

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
令和2年度分担研究報告書

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

研究代表者： 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部

フローサイトメトリーによるモノクロラミンの消毒効果判定方法の開発

研究分担者： 田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター  
研究分担者： 中西 典子 神戸市環境保健研究所  
研究協力者： 倉 文明 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室  
研究協力者： 田中 忍 神戸市環境保健研究所  
研究協力者： 平塚 貴広 広島県立総合技術研究所保健環境センター  
研究協力者： 井上 浩章 アクアス株式会社 つくば総合研究所  
研究協力者： 縣 邦雄 アクアス株式会社  
研究協力者： 杉山 寛治 株式会社マルマ 研究開発部  
研究協力者： 田中 慶郎 株式会社マルマ 営業部  
研究協力者： 蔡 国喜 長崎県環境保健研究センター  
研究協力者： 井原 基 長崎県環境保健研究センター  
研究協力者： 中尾 元 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

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

## A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

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

## B. 研究方法

### 1. Mch 消毒を満たす FCM 特異領域の設定

#### 1) 供試菌株

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

#### 2) Mch の調製方法

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

クス社) 1.08 mL を 12 mL 滅菌蒸留水に加えて希釈したものに、10%塩化アンモニウム (富士フィルムワコーケミカル社) 1.35 mL を一気に加えてよく攪拌した溶液の全量を、後述のモデル浴槽 24 L 水道水に加えた (終濃度 3.0 mg/L as NH<sub>2</sub>CL)。5 倍濃度 Mch を調製する場合には、それぞれの試薬を同じ要領で 5 倍量混合して水槽に加えた。

### 3) FCM による細菌数と大腸菌数の測定

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

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

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

### 4) モデル実験

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

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

### 5) 特異領域の設定

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

## 2. 営業施設の調査

### 1) 対象施設

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

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

## 2) 検査項目

### 2)-1 FCM による消毒効果判定

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

### 2)-2 FCM による LP 数の計測

FCM に用いる各種免疫蛍光染色試薬と LP 定量は、田栗らの方法<sup>10)</sup>に準拠した。即ち、蛍光抗体試薬は、市販の抗 LP 血清群 1 抗体 (V6051, Virostat) および抗 LP 非血清群 1 抗体 (アークリソース) を購入し、Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) により抗体を標識して作製した。これらを等量混合して、FL LP mix として使用した。本試薬は各抗体約 1 mg/mL を含む。

施設調査において、検水 500 mL を吸引ろ過した後の孔径 0.2  $\mu$ m ポリカーボネート製フィルターを 55 mm シャーレに貼付けた。これに 0.6 mL PBS と等量の 0.1%BSA 加 PBS を加えて、10 回以上フィルター表面をピペッティングで洗い出したのち、洗浄液 1 mL を回収した。次いで、回収後のシャーレに 1 mL 0.1%BSA 加 PBS を加えて前述と同じ操作を繰り返し 2 回目の回収液とした。各回収液に染色試薬 FL LP mix 1.5  $\mu$ L を加えて、30 分間回転振盪させたのち、2 mL ディスポシリンジで約 0.8 mL を採取し、miniPOC に装着して測定した。この時、LP 特異染色試薬由来の測定ノイズを除くように予め設定した特定エリア内の細菌数 ( $\mu$ L: 装置に表示される) を計数し、装置由来の誤差 (2000/42) と回収時に発生する誤

差 (容量比 : 1.1) を補正したのち、予め作成した検量線により濃度換算して LP 数とした。

## 3) レジオネラ属菌培養方法

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

## 4) リアルタイム PCR (生死判別含む)

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

## 5) レジオラート培養法

施設調査で得られた浴槽水のうち 18 検体分について、レジオラート (Idexx 社) 法による培養を行った。淀谷らの方法<sup>14)</sup>に準拠して、滅菌水 90 mL にレジオラートに付属する粉末培地を加えよく溶かした後、浴槽水 10 mL を加えた。十分に混和した後、専用の Quanti-Tray/legiolert に封入し、湿潤環境で、39°C で 7 日間培養した。培養後、茶色または濁りの生じたウェル数を陽性とし、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求め、定量した。

