

201429010A

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

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場  
等における衛生管理手法に関する研究  
(課題番号：H25-健危-一般-009)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 倉 文明

平成 27 (2015) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究-----1  
倉 文明

## II. 分担研究報告

1. 各種泉質及び形態の温泉施設におけるモノクロラミンによるレジオネラ属菌消毒効果の検証-----33  
長岡宏実、縣 邦雄、神野透人、八木田健司、杉山寛治、小坂浩司、泉山信司、片山富士男、  
和田裕久、榎原広里、市村祐二、青木信和
2. 消毒副生成物の暴露評価-----45  
神野透人、香川(田中)聡子、田原麻衣子、川原陽子、真弓加織、高橋淳子、縣 邦雄、杉山寛治、  
小坂浩司、八木田健司、泉山信司
3. 冷却水系の消毒維持管理と菌の多様性-----53  
縣 邦雄、井上浩章、神澤 啓
4. Liquid Culture EMA qPCR によるレジオネラ生菌迅速検査法の改良と評価-----63  
磯部順子、飯高 順子、金谷潤一、武藤千恵子、山口友美
5. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-----77  
森本 洋、磯部順子、緒方喜久代、中嶋 洋、小川恵子、金谷潤一、久保田晶子、佐々木麻里、  
田中 忍、千田 恭子、武藤千恵子、山口友美、吉野修司、渡辺祐子、倉 文明、前川純子、  
黒木俊郎
6. 公衆浴場の衛生管理等に関する検討-----103  
黒木俊郎、森本 洋、磯部順子、緒方喜久代、倉 文明
7. レジオネラ属菌の培養検査法と精度管理-----109  
緒方喜久代、佐々木麻里、成松浩志
8. 環境から分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 株の SBT 法による遺伝子型別および臨床  
分離株の収集と型-----115  
前川純子、倉 文明
9. 富山県の不明感染源解明のための環境調査-----123  
磯部順子、金谷潤一
10. 地域特異的な感染源不明クラスターに関する調査(平成 26 年度) -----133  
中嶋 洋
11. 家庭内環境における *Legionella* 汚染の実態に関する研究-----143  
黒木俊郎、前川純子、八木田健司、渡辺祐子、倉 文明
12. レジオネラ感染とアメーバ アメーバのレジオネラ受容体の解析-----153

八木田健司、泉山信司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----159

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さらに簡便性が求められている。培養法は検査機関で結果が異なり、検査法の標準化と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、日本でもモノクロラミンによる消毒でレジオネラ汚染が抑制されることが複数の入浴施設で観察されたが、泉質に応じた適用の検討が必要である。そこで、以下の検討を行い、成果を得た。

- 1) 遊離塩素での消毒効果が期待できない鉄泉の源泉水（静岡県内 1 検体）で、モノクロラミン濃度が安定して維持されることがわかった。そこで、その源泉水を使用する循環式入浴施設浴槽水において、モノクロラミン濃度を 2 mg/L に維持して実証試験を実施し、浴槽水中からレジオネラやアメーバは検出されず、塩素消毒臭の原因とされるトリクロラミンや消毒副生成物も少なく、モノクロラミン消毒の高い消毒効果と安全性が確認された。他の 1 県の鉄泉 6 源泉水についても調査し、3 源泉ではモノクロラミン濃度が一定程度維持された。成果を総説にまとめた（杉山寛治、ビルと環境 148 号 34-41, 2015）。
- 2) 静岡県内の循環式入浴施設において、モノクロラミン消毒における濃度管理を濃度測定方式からより簡便なタイマー注入方式に変更して、系内濃度 3 mg/L を概ね維持することができた。また、系内濃度は補給湯量の増減には影響を受けるが、利用者数には影響を受けないことが示唆された。アンモニウム源として塩化アンモニウム安価な硫酸アンモニウムが使用可能であること、塩素剤とアンモニウムのモル比を 1 : 1.5 に低減できることが示された。
- 3) 気泡発生装置使用浴槽を有する静岡県内 3 施設においてモノクロラミン濃度 2 mg/L 管理下における消毒効果及び消毒副生成物の発生について実証試験を行った。その結果、いずれの施設においてもレジオネラ属菌およびアメーバは検出されなかった。
- 4) 比較的ヨウ素イオン濃度の高い、モノクロラミン消毒を行っていない循環式温泉（新潟 5 施設・秋田 2 施設・静岡 4 施設）の浴槽水について、浴槽水中のヨウ素化消毒副生成物を測定した。その結果、2 施設では高濃度の  $\text{CH}_2\text{I}_2$  及び  $\text{CHI}_3$  が特徴的に検出された（ $\sim 75\mu\text{g/L}$ ）。同一試料について、遊離及び結合塩素濃度、ヨウ素イオン及びヨウ素酸イオン濃度、並びに TOC の測定を行い、これらのヨウ素化消毒副生成物の生成量に影響を及ぼす要因について検討を行った。温泉でのヨウ素化消毒副生成物曝露は、クロラミン処理導入の場合に考慮する必要があるのみならず、現行の処理においても曝露評価や低減化策を検討すべき問題であると考えられる。
- 5) 2013 年 4 月～2014 年 12 月の冷却水のレジオネラ属菌培養検査の結果（17606 検体）のうち使用殺菌剤が明記されている 6664 検体について、殺菌剤の種類ごとにレジオネラ属菌の菌数分布を集計した。塩素系殺菌剤では、他の有機系殺菌剤に比べてレジオネラ属菌に対する抑制効果が低かった。モデル冷却塔による各種殺菌剤の効果評価で実機と同様の結果が再現された。
- 6) 生菌を検出する迅速検査では、死菌由来 DNA を EMA で修飾して PCR 増幅を抑制し、液体培養と組み合わせる生菌由来 DNA のみを選択的に検出する。レジオネラ属菌迅速検査法の標準化に向け、現在市販されている迅速検査キット（生菌と死菌の両方を検出する LAMP 法）及び生菌迅速検査キット（生菌特異的検査法として新規に開発された LC EMA-qPCR 法、LC は liquid culture）の 2 法について、浴槽水等の実試料 176 検体を用い、平板培養法に対する感度、特異度等を評価した。

LC EMA-qPCR 法について、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100ml 相当を用いた場合、平板培養法に対する LC EMA-qPCR 法の感度は 89.5%、特異度は 73.9% であり、菌数の相関は  $R^2 = 0.6176$  であった。LAMP 法と比較すると、LC EMA qPCR 法を用いた方が感度・特異性が高かった。市販迅速検査キットを用いる際は、各検査キットの特徴を理解し、目的に応じて使い分けることが重要と考えられた。

