

2010J6032A

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた
総合的衛生管理手法に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 倉 文明

平成 23 年 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究-----1
倉 文明

II. 分担研究報告

1. 温泉施設におけるモノクロラミン生成装置の設置・運用結果-----25
縣 邦雄、杉山寛治、神澤 啓
2. 掛け流し式浴槽水に対するモノクロラミン消毒方法の導入-----33
杉山寛治、縣 邦雄、神田 隆、泉山信司、小坂浩司
3. モノクロラミン消毒による入浴施設の衛生管理（長崎県の実施例）-----41
田栗利紹、杉山寛治、泉山信司、小坂浩司、遠藤卓郎
4. 消毒副生成物の暴露評価-----47
神野透人、竹熊美貴子、高橋淳子、香川(田中)聡子、古川容子
5. 液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討-----59
烏谷竜哉、磯部順子、中嶋 洋、泉山信司、浅野由紀子、矢崎知子
6. 液体培地による前培養を組み合わせた RT-PCR 法（LC RT-PCR 法）を用いたレジオネラ
生菌を迅速に検出する検査法の検討-----89
荒井桂子、吉川循江、田中礼子、坂井 清、北爪 稔、前沢 仁、高津和弘
7. LC qRT-PCR（Liquid Culture Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain
Reaction）による浴槽水中レジオネラ属菌の定量（長崎県の実施）-----97
田栗利紹、烏谷竜哉、泉山信司
8. レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討ーレジオネラ属菌検査精度管理
ワーキンググループの発足及び地方衛生研究所を対象としたレジオネラ属菌検査法
アンケート調査結果ー -----101
森本 洋、磯部順子、大屋日登美、緒方喜久代、金子紀子、中島 洋、矢崎知子、吉野修司
9. レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討ー外部精度管理試料安定化に向けた取り組-----157
森本 洋
10. 斜光法を取り入れた培養法と研修-----163
緒方喜久代、若松正人、成松浩志
11. イギリス HPA 主催のレジオネラ属菌検査外部精度管理-----179
縣 邦雄
12. 環境水の新規濃縮ろ過法の検討-----185
大屋日登美、黒木俊郎

13. <i>Legionella pneumophila</i> のSBT法による遺伝子型別-----	191
前川純子、田栗利紹、縣 邦雄、井上浩章	
14. <i>Legionella pneumophila</i> の MLVA 法による型別-----	199
前川純子、竹内 彩、泉山信司	
15. 抗酸菌の調査 (<i>Mycobacterium avium</i> の遺伝子型) -----	207
山崎利雄、前川純子	
16. 感染の地域性とその原因-----	215
磯部順子	
17. レジオネラ属菌対策等に係る宿主アメーバの管理 —レジオネラ属菌以外の微生物と アメーバの共生実態について— -----	223
八木田健司、泉山信司	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	229
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

I. 総括研究報告

研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨： レジオネラは培養期間が長いので、迅速検査が工夫されてきたが、浴槽水を検体とした生菌の検出には未だ改良すべき点が残っている。培養法においても検査機関によって結果が異なり、外部精度管理が必要である。また、欧米でモノクロラミン消毒の有効性が給湯水系で報告され、日本でも次亜塩素酸に比べてモノクロラミンによる消毒ではレジオネラの出現が抑制されることがモデル浴槽で観察されたが、入浴施設における検討の必要がある。そこで、以下の検討を行い成果を得た。

- 1) 循環ろ過式（週 1 回定休日に完全換水）入浴施設にモノクロラミン消毒を導入した。モデル浴槽（保健医療科学, 59(2):109-115, 2010）で実施した作業手順に従い、手作業で濃度調整、測定を行い、実施した 1 週間レジオネラとアメーバが非検出であった。それまでの消毒剤次亜塩素ナトリウム+イソシアヌル酸ナトリウムと遜色ないコストであることを示した。
- 2) 掛け流し式浴槽にモノクロラミン消毒を導入した。アルカリ性（pH9.0）の源泉タンク内の温泉水へ、次亜塩素酸ナトリウムと塩化アンモニウムを混合することにより自動生成したモノクロラミンを自動注入し、温泉水中のモノクロラミン濃度（3.3mg/L）を保持した。2ヶ月間レジオネラ属菌、アメーバは検出されず、従属栄養細菌数もほぼ不検出であった。塩素臭の原因となるトリクロラミンはまったく検出されず、臭気や肌感覚で違和感はなかった。モノクロラミン消毒は、次亜塩素酸ナトリウムによる消毒が困難といわれるアルカリ泉質温泉水の新しい消毒方法として期待できる。なお、研究の実施にあたり、入浴者への情報提供として、「浴槽水のモノクロラミン消毒の実施」を口頭で告げるとともに、浴場の壁面にその旨掲示した。
- 3) 消毒副生成物暴露の健康リスクを精査する必要がある。モノクロラミン処理浴槽水中の消毒副生成物と比較するため、遊離塩素消毒を行っている入浴施設においてアルデヒド類を含め消毒副生成物濃度を調査した。いずれの施設の浴室空気中からもクロロホルムをはじめとするトリハロメタン類やジクロロアセトニトリル、ブromoクロロアセトニトリルが検出された。浴槽水中からはこれらの消毒副生成物に加えて、ジクロロ酢酸やトリクロロ酢酸が比較的高濃度で検出された。また、N-ニトロソジメチルアミンとクロロピクリンはいずれの浴槽水でも不検出であったが、抱水クロラールが高濃度（4-110 µg/L）であることが初めて判明した。
- 4) 入浴施設等の環境水を対象としたレジオネラ属菌の迅速、簡便かつ精度の高い検査法を開発する目的で、液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（以下、LC 法）の適用を検討した。公衆浴場法等で水質基準が定められている浴槽水及び原水 61 件を対象に、LC 法と平板培養法の検出結果を比較したところ、LC 法は感度 85.7%、特異度 100%であり、平板培養法の結果を迅速に予測できると考えられた。定量値においても両者は高い相関を示し（ $R^2=0.86$ ）、LC 法により施設の汚染状況を迅速に評価できることが明らかとなった。
- 5) 環境水のレジオネラ数検査の外部精度管理のためには、検査法の多様性を減らし、培養早期にレジオネラを観察可能にする斜光法（日本環境感染学会誌 25 (1): 8-14, 2010）を含む研修の必要性が感じられる。そこで最初に地衛研に対して、アンケートによる環境水のレジオネラ検査法の実態調査

を行った。77カ所に配布し、保健所1を含む75カ所から回収した。22% (16/71) が研修後に検査を導入し、48% (36/75) が安全キャビネットを利用していた。91% (68/75) が検査法の統一が必要だとした。

