

201237014B

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 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

研究代表者 倉 文明

平成 25 (2013) 年 3 月

# 目 次

## I. 総合研究報告

- 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. 資料編

1. 掛け流し式浴槽及び循環式浴槽におけるモノクロラミンによる消毒検証試験-----29  
杉山寛治、佐原啓二、縣 邦雄、神野透人、八木田健司、小坂浩司、泉山信司、片山富士男、  
富田敦子、江口大介、市村祐二、道越勇樹、八木美弥、神田 隆
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----35  
縣 邦雄、佐原啓二、田栗利紹、杉山寛治、神澤 啓
3. 消毒副生成物の暴露評価-----45  
神野透人、佐原啓二、縣 邦雄、香川(田中)聡子、古川容子、岡元陽子、真弓加織、竹熊美貴子、  
高橋淳子、杉山寛治、小坂浩司
4. 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開発-----51  
鳥谷竜哉、荒井桂子、磯部順子、田栗利紹、八木田健司、泉山信司、矢崎知子、金谷潤一、  
吉崎美和
5. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-----63  
森本 洋、磯部順子、大屋日登美、緒方喜久代、中嶋 洋、小川恵子、田中 忍、長瀬敏之、  
矢崎知子、山口友美、吉野修司、渡辺ユウ、倉 文明、前川純子
6. イギリス HPA 主催のレジオネラ属菌検査外部精度管理-----83  
縣 邦雄
7. レジオネラ属菌の培養検査法と精度管理-----87  
緒方喜久代、佐々木麻里、成松浩志
8. 環境水の新規濃縮ろ過法の検討-----95  
大屋日登美、渡辺祐子、黒木俊郎
9. *Legionella pneumophila* の SBT 法による遺伝子型別-----107  
前川純子
10. 富山県の感染源解明のための環境調査-----117  
磯部順子、金谷潤一
11. 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 22~24 年度)-----129  
中嶋 洋
12. 抗酸菌の調査 (*Mycobacterium avium* の遺伝子型) とレジオネラ subspecies 分類法の検討-----137  
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、小谷野路子

13. レジオネラ属菌対策における宿主アメーバの管理-----	149
---------------------------------	-----

八木田健司、泉山信司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	153
--------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	
-----------------	--

# I. 総合研究報告

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検証されたが、消毒の自動化が必要である。そこで、以下の検討を行い、成果を得た。

- 1) 4箇所(静岡県3箇所、長崎県1箇所)の温泉入浴施設において、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処理を導入し、調査研究を行なった。モノクロラミンを3mg/L程度以上、常時浴槽水に維持することで、浴槽水、ろ過器内水のレジオネラ属菌を不検出(10CFU/100mL未満)に維持することが出来た。従属栄養細菌、アメーバも不検出であった。浴槽水のモノクロラミン濃度を測定計器により常時測定し、モノクロラミン発生装置を制御することで、浴槽水中のモノクロラミン濃度を自動的に設定値に維持管理することが出来た。循環浴槽水におけるモノクロラミン(全塩素)濃度は、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。
- 2) 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 (J Microbiol Methods, 86: 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。
- 3) 公衆浴場等における塩素代替消毒剤、特にモノクロラミンの適用可能性を消毒副生成物暴露の観点から評価する目的で、まず従前の塩素消毒を行っている浴場施設において浴槽水及び浴室空気中の含窒素化合物(ハロアセトニトリル類・N-ニトロソジメチルアミン・クロロピクリン)を含む一群の消毒副生成物に関する調査を実施し、次いでモノクロラミン消毒を行っている施設で実施した。浴槽水のモノクロラミン消毒は遊離塩素消毒に比べ、消毒副生成物を低減させることができる好ましい塩素代替消毒剤であること、ただし、ヨウ素イオンが存在する温泉水では有害性が十分明らかにされていないヨウ素化消毒副生成物を生じることから、水質を考慮して消毒剤を選定する必要があることが判明した。
- 4) 入浴施設の浴槽水等を対象としたレジオネラ属菌の生菌迅速検査法として、液体培養(Liquid Culture)定量RT-PCR法(以下、LC RT-qPCR法)を開発した。DNAよりも鋳型量が豊富な5S rRNAを標的とし、カラム精製不要で定量性に優れた1 step RT-qPCRを作成した。濃縮浴槽水に液体培地を加えて18時間培養し、rRNAの増加量をRT-qPCRで測定することで、生菌量と死菌量を同時に評価するLC RT-qPCR法を確立した。培養法と比較すると、感度83.3%、特異度96.4%と、生菌に対する特異性が極めて高かった。平板培養法とLC RT-qPCR法の定量値は高い相関を示し( $R^2=0.80$ )、施設の汚染状況を迅速に評価できると考えられた。

