

201525002A

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 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 倉 文明

平成 28 (2016) 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. マンガンイオンを含む浴槽水へのモノクロラミン消毒の適用-----33
長岡宏実、縣 邦雄、八木田健司、杉山寛治、小坂浩司、泉山信司、前林公男、加藤千裕、
和田裕久、鈴木史恵、寺田善直、壁谷美加、土屋祐司、市村祐二、青木信和
2. 浴槽水の塩素消毒における電流滴定法の有用性-----45
荒井桂子、田中礼子、山之内孝、加藤元規、倉 文明
3. 冷却水系の消毒維持管理と菌の多様性-----51
縣 邦雄、井上浩章、神澤 啓
4. レジオネラ生菌迅速検査法の評価-----61
磯部順子、佐々木麻里、山口友美、武藤千恵子、金谷潤一、浦山 みどり、田栗 利紹、
原口浩幸、森中りえか
5. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-----71
森本 洋、磯部順子、黒木俊郎、佐々木麻里、中嶋 洋、前川純子、浦山みどり、大屋日登美、
緒方喜久代、小川恵子、金谷潤一、久保田晶子、田中 忍、千田 恭子、武藤千恵子、山口友美、
吉野修司、渡辺亮太、倉 文明
6. 水試料からのレジオネラ属菌検出法のマニュアル作成-----97
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-----103
佐々木麻里、一ノ瀬和也、百武兼道、緒方喜久代、森中りえか、原口浩幸
8. *Legionella pneumophila* 臨床分離株の収集と SBT 法による遺伝子型別-----109
前川純子、倉 文明
9. レジオネラの遺伝子型別：臨床分離株、多様な生息環境由来株の収集と型別、感染源調査
川崎市内で分離された環境中のレジオネラ属菌の SBT 法による型別-----113
淀谷雄亮、前川純子
10. レジオネラ属菌未記載種の解析-----117
前川純子、倉 文明
11. 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
12. 地域特異的な感染源不明クラスターに関する調査(平成27年度) -----131

中嶋 洋

13. 入浴施設等における *Legionella* 汚染の実態に関する研究-----139

黒木俊郎、前川純子、大屋日登美、鈴木美雪

14. 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-----145

八木田健司、泉山信司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----151

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、欧米でモノクロロミン消毒の有効性が給湯水系で報告され、日本でもモノクロロ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) より広範囲な泉質の浴槽水へのモノクロロミン消毒の適用を目指して、マンガンイオン(1.1 mg/L)を含む地下水を利用した循環式の入浴施設において、モノクロロミン消毒の実証試験を行った。地下水を用いた適合性試験を行い、マンガンイオンによるモノクロロミン濃度の低下がないことを確認した。本泉質の浴槽水で、モノクロロミン濃度(3 mg/L)を維持する6週間の実証試験を行なったところ、過去にレジオネラの集団感染を起こした気泡発生装置使用の浴槽水において、レジオネラやアメーバは検出されなかった。塩素消毒臭の原因であるトリクロロミンや、消毒副生成物のトリハロメタン類の生成はなく、N-ニトロジメチルアミン(NDMA)の生成量は遊離塩素管理時と変わらなかった。マンガンイオンを含む浴槽水の消毒にもモノクロロミンが適していると判断された。
- 2) 循環式浴槽のモノクロロミン消毒時のろ過器・配管の洗浄では、不連続点処理あるいは事前の完全換水が必要となる遊離塩素洗浄は不便である。そこで高濃度モノクロロミンによる配管洗浄の方法を検討した。実験室内の回流装置試験→プラント(循環式モデル浴槽)試験→現場施設での実証試験という手順で試験の効率化を図るとともに、安全性の確保を考慮しながら試験データを作成し、モノクロロミン濃度(10 mg/L以上)と処理時間(1時間以上)という配管洗浄の条件を決定し、循環式浴槽水へモノクロロミン消毒法を導入するにあたり必要な衛生管理手法を確立した。
- 3) 着色を呈している温泉等では DPD 試薬の比色による測定が難しい。また、測定対象水がアンモニア態窒素を高濃度で含有する場合、塩素剤と反応して高濃度の結合残留塩素を生じ、短時間に DPD 試薬と反応して桃色を呈するため、遊離残留塩素と結合残留塩素の区別がつきづらい。そこで、着色している温泉試料を対象に、電流滴定法の有効性を、通常現場で使用している DPD 試薬と比較した。DPD 試薬では判断できなかった着色試料の残留塩素を、電流滴定法では遊離残留塩素と結合残留塩素に区別して求めることが可能であった。また、アンモニア態窒素が高い濃度で含まれる試料においては、DPD 試薬では遊離残留塩素として測定されていた残留塩素を、結合残留塩素として検出することが出来た。
- 4) 前年度の調査で冷却水中のレジオネラ属菌クローンライブラリー解析の結果、菌種の多様性と、難培養性のレジオネラ属菌の存在を示唆した。今年度は、難培養性レジオネラ属菌をアメーバ共培養と定量 PCR の組み合わせで検出した。培養法でレジオネラ属菌が不検出、PCR 法でレジオネラ属菌の DNA が検出された冷却水 13 試料を調査し、5 試料でレジオネラ属菌の DNA の増加を認めた。クローン解析の結果、*Legionella drozanskii* 等の難培養性レジオネラ属菌が検出された。このことより、実冷却水では従来の培養法で検出されないレジオネラ属菌が存在しており、その存在は PCR 検査により認識することが出来ることがわかる。

- 5) サイクロン式エアサンプラー(コリオリス μ)による空気中のレジオネラ属菌の定量的測定法を確立した。冷却塔の内部や近傍では空気中にレジオネラ属菌が存在し、検出量は冷却水中のレジオネラ属菌数と相関が認められた。また、市街地の空気を採取して調査した結果、レジオネラ属菌の遺伝子が検出され、ビルが多い繁華街や土埃汚染が多い地域で、検出される遺伝子量が多い傾向であった。
- 6) モデル冷却塔により、前年度に引き続き各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果を調査した。結合臭素(全塩素 3mg/L)処理では $10^3 \sim 10^4$ CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出され、レジオネラ属菌の抑制効果はなかった。遊離塩素処理は、運転停止による残留塩素の消失、pH が 8.7 でアメーバが増殖した結果、レジオネラ属菌が検出された。遊離臭素処理においてもレジオネラが検出されており、遊離塩素と遊離臭素処理では、pH 条件、運転休止の影響など維持管理上の注意点が明確になった。
- 7) レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、LAMP 法、生菌を選択的に検出する LC EMA qPCR 法、および比色系 PALSAR 法(今年度新規)について、浴槽水などの実試料 441 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。342 検体について LC EMA qPCR 法を実施した。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 89.2% (74/83 検体)、特異度は 80.3% (208/259 検体) 菌数(定量値)の相関は $R^2 = 0.6874$ であり、平板培養法と高い相関を示した。286 検体について LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 84.0% (68/81 検体)、特異度は 76.6% (157/205 検体)であった。268 検体について PALSAR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 47.0% (39/83 検体)、特異度は 76.8% (142/185 検体)であり、LC EMA qPCR 法、LAMP 法と比べ、特異度は同等であったが、感度は低かった。今年度の結果から、LC EMA qPCR 法(カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当)および LAMP 法は、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。
- 8) レジオネラ属菌検査法の安定化を目的とし、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの3点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(WG)内で検討を行った。前 2 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・ビオメリュー社の 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。今年度は精度管理サーベイの実施母体を日水製薬(株)とし、公的、民間を問わず全国 189 の検査機関(延べ 192 試料配付)に対し外部精度管理を実施した。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所 68 機関については、WG でも集計・解析を実施した。300~9000cfu/100ml の目標値(良好範囲)を報告した機関の%は、非濃縮試料では 91% (62/68)、ろ過濃縮試料では 62% (38/61)、遠心濃縮試料では 36% (8/22)であった。
- 9) レジオネラ属菌の培養検査は容易ではない上、水試料におけるレジオネラ属菌の検査は定量検査であるため、検査の操作には細かい配慮が必要である。地方衛生研究所や民間の検査機関を対象にした水試料からのレジオネラ属菌検査法の研修を実施することで、検査法が普及するとともに検査技術が全国的に向上することが期待されることから、今年度は検討グループを構成し、研修で使用するマニュアルの作成を協議した。マニュアルにおける検査法の各項目の構成や注意点等の記載方法等を検討して、使いやすく、わかりやすいマニュアルの作成を試みた。
- 10) 標準的な検査法を提示する一助として、迅速培養法(斜光法を取り入れた培養法)と従来法、遺伝子検査法(LAMP 法及び比色系パルサー法)について、今年度に搬入された大分県の浴槽水および湯口水、25 施設 50 検体を対象として検討を行った。培養検査に斜光法を取り入れることにより、より短い期間で正確な培養結果が得られた。比色系パルサー法で認められた培養(+)遺伝子検査(-)の不一致は、検体処理法を変更し

