

研究要旨：公衆浴場等の水系施設における不適切な衛生管理は、重篤な肺炎等となるレジオネラ症等の感染症の原因となる。そこで、公衆浴場等の水系施設の適切な消毒法の検討とその効果の実証を行う。また、水系施設の衛生状態を確認するためにレジオネラ検査は不可欠であり、その改良、評価を行っていく。これまでに成果を上げてきた消毒法や検査法の改善点について、どのように還元し、普及を目指すかも課題である。今年度は以下の研究を実施した。

社会福祉施設の入浴設備にモノクロラミン消毒装置を設置し、適用終濃度 3 mg/L のモノクロラミン管理を行うことで、レジオネラ不検出を維持できた。週 1 回 2 時間、レジオネラに有効であった 10 mg/L モノクロラミンによる配管洗浄を併用していたが、時間の経過とともに高い従属栄養細菌数が検出された。従属栄養細菌の出現状況や種類は施設により異なっており、分離菌株の殺菌試験の結果、20 mg/L のモノクロラミン消毒による対策が必要と考えられた。また、25M プールのモノクロラミン消毒を実験的行なったところ、塩素臭がなく、一般細菌、レジオネラは不検出であった。

入浴施設のシャワーから生じる飛沫は、利用者が吸い込む危険があり、給湯系の衛生管理は重要である。レジオネラ属菌が継続して検出された入浴施設のカラン、シャワーは、高濃度塩素処理により、不検出となった。3 医療機関の水道水試料を検査したところ、全機関からレジオネラ属菌が検出された。給水・給湯系の構造、材質などの調査と、水質の理化学検査を行なったが、レジオネラ属菌の菌数、菌種等との相関は不明であった。給水の末端では残留塩素濃度が不十分になることがレジオネラ属菌検出の最大の要因と考えられ、調査対象の 1 医療機関について、受水槽に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置した。

浴槽水、シャワー水における *Legionella* 属菌の汚染率は、浴槽水で 8/40 検体 (20.0%)、シャワー水で 10/29 検体 (34.5%) であった。河川水はアメーバ共培養法で 6/20 検体 (30.0%) から、*Legionella* 属菌が検出された。道路沿い、浴室中の空気を捕集し、検査したところ、*Legionella* 属菌は分離されなかったが、それぞれ 7 割前後の検体から *Legionella* 属菌の遺伝子が qPCR により検出された。

試作された抗 *Legionella pneumophila* 血清群 1 抗体結合免疫磁気ビーズを用いて、通常の培養検査では分離されなかった *L. pneumophila* 血清群 1 を入浴施設の浴槽水から分離することができた。本手法は、レジオネラ症患者発生時の感染源特定の一助となると考えられた。

レジオネラ属菌迅速検査法として、qPCR 法、EMA qPCR 法、PALSAR 法、LAMP 法、LC EMA qPCR 法について、浴槽水などの実検体 349 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。LC EMA qPCR 法が、平板培養法の菌数を反映している方法であると考えられた。比色系パルサー法については、検水を注射筒を用いてフィルターでろ過後、そのフィルターごと細菌処理する方法について検討し、良好な結果を得た。

従来用いられてきた *L. pneumophila* の遺伝子型別法である SBT 法よりも簡便で、かつ同等以上の識別能力をもつと期待される MLVA 法の検討を行った。Sobral らの 12 領域について、PCR 条件を改良した。SBT 法では 32 種類の ST (sequence type) に分けられた臨床由来の 48 株について、

MLVA 法による解析を行ったところ、36 の MLVA タイプに分類でき、本法の有用性が確認された。

公衆浴場における水質基準等に関する指針について、検討の結果、原湯等における糞便汚染指標菌を大腸菌群から大腸菌に変更し、大腸菌検査に特定酵素基質法を適用することは妥当と考えられた。

培養アカントアメーバに *L. pneumophila* を感染させる際に、ヘパリンなどの硫酸基を分子構造中に一定の割合で含む硫酸化多糖を添加すると感染率が上昇することを見出した。同じ高分子糖鎖で非硫酸化多糖のヒアルロン酸は、逆に感染抑制の作用を示した。

民間会社が実施した外部精度管理サーベイについて、助言を行い、方法の改善を図った。公的、民間合わせて全国 165 の検査機関が参加し、本研究班からは 71 地衛研が参加した。昨年度同様ろ過濃縮による報告結果が良い傾向にあった。開催されたいくつかの研修会において、斜光法を含めたレジオネラ属菌標準的検査法の普及に努めた。

研究分担者・所属機関及び職名

泉山信司・国立感染症研究所主任研究官
 長岡宏美・静岡県環境衛生科学研究所細菌班長
 黒木俊郎・神奈川県衛生研究所微生物部長
 森本 洋・北海道立衛生研究所主幹
 磯部順子・富山県衛生研究所副主幹研究員
 佐々木麻里・大分県衛生環境研究センター主任研究員
 中西典子・神戸市環境保健研究所研究員
 八木田健司・国立感染症研究所主任研究官

養法に対して、1~2 日で結果が得られる迅速検査法が期待されることから、迅速検査法の妥当性を検証する。培養法についても、実検体での検査を重ね、改善を目指す。モノクロラミン消毒等による入浴施設等の衛生管理を実践して、問題点を明らかにして、有効な消毒法を示す。汚染源は半数が入浴施設に関連し、残り半分は不明とされることから、並行してレジオネラ属菌汚染実態調査、さらにレジオネラ分離株の特徴付けを行なう。レジオネラ検査実施機関に対して、外部精度管理や研修を行うことで、レジオネラ検査の質の向上を図る。研究成果を通じて、レジオネラ症対策が進み、安心して入浴できる施設が増えることが期待される。

