

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消毒洗浄に関連して、以下の成果を得た。pH10 程度のアルカリ性温泉の浴場施設の協力を得て、モノクロアミン消毒によるレジオネラ属菌に対する消毒効果を再確認できた。モノクロアミン消毒中の菌叢は、生活環境やヒトの常在菌に変化し、特に問題は感じられなかった。試験管内消毒試験により、高アルカリ温泉水と薬湯中の *L. pneumophila* に対して、遊離塩素消毒よりモノクロアミン消毒が有効と確認した。洗濯機と加湿器からレジオネラが検出され、このような生活環境中の感染源にも注意を要した。循環式浴槽のろ過器にオゾンを注入しただけではレジオネラが増殖してしまい、逆洗による汚れの排出が非常に重要と示唆された。ここで逆洗が適切に行われていれば、遊離塩素消毒の併用もあって、浴槽水中のレジオネラ汚染は長期に抑えられた。ただしオゾン逆洗を継続しても、ろ過器内の微生物は死滅しなかった。遊離塩素濃度 0.4mg/L 以上の重要性が改めて示された。

②培養よりも迅速な検査について、以下の成果を得た。フローサイトメトリーや遺伝子検査に塩素濃度測定の前培養な検査法を用いて、5 つの施設との丁寧な対話により、汚染を特定したり、管理を向上することが出来た。LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法の遺伝子検査は、培養検査法と概ね一致することを改めて確認した。

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。保健所の職員を対象にアンケート調査を行い、公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態が明らかになった。訪問の事前調整を行っているにも関わらず、施設側の担当者が不在で監視項目を十分に確認できないといった困難が見出された。入浴施設の衛生管理の手引きの見直しとチェックシートの作成等が行われた。

④レジオネラ培養検査の向上に以下を検討した。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。外部精度管理の一つ UKHSA (英国健康安全保障庁:UK Health Security Agency) の EQA (The external quality assessment legionella isolation scheme) に参加した。本物の環境水に近い試料が用意され、酸処理や熱処理といった培養前処理が必要な、実践的な精度管理であり、通常に行われる検査方法での参加が可能であった。レジオネラ属菌の新規培養検査法として、レジオラート/QT 法は従来の平板培養法と一致率が高いことを改めて確認した。培養前の酸処理により感度が若干低下したが、雑菌による偽陽性は抑制された。

⑤分子疫学の高度化について以下の成果を得た。レジオネラ血清型別のための multiplex-PCR 法の改良と普及が進んで全国的に使用可能となった。国内で比較的良好に検出される遺伝子型(ST)の ST1 と ST138 の全ゲノム解析を行い、ST 型によって多様性が異なること、多様性に乏しい ST138 型などは感染源の判断に注意を要することが示された。全ゲノム配列を用いた感染源調査には、ヒト分離株は 2 株で変異を把握できるのに対して、環境分離株では複数が必要であることが実測で示された。

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
主幹研究員
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
上席主任研究員
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 主任研究員
森 康則・三重県保健環境研究所 主査研究員
柳本 恵太・山梨県衛生環境研究所 主任研究員
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(モノクロラミン)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. pH10のアルカリ性温泉におけるモノクロラミン消毒効果と菌叢解析

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ラ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¹⁾。ただしモノクロラミンの連用により、*Mycobacterium phlei* 等の雑菌が増加し、16S rDNA コピー数の増加や、菌叢の変化が認められている²⁴⁾。本研究では、pH10 程度の温泉を利用した公衆浴場において、生菌を検出する EMA(Ethidium monoazide)-PCR の手法を用いて、モノクロラミン消毒の消毒効果、菌叢に与える影響を検討した。従来の結果は死菌を含む PCR を使用したもので、必ずしも生菌の増加を示していない点に注意が必要であった。

A2. 薬湯および高アルカリ温泉水中の *Legionella pneumophila* に対するモノクロラミンと遊離塩素の

消毒効果

高アルカリ温泉水とは別に、薬湯におけるモノクロラミン消毒の効果についても実地試験により報告してきた^{5,6)}。薬湯を対象にした実地試験の場合、遊離塩素消毒では薬湯が退色し、かつ遊離塩素濃度の変動が大きく、濃度管理が困難であった。モノクロラミン消毒では、これらの問題が解消され、かつレジオネラ属菌も抑制されていた⁵⁾。本研究は、経験的に明らかになってきた高アルカリ温泉水と薬湯における *Legionella pneumophila* の不活化について、*M. phlei*、*E. coli*、*B. subtilis* を比較対照とした試験管内試験により、その効果の検証を目的とした。

A3. 家庭用洗濯機におけるレジオネラ属菌の汚染実態

レジオネラ症は、レジオネラ属菌による汚染・増殖が起こった人工水環境を感染源として、多く発生することが知られている。主な感染源として入浴施設が挙げられ、入浴施設が集団感染事例の感染源としてしばしば報告されている⁷⁻⁸⁾。一方、感染事例の大半は散发事例であり、その感染源は不明であることが多い。感染源となり得る人工水環境は生活圏に多数存在すると考えられ、これまでに家庭内の水道やシャワーにおけるレジオネラ汚染が複数報告されている⁹⁻¹⁰⁾。洗濯機水を調査した Kuroki らの報告¹¹⁾では、レジオネラ属菌の遺伝子が高率に検出されていたが、感染源としてはあまり注目されていなかったかもしれない。洗濯機が感染源になる可能性を改めて検討するため、複数の家庭用洗濯機を対象として、レジオネラの存在を調査した。

A4. 加湿器のレジオネラ汚染

レジオネラ症の届出数は、増加の一途をたどり、公衆衛生上の脅威の一つとなっている。主な感染

源は国内の浴場とされるが、感染源不明も多く、その実態解明が求められる。近年のコロナ禍において、呼吸器感染症の多くは減少したが、レジオネラ症の届出数は減少せず、高止まりしている¹²⁻¹³⁾。この状況から感染源不明のレジオネラ症には、マスクを着用しない場面における感染事例が多く含まれると推察される。例えば汚染ミスの発生源となる加湿器は、そのような場面で使われている装置の1つであろう。加湿器が汚染源の集団感染も報告され、対策が取られるように注意喚起もされている¹⁴⁾。米国には、病院や介護施設で超音波加湿器のようなエアロゾルを発生させる加湿器の使用をほぼ禁止するガイドラインもある(使用には、滅菌、あるいは毎日の高水準の消毒と滅菌水の使用を求める)¹⁵⁾。本研究は加湿器のレジオネラ汚染に改めて着目して、加湿器の利用や汚染の実態について調査した。

A5. 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、「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、ろ過器を十分に逆流洗浄(以下、逆洗)して汚れを排出するとともに、ろ過器及び循環配管について、適切な方法で生物膜を除去、消毒」とされている¹⁶⁾。「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5~10mg/Lの高濃度塩素を用いる方法が紹介されている¹⁷⁾。「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5~10mg/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¹⁸⁾。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。

そこで過酸化水素や塩素以外の方法として、オゾンに着目した。オゾンは、空気(酸素)の無声放電¹⁹⁾や水の電気分解²⁰⁾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。

令和4年度は某スーパー銭湯の協力を得て、アトラクション浴槽の小規模ろ過器(0.2m³)で試験を行い、逆洗水のレジオネラ属菌を約10ヶ月間、概ね継続して不検出とすることが出来た。今年度はスケールアップを図り、より大規模なるろ過器(1.8m³)を対象に同様の試験を行った。その際に設備の都合によりろ過器の使用(循環)と逆洗を停止する期間があり、逆洗の重要性が強調される結果が得られたので、前後のレジオネラ検出を踏まえて考察する。

A6. 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)²¹⁾、遺伝子検査法²²⁾およびATP法²³⁾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げられることを期待している。入浴施設の協力、民間事業者等との連携から、現場施設の調査や予防・改善の実施例を蓄積する。

A7. 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

レジオネラ症対策として、感染源のおよそ4割を占めるとされる入浴施設の衛生管理の向上は

重要である²⁴⁾。入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握するため、2012年以降の11年間の結果を合わせて、陽性検体の特徴(遊離塩素濃度)や遺伝子検査(LAMP法)の結果等について改めて検討することとした。遺伝子検査の結果解釈を、監視員や施設管理者にわかりやすく説明することにも務める必要がある。

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多様ではあるが、レジオネラ症の分子疫学で利用されている遺伝子型(ST、Sequence-Based Typingによる型別)には偏りもあり、複数の環境から高頻度に検出されるSTは感染源の判断に迷う場合がある²⁴⁾。より解像度の高い分子疫学方法の開発を企図して、全ゲノム配列を用いたSNPs解析を検討している。本研究では患者と環境の同一検体内におけるSNPsの蓄積頻度を検討することとした。新規検査法開発の基盤となるだけでなく、結果解釈の参考となる知見にもなる。新しい検査法による公衆浴場の衛生管理およびレジオネラ症対策の向上を期待する。

A8. 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。実態としては、不適切な衛生管理体制や、適正な情報や人材の不足によって、不十分な管理状況となっている部分がある。この状況の一端を確認するため、管内の許可施設等に対する監視指導状況の調査を実施することとした。なお、本調査は監視実態の把握のため行うものであり、各組織や個人の問題点を調べるものではない。

A9. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

入浴施設の衛生管理の技術的助言として、厚生労働省から「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」並びに「レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針」が発出されている。これらの要領と指針は衛生管理の方向性を示しているが、具体的・詳細な管理方法は示していない。そのため、入浴施設の監視指導の現場からの、具体的な内容を示してほしいとの強い要望に対応して、入浴施設の衛生管理の手引き(以下、手引き)が作成されている。この手引きに対して、簡易版、チェックシートや記録票の例示、Q&Aの作成、説明動画の作成などの多くの要望が寄せられている。また、入浴施設の衛生管理手法の開発やそれらの導入が発生するなどしており、内容を追加あるいは修正対応を検討することとした。

A10. 外部精度管理の選択肢整備へ向けた検討と英国 UKHSA の EQA *Legionella* isolation scheme への参加

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。そのため、多くの検査機関は自施設で標準作業手順書(Standard Operating Procedures、以下SOP)を作成し、その方法に沿って外部精度管理に参加して検査精度を確認すると共に、検査技術の維持向上に努めて

いる。

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昨年度から情報収集している。現在、参加可能なレジオネラ外部精度管理は3種(国外2種:英国UKHSA、英国FAPAS、国内1種:島津ダイアグノスティクス株式会社)ある。この中から今年度は英国UKHSA(英国健康安全保障庁:UK Health Security Agency)の外部精度管理(The external quality assessment legionella isolation scheme、以下EQA)に参加し、試験操作や事務的な手続きを含めて、日本国内から問題なく参加できるかを確認した。EQAは、試料の作製、配付から結果の解析等すべてをUKHSAが行っている。これまでに20年以上の歴史があり、欧州を中心に150以上の検査機関が参加している。日本国内からは民間検査機関を中心に参加実績がある²⁵⁾。EQAの検査指示書には「ルーチンメソッドで行う」と指定されており、自施設のSOPに沿った、培養前の酸処理、熱処理を含む、標準的な検査法で参加が可能である。一方で、国内代理店がないため、参加者はUKHSAに直接申込みをしなければならなかった。

A11. 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。近年の水質管理に使用されているレジオラート/QT法は、専用培地(*legiolert*)と検体を専用トレイ(*Quanti-Tray*)に封入して培養するもので、これにより*Legionella pneumophila*を選択的に検出・定量できる検査法であり、上記の問題が無くて済む。レジオラート/QT法は一部検体において交雑菌による偽陽性が確認され、その抑制には昨年度の先行研究で培養前の酸処理5分が有効と示され

た。本研究では酸処理 5 分の有効性を実検体で検討することとした。

A12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の改良と普及

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、免疫血清では群別不能だった菌株への応用を目指している²⁶⁾。昨年度の改良により、1 段階目の PCR で、SG1、2、3/15、5、6/12、7、8、9、11、13、14 の判定ができるようになった。今年度は、ポジティブコントロールかつサイズマーカーとなる人工遺伝子の作製を行い、血清型別 M-PCR 法の普及を図った。

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)などが使われてきた。一方でゲノムシーケンサーの普及に伴って全ゲノム解析により、全ゲノム配列から菌株の同一性を確認する方法も利用できるようになってきた。本研究では全ゲノム配列から、従来法の妥当性の確認や、より高解像な

解析手法の確立と、比較するための基礎データの蓄積を目指している。これらを目的として、今年度は国内で検出される主要な2つの遺伝子型について、散发例や集団事例、環境由来株などを全ゲノム配列で比較することとした。ST1 は冷却塔水からよく分離される遺伝子型でGroup-C1に属し、国内の臨床株でも上位5 番目に検出されているが、世界で拡散している遺伝子型である^{24, 27-30)}。ST13 8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²⁴⁾。

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. pH10 のアルカリ性温泉におけるモノクロミン消毒効果と菌叢解析

消毒に影響を与える物質をほとんど含まない、pH10.1 の源泉水を利用する入浴施設の協力を得た。試験対象浴槽は約 40 m³ の内湯とした。入浴者数は 1 日に 100~300 名程度で、浴槽水の循環ろ過系統を有しており、少なくとも 1 週間に 1 回の換水と清掃をしていた。モノクロミン生成装置を設置し、概ね 3~5 mg/L の範囲となるように一定の注入量を設定した。各種測定は定法に従い、モノクロミン導入前の 3 週間と導入後の 4 週間、週

に1回、営業終了後に実施した。

遺伝子解析に用いる浴槽水 3L をろ過と遠心分離で 10,000 倍に濃縮し、死菌の影響を抑制するための EMA 処理サンプルと非処理サンプルに分割した。EMA 処理は、Viable Bacteria Selection Kit for PCR (タカラバイオ)を用いた。DNA 抽出は NucleoSpin Soil (タカラバイオ)を用いた。浴槽水中の 16S rDNA コピー数の定量は Clokie らの方法³¹⁾により行った。モノクロラミン導入前後のコピー数を比較し、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。また、同遺伝子の V3-V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンスによる菌叢解析を行った(生物技研)。

B2. 薬湯および高アルカリ温泉水中の *Legionella pneumophila* に対するモノクロラミンと遊離塩素の消毒効果

先の不活化試験の方法³²⁻³³⁾に準拠して実施した。高アルカリ温泉水の検液として、三重県内で湧出する pH9.6 の温泉水を、オートクレーブ滅菌処理(121°C15 分間)後に使用した。薬湯は、過去に本研究班の実地試験において使用したことのあるケイヒ等の生薬が配合された薬湯(健美泉、株式会社健美薬湯)を用いた。この生薬の配合品 25 g を 40°C の蒸留水 500 mL で 30 分間抽出し、規定の 1/10 の濃度で調製したりん酸緩衝液(PBS)で抽出液を 100 倍希釈し、さらにオートクレーブしたものを検液とした。菌株は、*L. pneumophila* の標準株(ATCC33152)を用いた。消毒はモノクロラミンと遊離塩素で行った。なお、高アルカリ温泉水と薬湯中のモノクロラミンは問題なかったが、薬湯中の遊離塩素は不足したことを後述している。菌濃度測定は、チオ硫酸ナトリウム溶液にて中和した後、適宜希釈してからGVPC寒天培地を用いて 7 日間 37°C で培養した。消毒剤の濃度(C)と、接触時間(T)の積として CT 値(Concentration × Time

value)³⁴⁾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. 家庭用洗濯機におけるレジオネラ属菌の汚染実態

大学の部活寮で使用している洗濯機(試料番号 W1~W9)を 9 台、および単身者の住宅で使用している洗濯機(W10)を 1 台の、合計 10 台を調査対象とした。4 台(W1~W4)からは、パルセーターの裏に付着したバイオフィルムを滅菌スワブで採取し、1/50 に希釈した phosphate-buffered saline(PBS) の 5 mL にバイオフィルムを懸濁した(以下、スワブ液)。6 台(W5~W10)からは、各洗濯機における最小量設定の水道水(数十 L)に十分量の 25%チオ硫酸ナトリウム溶液を添加後、10 分間、洗浄機能モードを利用して装置を動かしてから、500 mL を採取した。孔径 0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルターでろ過し、1/50 希釈した PBS の 5 mL に再浮遊した(以下、濃縮液)。

DNA 抽出に、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)あるいは Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 (タカラバイオ)を用いた。CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ)を用いた qPCR を実施して、菌数(死菌を含む)を算出した。

LC EMA-qPCR 法による、生菌に相当するレジオネラ属菌数の測定も行った。分取した 1 mL (W3~W10)を遠心分離でさらに 10 倍濃縮してから酸処理をした。*Legionella* LC medium (タカラバイオ) 0.9 mL を添加し、37°C で 18 時間培養した。培養後の 100 μL を分取し、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (タカラバイオ)を用いて EMA 処理した。Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 を用いて DNA を抽出した。CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いた qPCR を実施して、生菌に相当する菌数を算出した。

平板培地による培養の前処理は、酸処理、熱処理、熱・酸処理を行った。試料を培地に塗抹した後は、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で少なくとも7日間培養した。従属栄養細菌数は、スワブ液および濃縮前の洗濯機水をPBSで10倍段階希釈し、それらの1 mLを混釈法によりR2A寒天培地(BD)に接種した。 20°C で7日間培養し、集落数を計数した。

B4. 加湿器のレジオネラ汚染

この研究は、静岡県令和4年度新成長戦略研究費「新たな政策課題対応分」チャレンジ研究枠研究「加湿器におけるレジオネラ属菌汚染実態と汚染要因に関する研究」として行った成果の一部を抜粋した。

レジオネラ症の高リスク群に加湿器の使用が想定される高齢者福祉施設の117施設を対象にアンケートを郵送して、加湿器の利用と種類について問い合わせた。アンケートには、実地調査を依頼する可能性があることを明記し、協力を依頼するパンフレットを添付した。アンケート回収率は41%であった(=48/117施設)。そのうちの協力が得られた14施設の加湿器から検体を採取して、レジオネラを検査した。1つの加湿器につき、タンクの水、吹出口の拭き取り、水受け(トレイ)の拭き取りの計3箇所を採取した。14施設78台の加湿器から検体を採取したが、加湿器の構造の都合などにより、1つの加湿器から3箇所を採取できないこともあり、都合、タンクの水75検体、吹出口の拭き取り70検体、水受けの拭き取り69検体等となった。検査は定法に従い培養検査と、遺伝子検査等を行った。プライマーにLEG448A/854Bを用いて、PCR産物から塩基配列を決定した。

B5. 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

協力を得た当該スーパー銭湯の試験対象浴槽

は、当初露天風呂(約 40°C)として使用されていたが、施設側の意向により、オゾン供給直前に露天サウナ用の水風呂に変更された(井水、 17 m^3 、 $16\sim 24^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}7.3$ 、図5-1)。既設制御盤の故障により、当初の約2ヶ月間、ろ過器の使用(循環)と逆洗が停止した時期があったが、この間ろ過器(有効容量 1.8 m^3 、直径約 $1.4\text{ m}\times$ 高さ約 1.2 m)へのオゾン供給を行い、部分的にろ過器内水を採水してろ過器内の清浄度を調べた。先の試験と同様に、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。入館者数が多く、ろ過器への汚濁量は日常的に非常に多いと考えられた。オゾン供給前(露天風呂)の汚濁状況を調べるために、オゾン供給77日前(2022年8月13)より水質分析を開始し、この日を試験開始日とした。試験装置は前回同様、単相 100 V の電源で稼働し、始動スイッチを毎日一度押すだけで、電解オゾン水を逆洗前のろ過器に下部ドレン口より自動供給する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活性炭で塩素除去した後、市販のオゾン生成電極で電気分解することにより生成した。電極は昨年度のものから約5倍の面積を持つ電極(オゾンバスターインダストリー、オゾンマート製)にスケールアップした。流量は 30 L/min 、オゾン濃度は $0.5\sim 0.9\text{ mg/L}$ (平均 0.7 mg/L)、供給時間はろ過器容量分(1.8 m^3)を供給する60分間とした。陰極や電解槽内のスケール対策として、 100 g/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。なお、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(0.1 ppm 未満)であった。

消毒・洗浄の効果を調べるため、週1回の頻度で、浴槽水、オゾン消毒前の逆洗水、それから部分的にろ過器内水とオゾン消毒後のオゾン排水を採水した。ろ過器内水は、制御機器の故障によ

ろ過器の使用(循環)と逆洗が停止した約 2 ヶ月間(98 日目から 154 日目)に採水した。この間もろ過器へオゾンを注入し、ろ過器内水のレジオネラ属菌を分析した。オゾン消毒前の逆洗水は、汚染が最も蓄積されている状態を期待して 279 日目まで測定した。286 日目からオゾン消毒後のオゾン排水を測定し、ろ過器内部の状態を確認した。以上のレジオネラ測定試料は採水方法の違いにより 3 通りあって結果の単純比較は出来ないが、レジオネラの検出不検出や増減傾向は参考になる。

