

令和3年度 生活衛生関係技術担当者研修会

厚労科研

(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」成果（中間）報告

レジオネラ症とは

レジオネラ・ニューモフィラを代表とするレジオネラ属菌による細菌感染症。

レジオネラ・ニューモフィラによるものが、ほとんどをしめる。

病型には、レジオネラ肺炎と、感冒様のポンティアック熱とがある。

◆レジオネラ肺炎

免疫力の低下した人が、感染2～10日後に発症。

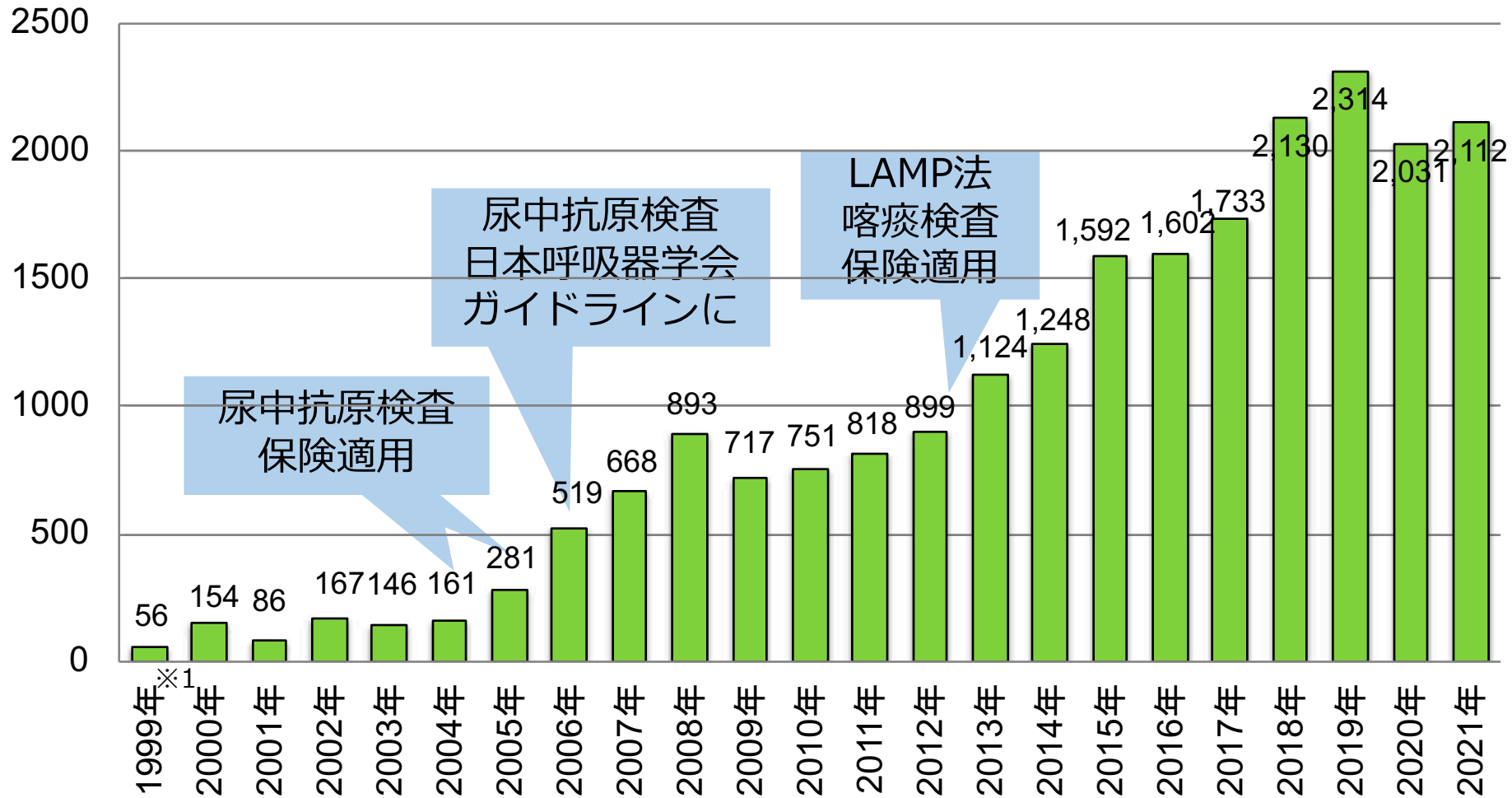
◆ポンティアック熱

菌を多量に吸い込むと、誰でも1～2日で発症する。

年別レジオネラ症報告数

(感染症発生動向調査)

(報告数)