て改善された。その他の要因として、泉質などの要因が考えられた。

- 11) 主たる起因菌 *L. pneumophila* (Lp) について、sequence-based typing (SBT) 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。これまで Lp SG1 の環境分離株の Minimum spanning tree 解析では、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る。昨年度収集した臨床分離株 67 株のうち血清群 1 の 61 株を型別してどのグループに属するか調べた。平成 23 年から平成 27 年までに川崎市健康安全研究所に搬入された冷却塔水及び浴槽水等から分離された *Legionella pneumophila* SG1 計 31 株を遺伝子型別し国内分離株のグループ分けを行った。
- 12) 16S rRNA 遺伝子および *mip* 遺伝子配列の解析から、既存種に当てはまらない日本各地の環境から分離されたレジオネラ属菌株について、菌体脂肪酸組成分析を行った。土壌、あるいは湧泉水から分離された 6 株は、菌体脂肪酸組成の類似度が高く、未記載の同一種であると考えられた。本未記載種は、*Legionella pneumophila* 3 群、あるいは 10 群の抗血清と交差反応を示すが、DNA 類似度から *L. pneumophila* とは別種と考えられ、菌体脂肪酸組成分析からもそのことが確認できた。
- 13) 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、今年度は浴用水に加えて、シャワー水 36 検体、河川水 15 検体とした。*Legionella* 属菌の検出率は浴用水で 14/51 検体 (27.5%)、シャワー水では 7/36 検体 (19.4%)、河川水では 6/15 検体 (40.0%) であった。シャワー水の検出率は平成 24 年からの 4 年間でもっとも低かった。河川水については、昨年度までと採水地点が大きく変更となったにも関わらず、昨年 (44.1%) 同様の検出率であった。調査した *L. pneumophila* SG1 の 14 株中、3 株が ST502 であったが、分離施設間の関連性は不明であった。臨床分離株に多い *lag-1* 遺伝子を保有した株は 7 株 (50.0%) であった。2011~2015 年の 5 年間に浴用水から *Legionella* 属菌が検出された 71 検体のうち、42 検体 (59.2%) から *L. pneumophila* SG1 が検出され、その 33.3% (14 検体) は *lag-1* 遺伝子を保有した。
- 14) 平成 27 年度の臨床分離株 5 株を、SBT 法による型別を実施した。このうちの 1 株は Lp 血清群(SG) 1 sequence type (ST) 609 で、過去にも患者 3 名から分離され、本県に地域特異性の高い菌株であった。また、Lp SG3 ST93 は国内では岡山県内の患者 9 名のみから分離されている菌株であり (感染症学雑誌 85:373-379, 2011)、これらの感染源を究明するための調査を実施した。環境由来の 37 検体中 7 検体(18.9%)からレジオネラを検出し、さらに保健所が分離したレジオネラ 83 株を収集した。これらの株を含め、今まで環境から分離された Lp SG1 と SG3 について、分子疫学解析を行ったが、患者由来株と同じ ST や PFGE パターンの菌株は、検出されなかった。感染源の究明には、より多様な検体の調査や患者発生時の自宅周辺の調査も、必要であると思われた。
- 15) 平成 27 年度は、浴槽と付随設備、給水系のレジオネラ汚染の実態を把握するために、神奈川県内の 3 ヶ所の入浴施設と 3 医療機関を対象に調査を実施した。循環装置を設置し、塩素消毒を実施している入浴施設では、浴槽からレジオネラ属菌は検出されなかったが、レジオネラ DNA 及びレジオネラ属菌が蛇口及びシャワーからの水試料 (47.1%及び 29.4%) とスワブ試料 (30.8%及び 7.7%) から検出された。循環装置は設置していないが塩素消毒を行っている入浴施設では、浴槽水 1 検体と浴槽壁のスワブ試料 1 検体からレジオネラ属菌が検出され、浴槽の洗浄が不十分であると推測された。循環装置を設置せず塩素消毒を実施していない入浴施設は限られた利用日にのみ浴槽に湯を張り、そのつど清掃していたため、レジオネラの汚染は少なく、蛇口水とシャワー水からレジオネラ DNA が検出されただけであった。医療機関は浴室と個室や共用スペースの洗面台、受水槽等の給水系を調査対象とし、医

療機関により汚染の程度は異なっていた。1 医療機関ではレジオネラ DNA とレジオネラ属菌の水試料での検出率はそれぞれ 6.7%及び 26.7%と汚染が少なく、2 医療機関ではそれぞれ 93.8%と 37.5%及び 60.0%と 66.7%からレジオネラ DNA とレジオネラ属菌が検出された。給水系に対するレジオネラ汚染防止対策が強く求められる結果となった。

- 16) レジオネラ属菌の宿主アメーバ感染における受容体の特性を明らかにするために、菌-アメーバ感染実験系を用いて、糖質およびレクチンの感染抑制あるいは促進効果を定量的に解析した。レクチン ConA とグルコース 2 糖のセルビオースの試験結果からグルコース残基が、またレクチン WGA とヘパリンの試験結果から N アセチルグルコサミン残基が、菌のアメーバ感染初期段階(接着プロセス)に関与していることが示された。WGA とセルビオースに感染抑制効果が、一方 ConA とヘパリンには感染促進効果があり、ヘパリンが感染時存在することで BCYE 培養中に経時低下するレジオネラ属菌の感染性が回復した。分離培養困難なフィールド試料からの菌分離の可能性を示した。
- 17) 大分県、東京都文京区、富山県、岡山県、神戸市、埼玉県、北海道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。NPO 入浴施設衛生管理推進協議会のレジオネラ対策シンポジウムで講演した。国立保健医療科学院平成 27 年度短期研修環境衛生監視指導でレジオネラ属菌の検査と感染対策の講義を行なった。

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
磯部順子・富山県衛生研究所副主幹研究員
黒木俊郎・神奈川県衛生研究所部長
佐々木麻里・大分県衛生環境研究センター
主任研究員
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

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。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我々が初めてである。すでにモノクロラミンの注入・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ラミンの使用が条例で認められている。モノクロラミンによる配管洗浄やモノクロラミン消毒時のバイオ

A. 研究目的

平成 27 年には過去最多の 1,587 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

フィルムの状態、泉質によるモノクロラ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、遊離塩素消毒が困難なマンガンを含む温泉、配管洗浄時のモノクロラミン濃度・タイムコース等についてを検討した。またタイマー式による簡易な注入法も実施した(結果は総合報告書参照)。

