

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、浴用水のほかに感染源を探求するため、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平成 18 年度から継続している浴用水に加えて、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シャワー水の調査を始めた平成 24 年からの 4 年間でもっとも低かった。また、シャワー水で陽性となった 7 検体のうち、5 検体は井戸水、2 検体は水道水で、昨年同様、井戸水での検出率が高かった。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。

今年度は浴用水とシャワー水から分離された、もしくは厚生センターで分離された *L. pneumophila* SG1 の ST と *lag-1* 遺伝子の保有状況について調べた。調査した 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。*lag-1* 遺伝子について、本遺伝子を保有したのは 7 株 (50.0%) であった。2011~2015 年の 5 年間に浴用水から分離された *lag-1* 遺伝子を保有する *L. pneumophila* SG1 の検出状況は、*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 (表 14)。この結果は他の 1 県と比べ、高い傾向であった。

本年度の調査結果からレジオネラ症と河川水の関連性は明らかにはならなかった。しかしながら、全ての調査地点で *Legionella* 属菌が分離されたこともあり、継続して調査する必要があると思われる。また、浴用水やシャワー水から分離される *L. pneumophila* SG1 について、*lag-1* 保有株に注目した調査が必要であると思われる。

11. 地域特異的な感染源不明クラスターに関する調査

岡山県環境保健センターがレジオネラレファレンスセンター活動の一環で平成 19 年より収集してきた患者由来株は 38 株となり、その多くは Lp SG1 と SG3 が占めた。このうち、Lp SG1(ST609 及び ST1077) (図 8) と Lp SG3(ST93)

は、いずれも本県に地域特異的に検出された菌株で、これらの感染源究明に向けて、環境水等の調査を実施してきた。しかしながら、現在までのところ、感染源の究明には至っていない。

Lp SG3 については、患者由来株 9 株すべてが ST93 で同じ PFGE パターンを示したが、患者の住所や感染時期は異なっており、疫学的な共通性も見られなかったことから、本菌が広範囲に多様な検体を汚染している可能性が、危惧された。今まで実施した浴槽水の調査では、県下の広範囲な地域の施設で採水した多数の検体からレジオネラを分離し、併せて保健所等で分離された菌株も収集して、このうちの Lp SG3 株計 161 株について、遺伝子解析を実施した。しかし、患者と同一の株は見つからなかったことから、浴槽水における本菌の汚染は、かなり低いものと思われた。Lp SG1(ST609 及び ST1077)についても、現在までの解析結果では、Lp SG3(ST93)と同様に、同じ ST の株は環境検体から検出されていない。このことから、これらの菌株の感染源究明のためには、今まであまり検査をしていない噴水や人口滝などの修景水等についても、積極的な調査が必要と考えていた。MST 解析の結果でも、ST609 は感染源不明の Group-U に属し、浴槽水や冷却塔水等に広く分布している ST の菌株とは、異なっていた。しかしながら、実際の調査の実施に際しては、各施設や設備ごとに管理者が異なっているため、それぞれ個別に許可が必要で、加えて許可の可否も依頼してみなければ不明であることから、調査は実施できなかった。

ところが、2015 年 12 月にスペインでバス停近くの噴水からレジオネラが検出され、多数のレジオネラ症患者を出す事例が発生した。このことから、修景水等の衛生管理の重要性が改めて示唆され、今後これらの汚染実態を把握するための行政的な対応が、必要であると思われた。一方、本年度実施した Lp SG1 の *lag-1* 保有については、調査した患者由来の 19 株中 16 株(84.2%)が保有していた。*lag-1* については病原性との関連が指摘されており、調査の結果でも高率に保有していたが、*lag-1* を保有していなかった菌株が分離された患者でも、その症状が比較的重篤な場合も見られることから、より多くの事例についての検討が

必要であると思われた。

12. 医療機関における *Legionella* 汚染の実態に関する研究

神奈川県内の3か所の医療機関（D、E、F）において調査を実施した。医療機関での試料の採取は平成27年10月26日から平成27年11月18日に行った。調査の対象とした医療機関は200床以上を有し、主要診療科を設置している。

今回の調査では3か所の医療機関を対象にして浴室の浴槽と付随設備、給水系におけるレジオネラ属菌の汚染状況を調べたところ、医療機関により差があるが、高率にレジオネラ属菌、特に *L. pneumophila* に汚染されている実態が明らかとなった（表15）。医療機関Fでは他の2医療機関と比較して汚染率が低率であった。この医療機関の水試料の遊離残留塩素濃度の平均は0.23mg/L、範囲は0.14～0.56mg/Lであったが、レジオネラ属菌が検出されたのは遊離残留塩素濃度が0.2mg/L未満の水試料であった。これに対して他の2医療機関の遊離残留塩素濃度は平均と範囲がそれぞれ0.09mg/L及び0.05mg/L、0.01～0.54mg/L及び0.01～0.11mg/Lと低かった。この結果から、給水系における遊離残留塩素濃度がレジオネラ属菌の汚染と関連していることが示唆された。そこで、レジオネラ属菌の汚染を防ぐ対策として、医療機関において独自に塩素を給水系に添加して遊離残留塩素濃度を0.2mg/L以上にすることを今後検討する必要があると考えられる。

13. アメーバのレジオネラ受容体の解析

L. pneumophila SG1のアメーバ感染率に基づく定量的な解析を行い、1) ConA とセルビオオスの試験結果から グルコース Glc 残基が、2) WGA とヘパリンの試験結果から N アセチルグルコサミン GlcNAc 残基が、Lp のアメーバ感染初期に関与していること、さらに3) ConA とヘパリンには菌の感染を促進する効果があること、が示された。また受容体反応においては阻害の効果が見られるのが一般的と考えられるが、ConA やヘパリンなどが促進的效果を示したことは、これまで報告はみられず極めて興味深い結果となった。

レクチンにはオプソニン効果として病原体の食能を向上させる効果があることが知られ、ConA にはそのような効果がある可能性がある。この点は臨床的にみると重要であり、ヒト体内にレジオ

ネラ属菌のマクロファージ等への取り込みを促進させるような物質が存在するかもしれないことを意味する。実際に肺胞での結核菌取り込みにこのようなメカニズムが働いていることが最近知られている。一方ヘパリンにも受容体反応を保護、促進させる作用があると言われているが、今回の研究からは恐らくヘパリンはアメーバ側に作用し、アメーバ表面全体がその主要成分である GlcNAc 残基でコーティングされるような形で、菌の接着機会を大幅に増えたことが促進効果の理由ではないかと推察される。GlcNAc を結合糖とする WGA がアメーバ側に作用して感染阻害的に働くことを合わせると、アメーバの GlcNAc 残基が主要な感染受容体分子として働いていることが予想され、少なくとも GlcNAc は感染をコントロールする標的分子として考えることができる。

一方、シアル酸は糖鎖の最先端部に付加され、糖鎖反応を制御すると考えられているものであるが、その酵素学的除去処理が菌の感染性向上に作用したことは、シアル酸で菌側の受容体関与分子が生理的にマスクされていることを示唆している。おそらくは GlcNAc 残基と結合性を有するタンパク（レクチンの物質）などが菌側にはあるものの、シアル酸でマスクされている可能性が考えられる。菌側の感染性に影響する分子としては、シアル酸も重要な存在ではないかと考えられ、これが培養条件で変化するかどうかなど検証する必要があると思われる。

また本研究では、低濃度でかつ発育性が低下したレジオネラ属菌を含む試料から、アメーバを増殖装置として菌を分離するアメーバ培養法を検討した。BCYE α 培地での発育能力が低下していることが想定される菌において、おそらくは同時にアメーバ感染性が低下するためであろうと考えられるが、単にアメーバと共培養するだけではアメーバの培養装置としての効果は得にくいことが示された。しかし、本研究で感染促進効果が明らかとなったヘパリンを利用することで、菌をより効率的に増幅させる可能性が示され、難培養性とされる菌の検出にアメーバが有用である可能性が示された。

