

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、21自治体36保健所等から回答を得た。衛生対策やレジオネラ症対策に関する全国共通の資料の提供が求められていること、また、地域の情報等を追加できるよう加工可能な電子データでの提供が強く求められていることがわかった。寄せられた意見や要望に応じて、入浴施設の衛生管理の手引きの簡易版、Q&A集、内容を短く平易にまとめたパンフレットを作成した。総合衛生管理プログラムの理解と入浴施設への導入に向けて、解説用スライドと動画を作成した。

④培養検査の向上に以下を検討した。近年、各種水環境の糞便汚染指標は大腸菌群から大腸菌に移行しており、浴槽水の糞便指標を大腸菌に移行することを検討した。実際の浴槽水における大腸菌の検出状況を定量・定性試験により調査した。容易ではないレジオネラ属菌の培養検査の精度向上を目的に、外部精度管理への参加の一般化と検査精度の安定化を目指した。地衛研の外部精度管理への参加を支援して、2024年度はUKHSAのEQA *Legionella* isolation scheme、2023年度はFeraのFAPAS *Legionella* spp. in Environmental Water Proficiency Testの外部精度管理に、各年55機関が参加した。レジオネラ属菌の新規培養検査法であるレジオラート/QT法の有用性を確認するため、外部精度管理に参加し、冷却塔水の検査を行い、平板培養法と遜色ない結果を得た。

⑤分子疫学の高度化について以下の成果を得た。国内外で臨床から高頻度に分離されて、従来のSequence-based typing (SBT)法による型別では区別できなかったSequence Type (ST)の一つである *L. pneumophila* ST23の全ゲノム解析を行ない、高解像に識別できた。*L. pneumophila* ST2398を中心とした過去の集団事例のPFGE、MLVA、SBT、ゲノム解析による型別の結果は、対応して矛盾せず、SNV (Single Nucleotide Variant)数が30~42個は近縁であった。ST354は、Gubbinsによる組換え領域の除去の有無でSNV数が大幅に変化し、除去しなかったとしても疫学的に関連性のない株間のSNV数が小さいことがあり、状況に応じた疫学的判断が必要と考えられた。

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

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

陳内 理生・神奈川県衛生研究所 主任研究員

A. 研究目的

公衆浴場は、適温の湯でレジオネラ属菌等の病原性微生物が増殖し、レジオネラ属菌による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)。公衆浴場における感染事故に加えて、昨年度は冷却塔等の環境の汚染源を疑う事故まで生じており、生活環境中の汚染源対策が広く求められている(2021年 広島県、2022年 兵庫県、2023年 宮城県・大阪府)。

先の研究班の成果として、一般的な遊離塩素ではなく、結合塩素(モノクロアミン)の消毒によって、消毒の不足や塩素臭の回避が可能となった。成果は厚労省通知「公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について(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15まである課題内容別に、A.目的、B.方法、C.結果および考察、D.結論を記載した。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. アルカリ性温泉(pH10)におけるモノクロアミンの消毒効果と菌叢に与える影響

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ア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⁾。ただしモノクロアミンの連用により、*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⁾。*M. phlei*は非結核性抗酸菌の一種であり、感染報告の例はほぼないが、バイオフィルム形成防止の観点からも、増殖に対しては注意が必要である。我々はこれまでにその様な病原細菌に類するものの増加が他にも生じるのか、モノクロアミン消毒が菌叢に与える影響に注意を払ってきた。本研究ではアルカリ性温泉におけるモノクロアミン消毒の例数を増やしながら、消毒効果や菌叢に与える影響を検討した。

A2. 入浴施設におけるレジオネラ属菌による汚染の実態調査および分子疫学的解析の活用

レジオネラ属菌による汚染に苦慮する浴場施設を、2015年から追跡調査してきた。遊離塩素濃

度を高く保つ対策等を実施することで、清浄化を目指していた。以前は8か所中の5か所(最大3,000 CFU/100 mL)からレジオネラ属菌の検出があったところ、2019年度は3か所(10~300 CFU/100 mL)、2021年度は1か所(20 CFU/100 mL)の検出まで軽減されていた⁵⁾。本報告はさらなる低減と、分子疫学による詳細な把握を目的とした。

A3. 電解生成オゾン水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⁶⁾。「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」では、循環配管に2~3%の過酸化水素や5~10 mg/Lの高濃度塩素を用いる方法が紹介されている⁷⁾。「レジオネラ症防止指針」では、ろ過器に対して、1週間に1回以上の頻度で5~10 mg/Lの高濃度塩素を使用した逆洗が推奨されている⁸⁾。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であったり、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⁹⁾や水の電気分解¹⁰⁾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。

これまでの検討で、複数のろ過器に電解オゾン水を適用してレジオネラ属菌による汚染を抑制できたことから、スケールアップを目標とした。本年度は、男女2つのジェット浴槽を1つのろ過器でろ過している大型ろ過器(有効容量≒ろ材充填量

1.8m³)を試験対象とした。当該ろ過器への汚濁量は非常に多く、またジェット循環により浴槽水へ溶存酸素が絶えず供給されるため、ろ過器内に生物膜が多量に蓄積していることが想定された。「レジオネラ症防止指針」では、ジェット浴槽のろ過器に対して、毎日1回以上の頻度で5~10 mg/L 高濃度塩素を使用した逆洗を推奨しているが、当該スーパー銭湯では未実施であり、このような条件下であっても通用するのか興味を持たれた¹¹⁾。令和4~5年度と同様の方法で電解オゾン水の消毒・洗浄効果について検討した。

A4. 薬湯の循環ろ過器を、電解オゾン水を用いて逆洗する試み

生物膜の発生が強く懸念される循環式浴槽のろ過器では、汚れや生物膜の除去に、通常のろ過とは逆方向に水を送る、逆洗作業が行われる¹²⁾。これまで逆洗時に、強い酸化力が期待できるオゾン水を注入することで、生物膜を剥離し強く消毒する方法の有効性を報告してきた¹³⁾。本研究ではさらなる事例の追加として、レジオネラ属菌に苦慮している薬湯のろ過器に電解オゾン水を用いて対策を試みた。薬湯と循環ろ過の組み合わせは、無機塩などを使うものであれば問題は少ないのかもしれないが、意図して有機物を多く入れる場合はろ過器を汚染する負荷となって、衛生管理が非常に難しくなると心配される。実際、過去のフローサイトメリー法による調査で継続的に高い細菌数が確認されており、薬湯システムの回収槽水や逆洗水の消毒効果が十分でないと思われた³⁰⁾。そこで、当該システムには塩素より強い殺菌力が期待できるオゾンを適用して消毒を強化することとした。

A5. フローサイトメ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の検査法と

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、フローサイトメリー法¹⁴⁾、遺伝子検査法¹⁵⁾およびATP法¹⁶⁾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。本研究では迅速な検査法を活用して、入浴施設、現場施設の調査・予防・改善につなげる実施例を蓄積する。

A6. 高濃度塩素消毒の効果を迅速に評価する、FCM法による細菌数の測定

フローサイトメリー(FCM)法は、さまざまな分野で各種細胞の解析に利用される方法で、浴槽水への応用では、細菌数を測定することで、レジオネラ属菌のリスク判定の指標となりうることが示されてきた^{17,18)}。本研究では、浴場現場での迅速な生物膜対策として、FCM法による細菌数の応用を進めた。今回、高濃度塩素消毒の効果を迅速に評価することを目標としたが、洗浄消毒が生物膜対策として重要であること、消毒の程度や頻度が施設の衛生管理にとっては大事なことがあった。すなわち消毒の十分・不十分を現場で迅速に判定すべく、実際に温浴施設(2施設)においてFCM法で細菌数を測定し、持ち帰って測定したレジオネラ属菌の遺伝子検査法、平板培養法の結果と比較することで、現場適用が十分に可能であることを確認した。

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

浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌の検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及して

いる。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに7~10日を要する。そのため、培養法と相関する遺伝子検査法は、浴槽水の衛生状態を的確に、かつ早期に把握する点から重要な方法である。近年、モバイル型のリアルタイムPCR装置が普及し始めており、採水現場で直接のレジオネラ属菌の遺伝子検出による、迅速な結果の還元も可能な状況となりつつある。このモバイル型装置を使用したqPCR法(モバイルqPCR法)について、平板培養法や他の遺伝子検査法(qPCR法およびLAMP法)との相関を検討した。モバイルqPCR法を現場でより簡便に行えるよう、これまでのプロトコルがさらに改良された、微細流路チップを用いたろ過濃縮・簡易DNA抽出法で試験した。

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」、「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「感染症の予防の総合的な推進を図るための基本的な指針」に基づく「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。本年度は、入浴施設の衛生管理の手引き改定の検討会(以下、検討会)及び入浴施設の衛生管理の手引き改定ワーキンググループ(以下、WG)において簡易版とQ&A集の内容を協議し、これらを作成した。さらに、入浴施設の営業者が手引きの内容を理解しやすいようにすることを目的として、パンフレットを作成した。また、総合衛生管理プログラム(以下、管理プログラム)の必要性に関する動画を作成した。

A10. 浴槽水の糞便汚染指標細菌の変更の妥当性の検討

水環境の糞便汚染指標細菌は長らく大腸菌群とされてきた。しかし、大腸菌群と大腸菌の迅速定性および定量検査法が近年開発されたことで、水道水をはじめとする種々の水環境の指標細菌が大腸菌群から大腸菌へと変更されている(水質基準に関する省令 厚生労働省令第101号 平成15年5月30日)。大腸菌群には糞便由来ではなく環境に由来する細菌が含まれていることから、大腸菌群の存在が糞便汚染の実態を正しく反映していないことが以前から指摘されており、大腸菌を選択的に検出することを可能にする検査技術が開発されたことが移行の大きな理由となっている。

浴槽水の糞便汚染指標は現行では大腸菌群とし、検査法は「下水の水質の検定方法等に関する省令(昭和37年厚生省・建設省令第1号)別表第1(第6条)」に規定する大腸菌群数の検定方法に準じて実施し、基準は1個/mL以下とされている。ところが、下水の水質の検定方法が令和7年4月1日からデソキシコレート寒天培地培養法から特定酵素基質寒天培地培養法に変更されることとなった。そこで、浴槽水の糞便汚染指標細菌の検査法を、下水の水質の検定方法の変更と同様にすることが妥当であるか、あるいは別の検査法を適用するかを検討することとした。さらに、変更した際の大腸菌の基準の設定についても協議した。

A11. 浴槽水における大腸菌検査法の検討

浴槽水の糞便汚染指標を大腸菌群から大腸菌に変更することは、前述の通りに妥当性が検討された。大腸菌群には糞便由来の細菌の他、水系や土壌に生息する自然由来の細菌も含まれ、指標性は低いというのが今日の国際的な理解となっている。そして今日では、特定酵素基質培地を用いることで大腸菌を簡便かつ迅速に検出できるようになった¹⁹⁾。本研究では、実際の浴槽水における大腸菌群と大腸菌の検出状況を調査した。

A12. レジオネラ属菌の培養検査の外部精度管理(UKHSA および FAPAS)への参加と、検査精度に関連する国際的な現状

浴槽水を対象としたレジオネラ属菌の検査は、地方衛生研究所(以下、地衛研)、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属菌の基準値は、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。培養法の検査結果は、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、検査機関は各施設で標準作業手順書(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している。外部精度管理の実際は、外部で用意された模擬試料を各施設の SOP に従って検査し、自他施設の結果を比較する。評価方法はZスコアが用いられ、Zスコアの絶対値2以内が良好範囲内とされる。本研究は、外部精度管理への参加の一般化と検査精度の安定化を目指し、地衛研の外部精度管理への参加支援を検討している。2024年度は、英国健康安全保障庁(UKHSA: UK Health Security Agency)のEQA *Legionella* isolation scheme(以下、UKHSA)、2023年度は英国食料環境研究庁(Fera: The Food and Environment Research Agency)のFAPAS *Legionella* spp. in Environmental Water Proficiency Test(以下、FAPAS)への参加を進めた。加えて、国際規格の認定など、検査精度に関連する国際的な現状について情報収集を行った。

A13. 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 *L. 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。今回は外部精度管理への参加と、冷却塔水検体への適用を検討した。

A14. *Legionella pneumophila* ST23 臨床分離株の分子疫学解析

レジオネラ症の主要な起因菌である *L.*

pneumophila は、土壌、浴槽水など環境中に広く生息している。レジオネラ症患者の感染源を特定するには、患者と感染源と疑われる入浴施設等の分離株から、同一性を分子疫学により確認する。これまで用いられてきた Sequence-based typing (SBT)法の型別法は、同じ遺伝子型(ST)が高頻度に分離されることがあり、それでは感染源特定の判断が困難となるため、他の分子疫学の方法が必要であった。近年に普及した全ゲノム解析は、より高い解像度の手法であることが示されている^{20, 21)}。

国内外で臨床から高頻度に分離される ST23 は、散発事例や集団感染事例を引き起こし、国内では 2000 年、2002 年、2015 年に発生した公衆浴場集団感染事例の起因菌でもあった^{22, 23)}。さらに、冷却塔水を感染源とした事例も存在するが、散発事例での感染源は不明なことが多い^{22, 24)}。本研究では ST23 の全ゲノム解析を行い、解像度の向上を企図した。

A15. 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。

この目的に、過去の集団感染で分離された *L. pneumophila* SG1 ST2398 と関連株、それから散発的な SG2 ST354 の複数の分離株のゲノム解析を行うこととした。

特に ST354 は Gubbins による組み換え領域の除去について検討を加えた。*L. pneumophila* のゲノムは組み換えが頻繁に起こりやすく^{25, 26)}、解像度に大きく影響する可能性があった。

B. 研究方法

研究班を①消毒洗浄、②迅速検査法、③保健所衛生部局との連携、④培養検査の向上、⑤分子疫学の大きく分けて 5 分野に編成し、これらの成果により直接あるいは間接的に衛生管理の向上と推進が得られることを目指した。研究分担者 10 名、研究協力者多数の参画を得て、研究を遂行した(図 0、表 0)。地衛研・保健所や民間企業を通じて、現場施設の支援、協力や参加を得た。感染研と地衛研で形成するレファレンスセンターの協力を得て、患者株や環境株の収集解析を行った。

B1. アルカリ性温泉 (pH10) におけるモノクロロミンの消毒効果と菌叢に与える影響

協力を得た対象施設は、消毒に影響を与える物質をほとんど含まない、pH9.8 の源泉水を利用していた。試験対象浴槽は約 5 m³ の露天風呂とした。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、1 週間に 1 回の換水と清掃をしていた。モノクロ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、採水はモノクロロミン導入前後の 4 週間に週 1 回、配管消毒 4 日後からの、営業開始前に実施した。

PCR 用試料の一部は、浴槽水 1L をろ過した後、死菌の影響を抑制するための DNA 修飾色素

(PMAxx、Biotium)で処理した。PMAxx 処理および非処理フィルターから DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN)を用いて DNA 抽出を行った。16S rDNA コピー数の定量は Clokie らの方法により行った²⁷⁾。同遺伝子の V3-V4 領域を対象として、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)。菌叢の割合は、モノクロラミン消毒導入前後と PMAxx 処理の有無別にそれぞれ 4 週間分のデータを平均した。病原性細菌の種類については、少なくとも 1%以上の存在割合の範囲に病原菌としての報告があるかを確認した。

B2. 入浴施設におけるレジオネラ属菌による汚染の実態調査および分子疫学的解析の活用

神奈川県内の入浴施設 1 か所において、2 つの浴室(浴室1 および2)の浴槽、湯口、カーン、シャワー、配管末端放水部、ろ過器、地下および高置貯湯槽から、計 18 試料を採水した。培養検査は定法により行った。SBT 法は、European Working Group of *Legionella* Infections (EWGLI)の方法に従い、7 つの遺伝子領域(*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*)の PCR-Seq による塩基配列から型別(Sequence type)した²⁸⁾。全ゲノム解析は、取得したリードデータ(Rhelixa)から、snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>)を用いて SNV を検出、Gubbins を用いて推定組み換え領域を除去してから、PopART でネットワーク図を作成した^{29,52)}。

B3. 電解生成オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

試験対象としたろ過器は、男女のジェット浴槽(源泉水、11 m³×2、42°C、pH7.5)を併せてろ過している(図 3-1)。先の試験と同様に、営業終了後、逆洗前のろ過器(有効容量=ろ材充填量 1.8m³、直径約 1.4m×高さ約 1.2 m)に対して、電解オゾン

水を毎日供給した(図 3-2)。協力を得た当該スーパー銭湯は、試験期間中、年末年始や連休等の繁忙期を含めると、1 日に 1,000~2,000 人の入館者数があった。ジェット浴槽は施設の中心的な浴槽であることから、ろ過器への汚濁量は日常的に非常に多いと考えられた。オゾン供給前の状況を調べるために、オゾン供給を開始する 263 日前(2022 年 11 月 12 日)より水質分析を開始し、この日を試験開始日とした。

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。電極は昨年度と同じ電極(オゾンバスターインダストリー、オゾンマート製)を用いた。オゾン濃度は、消毒効果に不足を感じたことから、0.5 から 1.5 mg/L へと段階的に変更した。始動スイッチを一度押すだけで、ろ過器下部のドレン口より電解オゾン水を供給し、タイマー制御により一定時間経過後停止する。ろ過器の逆洗の際にその始動スイッチの押下を施設担当者へ依頼して、逆洗時のろ過器に電解オゾン水を毎日供給した。井水の供給量の制限から、流量は 26L/min、供給時間はろ過器容量分(1.8m³)を供給する 70 分間(=1800L÷26L/min)とした。

電解オゾン水の効果を調べるため、週 1 回の頻度で浴槽水および逆洗水を採水し、レジオネラ属菌他を定法に従い測定した。浴槽水の採水は、汚染が最も高くなる換水前と、ジェット循環配管からの汚染を考慮に入れた換水後も行った。逆洗水の採水は、電解オゾン水の供給を開始する前の逆洗水(換水前オゾン無し逆洗水)と、電解オゾン水開始後は浴槽からの汚染を考慮に入れて換水前後(換水前オゾン有逆洗水、あるいは換水後オゾン有逆洗水)に行った。グラフ中のレジオネラ属菌の濃度の 1 CFU/100 mL は不検出(検出限界 10 CFU/100 mL)を表している(図 3-3)。

B4. 薬湯の循環ろ過器を、電解オゾン水を用いて逆洗する試み

1 日の入浴者数が千人規模の営業施設の協力を得て試験を実施した。それぞれの循環系統に回収槽があり、週 1 回の清掃・消毒が行われていた。生物膜対策として、週 1 回の頻度で 20 mg/L×1 時間の高濃度塩素による洗浄と、年 3 回の配管の化学的洗浄が行われていた。なお、当該浴槽水は毎日換水されていた。

電解オゾン水の発生装置を設置した薬湯は、井水に入浴剤や生薬などを入れていた。ろ過器は単独の循環系統でその大きさは約 100 L、浴槽水の水量は約 3 m³ であった。試験前の消毒は、次亜塩素酸ナトリウムにより残留塩素濃度 1.0~2.0 mg/L と高めに管理されていたが、回収槽の存在や薬湯の影響により、ろ過器内の強い汚染が懸念された。

ろ過器の消毒に、電解オゾン水を使用した¹³⁾。電解オゾン水の注入は、流量を 10 L/min、オゾン濃度を約 1.2~1.8 mg/L、注入時間を 20 分(200 L)で行った。月~土曜日の営業終了後、ろ過器の逆洗時に、毎日電解オゾン水の注入を実施した。毎週日曜日に高濃度塩素洗浄を行い、その日は電解オゾン水を注入しなかった。採水は、土曜日夜の逆洗時に行った。浴槽水は逆洗後に毎日換水されており、採水時は営業終了後の有機物等が最も蓄積した状態で行い、電解オゾン水の効果を最も評価しやすいタイミングと期待した。

電解オゾン水の処理を開始して3ヶ月が経過すると、排水からレジオネラ属菌が検出されて効果が認められにくくなった。そこで電解オゾン水の消毒効果がより強く発揮されることを期待して、ろ過器内の水を一旦排水した後から、電解オゾン水を注入する方式に変更した(以降、排水オゾン処理という)。その後も微量のレジオネラ属菌が検出される傾向は変わらなかったために、電解オゾン

水の開始から 8 か月後にろ材を交換したが、それでもレジオネラ属菌が検出された。その汚染源を究明して改善に至った経緯は既に報告したとおりである³²⁾。即ち、電解オゾン水の開始から約 10 ヶ月後に汚染源が循環排水口の上蓋にあることを発見、対処した。

調査全般にわたって月 1~2 回の頻度で逆洗水を採水、検査したが、浴槽水の安全性を確認するために、一時、浴槽水も検査した。詳細な採水の操作は、次のとおり実施した。即ち、逆洗前に予め検水の遊離塩素濃度を測定し、ろ過器内水を排水した。電解オゾン水の発生装置を稼働させたら、半自動的に逆洗を開始して、逆洗中の電解オゾン水のオゾン濃度を測定した。20 分間の電解オゾン水の注入後に、逆洗水を採水した。浴槽水を詳細に検査する場合、当日 19:00 の遊離塩素濃度の測定と同時に検水を採取した。採水した検水は冷蔵で実験室に運び入れ、非培養検査(ATP 法、FCM 法、遺伝子検査法)と培養検査法(平板培地とレジオラート)を実施した。

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

4 つの入浴施設(以下 O 施設、P 施設、Q 施設、R 施設)の協力を得た。フローサイトメトリー法、遺伝子検査法、塩素濃度測定、ATP 法等を用いて、4 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。塩素濃度(DPD 法、Hach 又は柴田科学)、ATP 濃度(ルミテスター PD-30 とルシパック A3 Water(液体測定用)、キョーマンバイオケミファ)、細菌数(RF-500 又は miniPOC、Sysmex-Partec)、レジオネラ属菌の遺伝子コピー数(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)、生菌数

(GVPC 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。顕微鏡観察に共焦点レーザー顕微鏡(LSM880、Zeiss 社製)を使用した。顕微鏡の観察試料は、SYTO9(Thermo Fisher Scientific 社製)、Rhodamine Concanavalin A (Vector Laboratories 社製)を用いて蛍光染色した。

省力化配管洗浄は、施設 Q と R において実施した。助剤の追加でフェントン反応を応用した過炭酸ナトリウムによる洗浄方法(花王)で、従来の過酸化水素や過炭酸ナトリウムを用いる方法より少ない洗浄剤の量で、従来同様の洗浄効果が得られる工夫がなされている。

モノクロロミン消毒は、添加装置(アクアス)を設置済みの施設 Q において、適用拡大を試みた。既報の通り³²⁾、循環式浴槽に供用して、濃度を安定して保てており、レジオネラ属菌の不検出、臭気を感じない、濃度管理に要する労力の著しい軽減効果を得ていた。他の循環系統でもモノクロロミン消毒を行うため、同じ井水を利用する他の循環系統へ、既存の消毒装置に制御装置と分配装置を増設した。最終的に、ジェット浴 18 t、野外にある歩行浴 25 t、サウナと併設する冷水浴 8 t、さらに薬湯 6 t を消毒した。添加装置は 3 系統あり、(毎日換水の)ジェット浴と薬湯をそれぞれ独立した 2 つの系統とし、3 系統目に(換水 7 日間隔で濃度安定の)歩行浴と冷水浴を接続して分配先を手動切り換えとした。水質検査は月 1 回の間隔で採水して、ATP 法、FCM 法、従属栄養細菌数の検査、レジオネラ属菌の培養検査法および遺伝子検査法を実施した。

