

201134019A

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
(課題番号：H22-健危-一般-014)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 倉 文明

平成 24 年 (2012) 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. モデル浴槽水におけるモノクロラミン生成・注入・測定の自動化-----	29
杉山寛治、神田 隆、市村祐二、江口大介、泉山信司、八木田健司、小坂浩司、遠藤卓郎	
2. モノクロラミン消毒による入浴施設の衛生管理 実際の入浴施設における注入・測定の自動化-----	37
縣 邦雄、田栗利紹、杉山寛治、神澤 啓	
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）-----	47
田栗利紹、縣 邦雄、杉山寛治、泉山信司、小坂浩司	
4. フローサイトメトリー法における不連続点を越えた塩素消毒の清浄化判定-----	53
田栗利紹、小坂浩司、泉山信司、小田康雅、山崎雅之	
5. 消毒副生成物の暴露評価-----	59
神野透人、竹熊美貴子、高橋淳子、香川(田中)聡子	
6. 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改良-----	69
鳥谷竜哉、荒井桂子、磯部順子、田栗利紹、八木田健司、矢崎知子、金谷潤一	
7. 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-----	95
荒井桂子、吉川循江、田中礼子、堀切佳代、坂井 清、前沢 仁、森本敏昭、刈込高子	
8. LC qRT-PCR による浴槽水中レジオネラ属菌の定量（長崎県の実施例）-----	103
田栗利紹、鳥谷竜哉	
9. リアルタイム RT-PCR 法を用いたレジオネラ迅速検査法の検討-----	107
荒井桂子、吉川循江、田中礼子、堀切佳代、坂井 清、前沢 仁、森本敏昭、刈込高子	
10. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-----	113
森本 洋、磯部順子、大屋日登美、緒方喜久代、中嶋 洋、田中 忍、長瀬敏行、矢崎知子、 吉野修司、渡辺ユウ、倉 文明、前川純子	
11. レジオネラ属菌の培養検査法と精度管理-----	135
緒方喜久代、佐々木麻里、成松浩志	
12. 環境水の新規濃縮ろ過法の検討-----	143
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-----	149
前川純子	

14. 富山県の不明感染源解明のための環境調査-----	155
磯部順子、金谷潤一	
15. 感染源不明クラスターに関連した環境、菌株調査について(平成 23 年度)-----	165
中嶋 洋	
16. 抗酸菌の調査とレジオネラ <i>subspecies</i> 分類法の検討-----	171
山崎利雄、前川純子、倉 文明、杉山寛治、縣 邦雄、磯部順子、緒方喜久代	
17. レジオネラ属菌対策における宿主アメーバの管理	
—モノクロラミンの <i>Acanthamoeba</i> に対する不活化効果— -----	179
八木田健司、泉山信司	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	183
--------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

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改善の余地がある。また培養法において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入浴施設で観察されたが、消毒の自動化が必要である。そこで、今年度は以下の検討を行い成果を得た。

- 1) 井水（pH 8.4）を使った循環ろ過式のモデル浴槽系にモノクロラミンの生成、注入、測定 of 自動化装置を導入した。循環浴槽水におけるモノクロラミン（全塩素）濃度は、12 日間にわたる入浴による有機物負荷に関わらず設定された濃度範囲内となり、塩素臭の原因となるジクロラミン、トリクロラミンは検出されなかった。浴槽水、ろ過器内水のレジオネラ属菌、従属栄養細菌、アメーバは不検出であった。
- 2) 長崎県の循環ろ過式温泉施設では、源泉水はヨウ素を含み、塩素消毒で維持管理することが困難であった。原水を次亜塩素酸ナトリウムで前処理した後、大浴槽にモノクロラミン生成装置及び、全残留塩素濃度監視制御装置を設置して運転した結果、浴槽水中の全残留塩素濃度を安定して維持管理することが出来た。塩素臭は感じず、レジオネラ属菌は不検出となった。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った。
- 3) フローサイトメトリー（FCM）法を用いて浴槽水中の微生物の菌数と形態を把握することにより、レジオネラリスクを迅速簡便に判別する方法を開発した（Journal of Microbiological Methods, 86(1): 25-32, 2011）。泉質によっては塩素要求量が高く消毒が困難であったが、FCM 法でその塩素要求量を判定できるので衛生管理が容易になった。
- 4) 62 種類の既知消毒副生成物（DBPs）について、主要な曝露経路（経気道及び経皮）を推定する目的で、CONFLEX/COSMOtherm を用いる計算化学的手法によりオクタノール-水分配係数など様々な物性値の推算を行った。その結果、比較的経皮吸収が高いと考えられる DBPs としてハロケトン類やハロニトロメタン類が、揮散性が高く経気道曝露の可能性のある DBPs としてハロニトロメタン類とハロアルデヒド類が同定された。
- 5) 液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（以下、LC 法）の改良を行った。従来の 2 step 法よりも迅速、簡便、安価でかつ定量性に優れた 1 step 法を作成した。検量線の作成及びコピー数の算出を簡素化するため、レジオネラ 5S rRNA を合成シコントロール RNA として用いた。Legionella pneumophila 1 CFU 当たりの 5S rRNA コピー数は 8,000 コピーで、18 時間培養後に 400,000 コピーに増加することを明らかにし、検水中の rRNA コピー数から CFU に換算することを可能とした。ATP を指標として微生物汚染の進んだ検体の前処理を追加することで、改良 LC 法は通常の平板培養法と比較して感度 77.3%、特異度 89.1%（108 試料）となった。平板培養法と LC 法の定量値は高い相関を示した（ $R^2=0.76$ ）。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った。

- 6) 環境水のレジオネラ数検査の外部精度管理のためには、標準的な検査法を普及して、迅速にレジオネラを観察する斜光法を中心とした研修を導入した後が適当である。感染研のホームページにある 病原体検出マニュアル（レジオネラ症） の改訂を担当した。
- 7) 昨年作製したオキシソイドのサプリメントを利用した BYE α 液体培地にゼラチンを添加して改良（輸送時の衝撃を低減し、安全性を確保）し、外部精度管理試料とした。配布菌は加熱処理後に培養されたコロニーより作製したところ、冷蔵 14 日まで安定となった。ただし、自家製培地に比べ市販培地では菌数が低下し検査者によるばらつきが最大 16.5 倍見られた（9 機関 10 人）。
- 8) 2 県で民間検査機関の調査を行った。O 県では平成 22 年下半期から平成 23 年上半期に 77% のレジオネラ検査が県内 18 社の内 2 社で行われた。平成 22 年、23 年の行政検査 58 施設中、42 施設が自主検査「適」、残りは未実施であった。42 施設の内 26 施設（62%）が行政検査で不適となったが、民間検査機関では適になるまで消毒・検査される背景があるのであろう。T 県では水質検査機関 12 社の内 8 社でレジオネラ検査を実施、2 社は外部委託で検査していた。培養における観察のための斜光法を知っていたり聞いたことがあるのは 5 社、研修会参加希望は 10 社、精度管理の希望は 7 社であった。
- 9) 噴水などの修景水から分離した 11 株の *L. pneumophila* SG1 について sequence-based typing（SBT）による遺伝子型別を行ったところ、9 株が sequence type（ST）1（81%）となった。ST1 が 77% を占める冷却塔水由来株（50/65）と似た傾向となり、ST 型が多様な浴槽水由来株とは異なった。ST1 以外の 2 株の ST 型は臨床分離例のある型で、修景水が感染源として留意すべきことが確認できた。臨床分離株については昨年度収集した *L. pneumophila* 42 株について SBT の型別をまとめた。1990 年前後に多く、近年ほとんど患者分離例のなかった ST1 が増えていることがわかった。今年度は、1 月末日時点で 33 株が収集されている。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）の菌株の事例を報告した（感染症学雑誌 85:373-379, 2011）。
- 10) 岡山県内のレジオネラ症散発患者から 2008 年～2011 年までに分離された *L. pneumophila* SG3 は 7 株あり、すべて ST93 だった。そこで、その感染源を究明するため、浴槽水等 49 検体を調査して、レジオネラを分離した。また、保健所の調査で分離されたレジオネラ菌株を収集した。パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法を用いた分子疫学解析でも、患者由来の 7 株は同じ PFGE パターンを示した。一方、浴槽水等から分離された *L. pneumophila* SG3 の 11 株は、患者の ST あるいは PFGE パターンと異なっていたたので感染源は未だ不明である。さらなる調査が必要である。
- 11) 富山県で発生するレジオネラ症患者の中で、感染源が推定できない事例について感染源をさぐるため、水溜まり 69 検体と車のウォッシャー液 31 検体から菌を分離した。水溜まりのレジオネラ属菌の検出率は、33/69 検体（47.8%）であった。平均で見ると、7、8 月に菌数が多くなった。分離された 363 株の血清群は、SG1（71 株）、SG5（55 株）、SG8（50 株）の順に多かった。62 株の SG1 について、臨床分離株に多い *lag-1* 遺伝子の保有状況を調べたところ、37/62（59.7%）で、浴用水のそれより高かった。*L. pneumophila* SG1 の SBT による系統樹を描いたところ、一部の患者と水溜まり由来の菌が同じ枝になり、水溜まりからの感染の可能性が示された。
- 12) *L. pneumophila* の 3 亜種 *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* を、56°C \pm 1°C でハイブリダイゼーションを行う事により、簡便な DDH 法にて鑑別することが可能になった。
- 13) 浴槽水等約 232 検体から 50 検体培養陽性で 65 株の抗酸菌が検出された。結核菌の検出はなかった。