D. 結論

循環式浴槽水のモノクロラミン消毒は、遊離塩素消毒が難しいアルカリ泉や、アンモニア態窒素、臭化物イオン、鉄イオンなどを含む広範囲な泉質

の温泉で、効果的に使用できることがわかった。また、マンガンイオンを含む浴槽水についてもモノクロラミン消毒が有効であることが実証された。

浴槽水のモノクロラミン管理時に必要な配管洗浄の方法も確立されたことから、今後、全国の地方自治体の公衆浴場法施行条例等へのモノクロラミン消毒法の採用が期待される。

着色した水の残留塩素を比色法の DPD 法で正確に測定するのは、その色が濃いほど難しい。電流滴定法は着色の度合いに係らず、測定が可能であり、非常に簡便である。また、アンモニア態窒素を含有する浴槽水の結合残留塩素の妨害も受けづらいことから、着色した水やアンモニア態窒素を含有する浴槽水の遊離残留塩素を測定するには、電流滴定法は有用と思われた。

培養法でレジオネラが不検出、遺伝子が検出された冷却水について、アメーバ共培養でレジオネラの増殖を調査した。13 検体中 5 検体で培養不能レジオネラ属菌の生菌の存在が確認された。実冷却水における、培養不能レジオネラ属菌生菌の存在が示され、冷却水系のレジオネラ感染源としてのリスク評価に PCR 法によるレジオネラ属菌遺伝子検出の重要性が示された。

エアサンプラーにより、空気中のレジオネラ属菌の存在を調査した結果、冷却塔の内部や側面の空气中に冷却水中の菌数に相応するレジオネラ属菌が存在した。空気中の菌数は冷却塔のファンが稼働している場合に高くなる傾向である。市街地や土埃の多い地域の空気からレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。市街地ではビルの屋上の空調用冷却塔からのレジオネラ汚染が考えられ、今後のレジオネラ症抑制対策のための汚染実態調査の重要性が示された。

冷却水の消毒で、結合臭素(塩素化スルファミン酸)処理では結合残留濃度を 3mg/L(asCl_2)維持しても $10^3 \sim 10^4$ CFU/100mL のレジオネラ属菌が継続的に検出され、レジオネラ属菌の抑制効果は無かった。遊離塩素(1.0mg/L)処理は、無処理に比較してレジオネラを低菌数に抑制するが、アメーバを抑制できず、レジオネラ属菌が 10CFU/100mL レベルで継続的に検出された。遊離臭素処理では 0.4mg/L(asCl_2)維持により塩素処

理よりもアメーバ、レジオネラを抑制したが継続的に不検出とはならなかった。酸化性殺菌剤の使用にあたっては、遊離残留濃度を適正に維持するとともに、レジオネラ属菌が抑制できなくなった場合は CMI (5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン) 製剤などを併用することが望ましい。

各種迅速検査法(LAMP法、LC EMA qPCR法、PALSAR法)について、浴槽水などの実試料を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。LC EMA qPCR法について、平板培養法に対する感度は 89.2%、特異度は 80.3%、菌数(定量値)の比較は $R^2 = 0.6874$ 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。LAMP法の平板培養法に対する感度は 84.0%、特異度は 76.6%であり、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。PALSAR法の平板培養法に対する感度は 47.0%、特異度は 76.8%であり、特異度は同等であったが、感度は低く改善の余地が残った。

外部精度管理調査実施主体を民間会社とし、官民間問わず幅広い調査を試みたことにより、全国規模で外部精度管理調査を実施するための一つのモデルを示すことができた。また、感染症法の改定により、平成 28 年 4 月から位置付けられる感染症発生动向調査における外部精度管理調査の一つとして対応可能と考える。今後さらに調査システムの検討を重ね、継続的かつ安定した外部精度管理調査ができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との協力が必要である。研修会については、継続的に開催できるよう、実施母体、講師育成、経費等を含めた検討が引き続き必要である。また、より良い研修マニュアル作成に向け検討を重ねる必要があると思われる。一案としては、外部精度管理実施母体において、定期的に研修会が開催できるようになれば理想的である。

内部精度管理については、標準的検査法を「公衆浴場における衛生等管理要領」で示し、基本となる検査法が全国的に周知、導入されることが重要であり、その対応を急ぐ必要がある。WG 推奨法は精度の高い検査法である。今後は、現在改訂作業中の ISO 法との調整を行い、「公衆浴場における衛生等管理要領」内で適切に位置付けられることで、全国の検査機関で導入されることにより、適切な内部

精度管理実施にも繋がり、その精度が安定すると思われる。

検査法の研修時に使用することを目的に、検討グループを構成して、使いやすくわかりやすいマニュアルの作成を試みた。検査法の操作段階ごとに項目立てし、各項目の構成を作成した。さらに各項目における注意点やポイントを見やすくするための工夫を施した。水試料からのレジオネラ属菌検査法の標準法が作成された時点で、今回検討した構成に基づいて研修用のマニュアルを作成することとした。

入浴施設における浴槽等の清掃・消毒効果を確保するための衛生管理手法として、迅速に結果が得られる LAMP 法や比色系パルサー法を導入することは効果的ではあるが、菌量が少ない場合、多種多様な泉質を有する温泉水の場合は、見逃しの危険性がある。また、「100ml あたり 10cfu 以下であること」という基準がある限り、培養法の併用は必須である。そこで、培養法における正確・迅速化を図るため、斜光法を取り入れた方法を併用することにより、迅速な行政対応が可能になるものとする。今後、斜光法を含めた標準的検査法を提示し、精度高いレジオネラ属菌検査を普及するための研修システムを確立し、民間検査機関への精度管理導入に向け、今後の検討を図ってきたい。

川崎市において分離された *Legionella pneumophila* SG1 について SBT 法で型別したところ、新規登録の 3 種を含む 15 種の ST に分類され、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。冷却塔水由来株は ST1 が分離された。関連のない施設から同一の ST が分離されたため、ST1 と同様に広く分布する ST がある可能性が示唆された。今後もさまざまな環境由来のレジオネラ属菌について ST を調査し環境中のレジオネラ属菌の分布状況を把握することで、レジオネラ症の感染源調査や新たな感染源の推定に寄与していきたい。

我が国の環境から分離されたレジオネラ属菌で、菌種が不明であった 15 菌株について、菌体脂肪酸組成分析を行ったところ、すべて既存種と一致しなかったが、6 菌株は菌体脂肪酸組成の類似性から同一種と考えられた。残りの 9 株は、そ

れぞれ異なる菌種であると考えられた。そのうち、1 株は新種 *L. thermalis* と報告され、1 株は新種 *L. norrlandica* と考えられ、1 株は未記載種 *L. sp.* 99-133 と同一種であると考えられた。

富山県における人口 10 万人当りのレジオネラ症発生が多い理由として、調査結果は直接的な関連性を示さなかったが、患者から分離された *lag-1* 保有 *L. pneumophila* SG1 に注目すると、他の 1 県と比べ高い検出率であったことから、この点に注目した調査が必要であることが示された。また、感染源を特定するために、*lag-1* を保有する *L. pneumophila* SG1 を選択的に分離することが有用になると考えられることから、今後の課題として検討すべきである。

平成 27 年度に、岡山県内で発生したレジオネラ症の患者由来株 5 株を収集した。これらは Lp SG1 株 4 株と、*L. longbeachae* SG2 株 1 株であった。このうち LpSG1(ST609)は、過去にも本県の患者から分離されている地域特異性の高い株で、MST 解析では感染源不明の臨床分離株が多い Group-U に属した。本年度、分離・収集した株のうち、Lp SG1 及び SG3 について遺伝子解析を行ったが、本県に地域特異的な患者由来株と同じ ST 及び PFGE パターンの株は見つからず、多様な生息環境のさらなる調査が必要である。