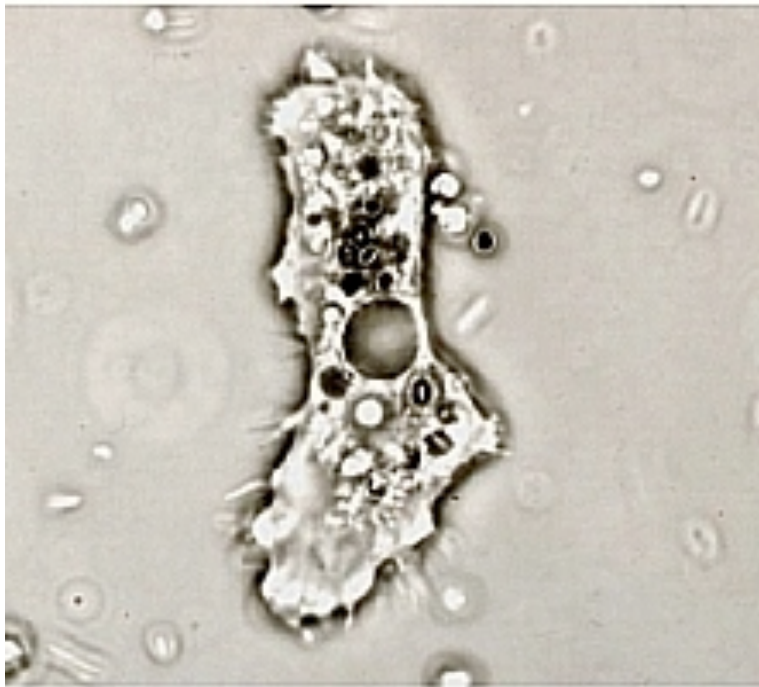


※1：1999年の報告数は4～12月までの数値である。

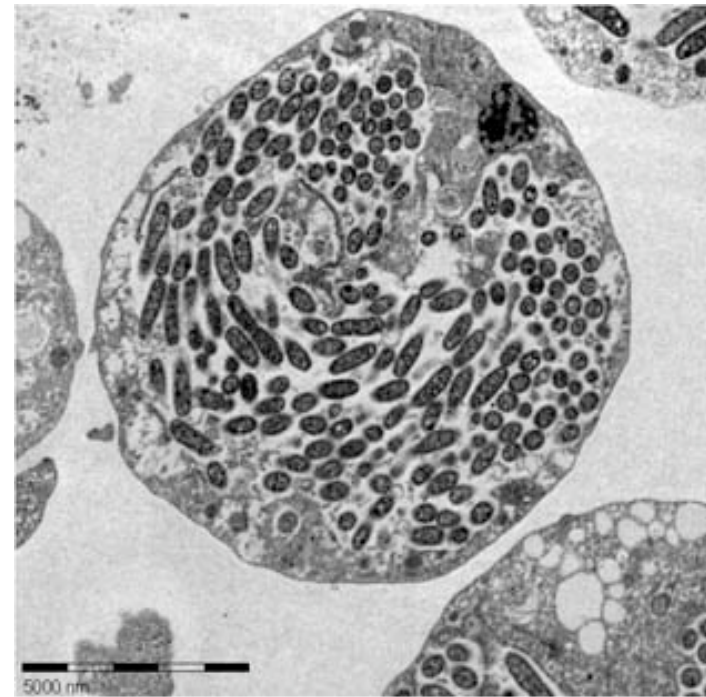
レジオネラ属菌の生態

河川、湖沼、土壌などに生息する環境細菌。

細菌捕食性のアメーバなどの原生動物に寄生し増殖する。



アcantアメーバ



Hartmannella vermiformis
(アメーバの一種) 中で増殖する
レジオネラ・ニューモフィラ

レジオネラ属菌が増殖する“人工”水系

◆冷却塔水



◆シャワー水



◆給湯・給水



◆修景水



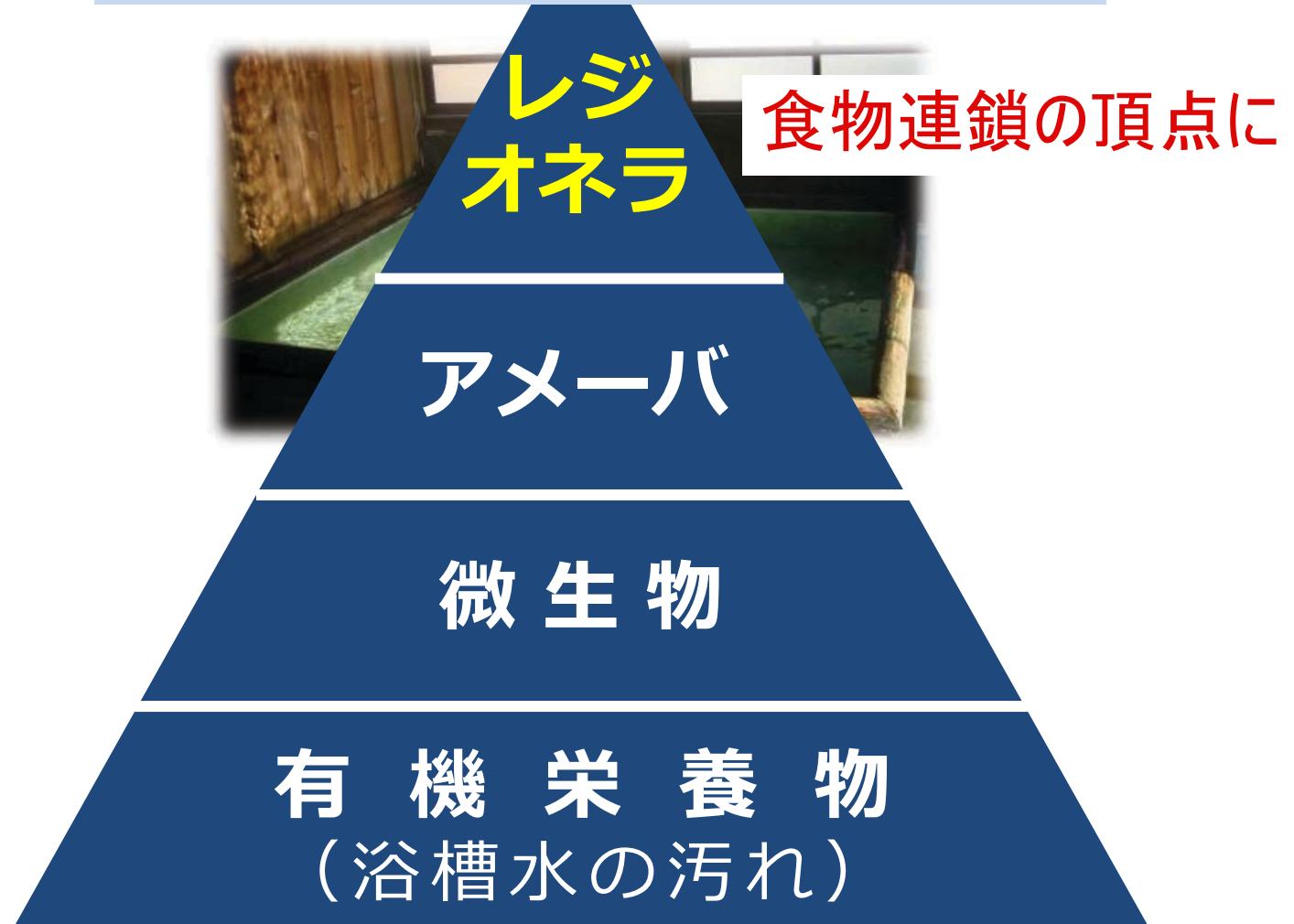
◆浴槽水



生じるエアロゾル（微小な水の粒）に菌体が含まれていると、経気道感染する。

レジオネラはどのようにして増殖するか

浴槽水内の「食物連鎖」



令和元年度～3年度

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

入浴施設の衛生管理

消毒法

の開発

ガイドラインの作成

消毒効果の検証

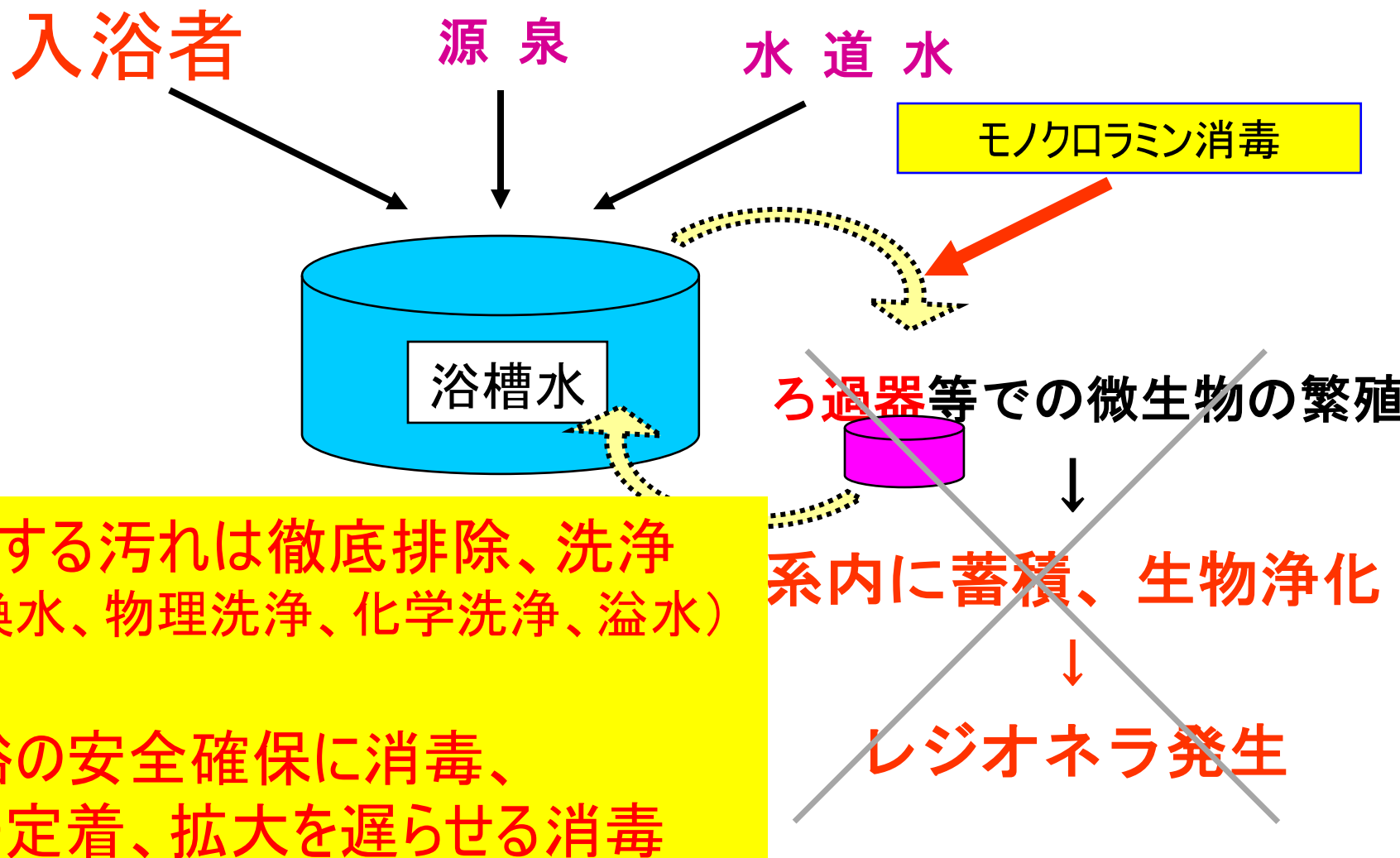
検査法

の開発

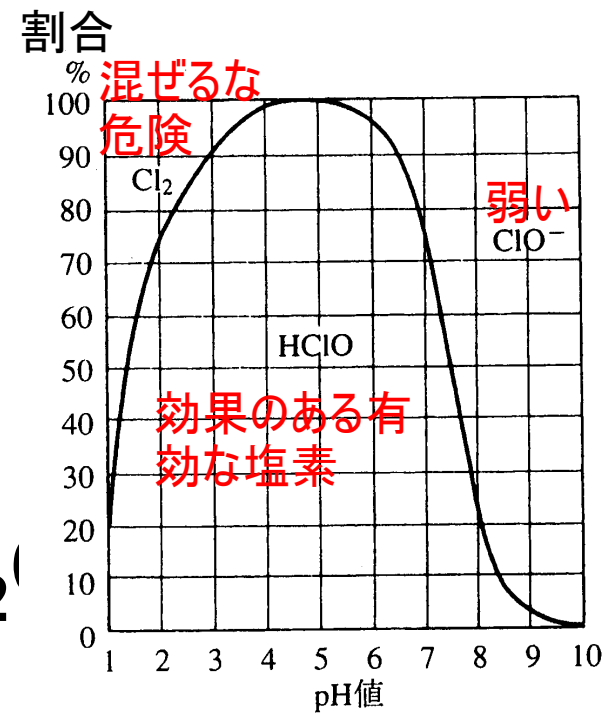
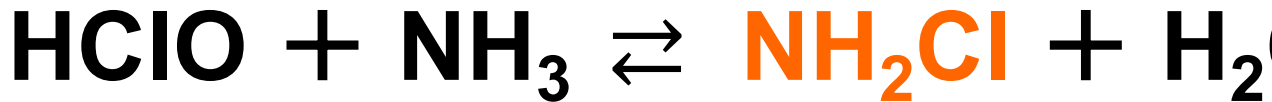
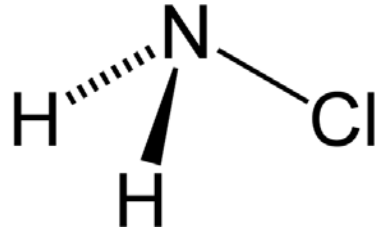
〈精度管理による手法の安定化〉

1. 現場の汚染への対処

浴槽では有機物が蓄積される/ 消毒と洗浄が必要



モノクロラミン消毒に着目



- 高pHでもレジオネラや宿主アメーバに殺菌効果
- プールのような不快な塩素臭が少ない
- 消毒副生成物(トリハロメタン)が少ない
- 欧米の水道にも利用されている

消毒分野の研究成果

1. モノクロラミン消毒

◆高pHでの実績の増

◆pHの範囲拡大、5から10で効果を確認

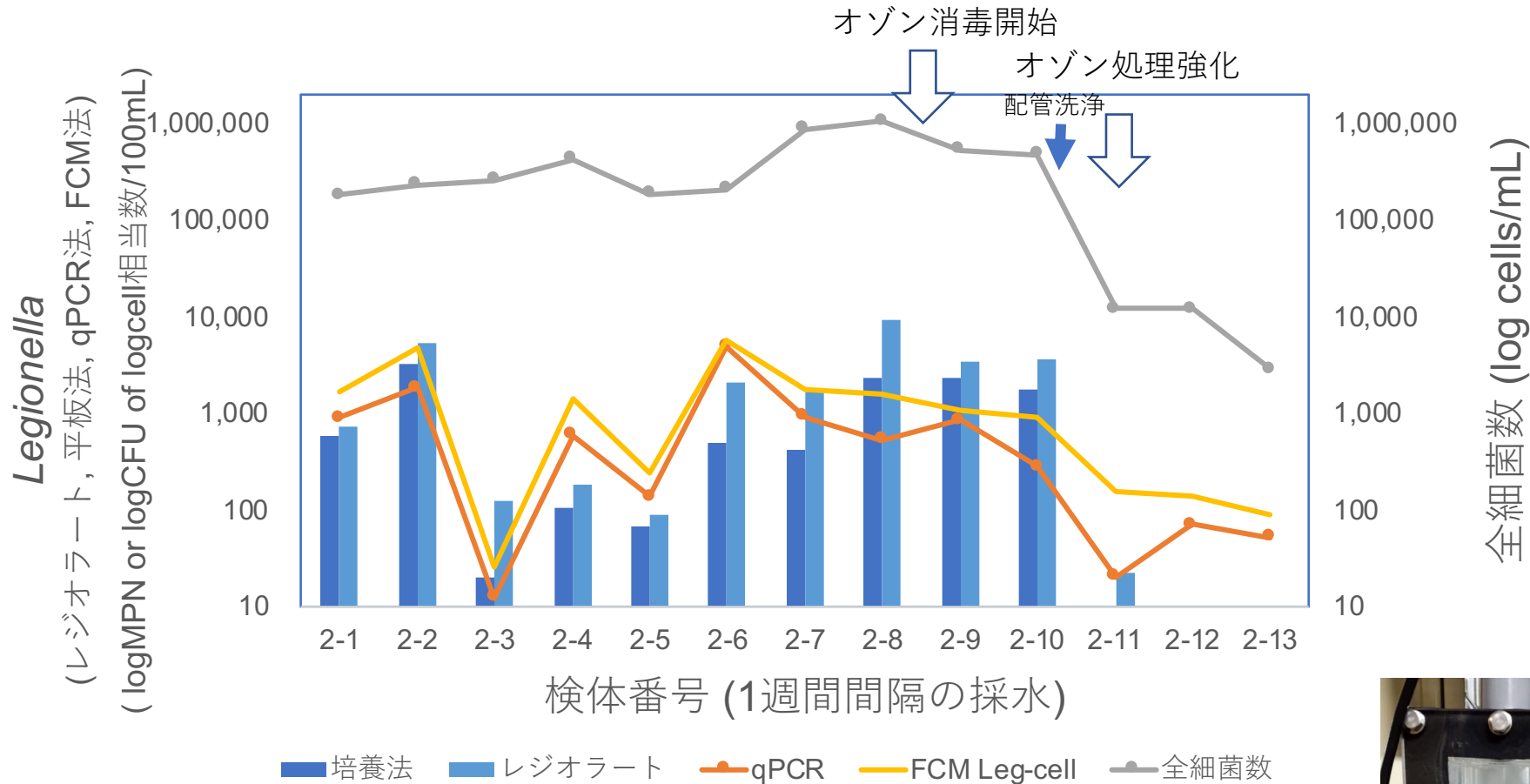
◆連用、高pHで従属栄養細菌数 (*Mycolicibacterium phlei*) の増
→試験管内消毒試験

2. ろ過器を洗浄する抜本対策

→過炭酸ナトリウムによる洗浄、薬剂量低減の改良

→オゾン処理の検討も開始

オゾン消毒によるろ過器排水中のレジオネラ数



電解槽 (オゾン生成中) →



2. 高pH泉入浴施設における モノクロラミン消毒実施例

結果1

4 入浴施設でモノクロラミン消毒を実施

	施設1	施設2	施設3	施設4
濃度維持	機器	手投入	機器	機器
換水頻度	毎日	毎日	週に1回	週に3回
配管消毒時間	1時間	なし	一晚	1時間、一晚
入浴者	100~200人	100~200人	50人	500~1000人
pH	10程度	10程度	10程度	9程度
採水時刻	営業終了後	営業終了後	営業中 (PM)	営業開始前
従属栄養細菌数	増加なし	増加なし	増加なし	増加あり

モノクロラミン消毒で従属栄養細菌数が増加した例（施設4）

検査項目	導入前 (9/10)	第1週 (9/17)	第2週 (9/24)	第3週 (10/1)	第4週 (10/8)	第5週 (10/15)	第6週 (10/22)	第7週 (10/29)
レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
レジオネラ属菌 (ヘアキャッチャー配管ふきとり)	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
アメーバ数 (/ 50 mL)	0	0	0	0	0	0	0	0
大腸菌群 (/ 100 mL)	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
一般細菌数 (CFU/mL)	52	7	20	2	18	5	48	9
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	100	93	4.95×10^5	1.79×10^5	3.93×10^5	4.67×10^3	2.46×10^5	2.75×10^5
pH	9.14	8.90	8.83	9.05	8.98	8.84	8.92	8.50
遊離残留塩素 (mg/L)	0.54	< 0.1	0.10	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
全残留塩素 (mg/L)	0.5	5.1	4.5	5.4	4.6	3.3	4.6	4.6
モノクロラミン (mg/L)	-	4.74	4.40	4.96	4.06	3.07	4.38	4.34
アンモニア態窒素 (mg/L)	-	> 1.10	> 1.10	> 1.10	0.94	> 1.10	> 1.10	> 1.10
高濃度モノクロラミン配管消毒	-	9/18 20 mg/L 1 h	9/25 20 mg/L 1 h	10/2 20 mg/L 1 h	10/9 20 mg/L 一晚	10/16 20 mg/L 一晚	10/23 20 mg/L 一晚	

結果2

TOC 9mg/L程度の源泉を用いた温泉

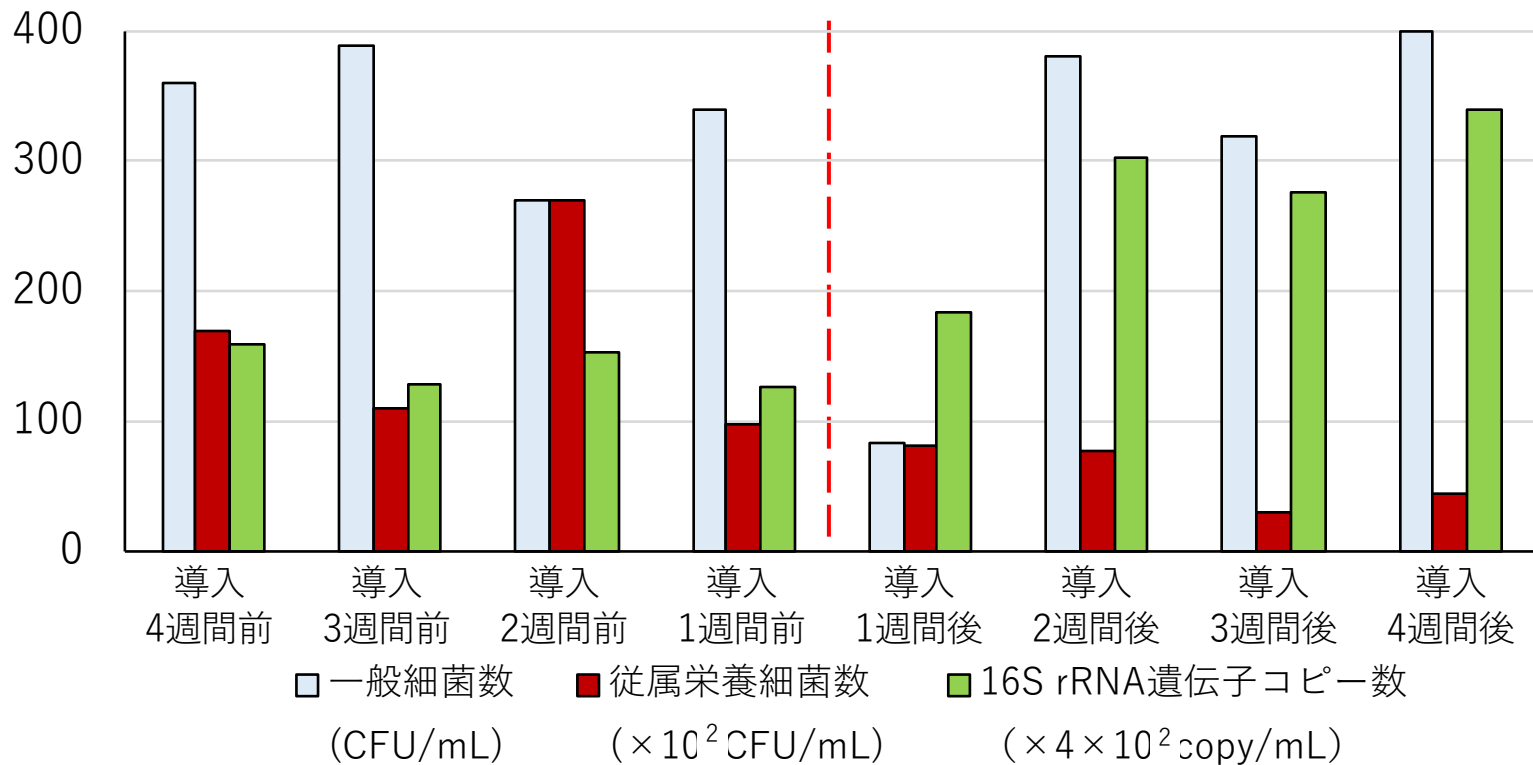
検査項目	導入4週間前	導入3週間前	導入2週間前	導入1週間前	導入1週間後	導入2週間後	導入3週間後	導入4週間後
レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	10未満	10未満	10未満	10未満	10未満	10未満	10未満	10未満
レジオネラ属菌 (ヘアキャッチャー配管 ふきとり)	—	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
アメーバ数 (/ 50 mL)	0	0	0	0	0	0	0	0
大腸菌群 (/ 100 mL)	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
pH	8.1	8.1	8.2	8.1	8.2	8.2	8.2	8.3
遊離残留塩素 (mg/L)	0.1	0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2
全残留塩素 (mg/L)	2.9	2.1	3.2	3.2	3.3	2.9	3.4	3.2
モノクロラミン (mg/L)	—	—	(3.5)	—	3.8	3.1	3.6	3.1