Micobacterium avium は 19 株分離された。

- 14) 温泉浴槽水から分離されたアカントアメーバに対するモノクロラミン作用をみた。3 log 以上の不活化に、栄養体は Ct45 (mg·min/l)、シストは Ct1700 が必要であった。
- 15) 国立保健医療科学院短期研修細菌研修の中でレジオネラについて講義した。文京区、岡山県のレジオネラ研修に対応した。。厚労省の生活衛生関係技術担当者研修会、第 85 回日本細菌学会総会技術講習会において成果を解説した。

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
専門研究員
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主査
縣 邦雄・アクアス(株)つくば総合研究所所長

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くなる。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) や短期液体培養を組み合わせた RT-PCR 法をこれまで評価した。検量線作成を含む検査手順の簡便化、微生物汚染の多い場合に見られる阻害の回避等、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。

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。今年度はモノクロラミンの注入・測定自動化を行い、有効性をモデル浴槽を含む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した。

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。以前の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、精度管理上の問題点を改良し、優良な検査機関に検体が集まり、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

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、昨年 9 月以降にもスポーツクラブの入浴施設で 9 人の集団感染が発生し、病院新生児室の給湯水による感染事例も報告されている。海外では歯科用装置に関連した感染事例 (イタリア、2011 年)、病院玄関ロビーの修景水による集団感染事例 (米国、8 名、2010 年) が近年報告され、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、外部精度管理用の試料を改良し、酸処理・加熱処理を省いた手順を指定して研究班の中で実施した。

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) を行った。また不明感染源の探索のため環境水の調査を行った。

B. 研究方法および材料

1. モノクロラミン消毒の実施

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昨年度開発した。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である。今年度は、浴槽水のモノクロラミン濃度の測定のため、モノクロラミン濃度にほぼ等しい全塩素濃度を測定できる、無試薬型全塩素計を使用した (図1)。測定値が下限設定値の2.5 ppmを下回った場合は、薬液注入の入力信号が入り、水道水の送水ポンプが稼動 (希釈水が送水) し、次に薬液ポンプ (次亜塩素酸ナトリウム、塩化アンモニウム) が稼動し、両試薬の混合によって生じたモノクロラミン生成液が浴槽系内に連続注入され濃度上昇を図る。薬液濃度が上限設定値の2.8 ppmを上回った場合には、入力信号は切れ、薬液ポンプの作動が停止する。本装置を循環ろ過式浴槽モデルに使用した時の全塩素濃度の経時的な推移をチャート紙に自動記録した (図2)。

モノクロラミン・ジクロラミン・トリクロラミンの分別定量は、米国の Standard Methods (第21版、2005) の DPD を用いた硫酸第一鉄アンモニウム (FAS) による滴定法 (DPD/FAS 滴定法) に準じて

行った。トリクロラミンの濃度測定は、HS-GC/MS 法 (ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析法、Agilent 6890N/5975C、Agilent Technologies 社) を併用した。なお、HS-GC/MS 法の定量下限値は15 μ g/l で、DPD/FAS 滴定法よりも高感度にトリクロラミンを測定できる。現場で実施できない DPD/FAS 滴定法、HS-GC/MS 法、サリチル酸法による塩素濃度の測定については、消毒副生成物等の測定方法に準じて浴槽水を輸送し、実験室 (国立保健医療科学院) で実施した。

消毒を実施した長崎県の循環式入浴施設では、1日あたりの入浴者数は約200~400人であり、週1回の定休日に完全換水とともに浴槽内の洗浄を実施していた。業者との委託契約により、ろ材 (セラミクス性) を年1回定期交換し、バイオフィーム対策として年1回循環水系を過酸化水素水で処理するとともに、年数回、貯湯槽を高圧洗浄機で洗浄していた。実験に先立って、次亜塩素酸ナトリウムにより循環系統内の30 mg/l \times 2時間の高濃度洗浄を施した後、対象浴槽水からレジオネラ不検出を確認した。原水に5 mg/l 程度のアンモニアを含んでいたことから、日常的には、その対策として原水汲み上げと同時に10tタンクに40 mg/l 相当の次亜塩素酸ナトリウムを投与していた。さらに、循環系統内のろ過器の直前でイソシアヌル酸を注入して消毒を行っていた。

2. フローサイトメトリー (FCM) 法における不連続点を越えた塩素消毒の清浄化判定

試験溶液 (検体) 10 ml を滅菌済み中試験管に分注し、菌液を最終10⁵ counts/ml となるように添加して40°Cに維持した恒温水槽に浸漬した。パックストのカチオン濃度とアンモニア態窒素量から必要塩素濃度を推定し、次亜塩素酸ナトリウムを用いて100倍濃度希釈列を作製した。例えば、塩化物泉では100 mg/l 近い塩素要求量が見込まれたため、最大値を300として、250、200、150、100、50、40、30、20、および0 mg/l の希釈列として、それぞれの100倍濃度液を作製した。恒温水槽中の各試験管を約50 rpm で振とうさせた状態で保持し、調製した塩素水希釈列の0.1 ml を試料中に挿入した状態で加え、約

10分後に振とうを停止して60分まで静置して反応させた。反応終了後、直ぐに各試験溶液を2.5%（塩化物泉は25%）チオ硫酸ナトリウムで中和するとともに0.05%グルタルアルデヒド溶液で菌を固定した。計測に際しては各試料を0.2 ml専用容器に分取し、フローサイトメーター（BACTANA, シスメックス社製）にセットして特定エリア内の細菌数を算出した。試験溶液の塩素濃度を塩素注入率として横軸に、測定された細胞数を縦軸にしてプロットし、細胞数が3.48 log counts/mlを下回った最小濃度を、FCMによる不連続点とした。さらに、温泉（炭酸水素塩泉）利用の4箇所の循環式入浴施設より、8つの浴槽水から採水して、塩素要求量とレジオネラ属菌検査を実施した。