A. 研究目的

水環境で増殖するレジオネラ属菌は、そこから生じるエアロゾルを介して感染し、重篤な肺炎やポンティアック熱を引き起こすため、特に公衆浴場を中心とした水環境で問題となっている。公衆浴場等のレジオネラ症対策の向上のために、レジオネラ検査法と消毒法の改善、開発、およびその普及が急務である。従来の 1~2 週間を要する培

B. 研究方法

各研究項目は、1 から数名の研究分担者及び研究協力者(表 1)が参加し、実施された。レジオネラ属菌の検出・定量は新版レジオネラ症防止指針に準じて行なった。遺伝子検査法である qPCR 法と LAMP 法は、複数の研究項目で実施された。

表1 研究協力者一覧

青木信和	ケイ・アイ化成株式会社	神田 由子	大分県衛生環境研究センター	原口 浩	株式会社フ雄スマック
縣 邦	アクアス株式会社	倉 文明	国立感染症研究所	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
一ノ瀬 和也	大分県衛生環境研究センター	小坂浩司	国立保健医療科学院	松尾千秋	川崎市健康安全研究所
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	杉山寛治	株式会社マル恵	武藤 千子	東京都健康安全研究センター
江口大介	ケイ・アイ化成株式会社	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所	森中 りか	株式会社ファスマック
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	田栗利紹	長崎県環境保健研究センター	山口友美	宮城県保健環境センター
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	田中 忍	神戸市環境保健研究所	吉崎 美	タカラバイオ株式会社
小澤 賢介	デンカ生研株式会社	千田恭子	仙台市衛生研究所	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
金谷潤一	富山県衛生研究所	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
壁谷美加	浜松市保健所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所
川野みどり	長崎県環境保健研究センター	野本竜平	神戸市環境保健研究所		

qPCR 法は、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。LAMP 法は、Loopamp レジオネラ検査キット E(栄研化学)を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。各研究項目の研究方法を以下に記した。

1. モノクロラミン消毒実証試験

(1) 社会福祉施設の入浴設備へのモノクロラミン消毒の適用：沸かした水道水を循環し、男女浴槽に使用するとともに、その一部をデイサービス個浴槽に配湯し、掛け流し的な利用を行っている入浴設備について、モノクロラミン濃度を 3 mg/L に維持する 6 週間の消毒実証試験を行なった。本施設は、ろ過器と、気泡発生装置と、炭酸カルシウム天然石入りの人工温泉装置を備えており、レジオネラ症患者が利用したとの届出があった。モノクロラミンは営業日の循環開始後（午前 8 時）から、ほぼ 1 時間 30 分間隔で計 8 回、タイマーで間欠的に注入された。夜間（午後 7 時半～翌日の午前 8 時）は循環と消毒を停止した。毎週土曜日にモノクロラミン濃度 10mg/L、2 時間循環による配管洗浄を実施し、その後換水した。毎週水曜日の朝 9 時に、男浴槽、デイサービスの個浴槽配管水(配管内水を 2 分排水後に採水)、デイサービスの配管滞留水(配管内水の排水なしで採水)の 3 カ所から採水し、微生物検査を行なった。浴槽水のモノクロラミン濃度、遊離アンモニア濃度をポケット水質計 PC (HACH 社)でインドフェノール法により測定し、全塩素濃度は MD100 残留塩素計 (Lovibond 社)を用いて DPD 法により測定した。一部の検水については、ジクロラミン、トリクロラミン濃度を測定した。

(2) 微生物検査法：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)および従属栄養細菌(R2A 寒天培地(ニッスイ))や一般細菌数(標準寒天培地(栄研化学))については常法により定量したが、従属栄養細菌の培養については浴槽水に近い温度の 37℃で、7 日間とした。

(3) 従属栄養細菌に対する殺菌効力試験：モノクロラミン消毒を過去に実施した 2 施設から分離

された従属栄養細菌を R2A 培地で画線培養にて増殖させ、滅菌水中で懸濁後、リン酸緩衝液(pH7.2)で $10^5 \sim 10^6$ に希釈したものをを用いた。この菌液 10mL に対し各薬剤を所定濃度添加し、30 攪拌条件下で 30 分および 120 分後の菌数を測定した。なお、菌数測定にあたっては、試験菌液 1mL に薬剤不活化液(滅菌した SCDLP 培地にカタラーゼを 0.2% 添加したもの)9mL を添加し消毒剤を失活させた後に、滅菌水で段階希釈して R2A 培地に接種し、37℃、7 日間培養した。モノクロラミン添加系の試験液濃度は、その 1mL を滅菌水 9mL で希釈し、その全量をインドフェノール法で測定した。一方、遊離塩素添加系については、試験液 0.5mL を滅菌水 9.5mL で希釈し、その全量を DPD 法で測定した。

