったが、370 日目から両者ともに 10 CFU/100 mL の値で検出され、オゾンの供給が不足した様子であった。電解槽の抜本的な更新が必要になったことを受けて、385 日目(2022 年 9 月 3 日)に本試験を終了した。ろ過器のオゾン処理により、逆洗水のレジオネラ属菌を、約 10 ヶ月間継続して不検出とできた。

#### C5. フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

具体的な施設調査の手順を作成した(図 5)。  
1 番目に、保健所や民間の環境衛生管理者等と連携して入浴施設に研究協力を申し入れる。  
2 番目に、施設の衛生管理者との対話の中で、調査対象とする試料と検査方法を定める。この時、非培養検査法を中心に提案するが、管理者の意向によっては培養検査も加える。計画に基づいて検査を実施する。3 番目に検査結果を施設の衛生管理者と共有する。4 番目に、4-a : 衛生状態が良好な場合は、維持を伝える。4-b : 衛

生状態に問題があった場合は、消毒の強化等の改善手段を提案し、必要に応じて配管洗浄等を含めて、これら対策を事業者にも体験してもらおう。5 番目に、培養法で浴槽水のレジオネラ陰性を確認する。6 番目の最終的に、以上から導き出される重要管理点を、施設の衛生管理マニュアルに反映、日常管理に役立ててもらおう。

H 入浴施設は、ジェット浴に課題があり、自主的な配管洗浄を実施したばかりであったが、FCM 法では消毒効果が不完全と判定され、レジオネラ遺伝子も検出されていた。省力化配管洗浄剤<sup>20)</sup>を用いて洗浄した結果、洗浄中の試料に多数の細菌の放出が確認され、洗浄効果は明らかであった(表 5)。レジオネラも不検出になった。

掛け流し式の J 施設では、対話の中で、原水汲上ポンプ後にあった 2 つのろ過器の 1 つが閉塞していたことと、盲管が判明した。改修により原水からレジオネラ属菌が検出されなくなり、丁寧な対話が汚染源対策の 1 例になった。

#### C6. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

モバイル型 qPCR の反応阻害を避けるため、プロトコルを改良し、活性炭を含む吸収剤を添加した。結果として、今年度の検討では遺伝子陰性培養陽性検体は認められなかった。また、感度・特異度は LAMP 法と同等であった(表 6-1)。

疫学的に関連のある事例の全ゲノム解析では、患者と入浴施設から分離された菌株間の SNPs は 0～41 個であった。

レジオネラ症患者から高頻度で検出される遺伝子型(ST23、ST120、ST502、ST505)の全ゲノム解析では、外来 DNA によって生じる組換え領域内の SNPs が多いと判明した(表 6-2、図

6)。とりわけ ST120 は、検出された SNPs の 99% 以上が組換え領域内であった。通常の SNP 解析として組換え領域内の SNPs を除外すると、ST120 は疫学的な関連性がない 2 株間で SNPs の 5 以内の組み合わせが 62 通りも存在した(表 6-2)。高頻度に検出される遺伝子型の SNPs 解析は、組み換え領域を除外しない解析や、実地疫学と分子疫学から総合判断する丁寧な感染源調査が重要と考えられた。

#### C7. 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態

ヒアリングの主要な回答を表 7 に抜粋した。いずれの自治体も立ち入り施設からレジオネラが検出されることがあり、多くは 10~< 100 CFU/100 mL であった。陽性施設の特徴として、消毒の方法に問題があり、清掃頻度が十分でない場合が多い傾向にあった。危機意識が高くない施設の清掃・消毒方法に欠陥があったり、自主検査を規定の頻度で実施していない施設も多く、衛生管理を徹底させる方法が課題との指摘があった。

職員へのレジオネラ症に関連した研修や事業者向けの講習が、実施されていた。課題として、実地研修の現場施設の確保を挙げられた。

患者発生時の対応は、いずれの自治体でもマニュアルが作成されていた。患者株と施設株は一致しない方が多く、培養できないこともあった。試料の採取は保健所、検査は衛生研究所で実施されて、いずれの自治体も保健所と衛生研究所との連携が取られていた。

#### C8. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

WG では浴槽水の塩素濃度の測定における問題点を議論し、Q&A で想定される質問を作成した。『営業時に浴槽水に次亜塩素酸ナトリウムを添

加して消毒を行っているが、DPD 法(N,N-Diethyl-p-phenylenediamine)で遊離残留塩素濃度を測定すると次のような現象が発生した。こうした現象が起きた場合はどのように解釈して対処すればよいか。』

Q1、現象 1:DPD 試薬を加えても全く発色しない。

Q2、現象 2:DPD 試薬を加えると一瞬発色するがすぐに透明になる。

Q3、現象 3:DPD 試薬を加えて次第に色が濃くなった。

検討会では手引きにおいて例示するチェックシートを中心に検討し、確認調査票案(構造設備基準、維持管理基準、水質基準)を作成した(表 8)。

#### C9. レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS<sup>®</sup>への試験的参加

従来から参加のサーベイは、R4 年度も各施設が日常的に行っている検査方法に対応しない回答であった。英国 UKHSA (UK Health Security Agency) の外部精度管理に参加している国内検査機関もあったが<sup>21)</sup>、決済や英語対応といった障壁が存在した。FAPAS は国内代理店を通じての決済とサポートを受けることが可能であった(表 9)。

試験的に FAPAS に参加した。試料(菌量の違う 2 種の試料 A、B)は常温で英国から空輸され、受取り後は検査開始まで冷蔵で保存した。指示書に記載された検査方法は、「ルーチンメソッドで検査すること」のみであり、各施設の検査手順での参加が可能であった。検出/不検出、菌数、菌種等を報告し、締切後の約 3 週間で分析レポートが返却された。返却された Z スコアから、全参加者中の位置を確認できた。他に参加施設の検査方法(フィルターや使用培地の種類)の情報もあり、参加者の知りたい情報が記載されていた。申込みから各種問い合わせまで、

すべて日本語で国内代理店を通じて行い、対応は丁寧かつ迅速であった。

#### C10. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

レジオラート法は、平板培養法と93%の高い一致率を示した(表10-1~10-4)。例数は少ないが、未処理で検出された1検体は酸処理5分及び10分では陰性で、未処理の陽性は偽陽性と推察され、酸処理が有効であった。酸処理により感度が低下することから、5分が適切と考えられた。50 MPN/100mL以上の検体は、酸処理10分でも全て陽性判定であったことから、交雑菌が多い場合に10分も有効と考えられた。結果の不一致はレジオネラ菌数の少ない検体に留まった。

#### C11. 浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

18施設のすべてで同一のSTが複数回検出された(表11)。複数のSTが複数回検出された施設もあった。検討できた5年の範囲で、4年2ヶ月の定着例があった。16施設は11か月以上の定着であった。同一ST株のMLVA型はおおむね同一か、1領域違いであった。反対に血清群5及び6で、異なるSTから同一MLVA型もあった。

血清群1のうちSTが一致するなどした19株の全ゲノム解析を実施した。同一STであっても施設ごとに分別できて解像度が高かった。同一施設から分離された株間のSNPs数は0のものから最大55であった。施設によっては、複数の遺伝子型(ST、MLVA、SNPs)が混在していた。

#### C12. *Legionella pneumophila* 血清型別のためのmultiplex-PCR法の実施と改良

レジオネラ免疫血清において判定不能のSGUTとされた41株を、6種類のSGg(SG-genotypes)に

分けることができた(図12-1)。本法を用いると判定不能とならず、いずれかのSGgに型別できるので、疫学調査において有用な型別法と考えられる。従来の免疫凝集法は必要な菌体量の確保に培養日数がかかるが、PCRを用いた本法は、ごく少量の菌数で施行できるので、感染源特定の時間短縮が期待できる。

SGg1のレジオネラ免疫血清による型別を再度検討したところ、前処理の加熱の有無により結果が変化すると判明した。M-PCR法ではそのような特別な検討を必要としない。

SG14に特異的な遺伝子を検出するプライマーを設定し、SGg14の群別を可能とした。SGg13の従来のプライマーには、日本で多く見られる株とミスマッチがあり、混合塩基から成るプライマーに改良した。改良したプロトコルを、レジオネラ・レファレンスセンターを通じて地方衛生研究所に配布した。普及に向けて、陽性コントロール・サイズマーカーも用意した(図12-2)。

#### C13. 分子疫学解析法の活用と環境水におけるNGSを用いた網羅的解析

MLVA領域(Lmps01, Lmps13, Lmps31)は、プライマーのミスマッチにより増幅されないことがあると判明し、プライマーの変更により改善した。他の複数の連携機関に活用してもらいながら、評価と修正を続ける計画である。

レジオネラ感染事例において、患者および疑似施設環境から、*L. pneumophila* SG1が分離された。SBT法でST138と型別されたが、これはよく検出される遺伝子型で、感染源の推定には根拠が弱い状況であった。患者分離株が1名分に限られ、他での感染が否定しきれなかったことから、より高解像度な全ゲノム解析に進んだ。患者株と施設環境株の間のSNPs数がわずか4個以下となる組合せが確認され、当該施設が感染源との判断

は妥当と考えられた(図 13)。Clade II と III に患者由来株と環境由来株の両方の株が含まれ、SNPs は 4 個以下であった。なお、患者由来の 14 株に多様性があり、その間の SNPs が 0~41 個であった。患者は多様なレジオネラ株に重複感染したと示唆された。患者株および施設環境株の間の SNPs 数も 0~42 個の範囲内と少なく、これらはとても近い関係にあると判明した。

以上の通り、公衆浴場の衛生管理の推進に有用な結果を得た。高 pH で塩素消毒の効果が低下することを、*L. pneumophila*、*M. phlei* の消毒試験により改めて確認した。高 pH には、遊離塩素よりモノクロラミンの消毒効果が高い結果であった。しかしモノクロラミン消毒を続けると従属栄養細菌数が増加し、バイオフィルムの発生が懸念された。モノクロラミンによる消毒だけで解決しようとせず、洗浄が大事なことに代わりはなかった。菌叢を解析した範囲において、モノクロラミン使用中の病原細菌の増加は認められず、レジオネラ属菌も抑えられていた。強く汚染を受けると考えられるのが循環ろ過器だが、これに対しては、オゾン消毒を併用した逆流洗浄により、レジオネラ属菌を 10 ヶ月の長期に抑える実施例が得られた。

レジオネラ培養検査は 1~2 週間の時間を要することから、より迅速な検査法があれば有用である。フローサイトメトリーやモバイル qPCR 法を整備し、特に前者の応用が進んだ。現場施設の不衛生な状態を探知し、丁寧な対話により施設が改善した 2 例が得られた。従来の培養検査法については、精度向上に新しい外部精度管理の選択肢を用意し、また複雑な前処理を避けられるレジオラート法を検討した。

公衆浴場の実際の現場に立ち入るのは保健所の衛生部局であることから、指導の内容や根拠が大事になる。実態を把握し、不足部分を補うようヒ

アリングや検討会を実施し、将来の通知や手引の改定を準備した。残念ながら患者が発生した際には、指導に根拠が求められることから、分子疫学の高度化を検討した。従来の免疫凝集法では群別できなかった菌株であっても、M-PCR 法により型別できた。MLVA 法も改良された。多少なりと感染源調査に要する時間の短縮が期待される。全ゲノム解析を行い、患者株と環境株が SNPs のわずか 2~4 個違いで対応し、疑い施設が感染源と判断された。レジオネラ感染事故の指導根拠として、知る限りにおいて、初めて全ゲノム解析が使われた事例となった。レジオネラが長期に施設に定着しており、洗浄消毒の困難さが改めて認識された。

#### D. 結論

##### D1. モノクロラミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

有機物を含む温泉の営業 1 施設の協力を得て、モノクロラミン消毒を行った。レジオネラ属菌を抑制することができた一方で、従属栄養細菌数や、16S rRNA 遺伝子コピー数の増加が確認された。菌叢解析の結果、*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌の増加が確認された。バイオフィルム対策として、洗浄が必要と考えられた。

##### D2. *Mycobacterium phlei* 他の不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒効果の有効性

pH9.6 の高アルカリ温泉水を用いて、遊離塩素とモノクロラミンの消毒下における消毒効果を比較した。*M. phlei* と *B. subtilis* の消毒耐性はほぼ同程度で、これらの 1-Log 不活化には、モノクロラミンの CT 値がおおよそ 250 mg/L・min に対し、遊離塩素は 2,000 mg/L・min であった。

pH9.6 の高アルカリ温泉水では、モノクロロミンの方が遊離塩素よりも消毒効果が高かった。

#### D3. 高 pH の遊離塩素によるレジオネラ消毒効果の低下

遊離塩素によるレジオネラ不活化試験の結果、pH が高い条件で消毒効果が低かった。当該医療機関の水道水の pH は高く、塩素消毒の効果が不十分である可能性が示唆された。

#### D4. 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

オゾン濃度が 0.8mg/L の条件で、電解オゾン水をろ過器の有効容量(200L)となるように供給したところ、逆洗水のレジオネラ属菌は、途中 1 回検出された以外は、約 10 ヶ月間継続して不検出となった。逆洗前の循環式ろ過器へ電解オゾン水を毎日供給する方法は、設備が単純で操作が簡易であった。

#### D5. フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

FCM 法等の非培養検査の結果を管理に反映する方法を整備した。H 施設で消毒が不完全と判定された循環系に省力化配管洗浄技術を適用し、洗浄後はレジオネラを不検出にできた。J 施設では、丁寧な対話により汚染源を特定し、故障への対応、盲管の撤去など、施設側の適切な判断と処置につなげることができた。

#### D6. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

モバイル型 qPCR 装置を使用した遺伝子検査法は、プロトコルを改良し LAMP 法と同等の感度・特異度を示した。全ゲノム解析を行い、各遺伝子型で組換え領域や SNP 数に差異を認め

た。疫学的に関連のある事例を解析した結果、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株間の SNPs は 0~41 であった。

#### D7. 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態

3 自治体(2 県、1 市)の衛生部局、あるいは保健所職員を対象に、レジオネラ症対応についてオンラインヒアリングを行った。対象施設の検水でレジオネラ陽性になることがあり、その多くは低濃度であった。消毒や洗浄の不足といった問題に対して、徹底方法が課題とされた。職員や施設向けの研修、講習が実施されて、マニュアルも整備されていた。患者と施設の菌株の不一致、培養できないことも多くあった。保健所と衛生研究所との連携が取られていた。

#### D8. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

WG と検討会を立ち上げて検討を行った。WG では浴槽水の塩素濃度の測定における問題点等を検討し、関連する Q&A の質問の作成を試みた。検討会では入浴施設において保健所が行う監視指導時に利用する調査票(確認調査票及び記録調査票)の検討を行い、確認調査票案を作成した。

#### D9. レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS<sup>®</sup>への試験的参加

外部精度管理の選択肢として、情報を整理した。英国 FAPAS に試験的に参加した結果、選択肢の 1 つになり得ると考えられた。

#### D10. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

レジオラート/QT 法における前処理法として、本検討においては酸処理 5 分が適切であると考えられた。

#### D11. 浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

施設にレジオネラ属菌の定着を確認した。洗浄消毒により除染できておらず、より効果的な対応が必要と考えられた。検出頻度の高い ST は、状況によっては、より解像度の高い SNPs 解析が推奨された。

#### D12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良

従来の免疫凝集法で判別不能だった菌株が、新しく開発した M-PCR 法により、型別できるようになった。SG13 と SG14 の型別能力を向上させる改良を加えた。バンドサイズの判定を容易にするポジティブコントロールを用意した。配布用プロトコルを作成した。

#### D13. 分子疫学解析法の活用と環境水における NGS を用いた網羅的解析

プライマーのミスマッチにより増幅されない MLVA 領域に修正対応した。レジオネラ感染事例の全ゲノム解析を行い、施設環境由来株と患者株間の SNPs は 4 個以下であった。

以上、公衆浴場の衛生管理の推進に有用な結果を得た。高 pH で塩素消毒の低下を改めて確認した。高 pH にはモノクロロミン消毒の効果が高かったが、洗浄の大切さが改めて指摘された。モノクロロミン消毒中の病原細菌の増加は認められず、レジオネラ属菌も抑えられていた。オゾン消毒を併用した逆流洗浄により、循環ろ過器のレジオネラ属菌を 10 ヶ月間抑えられた。培養検査より迅速なフローサイトメトリーやモバイル qPCR 法を整備し、応用により不衛生な状態 2 例が改善した。レジオネラ培養検査法の向上に新しい外部精度管理の選択肢を用意し、また複雑な前処理を避けられ

るレジオラート法を検討した。公衆浴場に立ち入る衛生部局とのヒアリングや検討会を行い、通知や手引の改定を準備した。M-PCR 法による血清型別、MLVA 法の改良、SNPs 解析を行い、指導根拠となる分子疫学がより高度化された。患者株と環境株が 2~4SNPs の違いで対応し、感染事故の指導根拠として使われた。レジオネラが長期に施設に定着しており、洗浄消毒の困難さが改めて認識された。

#### E. 引用文献

- 1) 磯目賢一, 中島佳代, 池町真実, 山崎貴之, 中浴伸二, 宮川一也, 永澤浩志. 院内感染で判明したレジオネラ菌による給湯系汚染とその後の対応. 環境感染誌. 2020, 35 巻, 第 2 号.
- 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/11130500/00556111.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) (公社)日本産業衛生学会:許容濃度等の勧告(2022 年度), 産業衛生学雑誌, pp.255, Vol.64, No.5, 2022 年.
- 6) 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.
- 7) 磯部順子ら, 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 30 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者:前川純子, 13-22, 2018.
  - 8) 黒木俊郎ら, ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究, 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)「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 20 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者:倉 文明, 91-100, 2021.
  - 9) 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.
  - 10) 中西典子ら, MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析. 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~3 年度総合研究報告書, 研究代表者:前川 純子, 220-234, 2022
  - 11) 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川 亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果, 2022, 温泉科学, 72, 26-37.
  - 12) 森 康則, 泉山信司, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 枝川亜希子, 藤井 明: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, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」(研究代表者 前川純子)より, 令和 3 年度 分担研究報告書.
  - 13) Hermanowicz, S.W., 微生物起因の水質:規制, 科学, 工学, 1999, 水道協会雑誌, 68(7), 53-63.
  - 14) (社)日本水道協会:水道施設設計指針, pp.219-220, 2000 年.
  - 15) Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, Parkhill J, Harris SR. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015 Feb 18;43(3):e15.
  - 16) 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.
  - 17) MLVA net support site (<http://mlva.i2bc.paris-saclay.fr/MLVAnet/spip.php?rubrique44>) (2023.4.28 時点)
  - 18) 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.
- 19) Yoshimura, D., Kajitani, R., Gotoh, Y., Katahira, K., Okuno, M., Ogura, Y., Hayashi, T., Itoh, T. Evaluation of SNP Calling Methods for Closely Related Bacterial Isolates and a Novel High-Accuracy Pipeline: BactSNP. Microb. Genom. 2019, 5, e000261.
- 20) 泉山信司ら, 省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験-厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和2年度総括・分担研究報告書, 研究代表者:前川 純子, 13-26, 2020.
- 21) 井上浩章, 抗レジオネラ用空調水処理剤協会の取り組みと冷却水系のレジオネラ属菌対策、ビルと環境、No.161、pp.43-50、2018
- 22) Indrelid S, Kleiveland C, Holst R, Jacobsen M, Lea T: The Soil Bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath Interacts with Human Dendritic Cells to Modulate Immune Function. Front Microbiol. 2017;8:320.
- 23) Beheshti Ale Agha A, Kahrizi D, Ahmadvand A, Bashiri H, Fakhri R: Identification of *Thiobacillus* bacteria in agricultural soil in Iran using the 16S rRNA gene. Mol Biol Rep. 2018;45(6):1723-1731.
- 24) Corteselli EM, Aitken MD, Singleton DR: Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class Gamma-proteobacteria, and proposal of Immundisolibacterales ord. nov. and Immundisolibacteraceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2017;67(4):925-931.
- F. 健康危険情報  
なし
- G. 研究発表  
1. 紙上発表  
1) 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果, 2022, 温泉科学, 72, 26-37.  
2) 森 康則, はじめて学ぶ ぼくたちの温泉科学, 2023, 三重大学出版会.  
3) Komatsu S, Tanaka S, Nakanishi N. Evaluation of *Legionella pneumophila* SGUT Serotypes Isolated from Bath Water Using a Multiplex-PCR Serotyping Assay. Jpn. J. Infect. Dis., 76, 77-79, 2023.  
4) Nakanishi N, Komatsu S, Tanaka S, Mukai K, Nomoto R. Investigation of a *Legionella pneumophila* Outbreak at a Bath Facility in Japan Using Whole-Genome Sequencing of Isolates from Clinical and Environmental Samples. Microorganisms. 2022 Dec 22;11(1):28.  
5) 泉山信司, 水の塩素消毒ー病原微生物の塩素消毒にまつわる誤解への回答例, 環境技術, 2022, 51(2), 43-48.  
6) 淀谷雄亮, 原 俊吉, 湯澤栄子, 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

者からのレジオネラ属菌の分離状況と ST1346 の集積について. 感染症学雑誌 2022, 96 (5), 193-197.

## 2. 学会発表

- 1) 柳本恵太, 植松香星, 望月映希, 鶴田芙美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司: 有機物が含まれる温泉におけるモノクロラミンの消毒効果, 令和 4 年度山梨県公衆衛生研究発表会, 2023 年 2 月, 山梨県
- 2) 柳本恵太, 植松香星, 望月映希, 鶴田芙美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司: 山梨県内の温泉施設におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水の菌叢解析について, 第 34 回地方衛生研究所関東甲信静支部細菌研究部会, 横浜市
- 3) 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による不活化, 日本温泉科学会第 75 回大会, 2022 年 9 月, 大分県.
- 4) Nakajima N, Jinnai M, Izumiyama S, Kuroki T. Influence of high pH on chlorine disinfection against *Legionella* spp. The 10th International Conference on *Legionella*. September 2022. Yokohama.
- 5) 中嶋直樹, 陳内理生, 黒木俊郎. レジオネラ属菌に対する遊離塩素の消毒効果における高 pH の影響. 第 4 回 Hospital Water Hygiene 研究会学術集会. 2022 年 11 月. 東京.
- 6) 小森正人, 住谷敬太, 齋藤利明, 泉山信司, 田栗利紹, 電解オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒試験, 日本オゾン協会 第 31 回年次研究講演会, 2022 年.
- 7) Taguri T, Cai G, Nakanishi N, Hiratsuka T, Inoue H, Shimoda T, Shinmichi K, Kura F, Amemura-Maekawa J. Bacterial counts by flow cytometry can determine presence/absence of *Legionella* in bath water. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
- 8) Kanatani J, Fujiyoshi S, Isobe J, Kimata K, Watahiki M, Maenishi E, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Maruyama F, Oishi K. Characterization of bacterial microbiome in water from public bath facilities, especially focused on *Legionella*. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
- 9) Nakaue R, Morita M, Murai M, Amemura-Maekawa J. PCR serotyping of *Legionella pneumophila* based on the diversity of LPS biosynthetic loci. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
- 10) Amemura-Maekawa J, Harada N, Murai M, Morita M, Akeda Y. Evaluating *Legionella pneumophila* NaCl-resistant mutant virulence using *Galleria mellonella* model. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
- 11) 前川純子: レジオネラ属菌検査法の現状と今後の展望. 第 34 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会. 2023 年 2 月. 横浜市.
- 12) 前川純子, 森中りえか, 明田幸宏: *Legionella pneumophila* 血清型別マルチプレックス PCR 法の改良. 第 96 回日本細菌学会総会. 2023 年 3 月. 姫路市.

- 13) Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto, Noriko Nakanishi. The genetic characterization of *L. pneumophila* SG1 isolates from bath water in Kobe City, Japan. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022, Yokohama, Japan.
- 14) Noriko Nakanishi, Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto. Whole-Genome analysis of *L. pneumophila* strains causing outbreak at bath facility in Kobe, Japan. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022, Yokohama, Japan.

### 3. 研修会

- 1) 前川純子:レジオネラ対策、専門課程 I 保健福祉行政管理分野分割前期・専門課程 III 地域保健福祉専攻科、2022 年 5 月、Web 対応.
- 2) 前川純子:レジオネラ属菌の検査と対策、令和 4 年度 短期研修 環境衛生監視指導研修、2022 年 11 月、Web 対応.
- 3) 前川純子:レジオネラ. 令和 4 年度 希少感染症診断技術研修会、2023 年 2 月、Web 対応.
- 4) 泉山信司:レジオネラ等の微生物汚染、検査、対策. 令和 4 年度レジオネラ属菌検査研修会(講義)、2022 年 11 月、静岡
- 5) 泉山信司:令和 4 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2023 年 2 月、Web 対応

### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他
- なし

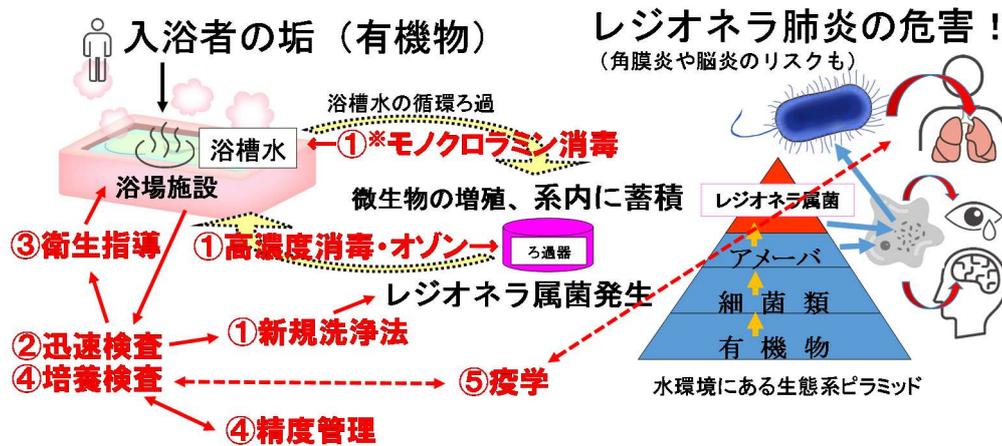


図0 本研究班の編成

※図中の丸数字は、①消毒洗浄、②迅速検査、③保健所衛生部局との連携、④培養検査の向上、⑤分子疫学の高度化の、大きく分けて5分野の課題対応を意味している。

表0 研究協力者一覧

縣 邦雄	アクアスつくば総合研究所	陳内 埋生	神奈川県衛生研究所
浅野 由紀子	愛媛県立衛生環境研究所	新道 欣也	株式会社お風呂のシンドー
安齋 博文	公益財団法人日本建築衛生管理教育センター	杉本 貴之	宮崎県中央保健所
石森 啓益	柴田科学株式会社	杉山 寛治	株式会社マルマ
磯部 順子	富山県衛生研究所	杉山 順一	公益財団法人日本建築衛生管理教育センター
市村 祐二	ケイ・アイ化成株式会社	高久 靖弘	東京都健康安全研究センター
稲窪 大治	日本板硝子株式会社	田中 慶郎	株式会社マルマ
井上 花音	岡山県保健福祉部	田中 忍	神戸市健康科学研究所
井上 浩章	アクアスつくば総合研究所	谷本 健吾	三重県保健環境研究所
植松 香星	山梨県衛生環境研究所	鶴田 英美	山梨県衛生環境研究所
梅津 萌子	東京都健康安全研究センター	豊田 真由美	三重県保健環境研究所
大橋 美至	神奈川県健康医療局	鳥井 良太	株式会社お風呂のシンドー
大森 恵梨子	仙台市衛生研究所	永井 佑樹	三重県保健環境研究所
緒方 喜久代	公益社団法人大分県薬剤師会検査センター	長岡 宏美	静岡県環境衛生科学研究所
尾崎 淳朗	愛媛県保健福祉部	中嶋 直樹	神奈川県衛生研究所
尾崎 吉純	高知県健康政策部	中臣 昌広	オフィス環監未来塾
小田 康雅	シスメックス株式会社	西里 恵美莉	川崎市健康安全研究所
貝森 繁基	内藤環境管理株式会社	野本 竜平	神戸市健康科学研究所
加藤 定男	長崎県環境保健研究センター	久田 美子	山梨県衛生環境研究所
亀山 有貴	三重県保健環境研究所	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
木村 哲也	株式会社ヤマト	藤井 明	健美薬湯株式会社
倉 文明	国立感染症研究所	細川 賢人	花王株式会社
小池 真生子	大阪健康安全基盤研究所	水戸 智文	北海道保健福祉部
小松 頌子	神戸市健康科学研究所	武藤 千恵子	東京都健康安全研究センター
小森 正人	株式会社ヤマト	望月 映希	山梨県衛生環境研究所
蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	森中 りえか	株式会社ファスマック
斎藤 利明	株式会社ヤマト	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所
佐伯 歩	国立感染症研究所	山口 友美	宮城県保健環境センター
佐藤 大輝	三重県保健環境研究所	山本 哲司	花王株式会社
茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社	吉田 裕一	川崎市健康安全研究所
下田 貴宗	株式会社シモダアメニティサービス		

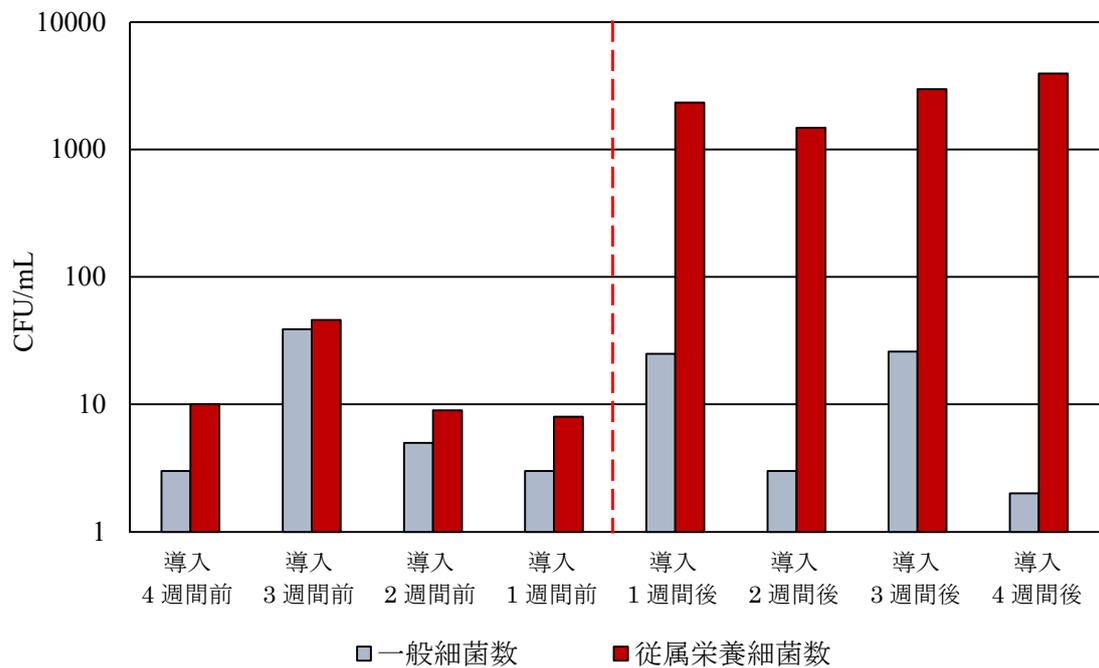


図 1-1 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数

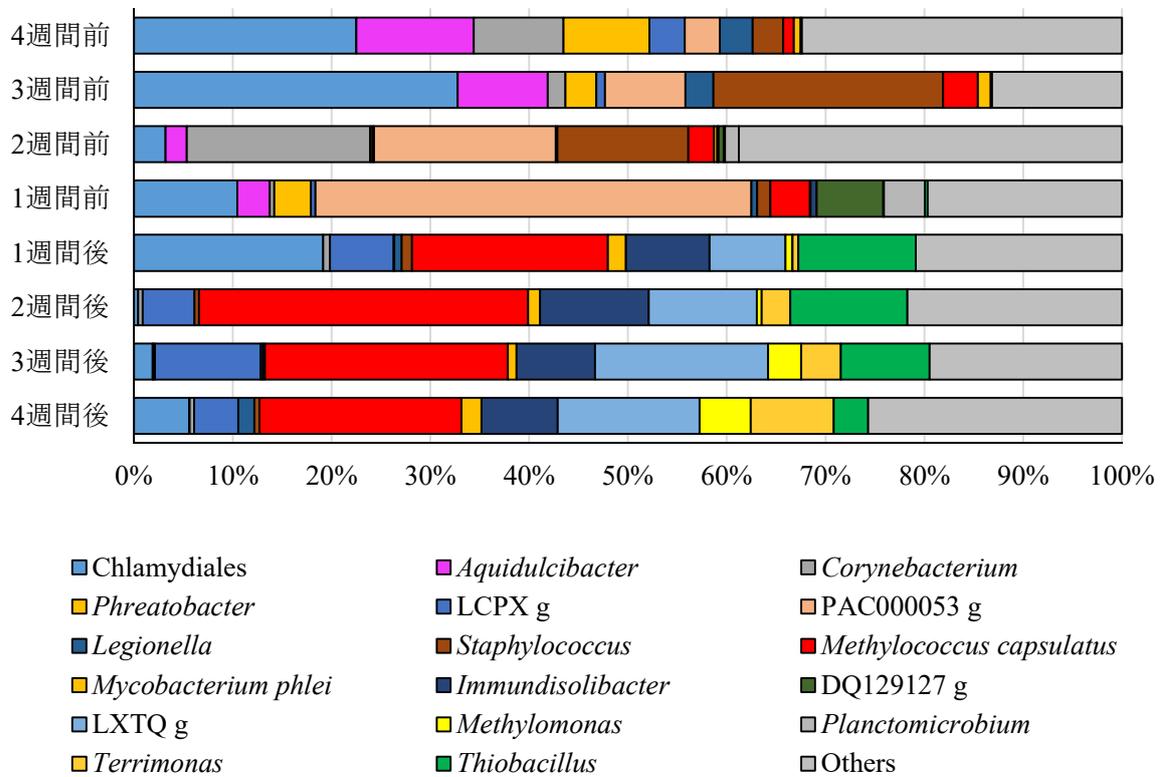


図 1-2 浴槽水の菌叢解析結果

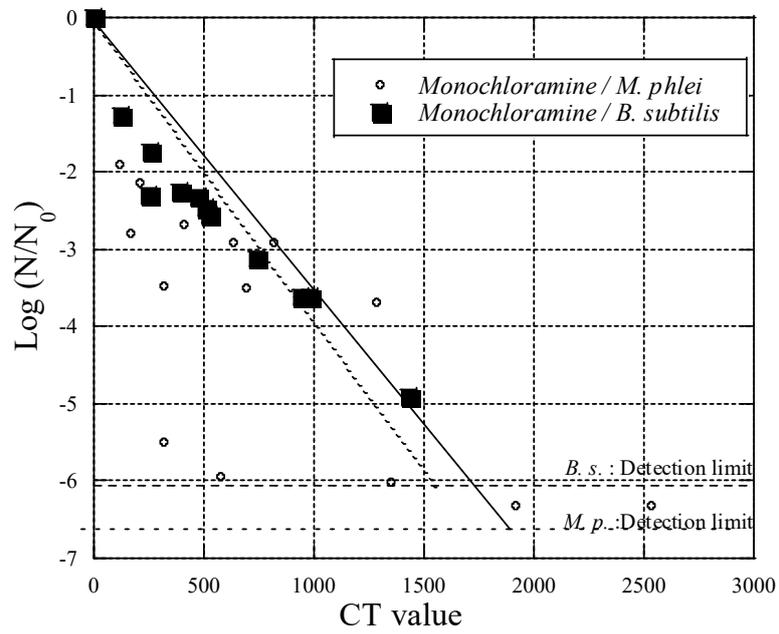


図 2-1 モノクロラミン消毒下の *M. phlei* と *B. subtilis* の不活化の比較  
 実線が *M. phlei*、破線が *B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

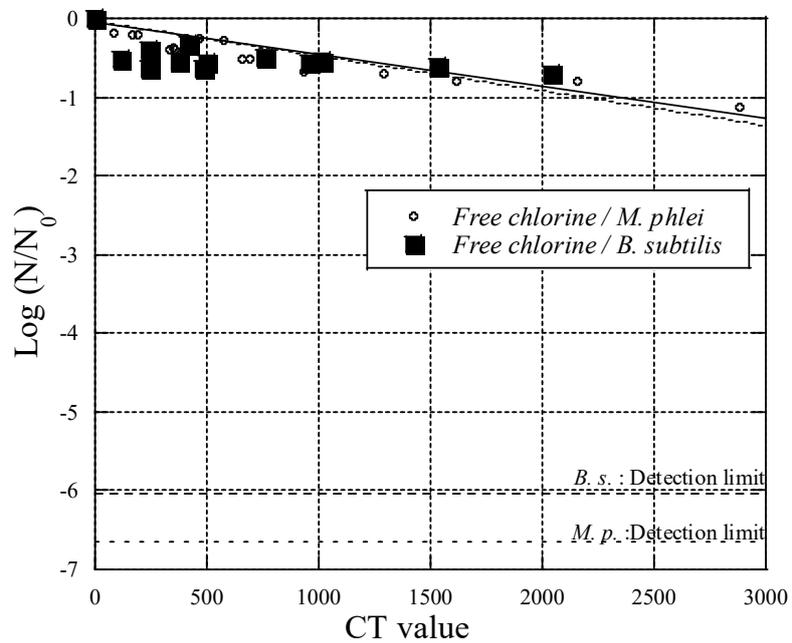


図 2-2 遊離塩素消毒下の *M. phlei* と *B. subtilis* の不活化の比較  
 実線が *M. phlei*、破線が *B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

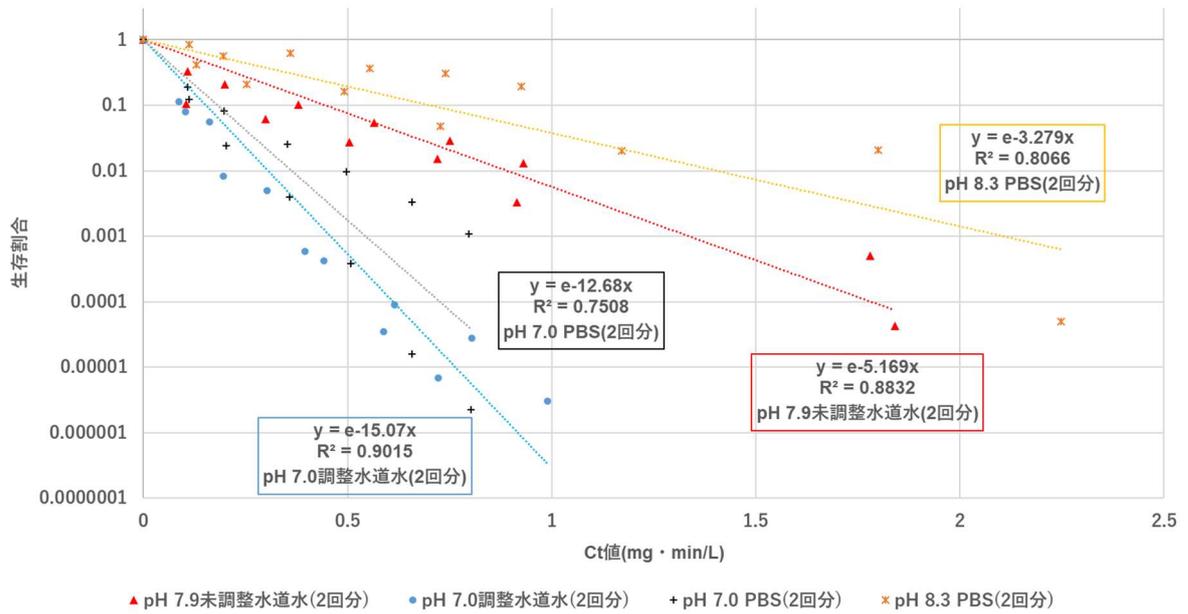


図3 医療機関由来の *L. pneumophila* に対する遊離塩素消毒による不活化曲線

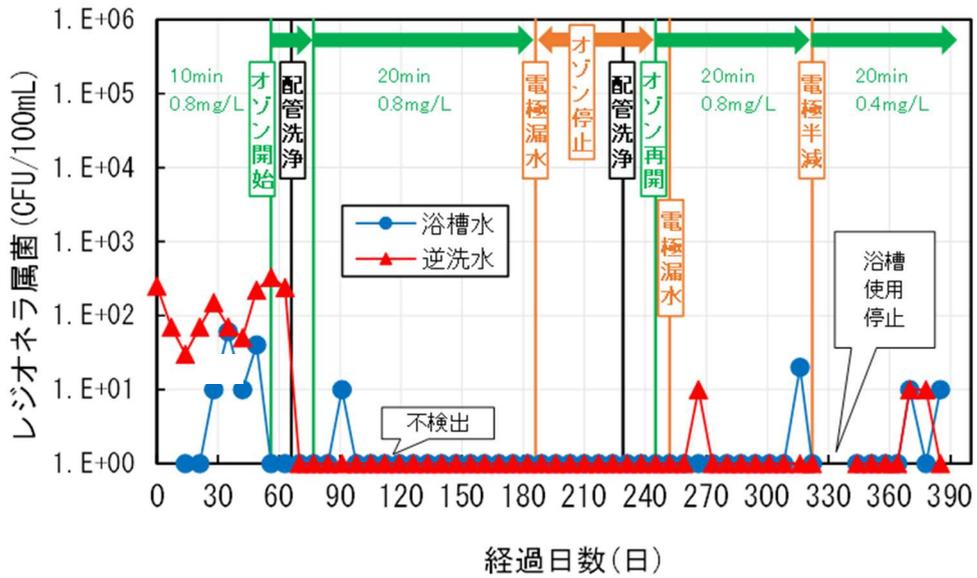


図4 レジオネラ属菌経日変化

レジオネラ属菌の1CFU/100mLは不検出(検出限界10CFU/100mL)を示している。オゾンが56日目より開始して、77日目より電解オゾン水の供給時間を20分間に倍増している。66日目と229日目に過酸化水素によるろ過器と配管の化学的洗浄を行った。186日目に漏水してオゾン进行停止、オゾン電解槽を交換して245日目に再開、322日目に断線により電極面積が半減した。370日目よりレジオネラ属菌が浴槽水と逆洗水から検出され始めた。385日目に本試験を終了した。

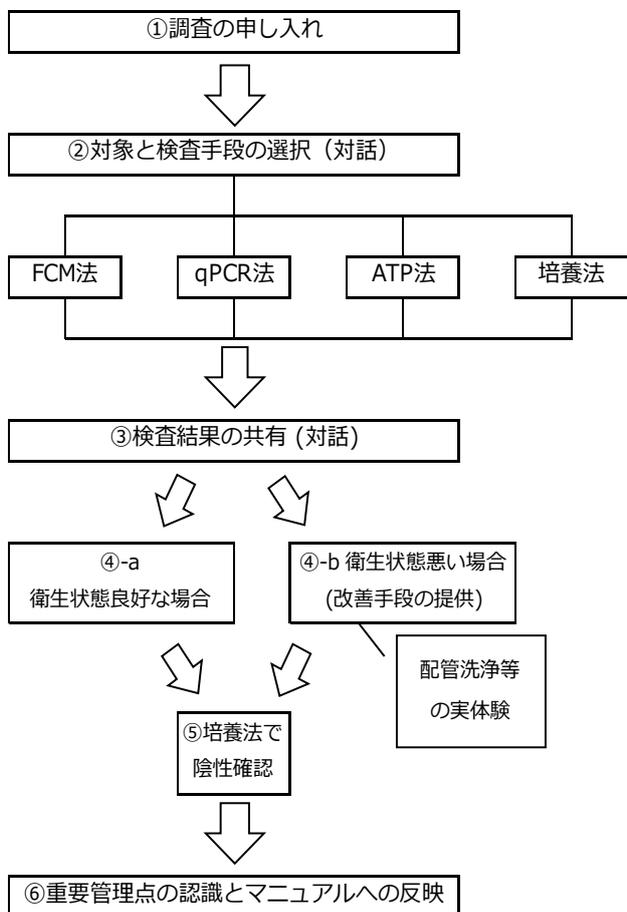


図5 施設との対話、調査フロー

表5 省力化配管洗浄剤の工程ごとの各種検査結果の推移

	処理前		A剤処理1時間後		中和剤注入後		すぎ		通常営業時	
	浴槽水	逆流水	浴槽水	逆流水	浴槽水	逆流水	浴槽水	逆流水	浴槽水	逆流水
培養法										
レジオラート	<10	32	NT <sup>**</sup>	NT	NT	NT	<10	<10	<10	<10
平板培養法	<10	10	NT	NT	NT	NT	10	<10	<10	<10
Lg生菌遺伝子	0	0	NT	NT	NT	NT	7	NT	NT	NT
Lg全遺伝子	19	7	NT	NT	NT	NT	27	NT	NT	NT
FCM法	287	587	103,233	53,987	493	9,073	353	4,007	90	40
ATP法	47	53	3	137	1	10	5	4	34	24
残留塩素濃度	0.23	0.53	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.50	0.60

<sup>\*\*</sup>MPN: most probable number, CFU: colony forming unit, GU: gene unit (CFU-equivalent value), RLU: relative light unit, <sup>\*\*</sup>NT: not tested

表 6-1 遺伝子検査法と平板培養法との相関

A)

		平板培養 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
LAMP	+	5	8	13
	-	1	16	17
		6	24	30

B)

		平板培養 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
モバイルqPCR	+	6	10	16
	-	0	13	13
		6	23	29