モノクロラミン消毒により安定してレジオネラを抑制することができた。

結果2

TOC 9mg/L程度の源泉を用いた温泉

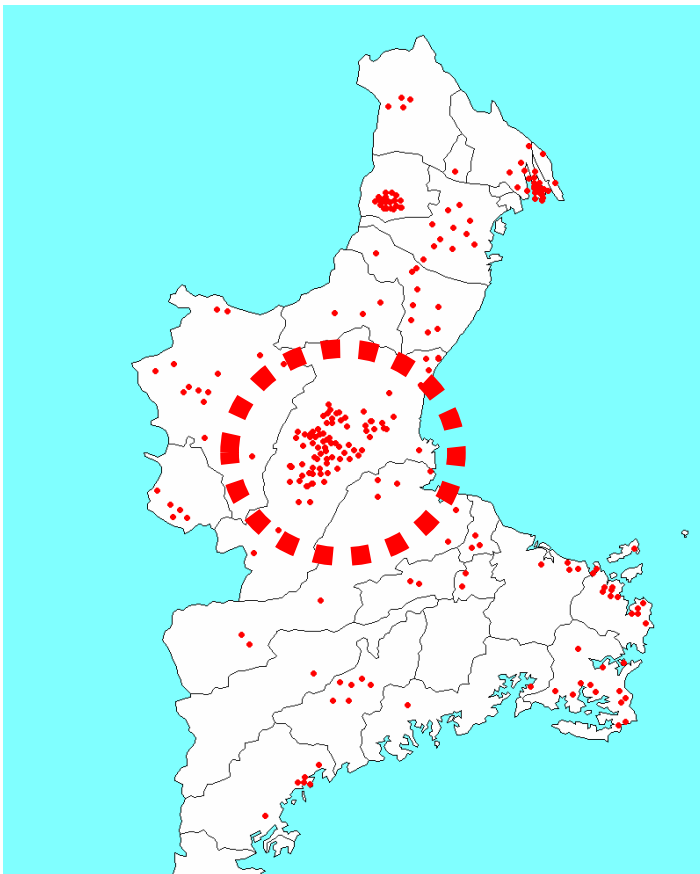
一般細菌数、従属栄養細菌数、16S rRNA遺伝子の変化



モノクロミン消毒により一般細菌数に増減はなく、従属栄養細菌数は減少した。一方で、16S rRNA遺伝子コピー数は増加した。

3. アルカリ泉における モノクロラミン実地試験と温泉水 を用いた試験管内試験

アルカリ泉におけるモノクロアミン実地試験



三重県内の温泉から、**高pH**の特徴を持つ
榑原温泉にある公営の温泉施設に研究協
力を依頼し、**モノクロアミン**の実地検証を
行った。



研究対象温泉(津市榑原町内)

pH = 9.5

泉温(湧出時): 24.6°C

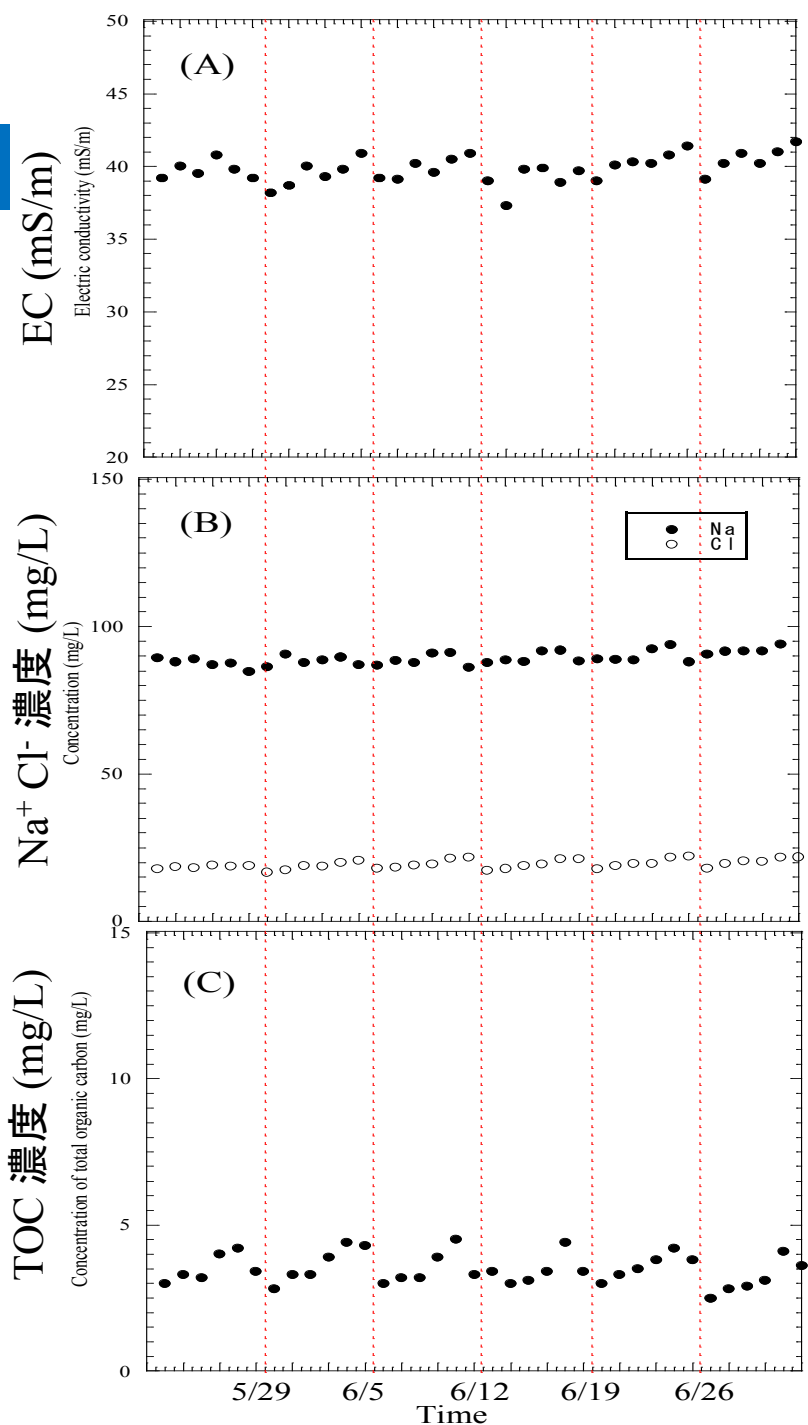
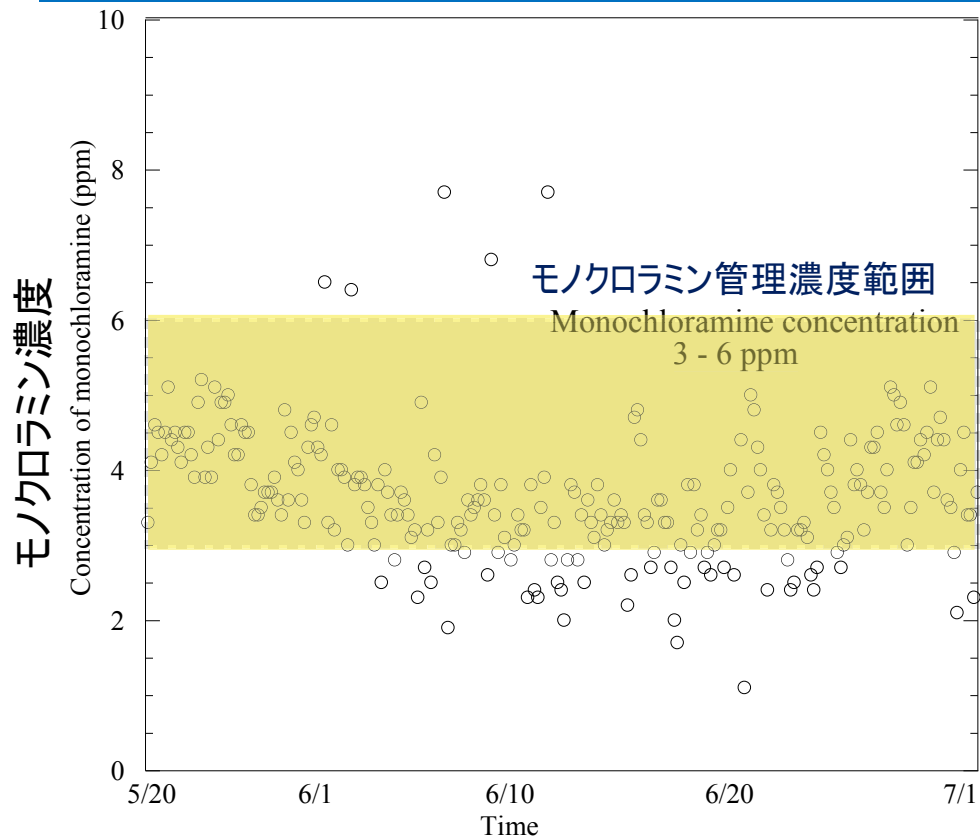
溶存物質総量: 0.34 mg/kg

現状の消毒法:

次亜塩素酸ナトリウムの添加

利用客: 約600人/日前後

浴用水中の理化学的分析結果



- ・浴用水中モノクロラミン濃度は、設定濃度付近で**ほぼ安定していた**。
- ・EC、Na⁺、Cl⁻、TOCの各濃度も、消毒効果の影響は認められず、**ほぼ安定的に推移していた**。

浴用水中の微生物学的分析結果

	レジオネラ属菌	一般細菌	大腸菌群	従属栄養細菌 (CFU/ mL)
1週目 1st week	—	—	—	+ (3,900)
2週目 2nd week	—	—	—	+ (>100,000)
3週目 3rd week	—	—	—	+ (45,700)
4週目 4th week	—	—	—	+ (59,300)
5週目 5th week	—	—	—	+ (21,250)
6週目 6th week	—	—	—	+ (31,400)

※ — : 陰性

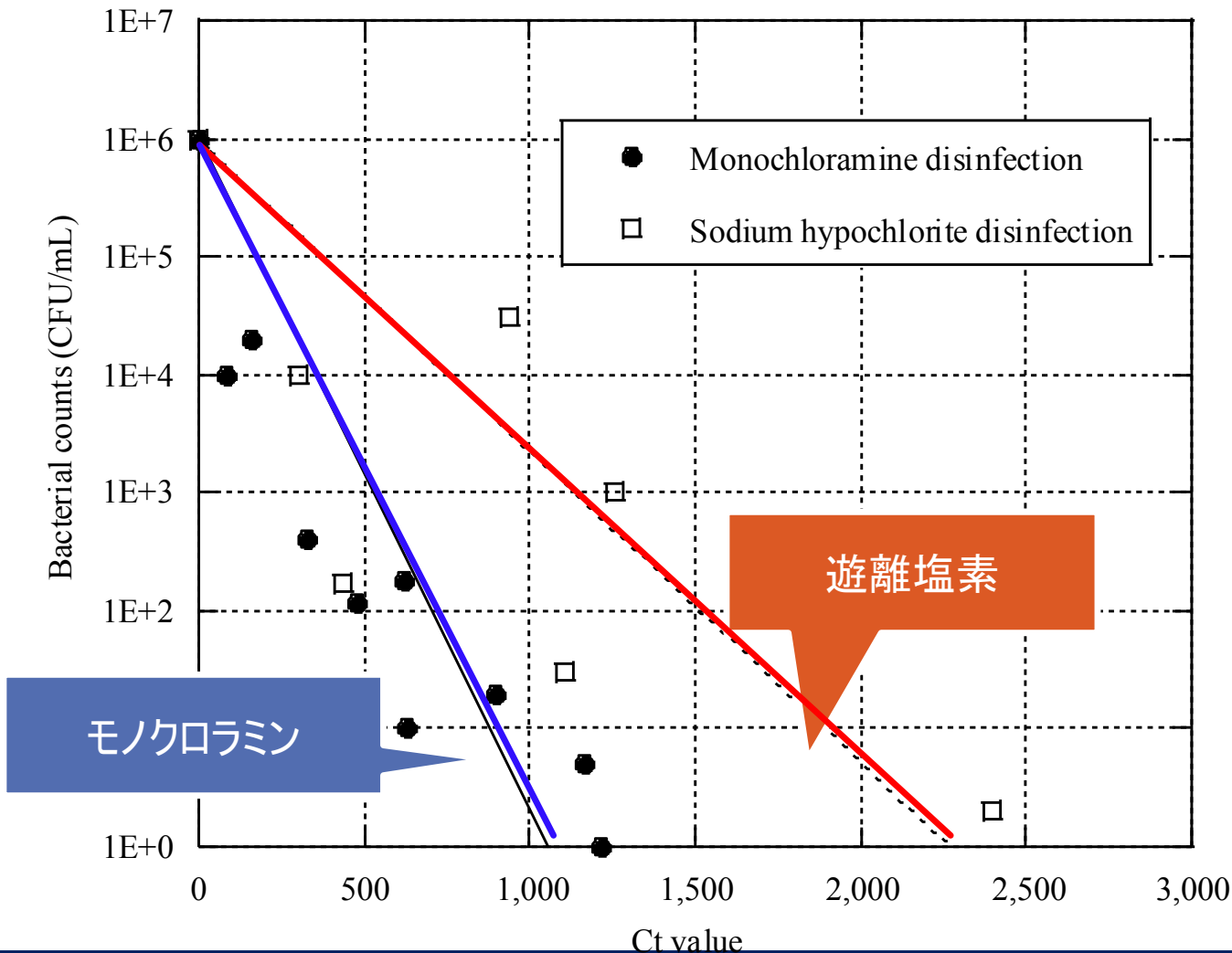
- ・レジオネラ、一般細菌、大腸菌群は、**全てのサンプルで陰性**であった。
- ・従属栄養細菌については、**いずれのサンプルでも陽性**であった。
→ モノクロミンと*M.phlei*を用いた試験管内試験を実施した。

モノクロラミンと*M.phlei*を用いた試験管内試験

	試験液名	pH	EC (S/m)	NH ₄ ⁺ (mg/L)
1	PBS	7.64	1.6	< 0.1
2	アルカリ泉 (実地試験と同一)	9.64	0.039	< 0.1

※ 分析値はいずれも滅菌処理後の検水を分析に供した。

PBSを用いた実験結果

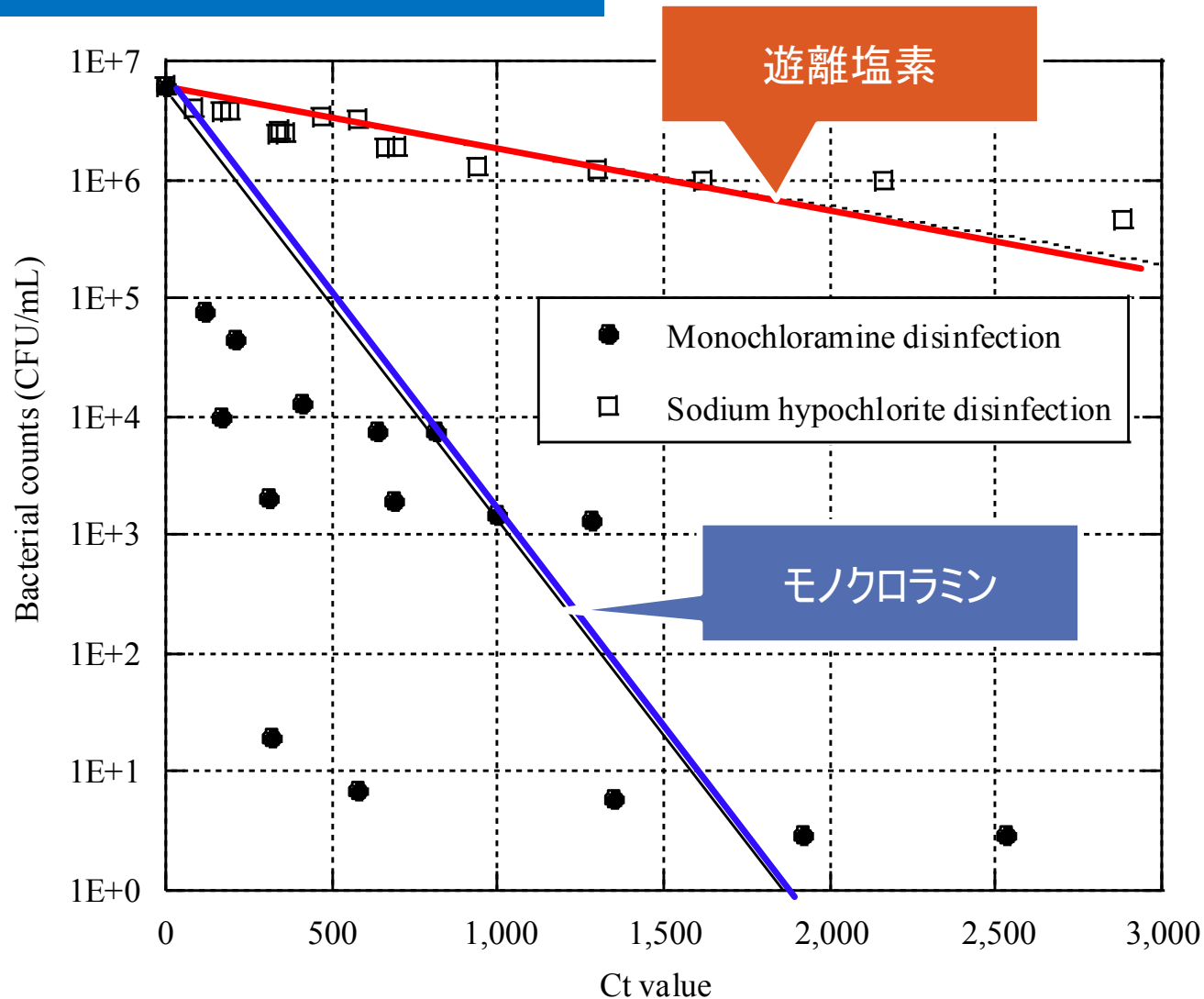


※ Ct値は、それぞれの消毒濃度(実測値)×経過時間とした。

※ 近似曲線は、実験開始時の菌数を切片とし、それぞれの消毒剤のプロットの指数近似により得た(以下、同)。

次亜塩素酸ナトリウムに比べて、同Ct値のモノクロラミンの方が消毒効果が高い傾向が見られた。→先行研究(枝川・藤井ら, 2019)と整合的な傾向であり、***M.phleil***に対するモノクロラミン消毒効果の高さを支持する結果が得られた。