- 5) 液体培養 (Liquid Culture) etidium monoazide-qPCR 法 (LC EMA-qPCR) を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の評価を行った。新規 16S rRNA 遺伝子検出系はレジオネラ標準菌 0.5 CFU/PCR 反応以上が検出可能であり、*Legionella londiniensis* を含め検討したすべての種が検出可能であることを確認した。浴槽水等の実試料 113 件を用いて評価を行った結果、LC EMA-qPCR 法で得られる定量値は、EMA 処理による死菌増幅抑制効果により、平板培養法と高い相関を示した ( $R^2=0.627$ )。LC EMA-qPCR のカットオフ値を 5 CFU/100ml 相当に設定した場合の感度は 95.5%、特異度は 75.4%であり、実試料を用いた迅速検査の成績として十分満足できる結果が得られた。本法は、簡便な操作で平板培養法の結果を迅速に予測可能であり、浴槽水等におけるレジオネラ生菌遺伝子検査法としての活用が期待される。
- 6) 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アンケート方式による実態調査を行った。その結果、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明らかとなった。まず 1)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)を改定して反映させ、次に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まとめた。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。3)については、研究班内(9 か所の地方衛生研究所)でプレ精度管理を行った。その結果、配付試料や検査法、培地等について改善を行い、適切な評価システムを構築する必要があると思われた。配付試料については、民間企業との協力も視野に入れ検討する必要があると思われた。また、外部精度管理に加え内部精度管理の必要性を指摘した。
- 7) *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。3年間で 112 株の *L. pneumophila* 臨床分離株、92 株の *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株について型別を行った。環境分離株全体 (臨床分離株と重複していると考えられる菌株を除く 82 株) では、32 種類の ST が見出された。一方、臨床分離株 112 株は 64 種類に分けられた。Minimum spanning tree 解析を行い環境分離株と対応させると、環境分離株で見出されたグループ(Bath 3つ、Cooling tower 2つ、土壌 3つ)の他に新しい 1つのグループ (感染源が不明のものが多いためグループ U と名付けた) が形成された。臨床分離株については J. Med. Microbiol. 59:653-9, 2010 に、環境分離株については Appl Environ Microbiol. 78:4263-4270, 2012 に報告した。
- 8) 平成 18~22 年の 5 年間に富山県で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 *lag-1* を保有する *L. pneumophila* (*L.p.SG1 (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。このことから、塩素消毒により *L.p.SG1 (lag-1+)* が選択的に生残し、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。
- 9) 浴用水以外の感染源を特定するため、平成 23~24 年富山県で水溜り 134 検体と車のウォッシュ液 137 検体についてレジオネラ属菌の調査を実施した。その結果、水溜り、ウォッシュ液の各各 54/134 (40.3%)、13/137 (9.5%) からレジオネラ属菌が分離された。水溜りから分離されたレジオネラ属菌では *L.p. SG1* が 20.4%ともっとも多く、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 (J. Infect. Chemother. 印刷中) が、水溜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。

- 10) 岡山県内のレジオネラ症散発患者から 2008 年～2012 年までに分離された *L. pneumophila* SG3 は 8 株あり、すべて **ST93** だった (感染症学雑誌 85:373-379, 2011)。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。その感染源を究明するため、浴槽水等 150 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 266 株を収集した。浴槽水等から分離された *L. pneumophila* SG3 は、患者の ST あるいは PFGE パターンと異なってい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) 公衆浴場等から検出される抗酸菌の再調査をおこなった。総検体数 482 検体から抗酸菌陽性は 60 検体、検出された抗酸菌は 15 菌種 75 株であった。今回検出された *Mycobacterium avium* 19 株と研究室保存の *M. avium* 計 89 株を用いて縦列反復数可変 (Variable Numbers of Tandem Repeats ; VNTR) 領域型別解析法をおこなった。Minimum spanning tree 法による解析では、*M. avium* が 3 つのグループに大別される事が分かった。
- 12) *L. pneumophila* の 3 亜種 *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*, *L. pneumophila* subsp. *fraseri*, *L. pneumophila* subsp. *pascullei* を、56°C±1°C でハイブリダイゼーションを行う簡便な DDH 法で鑑別する方法を開発した。国内分離株 128 株について本法を実施したところ、subsp. *pneumophila* は 1～15 の全血清群に分布したのに対し、subsp. *fraseri* は血清群 1、3、4、11 での存在が確認され、SBT で見出した C2 (冷却塔 2) グループに属した。subsp. *pascullei* は見出されなかった。
- 13) 浴槽水分離アメーバからは Parachlamydiae bacterium CRIB38 ならびに *Criblamydia sequanensis* に高い相同性を示す共生体が検出された。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では、3 log 以上の不活化に、栄養体は Ct47 (mg·min/l)、シストは Ct3700 が必要であった。*L. pneumophila* とアメーバとの適合性について、浴槽水分離のアメーバ *Vannella* sp. 1 株は冷却塔由来 C2 グループ 2 菌株 (subsp. *fraseri*) に対して抵抗性を示したものの他の土、冷却塔グループの菌株 (subsp. *pneumophila*) では死滅した。
- 14) 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細菌研修や短期研修新興再興感染症技術研修の中でレジオネラについて講義した。文京区、岡山県、宮崎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。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。和文総説 6 編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  
疫学情報科長  
佐原啓二 静岡県環境衛生科学研究所細菌班長  
杉山寛治・静岡県環境衛生科学研究所  
微生物部長 [現 (株) マルマ研究  
開発部長]  
田栗利紹・長崎県環境保健研究センター  
専門研究員 (現長崎県西彼保健所)  
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