- 7) 菌数を指定してシスメックス社のバイオボールを導入し、41 地衛研を対象に水中レジオネラ属菌数の外部精度管理を実施した。1 回の作製・配布に 184 万円かかる。今年度は WG 推奨法を指定したところ、目標範囲に入った機関は、昨年度の 36%から 89%に増加した。国立保健医療科学院の短期研修新興再興感染症技術研修で、斜光法を中心としたレジオネラ検査法研修を 24 地衛研等を実施した。
- 8) 加熱による雑菌処理時間を研究班推奨の方法 50°C20 分間と JIS K 0650-50-10:2006 の 50°C30 分間の 2 法で、浴槽水・湯口水 56 検体を用いて比較検討を行なった。その結果、50°C20 分の方が高い検出率が得られた。
- 9) 主たる起因菌 *L. pneumophila* (*Lp*) について、sequence-based typing を行い、菌の生息環境と関連した疫学状況を調査している。昨年度収集した臨床分離株 36 株を型別した。これまで調査した株と合わせ、*Lp* SG1 の環境分離株 408 株の Minimum spanning tree 解析を行った。環境分離株は生息環境に応じて 9 つのグループに分かれることを見出していたが、シャワー水および、噴水・修景水分離株は独自の遺伝的グループを形成しなかった。シャワー水分離株は、冷却塔水分離株同様、最も多い遺伝子型は C1 グループに属する ST1 だった。噴水・修景水分離株は、B (bath) グループに属しなかった。
- 10) 冷却水 11 検体および浴槽水 3 検体についてレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーを作製して解析したところ、浴槽水は *Lp* のクローンの比率が高かったが、冷却水においては既存種に属さない未知のレジオネラ属菌クローンの塩基配列が大部分を占めた (Inoue H, *Microbes Environ.* 30:108-112, 2015)。培養法・PCR・EMA-qPCR を比較した結果、冷却塔水では培養不能のレジオネラ属菌の存在が示唆され、浴槽水では、EMA-qPCR 法が培養法結果の予測に有効であった (Inoue H, *Biocontrol Sci.* 20:71-74, 2015)。
- 11) 富山県で多く発生するレジオネラ感染症の感染源を探求するため、11 浴用施設について、浴用水 44 検体、シャワー水 34 検体のレジオネラ属菌の検査を行った。レジオネラ属菌の検出率はそれぞれ 22.7%、29.4%であった。県内の河川水 7 か所 34 検体、土壌 13 か所 64 検体から検体を採取し、1 か月アメーバと培養し、酸処理後に GVPC にて培養した。河川水では、レジオネラ属菌の検出率は 44.1%、土壌では、レジオネラ属菌の検出率は 39.1%であった。H24 年度からの検体をまとめると、シャワー水 94 検体の内 34%から菌が分離され、臨床分離株に多い ST505 も分離された。
- 12) 倉敷周辺の患者に多い ST93 (*感染症学雑誌* 85:373-379, 2011) の生息環境は調査をするも未だ不明である。*L. pneumophila* SG1 の遺伝子型 ST609, ST1077 も ST93 と同様の ST グループに属し浴槽水由来株の ST とは異なるので、保健所の協力を得て浴槽水以外の調査も行っていく。
- 13) 一般家庭 14 軒 125 検体を調査して、水試料 75 検体のうち 3 検体；水槽、給湯水、蛇口水 (アメーバ培養) からレジオネラを分離した。LAMP 法は、直接実施した場合は水試料 75 検体中 24 検体 (32.0%) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、アメーバによる増菌後では水試料 75 検体中 31 検体 (41.3%) と検出率が増加した。

- 14) アメーバのレジオネラ受容体の解析を行なった。*Acanthamoeba castellanii* ATCC30010 に Lp 80-045 を感染させるときに、糖質等で 30 分前処理して感染阻害を認めた。
- 15) 北海道、仙台市、千葉県、富山県、多摩市、大分県、宮崎県のレジオネラ症防止のための研修に対応した。厚生省の生活衛生関係技術担当者研修会において成果を解説した。国立保健医療科学院平成 26 年度短期研修新興・再興研修で 5 日間レジオネラの講義と検査法実習を行なった。国立感染症研究所で開催されている希少感染症技術研修会でレジオネラ症と検査法について解説した。

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  
 神野透人・国立医薬品食品衛生研究所室長  
 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  
 専門研究員(総括)  
 黒木俊郎・神奈川県衛生研究所部長  
 長岡宏美・静岡県環境衛生科学研究所  
 細菌班長  
 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

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ロ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。モノクロロミンを入浴施設の浴槽水の消毒に応用するのは我々が初めてである。すでにモノクロロミンの注入・測定の自動化を行い、モデル浴槽を含む複数の入浴施設でレジオネラ不検出として、有効性を確認できた。静岡市ではモノクロロミンの使用が条例で認められた。モノクロロミンによる配管洗浄やモノクロロミン消毒時のバイオフィームの状態、泉質によるモノクロロミンの安定性の検査、消毒副生成物の調査を行なった。今年度は、遊離塩素消毒の困難な鉄泉、タイマー式による簡易な注入法とアンモニウム塩を硫酸にかえることによるコスト低減、を検討した。

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や米国 CDC で行われている。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。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討する。シスメックス社のバイオボールを利用すると、菌数を指定でき試料の作製と配布の労力が軽減された。今年度は、昨年度の結果のばらつき

A. 研究目的

平成 26 年には過去最多の 1,236 例(暫定値)のレジオネラ症が届けられている。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について、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 PCR 法のキット化を行ってきた。このような迅速検査の普及とそのため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

の低減化をめざし、研究班の標準検査法を指定して検討した。

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、昨年を引き続き、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岡山県と富山県の地域、神奈川県の一級家庭で行った。

## B. 研究方法および材料

### 1. 鉄泉温におけるモノクロラミン消毒、気泡発生装置使用浴槽のモノクロラミン消毒、タイマー式注入、硫安使用によるコスト削減

鉄泉の源泉水におけるモノクロラミンの濃度安定性試験は、各 100 mL をポリエチレン容器に入れ、モノクロラミンまたは次亜塩素酸ナトリウムを 5 mg/L 及び 10 mg/L となるよう添加し、室温 (25°C) で 1 時間、3 時間、5 時間、24 時間放置後の全残留塩素濃度を測定した。全残留塩素濃度は、適宜希釈してから、DPD 試薬による比色法で測定した。

レジオネラ属菌の定量は、浴槽水 500mL をメンブランフィルター法により 100 倍に濃縮し、GVPC 寒天培地を用いて分離培養し、100mL あたりの CFU (Colony Forming Unit) を算出した。さらに、レジオネラ属菌の増殖の場となる自由生活性アメーバ (大腸菌塗布無栄養寒天培地)、および一般細菌数 (標準寒天培地 (栄研化学)) についても常法により定量した。

気泡発生装置使用浴槽におけるモノクロラミン消毒効果の検証は、静岡県内 3 か所 (三島市、静岡市、浜松市) の営業施設において実証試験を行なった。図 1 に、の気泡発生装置使用浴槽の概要を示した。

採水現場における浴槽水のモノクロラミン濃度、全残留塩素濃度、遊離残留塩素濃度の測定は、簡易測定器であるポケット水質計 (HACH 社、オーヤラックス社) を用いた。測定試料は、測定器の測定可能範囲内にするた

め浴槽水を純水で 5 倍に希釈調製した。

静岡市の循環式入浴施設 0 と、浜松市の循環式入浴施設 H に、タイマー注入方式装置を設置し、モノクロラミンを概ね 3mg/L の濃度維持を目標にタイマーによる自動機械注入を行った。静岡市内の施設 0 は 1 日の平均利用者が 319 人の循環式露天風呂で、泉質はナトリウム - 炭酸水素塩、pH9.0 であった。試験は 3 か月実施しその間 6 回採水し、検査に供した。浜松市内の施設 H は同様の施設で、試験は 5 ヶ月間実施した。

## 2. 浴槽水の検査

4 ヶ所の地方衛生研究所において、平成 26 年度に入浴施設から 176 件の試料 (浴槽水 151 件、原水 7 件、シャワー水 9 件、採暖槽水 6 件、足湯 3 件) を採取し、遺伝子迅速検査法の検討に用いた。水質は温泉が 35.1%、白湯が 62.3%、薬湯が 2.6% であり、浴槽水の使用形態は、循環式が 87.4%、掛け流しが 12.6% であった。

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°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 $\alpha$  (ビオメリュー等) 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°C 2 日間培養後、従属栄養細菌数は R2A 寒天培地で 42°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。今年度の方法は、16S rRNA 遺伝子を標的にしている。

### 3. 消毒副生成物の測定

**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、高感度測定可能な 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) を併用した。浴槽水を輸送し、実験室 (国立保健医療科学院) で実施した。

秋田県内 2 カ所、新潟県内 5 カ所および静岡県 4 カ所、計 11 カ所の温泉施設で浴槽水を採取した。浴槽水は 40 mL ガラスバイアルに採水し、少量のアスコルビン酸ナトリウムを添加した後、冷蔵して研究室に輸送した。pH および残留塩素濃度は採取後直ちに測定を行った。

