

うち 3 株は、ST1845、ST1846、ST1847 の新規遺伝子型で、minimum spanning tree 解析で group S1 及び N に分類された。浴槽水由来の Lp SG1 のうち 2 株は、ST1948 の新規遺伝子型の株で、MST 解析では group U に分類された。患者由来株のうち、地域特異的に分離された Lp SG1 の ST609、ST1077 や、Lp SG3 の ST93 について、継続して感染源の究明を行う必要がある。

14 軒の家庭の水環境から 125 検体（水試料 75 検体、スワブ検体 47 検体およびその他の検体 3 検体）を採取し、培養法による *Legionella* 属菌の検出と LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出を試みた。*Legionella* 属菌は水試料 75 検体中 3 検体（4.2%）、スポンジ検体 3 検体中 1 検体（33.3%）から分離された。スワブ試料では、*Legionella* 属菌は分離されなかった。LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出では、直接 LAMP 法を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%）から遺伝子が検出された。平成 25 年度の調査と同様に、今回の調査でも家庭環境において *Legionella* 属菌が生息・汚染しており、水環境によっては高率に汚染していることが明らかとなるとともに、*L. pneumophila* SG1 による汚染も存在することが示された。このことから、家庭においても水環境におけるレジオネラ汚染に対する対応が必要であることが示された。

レクチンとその結合糖を用いて、アメーバのレジオネラ属菌受容体に関する知見を得ることを試みた。方法としては感染阻害試験がレクチンおよび糖質の作用を定量的に評価する上で有用であった。いくつかのレクチンは感染初期の菌とアメーバの接着に影響を与えることが示され、また糖質としては多糖類が接着に影響を及ぼす可能性も示された。またアメーバ培養液である PYGC が有力な手掛りを与えてくれる可能性も示された。

E. 健康危険情報  
なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文・総説発表

- 1) Tomizawa Y, Hoshino Y, Sasaki F, Kurita N, Kawajiri S, Noda K, Hattori N, Amemura-Maekawa J, Kura F, Okuma Y: The diagnostic utility of splenic lesion in a case of Legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 2. Intern Med, in press.
- 2) Inoue, H., Fujimura, R., Agata, K., and Ohta, H. Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. *Microbes and Environments*, 30(1):108-112, 2015
- 3) Inoue, H., Takama, T., Yoshizaki, M., and Agata, K. Detection of *Legionella* species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment. *Biocontrol Science*, 20(1):71-74, 2015.
- 4) Nishizuka M, Suzuki H, Ara T, Watanabe M, Morita M, Sato C, Tsuchida F, Seto J, Amemura-Maekawa J, Kura F, Takeda H: A case of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 12 and treated successfully with imipenem. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20(6):390-393, 2014
- 5) 倉 文明:VI 感染症 22 レジオネラ症、小児疾患診療のための病態生理 1、小児内科 46 巻増刊号 907-911 2014
- 6) 松田正法、重村久美子、徳島智子、吉田英弘、佐藤正雄、廣瀬みよ子、門司慶子、石津尚美、竹中 章、前川純子. 2015. 病院内冷却塔からのレジオネラ感染疑い事例—福岡市. 病原微生物検出情報. 36:13-4.
- 7) 笠原ひとみ、関口真紀、中沢春幸、藤田暁、畔上由佳、高山 久、千秋智重、関年雅、池田元彦、前川純子、倉 文明: *L. pneumophila* 血清群 9 の症例について、

病原微生物検出情報 36(1):14-5, 2015.

- 8) 杉山寛治：モノクロラミン消毒による浴槽水の衛生対策, ビルと環境, No. 148, 34-41 (2015)

## 2. 学会発表

- 1) Kuroki T, Teranishi H, Watanabe Y, Arai K, Sugiyama K, Nakajima H, Sasaki S, Fujita M, Isobe J, Taguri T, Ogata K, Yamane I, Kura F: ATP bioluminescence assay as an indicator of bacterial counts and risk for *Legionella* occurrence in bath water. ESGLI 2014. Barcelona. September 2014.
- 2) Karasudani T, Izumiyama S, Yazaki T, Isobe J, Kanatani J, Arai K, Taguri T, Yagita K, Kuroki T, Yoshizaki M, Shinomiya H, Kura F: Rapid quantification of culturable *Legionella* cells in bath water samples by liquid-culture-dependent reverse transcription quantitative PCR (LC RT-qPCR) assay. ESGLI 2014. Barcelona. September 2014.
- 3) 倉 文明：最近の研究から分かったレジオネラの実態と対策, NPO 入浴施設衛生管理推進協議会第25回レジオネラ対策シンポジウム, 招請講演, 2014年5月, 東京.
- 4) 前川純子, 倉 文明, 渡辺祐子, 金谷潤一, 磯部順子, 田中 忍, 中嶋 洋, 吉野修司, 大西 真新しい *neuA* プライマーによる *Legionella pneumophila* 臨床分離株の sequence-based typing (SBT). 第88回日本感染症学会学術講演会, 2014年6月, 福岡.
- 5) 井上浩章, 藤村玲子, 縣 邦雄, 太田寛行 (2014) EMA-qPCR 法とクローンライブラリーによる環境水中のレジオネラ属菌の多様性解析. 日本防菌防黴学会第41回年次大会要旨集, 264.
- 6) 金谷潤一, 磯部順子, 木全恵子, 清水美和子, 増田千恵子, 倉文明, 佐多徹太郎, 綿引正則：富山県内の浴用施設におけるシャワー水のレジオネラ属菌分離状況、日本防菌防黴学会第41回年次大会, 2014年9月, 東京都.
- 7) 磯部順子, 金谷潤一, 木全恵子, 清水美和子, 増田千恵子, 倉 文明, 佐多徹太郎, 綿引正則：ウインドウウォッシャー液のレジオネラ属菌による汚染実態調査. 日本防菌防黴学会第41回年次大会, 2014年9月, 東京.
- 8) 杉山寛治, 縣邦雄, 江口大介, 市村祐二, 神野透人, 小坂浩司, 泉山信司, 八木田健司, 片山富士男, 和田裕久, 富田敦子, 長岡宏美, 田中慶郎, 遠藤卓郎, 倉文明：種々の温泉水におけるモノクロラミン消毒効果と高濃度洗浄の検証, 日本防菌防黴学会第41回年次大会, 東京 (2014)
- 9) 青木信和, 江口大介, 市村祐二, 杉山寛治, 泉山信二, 倉文明：温泉水に含まれる成分がモノクロラミンに与える影響の確認, 日本防菌防黴学会第41回年次大会, 東京 (2014)
- 10) 渡辺祐子, 黒木俊郎, 前川純子, 倉文明：家庭内のレジオネラ汚染に関する基礎的調査, 日本防菌防黴学会第41回年次大会, 2014年9月, 東京.
- 11) 倉 文明：レジオネラ症の最近の話題, 第58回生活と環境全国大会, 公開講座, 2014年10月, 富山.
- 12) 高井健太, 牧田幸久, 平井 愛, 松橋平太, 柴田真也, 長岡宏美, 川森文彦, 杉山寛治, 縣 邦雄, 倉 文明：モノクロラミンによる浴槽水中のレジオネラ属菌消毒効果, 平成26年度地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会第27回総会・研究会, 2015年2月9日, 川崎.
- 13) 神野 透人, 香川(田中) 聡子, 田原 麻衣子, 川原 陽子, 真弓 加織, 五十嵐 良明, 縣 邦雄, 杉山 寛治, 小坂 浩司, 八木田 健司, 泉山 信司, 倉 文明：循環式温泉浴槽水および浴室空気中のヨウ素化消毒副生成物. 第51回全国衛生化学技術協議会年会 (2014.11, 大分)

