

平成 22・23 年度 地域保健総合推進事業

「保健所のレジオネラ対策における簡易迅速な検査方法の
実用化と自主管理の推進に関する研究」報告書

平成 24 年 3 月

(財) 日本公衆衛生協会

分担事業者 大黒 寛

(東京都多摩立川保健所長)

平成22・23年度地域保健総合推進事業

保健所のレジオネラ対策における簡易迅速な検査方法の実用化と

自主管理の推進に関する研究

分担事業者 大黒 寛 (東京都多摩立川保健所長)

〔要旨〕地域のレジオネラ感染症の減少を図るため、ATP検査法を用いて公衆浴場等における浴槽水中のレジオネラ属菌検出率とATP値との量反応関係を明らかにするとともに、監視現場で実施が可能な衛生管理手法を新たに開発した。さらに、ATP値と施設の維持管理状況等との関連性を検証し自主管理の方策を確立することを目的に、拭き取り用測定器とともに新たに開発された水中測定器の有効性について検討した。

I 目的

現在、レジオネラ属菌の検査は培養法で行われ、検査日数は概ね2週間を要している。営業施設への監視指導においてはレジオネラ属菌の判定、指導をより迅速に行うことが課題となっている。そこで、ATP検査法を培養法に補完する簡易迅速検査法として監視現場に導入することの有効性を検証し、全国の保健所に対し本法を用いた監視手法を普及拡充し、事業者の自主管理の一層の推進を目的として実施した。

II 実施事業所(順不同)

東京都多摩立川保健所、東京都南多摩保健所、台東区台東保健所、江東区保健所、目黒区保健所、札幌市保健所、岡山市保健所、長崎県県南保健所、福岡市東保健所、静岡市保健所、横浜市保健所、東京都健康安全研究センター、静岡市環境保健研究所、静岡県環境衛生科学研究所、東京都福祉保健局健康安全部合計11保健所4研究所等

III 研究内容

1 ATP検査法の実用化に関する検証

現場で簡易迅速にレジオネラ属菌の有無を推測するための手法としてATP検査法の有効性を検討するため、昨年に引き続き浴槽水のATP値とレジオネラ属菌検出率の関係について、白湯と温泉に分けて解析した。

2 施設管理・監視指導への導入の検討

本研究において従来から使用している拭き取り用ATP測定器よりも操作が容易な水中ATP測定器が市販されていることから、拭き取り用ATP測定器と水中ATP測定器3機種による測定値の比較を行った。

3 事業者の自主管理支援に関する検討

ATP値はろ過装置の汚れの蓄積に比例して経日的に増加することが平成22年度本事業からも示唆された。そこで、事業者にてATP測定器を貸し出し、現場での経日的測定を依頼するモニタリング調査を行った。

IV 調査方法

1 調査期間

平成22年6月～平成24年2月

2 調査対象

各保健所管内のろ過器等を使用する公衆浴場、旅館の浴槽水及び加温装置を使用したプール水等を対象とした。本事業の検体種別及び検体数は下表の通りである。

事業所名	検体種別件数		合計
	白湯※1	温泉※2	
東京都多摩立川保健所	493	9	502
長崎県県南保健所	24	59	83
東京都南多摩保健所	164	23	187
江東区保健所	96	11	107
台東区台東保健所	104	13	117
目黒区保健所	42	-	42
札幌市保健所	53	7	60
静岡市保健所	83	46	129
岡山市保健所	264	123	387
福岡市東保健所	151	18	169
横浜市保健所	-	95	95
合計	1474	404	1878

※1 プール水を含む ※2 薬湯を含む

3 調査項目

レジオネラ属菌、ATP値、pH、過マンガン酸カリウム消費量、大腸菌群、遊離残留塩素濃度等

4 検査方法

a レジオネラ属菌検査は新版レジオネラ症防止指針に準拠した。

b ATP値はキッコーマン社製（以下「K社」とする。）のルミテスター PD-20、3M社製（以下「M社」とする。）ルミノメーター UNG3、Hygiena社製（以下「H社」とする。）EnSURE 及び NEOGEN社製（以下「N社」とする。）AccuPointを使用した。

