201525002B

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 25 年度～平成 27　総合研究報告書

研究代表者　　倉　文明

平成 28（2016）年 3 月

目　次

I. 総合研究報告

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. 資料編

1. 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----------21
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、前林君男、
片山富士男、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. 冷却水系の消毒維持管理と菌の多様性----------37
縣　邦雄、井上浩章、神澤　啓

3. レジオネラ属菌迅速検査法の評価----------53
磯部順子、烏谷竜哉、佐々木麻里、八木田健司、山口友美、武藤千恵子、飯髙順子、淀谷雄亮、
金谷潤一、浦山みどり、田栗利紹、緒方喜久代、原口浩幸、森中りえか、泉山信司

4. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み----------61
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、渡辺祐子、渡邉涼太、倉　文明

5. 公衆浴場の衛生管理等に関する検討----------71
黒木俊郎、森本　洋、磯部順子、烏谷竜哉、緒方喜久代、倉　文明

6. レジオネラ属菌の培養検査法と精度管理----------75
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

7. *Legionella pneumophila* 分離株の収集と SBT 法による遺伝子型別および解析----------85
前川純子、磯部順子、金谷潤一、倉　文明

8. 富山県の不明感染源解明のための環境調査----------93
磯部順子、金谷潤一

9. 地域特異的な感染源不明クラスターに関する調査(平成 25-27 年度) ----------105
中嶋　洋

10. 入浴施設等における *Legionella* 汚染の実態に関する研究----------115
黒木俊郎、前川純子、八木田健司、渡辺祐子、大屋日登美、鈴木美雪、倉　文明

11. 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----------119
八木田健司、泉山信司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----------123

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I.　総合研究報告

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）

総合研究報告書

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 主任研究官

研究要旨：

1) 遊離塩素消毒が困難な高 pH の泉質や，アンモニア態窒素，臭化物イオン，鉄，マンガンイオンを含む温泉および井水の沸かし湯を使用する循環式入浴施設 10 ヶ所において，浴槽水のモノクロラミン濃度を 3 mg/L に維持する消毒効果確認試験を行い，いずれの浴槽でもレジオネラ属菌やその増殖宿主であるアメーバを不検出にすることができた。また，モノクロラミン濃度が安定して保たれることから，配管等に付着するバイオフィルムの形成が抑制できるとともに，人体に有害な消毒副生成物の生成も少なく，不快な塩素臭も低減できた。さらに，現場施設へのモノクロラミン消毒の適用にあたり，事前に源泉水におけるモノクロラミン濃度の経時的な安定性を調べ，泉質への消毒適合性を判断するモノクロラミン消毒導入スキームを構築した。

2) 公衆浴場法では，循環式浴槽のろ過器・配管の週 1 回以上の高濃度遊離塩素洗浄の実施を求めているが，浴槽水のモノクロラミン消毒時には，事前換水が必要な遊離塩素洗浄は不適である。遊離塩素に替わる配管洗浄方法として，高濃度モノクロラミン（10 mg/L 以上）による 1 時間以上の配管洗浄を実施したところ，洗浄後に一般細菌数，従属栄養細菌数の減少を確認できた。また，モノクロラミンによる配管洗浄後の洗浄水の中和剤として，チオ硫酸ナトリウムまたは亜硫酸ナトリウムが利用できることがわかった。以上から，循環式浴槽水へモノクロラミン消毒法を導入するのに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で，浴槽水のレジオネラ汚染が防止され，レジオネラ症患者発生の低減が期待できる。

3) 冷却水は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．我が国でも建築物の空調用冷却塔が夏季に多く稼働しており，冷却水を原因とするレジオネラ症の感染リスクがある．冷却水起因のレジオネラ症防止に役立てるために，冷却水のレジオネラ汚染の実態把握，市街地空気中のレジオネラ存在調査の検討，冷却水のレジオネラを抑制するための消毒・維持管理方法の確立を目的として調査研究を行った．

実際に運転している冷却水中のレジオネラ属菌検出率(10CFU/100mL 以上)は 25%程度である．殺菌剤の種類別では，CMI 等の有機系殺菌剤は無処理よりも検出率を低下させている．塩素系殺菌剤使用の冷却水におけるレジオネラ属菌数分布は無処理と同様であり抑制効果は無かった．

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存在しており，多様なレジオネラ菌種が確認された．冷却水中の難培養性レジオネラ属菌の存在をアメーバ共培養と定量 PCR の組み合わせにより調査した結果，*Legionella drozanskii* 等の難培養性レジオネラ属菌の生菌の存在を確認した．冷却水では培養法で検出されないレジオネラ属菌の生菌が存在しており，それらは PCR 検査により検出できることがわかった．

サイクロン式エアサンプラーによる，空気中のレジオネラ属菌の定量的測定法を確立した．実際の冷却塔内部や近傍では空気中にレジオネラ属菌が存在し，検出量は冷却水のレジオネラ属菌数と相関があった．市街地の空気を採集して調査した結果，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が多い地域で遺伝子量が多く検出される傾向であった．

モデル冷却塔による，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，結合塩素及

び結合臭素(各 3mg/L asCl_2)処理では 10^2～10^4CFU/100mL のレジオネラ属菌が連続的に検出された．結合塩素及び結合臭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レジオネラ属菌不検出を維持し，効果の持続性が確認された．遊離塩素は，循環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た．遊離臭素もレジオネラが検出され，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．

以上の結果，冷却水及び空気中のレジオネラ属菌汚染の実態と PCR 検査法の有用性，及び冷却水中の レジオネラ属菌の効果的な抑制方法が明確になった．

4) 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。従来法との比較においては同等の結果が得られたが、遺伝子検査法の比較においては、培養（＋）遺伝子検査（－）の不一致が認められ、検査法として導入するにあたり、その原因を明らかにする必要がある。レジオネラ属菌の菌数、検出される菌種や泉質などの要因が考えられた。また、加熱による雑菌処理時間を研究班推奨の方法 50℃20 分間と JIS K 0650-50-10:2006 の 50℃30 分間の 2 法で、浴槽水・湯口水を用いて比較検討を行なった。その結果、50℃20 分の方が高い検出率が得られた。