- 6) 外部精度管理試料として、オキシドのサプリメントを利用した BCYE α 液体培地 (活性炭を除く) を検討した。5°C 保存 3 日目までは、熱、酸処理によらず回収されたが、保存 4 日目以降菌数が熱処理で減少した。この配布用試料は、熱処理を行うには改良の余地があったが、酸処理を前提に使用可能であった。外部精度管理の海外の事例として、英国の Health Protection Agency によるレジオネラの外部精度管理の実施状況を報告した。
- 7) 新たに入手した *L. pneumophila* の臨床分離株 25 株、*L. pneumophila* 血清群 1 の浴槽水由来株 24 株、*L. pneumophila* 血清群 1 の冷却塔水由来株 15 株について sequence-based typing (SBT) を行った。臨床分離株と浴槽水分離株は多様であったが、冷却塔水分離株は 87% が ST (sequence type) 1 となり、多様性に乏しかった。この傾向は以前の調査でも指摘されたが、近年も続いていることが確認できた。臨床分離株では、かつて集団感染事例の起因菌となった ST23 が増えているという傾向がみられた。なお、同一地域で感染源不明のクラスターとして *L. pneumophila* 血清群 3 (ST93) の菌株の事例が検出された。これまでの 86 株の臨床分離株の SBT 型とモノクローナル (Mab) 抗体型については J. Med. Microbiol. 59:653-9, 2010 に報告した。*Legionella rubrilucens* が初めてヒトから分離された事例 (温泉に入浴後肺炎) を報告した (J. Med. Microbiol. 59:1242-6, 2010)。
- 8) *L. pneumophila* 臨床分離株 40 株と、環境由来の *L. pneumophila* 血清群 1 の菌株 (土壌分離株 26 株、冷却塔水分離株 28 株、浴槽水分離株 34 株) 計 128 株について multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) 法を用いて型別し、73 種類に分類された。従来行われている SBT 法と比較すると、一部の領域について PCR 産物が得られなかった株があったが、分解能は同等かそれ以上で、SBT 法やパルスフィールドゲル電気泳動法に比べ手法として簡便であった。SBT 法が世界的に行われている現時点では併用することが望ましい。
- 9) *Mycobacterium avium* は非結核性抗酸菌症の原因菌のうち臨床的に重要である。ヒト、動物、公衆浴場の浴用水等から分離された *M. avium* の 縦列反復数可変領域 (VNTR) のパターン を Minimum spanning tree 法により解析し、*M. avium* が 3 つのグループに大別される事が分かった。
- 10) *Acanthamoeba* にはレジオネラ属菌以外にも共生/寄生する微生物が多数存在する。温水環境より分離した *Acanthamoeba* 75 株のうち 5 株から Parachlamydia 科の Parachlamydiaceae bacterium が共生体として検出された。その中には 2002 年の宮崎でのレジオネラ集団感染の起きた施設より分離されたアメーバに共生するものも含まれた。
- 11) 環境に生息する *L. pneumophila* のごく一部がヒトに感染していることが *L. pneumophila* 血清群 1 の *lag-1* の保有状況から明らかになっている (Kozak NA, J Clin Microbiol. 47:2525-35, 2009)。富山県内のレジオネラ症報告数の地域差の原因を明らかにするため、過去 5 年間に得られた浴用水から分離されたレジオネラ属菌を比較した。その結果、レジオネラ症報告数の多い西部では、*L. pneumophila* 血清群 1 (*lag-1+*) が遊離残留塩素濃度の高い浴用水から分離されていることが明らかとなった。
- 12) 斜光法導入に向けた民間検査機関等への研修を、西日本地区食品衛生検査機関研究協議会、九州支部事業九州ブロック地方衛生研究所地域専門家会議 (微生物部門) において実施した。国立保健医療科学院短期研修新興再興感染症技術研修にも対応した。大分県水分野連絡会において県内の民間検査機関を対象にした研修を行った。厚労省の生活衛生関係技術担当者研修会、和文総説 6 編に

において成果を解説した。東北地方太平洋沖地震の後、津波に関連したレジオネラ症の届出があったので、感染研のホームページに被災地における注意事項を解説した。

研究分担者・所属機関及び職名

前川純子・国立感染症研究所主任研究官
八木田健司・国立感染症研究所主任研究官
山崎利雄・国立感染症研究所主任研究官
神野透人・国立医薬品食品衛生研究所室長
荒井桂子・横浜市衛生研究所医務職員
磯部順子・富山県衛生研究所副主幹研究員
緒方喜久代・大分県衛生環境研究センター
主幹研究員
大屋日登美・神奈川県衛生研究所主任研究員
烏谷竜哉・愛媛県立衛生環境研究所
主任研究員
杉山寛治・静岡県環境衛生科学研究所
微生物部長
田栗利紹・長崎県環境保健研究センター
主任研究員
中嶋 洋・岡山県環境保健センター
特別研究員
森本 洋・北海道立衛生研究所研究職員
縣 邦雄・アクアス(株)つくば総合研究所所長

A. 研究目的

平成15年2月に公衆浴場における衛生管理要領等が改正され、レジオネラ属菌にかかる規制や浴槽水の消毒方法が明記されたが、一昨年10月以降にもホテルの入浴施設で8人の集団感染、銭湯におけるシャワーや、太陽熱温水器を利用した給湯水による感染事例が報告され、ひき続き、現場の衛生管理の改善が求められている。

レジオネラは環境中に広く存在するため浴槽への混入を防ぐ事は難しく、浴槽水中の菌量を算出し、衛生管理の指標とすることが必須である。しかし、レジオネラの増殖は遅く培養期間が長いという欠点がある。そこで、浴槽水中のレジオネラをリアルタイムPCR等の迅速・簡便に定量化する方法、生菌

のDNAを選択的に増幅する新たな遺伝子検査法(EMA-qPCR)をこれまで評価した。浴槽水由来の菌は、培地で増殖した菌に比べてEMA処理に高感受性であり、浴槽水の生菌数の検査のためには、検査法の改良が望まれている。本研究では改良法を提示する。

現行の塩素消毒法は遊離残留塩素によっており、不連続点処理が前提となっている。しかしながら、泉質、ろ過槽の活性汚泥、配管系のバイオフィーム、あるいは入浴者自体による塩素消費などが想定され、不連続点処理は困難である。結合型塩素であるモノクロラミンは配管系におけるバイオフィーム対策として米国等では遊離塩素に代えて水道水の消毒剤として用いられ、レジオネラによる院内感染を抑制している実績がある。このモノクロラミンを入浴施設の浴槽水の消毒に応用するのは本研究が初めてである。すでにモデル浴槽で有用性を確認済みである。今年度有効性を複数の入浴施設で確認した。本研究ではモノクロラミン消毒を入浴施設で利用可能にする。

水中のレジオネラ属菌数の外部精度管理はヨーロッパで行われ、米国CDCでも開始された。これまで研究班に参加する地衛研、関東地区の地衛研及び1県の民間検査機関で外部精度管理が行なわれた。本研究では、さらに拡大した精度管理を行い問題点を改良し、優良な検査機関に検体が集まるようなシステムを構築し、精度管理が民間で事業として継続できるように検討する。現在、環境水中のレジオネラの検査法は公定法ではなく指針で示されている。検査法の明確化、明確化された検査法の研修による普及を経て外部精度管理を運用するのが妥当と思われる。今年度は、実際に各地衛研で行われている検査法をアンケート調査してまとめた。

さらに、わが国においてレジオネラ症の主要な感染源は温泉などの入浴施設であると推測されているが感染源の不明な例も多い。そこで、レジオネラ症の起因菌株について、レジオネラレファレンスセ

ンターにおいて収集し、遺伝子型別 (SBT、MLVA) を行った。

B. 研究方法および材料

1. 標準菌

1980年にレジオネラ肺炎患者より分離され、わが国における *L. pneumophila* serogroup 1 の基準株として広く用いられている長崎 80-045 株 (齊藤ら、1981) を暫定的な基準株とした。この保存株を BCYE α 培地 (DIFCO) に植え、30°C、4日間培養した。35°Cで培養しないのは、細長い形態の菌となるのを防ぎ正しい DNA-cfu 関係を求めるためである。得られた菌を生理食塩水に McFarland No. 2 程度の濃度に懸濁し、数段階の 10 倍希釈系列を作製し、希釈液ごとに DNA 抽出を行い、あわせて培養による菌数測定を行なった。

2. モノクロラミン消毒の実施

モノクロラミン溶液は、耐薬品性のバケツに入れた温泉水 3 L に、貯湯量 1 m³ 当たりの薬剤量として、6% 次亜塩素酸ナトリウム (オーヤラックス社) を 50 mL、次いで 10% 塩化アンモニウム (和光特級) を 60 mL の順に加えよく混合し作成した (反応式: $\text{NaClO} + \text{NH}_4\text{Cl} \rightarrow \text{NH}_2\text{Cl} + \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$ 、 NH_2Cl がモノクロラミン)。それを直に浴槽水に投入、攪拌することで、ほぼ 3 mg/L のモノクロラミン濃度が得られた。

その後、モノクロラミンの現場での自動生成と源泉タンク内の温泉水への自動注入が可能な装置を開発した。これは 6% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液と 10% 塩化アンモニウム水溶液を水道水に一定比率で混合することによりモノクロラミンを自動生成し、一定の濃度を確保するために必要な容量を温泉水に自動注入する装置 (図 1) である。