B6. 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

5つの入浴施設(以下K施設、L施設、M施設、N施設、O施設)の協力を得た。フローサイトメトリー、遺伝子検査、塩素濃度等の非培養検査法を用いて、5つの施設と丁寧な対話を行った。

各種検査は定法により行った。残留塩素濃度(DPD法、Hach又は柴田科学)、ATP(ルミテスターPD-30とルシパックSurface/Pen-AQUA、キッコーマンバイオケミファ)、フローサイトメトリーによる全菌数(RF-500又はminiPOC、Sysmex-Partec)、qPCRによるレジオネラ遺伝子コピー数(Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit、タカラバイオ)、EMA-qPCR法による生菌に相当する遺伝子コピー数(Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0)、レジオネラ生菌(GVPC α 培地、ビオメリュー、あるいはレジオラート、アイデックス)、従属栄養細菌数(R2A培地)等を測定した。

モノクロロミン消毒は、水道水、12%次亜塩素酸ナトリウム、15(w/w)%塩化アンモニウムの混合により約1300 mg/Lを機械的に生成して直ちに循環系統に添加した。1日4回(金土は5回)DPDにより全塩素濃度を測定して、注入量を調整した。

B7. 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

検査材料は2023年に公衆浴場などから採水された浴槽水31検体、シャワー水8検体、カラン水7検体を用いた。解析は2012年から2022年の結果も合わせて用いた。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)」に準じて実施し、10 CFU/100 mL以上を陽性とした。LAMP法は、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。同一検体から分離された菌株のSNPsを比較するため、10事例(散発)のレジオネラ症患者から8株ずつ分離し、同一STであることを確認後、SNPs解析に用いた。同様に、浴槽水10検体からも8株ずつ分離し、同一STであることを確認後、SNPs解析に用いた。菌株のDNAは、QIAamp DNAMini 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³⁵⁾。箱ひげ図の作成は、Davidらの文献を参考にした³⁶⁾。レファレンスには、*L. pneumophila* str. Pari 株(Accession no. NC_006368.1)のゲノム配列を用いた。

B8. 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

令和5年度国立保健医療科学院短期研修環境衛生監視指導研修受講者と本研究班関係の保健所等職員の、保健所・衛生部局の職員を対象にアンケート調査を行い、21自治体36保健所から36回答を得た。

アンケート内容は以下の通り。(1)環境衛生担

当部署に係る情報 3 問、(2)監視指導に係る規定等について 3 問、(3)監視指導に係る状況等について 8 問、(4)浴槽水のレジオネラ属菌等に係る対策について 8 問、(5)所管内のレジオネラ症患者の対応状況について(近年3年間;令和2~4年度)6 問、(6)環境衛生監視員に対する研修等について 6 問、(7)事業者に対する対応状況、5 問。

今年度はアンケート結果の(2)監視指導に係る規定等について、(3)監視指導に係る状況等についての回答を集計、解析した。表における構成比は小数点以下第2位を四捨五入しているため、合計しても必ずしも 100 とはならない。また、複数回答を求める設問においては、構成比を算出していない。

B9. 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)および入浴施設の衛生管理の手引き検討会(以下、検討会)において、手引きの内容の見直しや参考となるチェックシートの作成、Q&A の作成等を、昨年に続き検討した。

WG のメンバーは、昨年度と同様に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。今年度は手引きの内容の修正・追加と Q&A の作成について、それぞれの検討を行った。

検討会のメンバーは昨年度と同様に、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。検討会は基本的に月に1回の頻度でオンラインでの開催とし、入浴施設の監視指導時に施設の設備の設置状況と衛生管理状況を把握するためのチェックシート、手引きの簡易版、手引きに追加するQ&Aの作成等を検討しており、今年度はチェックシートの作成と検討を重点的に行った。

手引きに対する要望等を収集するために調査用紙を作成して、WG メンバーおよび検討会メンバーにメールで送付し、協力を依頼した。

B10. 外部精度管理の選択肢整備へ向けた検討と英国 UKHSA の EQA *Legionella* isolation scheme への参加

外部精度管理の選択肢を示すことを目指し、日本から参加可能な外部精度管理の情報を収集し、昨年度からの変更点をアップデートした。UKHSA が実施する EQA の G132(令和 5 年 10 月実施)に、大阪健康安全基盤研究所が参加した。EQA の検査指示書には「ルーチンメソッドで行う」と指定されており、自施設の SOP に沿った、培養前の酸処理、熱処理を含む、標準的な検査法で参加した。

B11. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

地方衛生研究所 6 箇所に搬入された公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等の計 204 検体を、レジオネラ検査の対象とした。未処理のレジオラート/QT 法は、添付された説明書の飲料水用 10 mL プロトコルに従った。酸処理は、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 5 分静置した後、15% KOH を 0.3 mL 加え、中和処理した。それぞれ検体全量を、滅菌水 90 mL で溶解したレジオラートと混合攪拌した後、Quanti-Tray に封入し 37°C で 7 日間培養した。菌数は、専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求めた。

レジオラートが陽性となったウェルの培養液を GVPC α 寒天培地等に接種し、レジオネラ属菌の分離同定を行った。レジオネラのコロニーが確認できなかった場合、優勢のコロニーから 16S rDNA 遺伝子等により菌種を同定した。分離され

た雑菌を懸濁したものからレジオラート/QT法を実施して、再び偽陽性を引き起こすか確認した。

レジオラート法と同じ試料のろ過濃縮検体から同時に、平板培養法にてレジオネラ属菌を分離培養した。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た。なお、平板培養法はいずれかの前処理方法(酸処理、熱処理、酸熱処理、無処理)から培養検出された結果を採用しており、レジオラート法と前処理条件が同一ではないので、単純比較ではない(仮に平板培養法を無処理で行えば、夾雑する雑菌によりレジオネラを分離ができないことが多くなる)。レジオネラ属菌の同定はシステム要求性又は免疫血清により行い、検出菌量を算出して10 CFU/100mL以上を陽性とした。遺伝子法はLAMP法、リアルタイムPCR法、PCR法のいずれかによりレジオネラ遺伝子を検出した。

B12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の改良と普及

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。M-PCR法によるSGg(SG-genotypes)の決定は、中植らの方法²⁶⁾にしたがった。コントロールDNAを人口遺伝子合成により用意した。

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

遺伝子型 ST1 の菌株は計 77 株を解析した。内訳は、給湯系統が感染源となった院内感染事例由来 18 株(同一患者由来 4 株、給湯水由来 11 株、冷却塔水由来 3 株)、2 地域(Region A と B)で分

離された浴槽水由来 25 株、冷却塔水由来 31 株、Region A と C での散発 3 事例の患者由来 3 株であった。

遺伝子型 ST138 の菌株は、公衆浴場集団事例の 2 事例に関連の 45 株と 8 株、2 地域(Region A と B)で分離された浴槽水由来 5 株、Region C での散発例患者由来 1 株の計 59 株を解析した。

QIAseq FX DNA Library kit (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。SNV (Single-nucleotide variant)解析は、既報に従い実施した³⁷⁾。すなわち、BactSNP³⁸⁾によりコールされた SNVs から、Snippy によるコア領域の推定、Gubbins²⁷⁾による組換え領域の除去に加え、繰返し領域の除去を行った。Reference 配列として、ST1 の解析に *L. pneumophila* str. Paris 株 (Accession no.; CR628336.1)、ST138 に自施設で分離された ST138 株の完全長配列を決定して用いた。

(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. pH10 のアルカリ性温泉におけるモノクロミン消毒効果と菌叢解析

浴槽水のレジオネラ属菌は、モノクロミン導入前の 1 検体から血清群型別不能の *Legionella pneumophila* が検出され、定量値は 10 CFU/100 mL であった(表 1-1)。他のサンプルは全て検出下限値未満であった。モノクロミンは pH10 の泉質においてもレジオネラ属菌を安定的に抑制でき、

良好な衛生状態を維持できることを再確認できた。浴槽水中の一般細菌数と従属栄養細菌数は、モノクロロミン導入後に増加しなかった(図 1-1)。一方の浴槽水中の 16S rDNA コピー数は、モノクロロミン導入後に増加傾向にあったが、EMA 処理により大きく減少し、導入前の EMA 処理サンプルと同等となった(図 1-2)。すなわちモノクロロミン導入後に、細菌の増殖はなく、EMA 未処理の 16S rDNA コピー数は死菌が多く含まれていたと考えられた。その理由については、遊離塩素よりもモノクロロミンの方が浴槽水中の DNA 分解能力が低い³⁾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 を検出した可能性が考えられた。

浴槽水の菌叢解析で属や種まで判明したのものとして、モノクロロミン導入前は、温泉や河川などの水環境中に存在する³⁹⁾ *Porphyrobacter* 属菌が優占種であった(図 1-3)。導入後は、洗濯物など生活環境中に存在する⁴⁰⁾ *Moraxella osloensis* や、ヒトの皮膚の常在菌⁴¹⁾である *Corynebacterium* 属菌の存在割合が高く、菌叢が変化していた(図 1-4)。モノクロロミン消毒の導入により菌叢が変化することは以前の試験でも確認されており³⁴⁾、今回はヒトの常在菌の増加が確認された(図 1-4)。細菌数自体に大きな変化はなく低濃度(概ね 100 CFU/mL 以下)であり、営業終了後の浴槽水から検出されるものは入浴の結果であり、病原細菌が増加すると言った特段の問題はなかった。

EMA 処理の前後で菌叢を比較したところ *Staphylococcus* 属菌や *M. osloensis* が主要であるサンプルもあるなど、一部は類似していた。一方で、*Cutibacterium* 属菌、*Acinetobacter* 属菌など、異なる結果もあった(図 1-3、1-4)。一致しなかったものについては、16S rDNA コピー数がどのサンプルも低く、テンプレート DNA 量としては 10~50 コピー程度と非常に少なかったことから、解析に偏りが生じてしまったものであり、さほど強調して

取り上げるものではないと考えられた。

C2. 薬湯および高アルカリ温泉水中の *Legionella pneumophila* に対するモノクロロミンと遊離塩素の消毒効果

高アルカリ温泉水中の *L. pneumophila* をモノクロロミンと遊離塩素により消毒した(図 2-1、2-2)。モノクロロミンと遊離塩素のいずれにおいても、レジオネラは *E. coli* と同程度に不活化され、いずれも高い消毒効果が確認できた。高アルカリ温泉水の遊離塩素消毒における、*M. phlei* や芽胞を含む *B. subtilis* の不活化が進まなかった先行研究とは異なり、レジオネラは大腸菌と同様にグラム陰性の芽胞を作らない弱い細菌であることと対応した。一方で *L. pneumophila* の遊離塩素消毒は、速やかな不活化が認められたが、実際の浴槽水ではレジオネラが検出されることがあるのと矛盾した。試験管内で単独で浮遊するレジオネラに遊離塩素消毒の効果があっても、浴槽水中のバイオフィルムで保護された状態は消毒効果が低下することが理由として考えられた。

薬湯中の *L. pneumophila* をモノクロロミンと遊離塩素で消毒した(図 2-3)。モノクロロミン消毒においては全ての CT 値においてコロニーが確認されず、薬湯中でもモノクロロミンの消毒効果が高いと考えられた。検液は TOC(全有機炭素)濃度が 41.4 mg/L と、薬湯の有機物が多量に含まれ、遊離塩素濃度を維持できず、遊離塩素消毒は阻害された(図 2-4)⁴²⁾。実際の入浴施設における薬湯の遊離塩素消毒は、*L. pneumophila* が浴槽水中に生残してしまう可能性、あるいは多量の次亜塩素酸ナトリウムで薬湯の色が消失したりすることが懸念された。

C3. 家庭用洗濯機におけるレジオネラ属菌の汚染実態

すべての洗濯機において、qPCR 法あるいは LC EMA-qPCR 法によってレジオネラ属菌が検出された(表 3-1, 3-2)。LC EMA-qPCR 法の結果から、洗濯機中には生菌のレジオネラ属菌の存在が示唆された。しかし、培養ではすべての検体でレジオネラ属菌のコロニーを分離できなかった。雑菌が培地表面全体を覆ってしまい、レジオネラ属菌の発育を確認できなかった。すべての洗濯機で従属栄養細菌数が多く、レジオネラの培養を阻害したと考えられた。洗濯機はレジオネラによる汚染が起こりやすく、感染源となり得る可能性が示唆された。適切な管理を怠ることができないと考えられた。

C4. 加湿器のレジオネラ汚染

アンケートの結果、使用している加湿器の種類は、気化式が 19 施設と最も多かったものの、次いで多かったのは超音波式の 9 施設(およそ 2 割=9/48)であった(図 4-1)。超音波式は実際にレジオネラ集団感染が報告されているにも関わらず、使用施設は少なくなかった¹⁴⁾。衛生管理に注意が必要と考えられた。アンケート調査により加湿器の日常的な使用が明らかになった施設に電話で連絡を取り、実地調査への協力を依頼し、14 施設の協力が得られた。

培養法によりレジオネラ属菌が検出されたのは(214 検体中の)1 検体であった。例数が少なく、無菌的な採材ができなかったものもあり、加湿器内での増殖の有無は不明であった。

PCR を行い産物の塩基配列を読み取りした 17 検体のうち、1 検体は *Legionella pneumophila* (100%=390/390bp, NR_074231)と一致した(表 4-1)。別の 1 検体は *L. quinlivanii* (>99%=389/390, NR_044966)、残り 15 検体は、一致率の高い登録配列がなく(あるいは PCR/読み取りエラーで) *Legionella sp.* であった。いずれにしても、レジオ

ネラに汚染される環境であることを改めて認識した。このような汚染源を見出して丁寧に対策することが、届出数を減少させることに大事と思われた。

C5. 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

オゾン試験 77 日前からオゾン消毒を開始するまでの間、浴槽水のレジオネラ属菌は、10~70 CFU/100 mL の間で断続的に検出された(図 5-2)。その間の 56 日目から測定したろ過器の逆洗水のレジオネラ属菌は、10~160 CFU/100 mL の間で連続して検出された。

75 日目の(施設による)配管洗浄(過酸化水素+塩素化イソシアヌル酸塩)の後、露天風呂は水風呂に変更され、77 日目よりオゾン試験を開始した。ろ過器の使用(循環)と逆洗が停止された 98 日目までの 3 週間は、オゾン消毒前の逆洗水から連続して 10~120 CFU/100 mL の間でレジオネラ属菌が検出された(図 5-2)。

ろ過器の使用(循環)と逆洗が停止された 98 日目から 154 日目までの約 2 か月間は、オゾン注入を継続したにも関わらず、20 CFU/100mL から 7900 CFU/100mL までレジオネラ属菌が対数増殖した(図 5-2)。すなわち逆洗を伴わないオゾン注入だけでは、レジオネラ対策としては不足であった。それまでに蓄積した汚れをオゾンで分解することにより、微生物代謝に資する易分解性の有機物(BOD)がろ過器内で増加したことが推察された。このような状況は、水道のオゾン後の活性炭槽でも生じることが知られており、細菌数の増加や微生物の漏出に注意が払われる⁴³⁻⁴⁴⁾。

154 日目よりろ過器の使用(循環)と逆洗が再開された後は、オゾン消毒前の逆洗水のレジオネラ属菌は、約 4 ヶ月間継続して不検出となった(図 5-2)。オゾンによる消毒だけでなく、逆洗による汚れの排出が非常に重要と示唆された。

浴槽水のレジオネラ属菌は、77 日目のオゾン消毒開始時より、約 7 ヶ月間継続して不検出であった(図 5-2)。これはオゾンの消毒効果により、遊離塩素を維持しやすかったためと考えられた。

286 日目からはオゾン消毒後のオゾン排水中のレジオネラ属菌およびアメーバを測定した(図 5-3)。いずれも逆洗水ではあるが、279 日目より以前はろ過器内の上層に蓄積された汚れを意図したオゾン消毒前の逆洗水であり、286 日目以降はオゾン消毒後のろ過器中心部の汚れを含む逆洗水であり、試料の性質が異なることに注意を要する。後者の 286 日目以降のオゾン消毒後のオゾン排水中から、濃度は低いものの、レジオネラ属菌は 10 ~ 30 CFU/100mL、アメーバは 1 ~ 15 PFU/100mL のレベルで検出され、微生物が完全に死滅することはなかった(図 5-3)。

C6. 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

施設 K は要望により、最初の現地調査はフローサイトメトリーの全菌数のみ実施した。水風呂の浴槽水と逆洗浄水はどちらも 0 cells/mL、薬湯の浴槽水と逆洗浄水はどちらも 95 cells/mL と菌数が低く、消毒効果が認められた。残留塩素濃度は共に 2.0 mg/L 程度であった。消毒効果を確認できた 1 週間後に、改めて採水してレジオネラ属菌を培養し、不検出であった。対話の中で衛生管理者がレジオネラ判定結果に対して凄く敏感であることが感じられた。フローサイトメトリーは、消毒効果を衛生管理者に認識させる、彼らに安心感をもたらす、有意義な指標であった。続くレジオネラ汚染に係る細菌汚染の指標、迅速試験の一種であり、有効な手段と感じられた事例であった。

施設 L はろ過器のオゾン消毒を試験していた。浴槽水からレジオネラは検出されないのに、逆洗浄水から原因不明のレジオネラが検出される状況

が続いた。浴槽水の ATP と FCM は低く、従属栄養細菌も検出されず、レジオネラ属菌、生菌遺伝子と全遺伝子は全て不検出であった。最終的に、排水口踏み板と人工芝の汚れが発見された(図 6-1、表 6-1)。衛生管理者に結果を伝えたところ、木製踏み板の金属製への交換と、人工芝の定期洗浄・消毒が追加されることとなった。対策以降、レジオネラは逆洗浄水から検出されなくなった。

施設 M の浴槽水は温泉を用い、シャワーとかけ湯は井水を利用していた。男湯のシャワー水から遊離塩素がほとんど検出されず、シャワー水によるレジオネラ事故事例とシャワーの定期的な洗浄消毒の必要性を伝えた。浴槽については、大浴場の女湯湯口からのみ貯湯タンクから給湯され、循環ろ過された湯が男湯と女湯に戻っていた。過去にレジオネラ汚染が認められたのは 2 次貯湯タンクで、遊離塩素濃度は原水と 2 次貯湯タンクで不検出であった(全ての浴用水は 2.0 mg/L を維持)。フローサイトメトリーによる全菌数は、温泉原水が 10^5 オーダー、一次貯湯タンクは消毒により 10^2 まで減少、2 次貯湯タンクは消毒が不足して 10^4 に増加していた。細菌増殖と消毒の必要性を施設事業者に再認識してもらうことができた。衛生管理者は自主的な対応の意向を示して調査を終了した。

施設 N の行政検査時の検査と廃棄ホースの結果を示した(図 6-2、表 6-2)。シャワー水から *Legionella pneumophila* SG4 が 175 CFU/100 mL 検出された。廃棄ホースの洗い出し液と拭き取りからは、レジオネラの平板培養とレジオラートが不検出であったが、遺伝子は検出された。廃棄ホースを切開すると内面に茶褐色のバイオフィルムが広範に付着していた。ホース以外であれば、井水の貯湯タンクで 60°C 以上、貯湯槽、内湯、露天風呂は塩素消毒、塩素管理がなされていない炭酸風呂と水風呂はかけ流し式で毎日換水と、管理は

適切と思われた。しかし市水のシャワーは5年間ほとんど何もしていなかった。施設はシャワー設備管理の必要性を認識し、シャワーヘッド及びホースの定期交換を管理マニュアルに定めた。

施設Oはモノクロアミン消毒事例となった。ジャグジー形式の浴槽で人気が高く、入浴者が多いときは遊離塩素濃度が急降下し、手動による塩素追加が必要であった。モノクロアミン消毒を適用して1ヶ月経過頃に濃度が3.5~4.5 mg/Lと安定した。浴槽水の塩素臭気は感じず、レジオネラ不検出であった。衛生管理者によると、濃度が安定するようになってからは、入浴者が100人増えた場合でも濃度が0.5 mg/Lを超えて下ることはなく、高濃度への対応はあっても遊離塩素のように激減せず、追加が無くなり、管理が軽減されたとのことであった。

C7. 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

2012年以降に県に搬入された検体のレジオネラ検査結果として、採水時の遊離残留塩素濃度が0.4 mg/L以上はレジオネラ陽性率が15%に対し、0.4 mg/L未満は40%と高く、塩素濃度の維持がレジオネラ抑制に重要であることが改めて示された。