c その他の項目は、上水試験法に準拠した。

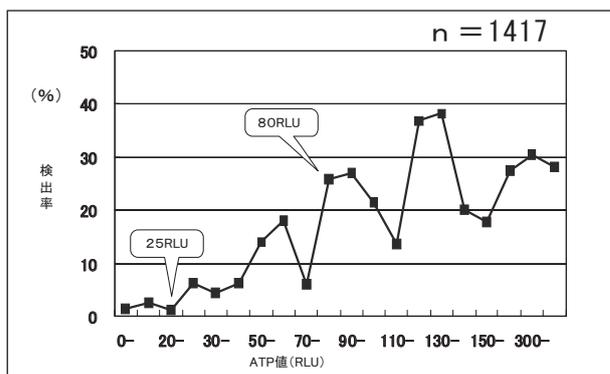


図1 ATP値とレジオネラ属菌検出率の関係

b カットオフポイントの検証

aにより得た 25RLU がレジオネラ属菌検出の閾値（カットオフポイント1）、80RLU が検出率上昇の閾値（カットオフポイント2）として妥当であることを検証するため、昨年度と同様に Youden Index を用いた方法で「感度（検査が陽性を正しく判定する確率）+ 特異度（検査が陰性を正しく判定する確率）- 1」を計算し、ROC 曲線による解析を行った。（図2）

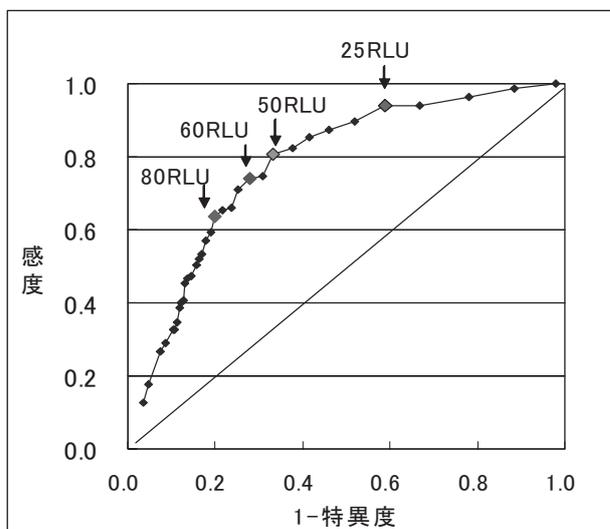


図2 カットオフポイント検証のためのROC曲線

V 結果及び考察

1 ATP検査法の実用化に関する検証

a ATP値とレジオネラ属菌検出率の関係

1,417 検体について K 社測定器で実施した ATP測定値とレジオネラ属菌検出率の関係を図1に示した。グラフの傾向は昨年度の報告¹⁾と同様で検出率は 25RLU 以降徐々に上昇し 80-130 RLU 周辺に検出ピークの存在が伺えた。

感度は 25RLU で 0.94 でありそれ以降徐々に下降していくことから、この値は従来どおりカットオフポイント1として妥当と思われた。カットオフポイント2の候補としては 50,60,80 の3つが上がったが、各値における感度、特異度とも大きな差は無いため、汚染の程度に応じた現場指導での有効性を考慮して、従来どおり 80RLU をカットオフポイント2とした。

表1 25・50・60・80RLUにおける感度・特異度

	25RLU	50RLU	60RLU	80RLU
感度	0.94	0.81	0.74	0.64
特異度	0.41	0.67	0.72	0.80

(参考) 感度・特異度

検査	検出	不検出	(合計)
陽性 (RLU)	A	B	A+B
陰性 (RLU)	C	D	C+D
(合計)	A+C	B+D	

●感 度 = $A / (A + C)$

●特異度 = $D / (B + D)$

c 温泉水のATP測定への影響

温泉は地域の泉質によりATP発光反応にプラスまたはマイナスの影響を与えることが考えられたため、昨年度の報告同様白湯とは別に集計した。温泉地を管轄するA～D保健所別にATP値とレジオネラ属菌検出率の関係を図3に示した。また、各温泉の詳細な泉質は不明であったため各地域の平均pHとATP値25RLUの感度を示したのが表2である。