B6. 高濃度塩素消毒の効果を迅速に評価する FCM 法による細菌数の測定

合計 149 検体の高濃度塩素洗浄後の浴槽水試料を全国各地の温浴施設等から収集した。それら

の FCM 法による細菌数の測定と、遺伝子検査法(qPCR、EMA-qPCR または LAMP)および平板培養法によるレジオネラ属菌の検査結果を比較した。

茨城県内の 2 ヶ所の温浴施設(A、B)において現地での FCM 法による測定を実施した。施設 A は天然温泉で茶褐色の濁質を含んでおり、日頃より遊離塩素処理されている。定期的にレジオネラ属菌の検査を実施しており、過去に源泉タンクからレジオネラ属菌が平板培養法で検出されたことがある。施設 B は井水の沸かし湯で濁質等は特に見られず、日頃より遊離塩素処理されている。定期的にレジオネラ属菌の検査を実施しており、検出された記録は見られない。

生物膜対策として用いられる 10 mg/L×2 時間の消毒後の採水を推奨しているが、基本的に施設衛生管理者に作業を任せているため採水時の消毒状態は必ずしも一定ではない。各施設では、高濃度塩素消毒後に中和して換水し、残留塩素濃度を測定したのちにチオ硫酸ナトリウム入り滅菌ポリ容器に採水して、冷蔵状態で検査施設に持ち込み、搬入後 24 時間以内に検査に供した。

可搬式フローサイトメーターとして、miniPOC (Sysmex-Partec 社製)を使用した³¹⁾。Gate 内の細菌数 1,000 cells/mL は今回の基準値とせず、遺伝子検査および平板培養法検査結果と比較して別に基準値を設定した。qPCR 法は、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を用いた³³⁾。EMA-qPCR 法は、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0(タカラバイオ)および LED Crosslinker 12(タカラバイオ)を用いた。LAMP 法は Loopamp®レジオネラ検出試薬キット E を用いた(栄研化学)。レジオネラ属菌の培養検査は ISO 11731 に準拠したろ過濃縮法により行い、培地は GVPC α 培地(日研生物)を使用した。

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

公衆浴場から採水した浴槽水 30 検体、シャワー水 8 検体、カラン水 8 検体を用いた。モバイル qPCR 法には濃縮前の検水を用いた。フィルター吸引ろ過により 100 倍濃縮液を用意して、培養試験、LAMP 法、qPCR 法に使用した。モバイル qPCR 法に、微細流路チップを用いたろ過濃縮・簡易 DNA 抽出法を組み合わせ使用した。すなわち、微細流路チップ(ピリユーチップ、ゴーフォトン)を固定治具(ゴーフォトン)にセットし、検水 40 mL をシリンジでフィルターろ過した³⁴⁾。滅菌水で洗浄後、カネカ簡易 DNA 抽出キット version2(カネカ)を用いて DNA を抽出した。なお、44 検体を対象に実施したが、4 検体はフィルターが詰まってる過できなかったため、40 検体(浴槽水、シャワー水・カラン水:陽性 13、陰性 27)と比較した。qPCR 反応は、PicoGene[®] *Legionella* spp. Kit(ゴーフォトン)および PicoGene[®] PCR1100(ゴーフォトン)を用いて実施し、レジオネラ属菌の遺伝子およびインターナルコントロールを検出した。なお、このモバイル qPCR 法の成績は、他の検査と同様に試験室で行い、現場では行ったものではない。標的遺伝子が検出された場合(Ct 値 42 未満)を陽性と判定した。LAMP 法は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E(栄研化学)を使用した。標的遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。qPCR 法は、Lysis Buffer for *Legionella*(タカラバイオ)で DNA を抽出後、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を使用した。標的遺伝子が検出された場合(Ct 値 45 未満)を陽性と判定した。

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。

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

WG(ワーキンググループ)および検討会(入浴施設の衛生管理の手引き検討会)において、簡易版と Q&A 集を検討した。検討会のメンバーはこれまでと同様に、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。WG のメンバーは、これまで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で構成した。

簡易版は、案を作成した後に検討会においてオンラインの会議において内容を協議した。WG では、検討会で簡易版案を修正した後にさらに内容を精査し、修正を加えた。Q&A 集の作成は、検討会においてオンラインで内容を協議した。検討会での協議に並行して、WG においてもメールの交換により Q&A 集案の内容を協議した。

パンフレットの作成は、研究協力者の中から、検討会と WG とは別に新たなグループを立ち上

げて、手引きの概要を平易に解説するパンフレットを作成した。グループメンバーから素案に対する意見を聴取し、修正を加えた。

手引きに記載されている管理プログラムの解説スライドをパワーポイントで作成し、説明動画を作成した。

B10. 浴槽水の糞便汚染指標細菌の変更の妥当性の検討

平成 18 年度の研究班(平成 18 年度 掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究:研究代表者 井上博雄(掛け流し式温泉研究班)、および平成 18 年度 温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究:研究代表者 倉文明(温泉の泉質研究班))において実施された浴槽水の大腸菌群・大腸菌汚染実態調査のデータに基づいて大腸菌群数と大腸菌数の比率を計算した。

現在の浴槽水の大腸菌群・大腸菌汚染の実態も調査した。3 自治体の 137 入浴施設から浴槽水を 1 検体ずつ採取した。各検体はチオ硫酸ナトリウムを添加したポリ容器に採取し、冷蔵で輸送し、検査を開始するまで冷蔵で保管した。検査法は、現行法と特定酵素基質培地法による定量法および定性法とした。現行法として、検水 1mL を 2 枚のデソキシコレート寒天培地に混和し、35°C で 20 時間培養した。培養後、コロニーの色調に基づいて、プレート 2 枚の平均値から大腸菌群数を算出した。定量法で用いる特定酵素基質寒天培地は、アキュディア™XM-G 寒天培地(島津ダイアグノスティクス)あるいは ES Colimark Agar(栄研化学)とした。検体 1mL を混釈し、35°C で 20 時間培養後に判定した。コロニーの色調に基づいて、プレート 2 枚の平均値から大腸菌・大腸菌群数を算出した。定性法の検査には、特定酵素基質培地である EC ブルー 100P(島津ダイアグノスティクス)または

Colilert (IDEXX)を用いた。あらかじめ培地が分包されたボトルに検水を 100mL 添加あるいは検体 100 mL に培地の 1 包を添加し、35~36°C で 24 時間培養後、青~青緑色/黄色の呈色および蛍光の有無により大腸菌群および大腸菌の判定を行った。定量法の大腸菌の基準を「1 個/mL 以下」、「1 個/mL 未満」、「不検出」の 3 通りと、定性法の基準を「不検出」とそれぞれ設定し、それらによる判定結果と現行法による大腸菌群の基準「1 個/mL 以下」の判定結果との比較をフィッシャーの正確確率検定 (OpenEpi サイト: [https:// www.openepi.com](https://www.openepi.com))により検定した。

残留塩素濃度が基準値未満(遊離残留塩素濃度<0.4mg/L または結合塩素濃度<3mg/L)の浴槽水と基準値以上(遊離残留塩素濃度 \geq 0.4mg/L または結合塩素濃度 \geq 3mg/L)の浴槽水に分け、それぞれの大腸菌群あるいは大腸菌の検出率の差の検定を、フィッシャーの正確確率検定を OpenEpi サイトを利用して行った。

欧米においては水浴場の水や浴槽水の水質基準は、recreational water にかかる基準とされている。今回の浴槽水の糞便汚染指標細菌の対象を大腸菌群から大腸菌への移行に伴う基準の検討に際して参考とするために、欧米の基準やその根拠に関連した文献等を調査した。

B11. 浴槽水における大腸菌検査法の検討

入浴施設 126 施設の実際の浴槽水を、大腸菌・大腸菌群の検査に用いた。なお一部試料は、前述の妥当性の検討と重複するものがあるが、集計タイミングが異なり、重複しないものもあった。

大腸菌検査の特定酵素基質寒天培地は、ES コリマーク寒天培地(栄研化学)、アキュディア™XM-G 寒天培地(島津ダイアグノスティクス)、クロモアガー™ECC 寒天培地(関東化学)、クロモカルトコロフォーム寒天培地(Merck)、Pro•media ア

ガートリコロール(エルメックス)、EC ブルー100P「ニッスイ」(島津ダイアグノスティクス)または Colilert (IDEXX)から、いくつかを選んで使用した。現行の大腸菌群試験にデソキシコレート寒天培地 (Merck)を使用した。

定量試験は、検体 1 mL を混積培養し、コロニーの色調に基づいて菌数を計数し、2枚の平均値を算出した。生育したコロニーの菌種同定には MALDI-TOF MS (Bruker)を用いた。定性試験は、培地と検体 100 mL を混合して、35~36°Cで 24 時間培養後、青~青緑色/黄色の呈色および蛍光の有無を判定した。

B12. レジオネラ属菌の培養検査の外部精度管理(UKHSA および FAPAS)への参加と、検査精度に関連する国際的な現状

2024 年度は UKHSA の G136(2024 年 10 月実施)、2023 年度は FAPAS の LG0124(2024 年 2 月実施)に、地衛研 55 機関が参加した。参加地衛研の募集は、国立感染症研究所と地衛研で構成される「衛生微生物技術協議会レジオネラ・レファレンスセンター」を通じて行った³⁵⁾。検査は、UKHSA および FAPAS に指示された方法に加えて、研究班が指定する方法で並行して行われた。すなわち、UKHSA に指示された方法は、各機関の SOP による環境水の標準的な方法の「前処理あり、選択培地」、研究班が指定する方法として「前処理なし、非選択培地」が行われた。一方、FAPAS に指示された方法は、「前処理なし、非選択培地」、その他の手順は各機関の SOP 通りで行う。研究班が指定する方法として、環境水の標準的な方法である「前処理あり、選択培地」を追加した。レジオネラ属菌の検査は前処理と選択培地への接種により菌数の減少が避けられず、研究班としては研究の参考として、その前後の菌数を把握する目的で測定を追加している。地衛研から収集

したデータと、UKHSA および FAPAS から提供を受けたデータを合わせて解析や課題の抽出を行った。検査精度に関連する国外の現状について、WHO や ESGLI (ESCMID Study Group for *Legionella* Infections)が策定したガイドライン等の情報を収集した。

B13. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

検査機関 5 施設において UKHSA の外部精度管理に参加し、sample A 及び sample B の 2 検体について、レジオラート/QT 法及び平板培養法の検出を比較した。レジオラート/QT 法は 10 mL プロトコルに従い n=2 で実施して、陽性ウェル数から専用の最確数表を用いて most probable number (MPN) 値を求めた。平板培養法は定法に従い、各施設の方法(無処理・酸処理・熱処理、またはその組み合わせ)で行った。

冷却塔水検体は、各機関に搬入された計 62 検体を対象とした。レジオラート/QT 法は 10 mL プロトコル(無処理と酸処理の 2 通り)で実施した。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 加えて 5 分間の後、15% KOH を 0.3 mL 加えて中和した。レジオラートの粉末を 90 mL の滅菌水で溶解し、検体全量を加えよく攪拌した後、Quanti-Tray/legiolert に封入し 37°C で 7 日間培養した。陽性ウェルの一部は GVPC 寒天培地等の培地に塗布し、36°C で培養し、レジオネラ属菌を分離した。

B14. *Legionella pneumophila* ST23 臨床分離株の分子疫学解析

日本国内で 2000 年から 2023 年までに分離された *L. pneumophila* ST23 の 78 株(臨床分離株 61 株ならびに環境分離株 17 株)を用いた。これには 3 事例の公衆浴場集団感染事例の分離株(9 株

(2000年)、9株(2002年)、4株(2015年))が含まれる。菌株 DNA からライブラリを調製後、MiSeq あるいは NovaSeq (Illumina) を用いてリードデータを取得した。系統解析に、クラスタリングパイプラインである *Legionella Clustering* (LegioCluster) pipeline (version 1.0.0) を用いた²⁵⁾。本パイプラインでは、基準配列が自動的に選択される。識別力を高めるために、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) に加えて、ME (mutation events; SNP+insertion+deletion イベント) が検出される。1~100塩基の挿入または欠失が単一の indel イベントとして定義される。すべての分離株の SNP と ME をペアワイズ比較した表 (SNP マトリックスならびに ME マトリックス) から、Prim のアルゴリズムに従い、Minimum Spanning Tree (MST) 図を作成される。各分離株の 2 株間 SNP ならびに ME を詳細に検討した³⁶⁾。

B15. 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

過去に入浴施設で発生した集団感染の一事例について、詳細な解析を行った⁵⁷⁾。患者 22 名から分離の 51 株と、浴槽水や浴槽ふき取りから分離の環境株 43 株中、ゲノム解析には一部の 32 株を用いた。ゲノム解析に供した菌株の内訳は、*L. pneumophila* SG1 ST2398 株が 13 株 (患者由来 10 株と環境由来 3 株)、ST2399 が 8 株 (患者由来 6 株、環境由来 2 株)、環境由来である ST2401 が 1 株、ST601 が 2 株、*L. pneumophila* SG8 が 2 株、SG11 が 6 株である。

散發例の *L. pneumophila* SG2 ST354 の 23 株をゲノム解析に使用した。内訳は、2022 年 7 月に発生した散發例の patient1 の 1 株 (KL2335) と、2022 年 11 月に発生した散發例の同一患者 (patient2) から分離された 14 株 (KL2436-00~KL2436-13)、事例とは全く関係のない入

浴施設 A と B で、それぞれ経年的に分離された 5 株 (KL1194, KL1286, KL1653, KL1880, KL2643) と 3 株 (KL1182, KL1399, KL1884) である。

菌株 DNA から 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、BactSNP によりコールされた SNV から、Snippy によるコア領域の推定、Gubbins 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^{38,39)}。Reference 配列として *L. pneumophila* str. Paris 株 (Accession no.; CR628336.1) を用いた。

(倫理面への配慮)

病原体の取り扱い、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがった。利益相反委員会の指導・管理に従って、研究協力関係にある企業等について、研究班内で情報共有を行った。開示すべき企業からの経済的利益は受けていない。

C. 結果および考察

C1. アルカリ性温泉 (pH10) におけるモノクロロミンの消毒効果と菌叢に与える影響

モノクロロミン導入前の全 4 検体から *Legionella pneumophila* 血清群 1 (および型別不能) が検出され、定量値は 70~300 CFU/100 mL であった (表 1-1)。モノクロロミン導入後は、浴槽水のレジオネラ属菌が抑制され、良好な衛生状態が得られることを再確認できた。浴槽水中の一般細菌数 (300~5,000 → 不検出~14 CFU/mL) と従属栄養細菌数 (400~24,000 → 1~4 CFU/mL) は大幅に減少した。これまでの実証試験では、従属栄養細菌数が増加した施設があった一方で、増加のない施設も

あった^{3,4,53})。増加しない施設の共通点は一日の入浴者数が比較的少数(100~300名)であり、汚染の負荷量と洗浄の頻度や程度、バイオフィルムの蓄積の有無が関連していると考えられた。

浴槽水中の16S rDNAコピー数は、モノクロロミン導入前後で有意な変化はなく、PMAxx処理サンプルでは非処理サンプルと比較し1/10~1/60程度に減少した(図1-1)。

浴槽水の菌叢解析の結果、モノクロロミン導入前のPMAxx非処理サンプルでは、温泉、湖や土壌などの自然環境中に存在する⁴⁰⁻⁴⁴) *Porphyrobacter* 属菌、*Pseudomonas alcaligenes*、*Aquidulcibacter* 属菌、*Tepidimonas fonticaldi*、*Acidovorax lacteus* が優占種であった(図1-2)。導入後は、これらの割合は大きく減少し、ヒトの皮膚の常在菌⁴⁵)である *Staphylococcus* 属菌や *Corynebacterium tuberculostearicum* の存在割合が増加するなど菌叢が変化したが、病原菌として報告されている細菌の割合は増加しなかった。

C2. 入浴施設におけるレジオネラ属菌による汚染の実態調査および分子疫学的解析の活用

2022~2024年における調査結果を表1に示した。遊離塩素濃度は2023年まで高値に維持されていたが、施設の方針に変更があり、2024年に中央値0.36 mg/Lまで濃度が低下した。汚染の悪化が心配されたが、幸い、レジオネラ属菌が高濃度にはならず、汚染は抑えられていた。レジオネラ属菌の検出が多いカラン4は、利用頻度が低く、遊離塩素の消毒効果が乏しいのかもしれない。

本調査で新たに追加したろ過器試料は、浴室1が不検出、浴室2で分離があった。浴室2ろ過器はレジオネラ属菌による汚染が確認されたものの、低値であり、両浴室のろ過器は管理が良くなされている方と考えられた。例えば、当該施設では営業終了後に毎日ろ過器の逆洗が行われていた。

浴室2のカランとろ過器は異なる血清群の *L. pneumophila* およびレジオネラ属菌であり、ろ過器の汚染の拡散はない模様であった。

しかし、今回分離されたSG1と9は過去にはカランや湯口から分離されたことがあったため、分子疫学的手法で汚染の詳細を検討した。過去の分離株(2015~2023年分離株)を含めたところ、同じST(ST1およびST1907)が過去の分離株にあり、ST1は浴室2湯口(2016年)およびカラン3(2018年)、ST1907はカラン1と3(2015年と2016年)から検出されていた。すなわち、同じSTが8年もの間、分離場所は異なるが、施設内に維持されていた。

これらST(ST1の4株、およびST1907の6株)の一致が偶然によるものか、さらに詳細な検討を加えた(図2-1)。ST1の浴室2ろ過器と湯口のSNV差が1~3と近縁で、これはろ過器の湯が湯口に届くためと考えられた。ST1907の浴室2のろ過器と浴室1のカラン1のSNV差も5~26と近縁であった。ST1907の多くは遊離塩素消毒が徹底される前の2015~2016年に分離された株で、2016年頃はこのST1907が浴室1と2に共通して施設の広い範囲を汚染していたが、その後の対策により汚染が軽減され、現在は浴室2のろ過器に限定的な汚染が残存していると推測された。

C3. 電解生成オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

電解オゾン水の供給を開始するまでの間、汚染が最も高くなる換水前浴槽水のレジオネラ属菌は、不検出の時はあるものの、散発的に検出された(図3-3A)。浴槽水の消毒はジクロロイソシアヌル酸を用いた遊離塩素消毒が濃度0.1~1.1 mg/L程度で維持されていたところ、消毒しきれない汚れがあると懸念された。263日目より電解オゾン水の供給を開始し、濃度を段階的に上昇させたが、

換水前浴槽水に大きな改善はなくレジオネラ属菌が検出された。換水後のレジオネラ属菌の濃度が低いのは当然なこととして、換水前の濃度が高かったのは、ジェット循環配管の問題が大きかったかもしれない。

装置の都合により電解オゾン水の供給を停止した700日目から727日目までの約1ヶ月の間、換水前と換水後の浴槽水共にレジオネラ属菌は連続して検出され、菌数が上昇傾向となった。その後、727日目より1.5mg/Lで電解オゾン水の供給を再開すると、換水前浴槽水の菌数は減少傾向、換水後浴槽水は4週間連続して不検出となり、ろ過器に対する電解オゾン水の消毒・洗浄効果が見られた。しかし前後してレジオネラ属菌が散発的に検出されており、ろ過器の電解オゾン水による消毒だけでは対策しきれなかった。

電解オゾン水のオゾン濃度が上昇するにつれ、換水前オゾン有逆洗水中のレジオネラ属菌は減少傾向となり、ろ過器内の汚れの減少が示唆された(図3-3B)。電解オゾン水の供給を停止した700日目から727日目までの約1ヶ月の間、換水前逆洗水のレジオネラ属菌は13,000 CFU/100mLまで急上昇し、オゾン再開後も菌数はすぐには下がらなかった(厳密にはオゾン無しだが、換水前オゾン有逆洗水と同列に図示)。電解オゾン水の供給の停止中に、ろ過器内に汚れが蓄積したと考えられた。なお、電解オゾン水の供給を再開後に、換水前オゾン有逆洗水のレジオネラ属菌は一時的に減少したものの、4,100 CFU/100mLまで増加して高めが続いたのは、年末年始の入館者数増加により、汚れの負荷が高かったかもしれない。

ろ過器に対する電解オゾン水は一応の効果があると考えられたが、オゾン濃度は不足したようであった。現場で実際に供給している電解オゾン水の減衰の程度を確認したところ、オゾン濃度は60分後に約1/4にまで減少することが分かった。一

方、電解オゾン水のろ過器容量分の供給に、70分を要した。つまり少なくとも、ろ過器下部より供給される電解オゾン水がろ材上部に到達するまでにオゾン濃度は1/4以下になってしまい、加えて汚れによる消費もあり、オゾン濃度の不足が強く示唆された。

本研究の電解オゾン水による消毒のスケールアップは、残念ながら不足があったと考えられた。

C4. 薬湯の循環ろ過器を、電解オゾン水を用いて逆洗する試み

電解オゾン水を薬湯に適用して、前後約2年間、薬湯の逆洗水を採水した。電解オゾン水の注入は、開始から1ヶ月間は処理前と比べてレジオネラ属菌を抑制する傾向を示したが、2ヶ月ほどたつと効きづらくなった(図4-1)。2023年2月17日以降排水オゾン処理により電解オゾン水処理を、ろ過器内を排水した後に電解オゾン水を供給する方式で処理を強化したところ、一定の抑制は認められた。ただし、低濃度とは言え散発的にレジオネラ属菌の生菌が検出され、一過性に高い濃度の遺伝子も検出された。ろ過器のろ材は長期に交換されていなかったことから、ろ材を交換し、廃ろ材からレジオネラ属菌を検査したところ、レジオネラ属菌の生菌も遺伝子も全く検出されなかった。

これら循環ろ過系統以外の、レジオネラ属菌の汚染源の発見と対応の詳細については、既報のとおりである³¹⁾。すなわち、レジオネラ属菌の汚染源が循環排水溝の上蓋にあることを発見し、当該部の消毒洗浄処理を開始してからは、レジオネラ属菌は検出されなくなった。

レジオネラ属菌の汚染源を発見する前の5か月間と発見後の1年2ヶ月間について、各種測定の平均値を比較した(表4-1)。汚染源対策後はレジオネラ属菌が不検出となったが、対策前の浴槽水からレジオネラ属菌の生菌は検出されず、遊離

塩素消毒の効果も十分にあったと考えられた。レジオネラ属菌の不検出は約1年間継続することができた。電解オゾン水のろ過器逆洗による清浄化作用はこれまでの報告¹³⁾でも認められており、その消毒効果は期待通りに得られていたと考えられた。汚染源対策前に微量なレジオネラ属菌の汚染が続いたのは、ろ過器とは別の理由であり、電解オゾン水が通用しなかったのは当然であった。