#### ジおよびトリハロメタン類 (DTHMs) の定量

あらかじめ NaCl 3 g を入れた 22 mL マイクロコネクター型インピンジャー (Sigma-Aldrich) 試料水 10 mL を採り、約 30 mL/min の流速で 30 分間空気を循環し、試料水から揮散した DTHMs を不活性処理ステンレス製 Tenax TA 吸着管 (CAMSCO, GL Sciences) に吸着させた。Tenax TA に吸着した DTHMs は加熱脱離-ガスクロマトグラフ/質量分析計 (TD-GC/MS) で定量した。TD 装置は Shimadzu TDTS-2010 を用いた。

#### ハロ酢酸類 (HAAs) の定量 Microsep Advance

Centrifugal Device (Pall) を用いて試料水を 3000 rpm で 20 分間遠心し、夾雑する垢などの懸濁物質を限外ろ過により除去した後に分析に供した。LC/MS/MS 分析には Shimadzu LCMS-8040 を用いた。

ヨウ素イオンはイオンクロマトグラフ法、ヨウ素酸イオンは高速液体クロマト-ポストカラム吸光度法で定量した。定量下限値はそれぞれ 0.2 mg/L、0.1 mg/L であった。

これらの測定は、国立医薬品食品衛生研究所で実施した。

### 4. 冷却水のレジオネラ属菌検出データの解析

2013 年 4 月から 2014 年 12 月にかけて日本全国の建築物 (ビル) や工場、医療施設、商業施設等の冷却水を採水し、アクアス (株) つくば総合研究所でレジオネラ属菌数を測定した結果を解析した。

アクアス (株) つくば総合研究所 (茨城県つくば市) の実験棟一階屋外南側テラスに、冷却塔を模擬した循環式モデル冷却塔を設置して、各種殺菌剤を使用してレジオネラ属菌、アメーバ等の抑制効果を評価した。モデル冷却塔は保有水量 60L、循環水量 180L/hr、電気ヒーターを使用して常時水温 30°C に維持し、循環水の蒸発は殆ど無く、つくば市水を 7L/day 補給するシステムである。4 系統の処理条件で試験を行った。

①無処理、②遊離塩素、③結合塩素、結合塩素剤 (塩素化スルファミン酸) を連続的に添加して、循環水中の全残留塩素濃度を 3 mg/L に維持する条件、④CMI + カチオン製剤品 CMI (5-クロロ-2-メチル-4-イソシアゾリノン-3-オン) とカチオンポリマー (WSCP) を含有する処理剤を循環水中に 200mg/L 維持する条件

実際に運転している冷却水 8 検体を採取して、培養法によるレジオネラ属菌の検出を行い、検出菌株について菌種を同定した。同じ試料水を用いて、レジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーを作製して解析した。

各検体の濃縮試料をエチジウムモノアジド処理 (Viable Legionella Selection Kit for PCR Ver. 2.0 および LED CrossLinker 12、タカラバイオ) した後 DNA を抽出・精製 (NucleoSpin gDNA Clean-up kit、タカラバイオ) し、レジオネラ属に特異的なプライマーペア (LEG 225F および LEG 858R) で PCR 増幅 (TaKaRa Ex Taq Hot Start Version、タカラバイオ) し、その PCR 増幅産物を用いて定法に従いクローニングした。得られたクローンの塩基配列は解析ソフト (Mothur platform) で解析し、塩基配列が 99%以上一致するものを同一の OTU として分類して、多様性指数を算出した。

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

迅速検査法は、qPCR 法として Cycleave PCR Legionella (16S rRNA) Detection Kit (CY240、タカラバイオ) を使用し、DNA 抽出には Lysis Buffer for Legionella (9181、タカラバイオ) を用いた。LAMP 法として Loopamp レジオネラ検査キット E (LMP661、栄研化学) を使用し、DNA 抽出にはキット添付のアルカリ熱抽出試薬を用いた。いずれも各キットのマニュアルに従い操作を行った。

生菌迅速検査は Viable Legionella Selection Kit for LC EMA-qPCR (7730、タカラバイオ)、Legionella LC Medium base (9016、タカラバイオ)、Lysis Buffer for Legionella (9181、タカラバイオ)、Cycleave PCR Legionella (16S rRNA) Detection Kit (CY240、タカラバイオ) を用い、方法を以下のように変えて使用した。活性炭による EMA 光照射の阻害を回避するため、試験菌液あるいは 1000 倍濃縮試料 100 $\mu$ l に液体培地 900 $\mu$ l を加えて 36 $^{\circ}$ C、18 時間培養後の増菌液を 500 x g、15 秒遠心し、上清 100 $\mu$ l を分取し、EMA 処理以降の操作を行った。ATP 値が 5,000 RLU/100ml 以上の検体は、1,000 倍濃縮液及び 100 倍濃縮液の両方について検査を実施し、定量値の高い値を採用した。

リアルタイム PCR 装置は Thermal Cycler Dice Real Time System (TP900 あるいは TP800、

タカラバイオ) を使用し、キットのマニュアルに記載された方法でコピー数から CFU に換算した。

#### 6. 外部精度管理

昨年度同様に、BioBall を利用した外部精度管理を実施した。供試菌株は、過去の販売実績において安定性が確認されている *Legionella pneumophila* ACM5197 を使用した。菌数は、15000cfu/Ball (水 500ml に溶かした場合、3000cfu/100ml) で発注した。この菌数は、一般的な検査手技において、分離平板上のコロニー数が、理論上、非濃縮検体で 3 コロニー、100 倍濃縮検体で 300 コロニー発育することを意味している。発注の結果、製品保証として、平均値 19316.0cfu/Ball、95%信頼区間：下限値 15319.7 cfu/Ball、上限値 23312.3 cfu/Ball の製品 (保証期間: 2014 年 10 月 1 日～2015 年 10 月 1 日) が納品 (図 10、表 5) された。なお納品は、メーカーから外部精度管理参加機関に直接輸送された。国立感染症研究所の「病原体等安全管理規定」を参考としているシスメックス・ビオメリュー社が求める BioBall 使用要件 1. 病原体のバイオセーフティレベル (以下 BSL) 規定について、2. 施設要件、4. 作業従事者要件を満たし、BioBall 使用承諾書に署名できる機関であることとした。

WG 構成機関である 10 カ所の地方衛生研究所及び全国地方衛生研究所の 6 ブロックから参加機関を募り計 41 カ所で外部精度管理を行った。これらの参加機関に 1～41 までの数字をランダムに振り分け結果集計を行った。

①平成 26 年 6 月: 製品の発注、②7 月: 全国地方衛生研究所衛生微生物技術協議会レファレンス会議で実施のお知らせ、レジオネラレファレンスセンター担当者を通じ参加依頼文の送付、③8 月: 参加希望機関から BioBall 使用承諾書の提出を求める、④10 月: レジオネラレファレンスセンター担当者を通じ実施要領及び結果記入ファイルの送付、製品の発送、⑤11 月: 結果締め切り。

試料発送: 平成 26 年 11 月 4 日 (火曜日) メーカーから直送

試料到着: 平成 26 年 11 月 5 日 (水曜日) 又は 6 日 (木曜日)

締め切り:平成 26 年 11 月 28 日(金曜日)

\*当初は9月 29 日発送、10 月 31 日締め切りとしていたが、メーカー側の BioBall 作製上の都合により、上記の実施となった。

外部精度管理指定法(WG 推奨法:実施要領参照)に従って実施依頼した。

メーカー保証による 95%信頼区間(下限値 15319.7 cfu/Ball、上限値 23312.3 cfu/Ball)については、前述したところであるが、この値をレジオネラ属菌検査で使用される、検体 100ml 中の cfu (colony forming unit)に換算すると、下限値 3063.94、中央値 3863.2、上限値 4662.46 cfu/100ml となる。例えば、非濃縮検体においては、分離平板上の1集落を 1000cfu/100ml と換算することから、結果は 1000cfu の整数倍となる。このことを勘案し、前述の 100ml 中の cfu を補正すると、3000 ~ 5000cfu/100ml となる。さらにこの範囲に対し、国内における食品衛生外部精度管理で実績・評価の高い、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が統計処理で行っている「Xbar 管理図における管理線を理化学調査では添加量の 70%および 120%、微生物学調査では全体の平均値の 30%および 300%」という考え方を参考に、本外部精度管理では、「メーカー保証されている菌数をベースに補正した範囲に対し、その下限値の 30%および上限値の 300%」という考え方を導入することとした。その結果、本外部精度管理においては、良好範囲目標値を 900 ~ 15000cfu/100ml として設定することとした。