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、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、民間検査機関による細菌検査精度管理サーベイにレジオネラを組み込んでもらい、そこに参加形で検討した。

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、昨年に引き続き、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 の病院で行った。

B. 研究方法および材料

1. マンガンイオンを含む浴槽水におけるモノクロラミン消毒効果

1) マンガンイオンの塩素剤に与える影響

マンガンイオンとして硫酸マンガン(Ⅱ)五水和物(関東化学、試薬特級)を使用し、10 mg/L 溶液を調製した。調製した溶液にモノクロラミンまたは比較対照として遊離塩素を系内濃度 3 mg/L となるように添加後、40℃湯浴内に静置させ、一定時間ごとのモノクロラミンと遊離塩素の濃度の推移を、それぞれインドフェノール法、DPD 法で測定した。

(2) マンガンイオンを含む地下水を用いたモノ

クロラミン消毒の事前適合性試験

浴槽水に使用されるマンガンイオン(1.1 mg/L)を含む地下水に、モノクロラミンまたは次亜塩素酸ナトリウムを 3 mg/L となるよう添加して実施した。

(3) 循環式入浴施設(営業施設)における検証試験

過去にレジオネラ症の集団発生を起こした入浴施設で、マンガンイオン(1.1 mg/L)を含む地下水を浴槽水として使用する循環式浴槽において、モノクロラミン消毒の実証試験を行った。浴槽水の消毒効果は、レジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌、抗酸菌、アメーバ検査で確認した。

モノクロラミンやジクロラミンの定量は、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は、HS-GC/MS 法(定量下限値は 0.015mg/L)で定量した。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行った。

また、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(トリクロロメタン、プ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。クロラミン処理により副生される恐れのある N-ニトロソジメチルアミン(NDMA))の定量を行った。

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。

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。

2. 高濃度モノクロラミンによる配管洗浄・殺菌効果

(1) 回流装置を用いた洗浄試験

実験室内に設置した 5 系統の回流装置内の 40℃に温度維持された市水(ブイヨン培地添加)

に、下記の 4 菌種を接種して、バイオフィルムを形成させた後に、終濃度 5, 10, 15, 20 ppm のモノクロラミンで循環洗浄を実施した。経時的 (0, 0.5, 1, 2 および 6 時間目) に観察板を取り出し、表面を拭き取り、一般細菌数、従属栄養細菌数を測定して、観察板表面の洗浄程度を評価した。

- ・ *Enterobacter aerogenes* NBRC 13534
- ・ *Escherichia coli* NBRC 14237
- ・ *Staphylococcus aureus* NBRC 12732
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13736

(2) 実験用循環式モデル浴槽における高濃度モノクロラミンによる配管洗浄試験

自然汚染と無殺菌循環によって循環系内にレジオネラ属菌や一般細菌を増殖させた実験用循環式モデル浴槽において、高濃度モノクロラミン 5, 10 mg/L (終濃度) で 1~2 時間の配管洗浄を実施した。

(3) 循環式入浴施設 (営業施設) における高濃度モノクロラミンによる配管洗浄試験

循環式の営業施設各 3 ヲ所で、約 10mg/L (終濃度) の高濃度モノクロラミンによる配管洗浄を実施した。配管洗浄前後のろ過器の逆洗水やろ材、ヘアキャッチャー接続配管内部の拭き取り検体を採材した。

(4) モノクロラミン消毒時に発生する従属栄養細菌の同定と殺菌方法の検討

循環式浴槽水のモノクロラミン消毒 (終濃度 3%) 時に分離された従属栄養細菌の一部について、26S rDNA (26S rRNA 遺伝子) の部分塩基配列解析を行い同定した。また、これらの分離菌に対するモノクロラミン、遊離塩素、過酸化水素水を用いて殺菌濃度を調べた。

3 DPD 法と電流滴定法による残留塩素濃度の測定

2 公衆浴場施設の温泉浴槽水 6 試料、温泉原水 2 試料。泉質はナトリウム-炭酸水素塩泉および、ナトリウム-塩化物炭酸水素塩泉。浴槽水および源泉は黒褐色透明。

現場で、遊離残留塩素、結合残留塩素、水温、pH を測定した。研究室で、遊離残留塩素、結合残留塩素、レジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌、色度、濁度、pH、アンモニア態窒素、亜硝

酸態窒素、硝酸態窒素を測定した。

残留塩素濃度について、現場検査でポサイドン水質比色検定器ダイヤル型 DP2 (水道機工)、DPD 試薬 (水道機工) および DPD 試薬 (SIBATA) による DPD 法を用いた。研究室では、残留塩素電流滴定器 AT-II 型 (磯村) を用いた。結合残留塩素値は総残留塩素値から遊離残留塩素値を引いて算出した。

4 浴槽水の検査

全国 6 か所の地方衛生研究所において、平成 27 年度に浴用施設やプールから 441 検体の試料を採取し、検査法の検討に用いた。検体の内訳は、浴槽水が 268 検体 (60.8%)、湯口水が 25 検体 (5.7%)、シャワー水が 50 検体 (11.3%)、プール水および採暖槽水が 88 検体 (20.0%)、その他 10 検体 (2.3%) であった。浴槽水の泉質は、温泉が 111 検体 (41.4%)、白湯が 137 検体 (49.3%)、薬湯が 3 検体 (0.7%)、不明が 17 検体 (3.9%) 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 μ m、0.4 μ m) した。ろ過のできなかつ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 α 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 α (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 α 培地にも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 等及びルシパックワイドまたはルシパック Pen (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。

5. 冷却水の菌の多様性と消毒維持管理、空気中のレジオネラ属菌調査

培養法でレジオネラ属菌の生菌不検出であり、遺伝子検査法で陽性となった冷却水 13 試料 (表 1.) についてアメーバ共培養によるレジオネラ属菌の増殖性を調査した。アメーバ共培養は 25 cm² の培養フラスコに *Acanthamoeba* sp. AC3722-12 (環境分離株) を PYGC 培地で培養 (30°C, 4 日間) し、培養フラスコの底一面にアメーバを増殖させ、培養上清を 10 mL の Page' s saline に置換した後、冷却水の 100 倍濃縮液を 0. 1 mL 添加して 30°C で 15 日間培養した。アメーバ共培養 6 日目と 15 日目にサンプリングして培養法 (試料液 0. 1 mL, GVPC 培地, 37°C, 8 日間) および定量 PCR 法 (試料液 50 μL, Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit, タカラバイオ) でレジオネラ属菌を検出した。また、PCR 増幅産物をクローニングして 16S rRNA 遺伝子の一部の塩基配列 (616 bp) を決定することで、PCR で検出したレジオネラ属菌を同定した。

市中の空気中のレジオネラ属菌存在調査では、エアサンプラーとしてコリオリス μ (Bertin 社, フランス) を用いた (図 1.)。コリオリス μ は専用の捕集容器に入れた 15 mL の捕集液 (滅菌脱イオン水) 中に空気中の粒子を捕集する。空気の吸引量は 300 L/min であり、10 分間ないし 20 分間吸引して、捕集液中のレジオネラ属菌を培養法と定量 PCR 法で検査した。培養法による検査は、捕集液を酸による前処理後 0. 1 mL ずつ 5 枚の選択培地に接種して培養しレジオネラ属菌を検出した。定量 PCR 法は、捕集液 2 mL をマイクロチューブに移し、15000 rpm で 10 分間遠心して上清を除き、アルカリ熱抽出法により DNA を抽出した。抽出した DNA は NucleoSpin gDNA Clean-up Kit (タカラバイオ) で精製した。