3. 消毒副生成物（DBPs）の計算化学的手法による物性値の推定

公衆浴場浴槽水では経気道と経皮からの取込が化学物質曝露の主な経路となる。いずれの経路が主要な寄与をするか、DBPsの揮散性（例えばヘンリー定数）や脂溶性（例えばオクタノール-水分分配係数（Log P））といった物理化学的なパラメーター、いわゆる物性値が決定要因となる。そこで、塩素消毒を行ったプール水で検出例が報告されている未規制物質を含むDBPs（Richardsonら, 2010）の主要曝露経路を予測する目的で、計算化学的手法による物性値の推定について検討を行った。

ハロケトン類20物質、ハロアミド類9物質、ハロアセトニトリル類9物質、ハロアルデヒド類11物質、ハロニトロメタン類9物質及びハロキノン類4物質の計62種類のDBPsを対象に検討を行った。まず、これらのDBPsの3次元分子構造をChemBio3D Ultra ver. 12 (CambridgeSoft)を用いて作成した。この3次元座標データ（MDL-MOL形式）を初期構造として、配座探索プログラムCONFLEX ver. 6により10 kcal/mol以内のエネルギー範囲の配座空間を探索し、最安定構造を取得した。得られた最安定配座について密度汎関数（DFT）法による量子化学計算を行った。計算にはPQSMol ver. 1.2-20-win及びPQS *ab initio* ver. 3.3 (Parallel Quantum Solutions)を使用し、汎関数BVP86、基底

関数tzvp_ahlrichsにより構造最適化及び表面電荷を算出した。

化学物質の物性値推定方法として、従来から汎用されているEPI SuiteなどQSARに基づく手法では、学習に使用したデータセットと構造が大きく異なる化合物では予測精度が低下し、また異性体や混合物の取扱が困難である。そこで、本研究では実験値を用いることなく量子化学計算のみで物性値を予測するDFT/COSMO-RS法の適用可能性について検討を行った。COSMO-RS法による物性値の算出にはCOSMOtherm ver. C21_0111 (COSMOlogic)を使用した。併せて、定量的構造活性相関（QSAR）による物性値の推算についても、EPI Suite ver. 4を利用して検討を行った。

4. 浴槽水の検査

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 μ m, 0.4 μ m）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 $^{\circ}$ C、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。

平板に発育した*Legionella*属菌様のコロニーについて、森本の報告した斜光法で特異的な形態を観察し、血液寒天培地とBCYE α （ビオメリュー）に移植し、システインの要求性を確認した。次にBCYE α 培地でのみ発育したコロニーについて、レジオネララテックステスト（OXIDO）とレジオネラ免疫血清（デンカ生研）により血清群を決定した。

一般細菌数は標準寒天培地で36 $^{\circ}$ C 2日間培養後、従属栄養細菌数はR2A寒天培地で42 $^{\circ}$ C 7日間培養後の菌数を求めた。ATP量の測定は、携帯用簡易測定器ルミテスターPD-10及びルシパックワイド（キッコーマン）を使用し、検水100倍濃縮液100 μ lから検水10 ml当たりのRLU値を求めた。

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)

1,000 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。なお、微生物汚染の激しい逆洗水については、酸処理時間を 20 分に延長したものを同時に培養した。ボルテックス後、100 μ l をマイクロチューブに分取し、-30°C 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°C 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°C 保存)。

Diederer ら (J Med Microbiol. 2007, 56: 94-101) の 5S rRNA を標的とした qPCR を改良し、1 step RT-qPCR の反応系を作成した。Legionella pneumophila 長崎 80-045 株の 5S rRNA 領域を PCR で増幅し、T7 RNA Polymerase を用いた *in vitro* transcription 反応により、一本鎖 RNA を合成した。Transcript RNA を MEGAclean kit (Ambion) で精製後、Quant-iT RNA Assay Kit (Molecular Probes) によりコピー数を決定した。

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。

- ① Ct (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 ($\Delta Ct = Ct (0h) - Ct (18h)$) としたとき、 $\Delta Ct \geq 1$)

LC RT-qPCR 法による「Total Legionella」は、Ct

(0h) から算出した検水 100 ml 中の 5S rRNA コピー数を 1 CFU 当たりのコピー数 (8,000) で除すことにより生菌数+死菌数の総菌数 (CFU/100 ml) に換算し、10 CFU/100 ml 以上を陽性とした。LC RT-qPCR 法による「Viable Legionella」は、Ct (18h) から算出した検水 100 ml 中の 5S rRNA コピー数を 18 時間培養後の 1 CFU 当たりコピー数 (400,000) で除し、同様に Ct (0h) から算出した菌数の差を生菌数 (CFU/100 ml) とし、5 CFU/100 ml 以上を陽性とした。「生菌下限値」は、Ct (0h) から算出した検水 100 ml 中の 5S rRNA コピー数を 18 時間培養後の 1 CFU 当たりのコピー数 (400,000) で除すことで、 $\Delta Ct < 1$ の場合に、生菌の検出下限値を示した。

6. 外部精度管理

ワーキンググループ構成機関である 9 か所の地方衛生研究所でプレ精度管理を行った。参加機関に A ~ J までのアルファベットを振り分けた。なお、試料安定性の評価結果等、その他比較基準となる北海道立衛生研究所の検査者結果については A、B と表示した。試料は郵パックでチルド、陸路のみと指定し、カテゴリー B 容器を使用した。

菌株は昨年度安定性が確認されたものを使用した。すなわち、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) と考えられる *L. pneumophila* SG3 浴槽水分離株を使用した。

BCYE α 寒天培地は、栄研化学、日研生物医学研究所、極東、Oxoid の市販培地同一ロット品、及び自家調製培地を使用した。選択分離培地として、GVPC 寒天培地は、日研生物医学研究所、極東、Oxoid を、WYO α 寒天培地は栄研化学の市販培地同一ロット品を、MWY 寒天培地は、Oxoid の市販培地同一ロット品、及び自家調製培地を使用した。なお、市販培地は北海道立衛生研究所で一括購入し、参加機関ごとに使用する BCYE α 寒天生培地 (1 メーカー分)、選択分離培地 (1 メーカー分) を事前配布した。北海道立衛生研究所では、使用した全メーカー、全種類の寒天培地について検査対応した。

配付試料を 25 試料作製した。すなわち精製水 200 ml に対し、Yeast extract (Oxoid) 5g を加え、滅菌後、ウォーターバス内で 50°C に安定させ *Legionella* BCYE Growth Supplement (SR0110A : Oxoid) 5 バイアルを指示通り溶解、添加し調製した。一方で精製水 250 ml に 8g のゼラチン (DIFCO) を加え、滅菌後、ウォーターバス内で 50°C に安定させた。これらを安全キャビネット内で混和し、BCYE α 寒天培地で 40 時間培養した供試菌を添加し、マクファーランド No.1 に調整し、20 ml ずつ分注し、冷蔵固化し配布試料とした。菌濃度の再現性を可能な限り確保するために、光電比色計 MODEL AC-114 (OPTIMA) を利用して透過率を測定した。

受け取った試料の検査については、予備実験同様供試菌添加 1.5%ゼラチン加レジオネラ培地溶解後検体、仮想非濃縮検体、100 倍濃縮検体について行った。ただしプレ精度管理においては、酸処理や熱処理による、発育コロニー数や回収率への影響を避けるため、未処理による実験を基本とし、濃縮工程や使用培地等の違いによる結果を確認することに重点を置いた。濃縮方法は指定せず、各参加機関の方法で行ってもらい、その方法の回答も求めた。北海道立衛生研究所では、配布試料を冷蔵 (5°C 前後) し、作製 3、5、7、10、12、14 日目に確認検査を行った。予備実験同様、一度溶解した配布試料は再使用せず、常に新しい試料で検査を行った。これにより、配布試料の均一性と安定性の確認を行った。なお、濃縮検体の回収率は、配布試料ゼラチン溶解後の検査結果 (コロニー数) を分母とし、その試料を基に 100 倍希釈した試料を各検査施設で作製 (非濃縮試料と仮定) し、それを 100 倍濃縮したものの検査結果 (コロニー数) を分子として回収率を算定することとした。

