

研究要旨：公衆浴場等の適切な衛生管理のための効果的な手法の検討を行った。また、公衆浴場等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、そのための手法の改良、評価を行った。今年度実施した主な研究およびその成果は以下の通りである。

(1) モノクロラミン消毒導入モデルスキームを作成し、3施設において実証試験を行った。これまで遊離塩素での消毒効果が期待できず、モノクロラミンの消毒効果も難しいと思われたヨウ化物イオン、臭化物イオンを含むフミン質有機物泉においても注入方法を工夫することで一定の消毒効果を得ることが実証された。

(2) pH10程度の温泉施設においてもモノクロラミン消毒が有効であることが確認できた。

(3) カラン・シャワーにレジオネラ属菌による継続的な汚染が検出される入浴施設の貯湯槽の前に次亜塩素酸ナトリウム添加装置が設置されたが、給湯栓およびシャワーから採取した試料からレジオネラ属菌が検出された。夜間や休日に貯湯槽とその先の配管中の遊離残留塩素濃度が低下するためレジオネラ属菌が増殖したと考えられた。3医療機関の給水・給湯系からレジオネラ属菌が検出された。流水後に採取した試料のレジオネラ属菌数および従属栄養細菌数は、初流水に比較して減少していたことから、細菌が蛇口とその近辺の配管中で増殖していると推測された。

(4) 入浴施設の衛生管理のうえで重要な砂ろ過器の洗浄法を検討し、既存の施設に導入可能なエアレーション・リフレッシュ法の実地試験を行ない、その効果を確認した。

(5) エアサンプラーを用いて道路沿い 82 検体、浴室内 5 検体および屋内 20 検体のエアロゾルを捕集したところ、平板培養法およびアメーバ共培養法でレジオネラ属菌は分離されなかったが、遺伝子検査法においては、道路沿い検体で 75.5% (114/151 検体)、浴室内検体で 71.4% (15/21 検体) および屋内検体で 45.0% (9/20 検体) からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された（昨年度の結果も含む）。道路沿い 23 検体および浴室内 9 検体については、次世代シーケンスによる 16S メタゲノム解析を実施し、道路沿い 22/23 検体および浴室内 9/9 検体から、レジオネラ属菌のリードが検出された。レジオネラ属菌のリードの割合の平均値は、道路沿い検体で 0.23%、浴室内検体で 0.10%であった。また、道路沿い 4/23 検体および浴室内 2/9 検体から *L. pneumophila* のリードが検出され、*L. pneumophila* のリードの割合の平均値は、道路沿い検体で 0.0033%、浴室内検体で 0.0337%であった。

(6) レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、PALSAR 法、LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法および EMA-qPCR 法について、浴槽水などの実検体 324 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。各種迅速検査法は、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であることが確認できた。また、適切な濃度での EMA 処理により死菌 DNA の増幅を抑制すると、より平板培養法と相関した。

(7) PALSAR 法は特殊な機器を必要としないことから、遠心機やろ過器を用いずに検体の調製もできれば現場での活用が期待されるので、検水を注射筒でろ過してフィルターごと溶菌処理する方法を検討して、良好な結果を得た。

(8) 現場調査が可能な携帯型フローサイトメーターによる抗レジオネラ染色試薬を用いた迅速検出法を検討したところ、*L. pneumophila* と *L. dumoffii* を特異的に検出することができた。

(9) 試作された抗 *L. pneumophila* 血清群 1 抗体結合免疫磁気ビーズは *L. pneumophila* 血清群 1 の選択的濃縮が可能で、感染源調査に有用であることが示せたので、実用化に向けて具体的な使用手順などを検討する。

(10) 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 法の確立ができたので、117 種類の ST (sequence type) を含む *L. pneumophila* 血清群 1 の菌株コレクション 315 株の解析を行ったところ、168 種類の MLVA タイプに分類された。また、過去の集団事例株を解析したところ、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関し、感染源推定のための遺伝子型別の迅速なタイピング方法として期待できると考えられた。

(11) レジオネラ属菌の宿主アメーバに作用し、ファゴソーム内活性酸素産生を阻害するアポシニン、およびリソゾームの内部 pH を中性化しその加水分解酵素作用を阻害するクロロキンならびに塩化アンモニウムは、難培養性のレジオネラ属菌のアメーバ感染率を増加させ、生残性を高めたが、アメーバ内増殖促進までは至らなかった。