空気の捕集は、実際に運転している冷却塔 4 基について、冷却塔の内部 (点検口から 0. 5 m) 及び冷却塔の側面約 1 m 付近でのサンプリングとした。また市街地のレジオネラの存在調査のために、市街地の一定範囲内を乗用車で移動しながら、右後部座席の窓から空気を採集した。

循環式モデル冷却塔を設置して、各種殺菌剤を添加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 60 L, 循環水量 180 L/hr, 電気ヒーターにより常時水温を 30°C に維持し、つくば市水を 7 L/day 補給した。以下の 3 種類の殺菌剤で試験を行った。

①遊離塩素: 次亜塩素酸ナトリウム溶液を残留塩素濃度測定計器により制御しつつ添加して、循環水中の遊離塩素濃度を 0. 4 から 1. 0 mg/L に維持。

②遊離臭素: 次亜臭素酸を残留塩素濃度測定計器により制御しつつ添加して、循環水中の遊離臭素濃度を 0. 4 mg/L (asCl₂) に維持。

③結合臭素: 結合臭素剤 (臭素化スルファミン酸) を連続的に添加して、循環水中の全残留濃度を 3 mg/L (asCl₂) に維持。

この運転期間中、無処理期間の設定、残留塩素の変更、休日運転停止などの条件調整を行っている。原則として 1 週間に一度、レジオネラ属菌数、アメーバ数、ATP 濃度、一般細菌数、従属栄養細菌数及び理化学的水質項目を測定した。

レジオネラ属菌の検査は以下の方法で行った。試料水 400 mL を冷却遠心 (6400 × g, 30 min) にて 100 倍に濃縮し、等量の 0. 2 M 酸性リン酸緩衝液 (pH 2. 2) を加えて 10 min 放置後、200 μL を GVPC 培地 (日研生医研) に接種した。37°C のインキュベータで培養し、8 日後に培地上のレジオネラ属菌と判断される集落数を計数した。アメーバ数の測定は、試料水 50 mL を遠心濃縮し、濃縮菌液の全量が大腸菌塗布寒天培地に接種、25°C で 2 週間培養した後、プラーク数を計数した。ATP 濃度は東亜 DKK 社製 ATP TESTER AF-70 を使用して測定した。

6. レジオネラ属菌迅速検査の評価

生菌迅速検査 LC EMA qPCR 法は、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、添付の取扱説明書に従い実施した。ATP 値が 5,000 RLU/10 ml 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 実施後、添付の取扱説明書に記載された方

法でコピー数からCFUに換算した。Cycleave PCRの原理となっている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。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。

LAMP 法として Loopamp レジオネラ検査キット E (LMP661、栄研化学; 16S rRNA 遺伝子を標的にしている) 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。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。いずれも各キットのマニュアルに従い操作を行った。

PALSAR 法は、Probe alternation link self-assembly reaction の略で、16S rRNA を検出する。2種類の DNA 断片(オリゴヌクレオチド・プローブ)を使って、大きな DNA ポリマー(塊)を作る。ポリマーを生成する際に核酸合成酵素が不要であり、一定の温度内(40°Cから 70°Cの範囲)かつ短時間(30秒から 30分)で増幅可能という特長がある。96穴プレート上の DNA プローブに結合させて比色反応で検出する。他の迅速検査法と同様に濃縮検体を用い、特殊な機器が不要で肉眼による判定が可能であり、当日中に結果が判明する方法である。100倍濃縮検体 1 ml を遠心後、上清を除去し、添付の取扱説明書に従い実施した。

7. 外部精度管理

<実施概要>

本年度は、実施母体を日水製薬株式会社とし、公的、民間を問わず全国の検査機関に案内を発信し外部精度管理を実施した。平成 27 年 9 月初旬に日水製薬より「参加募集案内文、参加要件、検査方法」(別紙参照)が示され参加募集が行われた。次に、参加申込者に対し、12月29日付けで詳細な日程がメールにより配信された。平成 28 年 1 月 18 日(月)に試料及び試料送付案内が発送された。回答期限は 2 月 19 日(金) 17 時に指定された。

<参加機関>

全国 189 の検査機関(延べ 192 試料配付)に対し、実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所 68 機関が参加した。

<結果集計と解析>

全参加機関に対する集計・解析は日水製薬が実施し、地方衛生研究所 68 機関については、ワーキンググループ(WG)による集計・解析も実施した。なお WG では、過去 2 年の研究報告と同じ換算値として集計することとした(500ml の滅菌生理食塩水に配付試料をすべて溶かした場合の 100ml 当たりの菌数に換算)。また、各機関の最終菌数は、コロニー数の平均値に換算のための定数を乗じたのち、四捨五入により上から二桁までを有効数字として表示した。本調査での目標値(良好範囲)は、過去 2 年間と同じく「配付試料について、メーカー保証されている 95%信頼区間におけ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、300~9000cfu/100ml を目標値(良好範囲)と設定した。

<検査方法>

本年度は、日水製薬の実施要領に従った。

8. *L. pneumophila* の遺伝子型の解析

日本各地の患者および環境から分離された株について、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、minimum spanning tree (MST) 法による解析(BioNumerics, Applied Maths 社)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*-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。

9. 未記載種の解析

16S rRNA 遺伝子塩基配列配列と、*mip* 遺伝子塩基配列解析のためのプライマーは、Ratcliff RM の既報に従った。一部の菌株については *proA* 遺伝子配列も解析した。得られた塩基配列は、GenBank (NCBI, USA)に対して Blast 検索を行い、相溶性の高い配列を探した。

菌体脂肪酸組成分析は、株式会社テクノスルガ・ラボ (静岡県) に委託して行った。脂肪酸抽出、測定は、Sherlock Microbial Identification System (Version 6.0) (MIDI, DE, USA)の操作マニュアルに従い、データベースとして、Calculation Method CLIN6 およびライブラリ CLIN6 6.20 を用いた。

10. 富山県の不明感染源解明のための環境調査

感染源調査は、公衆浴場の浴用水とシャワー水、河川水を対象とした。浴用水とシャワー水については、対象施設の選択と採水を厚生センター職員に依頼した。河川水については、今年度は富山市内を流れる4河川 (松川、赤江川、いたち川、土川) 5箇所を採水地点とした。

試料は、平成27年9～12月に採取された浴用水51検体とシャワー水34検体である。シャワー水については、温度を40°Cに設定後、約10秒間流出させ、容器に採取した。河川水は、平成27年6、8、12月に採水した15検体である。

浴用水 (500ml)、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, 0.2µm, 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。浴用水、シャワー水は、濃縮、非濃縮検体を検査し、いずれについても、未処理、酸処理 (0.2M KCl-HCl, pH2.2 で等量混合後4分間静置)、加熱処理 (50°C20分ヒートブロックで加熱) を行った。

河川水は、濃縮検体5 mlに、古畑らの報告にしたがって調整したアメーバ培養液 200 µl を添

加後、35°C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 (日水製薬) 2枚にコンラージ棒で広げて、35°C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 (ピオメリュウ) 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 (デンカ生研) 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'-CTCACAACAAGTCA AGCAAC-3' および *lag-R* : 5'-AAACCATACCAA 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 H₂O を加え反応液とした。PCR は95°C 2分、94°C 30秒、57°C 30秒、72°C 1分を30サイクル、72°C 5分で thermal cycler DICE (タカラバイオ) でおこなった。