5) 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，浴用水に加えて，それ以外の感染源を探求するため，環境中の *Legionella* 属菌の生息状況を調査した．3 年間で調査対象としたのは，公衆浴場関連では浴用水 134 検体，シャワー水 111 検体，計 245 検体である．河川水は，患者発生の多い地域を流れる河川水，東部地域の主要河川，また，富山市内の市街地を流れる市中河川から採水した 81 検体である．土壌は，平成 25 年度は河川の周辺の 4 か所から，平成 26 年度は新たに幹線道路沿いの 6 か所と東部地域の河川周辺の３か所を追加した計 13 か所から採取した 97 検体である．浴用水およびシャワー水における検出率は浴用水では 22.7~35.9%，平均 28,4%，シャワー水では，15.6～29.4%，平均 22.5%で，その菌数はおよそ 6 割が 10-99CFU/100mL であった．河川水における *Legionella* 属菌の検出率は，全体では 28/85 検体（32.9%）で，調査した 12 地点のいずれからも *Legionella* 属菌が検出されたが，患者発生地域との関連性については明らかにならなかった．これらの環境検体で，患者喀痰からもっとも多く分離される SG1 は，浴用水での分離が 18/37 検体（48.6%）と多かった．一方，ウィンドウッシャー液中では，すべての菌が 10 分経過後には 50%以下，24h 後に生存する株は認められなくなり，界面活性剤の使用がレジオネラ症のリスクを軽減することを示した．

6) 平成 25 年度と平成 26 年度は家庭内における *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ために、家庭内の水環境から *Legionella* 属菌の分離を試みた。2 年間で 19 軒の家庭の協力を得て、水試料 149 検体、スワブ検体 90 検体を対象に、*Legionella* DNA の検出及び培養によるレジオネラ属菌の検出、さらにアメーバ共培養によるレジオネラ属菌の増菌後の DNA 及び菌の検出を行った。アメーバ共培養により検出率が向上し、レジオネラ DNA は水試料では 77 検体（51.7%）、スワブ試料では 17 検体（18.9%）から検出された。水試料では洗濯機（92.9%）、水槽（86.7%）、浴槽水（58.3%）、給湯水（52.9%）、スワブ試料では給湯口（53.8%）での検出率が高かった。*Legionella* 属菌は水試料では 9 検体（6.0%）、スワブ試料では 3 検体（3.3%）から検出され、*L. pneumophila* SG1 が給湯水と浴槽洗浄用スポンジから検出された。

平成 27 年度は、浴槽と付随設備、給水系の *Legionella* 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。入浴施設の 1 施設では、浴槽から *Legionella* 属菌は検出されなかったが、*Legionella* DNA 及び *Legionella* 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。別の入浴施設では、浴槽水 1 検体と浴槽壁のスワブ試料 1 検体から *Legionella* 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。さらに別の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、*Legionella* の汚染は少なく、蛇口水とシャワー水から *Legionella* 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。

7) 厚生労働省は、入浴施設に関連したレジオネラ属菌感染症を防ぐために、通知等をもって旅館ならびに公衆浴場等における入浴施設の衛生管理の徹底を図っており、これに伴って、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。平成 26 年度に、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が期待される成果を整理することを目的に、ワーキンググループを立ち上げ、これまでに実施された研究の成果等を踏まえ、入浴施設の衛生管理やレジオネラ属菌の培養法等について、活用が期待される研究成果を整理した。検討した内容は、１）消毒法、２）検査法（迅速検査法、斜光法、検査法の標準化）、３）洗浄効果の簡易判定法、４）レジオネラ属菌汚染の指標、５）シャワーでのレジオネラ汚染と衛生管理とした。さらに、平成 27 年度は、水試料からのレジオネラ属菌検査法の普及を目的として実施する研修において使用する検査法のマニュアルの作成を試みた。

8) 1980 年から 2015 年までに分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 株（臨床分離株 354 株、環境分離株 397 株；内訳は、浴槽水由来 128 株、冷却塔水由来 110 株、水溜り由来 82 株、土壌由来 37 株、シャワー由来 19 株、噴水由来 18 株、給湯水由来 3 株）を 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）をして、minimum spanning tree 解析を行うと、 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 つに分かれた。レジオネラ・レファレンスセンターに送付された臨床分離株の遺伝子型がどこに位置するかという情報を地方自治体経由で医療機関に還元できるようになり、遺伝子解析が感染源の種類の推定に寄与することが明らかとなってきた。

9) 岡山県内のレジオネラ症患者由来株のうち、地域特異的に検出されている *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。また、Lp SG1(ST609、ST1077)も同様に地域特異的に検出されていることから、これら患者の感染源を明らかにするため、環境検体のレジオネラ汚染調査を行った。3 年間に 282 検体について検査を行った結果、69 検体(24.5%)からレジオネラが検出されたが、上記の菌株はどの検体からも検出されず、感染源の究明には至らなかった。このため、修景水等の未調査

の検体に調査対象を拡大して、より多様な検体についてもレジオネラ汚染実態の調査が必要であると思われた。

10) 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（以下 WG）内で検討を行った。WG では、これまでの厚労科研研究事業において、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。また、病原体の輸送においても日本国内での対応が平成24年6月以降厳しくなり[4)]、苦慮していたところである。本研究機関においては、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。平成27年度はその実施母体を日水製薬（株）とし、公的、民間を問わず全国192の検査機関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。今後もさらに検討を重ね、適切な研修会までの実施を視野に入れた継続的な外部精度管理を開催できるよう検討が必要と思われる。