今回の調査では、検査期間中の回収率の最低値が 50% を超えること、最大値が 100% を大きく超えないこと、最大値と最小値の幅が小さいこと、かつ平均値が高いことを目標とした。

7. *Legionella pneumophila* の遺伝子型の解析

昨年度 (2010 年度) にレジオネラ・レファレンスセンターで収集したレジオネラ臨床分離株 (実際の

分離年は 2006 年 1 月から 2011 年 2 月) についてデンカ生研のレジオネラ免疫血清を用いて血清型別を行い、*L. pneumophila* については 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 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した。7 遺伝子の遺伝子型が決まった分離株を EWGLI のデータベースに登録すると、新しい遺伝子型の組み合わせについては ST (sequence type) ナンバーが付与される。

2001 年から 2007 年に採取された公園の噴水などの修景水由来の *L. pneumophila* 血清群 1 の 11 株について SBT を行った。その他に、シャワー水由来 3 株、河川水 (水道原水) 由来 1 株の *L. pneumophila* 血清群 1 を収集し、遺伝子型別を行った。

8. 感染源不明クラスターに関連した環境、菌株調査

感染源を究明するため、レジオネラの環境分離菌株 (平成 23 年 4 月～12 月) と患者株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法と SBT による分子疫学的解析を行った。PFGE は改良プロトコルによる 2 日間の方法 (常彬ら、IASR 29:333-4, 2008) に従った。

9. 感染源解明のための環境調査

感染源調査として、道路上の水溜まりと、レジオネラ症との関連性が指摘されている車のウォッシャー液を選んだ。水溜まりについては平成 22 年 11 月～23 年 10 月の 1 年間に県内の幹線道路 6 地点で採取した 69 検体について、また、車のウォッシャー液については、平成 22 年 6 月～平成 23 年 11 月の間に採取した 31 検体である。

Legionella 属菌の分離は、基本的には浴用水の方法に準じて行なった。水溜りは 150ml、ウォッシャー液は 100ml をメンブランフィルター (直径 47mm、0.22 μ m、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE) で吸引ろ過し、フィルターを 50 倍濃縮量となる量の滅菌蒸留水で 5 分間ボルテックスしたものを試料とした。

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* 遺伝子の保有率を調べ

た。Kozak ら(J.Clinical Microbiology 2009 vol.47, 2525-2535) の報告したプライマー lag-F : 5'-CTCACAACAAGTCA AGCAAC-3'および lag-R : 5'-AAACCATAC CAAA GCAA CAT-3'を用い、GoTaqHS (プロメガ) 10 μ l に lag-F、lag-R (2 μ M) をそれぞれ 1 μ l、テンプレート 2 μ l を加え、20 μ l になるよう H₂O を加え反応液とした。PCR は 95°C2 分、94°C30 秒、95°C30 秒、72°C1 分を 30 サイクル、72°C5 分で thermal cycler DICE (TaKaRa) でおこなった。

SBT による 7 遺伝子の部分塩基配列をつなげた 2,501 塩基について、MEGA 4 Software を用いて Neighbor-Joining 法で系統樹を作成した。

10. 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。

C. 研究結果および考察

1. モノクロラミン生成・注入・測定の検証

わが国の水道では、結合残留塩素による消毒は 0.4 mg/l 以上、著しく汚染される恐れがある場合 1.5 mg/l 以上と規定されている (水道法第 22 条に基づく水道法施行規則第 17 条第 1 項第 3 号)。ここで言う結合残留塩素は主にモノクロラミンと想定される。

アルカリ性 (pH 8.4) の井水の沸かし湯を使った循環ろ過式浴槽モデルにモノクロラミンの生成、注入、測定の自動化装置を設置して、濃度維持と消毒効果を検証した。循環浴槽水におけるモノクロラミン (全塩素) 濃度は、12 日間にわたる入浴による有機物負荷にかかわらず、ほぼ設定された濃度範囲内に維持された。また、塩素臭の原因となるジクロラミン、トリクロラミンは検出されなかった。入浴者に臭気や肌感覚で違和感はなかった。その間の浴槽水とろ過器内水にはレジオネラ属菌、従属栄養細菌、アメーバは不検出であった。モノクロラミン消毒の自動化は、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の循環式浴槽水の新しい消毒法として期待できる結果が得られた。

次に、長崎県の温泉入浴施設(循環式)において、浴槽水のレジオネラ属菌抑制対策として、モノクロラミン添加による処理対策を導入した。当温泉入浴施設は、源泉を一日 50 m³ 使用、源泉水(20~50%) に対して水道水を(80~50%)添加して浴槽に供給している。泉質は塩化物、炭酸水素を多く含み、アンモニウムイオンが 5 mg/l 程度存在し、塩素を消費する泉質である。大浴槽(男女共通、保有水量 20 m³) に、モノクロラミン発生装置を設置し、ろ過器出口から連続的に循環浴槽水を採水してモノクロラミン(全塩素)濃度の連続測定と、ろ過器入り口へのモノクロラミン液の注入制御を行った (図 3)。発生装置の設計基準を表 1 に示す。その結果、運用開始後 3 ヶ月間にわたり、大浴槽水のモノクロラミン濃度を安定的に 4~5 mg/l 程度に維持し (図 4)、浴槽水中のレジオネラ属菌を不検出に出来た。測定データで急に 3 mg/l 付近になっている時間帯 (深夜 0 時から数時間) がある。これは夜間浴槽の循環ポンプが停止する時、計器の電極セルへのサンプル水が停止するためである。本計器は電極部の通水流速が低くなると測定値が低くなるのでサンプル水の流量調整には注意が必要である。なお 1 月 11 日は休業日であり値が低くなっている。次いで同じ施設の露天風呂とジャグジーにもモノクロラミン消毒を適用した。最終的には、いずれの浴槽においてもレジオネラ属菌を不検出とすることができた。

2. フローサイトメトリー (FCM) 法における不連続点を越えた塩素消毒の清浄化判定

水道水、井水、塩化物泉、炭酸水素塩泉、単純アルカリ泉の温泉等において、FCM 法で測定した不連続点は、従来の DPD 法による不連続点とほとんど変わらない値を示した (図 5、6)。炭酸水素塩泉を利用する温浴施設のフィールドテストでは全ての浴槽水から遊離塩素用 DPD で発色が認められたが、浴槽水により塩素要求量は異なっており、レジオネラ属菌の存否に影響した。レジオネラ菌不検出の 5 浴槽水は DPD で 0.2~1.2 mg/l (0.71 \pm 0.42) を示し、且つほとんど塩素要求量を満たしていた。し

かし、レジオネラ属菌が検出された 3 浴槽水では DPD の値が 0.39~0.7 mg/l (0.56±0.16) を示したにもかかわらず、これらの塩素要求量を満たすためにさらに 10~20 mg/l の塩素を必要としていた。

FCM 法で細菌汚染と清浄化の二つのステージの判定ができる。細菌汚染から清浄化ステージに至る閾値と塩素要求量の不連続点はほぼ一致し、清浄化ステージは塩素管理の不連続点を越えたところにあった。遊離塩素管理が行われている温浴施設の浴槽水にアンモニア態窒素が残留し、レジオネラの存否と関連していた。FCM 法による清浄度の判断と、レジオネラ属菌検査結果との対応が得られた。レジオネラ汚染と細菌汚染の密接な関係が改めて認識された。本研究で遊離塩素の測定に使用した簡易な DPD 法では発色して遊離塩素があるように測定されたが、本当の所は不連続点を越えていなかった。これは原水に含まれるアンモニアの影響により、クロラミンが共存する環境であったことに起因すると考えられた。アンモニア態窒素等を含む温泉のレジオネラ属菌を遊離塩素により消毒するには、常時、不連続点を越えた消毒を要することが示唆された。