2. 水泳プールのモノクロラミン消毒

廃止予定となっていた国立健康栄養研究所内の水温約 30℃、270m³ の屋内水泳プールを借用した。利用はなかったが、循環ポンプによる遊離塩素消毒管理が行われていたので、次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加を中止し、遊離塩素濃度が 0.2mg/L を下回った後に、モノクロラミン消毒を開始した。水道水に次亜塩素酸ナトリウム溶液と硫酸アンモニウム溶液を加えて混合し、モノクロラミンの自動生成と添加をするクロラクター装置(ケイアイ化成)をプールサイドに設置した。ポーラログラフ法による全塩素濃度の測定を行い、フィードバック制御により必要に応じて追加塩素を行い、全塩素濃度(モノクロラミン濃度)が維持される様に設定した。注入するモノクロラミンは、プール全体に行き渡るように、プール底の吸引口に導入した。モノクロラミン、アンモニア態窒素、遊離塩素濃度、全塩素濃度、濁度、過マンガン酸カリウム消費量を採水して測定した。微生物検査は上記 1. (2)と同様に行なった。

3. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

神奈川県内の 1 入浴施設の浴槽水、湯口水、蛇口水、シャワー水を、3 医療機関と 1 研究機関の洗面台の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。給水・給湯系の構造、配管の材質等も調査した。水試料の理化学項目は定法に従って測定した。

4. 感染源解明のための環境調査

(1) 検体：平成 28 年 9 月～12 月に公衆浴場 11 施設で浴槽水 40 検体、シャワー水 29 検体を採取した。5、6、9、10 月に、富山市内を流れる 4 河川 5 地点で河川水 20 検体を採取した。エアースンプラー（コロオリス μ ）を用いて、6 月～11 月の主に雨天の日に、富山県内 12 地点の道路沿い（99 検体）および、10 月～12 月にかけて 12 の浴用施設の浴室内（16 検体）で、15 mL の溶液（0.005% Tween 80）中に 300 L/min の条件で 10 分間エアロゾルを捕集した。

(2) アメーバ共培養法：濃縮液 1 mL に PYGC 培地で 30 1 週間培養したアメーバ増菌液を添加し、35 で 1 か月培養した。培養液を酸処理後、GVPC 培地にコンラージ棒で広げて、35 で 7 日間培養した。

(3) 免疫磁気ビーズ（IMB）を用いた選択的濃縮法による *Legionella pneumophila* 血清群 1（Lp1）の分離：Lp1 を 5 菌株、*L. pneumophila* 血清群 5、血清群 6、*L. bozemanii*、*L. cherokeei*、*L. anisa* 各 1 菌株、計 10 菌株を用いて、滅菌生理食塩水にてマックファーランド 2.0 に調整し、その -5 乗もしくは -6 乗まで 10 倍段階希釈し、菌懸濁液を作製した。また、*L. pneumophila* の 2 血清群または *L. pneumophila* と他の菌種の懸濁液をそれぞれ 1:1、あるいは 1:9 に混合した。浴槽水検体もしくは菌懸濁液 1 mL にデンカ生研で作製した IMB 1 滴（およそ 25 μ L）を滴下し、10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸着させた。ビーズを磁石で集め、滅菌生理食塩水で洗浄した。この操作（洗浄）を 2 回実施した後、最終的に生食 100 μ L もしくは 200 μ L に懸濁、ボルテックスでよく混和し、IMB 検体とした。この IMB 検体 100 μ L を BCYE- α 培地、GVPC 培地のどちらか 1 枚もしくは両方にコンラージ棒で広げ、35 で 7 日間培養した。

(4) Sequence-Based Typing 法による遺伝子型（ST）の決定：European Working Group for *Legionella* Infections の方法に従って実施した (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)。

5. レジオネラ生菌迅速検査法の評価

全国 6 か所の地方衛生研究所において、平成 28 年度に浴用施設などから採取された 349 検体（浴槽水 259 検体、湯口水 15 検体、シャワー水 30 検体、その他 [採暖槽水、プール水など] 45 検体）を用いた。

検水 100 倍濃縮液から、ルミテスター（キッコマン）を用いて、検水 10 mL 当たりの RLU 値を測定し、ATP 値を求めた。

EMA qPCR 法は、qPCR 法における DNA 抽出の前に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0（タカラバイオ）を用いて EMA 処理を実施した。

LC EMA qPCR 法は、添付の取扱説明書に従い、*Legionella* LC Medium base（タカラバイオ）を用いて培養、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR（タカラバイオ）により EMA 処理後、qPCR を実施した。

比色系パルサー法は、100 倍濃縮検体 4 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。当日中に測定しない場合は、RNA 抽出後の検体を -20 で保存した。

6. 斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査と比色系パルサー法感度向上のための検討

平成 28 年 8 月から 11 月に搬入された浴槽水および湯口水、20 施設 39 検体を対象とした。比色系パルサー法の検体調製は、上記 5. で記載した方法以外に、濃縮検体 1 mL を用いた方法、非濃縮検水 100 mL を注射筒を用いてメンブランフィルター（直径 13 mm、孔径 0.22 μ m、Merck 社、混合セルロースアセテート）でろ過し、ろ過後のフィルターから、100/30 倍に希釈した変性液 100 μ L で溶出する方法も実施し、比較した。

7. MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴

リファレンスセンターで収集された既に ST（sequence type）が決定している臨床分離株を 47 株を用いた。

Sobral ら（Appl Environ Microbiol 2011、77:6899）によって報告された 12 領域の PCR を 4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR に改変して、QIAGEN Multiplex PCR Kit を用いて実施した。PCR 産物は AB3500 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems) で泳動後、GeneMapper Ver. 4 (Applied Biosystems) により、フラグメントサイズおよびリピート数を測定し、MLVA 型を決定した。

得られた MLVA 型による株間の類縁関係を明らかにするために、BioNumerics Ver4.2 を用いて、Minimum spanning tree (MST) を作成した。