LAMP法によるレジオネラ遺伝子の検査結果と培養法は概ね相関していた(表7-1)。培養検査は結果判明に約1週間を要し、遺伝子検査はレジオネラ陰性を迅速(当日中)に判定する方法として有用であることが改めて明らかであった。とりわけ、洗浄・消毒効果の判定や、施設の営業再開の判断など、早期の判定が望まれる際に遺伝子などの迅速検査法の活用が有用と考えられた。培養陰性・LAMP陽性検体の多くは死菌DNAを検出したこと、培養陽性・LAMP陰性検体の多くは検体中に含まれるレジオネラ菌量が少なかったため、と考えられた。遺伝子検査と培養検査の不一致の

解釈について、監視員や施設管理者からしばしば質問を受けることから、わかりやすく説明する説明文を作成し、解釈の普及に努めた。

同一検体内でのSNPsの蓄積頻度を調査した結果、患者分離株はSNPsがほとんど検出されなかった。10事例の患者検体から8株ずつ解析した結果、9検体は8株内でSNPsが検出されず、1検体(Patient 08)から1株のみ他の7株と異なり1 SNPが検出された。一方、浴槽水分離株は多数のSNPsが検出され、浴槽水中ではレジオネラの多様性があり、SNPsが蓄積しやすいと考えられた(表7-2)。8株内(Facility 06は7株)でSNPsが検出されなかったのは2検体のみであった(Facility 02、09)。4検体からは、7種類ものvariantsが検出された(Facility 01、05、06、10)。Facility 08は変異が多く、最大98 SNPsが検出された。患者と環境から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。

当然のこととして、解析した菌株数が多いほど、検出可能なvariantsは増加する(図7-1)。患者由来株は1~2株の解析でvariantsを網羅できるのに対して、浴槽水由来株は今回の環境については少なくとも7株も解析する必要があった。したがって感染源調査には、複数の環境分離株の解析が望ましいと考えられた。株数の確保が難しい場合、環境中のレジオネラ属菌の多様性を考慮した上で、同一由来株であるかどうかを判断する必要があると考えられた。

C8. 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

保健所等の環境衛生監視員としてどのような規定に基づいて監視指導を行っているかを質問したところ、国の規定もしくは都道府県や市独自の

規定のどちらか、もしくは両方を基に監視指導を行っていた(表 8-1)。両方の規定を基に実施している回答が22件(61%)と、半数以上は国と自治体独自の両方の規定を基に監視指導を行っていた。監視回数や指導内容等を定める「監視指導要領」「監視指導計画」等については、半数以上の自治体で監視回数や指導内容等を定めていた(表 8-2)。立入検査手法や監視時の指導項目等を記載した「監視指導マニュアル」「監視指導手引き」等についても、半数以上の自治体で立入検査手法や監視時の指導項目等を策定していた(表 8-3)。以上の通り、常時から監視指導が行われている割合が高かった。

旅館業や公衆浴場の施設を対象としたレジオネラ属菌陽性時の「対応マニュアル」等の有無については、8割以上の自治体で策定されていた(表8-4)。同様にレジオネラ症患者発生時の「対応要領」や「対応マニュアル」等の有無についても、7割の自治体で策定されており、事故対応の準備もおよそ整っていた(表 8-5)。

本研究班で検討しているモノクロラミン消毒を浴槽水等の消毒方法のひとつとして認めているか質問したところ、半数以上の自治体で何らかの規定に基づき認めており、その他でも規定や明記がなくても、効果のある消毒を認めている回答が多数あり、およそモノクロラミンの利用に制約は見られなかった。「死菌も検出されるPCR法やLAMP法(PCR検出、測定に数時間)」の利用有りが10件(28%)と普及はまだこれからであったが、様々な迅速検査法に対する関心は半数以上と高いことが判明した。

立入検査の監視対象施設に対して、ほとんどで事前調整(アポイント等)を行っていた(表 8-6、8-7)。抜き打ち検査をしたいところではあるが、平日に行われ、施設利用者に配慮を要し、施設の管理担当者が不在では困ること等が調整を行う理由

として推測された。なお、立入検査人数や所要時間について代表的なケースを質問したところ、最小1人～最大4人(平均1.7人)、最小15分～最大120分(平均53分)、数値に広がりがあるのは対象施設の施設規模によるものと考えられた。様々な経験の共有や助言ができる体制が必要と考えられた。

立入検査で主に確認を行う項目、実施する項目を全て選択してもらったところ、維持管理記録と浴槽水の換水頻度の確認は全てで確認が行われており、浴槽水や貯湯槽、ヘアキャッチャー、残留塩素濃度の衛生状態の確認も94%以上が確認されていた(表 8-8)。浴槽水の衛生に直結するような項目は重点的に確認がなされていた。一方、立入検査時に生じた困りごととして、特に「施設の詳細がわかる(施設側の)担当者が不在で、監視項目を十分に確認できないことがある」が26件(72%)と多くあり、事前調整にも関わらず担当者不在があるとわかった(表 8-9)。立入検査は、施設にとって面倒なことではなく、施設の健康診断としての意味合いを周知できないかと考えられた。

C9. 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(WG)では、当研究班の成果を管理要領あるいは手引きに引用することを目指している。モノクロラミンおよびオゾンによる消毒法は、評価が十分得られた段階で、その成果を管理要領あるいは手引きに追加することとした。ろ過器の逆洗浄および高濃度塩素消毒の説明を協議したが文章の完成には至らず、継続とした。

検討会を9回開催し、手引きで例示するチェックシートを作成した(資料 9-1、9-2、9-3)。環境衛生監視員が入浴施設において把握すべきと想定されるすべての設備を網羅するように、給水施設、給湯施設、浴槽とそれに附随する設備を把握するためのチェックシートとした。レジオネラ関連構造

衛生管理チェックリストは、入浴施設の監視指導の際に、公衆浴場における衛生等管理要領あるいは各自治体の条例等に合致しているかを把握するためのものとした(資料 9-4)。これらを各自治体で利用する際は、対象施設に応じた内容に作り替えることを想定している。

手引きに対して 9 自治体から 85 の要望と意見を集めることができた(表 9-1)。これら要望、衛生管理に関する質問、現場で遭遇する疑問などを精査し、対応を検討している。手引き本文への追加、Q&A の作成、チェックシートの例示等を想定して作業を進める予定である。

C10. 外部精度管理の選択肢整備へ向けた検討と英国 UKHSA の EQA *Legionella* isolation scheme への参加

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情報を収集して表にまとめた(表 10-1)。昨年度からの大きな変更点として、英国 UKHSA の外部精度管理(EQA)の国内代理店が年度末に「あり」になった。今後は日本国内から容易に参加できるようになる予定である。

この EQA の G132(令和 5 年 10 月実施)に大阪健康安全基盤研究所が参加した。EQA の検査指示書(instruction sheets)は、UKHSA のサイトに英語、フランス語など 6 か国語で公開されている(<https://www.gov.uk/government/publications/legionella-scheme-sample-instruction-sheets>)。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」のみであり、自施設の SOP に沿った方法で行うものであった(図 10-1)。試料は 2 種類あり、指示書通りに Page's saline(または、1:40 Ringers' solution)で溶解して試料水を作製した。溶解方法は動画も用意されていた(<https://youtu.be/5IXHoiwIGpE>)。

試料の内容物はチューブのキャップラベルと同

じ色(緑・青)で色付けされおり、溶解を容易に目視で確認できた。この試料水から酸処理・熱処理等の前処理を含む通常の方法でレジオネラを検査し、検出/不検出、菌数、菌種等を報告した。今回参加した EQA の試料には、コロニーの形状がレジオネラ様のレジオネラ属菌以外の細菌も含まれていた(図 10-1)。L-システイン要求性試験など性状試験を正しく行わなければ鑑別できない内容になっており、環境水試料に非常に近い実践的な内容であった。外部精度管理は日常的に行われている各施設の方法で参加して検査精度を確認するものであり、EQA はこれを満たすものであった。換言すると、EQA は日本国内の標準的なレジオネラ属菌検査法で問題なく参加できることを確認した。報告期限日から 10 日で解答が送付され、20 日後に分析レポートが送付された。分析レポートには、Z スコアや参加者の報告菌数が全体のどの位置に分布しているかなどが示されていた。

C11. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

実検体におけるレジオラート/QT 法と平板培養法は高い一致率を示した。平板培養法と比較したレジオラート/QT 法(未処理)の感度は 84.7%、特異度は 93.9%であり、結果一致率は 92.6%であった(表 11-1)。レジオラート/QT 法(酸処理)と平板培養法を比較すると、特異度は 98.6%と向上したが、感度は 55.4%と低下した(表 11-2)。なお、レジオラート/QT 法(酸処理)とレジオラート/QT 法(未処理)を比較すると、未処理を基準に感度 54.2% 特異度 99.3%であった(表 11-3)。これまで実施した本研究班での検討と同程度であり、改めてレジオラート/QT 法の有用性が示された。

レジオラート/QT 法は酸処理により感度が低下し、検出菌量も低下した。レジオラート/QT 法の未処理と酸処理の両方で検出された 32 検体のうち、

(>22,726 MPN/100mL の 1 検体を除いた)31 検体の菌量を比較したところ、酸処理により 23 検体で減少し、平均 79%、中央値 62%となった。酸処理の実施は検査目的で異なり、ルーチン検査や雑菌の抑制を目的に特異性を求める(酸処理する)か、低い菌量からの汚染源調査を目的に感度を求める(酸処理しない)といった使い分けが考えられた。

レジオラート/QT 法の未処理・陽性、酸処理・陰性であった 27 検体のうち、レジオラート培養液からレジオネラ属菌が分離できたものは 12 検体とさほど多くはなかった(表 11-4)。逆にレジオネラ属菌が分離されなかった 14 検体中の 8 検体は平板培養法においてもレジオネラ属菌が検出されず、他は菌数の少ないものが多かった(1 検体だけ平板培養法 1,000 CFU/100mL の高い値の原因は不明)。

レジオラート陽性ウェルからレジオネラを培養したところ、おおむね平板培養法と同一血清群の *L. pneumophila* が検出された。25 検体から *L. pneumophila* (1 検体から *L. dumoffii*) が検出され、うち 19 検体から平板培養法と同一の血清群、6 検体は平板培養法では検出されなかった血清群や菌種が検出された。特に 3 検体で SG1 が検出され、複数ウェルに分散しての培養は、血清群や菌種を分けて取得するのに有利と考えられた。

レジオラート/QT 法(未処理)の培養液から *Stenotrophomonas* sp.他の雑菌が検出された 9 検体は、酸処理によりこれらを抑制して、レジオラート法の偽陽性を防ぐことができたと考えられた(表 11-4)。*Aeromonas* sp.の 1 菌種、*Pseudomonas* sp.の 2 菌種、*Klebsiella aerogenes* の 1 菌種をレジオラート/QT 法に植え継ぐと偽陽性を示し、酸処理はこれらの除外に有効であった。

一連の試験中に、平板培養法・陰性、レジオラート/QT 法・陽性でレジオネラが確認されたものも

あり、どちらかが劣るといった比較の問題ではなく、菌数が少なかったり凝集などの偶然によるばらつきが結果に反映されてしまうことが不一致の理由と推察された。検査目的によっては、遺伝子検査を含め、複数検査法の併用が推奨と考えられた。

C12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の改良と普及

コントロール DNA として用いる人工遺伝子は、GenBank/ENBL/DDBJ の accession no. の塩基配列に従って、各プライマーで増幅される領域を持つように設計、作製された(表 12-1)²⁶⁾。これらの人工遺伝子をコントロールとして用いて *Legionella* SG pre-mix primer set を用いて PCR を行うと、適切な大きさの増幅産物が確認できた。

増幅産物をアガロースゲル電気泳動してバンドサイズを測定するには、100 bp ラダーマーカー等を一緒に泳動しただけでは判断に苦慮することがある。抽出ゲノム DNA を混合したポジティブコントロールは、調製が煩雑で保存時の安定性に難があった。これらの課題を人工遺伝子の合成で解消した。

本方法は、令和 5 年 6 月から市販されることで普及が図られた(資料 12-1)。キットにはプライマーおよびコントロール DNA が含まれ、レジオネラレファレンスセンターが購入し、希望する 72 地衛研に配布され、全国的に使用可能となった。従来の血清群別法では、型別不能となる菌株が多く存在したが、本法では判定不能とならず、疫学調査に有用と考えられる。

本法は分離菌株を対象と想定したが、早速応用が進み、レジオネラの分離培養ができなかった喀痰から、起因菌の SGg13 同定事例が報告された⁴⁵⁾。これまで喀痰 DNA からの直接同定が可能な血清群は SG1 だけだったが⁴⁶⁾、本法の活用で SG1 以外も同定可能と初めて示された。

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

遺伝子型 ST1 の全ゲノムを比較した結果、*L. pneumophila* str. Paris 株を Reference 株として、Core genome size は 2,966,943 bp となり、ゲノムカバー率は約 85%であった。ST1 は相同組換えが多く、多様度の高い遺伝系統であることが報告されているが^{30,47)}、国内で分離された ST1 菌株においても同様の傾向であることが明らかとなった。

ST1 は大きく 4 つの Clade (I-IV) に分岐した (図 13-1)。Clade I は院内感染事例、Clade II は浴槽水由来が多い系統、Clade III と IV は冷却塔水由来が多い系統となった。各 Clade 間の SNVs は 600 個以上検出され、ここでは系統樹として図示した。

院内感染事例の患者分離株と給湯系統に由来の分離株が共に Clade I に存在しており、株間の SNV は数個であった。なお同じ病院の冷却塔分離株は Clade III と IV に存在し、給湯系統が感染源と改めて確認できた。

Region C の散発例は Clade I に含まれており、今後、給湯系の汚染対策が重要になるかもしれない。

ST138 の全ゲノムを比較した結果、全体の株間の SNVs は約 50 個以内と ST1 よりも少なく、ここではハプロタイプネットワーク図として示した (図 13-2)。Reference として *L. pneumophila* str. Paris 株用いたところ、疫学的に関連性のない Region B の浴槽水由来株と集団事例株の間で SNVs が 0-3 個と少なく分離が悪かった。そこで、ST138 の完全長配列を取得して Reference 株としたところ、Core genome size が、2,564,350 bp から 2,834,011 bp となり、コアゲノム領域が 269,661bp も拡大された。株間の SNVs 数も増加し、解像度はより高くなった (図 13-2)。近縁な株を Reference 株とする方がより

高解像な結果が得られた。

しかしそれでも、離れた地域で分離された、疫学的に関連性のないと考えられる株間であっても SNVs が 10 個以内と少なかった。図で説明すると、集団事例の分離株 (緑色、Region A) が図の上方に広がって多様性があるのに比べて、複数に由来する分離株が図の下方に小さくまとまった (図 13-2)。ST138 は、ST1 と比較して多様性に乏しく、感染源調査に注意を要すると考えられた。すなわち、感染源を判断する SNVs 数は、ST 型に応じて慎重な検討が必要と考えられた。菌株間の SNVs 数を行政判断の根拠にできるよう、分離株の全ゲノム解析を蓄積することが課題と考えられた。

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。

①高 pH や薬湯でのモノクロアミン消毒の効果と有用性を改めて詳細に確認できた。高 pH の実施でモノクロアミン消毒の試験を行い、消毒法の普及にも努めた。モノクロアミン消毒下の菌叢を解析した範囲において、病原細菌の増加は認められず、生活環境やヒト常在菌が検出されるにとどまり、特段の問題はなかった。ろ過器をオゾン消毒するだけでは不足で、逆洗の必要性が強く示唆された。すなわち消毒だけで解決しようとせず、洗浄の重要性が改めて指摘された。ろ過器のレジオネラはオゾン消毒で死滅しなかったが、逆洗と消毒が適切に行われていれば、浴槽水中のレジオネラ属菌は不検出を続けられた。これとは別に、遊離塩素消毒 0.4mg/L は浴槽水のレジオネラを抑えるのに有効であることが改めて指摘された。洗濯機や加湿器からレジオネラが検出され、浴槽に限らず身の回りの生活環境を含め、洗浄や消毒が大事であることを繰り返し注意喚起する結果であった。

②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望まれていた。遺伝子検査法やフローサイトメトリーなどの迅速な検査法を活用して、5 施設と丁寧な対話を行い、汚染を特定したり、管理の向上につなげることが出来た。レジオネラの培養検査は時々の確認にとどめて、平時のルーチン検査としては、培養ではない、こうした迅速な検査での管理が有効と考えられた。

③保健所の職員を対象に、アンケート調査を行い、公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態が明らかになった。多くの自治体でレジオネラ症への対応が取られており、規定や通知を通じて、現場施設の衛生が向上するように働きかけることができると考えられた。保健所職員の 1~2 人が 1 時間程度で立入検査を行っており、見直した手引きと作成したチェックシート等がそうした活動に利用されると想定される。寄せられた要望に対応して、より向上を目指したい。

④難しいレジオネラ培養検査の問題を改善するために、外部精度管理の選択肢を増やしている。UKSHA の EQA の場合、本当の試料に近い、夾雑菌を含む試料が届いており、各検査機関の日常的な検査法での参加が必要な、実践的な精度管理であった。参加者の本当の検査精度が明らかになることと、検査精度の向上がより期待できるものと言えた。他方で、難しい培養検査を避けられる新規のレジオラート法の検討も進めており、この新規の方法であっても従来からの平板培養法と高い一致率が得られている。指摘されていた偽陽性は酸処理により抑えられるので、検査目的により酸処理のありなしを選択して、精度に悩むことなく検査が可能となった。

⑤レジオネラ血清型別のための multiplex-PCR 法の改良と普及が進んだ。キット化・市販され、全国的に使用可能となり、早速の応用例が報告されていた。従来の血清型別は抗体試薬を 4°C で保

管する必要があったが、遺伝子の試薬は冷凍保管できるので、長期保管の安定性や費用で有利と言えた。血清型別は疫学にも大事なことから、型別不能が減少することで、感染源調査も向上が期待できる。さらなる分子疫学の向上に、全ゲノム解析も進めており、国内で比較的よく検出される ST138 型のような多様性が乏しいといった課題も見出された。この様なデータの蓄積により、将来の疫学調査に備えつつある。全ゲノム配列を用いた感染源調査には、ヒト分離株は 2 株で変異を把握できるのに対して、環境分離株では複数が必要であることが実測で示された。

D. 結論

D1. pH10 のアルカリ性温泉におけるモノクロミン消毒効果と菌叢解析

pH10 程度のアルカリ性温泉において、モノクロミン消毒によるレジオネラ属菌に対する消毒効果を再確認することができた。モノクロミン消毒時に増加傾向にあった 16S rDNA コピー数は、EMA 処理により遊離塩素消毒時と同程度まで低下した。モノクロミン消毒により菌叢の変化が生じ、自然環境由来の菌種から、生活環境やヒト常在菌の菌種に変化したと考えられた。

D2. 薬湯および高アルカリ温泉水中の *Legionella pneumophila* に対するモノクロミンと遊離塩素の消毒効果

高アルカリ温泉水と薬湯中の *L. pneumophila* に対して、試験管内消毒試験を行い、遊離塩素消毒よりも、モノクロミン消毒の方が有効であることを改めて確認した。

D3. 家庭用洗濯機におけるレジオネラ属菌の汚染実態

調査した全ての洗濯機から生菌に相当するレ

ジオネラが LC EMA-qPCR 法により検出され、洗濯機はレジオネラ症の感染源となる可能性が改めて示唆された。

D4. 加湿器のレジオネラ汚染

高齢者福祉施設を対象にアンケート調査を行い、回答が得られた施設中の 2 割(=9/48)で超音波加湿器が使用されていた。例数が少なく参考にとどまるが、214 検体中の 1 検体からレジオネラ属菌が培養陽性であった。PCR を行い産物の塩基配列を読み取りした 17 検体のうち、1 検体は *Legionella pneumophila* と一致した。別の 1 検体は *L. quinlivanii*、他は *Legionella sp.* であった。加湿器はレジオネラに汚染される環境であることを改めて認識した。

D5. 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

循環ろ過器を対象とした電解オゾン水による消毒・洗浄のスケールアップを検討した。ろ過器有効容量 1.8m³ のろ過器に対して、オゾン濃度 0.5~0.9(平均 0.7)mg/L の電解オゾン水を毎日逆洗前に注入した。オゾン消毒の開始直後 3 週間は、オゾン消毒前の逆洗水から 10~120 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出され、ろ過器の化学洗浄後であっても、ろ過器の汚れが目立った。ろ過器の使用(循環)と逆洗が停止した約 2 ヶ月間は、オゾンを注入したにも関わらず、ろ過器内水のレジオネラ属菌は 20 CFU/100mL から 7,900 CFU/100mL まで対数増殖し、逆洗による汚れの排出が非常に重要と示唆された。ろ過器の使用(循環)と逆洗が再開された後は、オゾン消毒前の逆洗水のレジオネラ属菌は、約 4 ヶ月間継続して不検出となった。オゾン消毒後のオゾン排水からレジオネラ属菌およびアメーバが断続的に検出され、ろ過器内の微生物は死滅しなかった。