アルカリ泉を用いた実験結果



次亜塩素酸ナトリウムに比べて、同じCt値のモノクロラミンの方が消毒効果が高いことが明確に示された。→**実地検証で従属栄養細菌が増殖した理由は、バイオフィームに起因する可能性が示唆された。**

4. 人工炭酸泉 (pH5) の モノクロラミン消毒

人工炭酸泉（pH5）の浴槽水にモノクロラミン消毒

【目的】

弱酸性(pH5程度)の人工炭酸泉の浴槽水の消毒には遊離塩素消毒が用いられているが、同一施設内の他浴槽でモノクロラミン消毒が行われていると、両薬剤の混入による悪臭(ジクロラミンやトリクロラミン)発生の恐れがある。

両消毒法の併用を避けるために、人工炭酸泉の浴槽水の消毒にもモノクロラミンが使用できるか検討した。



炭酸泉は、炭酸ガス(二酸化炭素)が溶け込んだお湯のこと。

【方法】

1. pH3～8に調整した緩衝液中でモノクロラミンの安定性を比較
2. 人工炭酸泉(3施設、4浴槽)でモノクロラミンの消毒効果を検証

- ・ 炭酸風呂浴槽水をモノクロラミン消毒することで、レジオネラ属菌の増殖だけでなく、従属栄養細菌数の増加を抑えることができた。
- ・ 塩素臭等の悪臭の発生もなかった。
- ・ 弱酸性(pH 5)の人工炭酸泉にもモノクロラミン消毒が適用できた。

pH を 3～8 に調整した緩衝液中でモノクロラミンの安定性を比較

各pH液(リン酸－クエン酸緩衝液にてpH調整)に3ppm相当になるようにモノクロラミンを添加。

添加 1分

塩素形態	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
全塩素	(96.4)*	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
遊離塩素	14.3	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0
モノクロラミン	78.6	92.8	100.0	100.0	100.0	100.0
ジクロラミン	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0

添加 5分

塩素形態	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
全塩素	(96.4)*	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
遊離塩素	25.0	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0
モノクロラミン	67.9	92.8	100.0	100.0	100.0	100.0
ジクロラミン	3.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0

添加 10分

塩素形態	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
全塩素	(92.8)*	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
遊離塩素	17.8	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0
モノクロラミン	67.9	92.8	100.0	100.0	100.0	100.0
ジクロラミン	7.1	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0

一旦生成されたモノクロラミンは緩衝液の pH が 5 以上であれば、安定して維持される。

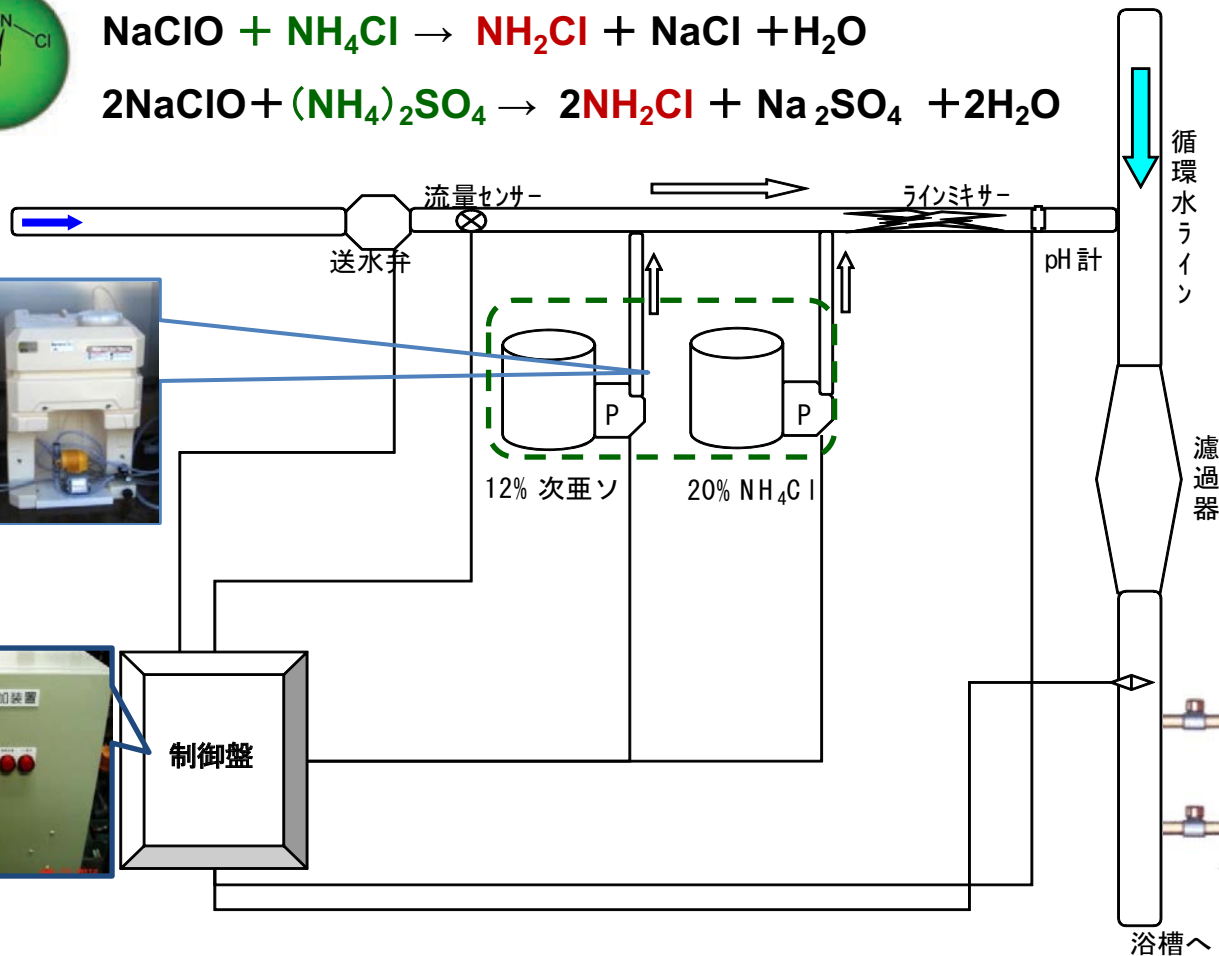
モノクロラミンの生成と人工炭酸泉製造装置の位置関係



水道水タンク
・ポンプ



制御盤



循環式浴槽水に
注入するモノクロ
ラミンは、中性域
の水質の水道水
または井水に、次
亜塩素酸ナトリウ
ムとアンモニウム源
を適正比率で混
合して生成する。

人工炭酸泉製造装置

液化炭酸ガスボンベ

浴槽へ

炭酸風呂(3施設、4浴槽水)におけるモノクロラミンの消毒効果

A施設の炭酸風呂

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

浴槽水のpH値 : 5.6

B施設の炭酸風呂

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

浴槽水のpH値 : 5.1、NT :検査せず

C施設の男子炭酸風呂

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

浴槽水のpH値 : 5.0、NT :検査せず

C施設の女子炭酸風呂

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

浴槽水のpH値 : 5.2、NT :検査せず

5.省力化配管洗浄法の開発

省力化配管洗浄法の開発

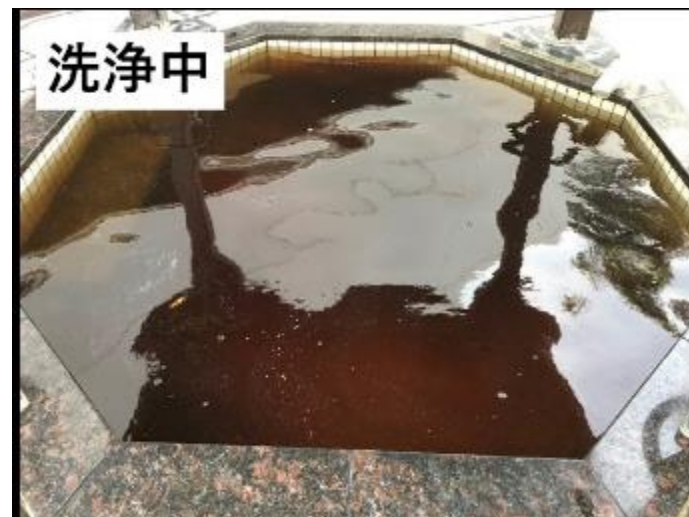
公衆浴場等におけるレジオネラ属菌の汚染を低減するには、消毒だけでなく、**定期的な洗浄**が必要になる。ろ過器や配管はブラシを使った物理的な洗浄ができず、過酸化水素や過炭酸ナトリウムを使用した化学的な洗浄を行っている。しかし、これらの物質は劇物や危険物であり、多量の薬剤を使っでの頻回な洗浄は容易ではなかった。本研究では使用する薬剤量の低減を目的として、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法に着目した。

	従来の配管洗浄法1	従来の配管洗浄法2	省力化配管洗浄法
薬剤（終濃度）	1% 過酸化水素	1% 過炭酸ナトリウム	0.1% 過炭酸ナトリウム +0.2% 還元剤助剤等
2tあたりの薬剤重量	57 L (35%過酸化水素使用時)	20 kg	6 kg
劇物	該当	非該当	非該当
発泡（エアーロック、 すすぎ不良の懸念）	あり	あり	なし
バイオフィルム除去能 (試験管内実験)	72%	61%	77%

省力化配管洗浄法を営業施設(4箇所)において実施

施設、泉質	A：(井水)	B：アルカリ性単純泉	C：ナトリウム・カルシウム-塩化物泉	D：ナトリウム-塩化物泉
消毒方法	モノクロラミン	モノクロラミン	モノクロラミン	遊離塩素
配管洗浄頻度	1回/月	1回/年	数回/年(不定期)	1回/年
高濃度塩素消毒	1回/週	1回/週	1回/週	なし
浴槽(循環系)の大きさ	7m ³	20m ³	5.2m ³	8.3m ³

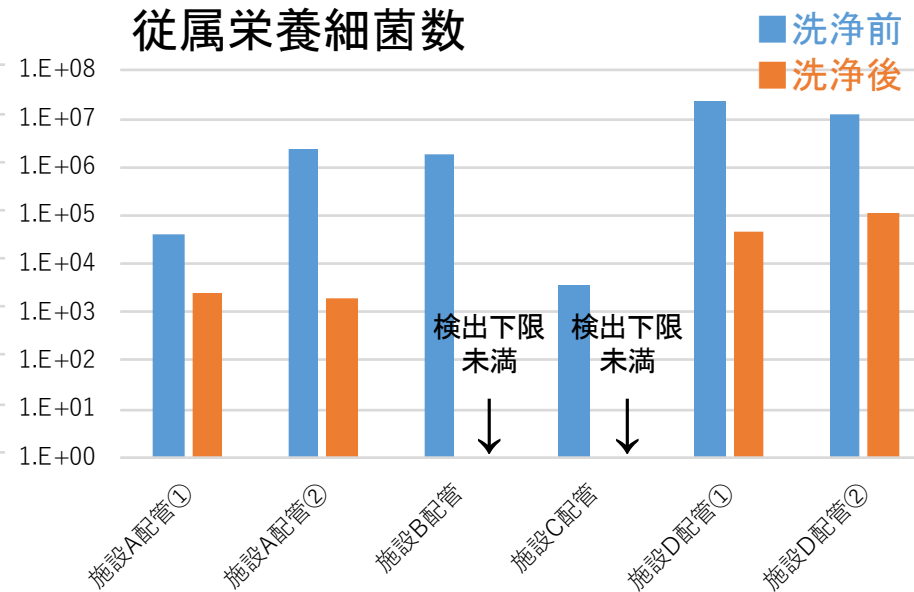
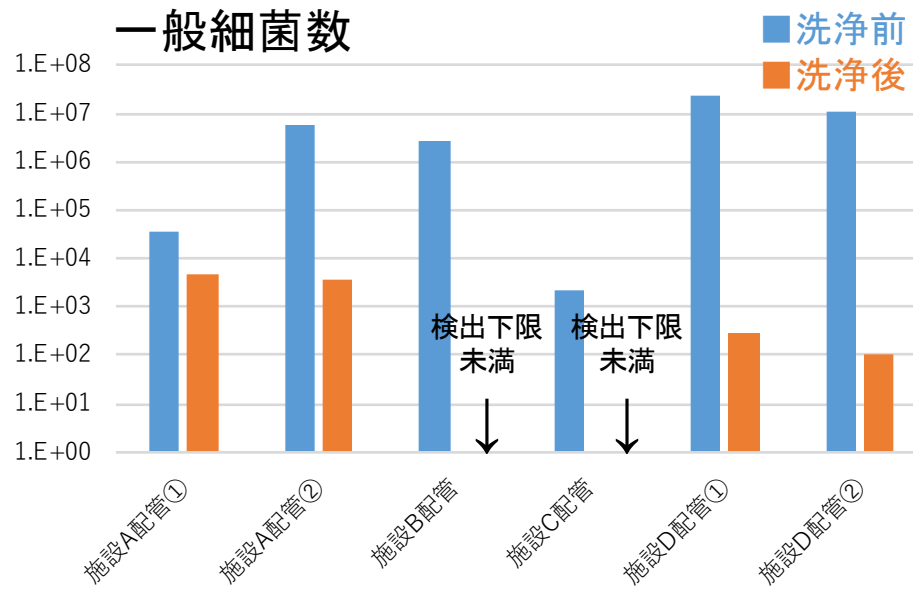
施設Cにおける配管洗浄中の浴槽の様子



省力化配管洗浄法による菌数低減効果

ATP値 (RLU/25cm²)
菌数 (cfu/ 25cm²)

	施設A配管①		施設A配管②		施設B配管		施設C配管		施設D配管①		施設D配管②	
	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後	洗浄前	洗浄後
ATP値	301	63	355	0	9,237	362	0	2	1,856	46	1,637	9
一般細菌数	3.5×10^4	5.0×10^3	5.5×10^6	3.5×10^3	2.7×10^6	検出限界未満	2.2×10^3	検出限界未満	2.4×10^7	3.0×10^2	1.1×10^7	1.0×10^2
従属栄養細菌数	4.1×10^4	2.5×10^3	2.4×10^6	2.0×10^3	1.9×10^6	検出限界未満	3.8×10^3	検出限界未満	2.2×10^7	4.4×10^4	1.2×10^7	1.1×10^5
レジオネラ属菌数	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	$>2.0 \times 10^4$	検出限界未満	$>2.0 \times 10^4$	140