過去の電解オゾン水を用いた逆洗では、ATP量、一般細菌数およびFCM法の細菌数が減少していた^{13,30)}が、今回はほとんど変化が認められなかった(表 4-1)。施設衛生管理者によると、レジオネラ属菌の汚染源であった排水溝上蓋のATP量は、対策後もゼロになることはなく、時に $10^3\sim 10^4$ RLUを示したとのこと(データ不掲載)。すなわち、逆洗水から検出された細菌は、排除しきれない生物膜由来と考えられた。このような細菌数の高さから生物膜再発が懸念されたが、ろ過器の逆洗水からレジオネラ属菌は検出されず、電解オゾン水による消毒は機能していたと考えられた(図 4-1)。浴場にとって生物膜の生成は避けられず、常時の消毒と定期的な洗浄が重要であることはまちがいない。今回の調査により、衛生管理者には設備の監視と洗浄消毒を継続して行うことの必要性を理解してもらうことができた。

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

施設 O は、受湯槽と貯湯槽の温度が 60°C に達しなかった冬季(52°C)では、受湯槽と遠方客室からレジオネラ属菌の遺伝子(死菌由来)が検出されたが、 60°C を超えた夏季(64°C)では不検出となった。受湯槽や貯湯槽の高温管理はレジオネラ属菌の制御に効果があるとともに、従来から言われていた 60°C が維持管理の目標値として適切であることが改めて確認された。対策としてリスク

の高い受湯槽、貯湯槽および遠方浴室の定期的な温度測定を提案して了承された。

施設 P は冬季でも高温を保持できており、源泉や湯口水から若干の ATP は検出されたものの、細菌数やレジオネラ属菌の遺伝子は低く保たれていた。冬季には見られなかった、ATP とレジオネラ属菌の遺伝子(死菌由来)の集積が、夏季に認められた。例えば湯口の温度は、冬季が 58°C 、夏季が 52°C と、夏季が低めであった。

施設 Q は省力化配管洗浄を実施した。洗浄処理前に培養検査や遺伝子検査で検出限界以下であったにもかかわらず、2 回目のすすぎ後検体からレジオネラ属菌の生菌($40\text{ CFU}/100\text{ mL}$)および遺伝子($13\text{ CFU-eU}/100\text{ mL}$)が検出されて、翌日の浴槽水からは検出されなかった。ATP量とFCM法の細菌数は洗浄中に急激に上昇し、すすぎにより減少していた。施設の意向で写真は無いが、透明な浴槽水が洗浄中に茶褐色に着色し、中和時は黒色に変化してすすぎにより透明化した。衛生管理者によると、この色の変化はこれまでの配管洗浄ではなかったもので、鉄イオンや生物膜と思われる物が剥離・洗浄されたと考えられた。すすぎ水に含まれていたレジオネラ属菌は、剥離の生物膜に由来と考えられた。ここでは特段の衛生管理の変更は要しなかったが、従来通りの年3回の配管洗浄を継続することとなった。衛生管理者にとって、循環系統の潜在リスクの存在と生物膜対策の必要性の認識を高めるには大いに役立った。

施設 R も省力化配管洗浄を行った(図 5-1)。浴槽水の色は、洗浄前に無色、洗浄中に褐色に変化して、中和で黒色化、2 回のすすぎで元に戻った。中和時に多量の泥状物が出現して、FCM法により大量の細菌が検出され(図 5-1b)、共焦点レーザー顕微鏡で多量の糖と核酸が観察された(図 5-1c)。泥状物は配管系統から剥離の生物膜と考

えられた。レジオネラ属菌は、培養陰性だったが、すすぎ2回目後に遺伝子(14 CFU-eU/100mL)が検出された。施設の衛生管理者とよく対話したところ、ろ材中に温泉由来の鉱石を含んでいることが判明した。本施設では、消毒装置の故障から循環式の廃止を検討していたが、今回の調査結果を伝えたところ、施設が循環式浴槽における生物膜対策の重要性とその難しさを再認識し、衛生管理方法を再考することが了承された。後日、施設自ら、毎日完全換水方式への切替を決断、切り替えしたと聞いている。

施設 Q において、モノクロアミン消毒の適用を拡大した。循環システムの概要図を図 5-2 に示した。消毒装置に3系統の制限があって、歩行浴と冷水浴の循環システムの消毒に手動切り替えを用いたが、4つの循環システムにおける浴槽水の塩素濃度の推移は概ね安定して問題なかった。一時的な若干の濃度変動を認めることはあったが、概ね 3.5~4.5 mg/L を維持していた。歩行浴と冷水浴はほとんど値のばらつきが認められず推移した。薬湯は、容量が小さいことから、他の浴槽と比べて値のばらつきが大きいようであった。施設では、薬剤費に関して、コスト的に満足いく状況とのコメントがあった。

ATP 量は 120~550 RLU、FCM 法の細菌数は 2,100~140,000 cells/mL、従属栄養細菌数は 230~3,200 CFU/mL を示し、他に比べて高い値であった。しかし、全ての浴槽水でレジオネラ属菌は、平板法とレジオラートとも不検出であった。レジオネラ属菌の遺伝子は、ジェット浴で 80 CFU-eU/100 mL があったが、他は検出限界値(1 CFU-eU/100 mL)程度に過ぎず、全て死菌と判定された。遊離塩素消毒と異なり、細菌数とレジオネラ属菌の関連はなかった。対策として月に1回程度 10 mg/L×3 時間程度の高濃度モノクロアミン洗浄を行うようにした。

C6. 高濃度塩素消毒の効果を迅速に評価する、FCM 法による細菌数の測定

高濃度塩素洗浄後の浴槽水試料の測定結果から、細菌数の判定閾値を設定した。FCM 法(miniPOC)の細菌数が多いほど、レジオネラ属菌の遺伝子量が多く、平板培養法によるレジオネラ属菌の生菌検出も増加する傾向が見られた。一部は別装置の FCM 法(RF-500)による細菌数測定も実施し、同様の結果を得た。高濃度塩素消毒の効果判定は、平時の消毒判定に使った 1,000 cells/mL を基準にすると、平板培養法によるレジオネラ属菌の生菌と不一致が散見されたので、改めて 95 検体からレジオネラ属菌の遺伝子及び生菌と比較して、630 cells/mL を基準とした。この FCM 法の細菌数の基準による高濃度塩素消毒の効果判定は、感度 100%、特異度 53%で、有効率 60%であった。判定閾値の違いは、高濃度塩素消毒により細菌破壊が亢進して、通常の塩素管理とは状態が異なったことが理由と考えられた。

以上の結果を踏まえて、現場測定を2施設において実施した。施設 A では FCM 法の細菌数が総じて高く、大半の検体が閾値 630 CFU/mL を超えていた(表 6-1)。すなわち高濃度塩素消毒の効果が不十分と判定された。判定は別の検査でも裏付けられて、実験室持ち帰りの 8 試料中 7 試料からレジオネラ属菌の遺伝子が検出され、消毒が不十分と考えられた。この施設 A は過去に源泉タンクからレジオネラ属菌の生菌が検出されており、濁質が多いことも相まって系内にバイオフィームが残存している可能性が示唆された。

施設 B は FCM 法による細菌数の測定値が低く、閾値を超えることがなく、PCR 法、平板培養法でもレジオネラ属菌は不検出であった(表 6-2)。すなわち高濃度塩素消毒の効果は十分に発揮されていたことが裏付けられた。レジオネラ属菌の

検出の経験がなく、日頃から衛生管理が徹底されており、洗浄消毒の効果が得られやすいと考えられた。例数は少ないが、高濃度塩素消毒の効果判定に、FCM 法による細菌数の測定を現場で実施して、現場判定することができた。高濃度塩素消毒には数時間を要するが、FCM 法による効果判定はその場の数分間で結果が得られた。

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

平板培養法を基準にしたモバイル qPCR 法の相関は、濃縮できなかった 4 検体を除いた 40 検体の場合、感度は LAMP 法と同等、特異度と一致率は LAMP 法や qPCR 法より高く、検討した範囲で最も平板培養法に近いものであった(表 7-1)。仮に濃縮のできなかった 4 試料を不検出相当とみなしたとしても(感度 78.6%、特異度 93.3%、陽性的中率 84.6%、陰性的中率 90.3%、一致率 88.6%)、平板培養法に近い結果であった。モバイル qPCR 法が、最も早く、平板培養法に近い結果が得られた。

フィルターが詰まって半量程度しかろ過できなかった場合は、ろ過できた範囲で試験することが考えられた。ろ過水量の倍半分は、qPCR にとっては Ct 値が 1 の違いでしかなく、NC のインターナルコントロールの誤差程度(±1)の違いでしかなかった。

モバイル qPCR 法が平板培養法に近い結果が得られた理由として、ろ過から DNA 抽出までの抽出効率が qPCR 法と比較して低いため、平板培養法陰性であっても qPCR 法では少ない遺伝子量(高い Ct 値)が検出された検体については、モバイル qPCR 法では検出されなかった可能性が考えられた。しかし、同一検体からモバイル qPCR 法および qPCR 法で抽出した DNA の遺伝子量を qPCR 法の Ct 値で比較した結果は両者の相関を

示した(図 7-1)。全体的に qPCR 法で抽出した DNA の方が遺伝子量が多かったとしても、現場試験を目的とした DNA のろ過抽出には便利で十分と考えられた。

冷凍保管の同一試料を用いて、5 機関でモバイル qPCR 法の再現性を評価したところ、結果は概ね一致した。NC のインターナルコントロールの Ct 値も安定しており、モバイル qPCR 法は通常レジオネラ属菌の検査を実施している機関・実施者であれば、問題なく実施可能な方法と考えられた。

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

都道府県や市において、モノクロラミン消毒の質問を行った(表 8-1)。この結果、半数以上の自治体で何らかの規定に基づきモノクロラミン消毒を認めていることがわかった。その他の意見として、消毒方法の規定や明記したものは無いが、効果を有する消毒を認めている回答が多数あった。

立入検査の現場での採水と試験について、利用や関心の有無を方法ごとに選択してもらった(表 8-2)。DPD 法の遊離塩素測定は大半の保健所等で導入されていた。その他の方法についても、導入は少ないが、関心が多いとわかった。

レジオネラ属菌の培養検査は待ち時間が 1~2 週間と長く、それを補う迅速な検査方法がいくつか整備されている。レジオネラ属菌の迅速試験の利用や関心の有無を方法ごとに選択してもらった(表 8-3)。「死菌も検出される PCR 法や LAMP 法(PCR 検出、測定に数時間)」の利用有りが最も高く、それ以外の検査方法はほぼ利用されていなかった。関心ありの割合は高いことがわかった。

浴槽水等のレジオネラ属菌検査陽性の探知方法は、「施設からの報告」が 36 件(100%)と、すべての保健所等で施設からの連絡体制があった(表 8-4)。保健所等としては、受け身の体制が主であ

ることが判明した。その他、複数の探知方法がある一方、反対に施設からの報告が無い場合の課題も伺えた。

浴槽水等のレジオネラ属菌検査で陽性(10 cfu/100 mL以上)を探知した場合の対応は、「電話や対面等で施設の状況を確認した後、すみやかに立入検査を行う」の回答が36件(100%)であり、保健所等としてレジオネラ属菌検査陽性時の対応体制が確立されていた(表 8-5)。近年3年間に保健所等が把握した浴槽水等のレジオネラ属菌の検出状況は、「管内施設で検出実績がある」が29件(80.6%)と約8割の保健所等で検出報告を受けていた(表 8-6)。詳細は省くが、検出状況の内訳から、毎年度、検査検体の約1割で陽性検出、毎年度半数程度の保健所等で1件以上の陽性検出があり、特定地域に限らず全国どこでもレジオネラ属菌による汚染が存在すると判明した。

旅館業や公衆浴場の事業者に対する情報発信として、講習会・研修会・説明会等の開催状況を質問したところ、「情報発信は行っていない」は0件(0%)であり、何らかの情報発信を行っていることがわかった。資料について意見を求めたところ、表 8-7 の通りであった。特に、「全国共通の資料として、衛生対策関係のものがあれば良い(加工可能なもの、電子データにて提供)」、「全国共通の資料として、レジオネラ症対策関係のものがあれば良い(加工可能なもの、電子ファイルにて提供)」が多く、本研究班では別の研究としてこれに対応した。

C9. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

簡易版は手引きにおける各設備の全ての項目を網羅することとし、各項目の内容を1~2ページにまとめた(資料 9-1)。各設備の項目の構成は、以下のとおりとした。

・公衆浴場における衛生等管理要領での記載箇

所・キーポイント・設備の概要・管理・レジオネラ属菌が検出された場合の措置

設備の概要(構造)については、アンケート調査で寄せられた手引きに対する回答の中に、図を掲載してほしい、カラーの図を載せてほしいとの複数の要望があったことに対応した。レジオネラ属菌が検出された場合の措置では、レジオネラ属菌が検出された場合には素早くかつ確実な対応が求められるため、必要に応じて複数の措置を併記して選択肢を複数挙げ、幅広く対応することが可能になるようにした。

Q&A 集に掲載する項目は、令和4年度から継続的に検討したものと、令和5年度に実施したアンケート調査を参考に、衛生管理上の重要性等に基づいて選び出した。選び出した項目を、「浴槽の管理」、「浴槽水の管理」、「配管の管理」、「付帯設備の管理」、「その他の設備の管理」及び「総合衛生管理プログラム」に分類した(資料 9-2)。

手引の内容をできるだけ簡素化した、誰もが手に取りやすく、詳細は手引きを参照できる、パンフレットを作成した(資料 9-3)。手引は施設管理者や環境衛生監視員にとって有益な内容であるが、小規模入浴施設や福祉施設の担当者等には敷居が高いのでは、との危惧が寄せられていた。

入浴施設の管理の不備やミスを減らすため、総合衛生管理プログラムが提案されている。その必要性及び概要を解説するための説明スライドを用意した。それを口述で解説する動画は Web 掲載を検討する。「レジオネラ症防止対策における総合衛生管理プログラムの必要性」は保健所の環境衛生監視員及び入浴施設の営業者などに向けて作成した。「入浴施設におけるレジオネラ問題への取り組み方 リスク軽減のための体制づくり」とした動画は、小規模な入浴施設の営業者が管理プログラムを理解しやすいように、より平易な内容とした。

C10. 浴槽水の糞便汚染指標細菌の変更の妥当性の検討

浴槽水の糞便汚染指標に関するワーキンググループを立ち上げて協議した。浴槽水以外の水環境の糞便汚染指標が大腸菌群から大腸菌へ変更されている状況を鑑み、浴槽水も大腸菌に変更することは妥当とした。検査法は、特定酵素基質寒天培地の定量法と、プール水と同じ特定酵素基質液体培地による定性法の意見があった。ここでは詳細を省くが、こうした議論を受けて、1)水環境の糞便汚染指標細菌検査の意義、2)指標細菌が大腸菌群から大腸菌に移行する背景、3)各種水環境の大腸菌群と大腸菌にかかる水質基準の比較、4)糞便汚染指標細菌の定量法と定性法の比較の課題をそれぞれ検討した。

過去の浴槽水における大腸菌群と大腸菌の値から比率を計算した。大腸菌群と大腸菌のいずれも検出された検体は、掛け流し式温泉研究班では187検体中70検体、温泉の泉質研究班では61検体中25検体であった。大腸菌群数と大腸菌数の範囲は、それぞれ大腸菌群数が $<3 \sim 24,000$ MPN/100mL および $<3 \sim \geq 2,400$ MPN/100mL、大腸菌数が $<3 \sim 2,400$ MPN/100mL および $<3 \sim 1,100$ MPN/100mL であった。これらのデータを対象にして、Smimov-Grubbs 検定を行ったが外れ値に該当するデータはなかった。すべての検体における大腸菌数/大腸菌群数の比率は、掛け流し式温泉研究班で0.006~1.0、平均0.55、温泉の泉質研究班で0.04~1.0、平均0.62であった。

現在の浴槽水137検体の大腸菌群・大腸菌汚染の実態を調査したところ、いずれかの方法により20検体(14.6%)から大腸菌群が、14検体(10.2%)から大腸菌が検出された。大腸菌の定量法の基準を「1個/mL以下」、「1個/mL未満」、「不

検出」、大腸菌の定性法の基準を「不検出」とそれぞれ設定したと想定し、現行の大腸菌群検査と比較した(表10-1~表10-4)。フィッシャーの正確確率検定では、いずれも検出率に差はなく、大腸菌の定量法と定性法のいずれの基準でも、現行法と同じ結果が得られていた。ただし、大腸菌検出は14検体に限られており、十分な検体数ではなかったことに注意を要した。

なお、大腸菌群と大腸菌のいずれでも残留塩素濃度が基準値を満たす浴槽水で検出されることがあり、消毒効果が不足していることが推測され、大腸菌群・大腸菌検査に意義があることが改めて示された。

欧米のrecreational waterにおける大腸菌の基準は、曝露集団における胃腸疾患の発生の有無により評価、決定されていた。基準と疫学調査の詳細はここでは省略するが、米国EPAが2012年に定めたrecreational waterにおける大腸菌の基準は(126CFU/100mL及び)100CFU/100mLとしていた^{54, 55)}。EUの浴場に関する基準では大腸菌数は ≤ 500 CFU/100mLがexcellentとされており、ドイツでは大腸菌のNOAEL(最大有害無作用レベル:有害な影響を示さない最大数)が100CFU/100mLと報告されていた⁵⁶⁾。これらと比べても、日本の浴槽水の大腸菌数の基準を1個/mL以下とすることは妥当であるといえた。前述の国内過去の大腸菌数/大腸菌群数の比率にあわせることも考え方としてありえなくはないが(0.55CFU/mL以下あるいは0.62CFU/mL以下)、1個/mL以下とは大差なかった。

C11. 浴槽水における大腸菌検査法の検討

浴槽水の6.3%~10.3%が大腸菌陽性となった(表11-1)。既報の浴槽水の大腸菌検出率1.0%(1/102検体)と比較すると高値であった⁴⁶⁾。この要因として、本研究では浴槽水の56.3%(71/126検

体が温泉水で、温泉水の汚染が多い(大腸菌検出 14%=10/71 検体)ことが理由と考えられた。温泉で残留塩素濃度の低いことが、少なくなかった(表 11-2)。過去の、かけ流し式温泉における大腸菌検出率 22.2%(88/396 検体)と同程度ともいえた⁴⁷⁾。

大腸菌・大腸菌群の検出を検査方法ごとにみた場合、定量試験よりも定性試験の方が高く、定性試験のみで大腸菌陽性となった検体が 5 検体あった(表 11-3)。これは、定性試験では供される試料の量が定量試験に比べて 100 倍多いために検出感度が 100 倍高くなるためと考えられた。定量試験における大腸菌の検出数・検出菌数は、大腸菌群数と比較しても同程度であった。

なお、培地の種類により、菌数や識別能に多少の差異が認められたが、試料の性質によるのか、培地のロットによるのかは、検討した範囲からは不明であった。最初は複数培地に標準株の添加試験など、試料と培地の相性などを理解したうえでの実施が好ましいと考えられた。また、大腸菌を添加した予備試験で、温泉水や海水を含む試料 100 mL を直接に用いる大腸菌定性試験は約半数に偽陰性が生じて、培地説明書にある通り試料の 10 倍希釈が必要の様であった。

C12. レジオネラ属菌の培養検査の外部精度管理(UKHSA および FAPAS)への参加と、検査精度に関連する国際的な現状

外部精度管理の UKHSA G136 に参加した。G136 の全参加者数は 258 名、うち地衛研から 55 名が参加して 55 名が結果を報告した。配布試料にはレジオネラ属菌以外の細菌も含まれており、各機関における試験は SOP にある、酸・熱の前処理と選択培地での培養を基本としている。UKHSA では、Z スコアの絶対値 2 以内および参加者中央値 $\pm 0.75\text{Log}$ 以内が良好範囲内とされる。

今回、Z スコアが算出された参加者のうち良好範囲内であったのは、G136-A は 32/38 名(84.2%)、G136-B は 46/54 名(85.2%)であった。UKHSA では、Z スコアは各参加者へ個別に返却されて参加者全体の表示がないので、地衛研参加者の Z スコアのグラフを別途作成した(図 12-1)。

WHO の外部精度管理の概説には、外部精度管理は懲罰的であってはならないこと、教育的なものにとらえ、検査室の改善努力を方向づけるためのツールとして使用するべきとの記載がある⁴⁸⁾。外部精度管理の結果を活用して、検査技術向上に繋げることが重要である。良好範囲外であった参加者のデータを確認したところ、入力ミスや計算の単位間違いと思われるものがあった。そのため、参加者への注意点として、正しい計算と入力時の確認を十分に行うように、代理店を通じて周知することとした。

FAPAS LG0124 の全参加者数は、71 名であった。配布試料 2 サンプルのうち、LG0124-A はブランク試料で、70 名が不検出と回答している。LG0124-B の全参加者 71 名のうち、レジオネラ属菌を検出したのは 69 名、Z スコアが算出された 67 名のうち、良好範囲内であったのは 62 名(93%)であった(図 12-2)。地衛研からの参加 55 名のうち、LG0124-A は全 55 名が不検出と回答した。LG0124-B の結果を報告したのは 54 名、このうち Z スコアが算出されたのは 53 名で、絶対値 2 以内の良好範囲内が 52 名(98.1%)、良好範囲外は 1 名(1.9%)であった。Z スコアが算出されなかった 1 名は、定量上限より多いと回答した。

FAPAS の配付試料はレジオネラ属菌以外の細菌が含まれないため、前処理(酸または熱処理)は行わず、培地は選択培地の代わりに非選択培地を用いる。その他は各機関の SOP 通りを行う。今回、地衛研参加者は、FAPAS 指定の方法に加えて、標準的な環境水の検査法(前処理あり、選

拓培地)も並行した。酸処理、熱処理の菌数は、いずれも一桁程度減少した。

UKHSA、FAPAS いずれも ISO 17043 (技能試験提供者の能力に関する一般的要求事項)の認定を受けた外部精度管理提供者であり、信頼性が保証された世界標準に沿った内容になっていた。ESGLI (ESCMID Study Group for *Legionella Infections*)が策定したガイドラインには、水試料のレジオネラ属菌の検査は、認定範囲にレジオネラ属菌の培養検査を含み、外部精度管理で評価を受けている ISO 17025 (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項)の認定検査機関に依頼するべきであると記述があった⁴⁹⁾。また、CDCの *Legionella Control Toolkit* にはレジオネラ属菌の検査を検査機関に依頼する際に考慮すべきこととして、ISO 17025 のような認定を受けていることを挙げている⁵⁰⁾。

外部精度管理に関する現状を把握するため、参加者にアンケート調査を行った。半数以上の地衛研で外部精度管理に参加したい意向はあるものの、参加費の予算化が難しいことが明らかになった。