医療機関の浴室の浴槽、蛇口、シャワー並びに給水系のレジオネラ汚染を調査したところ、主として蛇口水からレジオネラ DNA 並びにレジオネラ属菌、特に *L. pneumophila* SG1 及び 5 が検出されたが、検出率は機関により異なっていた。その差は、給水系の遊離残留塩素濃度が原因であることが推測され、この結果に基づいて、対策として給水系の遊離残留塩素濃度を 0.2mg/L 以上にすることを検討する必要があるとした。

レクチンや糖質には、レジオネラ属菌のアメーバ感染に抑制的に働くのみならず、促進的にも作用する可能性があるという興味深い事実が明らかとなった。アメーバ側の受容体としては N アセチルグルコサミンが糖鎖成分として重要と考えられ、これを標的に感染を制御することが可能と考えられた。またこの N アセチルグルコサミンを主成分とするヘパリンという巨大分子が、菌のアメーバ感染性を高めることを利用し、アメーバを

増殖装置とするレジオネラ属菌検出の可能性が示された。今後のフィールド調査に役立つことが期待される。

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: Diagnostic utility of splenic lesions in a case of Legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 2. Intern Med, 54(23):3079-82.
- 2) 倉 文明:レジオネラ症の国内外の動向,ビルと環境, No. 149, 36-44 (2015)
- 3) 磯部順子, 金谷順一, 三井千恵子, 木全恵子, 清水美和子, 綿引正則, 佐多徹太郎: 富山県における浴用水中の *Legionella* 属菌の分離状況 (2014 年). 富山県衛生研究所年報. 38, 61-68 (2015)
- 4) 中臣昌広著, 倉 文明監修: レジオネラ症対策のてびき, 一般財団法人日本環境衛生センター, 2015 年 8 月 21 日第 2 版発行。
- 5) 佐々木麻里: レジオネラ症にご注意, 衛生環境研究センターだより No.25:1-2, 2016.

2. 学会発表

- 1) Junko Amemura-Maekawa, Kyoko Chida, Hitomi Ohya, Junko Isobe, Jun-ichi Kanatani, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima, Shuji Yoshino, Makoto Ohnishi and Fumiaki Kura: Genetic features of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* SG1 in Japan. ESGLI 2015. London. September 2015.
- 2) Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M: Prevalence of *Legionella* Species in Shower Water from Public Bath Facilities in Toyama Prefecture, Japan. ESGLI 2015.

London. September 2015.

- 3) Isobe J, Kanatani J, Nakagawara T, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M: Case report of legionellosis with infections at two different bath facilities within a single incubation period. ESGLI 2015. London. September 2015.
- 4) Inoue, H., Agata, K., and Ohta, H.: Detection of uncultured *Legionella* spp. in cooling tower water samples by amoebic coculturing and quantitative PCR. 30th JSME annual meeting & 7th international symposium on Microbial Ecology in Tsuchiura, PN-221. (2015)
- 5) 高野さかえ, 前川純子, 倉 文明, 山元佳: 呼吸器検体から菌の分離を経ず直接 Sequence-based typing 法を行ったレジオネラ肺炎症例. 第 89 回日本感染症学会学術講演会. 2015 年 4 月, 京都.
- 6) 井上浩章, 太田寛行, 縣 邦雄: 培養法と遺伝子検出法によるレジオネラ属菌検査結果の相違に関する検討. 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 東京 (2015)
- 7) 長岡宏美, 市村祐二, 青木信和, 江口大介, 神野透人, 小坂浩司, 泉山信司, 八木田健司, 縣邦雄, 片山富士男, 榎原広里, 和田裕久, 杉山寛治, 倉文明: 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, 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 大阪 (2015)
- 8) 杉山寛治, 長岡宏美, 片山富士男, 和田裕久, 榎原広里, 市村祐二, 青木信和, 江口大介, 神野透人, 小坂浩司, 泉山信司, 八木田健司, 縣邦雄, 田中慶郎, 倉文明: 循環式浴槽水のモノクロラミン消毒による長期間にわたるレジオネラ属菌の制御, 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 大阪 (2015)
- 9) 浦山みどり, 田栗利紹, 石本陽介, 金谷潤一, 倉文明: LC EMA-q PCR 法 (レジオネラ生菌迅速検査法) に与える夾雑菌の影響, 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 2015 年 9 月, 大阪府.
- 10) 泉山信司, 倉 文明, 黒木俊郎, 渡辺祐子:

- 家庭の水環境における *Legionella* 汚染、2015年度 環境技術学会 第15回 年次大会、2015年9月、大阪府。
- 11) 倉 文明：入浴施設などにおける衛生管理・レジオネラ対策と ATP 検査法の活用、ATP・迅速検査研究会第33会講演会、特別講演、2014年10月、東京。
 - 12) 西堀武明, 前川純子: *Legionella pneumophila* 血清群 13 によるレジオネラ肺炎の1例. 日本感染症学会第62回東日本地方会学術集会. 2015年10月, 札幌.
 - 13) 牧田幸久, 鈴木秀紀, 森主博貴, 松橋平太, 柴田真也, 長岡宏美, 川森文彦, 小澤匡宏, 山内薫明, 森 健, 市村祐二, 青木信和: モノクロラミンの浴槽水消毒条件の検討, 静岡県公衆衛生研究会, 静岡 (2016)
 - 14) 前川純子, 倉 文明, 村井美代, 大西 真: *Legionella pneumophila* の血清群 1 の PCR によるサブグループピング, 第89回日本細菌学会総会, 2016年3月, 大阪市.
3. 研修会
- 1) 佐々木麻里:レジオネラ症に係る最近の知見と検査の取り組み、平成27年度環境監視員担当者会議、2015年5月、大分。
 - 2) 倉 文明:「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」の改正について、パネルディスカッション、第27回レジオネラ対策シンポジウム、NPO 入浴施設衛生管理推進協議会主催、2015年5月、東京。
 - 3) 長岡宏美: 文京区環境衛生監視員「公衆浴場等のレジオネラ症防止対策」研修会、文京区保健所主催、2015年5月28日、東京都文京区
 - 4) 倉 文明:レジオネラ症 多様な感染源と感染事例、平成27年度富山県環境衛生監視員研修会、2015年6月、富山。
 - 5) 壁谷美加:平成27年度生活衛生営業関係業務検討会、岡山県保健福祉部生活衛生課主催、2015年7月10日、岡山県岡山市
 - 6) 杉山寛治, 市村祐二:平成27年度浴槽の衛生管理に係る講習会、神戸市保健所・衛生監視事務所主催、2015年7月13日、兵庫県神戸市
 - 7) 倉 文明:レジオネラ症 多様な感染事例に学ぶ、平成27年度埼玉県環境衛生監視員等研修会、特別講義、2015年7月、さいたま。
 - 8) 森本 洋:レジオネラ感染症について、平成27年度道央南ブロック保健所試験検査担当者研修会、2015年10月、北海道室蘭市
 - 9) 倉 文明:レジオネラ属菌の検査と感染対策、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、2015年11月、和光市。
 - 10) 森本 洋:環境水のレジオネラ属菌検査について、平成27年度保健所微生物等検査業務担当者研修会、2016年2月、北海道札幌市
 - 11) 倉 文明:レジオネラの感染事例と分子疫学解析、平成27年度第4回病原細菌遺伝学的解析法研修、2016年3月、茅ヶ崎市。
 - 12) 倉 文明、長岡宏美、磯部順子:レジオネラ症をめぐる話題と動向、入浴施設におけるモノクロラミン消毒の導入事例、感染源の特定のために必要な呼吸器検体からの菌の分離(衛生研究所側)、平成26年度生活衛生関係技術担当者研修会、2016年2月5日、東京
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特許5782574「モノクロラミン調製装置」
特許権者ケイ・アイ化成株式会社
- H. 利益相反について
民間企業から国立感染症研究所に3人の協力研究者を受け入れた:タカラバイオ(吉崎美和)、デンカ生研(小澤賢介)、アーク・リソース(宮崎誠生)。
また花王と「浴場施設での水衛生管理の利便性向上に関する研究」について共同研究を行った。