表 6-2 4 遺伝子型 (ST) における組換え領域と SNPs

ST	株数	分離年	平均ゲノムサイズ (bp)	平均組換え領域 (bp)	%	総SNPs	組換え領域内のSNPs	%
ST23	14	2010-2021	3,430,085	79,450	2.3	11,270	10,983	97.5
ST120	21	2006-2021	3,379,816	61,726	1.8	18,122	17,983	99.2
ST502	32	2005-2021	3,375,724	24,586	0.7	4,926	4,264	86.6
ST505	30	2005-2021	3,380,811	59,507	1.8	7,948	7,168	90.2

ST	組換え領域外のSNPs	%	2株間の最大SNPs	2株間のSNPsが5以内の組み合わせ
ST23	287	2.5	99	8
ST120	139	0.8	40	62
ST502	662	13.4	191	6
ST505	780	9.8	194	3

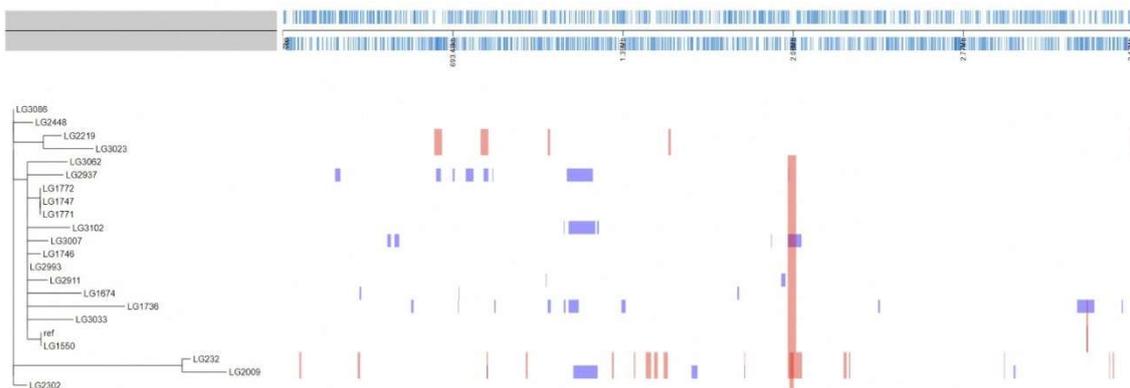


図 6 ST120 型における組み換え領域の例示

上部はレファレンス配列の ORF 領域を約 4,000 程の縦線で示した。左下は ST120 型の 20 株強の系統樹を示した。右下は組換え領域を示しており、赤色は複数の株で検出された領域、青色は 1 株のみに検出された領域。

表 7 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態(抜粋)

項目	A 県	B 県	C 市
過去 5 年間の、患者数、施設からの検出状況等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・当該保健所：入浴施設での検出事例(令和元年に 1 件、ただし患者は出ていない；280 CFU/100 mL)</li> <li>・検出濃度は、通常は 10 ~&lt; 100 CFU/100 mL がほとんど</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・当該保健所：H30 年：1 件、令和元年：3 件、令和 2 年：9 件、令和 3 年：1 件、令和 4 年：3 件</li> <li>・検出濃度は、10~&lt; 100 CFU/100 mL が多い。</li> <li>・水に関連したと断定した症例は 0</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・患者数：H29 以降、年 35 件、42 件、55 件、40 件、38 件</li> <li>・検出施設数／検査数：H29 以降、年 4/36、3/38、4/47、4/28、11/32</li> <li>・検出濃度：集計していないが、10~100 CFU/100 mL 程度、多いと 10000 CFU/100 mL</li> </ul>
発生施設の特徴、発生施設への指導、施設による対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>陽性施設の特徴：消毒の方法に問題があり、頻度が十分でない場合が多い(全く消毒をしていない施設はない)</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・これまで、レジオネラ症(患者)の原因となった施設の断定・推定はなし</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>患者からの株と施設からの株は、一致しない方が多い</u></li> <li>・<u>患者菌株が増えなかったり、逆のケースもある</u></li> </ul>
職員への研修の実施	<ul style="list-style-type: none"> <li>・5~6 月に異動した職員への研修を実施</li> <li>・これまでは、現場での実施研修を行っていたが、新型コロナで休館中</li> <li>・現場の研修は重要、聞くより体験</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・初任者研修があり、その中で、関連法規、監視指導のやり方について研修</li> <li>・業務マニュアルを作成している。職員は熟読している</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・OJT が基本、初任期研修の中でレジオネラ症に関する内容あり</li> <li>・感染症の観点から保健師と共同研修あり</li> </ul>
事業者向けの講習会、その他の啓発方法(リーフレット、インターネット Web ページ等の作成や紹介)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・年に 1 回県主体の入浴施設の責任者を対象とした講習会を実施(新型コロナ後再開予定)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・公衆浴場、旅館等、保健所が考えて実施(令和 2、3 年は実施していない)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・web 上で手引書の例</li> <li>・リーフレット配布、動画も作成</li> <li>・年 1 回、社会福祉施設事業者向けの講習会</li> </ul>
他部局との連携	<ul style="list-style-type: none"> <li>・本庁の衛生管理課や感染症対策課、<u>保健所、衛研と連携</u></li> <li>・高齢者部署に情報提供</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>衛生研究所との連携あり(保健所は検体採取、指導機関。衛生研究所は検査機関)</u></li> <li>・県庁衛生部局、感染症対策課とも連携</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>地衛研と連携あり</u></li> <li>・<u>検査は衛研のみが実施</u></li> </ul>
今後の目標や課題	<ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>実地研修の施設の確保</u></li> <li>・県としては現在、大きな問題は無いと考えている。事故発生した際の影響の大きさを知らない入浴施設の経営関係者が多くなってきているのが課題かもしれない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・<u>施設の清掃・消毒方法に欠陥があったり、自主検査を規定の頻度で実施していない施設も多く、どのようにレジオネラ症防止対策のための衛生管理を徹底させるかが課題</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・適切な維持管理の方法について、今後も指導していきたい</li> <li>・レジオネラや水質汚染事故は健康被害に直結するため、対応の優先度は高い</li> <li>・自主検査で発生が明らかとなった場合は、出来るだけ立入に行く</li> </ul>

表 8 確認調査票案(構造設備基準)(検討中)

項目		基準	管理要領 / 条例等			
構造設備基準	貯湯槽	60℃以上に保つ能力を要する加熱装置が設けられている これにより難しい場合は消毒する設備が設けられている 完全に排水できる				
	配管	ろ過器および循環配管に接続しない構造、原湯を浴槽水面の上方から浴槽に落とし込む構造である				
		内湯と露天風呂の接続	露天風呂の湯が内湯に混じることのない構造である			
		配管状況	配管の状況を正確に把握し、不要な配管を除去する			
		排水	配管内の浴槽水が完全に排水できる構造とする			
	ろ過器	設置	浴槽ごとの設置が望ましい			
		ろ過能力	1時間当たり浴槽の容量以上のろ過能力を有する			
		逆洗浄	逆洗浄を行える			
		排水	完全に排水できる			
		集毛器	ろ過器に毛髪等が混入しないように、ろ過器に入る前に設ける			
	気泡発生装置等	構造	連日使用した浴槽水を使用する構造でない			
		点検、清掃、排水	点検、清掃及び排水が容易に行うことができる			
		空気取入口	土ぼこりが入らない構造である			
		循環水の吐出口	浴槽の底部に近い部分に設置する			
		消毒剤の注入又は投入口	浴槽水がろ過器内に入る直前に設置されている			
		打たせ湯・シャワーの構造	循環ろ過水及び浴槽水を用いる構造でない			
		オーバーフロー回収槽の構造	浴用に供する構造になっていない 浴用に供する場合、オーバーフロー還水管は循環配管に接続せず回収槽につなぐ 浴用に供する場合、地下埋設でなく清掃が容易にできる 浴用に供する場合、消毒設備を設置する			
		水位計	構造	配管内を洗浄・消毒できる構造とする、あるいは配管を要しないセンサー方式にする		
		調節箱	構造	清掃しやすい構造とする		
			消毒	薬剤注入口を設けて塩素消毒できるようにする		

表9 日本国内から参加可能なレジオネラ検査外部精度管理

名称	レジオネラ属菌 検査精度管理サーベ イ	External Quality Assessment of Water Microbiology <i>Legionella</i> Isolation from Water Samples	FAPAS <sup>®</sup> (Food Analysis Performance Assessment Scheme)
実施者	日水製薬株式会社	UKHSA (UK Health Security Agency) 英国健康安全保障庁	Fera (The Food and Environment Research Agency) 独立行政法人英国食料環境研究 庁(英国環境食料農村地域省傘 下)
国	日本	英国	英国
日本からの参加実績	あり	あり	なし
参加費 (1回あたり)	38,500円(消費税込)	172ポンド(2022年度) (約30,000円)	52,800円(消費税込)
年間実施回数	1	4	4
参加者数	約180	114~173(1回あたり)	20程度(1回あたり)
国内代理店の有無	—	なし	あり(セントラル科学貿易)
日本語サポート	—	なし	あり
配付試料の輸送	冷凍	常温	常温
検査実施までの保管	冷凍	冷凍	冷蔵
1回あたりの 配付試料数	1	2	2
配布試料中のレジオネ ラ以外の細菌の混合	なし	あり	なし
いずれかの配布試料中 にレジオネラが含まれな い可能性	なし	あり	あり
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種	<i>Legionella pneumophila</i> のみ	複数種	複数種
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種数	1種	1~2種	1~2種
配布試料の形状	BioBall フリーズドライ	Lenticule Disc ゼラチン状のディスク	Lyophilized sample フリーズドライ様
検査方法	指定法	自施設の方法	自施設の方法 非選択培地を用いる (選択培地で参加も可)
検査結果の報告	菌数	菌数 菌種(血清群)	菌数 菌種(血清群)
解析方法	Zスコア	Zスコア	Zスコア
分析レポートの ページ数	23	10	28

この他に、米国 CDC の ELITE (The Environmental Legionella Isolation Techniques Evaluation) があるが、日本から参加可能かは不明である。

表 10-1 レジオラート陽性一覧

No.	レジオラート/QT法			平板培養法	検出菌種	LAMP法
	未処理	酸処理5分	酸処理10分			
1	10	0	0	30	Lp SG5, 6	+
2	10	11	11	10	Lp SG6	+
3	11	0	11	<10	-	+
4	11	0	23	10	Lp SG6	+
5	11	0	0	10	Lp SGUT	+
6	22	22	11	20	Lp SG6	+
7	22	32	0	10	Lp SG5	-
8	22	0	11	50	Lp SG1, 6	+
9	23	23	11	40	Lp SGUT	+
10	23	10	0	70	Lp SG1	+
11	39	0	0	10	Lp SG1	+
12	39	0	0	10	Lp SG5	+
13	39	11	52	10	Lp SG5, 10	+
14	43	11	0	10	Lp SG5, 6	NT
15	52	58	47	<10	-	+
16	65	84	39	210	Lp SG1, 5, 6, 9	NT
17	124	22	22	50	Lp SG3	+
18	146	74	79	180	Lp SG1	+
19	223	146	124	100	Lp SG2, Lsp	+
20	246	155	123	160	Lp SG5	+
21	264	84	39	180	Lp SG6	+
22	361	74	52	330	Lp SG3, 4	+
23	416	474	361	400	Lp SG6, 7	+
24	474	223	146	580	Lp SG1, 3, 5, 9	NT
25	642	854	659	2600	Lp SG4	+
26	921	361	219	700	Lp SG6, SGUT	+
27	4096	0	0	190	<i>L. thermalis</i> , <i>L. Nagasakiensis</i>	NT

表 10-2 2×2 分割表(未処理)

		平板培養法		計
		検出	不検出	
レジオラート/QT法 (未処理)	陽性	25	2	27
	陰性	4	59	63
	計	29	61	90

表 10-3 2×2 分割表(酸処理 5分)

		平板培養法		計
		検出	不検出	
レジオラート/QT法 (酸5分)	陽性	20	1	21
	陰性	9	60	69
	計	29	61	90

表 10-4 2×2 分割表(酸処理 10分)

		平板培養法		計
		検出	不検出	
レジオラート/QT法 (酸10分)	陽性	18	3	21
	陰性	11	58	69
	計	29	61	90

表 11 同一施設で複数回の同一 ST が検出された一覧

ST new は ST 番号が付与されていない allele の組み合わせであったものを示す。

\* 表記 ST が同年月に複数の検体から分離されたことを示す。

施設	血清群	ST	株数	検体採取年月			
				2018/10	2020/2		
A	SG1	552	2	2018/10	2020/2		
B	SG1	1	3	2017/11*	2018/10		
C	SG5	new5	2	2018/3	2018/4		
	SG12	362	6	2018/3*	2018/4	2020/2*	2021/12
D	SG4	new9	2	2020/2	2021/7		
	SG10	new9	2	2020/2	2021/7		
E	SG1	552	4	2017/8	2018/7	2020/7	2021/10
F	UT	new3	3	2018/2*	2019/2		
G	SG5	2790	2	2017/7	2020/7		
H	SG5	new1	2	2017/8	2021/7		
I	SG1	278	2	2019/2	2021/11		
	SG1	2075	2	2018/3	2021/11		
	SG3	1996	2	2018/3	2019/2		
J	SG6	537	2	2018/3	2021/11		
	SG1	128	2	2017/8	2021/6		
K	SG8	1324	6	2017/8	2019/12*	2021/6*	2021/7
	SG1	2076	3	2020/11*			
L	SG5	1631	2	2021/6*			
M	SG1	129	2	2020/11	2021/12		
	SG6	114	2	2019/11	2021/12		
N	SG6	191	4	2018/2	2018/3	2020/2*	
	SG6	292	2	2018/2	2019/2		
O	SG6	68	2	2019/1	2019/12		
P	SG5	new6	2	2019/1	2019/12		
Q	SG3	506	8	2017/7	2019/12*	2021/2	2021/7*
	SG8	new2	2	2017/12	2019/12		
	SG6	68	8	2017/8	2018/8	2019/8*	2020/2
R	SG6	68	8	2017/8	2018/8	2019/8*	2020/8

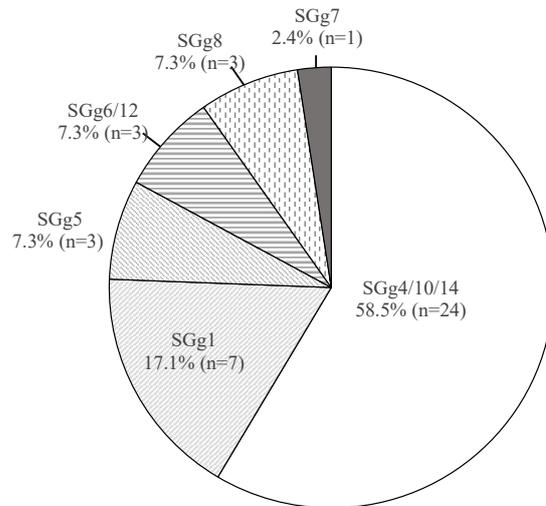


図 12-1 レジオネラ免疫血清で SGUT と判定された *L. pneumophila* 41 株の、M-PCR 法を用いた血清群別 (SGg) の結果割合

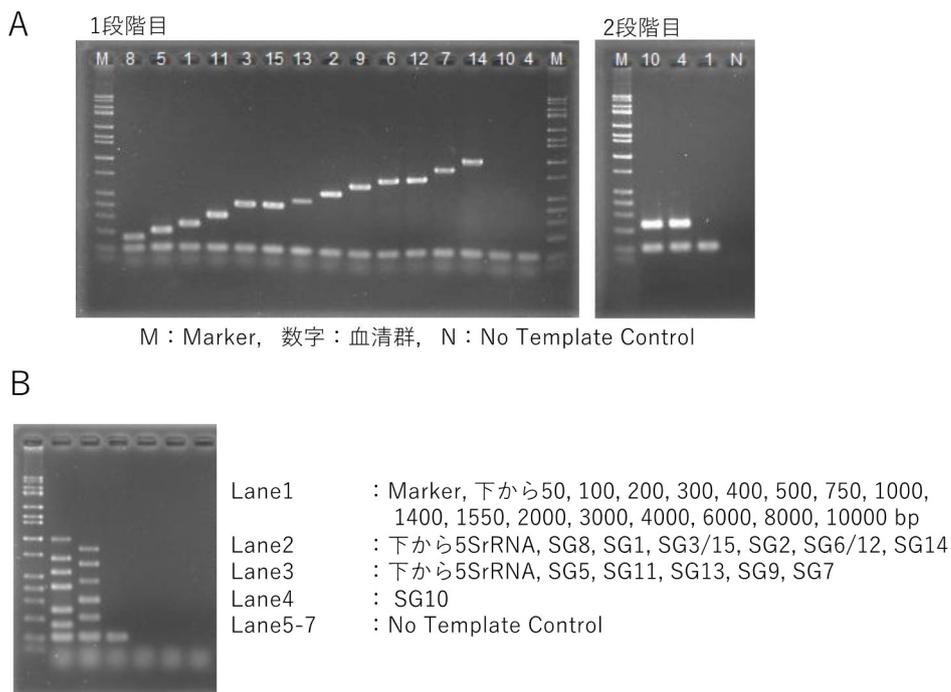


図 12-2 基準株を用いたポジティブコントロールの用意

(A) 各血清群の菌株から抽出した DNA を鋳型に用いた、各 M-PCR の結果。(B) 出現するバンドが 1 段おきになるよう、抽出 DNA を混合してポジティブコントロール (2 セット) を用意した。各セットを鋳型に M-PCR を行った結果 (Lane 2 がセット 1、Lane3 がセット 2 に対応)。

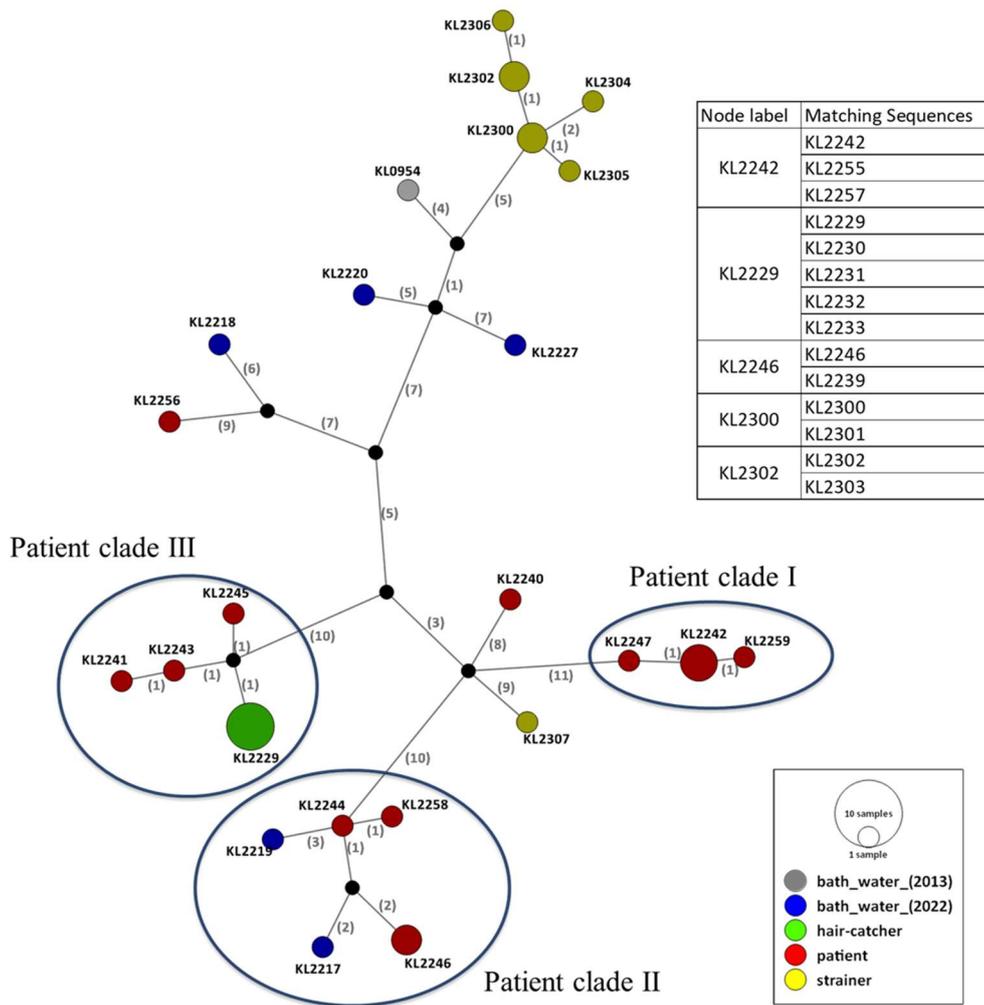


図 13 レジオネラ症発生事例の SNPs 解析に基づくハプロタイプネットワーク図  
各ノード間の数字は SNPs の数を表す

令和4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)

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部

### 分担研究報告書

#### モノクロラミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

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	望月 映希	山梨県衛生環境研究所	生活科学部
研究協力者	鶴田 芙美	山梨県衛生環境研究所	生活科学部
研究協力者	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所	微生物部
研究協力者	久田 美子	山梨県衛生環境研究所	微生物部
研究協力者	田中 慶郎	株式会社マルマ	PC 営業部
研究協力者	杉山 寛治	株式会社マルマ	研究開発部
研究協力者	茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社	機能性薬品部
研究協力者	市村 祐二	ケイ・アイ化成株式会社	機能性薬品部

#### 研究要旨

遊離塩素による消毒が困難なアンモニア態窒素、有機物、鉄、マンガンを含む温泉や高pHの温泉であっても、結合塩素のモノクロラミンはレジオネラ属菌への有効性が確認されている。ただし、連用により従属栄養細菌数が増加することから、菌叢の変化に懸念がある。本研究では遊離塩素消毒が困難な、有機物を含む温泉利用の営業1施設の協力を得て、モノクロラミン消毒の実証試験を行い、濃度の安定性、消毒効果、菌叢の変化について調査した。モノクロラミン導入前の4週間と導入後の4週間に、週1回の頻度で営業終了後の浴槽水を採水した。モノクロラミンの濃度は、薬液注入量の調節により、概ね3~6 mg/Lを安定的に維持することができた。モノクロラミン消毒の結果として、遊離塩素消毒の管理時に検出されたレジオネラ属菌が、検出下限値未満になった。しかし従属栄養細菌数と16S rRNA遺伝子のコピー数が増加し、*Aquidulcibacter* 属菌などが減少する一方で、非病原菌である *Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌などが増加した。レジオネラ属菌の抑制が可能であった一方で他の細菌の増加が確認され、洗浄等によりバイオフィルムを抑えることが重要と考えられた。

## A. 研究目的

公衆浴場におけるレジオネラ症の発生防止のため、もっぱら次亜塩素酸ナトリウム（遊離塩素）により浴槽水の消毒が行われている。多くの場合、遊離塩素消毒は有効に作用するが、アンモニア態窒素、鉄、マンガ、有機物を含む温泉では濃度が低下し、高pHの泉質の場合、十分な消毒効果を発揮しないことが知られている。

遊離塩素とアンモニアの反応により生成される結合塩素のモノクロラミンは、前述の条件下であってもレジオネラ属菌に対する有効性が確認されている<sup>1)</sup>。ただしモノクロラミンの連用により、*Mycobacterium phlei* 等の細菌の増加が報告されている<sup>2)</sup>。*M. phlei* は非結核性抗酸菌症の近縁であることから、感染報告の例がほとんどなくても、一応の注意が払われている。その様な病原性細菌に類するものの増加が他にも生じるのか、モノクロラミン消毒による菌叢への影響を確認する必要がある。先の菌叢の検討では、元から源泉水にアンモニア態窒素が含まれており、遊離塩素管理をしているつもりが、結果としてモノクロラミンの結合塩素消毒が行われていた。そのためモノクロラミンの導入による菌叢の変化は、不明瞭な結果であった<sup>3)</sup>。

そこで本研究では、有機物を含んではいるが、アンモニア態窒素濃度が比較的低い温泉を利用した公衆浴場において、モノクロラミン消毒の実証試験を行った。消毒効果、濃度の安定性、並びに菌叢の変化を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 対象施設

対象施設は全有機体炭素 (TOC: 湿式酸化方式による測定) が 2.4 mg/L、アンモニア態窒素 0.2 mg/L を含む、pH7.5 の源泉水を利用していた (表 1)。入浴者数は 1 日に 400~800 名程度で、浴槽水の循環ろ過系統を有しており、毎日換水・清掃していた。試験対象浴槽は約 45 m<sup>3</sup> の内湯とした。

### (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) を設置し、遊離塩素製剤 (ケイミックス SP、ケイ・アイ化成) とアンモニウム製剤 (レジサイド、ケイ・アイ化成) からモノクロラミン溶液を用時調製し、施設内全ての循環系統に添加した。浴槽水のモノクロラミン濃度として、概ね 3~6 mg/L の範囲となるように一定の注入量を設定した。試験期間中のモノクロラミン濃度の測定は、全残留塩素 (全塩素) の測定で代替した。

週 1 回、営業終了後に循環配管を高濃度モノクロラミンで消毒した (図 1)。具体的には、モノクロラミン濃度を 10~15 mg/L 程度に上昇させ、翌朝まで約 9 時間の循環を行い、配管を消毒した。消毒後、浴槽水は全て排水し、浴槽を洗浄した。

事前に試験管内で、源泉水による遊離塩素およびモノクロラミンの消費量を確認した。

### (3) 各種測定

各種の微生物試験は、定法に従い実施した。浴槽水は、チオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に採水した。細菌培養用は冷蔵、アメーバ培養用の試料は常温にて、搬送・保存した。採水は、モノクロラミン導入前の 4 週間と導入後の 4 週間の、週に 1 回、営業終了後に実施した (図 1)。レジオネラ属菌は、

0.20 µm ポリカーボネート製メンブレンフィルター(ADVANTEC)でろ過濃縮した 100 倍濃縮液を、熱処理または酸処理し、GVPC 寒天培地を用いて 35°C で 7 日間培養した。大腸菌群は、浴槽水 100 mL を EC ブルー-100P「ニッスイ」を用いて 35°C で 24 時間培養した。一般細菌数は、標準寒天培地を用いて 35°C で 48 時間培養した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 42°C の 14 日間で求めた。モノクロラミン消毒導入後の R2A 培地から、代表株の 16S rRNA 遺伝子配列(V3/V4 領域)を決定し、BLAST により相同性検索を行った。モノクロラミン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-検定の危険率 5%未満を有意差ありと判定した(Microsoft Excel 2016)。自由生活性アメーバは、浴槽水原液、および 1,000×g の 5 分間で 50 倍に遠心濃縮した濃縮試料の各 1mL について、大腸菌塗布無栄養寒天培地を用いて 42°C で 14 日間培養した。

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

浴槽水中の 16S rRNA 遺伝子コピー数の定量、同遺伝子の V3/V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンスによる菌叢解析、および菌叢の変化を比較する群間比較解析を行った(生物技研)。DNA 試料は、浴槽水 1L をろ過したフィルターから、DNeasy PowerSoil Pro kit(QIAGEN)を用いて抽出した。モノクロラミン導入前後の 16S rRNA 遺伝子コピー数を比較し、前述の比較と同じ、t-検定の危険率 5%未

満を有意差ありと判定した。

### C. 研究結果および考察

源泉水中の遊離塩素およびモノクロラミンの消費量は、遊離塩素が 2.1 mg/L 相当に対して、モノクロラミンは 0.2 mg/L 相当と消費量が少なかった(図 2)。遊離塩素濃度は経時的に減少したが、モノクロラミン濃度は安定であった(図 3)。今回の施設におけるモノクロラミンの濃度維持は、遊離塩素よりも有利と考えられた。

浴槽水中の全塩素濃度は、当初不調であった薬剤注入ポンプの改善と、注入量の調整後に、3~6 mg/L 程度を安定的に維持していた(図 4)。前回の結果<sup>3)</sup>と同様に、有機物を含む温泉においても、モノクロラミン濃度の維持は可能であった。

浴槽水のレジオネラ属菌は、モノクロラミン導入前の 1 検体から検出され、*Legionella pneumophila* 血清群 1 が 10 CFU/100 mL であった。他は全て検出下限値未満で、モノクロラミンは有機物を含む泉質においてもレジオネラ属菌を安定的に抑制できていた。

モノクロラミン消毒導入の前後を通じて、自由生活性アメーバ、大腸菌群はいずれも検出されなかった(表 2)。

浴槽水中の一般細菌数はいずれも 40 CFU/mL 未満であり、モノクロラミン消毒導入前後で定量値に大きな変化は確認されなかった。一方、導入後の従属栄養細菌数は 1,000~4,000 CFU/mL と導入前よりも 100 倍程度に有意に増加した(図 5)。増加した従属栄養細菌の 16S rRNA 遺伝子は、解析した 7 株全てが *M. phlei* と 100%(446 bp/446 bp)一致していた。以前の試験<sup>4)</sup>に準じて、高濃度モ

ノクロラミン配管消毒の濃度を 10~15 mg/L で実施したが、*M. phlei* の増殖を抑えることができなかった。

以前の施設との相違点としては、今回の施設では浴槽水の pH が 2 程度低いことと、1 日当たりの入浴者数が 8 倍程度 (350~700 名) 多いことが挙げられる。pH については、高い浴槽水でも従属栄養細菌の増殖が確認されており<sup>4)</sup>、pH5 の人工炭酸泉では今のところ増殖がない。pH が低いほうが増殖しづらいのは、モノクロラミンであっても低 pH で消毒効果が高いことの反映と示唆された。入浴者数については、1 日当たりの入浴 400 名以上で従属栄養細菌数が増加し、100 名未満は増加しない傾向であった<sup>3,4)</sup>。現在までのところ、pH による消毒効果の強弱と、入浴者による汚染の負荷量に、従属栄養細菌数の増加との関連性が示唆された。繰り返しになるが、洗浄等の対策が必要と考えられた。

浴槽水中の 16S rRNA 遺伝子のコピー数は導入後、100 倍から 1,000 倍程度に有意に増加した (図 6)。これは *M. phlei* を主体とする従属栄養細菌数の増加と整合性があった。ただし、遊離塩素よりもモノクロラミンの方が浴槽水中の DNA 分解能力が低い<sup>5)</sup>ことが報告されており、分解されず残存した死菌由来の DNA を検出した可能性も考えられた。

菌叢解析で属や種まで判明したのとして、モノクロラミン導入前は *Staphylococcus* 属菌、*Corynebacterium* 属菌、*Aquidulcibacter* 属菌の順で存在割合が高かった。モノクロラミン導入後は *Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌の順で割合が高く、モノクロラミン消毒により浴槽水中の菌叢が大きく変化していた。前回の菌叢解析<sup>3)</sup>で優占種であった

*Methylomonas* 属菌は経時的に増加傾向にあった (図 7)。前回の施設同様にモノクロラミン消毒を長期間連用した場合には、*Methylomonas* 属菌が優占種となる可能性が考えられた。

群間比較解析により細菌の系統ごとの増減を解析した結果、モノクロラミン導入により *Staphylococcus* 属菌、*Aquidulcibacter* 属菌などの 111 系統が有意に減少し、*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌など 152 系統が有意に増加した (図 8、図 9)。ただし大部分の細菌は存在割合が 1%未満であり、割合が大きい系統にはモノクロラミン消毒の影響が強く生じても、割合の少ない菌種の菌叢に与える影響は限定的と考えられた。レジオネラ属菌や、R2A 培地で増加を確認した *M. phlei* は、いずれも有意な増減はなかった。培養と結果が真逆に見える疑問が生じており、今後詳細な検討が必要である。*M. phlei* については、本研究班の森らが試験管内消毒試験を検討中である。

モノクロラミン消毒時に存在割合が高く、有意に増加した *Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌はいずれも環境中に存在する細菌であり<sup>6-8)</sup>、病原性の報告はなかった。これらの細菌による健康影響はないと考えられるが、バイオフィルム抑制の観点から排除する必要があり、洗浄等の対策が必要と考えられた。

#### D. 結論

有機物を含む温泉の営業 1 施設の協力を得て、モノクロラミン消毒を行った。レジオネラ属菌を抑制することができた一方で、従属栄養細菌数や、16S rRNA 遺伝子コピー

数の増加が確認された。菌叢解析の結果、*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌の増加が確認された。バイオフィルム対策として、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<sup>10</sup> 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. 長岡宏美, 泉山信司, 八木田健司, 杉山寛治, 小坂浩司, 壁谷美加, 土屋祐司, 市村祐二, 青木信和:社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について, 厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究 平成 28 年度分担研究報告書
3. 柳本恵太, 泉山信司, 望月映希, 大森雄貴, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二:有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒, 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 令和3年度分担研究報告書
4. 柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司:山梨県のアルカリ性 (pH10程度) 温泉

におけるモノクロラミン消毒の有効性の検討, 日本防菌防黴学会誌, 49, (2021), 261-267

5. 泉山信司, 藤井明, 松田宗大, 松田尚子, 枝川亜希子, 吉田光範, 星野仁彦:モノクロラミン消毒の薬湯への応用、並びに雑菌への対応, 厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究 平成 30 年度分担研究報告書
6. Indrelid S, Kleiveland C, Holst R, Jacobsen M, Lea T: The Soil Bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath Interacts with Human Dendritic Cells to Modulate Immune Function. *Front Microbiol.* 2017;8:320.
7. Beheshti Ale Agha A, Kahrizi D, Ahmadvand A, Bashiri H, Fakhri R: Identification of *Thiobacillus* bacteria in agricultural soil in Iran using the 16S rRNA gene. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):1723-1731.
8. Corteselli EM, Aitken MD, Singleton DR: Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class Gammaproteobacteria, and proposal of Immundisolibacterales ord. nov. and Immundisolibacteraceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(4):925-931.

#### F. 研究発表

誌上発表  
なし

口頭発表

1. 柳本恵太, 植松香星, 望月映希, 鶴田  
芙美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎,  
杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山  
信司: 有機物が含まれる温泉における  
モノクロラミンの消毒効果、令和 4 年  
度山梨県公衆衛生研究発表会, 2023 年  
2 月, 山梨県
2. 柳本恵太, 植松香星, 望月映希, 鶴田  
芙美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎,

杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山  
信司: 山梨県内の温泉施設におけるモ  
ノクロラミン消毒実証試験と浴槽水の  
菌叢解析について、第 34 回地方衛生研  
究所関東甲信静支部細菌研究部会、横  
浜市

**G. 知的所有権の取得状況**

特許申請・実用新案登録、その他  
なし

表 1. 源泉水の分析値

項目	分析値	項目	分析値
全塩素	0.1 mg/L	Cl <sup>-</sup>	414.8 mg/L
pH	7.5	Br <sup>-</sup>	0.8 mg/L
ORP	+59 mV	I <sup>-</sup>	<0.1 mg/L
一般細菌数	57 CFU/mL	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	<0.1 mg/L
TOC	2.4 mg/L	硫黄*	<0.1 mg/L
腐植質	<0.1 mg/L	マンガンイオン	0.1 mg/L
アンモニア態窒素	0.2 mg/L	総鉄イオン (鉄(II)イオン)	0.4 mg/L (0.1 mg/L)

\* 硫化水素(H<sub>2</sub>S)、硫化水素イオン(HS<sup>-</sup>)、硫化物イオン(S<sup>2-</sup>)の合計値

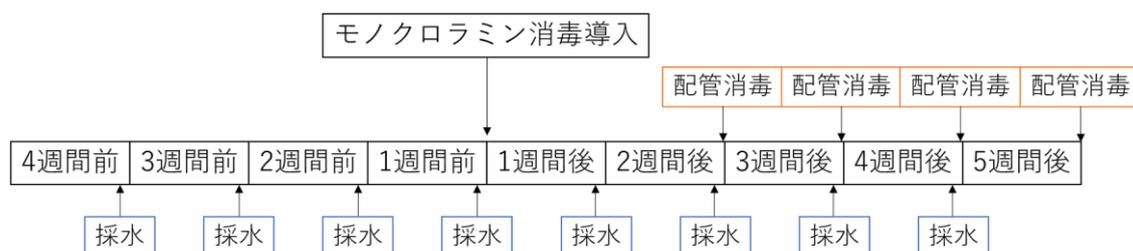


図 1. 試験期間中の採水・高濃度モノクロラミン配管消毒状況

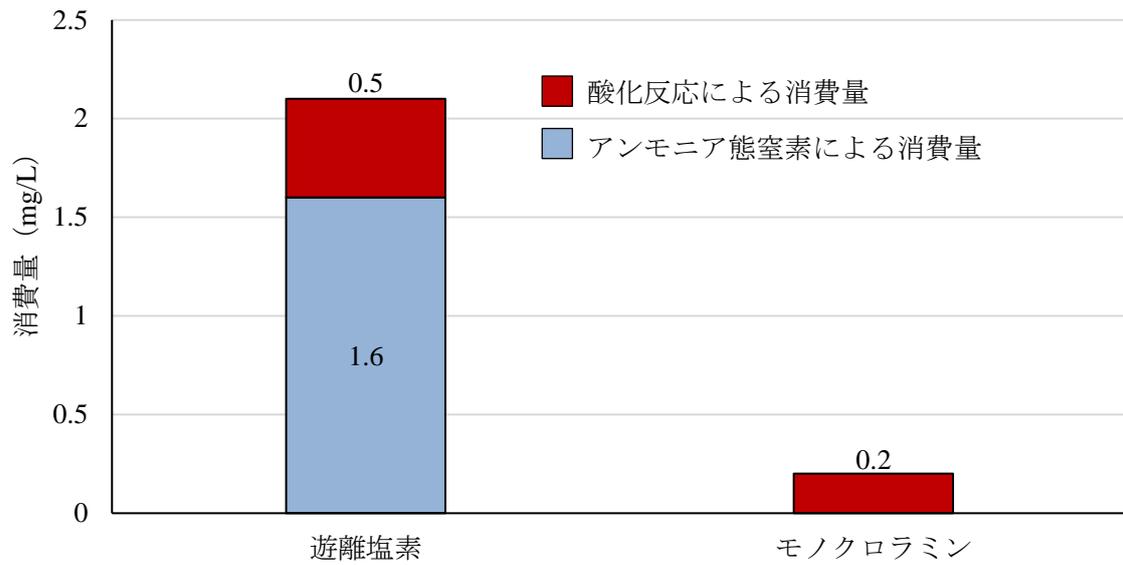


図 2. 源泉水での遊離塩素とモノクロラミンの消費量

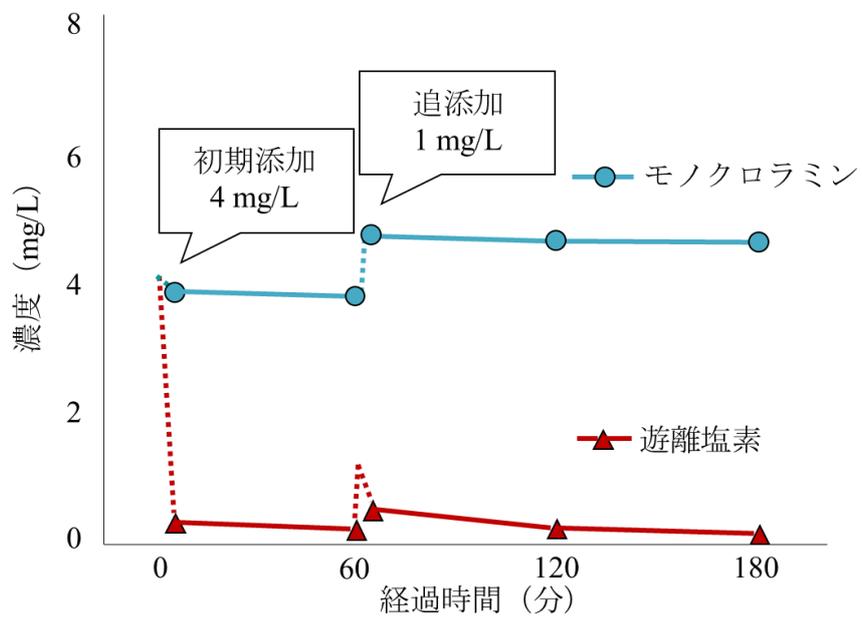


図 3. 源泉水での遊離塩素とモノクロラミンの経時的濃度変化

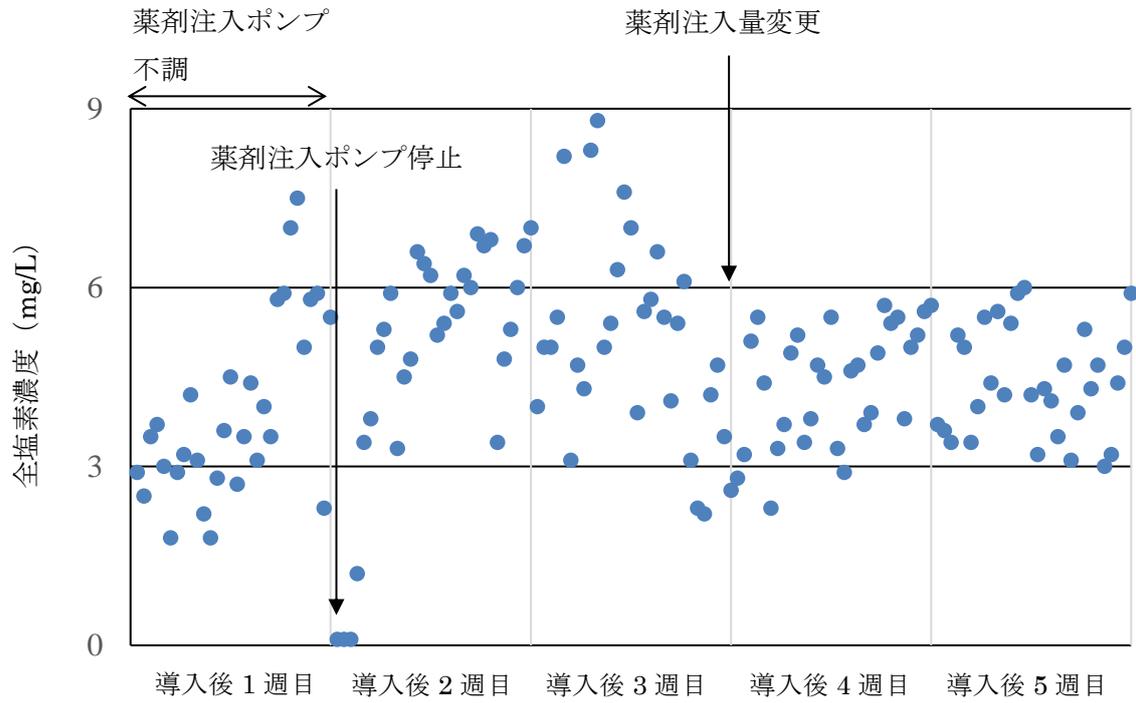


図 4. モノクロラミン消毒導入後における浴槽水の全塩素濃度

表 2. 浴槽水の微生物試験結果

検査項目	レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	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)	モノクロロミン (mg/L)
導入 4 週間前	<10	0	陰性	8.3	0.34	0.48	—
導入 3 週間前	<10	0	陰性	8.4	0.54	0.63	—
導入 2 週間前	<10	0	陰性	8.5	0.16	0.26	—
導入 1 週間前	10	0	陰性	8.5	0.15	0.21	—
導入 1 週間後	<10	0	陰性	8.6	<0.10	4.9	5.3
導入 2 週間後	<10	0	陰性	8.7	<0.10	6.8	8.0
導入 3 週間後	<10	0	陰性	8.6	<0.10	5.1	7.3
導入 4 週間後	<10	0	陰性	8.6	<0.10	5.4	6.6