11) レジオネラ属菌のアメーバ感染における糖鎖の関与を調べることで感染受容体の特性を明らかにし、また糖鎖を応用した感染制御の可能性に関して検討を行った。レジオネラ属菌とアメーバの感染実験、およびレクチンと糖質の感染への影響を定量解析し、受容体の特性を調べた。感染実験からアカントアメーバをモデル実験用アメーバに選択した。受容体の局在は明らかにできなかったが、その構成糖鎖残基に関する知見を得た。また感染抑制および促進効果のあるレクチンならびに糖質を明らかにした。促進効果のあったヘパリンは、アメーバに対するレジオネラ属菌感染能力の回復効果があること、またその効果が培養能力の低下した菌をアメーバを用いて検出する上で有用であることを明らかにした。

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
荒井桂子・横浜市衛生研究所医務職員
磯部順子・富山県衛生研究所副主幹研究員
緒方喜久代・大分県衛生環境研究センター
専門研究員(総括)
佐々木麻里・大分県衛生環境研究センター
主任研究員
烏谷竜哉・愛媛県保健福祉部健康衛生局
健康増進課感染症対策係　係長
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

A. 研究目的

循環式浴槽では肺炎の起因菌であるレジオネラ属菌による死亡例を含む集団感染が繰り返された。遊離塩素消毒が強化されたが、井水や温泉水など多様な水質の存在、高 pH の条件下では効果が十分には期待できない。また塩素臭などが敬遠されて遊離塩素の使用が必ずしも徹底されない恐れもあり、多方面から代替消毒方法が求められている。先の研究班では、米国の水道で実用化されているモノクロラミン（結合塩素の一種）消毒に着目し、入浴施設への適用について検討を開始した。本研究班では、さらに広範囲な泉質の消毒を目指し、入浴施設における実証試験を行う。モノクロラミンの注入方式、濃度の測定・維

持方式や、モノクロラミンによる配管洗浄方法など、衛生管理手法の詳細を検討する。

レジオネラ症の発生件数は夏期に多い傾向にありその理由として、冷却水からの感染の増加が推定される。また海外のレジオネラ症集団発生は、冷却塔を感染源とするものが主である。本研究では、実冷却水におけるレジオネラ属菌の存在実態を殺菌剤の種類別に調査し、各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果をモデル冷却塔で評価することにより冷却水系の消毒維持管理方法を確立する。また、冷却水のレジオネラ属菌をクローンライブラリー解析し、冷却水のレジオネラ属菌汚染の実態をより正確に把握する。更に、市中の空気中のレジオネラ属菌の調査方法を確立する。浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として広く用いられている培養法は結果を得るまでに 7 日から 10 日の長い時間を要する。患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時やレジオネラ属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、監視現場からより迅速で、かつ正確な検査が求められている。そこで、正確・簡便・迅速な培養結果を得る方法としての斜光法(森本洋：環境感染誌 25:8-14, 2010)をレジオネラ属菌検査の標準法に導入することを目的に従来の培養法との比較検討を行う。また、培養法は検査機関で結果が異なることがあり、検査法の標準化と研修、外部精度管理を行う。レジオネラ属菌遺伝子迅速検査法の標準化に向けた基礎的データを得るため、LC EMA qPCR 法（生菌検出法）、LAMP 法、パルサー法について、主に循環式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う。

レジオネラ症の主要な起因菌である *Legionella pneumophila* 血清群 1（SG1）について、浴槽水等さまざまな由来の環境分離株を収集し、その遺伝子型を解析して、臨床分離株の遺伝子型と比較し、臨床分離株の推定感染源との関連や、さまざまな環境の感染源の可能性を探る。岡山県以外では未検出か地域特異性の強い、*L. pneumophila* (以下、Lp) SG1 および SG3 の患者由来株の感染源を調査し、感染予防に役立てる。

レジオネラ属菌の宿主アメーバ感染の特性を明らかにすることは、環境中でのレジオネラ汚染の成立とその防止を考える上で重要である。本研究では、菌の遺伝子型とアメーバ感染特異性、菌感染における糖鎖の関与を明らかにする。また宿主アメーバの菌に対する高感受性を用いた高感度レジオネラ検出法の確立を行う。

B. 研究方法および材料

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

①各種因子の塩素剤に与える影響

アンモニア態窒素、ヨウ化物イオン、臭化物イオン、フミン酸、硫黄、鉄、マンガンイオンがモノクロラミンと遊離塩素に与える影響を、インドフェノール法、DPD 法でそれぞれの濃度を測定し調べた。

②モノクロラミン消毒の事前適合性試験

温泉源泉水の各 100 mL 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 となるよう添加し一定時間ごとに、モノクロラミン濃度と遊離塩素濃度を測定した。

③循環式入浴施設（営業施設）における検証試験（9 ケ所の施設）

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。また、入浴者が経気道および経皮的に取り込む化学物質暴露を評価するため、浴槽水と浴槽室内空気中の消毒副生成物(トリクロロメタン、N-ニトロソジメチルアミン（NDMA）等)の定量を行った。

2. 冷却水の殺菌剤別レジオネラ属菌検出実態

2013 年 4 月から 2014 年 12 月にかけて冷却水を採水し、レジオネラ属菌数を培養法により測定した。

3. モデル冷却塔を用いた各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果の評価

モデル冷却塔は保有水量 60L、循環水量

180L/hr、常時水温 30℃に維持し、つくば市水を 7L/day 補給する。

6 つの処理条件で評価した。運転期間中、pH 設定値の変更、休日の運転停止などの条件調整を行っている。1 週間に一度、理化学的項目の水質分析、レジオネラ属菌数、アメーバ数、ATP 濃度、一般細菌数、従属栄養細菌数を測定した。

4. クローンライブラリー解析による冷却水のレジオネラ属菌の多様性調査

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。

5. 遺伝子迅速検査

全国 6 か所の地方衛生研究所において、平成 26～27 年度に浴用施設から 424 検体の試料を採取した。平板培養法は新版レジオネラ症防止指針に準じ、各機関の方法で実施した。各遺伝子検査は、添付の取扱説明書に従い実施した。ただし、平成 26 年度の LC EMA qPCR 法については、酸処理を 4 分間とし、n=2 でリアルタイム PCR を実施した。