3. 消毒副生成物の暴露評価

塩素消毒を行った水中で検出される消毒副生成物 (DBPs) 62 物質について、量子化学計算に基づく非経験的な手法 (DFT/COSMO-RS 法) を用いて、主要曝露経路を推定する際に参考となる熱力学的パラメーターの予測を行った。

LogP 値の大きい DBPs、すなわち脂溶性が高く皮膚を透過しやすいと考えられる DBPs で、DFT/COSMO-RS 法と EPI Suite ver.4 の両方に含まれるものは 12 化合物であり、前者ではハロケトン類やハロニトロメタン類が 70%を占め、後者では化学構造にかかわらずおしなべてハロゲン置換数の多い DBPs が選択される傾向が認められた。一方、ヘンリー定数について同様の比較を行った結果では、高い揮散性が予想される DBPs として両者に共通する化合物はハロニトロメタン類 (Dichloronitromethane、Trichloronitromethane)、ハロアルデヒド類 (Trichloroacetaldehyde、Dichloroacetaldehyde、Bromochloroacetaldehyde) 及び

ハロケトン類 (1,1,1-Trichloro-2-propanone) の 6 化合物のみであり、DFT/COSMO-RS 法ではハロニトロメタン類とハロアルデヒド類、EPI Suite ver.4 ではハロケトン類とハロアルデヒド類が大きな値を示すことが予測された。DFT/COSMO-RS 法の結果では、ハロニトロメタン類は高い脂溶性と揮散性を兼ね備えていることから、浴槽水中に存在した場合には比較的経皮及び経気道の経路から曝露されやすい DBPs であると言えるであろう。

図 7 と図 8 は、それぞれ LogP 及びヘンリー定数について DFT/COSMO-RS 法と EPI Suite ver.4 による推定値の相関を示したものである。LogP については非経験的な量子化学計算による結果と定量的構造活性相関による結果とは比較的良い相関関係を示したのに対し、ヘンリー定数については明瞭な相関は認められなかった。現時点では、本研究で検討を行った大部分の DBPs についてヘンリー定数の文献値 (実測値) が得られないために両手法による予測値の妥当性を議論することは出来ないが、ヘッドスペース-GC/MS 等による気液分配係数の測定等により検証を行う予定である。一方、LogP 実験値が入手可能な一部の DBPs について予測値との関係を図 9 に示した。いずれの手法でも相関係数はほぼ同等であり、経皮曝露については非経験的な手法により比較的精度良く予測できる可能性が示唆された。以上の結果、比較的経皮吸収が高いと考えられる DBPs としてハロケトン類やハロニトロメタン類が、揮散性が高く経気道曝露の可能性のある DBPs としてハロニトロメタン類とハロアルデヒド類が同定された。今後、実測値の取得による妥当性の検証等を進め予測精度を向上させることにより、未規制 DBPs の主要な曝露経路や経皮/経気道吸収性について *in silico* による推定が可能になると考えられる。

4. 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の改良

平成 23 年 6 月~平成 24 年 1 月に、全国 5 地区 (愛媛県、横浜市、富山県、長崎県、宮城県) の入浴施設から 199 件 (浴槽水 176 件、原水 17 件、ろ過器逆洗水 6 件) の試料を採取し、平板培養法及び LC

RT-qPCR 法によりレジオネラ属菌数を算出した。

昨年度までに開発した LC RT-qPCR に改良を加え、より簡便かつ再現性に優れたレジオネラ生菌迅速検査法の検討を進めた。昨年度の課題として、検量線作成が煩雑かつ不安定で定量値が安定しないこと、微生物汚染の激しい検体でレジオネラの増殖抑制が起こることの 2 点が主に挙げられ、それらの問題点をクリアすべく次の改良を行った。

第 1 の改良は、1 ステップ RT-qPCR 法の採用である。昨年度までは、市販のレジオネラ遺伝子定量検出キットと RT 反応試薬を組み合わせた 2 ステップ RT-qPCR を用いたが、さらに操作を簡略化するため、既に報告されているリアルタイム PCR のプライマー、プローブを用い、1 ステップ RT-qPCR を作成した。使用したリアルタイム PCR 反応系は、文献調査で最も特異性、感度に優れたと考えられるものを採用した。今回の抽出法と反応系での感度は、1 反応当たり 10 コピーの検出が可能で、実試料でも十分活用可能な感度が確保できた。また、操作性の面では、従来 2 ステップ法が RT 反応後の cDNA を qPCR 反応系に加える操作が必要で、ピペット操作による測定誤差やコンタミネーションの可能性が危惧されていたが、1 ステップ化によってこれらの問題が解消された。また、2 ステップ法では RT-qPCR 反応自体に 100 分程度を要していたが、1 ステップでは 60 分に短縮され、検量線の増幅効率や直線性も優れていることから、1 ステップ化のメリットは大きいと考えられた。なお、特異性の面では、従来用いた市販キットにおいて *L. londiniensis* 等の一部のレジオネラ属菌が検出できないことが明らかになっているが、今回の反応系も同じ 5S rRNA を標的としており、同様に一部の菌種で検出できない可能性がある。

第 2 の改良は、検量線作成用の 5S rRNA コントロールの合成と、レジオネラ 1 CFU 当たりのコピー数の決定である。昨年度は、BCYEa 寒天培地で 30°C、4 日間培養した標準株を用いて希釈系列を作成し、検量線を作成していたが、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あり、施設間の定量値が異なる要因となっていた。

そこで、5S rRNA の全領域 (118 bp) をカバーした Transcript RNA を合成し、検量線作成用のコントロール RNA として協力地研に配布した。また、環境から検出されるレジオネラに近い状態の菌を再現するため、アメーバ内で増殖したレジオネラを使用し、菌体 1 CFU 当たりの 5S rRNA コピー数が 8,000 copies/CFU であり、18 時間培養後には 400,000 copies/CFU に約 50 倍増加することを明らかにした。この係数を用いて検水の定量値を算出した結果は、通常の平板培養法で得られた定量値と極めて高い相関 ($r^2=0.76$) を示し、感度 77.3%、特異性 89.1% となり (図 10、表 2)、今回決定したコピー数が妥当であることが確認された。

第 3 の改良は、検水の ATP を指標にした LC 法における反応阻害、培養抑制の予測と、それに応じた前処理の提案である。昨年度までの検討で、塩素消毒を行わない掛け流し式温泉やろ過器逆洗水等の微生物汚染が激しい検体では、LC 法で偽陰性となる検体が少なからず存在した。原因は、検水中の共雑菌による RT-qPCR 反応阻害と、液体培養時の増殖抑制の 2 点が考えられた。今回、ATP 5,000 RLU/10ml 以上の検体について 100 倍濃縮液を用い (通常は 1000 倍濃縮液)、抽出時に 5% Chelex を使用することで反応阻害が解消されること、及び、前処理を酸処理 5 分から酸処理 20 分に延長することで増殖抑制が解消されることがわかった (図 11、表 3)。

一方、LC 法は液体培養によるレジオネラ 5S rRNA の増加量から生菌数を算出するため、死菌が大量に存在する検体では少量の生菌が検出できない場合がある。培養時間を延長することで改善の余地はあるが、迅速検査としての位置付けから考えると、過度の検査時間の延長は望ましくない。そこで、LC 法が生菌のみならず、同時に死菌量も定量できる点を活用し、検査結果として Total *Legionella*、Viable *Legionella*、生菌検出下限値の 3 つのデータを明示し、一定量の生菌が否定できないことを明示することとした。大量の死菌検出は、ろ過器や循環配管等へのバイオフィルムの蓄積を示唆し、これらを潜在的なリスクとして捉え、洗浄等の対策を講じる