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、小規模の集団感染事例は近年も引き続き起こり、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くかかる。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 法の簡便化やキット化による普及が望まれている。

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。モノクロラミンの注入・測定の自動化を行い、有効性をモデル浴槽を含む複数の入浴施設でレジオネラ不検出を目的とする。

水中のレジオネラ属菌数検査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した地衛研、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。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。本研究では、精度管理上の問題点を改良し、精度管理が事業として継続できることを目指し、外部精度管理用の試料を作製し、研究班内で実施して問題点を検索する。

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

静岡県 3 箇所、長崎県 1 箇所の温泉入浴施設にモノクロラミン発生装置を設置した。浴槽水中のモノクロラミン濃度を所定濃度に維持できることを確認し、レジオネラ属菌等の微生物を検査した。

モノクロラミンの発生量として1時間あたり最大約 100g の発生装置を設計、現地に設置した。残留

塩素濃度測定計器を設置し、ろ過器出口配管から浴槽水を電極セルに通水（1L/分）して全残留塩素濃度を測定した。制御値を 3~4mg/L に設定してモノクロラミン発生装置の運転を制御した。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浴槽システムに設置した（図 1）。測定値が下限設定値を下回った場合は、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（図 2）。薬液濃度が上限設定値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。

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 $\mu$ 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。

## 2. 浴槽水の検査

遊離残留塩素濃度は DPD 法で現場で測定した。500 ml~1500 ml 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  $\mu$ m、0.4  $\mu$ 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 $\alpha$  培地や MWY 培地も用いて比較した。

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（環境感染誌 25:8-14, 2010）で特異的な形態を観察し、血液寒天培地と

BCYE $\alpha$ （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 $\alpha$  培地に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（Oxoid）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  $\mu$ 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（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。これらの方法は、5S rRNA 遺伝子、16S rRNA 遺伝子を遺伝子を標的にしている。

## 3. 消毒副生成物の測定

浴室空気中の消毒副生成物は Tenax TA 吸着管（トリハロメタン類・ハロアセトニトリル類）または LpDNP-H S10 捕集カートリッジ（アルデヒド類）を用いて採取し、それぞれ加熱脱離-ガスクロマトグラフ/質量分析計（TD-GC/MS）、高速液体クロマトグラフ（HPLC）により定量した。

浴槽水中の消毒副生成物は、水道の公定法にしたがって、トリハロメタン類はヘッドスペース-GC/MS または パージ&トラップ-GC/MS（PT-GC/MS）で、ハロ酢酸類はメチル誘導体化、アルデヒド類は PFBOA 誘導体化し GC/MS で定量した。ハロアセトニトリル類は溶媒抽出-GC/MS または PT-GC/MS で定量した。

浴槽水中のヨウ素化トリハロメタン類は上記の PT-GC/MS では十分な検出感度が達成できなかったため、インピンジャーを用いて浴槽水を曝気し、揮散した消毒副生成物を Tenax TA 吸着管で捕集して TD-GC/MS で定量した。

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

法)

1,000 倍濃縮液 100  $\mu$ l に酸処理液 (0.2M HCl-KCl buffer、pH2.2、関東化学) 100  $\mu$ l を加えて室温で 5 分間反応後、MWY 液体培地 900  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l を 36°C で 18 時間静置培養後、100  $\mu$ 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。RNA の抽出は、qRT-PCR の酵素溶菌希釈法に準じた (平成 23 年度総括・分担研究報告書)。RT 反応には PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) を使用した。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 MEGAclear 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。

①Ct (18h) が濃縮試料 100  $\mu$ 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) で除すことによって生菌数+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。

## 5. LC EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討

タカラバイオが新たに開発した LC EMA-qPCR 用のキットを用いた。

### ・EMA 処理

18 時間液体培養し EMA 処理を行う 18h LC (+) 試料は、Solution A を 25 $\mu$ l、Solution B を 6.25 $\mu$ l 添加し、ボルテックスで混合後、遮光下、室温で 15 分静置した。その後、LED Crosslinker (タカラバイオ、#EM100 または #EM200) で 15 分間光照射を行った。

### ・DNA 抽出

0h LC、18h LC (+)、18h LC (-) (-は EMA 処理なし) を 15,000rpm で 5 分遠心し、上清を除去した。得られた沈渣に DNA 抽出バッファード D5 を 50 $\mu$ l 添加し、95°C で 10 分加温した。ボルテックス混合後、15,000rpm、4°C で 10 分間遠心し、そのまま氷上で 5 分間静置後、上清 25 $\mu$ l を DNA 溶液として回収した。

Cycleave PCR レジオネラ検出キット (タカラバイオ、CY400) を用いた。測定機器は、Thermal Cycler DICE Real Time system TP900 (タカラバイオ) を使用し、反応条件は 95°C 10 秒の後、95°C 5 秒、55°C 10 秒、72°C 20 秒を 45 サイクル行った。

## 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。試料安定性の評価結果等、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、その他 8 か所の地方衛生研究所に C~J までのアルファベットを振り分けた。試料はゆうパックでチルド、陸路のみと指定し、カテゴリ B 容器を使用した。

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きわめて低いと考えられる *L. pneumophila* SG3 浴槽水分離株を使用した。