- 14) 森本 洋:培養法の現状と分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性, シンポジウム招請講演、平成 26 年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2015 年 2 月, 岡山
  - 15) 前川純子: *Legionella pneumophila* の遺伝子型別から得られる知見. シンポジウム招請講演、平成 26 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会. 平成 27 年 2 月、岡山.
  - 16) 石井将仁、倉 文明、前川純子: 水たまり中に生息するレジオネラ属菌の多様性に関する研究、第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月、岐阜.
  - 17) 前川純子、石井将仁、倉 文明、千田恭子、渡辺祐子、金谷潤一、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司、村井美代、大西 真: 日本で分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 の sequence-based typing 法による解析、第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月、岐阜.
3. 研修会
- 1) 緒方喜久代:レジオネラ検査の取り組みについて、平成 26 年度環境監視員担当者会議(大分)、2014 年 4 月
  - 2) 前川純子:レジオネラ症とレジオネラ属菌. 平成 26 年度レジオネラ属菌汚染防止対策講習会. 平成 26 年 7 月、宮崎.
  - 3) 倉 文明:レジオネラ属菌に関する最新の知識・知見について、平成 26 年度千葉県環境衛生監視員継続研修、特別講演、2014 年 8 月、千葉.
  - 4) 杉山寛治:レジオネラ症防止対策講演会、富山県主催、2014 年 9 月 9 日、富山市
  - 5) 森本 洋:レジオネラ感染症とその衛生対策について、道南獣医師会公衆衛生講習会、2014 年 11 月、北海道函館市
  - 6) 倉 文明、森本 洋、金谷潤一、磯部順子、緒方喜久代、前川純子、中臣昌広:レジオネラ検査診断実習概要、培養検査法概論、迅速検査法概論、レジオネラ感染源調査、浴槽水からのレジオネラ属菌遺伝子検査、レジオネラ感染症総論、Sequence-based typing 法概論、斜光法概論、施設のレジオネラ感染対策、国立保健医療科学院平成 26 年度短期研修新興・再興研修、2014 年 11 月、東京都.
  - 7) 倉 文明:レジオネラ症防止対策 ~最新の研究から見たレジオネラの実態と対策~、平成 26 年度仙台市環境衛生監視員継続研修、講演、2014 年 11 月、仙台.
  - 8) 倉 文明、前川純子、金谷潤一、森本 洋、長岡宏美、静岡市保健所生活衛生課、壁谷美加:レジオネラ症の最近の話題と動向、感染源調査に係る遺伝子型別の最新情報、浴用施設におけるシャワー水のレジオネラ属菌分離状況、標準的検査法(培養法)と外部精度管理に向けた検討、各種泉質の温泉におけるモノクロラミン消毒の効果と施設への導入事例、温泉入浴施設におけるモノクロラミン消毒設備導入事例について、入浴施設におけるレジオネラ症集団発生事例、平成 26 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2015 年 2 月 6 日、東京
  - 9) 緒方喜久代:レジオネラ症防止対策に係る最近の知見について、平成 26 年度環境監視員担当者会議(大分)、2015 年 2 月
  - 10) 前川純子:レジオネラ. 平成 26 年度希少感染症技術研修会. 平成 27 年 2 月、東京.
  - 11) 杉山寛治:レジオネラ対策講習会、東京都多摩府中保健所主催、2015 年 2 月 18, 23 日、東京都府中市
  - 12) 森本 洋:レジオネラ症と衛生対策、平成 26 年度 保健所生活衛生課監視指導班研修会、2015 年 3 月、北海道倶知安町
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



施設H

- ・泉質：ナトリウム-カルシウム塩化物泉、pH 8.2  
アンモニア態窒素0.4mg/L 含む
- ・浴槽容量：15 m<sup>3</sup>
- ・利用者数：平均554人/日



施設R

- ・井戸水の沸かし湯使用
- ・浴槽容量：8 m<sup>3</sup>
- ・ボタン操作による高濃度モノクロアミン洗浄実施
- ・利用者数：平均 100 人/日



施設T

- ・泉質：鉄泉  
(全鉄イオンFe<sup>2+</sup> + Fe<sup>3+</sup> :10mg/L)  
pH 6.9  
アンモニア態窒素 1 mg/L 含む
- ・浴槽容量：5 m<sup>3</sup>
- ・利用者数：20人/日

図 1 実証試験を実施した気泡発生装置設置浴槽の概要

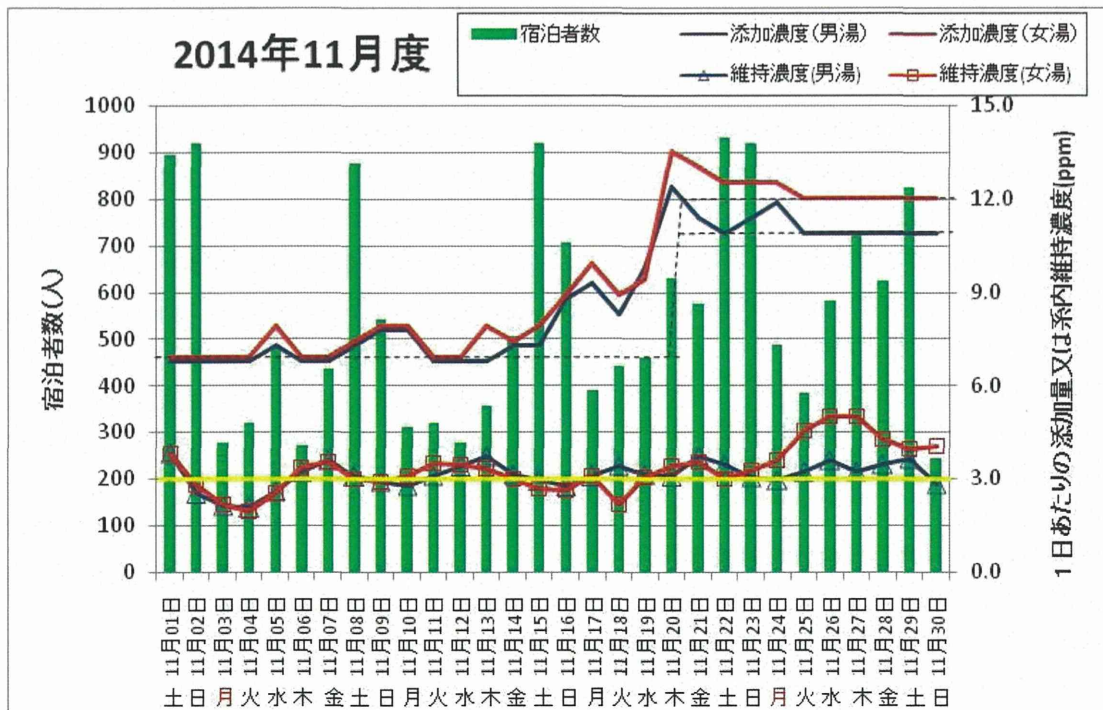


図 4 タイマー注入方式によるモノクロアミンの系内濃度維持と宿泊者数 (施設 H)

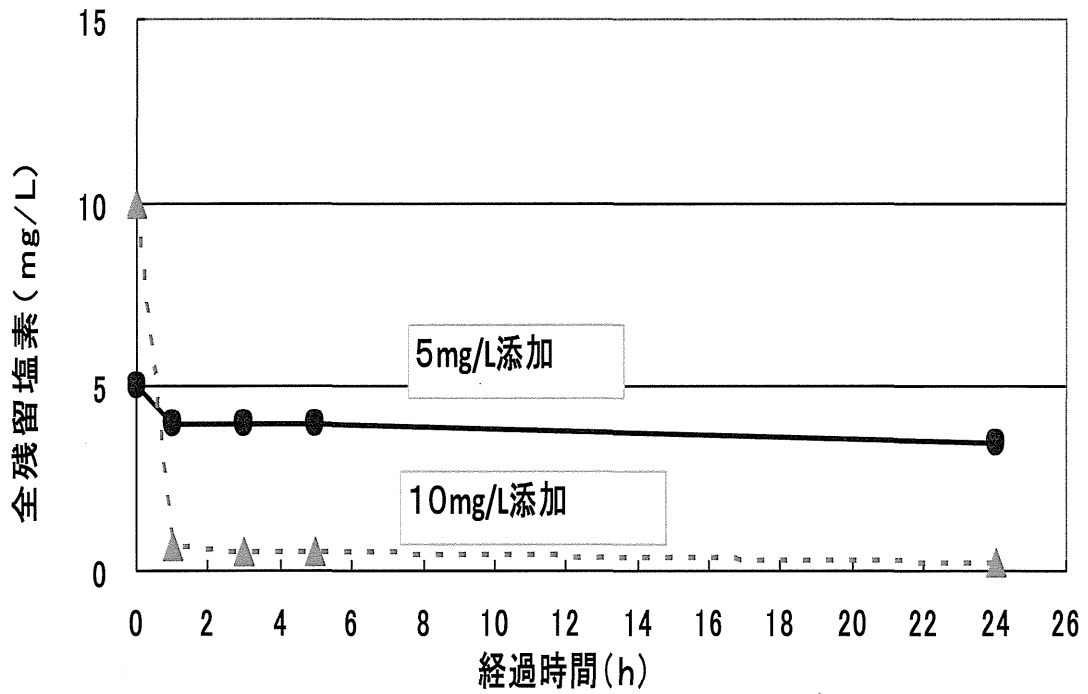


図2 鉄イオン含有温泉に次亜塩素酸Na添加時の全塩素濃度の変化  
(施設 T 源泉)