(12) 今年度で 3 回目となる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 173 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。本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことができる方法であり、今後も、継続的な外部精度管理サーベイができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要である。標準的検査法については、現在ワキンググループが推奨している方法と今年度改訂された ISO との調整を図った結果、現時点ではワキンググループ推奨法が最も適当に対応できる方法と思われた。

(13) 静岡県が開催したレジオネラ属菌の検査を行っている検査機関を対象としたレジオネラ属菌同定法の研修会に協力した。研修は講義と実習から成り、実習については検体の前処理法、接種、同定方法、遺伝子検査法を実施した。

研究分担者・所属機関および職名  
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班長  
黒木俊郎・神奈川県衛生研究所部長  
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  
田栗利紹・長崎県環境保健研究センター科長

本来環境細菌であるレジオネラ属菌は、人工水系の衛生管理に不備があると増殖し、そこから生じるエアロゾルを介して感染して、重篤な肺炎やポンティアック熱を引き起こす。その制御が、公衆浴場をはじめとする水系施設や設備で課題となっている。公衆浴場等のレジオネラ症対策の向上のために、レジオネラ検査法の改善、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ており、迅速検査法の妥当性の検証およびさらなる改良を行う。培養法についても、実検体での検証を重ね、標準的検査法を提唱する。入浴施設等の効果的な衛生管理を達成するため、これまでその有用性を明らかにしてきたモ

#### A. 研究目的

表1 研究協力者一覧

青木信和	ケイ・アイ化成株式会社	陳内理生	神奈川県衛生研究所	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	杉山寛治	株式会社マルマ	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所
稲葉尊高	静岡県健康福祉部生活衛生局	田中 忍	神戸市環境保健研究所	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
上野潤二	栄研化学株式会社	田中悠樹	株式会社ヤマト	村田学博	静岡県環境衛生科学研究所
植松香星	山梨県衛生環境研究所	田中慶郎	株式会社マルマ	森 健	静岡県健康福祉部生活衛生局
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	千田恭子	仙台市衛生研究所	森 康則	三重県保健環境研究所
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	森中りえか	株式会社ファスマック
小川恵子	北海道立衛生研究所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	森主博貴	静岡県環境衛生科学研究所
金谷潤一	富山県衛生研究所	中臣昌広	文京区文京保健所	森川正浩	静岡県健康福祉部生活衛生局
神田由子	大分県衛生環境研究センター	成松浩志	大分県衛生環境研究センター	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
木村哲也	株式会社ヤマト	野本竜平	神戸市環境保健研究所	山上隆也	山梨県衛生環境研究所
倉 文明	国立感染症研究所	原口浩幸	株式会社ファスマック	山口友美	宮城県保健環境センター
小嶋裕子	長崎県環境保健研究センター	東出誠司	栄研化学株式会社	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
後藤高志	大分県衛生環境研究センター	久田美子	山梨県衛生環境研究所	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
小森正人	株式会社ヤマト	平塚真大	広島県立総合技術研究所保健環境センター	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所
齋藤利明	株式会社ヤマト	堀内雅人	山梨県衛生環境研究所	渡邊涼太	北海道立衛生研究所
蔡 國喜	長崎県環境保健研究センター				

ノクロラミン消毒の実践、および入浴施設の設備構造上の問題を洗い出し、洗浄法の開発を行う。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、並行して入浴施設以外の環境のレジオネラ属菌汚染実態調査を行う。さらに感染源の同定に必要な分子疫学法の検証や、効率的にレジオネラ属菌を分離する方法の開発やそのための基礎的検討を行う。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。以上のような研究を実施することで、その成果を通じて、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。

## B. 研究方法

各研究項目は、1 から数名の研究分担者および研究協力者（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。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効導入スキームの構築と消毒効果の検証