—:測定なし

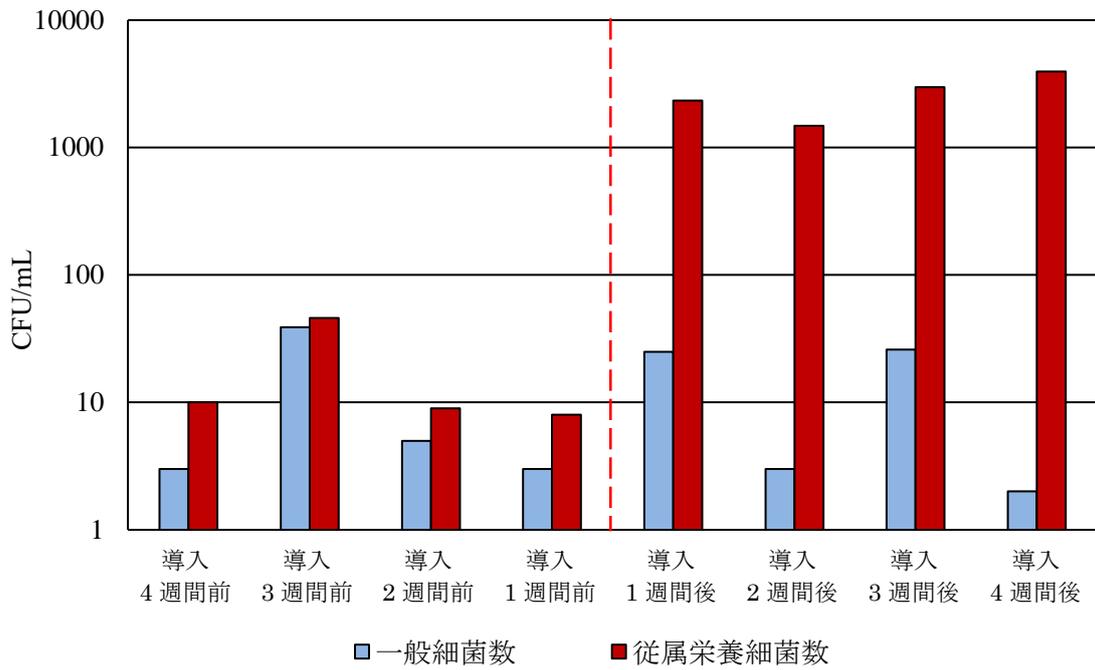


図 5. 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数

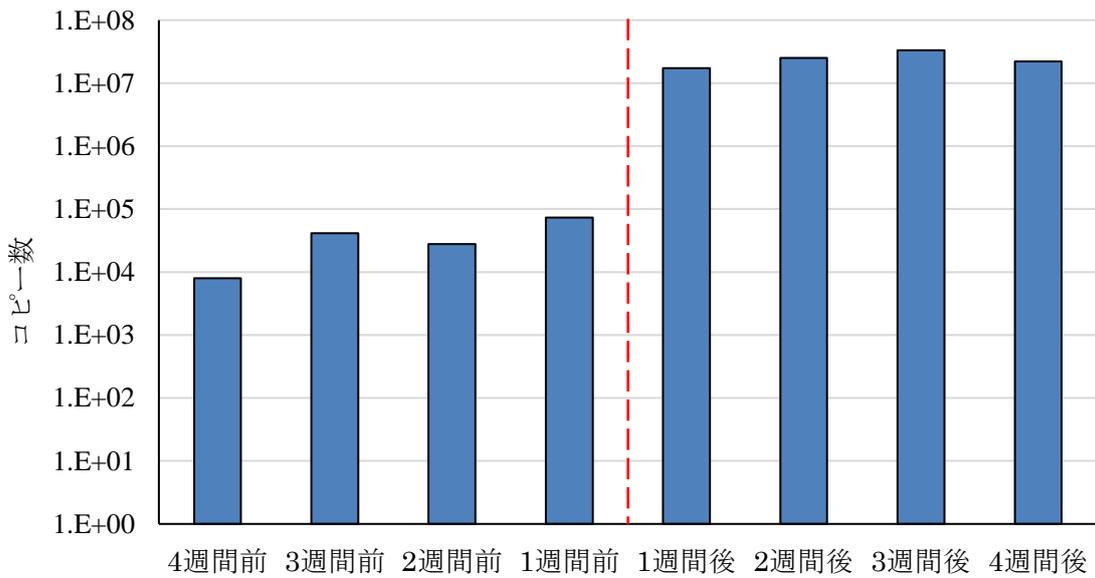


図 6. 浴槽水の 16S rRNA 遺伝子コピー数

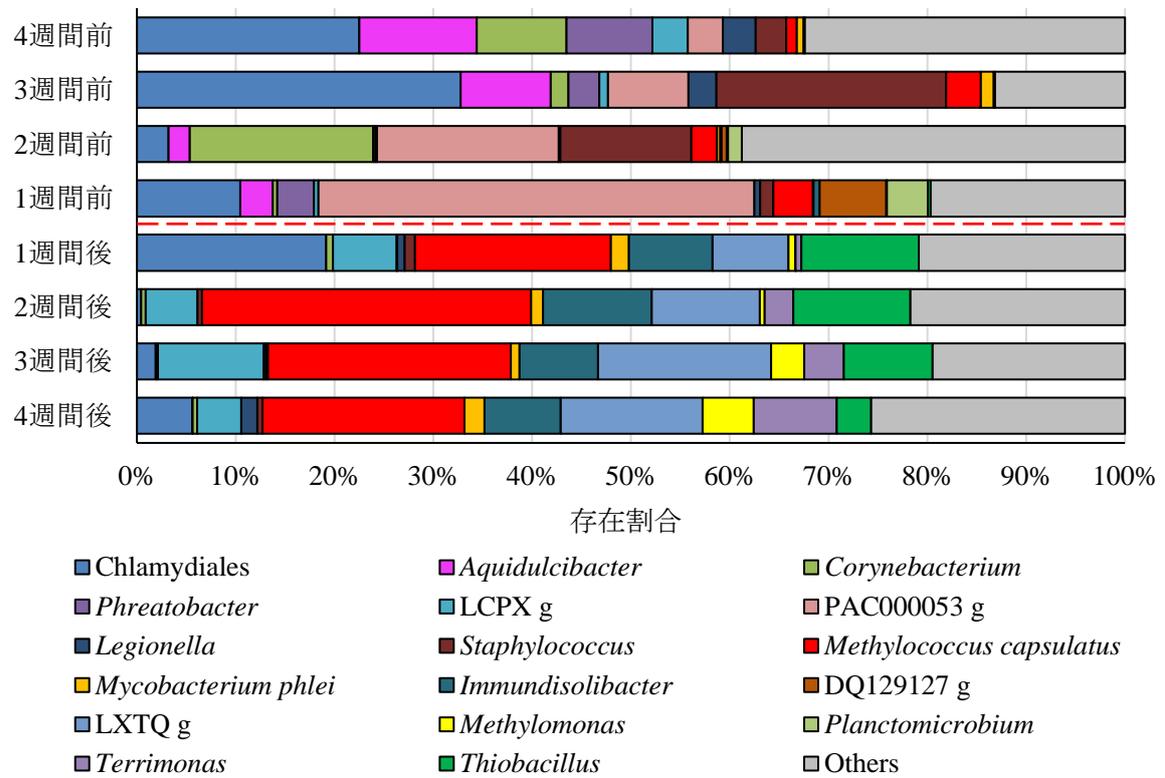


図 7. 浴槽水の菌叢解析結果

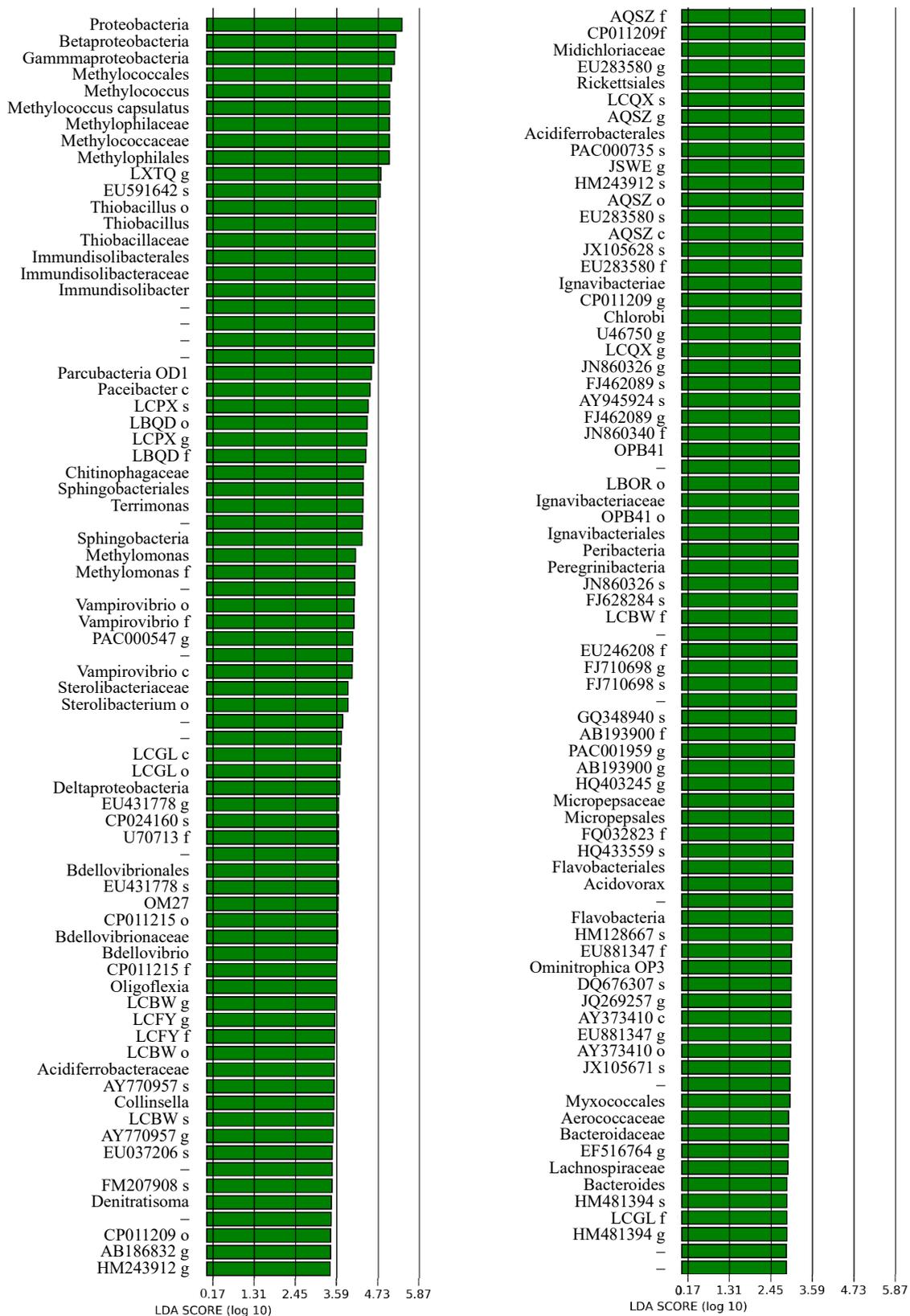


図 8.群間比較解析結果 (モノクロミン消毒導入後増加した系統)  
 系統名末尾 c: Class, o: Order, f: Family, g: Genus, s: Species



図9. 群間比較解析結果 (モノクロラミン消毒導入後減少した系統)

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

令和4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)

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部

### 分担研究報告書

*Mycobacterium phlei*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*の不活化試験から示された  
高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒効果の有効性

研究分担者	森 康則	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	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	豊田真由美	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	亀山 有貴	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	谷本 健吾	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	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

#### 研究要旨

高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒は、連用により *Mycobacterium phlei* 等の雑菌が繁殖してしまうことが問題となる。この増殖が生じる理由は未だ不明で、その解消を意図して、試験管内試験により消毒効果を詳細に検討した。*M. phlei* は、細胞壁に脂質を多く含む非結核性抗酸菌の一種であり、消毒への抵抗性が特に強いことが懸念される。比較対象に *Bacillus subtilis* と *Escherichia coli*、検液に pH 9.6 の温泉水を使用した。*E. coli* はモノクロラミンでも遊離塩素でも、速やかに不活化された。*B. subtilis* の 1-Log 不活化に必要な CT 値は、遊離塩素消毒でおよそ 2,000 mg/L・min、モノクロラミン消毒でおよそ 250 mg/L・min を要し、*M. phlei* の不活化と同程度であった。本実験条件では *B. subtilis* の芽胞形成が考慮されていないが、グラム陽性の強い方の細菌であり、*M. phlei* は消毒に強い抵抗性を有することが改めて示された。pH9.6 では遊離塩素消毒の効果がとても弱く、モノクロラミン消毒の有用性を改めて確認した。雑菌の繁殖に対しては、消毒だけで解決しようとせず、連用しないこと、洗浄を行うことが重要と考えられた。

## A. 研究目的

温泉利用施設では、その経済性や取扱の簡便さ等の理由から、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、遊離塩素消毒が阻害される高アルカリ温泉等の一部の温泉では、必ずしも遊離塩素が最適ではなく、モノクロラミン消毒が選択肢のひとつとして通知に追加された<sup>1-3)</sup>。非火山性地域の大深度掘削による温泉開発が全国的に増加しているが<sup>4)</sup>、これらは高アルカリ温泉水が多く、これらに対する効果的な消毒方法の要求が高まるとの予想もある。

本研究班では、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<sup>5-7)</sup>や、試験管内試験<sup>8)</sup>など、高アルカリ温泉に対するモノクロラミンの消毒効果や実用性の検証を続けてきた。その結果、モノクロラミン消毒の連用により生じる *Mycobacterium phlei*<sup>9, 10)</sup>が、試験内では遊離塩素消毒よりも、むしろモノクロラミンにより消毒されやすいことが示されてもいる<sup>8)</sup>。

*M. phlei* は、非結核性抗酸菌 (Non-tuberculous Mycobacteria NTM) の一種で、芽胞を作らない細菌ではあるが細胞壁に脂質を多く含むため、消毒への抵抗性が高いことが問題となる<sup>11)</sup>。実地試験では従属栄養細菌数の増加として *M. phlei* が検出されるのに対して、試験管内試験ではモノクロラミンにより *M. phlei* は消毒されやすく、挙動が異なって見えるのが説明しづらい状況である。考えられる理由として、浮遊状態の *M. phlei* と、バイオフィーム形成時の *M. phlei* の消毒耐性の違いに起因する可能性が示唆されている<sup>8)</sup>。

これらに対応するには、モノクロラミン

消毒下においても、こまめな浴槽清掃や配管洗浄を行い、バイオフィームの防止や除去が重要とされる<sup>8, 12)</sup>。

*M. phlei* の消毒抵抗性をより詳細に、客観的に評価するには、他の細菌の消毒と比較する方法が考えられる。当該研究では弱い方になるグラム陰性菌の大腸菌と、強い方になるグラム陽性菌の枯草菌を比較対象とした。温泉施設の協力を得て、実際に入浴に使用される pH9.6 の高アルカリの温泉水での消毒試験を行った。

## B. 研究方法

先の *M. phlei* の不活化試験<sup>8, 13)</sup>の方法に準拠して行った。一部繰り返しになるが、以下に概略を記す。

検液として、pH9.6、電気伝導度 EC = 39 mS/m のアルカリ泉を使用した。このアルカリ泉は、モノクロラミン消毒実地試験<sup>6)</sup>および *M. phlei* の試験管内試験<sup>8)</sup>で用いた温泉水と同一である。検液は試験前に 121°C 15 分間のオートクレーブ滅菌処理を行った。モノクロラミンの消毒液は、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (ケイ・アイ化成、ケイミックス SP) と硫酸アンモニウム溶液 (同社、レジサイド) を混合して用時調製した。

菌株は大腸菌 (*Escherichia coli* ATCC25922) と枯草菌 (*Bacillus subtilis* NBRC3134) を用いた。濁度により濃度調整した菌原液を、滅菌カップに用意した検液 150 mL に 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>CFU/mL 程度の終濃度で添加した。滅菌カップにモノクロラミンと遊離塩素を、それぞれ低濃度 (約 5ppm)、中濃度 (約 10ppm)、高濃度 (約 20ppm) の 3 段階の濃度となるように添加した。

消毒時間が 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分の時点でカップからサンプリングして、菌数と消毒濃度を測定した。培養用検液を適量のチオ硫酸ナトリウム (関東化学) にて中和した後、適宜希釈してから標準寒天培地 (栄研化学) に混釈し、24 時間 37°C で培養した。

モノクロラミン濃度はポケットモノクロラミン・遊離アンモニア計 (HACH DR300 Pocket Colorimeter) によるインドフェノール法、遊離塩素濃度はポケット残留塩素計 (HACH Pocket Colorimeter II) による DPD 法で測定した。消毒剤の濃度 (C) と、接触時間 (T) の積として CT 値 (Concentration × Time value)<sup>14)</sup> を算出した。なお、先行研究<sup>15,16)</sup> と異なり、本研究では消毒剤濃度を細かく実測して、その実測値から CT 値を算出している。消毒前後の菌数から消毒された菌の割合 (不活化割合、生残率) を求めた。

### C. 研究結果および考察

検液中のモノクロラミンおよび遊離塩素の濃度変化を図 1 に示す。モノクロラミン、遊離塩素とも、菌の添加から実験終了に相当する 120 分後まで、少なくとも 8 割前後の濃度を維持しており、消毒に問題はなかった。温泉水には、消毒を妨げる多様な化学成分が含まれていることがあるが、そのような妨害はなかった。

本消毒試験による各細菌の不活化割合と CT 値の相関プロットを、図 2 と図 3 にそれぞれ示す。*M. phlei* と *B. subtilis* の不活化は同程度であった。1-Log 不活化には、モノクロラミンが CT 値およそ 250 mg/L・min に対し、遊離塩素は CT 値およそ 2,000

mg/L・min であった。本実験の範囲では、遊離塩素消毒で 1-Log 程度しか不活化されず、2-Log 以上の不活化に必要な CT 値は不明であった。一方、モノクロラミンによる 3-Log 不活化は CT 値およそ 750 mg/L・min と測定できており、遊離塩素よりも消毒効果が高かった。すなわち、高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の有用性を改めて確認した。*M. phlei* や *B. subtilis* に対しモノクロラミンは遊離塩素のおよそ 8 倍程度の消毒効果を有するものと推測された。

*M. phlei* の消毒耐性の強さはこれまでも示唆されていたものの、比較的強い方のグラム陽性菌の *B. subtilis* に匹敵する耐性を有することが明らかになった。本実験の範囲では芽胞形成の有無を確認しておらず、芽胞との比較検討が今後の課題となる。*M. phlei* の消毒耐性は、脂質に富んだ細胞壁に起因するものと推測される。高アルカリ温泉水における遊離塩素消毒下においては、浴槽水の清掃や高濃度洗浄等を行わないと、浴槽水中の *M. phlei* を制御することは困難と思われる。

なお、弱い方のグラム陰性菌の *E. coli* は、高アルカリ温泉水の遊離塩素消毒であっても、それなりに消毒されることが判明した。*E. coli* は、実験最初のサンプリングである 15 分の時点ですでにコロニーをカウントできず、検出限界未満となった。すなわち、消毒剤濃度の最小が 5 mg/L、消毒時間の最短が 15 分により、CT 値 75 mg/L・min の時点で 5 ないし 6-Log 以上に不活化された (図 4)。

しかし、消毒耐性の高い *M. phlei* や *B. subtilis* は、この高アルカリ温泉水の条件で

は CT 値およそ 2,000 mg/L・min で 1-Log 程度しか不活化できないので、仮に 0.1 mg/L や 0.5 mg/L の遊離塩素消毒を行う場合は、20,000 分 (= 333 時間 = 約 14 日間) あるいは 4,000 分 (= 67 時間 = 約 3 日間) でようやく 1-Log の消毒と可能と計算される。消毒に要する時間が長すぎて、その間に菌が減少するよりも増加してしまうかもしれない。すなわち、pH9.6 の遊離塩素消毒では、これらの菌の制御は実用上困難と考えられた。同様の条件で従属栄養細菌数の増加が認められていないのは、単に試験をする機会がなかったのか、消毒により静菌の状態にでもあったのか、あるいは、浴槽水中に浮遊している菌の測定では状況を捉えることができているだけで、配管やろ過器でバイオフィーム形成が進む状況にあるのかもしれない。

これが 3 mg/L のモノクロラミン消毒であれば、3-Log の消毒に要する時間は 250 分 (= 4.2 時間 = 約 0.2 日間) と実用的な範囲と思われた。それでもモノクロラミン消毒を連用している場合は *M. phlei* が多く検出されることがあり、増殖の場や消毒を回避する仕掛けになお一層の興味を持たれる結果であった。

#### D. 結論

pH9.6 の高アルカリ温泉水を用いて、遊離塩素とモノクロラミンの消毒下における *M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* への消毒効果を比較した。*M. phlei* と *B. subtilis* の消毒耐性は、ほぼ同程度であった。1-Log 不活化には、モノクロラミンの CT 値がおよそ 250 mg/L・min に対し、遊離塩素は 2,000 mg/L・min であった。pH9.6 の高アルカリ温泉水

では、モノクロラミンの方が遊離塩素よりも消毒効果が高かった。

#### E. 参考文献

1. 泉山信司, 長岡宏美 他: 高 pH 浴槽水、薬湯、並びに水泳プールへの、モノクロラミン消毒の応用、厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」(研究代表者 前川純子) より, 平成 28~30 年度総合研究報告書.
2. 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について, 令和元年 9 月 19 日生食発 0919 第 8 号厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知 (令和 2 年 12 月 10 日生食発 1210 第 1 号一部改正).
3. 循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル, 令和元年 12 月 17 日薬生衛発 1217 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局 生活衛生課長通知.
4. 森 康則, 井上源喜: 日本の温泉の利用状況と経年変化—行政科学的アプローチを中心として, 2021, 地球化学, **55**, 43-56.
5. 柳本恵太, 泉山信司, 森 康則, 長岡宏美 他: 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, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」(研究代表者 前川純子) より, 令和元~3 年度 総合研究報告書.
6. 森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛

- 治, 田中慶郎, 茶山忠久, 西 智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司: 次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証—三重県津市の榊原温泉における検討—, 2019, 温泉科学, **69**, 90-102.
7. 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, 2021, **49**, 261-267.
8. 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果, 2022, 温泉科学, **72**, 26-37.
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 *Mycobacterium 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.
10. 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.
11. Oriani, AS., Sierra, F., Baldini, MD., Effect of chlorine an *Mycobacterium gordonae* and *Mycobacterium chubuense* in planktonic and biofilm state, 2018, Int. J. Mycobacteriol., **7**, 122-127.
12. 森 康則, 泉山信司, 柳本恵太, 長岡宏美 他: 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, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」(研究代表者 前川純子) より, 令和元~3 年度 総合研究報告書.
13. 森 康則, 泉山信司, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 枝川亜希子, 藤井 明: 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, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」(研究代表者 前川純子) より, 令和 3 年度 分担研究報告書.
14. Hermanowicz, S.W., 微生物起因の水質: 規制, 科学, 工学, 1999, 水道協会雑誌, **68**(7), 53-63.
15. Dantec C.L., Duguet J.P., Montiel A., Dumonutier N., Dubrou S., Vincent V., Chlorine Disinfection of Atypical Mycobacteria Isolated from a Water Distribution System, 2002, Appl. Environ. Microbiol., **68**, 1025-1032.
16. Chen Yu Qiao, Chen Chao, Zhang Xiao Jian, Zheng Qi, Liu Yuan Yuan,

Inactivation of resistant *Mycobacteria mucogenicum* in water: Chlorine resistance and mechanism analysis, 2012, Biomed. Environ. Sci., 25, 230–237.

#### F. 研究発表

誌上発表

1. 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果, 2022, 温泉科学, **72**, 26-37.

2. 森 康則, はじめて学ぶ ぼくたちの温泉科学, 2023, 三重大学出版会.

口頭発表

1. 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による不活化, 日本温泉科学会第75回大会, 2022年9月, 大分県.

知的所有権の取得状況

特許申請・実用新案登録、その他  
なし

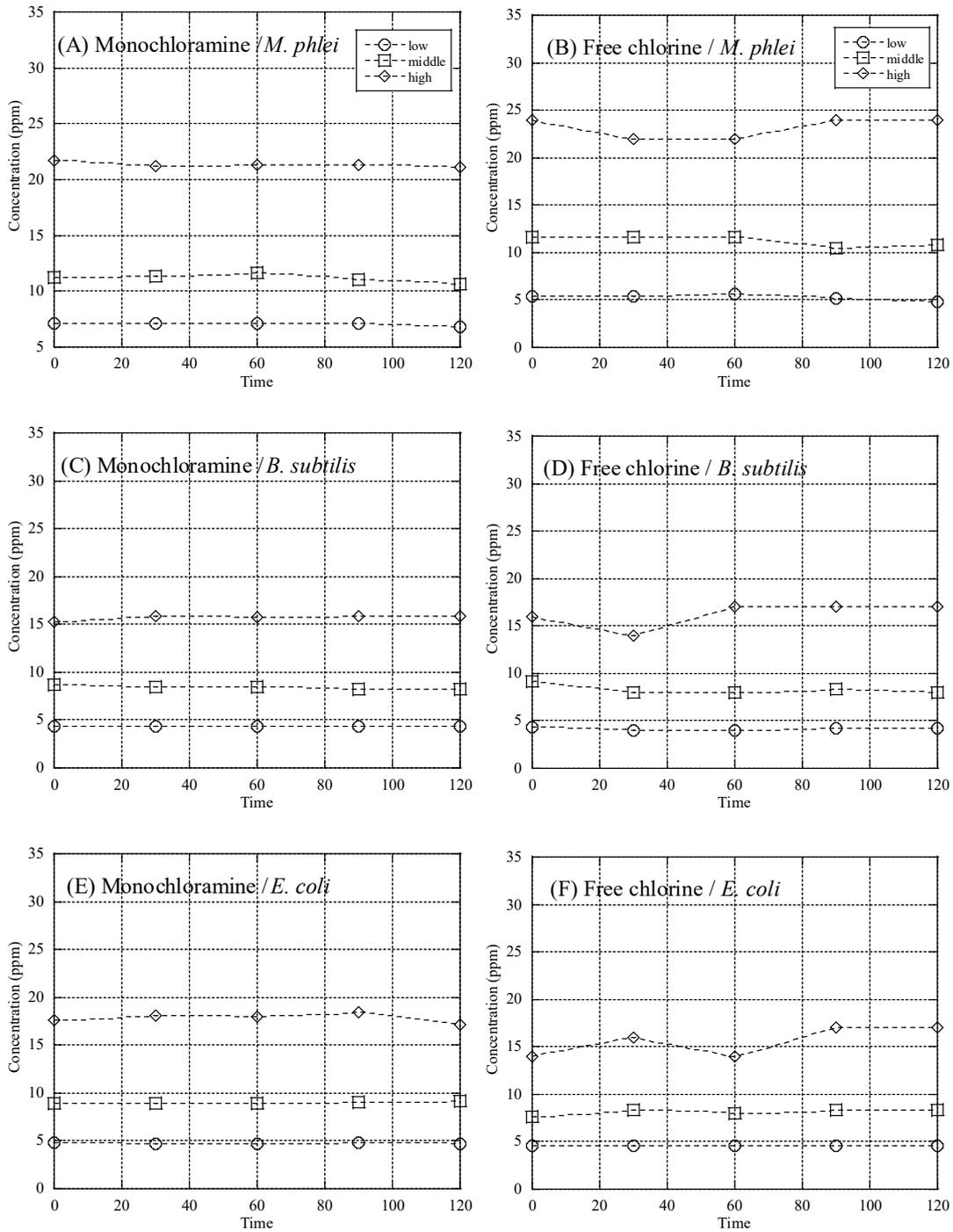


図 1. アルカリ泉中消毒剤濃度の経時変化

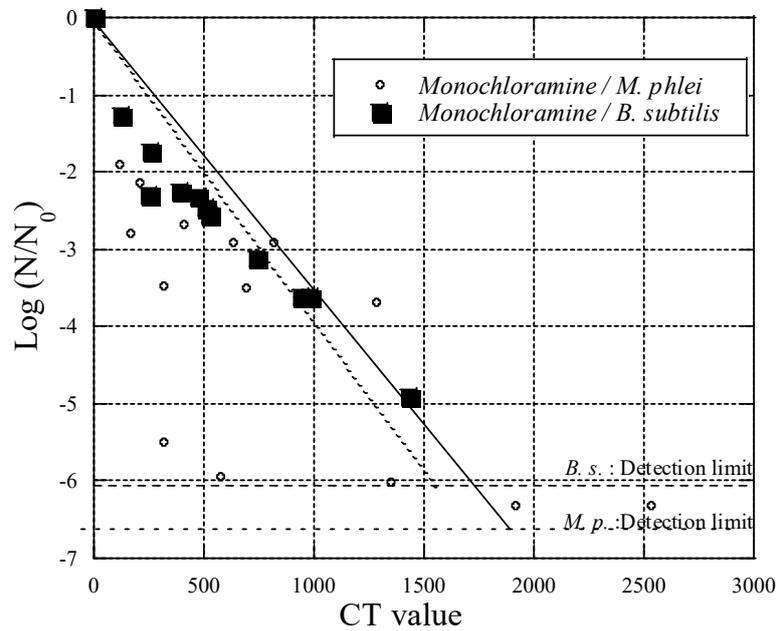


図2. モノクロラミン消毒下の *M. phlei* と *B. subtilis* の不活化の比較。実線が *M. phlei*、破線が *B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

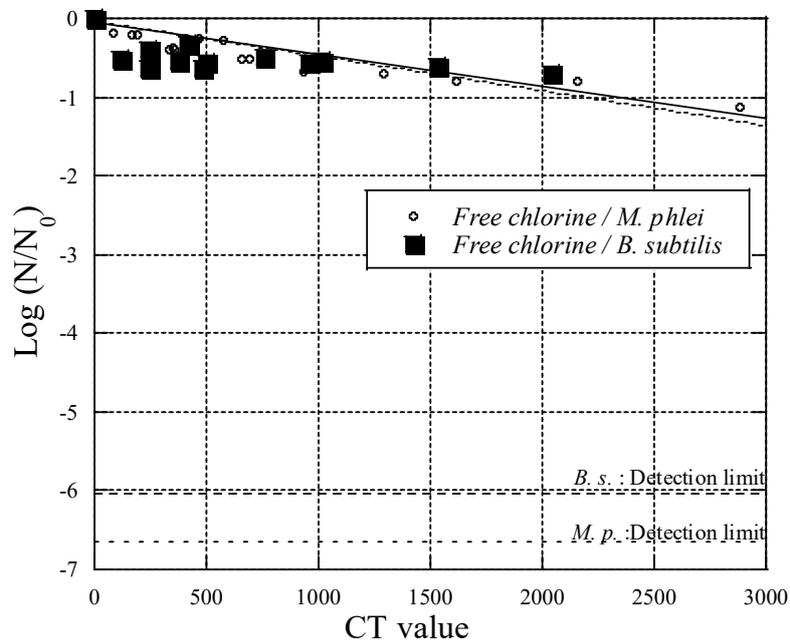


図3. 遊離塩素消毒下の *M. phlei* と *B. subtilis* の不活化の比較。実線が *M. phlei*、破線が *B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

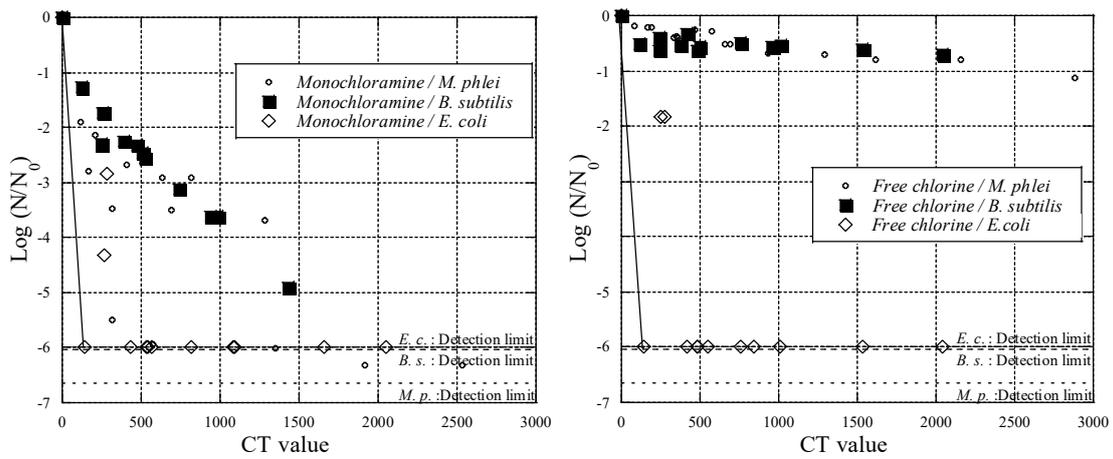


図4. 遊離塩素消毒およびモノクロラミン消毒下の *E. coli* の不活化。本研究の条件下では最も低い CT 値のサンプルを含め、多くがカウントできなかった（検出限界未満）。原点と最も CT 値が低いプロットとの交点を結んだ線を、不活化曲線として参考表示した。

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部

令和4年度分担研究報告書

高 pH の遊離塩素によるレジオネラ消毒効果の低下

研究分担者 黒木俊郎 岡山理科大学 獣医学部

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 中嶋直樹 神奈川県衛生研究所 微生物部

給水・給湯系のレジオネラ汚染は医療機関における院内感染の原因となり、衛生管理が重要となる。我々は継続的にレジオネラ属菌が検出される1医療機関の給水・給湯系において、受水槽に自動塩素添加装置を設置し、水道水の遊離塩素濃度を高く維持する対策を講じた。その結果、レジオネラ属菌が検出されていた水道蛇口において、レジオネラ属菌の不検出または減少を認めたが、完全な清浄化には至っていない。その要因として、当該医療機関の水道水の pH が高値のために、レジオネラ属菌に対して十分な消毒効果が得られていないと考えられた。これを検討するため、当該医療機関から分離した *Legionella pneumophila* SG1 を用い、異なる pH の条件下(pH 8.3 および pH 7.0 の PBS、ならびに当該医療機関の pH 7.9 未調整水道水および pH 7.0 調整水道水)で次亜塩素酸ナトリウムによる不活化試験を実施した。99 %不活化 Ct 値を比較した結果、PBS では pH 7.0 より pH 8.3 の条件の方が約 3.9 倍大きく、水道水では pH 7.0 調整より pH 7.9 未調整の方が約 2.9 倍大きかった。当該医療機関の水道水の pH では、遊離塩素濃度を高値に維持しても、消毒効果が十分に得られていない可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ属菌の汚染は、院内感染の原因となることから<sup>1)</sup>、衛生管理が重要となる。我々は2015年に1医療機関の給水系におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施したところ、複数の蛇口からレジオネラ属菌を検出した。レジオネラ汚染の改善に、2016年に自動塩素添加装置を受水槽に設置し、水道水の遊離塩素濃度を高く(約 1.0 mg/L)維持する対策を講じた。この対策により、レジオネラ属菌が検出されていた水

道蛇口において、不検出または減少の結果が得られた。しかし、2019年になっても完全な清浄化には至っておらず、3か所の水道蛇口からレジオネラ属菌が分離されている(菌数:10~360 CFU/100 mL、表1)<sup>2)</sup>。水道水の遊離塩素濃度は最大で 1.1 mg/L と高値を示しているにも関わらず、水道水からレジオネラ属菌が検出される要因として考えられたのが、水道水の pH が高値(7.9~8.6)であることだった。

水道水の消毒に使用している次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)は、水に溶けると次亜塩素酸

(HOCl)と水酸化ナトリウム(NaOH)になり、さらに HOCl が次亜塩素酸イオン(OCl<sup>-</sup>)と水素イオン(H<sup>+</sup>)に解離することが知られている。HOCl および OCl<sup>-</sup>の水中の割合は pH によって変化し、pH 4~6 で HOCl が、pH 8.5~10 で OCl<sup>-</sup>が優勢となる<sup>3)</sup>。HOCl および OCl<sup>-</sup>はいずれも強い酸化剤ではあるが、OCl<sup>-</sup>は HOCl より消毒効果が 1/80 しかないとされる<sup>4)</sup>。当該医療機関の水道水の pH は 7.9~8.6 であることから、水道水中では遊離塩素濃度が十分であっても OCl<sup>-</sup>が優勢であり、十分な消毒効果が得られていないと推測された。

当該研究では消毒効果の低下を確認する目的で、実際の水道水とそこから分離された菌の消毒実験を試験管内で行うこととした。当該医療機関の水道水から分離された *Legionella pneumophila* SG1 を対象に、pH 8.3 および pH 7.0 の PBS、ならびに当該医療機関の水道水(以下、未調整水道水) および pH 7.0 に調整した水道水の条件下で、次亜塩素酸ナトリウムによる不活化試験を実施した。既報にリン酸緩衝液を添加した水道水の、pH 7.6 における消毒試験があり、再現性について考察した<sup>5)</sup>。

## B. 研究方法

### 1. レジオネラ菌液の調製

当該医療機関の水道水から分離した *L. pneumophila* SG1 を、吸光度計(550nm)で OD 値 0.5 程度になるように滅菌水に懸濁した。これを  $n \times 10^8$  cfu/mL の濃度になるように滅菌水で希釈し、原液とした。原液の菌数は 10 倍段階希釈したものを、各段階で 2 枚の BCYE  $\alpha$  寒天培地に塗抹・培養することにより測定した。これを試験開始時の菌数とした。

### 2. 試験水の調製

#### (1) PBS

pH 7.2~7.4 程度の PBS を作製後、NaOH 水溶液および HCl 水溶液を用いてそれぞれ pH 8.3 および pH 7.0 になるように調整した。

#### (2) 水道水

医療機関の受水槽から採水し、0.2  $\mu$ m のフィルターで濾過滅菌した水道水を、pH 未調整水道水とした。pH は 7.8~7.9(以下 7.9)であった。この一部から、HCl 水溶液を用いて pH 7.0 に調整した水道水を作製した。

## 3. 試験水の遊離塩素濃度の調整

#### (1) PBS

5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を 0.25 mg/L 程度になるように、pH 8.3 および pH 7.0 PBS でそれぞれ希釈した。

#### (2) 水道水

pH 7.9 未調整水道水および pH 7.0 調整水道水の遊離塩素濃度は 0.69 mg/L および 0.76 mg/L であった。これを 0.25 mg/L 程度になるように、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液および 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を用いて調整した。

遊離塩素濃度の測定は、DPD 法 (アクアブ AQ-101 : 柴田科学) を使用した。

## 4. 遊離塩素によるレジオネラ不活化試験

試験開始時に各試験水の遊離塩素濃度および pH を測定し、滅菌容器に 198 mL を分取した。ここに 2 mL の菌液を添加して試験液とし、菌液を添加した時点から一定の時間経過ごと (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 60, 90 分) に試験液から 1 mL を分取するとともに、遊離塩素濃度および pH を測定した。なお、塩素の消失分を考慮し、各時点の遊離塩素濃度が試験開始前の遊離塩素濃度の 50%以下になった時点で試験

を終了した。

試験中の試験液は 20°Cの水浴中に静置した。分取した試験液 1 mL 中の塩素は 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液 2  $\mu$ L を添加することで中和した。これを 10 倍段階希釈し、各段階 2 枚の BCYE  $\alpha$  寒天培地に塗抹・培養し、時間経過ごとの菌数を測定した。以上の試験を各試験液で 2 回実施した。

時間経過ごとに、レジオネラ属菌の生存割合と、遊離塩素濃度(C)と経過時間(t)を乗じた Ct 値を算出した。縦軸を生存割合、横軸を Ct 値として、2 回分の結果を合わせて不活化曲線を求め、近似式を算出した。近似式から、99%の不活化に必要な Ct 値を算出した。

### C. 結果および考察

調製した菌液の原液は、各試験で  $1.2\sim 2.2 \times 10^8$  cfu/mL だった。試験中の遊離塩素濃度は、開始前に 0.20~0.27 mg/L であったが、30~90 分後にその 50%以下となった(表 2)。試験中に遊離塩素濃度が低下したのは、添加した菌によって消費されたためと考えられたが、十分な試験水量に対して少量の菌液とすることで、すぐに塩素が消失せずに済んだと推察された。試験中の pH は、各試験で試験中に pH の変動はほとんど認められず、設定した pH を維持していた。

PBS および水道水を用いた遊離塩素による不活化試験の結果を図 1 に示した。PBS における 99 %不活化 Ct 値は、pH 8.3 で 1.40 、pH 7.0 で 0.36 となり、pH 8.3 の方が約 3.9 倍大きかった。水道水における 99 %不活化 Ct 値は、pH 7.9 未調整で 0.89、pH 7.0 で 0.31 となり、pH 7.9 未調整水道水の方が約 2.9 倍大きかった。

Kuchta らは、遊離塩素濃度 0.1 mg/L の水道

水(リン酸緩衝液添加)において、水温 21°C、pH 7.6 および pH 7.0 の条件下で、*L. pneumophila* SG1 の不活化試験を実施した<sup>5)</sup>。その結果、99%不活化に要する時間は、pH 7.6 で 30 分以上だったのに対し、pH 7.0 で 10 分以内だった。Ct 値を算出しておらず、数値での比較はできないが、pH 7.0 の中性の方が不活化は速やかであり、本試験の結果も同様であった。本研究では、遊離塩素濃度を測定することで Ct 値を算出しており、99 %不活化 Ct 値をより詳細に比較することができている。

以上の通り、水道水の pH が高いことでレジオネラ属菌に対する塩素の消毒効果が低く、レジオネラの検出が続いている以上は消毒が不十分である可能性が示唆された。

当該医療機関の水道水の pH が高値の要因として、この地域の水道は水源に地下水を利用していることが挙げられる。浄水場では塩素滅菌のみを実施しているため、凝集剤の使用を目的とした pH 調整がなされていないと推測された。これに対して、例えば当該医療機関の受水槽に pH 調整剤を添加することは、水道水の pH を低下させて、消毒効果を向上させる一つの方法と考えられる。しかし、この医療機関以外でも蛇口の衛生や消毒が問題になっている可能性があり、個別の施設が費用をかけて設備をするよりも、浄水場で pH 調整をしてもらうことで、地域全体の消毒効果を向上させることができるかもしれない。

### D. 結論

遊離塩素によるレジオネラ不活化試験の結果、pH が高い条件の方が塩素の消毒効果が低かった。当該医療機関の水道水の pH は高く、塩素消毒の効果が不十分である可能性が示唆された。

E. 参考文献

1. 磯目賢一, 中島佳代, 池町真実, 山崎貴之, 中浴伸二, 宮川一也, 永澤浩志. 院内感染で判明したレジオネラ菌による給湯系汚染とその後の対応. 環境感染誌. 2020, 35 巻, 第 2 号.
2. 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)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究(研究代表者:前川純子)」より令和元年度分担研究報告書.
3. Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. Biocontrol Sci. 2006;11:147-157.
4. Morris JC. Future of chlorination. Journal-American Water Works Association. 1966, 58, 1475-1482.
5. Kuchta JM, States SJ, McNamara AM,

Wadowsky RM, Yee RB. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water. Appl Environ Microbiol. 1983, Nov;46(5):1134-9.

F. 研究発表

紙上発表

なし

学会発表

1. Nakajima N, Jinnai M, Izumiyama S, Kuroki T. Influence of high pH on chlorine disinfection against Legionella spp. The 10th International Conference on Legionella. September 2022. Yokohama.
2. 中嶋直樹, 陳内理生, 黒木俊郎. レジオネラ属菌に対する遊離塩素の消毒効果における高 pH の影響. 第 4 回 Hospital Water Hygiene 研究会学術集会. 2022 年 11 月. 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 医療機関のレジオネラ汚染実態調査結果(2019年度)

採水箇所	水系	種類	温度 (°C)	pH	遊離塩素 濃度 (mg/L)	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌		従属栄養細菌数 (CFU/mL)	
							検出菌種	菌数 (CFU/100 mL)		
病室	給水系	初流水	24.3	8.6	0.0	+	<i>L. anisa</i> <i>L. feeleii</i> SG1	360	24,000	
		3L 流水後	26.6	8.5	0.9	+	レジオネラ属菌 <i>L. anisa</i> <i>L. feeleii</i> SG1	30	77	
	給湯系	初流水	35.1	8.5	0.4	+	<i>L. anisa</i> <i>L. feeleii</i> SG1	20	46	
		3L 流水後	35.8	8.4	0.4	+	<i>L. feeleii</i> SG1	40	21	
	トイレ	混合	初流水	24.7	8.1	0.9	+	<i>L. pneumophila</i> SG1 <i>L. feeleii</i> SG1	190	680
			3L 流水後	23.3	8.2	1.0	-	<i>L. feeleii</i> SG1	20	40
手術室1	給水系	初流水	25.1	8.1	1.0	-	不検出 <sup>a</sup>		19	
		3L 流水後	24.3	8.1	1.0	-	<i>L. feeleii</i> SG1	10	4	
	給湯系	初流水	41.7	8.1	0.3	-	不検出		4	
		3L 流水後	52.9	8.0	0.5	-	不検出		1	
手術室2	混合	初流水	30.7	8.1	0.6	-	不検出		6	
		3L 流水後	38.1	7.9	0.8	-	不検出		5	
受水槽	混合	初流水	22.2	7.9	1.0	-	不検出		9	

<sup>a</sup><10 CFU/100 mL

引用元の表を一部修正・改変

表2 試験中の遊離塩素濃度

実験条件		実験	遊離塩素濃度(mg/L)			
溶媒	設定pH		0	30	60	90 <sup>a</sup>
PBS	8.3	1	0.27	0.16	0.12	N. D. <sup>b</sup>
		2	0.25	0.10	N. D.	N. D.
	7.0	1	0.25	0.13	0.09	N. D.
		2	0.25	0.10	N. D.	N. D.
水道水	未調整(7.9)	1	0.24	0.12	N. D.	N. D.
		2	0.25	0.17	0.13	0.11
	7.0	1	0.20	0.10	N. D.	N. D.
		2	0.22	0.12	0.05	N. D.