8. 原湯等の糞便汚染指標菌及び検査法について

平成 15 年 5 月 30 日付けで行われた水質基準の変更の議論を後ろ向きに検証し、水質基準における大腸菌群から大腸菌への変更の経緯を確認した。

原湯等を対象にした大腸菌の検査法の妥当性及び制限等について、文献収集等に基づいて議論し、検証を行った。

9. レジオネラ感染とアメーバ レジオネラ属菌感染促進物質の探索

PYGC で培養したアメーバ (*A. castellanii* 1501/10 株) をフラスコから剥離し、遠心洗浄後、 $10 \times AS$ で $1 \times 10^5/ml$ に調整した細胞浮遊液 0.5 mL を 24 ウェルマイクロプレートウェル内で、1 時間 30 で培養し、アメーバをプレートに接着させた後、 $10 \times AS$ で濃度を調整した被検物質 (低分子: Triton X-100、DMSO、サポニン、タウリン、グルタチオン、高分子: ヘパリン、コンドロイチン硫酸 B および C、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸溶液) 300 μL をマイクロプレート内の $10 \times AS$ と置換し、さらに 1 時間培養した。BCYE α 培地にて 30 で培養したレジオネラ属菌 (*L. pneumophila* 血清群 1 378 株) を $10 \times AS$ で 0.1OD に調整し、その 30 μL をマイクロプレートのアメーバ培養ウェルに加え、静かに攪拌してから 30 で 3 時間培養した。その後 50 $\mu g/mL$ 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。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 (500 rpm \times 3 分間) して、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、細胞内に分裂増殖像を示す、あるいは単独

で存在する菌が明確である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。

10. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

外部精度管理は、昨年度に引き続き実施母体を日水製薬株式会社とし、公的、民間合わせて全国 165 の検査機関 (延べ 171 試料配付) が参加した。レジオネラ属菌配付試料として、メーカー保証が得られ、各施設へ直送可能なシスメックス・ピオメリュー社の BioBall (特注品) を使用した。配付試料を受け取った各機関は、50 mL の滅菌生理食塩水に懸濁混和した「非濃縮試料」と、そこから試験用に 1 mL 分取した残りにさらに 441 mL の滅菌生理食塩水を加え、混和した「非濃縮試料」、さらに後述の試験の残試料について各機関が行なっているろ過濃縮、あるいは遠心濃縮を実施して得られる「濃縮試料」について、それぞれレジオネラ分離培地に塗布し、各試料中のレジオネラ菌数を算出した。メーカー保証値および微生物学調査の考え方から、回答の良好範囲を 300~9000 CFU/100 mL と設定した。回答及び解析結果の閲覧は専用ホームページにて行われた。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所等 71 機関については、独自に集計・解析を実施し、2015 年度の結果と比較した。

(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、個人情報保護に十分に配慮して行われた。利益相反委員会の指導・管理に従って、研究協力関係にある企業等について、研究班内で情報共有を行った。開示すべき企業からの経済的利益は受けていない。

C. 研究結果

1. モノクロラミン消毒実証試験

社会福祉施設の循環式浴槽において、モノクロラミン濃度を 3 mg/L に維持する 6 週間の消毒実証試験を行なった。モノクロラミン消毒を実施した男浴槽水、循環水を掛け流し的に使用するデイサービス個浴槽、それらの配管において、モノクロラミン濃度はほぼ 3 mg/L に安定して維持され、

レジオネラ属菌やアメーバは検出されなかった。

実証試験終了後、遊離塩素消毒の管理に戻した浴槽水から *L. pneumophila* 血清群 5、拭き取り検査から *L. pneumophila* 血清群 1、5、8、10 が検出された。本施設の浴槽水の消毒方法は、遊離塩素よりもモノクロラミンが適していると判断された。

本施設のモノクロラミン消毒の 3 週目以降に、浴槽水における従属栄養細菌数の増加がみられ、この菌は 16S rDNA 塩基配列が *Mycobacterium phlei* と 100% (466/466bp、CP014475) 一致した。本菌は、常時維持していたモノクロラミン濃度の 3 mg/L や、10 mg/L 濃度で 2 時間循環する消毒洗浄では抑制できなかったことになる。同様の管理をしていた他の施設の浴槽水からも、*M. phlei* の増殖が確認された。一方で、週 1 回 8 時間、20 mg/L のモノクロラミン消毒洗浄を実施している施設では検出されていなかった。浴槽水から分離された *M. phlei* に対する試験管内の消毒試験では、10 mg/L のモノクロラミンでは消毒の不足があり、20 mg/L の 30 分以上で消毒が可能であった。

2. 水泳プールのモノクロラミン消毒

水温が 30 程度の 270m³ の水泳プールにモノクロラミン消毒を適用した。1 週間の短期であったが、塩素濃度はほとんど減少せず、追加塩素は必要なかった。消毒管理に問題が生じることなく、レジオネラの発生もなかった。実際に泳いでみたが、いわゆる典型的な塩素臭(プール臭)がほとんどなかった。

3. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

神奈川県内の入浴施設において、カラン・シャワーにレジオネラ属菌による汚染があり、段階的に対策を実施し、その効果を検証した。カラン・シャワーの営業前の流水とシャワーヘッドの消毒ではレジオネラ属菌の汚染を取り除くことはできなかった。続いてカランおよびシャワーの交換を行ったが、検査によりレジオネラ属菌が検出された。さらに、高置貯湯槽とカラン・シャワー及びその間の配管に高濃度塩素消毒を施したところ、レジオネラ属菌は培養にて検出されなく