11. 病院環境における *Legionella* 汚染の実態に関する研究

1) 試料の採取

調査は入浴施設と医療機関において実施した。調査の試料は水試料およびスワブ試料とした。入浴施設では浴槽水、湯口水、蛇口水、シャワー水を水試料として採取し、浴槽壁、蛇口の内側、シャワーヘッドの内側からスワブ試料を採取した。医療機関では浴槽の湯口水、シャワー水、浴室や洗面台等の蛇口水、受水槽水を水試料として採取し、蛇口の内側及びシャワーヘッドの内側からスワブ試料を採取した。水試料は25%チオ硫酸ナトリウム 1.0ml を添加した滅菌容器に原則として500ml を採取した。シャワーや蛇口からの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。水試料の ATP 値の測定は、実験室に搬入後、ルシパック - Pen Aqua (キッコーマン) を用い、ルミテスター PD-20 (キッコーマン) により行った。スワブ試料は、滅菌綿棒で採取部位を拭って採取し、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.2) を滅菌水で 50 倍に希釈した液 (50 倍希釈 PBS) 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。

2) *Legionella* 属菌の分離

水試料は直径 47mm、孔径 0.2 μ m のポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、5ml の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した。スワブ試料は 50 倍希釈 PBS を加えて 5ml とし、十分に攪拌して試料を浮遊させた。試料の浮遊液は 0.5ml を 50 $^{\circ}$ C、20 分の加熱処理を行った。別の 0.5ml に同量の pH2.2 緩衝液を加え、4 分間酸処理した。未処理の試料及び処理後の浮遊液を 50 倍希釈 PBS で 10 倍希釈し、原液と 10 倍および 100 倍希釈液の各 100 μ l を MWY 寒天平板培地 (Oxoid) 及び GVPC 寒天平板培地 (日研生物医学研究所) に塗抹し、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。*Legionella* 属菌を疑う集落を BCYE α 寒天平板培地 (Oxoid) に転培し、性状により鑑別を行った。

3) LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出

LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) により行った。水試料を 5ml に濃縮した試料およびスワブ試料を 50 倍希釈 PBS に浮遊させた試料に対して、キット添付の説明書に従って実施した。

4) *Legionella* 属菌の同定

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。

5) 従属栄養細菌数

水試料を 50 倍希釈 PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の試料の 1.0ml を R2A 寒天培地 (BD) に接種し、混釈培養法により 25 $^{\circ}$ C で 7 日

間培養した。培養後、集落数を計数した。

12. アメーバのレジオネラ受容体の解析

L. pneumophila SG1 臨床分離株 (80-045 株 Lp と省略) を用いた。菌株は BCYE α 培地にて 30 $^{\circ}$ C で培養し実験に供した。アメーバ株として *A. castellanii* ATCC30010 株 (AC と省略) を用いた。PYGC 培地を用い 30 $^{\circ}$ C で培養した。培地は 2-3 日毎に交換し常に新鮮な栄養体を実験に供した。

単糖としてペントース (五単糖 C5) のアラビノース、二糖のセルビオース (グルコース 2 分子)、また多糖としてシクロデキストリン (グルコース 多糖)、グリコサミノグリカン (糖鎖構造) としてヘパリン (ヘパリン Na) を用いた。レクチンは Con A, WGA ならびに RCA120 (Biotinylated Lectin Kit I&II, Vector Laboratory, USA) を用いた。

AC に対する Lp 感染試験では、PYGC で培養した AC をフラスコより剥離し、10 x AS で遠心洗浄を 2 回繰り返す、10 x AS で 1 x 10⁶/ml に細胞浮遊液を調整した。24 ウェルマイクロプレートウェル内に浮遊液を 0.5ml 入れ、1 時間培養しアメーバをプレートに接着させた。

1) アメーバ前処理条件での感染

アメーバへの糖質あるいはレクチンの影響を見るために、これらの物質を含むバッファーで前培養を行った。方法は 10 x AS で試験濃度に希釈した糖質あるいはレクチン溶液を、アメーバの接着するマイクロプレートの 10 x AS を吸引除去後、0.2ml 加え 1 時間 30 $^{\circ}$ C で培養した。その後 10 x AS で 0.10D に希釈した Lp 浮遊液を 20 μ l 加え静かに混和し菌を感染させた。なお 10 x AS を用いた条件を対照実験として行った。

2) レジオネラ属菌前処理条件での感染

レジオネラ属菌への糖質あるいはレクチンの影響を見るためには、10 x AS で 0.10D に調整した Lp に糖質あるいはレクチンを試験濃度となるように加え 1 時間 30 $^{\circ}$ C で培養した。アメーバの接着するマイクロプレートの 10 x AS を吸引除去後、新たに 10 x AS 0.2ml を加え、そこに上述の前処理した Lp 浮遊液 20 μ l を加え静かに混和した。なお、10 x AS を用いた条件を対照実験として行った。

3) シアル酸除去試験

糖鎖成分として一般的なシアル酸は、糖鎖とレクチンの結合に阻害的な作用をもつことが知られていることから、レジオネラ属菌のアメーバ感染におけるその影響を調べた。シアル酸除去にはシ

アリダーゼ（ノイラミニダーゼ、ロッシュ製）を、クエン酸バッファー（10mM, pH5.8）で0.5U/mlとなるように調整し、この中で0.10Dの菌を37°Cで30分間処理した。酵素なしのクエン酸バッファーのみの処理を対照実験とした。遠心洗浄によりバッファーを10xASに置換後、先述の2) レジオネラ属菌前処理条件での感染、と同様にしてアメーバに感染させた。

上記において感染させた菌は3時間後に、50 μ g/mlとなるようにgentamycinを添加し、未感染のアメーバ外にある菌を不活化した。培養を継続し、感染18時間後にプレート底面全体を氷水上につけアメーバを剥離し、アメーバ浮遊液を回収、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後、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、その数を測定し感染率を求めた。なお細胞はランダムに約500個を調べた。

5. アメーバを利用したレジオネラ属菌増殖法

感染実験の準備と同様にして24ウエルマイクロプレートにACを接着後させた。10xASを吸引除去後、10xASで10倍希釈系列で調整したLp浮遊液を0.1ml加え25°Cで6時間培養し、その後0.2mlの10xASを加えて培養を継続。2日後にカルチャーの一部（50-100 μ l）を回収し、BCYE α 培地に接種し、感染による菌増殖の有無を確認した。

13. 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、試験中は浴槽入口に本消毒を実施している旨を掲示し、入浴者へ周知した。

C. 研究結果および考察

1. マンガンイオンを含む浴槽水におけるモノクロラミン消毒効果

モノクロラミン（3mg/L添加）は、マンガンイオン（10mg/L）溶液中に、40°C、5時間経過後も2.7mg/L残存しており、安定に残存する傾向が見られた。一方、遊離塩素（3mg/L添加）を添加した系では40°C、5時間経過後にほぼ完全

に遊離塩素は消失し、モノクロラミンと比べて不安定だった。また、外観は、モノクロラミン3mg/Lを添加した系では塩素剤未添加とほぼ変わらなかったが、遊離塩素を添加した系では徐々にマンガニオンの酸化によると思われる茶色へ変色が見られた。

マンガンイオン（1.1mg/L）を含む地下水に添加されたモノクロラミンは安定に維持されるのに対し、遊離塩素は添加直後に低下し、極めて不安定であった（図1）。外観色調は、遊離塩素添加系では経時で徐々に薄黄色～薄褐色へと変化し、臭気も確認されたが、モノクロラミン添加系では、外観色調に変化はなく（図1）、臭気も認められなかった。急激な遊離塩素濃度の低下と臭気から考えると、マンガンイオンに加えて、アンモニア態窒素が含まれる可能性が示唆された。