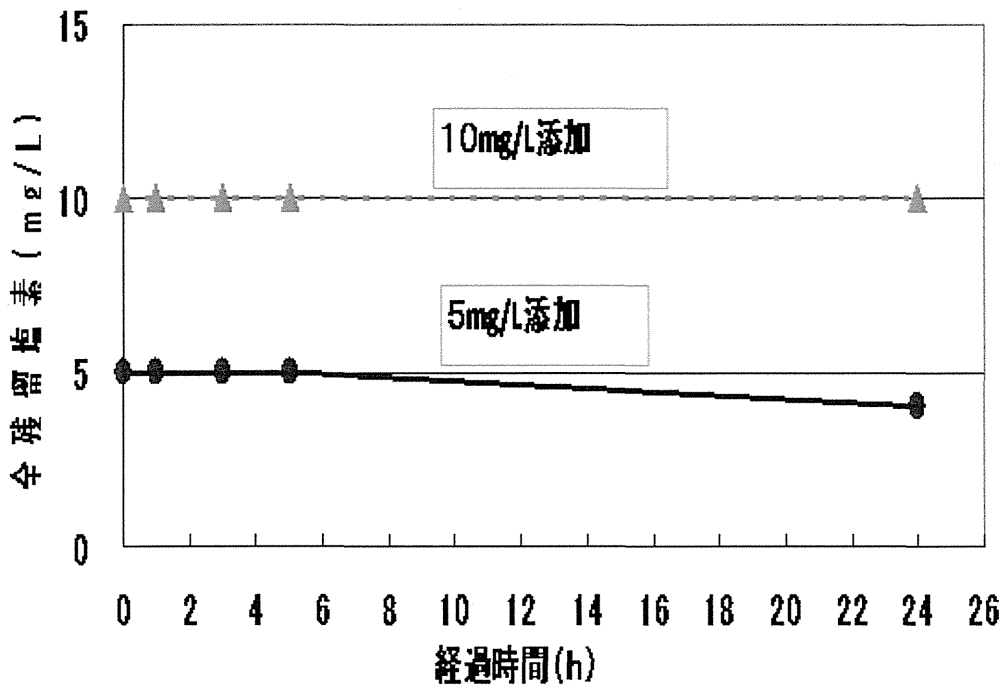


図3 鉄イオン含有温泉にモノクロアミン添加時の全塩素濃度の変化  
(施設 T 源泉)

表 1 浴槽水中の DTHMs 濃度 (µg/L)

温泉施設	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> BrCl	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	CHBrCl <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> ClI	CHBr <sub>2</sub> Cl	CH <sub>2</sub> BrI	CHCl <sub>2</sub> I	CHBr <sub>3</sub>	CHBrClI	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	CHBr <sub>2</sub> I	CHClI <sub>2</sub>	CHBrI <sub>2</sub>	CHI <sub>3</sub>
HS-1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-2	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.13	0.21	0.16	0.15	0.28	< 0.1	0.56	< 0.1	0.27	< 0.1	0.21
HS-3	< 0.1	< 0.1	0.54	< 0.1	0.44	0.55	0.51	< 0.1	0.37	0.44	< 0.1	31.0	0.27	2.80	0.59	34.6
HS-4	< 0.1	< 0.1	0.75	< 0.1	0.42	< 0.1	0.28	< 0.1	0.31	0.20	< 0.1	0.35	< 0.1	0.13	< 0.1	< 0.1
HS-5	< 0.1	< 0.1	0.17	< 0.1	0.18	0.13	0.20	< 0.1	0.31	< 0.1	< 0.1	0.59	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-6	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.17	< 0.1	< 0.1	0.22	< 0.1	0.23	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-7	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.15	0.21	< 0.1	0.34	0.23	< 0.1	0.64	< 0.1	0.36	< 0.1	0.90
HS-8	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.12	0.97	< 0.1	0.17	18.5	0.44	0.32	1.00	0.32	0.52	0.39
HS-9	< 0.1	< 0.1	7.90	< 0.1	0.68	< 0.1	0.35	< 0.1	< 0.1	0.28	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-10	0.10	< 0.1	34.8	< 0.1	11.8	< 0.1	4.90	< 0.1	< 0.1	0.93	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-11	0.15	< 0.1	0.13	< 0.1	0.17	0.53	0.26	0.41	0.77	0.35	< 0.1	16.8	0.64	5.00	1.80	74.8

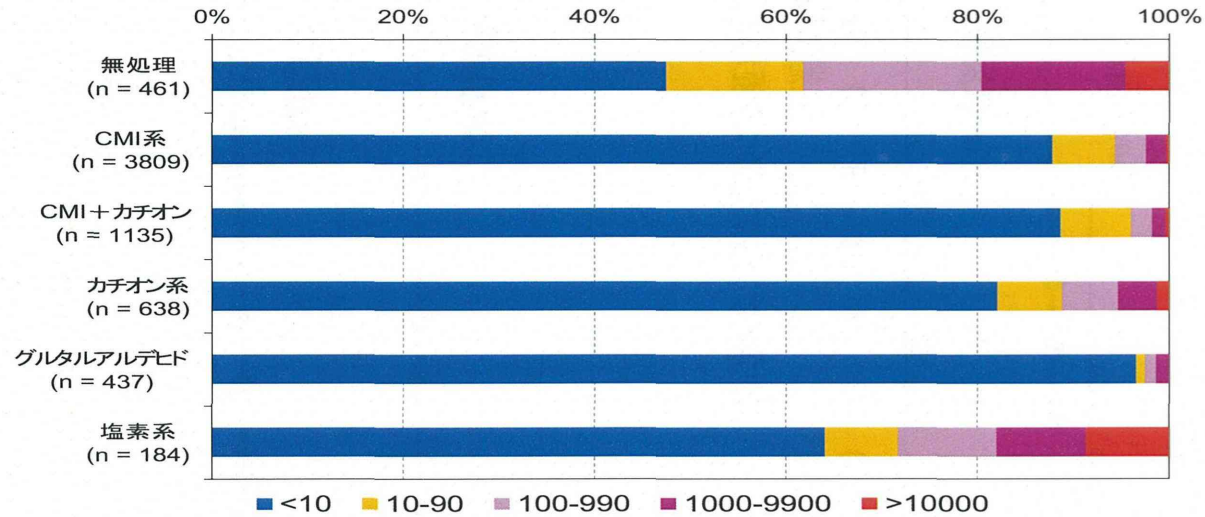


図 5. 殺菌剤の種類別レジオネラ属菌の菌数分布  
(凡例は、レジオネラ属菌数の範囲を示す 単位: CFU/100mL)