D6. 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

フローサイトメトリーや遺伝子検査に塩素濃度測定の前培養検査法を用いて、5 つの施設との丁寧な対話により、汚染を特定したり、管理を向上することが出来た。

D7. 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

公衆浴場における遊離残留塩素消毒は濃度維持(0.4 mg/L 以上)が重要なこと、迅速なレジオネラ検査として遺伝子検査(LAMP 法等)が有用なことが改めて明らかであった。全ゲノム配列を用いた感染源調査は、ヒト分離株は 2 株で variant を把握できるのに対して、環境検体からは複数株が必要であった。

D8. 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

21 自治体 36 保健所の職員を対象に、アンケート調査を行い、公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態が明らかになった。調査対象の全てで、国の規定もしくは都道府県や市独自の規定のどちらか、もしくは両方を基に監視指導を行っていた。61%で監視回数や指導内容等を定める「監視指導要領」「監視指導計画」等を整備し、半数以上で立入検査手法や監視時の指導項目等を記載した「監視指導マニュアル」「監視指導手引き」等を整備していた。旅館業や公衆浴場の施設を対象としたレジオネラ属菌陽性時の「対応マニュアル」を 81%で整備しており、レジオネラ症患者発生時の「対応要領」や「対応マニュアル」等は 67%で整備していた。立入検査人数は平均 1.7 人、所要時間は平均 53 分であった。立入検査時に、維持管理記録と浴槽水の換水頻度の確認は全て

で行われており、浴槽水や貯湯槽、ヘアキャッチャー、残留塩素濃度の衛生状態も 94%以上で確認されていた。立入検査時に「施設の詳細がわかる(施設側の)担当者が不在で、監視項目を十分に確認できないことがある」が 72%と、事前調整を行っているにも関わらず、十分な確認ができず困っていた。

D9. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

入浴施設の衛生管理の手引きの見直しとチェックシートの作成等を行った。WG では消毒法の成果を管理要領または手引きに追加することを検討した。検討会では入浴施設の設備と衛生管理の状況を把握するためのチェックシートを作成した。手引きに対する要望等を収集し、それらに対する対応を検討している。

D10. 外部精度管理の選択肢整備へ向けた検討と英国 UKHSA の EQA *Legionella* isolation scheme への参加

今年度に参加した UKHSA EQA は、環境水試料に近い試料が用意されて、日常的に行われている国内検査施設の SOP に沿った方法で参加可能であった。年度末に国内代理店が設定されて、日本国内から容易に参加できるようになった。レジオネラ外部精度管理の選択肢が整いつつある。引き続き課題の抽出と改善に努める。

D11. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

実検体におけるレジオラート/QT 法と平板培養法は高い一致率を示した。レジオラート/QT 法試験の前処理として、浴槽水試料の酸処理は有用であった。酸処理により感度が低下し、検出菌量も低下したが、雑菌を抑制し偽陽性を防いだ。

D12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための

multiplex-PCR 法の改良と普及

コントロール DNA が人工遺伝子の合成で用意され、サイズ判断、ポジティブコントロールの調製と保存の課題が解消した。キット化・市販されて、72 地衛研に配布されて全国的に使用可能となった。分離培養できなかった喀痰に応用されて、SGg13 の同定事例が報告された。

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

国内で比較的良好に検出される遺伝子型の ST1 と ST138 の全ゲノム解析を行い、ST 型によって多様性が異なることが明らかとなった。ST138 型のような多様性に乏しい場合は、感染源の判断に注意を要すると考えられた。

以上、公衆浴場の衛生管理の推進に有用な結果を得た。pH10 程度のアルカリ性温泉において、モノクロアミン消毒によるレジオネラ属菌に対する消毒効果を再確認できた。モノクロアミン消毒中の菌叢は、生活環境やヒトの常在菌に変化した。試験管内消毒試験により、高アルカリ温泉水と薬湯中の *L. pneumophila* に対して、遊離塩素消毒よりモノクロアミン消毒が有効と確認した。洗濯機と加湿器からレジオネラが検出され、このような生活環境中の感染源について改めて注意喚起となった。循環式浴槽のろ過器にオゾンを注入しただけではレジオネラが増殖してしまい、逆洗による汚れの排出が非常に重要と示唆された。ここで逆洗が適切に行われていれば、遊離塩素消毒の併用もあって、浴槽水中のレジオネラ汚染は抑えられた。ただしオゾン逆洗を継続しても、ろ過器内の微生物は死滅しなかった。フローサイトメトリーや遺伝子検査に塩素濃度測定の新培養な検査法を用いて、5つの施設との丁寧な対話により、汚染を特定したり、管理を向上することが出来た。遺伝子検査

が迅速なレジオネラ検査として有用なこと、遊離塩素濃度 0.4mg/L 以上の重要性が改めて示された。全ゲノム配列を用いた感染源調査には、ヒト分離株は 2 株で変異を把握できるのに対して、環境分離株では複数が必要であることが実測で示された。保健所の職員を対象にアンケート調査を行い、公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態が明らかになった。訪問の事前調整を行っているにも関わらず、施設側の担当者が不在で監視項目を十分に確認できないといった困難が見出された。入浴施設の衛生管理の手引きの見直しとチェックシートの作成等が行われた。外部精度管理の一つ英国 UKHSA の EQA に参加し、本物の環境水に近い試料が用意され、培養前処理ありの日常的な検査方法での参加が可能であった。レジオネラ属菌の新規培養検査法として、レジオラート/QT 法は従来の平板培養法と高い一致率が得られた。培養前の酸処理により感度が若干低下したが、雑菌による偽陽性は抑制された。レジオネラ血清型別のための multiplex-PCR 法の改良と普及が進んで全国的に使用可能となり、分離培養ができなかった喀痰への応用例が報告されていた。国内で比較的良好に検出される遺伝子型の ST1 と ST138 の全ゲノム解析を行い、ST 型によって多様性が異なること、多様性に乏しい ST138 型などは感染源の判断に注意を要することが示された。感染源調査には、ヒト分離株は 2 株で変異を把握できるとして、環境分離株ではなるべく多い複数が必要と実測で示された。

E. 引用文献

- 1) 杉山寛治:環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御¹⁰⁾ 浴槽のレジオネラ対策③ モノクロラミンによる消毒方法について, 防菌防黴, 47, (2019), 159-166
- 2) 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, 植松香星, 望月映希, 鶴田英美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二: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, 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
- 5) 泉山信司, 藤井 明 他: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 30 年度分担研究報告書.
- 6) 藤井 明, 渡邊貴明, 松田宗大, 松田尚子, 小倉 徹, 植園健一, 枝川亜希子, 泉山信司, 薬湯使用時におけるモノクロラミン消毒の有用性評価, 2019, 第 46 回建築物環境衛生管理全国大会, 東京都.

- 7) 日帰り温泉施設におけるレジオネラ症集団発生事例—埼玉県. IASR. 2013, Vol 34, 157-158.
- 8) 日帰り入浴施設におけるレジオネラ症集団発生事例と衛生管理上の対策—神奈川県. IASR. 2016, Vol. 37, 140-141.
- 9) Gleason JA, Conner LE, Ross KM. Associations of Household Factors, Hot Water Temperature, and Chlorine Residual with *Legionella* Occurrence in Single-Family Homes in New Jersey. *Sci Total Environ.* 2023;870:161984.
- 10) Hayes-Phillips D, Bentham R, Ross K, Whiley H. Factors influencing *Legionella* contamination of domestic household showers. *Pathogens.* 2019, 8:27.
- 11) Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. *Epidemiol Infect.* 2017, 145:1398–1408.
- 12) 山口蒼生 ほか:ウイルス性呼吸器疾患に及ぼす影響, 臨床と微生物 Vol.49 No.6 673-679 (2022)
- 13) 竹下健一 ほか:細菌性呼吸器疾患に及ぼす影響, 臨床と微生物 Vol.49 No.6 681-685 (2022)
- 14) 厚生労働省、レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針の一部改正(平成30年8月3日厚生労働省告示第297号により一部改正)
- 15) Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Preventing Health-Care–Associated Pneumonia, 2003 (Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee). *MMWR* 2004/ 53 (RR03); 1-36.
- 16) 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>).
- 17) 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>).
- 18) (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.
- 19) (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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani JI, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M; Working Group for *Legionella* in Japan. *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018 Aug 31;84(18):e00721-18.
- 25) 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、161、43-50、2018
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Kozak-Muiznieks NA, Lucas CE, Brown E, Pondo T, Taylor TH Jr, Frace M, Miskowski D, Winchell JM. 2014. Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J Clin Microbiol* 52:201–211.
- 29) Cassier P, Campese C, Le Strat Y, Che D, Ginevra C, Etienne J, Jarraud S. 2015. Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaires disease cases in France. *New Microbes New Infect* 3:29–33.
- 30) David S, Sánchez-Busó L, Harris SR, Marttinen P, Rusniok C, Buchrieser C, Harrison TG, Parkhill J. 2017. Dynamics and impact of homologous recombination on the evolution of *Legionella pneumophila*. *PLoS Genet* 13:e1006855.
- 31) Clokie BGJ, Elsheshtawy A, Albalat A, Nylund A, Beveridge A, Payne CJ, MacKenzie S: Optimization of Low-Biomass Sample Collection and Quantitative PCR-Based Titration Impact 16S rRNA Microbiome Resolution. *Microbiol Spectr.* 2022 21; 10(6):e0225522.
- 32) 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.
- 33) Mori, Y., Nagai, Y., Sato, D., Toyoda, M., Kameyama, Y., Tanimoto, K., Kobayashi, A., Yoshimura, H., Izumiyama, S., Effects of monochloramine and free disinfection on alkaline hot spring water as shown by inactivation experiments with *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*, 2023, *J. Hot Spring Sci.*, **73**, 46-55.
- 34) 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.
- 35) Nakanishi N, et al. 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.
- 36) David S, et al. Low genomic diversity of *Legionella pneumophila* within clinical specimens. *Clin Microbiol Infect*. 2018, 24(9):1020.e1-1020.e4.
- 37) Lee K, Iguchi A, Uda K, Matsumura S, Miyairi I, Ishikura K, Ohnishi M, Seto J, Ishikawa K, Konishi N, Obata H, Furukawa I, Nagaoka H, Morinushi H, Hama N, Nomoto R, Nakajima H, Kariya H, Hamasaki M, Iyoda S. Whole-Genome Sequencing of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* OX18 from a Fatal Hemolytic Uremic Syndrome Case. *Emerg Infect Dis*. 2021 May;27(5):1509-1512.
- 38) 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.
- 39) Kristyanto S, Lee SD, Kim J: *Porphyrobacter algicida* sp. nov., an algalytic bacterium isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017 ;67(11):4526-4533.
- 40) Kubota H, Mitani A, Niwano Y, Takeuchi K, Tanaka A, Yamaguchi N, Kawamura Y, Hitomi J: *Moraxella* species are primarily responsible for generating malodor in laundry. *Appl Environ Microbiol*. 2012 78(9):3317-24.
- 41) Ahmed N, Joglekar P, Deming C; NISC Comparative Sequencing Program; Lemon KP, Kong HH, Segre JA, Conlan S: Genomic characterization of the *C. tuberculostearicum* species complex, a prominent member of the human skin microbiome. *mSystems*. 2023 21;8(6):e0063223.
- 42) 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.
- 43) 藤田賢二 監修:水道工学, pp.281、技報堂出版(株)、2006 年 10 月.
- 44) 水道技術研究センター、高度浄水処理に関する基本事項, pp.1-11、水道事業における高度浄水処理の導入実態及び 導入検討等に関する技術資料より、2009 年 3 月 (<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/jousui/dl/01b.pdf>, 2024 年 2 月 28 日時点)
- 45) Seto J, Takahasi J, Sampei M, Ikeda T, Mizuta K. A case of *Legionella pneumophila* serogroup 13 pneumonia based on the detection of serogroup-specific genes in culture-negative sputum. *Jpn J Infect Dis. JJID*.2023.302. 2023.
- 46) Mérault N et al. Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. *Appl Environ Microbiol*. 77:1708-1717. 2011.
- 47) Mercante JW, Caravas JA, Ishaq MK, Kozak-Muiznieks NA, Raphael BH, Winchell JM. Genomic heterogeneity differentiates clinical and environmental subgroups of *Legionella pneumophila* sequence type 1. *PLoS One*. 2018 Oct 18;13(10):e0206110.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 紙上発表

- 1) Mori Y, Nagai Y, Sato D, Toyoda M, Kameyama Y, Tanimoto K, Kobayashi A, Yoshimura H, Izumiya S. Effects of monochloramine and free disinfection on alkaline hot spring water as shown by inactivation experiments with *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*, 2023, J. Hot Spring Sci., **73**, 46-55.
- 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) Kanatani J-i, Fujiyoshi S, Isobe J, Kimata K, Watahiki M, Maenishi E, Izumiya S, Amemura-Maekawa J, Maruyama F, Oishi K. Correlation between bacterial microbiome and *Legionella* species in water from public bath facilities by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Microbiol Spectr.* 2024 Apr 2;12(4):e0345923.
- 4) 前川純子:レジオネラとレジオネラ症. *モダンメディア*. 69:219-225. 2023.
- 5) 的場洋平、瀬戸順次、池田辰也、水田克巳、遠藤優子、三浦朗子、青木敏也、藤井俊司、佐伯 歩、前川純子、明田幸宏. *ダイレクト sequence-based typing 法により感染源を追究した自宅浴槽での Legionella pneumophila 感染事例—山形県*. *IASR*. 44:207-208. 2023
- 6) Komatsu S, Tanaka S, Nakanishi N. Prevalence and genetic distribution of *Legionella* spp. in public bath facilities in Kobe City, Japan. *J Water Health*. 2023 Nov;21(11):1727-1734.

7) 藤永千波、小松頌子、田中忍、八木正博、中西典子、大久保祥嗣、向井健悟. 市内浴場施設における理化学検査とレジオネラ属菌検出との関連性について. *神戸市健康科学研究所報* 第 51 巻 58-61 頁 2023.

8) 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) Kura F, Amemura-Maekawa J, Izumiya S. Sources of infection and settings in outbreaks of legionellosis -- Japan, 2018-2022. The 7th ESGLI meeting (ESCMID Study Group for *Legionella* Infections). Oct 2023, Crete, Greece.
- 2) 柳本恵太, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二, 植松香星, 山上隆也, 久田美子, 泉山信司:モノクロミン消毒を行った高アルカリ性温泉における菌叢解析, 令和5年度山梨県衛生環境研究所成果発表会, 2024 年 3 月, 山梨県
- 3) 森 康則, 永井佑樹, 佐藤大輝, 豊田真由美, 亀山有貴, 谷本健吾, 小林章人, 吉村英基, 泉山信司, 高アルカリ温泉水中のモノクロミンと遊離塩素による *Mycobacterium phlei* と枯草菌、大腸菌の消毒効果の比較, 日本温泉科学会第 76 回大会, 2023 年 9 月, 山口県.
- 4) 小森正人, 住谷敬太, 泉山信司, 田栗利紹, レジオネラ属菌を指標とした温浴施設循環式ろ過器の電解オゾン水による消毒方法の検討, 第 26 回日本水環境学会シンポジウム, 2023 年 9 月, 大阪府
- 5) 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 32 回年次研究講演会, 2023 年.
- 6) 田栗利紹, 蔡 国喜, 加藤定男, 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, 小田康雅, 下田貴宗, 泉山 信司, フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した入浴施設の衛生管理の推進方法, 防菌防黴学会第 50 回年次大会要旨集, 2023.
 - 7) 枝川亜希子, 地方衛生研究所全国協議会レジオネラレファレンスセンター会議、「レジオネラ属菌検査精度管理について」、2023 年 7 月 20 日、オンライン会議
 - 8) 前川純子. レジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の開発のための研究. 第 87 回ウォーター研究会. 2023 年 6 月. 東京.
 - 9) 中臣昌広, 井上浩章, 前川純子. 令和 4 年台風 15 号による大雨被災地からの泥から検出されたレジオネラ属菌について. 日本防菌防黴学会第 50 回年次大会. 2023 年 8 月. 大阪.
 - 10) 小松頌子、田中忍、中西典子. 公衆浴場から分離されたレジオネラ属菌の生態学的・遺伝的特徴(2016~2021). 日本防菌防黴学会第 50 回年次大会. 2023 年 8 月
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. 2023 年 5 月. Web 対応.
 - 2) 前川純子:レジオネラ検査法. 令和 5 年度新興再興感染症技術研修. 2023 年 10 月. web 対応.
 - 3) 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. 2023 年 11 月. 和光市.
- 4) 前川純子:レジオネラ症および検査法全般. 令和 5 年度「地域保健総合推進事業」関東甲信静ブロック地域レファレンスセンター連絡会議. 2023 年 11 月. Web 対応.
 - 5) 佐伯 歩:レジオネラ分子疫学解析. 令和 5 年度「地域保健総合推進事業」関東甲信静ブロック地域レファレンスセンター連絡会議. 2023 年 11 月. Web 対応.
 - 6) 泉山信司:公衆浴場のレジオネラ対策を目的としたモノクロミン消毒の解説. 令和 5 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2024 年 2 月、Web 対応
 - 7) 泉山信司:レジオネラ培養検査と消毒の問題を各種検査とモノクロミン消毒で解決したい. 令和 5 年度レジオネラ属菌検査研修会、2023 年 12 月、静岡市
 - 8) 泉山信司:浴場や蛇口等の水環境中で増殖するレジオネラ属菌の対策を目的としたモノクロミン消毒. 令和 5 年度宮崎県・宮崎市レジオネラ属菌汚染防止対策講習会、2023 年 9 月、宮崎市
 - 9) 泉山信司:レジオネラ研究班の取り組み. 日本環境衛生センター第 10 回保健所環境衛生監視員講座、2023 年 9 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
 - 1) 田中孝典、泉山信司、配管の洗浄方法、特許 7453065、発行日令和 6 年 3 月 11 日
 2. 実用新案登録 3. その他

なし

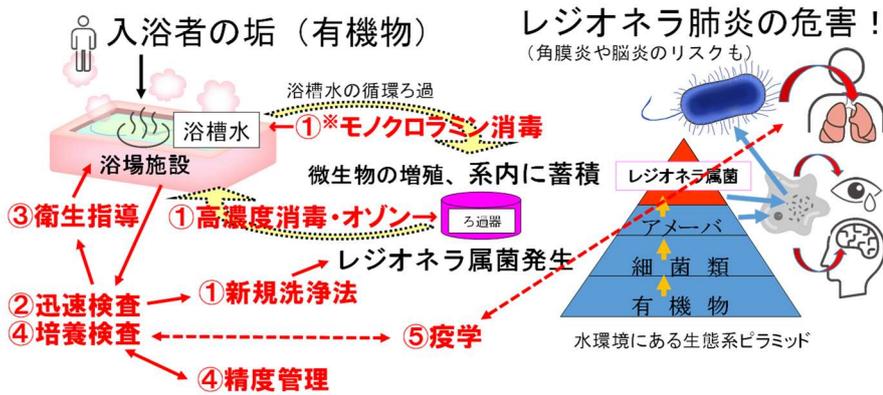


図0 本研究班の編成

※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(あいうえお順、敬称略)