いずれの施設配管においても、概ね90%以上の微生物の除去が可能であった

6. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

1 迅速検査(モバイル qPCR)

モバイル型の qPCR 装置、反応時間約 10 分



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

		平板培養		
		+	-	計
NSG qPCR (Ct 値 ≤ 50)	+	3	33	36
	-	1	32	33
		4	65	69

11 検体は反応阻害あり



DNA を 5 倍(または 10 倍)希釈して再測定
2 検体陽性、9 検体陰性
反応阻害検体なし

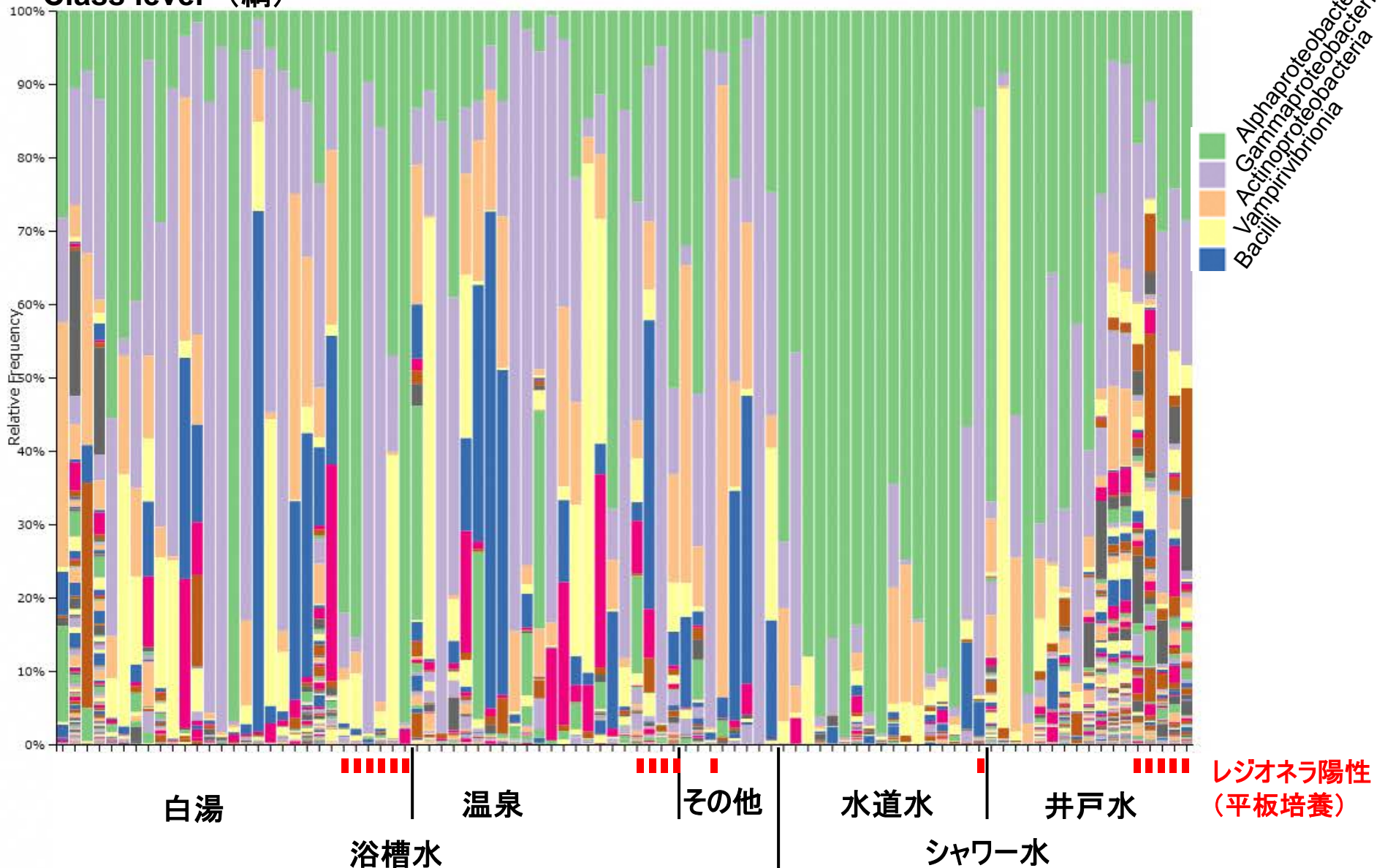
今後の検討課題

阻害がない濃縮(希釈)倍率の設定

プライマーダイマーの確認(Ct 値のカットオフ値の設定)

2 浴槽水、シャワー水の菌叢解析(16S rRNA 遺伝子)

Class level (綱)



シャワー水においては、井戸水を水源とする検体では *Alphaproteobacteria* が少なく、平板培養法におけるレジオネラ属菌の検出率が高い。

3 浴槽水における地域別 Lp1、*lag-1* 検出率

Lp1;レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1 (臨床分離株の大半から分離)
lag-1; LPS 合成関連遺伝子 (臨床分離株の大半が保有)

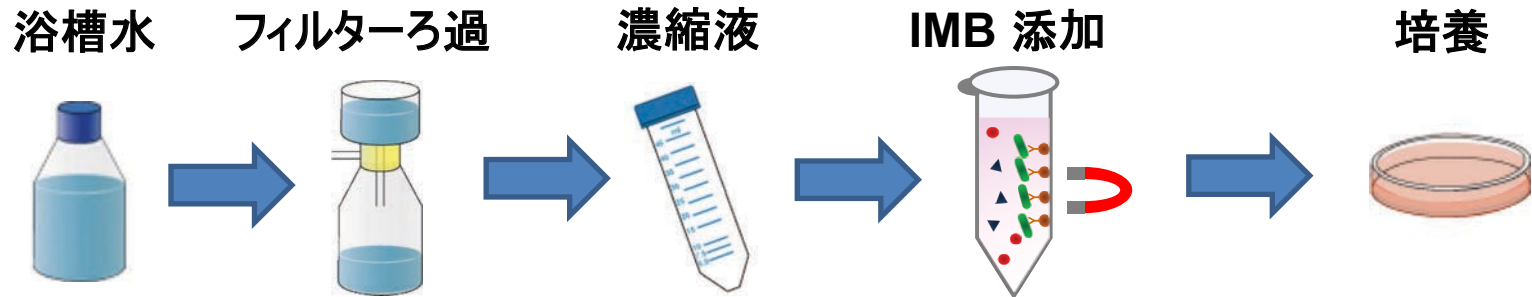
浴槽水のレジオネラ属菌検査 (2016~2020年)

検査 機関	検体数 (延べ)				
	検査数 N	L. spp 陽性 N (%)	Lp1 陽性 N (%)	<i>lag-1</i> 陽性 N (%)	<i>lag-1</i> /Lp1*
A	623	159 (25.5)	26 (4.2)	2 (0.3)	7.7%
B	604	88 (14.6)	35 (5.8)	5 (0.8)	14.3%
C	590	185 (31.4)	67 (11.4)	26 (4.4)	38.8%
D	287	33 (11.5)	7 (2.4)	NT	NT
E	222	103 (46.4)	28 (12.6)	4 (1.8)	14.3%
F	207	40 (19.3)	20 (9.7)	10 (4.8)	50.0%
G	78	19 (24.4)	7 (9.0)	NT	NT
H	4	3 (75.0)	0 (0)	NT	NT

地域によって、Lp1 検出率、*lag-1* 保有率が異なっていた。
地域における患者罹患率との関連について精査する必要がある。

4 Lp1 免疫磁気ビーズ(Lp1-IMB)

臨床分離株の大半を占める Lp1 を選択的に培養・分離する。



		Lp1 陽性(Lp1-IMB)		
		+	-	計
Lp1 陽性 (平板培養)	+	6	9	15
	-	8	204	212
計		14	213	227

平板培養法と Lp1-IMB 法を併用することで、Lp1 の分離率を上げることができる。

感染源調査など、原因菌の分離が必要な際には有用であると考えられる。

7. 新規酵素基質培地キットである レジオラート/QT法の有効性の検討

レジオラート/QT法とは...

*Legionella pneumophila*が特異的に持つ酵素を利用して検出する方法。
基質が酵素により分解されると茶色色素が遊離することを利用して検出する。

検体量を10 mLとすると検出限界は10 MPN/100mLとなる。
欧米等では飲用水、浴槽水、冷却塔水における水質検査に活用されている。

従来の平板培養法と比較した際のメリット、デメリット

メリット	デメリット
<ul style="list-style-type: none">• 検体の処理が非常に簡易 (濃縮工程が不要)• 検水量が10mLと少量• 確定試験が不要• 最確数法による定量検査 → MPN/100mL	<ul style="list-style-type: none">• <i>L. pneumophila</i>のみの検出系となるため、他のレジオネラ属菌は検出できない• 専用のシーラーを要する

レジオラート方法 手技

1

希釈液90mLに
培地を加え
振り混ぜ
溶かす



2

検水10mLを
①に添加する



3

トレイへ
検水を移す



4

シーラーPLUSを
用いてトレイを
密封する



5

7日間
培養する



IDEXX社資料より抜粋



7日間培養後
のトレイ

茶色または濁りが生じたウェル数を数え、
所定の最確数表を用いてMPN値を求める

大ウェル6個中5個、小ウェル90個中6個が陽性
検出菌量 219 MPN/100mL

結果

2019年4月から2021年3月までに各施設に搬入された公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水、冷却塔水等の計309検体を対象とした。各施設においてレジオラート/QT法と平板培養法を実施し、レジオネラ属菌の検出率と検出されるレジオネラ属菌の菌量を比較した。

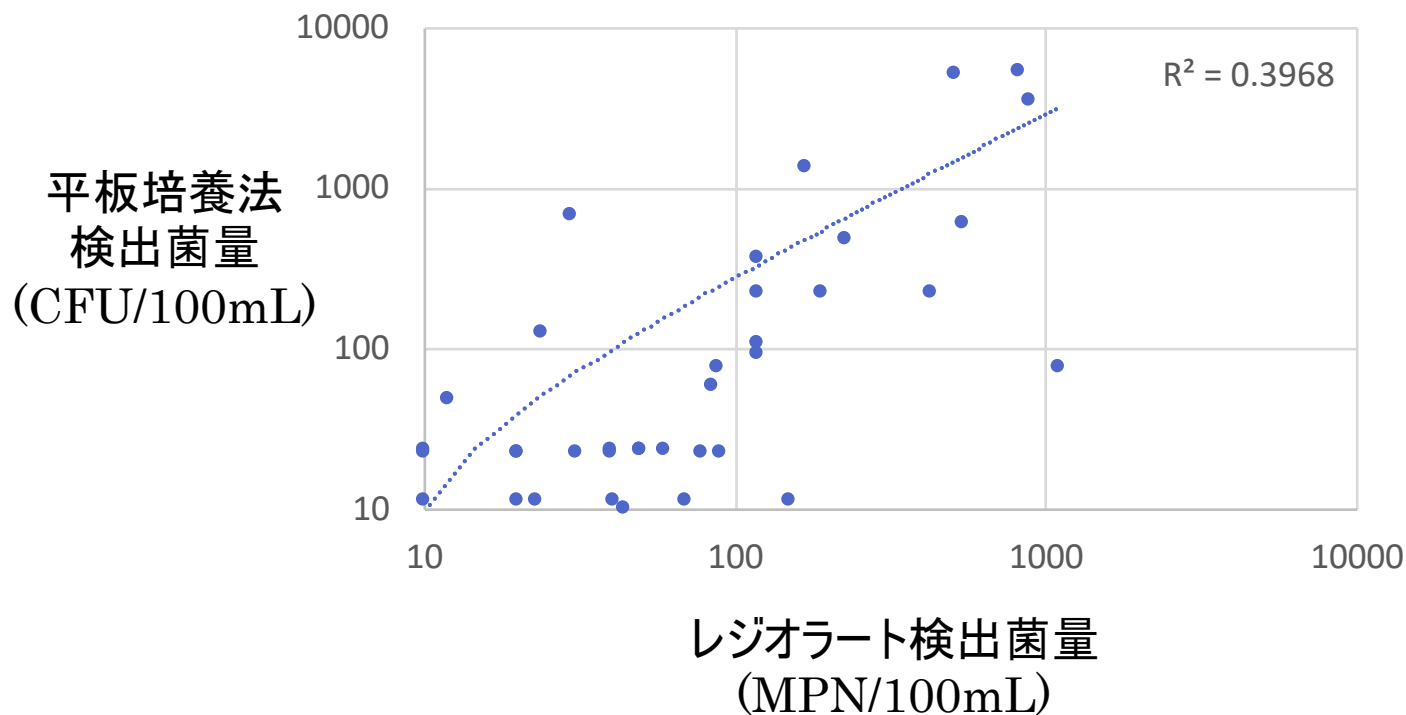
レジオラート/QT法と平板培養法の比較(n=309)

		平板培養法		
		陽性	陰性	計
レジオラート/QT 法	陽性	71	22	93
	陰性	34	182	216
	計	105	204	309

レジオラート/QT法は平板培養法と比較すると、感度67.6 %
特異度89.2 %、結果一致率 81.9 %であった。

陽性検体における菌数の相関

平板培養法とレジオラート/QT法の検出菌量(n=71)



平板培養法とレジオラート/QT法ともに陽性であった71検体について検出菌量を比較したところ、回帰直線の決定計数は $R^2=0.397$ となり、弱い相関が認められた。

まとめ

- 浴槽水を主体に各水検体においてレジオラート/QT法と平板培養法を比較検討したところ、81.9 %と高い一致率が確認できた。
- レジオラート/QT法と平板培養法の結果が不一致であった検体の75 %は、その検出菌量が30 CFU/100mLもしくは30 MPN/100mL未満であった。
- 平板培養法陰性-レジオラート/QT法陽性の不一致であった検体の一部の陽性ウェルから検出された*A. hydrophila*、*B. naejangsanensis*、*P. otitidis*が偽陽性の原因であった。
- *A. hydrophila*については培養後、2-3日程度で発色が見られ、レジオネラ属菌による発色と比較し早いことが確認され、観察により偽陽性を除外できることが示唆された。

偽陽性の起こる検体が確認されたもののその頻度はまれであり、全体の一致率は高く、操作が簡便で判定も容易あることから、レジオラート/QT法は有用な検査法であると考えられる。

8. 浴槽水のレジオネラ属菌検出の
ための検査方法について、
実検体（多様な泉質）を
用いた評価

①大分県の浴場水を用いた標準的検査法*の評価

*公衆浴場における浴槽水等の
レジオネラ属菌検査方法
薬生衛発0919第1号
令和元年9月19日



検水 1200mL

↓ 0.2μmポリカーボネート製フィルター

滅菌水 12mL

↓ 1分間洗い出し
(=濃縮検体)

未処理

熱処理
(50°C20分)

↓
×1、×10、×100希釈
各平板に200μL コンラージ

大分法

検出限界値は
5cfu/100ml

酸処理
(4分or5分)

↓
各平板に200μL
コンラージ

標準的検査法

検出限界値は
10cfu/100ml

熱処理
(50°C20分)

↓
各平板に100μL
コンラージ

非濃縮

↓
未処理

↓
各平板に200μL
コンラージ

検出限界値は
500cfu/100ml

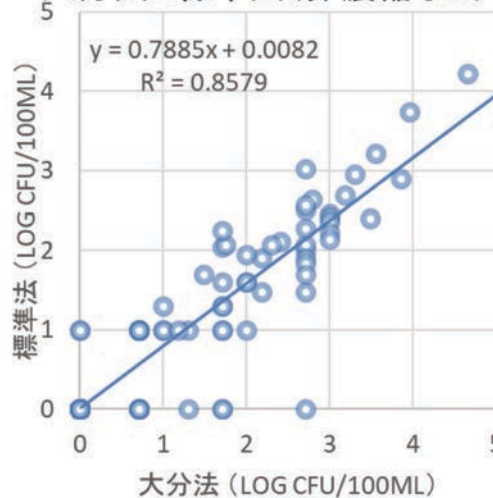
使用培地：WYOα (栄研化学) GVPC (日研生物) MWY (自家製)