なった。

調べた 3 医療機関の給水系は、その程度や菌種は異なっていたが、レジオネラ属菌に汚染されていた。1 研究機関はレジオネラ属菌不検出であった。給水系の理化学項目の測定結果との関連を検討したが、塩素濃度以外との相関は明らかとならなかった。

4. 感染源解明のための環境調査

浴槽水、シャワー水および市中河川水における *Legionella* 属菌の汚染状況調査と、感染源となり得る環境検体周辺の空気中の *Legionella* 属菌の棲息状況について、直接平板培養法だけでなく、アメーバ共培養法も併用して調査した。

Legionella 属菌の検出率は、浴槽水で 8/40 検体 (20.0%)、シャワー水で 10/29 検体 (34.5%) であった。アメーバ共培養法による分離結果は、浴槽水、シャワー水あわせた 69 検体中 10 検体 (14.5%) で、平板培養法より低かった。河川水からは 4 回中 3 回の調査で *Legionella* 属菌が分離され、その検出率は浴槽水やシャワー水より高かった。道路沿い 99 検体、浴室内 16 検体の空気からは、直接培養法およびアメーバ共培養法において *Legionella* 属菌は分離されなかった。しかし、遺伝子検査法では道路沿い検体で 69.7% (69/99 検体)、浴室内検体で 75.0% (12/16 検体) から *Legionella* 属菌の遺伝子が qPCR により検出された。その 16S rRNA 遺伝子のコピー数 (copies/m³) は、道路沿い検体で 60.6、浴室内検体で 71.0 であった。降水量が 10 mm 以上の日で遺伝子量が多い傾向であった (t 検定 = 0.073)。

患者検体から最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群 1 (以下 Lp1) を環境検体から効率よく検出するため抗 Lp1 抗体で感作した免疫磁気ビーズ (LP1 IMB) を用いて Lp1 を選択的に濃縮する方法を検討した。Lp1 の回収率は 25.0~50.0% であったのに対し、Lp6、Lp5 では 7.1%、9.6%、*L. bozemanii*、*L. cherii*、*L. anisa* の回収率は、0.0~0.01% となった。また、直接平板培養法で Lp1 が分離されなかった実際の浴槽水検体から、IMB 法で Lp1 を分離することができた。

5. レジオネラ生菌迅速検査法の評価

浴槽水などの実検体 310 検体について qPCR 法および EMA qPCR 法を実施した。平板培養法 (10 CFU/100 mL 以上を陽性) に対する感度は、qPCR 法で 96.4% (54/56 検体) EMA qPCR 法で 92.9% (52/56 検体) 特異度は qPCR 法で 55.5% (141/254 検体) EMA qPCR 法で 60.6% (154/254 検体) であった。したがって、qPCR 法および EMA qPCR 法では、どちらも平板培養法に対する感度は 90% 以上であり、平板培養陽性検体 (10 CFU/100 mL 以上) のほとんどを検出できる検査法であることが明らかとなった。また、EMA 処理を実施することで特異度は向上するが、検体によってはその効果が見られない場合もあった。リアルタイム機器 TP950 と TP900 を用いた測定値の比較では、実検体を用いた結果 (定量値) は概ね相関していたため、TP950 (fast mode) を用いることで検査時間 (増幅反応時間) を短縮できることが明らかとなった。

183 検体について比色系パルサー法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 60.5% (26/43 検体) 特異度は 65.0% (91/140 検体) であった。

229 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 65.1% (28/43 検体) 特異度は 91.9% (171/186 検体) であった。LAMP 法における偽陰性検体の多く (13/15 検体) は、平板培養法の菌数が 10 ~ 40 CFU/100 mL と低濃度であったため、低濃度培養陽性検体においては、LAMP 法の感度はやや低下すると考えられた。

LC EMA qPCR 法は、今年度は実施検体数が少ないものの (37 検体実施、感度 76.9%、特異度 79.2%)、昨年度の結果 (342 検体実施、感度 89.2%、特異度 80.3%) も考慮し、全体として平板培養法の菌数を反映している方法であると考えられた。

6. 斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査と比色系パルサー法感度向上のための検討

大分県内施設の浴場水 39 検体を用いて迅速培養法 (斜光法を取り入れた培養法) を実施したところ、より短い期間で正確な培養結果が得られた。浴場水由来の *L. pneumophila* 血清群 1 株につ

いて、調査を始めた平成 24 年度以降初めて *lag-1* 遺伝子保有株が検出された。

比色系パルサー法については、検水を注射筒を用いてフィルターでろ過後、そのフィルターごと溶菌処理する方法について検討し、良好な結果を得た。

7. MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴

MLVA 法は、安定性・迅速性・比較の容易性から、利便性の高い分子タイピング法である。*L. pneumophila* においても MLVA 法を適用し、従来の遺伝子型別法である SBT (Sequence based typing) 法との比較を行うことで、MLVA 法の菌株識別能力を評価し、感染源の特定のための迅速な遺伝子型別法としての有用性を検討した。Sobral らによって報告された 12 の MLVA 領域に関して、PCR 手法を改変し、利便性の高い MLVA タイピング手法を確立した。さらに、32 種類の ST (sequence type) の臨床分離株 47 株を用いて MLVA 法を行った結果、36 の MLVA タイプに分類され、MLVA 法は SBT 法と同等の識別能力であった。また、MLVA 法によるタイピングから得られた MST の樹形は、SBT 法による ST と相関していた。