## C. 結果及び考察

## 1. Mch 消毒を満たす特異領域の設定

### 1) モデル実験結果

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

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

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

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

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

### 2. 営業施設の調査

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

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

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

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

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

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

#### D. 結論

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

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

#### E. 参考文献

- 1) Buse, H.Y, Morris, B.J., Struewing, I.T., Szabo, J.G., Chlorine and Monochloramine Disinfection of *Legionella pneumophila* Colonizing Copper and Polyvinyl Chloride Drinking Water Biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e02956-18, 2019.
- 2) 厚生労働省生活衛生局長通知, 公衆浴場における衛生管理要領等について, 生衛発第 1811 号, 2000.
- 3) 杉山寛治ら, モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策, *保健医療科学*, **59**, 109-115, 2010.
- 4) 柳本恵太ら, 山梨県内のレジオネラ属菌の消毒が困難な浴用水におけるモノクロラミンの消毒効果, *山梨衛環研年報*, **59**, 55-57, 2015.
- 5) 森 康則ら, 温泉を用いた公衆浴場におけるモノクロラミン消毒の試行とその有効性, *温泉科学*, **70**, 50-60, 2020.
- 6) 田栗利紹ら, モノクロラミン消毒による入浴施設の衛生管理, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 23 年度分担研究報告書, 研究代表者: 倉 文明, 47-50, 2011.
- 7) Ireland Environment Protection Agency, Water Treatment Manuals: Disinfections, chloramination, pp62-66, <https://www.epa.ie/pubs/advice/drinkingwater/>

[watertreatmentmanualdisinfection.html](http://watertreatmentmanualdisinfection.html)

Accessed March 19, 2021.

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

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

10) 田栗利紹ら, レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28 ~30 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 31–36, 2019.

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

12) 森本洋ら, レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-:厚生労働科学研究費補助金(健

康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 24 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 倉 文明, 93–130, 2012.

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

14) 淀谷雄亮ら, 新規酵素基質培地キットであるレジオラートの有効性の検討: 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和元年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 22–26, 2019.

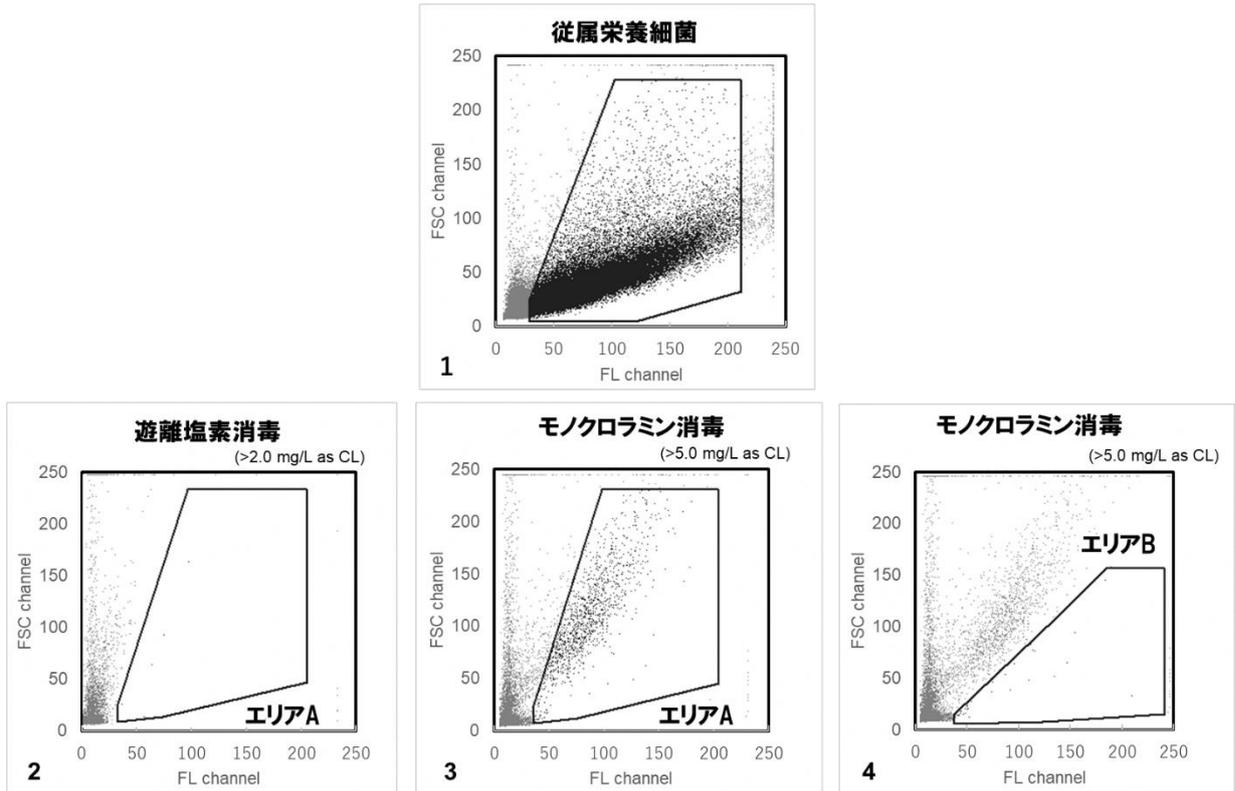
15) Quero, A, Parraga-Nino, N, Garcia-Nunez, M, et.al., The impact of pipeline changes and temperature increase in a hospital historically colonized with *Legionella*. *Sci. Rep.*, **11**, 1916, 2021.