BCYE $\alpha$  寒天培地は、栄研化学、日研生物医学研究所、極東、Oxoid の市販生培地同一ロット品、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 $\alpha$  寒天培地は栄研化学の市販生培地同一ロット品を、MWY 寒天培地は、Oxoid の市販生培地同一ロット品、及び自家調製培地を使用した。なお、市販生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 $\alpha$  寒天生培地(1 メーカー分)、選択分離生培地(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 $\alpha$  寒天培地で 40 時間培養した供試菌を添加し、マクファールランド 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、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。ゼラチンは輸送中の衝撃を軽くし破損時の被害を少なくするために添加した。ただし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. *L. pneumophila* の遺伝子型の解析

3 年間の研究実施により収集した *L. pneumophila* 臨床分離株 112 株 (分離年は 2006 年から 2012 年) およびレジオネラ症起因菌の 8 割を占める *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 92 株 (それぞれ独立に分離された浴槽関連株 44 株、冷却塔水関連株 28 株、噴水・修景水分離株 11 株、シャワー水 6 株、加湿器 2 株、河川水 (水道原水) 1 株) について 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。*flaA* は鞭毛 (flagellin) タンパク質、*pilE* は IV 型線毛 (type IV pilin) タンパク質、*asd* はスレオニン生合成系酵素であるアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*aspartate-b-semialdehyde dehydrogenase*)、*mip* は宿主マクロファージへの感染に寄与する (*macrophage infectivity potentiator*) タンパク質、*mompS* は主要外膜タンパク質 (*major outer membrane protein*)、*proA* は亜鉛メタロプロテアーゼ (*zinc metalloprotease*)、*neuA* は N-アシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼ (*N-acylneuraminate cytidylyltransferase*) をそれぞれコードする遺伝子である。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。

#### 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～平成24年）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. 地域差と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一県内の幹線道路27地点で採取した、

*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150 ml、ウォッシャー液は100 mlをメンブランフィルター（直径47 mm、0.22 μm、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 Clin Microbiol 2009 47:2525-2535)の報告したプライマー *lag-F* : 5'-CTCACAACAAGTCAAGCAAC-3' および *lag-R* : 5'-AAACCATACCAAA GCAACAT-3' を用い、GoTaqHS（プロメガ）10 μl に *lag-F*、*lag-R*（2 μM）をそれぞれ1 μl、テンプレート2 μlを加え、20 μlになるよう H<sub>2</sub>O を加え反応液とした。PCRは95°C2分、94°C30秒、57°C30秒、72°C1分を30サイクル、72°C5分で thermal cycler DICE（タカラバイオ）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. *L. pneumophila* の亜種を区別する DDH 法

基準株である *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* Philadelphia-1、および参照株である *L. pneumophila* subsp. *fraseri* Dallas 1E、*L. pneumophila* subsp. *pasucullei* U8W、対照として *E.coli* DH1 K12 株から抽出した DNA を熱変性により1本鎖にし、0.5 μg

をマイクロプレートのウェルに固定した。

DDH法の操作・判定は市販 DDH レジオネラ‘極東’キットの手順に従い、市販キット内の試薬を使用した。被検菌株からガラスビーズ法により抽出した DNA をビオチンで標識し、1本鎖 DNA とし、マイクロプレートのウェルに固定した *L. pneumophila* 各亜種の1本鎖 DNA と55～58°Cで、90分間ハイブリダイゼーションを行った。各ウェル内で形成されたハイブリッド DNA の比率をビオチン-アビジン反応を用いて測定することで比較し、被検菌 DNA と最も強く反応したウェルの菌種を被検菌の亜種と同定した。

#### 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。

#### C. 研究結果および考察

##### 1. モノクロラミン生成・注入・測定の自動化と衛生管理

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。

4箇所（静岡県3箇所、長崎県1箇所）の温泉入浴施設において、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処理を導入し、調査研究を行なった。その結果、以下の結論を得た。

1. モノクロラミンを3mg/L程度以上、常時浴槽水に維持することで、浴槽水中のレジオネラ属菌を不検出(10 CFU/100mL未満)に維持することが出来た。従属栄養細菌、アメーバも不検出であった(表1)。
2. モノクロラミンを添加した浴槽水は、遊離塩素消毒に比較して臭気が無い(又は少ない)という利点を得られた。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(表1)。入浴者

に臭気や肌感覚で違和感はなかった。

3. モノクロラミン生成装置を設置することで、人手により生成して添加する代わりに、浴槽水にモノクロラミンを連続的に添加することが出来た。

4. 浴槽水中のモノクロラミン濃度を測定計器によりにより常時測定し、モノクロラミン発生装置を制御することで、浴槽水中のモノクロラミン濃度を自動的に設定値に維持管理することが出来た。

5. しかしながら以下の課題があり今後の対応が必要である。

(1) モノクロラミンを消費する温泉泉質では、添加量が多くなり実用的でない場合があるので事前に予備試験を行い、適用可能性を確認する必要がある。

(2) モノクロラミン処理を行なうと浴槽水中のアンモニウムイオンが増加するので、1週間に一度行なう高濃度塩素洗浄の際、遊離残留塩素濃度を維持するためには、ブレイクポイント処理が必要となる。実際の現場では、その時の次亜塩素酸ナトリウムの添加量の設定が難しいので、具体的な高濃度塩素洗浄方法の検討が必要である。