①大分県の浴場水を用いた標準的検査法の評価

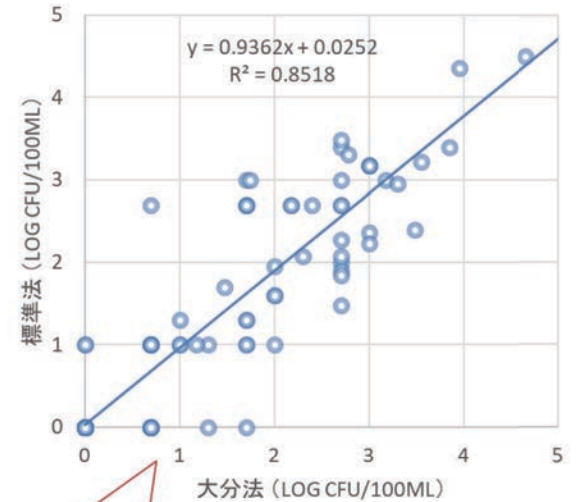
		前処理	希釈段階	平板塗抹量	検出限界 /100mL	使用培地枚数
大分法	濃縮試料	熱処理	1倍、10倍、100倍	各200μL	5cfu	6枚
		未処理	1倍、10倍、100倍	各200μL	5cfu	
標準法	濃縮検体	熱処理	1倍	100μL	10cfu	3枚
		酸処理	1倍(酸処理液で2倍に希釈される)	200μL	10cfu	
	非濃縮検体	1倍	200μL*	500cfu		

*通知に記載されている塗抹量は「100μL」

大分法と標準法(非濃縮なし)



大分法と標準法(非濃縮含む)



5cfu 6検体
20cfu 1検体
50cfu 1検体

		標準法		計
		≥10cfu/100mL	+	
大分法 ≥5cfu/100mL	+	53	8	61
	-	2	80	82
計		55	88	143

「検出不能」1検体を除く

- ◆ 培地枚数が少ない標準法で、培地枚数の多い大分法と同等の結果。
- ◆ 標準法は定期的な水質検査に適した方法。
- ◆ 濃縮試料のみでなく、非濃縮検水の検査も必要。塗抹量は200μLがよい。

②監視現場で使えるパルサー法の手法改良

・フィルターの孔径を0.45 μ mに大きくしてろ過に要する時間を短縮

測定結果(Φ 0.22 μ m)

	パルサー		計	
	+	-		
培養法*	+	10	2	12
	-	2	3	5
計		12	5	17

測定結果(Φ 0.45 μ m)

	パルサー		計	
	+	-		
培養法*	+	10	2	12
	-	4	1	5
計		14	3	17

同じ2検体
5cfu/100mL
50cfu/100mL

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

ろ過に要する時間
 Φ 0.22 μ m:約20分
 Φ 0.45 μ m:約5分

結果は変わらない

保健所衛生課で実践

Φ 0.22 μ m実施結果

No.	泉質	培養法 菌数(/100mL)	パルサー法
1	水道水	85cfu	陰性
2	水道水	85cfu	陰性



Φ 0.45 μ m実施結果

No.	泉質	培養法 菌数(/100mL)	パルサー法
1	水道水	25cfu	陰性
2	水道水	45cfu	陽性

- ◆ フィルターを直接溶菌するので、セルロース製フィルターでよい。
- ◆ 孔径を0.45 μ mにしてもセルロースなので菌が引っかかる。
- ◆ 孔径を0.45 μ mにすることでろ過に要する時間は短縮され、結果も良好。

③レジオラートを用いた定性的試験法の検討

検体	レジオラート定性試験法	平板培養法 (標準法濃縮試料)	
	(検水量10mL)	CFU/100mL	検出菌種
1	+(濁りのみ)	430	Lp及びそれ以外
2	+(濁りのみ)	230	Lp及びそれ以外
3	-	40	Lp及びそれ以外
4	-	120	Lp
5	-	50	Lp及びそれ以外
6	+(茶色のみ)	10	Lp
7	+(濁りのみ)	120	Lp及びそれ以外
8	+(濁りのみ)	120	Lp及びそれ以外
9	-	70	Lp及びそれ以外
10	-	170	Lp
11	-	10	Lp及びそれ以外
12	+(濁りのみ)	90	Lp

[検水※10mL + 40mLレジオラート溶液(1包80mLに溶解) = 計50mL]
 ベントキャップ付フラスコ(小250mL)に入れ、36°Cで7日間培養。
 ※50°Cで20分間加熱

10cfu 3検体
 20cfu 1検体

	レジオラート定性法		計	
	+	-		
標準法	+	11	4	15
≥10cfu/100mL	-	2	41	43
計	13	45	58	



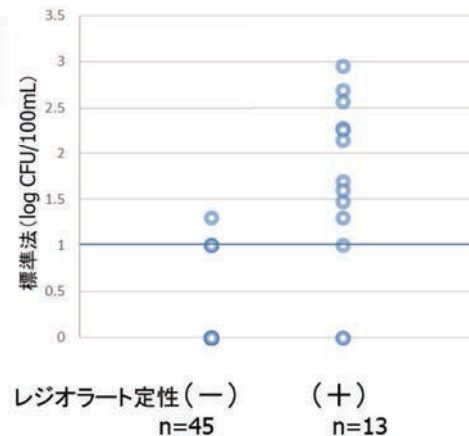
39°C培養↑ ↓36°C培養

検体	レジオラート定性試験法		レジオラート/QT法	平板培養法(標準法濃縮試料)		
	未加熱	検出菌種	加熱	検出菌種		
B9	+	non-LG	+	Lp6	223	490
A8	+	non-LG	+	LpUT	35	190
A18	+	non-LG	+	LpUT	74	180
B7	+	non-LG	+	Lp6	146	140
A5	+	LpUT	+	LpUT	23	50
A17	-	N.D.	+	Lp6	<10	20
B1	+	non-LG	+	Lp3	47	10
B2	-	N.D.	-	N.D.	<10	10
B6	-	N.D.	-	N.D.	<10	10
C7	+	non-LG	+	non-LG	23	<10
A12	-	N.D.	-	N.D.	<10	<10
A13	-	N.D.	-	N.D.	<10	<10
A14	-	N.D.	-	N.D.	<10	<10
A15	-	N.D.	-	N.D.	<10	<10
A16	-	N.D.	-	N.D.	<10	<10

Lp: *L.pneumophila* non-LG: レジオネラでない N.D.: 検出せず

レジオラート培養液からレジオネラを検出せず

加熱することで
 夾雑菌減少



30CFU/100mL以上は全て(+)

◆ 検水を熱処理し、培養温度を36°Cに下げることによって定性法が可能となった。

9. 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

◎携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化

【フローサイトメトリー法】

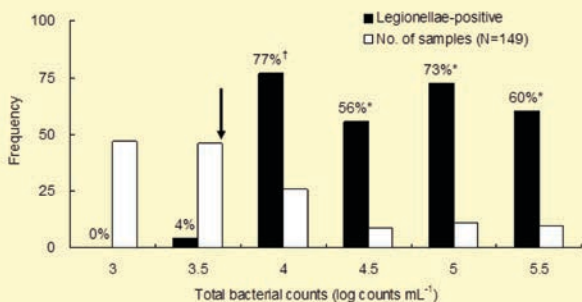


図 フローサイトメトリー法の消毒効果判定閾値によるレジオネラ汚染率の変化 (Taguriら, 2011)

【技術の概要】

○消毒効果判定

レジオネラ培養法の定性結果との高い一致率

感度93.3%、特異度95.1%、有効性94.7%

○レジオネラニューモフィラの特異検出

培養法の定量値との高い相関

$$(y = 1.3616x + 0.838, R^2 = 0.8884)$$

技術
検証

○試薬と技術研修

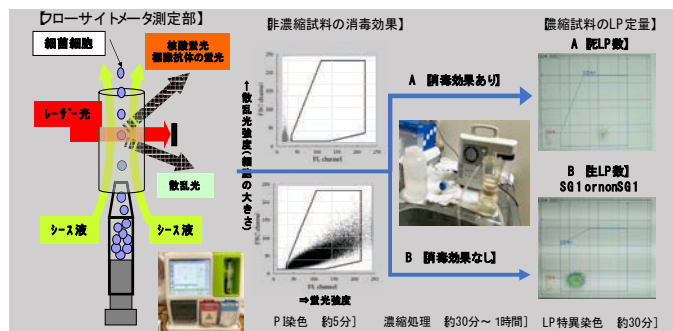
- ・模擬試料の作製方法の検討
- ・標準作業書作成と技術研修

○検査法の有効性検証

- ・4研究機関(地研、民間)
- ・300検体程度

○消毒効果判定方法

- ・モノクロアミン、オゾン等



フローサイトメトリー法の概念図

目標

検査法の標準化と普及

フローサイトメトリー法による実施研究所ごとの 消毒効果判定の感度と特異度の比較

消毒効果判定の閾値： <1000 cells/mL, 培養検査陰性： <10 CFU/100mL

	遊離塩素消毒				モノクロラミン消毒			
	感度	特異度	有効性	試験数	感度	特異度	有効性	試験数
A研究所	96.9%	73.8%	81.7%	93	—	67.9%	67.9%	28
B研究所	66.7%	81.8%	72.4%	29				
C研究所	91.7%	95.3%	94.5%	55	100.0%	100.0%	100.0%	6
D研究所	55.6%	75.3%	73.3%	90				
全体	83.1%	79.6%	80.5%	267	100.0%	72.7%	73.5%	34

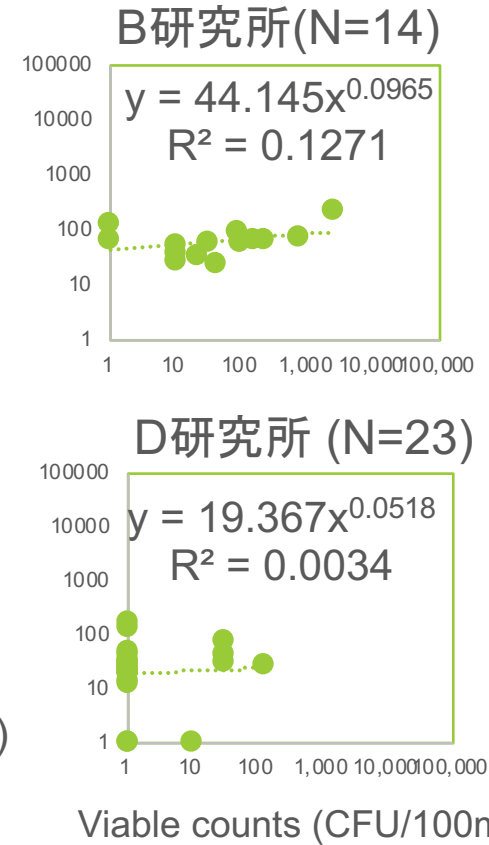
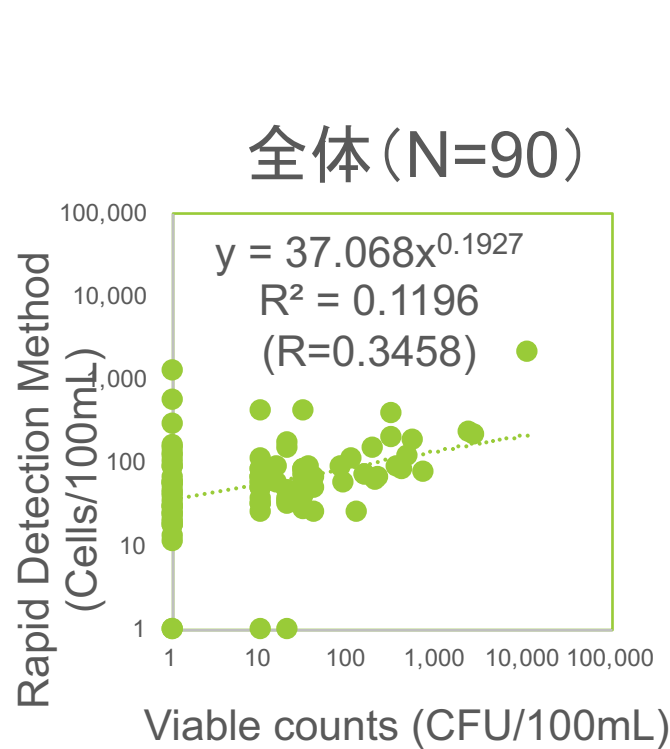
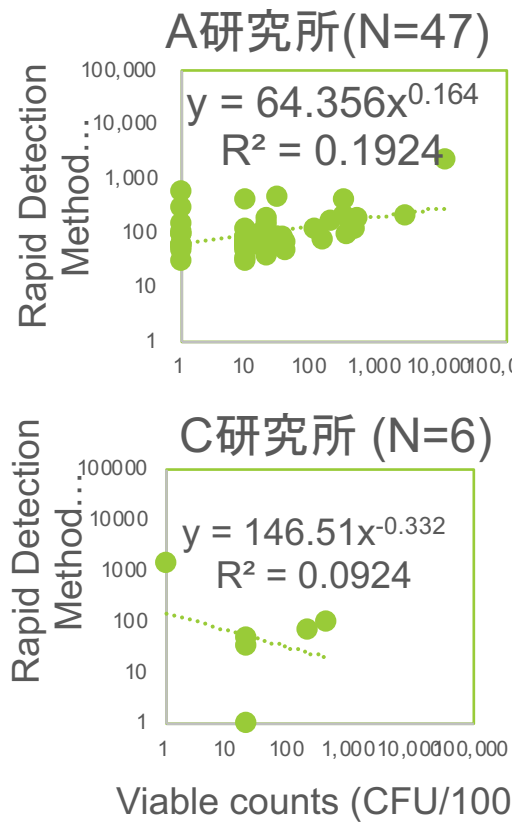
フローサイトメトリー法による実施研究所ごとの レジオネラ特異染色の回収率の比較

Legionella pneumophila NIIB0058を使った模擬試料と標準作業書を使用

	10^5 (CFU/mL)	10^4 (CFU/mL)	10^3 (CFU/mL)
A研究所	99.9%	108.3%	119.6%
B研究所	141.1%	69.1%	82.3%
C研究所	125.1%	90.3%	252.0%
D研究所	156.9%	78.8%	90.7%
全体	130.8%	86.6%	136.1%

培養法とフローサイトメトリー法のレジオネラ菌数の相関

実サンプルのうちフローサイトメトリー法で消毒効果が認められなかった検体を解析



フローサイトメトリー法のまとめ

◆ 消毒効果判定法

- ◆ 研究所により特異度と感度に差が認められた
 - ◆ 偽陰性は作業者の熟練性と器差の影響が考えられた
 - ◆ 偽陽性は水風呂やタンク水に多く認められた
 - ◆ 培養陰性でもレジオラート陽性例があった
- ◆ モノクロラミン消毒での適用可能性が示唆された
 - ◆ 偽陽性では *Mycolicibacterium phlei* が検出された