F. 学会発表

なし

G. 知的産権の出願・登録状況

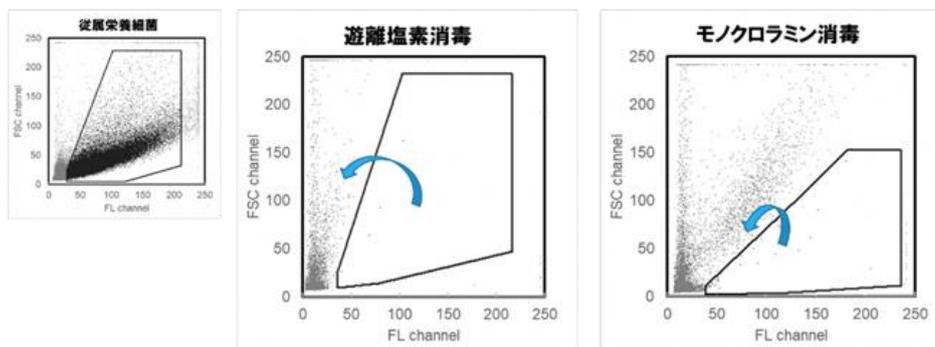
なし



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

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

## モノクロラミンによる消毒効果判定



大 酸化力 小

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

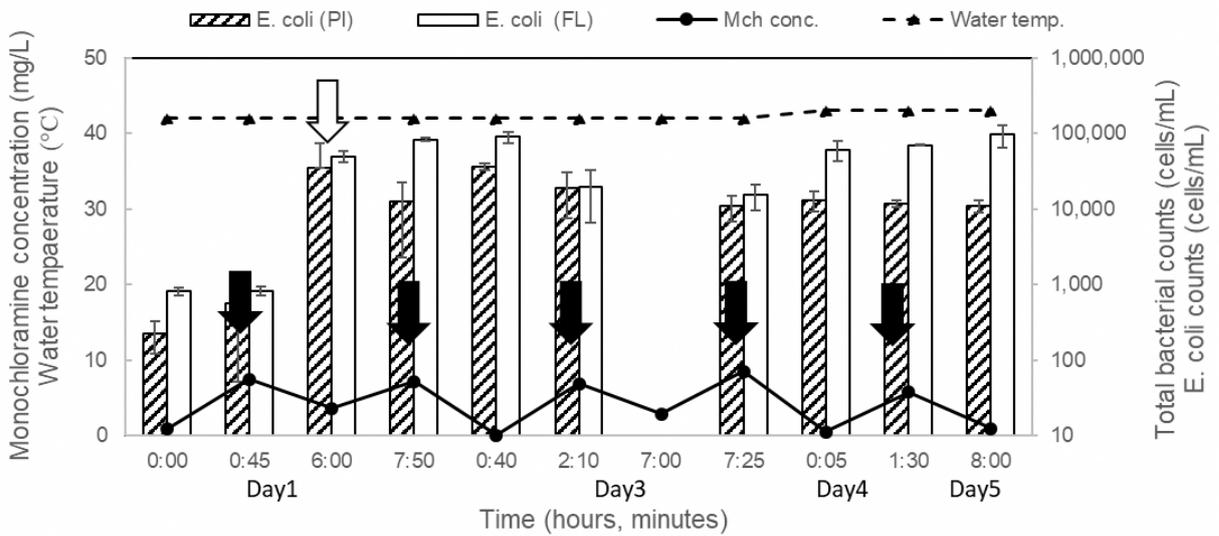


図 1. (A) 実用濃度モノクロラミン消毒による大腸菌数の変動

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

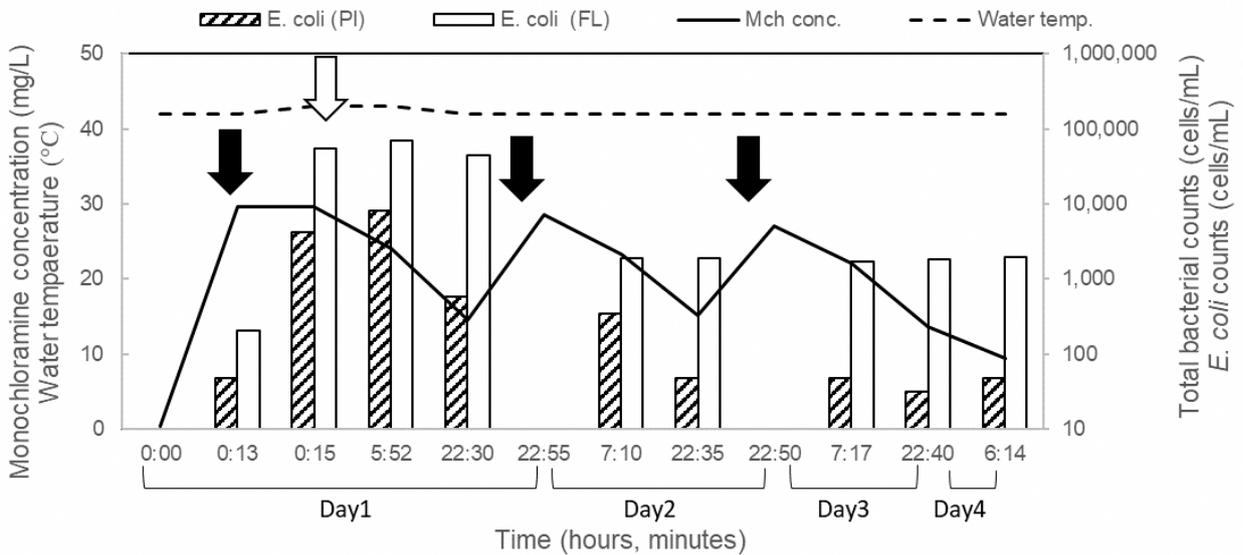


図 1. (B) 高濃度モノクロラミン消毒による大腸菌数の変動