6. Sequence-based typing

全国 6 ブロックを代表する地方衛生研究所および国立感染症研究所から構築されるレジオネラ・レファレンスセンターにおいて、レジオネラ属菌の臨床分離株と LpSG1 の環境分離株を収集した。LpSG1 の遺伝子型別を行い、今年度までに sequence-based typing 法によるデータが得られた 751 株（臨床分離株 354 株、環境分離株 394 株）について、minimum spanning tree (MST) を作成した。

7. 大分県の浴槽水および湯口水検査

研究期間の 160 検体を対象とした。レジオネラ属菌の分離培地として WYOα 寒天平板（栄研化学）、GVPC 寒天平板(日研生物)、MWY 寒天平板（自家製；Oxoid）を用い、非濃縮処理の検水および各濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、その 200μL を各分離平板　1 枚にコンラージ棒で塗布し 36℃で培養した。平成 26 年度の 56 検体については、50℃　30 分加熱後、急冷した濃縮検体についても同様の培養を実施した。

培養でレジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYEα 寒天培地及び血液寒天培地に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、PCR 法での同定検査を行った。斜光法観察(培養 3 日目)後の分離培地は 36℃で 10 日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、同様の同定検査を行った。分離した菌株は、Legionella Latex Test Kit(OXOID)及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

8. 家庭環境と医療機関の給湯設備

平成 25～26 年度に、家庭環境における *Legionella* 属菌の汚染状況を調査した。平成 27 年度は、公衆浴場における *Legionella* 属菌の汚染状況調査および医療機関の給水設備における *Legionella* 属菌の汚染状況調査を実施した。

9. 宿主アメーバとの関係

遺伝子型の異なる Lp 分離株と環境分離の自由生活性アメーバを用いて実験感染を行い、菌遺伝子型のアメーバ適合性を調べた。Lp SG1 臨床株とアカントアメーバ ATCC30010 株を用い、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、凝集実験および菌-アメーバ感染実験により解析した。また、この感染実験系を用いて、微量の菌を確実に感染させ、その増幅を培養で確認する方法を検討した。

（倫理面への配慮）

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、個人情報保護に充分に配慮して行われた。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。研究機関の研究所倫理審査委員会で審査し、研究の承諾を得た。

C. 研究結果および考察

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

①各種因子の塩素剤に与える影響

モノクロラミン濃度の減少がほとんど見られなかったのは、アンモニア態窒素とフミン酸であった。鉄イオンは、遊離塩素だけではなく、モノクロラミン濃度の減少が見られたが、添加直後の消失はモノクロラミンのほうが少なかった。ヨウ化物イオンは、遊離塩素の方の濃度減少が少なかったが、ヨウ化物イオンはDPD法の測定に影響を及ぼすことから正しい遊離塩素濃度が測定できていない可能性が示唆された。臭化物イオンは減少速度が遅かったが、ヨウ化物イオンと同様の傾向を示した。硫黄はいずれの添加でも、直後に急速な塩素の消失が確認され、添加した塩素剤の消費後に、硫黄濃度が安定した。

②モノクロラミン消毒の事前適合性試験

種々の成分を含む温泉源泉水に、モノクロラミンと遊離塩素を添加すると、㋑遊離塩素の濃度は著しく減少、モノクロラミン濃度は安定（図 **1**）、㋺遊離塩素よりは失活が少ないものの、モノクロラミン濃度減少、㋩遊離塩素、モノクロラミンのどちらも大幅な濃度減少するものに大別できた。

③循環式入浴施設（営業施設）における検証試験

源泉水や井水（沸かし湯）において、モノクロラミン濃度が比較的安定していた施設9ヶ所を選出し、これら施設において、浴槽水のモノクロラミン濃度（3 mg/L）を維持する4週間以上の実証試験を行なった。気泡発生装置使用浴槽の 4 ヶ所も含めたすべての浴槽水からレジオネラやアメーバの検出はなく、塩素消毒臭の原因であるトリクロラミン、NDMA も含め消毒副生成物の生成は少なかった（**表 1**）。

注入方式の検討では、センサー注入方式、タイマー注入方式のいずれにおいても濃度が安定して維持されることが確認された。また、モノクロラミンの系内濃度は補給湯量の増減に影響を受けるが、利用者数には影響されないことが明らかとなった。

施設の現場でポケット水質計を用いて測定した浴槽水のモノクロラミン濃度（インドフェノール法）は、全塩素濃度（DPD 法）とほぼ同様な値を示した（**表 1**）。

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

①5 系等の回流装置を用いた洗浄試験

バイオフィルムを形成した観察板と上部配管ﾋﾀﾞ部の拭き取り検体で、洗浄 0.5 時間後で 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

高濃度モノクロラミン約 10mg/L（終濃度）で、2 時間の配管洗浄前後のろ過器内ろ材やヘヤー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、従属栄養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

約 10mg/L（終濃度）と約 20 mg/L の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やヘヤーキャッチャー接続配管内部の拭き取り検体を実施した。配管洗浄前後のろ過器の逆洗水やヘヤー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、洗浄前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、従属栄養細菌数も減少したことが確認された（**表 2**）。

また、排水前に必要な中和作業の薬剤としてチオ硫酸ナトリウムまたは亜硫酸ナトリウムが使用できることがわかった。

3. 冷却水の殺菌剤別レジオネラ属菌検出実態

殺菌剤の種類は、5-ｸﾛﾛ-2-ﾒﾁﾙ-4-ｲｿﾁｱｿﾞﾘﾝ-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-ペンタンジアール(グルタルアルデヒド)、及び塩素系（遊離塩素、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を集計した結果(総数 6664 検体)を図 2 に示す。レジオネラ属菌検出率は殺菌剤無処理が 52.5 %、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。無処理と比較すると、有機系殺菌剤処理ではレジオネラ属菌の検出率は明らかに減少しており、有機系殺菌剤はレジオネラ属菌抑制の効果が認められる．一方、塩素系は無処理と比較して 10000 CFU/100mL 以上の高菌数のレジオネラ属菌が検出される割合が 4.6 %から 8.7 %に上昇しており、塩素系薬剤は冷却水系のレジオネラ属菌抑制効果が不十分である。