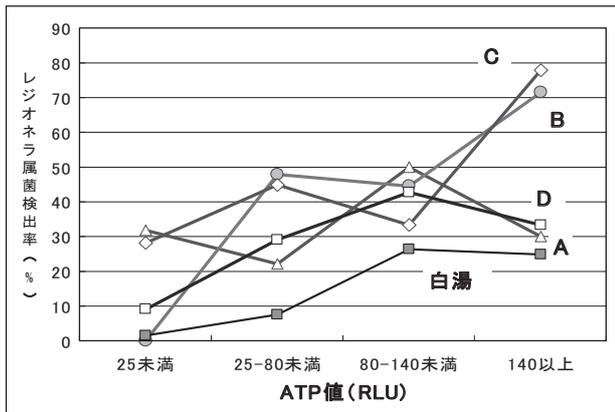


図3 温泉地の管轄別のATP値とレジオネラ属菌検出率 n=47

表2 各地域の温泉のpH及び25RLUの感度

	検体数	平均pH	25RLUの感度
白湯(参考)	—	7.6	0.94
A(保健所)	43	9.3	0.46
B(保健所)	59	7.7	1.00
C(保健所)	67	8.1	0.67
D(保健所)	85	8.1	0.86

pHが高めのA管内の温泉は、白湯に比べ検出の閾値である25RLUよりも低い領域でレジオネラ属菌が検出される傾向にあり、25RLUでの感度は0.46であった。一方、pH

が中性付近のB管内の温泉は、25RLUでの感度は1.00と白湯と同様傾向で、検出曲線も白湯同様のパターンを示した。C, Dは25RLU未満の領域での検出があるものの、検出曲線は白湯と同様なパターンを示した。このことから、pHを含めた温泉成分により、ATP発光反応が影響を受けることが推定された。