(3) アンモニウムイオンを含む温泉泉質では、単に次亜塩素酸ナトリウムを添加しても、モノクロラミンが生成していることがある。この場合の、浴槽水の残留塩素濃度の管理方法を、モノクロラミン処理方法と同様に全残留塩素濃度 3mg/L 程度以上とすることも検討されるべきである。

(4) モノクロラミン濃度測定計器の電極は、温泉泉質によってはスケールが付着して感度が低下し測定値がずれるので、適切な維持管理が必要である。

モノクロラミン発生装置の費用は 810,285 円(税込み、工事費含まず)である。残留塩素濃度測定計器の費用は、イワキ CL-320W-IA インライン型(濃度範囲 2~30mg/L) の場合 1,155,000 円(税込み、工事費含まず)である。運転コストは、同じ塩素量当たりのコストでは、モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムの約 2 倍である。モノクロラミン処理に関して、課題が明らかとなったので、実際の運転管理に適用できるよう継続的な解決を進めていく必要がある。

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。

## 2. 消毒副生成物の暴露評価

塩素による消毒を行っている 10 箇所の浴場施設について調査を行った結果、いずれの施設の浴室空気中からもクロロホルム ( $15\sim 111\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) 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 ( $0.37\sim 7.7\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ )、ブromoクロロアセトニトリル ( $0.95\sim 5.8\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) 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 ( $5.3\sim 43\ \mu\text{g}/\text{l}$ ) やトリクロロ酢酸 ( $2.0\sim 50\ \mu\text{g}/\text{l}$ ) が比較的高濃度で検出された。一方、*N*-ニトロソジメチルアミンとクロロピクリンについて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い濃度 ( $4\sim 110\ \mu\text{g}/\text{l}$ ) で存在していることが本研究によって初めて明らかになった。

次に、試験的にモノクロラミン処理を導入した浴場施設の浴槽水中消毒副生成物濃度を指標として塩素代替消毒剤モノクロラミンの適用可能性を検討した。その結果、塩素処理時に主要な消毒副生成物としてクロロホルム ( $20\ \mu\text{g}/\text{l}$ ) が検出された浴場施設 (K 湯) ではモノクロラミン処理への変更によって生成量が 1/100 ( $0.21\ \mu\text{g}/\text{l}$ ) まで大幅に低減した。また、ブromoホルム ( $110\ \mu\text{g}/\text{l}$ ) とジブromoアセトニトリル ( $37\ \mu\text{g}/\text{l}$ ) が主な塩素消毒副生成物である他の浴場施設 (H ホテル) においても、モノクロラミン処理時には消毒副生成物の生成が 1/5 以下(それぞれ  $0.42\sim 23\ \mu\text{g}/\text{l}$ 、定量下限値未満) に抑えられることが明らかになった。これらの結果は、消毒副生成物暴露の観点から、モノクロラミンが有望な塩素代替消毒剤であることを示している。

一方、もともと塩素処理時のトリハロメタン類濃度が低い別の浴場施設 (I 湯) ではモノクロラミン処理による低減化は 1/2 程度にすぎなかった(ジブromoクロロメタン濃度が  $0.89\ \mu\text{g}/\text{l}$  から  $0.39\ \mu\text{g}/\text{l}$  に減少)。この浴槽水を精査した結果、興味深いことに、塩素処理とモノクロラミン処理のいずれの場合にもヨードホルム ( $\text{CHI}_3$ ) やクロロジヨードメタン

(CHCl<sub>2</sub>)、ブロモジヨードメタン (CHBrI<sub>2</sub>) などのヨウ素化トリハロメタン類が比較的高濃度で存在していることが明らかになった。

### 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の改良

入浴施設の浴槽水等を対象としたレジオネラ属菌の生菌迅速検査法として、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (以下、LC RT-qPCR 法) を開発した。DNA よりも鋳型量が豊富な 5S rRNA を標的とし、カラム精製不要で定量性に優れた 1 step RT-qPCR を作成した。濃縮浴槽水に液体培地を加えて 18 時間培養し、rRNA の増加量を RT-qPCR で測定することで、生菌量と死菌量を同時に評価する LC RT-qPCR 法を確立した。コピー数既知のコントロール RNA を用い、アメーバで培養したレジオネラ属菌の 5S rRNA コピー数が、1 CFU 当たり 8,000 コピーから 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 コピー数を CFU に換算する係数とした。

夾雑菌による液体培養でのレジオネラ増殖抑制を回避するため、検水濃縮液の ATP 量に応じて前処理を追加・変更する手順を定めた。微生物汚染の激しい検体は、液体培養の段階でレジオネラの増殖が競合的に抑制されることが明らかとなっている。そこで、増殖抑制が認められたろ過器逆洗水を使用し、酸処理 5 分、酸処理 20 分、熱処理 (50°C 5 分)、熱酸処理 (50°C 5 分後、酸処理 5 分) の前処理を行い比較した (図 3)。平板培養法では、酸処理 5 分及び熱処理でレジオネラのコロニーは確認できなかったが、酸処理 20 分及び熱酸処理では雑菌の影響を受けることなくレジオネラの検出が可能であった (図 3 (a))。一方、LC RT-qPCR 法では、酸処理 20 分と熱酸処理で液体培養後に生菌定量値が得られ、熱酸処理は酸処理 20 分と比較して 1/10 程度に低下したが、培養前の総菌定量値はいずれの前処理においてもほぼ同じ結果が得られた (図 3 (b))。