#### 7. レジオネラ属菌検査研修

一昨年度「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報告書」及び昨年度本研究班の報告書内で WG 推奨法を報告したところである。本年度は、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修新興再興感染症技術研修」内で、WG 推奨法に沿ったレジオネラ検査研修を行った。本件集会には、地方衛生研究所 24 機関が参加した。

#### 8. *L. pneumophila* の遺伝子型の解析

以前、225 株の血清群 1 環境分離株の遺伝子型別の結果について、MST 法により解析を

行った。さらに日本各地の環境から分離された血清群 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 (ST) を決定し、金谷らが解析した水溜り由来の分離株の遺伝子型別の結果 (Kanatani J, Appl Environ Microbiol 79 : 3959-66,2013) も加え、合わせて 408 株 (浴槽水 136 株、冷却塔水 110 株、水溜り 82 株、土壌分離株 37 株、シャワー水分離株 19 株、噴水・修景水 18 株、給湯水 3 株、加湿器 2 株、下水 1 株) について、MST 法による解析 (BioNumerics, Applied Maths 社) を行った。

昨年度レジオネラレファレンスセンターで収集された 37 株のうち、*L. dumoffii* であった 1 株を除く *L. pneumophila* 36 株について、遺伝子型別を行った。

*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-acetylneuraminase cytidyltransferase) 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。

#### 9. 地域差と感染源解明のための環境調査

感染源調査は、公衆浴場のシャワー水、河川水および土壌を対象とした。河川水については、昨年の調査で選んだ *Legionella pneumophila* serogroup 1 (SG1) の Sequence-Based Typing (SBT) による Sequence

Type (ST) ST505 が分離された県西部地域にある浴用施設の近くを流れる河川に加え、県東部地域の河川についても対象とした。土壌はそれらの河川付近で採取した。

シャワー水の試料は、今年度の34検体を含む、平成24年9月～平成26年11月に採取された94検体である。シャワー水については、温度を40℃に設定後、約10秒間流出させ、容器に採取した。河川水と土壌の試料は、平成26年4月～平成26年10月の8か月間、西部地域を流れる庄川に設定した4地点と東部地域を流れる2河川に設定した3地点、およびそれらの河川の間設定した6地点で採取した河川水34検体、土壌64検体である。

シャワー水(400 ml)と河川水(1,000 ml)は、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100倍濃縮量となる滅菌蒸留水で、1分間ボルテックスしたものを試料とした。ただし、シャワー水については平成24、25年のボルテックスの時間は5分間、平成26年には100mlを非濃縮検体として供試した。

河川水および土壌検体は、アメーバを用いて共培養した。河川水は濃縮検体5 ml、土壌は約50 gに滅菌蒸留水100 mlを加えた試料に、調整したアメーバ培養液200 μlを添加後、35℃で1か月間培養した。培養液を酸処理液(0.2M KCl-HCl、pH2.2)と等量混合後、室温で15分静置した。混合液200 μlをGVPC培地(日研生物)2枚にコンラージ棒で広げて、35℃で7日間培養した。分離された*Legionella*属菌の同定:同定は、平板に発育した*Legionella*属菌様のコロニーについて、斜光法で特異的な形態を観察し、血液寒天培地とBCYE-α培地(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(OXIDO)とレジオネラ免疫血清(デムカ生研)により血清群を決定した。

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'-CTCACACAACAAGTCA AGCAAC-3'および*lag-R*: 5'-AAACCATACCAAA GCAACAT-3'を用い、GoTaqHS(プロメガ)10μl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℃2分、94℃30秒、57℃30秒、72℃1分を30サイクル、72℃5分でthermal cycler DICE(タカラバイオ)でおこなった。

#### 10. 家庭内環境における*Legionella*汚染の実態に関する研究

調査に協力が得られた14軒の家庭において、平成26年1月22日から11月3日の期間に調査材料を採取した。試料は水試料およびスワブ試料とし、水試料は25%チオ硫酸ナトリウム2.0mlを添加した滅菌容器に原則として1,000mlを採取した。水道水は放水直後に採取した。水試料は温度を採取時に、pHを実験室に搬入時に測定した。遊離残留塩素濃度はDPD法によりハンディ水質計“アクアブ”AQ-101型(柴田科学)を用いて実験室に搬入時に測定した。スワブ試料は、滅菌綿棒で採取部位を拭って採取し、滅菌リン酸緩衝液(pH7.0)を滅菌水で50倍に希釈した液1mlが入った滅菌管に入れた。各試料は冷蔵にて実験室に搬送し、搬入当日に実施する検査まで冷蔵保存した。

アメーバによる*Legionella*属菌の増殖では、水試料およびスワブ試料の再浮遊試料の加熱処理後の浮遊液1.0mlを、無菌的に継代培養している*Acanthamoeba castellanii*を浮遊させた3mlの50倍希釈リン酸緩衝液に接種し、25℃で3～5日間培養した。培養後、培養液をpH2.2緩衝液で4分間酸処理し、100μlずつをGVPC α寒天平板培地(Oxoid)およびWYO α寒天平板培地(栄研化学)に塗抹し、36℃で7日間培養した。また、LAMP法(Loopampレジオネラ検出試薬キットE、栄研化学)により培養液から*Legionella*属菌の遺伝子の検出を試みた。

調査試料から分離された *Legionella* 属菌は、LEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene) および Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) のプライマーを用いた PCR により *Legionella* 属菌と *L. pneumophila* であることを決定した。さらに、型別用血清 (デンカ生研) および自発蛍光の有無により種の鑑別を行った。通常の鑑別法により鑑別できない株は、16S rRNA 遺伝子および mip 遺伝子のシーケンスにより種を決定した。

*L. pneumophila* による汚染の有無を確認するために、*L. pneumophila* 特異的 mip 遺伝子検出のための PCR を、LAMP 法で陽性となった検体を対象にして実施した。mip 遺伝子が検出された検体は、さらに sequence typing を試みた。

アメーバの分離には、水試料の原液および 50 倍濃縮液の 1.0ml をアメーバ分離用寒天平板に接種し、25°C で 3 日間培養した。プラークを計数するとともに、プラーク部分のアメーバを分離して鑑別を行った。得られたアメーバは栄養体やシストの形態あるいは鞭毛形成の有無、運動時や水中浮遊時などの形態観察から属を決定した。

調査の協力が得られた家庭の特性に関するアンケート調査を行った。アンケートの内容は、住居 (形態、階数、築年数、居住人数)、水道 (受水槽の有無、給湯装置、浄水器の有無)、浴槽 (入浴頻度、浴槽水温度、給湯装置、清掃頻度、浴室の窓の有無、清浄剤の使用、配管の清掃、シャワーの使用、シャワーの清掃)、トイレ (温水洗浄便座の使用)、洗濯機 (種類、使用年数、使用頻度、残り湯の使用、乾燥機能の使用、洗浄の頻度) とした。

#### 11. アメーバのレジオネラ受容体の解析

レクチン凝集反応には、市販レクチン試薬 (Biotinylated Lectin Kit I&II, Vector Laboratory, USA) を用いた。これらは両キット合わせて 14 種類のレクチン (Con A, SBA, WGA, DBA, UEA1, RCA120, PNA 以上 KitI, GSL1, PSA, LCA, PHA-E, PHA-L, SJA, Succinylated WDA 以上 KitII) から構成される。