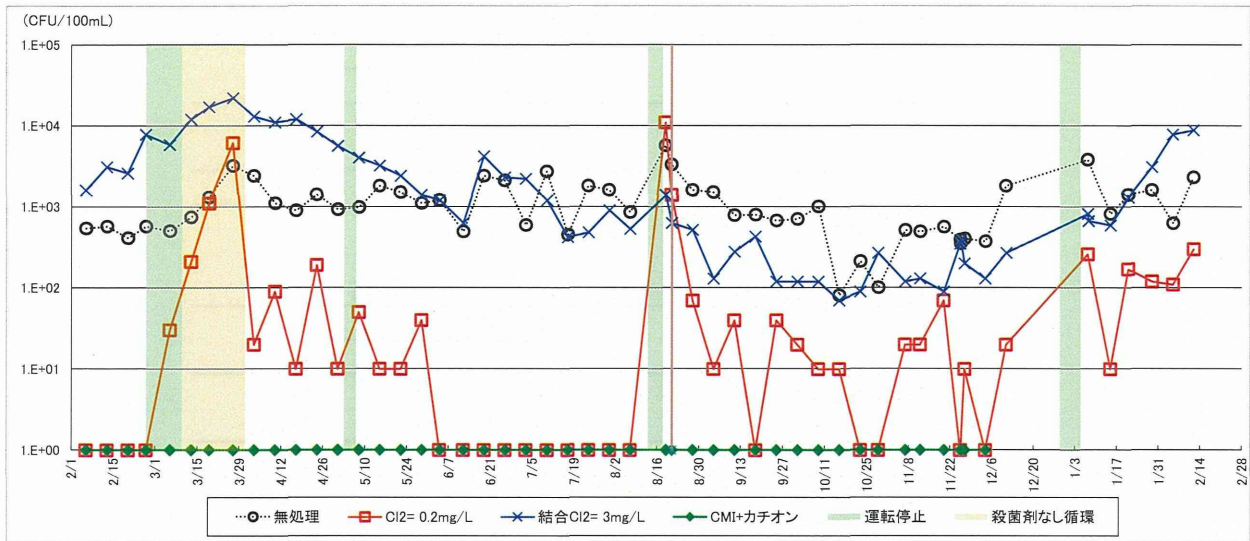


図 6. モデル冷却水のレジオネラ属菌の推移

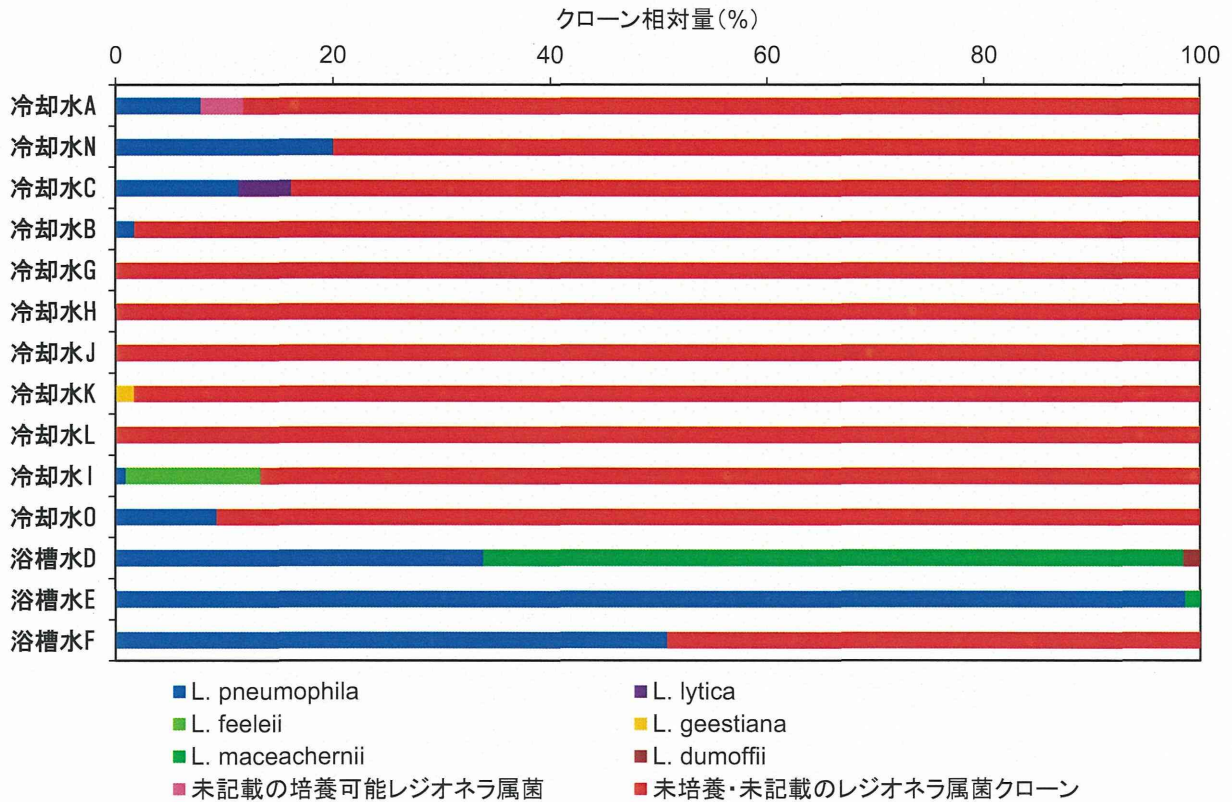


図 7. 各クローンライブラリーを構成するクローンの相対量

表 2 平板培養法とLC EMA qPCR法との比較

a. LC EMA qPCR法のカットオフ値1 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 1	51	31	82
	< 1	6	88	94
計		57	119	176

感度 89.5%、 特異度 73.9%

b. LC EMA qPCR法のカットオフ値5 CFU/100 ml相当

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 5	44	20	64
	< 5	13	99	112
計		57	119	176

感度 77.2%、 特異度 83.2%

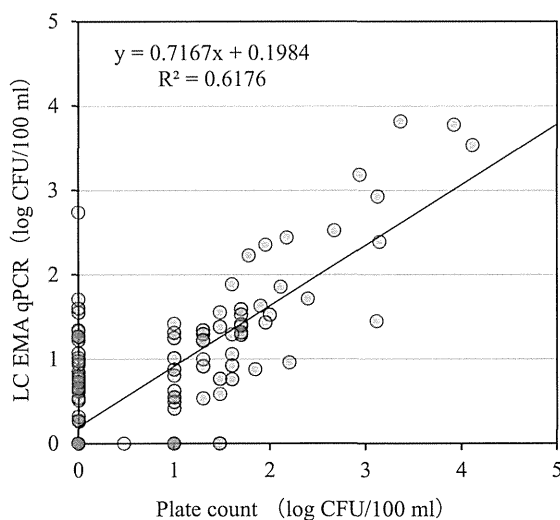


表 3. 平板培養法とLAMP法との比較

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LAMP法	検出	31	18	49
	不検出	9	40	49
計		40	58	98

感度 77.5%、 特異度 69.0%

図 8 平板培養法とLC EMA qPCR法との相関

表 4 LAMP実施検体におけるLC EMA qPCR法 (カットオフ値 1 CFU/100 ml相当)と平板培養法との比較

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA qPCR法	≥ 1	36	15	51
	< 1	4	43	47
計		40	58	98