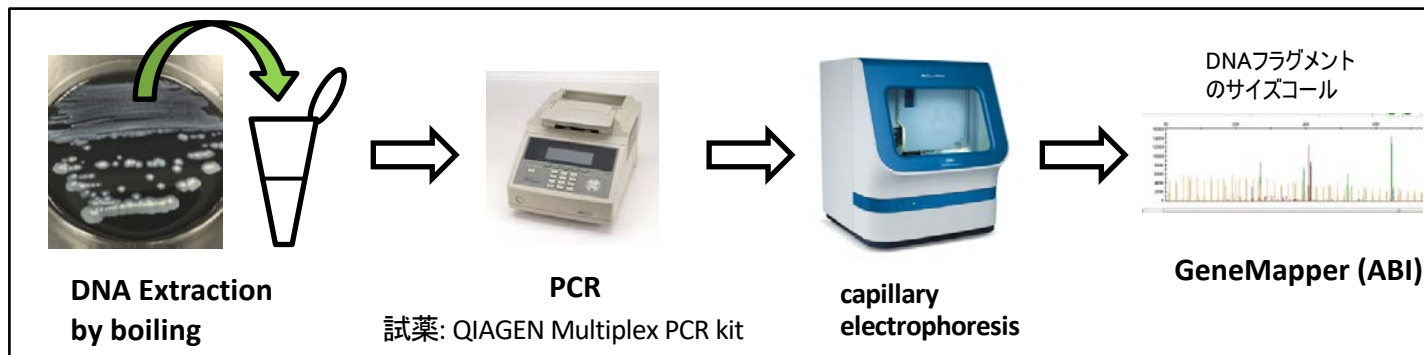
◆ レジオネラ特異染色法

- ◆ 標準作業書と模擬試料を使った回収率は80～130%と安定
- ◆ 培養法の定量値と比べて相関は認められなかった
 - ◆ FCM低値はサンプルに含まれる有機物等の影響（前処理追加で改善された）

10. *L. pneumophila*のMLVA
タイピングの確立と
ゲノム分子疫学との比較解析

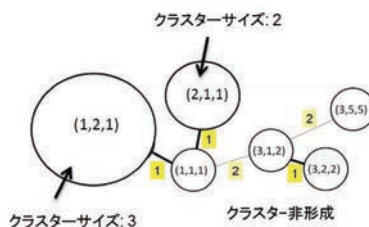
MLVA typing

ゲノム上の特定の領域の反復配列数による型別



MLVAの利点

- 迅速性
- 利便性
- 多検体の比較が容易



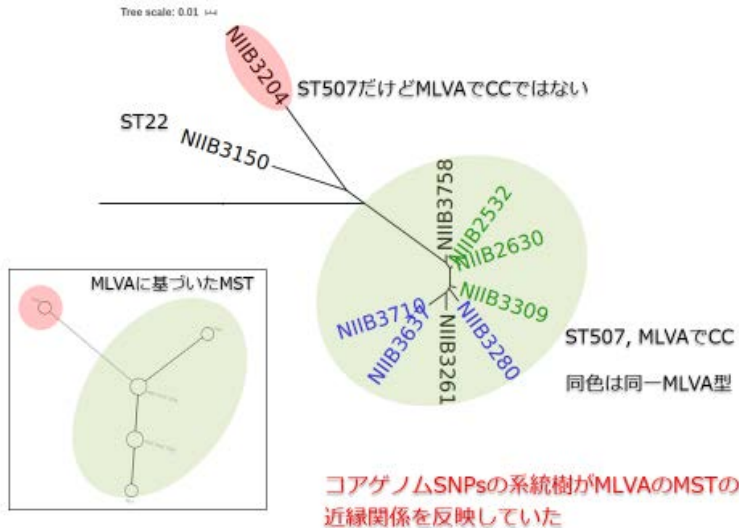
MLVA-12orsay

PCR-A	PCR-B	PCR-C
Lpms01-NED (45bp)	Lpms03-VIC (96bp)	Lpms38-NED (8bp)
Lpms31-FAM (45bp)	Lpms13-NED (24bp)	Lpms39-NED (6bp)
Lpms33-VIC (125bp)	Lpms19-PET (21bp)	Lpms19-PET (6bp)
Lpms35-PET (18bp)	Lpms35-FAM (125bp)	Lpms35-FAM (6bp)

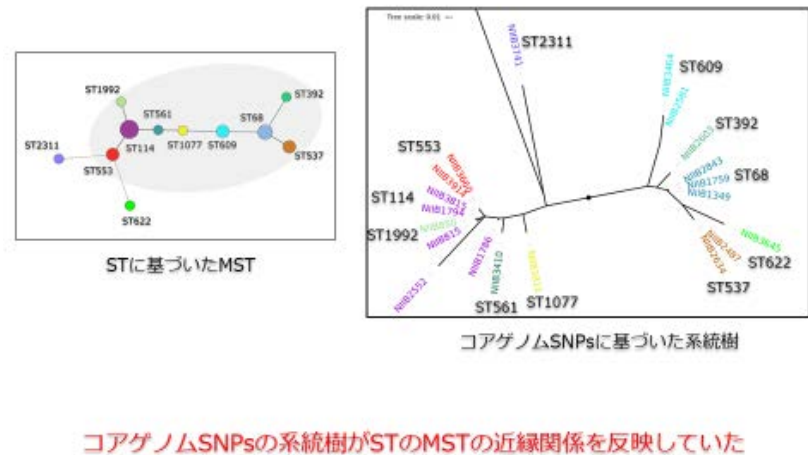
遺伝子型別法としてのMLVAを立ち上げた

- 分子疫学的手法としてのMLVAとSBTは全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられる。MLVAを菌株のスクリーニング（SBTの代替的）に用いることは、有用である。

【例 1】 ST型が一致でMLVA型が異なる例 ST507



【例 2】 MLVA型が一致でST型が異なる例 (20株)

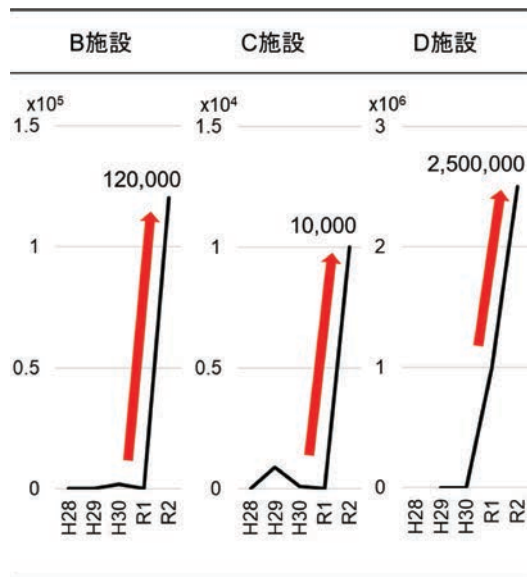


- リピート領域が存在しているがprimerのミスマッチにより増幅されないMLVA領域が存在していることが明らかになった。
(Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31)

→ primerを変えることで大きく改善することが明らかになった。

施設の衛生管理におけるMLVAの活用（菌の定着性を調べる）

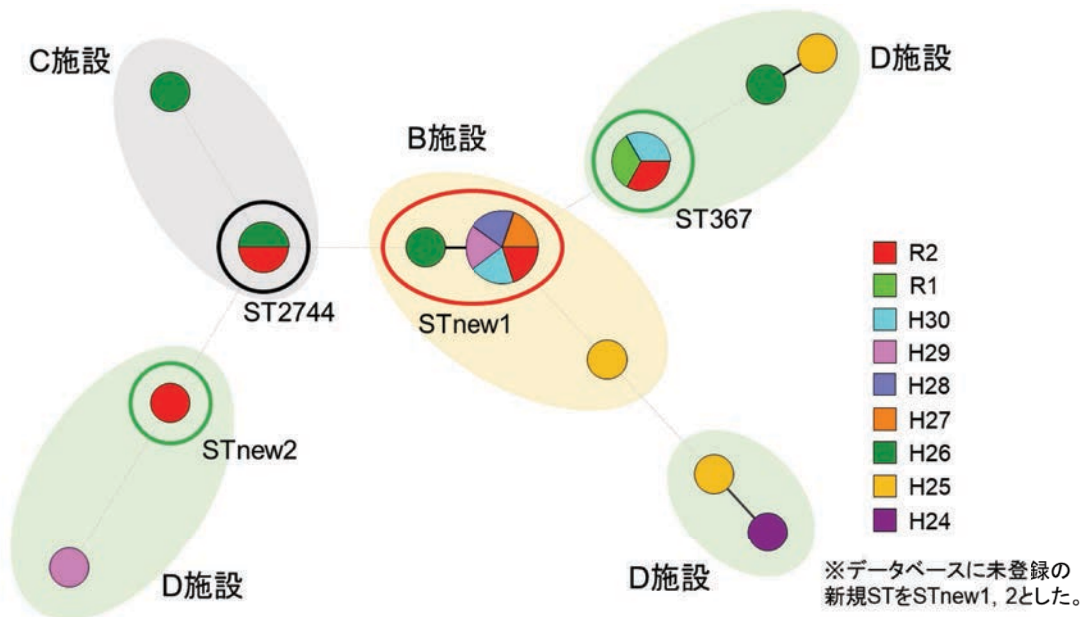
緊急事態宣言の影響



継続的なモニタリング

定着株 or 新規株の評価

MLVAに基づくMST (minimum spanning tree)



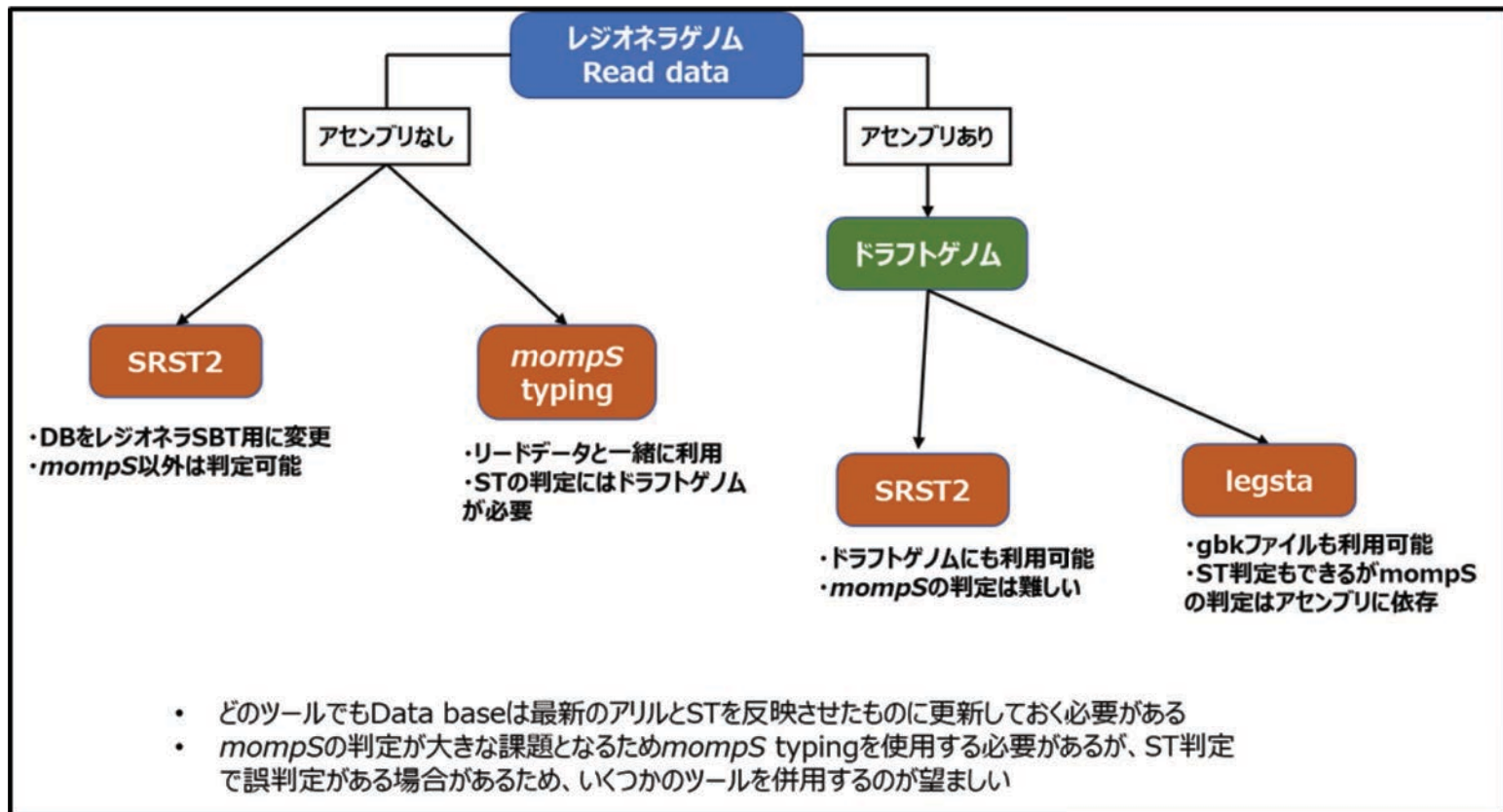
B, C施設で分離された株は、それぞれ緊急事態宣言前の期間に分離されたものと同じのST/MLVA型だった。D施設で分離されたST367は宣言前の期間に分離されたものと同じのMLVA型であったが、STnew2はR2年度に初めて分離された。

施設への衛生指導に役立つ！

ゲノムデータを利用した*Legionella pneumophila*のSBT解析フローを作成

SBT 7 locusのうち*mompS*はゲノム上でパラログ遺伝子がタンデムに並んでいるため、ゲノム解析のアセンブリではミスアセンブルが生じやすく、ドラフト配列のみでは正確なSBTの判定が困難であるという問題がある。また、ドラフトゲノム配列からSBTの判定に必要な領域を抜き出してくるのは手間がかかる。そこで、既存の解析ツールを利用して以下のようなフローを考案した。

多検体の処理も一括で可能な点はメリットであるが、*mompS*の判定については留意する必要がある。



***SRST2に用いるデータベースは、3010個のSTのプロファイル（2021.7.21）に更新した。**

11. 外部精度管理の 安定化に向けた検討

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

2021年9月吉日

レジオネラ属菌検査実施施設様 各位

2021年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイのご案内

日頃は弊社製品のご愛顧を賜り厚く御礼申し上げます。
さて、この度レジオネラ属菌検査を実施されている施設様を対象に、下記の要領で「2021年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」を実施致します。
日常の検査精度の確認のため、ご参加いただけますようお願い申し上げます。

■参加要件

別紙1.「参加要件」を満たし、かつ、別紙2.「2021年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」（参考：「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」（薬生衛発0919第1号 令和元年9月19日厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）による検査対応が可能なご施設様

■実施概要

検査試料	レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料（凍結乾燥品、-18～-33℃保存） 同封書類：①試料送付のご案内、②試料の使用法・操作手順、③結果記入用メモ、④試料受領書兼承諾書
実施方法について	「2021年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」に従って実施をお願いします（参照：別紙2）。 2021年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」（薬生衛発0919第1号 令和元年9月19日厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）を参考に、本精度管理サーベイ用に変化したものです。
参加費	1 セット 38,500 円（消費税込）
参加募集数	200セット（募集数に達し次第、締め切らせていただきますのでご了承ください。）

■実施スケジュール（予定）

10月1日(金)	参加募集開始 ● 弊社コスモホームページ(https://cosmokai.com)の2021年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ申込フォームから申込手順に従いお申しください。 ● 1施設複数名のお申込みも可能です。検査試料はそれぞれの試験実施者様へお送りさせていただきます。
11月5日(金)	参加募集締切 ● 〆切日前でも募集数に達し次第、参加申込を締め切らせていただきます。
12月6日(月)	試料発送 ● 検査試料到着後は直ちに-18～-33℃で保管願います。
12月7日(火)～	検査実施 ● 弊社コスモホームページ(https://cosmokai.com)にてIDとパスワードでログイン後、結果を入力していただきます。 ● 成績入力方法は検査試料に同封の資料を参照してください。
12月21日(火)	請求書送付 ● 請求書はお申込み者様へ一括でお送りさせていただきます。
1月21日(金)17時	回答締切
1月21日(金)	参加費お支払い期限 ● 振込用紙をご利用いただくか、弊社指定の口座にお振り込みいただけます。なお、振込手数料は貴施設ご負担をお願い致します。 銀行振り込みの控えをもって領収書とさせていただきます。
3月下旬	解析結果返却 ● 弊社コスモホームページ(https://cosmokai.com)にてID 番号とパスワードでログイン後、結果を表示・ダウンロードができます。