2 施設管理・監視指導への導入の検討

a 白湯における水中用測定器の検証

47検体についてK社製拭き取り用及び、M社、H社、N社の水中ATP測定器を使ってATP値を測定したのが図4である。各機種ともおおむね同様なパターンを示した。

また、M社及びH社製測定器とK社製測定器と比較したのが図5・図6である。それぞれの相関係数はいずれも0.64であった。

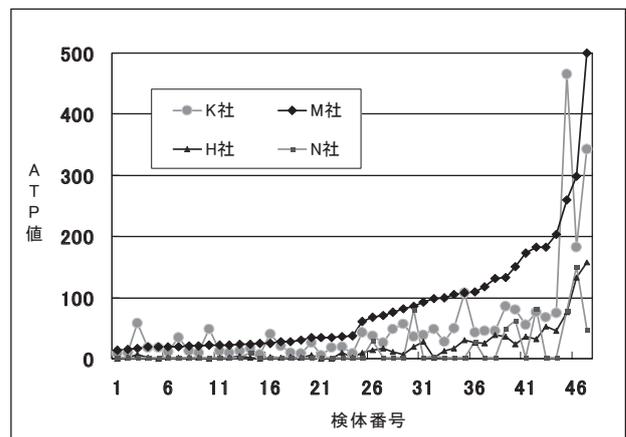


図4 4機種によるATP値の比較 n=47

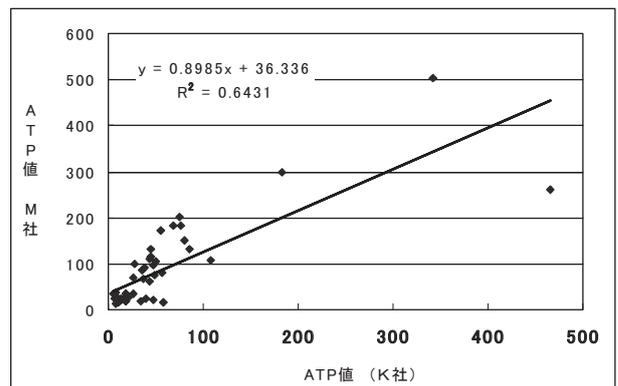


図5 M社とK社製測定器の相関 n=47

それぞれのカットオフポイントを回帰直線より求めたのが表3である。

なお、N社製測定器では、ATP値の低い領域では感度が低いため相関の検証には至らなかった。

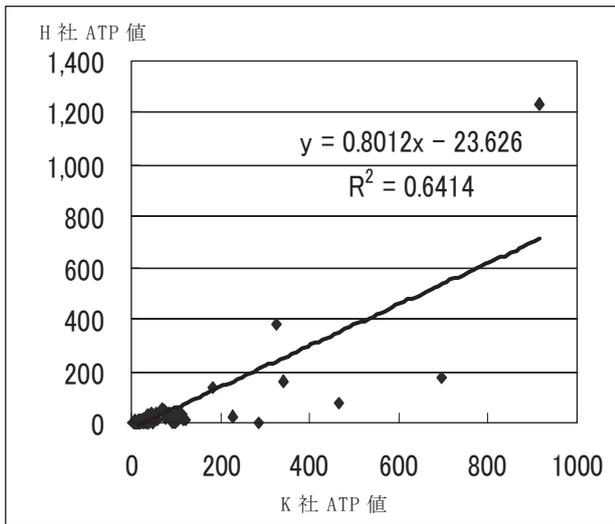


図6 H社とK社製測定器の相関 n=106

表3 K社との回帰曲線により求められたM社・H社製測定器のカットオフポイント

K社	M社	H社
25RLU	58.7RLU	0RLU
80RLU	110.2RLU	40.5RLU

b 温泉水による水中用測定器の検証

温泉成分による発光への影響に対する機種差の有無を見るため、M社製水中用測定器による測定結果を図7に示す。この調査は前述したB, C, D保健所において行われたものである。

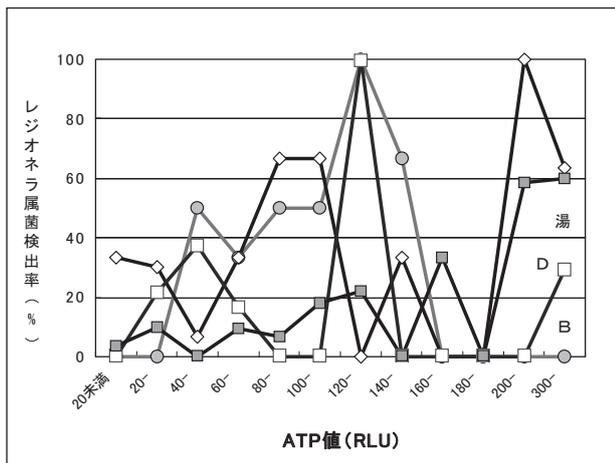


図7 温泉水の水中用測定器によるATP値とレジオネラ属菌検出率

結果は、1-cと同様に、pHがやや高いC, Dの地域の検体が白湯に比べ低いATP値の領域でのレジオネラ属菌検出が見ら

れ、一方、中性に近いBの地域の温泉の検出は白湯と同様の立ち上がりであった。このことから、温泉成分による発光への影響はK社及びM社製測定器の両者に見られることが明らかになった。

3 事業者の自主管理支援に関する検討

a K社ATP測定器の貸出し事例

A銭湯の管理者にK社拭き取り用ATP測定器を実際に使用してもらい経日的に測定した値を示したのが図8である。

営業開始時に比べ中間時でATP値が上昇しているのは、入浴者が持ち込む汚れの影響と考えられる。したがって、ろ過システム自体に蓄積した汚れを評価するためには、入浴者が一時的に持ち込む汚れによる影響を受けない営業開始時に採水する等の工夫が必要と思われる。

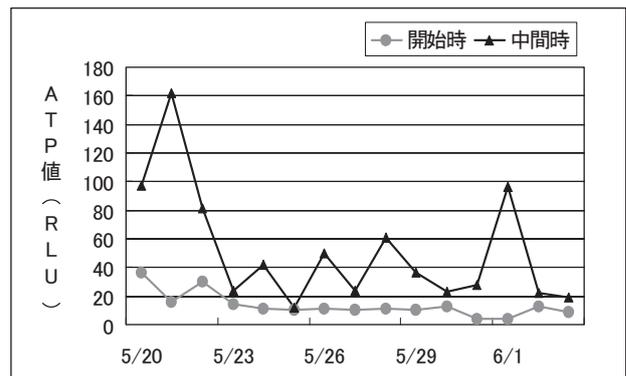


図8 ATP値の経日変化(A銭湯)

なお、浴場の管理者からは、目に見えない浴槽水の汚れが測定できるので今後の管理に役立つと評価する声がある一方、マイクロピペットを使用するので採水に手間がかかるなどの意見があった。

b M社ATP測定器の貸出し事例

B旅館の管理者にM社水中用ATP測定器を実際に使用してもらい経日的に測定したのが図9である。B旅館は24時間風呂を使用しており、浴槽水の交換は毎日半量ずつ行っている施設である。10日に循環配管の消毒を行ったが11日に浴槽水に塩素消毒薬を入れ忘れたことによりATP値が大きく上昇している。この上昇は杉山ら²⁾の報告に示されるように一般細菌、従属栄養