<sup>a</sup>経過時間(分)、<sup>b</sup>実施せず

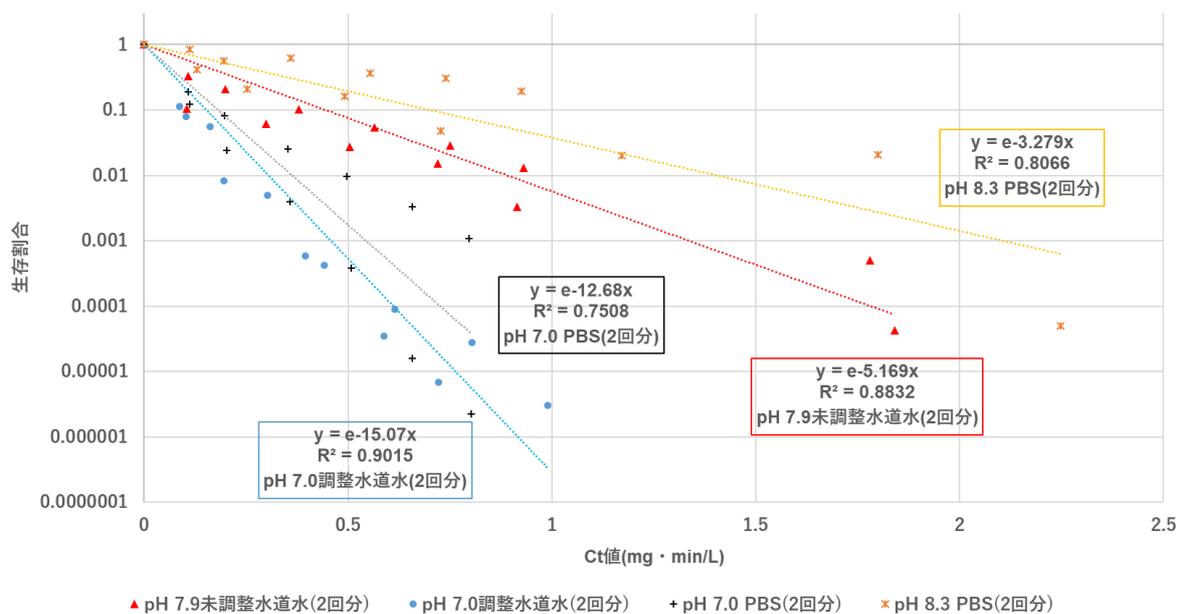


図1 医療機関由来の *L. pneumophila* に対する遊離塩素消毒による不活化曲線

令和4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)

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部

### 分担研究報告書

#### 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

研究分担者	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	枝川 亜希子	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
研究分担者	小坂 浩司	国立保健医療科学院 生活環境研究部
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	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	斎藤 利明	株式会社ヤマト 温浴事業部
研究協力者	木村 哲也	株式会社ヤマト 温浴事業部
研究協力者	小森 正人	株式会社ヤマト 大和環境技術研究所
研究協力者	山本 哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	細川 賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	田中 孝典	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	杉山 寛治	株式会社マルマ 研究開発部
研究協力者	田中 慶郎	株式会社マルマ PC 営業部
研究協力者	市村 祐二	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
研究協力者	茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
研究協力者	藤井 明	株式会社ヘルスビューティー

#### 研究要旨

公衆浴場のろ過器はレジオネラ属菌の汚染源の1つであり、週に1回以上の頻度で高濃度塩素を用いた洗浄消毒が推奨されている。しかし、この方法は多量の薬液を必要とし、労力・コスト負担が避けられないばかりか、消毒が不足すればろ過器のレジオネラ属菌の繁殖が防げなかったりする。一方、塩素より高い酸化力を有するオゾンの場合、消毒効果への期待はあるが、人体に有害であり、特に空気(酸素)の無声放電で生成する場合に排オゾン処理が必須となる。これが水の電気分解により生成するオゾンであれば、相対的に生成量が少なく安全性の問題が少ないことから、当該研究では電解生成オゾンに着目した。スーパー銭湯の協力を得て、営業

終了後のろ過器に対して、オゾン濃度 0.8mg/L の電解オゾン水を毎日供給した。当初の供給量はろ過器有効容量(ろ材充填量)の半分程度としたが、逆洗水のレジオネラ属菌は減少しなかった。そこで、ろ過器を過酸化水素で洗浄し、オゾン供給量を有効容量となるように倍増させたところ、逆洗水のレジオネラ属菌は約 10 ヶ月間、概ね継続して不検出となった。

## A. 研究目的

公衆浴場等の温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、洗浄や消毒の困難なことが知られている<sup>1)</sup>。つまり生物膜を除去し、その増殖を抑制することは、重要な衛生管理の1つとなっている。特にろ過器を有する循環式浴槽はレジオネラ属菌に汚染されやすく、「公衆浴場における衛生等管理要領等について」において、「1週間に1回以上、ろ過器を十分に逆洗浄して汚れを排出するとともに、ろ過器及び循環配管について、適切な方法で生物膜を除去、消毒」するとされている<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。「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<sup>4)</sup>。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、多くの労力やコスト負担が避けられない。

また、逆洗の浴槽水がアルカリ性のところに遊離塩素の高濃度を使う場合には、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<sup>5)</sup>、消毒効果が不足する。消毒が不足するとろ過器にレジオネラ属菌の検出が続いたり、雑菌が繁殖したりすることになる。

過酸化水素や塩素以外の方法として、前述のマニュアルや指針には、オゾン、紫外線、銀イオン、光触媒等の利用が挙げられている<sup>3),4)</sup>。そのうちオゾンは、先進的な管理要領が高知県で制定されており、有力な候補の一つと考えられる<sup>6)</sup>。オゾンは、空気(酸素)の無声放電<sup>7)</sup>や水の電気分解<sup>8)</sup>により必要量を現場で生成できて、多量の薬剤を搬入するための労力は不要となる。高pHでは、自己分解して酸化力の高いヒドロキシラジカルを生成し<sup>9)</sup>、pHの影響は無視できるか、むしろ消毒効果が高まる傾向を持つこともある<sup>10)</sup>。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<sup>11)</sup>。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、多量に使用する場合には排オゾン設備が必須となる等、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/m<sup>3</sup>)と定めている<sup>12)</sup>ものの、水溶液のオゾン水については特段の基準値等は見受けられなかった。水の電気分解により生成する

オゾン、相対的に生成量が少なく、安全性の問題が少ない。本試験では、電解生成オゾンに着目し、当該オゾンを用いたろ過器の消毒・洗浄方法について検討した。

## B. 方法

某スーパー銭湯における小規模なアトラクション浴槽(井水、約1m<sup>3</sup>、図1)の循環系統を試験対象とし、営業終了後、逆洗前のろ過器に対して、電解オゾン水を毎日供給した。試験条件を表1に示す。この検討は令和3年度より開始して当初の成果を一部報告したところで、さらに年余にわたって継続することで本結果を得ている。一部内容は繰り返しになるが、理解のために本報告にも詳細を記載する。

当該スーパー銭湯には、試験対象とした浴槽のろ過器(砂ろ過槽、直径約0.5m×高さ約1.0m、図2)以外にも、露天風呂、炭酸風呂およびジェット風呂等があり、複数のろ過器を制御盤にて自動逆洗している。従って試験を行うに際しては、既存設備の改変を極力少なくすることが求められた。また以下の理由により、試験装置はより効率的で簡易な操作方法とすることが望まれた。①施設全体の1日の入館者数が1,000人を超える多さであり(表1)、汚濁量が多いと考えられた。②営業が終了し、電解オゾン水の供給が可能となる時間が深夜(0:00～)であり、時間的制約があった。③専門的な知識に乏しいパートやアルバイト等が管理業務を担当していた。

以上のような観点から、試験装置は、単相100V電源のコンセントへ接続するだけで稼働し、ろ過器へ電解オゾン水を自動供給するだけの単純なシステムとした。電解オゾン水は、施設で使用している井水を市販のオゾン生成電極(オゾンバスターPRO、オゾンマート製)で

電気分解することにより生成した。オゾン供給装置、設置状況および試験装置概略を図3、図4および図5に示す。また、オゾン生成電極の外観、電気分解時の状況および仕様を図6、図7および表2にそれぞれ示す。

オゾン供給装置は、始動スイッチを一度押すだけで、ろ過器下部のドレン口より電解オゾン水の供給を開始し、タイマー制御により一定時間経過後停止する(図5)。前述の通り、当該スーパー銭湯は営業終了後に複数ろ過器の自動逆洗を行っており、試験対象ろ過器の逆洗を開始する前に、オゾン供給装置の始動スイッチを押すよう施設担当者へ依頼した。これにより、逆洗前の当該ろ過器に対して、電解オゾン水を毎日供給することが可能となった。

当該オゾン供給装置の目的は、一定量の電解オゾン水を断続的にろ過器へ供給して消毒・洗浄を行うことである。試験では、この操作を連日継続して行い、1回当たりの消毒・洗浄効果は1日の汚濁量を上回ることが求められる。電解オゾン水は注入後、そのほとんどがろ過器内で消費されるか、わずかに残留しても逆洗により施設外へ排水されるため、作業空間中へのオゾン漏洩は実質ゼロに近いレベルとなる。

なお、オゾン生成電極は、水道水の利用を想定して所定の電圧で電解を行うよう設計されており、目的外の成分が生成しない様に、電圧は調整変更をしていない。温泉水や海水等の電気伝導度が高い水の場合、電解電流が過大になると安全装置が働き停止することに注意を要する。電極にオゾン生成量(電解電流)をコントロールする機能は無く、電解に供する水の電気伝導度に伴って、オゾン生成量が決定する。従って、水質および水温が一定の条件では、電解オゾン水のオゾン濃度は流

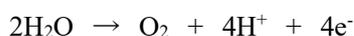
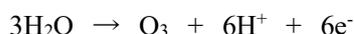
量に伴って一定になる。換言すると、オゾン濃度は流量に従い、オゾン供給量は供給時間に従い、この2つを調整することになる。

試験対象ろ過器の清浄化を確認するために、週1回の頻度で、営業終了後、オゾン供給前に逆洗水の水質を分析した。逆洗水の採水は、ろ過器をブローによりエアレーション(約200 L/min、約5分間)<sup>13)</sup>した後に行った。これにより、ろ材に残存する汚れを分析評価できるようにした。水質分析は試験対象に加え、他の浴槽についても行った。本試験における分析項目と分析方法を表3に示す。

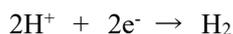
電解オゾン水は、機械室内の井水貯留槽からの井水を用いて生成した。井水の水温は約20℃で安定しているが、陰極や電解槽内へのスケール付着が多いため、100g/L クエン酸溶液を電解槽内に1時間浸漬させる薬品洗浄を月に1回の頻度で行った。

オゾン(O<sub>3</sub>)は空気(酸素)を原料とする無声放電の他、SnO<sub>2</sub>、PbO<sub>2</sub>あるいはBDD(ボロンドープダイヤモンド)電極等の酸素生成過電圧の大きい電極を陽極に用いて水を電気分解することにより、次式のように生成することができる<sup>8),14)</sup>。

陽極反応



陰極反応



水の電気分解によりオゾンを生成する際には、上式の通り、酸素(O<sub>2</sub>)や水素(H<sub>2</sub>)も同時に生成されている。すなわち、電解オゾン水は溶存オゾンの他に、溶存酸素や溶存水素、未

溶解のオゾンガス、酸素ガス、水素ガス等が混在しており、特に分離工程等を経ない限り、電解オゾン水はこれらの気液二相混合流体となっている。本試験においても特段の分離処理を行わず、当該混合流体を電解オゾン水として用いた。

水の電気分解で生成したオゾン、酸素および水素等は、Fickの法則により、電極表面と液相との濃度勾配および生成した微細気泡表面と液相との濃度勾配によりそれぞれ液相へ移動(溶解)する<sup>15)</sup>。水の電気分解でオゾンのみを大量に生成することは困難であるが、低電流密度条件では、オゾンの利用(溶解)効率は高く、生成量の多寡は問題ではないと考えられた。加えて、排オゾン処理の必要性が大きく低減し、環境中のオゾン濃度を測定した結果、本試験の電解条件では、排オゾン処理は不要(0.1ppm未満)であった。

### C. 結果および考察

浴槽水と逆洗水のレジオネラ属菌、浴槽水の残留塩素(DPD)、浴槽水と逆洗水の一般細菌数およびオゾンを供給していない浴槽を含めた各浴槽水のATP、それぞれの測定結果を図8から図11に示す。なお、レジオネラ属菌数の1CFU/100mLは不検出(検出限界10CFU/100mL未満)を示している。

当該スーパー銭湯は、施設全体で通常1日に約1,000~1,500人の入館者数があり、年末から正月にかけての繁忙期には2,000人に届く日も見受けられた。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)においても、平均して1日に約1,200人の入館者数があった。この人数が全て試験対象の浴槽へ入るわけではないものの、ろ過器への汚濁量は日常的に非常に高く、ろ過器

内で汚れが蓄積していることが疑われた。オゾン供給前の汚濁状況を調べるために、オゾン供給 56 日前(2021 年 8 月 14)より水質分析を開始し、この日を試験開始日とした。浴槽水は、遊離残留塩素が 0.1~0.2mg/L と低い場合に、レジオネラ属菌が 10~60 CFU/100 mL の間で検出され、逆洗水では、連続して 30~330 CFU/100 mL の間でレジオネラ属菌が検出された(図 8、図 9)。

オゾン供給開始当初は、オゾン濃度 1 mg/L 程度を目標に供給量を 10 L/min に設定した。この時、電解オゾン水のオゾン濃度は 0.7~0.9 mg/L (平均 0.8 mg/L)であった。供給時間は暫定的に当初 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)、オゾン供給量の不足が感じられた。試験対象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、以下同様)を挟んで、77 日目より電解オゾン水の供給時間を 20 min とし、電解オゾン水の供給量をろ過器の有効容量(ろ材充填量)となる 200 L と倍に増やした。

77 日目以降、オゾン供給装置は順調に稼働していたが、186 日目にアクリル製電解槽の接着部が剥離し、1L/min 弱の漏水が生じたため、オゾン供給を一時停止した。その後、229 日目の施設側による配管洗浄を挟んで、新規の電解槽に交換し、245 日目にオゾン供給を再開するまで、約 2 ヶ月間オゾン供給は停止となった。しかしながら、1 週間後(252 日目)の確認時に、フランジ蓋の変形によりゴムパッキン(図 7)から数 mL/min 程度の少量の漏水が確認された。そこで、板厚 5mm のアルミ板で蓋ごと電解槽をボルト締めで挟み込むことによ

り応急対応したが、1 分間に数滴程度の極少量の漏水が突発的に繰り返し発生した。漏水時には、隙間からオゾンガスも同時に漏洩していた可能性は否定できない。また、322 日目以降は、オゾンによる腐食に起因すると思われるリード線の断線により、2 個付設した電極の 1 個が停止した。このため、電極面積が半減することとなり、オゾン濃度は、平均で 0.8 mg/L から 0.4 mg/L へと減少した。

逆洗水のレジオネラ属菌は、オゾン供給前は、30~330 CFU/100 mL の間で検出されていたが、ろ過器の有効容量(200L)となるようにオゾン供給を開始した 77 日目から継続して不検出となった(図 8)。浴槽水のレジオネラ属菌は、91 日目に 10 CFU/100 mL で検出された以外は継続して不検出となった(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。オゾン供給を一時停止する 186 日目までの間、浴槽水の残留塩素はオゾン供給を開始した 56 日目前に比べ増加傾向となり、塩素消費が抑制されていたことが分かる(図 9)。一般細菌数は浴槽水と逆洗水で概ね同様の挙動を示しており、逆洗水では、 $10^6$  CFU/mL 程度だったものが  $10^1$  CFU/mL 程度にまで、概ね 5-Log 減少した(図 10)。ATP はレジオネラ属菌の検出リスクの指標として使用できることが報告されている<sup>16,17)</sup>。浴槽水の ATP は、危険ゾーン(検出率 22%)とされる 125RLU 以上<sup>16)</sup>だったものが、要注意ゾーン(検出率 3.1%)とされる 40 以上 125RLU 未満<sup>16)</sup>から安全ゾーン(検出率 0.3%)とされる 40RLU 未満<sup>16)</sup>まで減少し、オゾンを供給していない他の浴槽に比べて最も低い値で推移した(図 11)。

77 日目からのオゾン供給により、ろ過器は徐々に清浄化され、オゾン供給を停止した後もレジオネラ属菌はしばらく検出されずに済んだものと伺えた。オゾン供給を一時停止した186日目から245日目までの間は、レジオネラ属菌不検出で済んだものの、遊離塩素は減少傾向、一般細菌数とATPが増加傾向であった(図8)。229日目の配管洗浄の効果も限定的であった(図9)。一般細菌数は、浴槽水と逆洗水ともに $10^2$ CFU/mL程度まで増加した(図10)。浴槽水のATPについても、安全ゾーンとされる40RLU未満<sup>16)</sup>から、要注意ゾーンとされる40以上125RLU未満<sup>16)</sup>へと増加傾向となった(図11)。

オゾン供給を再開した245日目からは、電解槽からの極少量の漏水が突発的に発生しており、オゾン供給量が不足していたことが懸念された。266日目に逆洗水から10CFU/100mLのレジオネラ属菌が検出された。

オゾン電極が1個停止した322日目までは、浴槽水の遊離残留塩素は、0.5~1.0mg/Lの間で一定に推移していたものの(図9)、一般細菌数は浴槽水と逆洗水で増加傾向となり、逆洗水で $10^1$ CFU/mL程度だったものが、 $10^4$ CFU/mL程度まで、3-Log増加した(図10)。浴槽水のATPは、オゾンを供給していない他の浴槽に比べ低いか同程度であったが、要注意ゾーンとされる40以上125RLU未満<sup>16)</sup>の間で概ね推移した(図11)。316日目にも浴槽水からレジオネラ属菌が20CFU/100mL検出され(図8)、電解槽からの極少量の漏水によるオゾン供給不足が考えられた。

322日目からは、2個あったオゾン電極の1個が停止したことに加え、330日目から、試験浴槽の配管系統から漏水(試験とは無関係)があり、338日目までの約1週間、試験浴槽の

使用が停止された。この間、逆洗は行われていないが、電解オゾン水の供給は継続された。水質分析は322日目で一旦停止し、344日目より再開した。レジオネラ属菌は364日目まで浴槽水と逆洗水ともに不検出であったが、370日目から両者ともに10CFU/100mLの値で検出されるようになった(図8)。この間、浴槽水の遊離残留塩素は、0.5~1.5mg/Lで概ね一定に推移していたものの(図9)、一般細菌数は浴槽水と逆洗水で増加傾向となり、逆洗水では、 $10^2$ CFU/mL程度だったものが、 $10^5$ CFU/mL程度にまで、3-Log増加した(図10)。浴槽水のATPは、オゾンを供給していない炭酸浴槽と同程度に達し、要注意ゾーンとされる40以上125RLU未満<sup>16)</sup>の間で推移した(図11)。370日目よりレジオネラ属菌が浴槽水と逆洗水から検出され始めた。極少量の漏水に加え、オゾン濃度が0.8mg/Lから0.4mg/Lへと減少したことにより、オゾンの供給が不足した様子であった。

電解槽の抜本的な更新が必要になったことを受けて、385日目(2022年9月3日)に本試験を終了した。

#### D. 結論

某スーパー銭湯の小規模アトラクション浴槽を試験対象として、逆洗前のろ過器へ電解オゾン水を毎日供給し、逆洗水のレジオネラ属菌を指標として、ろ過器の消毒・洗浄効果を検証した。オゾン濃度が0.8mg/Lの条件で、電解オゾン水をろ過器の有効容量(200L)となるように供給したところ、浴槽水の残留塩素は増加し、一般細菌数およびATPは減少した。逆洗水のレジオネラ属菌は、途中1回検出された以外は、約10ヶ月間継続して不検出となった。10ヶ月間の内約2ヶ月間は、オゾン供給を行

わなくても、逆洗水と浴槽水ともにレジオネラ属菌は不検出となった。しかしながらその間、浴槽水の残留塩素は減少し、一般細菌数は増加しており、オゾン供給を行わないことによる汚れの蓄積が懸念された。電解オゾン水の漏水に加えて、電極の半減によりオゾンの供給が不足した模様で、逆洗水と浴槽水ともにレジオネラ属菌が検出されるようになったことを受けて、本試験を終了した。

以上より、逆洗前の循環式ろ過器へ電解オゾン水を毎日供給する方法は、設備が単純で操作が簡易であり、オゾン漏洩のリスクがほとんど無く、逆洗水中のレジオネラ属菌を不検出にすることができた。

#### 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/1113050/0/000580777.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、2023/2/13リンク切れ)。
- 7) (特非)日本オゾン協会:オゾンハンドブック(改訂版)、pp.151-158、2016年10月。
- 8) Foller, P. C. and Tobias, C. W.: The anodic evolution of ozone, *Journal of The Electrochemical Society*, Vol. 129, No.3, pp.506-515, 1982.
- 9) Staehelin, J. and Hoigne, J.: Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions, *Environmental Science & Technology*, 19, pp.1206-1213, 1985.
- 10) 宮崎朋美、安田奏平、中川健斗、高鳥浩介、釜瀬幸広、黒松久、櫻井美栄、白井淳資:オゾン水の殺糸状真菌(カビ)効果におけるpHの影響、*家畜衛生学雑誌*、44, pp.1-7、2018年。
- 11) 金子光美 著:水の消毒(初版)、pp.172-175、(財)日本環境整備教育センター、1997年8月。
- 12) (公社)日本産業衛生学会:許容濃度等の勧告(2022年度)、*産業衛生学雑誌*、pp.255、Vol.64、No.5、2022年。
- 13) (社)日本水道協会:水道施設設計指針、pp.219-220、2000年。
- 14) 潮俊希、榊原豊、小森正人:オゾンの生成と還元を伴う電気化学的促進酸化処理法に関する基礎的研究、*土木学会論文集 G(環境)*、Vol.73、No.7、III\_329-III\_335、2017年。
- 15) 小森正人、榊原豊:固体高分子電解質(SPE)膜電極を設置した固定床生物膜反

応槽による合成地下水の高速水素利用脱窒処理、土木学会論文集 G、Vol.65、No.3、pp.153-163、2009 年.

- 16) (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.
- 17) 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

なし

口頭発表

1. 小森正人,住谷敬太,齋藤利明, 泉山信司,田栗利紹, 電解オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒試験, 日本オゾン協会 第 31 回年次研究講演会, 2022 年.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし



図1 試験対象浴槽

表1 試験条件

オゾン 生成方式	濃度	流量	供給時間	供給量		頻度	試験施設
	mg-O <sub>3</sub> /L	L/min	min	L/回	mg-O <sub>3</sub> /回	回/日	
水電解 (井水)	0.7~0.9 (平均0.8)	10	10	100	80	1	スーパー銭湯 入館者数：1000~2000人/日 試験浴槽 pH：7.0~7.6
			20	200	160		



図2 試験対象ろ過器



図3 オゾン供給装置



図4 オゾン供給装置設置状況

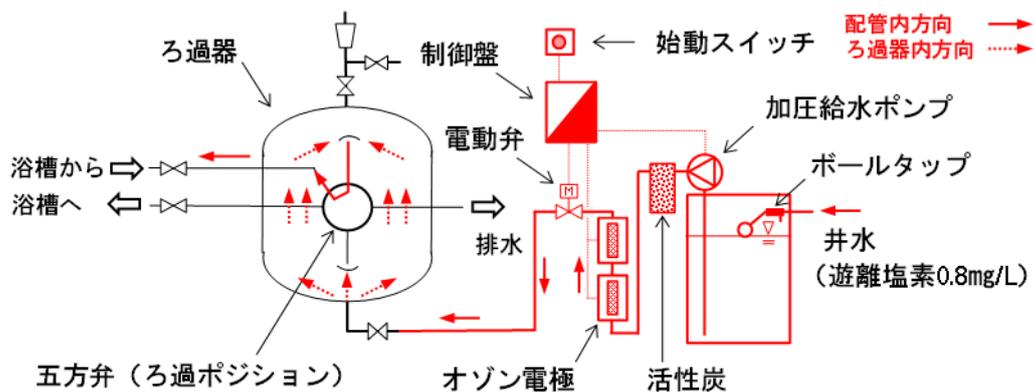


図5 試験装置概略

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6 オゾン生成電極

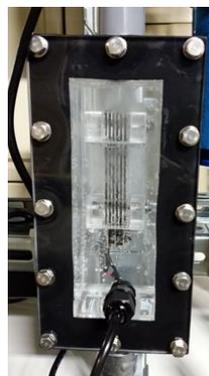


図7 電気分解時の状況

表2 オゾン生成電極仕様

	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3 分析項目および分析方法

項目	単位	測定方法
レジオネラ属菌	CFU/100mL	平板培養法
残留塩素濃度	mg/L	デジタル比色計DP-3F、笠原理化工業(株)
水中オゾン濃度	mg/L	デジタル比色計O3-3F、笠原理化工業(株)
気相中オゾン濃度	ppm	オゾンチェッカー OC-300、(有)オゾンテクニカ オゾンガスモニタ OZG-EM-010K、(株)アプリアス
一般細菌	CFU/mL	標準寒天培地法
ATP	RLU (Relative Light Unit)	ルミテスター・ルシパックA3法 <sup>16),17)</sup> 、 キッコーマンバイオケミファ(株)

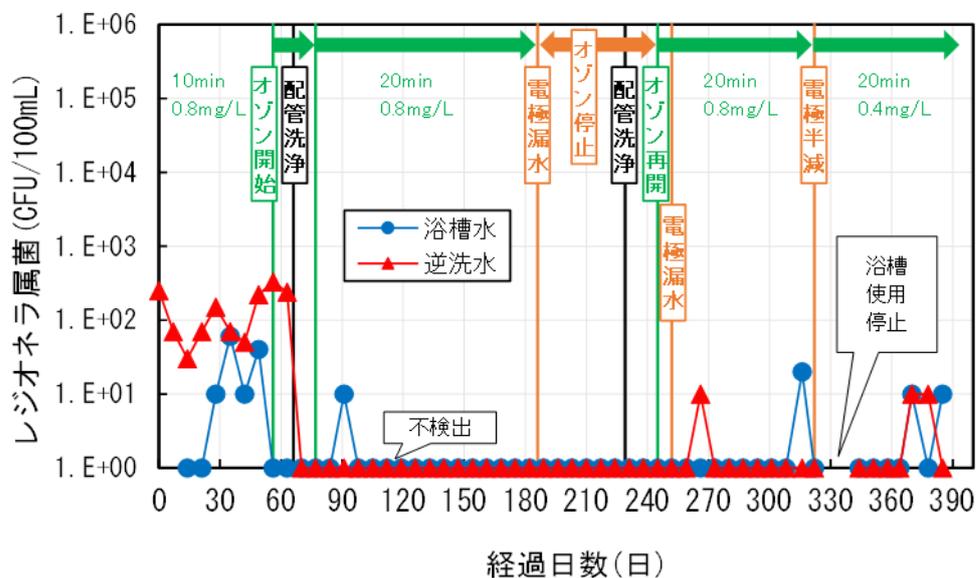


図8 レジオネラ属菌経日変化

レジオネラ属菌の1CFU/100mLは不検出(検出限界10CFU/100mL)を示している。オゾンは56日目より開始して、77日目より電解オゾン水の供給時間を20分間に倍増している。66日目と229日目に過酸化水素によるろ過器と配管の化学的洗浄を行った。186日目に漏水してオゾンを停止、オゾン電解槽を交換して245日目に再開、322日目に断線により電極面積が半減した。370日目よりレジオネラ属菌が浴槽水と逆洗水から検出され始めた。385日目に本試験を終了した。

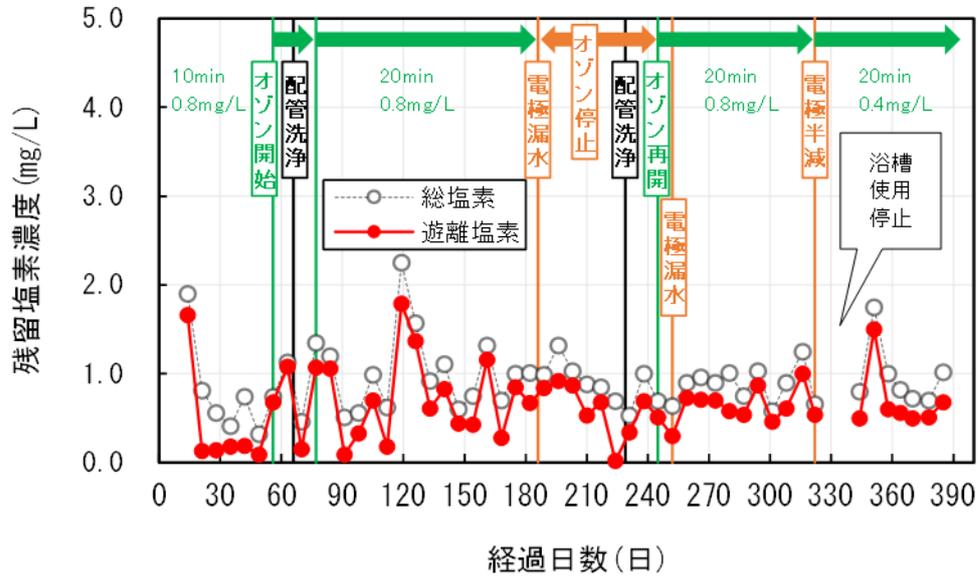


図9 浴槽水残留塩素経日変化

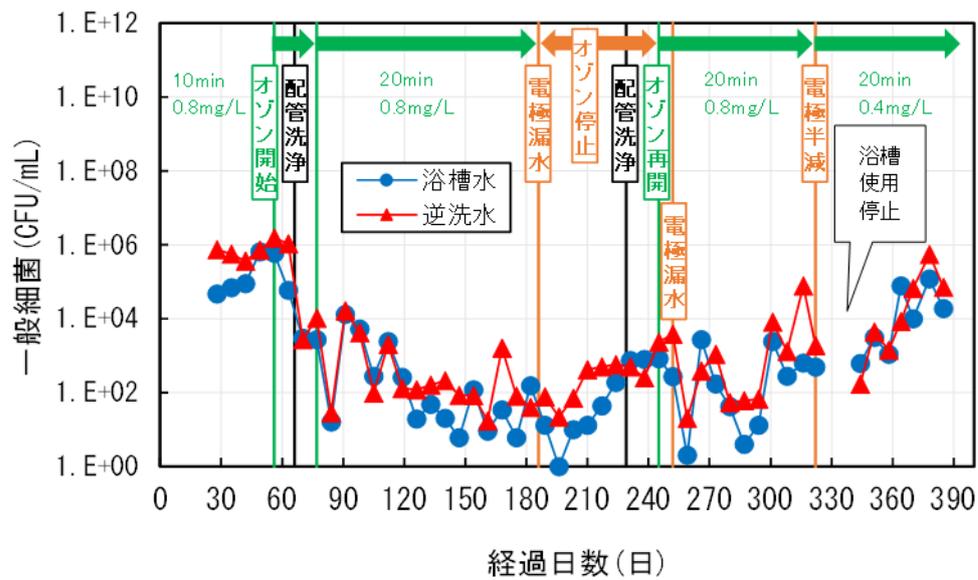


図10 一般細菌経日変化

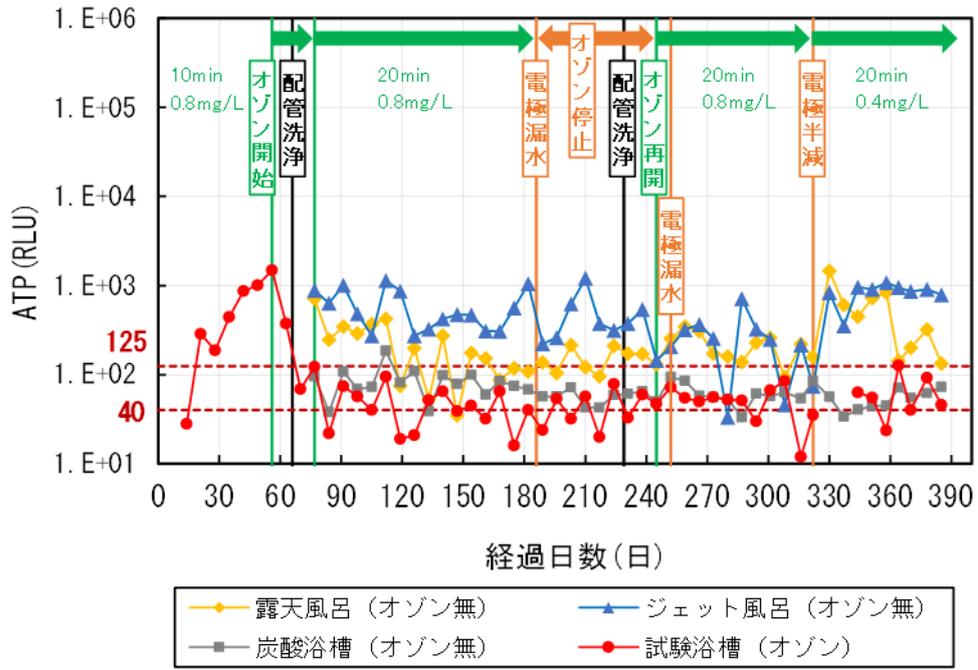


図 11 浴槽水 ATP 経日変化

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

令和4年度 分担研究報告書

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者： 泉山信司 国立感染症研究所

フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

- 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  
研究協力者： 平塚 貴大 広島県立総合技術研究所保健環境センター  
研究協力者： 井上 浩章 アクアス株式会社  
研究協力者： 縣 邦雄 アクアス株式会社  
研究協力者： 新道 欣也 株式会社お風呂のシンダー  
研究協力者： 鳥井 良太 株式会社お風呂のシンダー  
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： 山本 哲司 花王株式会社  
研究協力者： 細川 賢人 花王株式会社  
研究協力者： 小田 康雅 シスメックス株式会社  
研究協力者： 下田 貴宗 株式会社シモダアメニティサービス  
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： 加藤 定男 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

入浴施設におけるレジオネラ属菌の問題には、アメーバや生物膜による消毒からの回避など制御の難しさに加えて、施設の営業規模や泉質の違いなど、衛生状態が多様である等の課題がある。従来は培養時間と専門性を要する平板培養法の検査がなされてきたが、多様な施設や衛生状況をあまり考慮していなかったかもしれない。本研究は、従来とは異なる視点で培養検査法を補完できる、フローサイトメトリー (FCM) 法、ATP 法、レジオネラ属菌生菌遺伝子および全遺伝子検査法などの非培養検査法に着目して検討を進めた。これらの利点を生かして、効率的に現場の状況を把握して衛生管理に反映させることを目指した。具体的には現場調査を実施し、迅速検査法の結果をもって、施設事業者との対話を試みた。ある循環ろ過式入浴施設調査では、浴槽水の消毒効果を FCM 法で可視化した結果を施設衛生管理者と共有し、衛生状態の改善につなげる工程を実践できた。循環ろ過システムの消毒が不足気味であったことから、研究班で開発した省力化配管洗浄技術を試験し、施設事業者自身が洗浄を体験できた。別の掛け流し式入浴施設では、レジオネラ属菌の培養検査だけでなく、非培養検査を用いた原因究明により、施設事業者の理解、汚染源の推定、適切な判断や処置につなげることができた。民間事業者等と連携したこれらの実践は、多様な施設や衛生状態に関わらず、入浴施設のレジオネラ問題を軽減できるものと期待された。

## A. 研究目的

レジオネラ属菌は、レジオネラ症およびポ  
ンティアック熱の原因となる細菌であり、公  
衆衛生上懸念される水媒介病原体である。レ  
ジオネラ属菌は、生活環境中では人工水中に  
遍在しており、原生動物や微生物群により形  
成される生物膜の中で消毒から保護されるこ  
とが知られている<sup>1)</sup>。消毒の難しさに加えて、  
営業規模や設備による管理の違いや、泉質に  
よる消毒効果の違いもあり、施設の衛生状態  
は様々である。こうしたことが現場における  
レジオネラ属菌の制御を複雑化させており、  
入浴施設のレジオネラ属菌対策や衛生管理を  
難しくしている。

レジオネラ属菌は培養検査が標準検査法と  
して知られているが、7~10 日間を必要とす  
る専門性の高い検査であるために、現場の日  
常的な指標として衛生管理に反映させるには  
かなりの努力を要する。我々は、これまでに現  
場への迅速な適用を目指して、フローサイト  
メトリー (FCM) 法<sup>2)</sup>、遺伝子検査法<sup>3)</sup>および  
ATP 法<sup>4)</sup>等の非培養検査法を用いて、浴槽水  
のレジオネラ属菌汚染に関する衛生状態を迅  
速に評価する方法を検討してきた。それぞれ  
の方法の有用性は認められてきたものの、こ  
れら検査法の現場への実装は簡単ではない。  
迅速な非培養検査法の利点を生かしての、現  
場の衛生管理への反映を実証する必要がある。

我々がこれまでに評価してきた 300 を超え  
る浴槽水は、適切に消毒されていれば泉質の  
違いに関わらず、FCM 法の細菌数（種類を問  
わない雑菌の濃度）が一定の水準を下回る状  
態となり、レジオネラ属菌はほとんど検出さ  
れなかった。一方、浴槽水中の細菌数が閾値を  
超えた状態では、レジオネラ属菌の検出率が  
急激に上昇した<sup>5)</sup>。すなわち細菌数は、レジオ  
ネラ汚染とゆるやかに相関し、迅速な指標と  
してレジオネラ汚染を検知するのに有用と考  
えられる。細菌を指標とする検査であれば、濃  
度が桁違いに高く、低濃度なレジオネラ検査  
で行われる濃縮操作が不要である。細菌をフ

ローサイトメーターで検出する方法は、1 週  
間以上を要する培養と全く異なり、レーザー  
光で細菌由来の散乱光と蛍光を検出するので、  
染色と測定操作の時間が分単位と短い。人の  
主観の入りにくい機器測定であり、再現性が  
高く、多検体処理にも向いている。循環ろ過式  
や掛け流し式浴槽といった浴槽や泉質の種類  
も問われない。

本研究では、この FCM 法等の非培養検査の  
結果を施設衛生管理者と共有し、対話により  
消毒や細菌汚染による衛生状態等への施設の  
理解を促すことで、公衆浴場の衛生管理の向  
上に繋げられることを期待している。

具体的には入浴施設の協力を得て、民間事  
業者等と連携して、現場施設を調査、予防・改  
善の実施例を蓄積する。当該研究では、循環ろ  
過式と掛け流し式の 2 施設の事例を紹介する。  
必要により、省力化配管洗浄による生物膜対  
策を、施設衛生管理者が実体験する機会も用  
意した。掛け流し式では、源泉ポンプ付近の汚  
染源調査を発見に至った経緯を説明する。加  
えて、新しい試みであるろ過器のオゾン消毒  
にも協力し、非培養検査法による衛生状況の  
把握の測定の技術面について説明する。

## B. 材料と方法

### 1. 調査で用いた検査法

#### 1.1. 遊離塩素濃度の測定

検水の遊離塩素濃度は DPD (*N,N*-diethyl-*p*-  
phenylenediamine, Hach)法を用いて測定し  
た。

#### 1.2. FCM 法

フローサイトメーターとして、RF-500  
(Sysmex 社製) を使用した<sup>6)</sup>。従来の緑色レ  
ーザーではなく、より短波長な 488 nm 青色  
レーザーを使用している。散乱光は、感度や精  
度の向上を期待して、その検出信号のピーク  
高さ (Height) ではなく、信号面積 (Area) を  
検討対象とした。

測定の陽性対照として、*Escherichia coli*  
NBRC3972 と *Legionella pneumophila*

NIIB0058 を用いた。 *E. coli* は TSB 培地 (Trypticase Soy Broth, BD, 211768) で 37°C、6 時間増菌した。 *L. pneumophila* はレジオネラ growth サプリメント (オキシド、SR0110) を加えた Buffered yeast extract (BYE) 液体培地により 30 °C、72 時間増菌した。増菌液を希釈して約 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> および 10<sup>5</sup> CFU/mL の菌懸濁液を作製した。これらを装置で測定するとともに、 *E. coli* は TSA 培地、 *L. pneumophila* は BCYE $\alpha$ 培地で生菌数を計測した。細菌染色は Propidium Iodide (PI) を用いて、染色時間を 15 分間にした以外は、田栗らの方法<sup>2)</sup>に準拠して実施した。後述の通り、試料をグルタルアルデヒドで固定し、細菌が PI 染色される。

本研究の FCM 法は、浴槽水中の細菌数を測定して、迅速に消毒効果を判定する方法である。培養法と異なり、細菌の生死を指標とするのではなく、生死に関わらず、細菌数を指標として消毒の効果を判定する。塩素などに比較的耐性があり、生物膜やアメーバとの共生により消毒の効きづらいレジオネラに対して考案された方法である。

FCM による測定領域 (Gate) は次の通り設定した。即ち、 *E. coli* および *L. pneumophila* の 10<sup>5</sup> CFU/mL 菌懸濁液に、終濃度 10 mg/L となるように次亜塩素酸ナトリウムを加えて、室温で 2 ~ 3 時間回転振盪して、強い消毒による死菌を用意した。チオ硫酸ナトリウムにより塩素を中和後、死菌サンプルを FCM により測定して、この消毒の効果が強く出た死菌を測定の対象外となるように、測定領域を設定した。すなわち、消毒の効果が少ない、形状を保った細菌が測定対象となるようにした。この特異測定領域を用いて各種浴用水を測定し、エリア内の細菌数が暫定的な基準値 (200 cells/mL, 以降暫定基準値という) 未満であった場合は「消毒効果有り」と判定し、基準値以上の場合は「消毒効果不十分」と判定した。なお、測定は 3 回行い、平均値、標準偏差と変動係数 (CV 値) を求めた。

### 1.3. レジオネラ遺伝子検査法

レジオネラ遺伝子検査は磯部ら<sup>3)</sup>の方法に準拠した。qPCR 法は、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) および Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を用い、添付の取扱説明書<sup>7)</sup>に従い実施した。EMA-qPCR 法は、qPCR 法における DNA 抽出の前に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 (タカラバイオ) および LED Crosslinker 12 (タカラバイオ) を用いて、EMA 処理を実施した。得られた遺伝子コピー数を取扱説明書に従って CFU に換算した。EMA-qPCR と qPCR の CFU 換算値をそれぞれ生菌遺伝子量 (GU/100mL) と全遺伝子量 (GU/100mL) とした。

### 1.4. ATP 法

ルミテスター PD-30 (キッコーマンバイオケミファ) と ATP ふき取り検査システム (ルシパック Pen-AQUA, キッコーマンバイオケミファ) を用いて、添付の取扱説明書<sup>8)</sup>に従って処理した。

### 1.5. レジオネラ培養法

レジオネラ培養検査は森本らの方法<sup>9)</sup>でろ過濃縮法により行った。培地は GVPC $\alpha$ 培地 (ピオメリュー) を使用し、100 倍濃縮した検水を、無処理のまま、あるいは酸処理か熱処理の後、塗抹して 36°C で 3 ~ 7 日間培養した。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。レジオラート (アイデックス) は淀谷らの報告<sup>10)</sup>に準拠して、10 mL の検水に適量の前処理剤 (アイデックス) を加えて 10 分間反応、水酸化カリウムにより反応停止後に、37°C で 7 日間培養した。

## 2. 施設調査

### 2.1.1. 施設調査の方法

図 1 に想定の施設調査の手順を示した。1 番目に、保健所や民間の環境衛生管理業者等と連携して入浴施設に研究協力を申し入れる。2 番目に、施設の衛生管理者との対話の中で、調査対象とする試料と検査方法を定める。この

時、非培養検査法を中心に提案するが、管理者の意向によっては培養検査も加える。計画に基づいて検査を実施する。3番目に検査結果を施設の衛生管理者と共有する。4番目に、4-a: 衛生状態が良好な場合は、維持を伝える。4-b: 衛生状態に問題があった場合は、消毒の強化等の改善手段を提案し、必要に応じて配管洗浄等を含めて、これら対策を事業者に実体験してもらう。5番目に、培養法で浴槽水のレジオネラ陰性を確認する。6番目の最終的に、以上から導き出される重要管理点を、施設の衛生管理マニュアルに反映、日常管理に役立ててもらう。

#### 2.1.2. 検水の採取方法

試料の消毒効果を評価する場合には、最初に遊離塩素濃度と ATP 濃度を測定し、塩素を中和した後で FCM 法により細菌数を計測した。

FCM 法用の試料は 100 mL 滅菌採水瓶 (栄研, TG2000)、培養法用の試料は 1 L 滅菌済みポリ容器に採水した。共に終濃度 50 mg/L チオ硫酸ナトリウムにて塩素を中和し、FCM 法用試料はさらに終濃度 0.05% グルタルアルデヒドで固定した。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。遺伝子検査法は培養法の濃縮サンプルを用いた。

### 2.2. H 入浴施設の調査

#### 2.2.1. 施設の衛生管理状況

最初に協力を得た H 循環ろ過施設は、入浴者 700~千人規模で温泉 (塩化物泉) と井水を利用していた。温泉の内湯および露天風呂と、井水のジェット浴、および薬湯の浴槽があり、主に 4 系統の循環ろ過により管理されていた。

温泉は貯湯する段階で塩素を注入し、除鉄除マンガン処理をしていた。これとは別に、循環ろ過系統も、塩素消毒を実施していた。

井水は循環系統のみの消毒であった。

それぞれの循環系統に回収槽があり、週 1 回の清掃消毒を行っていた。生物膜対策とし

て、週 1 回の頻度で 20 mg/L×1 時間の高濃度な遊離塩素による洗浄と、年 3 回の過炭酸ナトリウム製剤による配管洗浄を行っていた。

#### 2.2.2. 調査の概要

調査は事業者との対話により、温泉タンク水と井水タンク水に加えて、温泉は内風呂と露天風呂の 2 系統、井水はジェット風呂と薬湯の 2 系統を対象とした。レジオネラ汚染に対する回収槽のリスクを説明して、各循環系統から浴槽水、回収槽水およびろ過器の逆洗水を対象とした。都合、2 (タンク) + (2+2 系統) × 3 (浴槽水・回収槽水・逆洗) = 14 試料を採取した。それぞれ遊離塩素濃度、FCM 法による細菌数および ATP 濃度を測定した。

#### 2.2.3. 調査に基づく対応

FCM 法により消毒効果を確認し、課題が認められた系統は洗浄した。これらの改善を確認した後に、4 系統の浴槽水のレジオネラを培養法で検査した。

#### 2.2.4. 省力化配管洗浄剤の活用

H 入浴施設は、ジェット浴ノズルにヌメリの課題を抱えていた。施設自身が定期的に市販製品を用いて配管洗浄を実施していたが、処理後に界面活性剤様の粘着物が浴槽表面に付着し、その除去に手間がかかるなどの不便も認められていた。そこで、研究班で開発した省力化配管洗浄剤<sup>11)</sup>を用いてジェット浴の系統を洗浄することとした。

ジェット浴系統の水量は、男女浴槽、回収槽、ろ過器を合わせて約 18 m<sup>3</sup>であった。本検討では、ヌメリ除去の向上を期待して、循環水量を減らさず処理した。新規省力化洗浄剤を、1 m<sup>3</sup>当たり 3 kg (すなわち 54kg) を投入して、1 時間循環させた。中和剤を投与して 15 分間循環させて、排水・すすぎを 2 回繰り返した。処理は休館日に実施して、処理前、洗浄剤反応中、中和剤投与後、すすぎ時および営業開始後に採水した。非培養検査 (ATP と FCM 法による細菌数、遺伝子検査) と培養検査 (レジオラートおよび平板法) を実施した。