レジオネラ属菌の凝集実験では、レクチン試薬を 200  $\mu$ g/ml に PBS で希釈し、マイクロプレートウェ

ル内でその 50  $\mu$ l を等量の約 1.0OD に調整したレジオネラ属菌と混和し、30 分間静置した。

アメーバの凝集実験では、100  $\mu$ g/ml から 2 倍希釈した Con A, WGA, PNA を調整し、AC, NG, VX の PBS 浮遊液と 50  $\mu$ l ずつスライドグラス上で 1 分間ほどゆっくりと混和し、倒立顕微鏡下で凝集反応を調べた。

ドットプロット法によるレクチン反応試験では、レジオネラ属菌 5 株の 1.0OD 浮遊液をタンパク定量し、最大濃度 250  $\mu$ g/ml から 2 倍希釈系列を作成した。その 1  $\mu$ l をニトロセルロース膜にスポットし、風乾後、50  $\mu$ g/ml ビオチン標識レクチンで 1 次反応を行い、洗浄、次いで 1,000 倍希釈 HRP 標識アビジン (BIO RAD170-6528) で 2 次反応を行った。洗浄後、DAB 試薬で発色を行った。

糖質による感染阻害試験では、PYGC 培養した *A. castellanii* ATCC30010 株を 10xAS で洗浄し浮遊液を調整した。24 ウェルマイクロプレートウェル内に浮遊液を添加、1 時間培養しアメーバをプレートに接着させた。10xAS で 50mM に調整した糖質溶液 (グルコース、ガラクトース、マンノースおよびセロビオース) 200  $\mu$ l で置換、30 分間前培養を行った。L.p 80-045 株 (BCYE  $\alpha$ , 30°C、2-3 日培養) を 10xAS で浮遊し、0.01O.D. となるようにアメーバのウェルに添加 (20  $\mu$ l)、3 時間培養し菌を感染させた。50  $\mu$ g/ml となるように gentamycin を添加、培養を継続し、感染 18 時間後にアメーバを含む培養液を回収、遠心 (500rpm x 3 分間) で浮遊する菌を分離除去した。濃縮されたアメーバ浮遊液をスライドグラスに塗布しギムザ染色を行った。単にアメーバ表面に付着した菌との区別をするために、細胞内で分裂増殖像を示す菌が明確なアメーバを感染細胞として、感染率を求めた。なお細胞はランダムに約 500 個を調べた。

レクチン、抗マンノース結合レクチン (MBL) 抗体および PYGC による感染阻害試験: 感染前の培養で、10xAS で 10  $\mu$ g/ml に調整した Con A, WGA, RCA120 のレクチン、またマンノースに結合性を示すレクチンとして知られるヒトの MBL に対するポリクロナル抗体 (R&D) について、0.1 および 1.0  $\mu$ g/ml に調整し、前培養に用いた。それ以外の手順は 5 の糖質による感染阻害試験と同様であった。

#### 12. 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. 各種泉質及び形態の温泉施設におけるモノクロラミンによるレジオネラ属菌消毒効果の検証

遊離塩素消毒の各種問題点を補う新たな消毒方法として、結合塩素の一種であるモノクロラミンの浴槽水に対する消毒効果を継続して検討している。鉄線の源泉水に調整したモノクロラミンや遊離塩素（次亜塩素酸ナトリウム）溶液を加え、それらの濃度の経時的変化を調べた。その結果、遊離塩素は直ちに結合型に変化したが、モノクロラミンは濃度の減少がほとんどなく、安定的に維持されることがわかった。次亜塩素酸ナトリウム 5 mg/L 添加では遊離塩素は直ちに結合塩素に変化した。10mg/L 添加では不連続点（ブレイクポイント）塩素処理に相当する全残留塩素濃度の大幅な減少がみられた（図 2）。モノクロラミンでは 5 mg/L 及び 10mg/L 添加ともに全塩素濃度は安定して維持された（図 3）。その源泉水を使用する循環式入浴施設の浴槽水（全鉄イオン  $Fe^{2+}+Fe^{3+}$ :10mg、pH6.9、アンモニア態窒素 1mg/L を含む）に、モノクロラミンを添加し、濃度を 3mg/L に維持したところ浴槽水からレジオネラ属菌やアメーバは検出されず、トリクロラミンは不検出で消毒副生成物も少なく、モノクロラミンの高い消毒効果と安全性が確認された。

レジオネラ症の発生リスクが高い浴槽形態である気泡発生装置を使用する静岡県内 3 か所の浴槽において、モノクロラミン濃度 3mg/L の濃度調整を行い、その消毒効果及び消毒副生成物の生成を調べた。その結果、いずれの施設においても浴槽水中からレジオネラやアメーバの検出はなく、消毒副生成物の生成は遊離塩素管理時時に比べ少なかった。

静岡県内 2 か所の入浴施設において、モノクロラミンのタイマー注入装置の導入と、ア

ンモニウム源の薬剤の硫酸アンモニウムへの変更、塩素剤とアンモニアのモル比を 1:1.5 に低減した長期運用試験を実施して、濃度安定性、消毒効果の確認、薬剤使用量、保守点検の必要性等を調査した。H 施設の 5 ヶ月の試験期間中 1 か月間の系内濃度維持状況と宿泊者数の関係を図 4 に示した。1 日のモノクロラミン添加量は 7~12mg/L で、宿泊者数の増減による系内濃度への影響は認められず、濃度の増減は補給湯量の増減によることがわかった。アンモニウム源として硫酸アンモニウムが使用可能であること、塩素剤とアンモニウムのモル比を 1:1.5 に低減できた。今後は、泉質による消毒効果の違いを考慮し、遊離塩素に加えモノクロラミンも含めた柔軟な消毒法の導入をすることがレジオネラ属菌対策に必須であると考えられる。

本研究においては、まず、実験室レベルで実証試験を行う源泉水にモノクロラミンや遊離塩素を加え経時的濃度変化を確認して、モノクロラミン消毒適用の可否を調査後、実証試験を行うという試験スキームを構築した。本スキームでモノクロラミンの濃度安定性が確認され、実証試験に向けた有用なデータを得ることができた。今後、このスキームの活用が期待される。

#### 2. 消毒副生成物の暴露評価

昨年度の分担研究で、ヨウ素（ヨウ化物）イオンを含有する温泉では塩素消毒およびモノクロラミン消毒のいずれの場合も、消毒副生成物としてヨウ素化トリハロメタン類やヨウ素化ハロ酢酸類が生じることを見出した。そこで、従前の塩素消毒時の消毒副生成物の実態を把握する目的で、源泉中のヨウ素イオン濃度が比較的高い新潟県、秋田県および静岡県内の計 11 施設を対象に、浴槽水中のヨウ素化消毒副生成物濃度および関連する水質指標の調査を実施した。その結果、2 施設でヨードホルム ( $CHI_3$ ) およびジヨードメタン ( $CH_2I_2$ ) が比較的高濃度で検出され、濃度範囲はそれぞれ 34.6 - 74.8  $\mu g/L$ 、16.8 - 31.0  $\mu g/L$  であった（表 1）。同時に、浴槽水中の残留塩素濃度、

全有機炭素濃度およびヨウ素イオン・ヨウ素酸イオン濃度を測定し、ヨウ素化消毒副生成物濃度との間に明確な関連性は認められなかった。ヨウ素化消毒副生成物の有害作用に関しては限られた情報しかないものの、化学的な反応性等から、塩素化あるいは臭素化消毒副生成物と比較して強い毒性を示す可能性が示唆されている。したがって、温泉施設におけるヨウ素化消毒副生成物曝露は、代替消毒剤としてのクロラミン処理導入の場合に考慮する必要があるのみならず、現行の処理においても曝露評価ならびに低減化策を検討すべき重要な問題であると考えられる。