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

表1-A 泉質ごとの各種レジオネラ属菌検査法成績

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

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

表1-B 消毒効果判定ごとの各種レジオネラ属菌検査法成績

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

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

(A) モデル実験試水

(B) モノクロミン消毒施設浴槽水

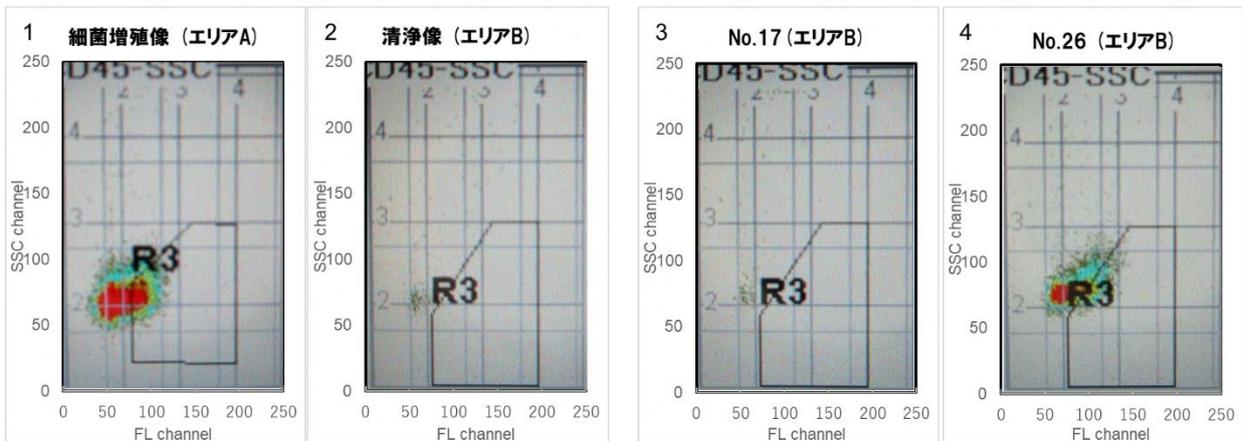


図2 RDM法におけるモノクロミン消毒用特定領域 (エリアB) と実試料 (No.17およびNo.26) の散布図