C13. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

UKHSA の外部精度管理に参加した 5 施設において、sample A 及び sample B の両方からレジオネラ属菌が検出された(図 13-1)。

Sample A は、UKHSA が示した菌量 93 CFU/100 mL に対して、レジオラートは平均 20.9 MPN/100 mL (中央値 22 MPN/100 mL)と若干少なく、C 及び E の 2 施設は n=2 の培養のうちの片方が不検出となった。平板培養法では平均 126 CFU/100mL (中央値 50 CFU/100 mL)であった。平板培養法が外れ値の 500 CFU/100 mL に引張られていることを考慮すると、レジオラートは遜色ない結果と言えた。sample A は元々のレジオネ

ラ属菌の量が少なく、前処理を行えば更に菌数が減ることになり、地衛研 55 参加中で不検出は 17 (31%)あったと聞いている。

Sample B は UKHSA が示した菌量 3,800 CFU/100 mL に対して、レジオラートは(すべてのウェルが変色した 3 試料を除き)平均 18,700 MPN/100 mL (中央値 17,178 MPN/100 mL)であった。平板培養法で検出された菌量は平均 8,570 CFU/100 mL (中央値 10,000 CFU/100 mL)であった。こちらも菌数が桁違いにはならない、大差ない結果と言えた。

冷却塔水計 62 検体でも、結果に遜色がなかった。レジオラート(無処理)と平板培養法がともに陽性は 18 検体、ともに陰性は 24 検体、感度は 95%、特異度は 56%、結果一致率は 68%であった(表 13-1)。レジオラート陰性・平板培養陽性の 1 検体は、10 CFU/100 mL と少ない菌数であった。レジオラート陽性・平板培養不検出の 19 検体のうち、遺伝子検査を実施した 10 検体中 7 検体でレジオネラ属菌の遺伝子が陽性であった。高感度は、レジオラートが誤りではなく、前処理の有無が理由かもしれない。一方で 10 検体中 3 検体に遺伝子陰性があり、レジオネラ属菌以外の菌による偽陽性が生じることもあって、酸処理後がより正確かもしれない。冷却塔水のレジオラート(酸処理)と平板培養法の比較は、ともに陽性が 12 検体、ともに陰性が 39 検体、感度は 63%、特異度は 91%、結果一致率は 82%と、特異度と一致率が向上した(表 13-2)。余力があれば無処理と酸処理の両方のレジオラート培養を行うことも考えられた。

C14. *Legionella pneumophila* ST23 臨床分離株の分子疫学解析

リファレンス配列に、*L. pneumophila* strain ST23 (GenBank accession. No. LT632615)がパイプラインにより選択された。

2000年と2002年の集団感染事例内では、2株間SNPが0~4、MEが0~14と小さい値を示した分離株の集団を作った。一方、互いに関連のない菌株間では、SNP:5~15,443、ME:7~15,690と株間のSNPとMEの数値が大きく、他の分離株から離れて位置した(図14-1、図14-2)。従来のSBT法では区別できなかった菌株が区別できるようになり、解像度が向上した。全ゲノム解析は、ST23分離株間の識別に有用であった。

2015年の集団感染事例の分離株間においては、2株間SNPならびにMEが大きい株と小さい株が存在した。2株間SNPとMEが大きい2つの環境分離株の関係については、汚染の場所(浴槽水とシャワー、あるいは男女別浴室)による違いを識別することができたと考えられた。2株間SNPとMEが小さい臨床分離株と環境分離株の関係については、感染源がシャワーであった可能性が解釈の一つとして考えられた。しかしながら、浴槽水ならびにシャワー由来の分離株がそれぞれ1株のみで、分離株間の関係性をより正確に判断するためには、環境中のレジオネラ属菌の多様性を考慮すると、複数の環境分離株があることが望ましいと考えられた。本研究班の金谷らによると、浴槽水由来のすべての variants を得るのに、少なくとも7株の解析が必要との報告がある⁵¹⁾。

同一都道府県内での散发事例において、SNPならびにMEの小さい菌株が存在した。これらは感染源不明とされていたが、未知の同一の感染源が存在した可能性、あるいは近縁のレジオネラが地域に定着していた可能性も考えられた。このような解析事例を蓄積することで、将来の感染源の解明に役立てられることが期待される。

C15. 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

L. pneumophila ST2398を中心とした過去の集

団事例のPFGE、MLVA、SBT法は相関していることが確認されている⁵⁷⁾。これに対するゲノム解析による型別の結果は、対応して矛盾しなかった。ST2398とST2399は、SBT法で2遺伝子の違いがあったが、ゲノム系統樹では同じクラスターにあり分離していない(図15-1A)。これがSNV解析ではST2399とST2398の2つのクレードに分かれて、クレード間のSNV数は30(P09-1とP09-2)~42(P04-4とP37-1)個であった。これらは一見、離れているように見えなくもないが(図15-1B)、一つの集団感染から同時に取得された患者分離株と環境分離株であり、同一施設で蓄積された僅かな差異の変異を持つ、近縁のはずである。実際、同じ集団感染の少なくとも3人の患者からST2398とST2399の両方の株が分離されており、患者らはST2398とST2399に同時に暴露されたと推測された。すなわち、本報告のSNV数の30~42個は、一つの集団感染に由来することの目安になると考えられた。この30~42個は、他の集団感染事例(*L. pneumophila* SG1 ST138)に報告にあった、同一患者株間のSNV数0~40個と同様の数値であった³⁹⁾。

L. pneumophila SG2 ST354に関して、散发例2名の患者分離株と、疫学的な関連性のない2か所の入浴施設から分離された環境分離株のゲノム解析は、Gubbinsによる組換え領域の除去をする場合としない場合で結果が異なった(図15-2)。Gubbinsなし(組換え領域を残したまま)の場合、コアゲノムサイズは2,782,307bp、ゲノムカバー率が79.4%であったのに対し、Gubbinsあり(組換え領域を除外)の場合、コアゲノムサイズが2,289,726bp、ゲノムカバー率は65.4%と減少した。組換え領域の除去によってコアゲノム領域が492,581bpも削られ、そこに含まれる25,000個あまりのSNVが除外された。患者分離株と施設Bは、Gubbins解析なし(組換え領域を残したまま)であ

れば、異なるクレードに分かれた。施設 A は、それでも患者分離株との SNV の差異が小さいままで、関連性があるように見えた(図 15-2B)。この ST354 は、疫学的に関連性がなくても SNV 数が小さいことがありえたことから、解析と判断には注意が必要であった。

なお、入浴施設に由来の株は、分離時期が年単位で異なっている、SNV の違いは数個と限られており、保存性が高かった。他方、SNVs の差が少ない感染事例が発生した際には、疫学的背景を欠いた解釈は誤った結論につながり得るため、疫学情報との統合が不可欠と考えられた。このような集団事例や分離頻度の高い遺伝子型のゲノム解析を蓄積しておくことは有用と考えられた。

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ラミン消毒の効果と有用性を改めて確認できた。高 pH の実施でモノクロラミン消毒の試験を行い、消毒法の普及にも努めた。モノクロラ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、特段の問題はなかった。レジオネラ属菌による汚染を遊離塩素消毒で対策している施設の追跡では、汚染は拡大せず抑えられていた。ろ過器のオゾン消毒は、小規模な薬湯では問題なかったが、大きいろ過器へのスケールアップでは不足が生じた。省力化配管洗浄剤を使用して、現場施設の衛生向上に寄与した。

②レジオネラ属菌の培養検査は 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。フローサイトメトリー法などの迅速な検査を活用して、複数施設と丁寧な対話を行い、汚染源を特定したり、施設の理解や管理の向上につなげることが出来た。可搬式フローサイトメーターを

利用して、高濃度塩素消毒の効果を現場判定できた。モバイル qPCR 法は、培養検査法に近い、もっとも早いレジオネラ属菌の検査であった。平時には、こうした迅速な検査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。多くの自治体でモノクロラミン消毒が認められていた。迅速検査に関心があっても、導入はこれからであった。直近3年間で、管内施設にレジオネラ属菌の検出の経験があった。講習会等に使える資料が求められていた。手引の簡易版、Q&A 集、パンフレット、総合衛生管理プログラムの解説用スライドと動画を作成した。

④浴槽水の大腸菌群の検査を大腸菌に移行することを検討し、妥当とした。大腸菌群数と大腸菌数の実測に大きな差はなかった。容易ではないレジオネラ属菌の培養検査の精度向上に、UKSHA の EQA と Fera の FAPAS への参加を支援した。Z スコアの基準外になる施設もあり、精度管理の必要性を改めて感じた。難しい培養検査の操作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、外部精度管理と冷却塔水等の測定は、従来の平板培養法と遜色なかった。

⑤分子疫学の向上に、全ゲノム解析の検討を進めた。従来の SBT 法では区別できなかった ST23 の全ゲノム解析を行い、識別できるようになった。ST2398 を中心とした全ゲノム解析では、SNV 数が 30~42 個は近縁であることを示した。ST354 の解析では、疫学的に関連性のない株間で識別できない組み合わせが見つかり、状況に応じた判断の必要性もあると判明した。

D. 結論

D1. アルカリ性温泉 (pH10) におけるモノクロラミンの消毒効果と菌叢に与える影響

pH10 程度のアルカリ性温泉において、モノクロ

ラ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。一般細菌数、従属栄養細菌数は減少したが、16S rDNA コピー数は大きな変化がなかった。モノクロラミン消毒により菌叢の変化が生じて、病原菌の増加はなく、良好な衛生状態を維持できたと考えられた。

D2. 入浴施設におけるレジオネラ属菌による汚染の実態調査および分子疫学的解析の活用

2015 年から追跡してきた入浴施設 1 か所における、2022～2024 年の汚染実態についてまとめた。遊離塩素濃度は高く維持されていた。浴室 2 のカランと新たに検査対象に追加した浴室 2 のろ過器からレジオネラ属菌が分離されたものの、低値であったことから、増殖は抑えられていると考えられた。血清群、SBT 法および SNV 解析の結果から、過去に汚染の拡散があったが、現在はろ過器からの汚染は拡大しておらず、一部の配管に限定的な汚染が残存していることが推定された。

D3. 電解生成オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

汚濁量の多い大型ろ過器(1.8m³)を対象として、電解オゾン水による消毒・洗浄のスケールアップを試みた。ろ過器に対して、有効容量分の電解オゾン水を毎日逆洗前に供給した。オゾンの不足を感じて濃度を 0.5 から 1.5mg/L まで段階的に上昇させたが、なお不足が示唆された。オゾン消毒が届かない、ジェット循環配管の付帯といった条件の悪さもあった。ろ過器容量分の電解オゾン水供給に 70 分間を要して、その間のオゾン濃度の低下も疑われた。本研究のオゾン消毒のスケールアップは残念ながら不足があり、ろ過器の大きさと逆洗速度といった要因を計算にいれることが必要と考えられた。

D4. 薬湯の循環ろ過器を、電解オゾン水を用いて逆洗する試み

薬湯の循環ろ過器に電解オゾン水を用いた逆洗を行った。当初、レジオネラ属菌の検出がわずかに続いたが、それはろ過器の問題ではなく、排水溝の汚染源によるものだった。汚染源の対策後はレジオネラ属菌の不検出を長期に維持できた。

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

FCM 法などの非培養の検査法を用いて浴槽水の衛生状態を迅速評価して、施設との対話から管理に反映することができた。施設 O は、冬季と夏季の比較により、60°C という管理指標の有益性を施設管理者は認識できた。施設 P も、温度と非培養検査法の結果から、施設管理者は配管等のリスク管理の重要性を認識できた。施設 Q と R は配管洗浄を行い、生物膜対策の重要性を再認識できた。モノクロラミン消毒を拡大適用した施設 Q は、消毒濃度は安定、レジオネラ属菌の不検出を長期に維持できた。

D6. 高濃度塩素消毒の効果を迅速に評価する、FCM 法による細菌数の測定

FCM 法の細菌数が多いほどレジオネラ属菌の遺伝子量が多く、平板培養法によりレジオネラ属菌の生菌も検出される傾向となった。通常の消毒時の浴槽水に比べて、高濃度塩素消毒の効果を判定する閾値(FCM 法の細菌数)が若干低くなった。FCM 法の細菌数は、迅速に測定結果が得られること、現場に持ち込んでの測定が可能なこと、そしてレジオネラ属菌の汚染との相関が見られることから、浴槽水の衛生管理や高濃度塩素による消毒効果の評価に提案したい。

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

モバイル qPCR 法に、微細流路チップを用いたろ過濃縮・簡易 DNA 抽出法を組み合わせた、新たな方法を検討した。平板培養法を基準として、モバイル qPCR 法の感度は LAMP 法と同等、特異度と一致率は LAMP 法や qPCR 法より高く、モバイル qPCR 法は平板培養法に近い結果が得られた。5 機関でモバイル qPCR 法を実施した結果、判定結果は概ね一致した。

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

保健所等の職員を対象に、公衆浴場等でのレジオネラ症対応、監視指導の実態についてアンケート調査を行い、21 自治体 36 保健所等から回答を得た。モノクロミン消毒は多くで認められていた。立入検査時の現場試験として、DPD 法による遊離塩素濃度測定が行われていた。迅速検査に関心が持たれたが、導入はこれからであった。施設浴槽水等のレジオネラ属菌陽性の探知は、「施設からの報告」の受け身の体制が主であった。探知されれば速やかに対応がなされていた。近年 3 年間のレジオネラ属菌陽性は、多くの保健所等で報告を受けていた。公衆浴場等に向けて、何らかの情報発信が行われていた。その業者向け講習会、研修会、説明会等を行うにあたり、全国共通の資料が求められていた。

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簡易版、Q&A 集、パンフレット、総合衛生管理プログラムの解説スライドと動画を作成した。

D10. 浴槽水の糞便汚染指標細菌の変更の妥当性の検討

浴槽水の水質基準における糞便汚染指標を大

腸菌群から大腸菌に変更すること、ならびに変更する場合の基準と検査法の妥当性について、WG において検討した。糞便汚染指標細菌を大腸菌群から大腸菌に変更することについては、他の水環境の基準との整合性や入手可能な検査法の存在から、妥当であるとした。大腸菌の検査法については、特定酵素基質寒天培地を使用した定量法とする意見と、特定酵素基質液体培地による定性法にするとの意見があった。大腸菌の基準は、定量法の場合は現行の 1 個/mL 以下、1 個/mL 未満および検出されないことの 3 案が、定性法の場合は検出されないことが挙げられた。過去の 2 つの研究班において得られた浴槽水の大腸菌群と大腸菌の汚染実態調査のデータに基づく大腸菌数/大腸菌群数の比率は、0.55 および 0.62 であった。現在の浴槽水 137 検体の汚染実態調査では、大腸菌定量法の 3 種の基準と、定性法不検出のいずれの基準でも、統計学的には現行法の大腸菌群と有意差はなかった。欧米の水浴場の大腸菌の基準は、米国は 100CFU/100mL と 126CFU/100mL、ドイツは 100CFU/100mL としていた。

D11. 浴槽水における大腸菌検査法の検討

126 検体の大腸菌定量試験は、大腸菌群の試験と同程度の結果であった。大腸菌の定量法は公衆浴場の水質基準として運用可能であり、大腸菌群検査を大腸菌検査へ移行できると考えられた。

D12. レジオネラ属菌の培養検査の外部精度管理(UKHSa および FAPAS)への参加と、検査精度に関連する国際的な現状

本研究は、レジオネラ属菌の培養検査における外部精度管理の整備と検討を進めてきた。今現在、ISO 17043 の認定を受けている英国 2 種の外部精度管理に日本国内から問題なく参加可能と

なった。引き続き、外部精度管理の課題の抽出を行い改善に努める。

D13. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

レジオラート/QT 法を用いて、5 機関が外部精度管理に参加した。冷却塔水 62 検体を検査した。概ね平板培養法と同等の結果であり、問題なかった。高感度には無処理、特異性と一致率には酸処理、状況が許せば無処理と酸処理を並行実施が有用と考えられた。

D14. *Legionella pneumophila* ST23 臨床分離株の分子疫学解析

全ゲノム解析により、従来の SBT 法による型別では区別できない ST23 型を高解像に識別できた。

D15. 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

過去の集団事例の分離株における PFGE、MLVA、SBT の解析結果に対して、全ゲノム解析は矛盾せず対応が得られた。同一の集団感染に由来したことから、異なる ST であっても、SNV 数が 30~42 個と近縁であった。ST354 は、Gubbins による組換え領域の除去の有無で SNV 数が大幅に変化した。除去しなかったとしても、疫学的に関連性のない株間の SNV 数が小さいことがあり、状況に応じた疫学的判断が必要と考えられた。

以上、公衆浴場の衛生管理の推進に有用な結果を得た。浴槽水のモノクロラミン消毒は、レジオネラ属菌に対して有効であり、菌叢などにも問題は見つかっていない。遊離塩素消毒も適切に対策していれば、汚染の拡大を抑止できていた。循環式浴槽のろ過器にオゾンを注入して消毒するには、汚染の負荷の程度や注入速度などを考慮する必要があり、スケールアップは単純ではなか

った。フローサイトメトリー法などの非培養の検査を用いて、複数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。可搬式フローサイトメーターを利用して、高濃度塩素消毒の効果を現場で判定できた。モバイル qPCR は、現場で迅速にレジオネラ属菌の検査が可能と考えられた。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。講習会向けの資料が求められており、手引の簡易版、Q&A 集、パンフレット、総合衛生管理プログラムの解説スライドと動画を作成した。大腸菌群検査の大腸菌検査への移行を検討し、測定結果に差がないことを確認した。外部精度管理の UKHSA の EQA と Fera の FAPAS への参加を支援した。レジオラート/QT 法によるレジオネラ属菌の培養検査は、平板培養法と遜色なかった。国内外で高頻度に検出される ST23 の全ゲノム解析を行い、解像度を高めることができた。ST2398 では近縁の SNV 数が 30~40 と目安が得られた。ST354 では、疫学的な関連性がなくても識別できない菌株が見つかり、状況に応じた判断の必要性が指摘された。

E. 引用文献

- 1) 杉山寛治:環境水からのレジオネラ・宿主アーマ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, 鶴田美美, 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) 黒木俊郎, 泉山信司, 大屋日登美, 陳内理生, 中嶋直樹ら. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究(研究代表者: 前川純子)」令和 3 年度分担研究報告書
 - 6) 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について(厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官、生食発 1210 第 1 号一部改正、令和 2 年 12 月 10 日)、pp.13、(<https://www.pref.chiba.lg.jp/eishi/koushuueisei/sonohoka/documents/20201210kaiseituut-zenbuni.pdf>, 2025/4/1 現在).
 - 7) 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 月改正、(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/001401965.pdf>, 2025/4/1 現在).
 - 8) (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.
 - 9) (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.
 - 10) 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.
 - 11) (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 5 版)、pp.125、2024 年 9 月.
 - 12) 公衆浴場における衛生等管理要領等について(厚生省生活衛生局長通知、令和 7 年 3 月 11 日健生発 0311 第 1 号一部改正)、p13、(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/001401962.pdf>, 2025/4/1 現在)
 - 13) 泉山信司ら, オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究令和 3 年度総括研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 33-51, 2021.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Taguri, T, et al., Bacterial counts by flow cytometry can determine presence/absence of *Legionella* in bath water. In the 10th International Conference on *Legionella* 2022, P-53, 2022.
- 19) Manafi, M., Kneifel, W. and Bascomb, S. (1991) Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol. Rev.* 55. 335-348.
- 20) David S, Mentasti M, Tewolde R, Aslett M, Harris SR, Afshar B, Underwood A, Fry NK, Parkhill J, Harrison TG. Evaluation of an Optimal Epidemiological Typing Scheme for *Legionella pneumophila* with Whole-Genome Sequence Data Using Validation Guidelines. *J Clin Microbiol* 54: 2135-2148, 2016.
- 21) Raphael BH, Baker DJ, Nazarian E, Lapierre P, Bopp D, Kozak-Muiznieks NA, Morrison SS, Lucas CE, Mercante JW, Musser KA, Winchell JM. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol* 82: 3582-3590, 2016.
- 22) Amemura-Mackawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani J, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M. *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* species Isolated From Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol* 84: e00721-18. 2018.
- 23) 佐伯歩、前川純子、明田幸宏. *L. pneumophila* の分子疫学解析. *IASR* 45:124-125, 2024.
- 24) 病院内冷却塔からのレジオネラ感染疑い事例—福岡市. 松田正法、重村久美子、徳島智子、吉田英弘、佐藤正雄. 廣瀬みよ子 門司慶子、石津尚美. 竹中章、前川純子. *IASR* 36:13- 14, 2015.
- 25) Haas W, Lapierre P, Musser KA. A Bioinformatic Pipeline for Improved Genome Analysis and Clustering of Isolates during Outbreaks of Legionnaires' Disease. *J Clin Microbiol* 59(2) :e00967-20, 2021.
- 26) Qin T, Zhang W, Liu W, Zhou H, Ren H, Shao Z, Lan R, Xu J. Population structure and minimum core genome typing of *Legionella pneumophila*. *Sci Rep* 6: 21356, 2016.
- 27) 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.
- 28) Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and

- environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 2005, 43:2047–52.
- 29) Leigh JW, Bryant D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol.* 2015, 6:1110–1116.
- 30) 田栗利紹ら, 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, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和4年度総合研究報告書, 研究代表者: 泉山信司, 77-89, 2022.
- 31) 田栗利紹ら, 携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和3年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 52-86, 2021.
- 32) 田栗利紹ら, 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, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和5年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 泉山信司, 102-115, 2023.
- 33) Inoue, H., et al., Phylogenetic characterization of viable but-not-yet cultured *Legionella* groups grown in amoebic cocultures: a case study using various cooling tower water samples. *Biocontrol Sci.*, 24, 39-45, 2019.
- 34) 井上浩章, 他: 微細流路チップとモバイルリアルタイムPCR装置を用いたオンサイトでのレジオネラ属菌迅速検査に関する検討. 日本防菌防黴学会第50回年次大会. 2023.8.29-30.
- 35) 佐伯歩, 前川純子ら, レジオネラ・レファレンスセンターの活動, IASR, 45, 125-126, 2024
- 36) Prim RC. Shortest connection networks and some generalizations. *Bell Syst Tech J* 36: 1389–1401, 1957.
- 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) Nakanishi N, Komatsu S, Tanaka S, Mukai K, Nomoto R. Investigation of a *Legionella pneumophila* Outbreak at a Bath Facility in Japan Using Whole-Genome Sequencing of Isolates from Clinical and Environmental Samples. *Microorganisms.* 2022. 22;11:28.
- 40) 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.
- 41) Batrich M, Maskeri L, Schubert R, Ho B, Kohout M, Abdeljaber M, Abuhasma A, Kholoki M, Psihogios P, Razzaq T, Sawhney S, Siddiqui