また、温泉成分等による RT-qPCR 反応阻害を回避するため、RNA 抽出液及び RT-qPCR 反応液に阻害回避試薬を加えること等の改良により、偽陰性反応の低減に成功した。RT-qPCR 反応阻害の要因とし

て、高度の微生物汚染とフミン酸等反応阻害物質の混入が挙げられる。高度の微生物汚染により RT-qPCR 反応阻害が認められたろ過器逆洗水を使用し、阻害回避試薬等の効果を検証した。RT-qPCR 反応液への Solution E (タカラバイオ) の添加及び RNA 抽出液の Zymo-Spin カラム (ZYMO RESEARCH) 処理ではいずれの方法でも培養前後ともに改善効果は認められなかったが、RNA 抽出液に終濃度 5% の Chelex を添加 (バイオ・ラッド) した場合には培養前検体で 10 倍、培養後検体で 40~50 倍程度の感度増加が認められた。また、フミン質が含まれた温泉水では、qPCR 反応が阻害されることが知られている。そこで、RT-qPCR キット (タカラバイオ、RR064) におけるフミン酸の MIC 値を算出し、各阻害回避試薬の効果を検証した。RT-qPCR 反応液中のフミン酸最終濃度 1.6 mg/L で 5S rRNA の回収率が 1/3~1/4 に低下したことから、当該キットにおけるフミン酸の MIC は 1.6 mg/L と考えられた。一方、RT-qPCR 反応液中に Solution E を添加した場合の MIC は 3.2 mg/L に上昇し、当該試薬の阻害回避効果が確認できた。RNA 抽出液を Zymo-Spin カラムに通じた場合は、終濃度 12.8 mg/L でも反応阻害は認められず、高い阻害回避効果が確認できた (図 4)。

改良 LC RT-qPCR 法を実試料で評価した結果、培養前の定量値から算出する Total Legionella (死菌+生菌) は、平板培養法と比較して感度 89.8%、特異度 81.8%であったが、液体培養後の定量値から算出する Viable Legionella は、感度 83.3%、特異度 96.4%と、生菌に対する特異性が極めて高い方法であることを明らかにした (表 2)。平板培養法と LC RT-qPCR 法の定量値は高い相関を示し ( $R^2=0.80$ )、施設の汚染状況を迅速に評価できると考えられた (図 5)。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。

### 4. LC EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討

液体培養 (Liquid Culture) EMA-qPCR 法 (LC

EMA-qPCR) を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の評価を行った。新規 16S rRNA 遺伝子検出系はレジオネラ標準菌 0.5 CFU/PCR 反応以上が検出可能であり、*Legionella londiniensis* を含め検討したすべての種が検出可能であることを確認した。

新規 16S rRNA 検出系を用いたレジオネラ標準菌 1 CFU 当たりのコピー数は、DNA 抽出にカラム精製を用いると 16 コピー、簡易熱抽出法では 20 コピーと算出された。レジオネラ標準菌を用いて LC EMA-qPCR を行った場合、1 CFU 当たりの 16S rRNA コピー数は、液体培養前 12 コピー、18 時間培養後 270 コピー、18 時間培養 EMA 処理後 100 コピーと見積もられ、コピー数を CFU に換算するための暫定的な係数とした。

浴槽水等の実試料 113 件を用いて評価を行った結果、LC EMA-qPCR 法で 1 CFU/100ml 相当を陽性とした場合の平板培養法に対する感度は 95.5%、特異度 56.5%であったが、得られる定量値は、EMA 処理による死菌増幅抑制効果により、平板培養法と高い相関を示した ( $R^2=0.627$ 、図 6)。最終的に LC EMA-qPCR のカットオフ値を 5 CFU/100ml 相当に設定した場合の感度は 95.5%、特異度は 75.4%であり、実試料を用いた迅速検査の成績として十分満足できる結果が得られた(表 3)。本法は、簡便な操作で平板培養法の結果を迅速に予測可能であり、浴槽水等におけるレジオネラ生菌遺伝子検査法としての活用が期待される。

## 5. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み

平成 22 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。実態調査のまとめの一例を表 4 に示した。平成 23 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。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 $\alpha$  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、検査者間での結果で安定しない状況が示された。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 $\alpha$  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 $\alpha$  寒天培地では、検査者間差は認められたものの、極東の BCYE $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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。

平成 24 年度のプレ精度管理でも、市販培地より自家調製培地で発育が顕著であった。この傾向は、適切に約 1 年保存した自家調製培地でも見られた。塗布時のコンラージ棒のタッチがハードな場合に減少する傾向がみられた。