4. モデル冷却塔を用いた各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果の評価

無処理冷却水では、一旦レジオネラ属菌が定着すると継続して検出されることが確認された。処理方式別では、結合塩素処理は循環水中の結合塩素濃度を 3mg/L 維持してもレジオネラ属菌及びアメーバを抑制できず、無処理よりも高い菌数となることもあった。CMI＋カチオン処理は、運転停止などの影響を受けず、安定してレジオネラ、アメーバを不検出に維持した。これは、殺菌効果を有するとともに効果の持続性(分解しにくい)が寄与していると考えられた。遊離塩素処理は、運転停止期間や夜間の循環停止で残留塩素濃度が無くなることに加えて、pH8.7 の条件ではアメーバ、レジオネラ属菌を抑制できなくなった。

5. クローンライブラリー解析による冷却水のレジオネラ属菌の多様性調査

11 検体の冷却水と、3 検体の浴槽水のクローンライブラリーの解析結果より、冷却水で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。一方、浴槽水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の割合が低い傾向にあった。クローンライブラリー解析の結果から、冷却水中に存在するレジオネラ属菌の 80%以上は既存種に該当しない未知のレジオネラ属菌だと予測できる。これは、培養法では冷却水中に存在するレジオネラ属菌の一部しか検出できないことを示している。

浴槽水では 111 検体中 q-PCR 法で 56 検体の不一致（培養法検査「陰性」、遺伝子検査「陽性」）が、EMA 処理により 23 検体に減少した。一方、冷却水の場合は、82 検体中 q-PCR 法 53 検体の不一致は EMA 処理によっても 53 検体のままであった。冷却水で EMA の効果が得られない原因は、今回のクローンライブラリー解析の傾向から推定される通り、冷却水中に多く存在する培養不能の未記載のレジオネラ属菌であることが考えられた。

6. 市中の空気中のレジオネラ属菌調査

サイクロン式エアサンプラー(コリオリス μ)を使用して、4 台中 3 台の冷却塔水からレジオネラ属菌の生菌、遺伝子ともに検出した。冷却塔の内部と外部の空気を 300 L/min で 10 分間採集した。すべての捕集液からレジオネラ属菌の遺伝子が検出され、冷却水中のレジオネラ属菌遺伝子量が多いほど空気中のレジオネラ属菌遺伝子量が多かった。また、2 台の冷却塔の内部の空気から 25 CFU/m^3、 5 CFU/m^3 のレジオネラ属菌の生菌を検出した。

市街地での空気採集は定点採集ではなく、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 10 分間または 20 分間採集した。採集日は 2015 年 9 月 21 日、東京地方の天気は晴れ、東の風 3 m/s。各採集エリアおよび移動時に採集した捕集液中のレジオネラ属菌検出結果を図 3.に示す。渋谷駅周辺、新宿駅周辺、銀座周辺、および池袋駅周辺で採集した捕集液からは 10 から 100 copies/m^3 のレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。国道 294 号では都内の繁華街と同レベルのレジオネラ属菌の遺伝子を検出したのは、9 月 10 日に発生した水害の影響と考えられた。各採集場所の捕集液から培養法によりレジオネラ属菌の検出を試みたが、何れの捕集液からもレジオネラ属菌の生菌は検出しなかった。

7. レジオネラ属菌迅速検査法の改良と評価

平成 26 年度は、LC EMA qPCR 法の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（10 CFU/100 ml 以上を陽性）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、LC EMA qPCR 法と平板培養法で高い相関を示した。また、LC EMA qPCR 法と平板培養法の菌数（定

量値）の比較においても R^2=0.6176 と高い相関を示し、LC EMA qPCR 法は全体として平板培養法の菌数を反映していた。一方、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）であり、いずれも LC EMA qPCR 法より低かった。

平成 27 年度は、LC EMA qPCR 法は、平成 26 年度と同様に平板培養法と高い相関を示した。また、LAMP 法の平板培養法に対する感度は 83.7%（41/49 検体）、特異度は 81.4%（114/140 検体）であり、LC EMA qPCR 法と同等であった。一方、パルサー法の平板培養法に対する感度は 41.4%（24/58 検体）、特異度は 76.4%（123/161 検体）であり、他の迅速検査法と比較して感度が低かった。

8. 精度管理、標準的検査法、研修システム

精度管理を継続的に実施するためには、目的に合った配付試料を適切に作製する必要が不可欠である。このことから、シスメックス・ビオメリュー社の BioBall を利用し、製品保証された試料での外部精度管理を試みた。精度管理ワーキンググループ（WG）推奨法での外部精度管理実施により、結果のバラツキが大きく解消された。最終年度は、外部精度管理実施主体を民間会社とし、官民問わず幅広い外部精度管理を試みた。WG 推奨法の標準的検査法を提示し、その周知を含めた研修会を国立保健医療科学院主催の「新興再興感染症技術研修」、厚労省主催の「生活衛生関係技術担当者研修会」ほか、で行った（項目 F. 研究発表の研修会を参照）。

9. 分子疫学 sequence-based typing

MST 解析により、LpSG1 分離株の遺伝子型の分布を見ると、互いの遺伝子型が似通っているいくつかの clonal complex が存在し、大きな clonal complex 中には環境分離株と臨床分離株が混在していたが、clonal complex 毎に、優勢となる環境分離株の由来が異なっていた。主要な clonal complex は 9 つあり、すなわち、浴槽水分離株が優勢であるグループ B1、B2、B3、土壌および水溜りからの分離株が優勢であるグループ S1、S2、S3、冷却塔水分離株が多いグループ C1、C2 の 8 つに加えて、臨床分離株が多く、環境分離株が少ないうえにその由来がさまざまであるグループ U の 9 つである。地方衛生研究所からレジオネラ・レファレンスセンターに送付された臨床分離株について、MST 解析で明らかになった遺伝子型分布図のどこに位置するかを報告することにより、その情報が、保健所や病院に還元された（図 4）。