8. 原湯等の糞便汚染指標菌及び検査法について

公衆浴場における水質基準等に関する指針においては原湯等の水質基準では、「水質基準に関する省令」(平成 4 年厚生省令第 69 号) に準じて糞便汚染指標として大腸菌群が 50mL 中に検出されないこととされている。水道の水質基準は平成 15 年に改訂され、糞便汚染指標菌は大腸菌群から大腸菌に変更され、検査法は特定酵素基質法が採用された。水道の水質基準において糞便汚染指標菌を大腸菌群から大腸菌に変更した経緯を参照し、原湯等の水質基準における大腸菌群を水道水の水質基準に準じて大腸菌に変更することの妥当性を検討した。検討の結果、原湯等における糞便汚染指標菌を大腸菌群から大腸菌に変更し、大腸菌検査に特定酵素基質法を適用することは妥当と考えられた。ただし、原湯等の性状によっては、そこに生息あるいは汚染する菌には、

特定酵素基質法における反応において大腸菌様を呈する菌が存在し、偽陽性となる場合があることを留意する必要がある。

9. 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

レジオネラ属菌の宿主アメーバ感染における感染促進物質の探索を行った。探索物質の条件として、極性、荷電、親水性に影響を及ぼす可能性のあるものとし、単一あるいは数個の分子からなる低分子量のものから、高分子糖鎖(分子量数万以上)のものを調べた。低分子量の物質には感染性に対する影響が見られなかった一方、高分子糖鎖に感染促進作用が認められた。この促進作用がみられたのは、ヘパリン、コンドロイチン硫酸およびデキストラン硫酸で、硫酸基を分子構造中に一定の割合で含む硫酸化多糖であった。同じ高分子糖鎖で非硫酸化多糖のヒアルロン酸は、逆に感染抑制の作用を示した。

10. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

外部精度管理に参加した地方衛生研究所において、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71機関中68機関(約96%)、非濃縮試料では71機関中66機関(約93%)、ろ過濃縮試料では62機関中47機関(約76%)、遠心濃縮試料では9機関中5機関(約56%)あった。濃縮試料では、昨年度同様ろ過濃縮による報告結果が良い傾向にあった。昨年度、今年度とも参加し、今年度良好範囲外の結果を報告した16機関中11機関(約69%)は、2年連続で同様の結果を報告していた。またこれら11機関中4機関(約36%)は、複数項目で良好範囲外の結果を報告していた。

研修については、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修新興再興感染症技術研修」内で、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(WG)推奨法に沿った実習を伴ったレジオネラ検査研修会を行った。日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナー、厚生労働省主催で開催された生活衛生関係技術担当者研修会にも参加し、WG推奨法の普及に努めた。

D. 考察

レジオネラ症の患者発生が疑われた人工温泉水を使用する社会福祉施設の浴槽設備に、モノクロラミン消毒を6週間にわたり適用した結果、浴槽水、配管水、前日からの配管内の滞留水のいずれからもレジオネラ属菌やレジオネラの増殖宿主であるアメーバは一切検出されなかった。本薬剤濃度の持続性と安定性が優れた消毒効果を担保していると考えられた。一方で、週に1度、2時間10mg/Lのモノクロラミン循環による配管洗浄では*M. phlei*と同定された従属栄養細菌の増殖を抑えることができなかった。*M. phlei*は、土壌、塵や植物などに広く分布する菌だが、日和見感菌を起こすとの報告もある。本菌のような薬剤に抵抗性の高い従属栄養細菌の循環系内での増殖を防ぐためには、試験管内消毒試験の結果からも、週1回、20mg/L以上のモノクロラミン濃度配管洗浄が効果的と考えられた。

国内外でこれまでほとんど実施例のない水泳プールのモノクロラミン消毒を試みたところ、1週間の短期であったが、衛生管理上問題がないことが分かった。一方で、上述のようにモノクロラミン消毒を適用した入浴施設において、数週間後に多数の従属栄養細菌数が検出されるようになったことから、週に1回の換水や洗浄が行われない水泳プールでは、従属栄養細菌数の増加が懸念される。したがって、換水消毒が容易な小型プールであれば、モノクロラミン消毒の適用が可能と考えられた。

3 医療機関の給水系からレジオネラ属菌が検出されたが、検出菌種は異なっていた。レジオネラ汚染の有無、あるいはその頻度と関連する項目について、今後検討を重ねる。1 医療機関の受水槽に遊離残留塩素濃度が0.5mg/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置した。レジオネラ属菌汚染への効果を検証するために、現在調査を進めている。

雨天の道路沿い、あるいは浴室中の空気を補集したところ、*Legionella*属菌を分離することはできなかったが、遺伝子検出法では、道路沿いで採取した検体の69.7%、浴室内のミスト発生装置周

辺で採取した検体の 75.0%が陽性となり、どちらの空気中にも *Legionella* 属菌が浮遊していることが示唆された。今後、晴天の日やエアロゾルの発生のない屋内における検出率や遺伝子量と比較することで、雨天の日の道路沿いや浴用施設の浴室内におけるレジオネラ症罹患のリスクを検討したい。

Lp1 を標的とした IMB (免疫磁気ビーズ) を用いた選択的濃縮分離法により、従来の直接平板培養法で検出できなかった Lp1 を検出できた意義は大きく、IMB 法はレジオネラ症の感染源の特定の一助となると考えられた。さらに検出感度を高めるため、Lp1 以外の菌を除去する方法として、酸処理法や熱処理法などを検査工程に加える検討が必要と思われる。