#### 6. *L. pneumophila* の SBT 法による遺伝子型別法

*L. pneumophila* を収集して、SBT (sequence-based typing) 法を用いて遺伝子型別を行った。3 年間で 112 株の *L. pneumophila* 臨床分離株、92 株 (感染源調査で分離され、臨床分離株と重複していると考えられる菌株を除くと、82 株) の *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株について型別を行った。

臨床分離株と重複していると考えられる菌株を除いた浴槽関連株 36 株は 21 種類に型別され、多様であったが、冷却塔関連株 28 株は 8 種類に分けられ、19 株が ST (sequence type) 1 となり、やや多様性に乏しかった。それ以外の環境分離株 18 株 (噴水・修景水 11 株、シャワー水 5 株、加湿器、河川水 (水道原水) 各 1 株) については、12 株が ST1 で残りの 6 株はそれぞれ異なる ST だった。環境分離株全体 (82 株) では、32 種類の ST が見出された。

一方、臨床分離株 112 株は 64 種類に分けられた。Minimum spanning tree 解析を行い環境分離株と対応させると、環境分離株で見出されたグループの他に新しい 1 つのグループ (感染源が不明のものが多いためグループ U と名付けた) が形成された (図 7)。

本研究で調べられた環境分離株 91 株 (82 株から、1 株しか解析できなかった河川水を除いた 81 株に患者分離株と一致した浴槽水分離株 8 株、シャワー

水分離株 1 株、加湿器分離株 1 株の計 10 株を加えた 91 株) を以前解析した環境分離株 134 株 (冷却塔水分離株 50 株、浴槽水分離株 50 株、土壌分離株 34 株) に加えた 225 株について minimum spanning tree 解析を行ったところ、以前の解析で見出された 8 つのグループは保持されており、新しく加わった浴槽水分離株も B1、B2、B3 に、冷却塔水分離株も C1、C2 に属するものが多かった。また、新しく菌株が加わったことにより、臨床分離株の解析で見出されたグループ U が環境分離株においても 4 種類の ST により形成されたが、由来は浴槽水、冷却塔水、修景水、シャワー水と互いに異なっていた (図 8)。

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、浴槽水、冷却塔水以外の水検体数をさらに増やして、遺伝子型を調査する必要がある。

#### 7. 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は、人口当たりの報告数が全国でもっとも多い状況となっている。これまでの調査の結果、患者報告数には地域差が認められることに加え、およそ 4 割は感染源が不明であることが明らかとなった。そこで、レジオネラ症の発生の背景を探ることを目的として、以下の調査を行い、成果を得た。

感染の地域性とその原因：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 *lag-1* を保有する *Legionella pneumophila* (*L.p.*SG1 (*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。このことから、塩素消毒により *L.p.* SG1 (*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。

不明感染源解明のための環境調査：浴用水以外の感染源を特定するため、水溜りと車のウォッシャー液についてレジオネラ属菌の調査を実施した。平成

23年度は水溜り 69 検体、ウオッシャー液 31 検体を、平成 24 年度は水溜り 65 検体、ウオッシャー液 106 検体についてレジオネラ属菌の分離を試みた。その結果、水溜り、ウオッシャー液から、平成 23 年度は 33/69 (47.8%)、10/31 (32.3%) が、平成 24 年度は 21/65(32.3%)、3/106(2.8%)のレジオネラ属菌が分離された。水溜りから分離されたレジオネラ属菌では *L.p.* SG1 が 20.4%と最も多く、それらのうち *L.p.* (*lag*-1+) 保有株が 57.3%と、浴水のそれ (45.3%) よりも高かった。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 (図 9)。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。

#### 8. 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分離された *L. pneumophila* (*Lp*)のうち、血清群(SG)3 の株は平成 20 年~24 年までに 8 株あり、これらすべての株が、SBT)法による型別で ST93 に型別され、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法でも同じパターンを示した。このことから、これら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、*Lp* SG3 の環境中での分布を調査した。浴槽水等 150 検体を調査した結果、22 検体(14.7%)からレジオネラが検出され、*Lp* SG3 は浴槽水 2 検体のみから検出された。一方、浴槽水等から分離されたレジオネラ 266 株を収集し血清型別を実施した結果、*Lp* SG3 は浴槽水由来の 50 株、原水由来の 6 株、プール水由来の 13 株およびフローミル水由来の 9 株の計 78 株であった。このうちの 57 株と、過去に収集した浴槽水等由来の *Lp* SG3 12 株、当センターで分離した浴槽水由来の 2 株および患者株 8 株の計 79 株について PFGE 法を行って、PFGE パターンを比較した。PFGE パターンは 26 パターンに分類され、患者株はすべて同一の PFGE パターンであったが、他の株とは一

致しなかった。現状では患者の感染源は不明であり、今後さらに多様な検体について調査を行って、感染源を究明していく必要がある。

さらに *Lp* SG1 の患者株 ST609、ST1077 が 3 株ずつあり、これも感染源不明で、今後の調査が必要である。

#### 9. 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。

#### 10. 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検体が培養陽性であった。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。この研究は 2012年11月に名古屋で開催された「生活と環境全国大会」で、最優秀賞を受賞した。

#### 11. DDH 法による *L. pneumophila* 亜種の同定

レジオネラ症の主要な起因菌である *L.*

*pneumophila* は *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* の 3 亜種に分類されることが知られているが、マイクロプレートでの比色による DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) 法を用いたこれらの鑑別法を確立した。