静岡県内でモノクロラミン消毒の導入を検討したいと所轄保健所に相談のあった3か所の入

浴施設（県内東部地域 S 施設、中部地域 I 施設、西部地域 D 施設）の湧泉水について、モノクロラミン及び比較対照として遊離塩素を添加後、40 で静置し、経時での系内濃度を測定し、その後、各施設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。それぞれの施設の泉質は S 施設が Na/塩化物泉（pH7.2）、I 施設が Na/塩化物泉（pH7.8）、D 施設が I-/アンモニア態窒素/フミン質有機物/臭化物イオンを含む塩化物泉（pH8.1）であった。3施設とも、浴槽水の消毒薬はろ過器前に注入した。モノクロラミンは営業日の循環開始後から、ほぼ1時間30分間隔で計8回、営業終了時までタイマーで間欠的に注入された。また、毎週土曜日には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。

検体は、毎週1回換水時の排水を S 施設3箇所、I施設原泉、貯湯槽、浴槽水6か所、D施設10箇所から採水した。

浴槽水のモノクロラミン濃度と遊離アンモニア濃度を、ポケット水質計 PC（HACH社）のインドフェノール法により測定し、モノクロラミンの生成を確認した。全塩素濃度は MD100 残留塩素計（Lovibond社）の DPD 法により測定し、全塩素濃度とモノクロラミン濃度の測定値の比較を行った。

### 2. pH10の温泉におけるモノクロラミン消毒

pH10を超える源泉の公衆浴場に、タイマー式制御のモノクロラミン生成装置を設置し、6週間の実証試験を行った。モノクロラミン濃度は3

mg/L を下回らないよう管理した。週に 1 回、10 mg/L の高濃度モノクロラミンで配管洗浄を行った。洗浄後は、チオ硫酸ナトリウムにより中和し、排水した。施設の浴槽は複数あるが、試験を行ったのは、男湯女湯それぞれ 1 つの浴槽（同一系統、容量計約 9m<sup>3</sup>）のみとし、他は従来の塩素消毒で管理した。浴槽水は砂ろ過の循環式で管理されていたが、毎日完全換水し、清掃も行われていた。入浴者への配慮として、結合塩素消毒（モノクロラミン消毒）を実施している旨を掲示した。

試験期間前に 1 回、期間中は 1 週間に 1 回、営業終了後に浴槽水の採水、およびヘアキャッチャー付近配管のふきとりを行った。検査項目は、浴槽水については、レジオネラ属菌、大腸菌群、一般細菌数、従属栄養細菌数、アメーバとし、ふきとり検体については、レジオネラ属菌とした。

大腸菌群は浴槽水 100 mL を EC ブルー-100P「ニッスイ」、一般細菌数は標準寒天培地を用いて 36、24 時間培養した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 42、14 日間で求めた。アメーバは、浴槽水原液および 1000×g、5 分間で遠心 50 倍濃縮した浴槽水から、大腸菌塗布無栄養寒天培地を用いて、42 で 14 日間培養した。

採水直後に pH（ガラス電極式 pH メーター、堀場）遊離残留塩素と全残留塩素（DPD 法によるポケット残留塩素計、HACH 社）、モノクロラミンとアンモニア態窒素（インドフェノール法によるポケットモノクロラミン・アンモニア計、HACH 社）の測定を行った。施設では、浴槽水の全残留塩素を、毎日午前 11 時頃に測定した。

### 3. 入浴施設およ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、シャワー水および貯湯槽水と高置貯湯槽水を、3 医療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。

### 4. レジオネラ検査法のマニュアル作成および入浴施設の衛生管理に関する研究成果の活用

マニュアルの作成のためのワーキンググルー

プを立ち上げ、水試料からのレジオネラ属菌検出のための試験法を、各ステップごとに検討した。

### 5. 空気洗浄と高濃度塩素消毒を併用した砂ろ過器のろ材の洗浄方法（エアレーション・リフレッシュ法）の提案

エアレーション・リフレッシュ法の実施にあたっては、容量 4.5 m<sup>3</sup> の循環式浴槽を有する東京都文京区の A 銭湯に協力していただいた。砂ろ過器は直径 600 mm、最後のろ材交換は平成 25 年頃で、ろ過流量は 200～250 L/min、ターン数は約 3 ターン/h である。消毒薬剤は、通常営業時はトリクロロイソシアヌル酸を使用し、逆洗は毎日実施していた。平成 29 年 7 月 3 日、および同年 12 月 11 日の 2 回実験を実施した。常用圧力 20 kPa、風量 350 L/min の市販ブロワポンプを、循環ろ過ポンプの圧力計接続部に接続した。循環ろ過ポンプを停止し、砂ろ過器のバルブを閉め、12%次亜塩素酸ナトリウムを遊離塩素濃度が 50 mg/L になる様にヘアキャッチャーに投入した。バルブを逆洗ポジションに切り替えて、循環ろ過ポンプを 10 秒間稼働させ、塩素をろ過タンク内に移送し、設置したブロワポンプを稼働させ、30 分間ろ過タンク内にエアーを吹き込み、空気洗浄した後、逆洗を行った。