縣 邦雄	アクアスつば総合研究所	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
有田 世乃	静岡県環境衛生科学研究所	杉本 貴之	宮崎県中央保健所
安齋 博文	(財)日本建築衛生管理教育センター	杉山 英視	静岡県環境衛生科学研究所
石田 愛美	岡山県保健医療部生活衛生課	杉山 寛治	株式会社マルマ
石森 啓益	柴田科学株式会社	杉山 順一	(財)日本建築衛生管理教育センター
磯部 順子	富山県衛生研究所	鈴木 史恵	静岡市環境保健研究所
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
井上 浩章	アクアスつば総合研究所	高橋 美徳	静岡市環境保健研究所
植松 香星	山梨県衛生環境研究所	田中 慶郎	株式会社マルマ
梅津 萌子	東京都健康安全研究センター	田中 孝典	花王株式会社
大橋 美至	神奈川県健康医療局	谷本 健吾	三重県保健環境研究所
大森 恵梨子	仙台市衛生研究所	寺井 克哉	静岡県環境衛生科学研究所
緒方 喜久代	(社)大分県薬剤師会検査センター	豊岡 大輔	北海道保健福祉部健康安全局
尾崎 吉純	高知県健康政策部	豊田 真由美	三重県保健環境研究所
尾崎 淳朗	愛媛県保健福祉部	鳥井 良太	株式会社お風呂のシンドー
小田 康雅	シスメックス株式会社	永井 佑樹	三重県保健環境研究所
小野田 早恵	静岡市環境保健研究所	中川 佳子	埼玉県衛生研究所
加藤 定男	長崎県環境保健研究センター	中嶋 直樹	神奈川県衛生研究所
亀山 有貴	三重県保健環境研究所	中臣 昌広	オフィス環監未来塾
木村 哲也	株式会社ヤマト	西里 恵美莉	川崎市健康安全研究所
倉 文明	国立感染症研究所	野本 竜平	神戸市健康科学研究所
小池 真生子	大阪健康安全基盤研究所	久田 美子	山梨県衛生環境研究所
小嶋 由香	川崎市健康安全研究所	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
小松 頌子	神戸市健康科学研究所	藤井 明	健美薬湯株式会社
小森 正人	株式会社ヤマト	細川 賢人	花王株式会社
近 真理奈	埼玉県衛生研究所	宮川 真澄	静岡県環境衛生科学研究所
蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	武藤 千恵子	東京都健康安全研究センター
斎藤 利明	株式会社ヤマト	本宮 恵子	千葉県環境保健研究所
佐伯 歩	国立感染症研究所	森中 りえか	株式会社ファスマック
佐藤 大輝	三重県保健環境研究所	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所
佐原 啓二	東海大学	山口 友美	宮城県保健環境センター
茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社	山本 哲司	花王株式会社
下田 貴宗	株式会社シモダアメニティサービス		

表 1-1 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)	モノクロラミン (mg/L)
導入 3 週間前	10	0	陰性	9.9	0.4	0.5	—
導入 2 週間前	<10	0	陰性	9.8	1.2	1.4	—
導入 1 週間前	<10	0	陰性	9.9	1.2	1.3	—

導入 1 週間後	<10	0	陰性	9.7	—	5.9	6.1
導入 2 週間後	<10	0	陰性	9.8	—	4.3	4.9
導入 3 週間後	<10	0	陰性	9.8	—	3.9	4.7
導入 4 週間後	<10	0	陰性	9.8	—	4.6	5.0

—:測定なし

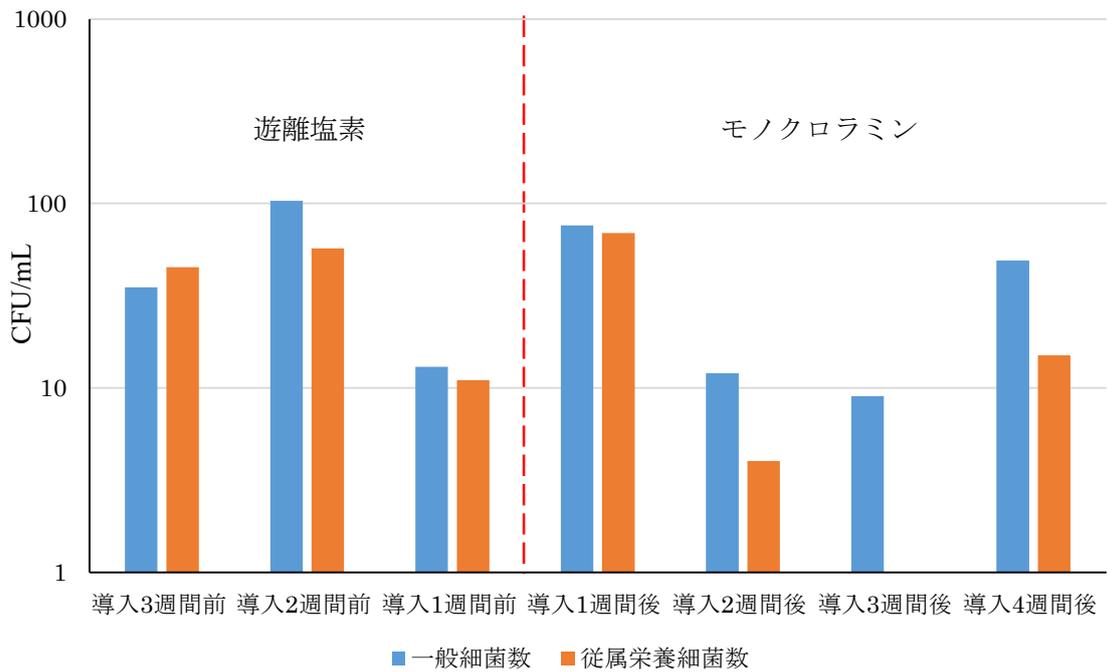
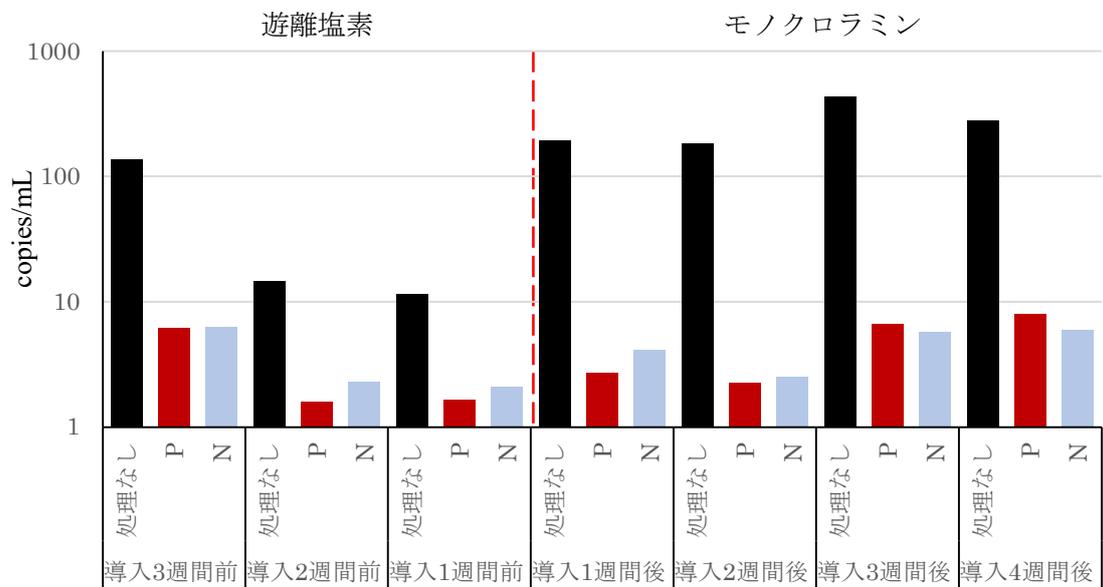


図 1-1 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数



P: グラム陽性菌用 EMA 試薬 N: グラム陰性菌用 EMA 試薬

図 1-2 浴槽水の 16S rDNA コピー数

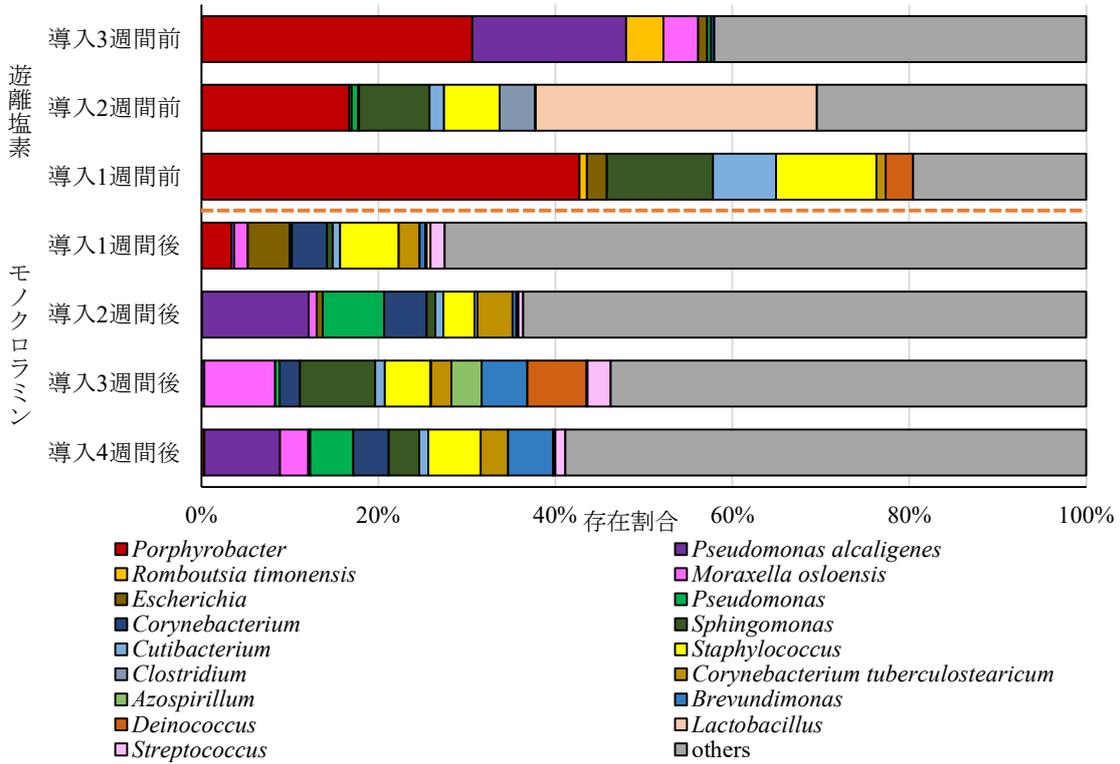


図 1-3 浴槽水の菌叢解析結果 (EMA 非処理)

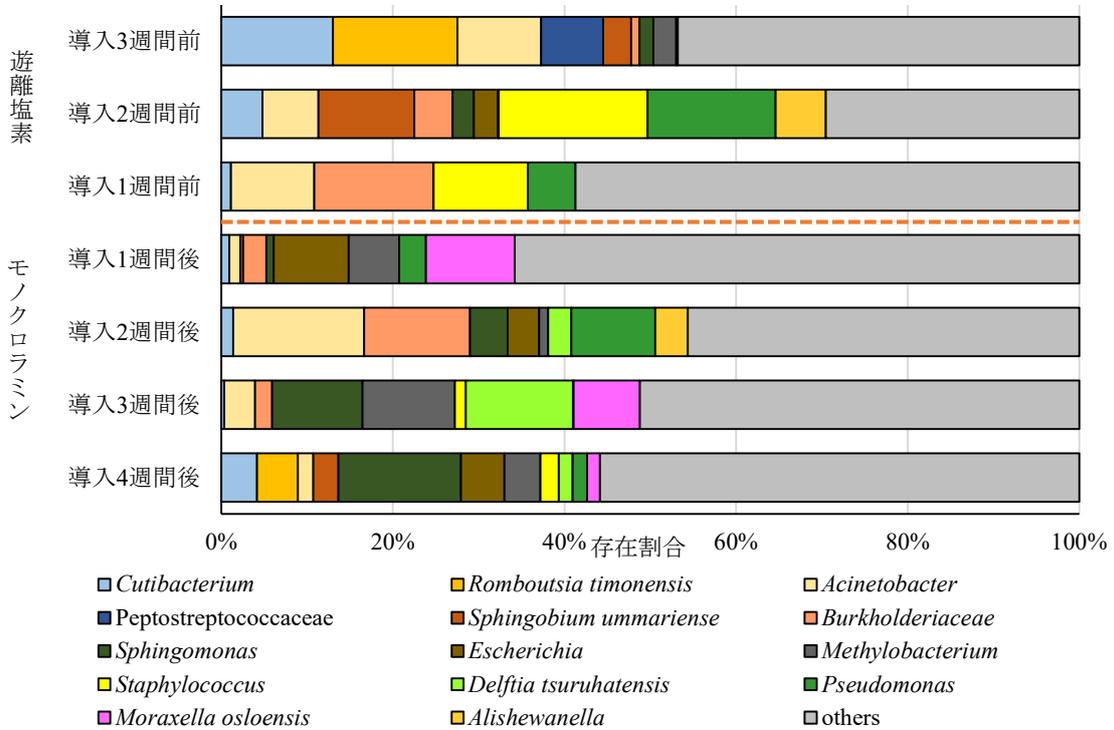


図 1-4 浴槽水の菌叢解析結果 (EMA 処理)
(グラム陽性菌用、陰性菌用の EMA 処理後の平均)

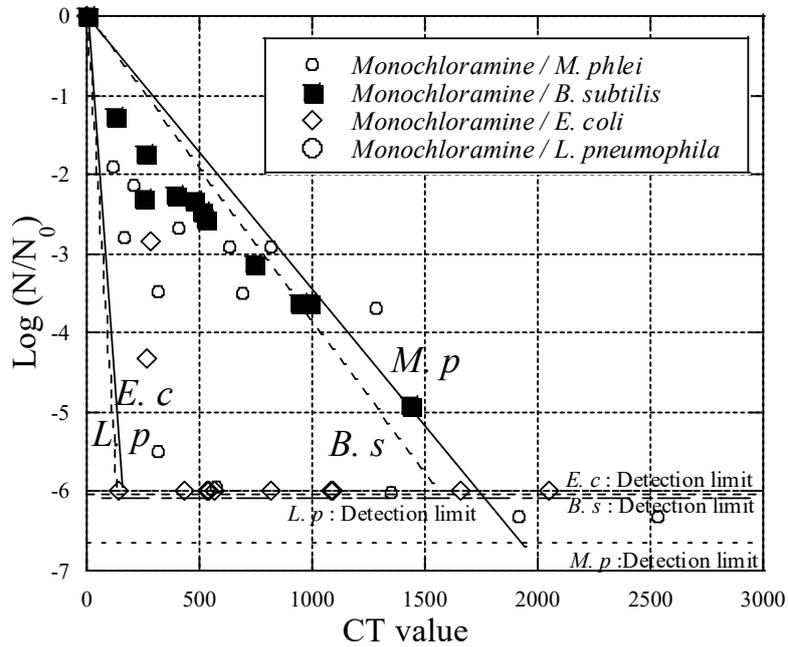


図 2-1 高アルカリ温泉水中の *L. pneumophila*、*M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* に対するモノクロアミン消毒の不活化の比較。実線が *M. phlei*、*E. coli*、破線が *L. pneumophila*、*B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。なお、*M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* のデータについては、Mori et al. (2023)³³⁾を用いた(図 2 も同じ)。

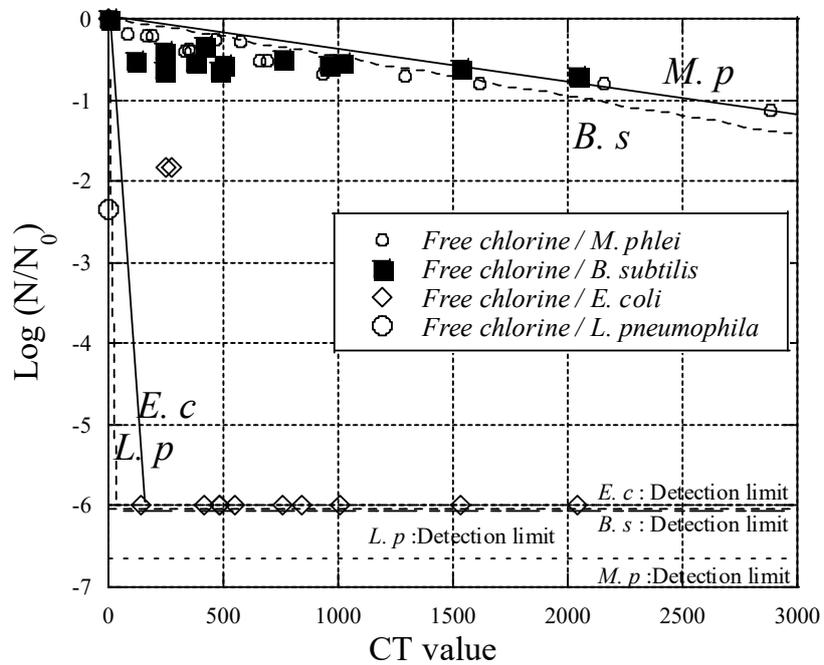


図 2-2 高アルカリ温泉水中の *L. pneumophila*、*M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* に対する遊離塩素消毒の不活化の比較。実線が *M. phlei*、*E. coli*、破線が *L. pneumophila*、*B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

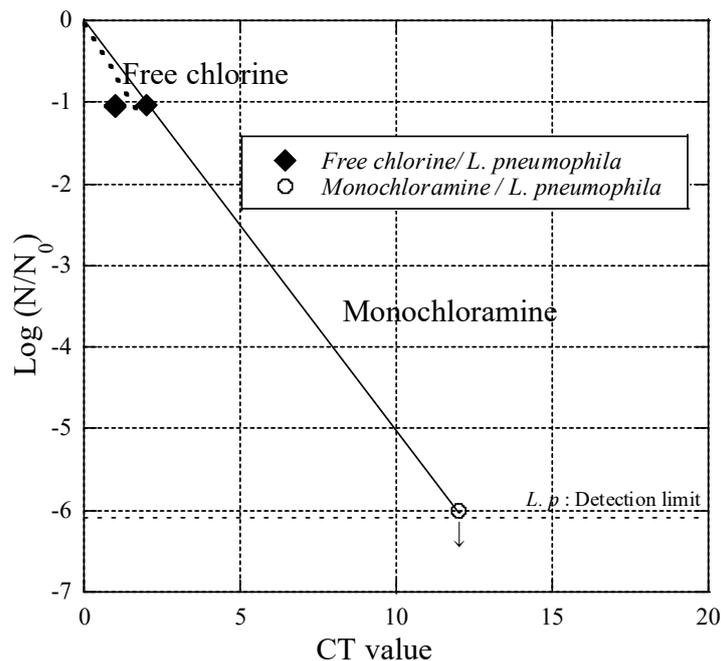


図 2-3 薬湯中の *L. pneumophila* に対するモノクロアミン、遊離塩素消毒の不活化の比較。実線がモノクロアミン消毒、破線が遊離塩素消毒による不活化をそれぞれ示す。モノクロアミンの最も低い CT 値の条件下で菌数が検出限界未満に達していた (○) に ↓ 矢印で表示)。不活化曲線は、最も CT 値が低いプロットと原点を結んだ線を参考表示した。遊離塩素消毒は、薬湯で塩素が消費されたことにより、低い CT 値 (CT2 以下) しか得られていない。

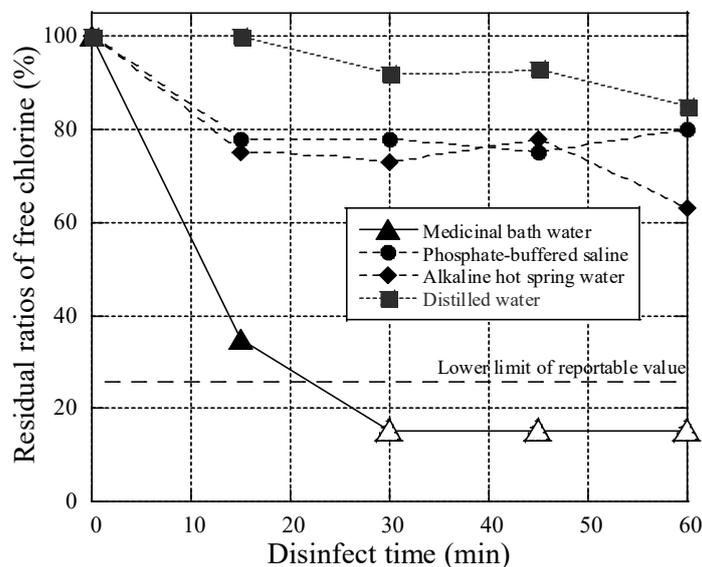


図 2-4 各検液における遊離塩素濃度の経時変化。全ての検液で、遊離塩素濃度の初期濃度が 0.4mg/L となるよう相当量を添加した。なお、薬湯の 30 分後、45 分後、60 分後は、報告下限値未満まで低下し、偽陽性の可能性も考えられるため、△プロットの参考表示とした。

表 3-1 大学の部活寮で使用している洗濯機の拭き取りスワブ検体(スワブ液)の結果

検体番号	レジオネラ属菌数 (CFU/mL)		レジオネラ属菌 分離培養	従属栄養細菌数 (CFU/mL)
	qPCR	LC EMA-qPCR		
W1	4.0×10^3	未実施	検出不能	4.9×10^7
W2	2.5×10^2	未実施	検出不能	1.4×10^8
W3	2.8×10^3	3.6×10^3	不検出	3.3×10^7
W4	7.3×10^2	2.0×10^2	不検出	4.3×10^7