指標に活用すれば、生菌汚染や事故発生を未然に防ぐことにつながると考えられる。

LC qRT-PCR 法(40 検体)、LAMP 法および TRC (Transcription Reverse Transcription Concerted Reaction) 法(各 45 検体)を培養法と比較した。培養法との一致率は、各々 0.71、0.58、0.36 であり、相関係数 R^2 は各々 0.7092、0.5814、0.4781 となり、LC qRT-PCR 法が一番培養法に近い検査法であった。

5. 塩素剤接触後の RNA の検出

浴槽水由来の *L. pneumophila* SG1 を用いて菌液を作製し、1 mg/l の塩素剤に 10 分間接触させ、直後に RNA を抽出して測定を行ったところ、培養法ではレジオネラが検出されなかったが RT-PCR 法では菌が検出され、塩素剤接触直後の試料から RNA が検出されることが再確認された。

次に、塩素剤接触後に経時的に RNA の検出を試みたところ、塩素剤接触 6 時間後までは 1×10^3 cfu/100 ml の菌数相当の RNA を示し、24 時間後には 8.5×10^2 cfu/100 ml、48 時間後には 2.5×10^2 cfu/100 ml 相当の RNA、72、96 時間後には不検出(10 cfu/100 ml 未満)となり、この検査法ではレジオネラの RNA は塩素処理後も長時間検出されることが推察された(図 12)。

浴場施設の殺菌洗浄後の試料で検査を行ったところ、殺菌洗浄後 3 日程度経過していれば、この研究の検査方法で死菌の RNA が検出されなくなると推察された。培養法の 7~10 日に比較すると、結果判明までの時間短縮の可能性が考えられた。

6. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み

昨年度に行った行政機関のレジオネラ属菌検査方法の実態調査の結果、1)標準的な検査法の整理と提示、2)研修システムの構築、3)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の認識に至った。そこで本年度は、これら 3 つの課題について、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(以下 WG)内で検討した。

1)については、改訂版病原体検出マニュアルに反

映させたが、次年度は検査定義をより明確にし、官民間問わず浴槽水等の自主検査に適切に対応した検査方法を提示することとした。2)については、標準的な検査方法提示後、それに基づいた研修会を開催するのが妥当と思われるが、参集範囲を考慮し、厚労省や地方衛生研究所協議会等に働きかけ、官民に対する研修会システムを構築する必要があるとの認識に至った。

3)については、WG 内(9 か所の地方衛生研究所)でプレ精度管理を行った。予備実験では、検査者 A、B で同時に検査を行った結果から、試料作製 14 日目まで検査者間で確認コロニー数に有意な差が認められなかった。使用した培地間では、BCYE α 培地(非選択分離培地)の方でコロニー数が多く確認される傾向にあった。また、前処理の違いでみると、未処理と酸処理では有意な差は認められなかったが、熱処理では試料作製 3 日目から他の処理と比較しコロニー数の減少率が高い傾向にあった。このため、プレ精度管理においては、未処理による実験を基本とし、濃縮工程や使用培地等の違いによる結果を確認することに重点を置くこととした。

プレ精度管理では、さらに試料の安定性を図るため、予備実験使用菌に対し 50°C、30 分間加熱処理を行い、選択分離培地である MWY 寒天培地に発育したものをプレ精度管理に供試することとした。

プレ精度管理配布試料においては、保存 3 日目試料でコロニー数約 300 前後を確認し、その後も検査者 A、B 間で確認コロニー数に有意な差が認められず、またその数も保存 14 日目試料までコロニー数 100 以上を保持し続けた。予備実験では、その安定性が 7 日間であったことから、供試菌の強化が有意に働いた可能性が示唆された。予備実験、プレ精度管理の光電比色計による透過率から推察し、透過率 90.0%前後であれば、試料作製 3 日目(試料到着日)の直接検査のコロニー数を約 300 前後で調製できると考えられた。この結果については、「回収率の最低値が 50%を超えること、最大値が 100%を大きく超えないこと、最大値と最小値の幅が小さいこと、かつ平均値が高いこと」という目標を達成した。しかしながら、その他の市販生培地の多くでは、各検

査者の結果、検査者間での結果で安定しない状況が示された。全体として、コロニー数、回収率ともに検査者 A で高い傾向がみられた。コロニー数において検査者間差が少なかった市販生培地は、極東の BCYE α 寒天培地だけであった。またこの培地では、両検査者で保存 12 日目試料までコロニー数が 100 以上を保持していた。Oxoid の BCYE α 寒天培地では、検査者間差は認められたものの、極東の BCYE α 寒天培地と同じく両検査者で保存 12 日目試料までコロニー数が 100 以上を保持していた。また、同じく検査者間差は認められたが、日研の BCYE α 寒天培地、Oxoid の MWY 寒天培地で保存 7 日目試料までコロニー数が 100 以上を保持していた。栄研の BCYE α 寒天培地においても、総合的に見ると保存 7 日目試料までコロニー数が 100 以上を保持できる可能性が示唆された（表 4）。回収率については、どの市販生培地においても安定した結果を示すことができなかった（図 13）。

7. 民間検査機関に対するアンケート調査

民間検査機関への精度管理・研修を導入するにあたり、民間検査機関の検査実態や要求を把握するために、試験的に 2 県でアンケート調査を行った。

T 県では、調査対象の 12 検査施設のすべてから回答が得られた。12 検査施設のうち、実際に検査を実施している機関は 9 施設であった。研修については、12 検査施設中 10 施設が、精度管理については、7 施設が積極的に希望する結果となった。

一方、保健所の協力を得て実施した平成 22 年度下半期から平成 23 年度上半期の一年間、O 県内の公衆浴場施設を対象にレジオネラ属菌の検査を実施した民間検査機関を集計した結果、その数は 18 機関となった。そのうち、所在地が O 県内にあるものは 2 機関のみであった。鹿児島県や関東に所在する検査機関も参入していた。

レジオネラ属菌の検査を実施している民間検査機関は、従来、環境検査を主とした中に、レジオネラ属菌の検査を取り入れたところも多く、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは取り組む経緯や成り立ちが異なる場合も多い。そのような場合、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは異なり、微

生物検査の技術を習得し、熟練した検査員が存在しない場合もある。民間検査機関への精度管理・研修の導入にあたっては、まず、レジオネラ属菌の検査実施機関の実態把握を行い、特徴・特性を熟知する必要がある。その上で、民間検査機関を含めたレジオネラ属菌検査にかかわる全ての検査機関の質の良い検査精度確保のため、精度管理は重要な課題である。その実現のため、①モニタリングに最適な検査法（採水時から検査結果まで）の提示、②精度管理用サンプルの安定提供、③評価機関の確保が肝要と考える。

8. *Legionella pneumophila* の SBT 法による遺伝子型別法

レジオネラ症患者に由来する臨床分離株を収集して、*L. pneumophila* については、SBT (sequence-based typing) 法を用いて遺伝子型別を行った。2010 年度に収集された臨床分離株は 43 株で、42 株が *L. pneumophila* で、血清群 1 が 35 株、血清群 3、5、6 が各 2 株、血清群 10 が 1 株だった。残りの 1 株は *Legionella londiniensis* だった。*L. londiniensis* の臨床分離例は初めてである。臨床分離株は血清群 5 の 1 株と、血清群 10 の株は 1 つの遺伝子が PCR により増幅せず、遺伝子型が決まらなかった。残りの 41 株は 27 種類の遺伝子型に分けられた（表 5）。ST (sequence type) 1 が 4 株と最も多かった。