今年度は、5 種類の迅速検査キット (qPCR 法、EMA qPCR 法、比色系パルサー法、LAMP 法、LC EMA qPCR 法) について、平板培養法の結果と比較し、評価した。新しいリアルタイム装置 (TP950) を用いると、PCR 反応時間が従来の装置 (TP900) の約 1 時間半から約 1 時間に短縮される。実検体を用いた検査で、両方の機器を用いた結果が概ね相関したので、TP950 (fast mode) を用いて検査時間の短縮を図れることが判明した。EMA 処理の効果が見られなかった検体は、現行の平板培養法では検出できない生菌が存在している可能性が考えられた。LAMP 法で偽陰性となった検体の一部は 5 倍希釈液で陽性となったため、一部の検体においては、反応阻害物質の存在が考えられた。比色系パルサー法における偽陰性検体の多くはシャワー水検体であり、これらの検体については溶菌できていない可能性がある。溶菌液の濃度、反応時間、温度などを検討し、RNA の抽出条件を改良する必要がある。

浴槽水を検体とした場合の比色系パルサー法の感度は高かった。特殊な機器を必要としないパルサー法の利点を活かすには、ろ過においても高価な機器を使用しない方法が望まれる。注射筒を用いたろ過であれば、現場での検査も可能で、繰り返し検査ができ、迅速な衛生管理につながる。一方で、ろ過に長時間かかる検体があり、その解消に向けて検討を進める。

利便性の高い MLVA 法は従来の SBT 法と同等の識別能力があることが示唆された。MLVA の結果は SBT の結果とある程度相関があり、感染源の推定の菌株の迅速なスクリーニングに期待できる。

分裂能力が衰え培養による検出が困難な菌であっても、アメーバを用いた培養によりアメーバ内にサルベージが可能で、これまで実態として把握が困難であった難培養性のレジオネラ属菌の検出、確保が可能となるのではないかと考えられる。今後はこのような単個に感染する菌の細胞内増殖を促進する因子を明らかにし、難培養性の菌のアメーバ内培養を可能にする方法を開発する。

外部精度管理における回収率について検討した。すべての試料において目標値 (良好範囲) を報告していた機関の回収率 (濃縮試料/非濃縮試料 $\times 100$) は 8 ~ 84% と大きな幅があった。80% の機関が回収率 20% 以上を達成していたので、今回の外部精度管理における最低限達成すべき回収率を 20% 以上とした。2 年連続で良好範囲外の結果を報告していた機関は、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、改めて検査工程を見直し検証する必要があると思われる。

標準的検査法については、現在、本研究班のレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ (WG) が推奨している方法と近々改定される ISO 法との調整を行う予定であり、その後、改訂版 WG 標準的検査法が提示できるよう準備を進めている。

また、実習を伴った研修会の要望が多くあるが、主催者、場所、条件、予算、講師の養成等クリアすべき課題も多く、研究班内外からの幅広い意見を求め、方策を検討する必要があると思われる。

E. 結論

公衆浴場等施設の衛生管理の向上を目指して、消毒法の検討と、検査法の検討を二本柱として、研究を実施した。

レジオネラ属菌への適用が確立したモノクロラミン消毒については、薬剤に抵抗性の高い従属栄養細菌の循環系内での増殖を防ぐ効果的な配

管洗浄方法の検討が必要と考えられた。

浴槽水、湯口水、シャワー水、蛇口水、河川水、浴室および道路沿いの空気等についてレジオネラ属菌検査を行い、汚染実態を明らかにした。レジオネラ培養には斜光法を取り入れ、一部の検体にはアメーバ共培養法、免疫磁気ビーズによる選択的濃縮法を適用した。新しい遺伝子検査法を検討し、感度の向上、時間の短縮を図った。

高分子硫酸化多糖がレジオネラ属菌の宿主アメーバ感染を促進することを見出した。遺伝子型別法として利便性の高いMLVA法を確立した。

官民間問わず参加可能なレジオネラ検査法外部精度管理サーベイの継続ができたことの意義は大きい。検査法等の研修会を研究班を通して行なっているが、まだ不十分である。

今後も、効果的な消毒法・検査法の確立および普及、浴場等の衛生管理要領等の改正のための知見等を得るために、研究を継続実施する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 神田 隆, 久保田 明, 縣 邦雄, 小坂浩司, 前川純子, 遠藤卓郎, 倉 文明, 八木田健司, 泉山信司, モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策, 日本防菌防黴学会誌, 2017年1月受理.
- 2) Kanatani JI, Isobe J, Norimoto S, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M. 2017. Prevalence of *Legionella* Species Isolated from Shower Water in Public Bath Facilities in Toyama Prefecture, Japan. J Infect Chemother. Epub ahead of print. doi: 10.1016/j.jiac.2017.01.002.
- 3) Kuroki T, Amemura-Maekawa J, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K,

Morita M, Lee K, Ohnishi M, Kura F. 2017. Outbreak of Legionnaire's disease caused by *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 13. Emerg Infect Dis. 23:349-351.

- 4) Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. 2017. Epub ahead of print. doi: 10.1017/S0950268817000036.
- 5) 磯部順子, 金谷潤一, 他: 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2015年) 富山県衛生研究所年報. 39:61-67, 2016.
- 6) 今野貴之, 高橋志保, 鈴木純恵, 櫻尾拓子, 熊谷優子, 木内 雄, 石井 淳, 前川純子, 大西 真, 倉 文明: 2016年に多発傾向がみられたレジオネラ症の解析 秋田県. 2017. 病原微生物検出情報. 38:22.