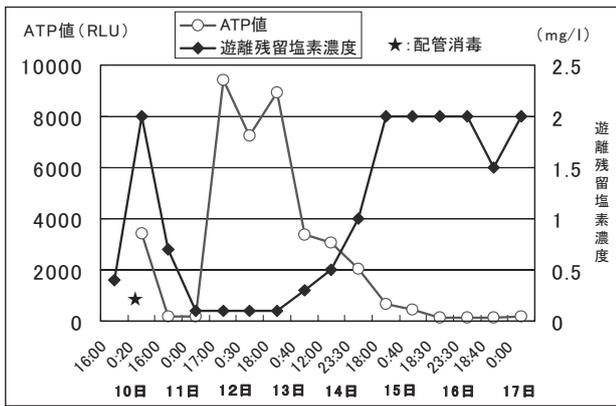


図9 ATP値の経日変化（B旅館）

細菌等の急激な増加によるものと思われる。その後遊離残留塩素濃度を最大 2.0mg/l まで高めることで大幅にATP値が減少した。

この事例のように、ATP値を測定することで日常の非常事態に気づいて早期に対応が可能となった。

VI 考察

1 ATP値による管理指標について

本事業で集約された 1878 検体の浴槽水のうち、白湯 1417 検体のATP値とレジオネラ属菌検出率の関係について解析したところ、25RLU 未満では検出率 1.9%、25 以上 80RLU 未満は 4.3 ~ 13.9%、80 以上では 25.7% となり、ATP値の上昇とレジオネラ属菌検出率に関連性が存在した。このことから 25RLU を検出の閾値（カットオフポイント 1）、80RLU を検出率上昇の閾値（カットオフポイント 2）とし、25RLU 未満を管理の良好な状態、25-80RLU は要注意、80RLU 以上を改善が必要な状態とする管理指標を提示した。昨年度報告に示した管理指標のイメージ図をデータの更新のうえ再掲する（表4・図10）。

表4 ATP値を指標とした管理区分（試案）

ATP値 (RLU)	レ菌※検出率 (%)	管理水準	管理区分
25未満	1.9	良好	管理目標値
25~80	4.3-13.9	やや不良	要注意
80以上	25.7	不良	要改善

※レ菌：レジオネラ属菌

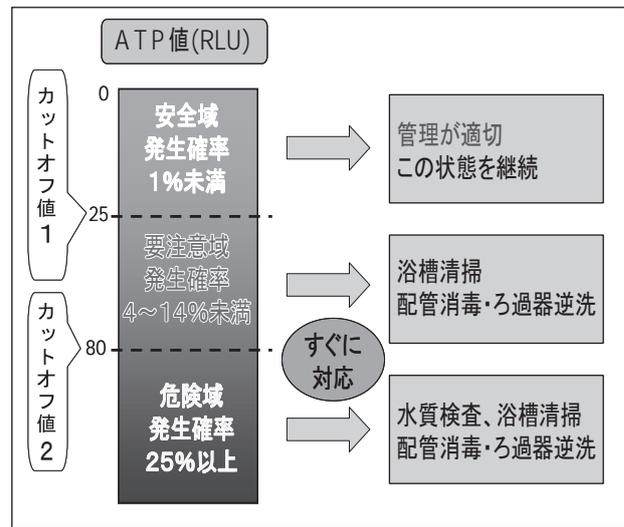


図10 ATP値による管理指標（イメージ）

2 温泉水のATP値

温泉のATP値とレジオネラ属菌検出率の関係について集計したところpHの高い地域の温泉ほど検出の閾値が低い側に移るなど、泉質によりATP発光反応が影響を受けることが確認された。

K社によると、ATP発光反応はpH³⁾や食塩濃度⁴⁾に影響され、pHの場合8.0で相対発光量が最大(100)、8.0から離れるに従い発光量が低下(pH7.8~8.2の範囲内で相対発光量は90%)し、また、食塩濃度も阻害要因となることが報告されている(0.5%のときの相対発光量は69.8%)。