10. 環境中のレジオネラ属菌の棲息状況

レジオネラ属菌の検出率は、河川水、土壌では、アメーバとの供培養（35°C 1 か月）で、それぞれ 26/71 検体（28.4%）、34/97 検体（35.1%）であった。分離された *Legionella* 属菌は、河川水では Lp SG6, SG1 が多く、土壌では SG8, SG1 が多かった。また、車のウインドウウオッシャー液では、その検出率は 18/193 検体（9.3%）で、*L. moravica* (12 検体)、Lp SG5(4 検体)等が分離された。陽性検体は、確認できたもので、タンクに水のみが補充されていた。*Legionella* 属菌は市販のウインドウウォッシャー液中では、およそ 10 分で発育しなくなることがわかった。一方、浴用施設のシャワー水については、25/111 検体（22.5%）で、Lp SG5 がもっとも多くの検体から分離された。環境から分離された *Legionella* 属菌 51 株の SBT では、ST は 26 型が認められ、ST763(6 株)のほか、ST505（2 株）および ST120（1 株）が認められた。

富山県における *Legionella* 属菌の棲息状況が明らかとなり、患者から良く分離される ST505 や、感染源不明症例からの分離頻度が高いとされる ST120 などが環境中から分離されたことは、環境調査が有用であることを示した。感染源調査の中に取り入れるなどの検討が必要であると思われた。シャワー水での *Legionella* 属菌の検出率 22.5%は、ミストの発生リスクから、監視指導を強化する必要性を示唆する。一方、喀痰の検査については、菌が分離されない検体からも遺伝子型を決定できる、すなわち、感染源を大まかに推定することが可能であることが明らかとなり、喀痰を収集することの重要性を示すものと考える。

11. 大分県の浴槽水・湯口水の検査 斜光法と

培養条件、迅速検査

160 検体中 77 検体（48%）からレジオネラ属菌が検出された。内訳は「掛け流し施設」では浴槽水 53 検体中 32 検体（60%）、湯口水 51 検体中 20 検体（39%）で、「循環式施設」では浴槽水 29 検体中 11 検体（38%）、湯口水 27 検体中 14 検体（52%）であった。

浴槽水と湯口水ともにレジオネラ属菌が検出された施設は 25 施設、浴槽水（＋）湯口水（－）となった施設は 13 施設、浴槽水（－）湯口水（＋）となった施設は 8 施設であった。

レジオネラ属菌が検出された 77 検体について分離培地の検出感度を比較した。濃縮未加熱検体では、使用した 3 種類の分離培地全てから分離されたものが 45 検体、WYOα＋GVPC からの分離が 4 検体、等であった。濃縮加熱検体では、3 種類の分離培地全てから分離されたものが 53 検体、WYOα＋MWY からの分離が 2 検体等であった。

レジオネラ属菌が検出された大分の 77 検体について、使用した分離培地 WYOα、GVPC、MWY の個々で分離状況をみると、レジオネラ属菌を感度よく分離するためには、レジオネラ属菌の発育特性に配慮し、選択性の異なる培地を併用することが望ましい。また、未加熱の濃縮検体では 67 検体から、加熱処理では 71 検体からレジオネラ属菌が分離され、処理工程を併用することにより、効率よくレジオネラ属菌が検出された。各種分離培地の併用や雑菌処理工程の併用など培養チャンスを多くすることが検出率アップにつながり、レジオネラ感染症の危険性を回避することに貢献できると考える。

斜光法は培養 3 日目を判定日とし、特徴あるモザイク状のコロニーについて確認検査を行った。その結果、レジオネラ属菌が検出された 77 検体のうち 71 検体は斜光法（3 日目）で確認することができたが、6 検体は継続培養後にレジオネラ属菌が確認された。継続培養で陽性となった 6 検体から分離されたレジオネラ属菌は、4 検体は Lp、1 検体は *L. quinlivanii*、1 検体は *L. micdadei* であった。

斜光法は高価かつ特殊な機器を必要とせず、簡便で迅速な結果が得られる培養法として、非常に有用な方法である。培養 7 日以降で発育を認める検体もあったため、培養 3 日目で培養検査を打ち切ることはできないものの、培養にかかる日数の短縮、検査精度向上の観点からも導入に向けた研修を行うことは意義がある。今後は、LAMP 法で得られた結果と斜光法の培養結果を合わせて迅速な行政対応を行い、10 日間引き続き培養を継続し、最終結果として判断することが可能と考える。

加熱による雑菌処理時間について検討したところ、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。このことから、加熱による雑菌処理には 20 分間加熱が適当と考えられる。雑菌が多いと考えられる検体については、雑菌処理に酸処理を組み合わせるなどの工夫が必要と考える。

濃縮検体 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行い、1 回でも陽性となった場合は、その結果を採用した。13 検体が培養（＋）LAMP（－）の不一致の結果となった。13 検体のうち 5 検体は、培養菌数が 5cfu/100ml で 10cfu/100ml 未満であった。残り 8 検体中 6 検体は 20cfu/100ml から 50cfu/100ml、2 検体はそれぞれ 150cfu/100ml、500cfu/100ml のレジオネラ属菌が検出された。菌数・菌種・泉質による影響が考えられる。

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。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。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、Lp、*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。泉質による影響が考えられる。

12. 岡山県の調査 地域特異的な遺伝子型

患者から分離された株のうち、地域特異的な菌株は、Lp SG3 ST93 と、Lp SG1 ST609 及び 1077 であった。県内の浴槽水等 282 検体について検査した結果、69 検体(24.5%)からレジオネラが検出され、Lp SG1 及び SG3 も多数検出された。しかし、患者と同じ ST の株は検出されず、PFGE パターンや MST による解析では、患者株は環境由来株に比べユニークであることがわかった。