### 3. 冷却水の消毒維持管理と菌の多様性

冷却水は浴槽水と同様にレジオネラ属菌の増殖環境であり、諸外国では多くの集団発生が報告されている。我が国においても、特に都会のビルでは夏期に多くの冷却塔が稼働しており、レジオネラ症感染のリスクは高い。冷却水における、レジオネラ属菌の汚染実態の把握と有効なレジオネラ属菌の消毒、維持管理方法を確立することを目的として調査研究を行った。

2013年4月から2014年12月における、冷却水の殺菌剤種類別のレジオネラ属菌検出率を調査した。殺菌剤の種類は、5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリル-3-オンに代表される CMI 系、CMI とカチオンポリマー(WSCP)の複合系、4級アンモニウム塩等のカチオン系、1-5-ペンタンジール(グルタルアルデヒド)、及び塩素系(遊離塩素、及び結合塩素剤)に分類した。殺菌剤の種類別にレジオネラ属菌数分布を集計した結果を図5に示す。無処理では52.5%から検出すること、有機系殺菌剤の有効性の程度の確認、塩素系殺菌剤では高い菌数の割合が無処理よりも増加することを明らかにした。

モデル冷却塔により、各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果を評価した(図6)。無処理と、結合塩素である塩素化スルファミン酸(全塩素3mg/L)処理は $10^2 \sim 10^4$ CFU/100mLのレジオネラ属菌が継続的に検出された。結合塩素剤ではレジオネラ属菌は抑制できなかった。

CMI+カチオン処理は、常時不検出を維持し、効果の持続性が確認された。遊離塩素(0.2mg/L)処理は運転停止による残留塩素の消失、pH条件によるアメーバ増殖等の要因によりレジオネラ属菌が検出されることから、維持管理上の注意点を確認した。

冷却水のクローンライブラリー解析の結果、培養法で検出されず既存種に属さないレジオネラ属菌クローンが多く存在し、多様なレジオネラ菌種が確認された(図7)。一方、浴槽水の多様性は低く、塩素剤による殺菌処理が影響している可能性が示唆された。クローンライブラリー解析の結果は、環境水中のレジオネラ属菌検査における、培養法「陰性」、遺伝子「陽性」の不一致の要因として、培養されない未記載のレジオネラ属菌の存在を示した。よってこの不一致は、EMA-qPCR法によっても解消されないことが確認された。

### 4. Liquid Culture EMA qPCR によるレジオネラ生菌迅速検査法の改良と評価

レジオネラ生菌迅速検査法の標準化に向けた基礎的データを得るため、昨年度までの検討をもとに従来のLiquid-culture ethidium-monoazide (LC EMA) qPCR法を少し改変し、主に循環式浴槽水などの実試料176検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。また、市販されている他の迅速検査キット(生菌と死菌の両方を検出するLAMP法)についても平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行い、LC EMA qPCR法と比較した。

LC EMA qPCR法について、平板培養法による10 CFU/100 ml以上の検体を検出するカットオフ値として1 CFU/100 ml相当を用いて解析を行った結果、平板培養法に対する感度は89.5% (51/57検体)、特異度は73.9% (88/119検体)であり、平板培養法と高い相関を示した(表2)。

LAMP法およびLC EMA qPCR法を実施した98検体について、平板培養法に対する感度、特異度をそれぞれ比較した結果、LAMP法の平板培養法に対する感度は77.5% (31/40検体)、

特異度は 69.0% (40/58 検体) であった。一方、LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 90.0% (36/40 検体)、特異度は 74.1% (43/58 検体) であり、いずれも LAMP 法より高かった (表 3、表 4)。

LC EMA qPCR 法と平板培養法の菌数 (定量値) の比較では、 $R^2 = 0.6176$  と高い相関を示し、全体として平板培養法の菌数を反映していた (図 8)。ワーキンググループ推奨法を用いて平板培養を実施した場合、LC EMA qPCR 法のカットオフ値に 5 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行うと感度が低下するため、昨年度の結果と同様に LC EMA qPCR 法のカットオフ値は 1 CFU/100 ml 相当が良いと考えられた。

今年度の結果から、主に循環式浴槽水を対象とした場合、LC EMA qPCR 法は、カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当を用いることで平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。

さらに、観賞用水槽による浸漬式実験モデルを長崎県で構築し、レジオネラ自然汚染を再現した検水について、平板培養法と LC EMA-qPCR との比較を行った (図 9)。入浴施設から入手した水と汚染ろ材を一定温度 (40~42℃) で攪拌して、レジオネラ属菌発生に適する環境を作り出した。今回の浸漬式モデル実験は、循環式浴槽モデルと同じ汚染様式を再現し、レジオネラ属菌を増殖させることが出来た。また、泉質によってレジオネラ属菌の増殖が異なってくることが示唆された。酸処理法と熱処理+酸処理法では平板培養法との高い定量性が示された。

#### 5. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み

レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループでは、これまでの厚労科研究事業において、レジオネラ属菌の特異的な性質から、外部精度管理用の配付試料の作製について、その安定性と再現性及びそれらの妥当性評価について試行錯誤を繰り返してきた。昨年度は、微生物定量試験用標準菌株の販売を行っているシスメックス・ビオメュー社の BioBall (特注品) を利用し、外部精度管理を試みた。その結果、配付試料の信頼

性においてメーカー保証が得られ、また、メーカーによる商品発送対応であることから、多施設へ安定した輸送が可能となった。

そこで本年度においても、BioBall (特注品) を利用し、全国 41 の地方衛生研究所を対象に外部精度管理を試みた。外部精度管理実施方法は、昨年度、各機関の SOP による結果において大きなバラツキが認められたことから、レジオネラ外部精度管理ワーキンググループ推奨法を指定した。全 41 機関のべ 46 試料に対する各参加機関の判定結果 (全条件中最大値) を表 6 に示した。表中では、各参加機関が採用した濃縮処理、前処理、使用培地に○印を付け、最終判定結果に採用した条件を◎印で示した。本集計では、平均値約 5950cfu/100ml、最大値 16000cfu/100ml、最小値 10cfu/100ml、中央値 5000cfu/100ml となった。今回の外部精度管理配付試料では、メーカー保証による 95%信頼区間が、下限値 3063.94、中央値 3863.2、上限値 4662.46 cfu/100ml であったことから、外部精度管理としての良好範囲目標値を 900 ~ 15000cfu/100ml と設定している。全 41 機関中 37 機関 (約 90%) が目標範囲に入り、良好な結果が得られた。また試料数でみても 46 試料中 41 試料 (約 89%) が目標範囲に入り、良好な結果が得られた。これら表 6 において良好な回答があった 37 機関では、全て非濃縮検体からの結果であった。非濃縮試料及び、未処理による検査工程を加えたことが良い結果につながったと思われる。昨年度目標範囲に入ったのは、39 機関中 14 機関 (36%) だったのに対し、本年度は、41 機関中 37 機関 (約 90%) と大きく改善された (表 7)。また、両年度に参加した 32 機関のうち、昨年度目標範囲外だったのが 19 機関あったが、そのうち 17 機関が本年度は目標範囲内に入った。また、2 年連続で目標範囲に入ったのが 13 機関あった。一方、2 年連続で目標範囲の下限値未満を回答したのが 1 機関、昨年度は下限値未満、本年度は上限値を超えたのが 1 機関あった。

一方で、今回の供試菌は、酸処理や熱処理、さらには選択分離培地により発育が強く抑制されることが確認された。このような現象は、これまでに研究班内でも確認されており、現状では、様々

な条件に対応できるだけの配付試料を作製するのは困難と思われた。

今後の外部精度管理においては、配付試料がより安定した性能を発揮できる範囲内で、検査工程のどの部分に重きを置くかの定義付けを適切に行い実施する予定である。一方で、実検体検査に対する注意点等については研修会で対応し、各検査機関が適切な内部精度管理を行えるような環境を整えることが重要と思われた。