- S, Xoubi E, Cooper A, Hatzopoulos T, Putonti C: *Pseudomonas* diversity within urban freshwaters. *Front Microbiol.* 2019; 10:195.
- 42) Iwashita T, Tanaka Y, Tamaki H, Nakai R, Yoneda Y, Makino A, Toyama T, Kamagata Y, Morikawa M, Mori K: Isolation and characterization of novel plant growth-promoting bacteria from the fronds of duckweed; *Jpn J Water Treat Biology*, 2021; 57(1): 1–9.
- 43) Chen WM, Huang HW, Chang JS, Han YL, Guo TR, Sheu SY: *Tepidimonas fonticaldi* sp. nov., a slightly thermophilic betaproteobacterium isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; 63: 1810-1816.
- 44) Chun SJ, Cui Y, Ko SR, Lee HG, Srivastava A, Oh HM, Ahn CY: *Acidovorax lacteus* sp. nov., isolated from a culture of a bloom-forming cyanobacterium (*Microcystis* sp.). *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2017 110(9):1199-1205.
- 45) 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.
- 46) 枝川亜希子, 安達史恵, 小池真生, 肥塚利江, 松島加代, 土屋誠, (2023) 大阪府内中核市における公衆浴場等浴槽水のレジオネラ属菌および水質状況調査. 大阪健康安全基盤研究所年報, 7: 94-101
- 47) 井上博雄ら, (2007) 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業) 掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究: (<https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/2006/064061/200639020B/200639020B0001.pdf>, 2024年10月4日取得)
- 48) WHO : Overview of External Quality Assessment (EQA), 2009 (<https://www.who.int/publications/m/item/overview-of-external-quality-assessment-eqa>, 2025年3月31日現在)
- 49) ESGLI: European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation, of Infections Caused by *Legionella* species, 2017
- 50) CDC : Toolkit for Controlling *Legionella* in Common Sources of Exposure (*Legionella* Control Toolkit), 2021
- 51) 金谷潤一、磯部順子. 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. 厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和5年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 泉山信司:116-127, 2024.
- 52) Croucher NJ, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43:e15.
- 53) 柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司: 山梨県のアルカリ性 (pH10 程度) 温泉におけるモノクロラミン消毒の有効性の検討, 防菌防黴, 49, (2021), 261–267
- 54) USEPA: Recreational Water Quality Criteria. pp63, Office of Water, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C., USA, 2012. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015->

- 10/documents/rwqc2012.pdf
- 55) USEPA: Ambient water quality criteria for bacteria-1986. pp18, US Environmental Protection Agency, Washington D.C., USA, 1986.
<https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-03/documents/ambient-wqc-bacteria-1986.pdf>
- 56) Wiedenmann et al.: A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of *Escherichia coli*, intestinal enterococci, *Clostridium perfringens*, and somatic coliphages. *Environ Health Perspect.* 2006;114(2):228-36.
- 57) 中西典子ら, MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成29年~30年度総合研究報告書, 研究代表者:前川 純子, 55-65, 2019.
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表
1. 紙上発表
- 1) Kanatani J, Fujiyoshi S, Isobe J, Kimata K, Watahiki M, Maenishi E, Izumiyama 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.
- 2) Nakajima N, Jinnai M, Izumiyama S, Kuroki T. Evaluating Fourier-transform infrared spectroscopy with IR Biotyper as a faster and simpler method for investigating the sources of an outbreak of legionellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2024 May;43(5):991-997.
- 3) Komatsu S, Fujinaga C, Nakanishi N. Detection of *Legionella* spp. in influent wastewater in Kobe City, Japan. *J Water Health.* 2024. 22 (11): 2054-2059.
- 4) 小松頌子、武藤千恵子、佐々木麻里、梅津萌子、高久靖弘、大谷彩恵、田中和良、木下輝昭、猪又明子、藤永千波、田中忍、中西典子. 浴槽水における大腸菌検査法の検討. *日本防菌防黴学会誌* 2025, 53(3), 69-73.
- 5) 淀谷雄亮, 西里恵美莉, 小嶋由香, 佐々木麻里, 蔡国喜, 井原基, 田栗利紹, 柳本恵太, 緒方喜久代, 武藤千恵子, 梅津萌子, 高久靖弘, 山口友美, 前川純子. 浴槽水等のレジオネラ属菌検査におけるレジオラート/QT 法と平板培養法の比較検討. *日本防菌防黴学会誌.* 2025, 53(1), 3-8.
- 6) 森 康則, 永井佑樹, 佐藤大輝, 谷本健吾, 豊田真由美, 亀山有貴, 原 有紀, 中野陽子, 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ラミンと遊離塩素に対する *Legionella pneumophila* の消毒耐性の定量的評価. *温泉科学* 2024, 74, 18-28.
- 7) 前川純子, 佐伯歩, 森田昌知, 明田幸宏, 中植竜大, 村井美代, 森中りえか. マルチプレックス PCR による *Legionella pneumophila* 血清型別法について. *IASR* 45: 123-124, 2024.
- 8) 佐伯歩, 前川純子, 明田幸宏. *Legionella pneumophila* の分子疫学解析. *IASR* 45: 124-125, 2024.

- 9) 佐伯歩、前川純子、大森恵梨子、陳内理生、金谷潤一、中西典子、平塚貴大、岡部祐未。レジオネラ・レファレンスセンターの活動。IASR 45: 125-126, 2024.
 - 10) 柳本恵太、森康則、田栗利紹、長岡宏美、杉山寛治、縣邦雄、市村祐二、藤井明、山本哲司、小坂浩司、前川純子、泉山信司。浴槽水のモノクロラミン消毒, 2024 年時点. IASR 45: 120, 2024.
 - 11) 枝川亜希子、小池真生子、井上浩章、縣邦雄、杉山順一、安齋博文、前川純子、泉山信司。レジオネラ外部精度管理の現状. IASR 45: 120-122, 2024.
 - 12) 金谷潤一、山口友美、武藤千恵子、淀谷雄亮、飯高順子、佐々木麻里、田栗利紹、蔡国喜、川野みどり、前川純子、泉山信司、倉文明。環境水における遺伝子検査の活用について. IASR 45: 122-123, 2024.
 - 13) 前川純子。レジオネラ症の疫学調査(菌株の型別法)。ビルと環境, 187, 27-33, 2024.
 - 14) 前川純子、レジオネラの基本情報、生活と環境、2024、69(5)、4-8.
 - 15) 泉山信司、公衆浴場のレジオネラ対策を目的とした衛生管理、生活と環境、2024、69(5)、26-31.
2. 学会発表
- 1) Kanatani J, et al. Prevalence and molecular epidemiology of Legionnaires' disease in Toyama Prefecture, Japan. The 8th ESGLI Meeting. Dresden, Germany. October 2024.
 - 2) 小森正人、金井博哉、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33回年次研究講演会、2024年6月、京都府京都市
 - 3) 中嶋直樹、陳内理生、黒木俊郎。入浴施設の塩素消毒によるレジオネラ対策事例。第5回 Hospital Water Hygiene 研究会学術集会。2023年11月。東京。
 - 4) 沢田牧子、黒木俊郎、泉山信司、小坂浩司。アンケートによる保健所等の公衆浴場等でのレジオネラ症防止対策の監視指導の実態調査。令和6年度全国会議(水道研究発表会)講演集, 920-921, 2024.
 - 5) 泉山信司、小坂浩司、黒木俊郎。入浴施設の衛生管理の手引・指針の検討。環境技術学会、2024年9月、大阪市
 - 6) 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」、2024年6月26日、オンライン会議
 - 7) 前川純子。レジオネラ症の発生状況と環境要因。第73回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第71回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 シンポジウム。2024年10月。東京。
 - 8) 森 康則、永井佑樹、大市真梨乃、佐藤大輝、小林章人、吉村英基、北浦伸浩、枝川亜希子、藤井 明、泉山信司、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、日本温泉科学会第77回大会、2024年9月、静岡県
 - 9) 森 康則、温泉・気候・物理医学分野における社会的要請の察知と境界領域からのアプローチ、第89回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会、2024年6月、和歌山県
 - 10) 小松頌子、田中忍、小川恵子、森本洋、中西典子。レジオネラ症発生事例における *Legionella longbeachae* の細菌学的・遺伝的特徴。日本防菌防黴学会 第50回年次大会。2024年9月。

- 11) 小松頌子、小川恵子、森本洋、中西典子. 本邦で稀なレジオネラ症起因菌 *Legionella longbeachae* の検査法と分離菌株の性状. 第94回日本感染症学会西日本地方会学術集会 第72回日本化学療法学会西日本支部総会 合同学会. 2024年11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. 2024年5月. Web対応.
- 2) 前川純子:レジオネラ属菌の検査と対策. 令和6年度 短期研修 環境衛生監視指導研修. 2024年11月. Web対応.
- 3) 泉山信司:公衆浴場等におけるレジオネラ対策について. 令和6年度生活衛生関係技術担当者研修会. 2025年2月. Web対応

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 2. 実用新案登録 3. その他
なし

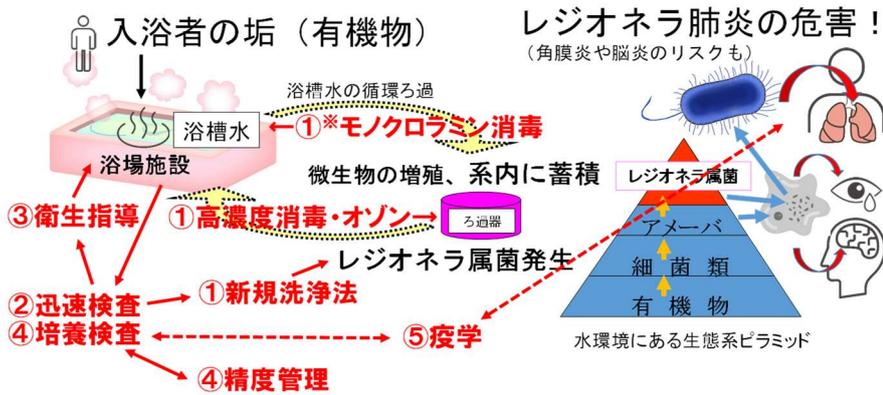


図0 本研究班の編成

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

表0 研究協力者一覧(あいうえお順、敬称略、オブザーバー参加を除く報告書の共同発表者)

縣 邦雄	アクアスつくば総合研究所	新道 欣也	株式会社 お風呂のシンダー
浅野 由紀子	四国中央保健所	杉本 貴之	宮崎県中央保健所
安齋 博文	公益財団法人日本建築衛生管理教育センター	杉山 寛治	株式会社 マルマ
五十嵐 日菜	北海道保健福祉部健康安全局	杉山 順一	公益財団法人日本建築衛生管理教育センター
石井 清隆	株式会社 ヤマト	鈴木 史恵	静岡市環境保健研究所
石森 啓益	柴田科学株式会社	高久 靖弘	東京都健康安全研究センター
井上 浩章	アクアスつくば総合研究所	高橋 美徳	静岡市環境保健研究所
梅津 萌子	東京都健康安全研究センター	高村 知成	山梨県衛生環境研究所
大島 萌愛	富山県衛生研究所	田中 慶郎	株式会社 マルマ
太田奈保美	岡山理科大学	土屋 邦男	山梨県衛生環境研究所
大橋 美至	神奈川県健康医療局	鳥井 良太	株式会社 お風呂のシンダー
大森 恵梨子	仙台市衛生研究所	中川 佳子	埼玉県衛生研究所
緒方 喜久代	公益社団法人 大分県薬剤師会検査センター	中嶋 直樹	神奈川県衛生研究所
尾崎 吉純	高知県健康政策部	中臣 昌広	オフィス環監未来塾
尾崎 淳朗	愛媛県保健福祉部	長埜 朗夫	千葉県環境保健研究所
小田 康雅	シスメックス株式会社	鍋田 信吾	静岡県環境衛生科学研究所
小野田 早恵	静岡市環境保健研究所	西里 恵美莉	川崎市健康安全研究所
鳥谷 竜也	愛媛県立衛生環境研究所	西澤 尚文	株式会社 ゴーフォトン
木村 哲也	株式会社 ヤマト	野本竜平	神戸市健康科学研究所
木村千鶴子	愛媛県立衛生環境研究所	花輪 由記	さいたま市健康科学研究センター
工藤 剛	宮城県保健環境センター	平井真太郎	愛媛県立衛生環境研究所
倉 文明	国立感染症研究所	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
小池 真生子	大阪健康安全基盤研究所	福田 隆志	グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社
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	藤永千波	神戸市健康科学研究所
近 真理奈	埼玉県衛生研究所	細川 賢人	花王株式会社
蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	三谷 康正	株式会社 ゴーフォトン
佐伯 歩	国立感染症研究所	武藤 千恵子	東京都健康安全研究センター
佐々木 麻里	大分県衛生環境研究センター	本宮 恵子	千葉県環境保健研究所
茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所
沢田牧子	国立保健医療科学院	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	湯澤 栄子	川崎市健康安全研究所

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 5 週間前	70	0	陰性	9.7	0.1	0.2	—
導入 4 週間前	300	6	陰性	10.0	0.1	0.1	—
導入 3 週間前	80	17	陰性	10.0	0.1	0.1	—
導入 2 週間前	170	10	陰性	9.9	0.1	0.1	—

導入 1 週間後	<10	0	陰性	10.0	—	3.4	3.5
導入 2 週間後	<10	0	陰性	10.0	—	4.7	5.4
導入 3 週間後	<10	0	陰性	10.1	—	3.7	3.8
導入 4 週間後	<10	0	陰性	10.0	—	3.7	3.9

—:測定なし

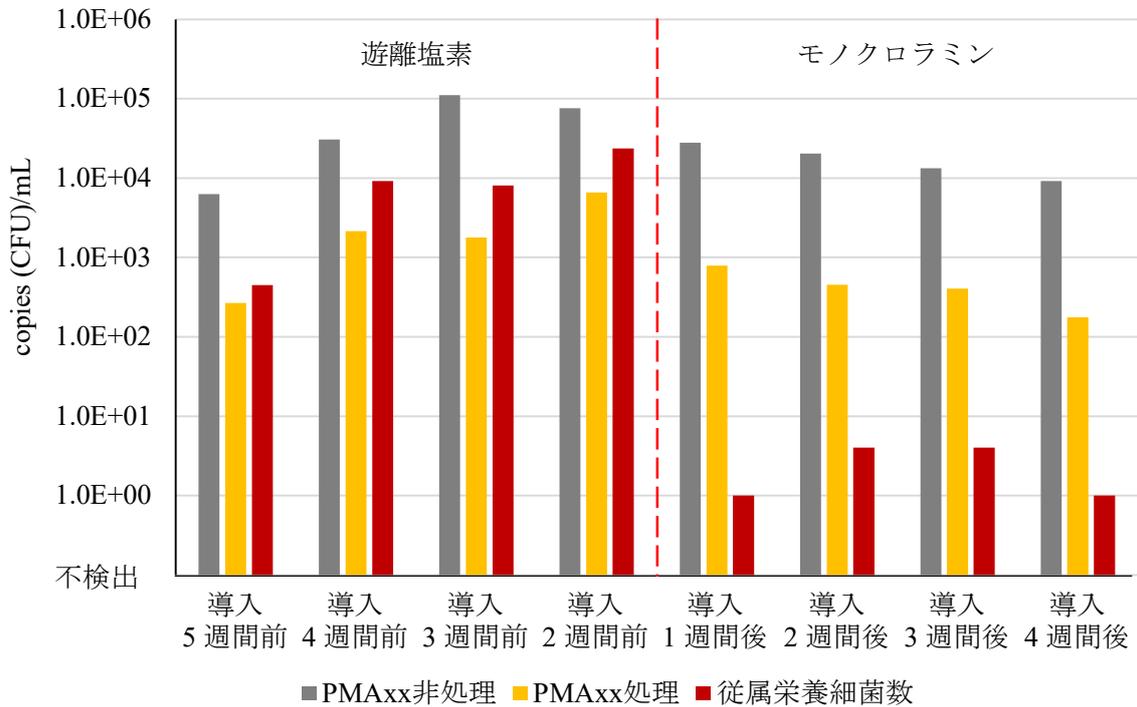


図 1-1 浴槽水の 16S rDNA コピー数、従属栄養細菌数

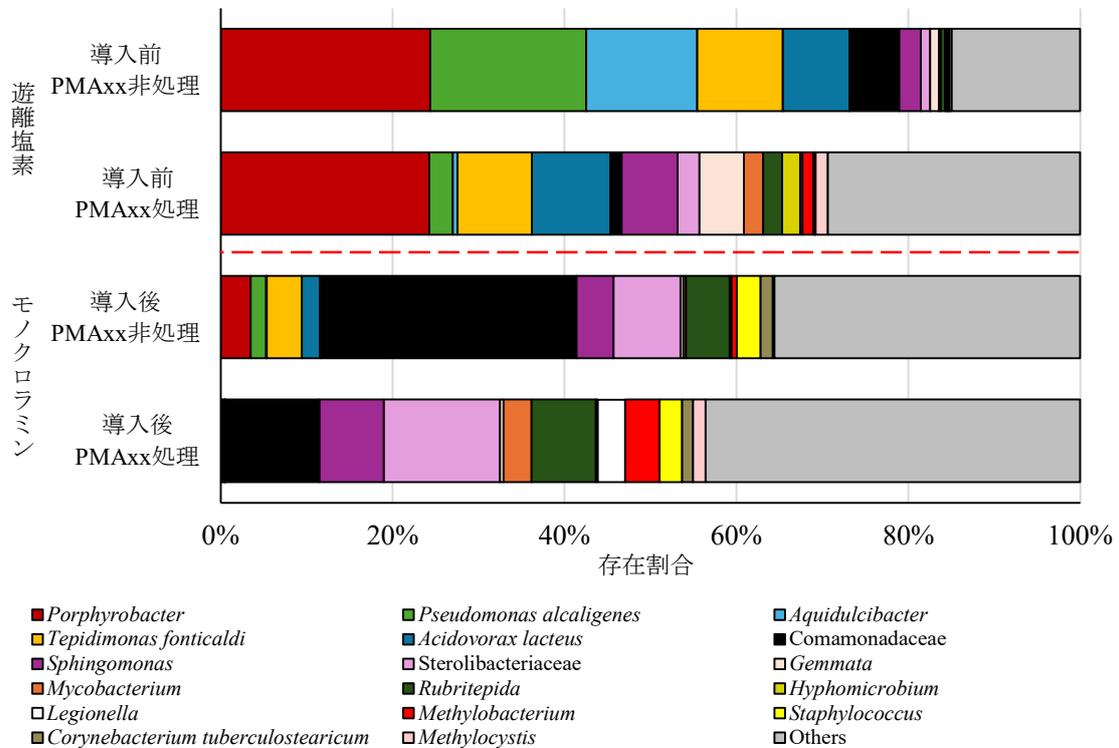


図 1-2 浴槽水の菌叢解析結果 (各 4 週間分データの平均)

表 2-1 2015 年から追跡の、レジオネラ属菌による汚染に苦慮する浴場施設 (2022~2024 年結果)

	実施年		
	2022	2023	2024
レジオネラ属菌分離			
地下貯湯槽	-	-	-
高置貯湯槽	-	-	-
浴室1			
浴槽	-	-	-
湯口	-	-	-
カラン1 初流水	-	-	-
カラン1 3分流水後水	-	-	-
カラン2 初流水	-	-	-
シャワー	-	-	-
配管末端放水部	-	-	-
ろ過器	-	-	-
浴室2			
浴槽	-	-	-
湯口	-	-	-
カラン3 初流水	80 (Lsp) [†]	-	-
カラン4 初流水	-	10 (Lp SG6)	10 (Lp SG6)
カラン4 3分流水後水	50 (Lp SG6, Lsp)	10 (Lp SG6)	40 (Lp SG6)
シャワー	-	-	-
配管末端放水部	-	-	-
ろ過器	260 (Lp SG1, Lp SG9)	10 (Lp SG1, Lp SG9)	50 (Lp SG1, Lp SG9)
遊離塩素濃度 (mg/L)	0.01-1.61 (中央値: 0.68)	0.02-2.00以上 (中央値: 1.59)	0.12-2.00以上 (中央値: 0.36)
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	$0.5 \times 10^0 - 7.0 \times 10^2$ (中央値: 1.2×10^1)	$0 - 2.3 \times 10^4$ (中央値: 1.5)	$0 - 9.2 \times 10^2$ (中央値: 2.3)
水温 (°C)	34.0-54.1	34.5-56.6	31.1-56.8
pH	8.02-8.17	7.99-8.51	7.86-8.36
アンモニア態窒素濃度 (mg/L)	すべて検出限界 (0.01) 以下	すべて検出限界 (0.01) 以下	すべて検出限界 (0.01) 以下

[†] 数値はレジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)、括弧内は分離された菌種を示す。

Lp: *Legionella pneumophila*, Lsp: *Legionella* sp., SG; Serogroup, -: 不検出 (10 CFU/100 mL未満)