表 3-2 大学の部活寮で使用している洗濯機水の結果

検体番号	レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)		レジオネラ属菌 分離培養	従属栄養細菌数 (CFU/mL)
	qPCR	LC EMA-qPCR		
W5	3.3×10^1	1.1×10^1	不検出	2.9×10^4
W6	2.1×10^2	5.2×10^1	不検出	4.4×10^5
W7	1.3×10^3	1.0×10^2	不検出	7.5×10^4
W8	3.2×10^3	1.8×10^2	不検出	1.1×10^5
W9	9.0×10^3	7.2×10^2	不検出	1.1×10^6

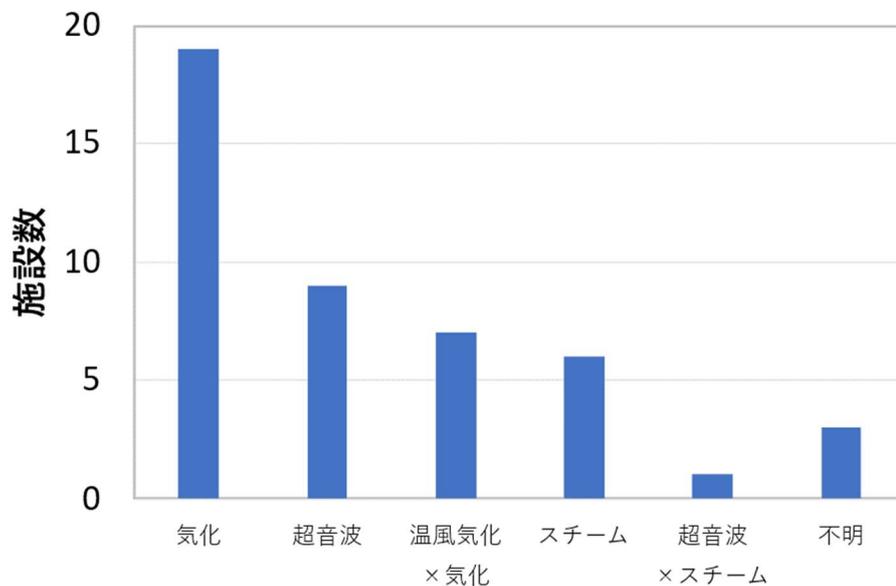


図 4-1 加湿器の方式 (複数回答あり)

表 4-1 実地調査で検出されたレジオネラ属菌の 16S rDNA 塩基配列

施設	加湿方式	検出箇所	菌種 (配列 >99% の一致で推定)
A	超音波式	タンク水、吹出口	<i>Legionella</i> sp.*1
	超音波式	タンク水	<i>Legionella</i> sp.
	超音波式	タンク水、吹出口	<i>Legionella</i> sp.
	スチーム式	タンク水	<i>Legionella</i> sp.
	気化式	タンク水、吹出口	<i>Legionella</i> sp.
B	気化式	タンク水	<i>L. quinlivanii</i> (>99%=389/390, NR_044966)
C	次亜*2	タンク水	<i>L. pneumophila</i> (100%=390/390, NR_074231)
D	気化式	タンク水	<i>Legionella</i> sp.
E	気化式	タンク水	<i>Legionella</i> sp.
F	気化式	水受け	<i>Legionella</i> sp.
G	気化式	タンク水、水受け	<i>Legionella</i> sp.
	気化式	タンク水	<i>Legionella</i> sp.
	気化式	タンク水	<i>Legionella</i> sp.

*1 配列の多くは、一致率の高い登録配列なし (あるいは PCR/読み取りエラーの可能性)

*2 超音波加湿器に次亜塩素酸水を使用

A) 試験浴槽



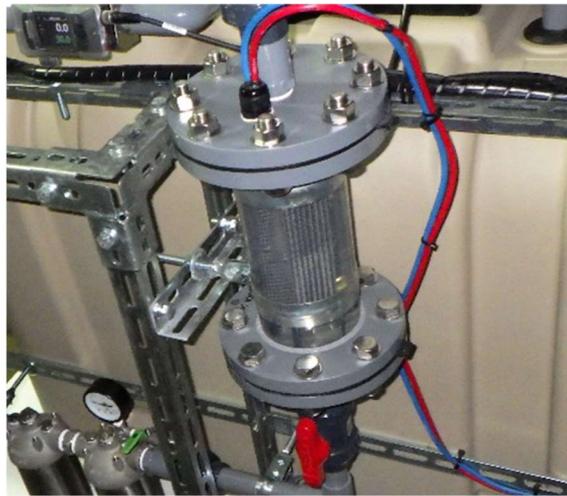
B) ろ過器



C) オゾン電極



D) オゾンを発生させる電解槽



E) オゾン消毒時の動作概略

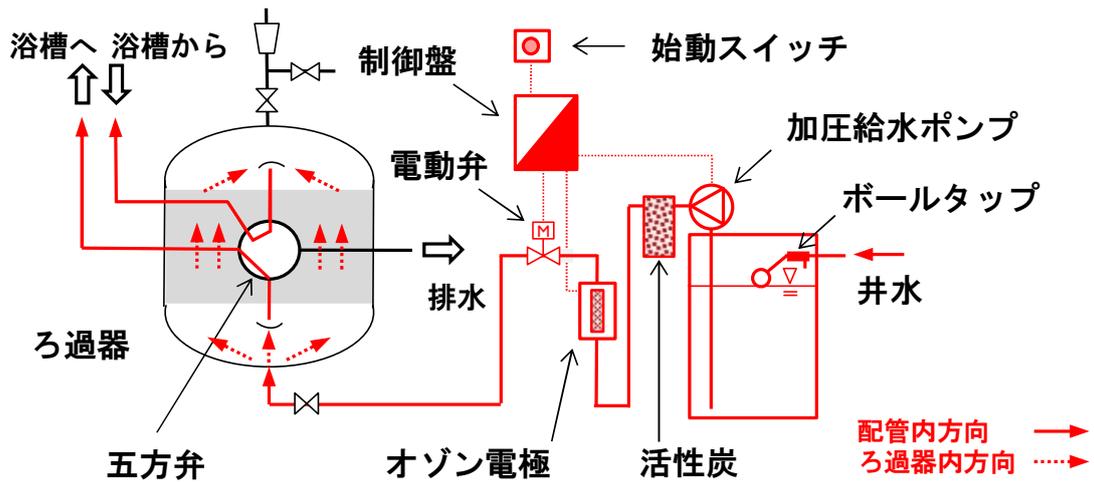


図 5-1 オゾン消毒試験装置

赤色の実線矢印および破線矢印は、オゾン水の通水方向を示している(黒色矢印は装置を説明)。

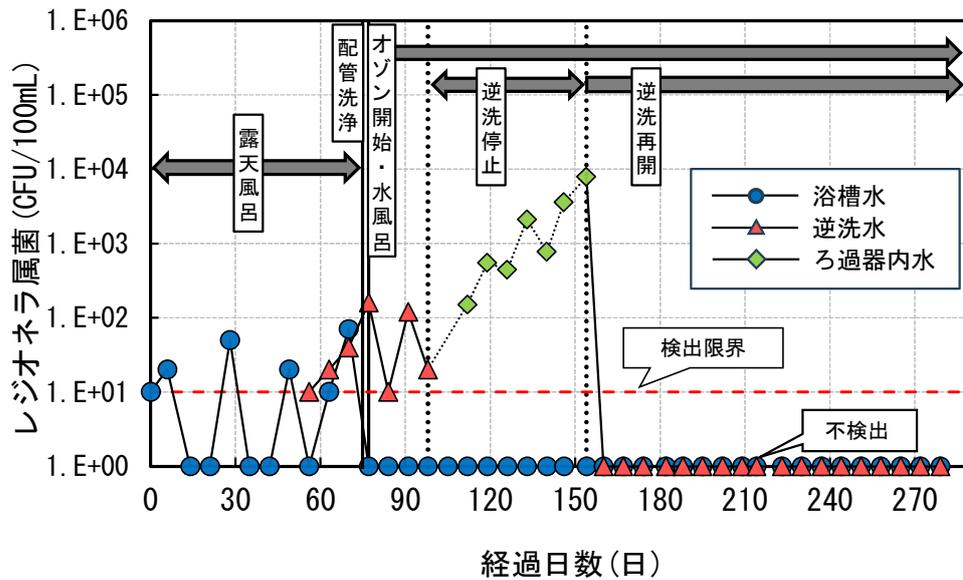


図 5-2 浴槽水、オゾン消毒前の逆洗水、あるいはろ過器内水のレジオネラ属菌の濃度推移
レジオネラ属菌の 1CFU/100mL は不検出(検出限界 10CFU/100mL)を示している。75 日目に過酸化水素によるろ過器と配管の化学的洗浄が行われ、対象浴槽が露天風呂から露天サウナ用の水風呂へ変更された。オゾン試験は 77 日目より開始された。98 日目から 154 日目までは、既設制御盤の故障によりろ過器の使用(循環)と逆洗が停止されたが、この間もオゾン注入は継続し、ろ過器内水のレジオネラ属菌を測定した。

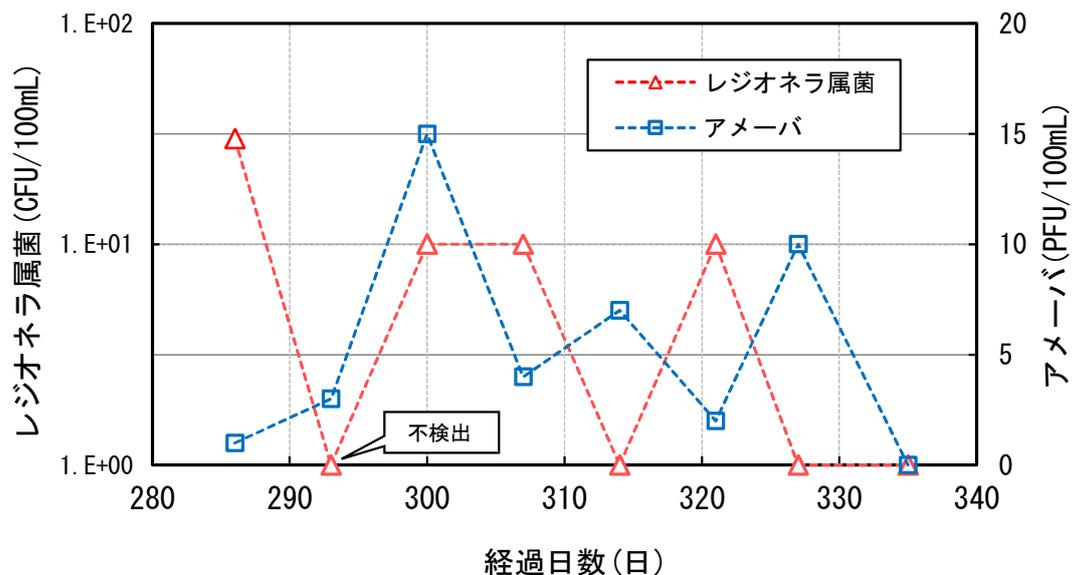


図 5-3 オゾン消毒後の排水中のレジオネラ属菌およびアメーバ経日変化

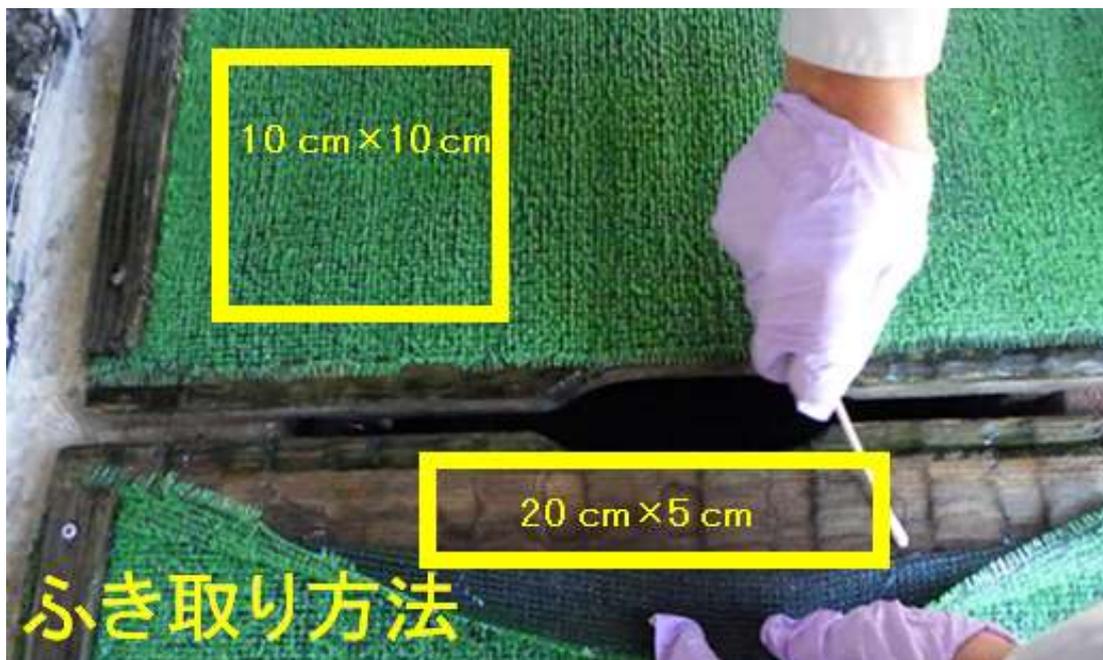


図 6-1 施設 L の排水溝表面の拭き取り

この排水は循環系に戻され再利用されていた。拭き取りは 1mL 蒸留水に懸濁、検査された。写真上の黄色い四角が拭き取り区画を意味する。

表 6-1 施設 L の測定値

検体	ATP *1	Flow cytometry 全菌数*2	レジオネラ遺伝子、生菌相当*3	レジオネラ死菌を含む全遺伝子*3	レジオネラ培養*4	従属栄養細菌数*5
浴槽水	4	<1,000	<10	<10	<10	<200
側溝水	29	12,700	104	392	1,190	5,440
踏み板表面拭き取り	202,000	- *6	-	2,500	8,190	384,000
人工芝表面拭き取り	46,600	-	-	6,570	3,670	-

*1 Relative Light unit/mL (拭き取りは/100cm²)、*2 Cells/mL、*3 Genome unit/100mL (拭き取りは/100cm²)、*4 Colony forming unit/100mL (拭き取りは/100cm²)、*5 Colony forming unit/mL (拭き取りは/100cm²)、*6 試験なし

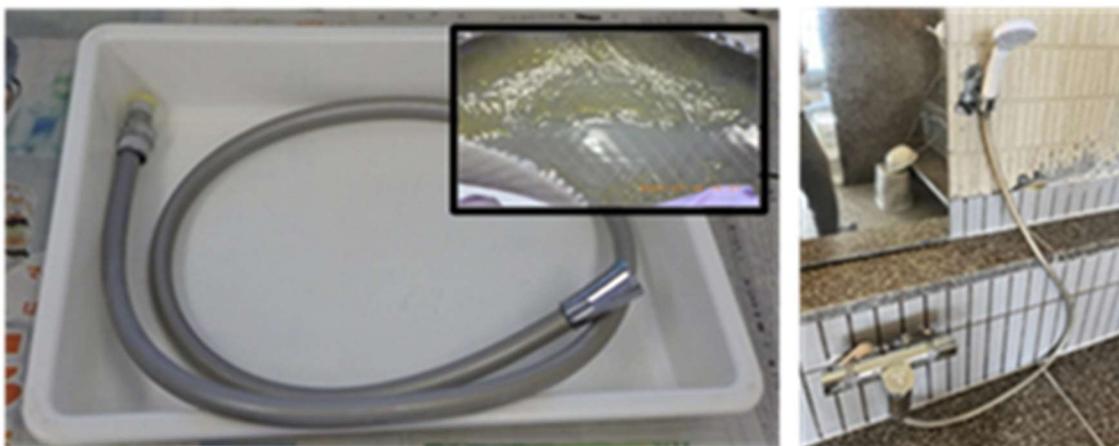


図 6-2 施設 N のシャワーホースの汚れ

中央上の写真がレジオネラ遺伝子の検出されたホースの内面、広範囲に茶褐色のバイオフィルムの付着が見えた。

表 6-2 施設 N の測定値

検体	ATP *1	Flow cytometry 全菌数*2	レジオネラ遺 伝子、 生菌相当*3	レジオネラ 死菌を含む 全遺伝子*3	レジ オネ ラ培 養*4	遊離残 留塩素 濃度*5
貯湯槽水	5	120	- *6	-	<10	0.1
内湯浴槽水	11	113	-	-	<10	1.8
炭酸風呂浴槽水	11	1,207	-	-	<10	0
水風呂浴槽水	48	940	-	-	<10	0
露天浴槽水	11	13	-	-	<10	1.3
かかり湯	16	13	-	-	<10	0.2
シャワー水	9	293	-	-	175	0
シャワーホース 洗浄液	627	1,330	<10	446	<10	-
同ホース内面 拭き取り	-	-	-	26,200	<10	-

*1 Relative Light Unit/mL (拭き取りは/100cm²)、*2 Cells/mL、*3 Genome Unit/100mL (拭き取りは/100cm²)、*4 Colony Forming Unit/100mL (拭き取りは/100cm²)、*5 mg/L as CL、*6 試験なし

表 7-1 培養法と遺伝子検査法(LAMP 法)の相関(2×2 表と感度他)

A) 浴槽水				B) シャワー・カラン水			
	培養 (+)	培養 (-)	計		培養 (+)	培養 (-)	計
LAMP (+)	33	78	111	LAMP (+)	41	32	73
LAMP (-)	6	130	136	LAMP (-)	9	133	142
計	39	208	247	計	50	165	215

C) 全検体			
	培養 (+)	培養 (-)	計
LAMP (+)	74	110	184
LAMP (-)	15	263	278
計	89	373	462

D) 感度、特異度、的中率、一致率			
培養法に対する(%):	浴槽水 (N = 247)	シャワー・カラン水 (N = 215)	全検体 (N = 462)
感度	84.6	82.0	83.1
特異度	62.5	80.6	70.5
陽性的中率	29.7	56.2	40.2
陰性的中率	95.6	93.7	94.6
一致率	66.0	80.9	72.9

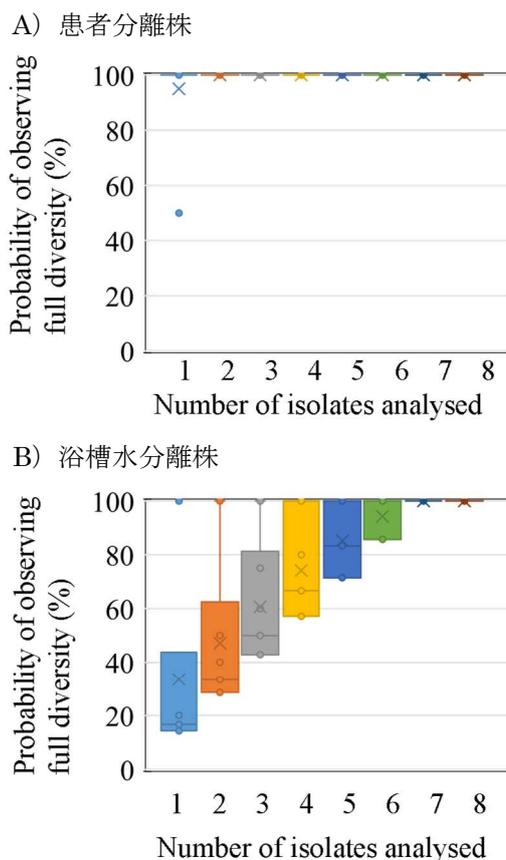


表 7-2 同一浴槽水から分離された 8 株間の SNPs 数

Facility	SBT	Allele no.	SNPs between pairs		No. of SNP variant
			range	mean median	
Facility 01	ST1151	(7, 43, 31, 3, 48, 15, 40)	0-4	1.929 2	7
Facility 02	ST1095	(6, 10, 15, 28, 21, 14, 11)	0 SNPs between all	0 0	1
Facility 03	ST644	(6, 10, 20, 10, 9, 14, 11)	0-4	2.393 2	6
Facility 04	ST1	(1, 4, 3, 1, 1, 1)	0-4	1.821 2	6
Facility 05	ST502	(6, 10, 19, 3, 19, 4, 6)	0-7	4.607 5	7
Facility 06 (N = 7)	ST141	(2, 12, 3, 6, 8, 14, 9)	1-17	6.238 3	7
Facility 07	ST1101	(6, 6, 15, 3, 9, 14, 11)	0-10	2.75 1	4
Facility 08	ST763	(6, 10, 19, 28, 19, 4, 11)	0-98	50.89 56	5
Facility 09	ST1528	(6, 10, 17, 28, 17, 14, 9)	0 SNPs between all	0 0	1
Facility 10	ST1	(1, 4, 3, 1, 1, 1)	0-8	3.786 3.5	7