表 1 マンガンイオン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結果

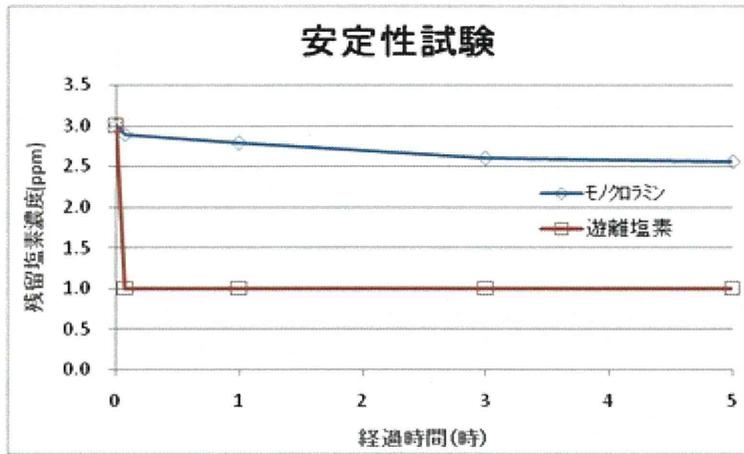
浴槽水 検査項目		実験浴槽(モノクロラミン管理)						対照浴槽	
		開始時	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目		6週目
微生物検査	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	一般細菌数(CFU/mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	5	8.3 × 10
	従属栄養細菌数(CFU/mL)	<1	<1	3.7 × 10 ³	3.9 × 10 ³	2.9 × 10 ³	6.7 × 10 ³	7.6 × 10 ³	5.8 × 10
	抗酸菌(定性)	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	アメーバ数(CFU/50mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
塩素濃度	モノクロラミン (mg/L)	-	-	6.0	-	3.7	-	-	<0.1
	ジクロラミン (mg/L)	-	-	0.2	-	0.2	-	-	0.2
	トリクロラミン (μg/L)	-	-	<15	-	<15	-	-	<15
	遊離塩素 (mg/L)	-	-	<0.1	-	<0.1	-	-	0.45
消毒副生成物	トリハロメタン類 4 物質(μg/L)	-	-	<0.001	-	<0.001	-	-	0.006
	NDMA(ng/L)	-	-	6.3	-	6.6	-	-	5.6
現場簡易検査	モノクロラミン (mg/L)	3.7	6.4	5.5	4.1	4.1	3.55	2.5	-
	全塩素 (mg/L)	3.64	5.85	5.41	3.72	3.63	3.52	2.7	-
	遊離塩素 (mg/L)	0.1	0.2	0	0	0	0	0	0.8
	遊離アンモニア (mg/L)	>	0.55	1.15	2.75	1.65	2.05	2.4	2.3

表 2 従属栄養細菌に対する各種薬剤の殺菌効力試験

薬剤名	濃度	30分後		120分後		薬剤名	濃度	30分後		120分後	
		菌数 (CFU/100mL)	最終濃度 (mg/L)	菌数 (CFU/100mL)	最終濃度 (mg/L)			菌数 (CFU/100mL)	菌数 (mg/L)		
モノクロラミン	5 mg/L	3.4 × 10 ⁵	4.9	3.3 × 10 ⁵	4.5	過酸化水素	0.5%	1.0 × 10 ³	<10	対照	3.9 × 10 ⁵
	10 mg/L	2.6 × 10 ⁴	9.7	1.0 × 10 ⁴	9		1.0%	1.1 × 10 ²			
	15 mg/L		14.2		13.6		1.5%				
	20 mg/L		18.8		18.1		2.0%				
	25 mg/L	<10	23.1	<10	21.1		2.5%	<10			
	30 mg/L		28.1		25.5		3.0%				
遊離塩素	5 mg/L	3.2 × 10 ⁵	3.7	1.5 × 10 ⁵	2.7						
	10 mg/L	2.2 × 10 ⁵	7	5.6 × 10 ⁴	7						
	15 mg/L	7.0 × 10 ⁴	14		12.5						
	20 mg/L	5.0 × 10 ⁴	16.4	<10	15.2						
	25 mg/L	4.2 × 10 ⁴	21.1		19.9						
	30 mg/L	6.1 × 10 ³	25.7		25.8						

表3 モノクロラミン消毒における適正濃度

貯湯槽内の消毒方法	50~100mg/L を内壁に噴霧
ろ過器の消毒方法 (ろ過器に直接注入して消毒する場合)	5mg/L 以上を注入
ろ過器の消毒方法 (浴槽水に投入し循環させて消毒する場合)	浴槽水に投入し 10mg/L 以上として 1 時間以上循環後、中和処理して排出
配管等の設備の消毒方法 (浴槽水に投入し循環させて消毒する場合)	
浴槽水の消毒方法 (通常の浴槽の場合)	3mg/L 以上



《3 時間経過時の外観写真》
未処理 モノクロラミン 遊離塩素



図1 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

表4. エアサンプラー調査した冷却塔の冷却水中のレジオネラ属菌数

冷却塔	冷却塔の運転状態		保有水量(m ³)	レジオネラ属菌	
	ファン	水の循環		培養法 (CFU/100 mL)	定量PCR (copies/100 mL)
CT-A	運転	運転	20	1.2 × 10 ⁵	6.2 × 10 ⁴
CT-B	停止	運転	20	1.0 × 10 ⁴	2.7 × 10 ⁶
CT-C	運転	運転	8	4.6 × 10 ³	1.6 × 10 ⁵
CT-D	停止	運転	18	<10	5.7



図2. サイクロン式エアサンプラー (コリオリス μ) の外観

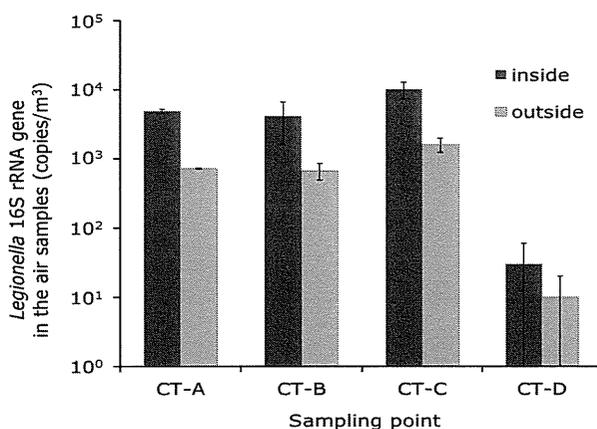


図3. 冷却塔の内部と外部の空气中レジオネラ属菌遺伝子

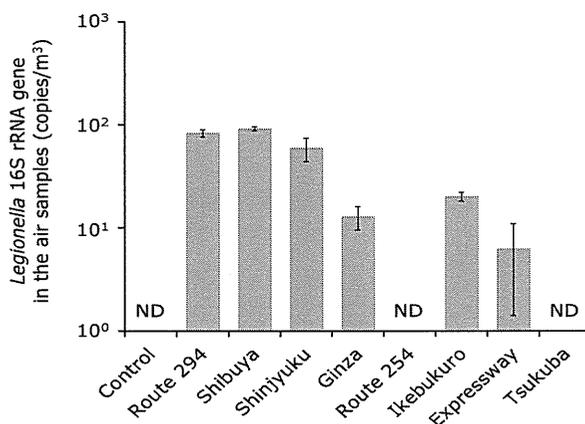


図4. 市街地の空气中のレジオネラ属菌遺伝子 (NDは不検出)

表5. 検体内訳と検査方法

		機関						
		A	B	C	D	E	F	計
浴槽水	温泉	21	6	21	17	33	13	111
	白湯	22	36	27	8	16	28	137
	薬湯	3						3
	不明	16					1	17
湯口水				25				25
シャワー水		48		2				50
プール水および採暖槽水							88	88
その他		1		9				10
計		111	42	59	50	49	130	441
検査方法								
LCEMA qPCR		○	○	○		○	○	
LAMP		○	○		○	○	○	
PALSAR		○	○	○	○	○		

表 6. 平板培養法による検出率

菌数(CFU/100 ml)	検体数	(%)
10 未満	333	(75.5)
10-99	63	(14.3)
100-999	20	(4.5)
1,000 以上	25	(5.7)
計	441	(100)