倉敷周辺で患者由来の Lp SG3 は 9 株すべてが同一の ST93 であるが、分離時期や患者住所などは異なっており、疫学的な共通性は見いだせていない。したがって、網羅的に環境材料を調査したが、今まで調査した検体からは検出されなかった。特に浴槽水は多数の検体について調査をした結果検出されなかったため、感染源として浴槽水は否定できると推察された。患者発生時に、患者宅の調査の実施も視野に入れて、積極的な疫学調査を行う必要があると思われた。

13. 家庭環境と医療機関の給湯設備

家庭環境における *Legionella* 属菌汚染実態調査では、水試料 149 検体中 77 検体（51.7%）が LAMP 法陽性であり、9 検体（6.0%）から *Legionella* spp.を検出した。スワブ検体では 90 検体中 17 検体（18.9%）が LAMP 法陽性で、3 検体（3.3%）から *Legionella* spp.が検出された。特に洗濯機と水槽の陽性率が高かった。公衆浴場と医療機関の調査ではそれぞれ 3 施設を調査対象とした。公衆浴場では 1 施設からは *Legionella* 属菌は検出されず、1 施設ではカランとシャワーから *Legionella* spp.が、1 施設では浴槽水と浴槽壁から Lp が検出された。医療機関では、すべての医療機関の給水・給湯系から *Legionella* spp.が検出され、検出率は 14.3～35.7%であった。

14. 成果普及

レジオネラ感染症発生の予防を目的として、公衆浴場等の入浴施設の衛生管理等について、これまでに厚生労働科学研究費補助金事業により国立感染症研究所、国立医薬品食品衛生研究所および地方衛生研究所等の研究者が参加して実施した研究の成果をワーキンググループを立ち上げて抽出した。取り上げられたのは、塩素系薬剤による消毒法、レジオネラ属菌検査法、洗浄効果の簡易判定法、レジオネラ属菌汚染の指標としての浴槽水中の浮遊菌の ATP 測定であった。これらの成果を、厚生労働省の発出した通知等の内容と照らし合わせ、現在の入浴施設等の状況を勘案しながら、衛生管理に有効な内容を取り上げ、活用されることを提案した。「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」の改正通知に反映された。

15. 宿主アメーバとの関係

環境および臨床検体由来の Lp に対し、アカントアメーバ株はすべて感染し、アメーバの中で最も高い菌への感受性を示した。アカントアメーバに対するレクチン 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。菌とアメーバ感染実験系では、ConA に感染促進作用が、一方 WGA に感染阻害作用がある可能性が示された。糖質としては多糖類に阻害作用の可能性が示された。なお、アメーバ増殖培地である PYGC に強い感染阻害作用が認められた。Lp 高感受性のアカントアメーバを単層に接着させたマイクロプレート法で、最少量のメディムで確実な菌の取り込みを図り、約 10 cfu/0.1ml の条件で、培養 2 日で多量に増菌されることを確認した。

菌の遺伝子型グループ（亜種レベル）による宿主アメーバ適合性が異なることが示され、環境中のレジオネラ属菌の分布、生態の決定要因にアメーバ相が関与しているものと考えられた。中でもアカントアメーバは最も重要な環境因子として作用するものと考えられる。感染には菌の接着が必須となるが、これに関与する糖鎖は特定できなかった。ただ感染試

験は結果を定量化できることが分かり、さらに多くのレクチン、糖類の作用を比較するのに役立つと考えられた。培養が困難な検体からレジオネラ属菌を分離する方法として、アメーバを増殖装置として利用することができる。生きたレジオネラ属菌を確保することで、より精確な環境あるいは感染減調査が可能になるものと期待できる。

D. 結論

浴槽水の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、消毒効果が長期間持続し、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、人体に有害な消毒副生成物の生成が少なく、不快な塩素臭を低減できることなど利点が多い。遊離塩素消毒が困難な場合、本消毒法の試行が有用である。

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。殺菌剤処理により検出率は低下するが、塩素系では高菌数が検出され、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、Lp のクローンが多く検出されており、多様性は低かった。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。

サイクロン式エアサンプラー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。冷却塔の付近の空気中からレジオネラ属菌が検出され、市街地の空気からもレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。

主に循環式浴槽水を対象とした場合、各市販迅速検査キットの特徴を理解することで、目的に応じて使い分け、信頼性の高い結果が得られると考えられた。

WG 推奨法は精度の高い検査法であり、公衆浴場法で適切に位置付けられることにより、全国的に検査精度が安定し、レジオネラ症発生予防に繋がると考えられる。外部精度管理の実施母体を民間にすることで、継続的な調査実施に向けた流れを作ることができた。今後は、継続的な研修会が開催できるよう、実施母体、講師育成、経費等を含めた検討が必要と思われる。

入浴施設における浴槽等の清掃・消毒効果を確認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、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 10 cfu 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考える。

Lp SG1 株の臨床分離株と環境分離株について、遺伝子型別を行い、環境分離株の由来により遺伝子型に特徴があることが明らかとなり、臨床分離株がとられたレジオネラ症患者の感染源の種類とも相関があることが推測された。

岡山県内のレジオネラ患者から検出された Lp SG3 (ST93)と、Lp SG1 (ST609 及び ST1077)は地域特異的なレジオネラであった。多種類の検体や多数の浴槽水について、調査したが、同一の ST は検出されず、感染源は不明である。

Legionella 属菌は水環境に広く生息する病原細菌であるが、家庭環境や医療機関においても汚染していることを示すことができた。国内外で感染事例が報告されており、今後は、家庭や医療機関における対策を検討する必要がある。

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: The diagnostic utility of splenial lesion in a case of Legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 2. Intern Med, 54(23):3079-3082, 2015.

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) Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M: Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. Appl. Environ. Microbiol. 79(13):3959-3966, 2013.

6) Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M: Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama prefecture, Japan. J. Infect. Chemother. 19(4):644-52, 2013.