図 7-1 同一検体から行う SNP 解析の株数と、把握できる多様性の割合

- A) 患者分離株は多様性に乏しく、SNP 数が少なく、解析株数が少なくても多様性を把握できた。
- B) 浴槽水分離株は多様性があり、解析株数を増やすほど、多様性の多くを把握できた。

表 8-1 監視指導を行うにあたっての規定の有無

	件数	回答割合(%)
国が定める規定「衛生等管理要領等について」等	28	78
都道府県や市が独自に定める規定等	30	83
その他	2	6
<ul style="list-style-type: none"> ・入浴施設におけるレジオネラ症防止対策 ・入浴施設の衛生管理の手引き 		

表 8-2 監視回数や指導内容等を定める「監視指導要領」、「監視指導計画」等の有無

	件数	回答割合(%)
有り	22	61
無し	13	36
未回答	1	3
計	36	100

表 8-3 立入検査手法や監視時の指導項目等を記載した「監視指導マニュアル」、「監視指導手引き」等の有無

	件数	回答割合(%)
有り	21	58
無し	15	42
計	36	100

表 8-4 旅館業や公衆浴場の施設を対象としたレジオネラ属菌陽性時の「対応マニュアル」等の有無

	件数	回答割合(%)
有り	29	81
無し	7	19
計	36	100

表 8-5 レジオネラ症患者発生時の「対応要領」や「対応マニュアル」等の有無

	件数	回答割合(%)
有り	24	66.7
無し	11	30.6
未回答	1	2.8
計	36	100

表 8-6 立入検査を実施する際に監視対象施設に事前調整(アポイント等)をしているか

	件数	回答割合(%)
全ての施設に対して日程、訪問・滞在時間等の事前調整を行う	22	61
一部の施設に対して日程、訪問・滞在時間等の事前調整を行う	12	33
日程、時間等の事前調整は行っていない	2	6
監視指導業務を行っていないため分からない	0	0
計	36	100

表 8-7 事前調整を行う場合の対象施設

	件数	回答割合(%)
旅館業の施設	27	75
公衆浴場の施設	25	69
大規模な施設	9	25
休業中の施設	5	14
担当者が少人数の施設	5	14
過去の経緯から事前調整が必要である施設	9	25
その他	3	8

表 8-8 立入検査時の主な監視項目(複数回答有り)

	件数	回答割合(%)
施設で作成している維持管理記録(点検票、記録簿等)	36	100
浴槽水の換水頻度	36	100
逆洗の頻度	35	97
浴槽の清掃頻度	35	97
ヘアキャッチャーの清掃頻度	35	97
シャワーヘッドの清掃頻度	27	75
循環構造の有無	34	94
配管構造	28	78
ろ過器の衛生状態	31 ※	86
貯湯槽の衛生状態(温度、清掃、消毒)	34	94
サウナ室及びサウナ施設	29	81
消毒剤の注入箇所	29	81
消毒剤の種類	35	97
残留塩素濃度の記録	35	97
残留塩素濃度検査の実施(現地検査)	31	86
ATP検査の実施(現地検査)	10	28
入浴設備以外の施設における衛生状態の確認(空気調和設備の冷却塔)	10	28
入浴設備以外の施設における衛生状態の確認(給湯設備)	11	31
入浴設備以外の施設における衛生状態の確認(加湿装置や加湿器)	8	22
衛生管理の責任者、担当者	31	86
施設における管理マニュアル等の有無	24	67
施設に対する苦情の有無	16	44
施設における体調不良者(探知、通報等)の有無	12	33
既届出内容との相違の確認	33	92
監視指導業務を行っていないため分からない	0	0
その他	1	3
・レジオネラ属菌自主検査の頻度、結果、系統数及びその書類の保管		

※未回答あり

表 8-9 立入検査時に生じる困りごと(複数回答可)

	件数	回答割合(%)
管内の監視対象施設件数が多く、十分な監視が行えないことがある	18	50
監視員の数が足りないと感じることもある	21	58
施設の規模が大きい場合、立入検査時間が不足することがある	9	25
施設側が忙しいため、立入検査を断られることがある	10	28
立入検査を行う時間帯に制約があることがある	15	42
立入検査に要する時間の制約があることがある	9	25
施設の詳細が分かる担当者が不在で、監視項目を十分に確認できないことがある	26	72
施設の担当者等から話を聞けない、聞いてもらえないことがある	6	17
通常業務だけでは監視指導を行う上での知識や経験を得ることが難しい	16	44
施設への説明資料として、全国共通の配布資料(レジオネラ症関係や施設の衛生対策関係のリーフレットやパンフレット、チラシ等)があればよいと思うことがある	20	56
特に困りごとはない	0	0
監視指導業務を行っていないため分からない	1	3
その他 ※複数回答あり	5	14

資料 9-2 給湯施設チェックシート

給水装置

装置	設置	設置場所	材質	容量(m ³)	消毒装置
水道水受水槽	有・無	1.屋外 2.屋内 3.地上 4.地下			有・無
水道水高置水槽	有・無	1.屋外 2.屋内 3.地上			有・無
井戸水原水槽	有・無	1.屋外 2.屋内 3.地上 4.地下			有・無
井戸水処理水槽	有・無	1.屋外 2.屋内 3.地上 4.地下			有・無
水道・井戸混合水槽	有・無	1.屋外 2.屋内 3.地上 4.地下			有・無
源泉槽	有・無	1.屋外 2.屋内 3.地上 4.地下			有・無
源泉高置水槽	有・無	1.屋外 2.屋内 3.地上			有・無
源泉処理水槽	有・無	1.屋外 2.屋内 3.地上 4.地下			有・無
源泉希釈水槽	有・無	1.屋外 2.屋内 3.地上 4.地下			有・無

給湯設備

貯湯槽（原湯、上がり用湯、その他）

設置数	構造	材質	容量	設置場所	熱交換器	温度計	設定温度
	開放、密封				有・無	有・無	
加温	加水	温度調節設備			消毒装置		
有・無	有・無	1.ミキシングバルブ 2.調節箱 3.チラー			有(塩素、その他)・無		
温度確認頻度	熱源設定頻度	冷却方法	清掃頻度	清掃方法	消毒薬	完全排水	
						可・不可	
備考							

貯湯槽（原湯、上がり用湯、その他）

設置数	構造	材質	容量	設置場所	熱交換器	温度計	設定温度
	開放、密封				有・無	有・無	
加温	加水	温度調節設備			消毒装置		
有・無	有・無	1.ミキシングバルブ 2.調節箱 3.チラー			有(塩素、その他)・無		
温度確認頻度	熱源設定頻度	冷却方法	清掃頻度	清掃方法	消毒薬	完全排水	
						可・不可	
備考							

貯湯槽（原湯、上がり用湯、その他）

設置数	構造	材質	容量	設置場所	熱交換器	温度計	設定温度
	開放、密封				有・無	有・無	
加温	加水	温度調節設備			消毒装置		
有・無	有・無	1.ミキシングバルブ 2.調節箱 3.チラー			有(塩素、その他)・無		
温度確認頻度	熱源設定頻度	冷却方法	清掃頻度	清掃方法	消毒薬	完全排水	
						可・不可	
備考							

貯湯槽がない場合の熱源

1.ボイラー 2.その他（ ）

資料 9-3 浴槽別設備チェックシート(記入例)

浴槽 浴槽	名称又は種類	●●銭湯 女風呂 (令和6年4月1日現在)		掃浴・槽 消毒の 消毒	頻度	1	回/週	
	設置場所	内湯			水位計	清掃内容	手洗	
	男女別	女				薬剤名	次亜塩素酸Na	
	利用形態	別浴				設置状況	有	
	浴槽壁の材質	御影石(框部はヒノキ)				形式	配管式	
	浴槽床の材質	御影石				頻度	感覚が悪い時に	
	浴槽の容量	6.3	m ³	運 通 管		清掃内容	手洗	
	設定水温	42	°C		薬剤名	ブラシ洗浄のみ		
	昇温 ^{注1}	有			設置状況	有		
	温度計の設置	有			形式	直管		
	新鮮湯の供給	湯面よりも上			排水弁	無		
	循環ろ過水の供給	湯面よりも下			頻度	1	回/週	
湯口の構造 ^{注2}	箱型湯口(木造)		清掃内容	薬剤				
浴槽水	方式	循環式		薬剤名	次亜塩素酸Na(高濃度)			
	消毒の有無と使用消毒剤	有		頻度	0	回/日・週		
	消毒剤濃度	6		清掃内容				
	消毒剤測定方法	自動滅菌装置内残留塩素計にて測定		薬剤名				
	換水頻度	1	回/週	頻度	0	回/日・週		
	補給水量	0.42	m ³ /h	清掃内容				
満水状態、溢水	適		水質検査の頻度	6	回/日			
ろ過器・循環配管	レジオネラ属菌自主検査の実施頻度 ^{注3}	1	回/年	ろ過器の 高濃度塩素消毒	頻度	1	回/週	
	ろ過器の設置状況 ^{注4}	有			薬剤名	次亜塩素酸Na		
	ろ材	砂			濃度	10	mg/L	
	ろ材	その他			頻度	1	回/年	
	循環ろ過能力	12.6	m ³ /h	循環配管の化学洗浄 ^{注5}	頻度	1	回/年	
	ターン数(理論値、浴槽の容量/ろ過能力)	2	回/h	ろ材交換頻度	1	回/年		
	ろ過器の逆洗機能	有		循環ろ過系の完全排水構造	可			
	ろ過器の逆洗	頻度	1	回/日	消毒装置	消毒剤の循環ろ過系への注入	ろ過器の前 集毛器の後	
	時間	15	分/回					

ろ過器のない循環配管	設置状況 ^{注6}	有	消毒剤添加装置	無
	設置目的	浴槽の湯温を下げないため		
	附帯設備 ^{注7}	自動温度調節ユニット		
	清掃・消毒方法	方法	高濃度塩素消毒	
	清掃・消毒の頻度	1	回/週	完全排水

気泡発生装置	設置状況	無	シャワーヘッド・ホース	設置数	4
	種類			使用水	水道水
	構造(空気取込口から土ほこり、浴槽水等が入りにくい)			混合比	100%
	清掃・消毒方法			使用水の消毒剤濃度	0.3 mg/L
オーバーフロー水・回収槽	清掃・消毒の頻度		打たせ湯	清掃・消毒の頻度	1 回/年
	オーバーフロー水の再利用	有		設置状況	有
	回収槽の設置場所	浴槽横		使用水	水道水
	回収槽の六面点検	不可		設置状況	有
ろ過器の 前	清掃・消毒方法	方法	手洗い	清掃・消毒	実施
	清掃・消毒の頻度	1	回/週	清掃・消毒の頻度	1 回/年
	オーバーフロー水専用の消毒設備	有	設置状況	有	
	消毒用薬剤	薬剤名	ジクロロイソシアヌル酸Na	ろ過器の 前	方法
	濃度	63%	集毛器	方法	手洗い
				薬剤名	次亜塩素酸Na
				清掃・消毒の頻度	1 回/週

備考	平成15年以前に許可取得した施設のため、現在の条例に規定する構造設備基準について経過措置があり、構造設備変更等の際に、新しい構造設備基準に適合させるよう、継続指導中。
----	---

- 注1:昇温装置の種類を記載します。
- 注2:原水・原湯の湯口が清掃・消毒しやすい作りかどうかを確認します。
- 注3:レジオネラ属菌自主検査の実施頻度を記載し、結果はここには記載せず別途記録・保管します。
- 注4:設置場所を記載する場合は備考に記載します。
- 注5:年に1回以上行う、過酸化水素等を用いる洗浄の状況を記載します。
- 注6:設置が有の場合には、設置した目的を記載します。
- 注7:昇温装置などの附属設備を記載します。

資料 9-4 レジオネラ関連構造衛生管理チェックリスト(記入例)

施設名	〇〇の湯	管理者	〇〇 〇〇
所在地	〇〇県〇〇市〇〇町0-0	電話番号	0000 (00) 0000
施設区分	<input checked="" type="checkbox"/> 公衆浴場業 <input type="checkbox"/> 旅館業 <input type="checkbox"/> その他()		調査日

項目 ^a		基準 ^b	管理要領 / 条例等 ^c	指導事項 ^d	備考	
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	管理要領 管理要領			
	配管	原水又は原湯の配管	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から浴槽に落とし込む構造である	条例		
		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	条例		
		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	条例		
	ろ過器	排水	配管内の浴槽水が完全に排水できる構造とする	管理要領		
		設置	浴槽ごとの設置が望ましい	管理要領		
		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	管理要領		
		逆洗浄	逆洗浄を行える	条例		
	気泡発生装置等	排水	完全に排水できる	条例		
		集毛器	ろ過器にも髪等が混入しないように、ろ過器に入る前に設ける	条例		
		構造	連日使用した浴槽水を使用する構造でない	管理要領		
		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	管理要領		
	循環水の吐出口	空気取入口	土ほこりが入らない構造である	管理要領		
		構造	浴槽の底部に近い部分に設置する	条例		
	消毒剤の注入又は投入	構造	浴槽水がろ過器内に入る直前に設置されている	条例		
	打たせ湯・シャワーの構造	構造	循環ろ過水及び浴槽水を用いる構造でない	条例		
	オーバーフロー回収槽の構造	構造	浴用に供する構造になっていない	条例		
		構造	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	条例		
構造		浴用に供する場合、地下埋設でなく清掃が容易にできる	条例			
水位計	構造	浴用に供する場合、消毒設備を設置する	条例			
	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	管理要領			
調節箱	構造	清掃しやすい構造とする	条例			
	消毒	薬剤注入口を設けて塩素消毒できるようにする	条例			

項目		基準	管理要領 / 条例等		
貯湯槽	温度	貯湯槽内の湯水全体の温度を60℃以上に保つ これにより難い場合は貯湯槽内の湯水の消毒を行う	管理要領		
	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	管理要領		
	管理	破損等の有無や温度計の性能を確認する	管理要領		
浴槽・浴槽水	換水・清掃	毎日換水し、清掃する	条例		
	消毒	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	条例		
	状態	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3mg/L程度を保つ 常に満杯状態に保ち清浄に保つ	条例		
水位計	構造	少なくとも週に1回、消毒により生物膜を除去する	管理要領		
ろ過器	構造	1週間に1回以上逆洗浄する	条例		
循環配管	構造	1週間に1回以上適切な消毒方法で生物膜を除去する	条例		
集毛器	構造	毎日清掃及び消毒を行う	条例		
消毒装置	構造	維持管理を適切に行う	条例		
調節箱	構造	必要に応じて清掃及び消毒を行う	管理要領		
オーバーフロー回収槽	構造	浴用に使用しない	管理要領		
	構造	浴用に供する場合は回収槽内の水を消毒する	管理要領		
気泡発生装置等	構造	適宜清掃、消毒する	条例		
打たせ湯・シャワー	構造	循環ろ過水及び浴槽水を用いない	条例		
シャワーヘッド、ホース	構造	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	条例		
循環式浴槽の塩素消毒	構造	ろ過器の直前で投入する	条例		
自主管理体制	構造	責任者を置いている	管理要領		
維持管理の記録	構造	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	条例		
点検表等	構造	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	条例		

資料 9-4 レジオネラ関連構造衛生管理チェックリスト(記入例) (続き)

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	条例		
		濁度	2度以下	条例		
		pH値	5.8～8.6	条例		
		有機物	3mg/L以下(TOC)、10mg/L以下(過マンガン酸カリウム消費量)	条例		
		大腸菌	検出されないこと	条例		
		レジオネラ属菌	検出されないこと(10cfu/100mL未満)	条例		
		検査頻度	1年に1回以上	条例		
	浴槽水	濁度	5度以下	条例		
		有機物	8mg/L以下(TOC)、25mg/L以下(過マンガン酸カリウム消費量)	条例		
		大腸菌群	1mL中に1個以下	条例		
レジオネラ属菌		検出されないこと(10cfu/100mL未満)	条例			
	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)	条例			

- a: 項目は自治体の状況に合わせて適宜行を追加して加えたり、必要ない項目は削除してください。
 b: 基準の表現は「～が望ましい」、「～すること」等各自治体の条例の設置状況等に合わせて修正してください。
 c: 衛生等管理要領あるいは各自治体の条例等の設置に拠るかに合わせて記載してください。
 d: 列は記入・使用例を参考にして必要に応じて追加・削除してください。

表 9-1 手引に対する要望等の概要

- ・レジオネラ属菌の検出と ATP 値との関係の説明
- ・アメーバ対策の説明
- ・かけ流し式温泉のレジオネラ対策の説明
- ・追い炊き配管の衛生管理の説明
- ・記録票の例示
- ・検査法の精度管理の説明
- ・サウナの衛生管理の説明
- ・集毛器の衛生管理の詳細な説明
- ・循環配管の衛生管理の説明
- ・消毒方法の詳細な説明
- ・スケールの除去方法の説明
- ・小規模施設に導入する総合衛生管理プログラムの説明
- ・貯湯槽の衛生管理方法の追加
- ・浴槽の衛生管理の詳細の説明
- ・ろ過器の衛生管理の詳細の説明

表 10-1 日本国内から参加可能なレジオネラ検査外部精度管理

略称	EQA	FAPAS®	レジオネラ属菌検査精度管理 サーベイ
実施者	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)	島津ダイアグノスティクス
国	英国	英国	日本
日本からの参加実績	あり	あり	あり
参加費 (1回あたり)	205 ポンド (約 38,000 円)	52,800 円(消費税込)	40,700 円(消費税込)
1回あたりの 配付試料数	2	2	1
年間実施回数	4	4	1
参加者数	114~173(1回あたり)	20 程度(1回あたり)	約 100
国内代理店の有無	なし ※2024 年度からあり (アイデックスラボトリーズ)	あり(セントラル科学貿易)	—
日本語サポート	あり	あり	—
配付試料の輸送	常温	常温	冷凍
検査実施までの保管	冷凍	冷蔵	冷凍
配布試料中のレジオネラ 以外の細菌の混合	あり	なし	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	あり	あり	なし
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種	複数種	複数種	<i>Legionella pneumophila</i> のみ
配布試料中に含まれる レジオネラの菌種数	1~2 種	1~2 種	1 種
配布試料の形状	LENTICULE disc ゼラチン状のディスク	Lyophilized sample フリーズドライ様	BioBall フリーズドライ
検査方法	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)	指定法 前処理(酸処理または熱処理)な し、非選択培地を用いる
検査結果の報告	菌数 菌種(血清群)	菌数 菌種(血清群)	菌数
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	10	28	6

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。

B) コロニー検出状況



A) instruction sheets (検査指示書)


Public Health England
Protecting and improving the nation's health

Food and Environmental Proficiency Testing Unit
The final date for return of results is indicated on the accompanying request/report form

Contact details:
The Organisers - FEPTU
Public Health England
61 Colindale Avenue,
London, NW9 5EQ, UK.
Fax: +44 (0) 20 8200 8264
Tel: +44 (0) 20 8327 7119
e-mail: foodeqa@phe.gov.uk


0006

Results should be returned on-line using the web-based reporting system. Go to: www.phe-ega.org.uk. You will need your log-in details for this process. Please contact us if you experience problems with the on-line system.

www.gov.uk/government/collections/external-quality-assessment-ega-and-proficiency-testing-pt-for-food-water-and-environmental-microbiology#legionella-isolation-scheme

Water EQA Legionella Isolation – Instruction Sheet

Each distribution consists of **two** LENTICULE® discs in screw-cap plastic vials (with desiccant). The LENTICULE discs require reconstitution by a process of re-hydration and dispersion prior to examination for legionellae.

Refer also to the Safety Data Sheet: www.gov.uk/government/publications/safety-data-sheet-for-lenticules

For a video on sample processing click on link below and scroll to bottom of page:
www.gov.uk/government/publications/legionella-scheme-sample-instruction-sheets

Storage:

- Store the samples at $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ on receipt.
- Allow the LENTICULE discs to reach ambient temperature (5 - 10 minutes) before reconstituting in diluent.

Reconstitution:

- Open the sample container and transfer the LENTICULE disc into **1 Litre** of diluent (use either Page's saline or 1:40 Ringers' solution) by inverting the container over the diluent.
- Leave at ambient temperature for a minimum of 10 minutes to rehydrate. Ensure that the LENTICULE disc has dissolved completely before proceeding.
- Disperse the inoculum by inverting approximately 30 times.
- Examine samples between 30 - 45 minutes of reconstitution.