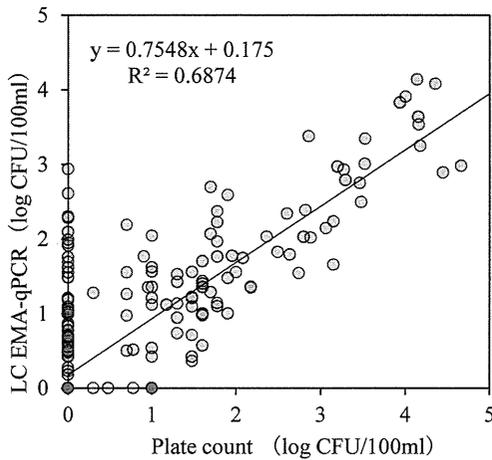


図 5 平板培養法とLC EMA qPCR法との相関

表 7. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 6	31
SG 1	25
SG 3	24
SG 5	24
SG 9	7
SG 15	6
SG 2	5
SG 10	5
SG 8	4
SG 7	3
SG 4	2
SG 12	2
UT	39
<i>Legionella</i> spp.	20

表 8. 平板培養法と PALSAR 法との比較

		平板培養法		計
		≥10	<10	
PALSAR 法	陽性	39	43	82
	陰性	44	142	186
計		83	185	268

感度 47.0%、特異度 76.8%

表 9. 各機関における培養法に対する迅速検査法の感度・特異度

		機関						6 機関
		A	B	C	D	E	F	
LC EMA qPCR	N	104	42	59	0	49	88	342
	感度(%)	76.0	83.3	100.0		92.0	測定不可	89.2
	特異度(%)	82.0	94.4	50.0		79.2	84.1	80.3
LAMP	N	111	42	0	50	49	34	286
	感度(%)	73.1	100.0		90.9	84.0	100.0	84.0
	特異度(%)	87.1	94.4		53.6	62.5	59.4	76.6
PALSAR	N	97	42	30	50	49	0	268
	感度(%)	28.6	33.3	33.3	59.1	60.0		47.0
	特異度(%)	80.3	86.1	57.1	67.9	79.2		76.8

表10 全判定結果

cfu/100ml

施設No.	非濃縮	ろ過濃縮	遠心濃縮	施設No.	非濃縮	ろ過濃縮	遠心濃縮
15110001001	2900	960	940	15110001041	2400	240	-
15110001002	1400	65	-	15110001042	700	-	440
15110001003	3000	390	-	15110001043	1900	560	180
15110001004	2900	1100	-	15110001044	2500	1100	-
15110001005	1600	790	-	15110001045	2300	500	-
15110001006	3000	1300	-	15110001046	2400	530	270
15110001007	1100	-	110	15110001047	0	110	-
15110001008	2500	800	310	15110001048	4800	3200	-
15110001009	500	19	-	15110001049	0	0	0
15110001010	100	180	-	15110001050	2900	1600	-
15110001011	1700	500	-	15110001051	3500	1800	-
15110001012	600	-	270	15110001052	800	-	130
15110001013	1800	95	-	15110001053	100	0	-
15110001014	1800	260	-	15110001054	2000	470	170
15110001015	2200	-	890	15110001055	2800	670	-
15110001016	1000	280	630	15110001056	2100	54	-
15110001017	2900	600	610	15110001057	2100	530	260
15110001018	1200	160	-	15110001058	370	8	-
15110001019	600	460	-	15110001059	3100	190	-
15110001020	1900	640	-	15110001060	3100	1100	-
15110001021	2600	1400	-	15110001061	2000	1500	-
15110001022	3700	1600	-	15110001062	1400	-	60
15110001023	3000	1600	420	15110001063	1800	530	-
15110001024	1900	1100	-	15110001064	2600	600	140
15110001025	2300	590	-	15110001065	2100	1700	-
15110001026	1100	340	-	15110001066	1100	920	-
15110001027	1900	0	350	15110001067	1400	600	-
15110001028	400	400	-	15110001068	1000	15	80
15110001029	1600	910	-	-:検査せず			
15110001030	2300	290	-				
15110001031	1700	350	140	平均値	1800	650	310
15110001032	2100	230	190	最大値	4800	3200	940
15110001033	0	0	-	最小値	0	0	0
15110001034	650	180	-	中央値	1900	500	245
15110001035	2000	190	-	対象機関	68	61	22
15110001036	3100	2200	-	良好機関	62(91%)	38(62%)	8(36%)
15110001037	1600	900	-				
15110001038	680	-	230				
15110001039	100	240	-				
15110001040	470	250	-				

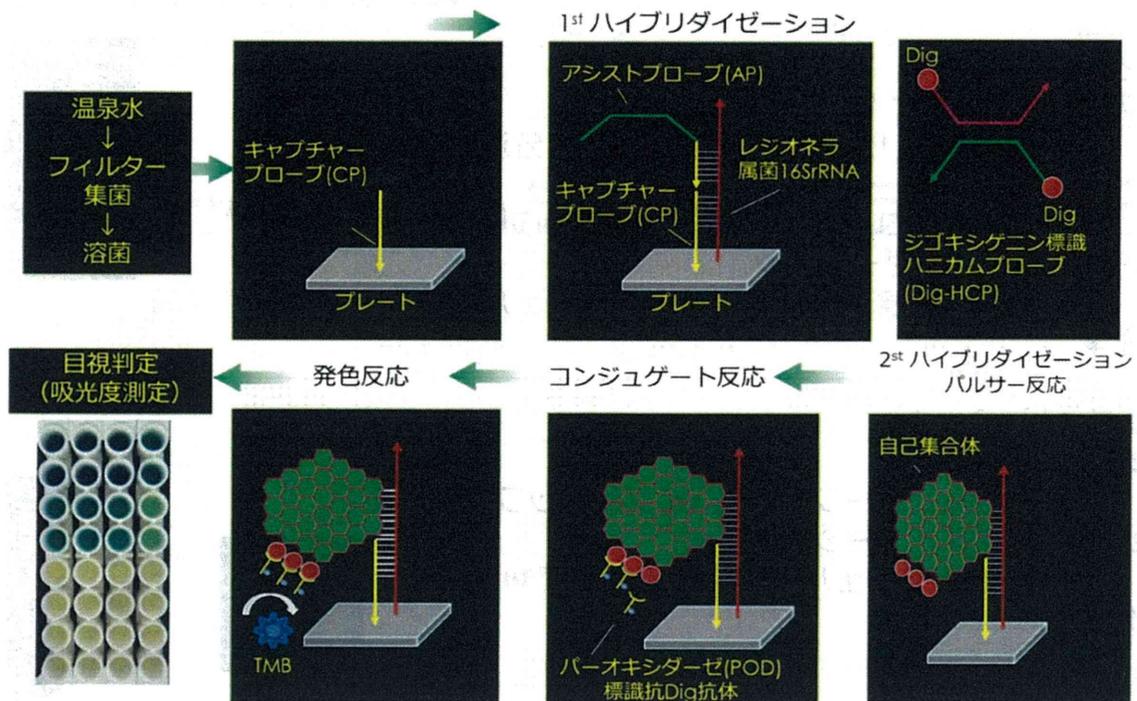


図 6. 比色計パルサー法

表 11-1 方法①パルサー法と培養法の比較 (n=18)

	パルサー		計	
	+	-		
培養法	+	13	4	17
	-	5	10	15
計		18	14	32

10cfu/100m によらない(定性)

表 11-2 方法②パルサー法と培養法の比較 (n=32)

	パルサー		計	
	+	-		
培養法	+	3	5	8
	-	1	9	10
計		4	14	18

10cfu/100m によらない(定性)