## 2.3. J 入浴施設の調査

次に協力を得たかけ流し式施設は、レジオネラ症患者の利用が疑われた施設であった。事前に実施されていたレジオネラ属菌検査により、温泉の原水からレジオネラ属菌が検出され、追加で汚染源調査を実施した。事前の検査結果を表 1 に示した。なお、施設からはレジオネラ属菌が検出されたものの、患者から菌が検出されず、因果関係は証明されていない。

### 2.3.1. 施設の衛生管理の状況

利用者数は 1 日あたり 50～100 人であった。施設は、温泉（塩化物泉）利用の大小浴場および露天風呂と、井水利用の打たせ湯、シャワーおよび水風呂を有していた。温泉系統は消毒しておらず、事前の検査で FCM 法により大量の細菌が検出されていた。井戸水は塩素剤により消毒されており、ほとんど細菌が認められなかった。当該温泉は 1000 m 超の地下から汲出されており、砂除去のろ過器と原水採取用蛇口が備えられていた（図 5 写真および模式図）。ろ過器には糸巻式カートリッジフィルター（以下 CF と略、図 5 D）を挿入して砂除去しており、毎日交換のたびに塩素浸漬により消毒と乾燥をしていた。ろ過器を通過した配管は 20 m ほど離れた浴室に連結しており、10 m<sup>3</sup> 程の浴槽に湯口から温泉を供給していた（図 5 模式図）。

### 2.3.2. 調査の概要

表 1 のとおり、事前調査では温泉原水、大浴場（女湯）および露天風呂（女湯）からレジオネラ属菌が検出されていた。大量の細菌も確認され、汚染源としてろ過器が疑われた。施設との対話の結果、温泉系統の原水（図 5 A）、ろ過器内水（図 5 B）およびろ過器排水（図 5 C）、湯口水（図 5 E）並びに浴槽水（図 5 F）を検査対象とした。CF（図 5 D）を装着しない状態と、装着した状態を測定し比較した。これらの非培養検査（ATP と FCM 数、遺伝子検査）と培養検査（平板法）を実施した。

なお、井戸水を利用する浴用水については、

レジオネラ属菌が検出されておらず、適正に塩素が検出され、かつ FCM 法による消毒効果が確認されたために、調査対象から外した（表 1）。

### 2.3.3. 調査に基づく対応

調査結果を検討し、施設事業者に推測される汚染源について説明した。施設側で対応を決定し、適切な措置を施したうえで、レジオネラ属菌の自主検査が行われた。

## C. 結果および考察

### 1. FCM 法による細菌数の迅速検査

#### 1.1. 培養法との比較試験

FCM 法（フローサイトメーター）により大腸菌とレジオネラを測定した結果は、培養法による結果と高い相関が認められた（図 2 a, b）。FCM 法と培養の双方で測定の際の直線性に問題はなかった（図 2）。FCM 法の標準偏差は 3 回の測定で平均値の 4% 程度と小さかった。培養の生菌数に比べて、若干、フローサイトメーターが高めの値であった。

本研究で使用した FCM 法は、培養によらずに、細菌数を迅速に検査できることを確認した。

#### 1.2. 消毒効果判定用の測定領域の設定

*E. coli* と *L. pneumophila* の 10<sup>5</sup> CFU/mL 懸濁液（図 3. A a, B a）を強く塩素消毒し中和することで、消毒後サンプルを用意した。消毒後の FCM 法の測定結果は、大腸菌もレジオネラもほぼ同じ散布図を示し、狙い通りに設定領域から大腸菌とレジオネラのドットが消失した（図 3. A b, B b）。

## 2.1. H 入浴施設の調査

薬湯以外の 3 系統は、浴槽水、回収槽水およびろ過器逆洗水の全てで、細菌数は暫定基準値（200 cells/mL）未満であり、消毒は適切に行われていることが確認された（図 4, A ①～③, B ①～③, C ①～③）。薬湯系統は、浴槽水が基準値未満であったが、回収槽水とろ過器逆洗水はそれぞれ 233 cells/mL、480

cells/mL と僅かに基準値を上回り、「消毒効果不十分」と判定された (図 4, D ②, ③)。衛生管理者との協議の結果、消毒の強化を試みることにし、別報告<sup>12)</sup>に倣い、ろ過器のオゾン消毒を試験した。

同管理者との対話の中で、ジェット浴系統において、塩素管理に懸念がある旨の話があった。そこでジェット浴には、後述 4.1 のとおり、泉山ら<sup>11)</sup>が開発した省力化配管洗浄剤を用いて配管洗浄を行うこととした。

調査終了後、内湯と露天風呂についてはそのまま、ジェット浴は省力化配管洗浄で処理した後、施設で自主的に実施した培養検査でレジオネラの不検出が確認された。

## 2.2. J 入浴施設の調査

調査前に、温泉原水、女湯の大浴場と露天風呂からレジオネラ属菌が検出されていた (表 1)。温泉は掛け流し式で、残留塩素は不検出であった。井水の残留塩素は 0.5~0.8 mg/L と、こちらは消毒がなされていた。温度が温泉利用箇所で 27.6~37.3°C、井水利用箇所で 19.5~38.0°C と低めであったが、これらは保健所の指示で採水日前日の浴槽水を排水しないで保存していたことによる。

FCM 法による細菌数 (以下 FCM 数と略す。) は、温泉で 1,213~659,950 cells/mL と高い値を示して「消毒効果不十分」であったが、井水では 40~53 cells/mL で全てが「消毒効果有り」と判定され、残留塩素濃度と細菌数は対応していた (表 1)。

ATP も細菌汚染と対応が取れており、温泉由来の浴槽水からは 46~1,234 RLU/0.1mL と比較的高い値が検出されたが、原水からは 6 RLU/0.1mL と低値であった。井水由来の検体は、原水を含めて 2~19 RLU/0.1mL と全て低い値を示し、井水利用系統の管理状態は悪くなかった (表 1)。

施設事業者との対話後に実施した各種測定結果を図 6 に示した。方法の通り、最初に CF を外した状態で原水、ろ過器内水および排水

並びに浴槽の湯口水と浴槽水を採水し、一旦浴槽水を排水した後、CF を取り付けた状態で同じように採水した。その結果、CF を外した状態の全てのサンプルからレジオネラ属菌が検出され、15~150 CFU/100mL であった (図 6 A)。CF を装着した状態のレジオネラ属菌検査結果は、不検出~40 CFU/100mL と若干低下し、CF の効果があったのかもしれないが、完全に取れるものでもなかった (図 6 B)。CF より上流側の汚染が疑われる変化にも受け取れた。

非培養検査は、やや低い値を示したものの、概ねレジオネラ生菌数と同様の傾向であった (図 6 A B)。FCM 数は、CF 取外し時に 733~11,467 cells/mL、CF を装着して 207~13,127 cells/mL であった。すなわち FCM 数は、全て基準値を超過し、消毒がない状況を反映した、消毒効果不十分の結果であった。CF 撤去時の FCM 数は湯口水で最大となり、CF 装着後はろ過器内水の FCM 数が急増し、消毒がなされていても CF の管理は容易ではないこと、ならびに浴槽水の常時の消毒の必要性が改めて示唆された。

ATP は、CF 取外し時に 8.7~40 RLU/0.1 mL、CF 装着後に 9~341 RLU/0.1 mL となり、微生物による汚染が明らかであった。

これら数値の詳細と解釈として大きく分類して 3 点、1:ろ過器前の蛇口の原水から、細菌が低値であるが一定量検出されたこと、2:原水のレジオネラ属菌数が最大で下流に行くに従い希釈されたいこと、および 3:CF と湯口水に起因する細菌が検出された模様であること、を施設に伝えた。

続く施設側との対話の中で、湯口付近にぬめりが付着していることと、併設ろ過器の 1 機が故障により閉塞していたことが判明した (図 5 模式図)。消毒直後の CF のレジオネラ汚染の可能性は低く、ろ過器より上流の配管からの汚染の可能性を指摘したところ、ろ過器の故障とろ過器上位の盲管が判明した。本来なら、好気性の土壌細菌であるレジオネラ

属菌が<sup>13)</sup>、温泉原水から高濃度に検出されることは考えにくいことであった。今回の事例では、採水用に取り付けた蛇口までの配管内が盲管状態となっており、ろ過器は CF を交換する際に外気に開放されていた。つまり、温泉システムのレジオネラ汚染は、地下 1,000 m の原水の汚染ではなく、CF ろ過器前後がレジオネラ汚染を受け、もっとも上流の汚染源になったと考えられた。

結果を受けて、施設は原水ポンプ周辺の配管を改修し、盲管部分を撤去した。その時の配管内部には BF 様の粘着物が付着していたとこのことで、改修後の原水からはレジオネラ属菌が検出されなくなった。丁寧な対話が汚染源の対策になった 1 例であった。

### 3.2 省力化配管洗浄剤の実践

H 入浴施設のジェット浴循環系統 (全水量 18 m<sup>3</sup>) について、省力化配管洗浄剤を用いて洗浄を行った<sup>11)</sup>。A 剤 (過炭酸ナトリウム等の洗浄剤) を 1 m<sup>3</sup> あたり 3 kg の割合で浴槽水に注入し、1 時間循環させた。次に B 剤 (中和剤) を添加し 15 分ほど反応させたのち、すすぎを 2 回実施した。表 3 に工程ごとの各種検査データを示した。

レジオネラ属菌は、処理前の浴槽水からは検出されなかったが、ろ過器逆洗水からはレジオラートと平板法の両方で検出され、ろ過器の汚れが心配された (表 3)。2 回すすいだ後のろ過器逆洗水からは、レジオネラ属菌不検出となり改善が得られた。浴槽水の平板法で 10 CFU/100mL とわずかに検出されたが、この時点では塩素消毒がなく、剥離されたバイオフィームに由来のレジオネラの検出と考えられた。すすぎが不完全だったかもしれない。なお、数日後の営業中のサンプルでは、塩素消毒がよく効いて、レジオラートと平板法共に不検出となった。

遺伝子検査では、処理前のサンプルからは生菌遺伝子が検出されなかったものの、全遺伝子は検出されており、塩素消毒が欠かせな

い状況にあった。すすぎ後のサンプルは浴槽水のみ検査したが、生菌遺伝子と全遺伝子のいずれも検出されており、やはりすすぎが不完全だったかもしれない。

浴槽水と逆洗水の FCM 数の推移をみると、処理前に一定量の細菌が認められたのち、A 剤処理中に最大となった。中和剤で減少し、すすぎのサンプルからも一定量の細菌が認められて、繰り返しになるが、すすぎが不完全だったかもしれない。数日後の営業中には浴槽水と逆洗水ともに細菌が認められなかった。

ATP は処理前に一定量の数値が認められ A 剤処理後の逆洗水で最大となる工程は FCM と同じであったがすすぎでは低値であった。

本来、すすぎの後のレジオネラ属菌は不検出が望ましいが、本施設の循環系統は男湯と女湯が上下の 2 階構造になっていて、完全にすすぎを行うのが難しかった。不完全なすすぎが、レジオネラや FCM 法の検出の理由と考えられた。

実は本洗浄の 2 週間前に、施設事業者により自主的な配管洗浄を実施したばかりであった。しかし FCM 法では消毒効果が不完全と判定されてレジオネラの死菌が検出されており、洗浄が不完全な様子であった。ここに省力化配管洗浄剤で処理した結果として、洗浄中の試料に多数の細菌の放出が確認され、洗浄効果は明らかであった。洗浄剤は 1 m<sup>3</sup> あたり約 3 kg を使用したが、事業者が使用した製品に比べて 1/2 以下の量で効果が認められた。施設によると、市販洗浄剤で発生していた粘調性の付着物が認められず、すすぎ後の処理が不要となったとのことである。

本配管洗浄剤の有効性を改めて確認できた。今後の施設調査で配管洗浄が必要な場合、営業者の洗浄体験に本洗浄剤を適用したい。

### D. まとめ

レジオネラ汚染の制御を目的に、FCM 法等非培養検査法を用いて浴槽水の衛生状態を迅速評価して、その結果を施設管理に反映させ

るための調査を実施した。

・新規フローサイトメーターを用いた大腸菌とレジオネラ測定では、測定値が生菌数よりも高めの値を示し、強い塩素消毒と中和により作製したサンプルからは測定領域から細菌を示す信号が消失した。

・循環ろ過式入浴施設 (H 施設) の調査では浴槽水の消毒効果を FCM 法を用いて可視化させることにより、施設衛生管理者との間で入浴施設全体の衛生状態を迅速に共有することができた。FCM 法で消毒状態が良好と判定された浴槽水はレジオネラ属菌検査でも不検出であることを確認した。これらの工程は今後の施設調査に応用できる。

・掛け流し式入浴施設 (J 施設) の調査では、レジオネラ属菌の培養検査とともに非培養検査を用いた原因究明実験を行うことにより、施設事業者の状況理解や的確な汚染源推定に役立たせるとともに、不適配管の撤去など施設側の適切な判断と処置につなげることができた。

・H 施設で衛生管理上の不具合が認められた循環系統には研究班で開発した省力化配管洗浄技術を提供した。本洗浄方法では FCM 法により洗浄時の明らかな細菌放出が認められたことで洗浄効果を可視化させることができ、洗浄後のレジオネラ属菌不検出も確認できたために、今後の施設調査における洗浄体験の手段として活用できると考えられた。

## E. 参考文献

1. United States Environmental Protection Agency, *Legionella: Drinking Water Health Advisory*, Office of Science and Technology Office of Water, Washington, DC 20460, EPA-822-B-01-005, 2001. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/legionella-report.pdf>.
2. 田栗利紹ら, レジオネラ属菌検査が現地でも可能となるフローサイトメトリー技術の開発, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・

危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28~30 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 31-36, 2019.

3. 磯部順子ら, 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 30 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 13-22, 2018.
4. 黒木俊郎, ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究, 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)「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 20 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 倉 文明, 91-100, 2021.
5. Taguri, T, *et.al.*, Bacterial counts by flow cytometry can determine presence/absence of *Legionella* in bath water. In the 10th International Conference on *Legionella* 2022, P-53, 2022.
6. 田栗利紹ら, 携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和 3 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 52-86, 2021.
7. タカラバイオ, Cycleave PCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit 取扱説明書, [https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/cy240\\_cy240s\\_j.pdf](https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/cy240_cy240s_j.pdf).
8. キッコーマンバイオケミファ, ルシパック Pen-AQUA (液体測定用) 取扱説明書, <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/products/detail/?id=11060>.
9. 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.

10. 淀谷雄亮ら, 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT 法の有効性の検討-:厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和 3 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 87–92, 2021.
11. 泉山 信司ら, 省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験-:厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和 2 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 13–26, 2020.
12. 泉山 信司ら, オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験-:厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和 3 年度総括・分

担研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 33–51, 2021.

13. 石井 當次, アメーバの生態とレジオネラ感染症, 生活衛生 47, 320–327, 2003.

#### F. 研究発表

Taguri, T., Cai, G., Nakanishi, N., Hiratsuka, T., Inoue, H., Shimoda, T., Shinmichi K., Kura F. and Amemura-Maekawa, J., Bacterial counts by flow cytometry can determine presence/absence of *Legionella* in bath water. In the 10th International Conference on *Legionella* 2022, P-53, 2022.

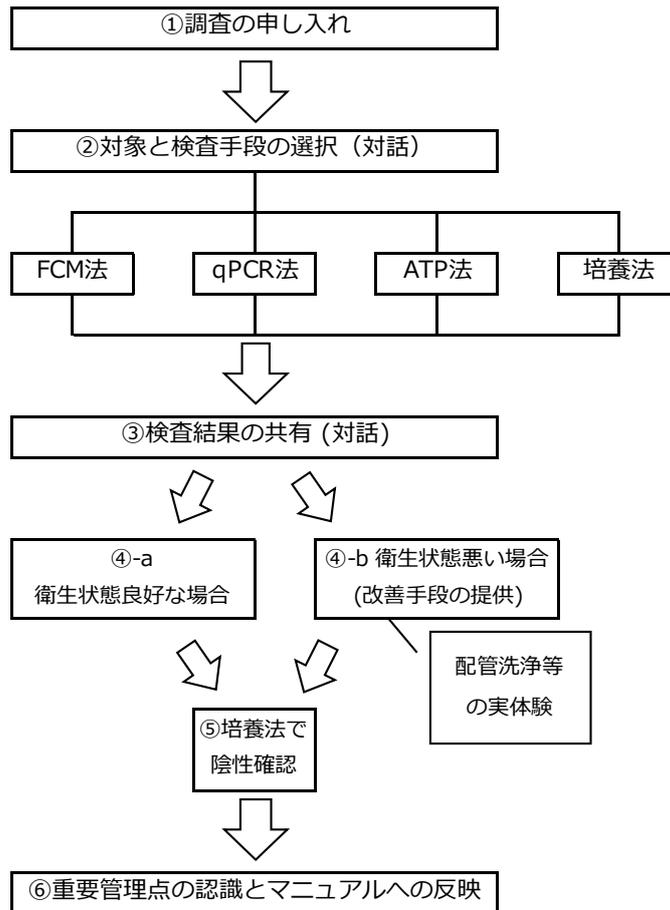


図1 想定される調査フロー

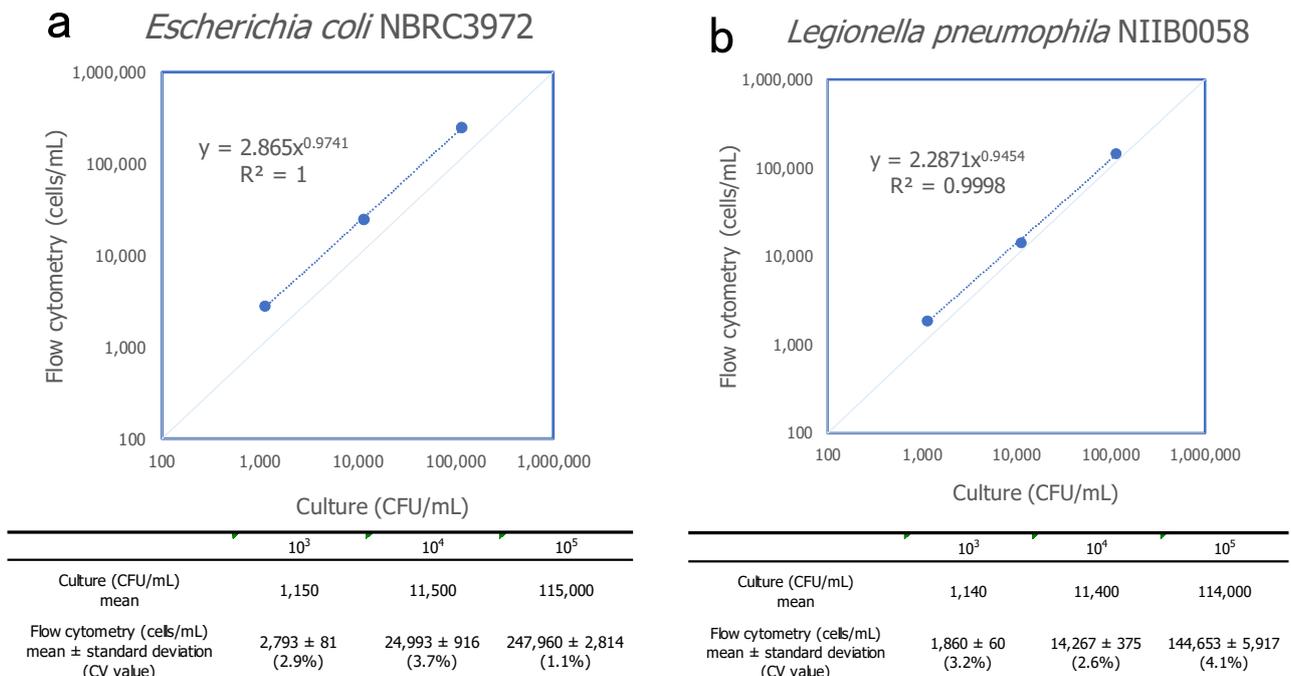
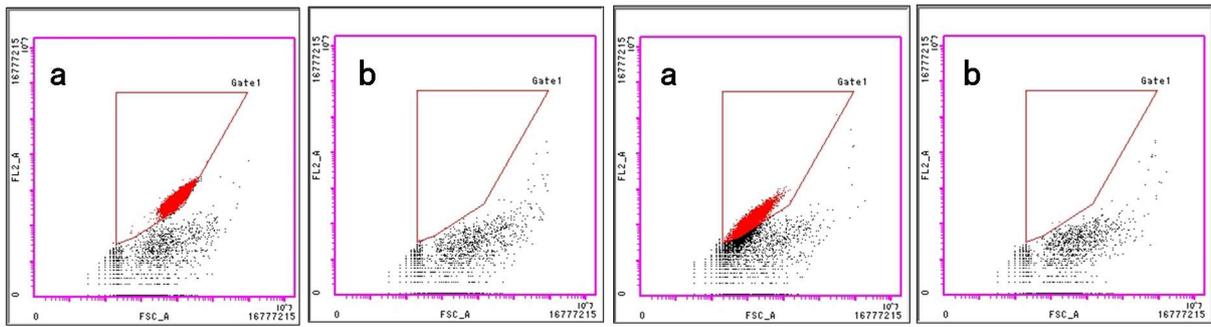


図2 標準株における培養法とFCM法の定量値の比較 (下の表は測定値の再掲)

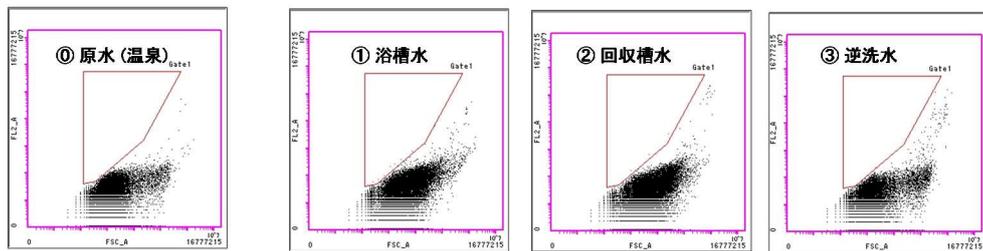


A 大腸菌

B レジオネラ

図3 FCM法による消毒効果判定のための特異領域の設定

大腸菌 (A) とレジオネラ (B) の  $10^5$  CFU/mL 懸濁液 (a) を遊離塩素消毒処理 (10 mg/L・3 hr) により処理・中和後に設定した特異領域 (b) を示す。散布図の縦軸は蛍光強度、横軸は前方散乱光強度を示す。



A 内湯循環系統 (温泉)

B 露天循環系統 (温泉)

C ジェット浴循環系統 (井水)

D 薬湯循環系統 (井水)

図4 H入浴施設の各種循環系統におけるFCM法の散布図の比較  
RF-500により得られたFCM法の散布図でエリアは図3に示した特異領域を使用。  
各散布図の縦軸は蛍光強度、横軸は前方散乱光強度を示す。

表 1 調査前に実施した J 入浴施設のレジオネラ属菌等検査結果

採水場所	水の種類	温度 (°C)	pH	残留塩素 (mg/L)	レジオネラ属菌検査		フローサイトメトリー法		ATP (RLU/0.1 mL)	
					定量値 (CFU/100mL)	菌種/血清型	細菌数 (cells/mL)	消毒効果判定 (≥100:有, <100:無)		
1	原水	温泉	37.3	7.3	0.0	70	<i>Legionella pneumophila</i> SG5	1,213	無	6
2	大浴場(男湯)	温泉	33.5	7.7	0.0	不検出		320,647	無	1,197
3	小浴場(男湯)	温泉	33.0	7.8	0.0	不検出		379,473	無	144
4	大浴場(女湯)	温泉	32.5	7.6	0.0	40	<i>Legionella pneumophila</i> SG5	659,950	無	1,234
5	小浴場(女湯)	温泉	31.5	8.1	0.0	不検出		199,060	無	46
6	露天風呂(女湯)	温泉	27.6	8.2	0.0	10	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	168,760	無	70
7	原水	井水	20.1	7.6	0.8	不検出		47	有	3
8	打たせ湯(男湯)	井水	38.0	7.3	0.6	不検出		53	有	19
9	水風呂(男湯)	井水	20.0	6.6	0.5	不検出		40	有	4
10	水風呂(女湯)	井水	19.5	7.7	0.8	不検出		53	有	2

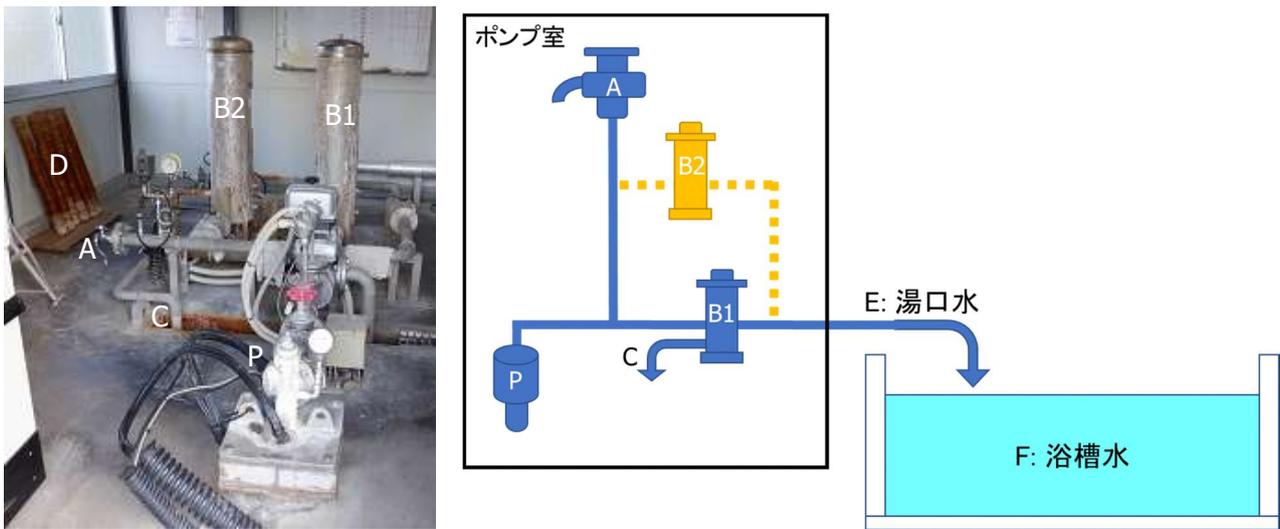


図5 原水の汲上ポンプと併設ろ過器の外観写真(左)と模式図(右)

P: 汲上げポンプ, A: 原水採水用蛇口, B1: 稼働中ろ過器, B2: 閉鎖中ろ過器 C: ろ過器排水  
D: カートリッジフィルター, E: 湯口水, F: 浴槽水, 模式図破線の配管は閉鎖中

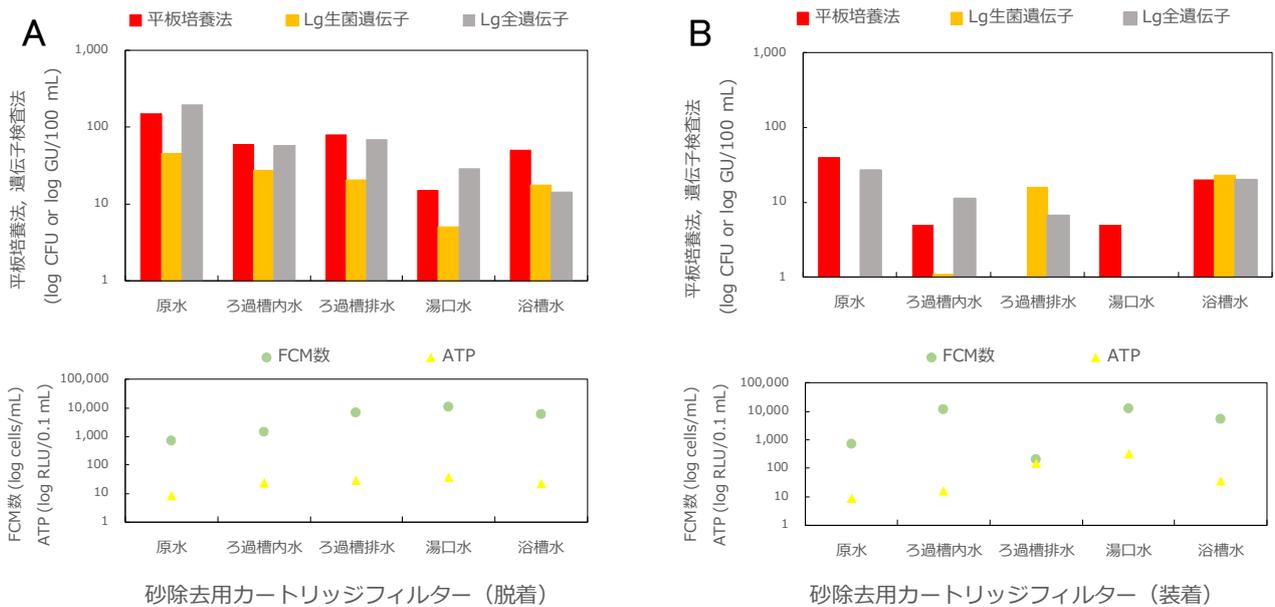


図 6 J 入浴施設の温泉系統におけるレジオネラ属菌と各種汚染指標の推移  
レジオネラ汚染源究明のために砂除去用カートリッジフィルターを脱着状態(A)と装着状態(B)で比較

表2 省力化配管洗浄剤の工程ごとの各種検査データの推移

			処理前		A剤処理1時間後		中和剤注入後		すすぎ		通常営業時	
			浴槽水	逆洗水	浴槽水	逆洗水	浴槽水	逆洗水	浴槽水	逆洗水	浴槽水	逆洗水
培養法	レジオラート	(MPN <sup>※</sup> /100mL)	<10	32	NT <sup>※※</sup>	NT	NT	NT	<10	<10	<10	<10
	平板培養法	(CFU <sup>※</sup> /100mL)	<10	10	NT	NT	NT	NT	10	<10	<10	<10
遺伝子検査法	Lg生菌遺伝子	(GU <sup>※</sup> /100mL)	0	0	NT	NT	NT	NT	7	NT	NT	NT
	Lg全遺伝子	(GU/100mL)	19	7	NT	NT	NT	NT	27	NT	NT	NT
	FCM法	(cells/mL)	287	587	103,233	53,987	493	9,073	353	4,007	90	40
	ATP法	(RLU <sup>※</sup> /0.1 mL)	47	53	3	137	1	10	5	4	34	24
	残留塩素濃度	(mg/L)	0.23	0.53	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.50	0.60

※MPN: most probable number, CFU: colony forming unit, GU: gene unit (CFU-equivalent value), RLU: relative light unit, ※※NT: not tested

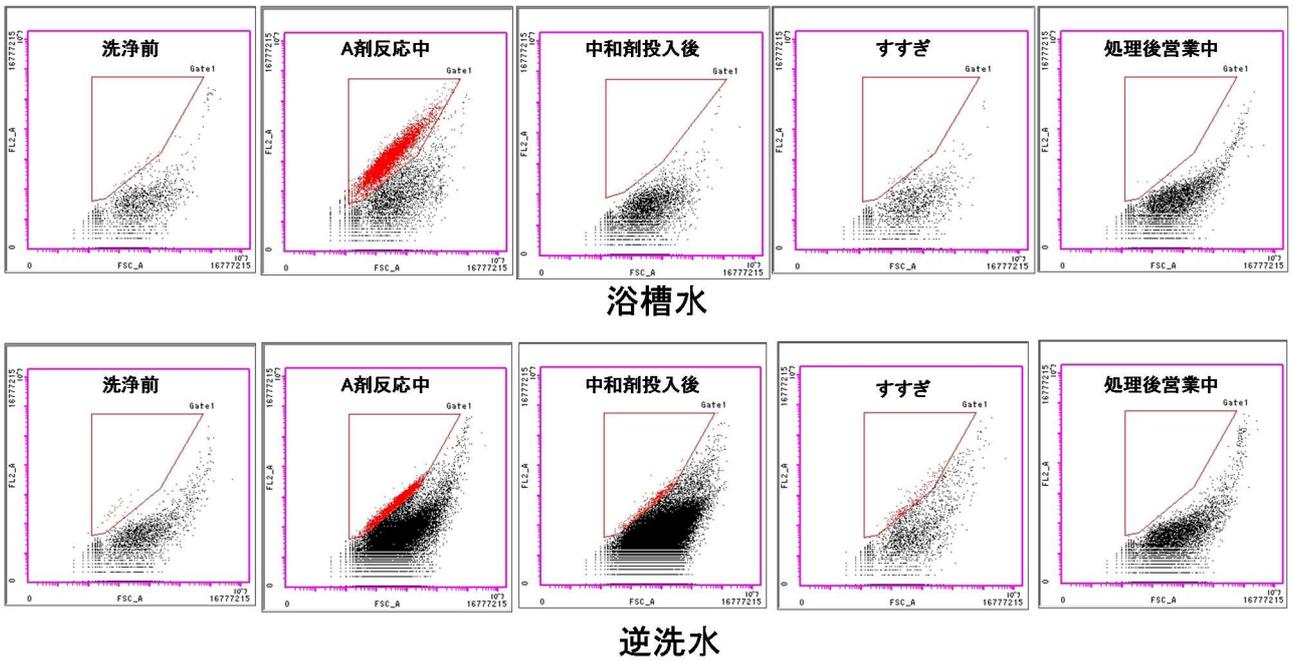


図7 省力化配管洗浄剤の作業工程におけるFCM法スカッタグラムの変化  
 洗浄前は休業中で非消毒の状態、A剤処理中(1時間)、中和剤処理中(15分)、すすぎ後、処理後の営業中に採水した。逆洗水のすすぎは検査せず。

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）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所

分担研究報告書

レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

研究分担者

○金谷 潤一 富山県衛生研究所

研究協力者

磯部 順子 富山県衛生研究所 稲窪 大治 日本板硝子株式会社

研究要旨

入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染が問題となっているが、培養検査法は7日間以上を要して、汚染源が不明に終わることも少なくない。より迅速な検査と汚染源を追求する分子疫学的手法の確立と普及を目的に、1. モバイル型装置を用いた迅速な検査法の開発、2. 患者および地域流行株の解析によるその特徴の解明、3. 患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株のゲノム SNP 解析を行った。モバイル型 qPCR 装置（PicoGene® PCR1100、日本板硝子）を使用した遺伝子検査法では、これまでのプロトコルを改良した結果、LAMP 法と同等の感度・特異度を示した。本県でレジオネラ症患者から高頻度で検出される遺伝子型（ST23、ST120、ST502、ST505）の菌株について全長ゲノム解析を行い、分子疫学的手法の向上と汚染源の解析を進めた。平均ゲノムサイズに大きな差異はなかったが、外来 DNA によって生じる組換え領域内の SNPs が、ST23 と ST120 は、ST502 や ST505 と比較して多いことが判明した。とりわけ ST120 は、検出された SNPs の 99%以上が組換え領域内であった。通常の SNP 解析では組換え領域内の SNPs を除外しており、ST120 は 2 株間の SNPs が最多でも 40 に限られ、他の遺伝子型に比べて少ない傾向であった。また ST120 は、2 株間の SNPs が 5 以内の組み合わせが 62 通りも存在した。今回解析した菌株の多くは疫学的な関連性がないものであり、より高解像度な株の異同の識別が望ましかった。ST23 や ST120 といった高頻度に検出される遺伝子型の SNP 解析は、組み換え領域を除外しない解析や、実地疫学と分子疫学から総合判断する丁寧な感染源調査が重要と考えられた。

## A 研究目的

2022年の国内におけるレジオネラ症患者報告数は、2,129件（暫定値）であり、前年比99.8%であった<sup>1,2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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. モバイル型装置を用いた迅速な検査法の開発、2. 患者および地域流行株の解析によるその特徴の解明、3. 患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株のゲノムSNP解析を行った。

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。そのため、培養法と相関する遺伝子検査法は、入浴水の衛生状態を的確に、かつ早期に把握する点から重要な方法である。また近年、モバイル型のリアルタイムPCR装置が普及し始めており、採水現場で直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出でき、より迅速な結果の還元が可能となる。したがって本研究では、採水現場で測定可能なモバイル型装置を使用したqPCR法（モバイルqPCR法）について、平板培養法や他の遺伝子検査であるLAMP法と相関が取れるよう、これまで構築してきたプロトコルを改良し、比較検討した。

レジオネラ属菌は、土壌、浴槽水など環境中に広く生息しているが、レジオネラ症患者から検出される遺伝子型（ST、Sequence-Based Typing）には偏りがある<sup>3)</sup>。そこで、本県でレジオネラ症患者から高頻度で検出される遺伝子型の菌株について、ゲノム解析からその特徴を明らかにし、患者に感染・定着しやすいメカニズムの解明に資する知見とする。また、これらの遺伝子型の菌株は複数の環境検体から検出されるため、遺伝子型別結果による感染源特定の判断に迷う場合がある。そこで、患者および患者が利用した入浴施設から分離され

た菌株について、ゲノム配列のSNP数を明らかにする。得られた結果は、感染源調査の際に患者由来株と環境由来株のゲノム解析を実施した場合に、その結果の解釈において参考となる知見となる。本研究により、公衆浴場の衛生管理およびレジオネラ症対策の向上が期待される。

## B 材料と方法

### 1 検査材料

2022年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、カラン水であった。

### 2 平板培養法

平板培養法は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法（薬生衛発0919第1号）」に準じて実施し、10 CFU/100 mL以上を陽性とした。

### 3 LAMP法

検水の100倍濃縮液2 mLを用いて、Loopampレジオネラ検出試薬キットE（栄研化学）を使用して取扱説明書に従い実施した。

### 4 モバイルqPCR法

検水500 mLをフィルターろ過後（ポリカーボネート、0.2 μm、47 mm）、現在開発中の核酸抽出試薬200 μLを添加した手もみ式簡易破碎容器にフィルターを入れ、室温で30秒間手もみした。新規の活性炭を含む吸収剤を40 μL添加し、核酸抽出試薬と混和したものを核酸抽出液とした。qPCR反応は、PicoGene® *Legionella* spp. Kit（日本板硝子）およびPicoGene® PCR1100（日本板硝子）を用いて実施した。

### 5 次世代シーケンサー解析

2005年以降に県内でレジオネラ症患者から高頻度に検出された4つの遺伝子型（ST23、ST120、

ST502、ST505) の菌株について、SNP 解析を実施した。解析には、患者の他に、浴槽水、シャワー水、カラン水、水たまり、土壌から分離されたものを用いた。また、患者および利用した入浴施設から分離された上記遺伝子型の菌株についても、同様に解析した。

菌株の DNA は、QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) を用いて抽出した。イルミナ社のプロトコルに従い、Nextera XT DNA Library Preparation Kit、Nextera XT Index Kit および MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) を用いてライブラリーを作製後、RUN を実施した。遺伝子型ごとに BactSNP で pseudogenome を作成後、Gubbins を用いて組換え領域を除去し、SNPs を比較した<sup>7)</sup>。各遺伝子型の任意の 1 株のドラフトゲノム配列をレファレンス配列とした。

(倫理面への配慮)

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

## C 結果

### 1 LAMP 法およびモバイル qPCR 法の結果

各遺伝子検査法の平板培養法に対する感度は、LAMP 法で 83.3% (5/6 検体)、モバイル qPCR 法で 100% (6/6 検体) であった (表 1)。特異度は、LAMP 法で 66.7% (16/24 検体)、モバイル qPCR 法で 56.5% (13/23 検体) であった。

### 2 4 遺伝子型 (ST) における組換え領域と SNPs

解析の結果は表 2 に示した。各遺伝子型の平均ゲノムサイズは 3,375,724~3,430,085 bp であった。そのうち、平均組換え領域は 24,586~79,450 bp であり、ゲノム全体に占める割合は、最も低かった ST502 で 0.7%、最も高かった ST23 で 2.3% であった。検出された総 SNPs は 4,926~18,122 bp であり、そのうち組換え領域内の SNPs は 4,264~17,983 bp であった。ゲノム全体に占める組換え領域内の

SNPs の割合は、ST23 が最も低く 86.6% であり、最も高い ST120 で 99.2% であった。また、組換え領域外の SNPs は 139~780 bp、総 SNPs に占める割合は 0.8~13.4% であった。

各遺伝子型における 2 株間の最大の SNPs を見ると、最も SNPs が少ない ST120 は 40 であった。また、ST120 では、2 株間の SNPs が 5 以内の組み合わせは 62 あった。一方、ST505 は、2 株間の最大の SNPs が 194 であり、2 株間の SNPs が 5 以内の組み合わせは 3 通りのみであった。

各遺伝子型の SNPs による系統樹と、レファレンス配列に対する組換え領域を図 1 に示した。ST23、ST120 においては、多くの株に組換え領域が検出されたが、ST502、ST505 においては、特定の系統に属する株にのみ検出された。

## 3 疫学的関連のある事例の SNPs

疫学的に関連があると推定された 6 事例について、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株のゲノム SNPs を比較した (表 3)。事例 4 においては、SNPs が検出されなかった。一方、事例 6 においては、SNPs が 41 検出された。これらの事例から分離された菌株は、いずれも ST502 であった。ST505 が分離された事例 1~3 は、検出された SNPs が 13~16 であった。

## D 考察

モバイル型 qPCR 装置を使用した遺伝子検査法の検討では、検体中に含まれる成分などの影響により遺伝子増幅反応が阻害される結果 (遺伝子陰性培養陽性) を避けるため、今年度はこれまでのプロトコルを改良し、活性炭を含む吸収剤を添加した。結果として、今年度の検討では遺伝子陰性培養陽性検体は認められなかった。また、感度・特異度は LAMP 法と同等であった。モバイル qPCR 法は、濃縮後の DNA 抽出操作において遠心機などの機器が不要であること、反応時間が 30 秒間と短時間での処理が可能であることから、既存の方法

と比較し採水現場での遺伝子検査に適した改良が加えられている。今後は他機関でも検討し、同様の結果が得られるか検討する必要がある。また、採水現場での濃縮を想定した、より簡便なプロトコルについても検討したい。

各遺伝子型のゲノム解析を実施した結果、ドラフトゲノム配列から算出した平均ゲノムサイズは、ST23のみ他の3遺伝子型(ST120、ST502、ST505)より少し大きかったが、大きな差異は認められなかった。検出されたSNPsを比較すると、ST23とST120は、組換え領域内のSNPsがST502やST505と比較し多かった。とりわけ、ST120は検出されたSNPsの99%以上が組換え領域内であった。したがって、ST23とST120は、外来遺伝子を獲得した特定の系統の株が広く伝播している可能性が考えられた。ST502やST505は、浴槽水から高頻度に検出される遺伝子型である一方で、ST120は水たまりから高頻度に検出される<sup>4)</sup>。これらの生息環境の違いが変異の蓄積に与える影響についても、今後解析していきたい。

細菌は外来遺伝子を取り込んで相同組換えが生じると、多数のSNPsを獲得してしまうかもしれない。細菌の進化系統解析が目的の際は、変異の蓄積が一定の頻度と速度で生じる分子時計を解析対象にすべく、攪乱の要因になる組換え領域を除いての、SNPsの比較が望ましいとされる<sup>7)</sup>。これに準じて、感染源調査を目的としたSNP解析でも、組み換え領域が除外されてきた<sup>7)</sup>。

過去の報告では、同一感染事例から分離された菌株のSNPsは、その多くが5未満と少なかった<sup>5)</sup>。今回解析した遺伝子型の中では、ST120は2株間のSNPsが5以内の組み合わせは62通りもあった。今回解析した菌株の多くは疫学的に関連がないため、より高解像度な株の異同の識別が望ましかった。ST23やST120といった高頻度に検出される遺伝子型のSNP解析結果は、むしろ組み換え領域内に多数のSNPsを認めており、組み換え領域を除外しない解析を試みるべきかもしれない。当

面のこととして、低解像度な遺伝子型のSNP解析については、分子疫学の結果だけで判断するのではなく、実地疫学データと合わせて総合判断する丁寧な感染源調査が重要であると考えられる。疫学的に関連のある事例でSNPsが最も少なかった事例No.4は、患者および患者が利用した入浴施設から分離されたST502の菌株間のSNPsは0であった。疑い施設での感染を強く支持する結果であった。

一方で、同じST502が分離された事例No.6では、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株間のSNPsは41と多かった。この数字は従来の5SNPs未満の暫定的な閾値に比べてとても多く、この41SNPsの解釈については以下の通りである。

レジオネラ症患者からは、しばしば複数の遺伝子型の菌株が検出され、重複感染が生じていると考えられる<sup>6)</sup>。つまり、同一患者から分離される同一の遺伝子型からも、様々なSNPsが検出される可能性がある。環境中についても同様で、同一遺伝子型から様々なSNPsが検出されると考えられる。したがって、上述の41SNPsについては、残念ながら菌株の取得が不足して、近縁を捉えることはできたが、完全一致するものを拾えなかったと解釈される。SNPsが完全一致した株を取得するのは容易ではなく、何株を釣菌すれば一致するかは、その環境におけるレジオネラの多様性や割合に左右されそうである。当面の感染源調査は、許される範囲で同一検体から複数の株を解析し、レジオネラの多様性を考慮するのが望ましいと考えられた。このような高解像な結果が得られるのは好ましいことであるが、解析の規模については検討を要する。今後は、同一検体から分離した複数の菌株についてSNP解析を実施し、同一検体内におけるSNPsの多寡について検討する必要がある。

## E 結論

モバイル型 qPCR 装置を使用した遺伝子検査法

は、LAMP 法と同等の感度・特異度を示した。全長ゲノム解析を行い、各遺伝子型で組換え領域の割合や SNP 数に差異を認めた。疫学的に関連のある事例を解析した結果、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株間の SNPs は 0~41 であった。

#### 参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ 2022 年第 52 週.  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/11740-idwr-sokuho-data-j-2252.html>
- 2) 国立感染症研究所発生動向調査年別報告一覧 (全数把握)  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/11529-report-ja2021-20.html>
- 3) Amemura-Maekawa J et al. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84(18), pii: e00721-18.
- 4) Kanatani J et al. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based typing. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jul;79(13):3959-66.
- 5) Raphael BH et al. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol.* 2016 May 31;82(12):3582-3590.
- 6) Wewalka G et al. Dual infections with different *Legionella* strains. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Jan;20(1):O13-9.
- 7) Croucher NJ et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015 Feb 18;43(3):e15.