加熱による雑菌処理時間について検討した結果を図 11、表 8 に示した。雑菌が多い検体は、20 分加熱に比べ 30 分加熱が有効との結果が得られたが、30 分加熱することにより、検出できない検体が 5 検体あった。

#### 6. 公衆浴場の衛生管理等に関する検討

入浴施設におけるレジオネラ感染症対策を目的とした研究が厚生労働科学研究費補助金を受けて実施され、衛生管理や消毒法あるいは検査法等について検討を重ね、得られた成果は毎年度に報告書としてまとめられている。本研究班では、これまでの研究成果の中から、その活用の提言に向けて、衛生管理のさらなる向上ならびにレジオネラ症予防につながることを期待される成果を整理することを目的に、昨年度にワーキンググループを立ち上げ、今年度もその活動を継続した。

今年度の検討内容は、過去の研究成果をさらに検討するとともに、本研究班における平成 25 年度と平成 26 年度の研究成果のなかから、現時点においてレジオネラ対策に関する行政対応等として直ちに活用することが適切と思われる項目の検討を行った。具体的には、シャワーにおけるレジオネラ汚染の実態の解明と衛生管理の導入の必要性、消毒剤としてのモノクロラミンの導入及びレジオネラ属菌を対象とした生菌迅速検査法の評価とした。

#### 7. 環境から分離された *Legionella*

##### *pneumophila* 血清群 1 株の SBT 法による遺伝子型別および臨床分離株の収集と型別

これまでに 225 株の *Legionella pneumophila* 血清群 1 環境分離株の遺伝子型別の結果について、minimum spanning tree (MST) 法により

解析を行った。今年度は、シャワー水分離株などの環境由来の菌株について遺伝子型別を行い、これまでの結果も合わせて 408 株の血清群 1 環境分離株の遺伝子型別結果を用いて、MST 法による解析を行った。血清群 1 環境分離株は、ほとんどが浴槽水分離株から成る B1、B2、B3 の 3 グループ、冷却塔水分離株が多い、C1、C2 グループ、土壌、水溜り分離株が多い、S1、S2、S3 グループ、様々な由来の菌株から成る U グループの 9 つに分かれることを見出していたが、株数がおおよそ倍増しても、その傾向は変わらなかった (図 12)。また、今回、解析数の増えたシャワー水および、噴水・修景水分離株については、独自の遺伝的グループの形成は見られなかった。シャワー水分離株は、冷却塔水分離株同様、最も多い遺伝子型は C1 グループに属する ST1 だったが、それ以外の遺伝子型は全グループに散在した。噴水・修景水分離株は、B グループに属するものは見られず、それ以外のグループに散在していた。レジオネラレファレンスセンターで昨年度収集した 36 株の *L. pneumophila* 臨床分離株についても遺伝子型別を行い、血清群 1 株についてはどのグループに属するか調べた。

#### 8. 富山県の不明感染源解明のための環境調査

富山県で多く発生するレジオネラ感染症の感染源として、浴用水以外の感染源を探索するため、環境中の *Legionella* 属菌の生息状況を平成 24 年より調査している。今年度の調査対象はシャワー水 34 検体、河川水 34 検体、河川水周辺の土壌 64 検体とした。シャワー水については平成 24、25 年分も含め、3 年間で得られた 94 検体について解析した。*Legionella* 属菌の検出率はシャワー水 32/94 検体 (34.0%)、河川水 15/34 検体 (44.1%)、土壌 25/64 検体 (39.1%) であった (表 9、表 10、表 11)。シャワー水では、水源の種別の *Legionella* 属菌の検出率は、水道水に比べ、井戸水、湧水や温泉水などで高かった。土壌では、*Legionella* 属菌の検出率は、道路沿いの土壌で 8/30 検体 (26.7%) に対し、河川付近では 17/34 検体

(50.0%) と、河川付近の土壌で *Legionella* 属菌の検出率が高かったが、個別に見ると、河川と土壌の関連性は明らかではなかった。分離された *Legionella* 属菌は *L. pneumophila* がもっとも多く、それらの血清群はシャワー水では SG5、河川水では SG3、そして土壌では SG8 が多かった。また、河川水と土壌から分離された *Legionella* 属菌では型別不能 (UT) も多く分離された。今年度の調査では富山県特有の ST505 の *Legionella pneumophila* SG1 は河川水・土壌およびシャワー水から分離されなかった。

今年度は、*Legionella* 属菌の自動車のウィンドウォッシャー液中での生残性について、*L. pneumophila* SG1、SG5、SG14 および *L. rubrilucens* を用いて調べた。市販のウィンドウォッシャー液中ではどの株も 24h 後に生存株は認められなかった。これに対し PBS 中でのこれらの株はおよそ 50%が生残した。この結果から、ウィンドウォッシャー液を使用することで、レジオネラ感染症に対するリスクを軽減することが示された。

#### 9. 地域特異的な感染源不明クラスターに関する調査

岡山県内で発生したレジオネラ症患者の分離株を収集し、sequence-based typing (SBT) 法による型別を実施している (表 12)。このうち *L. pneumophila* (Lp) 血清群 (SG) 3 は、9 株すべてが sequence type (ST) 93 で、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による遺伝子パターンも一致した。本菌及び Lp SG1 (ST609、1077) は、地域特異的にほぼ県内のみで検出され、本年度収集した Lp SG1 (ST1845、ST1846、ST1847) も、他に分離報告のない新規遺伝子型であった。本年度の環境検体の調査結果は、浴槽水等 105 検体中 31 検体 (29.5%) からレジオネラが検出された。また、保健所等が分離したレジオネラ 119 株を収集・解析し、今までに浴槽水等から分離された 146 株の Lp SG3 について、PFGE 法による解析を行った。その結果、72 パターンに分類されたが、いずれの菌株も患者分離株のパターンとは異なっていた。Lp SG3 の minimum spanning tree による解析でも、

患者由来の ST93 株は環境由来株と clonal complex を作らず、類縁関係は見られなかった (図 13 左下の黄色の円)。今後も感染源究明のため、より多様な検体について、継続した調査が必要である。

#### 10. 家庭内環境における *Legionella* 汚染の実態に関する研究

家庭内における *Legionella* 感染のリスクを把握し、感染予防対策作成の基礎資料とすることを目的に、昨年度に引き続き家庭内の水環境から *Legionella* 属菌の分離を試みた。協力が得られた 14 軒の家庭から 125 検体 (水試料 75 検体、スワブ試料 47 検体、その他 (スポンジ) 3 検体) を採取し、培養による *Legionella* 属菌の分離と LAMP 法による遺伝子の検出を行った。 *Legionella* 属菌は水試料 75 検体中 3 検体 (4.0%) およびスポンジ 3 検体中 1 検体 (33.3%) から分離された (表 13) が、スワブ検体からは検出されなかった (表 14)。LAMP 法は、直接実施した場合は水試料 75 検体中 24 検体 (32.0%)、スワブ試料 47 検体中 6 検体 (12.8%) およびスポンジ 3 検体中 1 検体 (33.3%) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、アメーバによる増菌後では水試料 75 検体中 31 検体 (41.3%)、スワブ試料 47 検体中 6 検体 (12.8%) およびスポンジ 3 検体中 2 検体 (66.7%) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。浴槽の給湯水、洗濯機内水および水槽は LAMP 法による遺伝子検出は 50.0~87.5% と特に陽性率が高く、次いで台所や洗面所、浴室の蛇口水およびシャワー内水は陽性率が 12.5~37.5% であった。 *Legionella* 属菌は台所の蛇口水、浴槽の給湯水、水槽およびスポンジから検出され、菌種は *L. pneumophila* SG1、*L. rowbothamii* および *Legionella sainthelensi* であった。今回の調査においては平成 25 年度の調査結果を同様に、家庭環境が *Legionella* 属菌により汚染され、*Legionella* 感染リスクが存在することが明らかとなった。