感度 90.0%、 特異度 74.1%



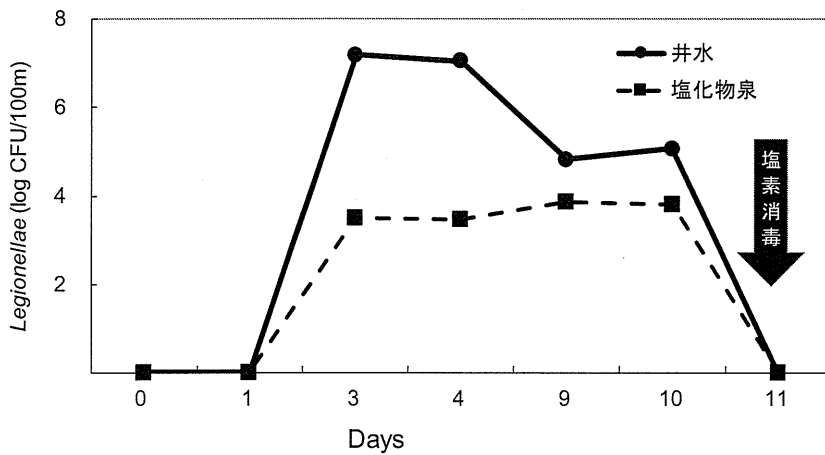


図9 経過日数とレジオネラ属菌数の推移

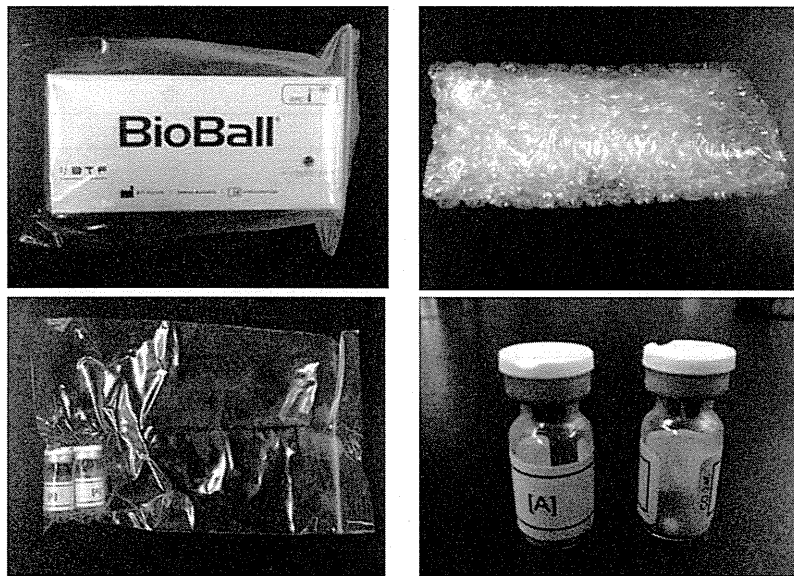


図10 外部精度管理配布試料

表5 特注 Bioball と外部精度管理目標値

	平成25年度	平成26年度
供試菌	<i>Legionella pneumophila</i> ACM5197	<i>Legionella pneumophila</i> ACM5197
発注菌数 (CV(%)<20)	15000cfu/Ball (3000cfu/ 100ml)	15000cfu/Ball (3000cfu/ 100ml)
完成品 (製品保証) : 平均値	16916cfu/Ball	19316cfu/Ball
: 95%信頼区間	下限値 9875.3 上限値 23956.7	下限値 15319.7 上限値 23312.3
: CV(%)	17.5	8.72
外部精度管理目標値	300~15000cfu/100ml	900~15000cfu/100ml

表6 各参加機関全条件中最大値による判定結果(全41機関のべ46試料)

参加機関	最終判定結果 cfu/100ml	濃縮処理			前処理			使用培地					
		非濃縮	ろ過法	遠心法	未	酸	熱	BCYE α	WYO α	GVPC	MWY	CAT α	
1	3000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○		
	2000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○		
2	2000	◎	○		◎	○	○	◎		◎	◎		
3	12000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○		
4	3000	◎	○		◎	○	○	◎		○			
5	15000	◎	○		◎	○	○	◎					
6	6000	◎	○		◎	○	○			◎			
7	10	○		◎	◎	○	○			◎			
8	1000	◎	○		○	◎	○					◎	
9	20	○	◎		◎	○	○					◎	
	20	○	◎		◎	○	○					◎	
10	9000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○			
	8000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○			
11	7000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○			
12	8000	◎	○		◎	○	○			◎			
13	8000	◎	○		◎	○	○		◎				
14	3000	◎	○		◎	○	○		◎				
	3000	◎	○		◎	○	○		◎				
15	4000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○			
16	3000	◎	○		◎	○	○			◎			
17	7000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○	○	
18	9000	◎	○		◎	○	○	◎		○			
19	12000	◎	○		◎	○	○	◎	○			○	
20	140	○	◎		◎	○	○		◎				
21	8000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○			
22	2500	◎	○		◎	○	○			◎			
23	6000	◎	○		◎	○	◎		◎(未)	◎(熱)			
24	14000	◎	○		◎	○	○	◎		○			
25	6000	◎		○	◎	○	○			◎			
26	4000	◎	○		◎	○	○			◎			
27	2000	◎	○		◎	○	○			◎			
28	2000	◎	○		◎	○	○		◎	○	○		
29	11500	◎	○		◎	○	○	◎		○			
	13500	◎	○		◎	○	○	◎		○			
30	3000	◎	○		◎	○	○			◎			
31	10000	◎	○		◎	○	○			◎			
32	6000	◎	○		◎	○	○	◎	○	◎		○	
33	1000	◎	○		◎	◎	○		○			◎	
34	16000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○			
35	4000	◎	○		◎	○	○		◎	◎			
36	4000	◎	○		◎	○	○			◎			
37	14000	◎	○		◎	○	○	◎	○				
38	11000	◎	○		◎	○	○	◎		○	○		
39	2000	◎	○		◎	○	○					◎	
40	6000	◎	○		◎	○	○	◎		○			
41	2000	◎	○		◎	○	○	◎	○	○			

平均値 5949.782609

最大値 16000

最小値 10

中央値 5000

表7 判定結果比較(全条件中最大値、H25:全39機関のべ42試料、H26:全41機関のべ46試料) cfu/100ml

参加機関	H25(SOP)	H26(WG法)	参加機関	H25(SOP)	H26(WG法)	参加機関	H25(SOP)	H26(WG法)
A1	2000	3000	Q1	30	4000	K2	120	11500
	5000	2000	R1	40	3000		190	13500
B1	3000	2000	S1	350	7000		30	NT
C1	110	12000	T1	310	9000	L2	30	6000
D1	2000	3000	U1		12000	M2	10	1000
E1		15000	V1		140	N2	20	16000
F1		6000	W1	300		O2	70	4000
G1	60	10	X1	80	8000	P2	850	4000
H1		1000	Y1		2500	Q2	110	
I1		20	Z1		6000	R2	3000	14000
		20	A2	80		S2	810	11000
J1	20		B2	50		T2	370	2000
K1	20		G2	15		U2	560	6000
L1	56	9000	D2	200	14000	V2		2000
		8000	E2	160	6000	良好機関	14/39(36%)	37/41(90%)
M1	160	7000	F2	20	4000	全試料中	15/42(36%)	41/46(89%)
N1	220	8000	G2	920	2000	平均値	532.761905	5949.78261
O1	400	3000	H2	530	2000	最大値	5000	16000
		3000	I2	40	3000	最小値	10	10
P1	10	8000	J2	25	10000	中央値	115	5000