表 13. レジオネラ属菌未記載種の脂肪酸組成のプロファイル

表 2 脂肪酸組成のプロファイル^a

菌株番号	脂肪酸組成 (%)													
	i14:0	a15:0	15:1 w6c	i16:1 H	i16:0	C16:1 w7c/ 16:1 w6c	16:0	i17:0	a17:0	cyc17:0	17:0	18:0	19:0	20:0
NIIB0236	2.03	26.71	2.02	-	11.13	23.71	10.22	0.95	11.65	1.36	2.98	2.48	0.76	0.65
NIIB0383	5.42	17.87	2.13	1.54	22.64	14.45	12.41	0.52	6.16	1.40	0.64	4.23	0.91	4.62
NIIB0410	5.07	15.22	2.60	2.13	25.51	17.07	11.97	0.26	5.70	1.47	0.82	3.66	0.97	4.37
NIIB1169	1.05	40.01	5.17	-	7.31	21.51	8.27	0.58	8.51	0.17	0.53	0.52	0.12	0.94
NIIB2131	5.43	25.65	2.83	-	19.42	18.40	10.51	1.50	8.35	1.48	2.22	0.89	-	0.60
NIIB2330	7.97	12.98	2.41	1.79	32.16	11.71	10.17	0.42	4.42	2.13	0.85	3.58	1.03	3.80
NIIB2331	7.61	21.81	1.38	2.23	30.60	12.30	7.59	0.48	6.75	0.27	0.57	2.60	0.39	2.07
NIIB2358	7.50	20.50	1.96	2.40	25.70	13.78	9.23	0.38	5.90	1.83	-	2.75	0.55	3.21
NIIB2556	0.59	17.11	0.77	-	10.43	25.79	11.39	2.36	21.77	0.56	-	1.27	2.62	1.40
NIIB2557	0.95	29.46	1.25	-	12.98	17.72	6.94	1.65	20.82	-	-	0.72	1.30	0.73
NIIB2558	5.40	17.31	1.94	0.64	36.94	16.73	5.21	-	8.38	1.61	0.41	1.02	-	-
NIIB2652	3.44	30.15	4.09	-	19.70	14.94	7.65	0.29	11.8	-	0.70	1.32	0.49	0.80
NIIB2888	15.26	13.36	6.73	-	35.63	11.16	6.00	-	3.18	-	1.02	1.51	0.82	0.85
NIIB3046	5.63	9.36	1.83	2.15	27.98	16.24	14.33	0.33	3.68	2.98	0.92	4.58	1.06	4.56

^a いずれかの菌株で 2%を越える脂肪酸の種類について表示した。

- 検出されなかった。

表 12 2014 年度に収集した臨床分離株 (67 株)

No.	年	性別	感染源	PFGE	NIB (受付番号)	血清群	ST (Sequence Type)	ST										Group (SG1)	同じSTの報告があるか
								flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA					
322	2014	男	不明(1回/2日のペースで近隣の温泉、菌不検出)		3164	<i>L. pneumophila</i>	1	1756	3	13	1	21	11	9	9	(U)	無		
323	2013	男	不明		3183	<i>L. pneumophila</i>	1	1773	6	43	15	6	21	7	53	N	無		
324	2014	男	温泉(推定)		3184	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内18例目		
325	2014	女	不明		3185	<i>L. pneumophila</i>	1	118	12	8	11	20	5	12	6	S3	国内3例目		
326	2014	男	不明		3186	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内6例目		
327	2014	男	温泉(推定)		3187	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内21例目、国外		
328	2014	男	不明		3192	<i>L. pneumophila</i>	1	1798	7	10	17	10	13	4	11	B2	無一国内		
329	2014	男	銭湯(推定)		3193	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内19例目、国外		
330	2014	男	温泉(推定)		3194	<i>L. pneumophila</i>	1	505	7	6	17	3	11	11	9	B2	国内5例目		
331	2014	男	不明		3200	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内17例目、国外		
332	2013	女	浴槽水(集団感染、高齢者福祉施設)	一致	3201	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内22例目、国外		
333	2014	男	不明		3202	<i>L. pneumophila</i>	1	550	2	3	6	10	51	1	6	S1	国内4例目		
334	2014	男	草刈り(推定)		3204	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内5例目		
335	2014	男	温泉(毎日利用、当該菌分離されず)		3205	<i>L. pneumophila</i>	9	1808	4	8	11	25	11	12	2	-	無		
336	2014	男	不明		3206	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内23例目、国外		
337	2014	男	不明(水槽水検査中)		3208	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内8例目、国外		
338	2014	男	不明(草刈り)		3209	<i>L. pneumophila</i>	1	739	12	8	11	2	10	12	2	S3	国内2例目、日本・中国環境		
339	2014	男	土壌(推定、大工)		3210	<i>L. pneumophila</i>	13	1826	12	10	5	10	18	1	209	-	無		
340	2014	男	不明		3216	<i>L. pneumophila</i>	1	1847	2	3	5	12	2	1	6	S1	無		
341	2014	男	不明(整備員)		3217	<i>L. pneumophila</i>	1	1845	21	27	28	15	29	9	N	無			
342	2014	男	土壌(推定、清掃等)		3220	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内24例目、国外		
343	2014	男	循環風呂(推定)		3224	<i>L. pneumophila</i>	1	1846	2	4	9	12	2	1	20	S1	無		
344	2014	女	院内感染(冷却塔)	一致	3243	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内18例目、国外		
345	2007	男	公衆浴場(推定)		3245	<i>L. pneumophila</i>	1	256	6	10	14	5	39	14	9	(B1)	国内4例目、国外、国内環境(シャワー)		
346	2007	男	公衆浴場(推定、PFGE一致せず)		3246	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内20例目、国外		
347	2008	男	入浴施設(推定、血清群一致せず)		3247	<i>L. pneumophila</i>	1	143	4	17	11	23	5	12	19	N	国内2例目、国外		
348	2011	男	家庭菜園の散水ホース	一致	3248	<i>L. pneumophila</i>	1	1865	2	3	46	13	2	5	6	S1	無		
349	2014	男	不明		3249	<i>L. pneumophila</i>	1	1867	21	14	29	11	15	29	6	N	無		
350	2014	男	不明		3250	<i>L. pneumophila</i>	8	1866	17	23	13	20	32	22	205	-	無		
351	2014	男	公衆浴場(推定)		3251	<i>L. pneumophila</i>	1	502	6	10	19	3	19	4	6	B1	国内3例目		
352	2014	男	不明(家庭園芸をする程度)		3253	<i>L. pneumophila</i>	3	465	2	29	2	5	50	20	15	-	国外1例		
353	2014	男	畑で農作業(推定)		3254	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内20例目、国外		
354	2014	男	不明		3260	<i>L. pneumophila</i>	1	1924	2	3	9	12	2	1	6	S1	無		
355	2012	男	24時間風呂(推定)		3261	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内8例目		
356	2013	男	自宅の24時間風呂(推定)		3262	<i>L. pneumophila</i>	1	1964	6	10	17	28	19	14	6	B1	無		
357	2014	男	不明		3263	<i>L. pneumophila</i>	1	48	5	2	22	27	6	10	12	S2	無		
358	2014	男	不明		3264	<i>L. pneumophila</i>	1	1480	3	13	1	14	14	9	6	U	国内2例目		
359	2014	女	不明		3265	<i>L. pneumophila</i>	4	1966	6	6	15	6	4	14	11	無	無		
360	2014	男	温泉(推定)		3266	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内9例目、国外		
361	2014	男	温泉(推定)		3267	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内10例目、国外		
362	2014	男	入浴施設(推定、スポーツジム)		3268	<i>L. pneumophila</i>	1	1965	4	3	18	28	5	1	9	N	無		
363	2014	男	不明		3269	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内26例目、国外		
364	2014	男	24時間風呂(推定)		3270	<i>L. pneumophila</i>	1	1933	7	10	19	10	19	4	6	B1	無		
365	2013	男	自宅(風呂水、貯水槽水)	一致	3275	<i>L. pneumophila</i>	1	1857	6	6	3	28	9	4	11	B1	国内環境株(シャワー)		
366	2013	男	不明		3276	<i>L. pneumophila</i>	1	1187	2	3	5	13	2	1	6	S1	国内環境株(水溜り)		
367	2013	男	不明		3277	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内25例目、国外		
368	2013	男	不明(家庭菜園?)		3278	<i>L. pneumophila</i>	1	294	8	3	3	15	21	1	6	S1	国内2例目、国外		
369	2013	男	不明(タクシー運転手)		3279	<i>L. pneumophila</i>	1	905	2	3	9	13	56	5	6	S1	国内2例目		
370	2013	男	温泉(推定)		3280	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内7例目		
371	2013	男	不明		3281	<i>L. pneumophila</i>	6	1945	6	6	15	6	4	14	9	無	無		
372	2014	男	不明		3282	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内27例目、国外		
373	2015	女	浴室シャワー(推定)		3288	<i>L. pneumophila</i>	1	566	6	10	20	13	21	14	11	B1	国内3例目		
374	2014	男	公衆浴場(推定)		3289	<i>L. pneumophila</i>	1	502	6	10	19	3	19	4	6	B1	国内4例目		
375	2015	男	不明(仕事でスチーム洗浄作業)		3290	<i>L. pneumophila</i>	1	1187	2	3	5	13	2	1	6	S1	国内2例目、環境(水溜り)		
376	2014	男	不明(旅行歴)		3291	<i>L. pneumophila</i>	1	9	3	10	1	3	14	9	11	U	国外		
377	2014	男	不明		3292	<i>L. pneumophila</i>	1	211	3	10	1	1	14	9	11	U	国内4例目、国外4例		
378	2014	男	不明(市場で魚輸送)		3293	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内7例目、国外		
379	2015	男	不明		3294	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内11例目、国外		
380	2015	男	入浴施設(スポーツジム)	一致	3305	<i>L. pneumophila</i>	1	642	2	10	3	10	9	14	6	B1	国内3例目		
381	2015	男	温泉	一致	3308	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内19例目		
382	2015	男	不明		3309	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内8例目		
383	2015	男	公衆浴場の利用あり		3310	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内7例目		
384	2015	男	公衆浴場の利用あり		3311	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内8例目		
385	2015	男	不明		3312	<i>L. pneumophila</i>	1	142	2	10	3	13	9	4	18	B1	国内4例目		
386	2015	男	不明(自家用車の加湿器レジオネラ陰性)		3313	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内28例目、国外		
387	2015	男	公衆浴場の利用あり		3314	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内9例目		
388	2015	男	公衆浴場の利用あり		3315	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内10例目		