■問い合わせ先

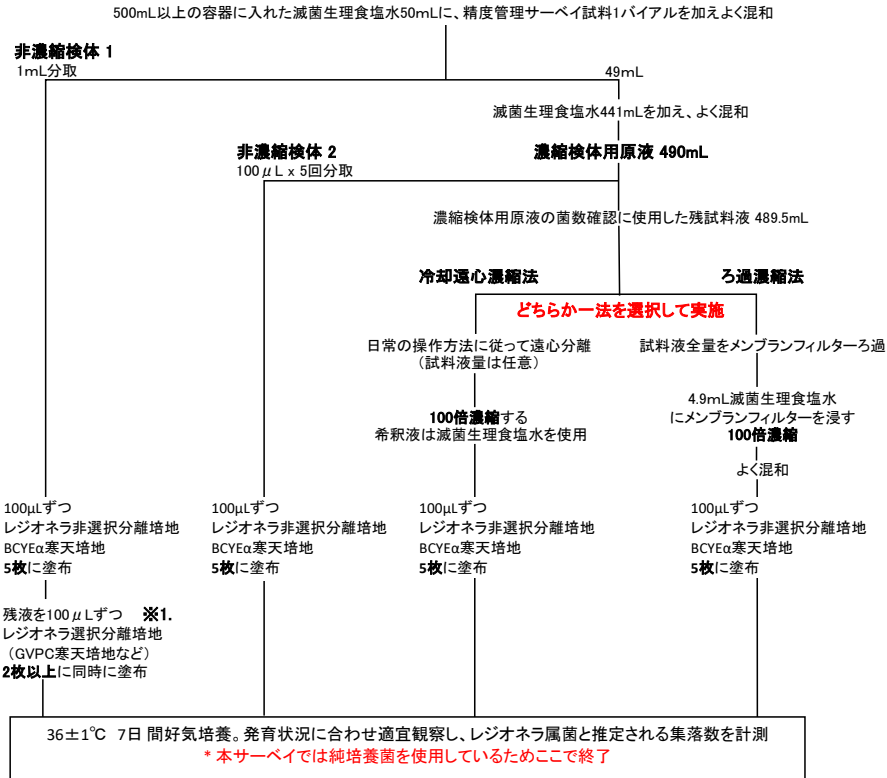
日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局
〒110-8736 東京都台東区上野3丁目24番6号
TEL : 03-5846-5534 FAX:03-5846-5629
E-mail: legi-srvy@nissui-pharm.jp



日水製薬株式会社

2021 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

参考:「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」(薬生衛発0919第1号 令和元年9月19日厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)



■ 2021年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」(薬生衛発0919第1号 令和元年9月19日厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)を参考に、本精度管理サーベイ用に変化したものです。

■ 2021年度サーベイにおいては、濃縮操作や培地接種操作などの手技の精度確認に主眼を置いています。レジオネラ属菌以外の夾雑菌は入っていないため、日常検査において濃縮加熱処理もしくは酸処理を実施している施設におかれましても、上記指定法に従って行った検査法での結果の報告をお願いします。

■ 指定法に記載されていない手技、使用器材(例:冷却遠心濃縮液量、メンブランフィルター材質、培地メーカー、レジオネラ選択分離培地の種類、など)は、各施設の操作方法で行ってください。

■ 各法におけるレジオネラ属菌数は、レジオネラ非選択分離培地BCYE α 寒天培地から得られた集落数から算出し、報告してください。

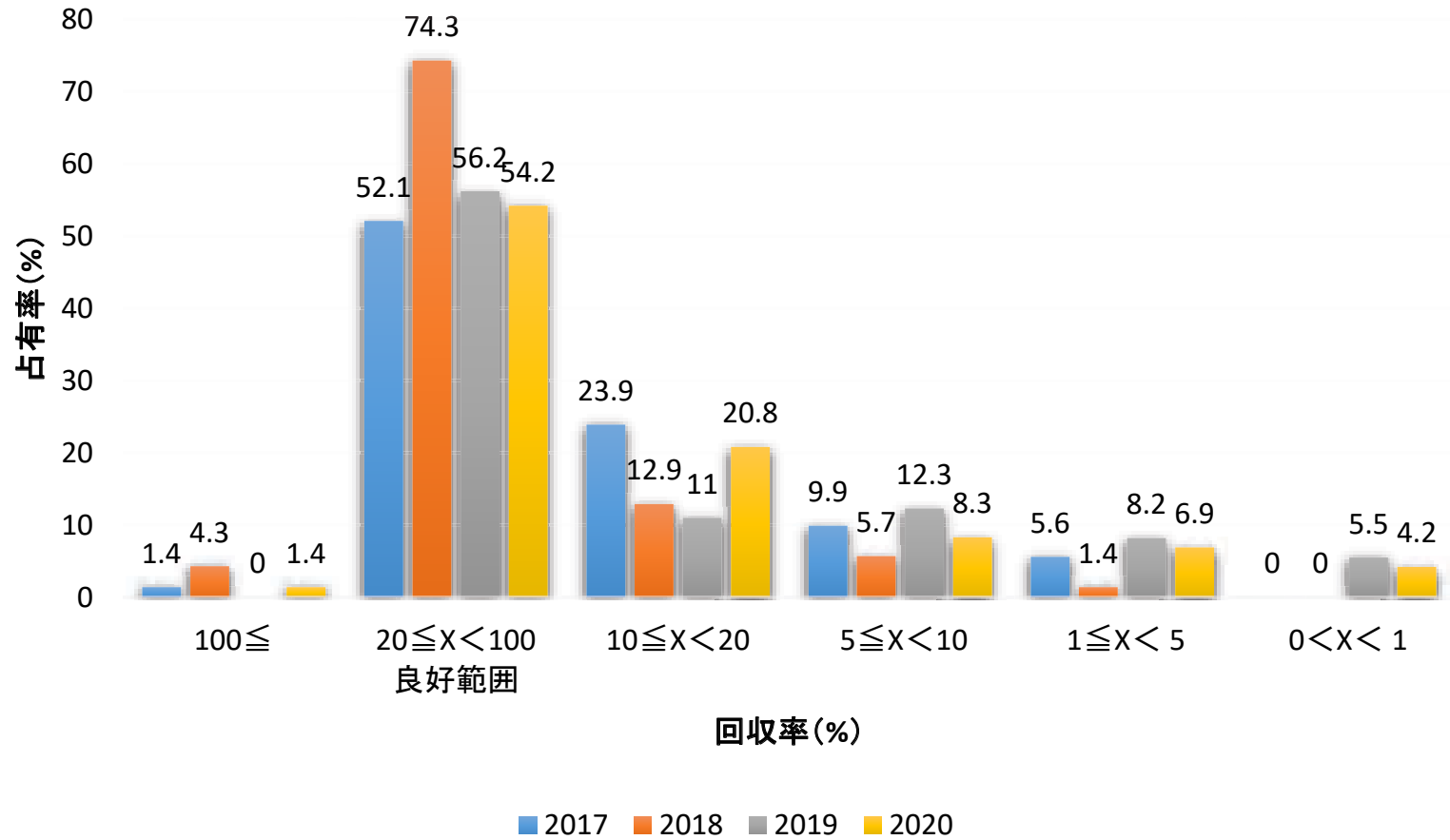
※1. 日常の試験にレジオネラ選択分離培地を使用している施設におきましては、参考値として、同培地における集落数も計測してください。なお、レジオネラ研究事業において、レジオネラ選択分離培地における集落数は、組成中の選択剤による影響等により、レジオネラ非選択分離培地における集落数に比べ減少することが報告されています。

外部精度管理調査研究班協力機関

- 2015年度：地衛研を中心とした67機関
- 2016年度：地衛研を中心とした71機関
- 2017年度：地衛研を中心とした71機関
- 2018年度：地衛研を中心とした70機関
- 2019年度：地衛研を中心とした73機関
- 2020年度：地衛研を中心とした72機関
- 2021年度：地衛研を中心とした70機関

7年間連続参加機関：44機関

外部精度管理参加機関の回収率の変化



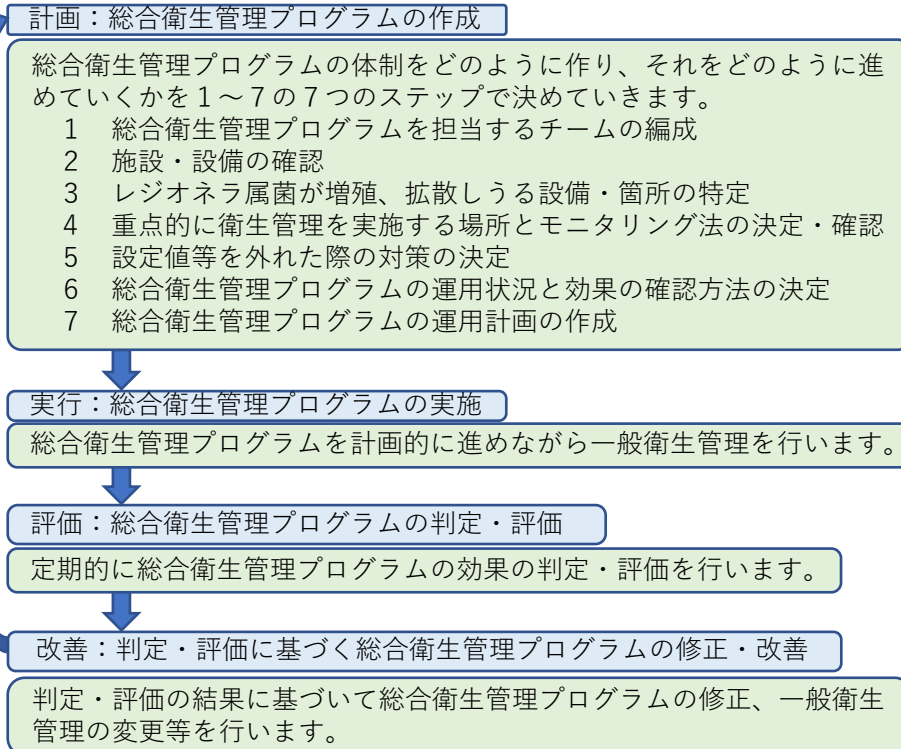
12. 入浴施設の衛生管理の手引き
及び
公衆浴場等入浴施設が原因と疑われ
るレジオネラ症調査の手引き
の作成

「入浴施設の衛生管理の手引き」の作成

- 構成
- I. 総合衛生管理プログラム
 - II. 一般衛生管理

総合衛生管理プログラムの概要

入浴施設における衛生管理を組織的・計画的に行うための体制



チームの重要性

入浴施設の衛生管理を担当者だけの責任とせず、チーム全体で管理のための体制を作り、計画し、評価し、改善しながら進めていくことが推奨される。これにより安全で安心できる施設の提供が可能となる。

一般衛生管理

- ・入浴施設の設備におけるレジオネラ属菌の発生を予防するための清掃や消毒等の管理方法
- ・設備ごとの構造と衛生管理方法を具体的に解説

1. 全般
2. 貯湯槽
3. 補給配管
4. 湯口
5. 浴槽
6. 循環配管
7. ろ過器
8. 循環ポンプ
9. 集毛器
10. 加熱器（熱交換器）
11. 消毒装置
12. 気泡発生装置等
13. 水位計及び水位計配管
14. 連通管
15. オーバーフロー回収槽
16. 調節箱
17. シャワー、打たせ湯
18. 原水、原湯の管理
19. 上がり用湯、上がり用水の管理
20. 排水

「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われる レジオネラ症調査の手引き」の作成

作成の基本方針

集団発生の調査時に参考となる手引き

構成

1. 調査の手引き
2. レジオネラ症疫学調査票
3. 施設調査票
4. 施設調査必要物品チェックリスト

13. 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)に対する塩素系消毒剤 の効果

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に対する塩素系消毒剤の効果

新型コロナウイルスに対する0.1～1.0mg/Lの遊離残留塩素の効果は世界的にデータがない

実験方法

1. 次亜塩素酸Na

ウイルス培養100倍希釈液に設定濃度になるように次亜Na 1,000mg/Lの所定量を添加し、所定の時間曝露させて不活化を測定

2. モノクロラミン

所定の濃度のモノクロラミン溶液に、100倍になるようにウイルス培養液を添加し、所定の時間暴露させて不活化を測定

期待される効果：入浴施設の浴槽におけるウイルス汚染に対して、科学的根拠に基づいた対策を講じることが可能になる。

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に対する塩素系消毒剤の効果

メディウム	塩素系剤	濃度 (mg/L)	温度 (°C)	効果
PBS	遊離残留塩素	0.1	24	99.9%
PBS	遊離残留塩素	0.1	41	99.9%以上
PBS	モノクロラミン	1	24	80%前後
PBS	モノクロラミン	6	24	90%前後
浴槽水A	遊離残留塩素	0.4	24	99.5%
浴槽水A	遊離残留塩素	1	24	99.9%以上
浴槽水B	遊離残留塩素	0.4	24	96.8%
浴槽水B	遊離残留塩素	1	24	99.9%以上

リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用いた実験よりも浴槽水での実験ではやや効果が減少したが、新型コロナウイルスに対して遊離残留塩素は高い効果を示した。新型コロナウイルス以外のウイルスでの報告と同様に、モノクロラミンは遊離残留塩素よりも効果が低かった。

14. 研究班の研究成果の発信

成果のWeb発信

保健所・衛生部局の疑問に答える

レジオネラ研究班でGoogle検索→

レジオネラ研究班

about monochloramine_main monochloramine2_main test_main

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（令和元年～）

本Webページは、上記研究班の成果の一部を公開する目的で用意したものです。

1. [入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン](#)（2021年10月13日）
2. [浴槽水のモノクロラミン消毒を中心とした、衛生維持に関する情報提供～施設の衛生管理者や自治体向け～](#)
（2020年9月14日）

これまでの研究報告書は
厚生労働省化学研究成果データベース
で読むことができます。
<https://mhlw-grants.niph.go.jp>

厚生労働科学研究成果データベース
MHLW GRANTS SYSTEM

研究者・管理者はこちら

本データベースについて | 本データベースの使い方 | 利用規約 | 利用環境について

ホーム | 研究成果検索 | 研究分野一覧 | 担当課一覧 | 研究事業変遷表一覧

研究成果を検索する

研究分野一覧を見る

担当課情報を見る

研究事業変遷表を見る

**“公衆浴場”
で検索**

お知らせ 一覧を表示

2022年1月20日	【システム再開のお知らせ】	2022年1月20日(木)
2022年1月13日	【システム停止のお知らせ】	2022年1月20日(木) 11:00~15:00
2022年1月6日	【アクセス制限のお知らせ】	2022.2.1 (火) ~ 2022.3.23 (水)
2021年12月13日	【システム停止のお知らせ】	2021年12月13日(月) 10:00 - 14:00
2021年11月25日	【システム停止のお知らせ】	2021年12月11日 (土) 8:30~18:00

はじめてご利用の方へ

本データベースについて > | 本データベースの使い方 > | よくあるご質問 >

利用規約 > | 利用環境について >

厚生労働科学研究成果データベース MHLW GRANTS SYSTEM

↑ このページのトップへ