マンガンイオン（1.1mg/L）を含む地下水を使用した循環式浴槽におけるモノクロラミン消毒検証試験の結果を表1に示した。レジオネラ感染リスクが高いと言われる気泡発生装置使用の浴槽水から、レジオネラやアメーバは検出されなかった。また、塩素消毒臭の原因であるトリクロラミンや、消毒副生成物のトリハロメタン類の生成はなく、N-ニトロソジメチルアミン（NDMA）の生成量は遊離塩素管理時とかわらなかった。また、従属栄養細菌数が2週目以降に高く、従来どおり週1回の完全換水と清掃は必要と考えられた。

実験室内で事前に源泉水を使ったモノクロラミンの適合性試験を行い、源泉水におけるモノクロラミン濃度の安定性を調べ、本消毒方法の導入の可否を判断している。温泉の泉質は源泉ごとに異なる可能性が高いため、営業施設へのモノクロラミン消毒導入の際には、源泉水を使ったモノクロラミンの事前適合性試験が活用できると思われる。

2. 高濃度モノクロラミンによる配管洗浄・殺菌効果

回流装置を用いた洗浄試験で、バイオフィルムを形成した観察板の拭き取り検体で、モノクロラミン5mg/L洗浄の0.5時間後に10³以上の菌数の低下が認められた。

実験用循環式モデル浴槽で実施したモノクロラミン5、10mg/L（終濃度）による1～2時間

の配管洗浄前後の浴槽水、ろ過器内ろ材および配管、ヘアキャッチャー網の拭き取り検体のレジオネラ属菌数、一般細菌数を検討した。洗浄後の検体からはレジオネラ属菌は検出されず、一般細菌数も洗浄後に大きく減少した。

2 営業施設で行った高濃度モノクロラミンによる配管洗浄前後のろ過器の逆流水、ヘアキャッチャー網の拭き取りの成績と、ヘアキャッチャー接続配管内部の拭き取り検体の成績を比較したところ、洗浄後の検体からはレジオネラ属菌数、アメーバは検出されず、一般細菌数も大きく減少していた。しかしながら、完全な不検出とはならず、簡易な洗浄効果に留まることには注意を要することが必要であると考えられた。

公衆浴場法等の条例で週 1 回以上の実施が求められている循環式浴槽のろ過器・配管洗浄方法として、遊離塩素管理時に使用されている高濃度遊離塩素は、モノクロラミン管理時には不連続点処理や事前換水が必要となり、薬剤コストや所要時間の面から現場向きではない。そこで、モノクロラミンによる配管洗浄等の方法（適正濃度及び時間）を検討した。実験室内の回流装置試験→プラント（循環式モデル浴槽）試験→現場施設での実証試験という手順で試験の効率化を図るとともに、安全性の確保を考慮しながら試験データを作成し、モノクロラミン濃度（10 mg/L 以上）と処理時間（1 時間以上）という配管洗浄の条件を決定できた。

モノクロラミン消毒時に浴槽水から分離された従属栄養細菌の一部は、部分塩基配列解析の結果から、*Mycobacterium phlei* と同定された。この菌株は約 15 mg/L 濃度のモノクロラミンの 30 分間感作で殺菌されると推察された（表 2）。従属栄養細菌の減少には 5 mg/L 以上のモノクロラミンで 30 分間の感作が必要であった。モノクロラミン濃度 10 mg/L、1 時間の配管洗浄で十分な殺菌・洗浄効果が得られない場合は処理時間を延長するなどの対応が必要と思われる。また、ろ過器の消毒をモノクロラミン直接注入により実施する場合には 5 mg/L 以上、貯湯槽消毒では 50～100 mg/L を内壁に直接噴霧する方法が適当であると示唆された（表 2）。

なお、モノクロラミン消毒後は、水質汚濁防止

法による規制を鑑み、チオ硫酸ナトリウム等で中和した後排水することが望ましい。

3 DPD 法と電流滴定法による残留塩素濃度の測定

公衆浴場の浴槽水は塩素等で消毒が行われており、日常の残留塩素濃度管理はレジオネラ症防止の観点から非常に重要である。浴場施設の管理者は毎日浴槽水の残留塩素濃度を測定して、適正な塩素濃度に調節している。残留塩素の測定には、DPD 試薬による比色法が用いられることが多い。この方法は簡便で感度が高い上、現場で行うことができることから、行政の立ち入り調査時にもこの方法を用いている。しかし、この方法は発色の桃色の色調変化が見にくく、着色を呈している温泉等では DPD 試薬の比色による測定が難しい。また、測定対象水がアンモニア態窒素を高濃度で含有する場合、塩素剤と反応して高濃度の結合残留塩素を生じ、短時間に DPD 試薬と反応して桃色を呈するため、遊離残留塩素と結合残留塩素の区別がつきづらいなど、問題が多い。そこで、着色している温泉試料を対象に、電流滴定法の有効性を、通常現場で使用している DPD 試薬と比較した。

その結果、通常使用している DPD 試薬では判断できなかった着色試料の残留塩素を、電流滴定法では遊離残留塩素と結合残留塩素に区別して求めることが可能であった。また、アンモニア態窒素が高い濃度で含まれる試料においては、DPD 試薬では遊離残留塩素として測定されていた残留塩素を、結合残留塩素として検出することが出来た。

4. 冷却水の菌の多様性と消毒維持管理、空気中のレジオネラ属菌調査

冷却水は浴槽水と同様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。我が国でも建築物における空調用冷却塔が夏季に多く稼働しており、レジオネラ症感染のリスクがある。冷却水起因のレジオネラ症防止に資するために、冷却水におけるレジオネラ汚染の実態把握、市中の空気中のレジオネラ存在調査の検討及び、冷却水のレジオネラ属菌を抑制するための消毒、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。

前年度の調査で冷却水中のレジオネラ属菌クローンライブラリー解析の結果、菌種の多様性と、難培養性のレジオネラ属菌の存在を示唆した。今年度は、難培養性レジオネラ属菌をアメーバ共培養と定量 PCR の組み合わせで検出した。培養法でレジオネラ属菌が不検出、PCR 法でレジオネラ属菌の DNA が検出された冷却水 13 試料を調査し、5 試料でレジオネラ属菌の DNA の増加を認めた。クローン解析の結果、*Legionella drozanskii* 等の難培養性レジオネラ属菌が検出された。このことより、実冷却水では従来の培養法で検出されないレジオネラ属菌が存在しており、その存在は PCR 検査により認識することが出来ることがわかる。ただし、培養法でも温度を 30℃と 5%CO₂を組み合わせることで培養することにより菌の検出率の改善が期待される。

調査した 4 基の冷却塔循環水のレジオネラ属菌数を表 4. に示す。CT-A、B、C からはレジオネラ属菌の生菌、遺伝子ともに検出したが、CT-D からはレジオネラ属菌の生菌は検出しなかった。サイクロン式エアサンプラー(コリオリス μ 、図 2)による空気中のレジオネラ属菌の定量的測定法を確立した。冷却塔の内部や近傍では空気中にレジオネラ属菌が存在し、冷却水中のレジオネラ属菌の遺伝子量と比較すると、上部のファンが稼働中の CT-A と CT-C では、水中の遺伝子量が多い CT-C の方が空気中の遺伝子量が多かった。上部ファンが停止中の CT-B は、冷却水中のレジオネラ属菌の遺伝子量が最も高かったが、空気中のレジオネラ属菌の遺伝子量は比較的少なかった。冷却水から生菌が検出されず遺伝子量も少なかった CT-D の空気からは、極少量の遺伝子が検出された(図 3)。捕集液からの定量 PCR によるレジオネラ属菌は吸引した空気 1 m³中のレジオネラ属菌遺伝子のコピー数に換算して示す。また、各捕集液から培養法によりレジオネラ属菌を検出した結果、CT-A 内部から 25 CFU/m³、CT-C 内部から 5 CFU/m³検出しており、冷却水中のレジオネラ属菌数が多い CT-A の方が空気中のレジオネラ属菌数が多かった。一方、CT-B 内部から生菌は検出しなかった。これは、CT-B は上部のファンが停止しておりエアロゾルの発生が少なく、レジオネラ属菌の飛散が少なかったものと推察する。