3. 消毒副生成物の測定

10 箇所の浴場施設で試料を採取した。午後の営業時間中に浴槽水を採水し、同時刻に浴室内の空気を捕集した。採水は対象とする化学物質の種類毎に、それぞれ水道法の公定法に従いサンプリングした。空気の捕集にはサンプリングポンプ MP-Σ30 (柴田化学) を使用し、揮発性有機化合物 (VOC) は捕集剤

TenaxTA (Supelco)、アルデヒド類は捕集剤 LpDNPH S10 (Supelco) を用いて、それぞれ流速 75 ml/min で 10 分間 (総流量 0.75L)、1000 ml/min で 10 分間 (総流量 10L) 試料を採取した。

浴室空気中のトリハロメタン類 (クロロホルム、ブロモジクロロメタン、ジブロモクロロメタン、ブロモホルム)、ハロアセトニトリル類 (ジクロロアセトニトリル、ブロモクロロアセトニトリル、ジブロモアセトニトリル) 及びアルデヒド類 (ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド) 計 9 物質、並びに浴槽水中のハロ酢酸類 (モノクロロ酢酸、モノブロモ酢酸、ジクロロ酢酸、ブロモクロロ酢酸、ジブロモ酢酸、トリクロロ酢酸、ブロモジクロロ酢酸、ジブロモクロロ酢酸、トリブロモ酢酸) 及びアルデヒド類 (ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、n-ブチルアルデヒド、カプロンアルデヒド) については埼玉県衛生研究所で測定を行い、浴槽水中のトリハロメタン類、ハロアセトニトリル類 (クロロアセトニトリル、ジクロロアセトニトリル、トリクロロアセトニトリル、ブロモクロロアセトニトリル、ジブロモアセトニトリル、ブロモアセトニトリル、トリブロモアセトニトリル、ブロモジクロロアセトニトリル、ジブロモクロロアセトニトリル) 及び NDMA、クロロピクリン、抱水クロラールについては (財) 千葉県薬剤師会検査センターで測定を行った。

水道法の公定法に従い、浴槽水中のハロ酢酸類はメチル誘導体化し GC/MS で、アルデヒド類は PFBOA 誘導体化し GC/MS で、TOC は全有機炭素計 TOC-V CPH (島津製作所) で定量した。

空気中の VOC は加熱脱着-GC/MS で、アルデヒド類は DNPH 誘導体化して HPLC で定量した。

4. 浴槽水の検査

地衛研により 500 mL~1500mL の浴槽水をろ過濃縮 (ADVANTEC あるいはミリポア ISOPORE ; 直径 47 mm のポリカーボネート 0.2 μm , 0.4 μm) した。ろ過のできなかった薬湯等の一部は遠心濃縮し

た。培養法はGVPC培地で37℃、5～7日間培養した。一部にはWYO α 培地やMWY培地も用いて比較した。遊離残留塩素濃度（現場測定、DPD法）を測定した。

DNA抽出はアルカリ抽出法と酵素溶菌法の2方法を用いた。酵素溶菌法では、DNA抽出工程を中性域（pH 7.6のTE緩衝液使用）で行い、Proteinase Kにより溶菌する。さらにDNA回収用シリカ・カラムを使用した。一部にはキレックス樹脂の添加と加熱の手順でDNAを抽出した。

DNA増幅法としては、リアルタイムPCR（ここではサイクリングプローブ法と通常のプローブ法）やLAMP法を用いた。サイクリングプローブ法は、RNAとDNAからなるキメラプローブとRNase Hの組合せにより蛍光を検出し、高感度で非常に配列特異性が高い。LAMP法は、被検試料を恒温で培養し、濁度測定によってレジオネラを検出する迅速簡便な方法である。これら2つの方法は、それぞれ5S rRNA遺伝子、16S rRNA遺伝子という異なる遺伝子を標的にしている。

RNAの抽出は、qRT-PCRの酵素溶菌希釈法に準じた。RT反応にはPrimeScript RT reagent Kit（タカラバイオ）を使用した。

5. 液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（LC法）

1000倍濃縮液100 μ lに酸処理液（0.2M HCl-KCl buffer、pH2.2、関東化学）100 μ lを加えて室温で5分間反応後、MWY液体培地900 μ lを加えて中和した。ボルテックス後、100 μ lをマイクロチューブに分取し、-30℃で保存した（Ct（0h）測定用）。残りの濃縮試料加MWY液体培地1000 μ lを36℃で18時間静置培養後、100 μ lをマイクロチューブに分取した（Ct（18h）測定用、即時処理しない場合は-30℃保存）。

LC法によるレジオネラ陽性の判定は、次の①、②の基準を同時に満たす場合にレジオネラ生菌が存在すると判断した。

- ①Ct（18h）が濃縮試料100 μ l中1 CFUに相当するCt値以下であった場合
- ②液体培養前のCt値（Ct（0h））に比較して培養

18時間後のCt値（Ct（18h））が有意に低下した場合（ Δ Ct = Ct（0h）-Ct（18h）としたとき、 Δ Ctが一定値以上になった場合）

LC法による定量値の算出は、Ct（18h）及びCt（0h）を生菌培養液で作成した検量線に代入し、得られた菌数（真数）の差を生菌の定量値（LC法生菌定量値）とした。

LC qRT-PCR法によるレジオネラ陽性の判定は、加熱殺菌試料のCt値（Ct（H））と未加熱試料のCt値（Ct（N））を比較し、未加熱試料においてCt値の減少（ Δ Ct）が有意にみられた場合にレジオネラ生菌が存在すると判断した。

6. 外部精度管理試料の作製

外部精度管理のための供試菌は、培養検査工程において、レジオネラ属菌として典型的な性状を有し、酸処理、熱処理、各種選択分離培地により大きな影響を受けにくく、さらには、ヒトに対しての感染性が低い（無い）タイプのもものが理想である。そこで、過去の浴槽水検査において、未処理、熱処理、酸処理、熱処理後酸処理、これら全てから、非選択分離培地（BCYE α ：Oxoid社）、選択分離培地（MWY：Oxoid社、GVPC：Merck社）上で有意に発育し、かつ 10^4 CFU/100mL以上検出されたにもかかわらず、施設利用者から感染者の報告がない、*L.pneumophila* SG3野生株を使用した。

液体培地の組成は、Oxoid社のBCYE α 寒天培地をベースに、寒天とActivated Charcoalを除いたものとした。BCYE α 寒天培地で、36℃、40時間培養した供試菌を、液体培地内でマクファーランドNo. 1に調整し、それを同じ液体培地で 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍に希釈したものを供試菌液とした。

調製した菌液に対し、それぞれ前処理（未処理、熱処理：50℃ 20分、酸処理：0.2M HCl・KCl buffer pH2.2を等量加え室温で4分間放置）を行い、BCYE α とMWY寒天培地各2枚に100 μ Lずつ接種（酸処理は200 μ l）し、36℃で7日間培養（毎日観察）後、最終的な菌数を測定し平均値を求めた。この操作を菌液保存0、1、2、3、4、7日目に行った。菌液の保存は郵パックのチルドを想定し5℃で行った。なお、昨年度までの精度管理試行で、加熱

処理後の菌数の低下が著しかったことから、急激な温度変化による影響を避けるために、冷蔵保存菌液を試験前に 36°C、30 分間加温してから、各前処理を行った。

7. *Legionella pneumophila* の遺伝子型の解析

EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections)の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (sequence-based typing, SBT) を行い、遺伝子型を決定した。また、Pourcel らの報告 (J. Clin. Microbiol. 45:1190-9, 2007) に基づき、8 箇所の反復配列領域 *Lpms1b*、*Lpms3*、*Lpms13*、*Lpms17*、*Lpms19b*、*Lpms33*、*Lpms34*、*Lpms35* を PCR で増幅する 8 組のプライマーを用いて、反復塩基配列数が株により異なることを利用した MLVA (multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis) 法による型別を行った。反復数は VNTR を含む PCR 産物のサイズにより求める。