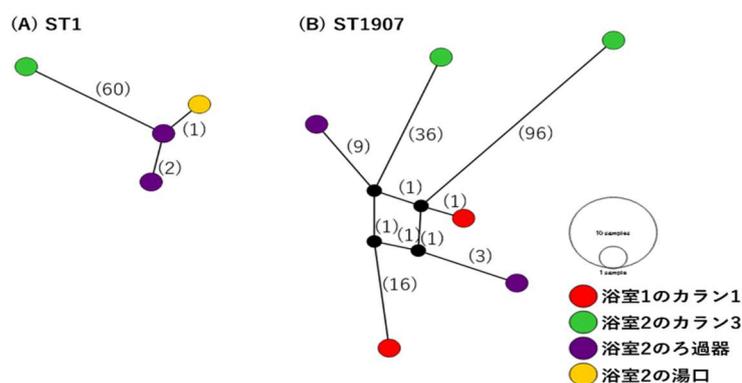


図 2-1 Single nucleotide variant (SNV) 解析に基づくネットワーク図

A) *L. pneumophila* ST1 株、
B) ST1907 株。括弧内の数値は株間の SNV 差を示す。
ST: Sequence type

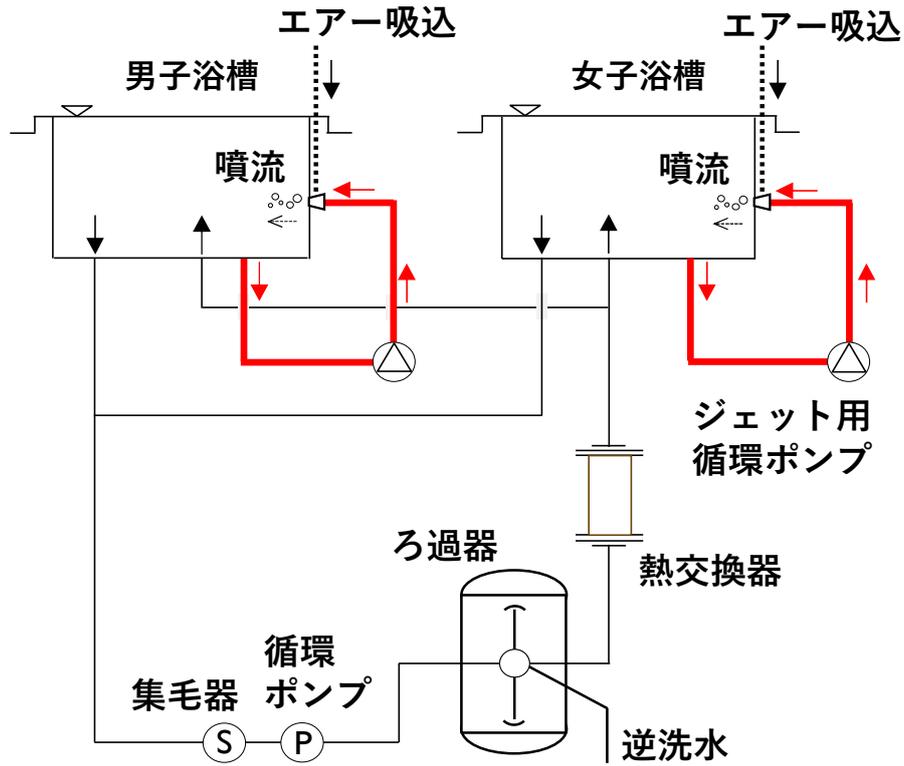


図 3-1 試験浴槽循環系統図

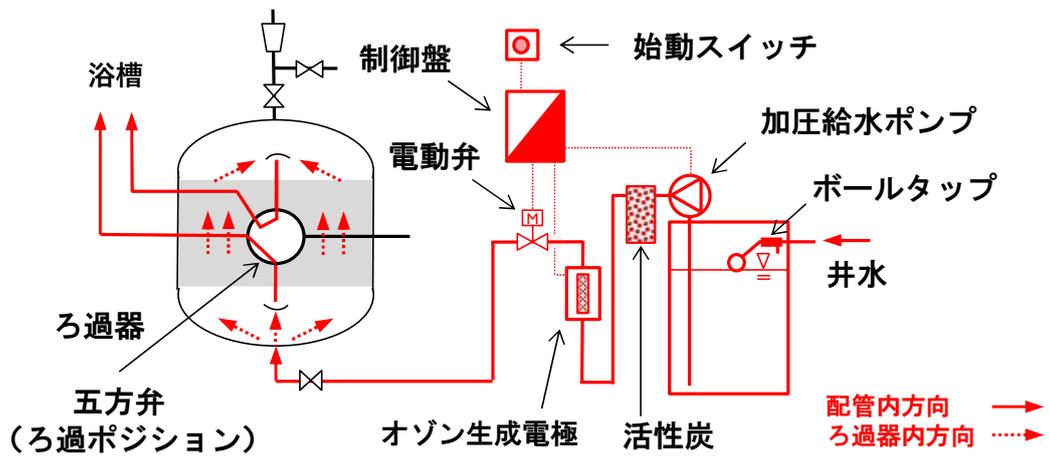
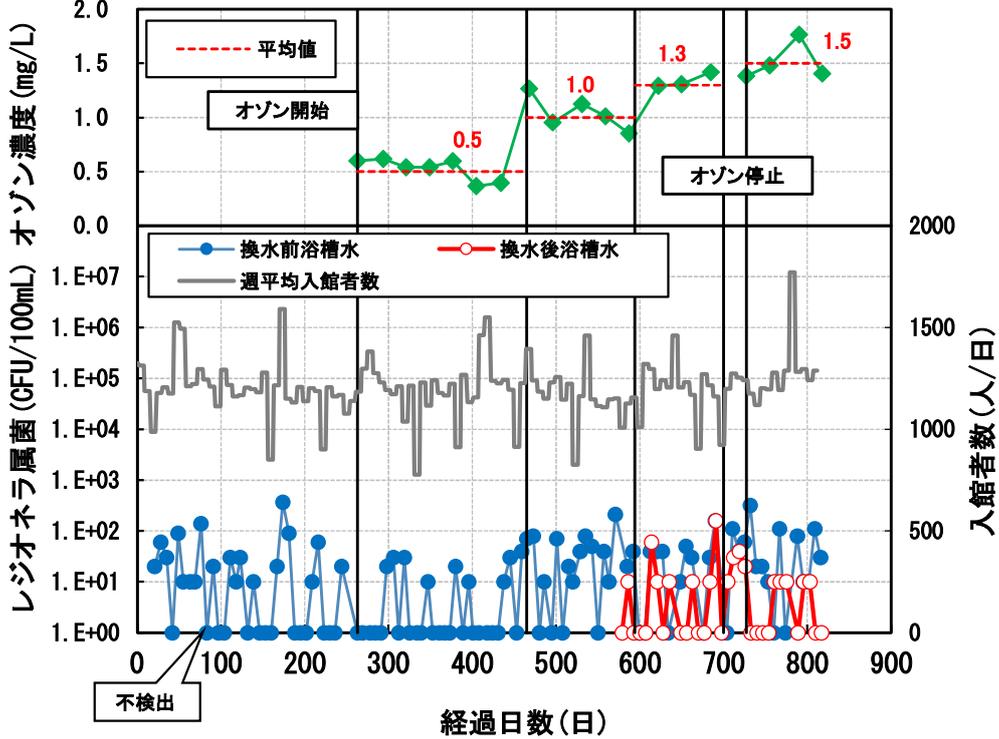


図 3-2 試験装置概略

実線矢印および破線矢印は、それぞれ洗浄中の配管内における電解オゾン水の通水方向、およびろ過器内における電解オゾン水の通水方向を示している。

A) 浴槽水のレジオネラ属菌



B) 逆洗水のレジオネラ属菌

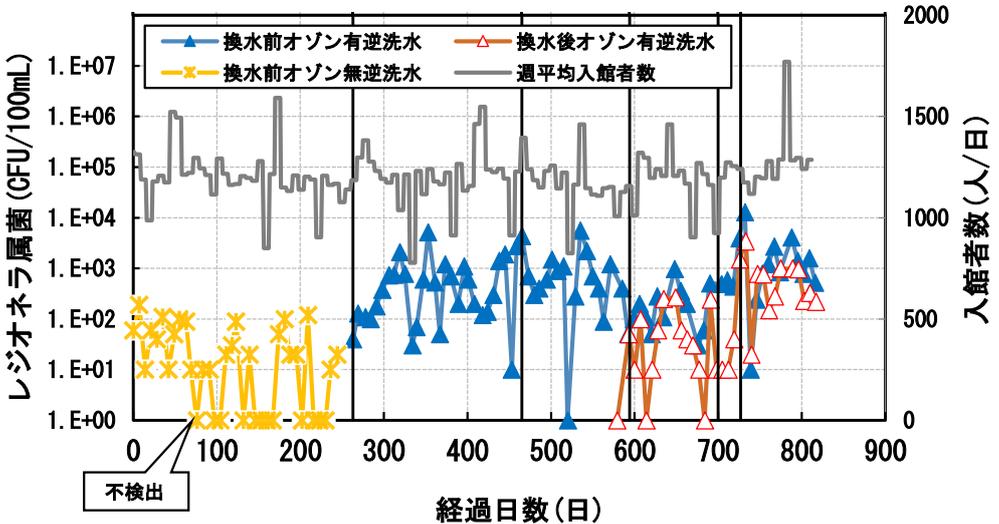


図 3-3 電解オゾン水のオゾン濃度、週平均入館者数、およびレジオネラ属菌の濃度、の経日変化

レジオネラ属菌の 1CFU/100mL は不検出(検出限界 10CFU/100mL)を示している。浴槽水は代表して男子浴槽から採水し、電解オゾン水の供給は図の 263 日目より開始した。オゾン電極の枚数を調節することにより、465 日目に 0.5mg/L から 1.0mg/L へ、594 日目に 1.0mg/L から 1.3mg/L へとオゾン濃度(平均値)を段階的に上昇させた。700 日目から 727 日目までの約 1 ヶ月間は電極の故障により電解オゾン水の供給を停止したが、727 日目からは電極槽を更新してオゾン濃度 1.5mg/L で再開した。

オゾン供給前

オゾン不足(試運転)

ろ過器内排水後オゾン水供給

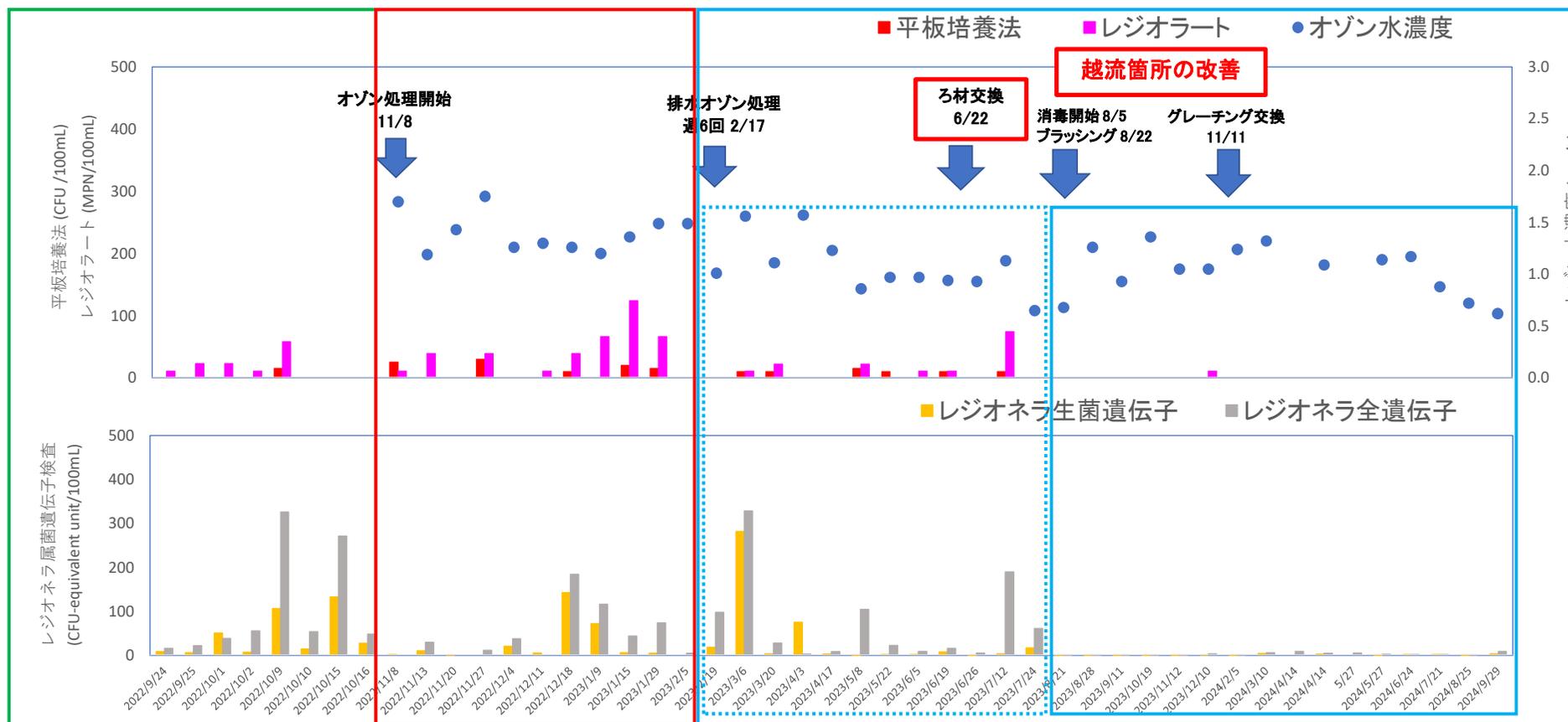


図 4-1 ろ過器の電解オゾン水による消毒、レジオネラ属菌の解析結果

緑枠： 電解オゾン水の供給前の期間(2022年9月24日～10月16日)、赤枠： オゾン量の不足した時期(2022年11月8日～2023年2月5日)

青枠： ろ過器内を排水した後に電解オゾン水を供給した期間(2023年2月17日～2024年9月29日、レジオネラ属菌の汚染源の特定 2023年8月5日)

青枠内部は、レジオネラ属菌の汚染源を発見する前(破線)と発見後対応して以降(実線)の期間、電解オゾン水処理によっても微量ながらレジオネラ属菌の汚染を認めため、ろ材交換と、循環系排水溝からの越流箇所の改善(消毒、ブラッシング、グレーチング交換)を行った。

検出限界： 平板培養法 (10 CFU/100mL)、レジオラート(10 MPN/100mL)、レジオネラ属菌遺伝子検査 (1 CFU-equivalent unit/100 mL)

表 4-1 ろ過器の外にあった汚染を対策した前後の、逆洗浄水の各種検査結果

採水時の運転状況	ATP (RLU ¹⁾)	Flow cytometry ¹ (cells/mL)	レジオネラ属菌検査		レジオネラ属菌遺伝子検査		従属栄養細菌数 (R2A法) (CFU/mL)	遊離塩素濃度 (mg/L)	
			平板培養法 (CFU ²⁾ /100mL)	レジオラート (MPN ³⁾ /100mL)	EMA-qPCR (CFU-eU ⁴⁾ /100 mL)	qPCR (CFU-eU/100 mL)			
ろ過器外の汚染発見前 (n=31)	オゾン供給前 (n=8)	58.19±51.06	55,640±98,944	7.50±10.35	15.75±19.56	41.89±51.44	104.02±122.07	NT ⁵⁾	1.51±0.66
	オゾン供給初期 (n=10)	63.10±26.74	67,409±103,704	10.50±12.12	39.50±38.43	26.46±46.10	50.21±59.96	NT	1.93±0.16
	ろ過器内排水後 オゾン供給(n=13)	48.08±28.27	22,574±38,972	5.00±5.77	11.62±20.52	31.88±77.77	67.7±95.97	3,386±6,070	1.83±0.30
	小計	55.53±34.46	45,570±80,829	7.67±9.39*	22.40±29.32*	34.46±60.58*	73.65±93.16*	3,386±6,070	1.79±0.42 [#]
	ろ過器外の汚染発見後 (n=16)	88.89±61.86	33,252±46,422	0 ⁶⁾ *	0.69±2.75*	1.51±1.08*	3.19±2.85*	6,449±14,250	1.10±0.76 [#]

¹⁾ Relative Lights Unit, ²⁾ Colony Forming Unit, ³⁾ Most Provable Number, ⁴⁾ CFU-equivalent Unit, ⁵⁾ Not Tested, ⁶⁾ All samples were below the detection limit. !: The RF-500 Flow Cytometer (Sysmex.co.) was used in this study. *t*-test: *, P<0.01, #; P<0.05, The values below the detection limit were calculated as 0 in the *t*-test.

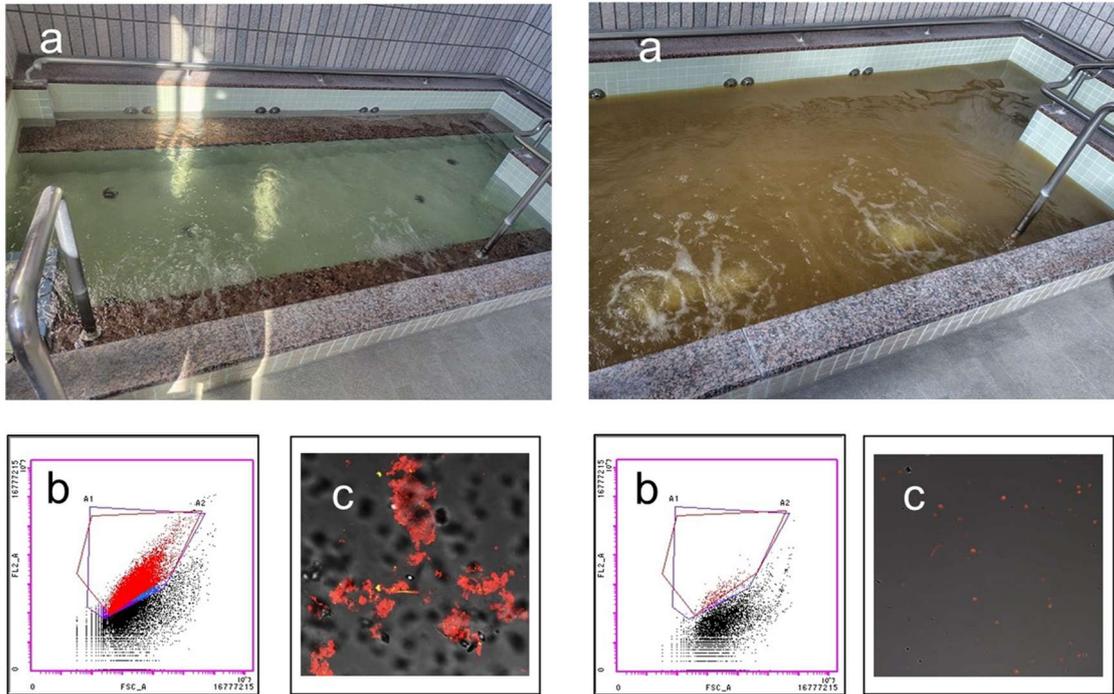


図 5-1 省力化配管洗浄剤の洗浄工程の写真(R 施設)

- a: 洗浄処理中の浴槽、b: 同、フローサイトメトリー法のスクアッタグラム(赤は細菌部分)、
 c: 同、共焦点レーザー顕微鏡による顕微鏡写真(赤は糖、緑は核酸、黄は両者の重なり部分)、
 d: 中和処理中の浴槽、e: 同、スクアッタグラム、f: 同、顕微鏡写真

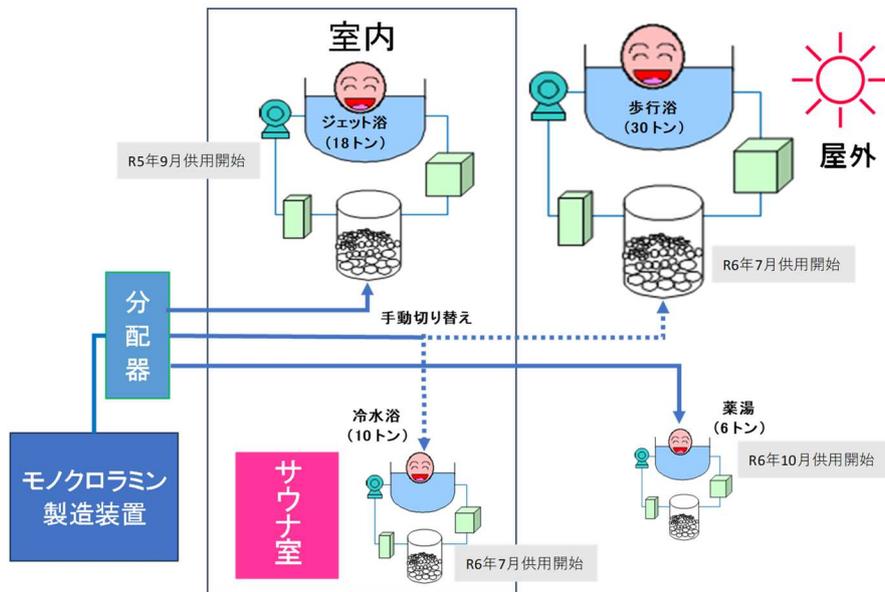


図 5-2 モノクロラミン製造装置による生成・分配の 3 系統(うち 1 系統を手動で添加先を切替)と、浴槽水の循環 4 系統の模式図(Q 施設)

表 6-1 施設 A 浴槽水の、FCM 法による現地測定と、その他の持ち帰り測定結果

	FCM (cells/mL)	レジオネラ PCR (+/-)	レジオネラ平板培養 (CFU/100 mL)
浴槽 1	6,167	+	<10
浴槽 2	1,857	+	<10
浴槽 3	476	-	<10
浴槽 4	4,857	+	<10
浴槽 5	6,095	+	<10
浴槽 6	1,952	+	<10
浴槽 7	571	+	<10
浴槽 8	3,619	+	<10

表 6-2 施設 B 浴槽水の、FCM 法による現地測定と、その他の持ち帰り測定結果

	FCM (cells/mL)	レジオネラ PCR (+/-)	レジオネラ平板培養 (CFU/100 mL)
浴槽 1	95	-	<10
浴槽 2	190	-	<10
浴槽 3	190	-	<10
浴槽 4	190	-	<10
浴槽 5	190	-	<10
浴槽 6	95	-	<10

表 7-1 培養法と遺伝子検査法の相関(2×2 表と感度他)

A) モバイルqPCR法*

		平板培養		計
		+	-	
モバイルqPCR	+	11	2	13
	-	2	25	27
		13	27	40

*4検体は、フィルターが詰まりろ過できなかった

感度	84.6%
特異度	92.6%
陽性的中率	84.6%
陰性的中率	92.6%
一致率	90.0%

B) LAMP法

		平板培養		計
		+	-	
LAMP	+	12	10	22
	-	2	20	22
		14	30	44

感度	85.7%
特異度	66.7%
陽性的中率	54.5%
陰性的中率	90.9%
一致率	72.7%

C) qPCR法

		平板培養		計
		+	-	
タカラqPCR	+	13	17	30
	-	1	13	14
		14	30	44

感度	92.9%
特異度	43.3%
陽性的中率	43.3%
陰性的中率	92.9%
一致率	59.1%

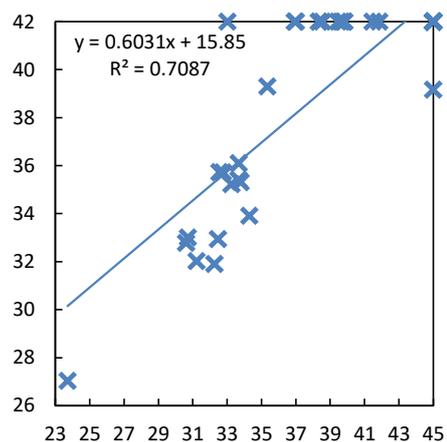


図 7-1 モバイル qPCR 法(縦軸) および qPCR 法(横軸)で測定した 遺伝子量(Ct 値)の比較

モバイルqPCR法における Ct 値 42 と、qPCR 法における Ct 値 45 は、不検出を意味する。

表 8-1 都道府県や市で浴槽水等の消毒方法のひとつとしてモノクロラミン消毒を認めているか

	件数	回答割合(%)
条例で認めている	24	67
条例では認めていないが、規則や要領、マニュアル等で認めている	1	3
現在は条例で認めていないが、変更する予定がある	0	0
条例等で認めていない	2	6
その他	9	25
<ul style="list-style-type: none"> ・ 条例で消毒方法を規定、明記していない(5) ・ 条例等に記載はないが、認めている ・ 条例において、「市長の定めるところにより」と規定し、本市規則にて具体的に規定している ・ 塩素系薬剤により難しい場合に、塩素系薬剤を用いた場合と同等以上の消毒効果を有する方法により行うものとしている ・ 条例では、ただし書きにより、「原湯又は原水の水質その他の浴槽水の水質に応じて、他の適切な方法により消毒すること」を認めており、また公衆浴場衛生管理要領において、モノクロラミン消毒を行う場合の規定を定めている 		
計	36	100