#### F 研究発表

- 1) Kanatani J et al. Characterization of bacterial microbiome in water from public bath, especially focused on *Legionella*. The 10th International Conference on *Legionella*. Yokohama, Japan. September 2022.

#### G 知的財産権の出願・登録状況 なし

表 1. 遺伝子検査法と平板培養法との相関

A)

		平板培養 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
LAMP	+	5	8	13
	-	1	16	17
		6	24	30

B)

		平板培養 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
モバイルqPCR	+	6	10	16
	-	0	13	13
		6	23	29

表 2. 4 遺伝子型 (ST) における組換え領域と SNPs

ST	株数	分離年	平均ゲノムサイズ (bp)	平均組換え領域 (bp)	%	総SNPs	組換え領域内のSNPs	%
ST23	14	2010-2021	3,430,085	79,450	2.3	11,270	10,983	97.5
ST120	21	2006-2021	3,379,816	61,726	1.8	18,122	17,983	99.2
ST502	32	2005-2021	3,375,724	24,586	0.7	4,926	4,264	86.6
ST505	30	2005-2021	3,380,811	59,507	1.8	7,948	7,168	90.2

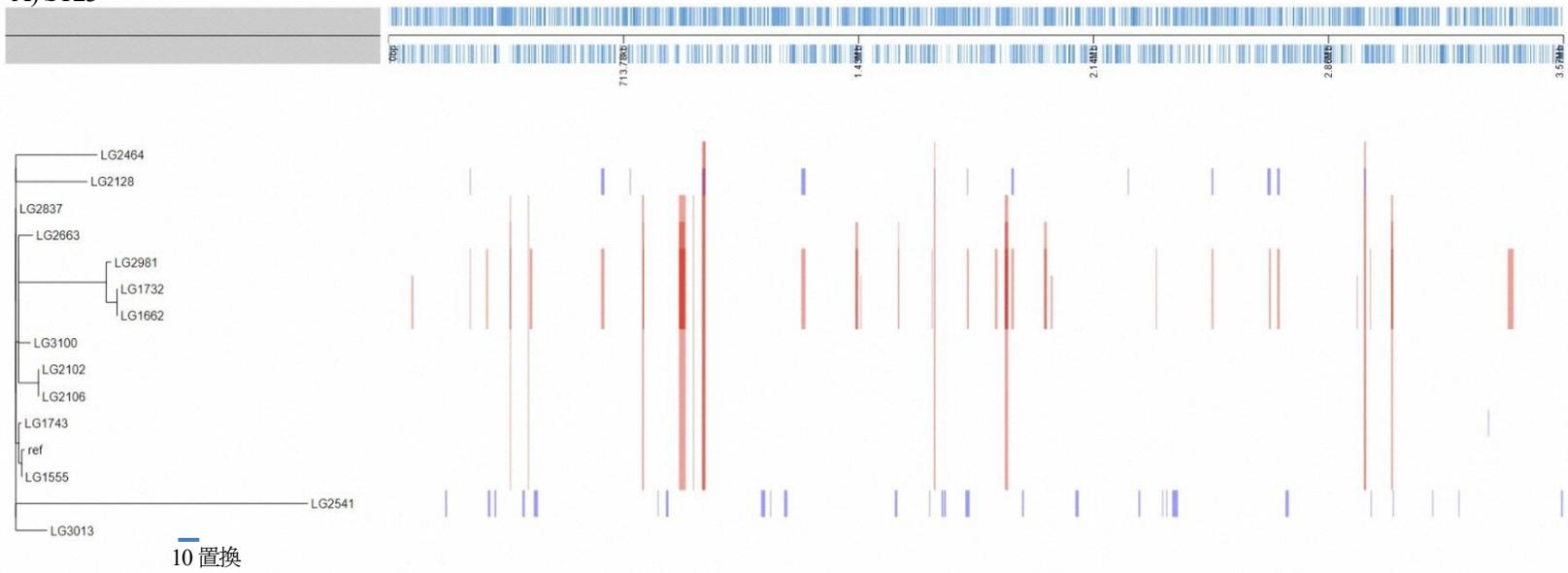
ST	組換え領域外のSNPs	%	2株間の最大SNPs	2株間のSNPsが5以内の組み合わせ
ST23	287	2.5	99	8
ST120	139	0.8	40	62
ST502	662	13.4	191	6
ST505	780	9.8	194	3

表 3. 疫学的に関連のある事例の SNPs

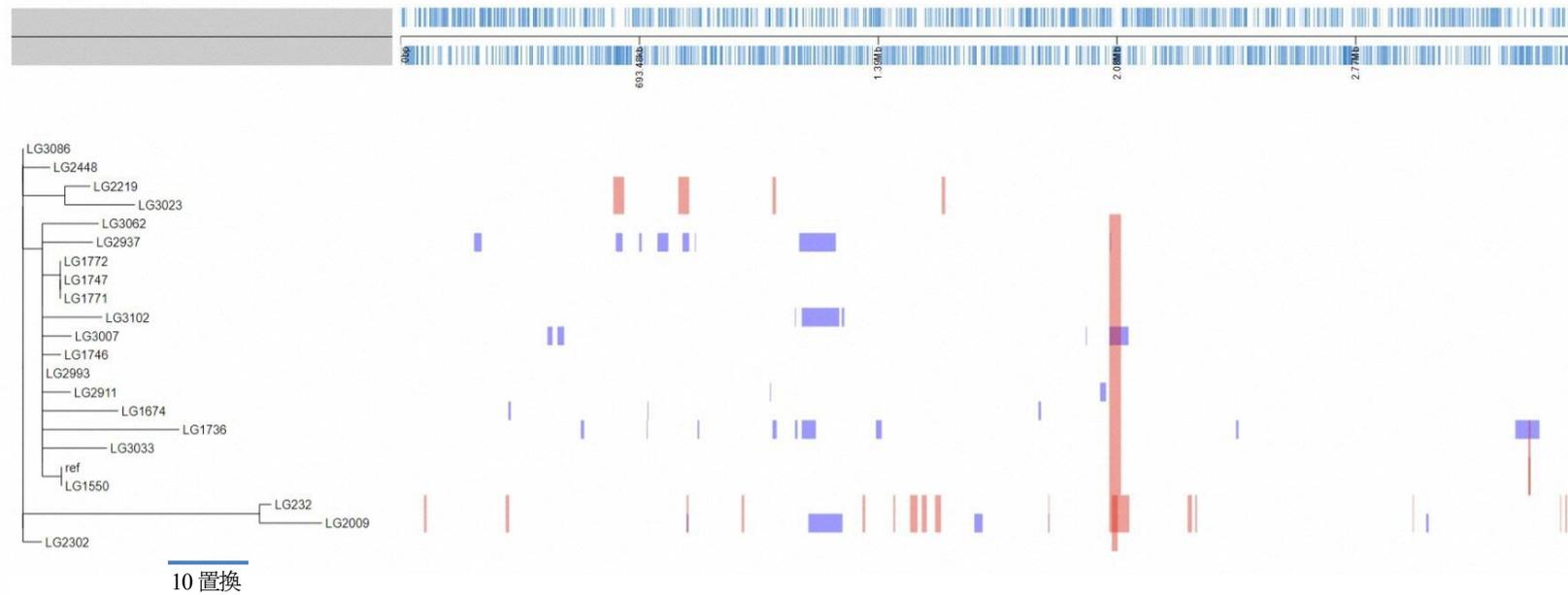
事例	年	月	菌株No.	由来	菌種・血清群	シーケンスタイプ	2株間のSNPs
事例1	2005	8	LG3	患者	Lp1	ST505	16
			LG7	入浴施設 (施設A)	Lp1	ST505	
事例2	2008	9	LG613	患者	Lp1	ST505	13
			LG626	入浴施設 (施設B)	Lp1	ST505	
事例3	2014	6	LG2338	患者	Lp1	ST505	13
			LG2340	入浴施設 (施設C)	Lp1	ST505	
事例4	2015	9	LG2564	患者	Lp1	ST502	0
			LG2566	入浴施設 (施設D)	Lp1	ST502	
事例5	2016	8	LG2684	患者	Lp1	ST502	12
			LG2681	入浴施設 (施設A)	Lp1	ST502	
事例6	2021	3	LG3087	患者	Lp1	ST502	41
			LG3088	入浴施設 (施設A)	Lp1	ST502	

図 1. 4 STs における分子系統樹と組換え領域

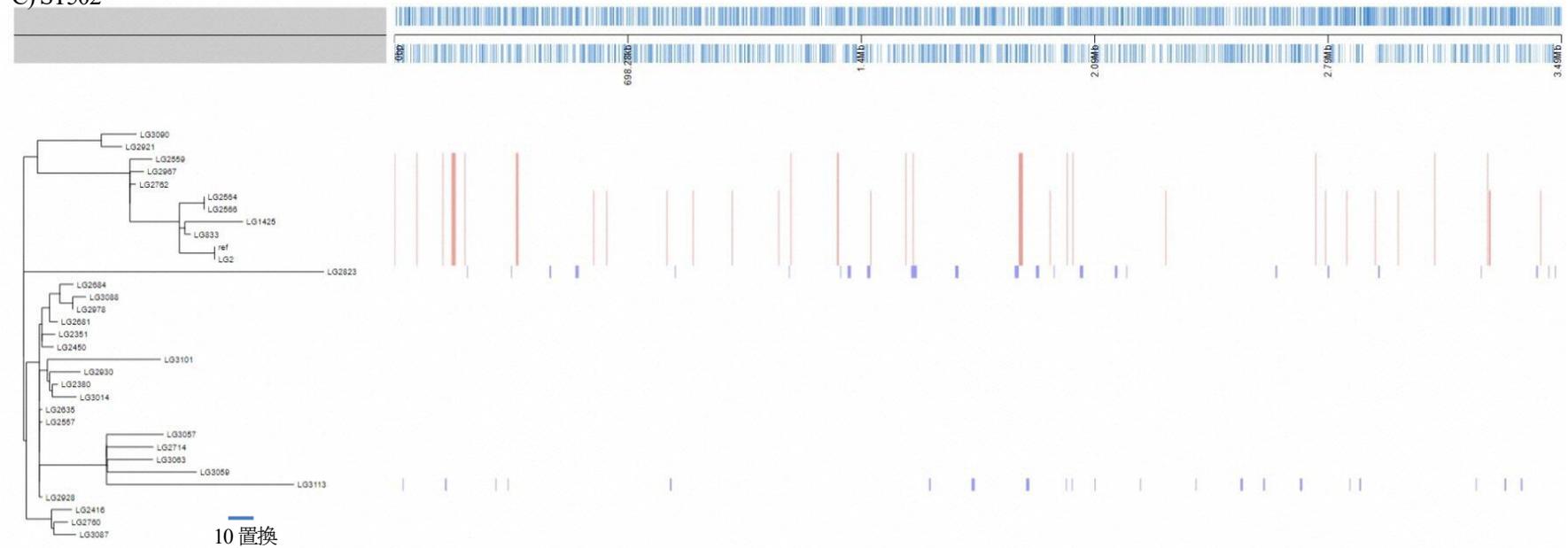
A) ST23



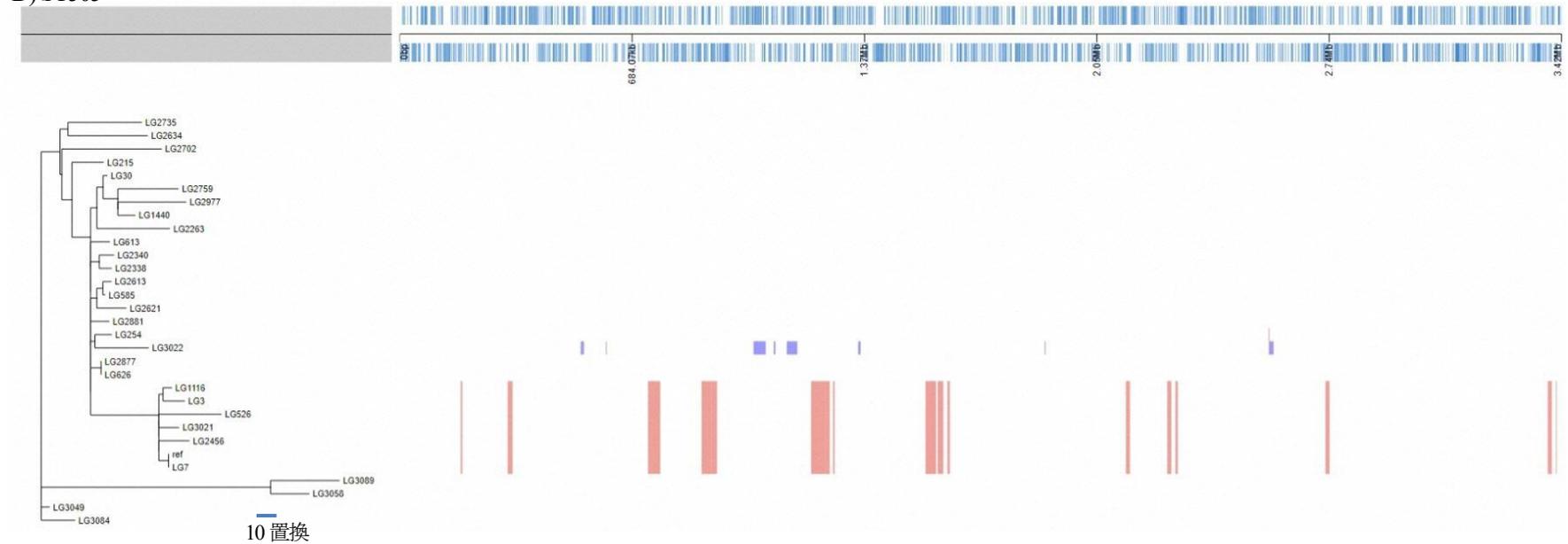
B) ST120



C) ST502



D) ST505



\*各遺伝子型の図において、左側は菌株の系統樹を示した。上部は、レファレンス配列の ORF 領域を示した。右下は組換え領域を示しており、赤色は複数の株で検出された領域、青色は1株のみに検出された領域である。

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」  
研究代表者 泉山信司 国立感染症研究所寄生物部  
令和4年度研究報告書

保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態

研究分担者 小坂浩司 国立保健医療科学院生活環境研究部  
黒木俊郎 岡山理科大学獣医学部

研究要旨

2022年11～12月、3自治体（2県、1市）の衛生部局、あるいは保健所職員を対象に、レジオネラ症関係に対応する組織、対象とする施設、レジオネラ症発生状況、レジオネラ症対応で実施していること、現状の課題の有無とその程度の点から、オンラインヒアリングを行った。対象施設は、3自治体間で大きくは変わらないが、施設数は自治体によって異なり、施設あたりの年間の見回り回数も自治体によって異なった。レジオネラ症の発生時の対応、立ち入り検査時の対応は、いずれの自治体でも調査票を作成し、それに基づいて実施していた。職員へのレジオネラ症に関連した研修は、異動した職員、あるいは初任者研修で実施していた。加えて、各自治体で独自の説明会、研修会等を実施していた。事業者への講習会は、毎年行っているところ、保健所の裁量で行っているところがあった。前者の場合、義務化しているところもあった。いずれの自治体も、試料の採取は保健所が行い、検査は衛生研究所が行っていた。衛生研究所との連携は上手くいっていた。レジオネラ症に対する優先度は自治体によって異なった。危機意識が高くないところでは、施設の清掃・消毒方法に欠陥があったり、自主検査を規定の頻度で実施していない施設も多く、どのようにレジオネラ症防止対策のための衛生管理を徹底させるかが課題であると回答していた。

A. 研究目的

公衆浴場における公衆衛生上の最も重要な課題は、レジオネラ症への対策である。保健所、衛生部局は、公衆浴場の事業者に対して、衛生管理に係る監視指導を行う立場を担っている。したがって、公衆浴場の衛生管理を向上させる上で、公衆浴場におけるレジオネラ属菌に対する消毒手法の構築や普及、あるいは検出手法の構築等だけでなく、事業者への適切な監視指導等も重要であると言える。しかし、現状、保健所、衛生部局等での監視指導の実態、および課題等は十分にはわかってはいない。

地方自治体における公衆浴場の監視指導業務の担当職員を対象に、ヒアリングを行い、レジオネラ症発生防止や発生時の対応に係る監視指導の実態や課題を整理した。

B. 研究方法

1. ヒアリングでの質問票の作成

ヒアリングにおける質問票を作成した。その内容は以下のとおりであった。

- ・レジオネラ症関係に対応する組織、対象とする施設
- ・レジオネラ症発生状況
- ・レジオネラ症対応で実施していること
- ・現状の課題の有無とその程度

2. ヒアリングの実施

2022年11～12月、3自治体（A～C自治体）の保健所・衛生部局を対象に、オンラインでヒアリングを行った。A、B自治体は県保健所、C自治体は市保健所であった。質問票は、事前に送付した。

C. 結果およびD. 考察

表1～4に、それぞれレジオネラ症関係に対応する組織、対象とする施設、レジオネラ症発生状況、レジオネラ症対応で実施していること、現状の課題の有無とその程度について、3自治体の結果を整理したものを示す。

対象施設は、3自治体間で大きくは変わらないが、施設数は自治体によって異なっていた。このため、施設あたりの年間の見回り回数も自治体によって異なった。C施設は、施設種に応じて見回り頻度を設定していた。

レジオネラ症の発生状況は、患者が発生していたところとそうでないところがあった（発生していた場合、少なくとも1自治体は水に由来する事例はなし）。いずれの自治体も、施設からは検出されていたが、2自治体では、多くは10～100 CFU/100 mLであった。患者発生時の対応は、いずれの自治体でもマニュアルが作成されていた。その後、施設を調査した場合、患者からの株と施設からの株は、一致しない方が多いこと、患者の菌株が増えなかったり、その逆のケースもあることが報告された。また、陽性施設の特徴として、消毒の方法に問題があり、頻度が十

分でない場合が多い傾向にあった。

職員へのレジオネラ症に関連した研修は、1自治体は異動した職員への研修を実施し、2自治体では初任者研修で実施していた。それ以外にも、条例、指導要綱の改定にともなう説明会や衛生研究所主体のモノクロミン消毒研修を実施しているところもあった。新型コロナ感染症以前は、現場での実施研修を行っている自治体もあった。事業者向けの講習については、2自治体では、毎年、講習を行っており、そのうち1自治体は、条例で義務化していた。残り1自治体の場合、講習の実施は、各保健所の裁量であったが、条例改正や関係通知などについて、事業者に対して通知していた。また、1自治体ではリーフレットを配布し、動画も作成してwebにアップしていた。施設への立ち入り検査は、いずれも調査票に基づいて行っていた。モノクロミン消毒については、2自治体で条例で承認していた。

レジオネラ症に関連した職員の知識について、いずれも自治体も、現状は問題ないこと、また、検査体制については、いずれも衛生研究所で実施していた（試料の採取は保健所が実施）。監視方法について、県土が広く、それを6保健所でカバーしているため、全ての施設を監視するには期間を要すると回答した。施設関連の情報収集については、申請時に図面の提出があり、配管図も提出しているところもあった。

他部局との連携は、いずれの自治体も衛生研究所との連携は上手くいっていた。県庁衛生部局、感染症対策課と連携しているところもあった。

現状の課題として、研修内容（実地研修の施設の確保）を挙げている自治体があった。レジオネラ症に対する優先度は自治体によって異なった。危機意識が高くないところでは、施設の清掃・消毒方法に欠陥があったり、自主検査を規定の頻度で実施していない施設も多く、どのようにレジオネラ症防止対策のための衛生管理を徹底させるかが課題であると回答していた。

## E. 結論

3自治体（2県、1市）の衛生部局、あるいは保健所職員を対象に、レジオネラ症関係に対応する組織、対象とする施設、レジオネラ症発生状況、レジオネラ症対応で実施していること、現状の課題の有無とその程度の点から、オンラインヒアリングを行った。

- ・対象施設は、3自治体間で大きくは変わらないが、施設数は自治体によって異なり、施設あたりの年間の見回り回数も自治体によって異なった。
- ・レジオネラ症の発生時の対応、立ち入り検査時の対応は、いずれの自治体でも調査票を作成し、それに基づいて実施していた。
- ・職員へのレジオネラ症に関連した研修は、異動した職員、あるいは初任者研修で実施していた。加えて、各自治体で独自の説明会、研修会等を実施していた。
- ・事業者への講習会は、毎年行っているところ、保健所の裁量で行っているところがあった。前者の場合、義務化しているところもあった。
- ・いずれの自治体も、試料の採取は保健所が行い、検査は衛生研究所が行っていた。衛生研究所との連携は上手くいっていた。
- ・レジオネラ症に対する優先度は自治体によって異なった。危機意識が高くないところでは、施設の清掃・消毒方法に欠陥があったり、自主検査を規定の頻度で実施していない施設も多く、どのようにレジオネラ症防止対策のための衛生管理を徹底させるかが課題であると回答していた。

F. 参考文献  
なし

G. 健康危機情報  
なし

H. 研究発表  
なし

表1 レジオネラ症関係に対応する組織、対象とする施設について

項目	A 県	B 県	C 市
対応する職員の人数	<ul style="list-style-type: none"> <li>・当該保健所：主担当者1名、他の職員5名+1名（課長級）、計7名</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・当該保健所：3名</li> <li>・県全体：18名</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・市の健康福祉局：4名、健康安全課（感染症対策）：7名（うち4名）</li> <li>・環境衛生監視員：市全体で200名程度</li> <li>・各区の生活衛生課（対物）、福祉保健課（対人）：各4名ぐらい</li> </ul>
対象施設	<ul style="list-style-type: none"> <li>・公衆浴場、旅館、遊泳用プール、医療機関（医療監視実施施設）、特定建築物関係の施設（空調（冷却塔）、高齢者施設や学校（対象外だが相談があれば対応）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・各保健所衛生推進課で所掌している公衆浴場法、旅館業法、建築物衛生法や、法律ではないが遊泳用プールでレジオネラ属菌をチェック。</li> <li>・その他の施設（高齢者施設、学校、特定建築物関係（冷却塔含む）等）は直接担当しておらず、レジオネラ症患者発生の事例を探知した場合に助言。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・旅館、公衆浴場、プール採暖槽、特定建築物、病院、社会福祉施設、民泊、公共施設</li> </ul>
施設数	<ul style="list-style-type: none"> <li>・当該保健所の施設数：11～13程度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・当該保健所の施設数：公衆浴場：56、旅館：185、特定建築物：55、遊泳用プール：21</li> <li>・県全体の施設数（中核市除く）公衆浴場：288、旅館：1635、特定建築物：365、遊泳用プール：92</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・旅館406、公衆浴場295、プール採暖槽（不明）、特定建築物1451、病院120位、社会福祉施設680位、民泊178位、公共施設300位</li> </ul>
年間の見回り施設数、施設あたり回数、延べ施設数、施設あたり訪問時間、等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・年間見回り：全施設で年1回以上（+臨時の立ち入り（発生施設があったら他の施設も臨時の立ち入りを行う））</li> <li>・訪問時間：かけ流しの施設（循環設備無し、水道水+塩素消毒のみの簡易なレベル）では1時間程度循環配管を有する施設では1.5時間ぐらい（2時間はかからない）</li> <li>・確認する主要な部分（浴槽、ろ過装置、配管、塩素注入、貯湯槽）</li> <li>・確認する主要な書類（管理手順書又はマニュアル、各種点検測定記録簿）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・監視施設数（全県（中核市除く）、数値は年間割合）</li> <li>①公衆浴場：31.4%（89/全283）</li> <li>②旅館業：19.6%（321/全1635）</li> <li>③特定建築物：51.0%（186/全365）</li> <li>④遊泳用プール：68.5%（63/全92）</li> <li>・基本1施設1回の監視で以下は延べ件数。監視にかかる時間は1時間程度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・見回り頻度</li> <li>旅館、公衆浴場：年1回</li> <li>病院、社会福祉施設：年1回ぐらい（前年度レジオネラ検出、患者の利用があった施設、過去の立入で文書指導したところ、新規の施設）</li> <li>2年に1回程度（100名程度利用の社会福祉施設）</li> <li>必要に応じて（それ以外）（ただし、郵送による指導、啓発は実施）</li> <li>民泊：今年度から対象施設になったため、始まったところ</li> <li>公共施設：病院、福祉施設と同じ扱い</li> <li>・施設あたり訪問時間：規模や状況によって異なる：1時間～半日（時間がかかるところは、大きいところ、過去に問題があったところ等）</li> <li>*市全体の回答、その他区独自で検討している内容があるかもしれない。</li> </ul>

表2 レジオネラ症発生状況

項目	A 県	B 県	C 市
過去5年間の、患者数、施設からの検出状況等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・当該保健所：入浴施設での検出事例（令和元年に1件、ただし患者は出ていない；280 CFU/100 mL）</li> <li>・県全体：検出事例は22件（公衆浴場12件、看護多機能、高齢者、障害者、プール、学校等10件；いずれも患者は出ていない）</li> <li>・検出濃度は、通常は10～&lt; 100 CFU/100 mLがほとんど。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・当該保健所： H30年：1件、令和元年：3件、令和2年：9件、令和3年：1件、令和4年：3件</li> <li>・県全体： H30年：26件、令和元年：36件、令和2年：50件、令和3年：38件、令和4年：30件</li> <li>＊令和4年は第43週時点</li> <li>・検出濃度は、10～&lt; 100 CFU/100 mLが多い。</li> <li>・レジオネラ症の発症件数のうち、水に関連したと断定した症例は0</li> <li>・毎年度浴槽水のレジオネラ属菌検査事業を実施している：H23～令和2年度において、32～106施設、55～120浴槽を検査、レジオネラ検出浴槽の割合は15.1～46.7%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・患者数： H29年35件、H30年42件、令和元年55件、令和2年40件、令和3年38件</li> <li>・コロナによって増えた印象は特にはない。</li> <li>・施設からの検出状況： 検出施設数／検査施設数：H29年4/36、H30年3/38、R元年4/47、R2年4/28、R3年11/32</li> <li>・調査施設</li> <li>＊患者発生届に基づいて調査した疑い施設（市衛研に検体を送付して検査）</li> <li>＊通常の立ち入り調査： 検体採取は行っていない。年によっては実態把握のために行っている場合もある。</li> <li>＊それ以外に自主検査で30件ぐらい報告あり。</li> <li>＊自主検査の状況は、各区では把握している：自主検査していなければ指導している。</li> <li>＊特定建築物：年間管理計画・年間管理実施報告書にレジオネラ属菌検査について記載することになっている。</li> <li>・検出濃度：集計していないが、少ない場合10～100 CFU/100 mL程度、多い場合10000 CFU/100 mL</li> </ul>
発生施設の特徴、発生施設への指導、施設による対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・陽性施設の特徴： 消毒の方法に問題があり、頻度が十分でない場合が多い（全く消毒をしていない施設はない）。清掃は年一回の過酸化水素洗浄を行うなど、基本的な対応している。全体的に大きな問題があるわけではない。</li> <li>昨年度、「公衆浴場におけるレジオネラ症防止対策」が改正された事を受け、県の条例及び細則等を改正。その内容を元に今年度から施設に指導している。</li> <li>・内容の変更による効果： 国の「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」が改正され</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・これまで、レジオネラ症の原因となった施設の断定・推定はなし</li> <li>・レジオネラ属菌検査事業において、レジオネラ属菌陽性となった施設については、主に下記の内容について指導</li> <li>①レジオネラ属菌検出系統の浴槽使用を自粛し、気泡発生装置の停止等の必要な措置を講ずること</li> <li>②浴槽水の完全換水、清掃。高濃度塩素消毒（10～50 mg/L）を実施すると共に、循環ろ過装置や集毛器等がある場合、ろ過配管等の内部状況を確認し清掃等を実施すること</li> <li>③清掃等終了後、浴槽水の遊離残留塩素濃度が</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・通常時とは別に、患者が発生したときのマニュアルがある（患者用と施設用の両方を行う）</li> <li>・通常時は、施設用のみ使用する</li> <li>・自主検査、患者利用施設で陽性が判明した際は、立入調査して改善してもらう。</li> <li>・患者からの株と施設からの株は、一致しない方が多い。患者の菌株が増えなかったり、その逆のケースもある。</li> <li>・レジオネラ症の（発生源の）特定は、調査票を用いて行う。患者には福祉保健課の保健師が行う。ただし、環境衛生課も一緒に行って聞き取りを行</li> </ul>

	<p>たが、遊離残留塩素濃度の変更が一番大きいと考えている。</p> <p>シャワーヘッド・ホースに関して規程に盛り込まれたので、その効果の可能性あり。</p> <p>シャワーヘッドに関しては、水道水以外を原水としている施設があり、そのような施設に対して県の条例に明記することで指導効果があるように考えている。</p>	<p>0.4～1.0 mg/L に保たれていることを確認してから、使用を再開すること。</p> <p>また、レジオネラ属菌が検出されないことが確認されるまで、使用開始前及び使用中は、毎時 1 回以上遊離残留塩素濃度が 0.4～1.0 mg/L であることを確認すること。</p> <p>④使用再開後は、速やかに自主検査を実施し、レジオネラ属菌が検出されないことを確認すること</p> <p>⑤改善措置完了後、改善報告書を保健所に提出すること</p>	<p>う。発生源は、特定されない場合の方が多い。</p>
--	---	--	------------------------------

表3 実施していること

項目	A 県	B 県	C 市
職員への研修の実施	<ul style="list-style-type: none"> <li>・5～6月に異動した職員への研修を実施。</li> <li>・生活衛生関係の職員を対象に研修を実施。</li> </ul> <p>研修内容：レジオネラの基本知識。条例の内容、衛生管理の基準等、指導の際に必要な知識</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・これまでは、現場での実施研修を行っていた（過去に事故の起きた施設で実施）が、現在同施設は新型コロナウイルス感染症の影響で休館中</li> <li>・図面（配管）を読めるようになっていた方が多い。図面は施設が大きくなるほど複雑になる。現場の研修は重要と考えている。過去には他府県の職員が現場研修に泊まり込みで参加することもあった。聞くより体験したほうが良い。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・毎年度監視結果や指導内容について、特筆すべき事項があった場合は、保健所において報告書や発表スライドを準備し、業務研修会で発表する</li> <li>・毎年度監視結果や指導内容について、県の疑義照会や事例報告、保健所間での統一した指導の擦り合わせ等を目的として、担当者会議の場で情報共有する</li> <li>・レジオネラに特化した研修は行っていない。</li> <li>・初任者研修があり、その中で、関連法規、監視指導のやり方について研修</li> <li>・業務マニュアルを作成している。職員は熟読している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・OJT が基本、初任期研修の中でレジオネラ症に関する内容あり</li> <li>・感染症の観点から保健師と共同研修あり</li> <li>・条例、指導要綱の改定にともなう説明会</li> <li>・衛生研究所主体のモノクロラミン消毒研修を実施</li> </ul>
事業者向けの講習会、その他の啓発方法（リーフレット、インターネット Web ページ等の作成や紹介）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・年に 1 回県主体の入浴施設の責任者を対象とした講習会を実施（条例で規定、浴室等衛生管理責任者は受講義務あり）</li> <li>・新型コロナウイルス発生後は実施しにくくなっている。</li> <li>・今後は、新型コロナウイルスの収束次第で集合形式の講習会の実施を再開する予定。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・各保健所の裁量で講習会を実施。</li> <li>・条例改正や関係通知などについて、事業者に対して通知。</li> <li>・公衆浴場、旅館等、保健所が考えて実施（令和 2、3 年は実施していない）。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・web 上で手引書の例を示している。</li> <li>・リーフレット、また、条例改正の際はそれをまとめたリーフレットを配布、動画も作成して web にアップしている。</li> <li>・年 1 回、社会福祉施設事業者向けの講習会を実施し、その中で、レジオネラ症に関する年間の管理計画等について講習。</li> </ul>
・検査あるいは聞き取り確認の有無と内容	<ul style="list-style-type: none"> <li>・調査票を作成し、立ち入りはそれに基づいて実施。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・通常監視：浴槽水残塩濃度、レジオネラ属菌自主検査の確認、各種記録の</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・調査票に基づいて聞き取りを実施</li> <li>・調査票は、施設ごとに作</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>・現在の調査票は令和3年版なので、シャワーヘッド等について追加予定。</li> <li>・DPD試薬による遊離残留塩素濃度の測定が主。</li> <li>・レジオネラ属菌の自主検査で検出されていない場合、行政検査は行っていない。</li> </ul>	<p>確認、清掃・消毒方法の確認を実施</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・レジオネラ属菌検査事業：施設の状況や管理状況、入浴者数や換水状況等について確認を行ったうえで、浴槽水残留塩素濃度、pH、浴槽水温、気温を現地で検査。</li> <li>・立入マニュアルを作成し、立入時の検査内容は調査票にまとめている。</li> </ul>	<p>成している（浴場設備、給湯設備等）</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・例えば、浴場施設では以下について確認 浴槽、ろ過装置、消毒、集毛器、調節箱・シャワータンク、オーバーフロー回収槽、上がり用湯、水位計・連通管等、貯湯槽、水質検査</li> </ul>
モノクロラミン消毒について	<ul style="list-style-type: none"> <li>・条例で承認</li> <li>・現在、当該保健所管内には適用施設は無い。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・条例は設定していない。</li> <li>・関心のある事業者はいる。高pHの泉水も多い。しかし、モノクロラミンの用事調製へのハードルが高く、断念している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・条例で承認</li> </ul>

表4 課題の有無や程度

項目	A 県	B 県	C 市
職員の知識	<ul style="list-style-type: none"> <li>・問題は感じていない。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・基本的にOJTで経験を積む。</li> <li>・保健所の職員への最新の知識の導入：業務発表会、厚労省の生活衛生課による研修</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・条例や要綱に基づいた対応は認識している。しかし、条例以上のこと、具体的対応については、経験にもよるが難しい点があるかもしれない。</li> <li>・保健所間のレジオネラ対応への格差や温度差（自治体内、自治体間）：市内の各保健所内での格差はない。</li> <li>他自治体の保健所との違いは感じるところがあるかもしれない。</li> </ul>
監視方法、検査体制	<ul style="list-style-type: none"> <li>・検査は衛生研究所で実施。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・県土が広く、それを6保健所でカバーしているため、全ての施設を監視するには期間を要する。</li> <li>・監視員も3～6年程度で異動となるため、引き継ぎに苦慮</li> <li>・検査は衛生研究所で実施。ただし、レジオネラ属菌検査は本所のみで実施可能で、支所では実施していない。</li> <li>・民間の検査機関は足りている。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・行政検査は衛生研究所が実施（保健所が試料採取、採取持ち込みを行う）。</li> <li>・事業者は民間検査機関を用いた自主検査。発生した場合、原因究明は市で行うが、改善の確認は事業者が行う。</li> </ul>
対策マニュアルの作成	<ul style="list-style-type: none"> <li>・県のレジオネラ対策マニュアルを作成している。</li> <li>・関係機関として本庁（衛生管理課、感染症対策課）、保健所、衛研が含まれ、対応フローを作成している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・令和3年度より、県条例の浴槽水質の基準にレジオネラ属菌が追加されたため、「県の公衆浴場等におけるレジオネラ症防止対策指導要綱」が策定され、レジオネラ属菌検出時等の対応方法が統一化された。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・調査表は作成しており、それに基づいて実施。</li> <li>・市の感染症対策マニュアルの中にレジオネラ編があり、それに基づき応。施設への指導内容は指導要綱に基づいている。</li> <li>・旅館業、公衆浴場への監視指導票も作成しており、それに基づいて監視</li> </ul>

<p>他部局との連携：水道局、地衛研、等</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・本庁の衛生管理課や感染症対策課、保健所、衛研と連携</li> <li>・衛生研究所と連携している。</li> <li>・高齢者対策をしている部署については、情報提供している</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・衛生研究所との連携あり（保健所は検体採取、指導機関。衛生研究所は検査機関）。</li> <li>・県庁衛生部局、感染症対策課とも連携。</li> </ul>	<p>指導。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・地衛研とは連携はある。検査は衛研のみが実施。</li> </ul>
<p>情報の収集と保持状況：施設の老朽化や図面、立ち入りチェック表（チェックするポイント）、等</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・立ち入り調査表を作成している。</li> <li>・立ち入りの際は、許可申請時の図面を持参し、その内容を確認している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・施設に変更があった場合、事業者は速やかに保健所に変更届を提出することになっている。</li> <li>・立ち入りチェック表は、県保健所統一の様式を有している。</li> <li>・図面は配管図も合わせて入手している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・旅館、公衆浴場、特定建築物は、図面は許可申請時に提出している（図面は永年保管）。保管期間内は関連情報も保有している。各施設でも図面の保管は行っている。</li> </ul>
<p>新型コロナウイルス感染症やその他の肺炎対応との兼ね合い</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・現場の立ち入りを、書面でのやり取りにかえたときもある。</li> <li>・新型コロナウイルスの感染対策を十分に行い、最小限の人数で立ち入りを実施した。</li> <li>・医療機関において、肺炎が疑われた際は、問診で浴場の利用の有無について聞き取りがされている。それを踏まえて、レジオネラ症が疑われる症例については尿中抗原検査を実施している。</li> <li>・休業施設の再開時は、レジオネラ症の発生リスクが高いと考えられるため、厚労省からも通知が出ている。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・コロナ禍以降は、新型コロナウイルス感染症を疑って受診や救急搬送され、レジオネラ症と診断されるケースが多い。</li> <li>・レジオネラ症調査は、医師による診断結果（レジオネラ症発生届）に基づき調査を行うものであり、肺炎症状の相談により行うものではない。</li> <li>・肺炎症状があれば、レジオネラに関する尿中抗原検査は行っている。</li> <li>・レジオネラ症の患者が発生したとき、保健所では感染症予防チームを組織している。</li> <li>・休業の際は、届出が出される。再開時は循環配管の清掃等について指導している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・市の衛生部局では、人員を新型コロナに割いていた。患者調査は、衛生監視員が行っていた場合もある。</li> </ul>
<p>その他、もしあれば今後の目標や課題</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・実地研修の施設の確保。</li> <li>・入浴施設におけるレジオネラ症防止対策について、県としては現在、大きな問題は無いと考えている。一方、過去の事故の経験から時間が経って発生した際の影響の大きさを知らない入浴施設の経営関係者が多くなってきているのが課題かもしれない。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・国的に集団感染と断定された事例も少なく頻度も低いため、レジオネラ症への危機意識は未だ低い。</li> <li>・施設の清掃・消毒方法に欠陥があったり、自主検査を規定の頻度で実施していない施設も多く、どのようにレジオネラ症防止対策のための衛生管理を徹底させるかが課題。</li> <li>・目標：①効率的な監視の実施、②施設の適切な清掃、消毒等の衛生管理の徹底、③環境衛生監視員のレジオネラ症防止対策に対する知識の習得</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・適切な維持管理の方法について、今後も指導していきたい。</li> <li>・レジオネラや水質汚染事故は健康被害に直結するため、対応の優先度は高い。</li> <li>・自主検査で発生が明らかとなった場合は、出来るだけ立入に行く。行かなくても陰性確認は実施している。</li> <li>・旅館、公衆浴場は、水質検査の報告も義務付けしている。</li> </ul>

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）

「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」

研究代表者 泉山信司 国立感染症研究所

令和4年度分担研究報告書

「入浴施設の衛生管理の手引きの改定」

研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学
研究分担者	小坂浩司	国立保健医療科学院
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	水戸智文	北海道保健福祉部
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	大橋美至	神奈川県健康医療局
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	井上花音	岡山県保健福祉部
研究協力者	平塚貴大	広島県衛生研究所
研究協力者	尾崎淳朗	愛媛県保健福祉部
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	尾崎吉純	高知県健康政策部
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	杉本貴之	宮崎県中央保健所
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	オフィス環監未来塾
研究協力者	斉藤利明	株式会社ヤマト
研究協力者	藤井 明	健美薬湯株式会社
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

令和元年度から令和3年度に実施した厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「公衆浴場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」において、入浴施設におけるレジオネラ症の防止のための具体的な衛生指導や衛生管理を紹介することを目的に、入浴施設の衛生管理の手引きを作成した。当該手引きが現場で活用され続けるためには、内容の見直しと新しい設備や管理技術等に関する情報や具体例の追加が必要である。そこで研究班の研究分担者と研究協力者から構成する手引きワーキンググループと複数の自治体の環境衛生部署の担当者をメンバーとする入浴施設の衛生管理の手引き検討会を別々に立ち上げ、手引きの改定の検討を行った。ワーキンググループは研究班の成果を手引きに加えることや手引きの見直しを行うことならびに手引きに追加するQ&Aを検討することを役割として担うこととし、Q&Aに関連して浴槽水の塩素濃度の測定に関する問題点などを協議した。検討会では、手引きの作成時に自治体の環境衛生担当部署から寄せられた手引きの内容に対する要望の中から対応できなかったQ&Aの掲載、監視指導や管理のためのチェックシートならびに記録簿の例示、簡易版の作成について検討することとし、今年度はチェックシートの作成を検討した。

#### A. はじめに

日本においてはレジオネラ症の発生に関連する主な要因は入浴施設とされている。そのため、入浴施設ではレジオネラ属菌の増殖・定着を防ぐための衛生管理を徹底させることが求められており、厚生労働省が発出している「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」（以下管理要領）、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」（以下マニュアル）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」（以下指針）や自治体が定める条例等に従って保健所の監視指導も行われている。

厚生労働省から技術的助言として発出されている上述の管理要領やマニュアルは管理方法等の具体的な記述が少ないため、具体的な内容を提示してほしいといったこと

が保健所等から求められていた。そうした要望を受けて、令和元年度から令和3年度に実施した厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「公衆浴場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」においては、上述の指針や管理要領及びマニュアルによる技術的助言に基づいて行われる入浴施設でのレジオネラ症防止のための具体的な衛生指導や衛生管理を紹介することを目的に、入浴施設の衛生管理の手引き（以下手引き）を作成した。しかし、入浴施設に関連するレジオネラ症あるいは汚染事例の発生や入浴関連設備・管理手法の開発・導入などがあるため、当該手引きの見直しや改定は継続して行う必要がある。そこで本研究班においては、見直しや不足している内容の追加ならびに新たな管理手法の紹介などを行うこととした。

## B. 方法

手引きの内容の見直しと追加などを行うために、ワーキンググループ（以下 WG）と入浴施設の衛生管理の手引き検討会（以下検討会）を立ち上げた。

### 1) WG における検討

WG のメンバーは研究班に所属する研究分担者と研究協力者の一部とした。WG の役割は、手引きの内容の見直しや修正の検討、本研究班で検討している研究のうち手引きに引用することが可能な内容を検討して追加すること及び Q&A の検討などとした。今年度は浴槽水の塩素濃度の測定における問題点を議論した。

### 2) 検討会における検討

検討会のメンバーは、自治体の本庁あるいは保健所の環境衛生部署に所属し、入浴施設の監視指導に当たっている自治体職員とし、入浴施設の現場における監視指導の経験を活かした内容を手引きに盛り込むことを目指した。

複数回の検討会をオンラインで開催し、入浴施設の監視指導の際に利用することが出来るチェックシートや記録簿の作成、簡易版や手引きに追加する Q&A の作成を検討することとした。今年度は手引きにおいて例示するためのチェックシートの作成を中心に検討を行った。

## C. 結果及び考察

### 1) WG における検討

浴槽水の遊離残留塩素濃度及び結合塩素濃度を測定する場合に泉質が様々であり、泉質によっては正確に測定することが困難

である場合や測定結果が正しくない可能性が生じる場合があるといった問題点を指摘した。測定時における異常の発生に関連する Q&A の必要性も議論した。

WG での議論を受けて、塩素濃度の測定に関連した Q&A で想定される質問の作成を試みた。

Q:『営業時に浴槽水に次亜塩素酸ナトリウムを添加して消毒を行っているが、DPD 法で遊離残留塩素濃度を測定すると次のような現象が発生した。こうした現象が起きた場合はどのように解釈して対処すればよいか。』

現象 1：DPD 試薬を加えても全く発色しない。

現象 2：DPD 試薬を加えると一瞬発色するがすぐに透明になる。

現象 3：DPD 試薬を加えて次第に色が濃くなった。

今後前述の Q&A を完成させるとともに、入浴施設の衛生管理を進める際に生じる様々な問題点に関連する Q&A の作成を検討する予定である。

### 2) 検討会における検討

初回の検討会において、手引きの概要ならびに検討会の目的と役割、予定している検討の内容などの説明を行った。続いて検討する内容としてチェックシートの作成から検討することを決め、Q&A については質問とそれに対する回答を検討しながら蓄積していくこととした。

チェックシートは、施設の構造や衛生管理の状況を記録するための調査票（以下調査票 1）と入浴施設の監視指導時に施設の

構造や衛生管理の実施状況が管理要領や各自治体の条例等に適合しているかを確認するための調査票（以下調査票 2）の 2 種類を作成することとし、今年度は調査票 2（構造設備基準、維持管理基準、水質基準）を作成した（別添参照）。項目は設備のリストとし、基準の列には管理要領や条例等の内容を掲載し、その右側の列には基準が管理要領に拠るか条例等に拠るかを記載できるようにした。さらにその右側の列は調査の結果を記録することを想定しているが、調査票を利用する自治体が自由に使えるように空白にした。当報告書には現在継続して検討している調査票 2 案を掲載しているが、今後修正する可能性がある。調査票 1 は調査票 2 が完成した後に検討する予定である。