SBT 法では、昨年度に送付されたレジオネラ臨床分離株 28 株 (実際分離年は 2008 年 3 月から 2010 年 3 月) について同定を行い、うち *L. pneumophila* の 25 株、および 2002 年から 2010 年にかけて長崎県の浴槽水から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 の 24 株と、2010 年 9 月から 10 月にかけて全国各地の冷却塔水から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 の 15 株について SBT を行った。

MLVA 法では、すでに SBT による遺伝子型が決定していて各々独立に分離された、*L. pneumophila* 臨床分離株 46 株、土壌分離株 30 株、冷却塔水分離株 29 株、浴槽水分離株 38 株、計 143 株の *L. pneumophila* を用いた。環境分離株については血清群 1 の株を選んだ。

遺伝子型別による菌株間の類縁関係を示すため、BioNumerics (Applied Maths) を用いて、1 遺伝子のみが異なる ST 間をまず最小の長さの枝でつなぎ、それ以上の差異をもつ ST 間を差異数に比例した長さの枝でつなぎ、枝の合計の長さが最小になるように minimum spanning tree を作成した。また、得られた型別数と各株数から index of discrimination (D 値)

を計算した。これは、2 つの株が集団から無作為に選ばれたときに、互いに異なる型となる割合を示す値で、型別能の目安となる。次の式で計算できる。

$$D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

N, 総株数; n_i , i 番目の型に属する株数

8. *Mycobacterium avium* の VNTR 法による遺伝子型

平成 16 年度～平成 18 年度間にホテル、旅館、又は公衆浴場等より採取された浴槽水 100ml の遠心分離後の沈渣を、1ml の滅菌精製水に再懸濁した。この懸濁液に 1ml の 4%NaOH を加えて、室温で 20 分間処理後、このアルカリ処理液 0.1ml ずつを 2～3 本の 2%小川培地に接種し 36±1°C で培養し、コロニーの出現状況を毎週観察した。コロニー陰性の場合には 8 週間まで培養した。検出された菌を、チール・ネルゼン染色法で抗酸菌であることを確認した。極東抗酸菌鑑別セット (極東製薬工業)、DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) 試験 (極東製薬工業)、16S-rRNA の DNA のシーケンスにより同定した。今年度は、当研究室にて冷凍保存された *M. avium* 50 株を用いた。その分離された由来菌株の内訳は、ヒト 22 株、鳥 11 株、象 1 株、関東地方にある温泉地のホテル、旅館、公衆浴場および社会福祉施設等の浴槽水 12 株や濾材 4 株である。

PCRは、西森らの方法を元に15種類のプライマーセットを用いた。電気泳動後、サイズマーカーより増幅産物のバンドのサイズを簡易的に計測して、西森等の換算表にしたがって反復配列のコピー数 (TR数と略す) を求め、アリルプロファイルを作成し、Bio Numerics ver.5.1ソフトを用いてMinimum spanning tree法により解析した。

9. 感染の地域性

平成 18～22 年の 5 年間の浴用水のレジオネラ汚染実態調査で得られた浴用水の性状とそれらから分離されたレジオネラ属菌を対象に行った。データは東部 (E) (朝日町・魚津市・上市町・黒部市・立山町・富山市・滑川市・入善町) と西部(W) (射水市・小矢部市・高岡市・砺波市・氷見市・南砺市) に大きく分けて比較した。はじめに浴用水から分離されたレジオネラ属菌と浴用水の遊離残留塩素濃

度（残塩）などの特性との関連性を調べた。次に、患者から分離される *L. pneumophila* 血清 1 との関連が報告されている *lag-1* 遺伝子 (J.Clinical Microbiology 2009 vol.47, 2525-2535) について、患者 24 名および浴用水 55 件から分離された *L. pneumophila* 血清 1 における保有状況を調べた。

県内の公衆浴場およびスポーツ施設 96 施設の浴用水 260 件（東部 122 件、西部 138 件）について調査した。採水は厚生センターおよび浴用施設に協力を依頼した。おもな調査項目は pH、残留遊離塩素濃度（残塩）と、一部の浴用水については、従属栄養細菌数について検討した。

患者株は医療機関あるいは富山県衛生研究所で、また、浴用水株は富山県衛生研究所で分離した。血清型はレジオネララテックステスト (OXOID) とレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) による凝集反応で決定した。また、患者からの分離株 25 株はレファレンス事業として感染症研究所に送付し、Monoclonal Antibodies (MAb) 型別、SBT 型別を依頼した。

10. アメーバと微生物の共生

自由生活性アメーバ類の生態とヒトの生活様式との関係を考慮し、浴槽水あるいはハウスダストをアメーバの採取材料とした。アメーバ分離は大腸菌塗布寒天培地を使用し、30℃で培養した。なお、浴槽水試料分離株は平成 12 年から 15 年、ハウスダスト分離株は平成 5-6 年の調査で分離されたもので、共生体を持つことをギムザ染色で確認後、一部は培養株として保存し、残りは DNA 試料として保存した。

無菌培養株を 15ml 遠心管に回収し、1,000xg、5 分間の遠心を 2 回行って培地を除去した。ペレットの一部をスライドグラスに径 1cm ほどの円となるように塗り広げ風乾、メタノール固定の後、ギムザ染色した。Chlamydiales 関連の共生体の 16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅し塩基配列を決定した。その後 BLAST を用いて GeneBank に登録されたデータに対する相同性の比較を行った。系統解析は CLUSTAL W を用いた。

11. 倫理面

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規

定にしたがい、周辺の環境の汚染を引き起こさず、個人情報保護に十分に配慮して行われた。

入浴施設における消毒剤としてモノクロラミンを使用するにあたり、関係者に周知した。

(循環ろ過式入浴施設例) 調査に先だって、管轄保健所および衛生管理者等施設関係者に対する調査の目的、調査期間、塩素系消毒剤としてのモノクロラミンの性質、当該消毒剤の投与方法、投与場所およびその管理方法についての周知、並びに施設利用者に向けた当該消毒剤使用とその目的の告知を行ない、匿名にて感想意見を聴取した。

(掛け流し式入浴施設例) 入浴者への情報提供として、「浴槽水のモノクロラミン消毒の実施」を口頭で告げるとともに、浴場の壁面にその旨掲示した。

C. 研究結果および考察

1) モノクロラミン消毒による入浴施設の衛生管理

塩素管理下で pH \geq 8.0 を示す温泉水を利用した循環ろ過式入浴施設において、モノクロラミンによる浴槽水の消毒効果を検証した。杉山らの方法に基づき 1 週間にわたり手投入で管理した結果、途中でモノクロラミン濃度は温泉水補給時には大きく低下したものの、レジオネラ属菌、従属栄養細菌、およびアメーバは全く検出されなかった。モノクロラミン濃度は測定値が投与量に比例し、全塩素濃度と平行して推移したことに加え、現地と実験室の値にほとんど差が認められなかった。モノクロラミンによる浴槽水の衛生管理は営業施設においても有用なことが示された。コストは年間 34 万円でそれまでの消毒剤と同程度であった。

次に、掛け流し式浴槽にモノクロラミン消毒を導入した。アルカリ性 (pH9.0) の源泉タンク内の温泉水へ、次亜塩素酸ナトリウムと塩化アンモニウムを混合することにより自動生成したモノクロラミンを自動注入し、温泉水中のモノクロラミン濃度 (3.3mg/L) を保持した。2ヶ月間に 7 回分析し、各浴槽水のモノクロラミン濃度は、ヒトの入浴によっても大幅な減少はなかった(表 1)。事前に継続的に浴槽水からレジオネラが検出されていたものの、消毒後はレジオネラ属菌、アメーバは検出されず、従

属栄養細菌数もほぼ不検出と細菌学的に良好な成績であった(表 2)。モノクロラミン消毒後の源泉タンク水や各浴槽水における水質検査では塩素臭の原因となるトリクロラミンはまったく検出されず(表 1)、入浴者 29 名へのアンケートでも臭気や肌感覚で違和感を感じる者はなかった(表 3)。モノクロラミンの投入や入浴等による浴槽水の pH、過マンガン酸カリウム消費量、TOC などの水質の推移を表 3 に示した。入浴に伴う有機物等の増加や、モノクロラミンの投入に伴うアンモニア態窒素の増加が観察された。モノクロラミン消毒は、次亜塩素酸ナトリウムによる消毒が困難といわれるアルカリ泉質温泉水の新しい消毒方法として期待できる。