血清群 1 の基準株および血清群 2 から 15 の参照株、計 18 株 (血清群毎に各 1 株、血清群 5 のみ 4 株) を用いてこの鑑別法の正確さを確認できた。

国内分離株 128 株について同様に DDH 法を実施したところ、1~15 の全血清群に *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* が分布し、血清群 1、3、4、11 で subsp. *fraseri* の存在が確認され、複数の血清群に分布することが分かった (表 5)。subsp. *pascullei* は見出されなかった。由来別に国内分離株の subsp. *fraseri* の分布を見たところ、臨床分離株 46 株では subsp. *fraseri* は 1 株 (2%) だけだった。環境分離株 63 株では、subsp. *fraseri* は 4 株 (6%) と占める割合が高かった (Fisher の正確確率検定で有意差無し)。さらに環境分離株の内訳をみると、風呂水 (34 株中 1 株) より冷却塔水 (20 株中 2 株) からの分離が多いことが分かった (Fisher の正確確率検定で有意差無し)。

SBT 法と亜種との相関を見ると、SBT 法で用いられる遺伝子のうち、特定の *pilE* の遺伝子配列をもつものが DDH 法により、*L. pneumophila* subsp. *fraseri* と同定される可能性が出てきた (表 6)。

#### D. 結論

アルカリ泉質の入浴施設に、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) 濃度を制御できた。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であった。

モノクロラミン消毒を行なっている入浴施設で消毒副生成物を評価した。遊離塩素消毒に比べ、消毒副生成物を低減させることができるが、ヨウ素イオンが存在する温泉水では有害性が十分明らかに

されていないヨウ素化消毒副生成物を生じることから、水質を考慮して消毒剤を選定する必要がある。

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、入浴施設の浴槽水等を対象としたレジオネラ属菌の生菌数を迅速に評価可能な液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC RT-qPCR) を開発した。さらに別に、液体培養と組み合わせた Ethidium monoazide-qPCR 法 (LC EMA-qPCR) によりレジオネラ生菌迅速検査法のキット化を検討した。これは死菌由来 DNA を EMA で修飾して PCR 増幅を抑制し、生菌由来 DNA のみを選択的に検出する。これらの方法は、簡便な操作で平板培養法の結果を迅速に予測可能であり、浴槽水等におけるレジオネラ生菌遺伝子検査法としての活用が期待される。

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。病原体検出マニュアル (レジオネラ症) を改訂し、BYEα 液体培地にゼラチンを添加して試料を作製して、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。

*L. pneumophila* 血清群 1 について SBT を行い、環境分離株を生息環境に従い 9 つにグループ化できた。臨床分離株もその中に位置づけることができた。

岡山県内のレジオネラ症散発患者から *L. pneumophila* が 26 株分離された。このうち血清群 3 は 8 株ですべて ST93 で、調べた 7 株は同じ PFGE パターンであった。今のところ ST93 の株は環境中から見つかっていない。

富山県でレジオネラ症の報告数が多い理由のひとつとして、西部地区での残塩の高い浴用水における *lag-1* を保有する *L. pneumophila* の分布が考えられた。今後、塩素剤を用いない衛生管理手法を併用すべきと思われる。そのためには、効率的な塩素剤の使い方など、浴用水の衛生管理基準や管理方法については検討が必要である。また、水溜りと感染源が推定不能であったレジオネラ症患者から分離さ

れたレジオネラ属菌が遺伝的に近い関係にあることが明らかとなった。

*L. pneumophila* subspecies の同定は困難であったが、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* の3亜種を、DDH法を用いて簡単に鑑別同定する方法を確立し日本の株は subsp. *pneumophila* が多いことが判明した。

昨年11月から12月にかけて山形で3例、埼玉で8例のレジオネラ症の患者が入浴施設で発生している。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）、英国の浴槽展示による集団感染（2012年）が近年報告され、引き続き現場の衛生管理が求められている。

## 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) 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、防菌防衛 38(4):259-71(2010)
- 4) 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、防菌防衛 38(4):251-8(2010)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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.
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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).
- 11) 西山明宏、石田直、興陽陽平、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、橘洋正、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)
- 12) 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ユ  
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
- 13) 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*、  
61:21-23, 2011.
- 14) Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig J,  
Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhata 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.* 78:4263-4270 (2012)

- 15) Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M: Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama prefecture, Japan. *J. Infect. Chemother.* in press.
- 16) 市原祥子・江藤良樹・濱崎光宏・村上光一・竹中重幸・堀川和美、西原千鶴子、荒牧明世、前川純子:患者及び浴場施設検体から複数血清群の *Legionella pneumophila* が分離された事例について. 2012. 福岡県保健環境研究所年報第 39 号 (印刷中) .

## 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. 25<sup>th</sup> 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. 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Copenhagen, Denmark. Sep 2010.
- 3) 山崎利雄、倉 文明、循環式浴槽における浴用水の抗酸菌の検出調査、第 80 回実験結核研究会総会、2010 年 5 月、京都
- 4) 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)

- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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 4 8 回例会、大分 (2011.3)
- 12) 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.