これらの結果は、稼働中の冷却塔では冷却水のレジオネラ属菌汚染量と飛散するレジオネラ属菌の量に相関があることを示唆する。

また、市街地の空気を採取して調査した結果、レジオネラ属菌の遺伝子が検出され、ビルが多い繁華街や土埃汚染が多い地域で、検出される遺伝子量が多い傾向であった(図 4)。

モデル冷却塔により、前年度に引き続き各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果を調査した。結合臭素(全塩素 3mg/L)処理では 10³~10⁴CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出され、レジオネラ属菌の抑制効果は無かった。遊離塩素処理は、運転停止による残留塩素の消失、pH が 8.7 でアメーバが増殖した結果、レジオネラ属菌が検出された。遊離臭素処理においてもレジオネラが検出されており、遊離塩素と遊離臭素処理では、pH 条件、運転休止の影響など維持管理上の注意点が明確になった。

5. 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、Liquid-culture ethidium-monoazide (LC EMA) qPCR 法を評価を行った。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 法と rRNA を検出する PALSAR 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。浴槽水などの実試料 441 検体(表 5)を用い、平板培養の結果は表 6 のとおり、24.5% (108/441) の検体から 10 CFU/100ml 以上のレジオネラ属菌(表 7)が検出された。

342 検体について LC EMA qPCR 法を実施した。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 89.2% (74/83 検体)、特異度は 80.3% (208/259 検体) 菌数(定量値)の相関は R² = 0.6874 であり、平板培養法と高い相関を示した(表 9、図 5)。

286 検体について LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 84.0% (68/81 検体)、特異度は 76.6% (157/205 検体) であり(表 9)、LC EMA qPCR 法の感度(89.2%)、特異度(80.3%)

よりもやや低かったものの、全体として平板培養法と相関している方法であると考えられた。

268 検体について PALSAR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 47.0% (39/83 検体)、特異度は 76.8% (142/185 検体) であり、LC EMA qPCR 法、LAMP 法と比較し、特異度は同等であったが、感度は低かった (表 8, 表 9)。異なる菌種や血清群 8 株を用いた感度実験に顕著な差はなかったため、実検体で検出された菌種に対する特異性が低かったわけではないと考えられる。一部の濃縮検体については、測定まで冷蔵または -20°C で保存していた。保存状態が RNA の検出に影響するかどうか確認する必要があるが、PALSAR 法の平板培養法に対する感度が不足している可能性は考えられる。検体の濃縮率を上げて 1 反応あたり用いる検水量を多くすることで感度が向上するかについても、検討する必要がある。

今年度の結果から、LC EMA qPCR 法 (カットオフ値 1 CFU/100 ml 相当) および LAMP 法は、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。

6. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み

1) 精度管理

平成 27 年度は、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。③BCYE α 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)、以上を念頭に、実施母体を日水製薬株式会社とし、公的、民間を問わず全国の検査機関に対し外部精度管理の実施を試みた。全国の結果集計・解析は日水製薬で行い、3 月 30 日、検査実施者が専用ホームページから個別の ID によりログインし、解析結果をダウンロードすることが可能となる。

一方、WG が集計した地方衛生研究所 68 機関の全判定結果を表 10 に示した。300~9000cfu/100ml の目標値 (良好範囲) を報告した機関は、非濃縮試料では 68 機関中 62 機関 (91%)、ろ過濃縮試料では 61 機関中 38 機関 (62%)、遠心濃縮試料では 22 機関中 8 機関 (36%) であった。濃縮試料ではろ過濃縮

による判定結果が良い傾向にあった。WG ではこれまでも検査者間差が少なく、回収率が比較的安定しているろ過濃縮法を推奨してきている。非濃縮及び濃縮試料 (ろ過および遠心濃縮両方を実施していた場合そのどちらか) とともに目標値 (良好範囲) を報告した機関を示したのは 42 機関 (62%) であった。非濃縮及び 2 種類の濃縮試料すべてに対応していたのは 15 機関で、そのうち全試料目標値 (良好範囲) を報告した機関は 4 機関 (27%) であった。

非濃縮試料において、目標値 (良好範囲) を報告していたが 1000cfu/100ml 未満の菌数を報告していた 10 機関については、配付試料の製品保証精度及び北海道衛研で 7 ボールを調べた結果等から、検査工程を再確認することが望ましいと思われる。レジオネラ属菌検査においては、コンラージや濃縮時のいくつかの操作等が結果へ影響し、菌数の減少に繋がる傾向にあるので注意が必要である。また今回非濃縮試料で目標値 (良好範囲) を報告できなかった 6 機関は、濃縮試料についても目標値 (良好範囲) を報告できていなかった。さらに、このうちの 2 機関 (うち 1 機関は日常的に検査を実施していない) は、今回の配付試料からレジオネラ属菌を検出できていなかった。これらの機関は、試料の混ぜ方、培地への接種量、コンラージの力加減、濃縮操作等、全検査工程を確認し検証する必要があると思われる。また、可能であれば、適当な機関での研修を視野に入れた対応が必要と思われた。

2) 標準的検査法および研修システム

標準的検査法については、以下の考え方を柱に検討してきたところである。①ISO 11731:1998(E) に準じた方法。②検査結果のバラツキを無くす方法。③分離培地に発育したレジオネラを見逃さないようにする。つまり、ある精度以上を確保した基準となる方法、基本となる考え方を統一した方法、と定義することができる。今回の外部精度管理結果から、非濃縮試料の検査実施の重要性が改めて示された。濃縮法については、WG では、検査者間差が少なく、回収率が比較的安定しているろ過濃縮法を推奨してきた。一方で、この方法は、多検体処理や夾雑物の多い検体に対しては課題が多い。このような状況においては、遠心濃縮法での対応が扱いやすい場合がある。レジオネラ症防止指針-第3版-では、培養法の基本を JIS K 0350-50-10:2006 に準拠してお

り、JIS 法では回収率を高めた遠心濃縮方法が提示されている。WG でも遠心濃縮を行う場合においては、この方法を推奨している。なお、現在 ISO でも本検査法の改訂作業が進められていることを受け、今後は WG 推奨法との調整を行い、「公衆浴場における衛生等管理要領」内で提示したいと考える。

今年度は、研修会マニュアル作成に向けた検討を行ってきた(黒木分担研究者の報告参照:平成 27 年度)。今後は、各検査機関で適切な内部精度管理を行えるよう、より具体的な注意点等を提示した研修会を実施することが重要と思われる。

7. パルサー法の感度に関する検討

パルサー法は、2 種類の DNA 断片 (オリゴヌクレオチド・プローブ) を使って、大きな DNA ポリマー (塊) を作る。ポリマーを生成する際に核酸合成酵素が不要であり、一定の温度内 (40°C から 70°C の範囲) かつ短時間 (30 秒から 30 分) で増幅可能な検査法である (図 6)。以下のように、検体を送付して測定する場合、当初の方法①では感度がよくなかったので、方法②に変更した。

(方法①) 濃縮検体 18 検体について、1ml を 12,000rpm(13,000×g) で 5 分遠心後、上清を全て除いたものを冷蔵送付し、2 日後に株式会社ファスマックにおいて溶菌液を調製して測定を実施した。