今回製作したモノクロラミン生成装置は、モノクロラミンを毎時 32g 連続的に生成することが出来た。生成量の増減は±50%以上可能である。毎時 10.8m³で流出する温泉水に対して連続的に添加することで、温泉水中のモノクロラミン濃度を安定して 3mg/L に維持することが出来た。温泉水中のレジオネラ属菌を 2 ヶ月にわたり不検出 (10CFU/100mL 未満) に出来ている。本装置の設置費用は 747,495 円 (工事費含まず)、一ヶ月間の運転コスト(薬品代)は現状 100,940 円である。残留塩素濃度計 CL-310W-1A 型(表示部改造品)は、モノクロラミン濃度(残残留塩素濃度)を 0.7~3.5mg/L の範囲で計測できた。今後、計器によるモノクロラミン濃度自動制御に適用可能と考えられる。

2)消毒副生成物の暴露評価

消毒副生成物暴露の健康リスクを精査する必要がある。モノクロラミン処理浴槽水中の消毒副生成物と比較するため、塩素消毒を行っている入浴施設(表 4)においてアルデヒド類を含め消毒副生成物濃度を調査した。いずれの施設の浴室空気中からもクロホルム (15-111 µg/m³) をはじめとするトリハロメタン類やジクロロアセトニトリル (0.37-7.7 µg/m³)、ブromokloroアセトニトリル (0.95-5.8 µg/m³) が検出された。浴槽水中からはこれらの消毒副生成物に加えて、ジクロロ酢酸 (5.3-43 µg/L) やトリクロロ酢酸 (2.0-50 µg/L) が比較的高濃度で検出された。また、N-ニトロソジメチルアミンとクロ

ロピクリンはいずれの浴槽水でも不検出 (それぞれ<0.01 µg/L、<1.0 µg/L) であったが、抱水クロラールが高濃度 (4-110 µg/L)であることが初めて判明した(表 5)。

TOC と浴槽水中の全消毒副生成物濃度 (トリハロメタン類、ハロ酢酸類、ハロアセトニトリル類、アルデヒド類及び抱水クロラールの合計) の関係について検討を行った結果、図 2 に示したように両者の間には統計的に有意な正の相関 (Pearson $r = 0.913$, $p < 0.01$) が認められ、浴槽水の TOC が消毒副生成物の生成量を推定する上で良い指標となる可能性が示唆された (尚、施設 No.9 で使用されている消毒剤ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムは浴槽水の TOC に影響を及ぼすことから、同施設のデータを除外して相関解析を行った)。

3) 液体培養 (Liquid Culture) 定量逆転写 (RT) -PCR を用いたレジオネラ属菌迅速検査法

入浴施設等の環境水を対象としたレジオネラ属菌の迅速、簡便かつ精度の高い検査法を開発する目的で、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (以下、LC 法) の適用を検討した。

循環式浴槽施設から得られた 68 件の試料を用い、平板培養法におけるレジオネラ検出の有無と、LC RT-qPCR 法における液体培養前後の Ct 値の推移について検討した (図 3)。レジオネラ陰性検体 (○) は Ct (0h) と Ct (18h) の値がほぼ一致し、図 1 の右上から左下に掛けての対角線上にプロットされたが、Ct 値が大きい検体 (図 1 左下) ほどプロットが対角線から離れ、データの安定性が損なわれる傾向がみられた。一方、レジオネラ陽性検体 (●) では Ct (0h) よりも Ct (18h) が低値を示し、対角線の左上方にプロットされた。図 1 対角線左上の点線は $\Delta Ct = 1$ のラインを示す。

①濃縮試料を液体培地で 18 時間培養した際の Ct 値 (Ct (18h)) が 34 未満、②培養前の Ct 値 (Ct (0h)) との差 (ΔCt 値) が 1 以上、の基準①②を同時に満たす場合にレジオネラ生菌の存在が予測可能であった (表 6)。公衆浴場法等で水質基準が定められている浴槽水及び原水 61 件を対象に、LC 法と平板培養法の検出結果を比較したところ、LC 法は感度

85.7%、特異度 100%であり、平板培養法の結果を迅速に予測できると考えられた。逆洗水を含めた全試料の場合に感度が 60%と低かったのは、微生物汚染の激しいろ過器逆洗水では共存微生物との競合で液体培養時のレジオネラ増殖が阻害され、LC 法で偽陰性となった可能性が考えられた。定量値においても両者は高い相関を示し ($R^2=0.86$ 、図 4)、LC 法により施設の汚染状況を迅速に評価できることが明らかとなった。本法は、検体搬入から最短 21 時間程度で生菌の有無と汚染レベルが判明することに加え、死菌量により潜在的な汚染リスクが評価可能であり、施設の衛生管理及び指導に十分活用可能と考えられた。

LC 法のもう一つの問題として、検量線作成の煩雑さと不安定さが挙げられる。菌株の状態や液体培地の組成などの条件を統一しても、検量線にバラつきがみられる傾向にあった。今回は、複数の施設で一致した検量線を採用して定量値を算出した結果、平板培養法と高い相関が得られたが、それ以外の検量線を用いれば、定量値が平板培養法の結果を予測できず、誤判定を招く原因となる。この理由としては、環境から検出されるレジオネラと、培地上で作成したレジオネラの rRNA 量の違いが考えられる。検量線の問題は、別の浴槽水試料を用いた検討でも指摘された。

なお、分担報告書の資料 A に液体培養時に使用する活性炭として、基準である Norit SA2 以外の製品を使用すると rRNA の増幅が少なく感度が低下する例を示した。

4) 地方衛生研究所に対するレジオネラ属菌検査法のアンケート調査

レジオネラ属菌検査については、これまで行政検査機関と民間検査機関の結果が大きく異なることがあった。そこで、地方衛生研究所のレジオネラレファレンスセンターを中心メンバーとしたレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ (WG) を発足し、これまでの精度管理の検証を含めた今後の方向性(考え方、検査法、評価法等)の検討を 3 回にわたって行った。今年度の中心的事業として、精度管理および標準的な検査法等の方向

性を適切に判断するための一助として、本 WG 内で作成したアンケートを基に、全国 77 か所の地方衛生研究所に対しレジオネラ属菌検査方法の実態調査による行政機関の検査状況把握を行った。検査法は、これまでも SOP の基となる文献が多数あること、各文献で記載されている内容が異なる場合があること、また、検査工程については検査者自身によって選択の幅があることが指摘されていた。全体として、本実態調査結果においても同様の傾向が見られ、検査工程の違いが認められた。これは、未研修で検査を導入している施設が多数あったこと、標準とする検査法が多様であることが理由と思われるが、このことが施設間での検査精度に影響を与えている可能性も考えられた。民間検査施設に対しても同様の傾向が言えると思われる。標準的な検査法の整理と提示、研修システムの構築、精度管理の 3 点を柱とし、行政・民間を問わず検査精度の安定に向けた取り組みを進める必要があると思われる。

アンケート結果の一部を紹介する。22% (16/71) が研修後に検査を導入し、49% (36/74) が安全キャビネットを利用していた。63% (47/75) が検査に不安を感じ、91% (68/75) が検査法の統一が必要だとした。

採水時にチオ硫酸ナトリウムによる中和を 92% が行っていたが、行わない施設も 8% あった。搬送温度は 68% (51/75) が冷蔵、27% (20/75) が室温であった。

検体の濃縮には、ろ過法が 65% (49/75)、遠心法が 35% (26/75)。検水量 500mL が 73% (36/49)、次いで 1L が 20% (10/49) であった。ろ過法で使うフィルターは、ポリカーボネートが 61% (30/49)、セルロース混合エステルが 31% (15/49) であった。ポアサイズは、61% (30/49) が 0.2~0.22 μm 、39% (19/49) が 0.4~0.45 μm であった。遠心法では検水量 200mL が 79% (26/33) であった。遠心加速度は 67% (22/33) が 6000g 以上、残りは 3000~6000g 未満。遠心時間は、82% (27/33) が 30 分間。上清除去は、70% (23/33) でデカンテーション。沈渣の希釈は 78% (25/32) で滅菌蒸留水によった。