また、静岡県環境衛生科学研究所の杉山ら⁵⁾は、温泉水の泉質によるATP発光阻害の有無について調査した報告書の中で、塩化物泉や有機物泉で発光量の低下がみられるものは、バックグラウンド値が泉質ごとに異なるためであり、発光阻害は認められなかったこと、及びブランク値の測定の必要性について言及している。

これらの事実を踏まえ、温泉利用施設におけるATP測定法の活用については、泉質がATP測定値に与える影響を考慮することが必要である。

3 水中用ATP測定器と自主管理の推進

従来の拭き取り用ATP測定器を使って浴槽水のATP値を測定する場合、採水量を一定にするためにマイクロピペットを使

用して定量する必要があった。今回、拭き取り用と水中用測定試薬との比較を行い、測定法や測定機器の違いによるカットオフポイントを設定することにより、実際の管理現場では測定のための操作が簡易な水中用ATP測定器を導入することで管理者の負担軽減と衛生の向上を図れることが期待される。ATP測定を取り入れることのメリットを以下にあげる。

- ① 浴槽の使用開始前にATP値を測定することにより、ろ過システム内部の生物膜の発生状況を推測できる。
- ② 日常的にATP値を測定することにより、利用者数等に関連した浴槽水の汚れた状況や維持管理の効果などが把握できる。
- ③ 配管消毒実施前及び実施後のATP値を測定することにより、配管消毒の効果を確認できる。
- ④ レジオネラ症発生予防が期待できる。

4 浴槽水のATP値が表すもの

配管内にある生物膜のATPがなぜ浴槽水で測定できるのかについて2つの理由が考えられた。

① 水流による生物膜の崩壊

菌の増殖により成長した不定形な生物膜が、循環系を流れる水流の物理的な力を受けて剥離や崩壊、細胞の脱落等が起こり、浴槽水に放出されることによりATP値の増加を引き起こす⁶⁾。

② 塩素剤による細菌細胞膜の崩壊

塩素消毒により生物膜表層の細菌の細胞膜が破壊され、細胞内に存在していたATPが浴槽水中に放出されることによりATPが浴槽水中に検出される⁷⁾。

浴槽水のATP値は、具体的にはレジオネラ汚染のポテンシャルを示すと考えられる。すなわち、25RLU未满是システム内部に生物膜が存在しないもしくは極めて少ない状態、25-80RLUは基準値を超えない程度のレジオネラ属菌を供給する生物膜が存在する状態、80以上は基準値を超える量の生物膜が存在する状態としてとらえると、ATP値とレジオネラ属菌の関係が理解しやすいと思われる。

VII まとめ

レジオネラを迅速に検出するための検査法の開発は過去の厚生労働科学研究等において多くの報告がなされているが、PCRやLAMP法は専門の設備を備えた検査機関による検査が必要で、営業施設が日常的に実施するのは困難である。ATP値測定の最大のメリットは、管理者が現場で直接かつ迅速に自らが管理する浴槽のレジオネラ汚染の可能性を把握できることである。

今年度の調査では、浴槽水の検査に適した水中用ATP測定器を試験し、有効であることが示唆され、今後更にデータを蓄積することで浴槽水のATP値測定を日常管理に導入する上で非常に有効と思われる。

今後は、ATP測定法のメリットを生かし、有効性についての検証及び普及に努め、将来的には、残留塩素測定同様に浴槽水の日常管理に導入されることを目指したい。

VIII 参考文献

- 1) 平成22年度地域保健総合推進事業「保健所のレジオネラ対策における簡易迅速な検査法の実用化と自主管理の推進に関する研究」報告書(財)日本公衆衛生協会 分担事業者上木隆人
- 2) 平成14年度厚生労働科学研究費補助金厚生労働科学特別研究事業「循環式浴槽システムにおける微生物管理手法に関する研究」研究報告書. 2003
- 3) ルシパック. TECHNICAL SHEET「ルシパックワイドの諸性質 pH依存性.」2001 キッコーマン食品(株)
- 4) 「食品成分、消毒剤等によるルシパックPenの反応阻害」キッコーマン食品(株)バイオケミカル事業部 2010. 7月
- 5) 第43回静岡県公衆衛生研究会 抄録集 静岡県健康福祉部 3B-66～3B-68 (2007)
- 6) 第3版「レジオネラ症防止指針」(財)ビル管理教育センター P83～84
- 7) 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「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成20年度総括・分担研究報告書. 2009