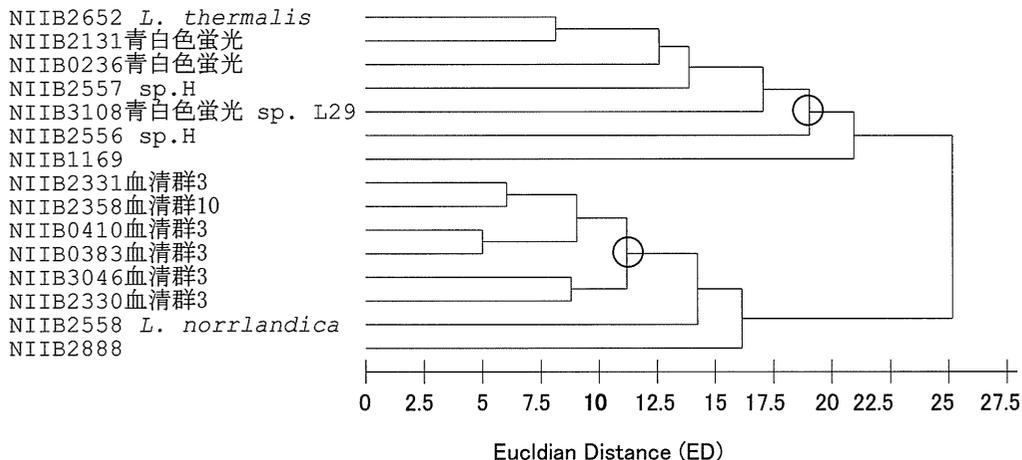


図 7. 菌体脂肪酸組成分析のデータによる Sherlock System を用いて作成した系統樹

表 14. 富山県の浴用水から分離された *L. pneumophila* SG1 における *lag-1* 遺伝子保有状況 (2011-2015)

	<i>lag-1</i> 検出		SG1検出		レジオネラ検出		全検査数	
	(施設数)	(検体数)	(施設数)	(検体数)	(施設数)	(検体数)	(施設数)	(検体数)
2011年	2	5	5	9	8	15	14	45
2012年	2	2	3	4	9	14	15	45
2013年	2	3	4	8	7	14	13	39
2014年	2	3	5	13	6	16	11	44
2015年	1	1	4	8	6	12	13	51
	9	14	21	42	36	71	66	224

表 15 医療機関において培養検査結果が陽性となった試料

医療機関	温度	pH	残留塩素	LAMP	検出菌	菌数 (CFU/100ml)
D 病室 1 蛇口	26.9	7.7	<0.1	-	<i>L. pneumophila</i> SG5	20
病室 1 蛇口スワブ				-	<i>Legionella</i> sp.	
病室 2 蛇口	25.3	7.8	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1 <i>L. pneumophila</i> SG5 <i>Legionella</i> sp.	1,670
洗面台 1	26.4	7.8	<0.1	-	<i>L. pneumophila</i> SG5	50
洗面台 2	28.8	7.8	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	10
処置室給湯	31.5	7.8	<0.1	+	<i>Legionella</i> sp.	10
浴室蛇口	36.1	7.7	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	40
談話室 蛇口	29.2	7.8	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	180
手術室 水道	23.5	7.8	<0.1	-	<i>L. feelei</i> SG1	130
手術室 洗浄蛇口	24.7	7.8	<0.1	+	<i>Legionella</i> sp.	3,320
受水槽	18.0	7.8	0.11	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	120
E 病棟 廊下 洗面台 1	33.7	7.5	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	610
病棟 廊下 洗面台 1 蛇口スワブ				+	<i>L. pneumophila</i> SG1	
病棟 廊下 洗面台 2	33.4	7.5	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	10
病室 1 蛇口	31.1	7.5	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	90
病室 2 蛇口	33.4	7.6	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1 <i>L. feelei</i> SG1	1,910
談話室 蛇口	26.7	7.5	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	3,600
談話室 蛇口 スワブ				-	<i>L. pneumophila</i> SG1	
ステーション	33.6	7.6	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	3,500
F 談話室 蛇口 1	26.7	7.5	0.15	+	<i>Legionella</i> sp.	430
談話室 蛇口 2	30.9	7.6	0.14	-	<i>Legionella</i> sp.	270
病棟 洗面台	35.3	7.4	0.16	-	<i>Legionella</i> sp.	130
病室 蛇口	28.5	7.4	0.16	-	<i>Legionella</i> sp.	20