#### D. まとめ

手引きの内容の見直しと、各自治体から寄せられた要望に対応するためのチェックシートや記録票の作成、Q&A の作成及び縮小版の作成を行うために、WG と検討会を立ち上げて検討を行った。WG では浴槽水の塩素濃度の測定における問題点等を検討し、関連する Q&A の質問の作成を試みた。検討会では入浴施設において保健所が行う監視指導時に利用する調査票（調査票 1 及び調査票 2）の検討を行い、調査票 2 の案を作成した。

#### 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



別添 調査票 2 (維持管理基準) (検討中)

項目		基準	管理要領 / 条例等		
維持 管理 基準	貯湯槽	温度	貯湯槽内の湯水全体の温度を 60℃以上に保つ これにより難しい場合は貯湯槽内の湯水の消毒を行う		
		清掃・消毒	必要に応じて生物膜の状況を監視し、清掃及び消毒を行う		
		管理	破損等の有無や温度計の性能を確認する		
	浴槽水	換水・清掃	毎日換水し、清掃する		
			連日使用型循環浴槽水は 1 週間に 1 回以上完全に換水し、 清掃する		
		消毒	遊離残留塩素濃度を頻繁に測定し、常時 0.4~1.0mg/L に 保つ。モノクロラミンの場合は 3 mg/L 程度を保つ		
	状態	常に満杯状態に保ち清浄に保つ			
	浴槽	1 週間に 1 回以上清掃および消毒を行う			
	水位計	少なくとも週に 1 回、消毒により生物膜を除去する			
	ろ過器	1 週間に 1 回以上逆洗浄する			
	循環配管	1 週間に 1 回以上適切な消毒方法で生物膜を除去する			
	集毛器	毎日清掃及び消毒を行う			
	消毒装置	維持管理を適切に行う			
	調節箱	必要に応じて清掃及び消毒を行う			
	オーバーフロー回収槽	浴用に使用しない			
		浴用に供する場合は回収槽内の水を消毒する			
	気泡発生装置等	適宜清掃、消毒する			
	打たせ湯・シャワー	循環ろ過水及び浴槽水を用いない			
	シャワーヘッド、ホース	1 週間に 1 回以上通水し、1 年に 1 回以上内部を洗浄、消 毒する			
	循環式浴槽の塩素消毒	ろ過器の直前で投入する			
自主管理体制	責任者を置いている				
維持管理の記録	残留塩素の測定、水質検査結果、pH の結果を 3 年間保存 する				
点検表等	管理要領書及び点検記録表により衛生管理を徹底する。結 果は 3 年間保存する				

別添 調査票 2 (水質基準) (検討中)

項目		基準	管理要領 / 条例等		
水質基準	原湯・原水・ 上がり用湯・ 上がり用水 (水道水以外 の水を利用 した場合)	色度	5 度以下		
		濁度	2 度以下		
		pH 値	5.8~8.6		
		有機物	3 mg/L 以下 (TOC)、 10mg/L 以下 (過マンガン酸カリウム消費量)		
		大腸菌	検出されないこと		
		レジオネラ属菌	検出されないこと (10 cfu/100 mL 未満)		
		検査頻度	1 年に 1 回以上		
	浴槽水	濁度	5 度以下		
		有機物	8 mg/L 以下 (TOC)、 25mg/L 以下 (過マンガン酸カリウム消費量)		
		大腸菌群	1 mL 中に 1 個以下		
		レジオネラ属菌	検出されないこと (10 cfu/100 mL 未満)		
		検査頻度	ろ過器を使用していない浴槽水及び毎日完全に換水している浴槽水は、1 年に 1 回以上、連日使用している浴槽水は、1 年に 2 回以上 (ただし、浴槽水の消毒が塩素消毒でない場合には、1 年に 4 回以上)		

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）

「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」

研究代表者 泉山信司 国立感染症研究所

令和4年度分担研究報告書

「レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS®への試験的参加」

- |         |       |                |
|---------|-------|----------------|
| ○ 研究分担者 | 枝川亜希子 | 大阪健康安全基盤研究所    |
| 研究分担者   | 前川純子  | 国立感染症研究所       |
| 研究協力者   | 井上浩章  | アクアス株式会社       |
| 研究協力者   | 縣 邦雄  | アクアス株式会社       |
| 研究協力者   | 杉山順一  | 日本建築衛生管理教育センター |
| 研究協力者   | 安齋博文  | 日本建築衛生管理教育センター |
| 研究協力者   | 小池真生子 | 大阪健康安全基盤研究所    |

浴槽水を対象としたレジオネラ検査結果は、行政指導の根拠となることに加え、日常的な衛生管理を行う上での重要なデータであることから高い精度が求められる。そのため、レジオネラ検査を実施している多くの検査機関は外部精度管理に参加し、自施設の検査精度の確認を行っている。

レジオネラ外部精度管理は、国内外で複数実施されている。国内は1社のみで、前研究班がサポートする形で2015年から実施されているが、この外部精度管理は指定法で行うことが定められており、自施設の日常的に行っている通常の検査方法で参加したいとの要望が強くあった。そこで本研究班では課題の抽出を行うと共に、課題解消の要望を行った。また、外部精度管理の選択肢を示すことを目的に、日本国内から参加可能な海外の外部精度管理について、情報を整理して紹介することとした。そして、その中から英国 FAPAS に試験的参加を行い、国内から問題なく参加できるかを確認した。FAPAS は、参加費支払いなどの事務的な手続き、検査内容、分析レポートの発行まで、全体的に問題なく参加可能であったことから、レジオネラ外部精度管理の選択肢の1つになり得ると考えられた。

#### A. はじめに

浴槽水を対象としたレジオネラ検査は、地方衛生研究所、保健所、民間検査機関を含め多くの機関で実施されている。公衆浴場

等の浴槽水のレジオネラ基準値は、厚生労働省の通知により、培養法で「検出されないこと（10 CFU/100mL 未満）」と定められている。レジオネラ検査結果は、行政指導の根

拠となることに加え、日常的な衛生管理を行う上での重要なデータであることから、高い精度が求められる。

培養法は、試料水の濃縮、レジオネラ以外の微生物類を抑制するための前処理、培地への接種の3工程で実施する。これらの工程にはそれぞれ複数の方法があり、濃縮方法としてろ過濃縮法または遠心濃縮法、前処理として酸処理または熱処理、選択培地はGVPC $\alpha$ 寒天培地またはWYO $\alpha$ 寒天培地などがある。それぞれの工程で選択肢があることは、試料水の水質、検査機関の保有機器類などを考慮して、それぞれに適した検査方法を選択できるという利点がある一方で、これら一連の操作が検査精度に反映されるため、各検査機関での精度にばらつきが出やすい要因の一つとなっている。そのため、各検査機関は外部精度管理に参加し、自施設の検査精度の確認を行っている。

レジオネラ外部精度管理は、海外を含めて複数実施されている。国内は1社のみで、前研究班がサポートする形で2015年から実施されているが、この外部精度管理は指定法で行うことが定められており、自施設の日常的な検査方法で参加したいとの要望が強くあった。そこで本研究班では、現行の国内外外部精度管理について、課題の抽出を行うと共に、実施母体の日水製薬に課題の解消を要望することとした。また、外部精度管理でのばらつきの要因の一つである培地種別による検出菌数の違いについて確認を行った。さらには、外部精度管理の選択肢を示すことを目的に、日本国内から参加可能な海外の外部精度管理について、情報を整理して紹介することとした。そして、その中から英国FAPASに試験的参加を行った。

## B. 方法

### 1) 国内外外部精度管理の課題

日水製薬が実施する「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ（以下、サーベイ）」について、提供された実施概要から指定法や解析方法を確認すると共に、前研究班が参加したこれまでのデータを確認した。

サーベイは指定法で行うため、各工程でのばらつきは大きくないと考えられたが、使用培地の種類は指定されているものの、メーカーの指定はされていない。参加者の多くが生培地を購入して使用しており、主に国内で流通している4社の培地が使用されていた。これら培地種別およびメーカーによる検出菌数の違いを確認するために、配付試料であるバイオボール（令和3年度分）をサーベイの指定通りに生理食塩水に溶解し、それぞれの培地に接種した。選択培地はGVPC $\alpha$ 寒天培地（日水製薬、日研生物、関東化学）、WYO $\alpha$ 寒天培地（栄研化学）、MWY寒天培地（関東化学）、非選択培地はBCYE $\alpha$ 寒天培地（栄研化学、日水製薬、日研生物、関東化学）を使用した。

### 2) 外部精度管理の情報収集

国内の外部精度管理に課題が多いことから、民間検査機関の中には英国UKHSA（UK Health Security Agency）の外部精度管理に参加しているところも多い<sup>1)</sup>。しかし、支払い事務での制約や、英語対応のみであることから、地方衛生研究所等の行政機関や小規模な民間検査機関が参加するのは難しい場合がある。本研究班では、外部精度管理の選択肢を示すことを目指し、今現在、日本から参加可能な外部精度管理の情報収集を行った。

### 3) 英国 FAPAS®レジオネラ外部精度管理プログラムへの参加

国外外部精度管理のうち、国内で代理店が設定されている英国 FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) に試験的参加を行った。FAPAS は、1990 年設立された ISO/IEC 17043 (認証番号 0009) に認定された国際的な技能試験プロバイダーの 1 つである。大きく分けて 4 つのスキームがあり、食品化学検査分野の FAPAS、微生物検査分野の FEPAS、遺伝子組換え食品検査分野の GeMMA、水質検査分野の LEAP がある。これまでに世界 140 カ国以上、4500 以上のラボが参加し、日本では 250 カ所以上のラボが参加しているが、レジオネラ外部精度管理に関しては国内参加実績がない。今回、外部精度管理の内容だけでなく、申込みや参加費支払いなどの事務的な手続きも含めて、国内から問題なく参加できるかを確認した。

令和 4 年 10 月実施された FAPAS レジオネラ外部精度管理 (LG0119) に、国立感染症研究所、大阪健康安全基盤研究所、アクアス株式会社、日本建築衛生管理教育センター、大阪府茨木保健所、大阪府藤井寺保健所、大阪府泉佐野保健所の計 7 機関が参加した。FAPAS は、自施設の方法で非選択培地 (BCYE  $\alpha$  寒天培地) を用いることが指定されているが、選択培地で参加も可能との回答を得た。ただし、その場合は選択培地を用いた参加機関のみで解析を行うとのことであったため、今回は非選択培地でのデータを FAPAS に回答することとし、合わせて選択培地を用いた検査を実施し、結果について解析した。

### C. 結果及び考察

#### 1) 国内外外部精度管理の課題解消へ向けての要望

日水製薬の「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」は、凍結試料 (バイオボール) を生理食塩水で溶解して精度管理用試料を作製し、培養法を実施する。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るため、通常検査で必須な前処理 (酸処理または熱処理) が指定法には含まれない。培地は非選択培地を使うことや、それぞれの工程に方法や容量が指定されており、日常的に行っている通常検査の方法とは相違が見られた。また、これまでに前研究班が実施した 8 年分の報告書やデータを確認したところ、培地 1 枚当たりの菌数が 0 や 1 桁であるものも多く、培地上のコロニー数が 30~300 が望ましいとされている中、菌数設定が少ないと考えられた。

これらのことから、研究班から日水製薬へ、日常的に行っている検査方法で参加可能な外部精度管理への変更を要望した。具体的には、前処理方法や選択培地を用いた検査を指定法に追加し、これまでの方法も同時に行うことで蓄積されたデータも生かせるように配慮した。また、参加者の培地準備の負担が増えないように、全体として必要最低限の培地枚数を提案した。これらについて、対面およびオンラインでの協議を重ねたが、最終的には研究班からの要望には応じられないとの回答があり、令和 4 年度の日水製薬「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」は前年度からほぼ変更なしで実施されることとなった。

培地種別およびメーカーによる検出菌数の違いを確認するために、同一ロットのバ

イオボール 2 個を使用して、指定法に記載の通り滅菌生理食塩水に溶解し、それぞれ培地に接種した。その結果、イオボールおよび培地メーカーの違いで若干の菌数の差が見られたものの（表 1）、Z スコアへの影響は大きくないと考えられた。培地上のコロニーの形状や色調に若干の差が見られたことから、新たにメーカーを変更する場合は、事前にコロニーの発育を確認することが必要である。

## 2) 外部精度管理の情報収集

日本国内から参加可能なレジオネラ検査外部精度管理について、表 2、写真 1 に示す。

## 3) FAPAS<sup>®</sup>レジオネラ外部精度管理

FAPAS の申込みは、代理店であるセントラル科学貿易 (<https://cscjp.co.jp/fera/>) を通じて行った。試料はカテゴリー B の病原体として常温で英国から Fedex で空輸され、受取り後は検査開始まで冷蔵で保存した。小型のプラスチック容器（バイオボトル）の中に試料のガラスバイアル 2 本（試料 A、B）が入っており、ガラスバイアルの底面から 1cm 程度、フリーズドライ様のものが充填されていた（写真 2）。これを指示書通りに滅菌蒸留水で溶解し、外部精度管理用の水試料を作製した。指示書に記載された検査方法は、「ルーチンメソッドで検査すること」のみであった。レジオネラ検査を実施後、検出/不検出、菌数、菌種等を報告した。報告締切後、約 3 週間で分析レポートが返却された。

分析レポートの内容は、全施設の報告結果と Z-スコアである。FAPAS レジオネラ

外部精度管理 (LG0119) には、24 施設が参加し、試料 A は 92%、試料 B は 83% がレジオネラ検出と回答していた。本研究班からの 7 機関はすべて、試料 A、B 共にレジオネラ検出で回答している。分析レポートでは全参加機関が回答した菌数や菌種が示され、Z スコアのグラフから参加機関中での自施設の位置が確認できた。この他に、各施設での検査方法やフィルターや使用培地の種類についての記載もあり、参加者にとって知りたい必要十分な情報が記載されていた。分析レポートは A4、28 ページで発行された（写真 3）。実施者である Fera への申込みから分析レポートに関する問い合わせまで、すべて日本語でセントラル科学貿易を通じて行っており、担当者の対応は丁寧かつ迅速であった。

FAPAS への報告分とは別に、試料 B について、残りの試料を用いて 7 機関で前処理と選択培地を用いた通常のレジオネラ検査を計 23 試験行ったところ、レジオネラ検出が 14 試験（10~100 CFU/100mL）、不検出が 9 試験であった。レジオネラ検出の 14 試験について、Z スコアを算出したところ、Z スコアはすべて 2.0 以下であったもの、試料 B は通常のレジオネラ検査で実施するには若干菌量が少ないと考えられた。FAPAS が指定する前処理なし+非選択培地で行った結果の菌数を 100% とすると、前処理なし+選択培地は 91.1%、酸処理+BCYE  $\alpha$  は 48.0%、熱処理+BCYE  $\alpha$  は 32.0%、酸処理+選択培地は 36.3%、熱処理+選択培地は 27.4% となり、前処理および選択培地を使用することで菌数の減少が見られ、前処理方法別では酸処理より熱処理の方が菌数の減少が大きかった。

今回、試料 A は 5~6Log10 CFU/L の菌量が含まれており、100 倍濃縮で行うルーチンメソッドでは培地 1 枚当たりの菌数が多く、コロニーのカウントが出来ない施設があった。今回はルーチンメソッドである濃縮法のみで行ったが、菌量が多いことも想定して検査方法を追加した方がより正確な菌数を報告できると考えられた。一方、試料 B は 3~4Log10 CFU/L の菌量が含まれており、前処理なし+非選択培地での検査法では培地 1 枚当たりのレジオネラ菌数が適量であったが、同時に行った前処理+選択培地では不検出となったものがあった。今回、日常的に行っている通常の検査方法で参加したいという研究班からの要望に対し、前処理+選択培地を用いた参加機関のみで解析を行うセミオーダー試験の提案があったが、セミオーダー試験で受けていた場合、試料 B については菌数の回答ができず、解析結果が得られない可能性があった。外部精度管理ではより多くの参加機関数で解析した方が偏りは小さいことから、日本国内での参加機関のみ抽出するのではなく、FAPAS の指示通りの検査方法で参加し、全参加機関数で解析した分析レポートをもらった方が有用であると考えられた。

FAPAS レジオネラ外部精度管理の毎回の菌数設定については不明であるが、LG0119 については菌量の違う 2 種の試料が配布され、それぞれの機関のルーチンメソッドで行った結果、FAPAS が設定する設問に回答が可能であった。また、返却された分析レポートの Z スコアからは、全参加者中の位置を確認することができた。また、参加費支払いなどの事務的な手続きを大阪健康安全基盤研究所（支払い等々の経理ルー

ルは大阪府と同じ）で行ったが、特に問題はなかった。全体的に問題なく参加可能であったこと、そして前処理なし+非選択培地との指定があったものの、操作自体は日常的な通常の検査方法と同じで参加可能であったことは、日頃の検査技術を確認したい参加者にとって非常に有用であり、FAPAS はレジオネラ外部精度管理の選択肢の 1 つになり得ると考えられた。今回、通常の検査方法で参加したいという研究班からの要望に対し、実施者である Fera から事前にそれに応える提案があったことや、その他の問い合わせに対しても丁寧な回答があったことは好印象であった。今後、日本国内での参加者が増えた際には、日本の参加機関からの様々な要望に引き続き対応してくれることを期待したい。

#### D. まとめ

現行の国内外外部精度管理について、課題の抽出を行うと共に、課題の解消を実施者に要望した。外部精度管理の選択肢を示すことを目的に、日本国内から参加可能な外部精度管理について、情報を整理して紹介した。そして、その中から英国 FAPAS に試験的参加を行った。FAPAS はレジオネラ外部精度管理の選択肢の 1 つになり得ると考えられた。

#### E. 引用文献

1) 井上浩章、抗レジオネラ用空調水処理剤協議会の取り組みと冷却水系のレジオネラ属菌対策、ビルと環境、No.161、pp.43-50、2018

#### 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

H. 謝辞

FAPAS 外部精度管理の参加について、大阪府健康医療部健康医療総務課ならびに大阪府茨木保健所・藤井寺保健所・泉佐野保健所の検査課にご協力いただきました。

表 1. 培地種別およびメーカーの違いによる検出菌数

	Bioball ①	Bioball ②
WYO $\alpha$ 寒天培地 (栄研化学)	20	31
GVPC $\alpha$ 寒天培地 (日水製薬)	16	44
GVPC $\alpha$ 寒天培地 (日研生物)	16	32
GVPC $\alpha$ 寒天培地 (関東化学)	24	40
MWY 寒天培地 (関東化学)	21	56
BCYE $\alpha$ 寒天培地 (栄研化学)	46	52
BCYE $\alpha$ 寒天培地 (日水製薬)	25	50
BCYE $\alpha$ 寒天培地 (日研生物)	46	62
BCYE $\alpha$ 寒天培地 (関東化学)	48	65

Bioball ①と②は、同一ロット

菌数は、培地 5 枚に接種した平均値 (CFU/plate)

培地名称は、一般名を記載 (商品名ではない)。

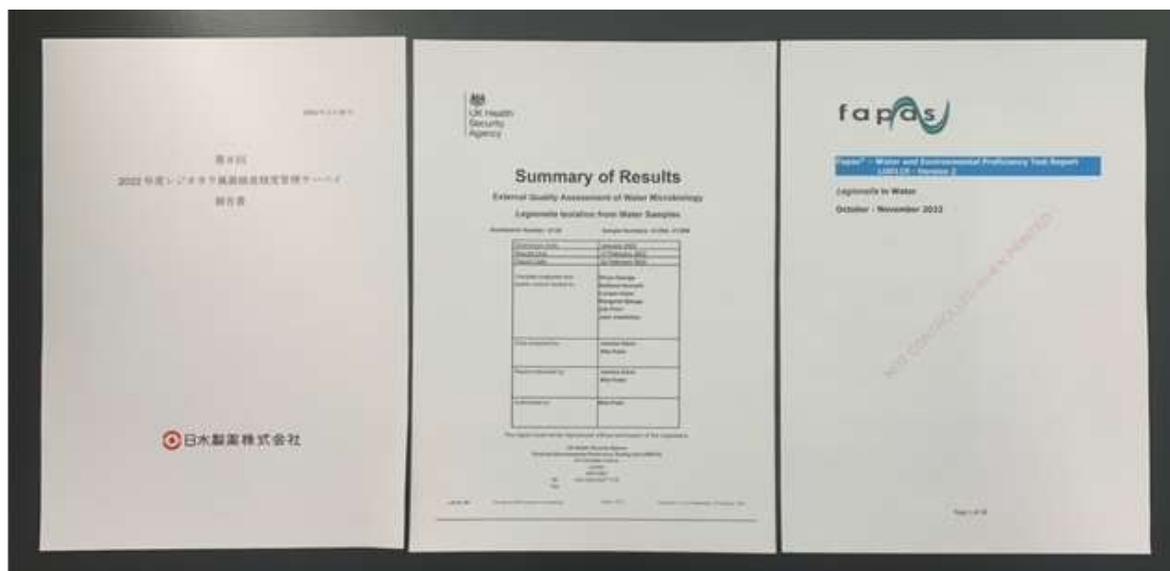


写真 1. 日本国内から参加可能なレジオネラ検査外部精度管理の分析レポート  
 左からレジオネラ属菌検査精度管理サーベイ、UKHSA による外部精度管理 (資料提供：  
 アクアス株式会社井上浩章氏)、FAPAS

表 2. 日本国内から参加可能なレジオネラ検査外部精度管理

名称	レジオネラ属菌 検査精度管理サーベイ	External Quality Assessment of Water Microbiology <i>Legionella</i> Isolation from Water Samples	FAPAS <sup>®</sup> (Food Analysis Performance Assessment Scheme)
実施者	日水製薬株式会社	UKHSA (UK Health Security Agency) 英国健康安全保障庁	Fera (The Food and Environment Research Agency) 独立行政法人英国食料環境研究 庁(英国環境食料農村地域省傘下)
国	日本	英国	英国
日本からの参加実績	あり	あり	なし
参加費 (1回あたり)	38500 円 (消費税込)	172 ポンド (2022 年度) (約 30000 円)	52800 円 (消費税込)
年間実施回数	1	4	4
参加者数	約 180	114~173 (1回あたり)	20 程度 (1回あたり)
国内代理店の有無	—	なし	あり (セントラル科学貿易)
日本語サポート	—	なし	あり
配付試料の輸送	冷凍	常温	常温
検査実施までの保管	冷凍	冷凍	冷蔵
1回あたりの 配付試料数	1	2	2
配布試料中のレジオネ ラ以外の細菌の混合	なし	あり	なし
いずれかの配布試料中 にレジオネラが含まれ ない可能性	なし	あり	あり
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種	<i>Legionella pneumophila</i> のみ	複数種	複数種
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種数	1 種	1~2 種	1~2 種
配布試料の形状	BioBall フリーズドライ	Lenticule Disc ゼラチン状のディスク	Lyophilized sample フリーズドライ様
検査方法	指定法	自施設の方法	自施設の方法 非選択培地を用いる (選択培地で参加も可)
検査結果の報告	菌数	菌数 菌種 (血清群)	菌数 菌種 (血清群)
解析方法	Z スコア	Z スコア	Z スコア
分析レポートの ページ数	23	10	28

この他に、米国 CDC の ELITE (The Environmental Legionella Isolation Techniques Evaluation) があるが、日本から参加可能かは不明である。



写真 2. FAPAS レジオネラ外部精度管理の配付試料

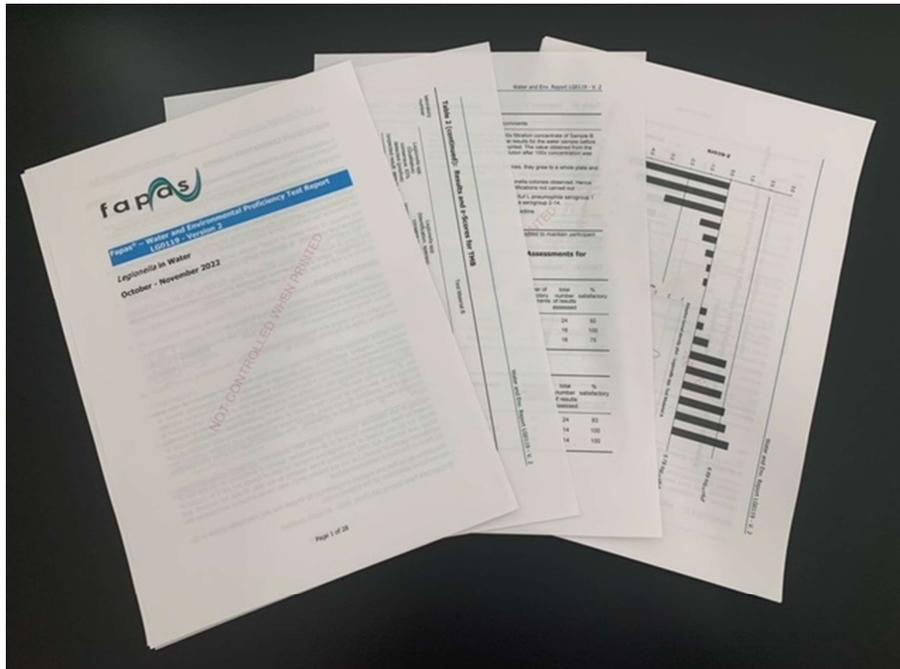


写真 3. FAPAS レジオネラ外部精度管理分析レポート

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

令和4年度 分担研究報告書

「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」

レジオネラ属菌の新規検査法の検討

研究分担者	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所
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	山口友美	宮城県保健環境センター
研究協力者	梅津萌子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	高久靖弘	東京都健康安全研究センター
研究協力者	西里恵美莉	川崎市健康安全研究所
研究協力者	吉田裕一	川崎市健康安全研究所

研究要旨

操作が容易で利便性が高いと期待されるレジオラート/QT法は、浴槽水等の実検体で偽陽性が経験されており、対策として前処理の酸処理の有効性について検討した。浴槽水等 90 検体から、前処理なし、酸処理 5 分、酸処理 10 分の 3 通りでレジオラート/QT 法の測定を行い、平板培養法と比較した。レジオラート/QT 法の感度及び検出菌量は酸処理の反応時間に従って低下する傾向にあったが、従来の平板培養法であってもそうしたものであり、特に問題とはならなかった。未処理で 50 MPN/100mL 以上に着目すると、13 検体中の 12 検体は酸処理 5 分と 10 分であっても陽性と判定された。残り 13 検体中の 1 検体は酸処理により、レジオネラではない偽陽性を抑制できていた。例数が少ないかもしれないが、レジオラート/QT 法の前処理として、酸処理 5 分が有効であった。

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。本研究班では平成 31 年度からレジオラート/QT 法の感度・特異度及び定量性を確認するため、従来法である平板培養法と比較検討してきたが、非常に稀ではあるものの一部検体において交雑菌による偽陽性が確認されていた。そこで、本研究では検体の培養前に酸処理を加えた改良したプロトコールにおける有効性を確認するため、実検体を使用した前処理の実施条

件を比較検討した。

## B. 研究方法

各地方衛生研究所に搬入された公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 90 検体を対象とした。レジオラート/QT 法（未処理）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。

上記プロトコールに追加する酸処理の工程として、検体 10 mL に対し、あらかじめ滅菌水 10 mL で溶解した×20 前処理剤 (IDEXX Pre-treatment reagent) を 0.5 mL 加え前処理を 5 分又は 10 分実施した後、15% KOH を 0.3 mL 加え、中和処理した。レジオラートの粉末を 90 mL の滅菌水で溶解し、検体全量を加えよく攪拌した後、Quantitray/legiolert に封入し 37°C で 7 日間培養した。

同時に平板培養法にてレジオネラ属菌の分離を実施した。平板培養法は「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法（薬生衛発 0919 第 1 号）」に準じた各検査施設の方法で実施し、ろ過濃縮法にてレジオネラ属菌の分離を行い、システイン要求性又は免疫血清により検出菌の同定及び検出菌量を算出し、10 CFU/100mL 以上を陽性とした。

各処理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。

遺伝子検出法は LAMP 法によりレジオネラ属菌の遺伝子検出を行った。

## C. 結果

3 施設に搬入された計 90 検体について各法で比較検討した。まず、レジオラート/QT 法（未処理）と平板培養法を比較したところ、ともに陽性であったものが 25 検体、ともに陰性であったものが 59 検体であった（表 1）。平板培養法と比較したレジオラート/QT 法の感度は 86.2%、特異度は 96.7% であり、結果一致率は 93.3% であった。酸処理 5 分及び 10 分ではともに 21 検体が陽性となり、平板培養法と比較した特異度はともに 98.4% と変わらなかったものの、感度は 69.0%、66.7% と低下する傾向が確認された（表 2 及び表 3）。

1 検体において、レジオラート/QT 法（未処理）でレジオネラ属菌が 4096 MPN/100mL 検出されたが、酸処理 5 分、10 分ともに陰性となった。平板培養法では 190 CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出されており、検出菌種は *L. thermalis* 及び *L. nagasakiensis* であった（表 4）。

レジオラート/QT 法（未処理）で検出されたもののレジオラート/QT 法（酸処理 5 分）で検出されなかった検体は 8 検体であり、上記 1 検体を除いて 11 から 39 MPN/100mL であった（表 4）。レジオラート/QT 法（未処理）で検出されたもののレジオラート/QT 法（酸処理 10 分）で検出されなかった検体は 8 検体であり、このうち、3 検体は酸処理 5 分では検出されたものの酸処理 10 分では検出されなかった。レジオラート/QT 法（未処理）において 50 MPN/100mL 以上の検出菌量であった 13 検体中上記の *L. thermalis* 及び *L. nagasakiensis* が検出された 1 検体を除く 12 検体においては、酸処理 5 分及び酸

処理 10 分ともに全ての検体で陽性と判定された。

平板培養法でレジオネラ属菌が検出された 29 検体のうち、LAMP 法を実施した 24 検体中 22 検体で陽性となった。陰性であった 2 検体の平板培養法の検出菌量はともに 10 CFU/100mL であった。レジオラート/QT 法では 1 検体は未処理、酸処理 5 分で陽性で、酸処理 10 分で陰性となり、もう 1 検体は未処理、酸処理 5 分で陰性、酸処理 10 分で陽性となった。

レジオラート/QT 法の 3 法すべてで陽性であった 16 検体について酸処理による検出菌量の変化を検討した。16 検体中 9 検体において酸処理 5 分で検出菌量が低下し、酸処理 10 分では 13 検体で検出菌量が低下した。酸処理 5 分と 10 分を比較すると 12 検体で検出菌量が減少していた (図 1)。

#### D. 考察

実検体におけるレジオラート/QT 法の有効性を検討したところ、平板培養法の結果一致率は 93.3 % と高い一致率を示した。過去の検討と同等程度であり、改めてレジオラート/QT 法の有用性が示された。酸処理を追加することにより、未処理と比較して感度の低下が確認された。検出菌量の比較においても、酸処理により検出菌量の低下が確認されており、酸処理 10 分においては酸処理 5 分よりもさらに検出菌量の低下が確認された。また、1 検体においては未処理では検出されたものの酸処理 5 分及び 10 分では陰性であったことから、未処理の陽性反応は偽陽性であったことが推察され、酸処理の前処理法が有効であった事例となった。レジオラート/QT 法は *L. pneumophila* を

特異的に検出するキットであるため、当該検体において平板培養法で検出された *L. thermalis* 及び *L. nagasakiensis* といった菌種には反応しないと考えられた。酸処理の反応時間については、1 検体ではあるが偽陽性を検知できたこと、酸処理 5 分に比べ酸処理 10 分の方がレジオネラの検出菌量が低下傾向にあったことから、本検討においては 5 分が適切であると考えられた。一方で、50 MPN/100mL 以上の比較的多いレジオネラ属菌が含まれると考えられる検体においては、酸処理 10 分でも全ての検体で陽性と判定できたことから、酸処理 10 分も有用であると考えられ、検体の特性をあらかじめ考慮し交雑菌の菌量を推定した上で、酸処理時間を設定する必要があると思われる。本検討で実施した検体数は 90 検体であり、陽性検体数は平板培養法及びレジオラート/QT 法ともに陽性であった検体は 25 検体のみであること、平板培養法で陽性であった 29 検体中 10 検体が検出限界値の 10 CFU/100mL であり、遺伝子検査法においても結果が不一致であるなど、非常に低い菌量の検体を対象としていることを留意する必要がある。酸処理の有用性を明らかにするにはさらなる検討数の積み重ねが必要であると考えられた。

#### E. 総括

レジオラート/QT 法における前処理法として本検討においては酸処理 5 分が適切であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 レジオラート/QT法（未処理）と平板培養法のレジオネラ属菌検出検体数

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート/QT法 (未処理)	陽性	25	2	27
	陰性	4	59	63
計		29	61	90

表2 レジオラート/QT法（酸処理5分）と平板培養法のレジオネラ属菌検出検体数

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート/QT法 (酸5分)	陽性	20	1	21
	陰性	9	60	69
計		29	61	90

表3 レジオラート/QT法（酸処理10分）と平板培養法のレジオネラ属菌検出検体数

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート/QT法 (酸10分)	陽性	18	3	21
	陰性	11	58	69
計		29	61	90

表4 レジオラート/QT法（未処理）で陽性であった検体の結果一覧（n=27）

No.	レジオラート/QT法			平板培養法	検出菌種	LAMP法
	未処理	酸処理5分	酸処理10分			
1	10	0	0	30	Lp SG5, 6	+
2	10	11	11	10	Lp SG6	+
3	11	0	11	<10	-	+
4	11	0	23	10	Lp SG6	+
5	11	0	0	10	Lp SGUT	+
6	22	22	11	20	Lp SG6	+
7	22	32	0	10	Lp SG5	-
8	22	0	11	50	Lp SG1, 6	+
9	23	23	11	40	Lp SGUT	+
10	23	10	0	70	Lp SG1	+
11	39	0	0	10	Lp SG1	+
12	39	0	0	10	Lp SG5	+
13	39	11	52	10	Lp SG5, 10	+
14	43	11	0	10	Lp SG5, 6	NT
15	52	58	47	<10	-	+
16	65	84	39	210	Lp SG1, 5, 6, 9	NT
17	124	22	22	50	Lp SG3	+
18	146	74	79	180	Lp SG1	+
19	223	146	124	100	Lp SG2, Lsp	+
20	246	155	123	160	Lp SG5	+
21	264	84	39	180	Lp SG6	+
22	361	74	52	330	Lp SG3, 4	+
23	416	474	361	400	Lp SG6, 7	+
24	474	223	146	580	Lp SG1, 3, 5, 9	NT
25	642	854	659	2600	Lp SG4	+
26	921	361	219	700	Lp SG6, SGUT	+
27	4096	0	0	190	<i>L. thermalis</i> , <i>L. Nagasakiensis</i>	NT

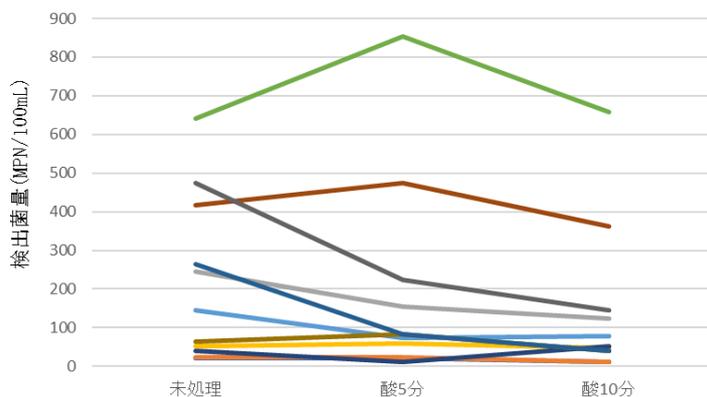


図1 同一検体ごとのレジオラート/QT法における各処理の検出菌量（n=16）

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4年度 分担研究報告書

「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」

浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

研究分担者 淀谷雄亮 川崎市健康安全研究所

研究協力者 西里恵美莉 川崎市健康安全研究所

研究協力者 吉田裕一 川崎市健康安全研究所

#### 研究要旨

施設におけるレジオネラ属菌の定着状況を把握することを目的として、SBT (Sequence based typing) 法、MLVA (MultiLocus Variable-number tandem-repeat Analysis) 法及びSNV (Single Nucleotide Variant) 解析を用いた分子疫学解析を実施した。対象 18 施設中の 16 施設において、施設内で同一の (SBT による) ST 及び MLVA 型の菌が 11 か月以上の期間に複数回検出され、同一の菌が定着していると示唆された。ST 及び MLVA 型では施設ごとに異なる型が多かったが、同一と判定される株も存在し、解像度の不足する場合があった。これが SNV 解析では、異なる施設の同一 ST 及び MLVA 型であった株でも、由来施設ごとに分類可能であり、解像度が高かった。同一施設の SNV 数は、施設事例ごとに SNV 数に大きな差がみられた。一部施設は複数の ST、MLVA や SNV のタイプが混在していた。

#### A. 研究目的

公衆浴場法等により浴槽水等からレジオネラ属菌が検出されないことと定められており、年 1 回以上の検査が求められている。レジオネラ属菌が検出された場合、通常、施設では清掃消毒等が行われ、洗浄後に再度検査を実施し、レジオネラ属菌の陰性が確認されている。しかしながら、陰性確認後も継続的に同じ血清群が検出される施設が散見されており、菌が定着していることが疑われている。これらの継続的に検出される菌について各種分子疫学解析法を実施し、

分離菌株の相同性を明らかにし、施設でのレジオネラ属菌の定着状況を把握することを目的として検討を行った。

#### B. 研究方法

2017 年 4 月から 2022 年 3 月までの 5 年間に当所に搬入された検体のうち、同一施設で異なる時期に採取された検体から同一の血清群が検出されたレジオネラ属菌を対象とした。すなわち、18 施設から分離された *Legionella pneumophila* の保存株 99 株を対象とし、検体採取年月と血清群について

て抽出した。99 株について病原体検出マニュアルを参考に Sequence-Based Typing (SBT)法を実施し、Sequence Type (ST)を決定した。同様に、Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)法を実施し、各領域のリピート数を算出した。また、血清群 1 の 19 株について iseq100 を用いて全ゲノム解析を実施し、Philadelphia1 (NC\_002942)を参照株として bionumerics を用いて Single Nucleotide Variants (SNV)解析を行い株間の SNV 数を算出し、菌株間の相同性を検討した。

### C. 結果

本調査対象の 18 施設のうち、最も多く分離された血清群は血清群 1 の 9 施設であり、次いで血清群 5 及び血清群 6 が各 5 施設であった（重複を含む）。血清群 1 の 28 株について SBT 法により ST を決定し、MLVA 型ごとに minimum spanning tree で示した（図 1）。9 施設中 6 施設で同一の ST が複数回検出されたが、3 施設においては分離株ごとに異なる ST であった。同一 ST であった 6 施設の株については MLVA 法においても同一若しくは 1 領域違いの MLVA 型となった。ST が一致しない株は MLVA 法においても異なる MLVA 型を示した。一方で、異なる施設から同一の ST (ST1、ST128 及び ST552) が検出され、これらはそれぞれ MLVA 型においても一致若しくは 1 領域違いであった。

血清群 1 以外の血清群が検出されていた 15 施設中 14 施設で同一の ST が複数回検出された（図 2）。同一施設において複数の ST が複数回検出された施設もあった。同一の ST 株の MLVA 型はおおむね同一若しくは 1 領域違いであったが、血清群 5 及び 6 につ

いて SBT 法では異なる ST であったのに対し、MLVA 型は同一になる株が確認された。

同一施設において複数回同一の ST が検出された事例の検体採取年月を示した（表 1）。施設 K 及び施設 L は同一の年月のみに同一 ST が検出されていたが、他の 16 施設については 11 か月から 4 年 2 か月の間隔で同一 ST が検出されていた。

血清群 1 のうち ST が一致するなどした 19 株について全ゲノム解析を実施し SNV 数を算出し minimum spanning tree で示した（図 3）。SNV 解析では ST ごとに分類され、同一 ST が分離されていた株についても分離由来施設ごとに分離することが可能であった。同一施設から分離された株間の SNV 数は 0 のものから最大 55 と施設ごとに大きく異なっていた。特に ST552 が分離されていた施設 E の 4 株については分離年ごとに異なり、多様な株が検出されていた。

### D. 考察

本研究において SBT 法及び MLVA 法の解析の結果、本調査対象の 18 施設すべてで同一の ST 及び MLVA 型の菌が複数回検出されていた。このうち、18 施設中 16 施設については 11 か月以上の期間において同一の菌が施設内に定着していることが示唆された。一方で、同一の血清群が検出されていたが、異なる ST もしくは MLVA 型であったケースもあった。ST 及び MLVA 型では施設ごとに異なる型となる事例が多かったが、異なる施設から分離された株について ST 及び MLVA 型ともに同一であると判定される株も存在した。SNV 解析では異なる施設由来の同一 ST 及び MLVA 型であった株も由来施設ごとに分類可能であった。

SBT 法及び MLVA 法はともに感染源調査等で有用な方法である一方で、異なる施設由来であっても同一の ST/MLVA 型となることがあり、感染源調査の際には注意が必要であると考えられた。そのため、検出頻度の高い ST/MLVA 型についてはよく把握しておく必要があると推察された。また、同一施設で分離された株の SNV 数については施設事例ごとに SNV 数に大きな差がみられた。一部施設については施設内で複数の SNV タイプの株が混在している可能性が示唆された。

#### E. 総括

本検討により一部施設においてレジオネラ属菌が定着していることが確認され、よ

り効果的な監視指導が必要であると考えられる。また、検出頻度の高い ST については、状況に応じて、より詳細な解析が可能である SNV 解析を実施する必要があると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

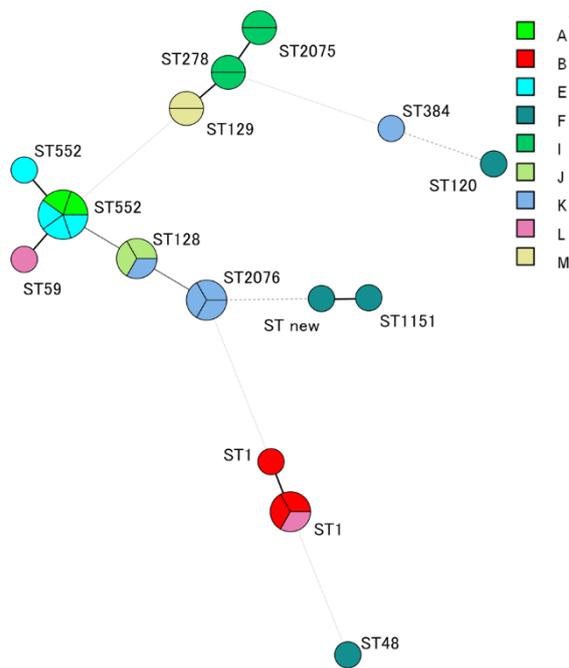


図1 SG1 株の MLVA 型ごとの MST 数値は ST、色は分離由来施設を示す。ST new は ST 番号が付与されていない allele の組み合わせであったものを示す。

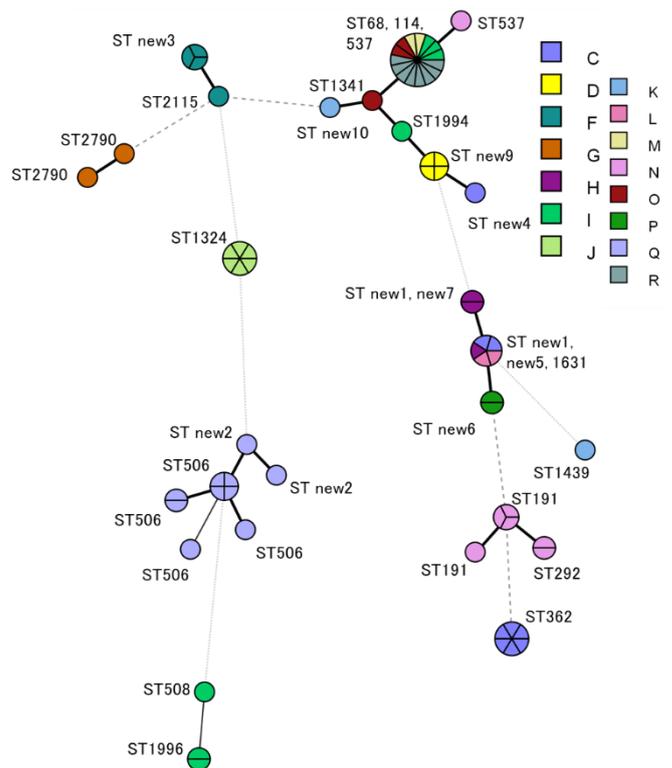


図2 Non-SG1 の MLVA 型ごとの MST 数値は ST、色は分離由来施設を示す。ST new は ST 番号が付与されていない allele の組み合わせであったものを示す。