表8 加熱時間と菌の検出状況

菌数	検体数*	20分	30分
10未満	38	41	46
10-99	10	9	3
100-999	5	3	6
1000以上	3	3	1

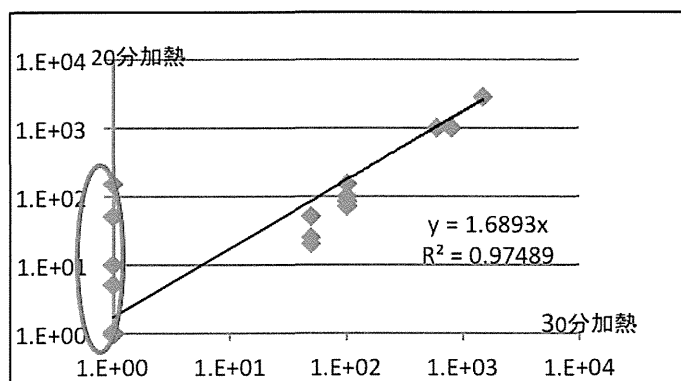


図11 加熱時間と菌の検出状況

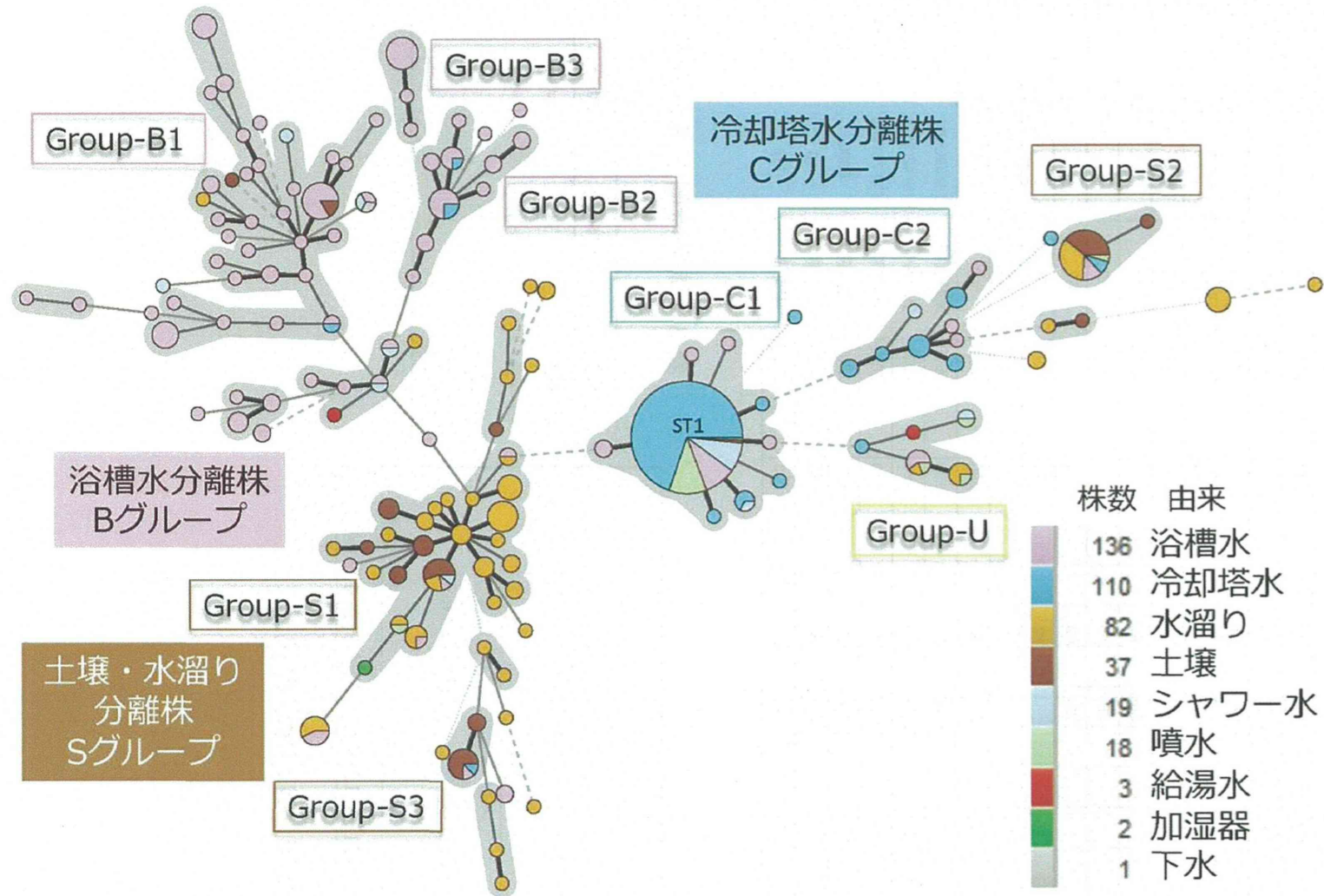


図1. *L. pneumophila*血清群1の環境分離株408株のSTのMST解析

図12 *Legionella pneumophila*血清群1の環境分離株408株のsequence typeのMST解析

表 9. シャワー水におけるレジオネ属菌

菌数	検体数 (%)
10 未満	62 (66.0)
10 - 99	19 (20.2)
100 - 999	11 (11.7)
1,000 以上	2 (2.1)
合計	94 (100)

表 10 河川水における Legionella 属菌検出率

地点	河川	陽性数 / 検体数
A	庄川	3 / 5
B	庄川	1 / 5
C	庄川	1 / 5
D	庄川	1 / 5
E	神通川	3 / 5
F	常願寺川	2 / 5
G	常願寺川	4 / 4
計		15/34

表 11 土壌における Legionella 属菌検出率

地点	陽性数 / 検体数
1 道路沿い	0 / 5
2 道路沿い	0 / 5
3 庄川付近	4 / 5
4 庄川付近	5 / 5
5 庄川付近	2 / 5
6 庄川付近	1 / 5
7 道路沿い	3 / 5
8 道路沿い	1 / 5
9 道路沿い	3 / 5
10 道路沿い	1 / 5
11 神通川付近	5 / 5
12 常願寺川付近	0 / 5
13 常願寺川付近	0 / 4
	25/64

表 12 県内で発生したレジオネラ症患者分離株 (平成 19 年~26 年)

菌株No	分離年	菌種	血清群	ST	PFGE パターン	年齢	性別	検体	症状					
									発熱	咳嗽	呼吸 困難	意識 障害	肺炎	その他
K9	2007	Lp	1	595		64	男	喀痰	●	●	●	●	●	
K11	2007	Lp	1	593		69	男	喀痰	●			●	●	
K105	2008	Lp	1	609		59	男	喀痰	●		●	●	●	頭痛
K117	2008	Lp	1	609		79	男	喀痰	●		●	●	●	
K118	2008	Lp	1	594		55	男	喀痰	●	●		●	●	
K090729	2009	Lp	1	550		37	男	喀痰	●	●		●	●	下痢
O100216	2009	Lp	1	23		54	男	喀痰	●		●		●	
K100118	2010	Lp	1	609		58	男	喀痰	●				●	
K100503	2010	Lp	1	42		69	男	喀痰	●			●	●	
K110728	2011	Lp	1	1077		55	女	喀痰	●		●		●	胸部異常影(糖尿病あり)
K111019	2011	Lp	1	120		78	男	喀痰	●		●		●	
KD111109	2011	Lp	1	120		78	男	喀痰	●		●	●	●	腹痛、多臓器不全
K111117	2011	Lp	1	1077		91	男	喀痰	●	●			●	
K111213	2011	Lp	1	1077		69	男	喀痰	●	●		●	●	
K120214	2012	Lp	1	42		55	男	喀痰	●		●		●	
K121108	2012	Lp	1	530		71	男	喀痰	●		●		●	ICUに入院
K140618	2014	Lp	1	1845		53	男	喀痰	●	●	●		●	多臓器不全
K140624	2014	Lp	1	1847		50	男	喀痰	●				●	下痢
K140714	2014	Lp	1	23		68	男	喀痰	●				●	筋肉痛、全身倦怠感、下痢
K140904	2014	Lp	1	1846		49	男	喀痰	●				●	肝障害、腎不全
KD110625	2011	Lp	2	354		63	男	喀痰	●	●			●	肺炎から死亡(糖尿病あり)
K79	2008	Lp	3	93	A	66	男	喀痰	●	●			●	
K86	2008	Lp	3	93	A	58	女	喀痰	●				●	胸部異常影、症状無し
K95	2008	Lp	3	93	A	79	男	喀痰	●				●	胸部異常影、症状無し
K100423	2010	Lp	3	93	A	60	女	肺胞洗浄液	●		●		●	
K100712	2010	Lp	3	93	A	74	男	喀痰	●				●	
K110707	2011	Lp	3	93	A	77	男	喀痰	●				●	胸部異常影、症状無し
K110908	2011	Lp	3	93	A	59	女	喀痰	●				●	胸部異常影、症状無し
K120831	2012	Lp	3	93	A	58	女	喀痰	●				●	胸部異常影、非定型肺炎疑い
K130920	2013	Lp	3	93	A	73	男	喀痰	●	●			●	
K130108	2013	Lp	9	1283		65	男	喀痰	●				●	全身倦怠感
K141119	2014	Lp	9	未実施		59	男	気管内 吸引痰	●			●	●	
KD120905	2012	Lp	10	1427		74	男	喀痰	●	●	●		●	ICUに入院、死亡(糖尿病あり)