2. 総説

- 1) 倉 文明. 入浴施設等のレジオネラ対策にATP検査法を活用する. クリーンテクノロジー. 2017. 27:27-31.

3. 学会発表

- 1) 黒木俊郎, 泉山信司, 大屋日登美, 鈴木美雪, 前川純子, 倉文明, 医療機関の給水系におけるレジオネラ属菌汚染調査, 日本水道協会水道研究発表会, 2016年11月, 京都市.
- 2) 杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 和田裕久, 土屋祐司, 市村祐二, 青木信和, 神野透人, 小坂浩司, 泉山信司, 八木田健司, 縣邦雄, 田中慶郎, 前川純子, 倉文明, モノクロラミン消毒の事前適合性試験の提案, 防菌防黴学会, 2016年9月, 東京都.
- 3) 泉山信司, 倉文明, 大屋日登美, 黒木俊郎, 病院の蛇口におけるレジオネラ汚染の検出, 環境技術学会, 2016年9月, 姫路市
- 4) 黒木俊郎, 大屋日登美, 鈴木美雪, 政岡智佳, 古川一郎, 前川純子, 倉 文明. 医療機関の給水系におけるレジオネラ属菌汚染実

態調査. 第 90 回日本感染症学会学術講演会. 2016 年 4 月, 仙台.

- 5) T. Kuroki, Y. Watanabe, H. Teranishi, S. Izumiyama, J. Amemura-Maekawa, and F. Kura. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. ESGLI 2016. Amsterdam, September 2016.
- 6) Amemura-Maekawa J, Chida K, Ohya H, Isobe J, Kanatani JI, Tanaka S, Nakajima H, Yoshino S, Ohnishi M, and Kura F: Characterization for clinical *Legionella* species by *Legionella* Reference Center in Japan. ESGLI 2016. Amsterdam, September 2016.
- 7) 中西典子, 田中忍, 有川健太郎, 岩本朋忠: 温泉環境由来レジオネラ属菌の遺伝学的特徴と病原性遺伝子保有状況. 第 90 回日本細菌学会総会. 平成 29 年 3 月, 仙台.

4. 研修会

- 1) 杉山寛治: 平成 28 年度第 2 回衛生環境研究所感染症等研修会, 山梨県衛生環境研究所主催, 2016 年 12 月 7 日, 山梨県甲府市.
- 2) 杉山寛治: 平成 28 年度神戸市保健所研修会, 神戸市保健福祉局健康部生活衛生課主催, 2017 年 2 月 16, 17 日, 兵庫県神戸市.
- 3) 杉山寛治: 南加賀モノクロラミン講習会, 石川県南加賀保健福祉センター主催, 2017 年 3 月 2 日, 石川県加賀市, 3 月 3 日, 石川県小松市.
- 4) 杉山寛治: 千葉市保健所研修会, 2017 年 3 月 13 日, 千葉県千葉市.
- 5) 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 28 年度環境監視員担当者会議, 2016 年 4 月, 大分.
- 6) 前川純子, 森本 洋, 金谷潤一, 八木田健司, 倉 文明, 磯部順子, 佐々木麻里, 緒方喜久代, 他: レジオネラ検査法, レジオネラ属菌培養法概論, 迅速診断検査法概論, 環境中のアメーバとレジオネラ感染, レジオネラ感染症総論, 臨床検体(喀痰)検査法, 他: 国立保健

医療科学院平成 28 年度短期研修新興・再興研修, 2016 年 10 月 3-7 日, 東京.

- 7) 倉 文明, 森本 洋, 縣 邦雄, 他: レジオネラ症の国際動向, レジオネラの検査法と外部精度管理, 配管洗浄の方法, 他: 平成 28 年度生活衛生関係技術担当者研修会, 2017 年 2 月 6 日, 東京.
- 8) 倉 文明: レジオネラ属菌の検査と対策, 平成 28 年度短期研修環境衛生監視指導, 2016 年 11 月 17 日, 東京.
- 9) 倉 文明: レジオネラ症の最近の話題と動向, 岡山県レジオネラ属菌対策研修, 2016 年 7 月 15 日, 岡山.
- 10) 前川純子, 森本 洋, 他: レジオネラ属菌検査の現状と今後の方向性, レジオネラ属菌検査における結果の変動要因と手技のポイント, 他: レジオネラ属菌検査セミナー(主催: 日水製薬株式会社), 2016 年 7 月 14 日, 東京.
- 11) 倉 文明, 森本 洋, 他: ISO11731 の改訂とレジオネラ属菌検査外部精度管理の動向, レジオネラ属菌培養法について, 他: レジオネラ属菌検査セミナー(主催: 日水製薬株式会社), 2017 年 3 月 10 日, 東京.
- 12) 前川純子: レジオネラ症集団感染事例, 平成 28 年度レジオネラ対策講習会, 東京都多摩府中保健所主催, 2016 年 2 月 27, 28 日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

1. 藤野敬介, 泉山信司, 特願 2016-233947, モノハロゲノアミン製造用組成物
2. 花王, 特願 2016-225469, モノハロゲノアミンの製造方法
3. 花王, 特願 2016-225470, モノハロゲノアミン製造用固体組成物
4. 花王, 特願 2016-225471, モノハロゲノアミン製造用被覆粒子群
5. 花王, 特願 2016-225472, モノハロゲノアミン製造用組成物

実用新案登録, その他

なし