Examination:

- Each reconstituted LENTICULE disc is equivalent to a 1 Litre water sample.**
- The request/report form indicates the sample dilutions most likely to give a definitive result (rather than a censored value).
- Once the dilutions have been prepared, the samples must be examined in accordance with routine procedures.
- All samples require examination for the presence of *Legionella* spp.
- The identification and level (colony forming units per Litre (cfu L^{-1})) of any legionellae detected must be determined.

Return of Results:

- Return your results on-line using the web-based reporting system.
- The distribution will be closed on the deadline date for return of results.
- Results cannot be accepted after the distribution has closed.

図 10-1 UKHSA EQA 参加例

A) instruction sheets (検査指示書) <https://www.gov.uk/government/publications/legionella-scheme-sample-instruction-sheets>, B) UKHSA EQA (G132) を WYO α 寒天培地で培養、レジオネラ属菌 2 種、レジオネラ属菌以外の菌が複数種含まれた。

表 11-1 レジオラート/QT 法(未処理)と平板培養法によるレジオネラ検出の比較

		平板培養法		計
		検出	不検出	
レジオラート/QT 法(未処理)	陽性	50	9	59
	陰性	6	139	145
計		56	148	204

表 11-2 レジオラート/QT 法(酸処理)と平板培養法によるレジオネラ検出の比較

		平板培養法		計
		検出	不検出	
レジオラート/QT 法(酸処理)	陽性	31	2	33
	陰性	25	146	171
計		56	148	204

表 11-3 レジオラート/QT 法の未処理と酸処理によるレジオネラ検出の比較

		レジオラート/QT法 (未処理)		計
		検出	不検出	
レジオラート/QT 法(酸処理)	陽性	32	1	33
	陰性	27	144	171
計		59	145	204

表 11-4 レジオラート法で未処理陽性・酸処理陰性の一覧(酸処理による偽陽性の抑制例)

No.	レジオラート/QT法(菌数MPN/100mL)			平板培養法(菌数cfu/100mL)		遺伝子 検査法
	未処理の菌数	未処理から分離された菌種	酸処理の菌数	菌数	検出菌種	
1	23	Lp SG6	0	10	Lp SG8	陽性
2	155		0	<10		陽性
3	11	<i>L. dumoffii</i>	0	20	Lp SG1	陽性
4	11	Lp SG6	0	10	Lp SG6	陰性
5	23	Lp SG15,UT	0	10	Lp SG15	陽性
6	11	Lp SG1	0	20	Lp SG3, UT	陽性
7	11	Lp SGUT	0	370	Lp SGUT, <i>L. sp</i>	陽性
8	104	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	0	<10		陰性
9	52		0	1000	Lp SGg4/10	陽性
10	74		0	50	Lp SG6, SGg4/10	陽性
11	39		0	<10		陰性
12	264	Lp SG5	0	130	Lp SG1, 5	NT
13	58	Lp SG3	0	74	Lp SG3	NT
14	169	Lp SG3	0	220	Lp SG3	NT
15	58	Lp SG1	0	52	Lp SG1, 3	NT
16	11	Lp SG5	0	17	Lp SG5, 6	NT
17	58	発育せず	0	18	<i>L. nagasakiensis</i> <i>L. thermalis</i>	NT
18	310	雑菌	0	120	Lp SG3, SGg4/10	NT
19	90	<i>Aeromonas sp.</i>	0	30	Lp SG1, <i>L. micdadei</i>	陽性
20	22	<i>Pseudomonas sp.</i>	0	20	Lp SG1, <i>L. micdadei</i>	陰性
21	11	<i>Pseudomonas sp.</i>	0	<10		陰性
22	106	<i>Aeromonas sp.</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	<10		陽性
23	124	<i>Aeromonas sp.</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Serratia marcescens</i>	0	<10		陽性
24	22	<i>Serratia marcescens</i>	0	10	Lp SG9	陽性
25	22	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	<10		陰性
26	11	Lp SG5	0	10	Lp SG5	陽性
27	35	<i>Klebsiella aerogenes</i>	0	<10		陰性

表 12-1 人工遺伝子作製に用いた配列

Target	Accession no.	Nucleotide position of F primer	Nucleotide position of R primer
MP_SG1	NC_002942	839256..839235	839007..839030
MP_SG2	LC586135	38033..38052	38576..38557
MP_SG3/15	LC586134	51624..51649	520332..52008
MP_SG5	CP014256	879332..879353	879537..879518
MP_SG6/12	CP003192	878012..878033	878710..878690
MP_SG7	LC586136	32146..32165	32981..32961
MP_SG8	LT906452	938340..938364	938506..938485
MP_SG9	LC586133	31774..31796	32408..32386
MP_SG11	LC586137	21666..21686	21980..21958
MP_SG13	FR747827	11660..11679	12121..12101
MP_SG14	CP113435*	1605760..1605737	1604797..1604774
SP_SG4/10	LC586140	40773..40794	41008..40988
5S rRNA	AP024961	431324..431344	431410..431431

*人工遺伝子作製にあたっては未登録配列を用いたが、blast 検索を行ったところ、用いた領域について 100%同一の配列が登録されていたので、参照として示した。

資料 12-1 Legionella pneumophila 血清型別マルチプレックス PCR 用試薬取扱説明書

GenCheck® Legionella SG pre-mix primer set
 GenCheck® Legionella SG control set
 GenCheck® Legionella SG pre-mix primer & control set

商品コード: F-0002
 商品コード: F-0008
 商品コード: F-0004

取扱説明書

製品説明
 L. pneumophila は 15 血清型に分けられるが、血清型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、血清型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、血清型 1、血清型 2、血清型 3/15、血清型 5、血清型 6/12、血清型 7、血清型 8、血清型 9、血清型 11、血清型 13、血清型 14 の判定ができる (血清型 2、15、血清型 6/12 は 10 は区別できない)。2 段階目の PCR では、11 以外の血清型のみを判定する。血清型 4 または 10 は区別できない。供試菌株が L. pneumophila である場合には、1 段階目から 2 段階目にかけて血清型特異的な PCR 反応が確認できる。M-PCR には Legionella 属特異的プライマーも追加されており、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が確認できる。

製品内容

製品名	内容
GenCheck® Legionella SG pre-mix primer set 商品コード: F-0002	Primer set1 (1 段階目 M-PCR 用) 40 反応分 (100 μL × 2 本) SG1/10 primer (1 本)、及び Legionella 属特異 SsrRNA primer) Primer set2 (2 段階目 M-PCR 用) 40 反応分 (35 μL × 1 本) SG1/10 primer 及び Legionella 属特異 SsrRNA primer)
GenCheck® Legionella SG control set 商品コード: F-0008	PTC1 20 反応分 (20 μL × 1 本) SSrRNA= 108 bp, S82= 106 bp, S81= 249 bp, S83/15= 408 bp, S82= 243 bp, S80/12= 408 bp, S14= 396 bp PTC2 20 反応分 (20 μL × 1 本) SSrRNA= 108 bp, S82= 205 bp, S81= 314 bp, S81= 461, S82= 413 bp, S87= 435 bp, S81/10= 233 bp)
GenCheck® Legionella SG pre-mix primer & control set 商品コード: F-0004	Primer set1 (1 段階目 M-PCR 用) 40 反応分 (100 μL × 2 本) SG1/10 primer (1 本)、及び Legionella 属特異 SsrRNA primer) Primer set2 (2 段階目 M-PCR 用) 40 反応分 (35 μL × 1 本) SG1/10 primer 及び Legionella 属特異 SsrRNA primer) PTC1 10 反応分 (10 μL × 1 本) SSrRNA= 108 bp, S82= 106 bp, S81= 249 bp, S83/15= 408 bp, S82= 243 bp, S80/12= 408 bp, S14= 396 bp PTC2 10 反応分 (10 μL × 1 本) SSrRNA= 108 bp, S82= 205 bp, S81= 314 bp, S81= 461, S82= 413 bp, S87= 435 bp, S81/10= 233 bp)

保存方法
 -20℃

外部特許情報
 外特許に抵触

本製品以外に必要となる試薬および機器類

試薬
 QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany)
 アギロースゲル (濃度 2.0%~2.5%)
 ゲルロードングバッファー
 電気泳動用ランゲージン (0.5x~1.0x TAE buffer)
 DNA 分子量マーカー
 ゲル染色液 (エタナラムプロピオン酸、または同等の結果が得られるもの)

機器類
 PCR 増幅反応装置 Veriti [アプライドバイオシステム社製]、または同等の結果が得られるもの
 電気泳動装置および画像解析装置
 マイクロピケット、チップ、チューブ
 ボルタックスミキサー
 凍上機

実用例
 【試薬調製および PCR 増幅反応】
 1. QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix, Primer set1, Primer set2, PTC1, PTC2 及び RNase-Free Water を解凍した後、ボルタックスミキサーで均質し、凍上機等でスピンダウンする。
 2. 反応液組成表に従い、調整 DNA 及び PTC を以外の試薬を必要量調整し、ボルタックスミキサーで混合し、凍上機等でスピンダウンする。
 3. 調製した溶液から 19 μL ずつを PCR 用チューブまたは PCR 用プレートのウェルに分注する。
 4. 調整 DNA または PTC を PCR 用チューブまたは PCR 用プレートのウェルに 1.0 μL ずつ加えた後、PCR 増幅反応装置にセットする。
 5. PCR 反応条件に従って、PCR を開始する。
 ※ 反応系へのコンタミネーションがないことを確認するためには、Primer set を加えないの並びに DNA 溶液を加えないものを陰性コントロールとし、同時に PCR を行なうことを推奨する。
 ※ 調整 DNA 1ng 程度あるいは 10¹~10⁷ CFU 相当レジオネラ菌体 (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)。

【反応液組成表】

1 段階目 M-PCR	10 μL
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	4.8 μL
Primer set1	1.0 μL
調整 DNA または PTC (および RNase-Free Water)	1.0 μL
RNase-Free Water	1.2 μL
Total	20 μL

【PCR 反応条件】

温度	時間	サイクル数
95°C	15 min	1 cycle
94°C	30 sec	28 cycles
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	1 cycle
4°C	10 min	

【電気泳動】
 1. TAE バッファーを調製した電気泳動槽に 2.5% アギロースゲルをセットし、PCR 増幅反応液 2.0~4.0 μL と適量のゲルロードングバッファーを混合しウェルに全量注入する。
 2. 電気泳動を行う。

M-marker (Wide Range DNA Ladder, Takara Bio Inc.)、数字:血清型、P1:PTC1、P2:PTC2、N:No Template Control
 1 段階目 Primer set1/P1 (下から SsrRNA, SG8, SG1, S83/15, S82, SG6/12, S14)、Primer set1/P2 (下から SsrRNA, S85, SG11, SG13, S89, SG7)、2 段階目 Primer set2/P1 (下から SsrRNA のみ)、Primer set2/P2 (下から SsrRNA, SG4/10)

使用上の注意
 【PCR 反応液】
 (1) 本製品は PCR をするための試薬です。その他の目的には使用されません。
 (2) 試薬についての基礎的な知識がある方は、取扱はなくても構いません。
 (3) 取扱説明書記載内容と異なる取り扱いに気づいた場合は、弊社では責任を負いません。
 (4) 本製品は使用期限が表示されており、使用期限を守ってご使用ください。
 (5) 廃棄方法は、必ずまたは地方自治体の条例に従ってください。※ 素材: 0.5 mL チューブ (PP)、袋 (PE)、フネル (PET)
 (6) 本製品は、冷凍保存品となります。使用前に氷上等で融解し、よく混ぜてから使用してください。

開発者
 Nakase R, Qin T, Morita M, Ren H, Chang B, Murai M, Amomura-Mackawa 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: e0157-21, 2021.

製造販売元: FASMACK 株式会社ファスマック
 お問い合わせ先: 株式会社ファスマック 遺伝子検査事業部
 〒243-0041 神奈川県川崎市麻生区庄5-1-3 TEL:046-285-8787 FAX:046-284-3738

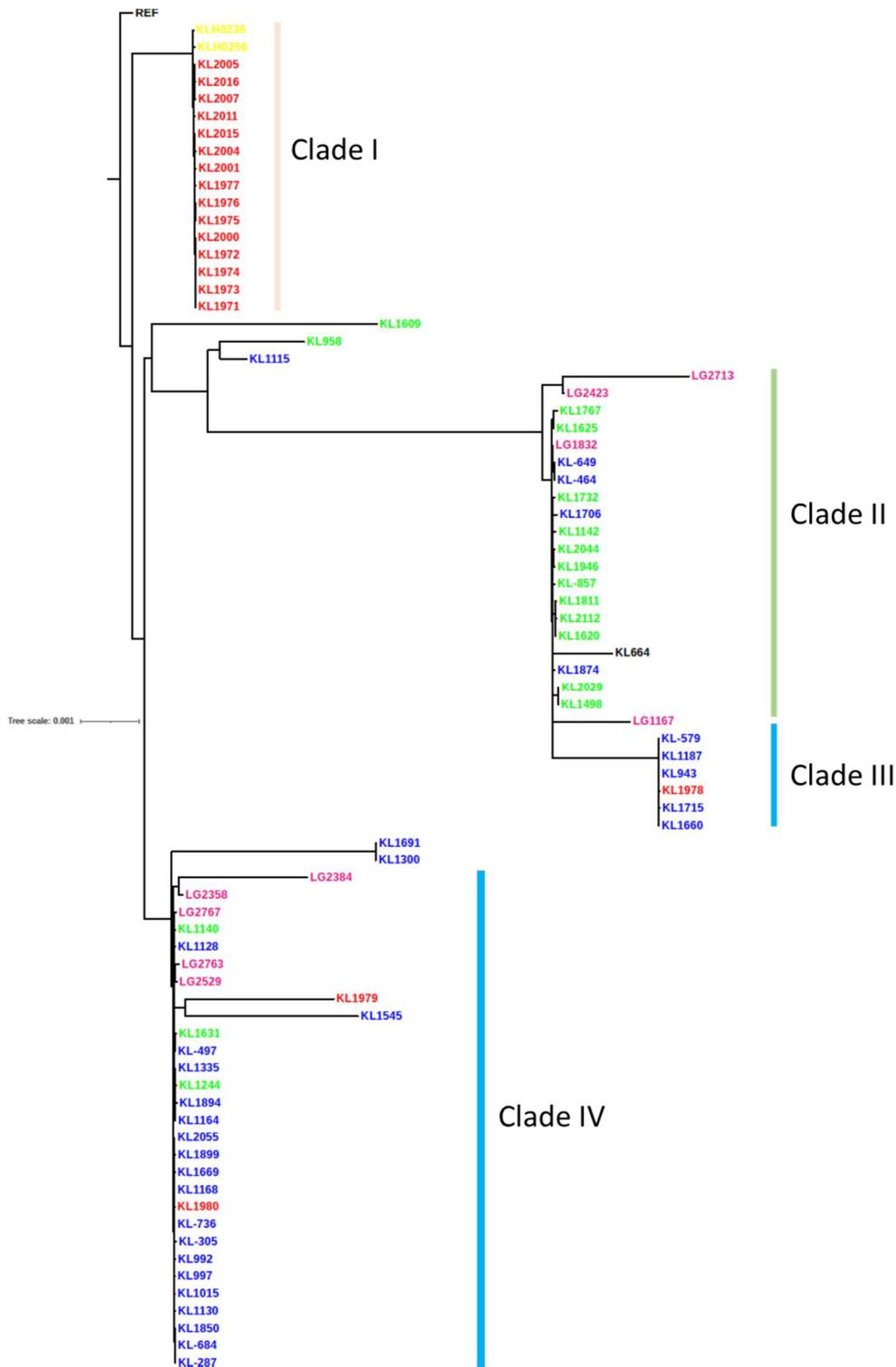


図 13-1 ST1 の 77 株から SNV 解析した系統樹

Clade I は院内感染事例、Clade II は浴槽水由来、Clade III と IV は冷却塔水由来が多い系統となった。分離株の由来を株名の色分けで表示した(院内感染事例: 赤色、浴槽水由来: 緑色 (Region A) とピンク色 (Region B)、冷却塔由来: 青色、散発事例 3 株: 黄色 (Region C) と黒色 (Region A))。

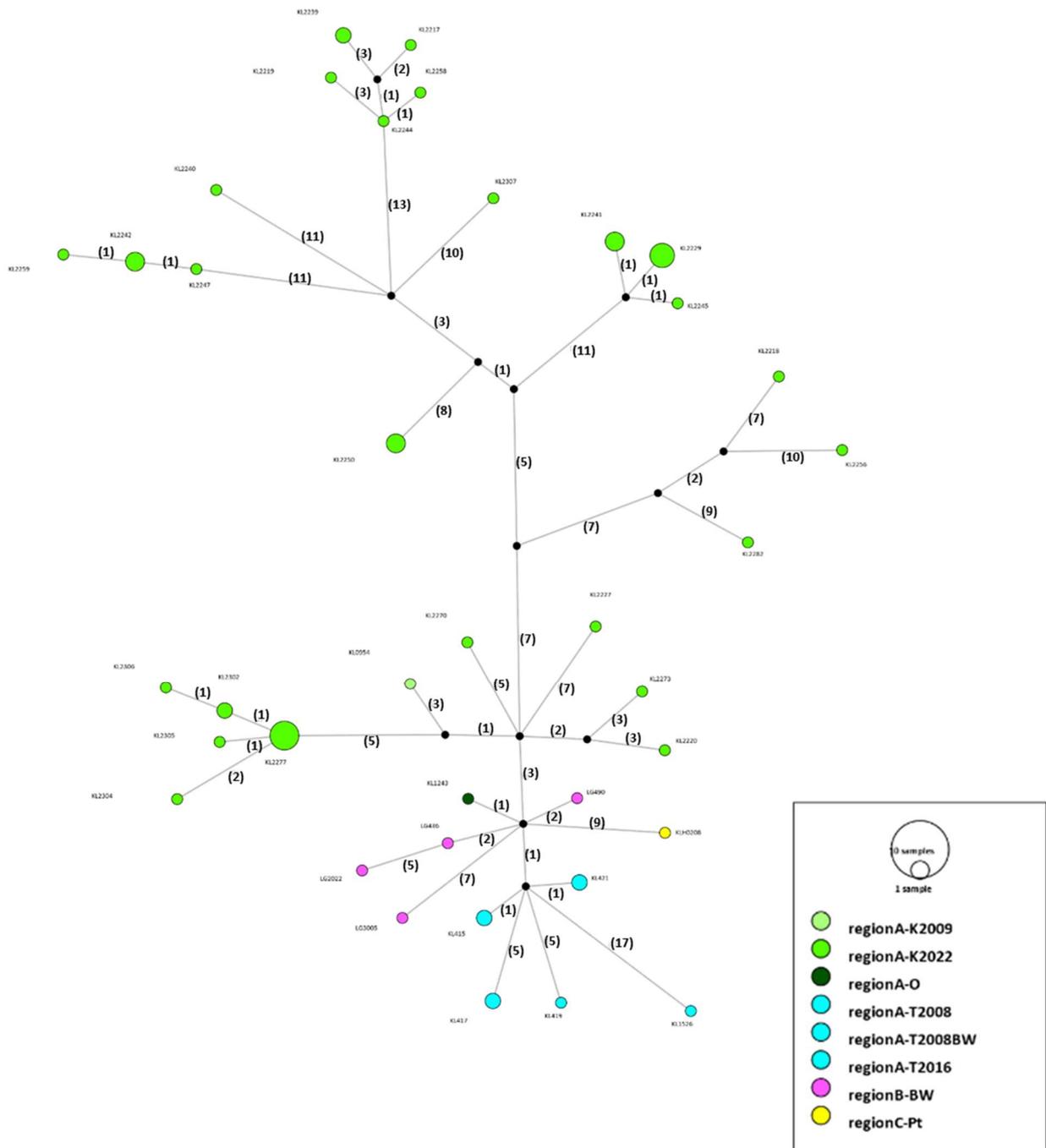


図 13-2 ST138 の 59 株から SNV 解析したハプロタイプネットワーク図

各ノード間の括弧付き数字は SNV 数を表し、多くは一行であった。異なる由来の分離株が、わずか数個の SNV しか離れておらず、図の下方に集まっており、解像度が低いことを意味している。なお、2 つの公衆浴場における集団事例から分離された株は緑色 (Region A) と水色 (Region A)、別の浴槽水に由来する分離株が深緑色 (Region A) とピンク色 (Region B)、異なる地域で生じた散发事例の 1 株が黄色 (Region C) で色分けされている。