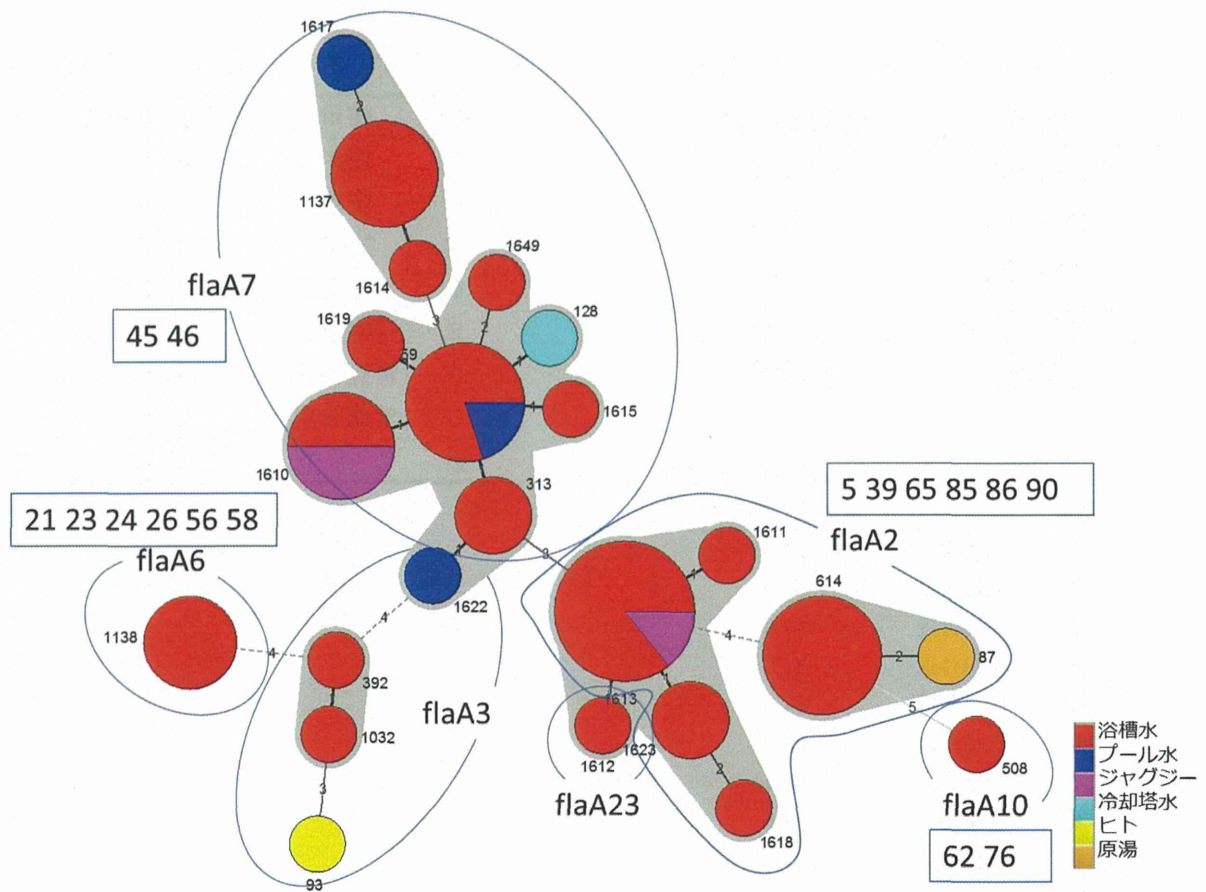


図 13 *Legionella pneumophila* SG3 の SBT 法による minimum spanning tree における *flaA* との関係 (感染研:前川純子先生)

□内の数字は、本年度分離された浴槽水由来株の番号

円の大きさは菌株数を示す。

円の中の数字は ST を示す。

短く太い線は、single locus variant

薄い実線は、double locus variant

背景が太い集まりは clonal complex を示し、隣り合う遺伝子座の違いが 2 つ以下の ST の集団を示す。

線の中の数字は、7 つの locus の内いくつ違うかを示す。

表 13 家庭環境で採取した水試料の性状と *Legionella* 属菌の汚染状況

試料	家庭数	検体数	温度 (°C)		pH		塩素濃度(ppm)		HPC log <sub>10</sub> (CFU/ml)		培養 菌数 陽性 (CFU/100ml)	LAMP 陽性	アメーバ増菌後		
			平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均 <sup>a</sup>	範囲			培養陽性	LAMP 陽性	
台所 蛇口水	6	8	26.5	24.0-30.0	7.3	7.1-7.4	0.14	0-0.53	2.30	0.30-5.05	0	1(12.5)	1 <sup>d</sup> (12.5)	3(37.5)	
浄水器 蛇口水	2	2	24.4	22.5-26.2	7.1	7.0-7.2	0	0	3.92	3.65-4.20	0	0	0	0	
浴室 蛇口水	8	8	26.0	18.5-36.0	7.3	7.1-7.8	0.19	0-0.45	2.31	0.30-4.01	0	1(12.5)	0	1(12.5)	
浴室 給湯水	9	10	32.5	28.0-39.0	7.4	7.3-7.8	0.12	0-0.50	3.55	1.38-6.25	1 <sup>b</sup> (10.0)	15	5(50.0)	0	5(50.0)
浴室 浴槽水	3	3	29.8	29.5-30.0	7.3	7.2-7.3	0.15	0-0.45	4.72	1.54-6.53	0	1(33.3)	0	0	
浴室 シャワーホス内水	6	6	26.1	23.0-31.5	7.4	7.1-7.8	0.17	0-0.49	2.78	1.13-5.14	0	0	0	1(16.7)	
洗面台 蛇口水	4	5	25.6	22.0-30.0	7.3	7.2-7.4	0.16	0.02-0.33	1.99	0.60-3.46	0	0	0	1(20.0)	
トイレ 便所内水	2	2	24.5	22.0-27.0	7.3	7.2-7.4	0.23	0.01-0.44	2.72	1.81-3.62	0	0	0	0	
洗濯機内水	5	8	22.7	16.0-27.0	7.5	7.3-7.9	0.05	0-0.20	3.44	2.18-5.55	0	5(62.5)	0	7(87.5)	
庭 ホス内水	3	5	28.8	21.0-33.0	7.3	7.1-7.5	0.01	0-0.02	4.97	4.23-5.64	0	0	0	0	
水槽	6	18	25.5	23.5-27.0	6.4	3.3-7.6	0	0	—	—	1 <sup>c</sup> (5.6)	25	11(61.1)	0	13(72.2)
合計		75									2(2.7)	24(32.0)	1(1.3)	31(41.3)	

a: 幾何平均、 b: *L. pneumophila* SG1、 c: *L. saintelensi* d: *L. rowbothamii*

表 14 家庭環境で採取したスワブ検体等における *Legionella* 属菌の汚染状況

試料	家庭数	検体数	培養	LAMP	アメーバ増菌後		
			陽性	陽性	培養陽性	LAMP 陽性	
スワブ							
台所 蛇口	6	8	0	0	0	0	
浄水器 蛇口	2	2	0	1(50.0)	0	1(50.0)	
風呂 蛇口	8	8	0	1(12.5)	0	0	
風呂 給湯口	9	9	0	4(44.4)	0	5(55.6)	
風呂 シャワーヘッド	3	3	0	0	0	0	
洗面台 蛇口	4	5	0	0	0	0	
ロータンク	3	3	0	0	0	0	
水槽	1	4	0	0	0	0	
庭 ホース	3	5	0	0	0	0	
合計		47	0	6(12.8)	0	6(12.8)	
その他							
スポンジ	2	3	1 <sup>a</sup> (33.3)	1(33.3)	0	2(66.7)	

a: *Legionella pneumophila* SG1 検出

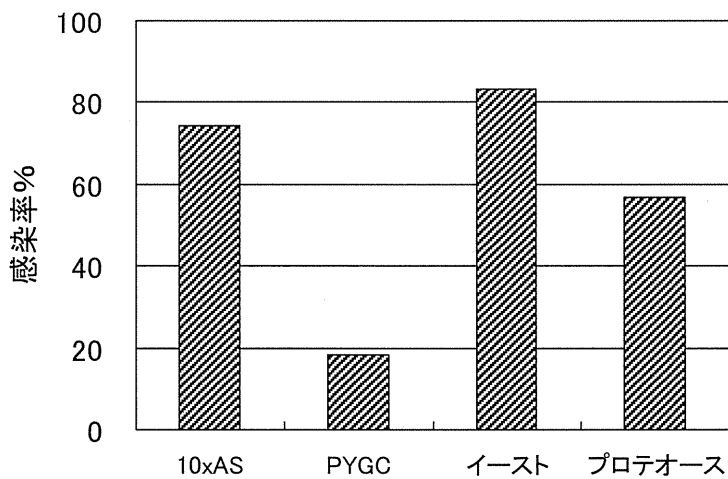


図 14 PYGC とその構成成分によるレジオネラ属菌感染阻害試験



## II. 分担研究報告

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  
研究代表者：倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部