施設	血清群	ST	株数	検体採取年月				
				2018/10	2020/2			
A	SG1	552	2	2018/10	2020/2			
B	SG1	1	3	2017/11*	2018/10			
C	SG5	new5	2	2018/3	2018/4			
	SG12	362	6	2018/3*	2018/4	2020/2*	2021/12	
D	SG4	new9	2	2020/2	2021/7			
	SG10	new9	2	2020/2	2021/7			
E	SG1	552	4	2017/8	2018/7	2020/7	2021/10	
F	UT	new3	3	2018/2*	2019/2			
G	SG5	2790	2	2017/7	2020/7			
H	SG5	new1	2	2017/8	2021/7			
I	SG1	278	2	2019/2	2021/11			
	SG1	2075	2	2018/3	2021/11			
	SG3	1996	2	2018/3	2019/2			
	SG6	537	2	2018/3	2021/11			
J	SG1	128	2	2017/8	2021/6			
	SG8	1324	6	2017/8	2019/12*	2021/6*	2021/7	
K	SG1	2076	3	2020/11*				
L	SG5	1631	2	2021/6*				
M	SG1	129	2	2020/11	2021/12			
	SG6	114	2	2019/11	2021/12			
N	SG6	191	4	2018/2	2018/3	2020/2*		
	SG6	292	2	2018/2	2019/2			
O	SG6	68	2	2019/1	2019/12			
P	SG5	new6	2	2019/1	2019/12			
Q	SG3	506	8	2017/7	2019/12*	2021/2	2021/7*	2021/8
	SG8	new2	2	2017/12	2019/12			
R	SG6	68	8	2017/8	2018/8	2019/8*	2020/2	2020/8

表1 同一施設で複数回同一のSTが検出された検体採取年月一覧  
ST newはST番号が付与されていないalleleの組み合わせであったものを示す。

\* 表記STが同年月に複数の検体から分離されたことを示す。

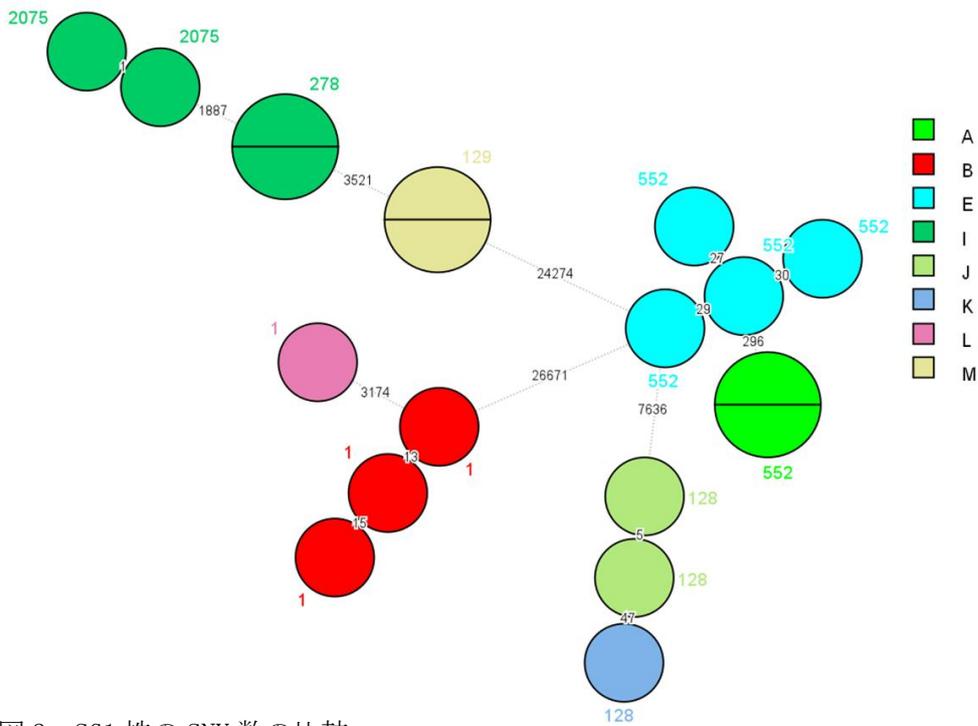


図3 SG1株のSNV数の比較

円の数値はSTを示す。枝間の数値はSNV数を示す。

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）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部

### 分担研究報告書

#### *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良

研究分担者	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	小松頌子	神戸市健康科学研究所 感染症部
研究協力者	田中 忍	神戸市健康科学研究所 感染症部
研究協力者	森中りえか	(株) ファスマック 遺伝子検査事業部

研究要旨： 従来の免疫凝集法では血清群の判定が不能だった *Legionella pneumophila* の菌株について、新しく開発した multiplex-PCR 法とその改良により、血清群の型別を可能にした。本法を用いると判定不能とならず、いずれかの血清群に型別できた。本法の改良では、プライマーの修正と追加により、血清群 13 と 14 の型別能力が向上した。従来の免疫凝集法では、必要な菌体量の確保に培養の日数を要したが、PCR を用いた本法では、ごく少量の菌で実施が可能となった。判定不能を解決した際に、免疫凝集法の前処理における問題点を指摘した。本法は判定までの日数が短く、感染源の特定に有用と期待できる。

#### A. 研究目的

レジオネラ症の主要な起因菌である *L. pneumophila* は、15 の血清群（Serogroup、以下 SG と略）が知られている。レジオネラ症患者の感染源を特定するには、患者から菌株を分離し、感染源が疑われる入浴施設などからの環境分離株をスクリーニングし、血清群が一致した菌株について、遺伝子解析を行い、その同一性を確認する。従来行われてきた免疫血清を用いた凝集反応による血清群別は、菌体の量を必要とし、培養による菌体の調製に日数がかかるといった欠点があった。また、いずれの免疫血清とも反応せず、群別できない菌株の存在も問題となっていた。

レジオネラ症の診断の 95% は、尿中抗原の検出によって行われている<sup>1)</sup>。従来の尿中抗原検出キットは、起因菌が *L. pneumophila* SG1 の場合のみ陽性となったが、2019 年より他の血清群の場合も診断可能な尿中抗原キットが販売され、使用率が伸びている<sup>2)</sup>。そうした背景か

ら、従来は SG1 の群別が主であったところを、2 から 15 の群別の必要性が高まりつつある。一方で、できれば培養の時間をかけず少量の菌体から血清群を型別できる方が、感染源の特定には有利である。

そこで当該研究では、血清群別を微量な試料から行うことの出来る、multiplex-PCR (M-PCR) 法を開発<sup>3)</sup>した。本法は 2 段階から成り、1 段階目の PCR で、SG の 1、2、3/15、5、6/12、7、8、9、11、13 の判定ができる（3 と 15、6 と 12 は区別することができない）。いずれの血清群のバンドも得られなかった場合は、SG4/10/14 プライマーを用いた 2 段階目の PCR を行い、バンドを確認する（バンドが得られた場合、SG4 か 10 か 14 のいずれかである）。供試菌株が *L. pneumophila* である場合には、1 段階目か 2 段階目で血清群に特異的なバンドを確認できる。本研究において、M-PCR を用いて、免疫血清では群別不能だった菌株の型別を行った。さらに SG13 と 14 の検出を改良し、その

後にレジオネラレファレンスセンターを通じて普及を進めた。

## B. 研究方法

### 1. 使用菌株

2016年から2020年に神戸市内の浴場水から分離された *L. pneumophila* 220株の内、レジオネラ免疫血清「生研」（デンカ株式会社）を用いて判定不能のSGUTとされた *L. pneumophila* 41株を使用した。基準として、日本国内で分離された、SG1から15の15株を使用した（レジオネラ免疫血清「生研」による判定）。この15株については、SG1は長崎大学から分与された臨床分離株、SG2から15は東京都予防医学協会から分与された環境分離株である。

### 2. 実験方法

M-PCR法によるSGg (SG-genotypes)の決定は、中植らの方法<sup>3)</sup>にしたがった。混合DNAの作製には、DNA Blood & Tissue Kit (QIAGEN)で抽出した精製DNAを用いた。

(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った。利益相反委員会の指導・管理に従って、研究協力関係にある企業等について、研究班内で情報共有を行った。開示すべき企業からの経済的利益は受けていない。

## C. 研究結果

### 1. レジオネラ免疫血清において判定不能だった41株のM-PCRによる型別

レジオネラ免疫血清において判定不能のSGUTとされた41株(18.6%)に対して、M-PCRを適用してSGg (SG-genotypes)を決定した。24株(58.5%)がSGg4/10/14、7株(17.1%)がSGg1、3株(7.3%)がSGg5、3株(7.3%)がSGg6/12、3株(7.3%)がSGg8、1株(2.4%)がSGg7に血清群別された(図1)。すなわち、41株全部がいずれかの血清群に定まり、不明がなかった。

临床上重要なSGg1について、レジオネラ免疫血清による型別を再度検討したところ、前処

理の加熱処理の有無により結果が変化することが判明した。SGg1と判定されたSGUT株について、生菌を用いた免疫凝集反応(Oxoid レジオネラ・ラテックステスト(関東化学))を実施すると、すべてSG1となり、M-PCRの結果と一致した。

### 2. プロトコールの改良

#### (1) SG14プライマーの設定

中植ら<sup>3)</sup>が登録したSG14の塩基配列(accession no. LC586140)において、*lpg0745*遺伝子から743 kb下流にSG14特異的な遺伝子が存在したため、その遺伝子を検出するプライマーを設定した。このPCRによりSGg14も群別が可能となった。

なお、先のSGUTからSGg4/10/14と型別できた24株にSGg14は含まれておらず、すべてSGg4/10と判定された。

#### (2) SG13プライマーの改良

後述する混合DNAを用いたポジティブコントロールの作製にあたり、SGg13のバンドが弱くなる現象が認められた。ATCC 43736の配列(accession no. FR747827)に基づく従来のSG13プライマーには、日本のSG13(accession no. LC586138)<sup>3)</sup>で多く見られる置換変異との mismatchesが存在したことから、混合塩基から成るプライマーに改良した。

#### (3) 混合DNAを用いたポジティブコントロールの用意

SGの8、1、3/15、2、6/12、14の精製DNAの同量混合物(セット1)、およびSGの5、11、13、9、7の精製DNAの同量混合物(セット2)、の2セットの混合物を用意した。これを鋳型として1段階目のM-PCRを行うと、それぞれに対応するバンドが得られ、陽性コントロールかつサイズマーカーとなることが確認できた(図2)。

以上により改良したプロトコール(別添1)をレジオネラ・レファレンスセンターを通じて地方衛生研究所に配布した。

## D. 考察

免疫血清では判定不能であった 41 株を 6 種類の SGg に分けることができた。本法を用いると判定不能とならず、いずれかの SGg に型別できるので、疫学調査において有用な型別法であると考えられる。また、従来の免疫凝集法を行うのに必要な菌体を確保するための培養には日数がかかるが、PCR を用いた本法は、ごく少量の菌数で施行することができるので、判定までの日数が短くなる。感染源特定の際の時間の短縮が期待できる。血清凝集反応の交叉反応を避ける前処理として加熱処理を行われることがあり、菌株によってはこの加熱処理により本来の免疫原性が失われると判明したが、M-PCR 法ではそのような特別な検討を必要としない。

本法で得られた増幅産物は、アガロースゲル電気泳動で数 10 bp 違いのバンドとして出現するが、市販の 100 bp ラダー DNA マーカーと一緒に泳動しただけでは、バンドサイズの判断に苦慮することもある。今回開発した混合 DNA を用いたポジティブコントロールを用いることにより、バンドサイズの判定を容易にすることができた。

#### E. 結論

従来の免疫凝集法で判別不能だった *Legionella pneumophila* の菌株が、新しく開発した M-PCR 法により、型別できるようになった。SG13 と SG14 の型別能力を向上させる改良を加えた。バンドサイズの判定を容易にするポジティブコントロールを用意した。配布用プロトコールを作成した。

#### F. 参考文献

- 1) 国立感染症研究所 感染症疫学センター. レジオネラ症の届出状況、2011 年第 1 週～2021 年第 35 週.  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/legionella-m/legionella-idwrs/10791-legionella-20211201.html>
  - 2) Kinjo T, Ito A, Ishii M, Komiya K, Yamasue M, Yamaguchi T, Imamura Y, Iwanaga N, Tateda K, Kawakami K. National survey of physicians in Japan regarding their use of diagnostic tests for legionellosis. *J. Infect. Chemother.* 28:129. 2022.
  - 3) 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.
- #### G. 研究発表
1. 論文発表
    - 1) Komatsu S, Tanaka S, Nakanishi N. Evaluation of *Legionella pneumophila* SGUT Serotypes Isolated from Bath Water Using a Multiplex-PCR Serotyping Assay. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 76, 77-79, 2023.
  2. 学会発表
    - 1) Nakaue R, Morita M, Murai M, Amemura-Maekawa J. PCR serotyping of *Legionella pneumophila* based on the diversity of LPS biosynthetic loci. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
    - 2) Amemura-Maekawa J, Harada N, Murai M, Morita M, Akeda Y. Evaluating *Legionella pneumophila* NaCl-resistant mutant virulence using *Galleria mellonella* model. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
    - 3) 前川純子：レジオネラ属菌検査法の現状と今後の展望. 第 34 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会. 2023 年 2 月. 横浜市.
    - 4) 前川純子、森中りえか、明田幸宏：

*Legionella pneumophila* 血清型別マルチプレックス PCR 法の改良. 第 96 回日本細菌学会総会. 2023 年 3 月. 姫路市.

3. 研修会

- 1) 前川純子：レジオネラ対策、専門課程 I 保健福祉行政管理分野分割前期・専門課程 III 地域保健福祉専攻科、2022 年 5 月、Web 対応.
- 2) 前川純子：レジオネラ属菌の検査と対策、

令和 4 年度 短期研修 環境衛生監視指導研修、2022 年 11 月、Web 対応.

- 3) 前川純子：レジオネラ. 令和 4 年度 希少感染症診断技術研修会、2023 年 2 月、Web 対応.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

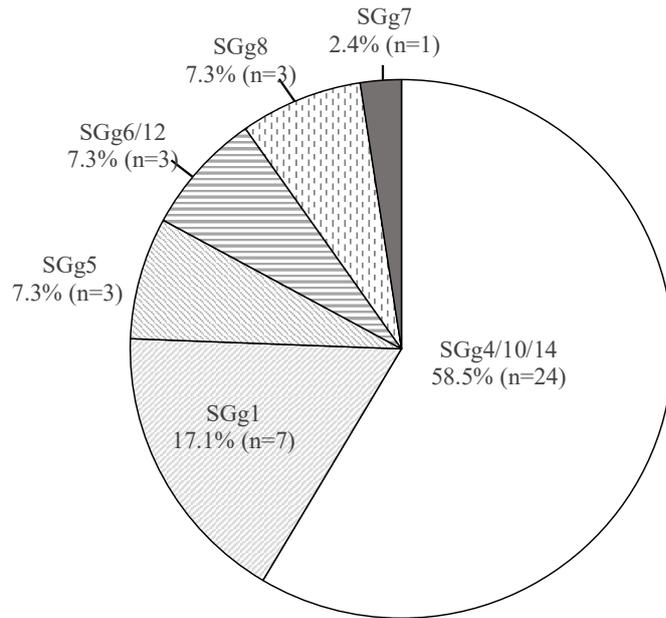


図 1. レジオネラ免疫血清で SGUT と判定された *L. pneumophila* 41 株の、M-PCR 法を用いた血清群別 (SGg) の結果割合

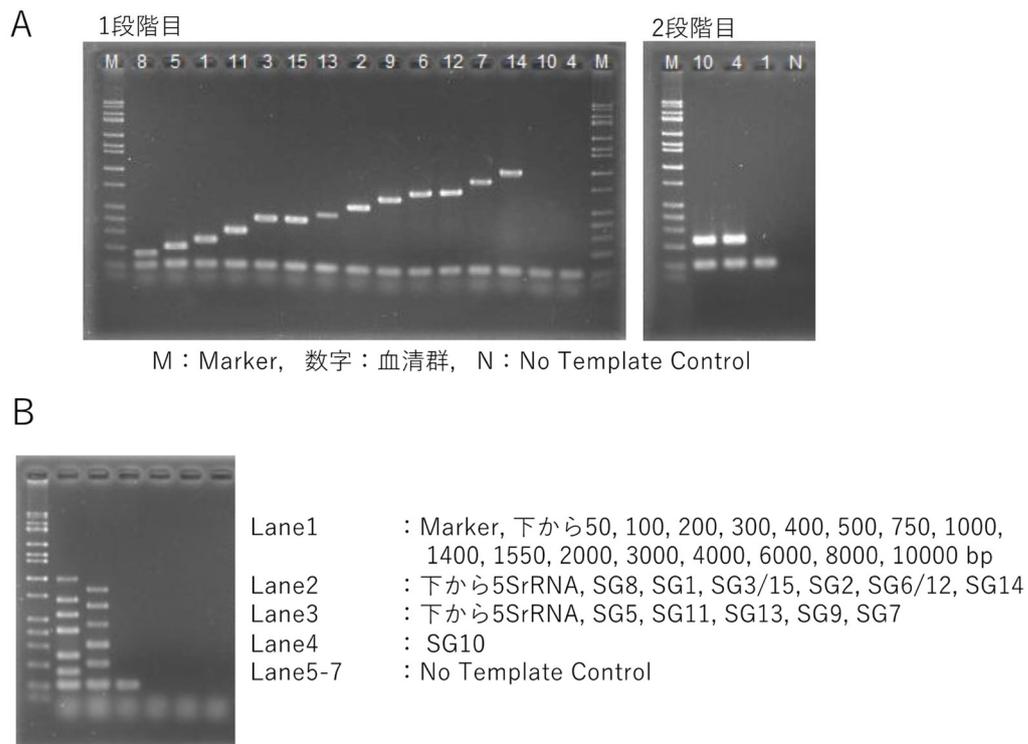


図 2. 基準株を用いたポジティブコントロールの用意

(A) 各血清群の菌株から抽出した DNA を鋳型に用いた、各 M-PCR の結果。(B) 出現するバンドが 1 段おきになるよう、抽出 DNA を混合してポジティブコントロール (2 セット) を用意した。各セットを鋳型に M-PCR を行った結果 (Lane 2 がセット 1、Lane 3 がセット 2 に対応)。

## &lt;Legionella pneumophila のマルチプレックス PCR による血清型別法&gt; Ver. 2.0

*L. pneumophila* は 15 血清群に分けられるが、血清群特異的配列プライマーを用いたマルチプレックス PCR (M-PCR) により、血清群をグループ分けすることができる。この M-PCR は 2 段階から成り、1 段階目の M-PCR で、血清群 1、血清群 2、血清群 3/15、血清群 5、血清群 6/12、血清群 7、血清群 8、血清群 9、血清群 11、血清群 13、血清群 14 の判定ができる (血清群 3 と 15、血清群 6 と 12 は区別することができない)。いずれの血清群のバンドも得られなかった場合は、血清群 4/10 プライマーを用いた 2 段階目の PCR を行い、バンドを確認する (バンドが得られた場合、血清群 4 か 10 と判定される。血清群 4 と 10 は区別できない)。供試菌株が *L. pneumophila* である場合には、1 段階目か 2 段階目のいずれかで血清群特異的なバンドが確認できる。スライド凝集反応でいずれの免疫血清にも凝集せず、UT と判定される菌株も M-PCR ではいずれかに分類される。免疫血清による群別と区別するため、PCR による血清型別は、SG の後に g を加えて、SGg1 のように記載することとする。M-PCR には *Legionella* 属特異的プライマーも加えていて、供試菌株が *Legionella* 属菌であることを確認するとともに、PCR 反応が正しく行われているか確認できる。

## 方法

1 段階目の M-PCR 用として、血清群 4/10 以外のプライマーセットと *Legionella* 属特異的プライマーセットからなる 24 種類のプライマー (表 1) 各 20 pmol/μL をプールした Primer-Mix を予め作製する。2 段階目の M-PCR 用には、血清群 4/10 プライマーセットと *Legionella* 属特

異的プライマーセット各 20 pmol/μL をプールする。2 段階目の M-PCR は 1 段階目で血清群が  
決まらなかったときに行う。

M-PCR の反応溶液組成は以下の通り（1 検体当たり）。

QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix（Qiagen, Hilden, Germany） 10 μL

Primer-Mix 1 段階目 4.8 μL（最終プライマー濃度 0.2 μM）

2 段階目 0.8 μL（最終プライマー濃度 0.2 μM）

鋳型 DNA 1ng 程度あるいはレジオネラ菌体\*（ $10^4$ - $10^6$  CFU 相当）

滅菌水を加えて、全量を 20 μL にする。

\* 滅菌した爪楊枝で平板上のコロニーをつつき、10~100 μL の滅菌水に懸濁し、そのうち  
の 1 μL を用いる。

反応条件

95°Cで 15 分間の初期変性

28 回の増幅サイクル 94°Cで 30 秒の変性

60°Cで 90 秒のアニーリング

72°Cで 30 秒の伸長

72°Cで 10 分間の最終伸長

100—1,000 bp の範囲がよく分離されるような条件（例えば、0.5×TAE buffer、2.0%アガ  
ロースゲル）で、ローディングバッファーを添加した PCR 反応液 2 μL を電気泳動にかける。  
サンプルの少なくとも片方の隣に、100 bp 刻みの DNA サイズマーカーを泳動する（例えば、  
Gene Ladder; ニッポンジーン、2.5 μL/レーン）。

SG8、SG1、SG3/15、SG2、SG6/12、SG14 の精製 DNA の同量混合物および SG5、SG11、

SG13、SG9、SG7 の精製 DNA の同量混合物を用いて、1 段階目の M-PCR を行うと、それぞれに対応するバンドが得られ、陽性コントロールかつサイズマーカーとなる。

## 結果

日本と中国の臨床分離株、環境分離株計 238 株（各血清群の菌株数は、3 から 48 株）について、M-PCR による血清型別を行ったところ、デンカのレジオネラ免疫血清で群別できなかった 5 株を除いて、すべて免疫血清による結果と一致した。免疫血清で群別できなかった 5 株は、SGg4/10 が 3 株、SGg6/12 が 1 株、SGg8 が 1 株であった<sup>1)</sup>。

## 参考文献

1 Nakaue R, Qin T, Morita M, Ren H, Chang B, Murai M, Amemura-Maekawa J, and Ohnishi M: Development of a multiplex-PCR serotyping assay for characterizing *Legionella pneumophila* serogroups based on the diversity of LPS biosynthetic loci. J Clin Microbiol. 59: e00157-21, 2021.

問い合わせ先

国立感染症研究所 細菌第一部

前川純子

[jmaekawa@niid.go.jp](mailto:jmaekawa@niid.go.jp)

**TABLE 1** Primer sequences of the PCR serotyping <sup>1)</sup>

Primer set	Target gene (Gene name)	Product size (bp)	Target SG(s)	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
SGg1	<i>sg1-25 (srkA)</i>	249	SG1	AAACGCCTCTTTGCTGAACCAG	GTTGGGCATCTTCTTGATTAATCC
SGg2	<i>sg2-37</i>	543	SG2	AAACGAGGGTACTAAGTGC	TATCAGGGGTAGCTGTTGGC
SGg3/15	<i>sg3-48/sg15-49</i>	408	SG3 and SG15	GGAATTTGTAAAGCAAAGAAAACCAG	AGATGTTTTGATCGCTAAAATGCCT
SGg5	<i>sg5-35</i>	205	SG5	GAACCTATTCTTAATCCAGAGG	TAGACGCATTGCCAAACAAG
SGg6/12	<i>sg12-57</i>	698	SG6 and SG12	TTACTTGGCCATCTAAGTTACC	CTTCACTTCCTTGGACTGTGC
SGg7	<i>sg7-30 (dapA)</i>	835	SG7	TTAGTATTGAGAGGGTTGGC	TGTGTAGGGCTTACAAAGTCC
SGg8	<i>sg8-68</i>	166	SG8	TGCTCACTCTATAGTTTATGATTGG	TAGTTTGACGATCAATTCCAGC
SGg9	<i>sg9-29</i>	634	SG9	TTATCTGGATTATCTTCACCTCG	GAATGGTATGAGAGAATCACTGG
SGg11	<i>sg11-23 (legI)</i>	314	SG11	ACATTACGGTAGTGGCAAAGG	TGTTCGATTTACCTAACAATGC
SGg13	<i>sg13-37</i>	461	SG13	ACCTTATGGT(A/C)TTGCAGATTC	CA(G/T)CC(A/C)TCATGATCACTTGG
SGg14 <sup>a</sup>	-	986	SG14 and ST23 <sup>b</sup>	GTTTGGTTGATGCCAATAATCTCG	AGCCAGAATATAAGTCATTGTCCG
SGg4/10	<i>sg4-40 /sg10-36 (patA)</i>	235	SG4, SG10 and other SGs <sup>c</sup>	AAACGAGATAAAGTCATATGCC	TACGCAAATACCGTCTTTAGC
<i>Legionella</i> genus	5S rRNA	108		GGCGACTATAGCG(A/G)TTTGGAA	GCGATGACCTACTTTC(A/G)CATGA

<sup>a</sup> Amemura-Maekawa *et al.*, The 10th International Conference on *Legionella*, 2022.<sup>b</sup> Detection for SG14 and ST23 among SG1.<sup>c</sup> Detection for SG4, SG5, SG8, SG9, SG10, SG13, SG14, SGUT, a part of SG7, and a part of SG11.

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）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

令和4年度分担研究報告書

分子疫学解析法の活用と環境水における NGS を用いた網羅的解析

研究分担者	中西典子	神戸市健康科学研究所	感染症部
研究分担者	前川純子	国立感染症研究所	細菌第一部
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	田中忍	神戸市健康科学研究所	感染症部

研究要旨：本研究では、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れ、遺伝子型別間での妥当性を評価し、より最適な MLVA 領域の利用により MLVA の解析精度を向上させる。さらに、次世代シーケンサー（NGS）を用いた集団事例での評価や汚染源調査での経時的な網羅的菌叢解析を行い、解析手法の確立と基礎データの蓄積を目指す。

今年度は、MLVA primer のミスマッチにより増幅されない株への対応のため、primer を変えた新たな multiplex PCR の系を構築した。

レジオネラ症発生事例における NGS 解析により、当該事例における施設環境由来株と患者株間の SNVs は 5 個以下であった。さらに、同一患者由来株による多様な遺伝系統が確認されたことから、状況に応じて複数の患者分離株を解析に加える必要があると考えられた。

A. 研究目的

感染源の特定には、レジオネラ症患者からの分離株と、推定感染源とされる環境分離株の遺伝子型の一致を確認する必要がある。これまでパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）や世界的に普及した塩基配列の多型解析（Sequence based typing、SBT）法が主流の方法として用いられてきた。しかしこれら従来法は、多検体処理の煩雑さに加え、時間や費用が課題となっていたことから、我々は *L. pneumophila* においてより簡便な手順で実施可能な反復配列多型解析法（MLVA）を導入し、これま

で評価してきた。その結果、レジオネラの汎用性の高い分子疫学的手法として MLVA 法を普及させてきた。このようにレジオネラの分子疫学には様々な遺伝子型別手法が報告されているが、それぞれの手法間での遺伝子型別結果に相違が生じるケースや新規な手法を自治体へ導入する際の技術的な課題が認められている。さらに、菌株の同一性をより詳細に解析するには全ゲノム配列を用いた系統解析を今後取り入れていく必要がある。

そこで本研究では、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れ、従来法で型別され

た遺伝系統の妥当性を評価することで、より最適なMLVA領域の利用によりMLVAの解析精度を向上させる。さらに、次世代シーケンサー(NGS)を用いた集団事例での評価や汚染源調査での経時的な網羅的菌叢解析を行い、解析手法の確立と基礎データの蓄積を目指す。

今年度は、ゲノム解析により明らかになった、primer部分のミスマッチにより増幅されないMLVA領域について、新たなprimerを用いたMultiplex PCRの系を構築した。また、レジオネラ発生事例においてNGS解析を実施し、得られた全ゲノム配列を用いて系統解析やSNP解析を行い、ゲノム分子疫学的な観点から菌株間の異同性の評価を行った。

## B. 研究方法

①菌株：MLVA領域のprimerおよびMutiplex PCR評価には *L. pneumophila* SG1の菌株439株を対象とした<sup>1)</sup>。

レジオネラ症発生事例におけるNGS解析では、同一患者の喀痰由来14株と施設環境分離株18株(浴槽水由来5株、ヘアーキャッチャー由来5株、ろ過器由来8株)および2013年に同一施設の浴槽水由来1株を用いた(表2,3)。

②MLVA：Sobralら<sup>2)</sup>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。また、Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31, Lpms33,

Lpms34, Lpms35に関しては、Pourcelらによって報告された primer<sup>3) 4)</sup>を 2nd primerとして用いた。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。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。SNV(Single-nucleotide variant)解析にはBactSNPを用いてPseudogenomeを作成

し<sup>5)</sup>、組換え領域の除去は Gubbins を用いた<sup>6)</sup>。リファレンスには、*L. pneumophila* str. Pari 株 (Accession no.; CR628336.1)のゲノム配列を用いた。

## C. 研究結果

### (1) MLVA のプロトコルの改良

primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域 (Lmps01, Lmps13, Lpms31) について、Pourcel ら<sup>3) 4)</sup>によって報告された primer (2nd primer とする)を用いることにより、大きく改善された。そこで、Lmps01, Lmps13, Lpms31 は 2nd primer に変更し、primer 濃度を最適化することで、4 領域がきれいに増幅される条件を決定し、multiplex PCR の系を構築した(表 1)。

### (2) レジオネラ症発生事例における NGS の活用

レジオネラ症発生事例において、患者および感染源の施設環境から *L. pneumophila* SG1 ST138 が分離された。それぞれの株における MLVA 型を表 2 と表 3 に示した。患者由来株 14 株と環境由来株 19 株の *L. pneumophila* SG1 ST138 の MLVA 型は 6 種類に型別された(図 1)。さらに、菌株間の遺伝的類似性を調べるため、NGS 解析を行った。SNV に基づくハプロタイプネットワーク解析の結果、同一患者喀痰由来株および施設環境由来株間の SNVs は 0~42 個の範囲内であった。同一患者由来 14 株間の SNVs は 0~41 個であり、14 株中 12 株は三つの Clade (Clade I, II, III)に分かれ、Clade 内の SNVs

は 10 個以下であった(図 2)。Clade I は、SNV が 0-1 個の患者株 5 株のみで構成されていた。Clade II と III には、患者由来株と環境由来株の両方の株が含まれ、SNV は 4 個以下であった。2013 年に同一施設の浴槽水から分離した KL0954 株と患者由来株間の SNVs は約 30 個であった。さらに、KL0954 株は、ろ過器由来の KL2300 株と KL2301 株、浴槽水由来 KL2220株との SNVs は 9~10 個であった。

## D. 考察

Pourcel らが報告した primer を用いても MLVA 領域自体は Sobral らと同じ領域である。今回、Lpms01, Lpms13, Lpms31 については、最初から 2nd primer に変更した multiplex PCR の系を構築した。今後、菌株数を増やして構築したプロトコルの評価を行っていく必要がある。また、他の複数の連携機関にも有効性を検証してもらう必要がある。

*L. pneumophila* SG1 ST138 におけるレジオネラ発生事例について NGS による解析を行った。ST138 は、B3 グループ (bathwater group) に属し、散发例や小規模アウトブレイクを引き起こしている日本に特有の遺伝子型である<sup>7)</sup>。当該事例においては、施設環境由来株と患者株間の SNVs が 5 個以下となる組合せが確認された。疫学的に関連のある菌株間の SNV 数は 5 個以下と報告されていることから<sup>8)</sup>、当該施設が感染源であると判断できる。しかしながら、その一方で、同一患者由来株間の SNV 数は 0~41 個と多

様であり、患者株と近縁な環境由来株が分離できていない clade が存在していたことから、状況に応じて複数の同一患者分離株を解析に加える必要があると考えられた。また、同一患者由来株の多様性は同時に複数の遺伝系統に暴露されたことを示しており、浴槽などエアロゾルが発生する環境に長時間滞在することが影響していると考えられる。さらに、2013年の当該施設分離株との比較においては、患者由来株間の SNVs 数は約 30 個、浴槽由来およびろ過器由来株間の SNVs が 10 個以内であったことから、少なくとも 2013 年から施設内に定着しており、複数の遺伝子系統に多様に分岐した可能性が考えられた。

#### E. 結論

primer のミスマッチにより増幅されない株への対応のため、primer を変えた新たな multiplex PCR の系を構築した。

レジオネラ症発生事例における NGS 解析により、当該事例における施設環境由来株と患者株間の SNVs は 5 個以下であった。また、同一患者由来株において多様な遺伝系統が確認されたことから、複数の患者分離株を解析に加える必要があると考えられた。

#### F. 参考文献

1) 中西典子ら, MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析. 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～3 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 220-234, 2022

- 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.parisclay.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) Yoshimura, D., Kajitani, R., Gotoh, Y., Katahira, K., Okuno, M., Ogura, Y., Hayashi, T., Itoh, T. Evaluation of SNP Calling Methods for Closely Related Bacterial Isolates and a Novel High-Accuracy Pipeline: BactSNP. *Microb. Genom.* 2019, 5, e000261.

- 6) Croucher, N.J.; Page, A.J.; Connor, T.R.; Delaney, A.J.; Keane, J.A.; Bentley, S.D.; Parkhill, J.; Harris, S.R. Rapid Phylogenetic Analysis of Large Samples of Recombinant Bacterial Whole Genome Sequences Using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, e15.
- 7) Amemura-Maekawa; J. Kura, F.; Chida, K.; Ohya, H.; Kanatani, J.I.; Isobe, J.; Tanaka, S.; Nakajima, H.; Hiratsuka, T.; Yoshino, S.; et al. *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* species Isolated From Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018, 84, e00721-18
- 8) Raphael, B.H.; Baker, D.J.; Nazarian, E.; Lapierre, P.; Bopp, D.; Kozak-Muiznieks, N.A.; Morrison, S.S.; Lucas, C.E.; Mercante, J.W.; Musser, K.A.; et al. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates From New York State. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 82, 3582–3590
- International Conference on Legionella. October 2022, Yokohama, Japan.
- 2) Noriko Nakanishi, Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto. Whole-Genome analysis of *L. pneumophila* strains causing outbreak at bath facility in Kobe, Japan. The 10th International Conference on Legionella. October 2022, Yokohama, Japan.

#### 論文発表

- 1) Nakanishi N, Komatsu S, Tanaka S, Mukai K, Nomoto R. Investigation of a *Legionella pneumophila* Outbreak at a Bath Facility in Japan Using Whole-Genome Sequencing of Isolates from Clinical and Environmental Samples. *Microorganisms.* 2022 Dec 22;11(1):28.  
doi: 10.3390/microorganisms11010028.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### G. 研究発表

##### 学会発表

- 1) Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto, Noriko Nakanishi. The genetic characterization of *L. pneumophila* SG1 isolates from bath water in Kobe City, Japan. The 10th

表 1. Multiplex PCRのMLVA領域とプライマー

Multiplex PCR	MLVA locus	primer	Sequence (5'→3') (Labeling)	Primer conc (pmol)
A	Lpms01	Lpms01F_2nd	(NED)-ACGRGCATATGACAAAGCCTTG	10
		Lpms01R_2nd	CGGATCATCAGGTATTAATCGC	
	Lpms31	Lpms31F_2nd	(FAM)-GCAATCCGGCCTCGCAAGCC	1.25
		Lpms31R_2nd	CAGGCACACCTTGCCGTCA	
	Lpms33	Lpms33F	(VIC)-GACACCACAGCAGTTTGAAC	1.25
		Lpms33R	CGAGGAAATCTTCTCAGCC	
Lpms35	Lpms35F	(PET)-GAATCTGAAACAGTTGAGGATG	1.25	
	Lpms35R	TATCAACCTCATCATCCCTG		
B	Lpms03	Lpms03F	(VIC)-GGACAAACAACCAATGAAGC	5
		Lpms03R	TGATGGTCTCAATGGTCCG	
	Lpms13-2nd	Lpms13F_2nd	(NED)-CAATWGCATCGGACTGAGYA	5
		Lpms13R_2nd	TGCCTGTGTATCTGGRAARGC	
	Lpms19	Lpms19F	(PET)-GAACTATCAGAAGGAGGCGA	1.25
		Lpms19R	TCCAGAGGCTCTGGATTATC	
	Lpms34	Lpms34F	(FAM)-AAGGAATAAGGCGCAGCAC	1.25
		Lpms34R	ATGCAGGATGTTTGCGCATG	

表 2. 同一患者由来*L. pneumophila* ST138 14株のMLVA型

Patient No.	No. of isolates	MLVA-12 profile											
		Lpms01	Lpms03	Lpms13	Lpms19	Lpms31	Lpms33	Lpms34	Lpms35	Lpms38	Lpms39	Lpms40	Lpms44
A	KL2239	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
	KL2240	8	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
	KL2241	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
	KL2242	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2243	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2244	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2245	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2246	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2247	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2255	0	7	0	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2256	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2257	0	7	0	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2258	0	7	0	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2259	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9

表3. 環境由来*L. pneumophila* ST138 18株のMLVA型

No. of isolates	year	sample source	MLVA-12 profile											
			Lpms01	Lpms03	Lpms13	Lpms19	Lpms31	Lpms33	Lpms34	Lpms35	Lpms38	Lpms39	Lpms40	Lpms44
KL2217	2022	bath water (man)	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2218		bath water (man)	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2219		bath water (man)	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2220		bath water (man)	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2227		bath water (women)	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2229		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2230		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2231		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2232		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2233		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2300		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2301		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2302		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2303		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2304		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2305		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2306		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2307		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL954	2013	bath water	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0

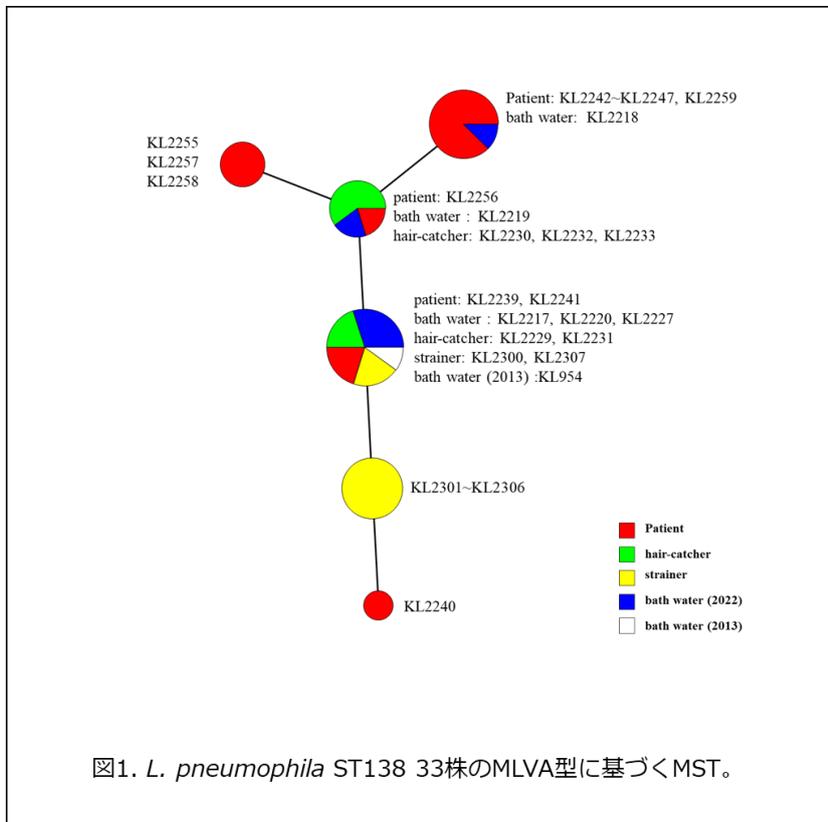


図1. *L. pneumophila* ST138 33株のMLVA型に基づくMST。

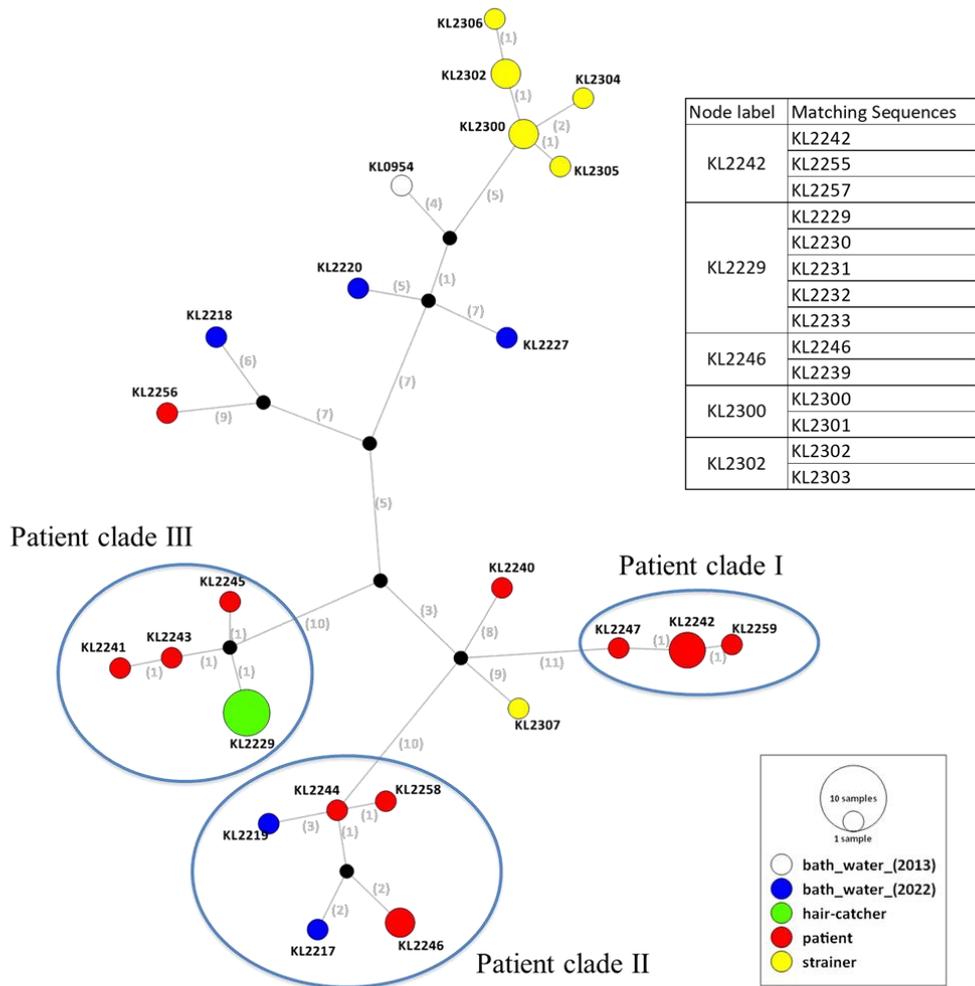


図2. *L. pneumophila* ST138 33株の全ゲノム配列を用いたSNVs解析によるハプロタイプネットワーク。各Node間の数字はSNVsの数を表す。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
黒木俊郎 他		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	(Web 公開) (URL、2023年4月21日現在)	https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/00961757.pdf	令和4年(2022)	全58ページ
森 康則		森 康則	はじめて学ぶ ぼくたちの 温泉科学	三重大学 出版会	三重県 津市	令和5年(2023)	全114ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井明, 泉山信司, 前川純子.	温泉浴槽水中の <i>Mycobacterium phlei</i> に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果	温泉科学	72	26-37	2022
Nakanishi N, Komatsu S, Tanaka S, Mukai K, Nomoto R.	Investigation of a Legionella pneumophila Outbreak at a Bath Facility in Japan Using Whole-Genome Sequencing of Isolates from Clinical and Environmental Samples.	Microorganisms	11	28	2023
Komatsu S, Tanaka S, Nakanishi N.	Evaluation of <i>Legionella pneumophila</i> SGUT serotypes isolated from bath water using multiplex-PCR serotyping assay.	Jpn J Infect Dis	76(1)	77-79	2023
淀谷雄亮, 原 俊吉, 湯澤栄子, 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状況と ST1346 の集積について	感染症誌	96	193-197	2022
泉山信司	水の塩素消毒－病原微生物の塩素消毒にまつわる誤解への回答例	環境技術	51(2)	43-48	2022

令和5年4月3日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 寄生動物部・主任研究官  
(氏名・フリガナ) 泉山 信司・イズミヤマ シンジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年4月14日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 地方独立行政法人  
大阪健康安全基盤研究所

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 朝野 和典

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業

2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生化学部 生活環境課 主幹研究員

(氏名・フリガナ) 枝川 亜希子・エダガワ アキコ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年4月6日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 富山県衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 大石 和徳

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業

2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 細菌部 主任研究員

(氏名・フリガナ) 金谷 潤一 ・ カナタニ ジュンイチ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年4月18日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 岡山理科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 平野 博之

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業

2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 獣医学部・教授

(氏名・フリガナ) 黒木 俊郎・クロキ トシロウ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立保健医療科学院

所属研究機関長 職 名 院長

氏 名 曾根 智史

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業

2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生活環境研究部 上席主任研究官

(氏名・フリガナ) 小坂浩司 (コサカ コウジ)

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 長崎県環境保健研究センター

所属研究機関長 職 名 所 長

氏 名 本多 雅幸

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業

2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 次 長

(氏名・フリガナ) 田栗 利紹・タグリ トシツグ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 神戸市健康科学研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 岩本 朋忠

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業

2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 感染症部・副部長

(氏名・フリガナ) 中西典子・ナカニシノリコ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業

2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 細菌第一部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 前川 純子・マエカワ ジュンコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口をチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月28日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 三重県保健環境研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 中井 康博

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業

2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生研究室 衛生研究課 主査研究員

(氏名・フリガナ) 森 康則・モリ ヤスノリ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由: 過去に必要な事例がなかったため)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: 国立感染症研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 山梨県衛生環境研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 内田 裕之

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業
2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 微生物部・研究員  
(氏名・フリガナ) 柳本恵太・ヤナギモトケイタ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: 国立感染症研究所 )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年 4月14日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 川崎市健康福祉局健康安全研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 岡部 信彦

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 健康安全・危機管理対策総合研究事業

2. 研究課題名 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 呼吸器・環境細菌担当 技術職員

(氏名・フリガナ) 淀谷 雄亮・ヨドタニ ユウスケ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。