#### 11. アメーバのレジオネラ受容体の解析

レジオネラ属菌の宿主アメーバ感染に関与する菌受容体として、糖鎖結合性タンパク質のレクチンおよびその結合糖の存在および作用を解析した。凝集ならびにブロッテング実験では、

*Acanthamoeba*に対するConAの強凝集性以外にレクチンおよびその結合糖の顕著な作用はみられなかった。レジオネラ属菌と *Acanthamoeba* の感染実験系では、ConA に感染促進作用、一方WGA に感染阻害作用がある可能性が示された。*Acanthamoeba* に存在が知られるマンノース結合レクチンに関しては、菌感染との関係が認められなかった。最も顕著な感染阻害作用が見られたのはアメーバ培養用のPYGCであった。その構成成分である Protease、Yeast extract およびグルコースは、個々には PYGC に匹敵する感染阻害作用を示さず、PYGC の感染阻害作用の機序は不明であった(図 14)。

#### D. 結論

遊離塩素管理では十分なレジオネラ属菌殺菌効果が期待できない鉄イオンを含む泉質において、モノクロロミン管理の実証試験を実施し、その有用性を確認した。また、実験室レベルで予めモノクロロミンや遊離塩素の経時的濃度変化を確認したうえで実証試験を行うという試験スキームを構築した。

気泡発生装置を使用している浴槽においても、モノクロロミン管理は安全にレジオネラ属菌をコントロールすることが可能であることを確認した。長期間にわたるモノクロロミン管理においては、簡便なタイマー注入方式装置が対応可能であることが示唆された。加えて、アンモニウム源としての硫酸アンモニウムの有用性を確認し、モノクロロミン消毒法導入の実用化に向けた結果が得られた。

代替消毒剤としてのクロロミン処理の問題点として、含ヨウ素温泉では有害性未知のヨウ素化消毒副生成物が生じることを明らかにしてきたが、本研究の結果から通常の塩素処理を行っている含ヨウ素温泉浴槽水においても高濃度のヨウ素化消毒副生成物を生じている事例があることを見出した。ヨウ素化消毒副生成物の有害作用に関しては限られた情報しかないものの、化学的な反応性等から、塩素化あるいは臭素化消毒副生成物と比較して強い毒性を示す可能性が示唆されている。し

たがって、温泉施設におけるヨウ素化消毒副生成物曝露は、代替消毒剤としてのクロロミン処理導入の場合に考慮する必要があるのみならず、現行の処理においても曝露評価や低減化策を検討すべき重要な問題であると考えられる。

2013年4月から2014年12月の期間の、冷却水におけるレジオネラ属菌の存在実態を調査した。無処理の冷却水では、52.5%からレジオネラ属菌が検出された。殺菌剤種類別の検出率は、CMI系が12.1%、CMI+カチオン系が11.3%、カチオン系が17.9%、グルタルアルデヒドが3.4%、塩素系が35.9%であった。殺菌剤処理により検出率は低下するが、不検出にはなっておらず、特に塩素系では高菌数が検出されている。有効な殺菌剤の選定、及び維持管理に注意する必要がある。

モデル冷却塔により、各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果を評価した。無処理と、結合塩素(塩素化スルファミン酸、全塩素3mg/L)処理では $10^2\sim 10^4$ CFU/100mLのレジオネラ属菌が継続的に検出された。結合塩素はレジオネラ属菌の抑制効果は無かった。CMI+カチオン処理は、常時不検出を維持し、効果の持続性が確認された。

遊離塩素(0.2mg/L)処理は、休日や夜間の運転停止による残留塩素の消失、pHが8.7に上昇したことによるアメーバが増殖等の要因により、レジオネラ属菌が検出されるようになった。冷却水の遊離塩素処理では、こうした点に注意して維持管理を行う必要があることを確認できた。

クローンライブラリー解析の結果、冷却水では、培養法で検出されない既存種に属さないレジオネラ属菌クローンの塩基配列が大部分を占め、多様なレジオネラ菌種の存在が確認された。一方浴槽水では、*L. pneumophila*のクローンが多く検出されており、多様性は低かった。多様性の低さは、塩素による殺菌処理が関係している可能性が示唆された。環境水中のレジオネラ属菌検査における培養法「陰性」、遺伝子「陽性」の不一致の要因とし

て、培養不可能、未記載のレジオネラ属菌の存在があり、不一致の解消はできないことが確認された。

市販されている生菌迅速検査キット（LC EMA qPCR 法）について、培養後の活性炭を除去するなど一部改良した方法で実施し、平板培養法や LAMP 法の結果と比較し、評価した。LC EMA qPCR 法について、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った結果、平板培養法に対する感度は 89.5%、特異度は 73.9%であり、平板培養法と高い相関を示した。今年度の結果から、主に循環式浴槽水を対象とした場合、LC EMA qPCR 法は、カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当を用いることで平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。

昨年度、各機関の SOP による結果において大きなバラツキが認められたことから、本年度の外部精度管理調査では、WG 推奨法を指定した。その結果、昨年度に比べバラツキは解消された。これは非濃縮試料及び、未処理による検査工程を加えたことが良い結果につながったと思われる。一方で、今回の供試菌は、酸処理や熱処理、さらには選択分離培地により発育が強く抑制されることが確認された。特に濃縮試料に対する影響が大きかった。このような現象は、これまでも研究班内で作製した自家試料で確認されていたが、特注品 BioBall でも確認された。

実検体に対する標準的な検査法と外部精度管理のための検査法については、分けて考えるのも選択肢の一つと思われる。選択分離培地の使用や酸処理、熱処理は、実検体中に混在するその他の細菌を抑えるための手法であり、レジオネラの純培養菌を使用した場合の外部精度管理では、それらの工程が不確定な結果につながる可能性が大きいと思われる。

今年度の結果から、非濃縮試料、未処理試料及び BCYE  $\alpha$  を使用した結果においては、十分に外部精度管理として評価できるものと思われた。これらのことから、次年度の外部精度管理では、検査手技の確認に重点を置き、①特注品 BioBall

を利用する。②未処理のみで検査をする。③ BCYE  $\alpha$  培地のみで検査をする。④非濃縮試料、濃縮試料について検査する（非濃縮試料が適切に混和されているか、適切な濃縮が行われているかを大きな評価点とする）。これらの条件の下、供試菌数及び評価方法等を改めて WG 内で協議したいと考える。

これまでに本研究班が協力し実施してきたいくつかの研修会での知見を合わせ、研修マニュアル作成に向けた検討をする予定である。また、今後開催される研修会では、実検体検査に対する注意点等について適切に対応できるよう検討し、各検査機関が適切な内部精度管理を行えるような環境を整えることが重要と思われた。

408 株の *L. pneumophila* 血清群 1 環境分離株の遺伝子型別結果を用いて、MST 法による解析を行ったところ、遺伝子型により、B1、B2、B3、C1、C2、S1、S2、S3、U の大きく 9 つのグループに分けられ、B グループは浴槽水分離株を多く含み、C グループは冷却塔水分離株を多く含み、S グループは土壌および水溜り分離株を多く含んでいた。U グループはさまざまな由来の株を含んでいた。また、臨床分離株も多くはいずれかのグループに属しており、土壌から感染した可能性がある場合、菌の遺伝子型が S1 グループに属していた。

これまでの環境調査から、富山県におけるレジオネラ症発生が多い理由を明らかにすることはできなかった。しかしながら、患者から分離されている ST の *L. pneumophilla* や *L. rubrilucens* などが分離されたことから、シャワー水や河川水も感染源となりうることが示された。とりわけ、ミスト発生の多いシャワー水における *Legionella* 属菌の検出率、種類、ST など、浴用水のそれと大きく異なることがなかったことから、きわめてリスクが高く、注意を要することが改めて示された。得られた結果を広く広報し、予防につなげることが重要である。

平成 26 年度に、岡山県内で発生したレジオネラ症の患者由来株について、Lp SG1 株 4 株と Lp SG9 株 1 株を収集した。患者由来株の LpSG1 の