水質分析のための採水は以下のように行なった。1 回目（平成 29 年 7 月 3 日）は、まず従来の逆洗水、およびその後空気洗浄を 5 分行うことで内部を攪拌して得られる砂ろ過器内水を採水、その後、高濃度塩素下での 30 分間の空気洗浄（エアレーション・リフレッシュ法）実施後の逆洗水、および 5 分の空気洗浄による内部攪拌後の砂ろ過器内水を採水した。

2 回目（平成 29 年 12 月 11 日）は、1 回目と同様にエアレーション・リフレッシュ法実施前後の採水を行った後、さらにその後の逆洗時間を検討するため 2 回の逆洗を追加し、その都度逆洗水と、砂ろ過器内水を採水した。

分析項目はレジオネラ属菌、大腸菌群、一般細菌、濁度、SS (Suspended Solid) とした。

### 6. 感染源解明のための環境調査

(1) 検体：平成 29 年度に 14 施設で浴槽水 39 検体、シャワー水 32 検体、カラン水 15 検体を採

取した。シャワー水およびカラン水については、温度を 40 に設定後、約 10 秒間流出させた後、容器に採取した。3、9、10、11 月に、富山市街を流れる 4 河川 5 地点で河川水計 20 検体を採取した。エアサンプラー（コリオリス μ）を用いて、主に雨天の日の道路沿い 82 検体、浴用施設の浴室 5 検体（5 施設）および屋内 20 検体（1 施設および民家 2 軒）のエアロゾルを捕集した。浴室 4 検体は、稼働中のミスト発生装置周辺で捕集した。15 ml の捕集液（0.005% Tween 80 液）中に 300 l/min の条件で 10 分間捕集した。ただし、道路沿い 30 検体については、15 ml の捕集液（滅菌水）中に 300 l/min の条件で 30 分間捕集した。

(2) 16S メタゲノム解析：道路沿い 23 検体および浴室 9 検体について、次世代シーケンスを実施した。イルミナ社のプロトコルに従い 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR で増幅後、Nextera XT Index Kit および MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) を用いてランを実施し、MiSeq Reporter で解析した。

(3) 免疫磁気ビーズ（IMB）による *Legionella pneumophila* 血清群 1（以下 Lp1）の選択的濃縮法：100 倍濃縮された浴槽水 35 検体、シャワー水 12 検体、カラン水 6 検体、計 53 検体について、デンカ生研で作製した Lp1-IMB を 25 μl 接種し、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 μl もしくは 200 μl 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 μl を培養前に熱または酸にて処理し、未処理検体と併せて BCYE-α 培地、GVPC 培地の両方にコンラージ棒で拡げ、35 で 7 日間培養した。

#### 7. レジオネラ生菌迅速検査法の評価

全国 5 か所の地方衛生研究所において、平成 29 年度に浴用施設などから採取された 324 検体（浴槽水 210 検体、湯口水 24 検体、シャワー水 32 検体、採暖槽水 28 検体、カラン水 15 検体、その他（井戸水など）15 検体）を用いた。

PALSAR 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。目視の発色確認により 16S rRNA が検出された場合を陽性と判定した。なお、溶菌条件を昨年度の 37 15 分から 70 5 分に変更した。

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。EMA-LAMP 法は、1000 倍濃縮検体に EMA 処理を実施後、Chelex 溶液を用いて DNA を抽出し、LAMP 法に用いた。

#### 8. 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 29 年 6 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水、25 施設 49 検体を対象とした。比色系パルサー法の検体調製は、検水 50 mL を注射筒に入れてメンブランフィルター（直径 13 mm、孔径 0.22 μm、Merck 社、セルロース混合エステル）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 μL で溶出する方法（方法 1）、検水 100 mL（方法 2）、あるいは 200 mL（方法 3）を直径 25 mm のセルロース混合エステルフィルターでろ過し、200 μL の溶出液の半量を用いる方法の 3 法を実施し、比較した。