今まで調べられていない環境水として、噴水などの修景水やシャワー水、加湿器等から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 の 15 株についても遺伝子型別を行った（表 6）。環境由来株は 11 株が ST1 で、以前から調査されている冷却塔水由来株と似た傾向を示し、温泉水由来株の傾向とは異なっていた。残り 4 株は 4 種類の遺伝子型に分かれたが、1 種類の新規遺伝子型を除いて臨床分離例のある遺伝子型で、それらの環境水もレジオネラ症の感染源として注意が必要であることが示された。

9. 富山県の不明感染源解明のための環境調査

富山県におけるレジオネラ症患者のおよそ 4 割は感染源が不明である。そこでこれまで調査してきた浴用水以外の感染源を特定するために、環境中に分

布する *Legionella* 属菌を調査した。今年度は対象として水溜まり 69 検体と車のウオッシャー液(2ヶ所の車検場で 31 検体)について調査を実施した。その結果、水溜まりから 33/69 (47.8%) (表 7)、ウオッシャー液からは 10/31 (32.3%) (表 8) の *Legionella* 属菌が分離された。水溜まりから分離された *Legionella* 属菌では *L. pneumophila* SG1 がおよそ 2 割と多く、それらのうち *lag-1* 遺伝子保有株が 37/62(59.7%)と浴用水のそれよりも高かった。平均でみると、7、8 月に菌数が多くなった。分離された 363 株の血清群は、SG1 (71 株)、SG5 (55 株)、SG8 (50 株) の順に多かった (図 14)。ウオッシャー液から分離されたのは *L. pneumophila* SG5 1 株と UT 9 株であった。分離された菌について SBT の塩基配列を系統樹解析したところ、感染源不明のヒトから分離された株が、水溜まりから分離された一部の株と遺伝的に近い系統に位置することが明らかとなった。したがって、これら環境中から分離される菌とレジオネラ症との関連性が示された。今後は、これらのヒトへの感染の可能性や感染ルートの解明に向けてさらなる調査が必要である。

水溜まりから分離される *Legionella* 属菌の中でもっとも多く分離された ST は *L. pneumophila* SG1 の ST48 (8 株) であった。この ST は前川らが土壤に多いことを報告している。すなわち水溜まりから分離される *Legionella* 属菌は周辺の土壤に生息する菌を反映するものと考えられる。次いで多く分離されたのは ST120 (7 株) で、患者から分離された感染源不明の *L. pneumophila* SG1 の ST である (図 15)。

10. 感染源不明クラスターに関連した環境、菌株調査

岡山県内のレジオネラ症散発患者から 2007 年 10 月から 2011 年 12 月に分離され収集した株は 22 株であった (表 9)。この内 *L. pneumophila* 血清群 3 の株は 2008 年～2011 年までに 7 株あり、これらすべての株が sequence-based typing (SBT) 法による型別の結果、sequence type (ST) 93 に型別された。このことから、7 名の患者は同一の感染源あるいは環境中に分布した同一の株により感染した可能性が、示唆された。

そこで、その感染源を究明するため、平成 23 年度は浴槽水等 49 検体を調査して、レジオネラを分離した。また、保健所の調査で環境から分離されたレジオネラ菌株 133 株を収集した。今回の浴槽水 49 検体の検査からは *L. pneumophila* 血清群 3 は分離されなかった。保健所から収集した株には、浴槽水から 21 株、プール水から 3 株分離された。

これらの内、浴槽水から分離された *L. pneumophila* 血清群 3 菌株 11 株と患者株を用いて分子疫学的解析を行った。パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE) 法を用いた分子疫学解析でも、患者由来の 7 株は同じ PFGE パターンを示した (図 16)。一方、浴槽水等から分離された *L. pneumophila* 血清群 3 の 11 株は、患者の ST あるいは PFGE パターンと異なっていた (詳細は研究分担報告書参照)。したがって、患者の感染源は現状では不明であるが、過去に分離・収集した菌株や、今後多種類の検体についてさらに調査を行い、感染源を究明していく必要がある。

11. 抗酸菌の調査

今年度、調査地域を関東地方から拡大し、関東、中部、北陸、九州地方の各衛生研究所管内のホテル、旅館、又は公衆浴場等の浴槽水についてレジオネラ菌調査と共に抗酸菌調査も行った。総検体数 232 検体から抗酸菌陽性は 50 検体、抗酸菌は 65 株検出された。その内訳を表 10 に示した。結核菌は、検出されなかった。

12. *L. pneumophila* subspecies 分類法の検討

ATCC 由来の *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascalii* を基準株として固定したマイクロプレートを作成し、ハイブリダイゼーション温度と時間の検討を行った。市販 DDH レジオネラ「極東」(極東製薬工業) が指定するハイブリダイゼーション温度である 50°C では、3 亜種の鑑別ができなかった。65°C 以上では、発色が見られなかった。60°C では、特異性は高いが、発色までに 30 分以上の時間がかかるため不正確であり、55°C が適当と思われる (図 17)。また、ハイブリダイゼーションの時間は、60 分～180 分の 30 分間隔で調べたが、90 分以上は変わらない

ので、市販キットの条件と同じ 90 分間とした。基準株とした以外の ATCC 株も 3 亜種がそれぞれ正しく同定され、肉眼でも明確に鑑別する事ができた。

13. モノクロラミンの *Acanthamoeba* に対する不活化効果

レジオネラ属菌の宿主アメーバである *Acanthamoeba* に対するモノクロラミン（結合型塩素）の効果を実験的に調べた。*Acanthamoeba* 浴槽水分離株を用いて、大腸菌培養で調製したシストおよび無菌培養で調製した栄養体を試料として、モノクロラミンの濃度と作用時間を変えてアメーバの生残性を培養法で調べた。その結果、モノクロラミンの実用的濃度とされる 3 mg/l の条件で、栄養体は 15 分間（Ct 値：47）で、またシストは 24 時間（Ct 値：3700）で 3 log の生残性低下が認められた（表 11）。以上の結果から、浴槽水の衛生管理手法としてのモノクロラミン消毒が宿主アメーバに対しても実用性があることが示唆された。

14. シャワー水による感染事例後の衛生管理

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（病原微生物検出情報 31:332-3, 2010）、湯と水を混ぜてシャワー水を作る調節箱の消毒が課題となった。簡易の吊り下げ容器では濃度管理が困難なので、自動塩素注入装置を自治体の事業として費用を補助している。今年度は公衆浴場等（銭湯、スポーツクラブ、サウナ施設、旅館・ホテル、介護保険施設）44 施設について 145 検体調査し、4 検体培が養陽性であった。蓋で覆われた水位計、浴槽水を洗濯水に利用するための配管に続く穴等が汚染していた例があった。

D. 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。アルカリ泉質の井戸水を使用した浴槽水における循環式浴槽モデルに、モノクロラミンの生成、注入、測定の自動化装置を設置し、浴槽水のモノクロラミン（全塩素）濃度は、12 日間の入浴による有機物負荷にかかわらず、ほぼ設定された濃度範囲内で制御された。また、塩素臭の原因となるジクロラミン、トリクロラミンは検出されなかった。その間の浴槽水、ろ過器内水のレジオネラ属菌、従属栄養細菌、自由生活性アメーバはいずれも不検出と、モノクロラミン消毒により、レジオネラ属菌等の制御が可能との成績であった。

循環式温泉入浴施設においてモノクロラミン発生装置及び、全残留塩素測定装置を設置して、浴槽水中のモノクロラミン濃度を安定して連続的に設定濃度に維持し、浴槽水中のレジオネラ属菌を不検出（10 CFU/100 ml 未満）に出来た。4 mg/l 程度のモノクロラミンが残留する浴槽水に入浴した場合、不快な塩素臭気を感じることはなかった。大浴場（保有水量 20 m³）に設置した自動化装置の費用は 1,350,195 円（税込み、工事費含まず）で、一ヶ月間の運転コスト（大浴槽の薬品費のみ）は約 3 万円であり、従来处理とほぼ同等であった。塩素濃度測定装置を設置することなく、浴槽水のモノクロラミン濃度を手動で調整することも可能である。