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

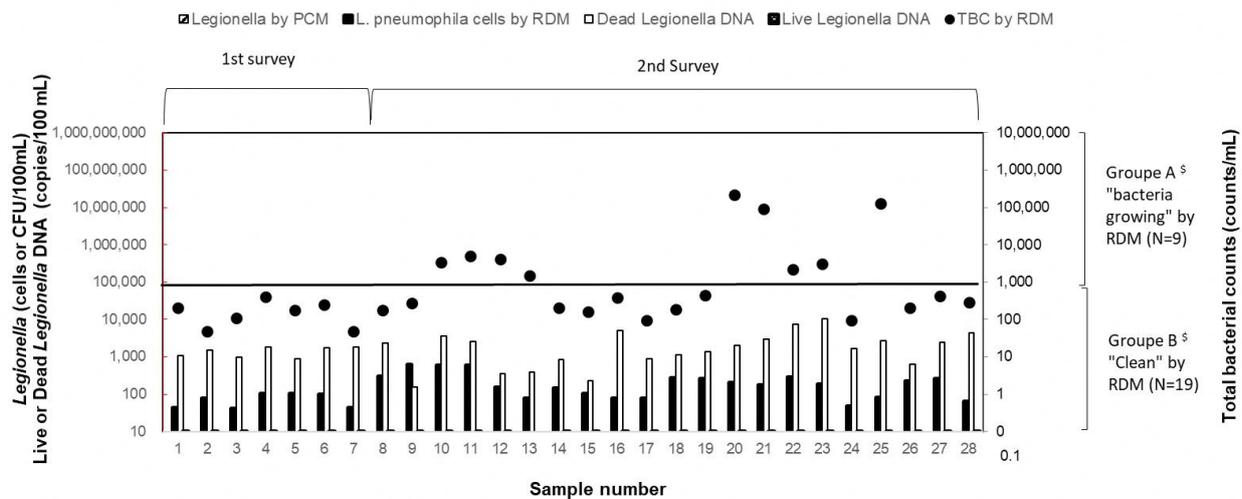


図3. Rapid Ditection Method (RDM) による消毒効果判定法に基づくレジオネラ属菌培養法(Plate Counting Method, PCM)、RDM法によるレジオネラニューモフィラ数、生菌及び死菌レジオネラ属菌DNA量の比較。

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

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

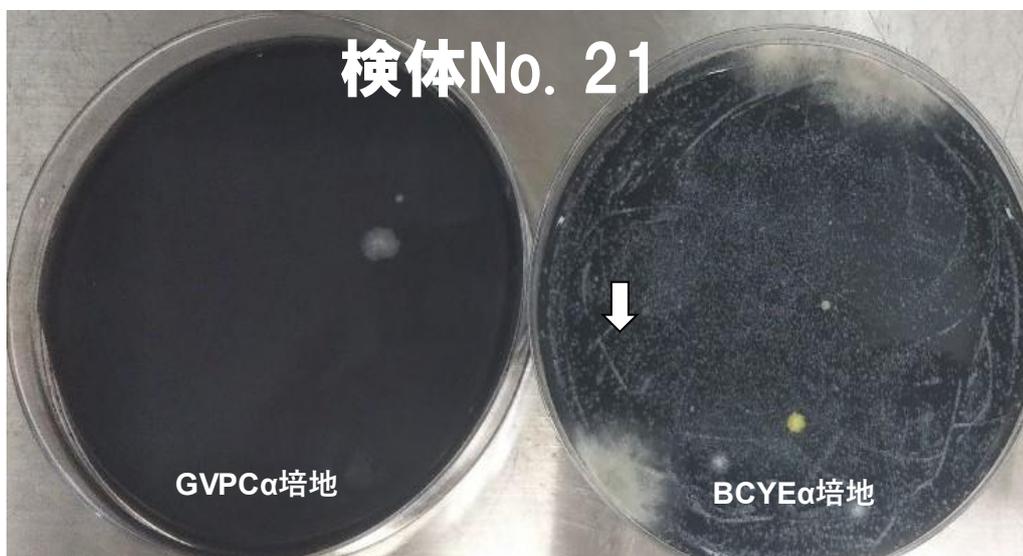


図4. レジオネラ属菌培養培地に生息した従属栄養細菌

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