前処理は 54% (40/74) が酸処理、14% (10/74) が熱処理で、酸処理、未処理の並列が 12% (9/74)、未処理・酸処理・熱処理の並列が 11% (8/74)、加熱後酸処理が 5% (4/74) であった。加熱時間は、20 分間が 60% (23/39)、30 分間が 38% (15/39) であった。酸処理時間は、41% (27/66) が 4 分、33% (22/66) が 5 分、9% (6/66) が 10 分であった。

5) 外部精度管理試料安定化に向けた取り組み

昨年度までの精度管理施行に伴い報告された課題点の一つに、配布用試料の安定性が指摘されていた。そこで今回、外部精度管理試料安定化に向けた取り組みとして、液体培地を利用した試料作製を試みた。本法による模擬試料は、作製後 1 週間以内に検査ができるのであれば、未処理、酸処理の場合、非選択培地、選択培地（今回は MWY 寒天培地）に関係なく、オーダーの減少もなく検査結果を求めることができた。熱処理については試料作製 3 日目以内であれば、同じ結果を求めることができると思われたが、保存期間が長くなるほど、熱処理による影響が認められた。このことから、熱処理を想定した模擬試料を作製することは容易な事ではなく、供試菌の選択を含めた十分な検討が必要であると思われる（表 7）。

精度管理については、検査のどの部分に重きを置くかが重要になると思われる。夾雑菌の減少のための処理として外部精度管理においては酸処理に限定するのも一法である。加えて複数の担当者間で比較的簡易に調製ができるような、試料作製方法であることが望ましい。

6) Legionella pneumophila の SBT 法による遺伝子型別法

Legionella pneumophila を収集して、SBT (sequence-based typing) 法を用いて遺伝子型別を行った。重複していると考えられる菌株を除くと、臨床分離株 25 株、浴槽水分離株 18 株、冷却塔水分離株 15 株について型別を行った。臨床分離株は 21 種類に、浴槽水分離株（表 8）は 15 種類に型別され、多様であったが、冷却塔水分離株は 3 種類に分けられ、13 株が ST (sequence type) 1 となり、多様性に乏

しかった（表 9）。この「臨床分離株と浴槽水分離株は多様性にとみ、冷却塔水分離株は ST1 が多く、多様性に乏しい」という傾向が、近年も続いていることが確認できた。臨床分離株では ST23 が増えているという傾向がわかった。また、以前調べた日本国内の浴槽水分離株の傾向が特定の地域（長崎県）を集中して調べても同様であること、関東地方中心だった 2006 年以前の冷却塔水分離株の傾向についても、今回の 2010 年の全国規模での菌株収集でも同様であることがわかった。臨床分離株の遺伝的多様性はレジオネラ症の主要な感染源である浴槽水に由来する菌株の多様性を反映していると考えられるが、感染源不明の事例も多くあることから、従来の感染源と考えられる水系からの分離株をさらに調査するとともに、まだ調べられていない水系からの分離株の調査の必要性も示唆された。

7) Legionella pneumophila の MLVA 法による型別

L. pneumophila 臨床分離株 40 株、土壌分離株 26 株、冷却塔水分離株 28 株、浴槽水分離株 34 株の計 128 株の VNTR 解析を行ったところ、73 種類に分類された。今回解析した 128 株について、すでに結果が得られている SBT 法では 68 種類に分類されたので、MLVA 法の分解能は SBT 法と比較して同等以上であり（表 10）、手法も簡便だった。しかし、MLVA 法で同一遺伝子型を示したものを SBT で細分化できる場合があり（図 5）、SBT のデータベースが世界規模で整備されている現状を考えると、両手法を併用することが有効だと考えられた。現在、感染源の特定のための最適法と考えられているパルスフィールドゲル電気泳動法と比較しても簡便であり、感染源の特定のための菌株の迅速なスクリーニングにも適していると考えられる。

8) Mycobacterium avium の VNTR 法による型別

M. avium 症患者と、この患者宅の 24 時間循環式風呂濾材から分離された 3 株の *M. avium* について、アリルプロファイルを作成したところ、濾材由来の 3 菌株と患者由来株のアリルプロファイルは、良く一致していた。

由来が異なる *M. avium* 50 株を用いて VNTR 法をおこなったところ象 1 株と鳥由来 3 株は、全く同じ

パターンを示した。ヒトおよび浴槽水由来の *M. avium* のアリルパターンは複雑であった。Minimum spanning tree 法により3つのグループに大別された(図6、円内の数字は菌株の識別番号を示す)。鳥由来の *M. avium* がヒトや浴槽水由来の *M. avium* と離れた位置にあることは興味深い。

9) 感染の地域性とその原因

富山県におけるレジオネラ症報告数の地域差の原因を明らかにするため、平成18~22年の5年間に得られた浴用水の状況とそれらから分離されたレジオネラ属菌を対象に地域間の特性を比較した。その結果、レジオネラ症報告数の多い西部では、患者から分離される頻度の高い *L. pneumophila* 血清群1 (*lag-1+*) が遊離残留塩素濃度の高い浴用水から分離されていることが明らかとなった(図7, 8)。このことから、塩素消毒により *L. pneumophila* 血清群1 (*lag-1+*) が選択的に生残り、結果として感染の確率を高めている可能性が推察された。

10) *Legionella* 以外の微生物とアメーバの共生

環境中に生息する *Acanthamoeba* を対象に、ギムザ染色で細胞内の共生微生物(共生体)が確認された共生アメーバのDNAアーカイブ標本を材料として、遺伝子解析による共生体の同定を行った。温泉浴槽水等の温水環境より分離したアメーバ75株ならびにハウスダストより分離したアメーバ59株から、それぞれ共生アメーバが9株、13株の合計22株検出された。16SrRNAのシーケンス解析に基づく同定の結果、14株の共生体がクラミジア類に分類され、ヒトの呼吸器疾患との関連性が知られる *Parachlamydia* 科と相同性が一致する共生体も含まれた(図9)。また桿菌様の共生体も検出され、細胞内寄生性が知られるリケッチア属のものも含まれた。ほとんどの共生体との関係において、共生アメーバは安定した共生関係を維持しているものと考えられ、アメーバに対する病原性は極めて低いものと想定された。今後は *Parachlamydia* 科の共生体を中心に、アメーバ共生体のヒトの健康に及ぼす影響に関するエビデンスの蓄積が重要と考えられた。

11) シャワー水等の調査

2009年10月の東京都内の公衆浴場のシャワー水

を感染源とするレジオネラ症が報告され(病原微生物検出情報31:331-2, 2010)、同年12月に汚染状況が調査され12施設の内6施設のシャワー水からレジオネラが培養法で検出された(病原微生物検出情報31:332-3, 2010)。その後の調査を6施設について2011年2月から3月に行ったところ、すべて培養陰性であったが、2施設からLAMP法でレジオネラが検出された。検出された検体は1施設でシャワー水、もう1施設で調節箱と浴槽水の3検体であった。浴槽水からレジオネラの遺伝子が検出された施設において8日後の塩素投入前の採水で少数の菌が浴槽水から培養で確認された。

結論

わが国におけるレジオネラ症の集団発生は主として入浴施設を介して起きており、浴槽水中のレジオネラ増殖が大きな問題となっている。これまで浴槽水は次亜塩素酸ナトリウムにより主として消毒がなされてきたが、アルカリ泉質の温泉水は次亜塩素酸ナトリウムによる消毒が困難である。今回モノクロロミン消毒を掛け流し式、循環ろ過式の入浴施設で実施して期待できる結果が得られた。別の10箇所の浴場施設について浴槽水及び浴室空気中の消毒副生成物について調査を行い、抱水クロラールが浴槽水中に高濃度に存在することを明らかにした。また、浴槽水のTOCと全消毒副生成物濃度の間に高い相関がみとめられ、消毒副生成物の生成量を予測する上でTOCが有用な指標となる可能性が示された。今回の消毒副生成物プロファイルを踏まえ、モノクロロミン処理を行った浴場において今後調査を実施する。