表 8-2 立入検査時の現場試験の実施方法

	利用の有無		(利用無しの場合) 関心の有無				未回答	
	利用中		関心あり		関心なし			
① DPD法による遊離塩素濃度測定	35	97%	1	3%	0	0%	0	0%
② DPD法による総塩素濃度測定	9	25%	12	33%	9	25%	6	17%
③ インドフェノール法によるモノクロラミン濃度測定	2	6%	20	56%	8	22%	6	17%
④ アンモニア態窒素測定	3	8%	17	47%	11	31%	5	14%
⑤ モバイルPCR法やバルサー法によるレジオネラ遺伝子検出	0	0%	24	67%	8	22%	4	11%
⑥ ATP法によるATP測定	14	39%	15	42%	5	14%	2	6%
⑦ その他	2	6%	0	0%	0	0%	17	47%
	その他はない						17	47%
<ul style="list-style-type: none"> ・ DPD法による結合塩素濃度測定 ・ 試験紙による遊離塩素濃度測定 								

表 8-3 立入検査後にレジオネラ属菌を迅速に試験する方法

	利用の有無		(利用無しの場合) 関心の有無				未回答	
	利用中		関心あり		関心なし			
① フローサイトメトリー法 (雑菌の有無を測定、消毒効果を推測、測定に数分間)	0	0%	21	58%	8	22%	7	19%
② 死菌も検出されるPCR法やLAMP法 (PCR検出、測定に数時間)	10	28%	13	36%	8	22%	5	14%
③ 生菌を検出するEMA-PCR法 (EMA処理後にPCR検出、測定に数時間)	1	3%	22	61%	7	19%	6	17%
④ 生菌を検出するLC-EMA-PCR法 (培養とEMA処理後にPCR検出、測定に一晩)	2	6%	20	56%	9	25%	5	14%
⑤ その他	0	0%	0	0%	0	0%	15	42%
	その他はない						21	58%

表 8-4 浴槽水等のレジオネラ属菌の検査が陽性の場合の探知方法

	件数	回答割合(%)
施設からの報告	36	100
検査機関からの報告	8	22
他部署からの報告	4	11
立入検査時	21	58
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	0	0

表 8-5 浴槽水等のレジオネラ属菌の検査が陽性の場合の対応(複数回答可)

	件数	回答割合(%)
電話や対面等で施設の状況を確認した後、すみやかに立入検査を行う	36	100
電話や対面等で施設の状況を確認した後、電話等で口頭指導を行う(立入検査なし)	8	22
陽性を探知した場合でもすぐに対応せず、通常の監視時に対応する	0	0
陽性の場合があっても、特段の対応は行わない	0	0
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
・ 県条例で定める公表基準を超過した際には自主公表させる。しない場合は県が公表する		

表 8-6 浴槽水等における近年3年間のレジオネラ属菌の検出状況

	件数	回答割合(%)
管内施設において、近年3年間の検出実態はない	5	13.9
管内施設で検出実態がある	29	80.6
分からない	2	5.6
計	36	100

表 8-7 業者向けの講習会等に用いる、対策に関する資料についての意見

	件数	回答割合(%)
全国共通の資料として、衛生対策関係のものがあれば良い (加工可能なもの、電子データにて提供)	29	81
全国共通の資料として、レジオネラ症対策関係のものがあれば良い (加工可能なもの、電子ファイルにて提供)	28	78
全国共通の資料として、リーフレット等の紙資料があれば良い	21	58
法改正等の大きな変更がある際には、全国共通の資料を提供して欲しい(電子データ)	29	81
都道府県や市・区として作成したものがあって問題ない	3	8
保健所等毎に作成したものがあって問題ない	0	0
担当者個人が作成したものがあって問題ない	0	0
関係団体が作成したものがあって問題ない	0	0
意見はない	1	3
その他	1	3
・ 条例で定められる事項なので、都道府県毎に作成される必要があると思う。 そのため、加工しやすいデータが提供されるとよいと思う。		

資料 9-1 入浴施設の衛生管理の手引き 一般衛生管理 簡易版

設備名 貯湯槽

【別添2 公衆浴場における衛生等管理要領】での記載箇所
 I 規則 第2 適用の範囲及び附則の注釈 2(9)
 II 施設設備 第1 一般公衆浴場 6 給水、給湯設備 (2)
 III 衛生管理 第1 一般公衆浴場 1 施設全般の管理 (1)、7 給水、給湯設備の管理 (1)

キーポイント
 60°C未満では生物膜内でレジオネラ菌が繁殖する。
 ○ 貯湯槽の湯の補給口から底部に至るまで常に60°C以上（最大使用時でも55°C以上）に保つ。
 ○ 60°C未満の場合には貯湯槽内の湯を消毒する。消毒装置を設置する。
 貯湯槽の底部は汚れが溜まりやすく、低温になりやすい。
 ○ 底部に水抜き弁を設置するなどして完全に排水できる構造とする。
 ○ 年に1回以上、完全に排水して内部を洗浄・消毒し、スケールを除去する。
 ○ 維持管理記録を残す。

設備の概要（構造）
 ○ 密閉式貯湯槽（槽が密閉されて常に湯で満たされている）と開放式貯湯槽（槽上部に開口部があり槽内に空気が出入りする）がある。
 ○ 配管を短くするために開放式・密閉式ともに浴槽に近接して設置することが推奨される。

【密閉式貯湯槽】

【開放式貯湯槽】

管理

- 貯湯槽の底部は低温になりやすいため、全体を60°C以上に保つように管理する。
- 貯湯槽水を60°C以上に保つことができない場合には必要に応じて消毒装置を設置して遊離残留塩素濃度を0.1 mg/L以上に保つ。
- 1年に1回以上、完全に排水して内部の洗浄と消毒を行い、スケールを除去する。
- 設備（通気管及びオーバーフロー管の防止網、マンホールの蓋等）の取組等の確認や圧力計の性能確認を月に1回程度、定期的に実施する。
- 湯し管や漏れなど貯湯槽の液水面は生物膜が形成されやすいので、定期的に確認する。
- 維持管理記録を付け、3年間保管することが推奨される。

レジオネラ菌値が検出された場合の措置

- 貯湯槽や配管系からレジオネラ菌値が検出され、貯湯槽の洗浄・消毒が必要となった場合は、まずブラシや高圧洗浄機を使って貯湯槽の内部を洗浄して生物膜や汚れを十分に除去する。
- 洗浄時にマスクなどを着用して、感染予防に十分留意する。
- 消毒には以下の方法が推奨されており、感度下剤に十分留意する。
 ・遊離残留塩素濃度が50~100 mg/Lの塩素系薬剤を適量あるいはブラス等で散布する。30分以上放置後に水ですすぐ。消毒とすすぎを2回繰り返す。（平成20年1月25日付け健発第0125001号厚生労働省健康局長通知「建築物における衛生的環境の維持管理について」を参照）
 ・満水にしてから、例として遊離残留塩素濃度が50~100 mg/Lになるように塩素系薬剤を使用し、2時間以上放置後に排水する。
- レジオネラ菌値の再検査を行って、検出されないことを確認する。



目次

序言	3
はじめに	5
目的	6
対象施設	6
公衆浴場	6
温泉	6
海水浴場	6
更衣室	9
洗面所	11
熱湯浴場	12
湯上り場	13
更衣室・浴室	15
公衆浴場の施設設備	15
給湯設備	16
オーバーフロー防止網	17
設備類	18
シャワー・排水設備	19
暖房・電気・その他設備	21
上りり材料の取扱い	21

*本資料における「施設」とは公衆浴場における給湯設備やシャワー設備、更衣室、浴室等に限定して指すのではなく、温泉施設や海水浴場、更衣室、洗面所、熱湯浴場、湯上り場、公衆浴場の施設設備の取扱いに関する、そのほかの施設設備も含まれる。

資料 9-2 入浴施設の衛生管理の手引き Q&A 集

資料 2	
入浴施設の衛生管理の手引き	
Q&A 集	
目 次	
総合衛生管理プログラム	1
浴槽の管理	3
浴槽水の管理	5
生物膜	5
消毒方法	6
消毒剤濃度の測定	12
水質基準	15
配管の管理	16
配管配管	16
逆流管	18
付帯設備の管理	19
ろ過器	19
集毛器	20
熱交換器	20
給湯器	21
水栓計	22
シャワー	22
その他の設備の管理	23
サウナ	23
錠石	23
略号等	
衛生管理要領	【公衆浴場における衛生管理要領等について】(平成 12 年 12 月 15 日付労働 省第 1811 号厚生省生活衛生局長通知)の 別添 2「公衆浴場における衛生管理 要領」
手引き	【入浴施設の衛生管理の手引き】
手引きの掲載版	【入浴施設の衛生管理の手引き】 第 1 版(衛生管理 掲載版)

総合衛生管理プログラム 1

Q：入浴施設においてレジオネラ属菌対策を進めるためには、チーム編成をしなければならぬでしょうか。

A：レジオネラ属菌対策のための衛生管理の技術には様々なものがあり、それらを活用することでレジオネラ問題を解決することができます。しかし、レジオネラ問題が存在することを認識し、技術を適切に活用しなければ問題を解決することが難しくなります。そのため、レジオネラ問題を解決するには、衛生管理に関する技術だけでなく、組織体制を確立することが重要です。

総合衛生管理プログラムにおいて編成するチームは、部署横断的な人選によって構成されるもので、異なる部署のスタッフがグループで活動する業務です。施設としてレジオネラ属菌やレジオネラ症に対する危機意識をもって施設一丸となって取り組むことを勧めてください。

もしもレジオネラ属菌が検出された場合やレジオネラ症患者が発生した場合には、感染拡大防止のための措置を講じなければなりません。そのような場面においても、限られた人員で迅速に対応するためには、善後からチームという体制を作り、効率的に対処することが推奨されます。

総合衛生管理プログラム 2

Q：チームには衛生管理担当者だけではなく、施設のあらゆる部署の担当者が加わらなければならないでしょうか。フロント係や接客係であっても、浴場の衛生管理やレジオネラ属菌のことを知り、チームに参加したほうがよいでしょうか。

A：レジオネラ属菌対策には施設が一丸となって取り組むことが重要です。レジオネラの問題が存在するという共通認識を持ち、それぞれの部署が連携して継続的に対策を実施していかなければなりません。それぞれの部署の担当者はチームの中で役割を担います。フロント係や接客係が浴場の衛生管理やレジオネラ症を知っていれば、自信を持ってお客様と接することができます。手引にあるチーム編成を、もう少し砕けた表現で列挙すると、役割として次のような内容が例として挙げられます。この中に、レジオネラ属菌対策・施設管理講習会等の受講者がいて、レジオネラ属菌の知識をチームとして有していることも大事です。

- チーム責任者（施設管理責任者等、例えば経営者）
 - 施設の営業・運営方針を定めます。また、チーム会議での現場からの意見等を参考にして方針を新たに定め、あるいは修正します。
- 経理担当責任者
 - 施設における衛生管理の重要性を認識し、適切な支出を検討します。
- 接客担当責任者
 - 1. 入浴者の人数、性別、年齢などを把握します。
 - 2. 入浴者からの評判、感想、詳細、クレームなどの情報を収集し、チームに伝えます。
 - 3. 施設の衛生管理に関する状況等を必要に応じて入浴者に説明します。
- 企画担当責任者
 - 管理状況等を把握したうえで入浴施設の良さを宣伝し、イベント等を企画します。

1

資料 9-3 入浴施設の衛生管理の手引き 概要版(パンフレット)

資料 3

入浴施設の衛生管理の手引き 概要版

1 入浴施設におけるレジオネラ属菌対策の意義

レジオネラ属菌は人に感染する病原細菌であり、風邪症状のポンティアック熱、あるいは重篤なレジオネラ肺炎を引き起こします。レジオネラ症は全国で年間 2,000 件以上の届け出があり、そのうち年間 50 件程度の死亡例があります。

レジオネラ属菌は、河川や水溜まりなどの淡水や土壌などの環境に生息している細菌ですが、増殖に適した温度は 20~45℃とされており、入浴施設を適切に管理していないと、レジオネラ属菌が浴槽、ろ過器、集毛器、貯湯槽、配管等の設備内で増殖し、菌を吸い込んだ入浴者に重篤な健康被害を与える可能性があります。

水と長時間接触している配管や浴槽等の表面では、付着した細菌やアメーバが水中の有機物を利用して増え、生物膜(ぬめり)を作ります。レジオネラ属菌は、この生物膜の中に生息するアメーバの体内で大量に増殖し、その結果、浴槽水やシャワー水に浮遊するレジオネラ属菌が増えることで、入浴者に感染します。

生物膜に包まれたレジオネラ属菌は消毒剤から守られており、浴槽の清掃と浴槽水の消毒だけではレジオネラ属菌の発生を防ぐことはできません。生物膜の発生をできるだけ抑え、発生した生物膜を定期的に除去するよう日々管理するとともに、入浴者が吸い込むエアロゾル(空中を浮遊する細かい液体粒子)の発生を防ぐことが極めて重要です。

2 衛生管理体制の確認 (総合衛生管理プログラム)

まず、入浴施設において、レジオネラ属菌の増殖・定着を防ぎ、レジオネラ症患者の発生を予防するため、以下の項目について、それぞれの施設の衛生管理体制を確認しましょう。

- (1)衛生管理の責任者はだれか、実際に管理する担当者はいだれか。
- (2)施設の構造はどうなっているのか、どんな設備があるのか、いつ交換・洗浄・消毒したのか。
- (3)レジオネラ属菌が増えやすい場所やエアロゾルが発生しやすい場所はどこか。
- (4)重点的に管理すべき場所はどこか、管理状況をどのように確認し、どう記録に残すのか。
- (5)管理状況が基準を外れたとき、どのような処置をするのか。

次に、施設ごとにこれらの内容を文言化し、日々の衛生管理を計画的に行うための指標とします。そして、組織体制の変更、施設設備の更新や、管理上の不都合が確認された際は、速やかに改訂して施設内で情報を共有し、常に改善していくことが重要です。

参考資料として、施設設備/保守管理のチェックリストや施設設備の点検管理表の例を添付しましたので、各施設の衛生管理体制や、衛生管理状況の確認・文書化にご活用ください。

わからない点があれば、地域を管轄する保健所の生活衛生担当部署に相談しましょう。

このパンフレットは、厚生労働科学研究費補助金「健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消費方法等の衛生管理手法のための研究」が作成した「入浴施設の衛生管理の手引き」(令和4年5月13日、以下「手引き」という。)の概要版です。具体的な対応等の詳細は、「手引き」に示した該当ページをご確認ください。

3 衛生管理のポイント (一般的衛生管理)

循環式浴槽の例：設備概要、図中の丸数字は以下文書の各項目に対応
 丸数字は設置している場合とない場合があること、
 ○の中には△はポンプを表す
 なお、オーバーフロー水の浴用利用は推奨されない

1 貯湯槽(源泉槽)

【構造】

- 湯の補給口、底部等に至るまで 60℃以上に保ち、かつ、最大使用時でも 55℃以上に保つことができる加温装置を設置する。
- 加温できない場合は、貯湯槽水の遊離残留塩素濃度を 0.4 mg/L 以上に保つことができる消毒設備を設置する。

【管理】

- ブラシ等による洗浄で生物膜を除去し、次亜塩素酸ナトリウム溶液等を用いて消毒する。
- 高圧洗浄では生物膜が残ることがあるので、洗浄後に徹底した消毒で生物膜を除去する。

2 循環配管

【構造】

- 給湯配管や給水配管は循環配管に接続しない。
- 高温で劣化せず、湯の温度が下がりにくい材質(耐熱性硬質ポリ塩化ビニル等)を使用する。

【管理】

- 生物膜を除去するため、貯湯槽の清掃に併せて定期的に配管洗浄を実施する。

3 湯口

【構造】

- 原水又は原湯の注入口は循環配管に接続せず、浴槽水面上部の湯口から浴槽に落とし込む構造とする。
- 循環水は浴槽底部に近い部分から補給し、湯口から出さない。
- 上蓋が外せ、内部の洗浄・消毒が容易な構造が望ましい。

【管理】

- 定期的にブラシを使って洗浄し、塩素系消毒剤で消毒する。

表 10-1 現行法と大腸菌定量法(1 個/mL 以下)の比較

		現行法		合計
		基準値超過	基準値内	
定量法(1 個/mL 以下)	基準値超過	2	1	3
	基準値内	4	130	134
合計		6	131	137

フィッシャーの正確確率検定により 2 法の結果に差はない。 $p=0.0095<0.01$

表 10-2 現行法と大腸菌定量法(1 個/mL 未満)の比較

		現行法		合計
		基準値超過	基準値内	
定量法(1 個/mL 未満)	基準値超過	4	1	5
	基準値内	2	130	132
合計		6	131	137

フィッシャーの正確確率検定により 2 法の結果に差はない。 $p=0.000011<0.01$

表 10-3 現行法と大腸菌定量法(不検出)の比較

		現行法		合計
		基準値超過	基準値内	
定量法(不検出)	基準値超過	5	3	8
	基準値内	1	128	129
合計		6	131	137

フィッシャーの正確確率検定により 2 法の結果に差はない。 $p=0.0000018<0.01$

表 10-4 現行法と大腸菌定性法(不検出)の比較

		現行法		合計
		基準値超過	基準値内	
定性法(不検出)	基準値超過	5	9	14
	基準値内	1	122	123
合計		6	131	137

フィッシャーの正確確率検定により 2 法の結果に差はない。 $p=0.000061<0.01$

表 11-1 定量・定性試験における大腸菌および大腸菌群の検出率

	サンプル数	定量試験		定性試験	
		大腸菌陽性の サンプル数 (%)	大腸菌群陽性の サンプル数 (%)	大腸菌陽性の サンプル数 (%)	大腸菌群陽性の サンプル数 (%)
井戸水(ボーリング水含む)	18	1	1	1	1
水道水	33	1	1	2	2
井戸水&水道水	4	0	0	0	0
温泉水	71	6	10	10	11
合計	126	8 (6.3%)	12 (9.5%)	13 (10.3%)	14 (11.1%)

表 11-2 浴槽水の種類と残留塩素濃度

	サンプル数	残留塩素濃度 ¹⁾			
		基準値未満	基準値内	基準値超過	測定不能/不明
井戸水(ボーリング水含む)	18	3	8	7	0
水道水	33	1	24	7	1
井戸水&水道水	4	2	1	1	0
温泉水	71	25	24	18	4
合計	126	31	57	33	5

¹⁾遊離残留塩素濃度は、< 0.4 mg/Lを基準値未満、0.4~1 mg/Lを基準値内、>1 mg/Lを基準値超過とした。モノクロロアミン濃度については、< 3 mg/Lを基準値未満、3~4 mg/Lを基準値内、> 4 mg/Lを基準値超過とした。

表 11-3 大腸菌・大腸菌群陽性となった検体のリスト

サンプル No.	水源	残留塩素濃度 ¹⁾	培地A (CFU/plate)			培地B (CFU/plate)			培地D (CFU/plate)			ECブルー100P 「ニッスイ」		コリラート		デソキシコレート 寒天培地 (CFU/plate)
			大腸菌	大腸菌群	他	大腸菌	大腸菌群	他	大腸菌	大腸菌群	他	大腸菌	大腸菌群	大腸菌	大腸菌群	
E-002	井戸水	基準値未満	0	0	3+	0.5	0.5	3+	0	0	3+	+	+	実施せず		0.5
E-007	温泉水	基準値未満	0	0	0	0	0	1+	0	1.5	0	-	+	実施せず		0
E-018	温泉水	基準値内	0	0.5	1+	0	0	0	0	0	1+	-	-	実施せず		0
E-035	温泉水	基準値未満	0	>4	2+	0.5	>4	1+	2	2	2+	+	+	実施せず		1.5
E-057	温泉水	基準値未満	9	1	3+	9	1.5	3+	実施せず			+	+	実施せず		9
E-063	温泉水	基準値未満	0	0	2+	0	0	1+	実施せず			-	+	実施せず		0
E-064	温泉水	基準値未満	0	1	1+	0	0	0	実施せず			+	+	実施せず		0.5
E-066	温泉水	基準値未満	11.5	0	2+	9.5	0.5	0	実施せず			+	+	実施せず		13
E-070	水道水	基準値未満	0.5	1	3+	0.5	0.5	3+	0	0	3+	実施せず		+	+	0
E-073	温泉水	基準値内	1	1		0.5	0.5		1	1		実施せず		+	+	1.5
E-076	温泉水	基準値内	0	0		0	0		0	0		実施せず		+	+	0
E-080	温泉水	測定不能	0	4		1	4.5		0	1.5		実施せず		+	+	3
E-081	温泉水	測定不能	0	0		0	0		0	0		実施せず		+	測定不能	0
E-082	温泉水	測定不能	0	0		0	0		0	0		実施せず		+	測定不能	0
E-083	温泉水	基準値内	0	0.5		0	0		0	0		実施せず		-	+	1
E-084	水道水	基準値内	0	0		0	0		0	0		実施せず		+	+	0
E-098	温泉水	基準値未満	0.5	0.5		2	3		0	0.5		実施せず		+	+	0.5

¹⁾遊離残留塩素濃度は、< 0.4 mg/Lを基準値未満、0.4~1 mg/Lを基準値内、>1 mg/Lを基準値超過とした。モノクロロアミン濃度については、< 3 mg/Lを基準値未満、3~4 mg/Lを基準値内、> 4 mg/Lを基準値超過とした。

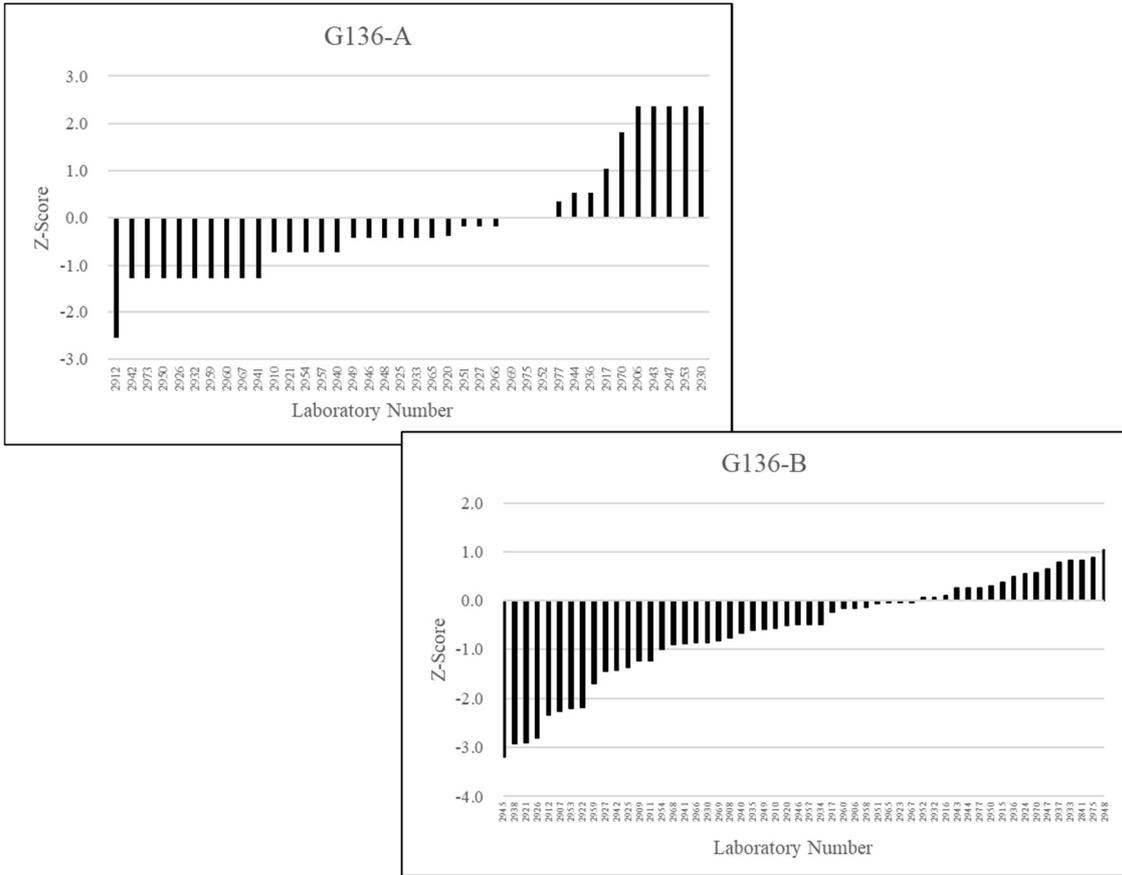


図 12-1 UKHSA 地衛研参加者の Z スコア (G136-A、G136-B)