L. pneumophila 血清群1 (751株) の minimum spanning tree 図

当該菌株の位置を示した。

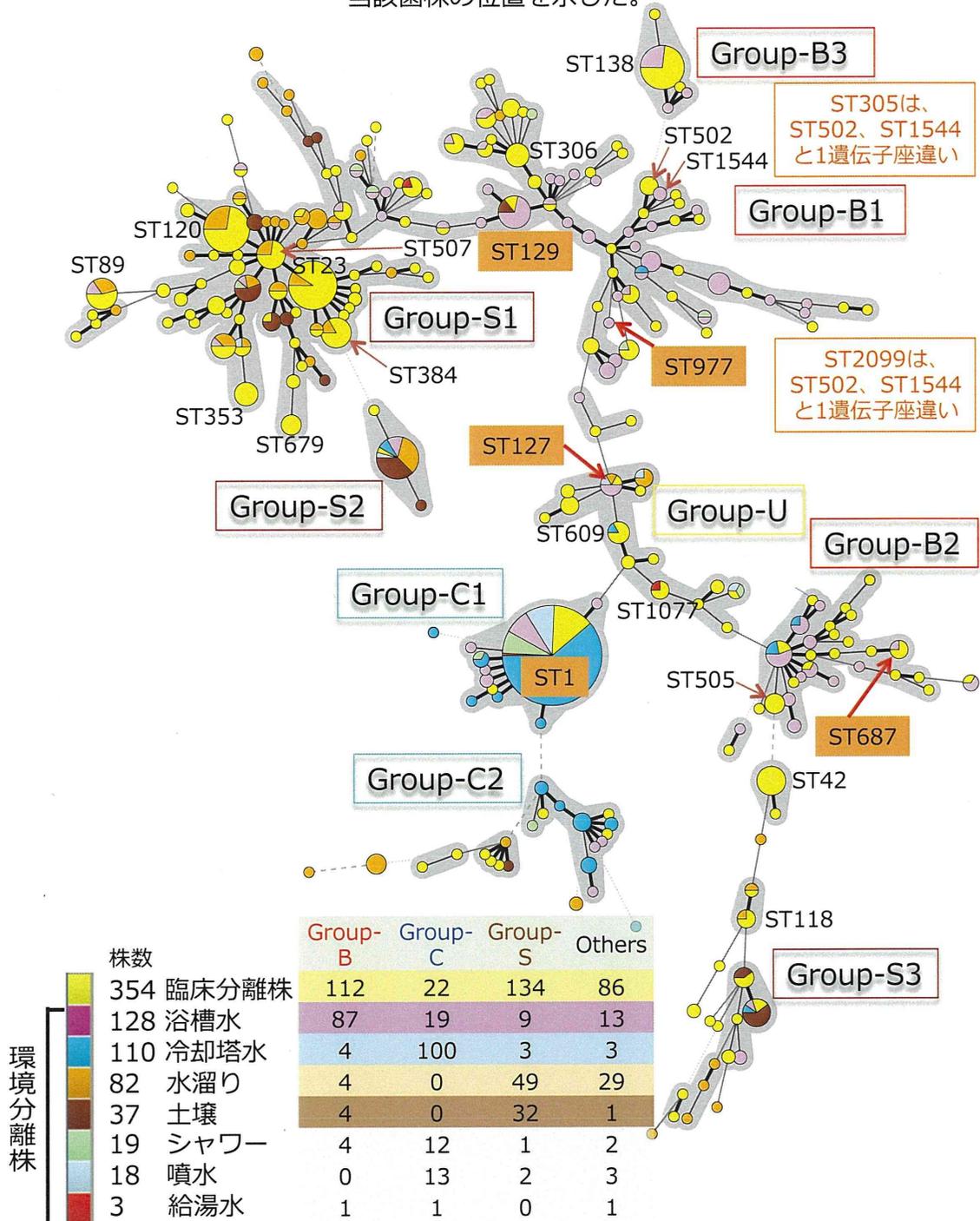


図8 *L. pneumophila* 血清群1 (751株) の minimum spanning tree (作図、感染研:前川純子)

II. 分担研究報告

平成 27 年度 分担研究報告書

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

研究分担者	○長岡宏美	静岡県環境衛生科学研究所
	縣 邦雄	アクアス株式会社 つくば総合研究所
	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
	小坂浩司	国立保健医療科学院 水道工学部
	泉山信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	前林公男	静岡市保健所
	加藤千裕	静岡市保健所
	和田裕久	静岡市環境保健研究所
	鈴木史恵	静岡市環境保健研究所
	寺田善直	浜松市保健所
	壁谷美加	浜松市保健所
	土屋祐司	浜松市保健環境研究所
	市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社
青木信和	ケイ・アイ化成株式会社	

(研究要旨)

より広範囲な泉質の浴槽水へのモノクロラ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、モノクロラミン消毒の実証試験を行った。実証試験前に、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ラ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、モノクロラミン濃度(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ラミンが適していると判断された。

循環式浴槽のモノクロラ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り、モノクロラミン消毒との相性が良くない。この相性問題を回避し、より簡便で確実な高濃度モノクロラ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し、循環式浴槽水へモノクロラ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。今後、全国の入浴施設へモノクロラミン消毒法が導入されることにより、浴槽水の確実なレジオネラ防除がなされ、レジオネラ症患者発生の低減が期待される。

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、厚生労働省の通知を参考として、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、アンモニア態窒素など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、本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。これまでに、遊離塩素消毒ではレジオネラ属菌等の十分な殺菌効果が期待できない高 pH や、アンモニア態窒素、臭化物イオン、鉄を含む泉質の温泉や、井水の沸かし湯を使用する入浴施設において、モノクロラミン消毒の実証試験を行い、レジオネラ属菌やその増殖宿主であるアメーバに対する高い殺菌・不活化効果を確認することができた。具体的には、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ること、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¹⁾。

今年度は、さらに広範囲な泉質の消毒を目指し、遊離塩素を消費する成分であるマンガンイオンを含む浴槽水の消毒を営業施設において実施した。

また、循環式浴槽のモノクロラミン消毒時におけるろ過器・配管の洗浄方法として、不連続点処理や事前完全換水が必要となり、モノクロラミン消毒と遊離塩素による洗浄は相性が良くない。言い換えると、薬剤使用量や作業時間などの面から適当とは言えない。そこで、よりリーズナブルで

簡便な洗浄を可能とするために、高濃度モノクロラミンによる配管洗浄の方法について検討した。

B. 研究方法

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の検証

(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、工業用水に一定量添加することでマンガンイオン 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、添加 5 分後および 1, 3, 5 時間後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殺菌前のマンガンイオン（1.1 mg/L）を含む地下水を浴槽水として殺菌使用される前に採水した。これ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 3 mg/L となるよう添加し、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。

(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²⁾。

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、ブromoジクロロメタン、ジブromoクロロメタン、トリブromo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³⁾。

2 高濃度モノクロラミンによる配管洗浄・殺菌効果の検証

(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(図1)内の40℃に温度維持された市水(プイオン培地添加)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^{4, 5)}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。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、一般細菌数を測定した。

(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ヵ所で、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。検査項目は2-(2)と同様である。

(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。

(倫理面への配慮)

モノクロラミン消毒の試験中は、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. 結果

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の検証

(1) マンガンイオン存在下におけるモノクロラミン安定性試験

モノクロラミン(3 mg/L 添加)は、マンガンイオン(10 mg/L)溶液中に、40℃、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℃、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(図2)。

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ンイオンの酸化によると思われる茶色へ変色が見られた(図2)。

(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

マンガンイオン(1.1 mg/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3)。

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 3）、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。

(3) 循環式入浴施設（営業施設）における検証試験

マンガンイオン(1.1 mg/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。

2 高濃度モノクロラミンによる配管洗浄・殺菌効果の検証

(1) 回流装置を用いた洗浄試験

観察板表面拭き取りの一般細菌数および従属栄養細菌数の洗浄濃度別の経時的推移を図 4 に示した。バイオフィー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 10^3 以上の菌数の低下が認められた。

(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

実験用循環式モデル浴槽で実施したモノクロラミン 5, 10 mg/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(表 2)、一般細菌数(表 3)を示した。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。

(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

2 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洗水、ヘアキャッチャー網の拭き取りの成績(表 4)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(表 5)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。

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

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 6)。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。

D. 考察

1 種々の温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証

マンガンイオンを含む水において、遊離塩素を発生させるまでには、マンガンイオン濃度の約 1.3 倍の遊離塩素を必要(塩素要求量)とする⁶⁾。今回の実験でも、マンガンイオン 10 ppm の溶液中に遊離塩素 3 ppm を添加した系では遊離塩素は完全に消失した。一方、モノクロラミン 3 ppm の添加系ではモノクロラミン濃度は安定して維持されていた(図 2)。

浴槽水の原水であるマンガンイオン (1.1 mg/Kg) 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でも、モノクロラミン濃度は安定して維持されることが推測できた(図 3)。この予測は営業施設での実証試験時に、浴槽への補給水量分のモノクロラミン濃度を補う薬剤をタイマー注入するプログラムを導入することで、安定した濃度管理が可能であったことから支持された。