現行の培養法では、結果判定までに1週間程度を要しているため、関係者からは迅速な汚染度評価方法に関する要望が強い。そこで、浴槽水及び原水を対象に、液体培養(Liquid Culture)定量RT-PCR法(LC法)と平板培養法の検出結果を比較したところ、LC法は感度85.7%、特異度100%であり、平板培養法の結果を迅速に予測できることが明らかとなった。定量値においても、両者は高い相関を示し($R^2=0.86$)、施設の汚染状況を迅速に評価できると

考えられた。本法は、検体搬入から最短 21 時間程度で生菌の有無と汚染レベルが判明することに加え、死菌量から潜在的な汚染リスクが評価可能であり、施設の衛生管理及び指導に十分活用可能と考えられた。

環境水のレジオネラ検査について、SOP の基となる複数の文献で、記載されている検査法の内容が異なる場合があること、検査者自身によって選択の幅がある検査工程があることが指摘されている。未研修で検査を導入している施設が多数あったこと、標準とする検査法が示されていないことが精度管理を実施する上で影響を及ぼす可能性がある。標準的検査法については、各検査機関で、費用、設備等を考慮した検査体制が既に整備されているが、事件対応における行政検査のようにより高い検出精度が求められる場合と、自主検査のような日常の衛生管理を区別し検査手技の設定を変えることも視野に入れ検討する必要がある。アンケート結果から、約 91% の施設が検査法の統一が必要であると回答していた。標準的な検査法の整理と提示、研修システムの構築、精度管理の 3 点を柱とし、検査精度の安定に向けた取り組みを進める。精度管理試料については、長期間の冷蔵や冷凍保存、酸処理や熱処理、各種選択分離培地の影響を受けないことが理想であるが、そのような試料の作製は容易なことではない。そのため、場合によっては精度管理を行うための検査法は通常の検査法とは別で考え、例えば、熱処理は行わない方法も視野に入れての総合的な検討が必要である。

L. pneumophila の臨床分離株、*L. pneumophila* 血清群 1 の浴槽水及び冷却塔水由来株について sequence-based typing (SBT) を行った。臨床分離株と浴槽水分離株は多様であったが、冷却塔水分離株は多様性に乏しい傾向近年も続いていることが確認できた。また、同一地域で ST93 型による感染源不明のクラスターが検出された。一方、multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) 法を用いて型別すると、一部の領域について PCR 産物が得られなかった株があったが、分解能は SBT 法と同等かそれ以上で SBT 法やパルスフィールドゲル

電気泳動法に比べ簡便であった。

Mycobacterium avium は非結核性抗酸菌症の原因菌のうち臨床的に重要である。ヒト、動物、公衆浴場の浴用水等から分離された *M. avium* の縦列反復数可変領域 (VNTR) のパターンを Minimum spanning tree 法により解析し、*M. avium* が 3 つのグループに大別される事が分かった。

感染の地域性の原因を探るなか、症例数の多い地域で遊離残留塩素の“多い”浴槽水から *lag-1* 遺伝子陽性の菌 (臨床分離株に多い) が分離されていた。浴用水の衛生管理を塩素剤だけに頼らず、他の手法も併用すべきと思われる。

環境中に生息する *Acanthamoeba* の共生体として、ヒトの呼吸器疾患との関連性が知られる *Parachlamydia* 科の共生体を含む多様な共生体を検出した。共生アメーバは安定した共生関係を維持し、アメーバに対する病原性は極めて低いものと想定されたが、ヒトへの健康に及ぼす影響は *Parachlamydia* 科の共生体を始めとして、エビデンスの蓄積が重要と考えられた。

D. 健康危険情報
なし。

E. 研究発表

1. 論文・総説発表

- 1) Matsui M, Fujii S, Shiroiwa R, Amemura-Maekawa J, Chang B, Kura F, Yamauchi K. Isolation of *Legionella rubrilucens* from a pneumonia patient co-infected with *Legionella pneumophila*. J. Med. Microbiol. 59:1242-6 (2010)
- 2) Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, Watanabe H; Working Group for *Legionella* in Japan. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. J. Med. Microbiol. 59:653-659

(2010)

- 3) Taguri T, Oda Y., Sugiyama K., Nishikawa T, Endo T, Izumiyama S, Yamasaki M., and Kura F: A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of legionellosis in bath water. *J. Microbiol. Methods* (in press).
 - 4) 縣邦雄: レジオネラ症のリスクマネジメント
レジオネラ属菌の制御方法、防菌防黴
38(4):259-71(2010)
 - 5) 荒井桂子: レジオネラ症のリスクマネジメント
レジオネラ属菌の検査 遺伝子検査、防菌防
黴 38(4):251-8(2010)
 - 6) 荒井桂子: 浴場施設におけるレジオネラ対策、
環境と病気 19(1-2): 26-7(2010)
 - 7) 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣邦雄, 遠藤
卓郎, モノクロラミン消毒による浴槽レジオ
ネラ属菌の衛生対策, 保健医療科学, 59(2)
p.109-115 (2010)
 - 8) 倉 文明, 常 彬, 前川純子: レジオネラの
環境中での生態とその迅速検出、化学療法
の領域、26(12): 2385-94, 2010.
 - 9) 前川純子, 倉 文明: レジオネラ感染の分子機
構と診断法の進歩、呼吸 30(2):124-8(2011)
 - 10) 国立感染症研究所 細菌第一部・感染症情報
センター: 被災地におけるレジオネラ症につ
いて、
[http://idsc.nih.go.jp/earthquake2011/RiskAssessm
ent/20110325rejonera.html](http://idsc.nih.go.jp/earthquake2011/RiskAssessment/20110325rejonera.html)
2. 学会発表
- 1) Junko Amemura-Maekawa, Kiyomi Kikukawa, Akiko Kaneko, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Katsunori Furuhashi, Yuki Tada, Miyo Murai, Bin Chang, and Fumiaki Kura. Sequence types of *Legionella pneumophila* isolates from patients and environments in Japan. 25th Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Copenhagen, Denmark. Sep 2010.
 - 2) Kura F, Amemura-Maekawa J, Chang B, Kuroki T: The links between *Legionella* concentrations in spa water and outbreaks of legionellosis. 25th Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Copenhagen, Denmark. Sep 2010.
 - 3) 荒井桂子, 加藤元規, 望月圭太, 坂井暁子, 坂東奈緒子, 鈴木かおる, 古藤絵美, 小寺由美, 白川 冬, 丸山真紀, 中壺 文, 待永洋子, 山下聡子, 高瀬真理, 坂井雄太, 佐藤宏士, 玉崎悟: オーバーフロー回収槽を設置した浴場施設からのレジオネラ属菌検出状況. 日本防菌防黴学会第 37 回年次大会, 東京 (2010.9)
 - 4) 杉山寛治, 神田隆, 西尾智裕, 八木美弥, 田栗利紹, 泉山信司, 八木田健司, 倉文明, 小坂浩司, 遠藤卓郎, 循環ろ過式浴槽モデルにおけるモノクロラミンの消毒効果, 日本防菌防黴学会第 37 回年次大会, 東京 (2010.9)
 - 5) 神田隆, 高橋奈緒美, 八木美弥, 西尾智裕, 杉山寛治, 泉山信司, 常 彬, 倉文明, 遠藤卓郎, EMA-qPCR による浴槽水中のレジオネラ生菌検出法の検討, 日本防菌防黴学会第 37 回年次大会, 東京 (2010.9)
 - 6) 神野透人, 高橋淳子, 竹熊美貴子, 香川 (田中) 聡子, 古川容子, 泉山信司, 遠藤卓郎: モデル浴槽のモノクロラミン消毒副生成物に関する暴露評価. 日本防菌防黴学会第 37 回年次大会 (2010.9)
 - 7) 前川純子, 菊川紀世己, 常 彬, 村井美代, 山崎利雄: レジオネラ属菌の菌種同定と遺伝子型別. 第 22 回日本臨床微生物学会総会. 岡山 (2011.1)
 - 8) 荒井桂子: 社会福祉施設の機械浴槽環境におけるレジオネラ属菌の検出状況、第 26 回日本環境感染学会、横浜 (2011.2)
 - 9) 竹熊美貴子, 吉田栄充, 澁木優子, 香川 (田中) 聡子, 神野透人, 西村哲治: 遊泳用プールにおける水中及び室内空気中の消毒副生成物調査. 日本薬学会第 131 年会, 静岡 (2011.3)
 - 10) 緒方喜久代, 若松正人, 成松浩志: 水環境にお