7) 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。

8) 倉　文明:レジオネラ症の国内外の動向、ビルと環境 149:36-44, 2015.

9) 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

10) 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.

11) 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. pmeumophila* 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.

12) 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)

13) 三橋 徹, 五十嵐 悠, 大幡 保夫, 川田葉子, 鈴木 かおる, 小野 嘉之, 古藤 絵美, 小寺 由美, 加藤 愛矢, 牛頭 文雄, 渡辺 昭嘉, 荒井 桂子：太陽熱温水器で加温された給湯水によるレジオネラ症感染事例について、生活と環境 58 巻 12 号 62-64 (2013)

14) 杉山寛治：浴槽水のモノクロラミン消毒による衛生管理,公益財団法人中央温泉研究所第 53 回温泉保護・管理研修会テキスト,13-1～13-4 (2013)

15) 倉　文明、前川純子：レジオネラ症-最近の多様な感染源、病原微生物検出情報 34(6):169-70, 2013.

16) 黒木俊郎、渡辺祐子、寺西　大、佐々木美江、藤田雅弘、荒井桂子、杉山寛治、磯部順子、中嶋　洋、田栗利紹、緒方喜久代、倉　文明：ATP 測定による入浴施

設の衛生管理・レジオネラ汚染リスク評価、病原微生物検出情報 34(6):167-8, 2013.

17) 井上浩章, 高間朋子, 石間智生, 縣邦雄：各種水利用設備のレジオネラ属菌検出実態，防菌防黴誌．Vol.41, NO.12, pp659-661(2013)

2. 学会発表

1) 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.

2) 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.

3) Amemura-Maekawa J, Chida K, Ohya H, Isobe J, Kanatani J, Tanaka S, Nakajima H, Yoshino S, Ohnishi M, Kura F: Genetic features of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* SG1 in Japan. ESGLI 2015. London. September 2015.

4) 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.

5) 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.

6) Amemura-Maekawa J, Koyano M, Yamazaki T, Murai M, Ohnishi M, Kura F: Identification of *Legionella pneumophila* subspecies in clinical and environmental isolates in Japan using the microplate DNA-DNA hybridization method. The 8th International Conference on Legionella 2013. Melbourne. October 2013.

7) Kura F, Amemura-Maekawa J, Ohnishi M, Saito T, Kinoshita H, Yoshikura H, Sunagawa T, Ohishi K: Epidemiology of legionellosis in Japan, Jan 2008 ~ Dec 2012. The 8th International Conference on Legionella 2013. Melbourne. October 2013.

8) Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M: Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. The 8th International Conference on Legionella 2013. Melbourne. October 2013.

9) Sahara K, Sugiyama K, Agata K, Eguchi D, Ichimura Y, Jinno H, Kosaka K, Izumiyama S, Yagita K, Katayama F, Tomita A, Michikoshi Y, Yagi M, Tanaka Y, Endo T, Kura F: Sanitary control of circulating bath water by Monochloramine disinfection. The 8th International Conference on Legionella 2013. Melbourne. October 2013.

10) 前川純子、倉　文明、村井美代、大西真：*Legionella pneumophila* の血清群 1 の PCR によるサブグルーピング、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月、大阪市.

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) 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.

13) 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.

14) 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、江原広里、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、2015年9月、大阪府.

15) 杉山寛治、長岡宏美、片山富士男、和田裕久、江原広里、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、2015年9月、大阪府.

16) 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 法を行なったレジオネラ肺炎症例、第89回日本感染症学会総会・学術講演会、2015年4月、京都.

17) 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.

18) 井上浩章，藤村玲子，縣 邦雄，太田寛行: 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、2014年9月、東京都.

19) 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.

20) 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：ウインドウウオ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.

21) 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)

22) 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)

23) 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.

24) 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.

25) 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.

26) 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)

27) 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

28) 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.

29) 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.

30) 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.

31) 杉山寛治：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 (2013)

32) 倉　文明：レジオネラ症に関する最新の知見、地研全国協議会関東甲信静支部平成 25 年度細菌研究部会総会・研究会、招請講演、2014年2月、東京都.

33) 田原麻衣子，香川(田中)聡子，岡元陽子，杉山寛治，五十嵐良明，倉 文明，神野透人: LC/MS/MS を用いた直接分析法による水中のハロ酢酸類の定量．日本薬学会第 134 年会 (2014.3, 熊本)

3. 研修会

1) 杉山寛治：モノクロラミン消毒法の活用，第23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, 2013年6月12日，東京.

2) 緒方喜久代、森本　洋、磯部順子、倉　文明：レジオネラ症総論、環境・臨床材料からのレジオネラ属菌の分離培養法について、レジオネラ属の培養法のコツと注意点；実習　ろ過濃縮・プレート処理、顕微鏡観察、九州地区レジオネラ実技研修会、関東化学主催、2013年8月23日、久留米

3) 磯部順子、金谷潤一、緒方喜久代、森本　洋、倉　文明：レジオネラ症総論、富山県における環境・臨床材料からの分離状況、培養法概論と斜光法について、大分県における浴槽水検査の実際；実習　ろ過法・培養法・顕微鏡観察、レジオネラ検査研修会、富山県衛生研究所主催、2013年9月27日、富山

4) 磯部順子、神野透人、渡辺祐子、中臣昌広、倉　文明：民間検査機関に向けたレジオネラ属菌培養検査法の研修、モノクロラミン消毒による消毒副生成物の低減について、家庭内におけるレジオネラ検出状況、ホテル給湯系のレジオネラ属菌検出時の対応事例（文京区）、国際的なレジオネラ対策の動向、平成 25 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2014年3月5日、東京

5) 森本　洋、倉　文明：レジオネラ症総論、レジオネラ症を予防するために、レジオンラ属菌培養法、斜光法を利用したレジオネラ属菌培養法実習、「レジオネラと環境衛生」研修会、福岡市保健環境研究所主催、2014年3月 13-14日、福岡市

6) 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

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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

11) 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