(方法②) 濃縮検体 32 検体について、次の方法で調製した溶菌液を冷凍送付したものをを用いて、株式会社ファスマックにおいて測定を実施した。溶菌液は、濃縮検体 1ml を 12,000rpm(13,000×g) で 10 分遠心後、70 μ l 残して上清を除去し、30 μ l の変性液を加えて、37°C 15 分溶菌し、その後 10 μ l の中和液を加えて調製した。

方法①、方法②とも濃縮検体 1 検体につき 2 回溶菌液を調製して測定を行った (方法①の 1 検体は 1 回のみ)。

濃縮検体 1 検体につき 2 回測定を行い、1 回でも陽性となった場合は、その結果を採用した。

方法①について、18 検体中培養法で (+) となった 8 検体のうち、半数以上の 5 検体がパルサー (-) となった (表 11-1)。その培養菌数は 50cfu/100ml から 1500cfu/100ml であった。

方法②について実施した結果、32 検体中、培

養法、パルサー法ともに (+) となったのは 13 検体、培養法 (-) パルサー (+) となったのは 5 検体、培養 (+) パルサー (-) の不一致の結果となったのは 4 検体であった (表 11-2)。不一致の結果となった 4 検体は、2 施設から採取した浴槽水及び湯口水各 2 検体であり、40cfu/100ml から 50cfu/100ml のレジオネラ属菌が検出された。その 4 検体について、非濃縮検体を用いてろ過したフィルターから直接溶菌する方法で測定したところ、1 施設 2 検体についてはパルサー (+) となったが、もう 1 施設 2 検体についてはパルサー (-) であった。後者の 2 検体から分離されたレジオネラ属菌は、*L. pneumophila*、*L. quinlivanii*、及び *L. rubrilucens* であり、分離された全ての株において、比色系パルサー法のプローブと 100% マッチしていることを確認した。

比色系パルサー法については、方法①で実施した不安定な結果は、上清除去時にロスが生じたこと、ターゲットが RNA であるために壊れやすいことが理由として考えられた。そのため、濃縮検体をすぐに溶菌処理した方法②で実施したところ、5cfu/100ml といったレジオネラ属菌数の少ない検体においても感度良く検出できた。しかし、培養法 (+) パルサー (-) となる検体も存在し、泉質など菌種以外の要因が検出に影響することが考えられた。LAMP 法とともに、今後、事例を積み重ねて検証していく必要がある。

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別

MST 解析により、*L. pneumophila* 血清群 1 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る。昨年度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 67 株は、表 12 の通りで、血清群 1 が 61 株、血清群 3、4、6、8、9、13 が各 1 株だった。感染源が、浴槽水と推定・確定されている例は 28 例 (42%) だった。SBT 法による遺伝子解析を行い、血清群 1 株については、MST 解析により、どのグループに属するか決定した。

推定感染源からの環境分離株と PFGE が一致している菌株は 6 株あった。4 例は浴槽水分離株で、1 例は冷却塔水、1 例は散水ホースによる 2011 年に分離された菌株である。浴槽水が感染源だった 4 事例のうち、3 事例の菌株は、浴槽水分離株が多い B グループに属していた。1 事例の菌株は土壌からの分離株が多い S1 グループに属する ST23 だったが、ST23 は、今までの入浴施設における集団感染事例の起因菌として最も多い遺伝子型であることが知られている。冷却塔水による感染事例は ST1 (冷却塔水分離株が多い C1 グループに属する) の菌株によるものであった。庭の散水ホースによる感染事例の菌株は S1 グループに属していた。今年度も昨年度と同数の 6 例の土壌による感染の可能性が推定されている。そのうち、血清群 1 株が起因菌であったものは 5 例あり、すべて S グループに属していた。

平成 23 年から平成 27 年までに川崎市健康安全研究所に搬入された冷却塔水及び浴槽水等から分離された *Legionella pneumophila* SG1 計 31 株を遺伝子型別し国内分離株のグループ分けを行った。31 株は新規 ST である 3 種を含む 15 種の ST に分類された。ST2075、ST2076 及び ST2077 についてはデータベースに登録がなかったタイプであったため新規に登録した。今回分離された 31 株中 23 株、15 種の ST のうち 8 種は国内外で臨床分離株として報告されている ST であり、当該施設がレジオネラ症の原因施設となりうることが示された。由来環境別においては、冷却塔水由来の 12 株はすべて ST1 (C1) であった。浴槽水由来の 13 株は 12 種の ST に分類され、同一施設の浴槽拭取り由来株は 2 株とも ST1 であった。浴槽水由来株は B1 及び B2 に含まれる株が多かったが、ST1151 (N) や ST48 (S2) も分離された。採暖槽水由来 4 株は ST48 (S2)、ST384 (S1)、ST552 (B2) 及び ST2076 (B2) であり、さまざまなグループに分布した。今回 2 検体で分離されている ST48 については、検体を採取した施設は別の地域にあり、特に関係性は見られなかった。過去にも別施設から ST48 が検出されており、川崎市内において環境中に広く分布している ST である可能性が示唆された。また、ST552 においても 2 施設で分離されているが、同様に施設の関係性は特

になかった。しかし、同一施設で過去にも ST552 が検出されており、この施設においては洗浄不足か汚染源が存在する可能性が示唆された。採暖槽水 No. 25 から検出された ST384 は患者から分離されることが多く、川崎市内において過去に患者から同一の ST が分離されており注意すべき ST であると考えられる。

9. 未記載種の解析

菌体脂肪酸組成を分析し、データベースと照合したところ、いずれの菌株も既存種のレジオネラ属菌と一致しなかった。さらに、菌体脂肪酸組成の類似度から系統樹を作成した (図 7)。

16S rRNA 遺伝子塩基配列と *mip* 遺伝子塩基配列の結果から、NIIB0383、NIIB0410、NIIB2330、NIIB2331、NIIB2358、NIIB3046 は 1 未記載種を形成していると考えられた (表 13) が、菌体脂肪酸組成の類似度からも、この 6 菌株は同一種の可能性が高いと考えられた。

NIIB2652 と NIIB2888 は、*mip* 遺伝子が増幅せず、解析ができなかった。16S rRNA 遺伝子塩基配列は互いに 99%以上の相同性を示したが、*proA* 遺伝子塩基配列は 5.4%異なっており、菌体脂肪酸組成も異なっていた (図 7) ため、別種であることが分かった。

NIIB2556 と NIIB2557 は、16S rRNA、*mip*、*proA* 遺伝子塩基配列が同一だったにも関わらず、菌体脂肪酸菌体脂肪酸組成分析の結果からは、別種であると考えられた。

NIIB0236 は *mip* 遺伝子塩基配列が *L. sp.* D4585 と、16S rRNA 遺伝子塩基配列が *L. sp.* 8207 とそれぞれ一致し、菌体脂肪酸組成は既存種と一致するものはなかった。

NIIB1169 の 16S rRNA 遺伝子塩基配列は *L. sp.* D3923 と 98.8%の相同性があったが、*mip* 遺伝子は *L. sp.* D3923 との相同性は見られず、新規の配列であった (表 13)。

NIIB2131 の 16S rRNA、*mip*、*proA* 遺伝子塩基配列はともに *L. sp.* 99-113 と一致した。NIIB2558 の 16S rRNA および *mip* 遺伝子塩基配列は、2015 年に新種として登録された *Legionella norrandica* と一致した。NIIB3108 の 16S rRNA 遺伝子塩基配列は、*L. sp.* L-29 の配列と一致した。

10. 富山県の不明感染源解明のための環境調査