けるレジオネラ属菌の生息状況. 大分感染症研究会第48回例会, 大分 (2011.3)

F. 知的財産権の出願・登録状況

前川 純子、渡邊 治雄、倉 文明、常 彬、森林 敦

子、杉江 元、早川 洋一：新規イソクマリン系
蛍光物質. 特許第 4590625 号. 登録日 2010 年 9
月 24 日. (レジオネラ菌体に由来する蛍光物
質)

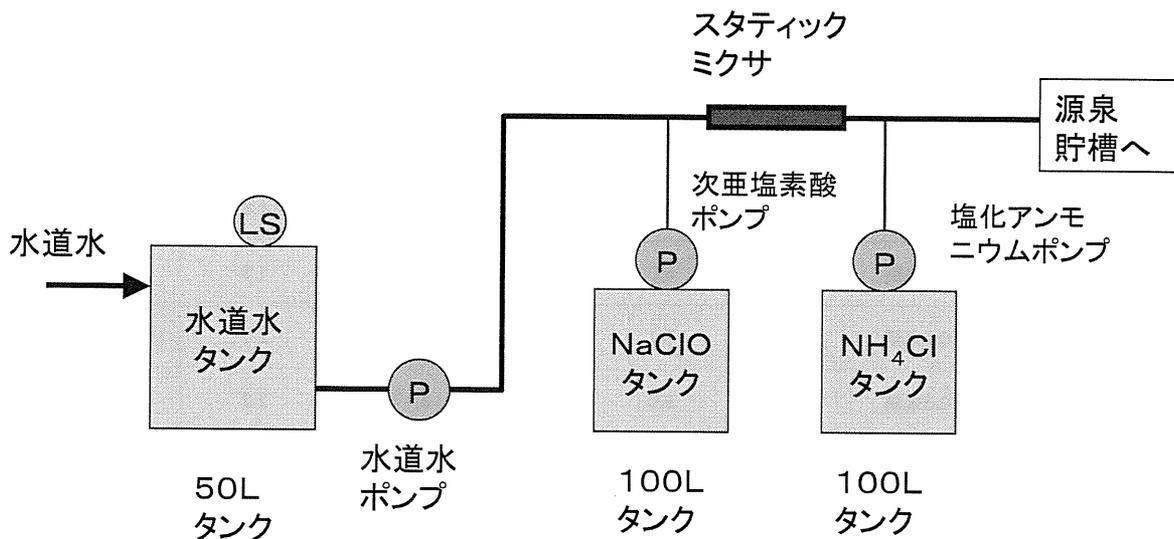


図1. モノクロラミン生成装置のフロー図

表1 源泉タンク内へ自動生成したモノクロラミンを自動注入時の各種塩素等の濃度

No	採水時期	現地測定(ポータブル測定器)				科学院測定(精密検査)				
		遊離塩素	モノクロラミン	遊離アンモニア	全塩素	遊離塩素	モノクロラミン	ジクロラミン	トリクロラミン	トリクロラミン
		DPD(HACH)	MC(HACH)	NH3(HACH)	DPD(HACH)	DPD/FAS	DPD/FAS	DPD/FAS	DPD/FAS	HS-GC/MS
1	モノクロラミン消毒前 源泉水	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
2	消毒後の源泉タンク 内温泉水	0.12	3.05	0.75	2.55	ND	2.7	0.06	ND	ND
3	B浴槽水	0	3.3	0.65	2.7	ND	2.7	0.07	ND	ND
4	A浴槽水	0	3.2	0.8	2.8	ND	2.8	0.04	ND	ND
5	C浴槽水	0	3.6	0.65	2.85	ND	2.8	0.06	ND	ND

注: 数値の単位はmg/L ND:検出せず

表2 源泉タンク内へ自動生成したモノクロラミンを自動注入時の細菌学的検査結果

No	採水場所	試料の種類	レジオネラ (CFU/100ml)	一般細菌数 (CFU/ml)	従属栄養細菌数 (CFU/ml)	アメーバ数 (CFU/50ml)
1	モノクロラミン消毒前	源泉水	1.4×10^3	2.1×10	7.2×10^2	検出不能 (粘菌様微生物多数)
2	消毒後の源泉タンク内水	温泉水	<10	0	6	0
3	B浴槽水	浴槽水	<10	0	0	0
4	A浴槽水	浴槽水	<10	0	0	0
5	C浴槽水	浴槽水	<10	0	0	0

CFU: Colony Forming Unit

表3 モノクロロミンの投入や入浴による浴槽水の水質の推移

試料名	項目	残留塩素 (mg/L)	色度 (度)	濁度 (度)	pH	電気伝導率 (mS/m)	アンモニア態窒素 (mg/L)	有機物等 ^{注1)} (mg/L)	TOC ^{注2)} (mg/L)
A浴槽水 モノクロロミン投入前		0.0	0.5未満	0.1未満	9.0	128	0.05未満	1.3	0.3未満
A浴槽水 濃度調整直後		0.0	0.5未満	0.2	9.0	118	2.28	1.3	0.3未満
A浴槽水 入浴終了時		0.0	0.5未満	0.2	9.1	120	2.04	2.7	0.3未満
B浴槽水 濃度調整直後		0.0	0.5未満	0.1	9.0	106	3.17	2.2	0.3未満
B浴槽水 入浴終了時		0.0	0.5未満	0.3	9.0	99	1.79	2.2	0.3未満

注1) 有機物等＝過マンガニ酸カリウム消費量

注2) TOC＝有機物(全有機炭素(TOC)の量)

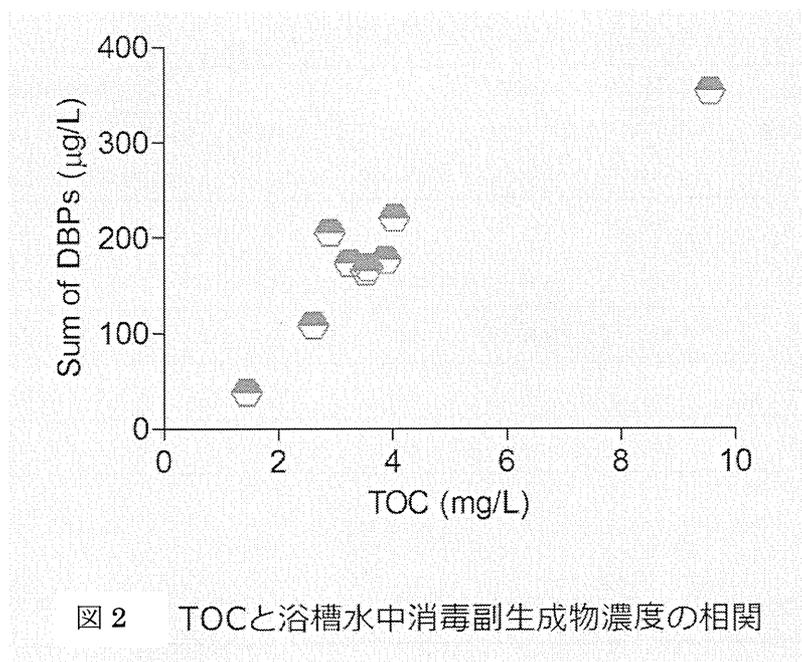


図2 TOCと浴槽水中消毒副生成物濃度の相関