遊離塩素を用いた温泉等の消毒においてレジオネラリスクを低減するには、不連続点塩素管理が要求される。FCM 法清浄化ステージは、アンモニア態窒素を含む温泉等における遊離塩素消毒の不連続点を見出すのを容易にした。

塩素消毒を行った水中で検出される未規制物質を含む消毒副生成物（DBPs）62 物質について、主要曝露経路を推定する際に参考となる熱力学的パラメーターの予測を量子化学計算に基づく非経験的な手法により行った。その結果、比較的経皮吸収が高いと考えられる DBPs としてハロケトン類やハロニトロメタン類が、揮散性が高く経気道曝露の可能性のある DBPs としてハロニトロメタン類とハロアルデヒド類が同定された。今後、実測値の取得による妥当性の検証等を進め予測精度を向上させる

ことにより、未規制 DBPs の主要な曝露経路や経皮/経気道吸収性について *in silico* による推定が可能になると考えられる。

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。迅速、簡便、安価でかつ定量性に優れた 1 step RT-qPCR を作成した。コピー数が明らかなコントロール RNA として配布することにより、定量検査が簡便になった。また、レジオネラ属菌 1 CFU 当たりの 5S rRNA コピー数を求め、検水中の rRNA コピー数から CFU に換算することが可能とした。ATP を指標として微生物汚染の進んだ検体の前処理を追加・変更することで、感度 77.3%、特異度 89.1%まで改善でき、平板培養法と高い相関を示した ($R^2=0.76$)。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数検査の外部精度管理のためには、標準的な検査法を普及して、迅速にレジオネラを観察する斜光法を中心とした研修を導入する必要がある。今年度は感染研のホームページにある病原体検出マニュアル (レジオネラ症) を改訂し、昨年作製したオキシソイドのサプリメントを利用した BYE α 液体培地にゼラチンを添加して (輸送時の衝撃を低減し、安全性を確保) 改良した試料を作製して、外部精度管理を行った。配布菌は加熱処理後に培養されたコロニーより作製したところ、冷蔵 14 日まで安定となった。

昨年度に感染研に送付されたレジオネラ臨床分離株 43 株 (実際の分離年は 2006 年 1 月から 2011 年 2 月) について同定を行い、うち *L. pneumophila* 株、公園の噴水などの修景水等由来の *L. pneumophila* 血清群 1 の 15 株について SBT を行った。SBT 法の疫学的有用性が確認できるとともに、2010 年度は ST1 が増えているという傾向がわかった。今年度も新規遺伝子型が多数同定されたことか

ら、今後も分離株の遺伝子型を調べ、分離株の動向を明らかにしていく必要がある。

岡山県内のレジオネラ症散発患者から *L. pneumophila* が 22 株分離された。このうち血清群 1 は 14 株、血清群 3 は 7 株であった。血清群 3 の 7 株はすべて同じ PFGE パターンで ST93 であった。この ST93 の感染源の究明のため、環境分離株 150 株を調査した。この内、*L. pneumophila* 血清群 3 は 21 株 (すべて浴槽水由来) であった。今のところ ST93 の株は環境中から見つかっていないので、今後も継続して環境調査を実施する必要がある。

富山県で発生するレジオネラ症患者の中で、感染源が推定できない事例について感染源をさぐるため、水溜まりと車のウォッシュ液から菌を分離した。水溜まりのレジオネラ属菌の検出率は、47.8% 菌で *L. pneumophila* の血清群は、SG1、SG5、SG8 の順に多く、SG1 株の *lag-1* 遺伝子 (臨床分離株に多い) の保有状況は 59.7% と浴用水のそれより高かった。ウォッシュ液のレジオネラ属菌の検出率は 32.3% で分離された菌の血清群に SG1 はなかった。*L. pneumophila* SG1 の SBT による系統樹を描いたところ、感染源不明の患者分離株が、水溜まりから分離された一部の株と遺伝的に近い系統に位置することが明らかとなり、レジオネラ症の発症との関連性が示された。

自然界に広く分布している抗酸菌用の再調査を行った。総検体数 232 検体から抗酸菌陽性は 50 検体、抗酸菌は 65 株検出された。検出菌の同定を行い、結核菌 (*M. tuberculosis*) は、検出されなかったが、*M. avium* 19 株他、ヒトに病原性のある非結核性抗酸菌が同定された。これらの菌種は、非結核性抗酸菌症の感染源となり得るので、浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化を検討することが必要である。

L. pneumophila subspecies の同定は困難であるが、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascuallei* の 3 亜種は、DDH 法を用いて簡単に鑑別同定する方法を確立した。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文・総説発表

- 1) 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* 8:25-32 (2012).
- 2) Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig J, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F and the Working Group for *Legionella* in Japan: Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bath water and soil in Japan. *Appl Environ Microbiol.* in press.
- 3) 西山明宏、石田直、興梠陽平、小西聡史、坪内和哉、伊賀知也、國政啓、岩破将博、福山一、仲川宏昭、伊藤明広、生方智、吉岡弘鎮、橋洋正、有田真知子、橋本徹、前川純子：*Legionella pneumophila* serogroup3による呼吸器感染症の4症例。感染症学雑誌 85:373-379 (2011)
- 4) 森本 洋、杉山寛治、磯部順子、内田順子、前川純子、倉 文明：病原微生物検出マニュアル「レジオネラ症」、国立感染症研究所のホームページに掲載予定
- 5) 森本 洋、池田徹也、清水俊一、山口敬治：浴槽水中のレジオネラ属菌検査における非濃縮検体の重要性。北海道立衛生研究所所報、61、印刷中、2011.

2. 学会発表

- 1) Junko Amemura-Maekawa, Akiko Kaneko, Toshiro Kuroki, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Yuki Tada, and Fumiaki Kura: *Legionella* isolates from

patients in Japan. Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* Infections, Vienna, Austria. May 2011.

- 2) Junko Amemura-Maekawa, Kiyomi Kikukawa J. H. Helbig, Katsunori Furuhashi, Masayuki Ichinose, Atsuko Suzuki-Hashimoto, Bin Chang, Miyo Murai, and Fumiaki Kura: Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from bath water, cooling tower water, and soil in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 2011.
- 3) Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, Akiko Kaneko, Toshiro Kuroki, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Yuki Tada, and J. H. Helbig: Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 from patients in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 2011.
- 4) 原田義高、吉嶺裕之、諸角美由紀、生方公子、前川純子、倉 文明、渡辺喜和雄、森本浩之輔、有吉紅也：MultiplexPCR が有用であった *Legionella pneumophila* serogroup 10 によるレジオネラ肺炎。第 85 回日本感染症学会総会。東京、2011 年 4 月。
- 5) 山崎利雄：臨床、動物、公衆浴場の浴用水等から検出された *Mycobacterium avium* における VNTR 法による検討、第 86 回日本結核病学会総会、東京、2011 年 6 月。
- 6) 山崎利雄、杉山寛治、前川純子、泉山信司、遠藤卓郎、倉 文明：臨床および循環式浴槽水等から検出された *Mycobacterium avium* の縦列反復数可変領域 (VNTR) を用いた解析、第 81 回実験結核研究会、東京、2011 年 6 月。
- 7) 金谷潤一、磯部順子、嶋智子、木全恵子、綿引正則、佐多徹太郎：富山県内で分離された *L. pneumophila* 血清群 (SG) 1 の遺伝子解析。日本防菌防黴学会第 38 回年次大会、大阪、2011 年 8 月。
- 8) 田栗利紹、杉山寛治、小坂浩司、泉山信司、倉 文明：温泉利用循環ろ過式浴槽水におけ