平成 26 年度 分担研究報告書

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

研究分担者	○長岡宏美	静岡県環境衛生科学研究所
研究分担者	縣 邦雄	アクアス株式会社 つくば総合研究所
研究分担者	神野透人	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
研究分担者	八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	杉山寛治	株式会社マルマ 研究開発部
研究協力者	小坂浩司	国立保健医療科学院 水道工学部
研究協力者	泉山信司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	片山富士男	静岡市保健所
研究協力者	和田裕久	静岡市環境保健研究所
研究協力者	榎原広里	静岡市環境保健研究所
研究協力者	市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社
研究協力者	青木信和	ケイ・アイ化成株式会社

(研究要旨)

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。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。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。その結果、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 に低減できることが示された。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。

## A. 研究目的

各都道府県や政令市の循環式浴槽水の衛生管理に関する条例には、浴槽水の遊離塩素濃度を適切に管理すること（0.2 または 0.4 mg/L 以上に保ち、かつ最大 1.0 mg/L を超えない等）が定められている。しかし、遊離塩素消毒に使われる次亜塩素酸ナトリウムは殺菌力に優れているが、アルカリ泉質による殺菌効果の低下や、アンモニア態窒素を含む泉質による遊離塩素の消費、濃度維持の困難、消毒不十分といった問題が生じている。また、遊離塩素消毒による塩素臭や有害なトリハロメタン等の消毒副生成物の生成も問題となっている。

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、厚生労働省の研究班では水道法施行規則第 17 条に記載されている結合塩素に着目し、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検証してきた。平成 23 年度は実験用循環式モデル浴槽<sup>1,2)</sup>で、平成 23、24 年度は温泉水の循環式浴槽を使用している営業施設<sup>3,4)</sup>において、モノクロラミンの生成装置と全塩素濃度測定器による自動制御装置を導入し、モノクロラミン消毒の有用性を実証してきた。モノクロラミン消毒は、遊離塩素消毒に比べ、濃度が安定して維持され、消毒効果が持続すること、消毒副生成物の生成が少ないこと、配管等に付着するバイオフィルムの殺菌と形成抑制ができること、不快な塩素臭が低減できることなどを明らかにした。平成 25 年度までの本研究において、未実施の泉質である鉄イオンを含む温泉でモノクロラミン消毒の実証試験を行った。

本年度は、前年度に試験室で実施した鉄イオンを含む水中でモノクロラミン濃度が遊離塩素に比べ安定的に保たれた実験結果<sup>5)</sup>を受け、鉄イオンを含む源泉水を使用する営業施設でモノクロラミン消毒の実証試験を行い、その有効性を検討した。

また、レジオネラ属菌はエアロゾルに含まれ感染を起こすことが知られており、気泡発生装置を有する浴槽形態はリスクが高いと考えられる。そこで、気泡発生装置付き浴槽においても普通浴槽

と同様なモノクロラミン消毒の殺菌効果が得られるか実証試験を行った。

また、本消毒法を導入するにあたっては長期運用が可能であることや薬剤のリーズナブルな使用条件での検討が望まれることから、営業施設における長期運用試験を実施した。

## B. 研究方法

### 1 鉄イオンを含む泉質におけるモノクロラミン消毒効果の検証

#### (1) 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

静岡県内 1 検体について、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℃）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。

#### (2) 循環式入浴施設（営業施設）における検証試験

上記試験でモノクロラミン濃度安定性が確認されたため、その源泉水を使用する循環式入浴施設 T の浴槽水において、モノクロラミン濃度を 3 mg/L に維持して実証試験を行った。

対象施設は静岡県三島市内の日帰り入浴施設で、実験浴槽は循環式浴槽の室内風呂（総容量 5 トン、補給水なし、ろ過器なし）、泉質はナトリウム・カルシウム塩化物温泉（低張性/弱アルカリ/低温泉）で、試験前の水質分析の結果は pH 6.9、全鉄イオン  $Fe^{2+}+Fe^{3+}$ :10mg、アンモニウム態窒素は 1.0 mg/L であった。

モノクロラミンは、水道水に次亜塩素酸ナトリウムと塩化アンモニウムのモル比が 1 : 2.5 になるように混合することで生成<sup>1-4,6)</sup>し、直ちに浴槽水に添加した。

モノクロラミン濃度は約 1 時間間隔で全塩素濃度測定により確認して約 3mg/L の維持を図った。

浴槽水は、遊離塩素管理時及びモノクロラミン管理時とも試験前と試験後に採水し、各種検査に供した。

### (3) 検査項目

#### ①微生物検査

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。

#### ②塩素濃度の測定

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。

モノクロラミンの定量およびモノクロラミン生成に伴って生成される恐れのあるジクロラミンの定量は、米国 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。悪臭の原因となるトリクロラミンの濃度測定については、高感度に定量できる HS-GC/MS 法 (定量下限値は  $15\mu\text{g/L}$ ) により定量した。これらの塩素濃度の測定については、国立保健医療科学院で実施した。試料は冷蔵の宅配便で輸送し、すみやかに試験した。

#### ③消毒副生成物の定量

入浴者が経皮的に取り込む化学物質暴露を評価するため、浴槽水中の消毒副生成物 (ジクロロアセトニトリル、ブロモクロロアセトニトリル、ジブロモアセトニトリルのハロアセトニトリル類 3 物質、トリクロロメタン、ブロモジクロロメタン、ジブロモクロロメタン、トリブロモメタンのトリハロメタン類 4 物質およびモノクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、モノブロモ酢酸、ジブロモ酢酸、ブロモモノクロロ酢酸、ブロモジクロロ酢酸、ジブロモクロロ酢酸のハロ酢酸類 8 種) の定量を行った。これらの測定は、国立医薬品食品衛生研究所で実施した。

### 2 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

#### (1) 営業施設における実証試験

図 1 に、静岡県内 3 か所 (三島市、静岡市、浜松市) の気泡発生装置使用浴槽の概要を示した。

三島市の対象施設 T は 1 日平均利用者数 20 人の日帰り入浴施設で、実験浴槽は循環式浴槽の室内風呂 (総容量 5 トン、補給水なし、ろ過器なし)、試験前の水質分析の結果成分分析表による泉質はナトリウム・カルシウム塩化物温泉 (低張性/弱アルカリ/低温泉) で pH 6.9、全鉄イオン  $\text{Fe}^{2+}+\text{Fe}^{3+}$ :10mg アンモニウム態窒素は 1.0 mg/L であった。モノクロラミンは、水道水に次亜塩素酸ナトリウムと塩化アンモニウムのモル比が 1 : 2.5 になるように混合することで生成し、直ちに浴槽水に添加した。モノクロラミン濃度は約 1 時間間隔で全塩素濃度測定により確認して約 3 mg/L の維持を図った。

静岡市の対象施設 R はスポーツクラブで、温水プールに併設されているジャグジー付の採暖槽 (総容量 8 トン、井戸水の沸かし湯) で、モノクロラミンの添加は下限値 3.2mg/L 検知で自動添加するセンサー注入方式により行った。試験期間は 1 週間に 1 回採水し検査に供した。

浜松市の対象施設 H は 1 日平均利用者数 554 人の循環式浴槽の室内風呂 (総容量 15 トン、補給水あり)、試験前の水質分析では、ナトリウム・カルシウム塩化物泉、pH8.2、アンモニウム態窒素を 0.4mg/L を含んでいた。モノクロラミンは、概ね 3mg/L の濃度維持を目標に 14 回のタイマー方式による自動機械注入により行った。試験期間は 118 日で、期間中 8 回採水し検査に供した。

#### (2) 検査項目

検体は、微生物検査、塩素濃度の測定、消毒副生成物の定量を前述 1 - (3) と同様の方法で行った。

### 3 モノクロラミン消毒の長期運用試験

#### (1) タイマー注入方式装置の導入

静岡市の循環式入浴施設 O 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、