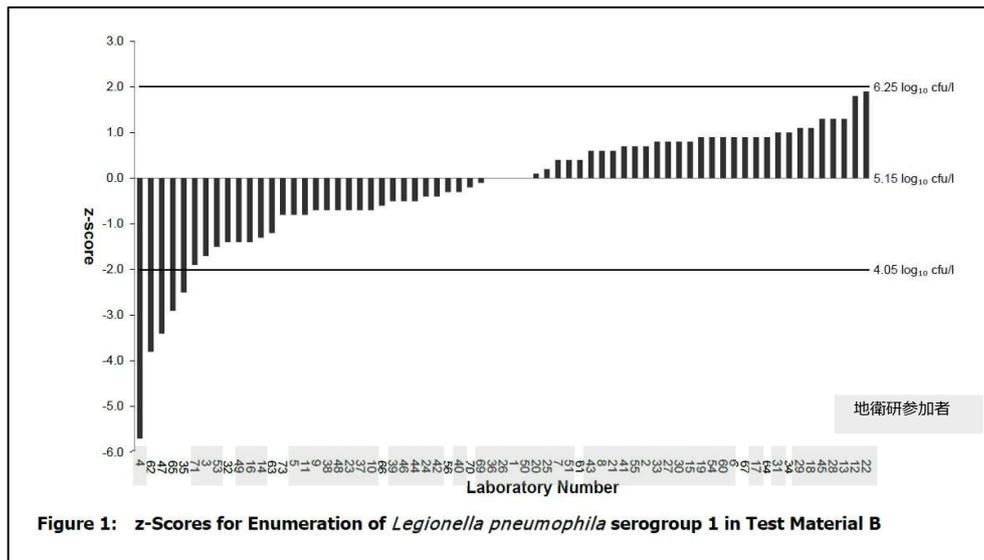
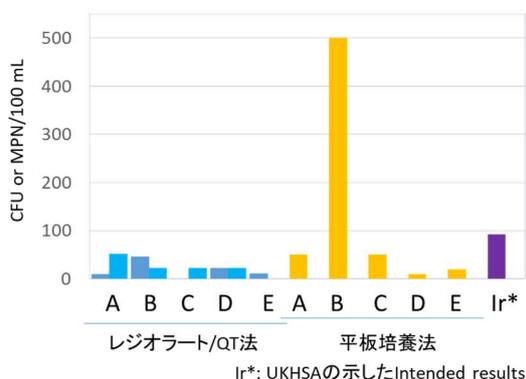


Figure 1: z-Scores for Enumeration of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in Test Material B

図 12-2 FAPAS LG0124-B 全参加者の Z スコアと分布
(Fapas-Water and Environmental Proficiency Test Report より)

A) Sample A



B) Sample B

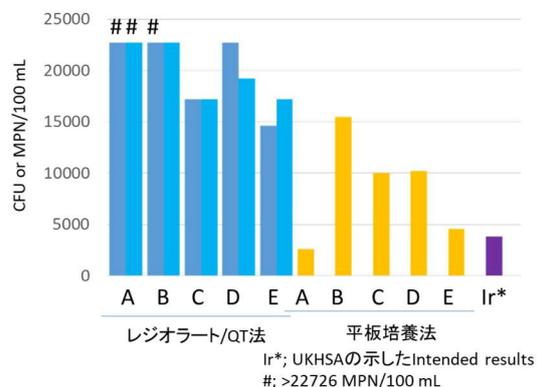


図 13-1 UKHSA 外部精度管理をレジオラートでも受験した 5 施設の結果

表 13-1 冷却塔水におけるレジオラート/QT 法(未処理)、
平板培養法により、レジオネラ属菌を検出した検体数

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート /QT法 (未処理)	陽性	18	19	37
	陰性	1	24	25
	計	19	43	62

表 13-2 冷却塔水におけるレジオラート/QT 法(酸処理)、
平板培養法により、レジオネラ属菌を検出した検体数

		平板培養法		
		検出	不検出	計
レジオラート /QT法 (酸処理)	陽性	12	4	16
	陰性	7	39	46
	計	19	43	62

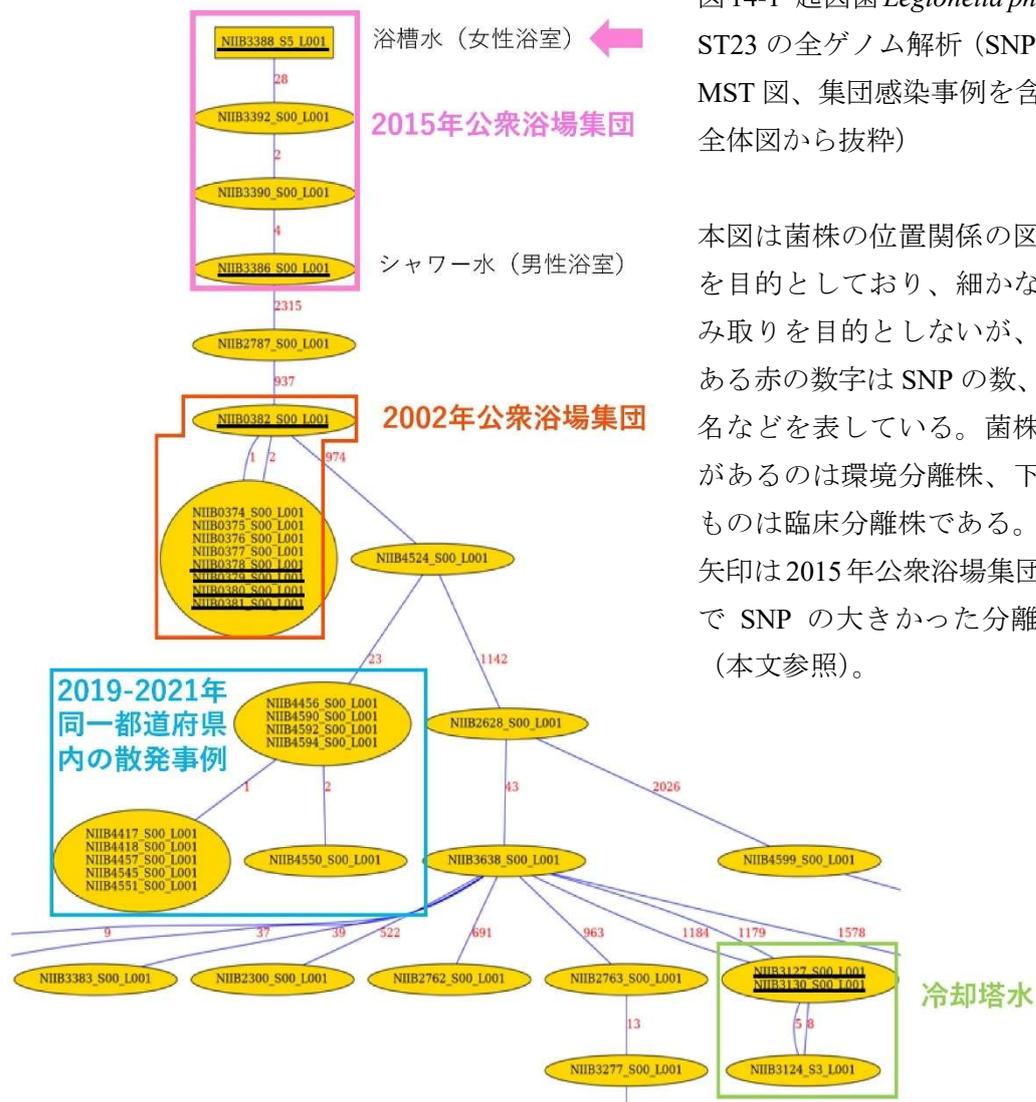
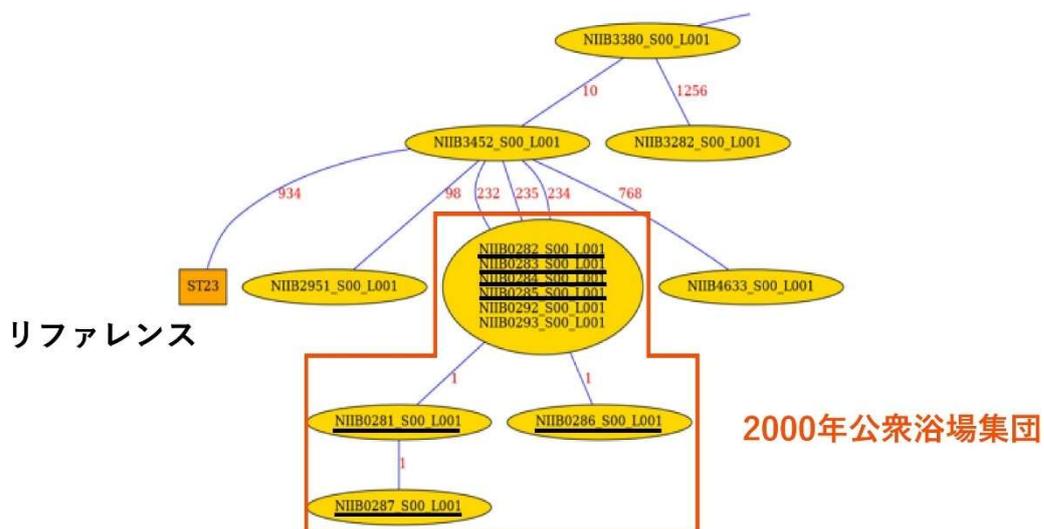


図 14-1 起因菌 *Legionella pneumophila* ST23 の全ゲノム解析 (SNP に基づく MST 図、集団感染事例を含む部分を全体図から抜粋)

本図は菌株の位置関係の図示と把握を目的としており、細かな文字の読み取りを目的としないが、線の横にある赤の数字は SNP の数、黒字は株名などを表している。菌株名に下線があるのは環境分離株、下線のないものは臨床分離株である。一番上の矢印は 2015 年公衆浴場集団感染事例で SNP の大きかった分離株を示す (本文参照)。



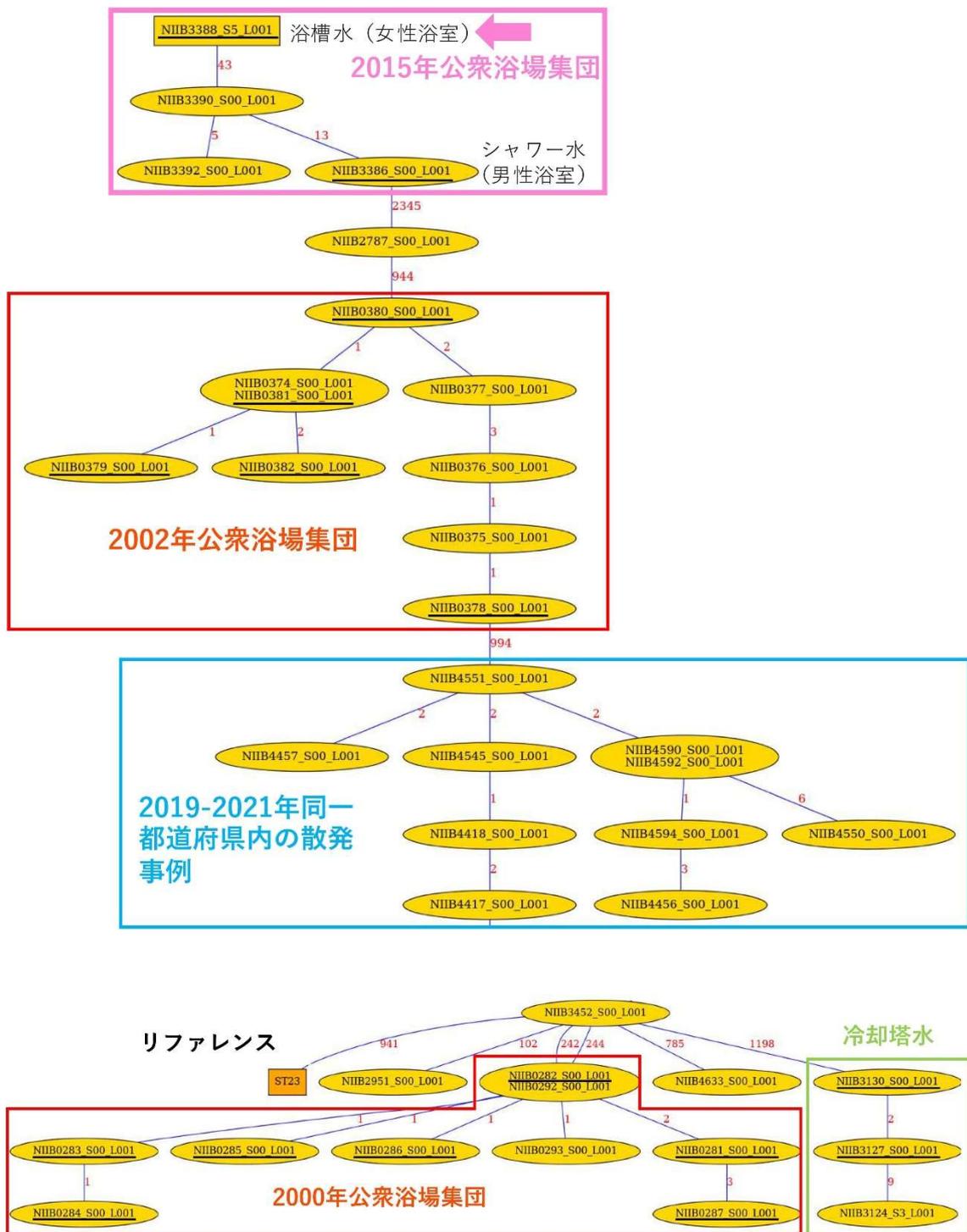
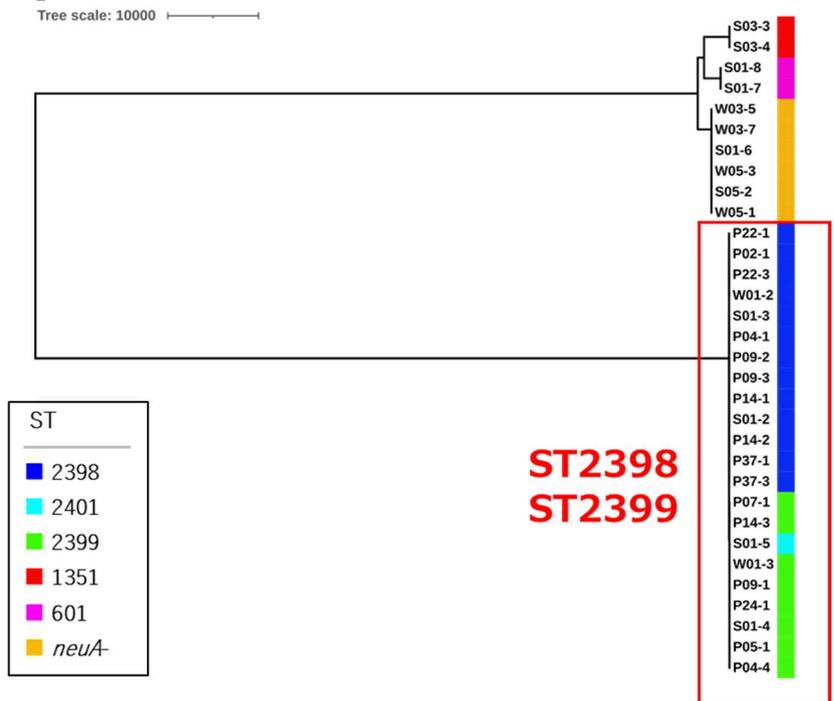


図 14-2 起因菌 *Legionella pneumophila* ST23 の全ゲノム解析 (ME に基づく MST 図、集団感染事例を含む部分を全体図から抜粋) 見方は図 1 と同様である。

(A)



(B)

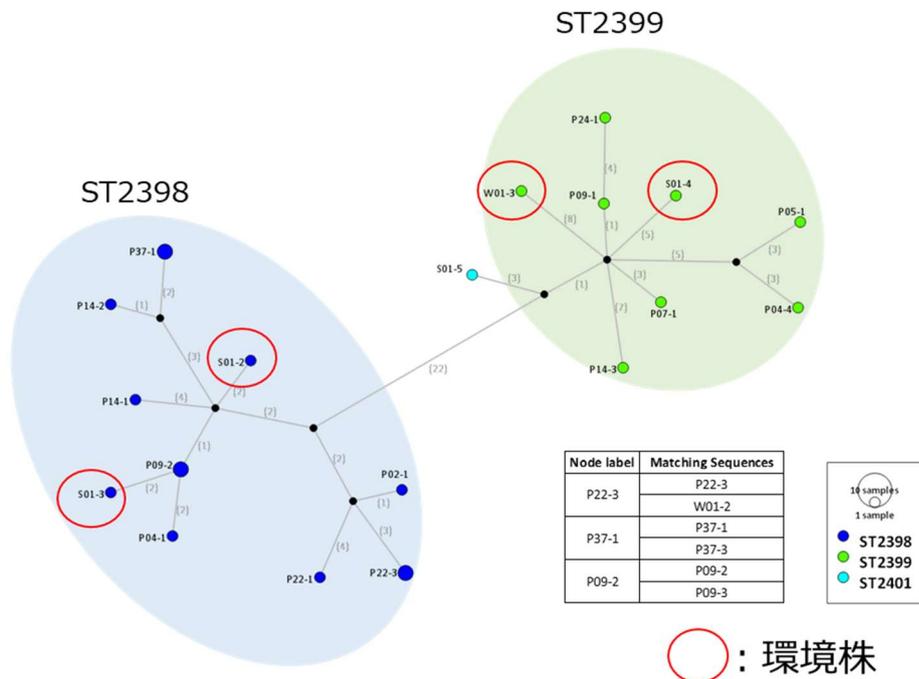


図 15-1 ST2398、ST2399、ST2401 他の全ゲノム解析

A) 32 株の全ゲノム配列による系統樹

B) ST2398 と ST2399 の 2 集団を分別できたハプロタイプネットワーク図

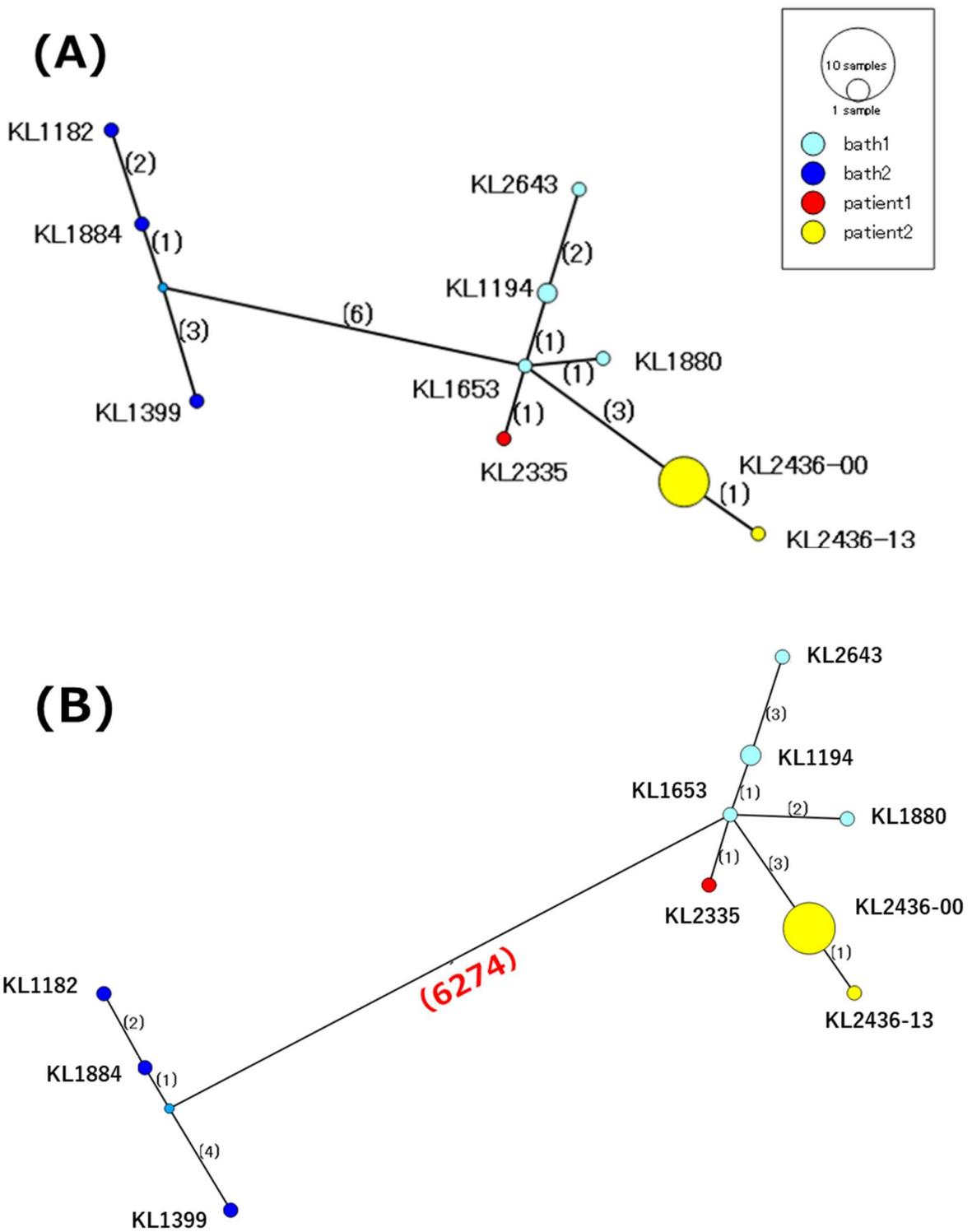


図 15-2 ST354 の 23 株の全ゲノム解析 (ハプロタイプネットワーク図)

A) Gubbins により組み換え領域の除去をした場合

B) Gubbins により組み換え領域の除去をしない場合