#### 9. 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 133 株（内 48 株は昨年度解析済み）、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 48 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 25 株、土壌由来 36 株の計 315 株、および過去の 1 集団感染事例に由来する臨床分離株 45 株、浴槽水由来 21 株、浴槽ふきとり由来 22 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 Ver7.6 を用いて、Minimum spanning tree (MST) を作成した。MLVA の分解能評価には、HGDI (Hunter-Gaston Discrimination Index) を算出し、各 MLVA 領域の多様性評価には、PIC (polymorphic information content) を算出した。

#### 10. レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発

抗レジオネラ・ニューモフィラ抗体 (V6051、バイロスタット社)、抗レジオネラ・ニューモフィラ抗体 (アークリソース社)、抗レジオネラ属菌抗体 (アークリソース社) を Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を使って処理し、抗レジオネラ染色試薬を作製した。*Legionella pneumophila* 血清群 1 を 3 株、*L. pneumophila* の血清群 3、血清群 4、血清群 5、血清群 6、血清群 9、および血清群 10 を各 1 株、型別不能 2 株、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌 11 株、*Escherichia coli* 1 株を使用して、携帯型フローサイトメーター miniPOC (シスメックスパルテック社、励起/蛍光波長は 532 nm/570 nm, 610 nm、重量 6.5 kg) による抗レジオネラ染色試薬を用いたレジオネラ属菌の検出限界と特異性を調査した。

#### 11. レジオネラ感染とアメーバ

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 (後述) 300  $\mu L$  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 $\alpha$  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  $\mu L$  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。所定の培養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 ( $500 \text{ rpm} \times 3$  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。用いた被検物質は、アポシニン (SIGMA-ALDRICH) は少量のエタノールで溶解後、クロロキン (SIGMA-ALDRICH) はそのまま  $10 \times AS$  で 10 mM に調整し、塩化アンモニウム (和光純薬) は  $10 \times AS$  で 100mM に調整し、ヘパリン (和光純薬) は、 $10 \times AS$  で 10,000U/ml に調整して、ストック溶液とし、用時濃度調整した。

#### 12. 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、2015 年、2016 年度と同様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 173 の検査機関 (延べ 176 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 100  $\mu L$  ずつ塗布し、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 ~15,000 CFU/100 mL と設定した。回収率についても解析した。目標とした回収率は、昨年度の外部精度管理で報告を求めたすべての試料 (非濃縮、濃縮) において目標良好範囲を報告し、かつ非濃縮の菌数が濃縮の菌数以上を報告した機関のうち、80% 以上の機関がクリアしていた 20% とした。回答およ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、2016 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効導入スキームの構築と消毒効果の検証

モノクロラミン消毒効導入スキームにより源泉水のモノクロラミンの濃度安定が確認された 3 施設の 6 週間にわたるモノクロラミン濃度の安定性とレジオネラ属菌検出状況を調べた。実施期間中モノクロラミン濃度が安定していた施設はレジオネラ属菌不検出であった。2 週目以降安定した施設と 1 日内の濃度変動が激しい施設は、消毒前の源泉からレジオネラ属菌が検出されていたが、後者は期間中に浴槽水からはレジオネラ属菌不検出となった。

### 2. pH10 の温泉におけるモノクロラミン消毒

浴槽水の全残留塩素濃度は、おおむね 3 mg/L 以上を維持することができた。試験期間前半に、濃度が 6 mg/L 程度まで高くなることもあったので、モノクロラミン注入量を調整し、終日 4 mg/L 前後に維持することができた。

レジオネラ属菌は、浴槽水と配管ふきとり検体のいずれにおいても、検出されなかった。レジオネラ属菌増殖の温床となるアメーバ、衛生指標菌である大腸菌群についても、全て不検出であった。一般細菌数と従属栄養細菌数は、実証試験前後を比較すると、いずれも全ての検体において減少した。

### 3. 入浴施設およ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、高置貯湯槽とカラン・シャワーおよびその間の配管への

高濃度塩素消毒を施したところ、施術後はレジオネラ属菌は培養にて検出されなくなったが、その後再び、レジオネラ属菌が検出されるようになった。当該施設は、源泉からの原湯を地下の貯湯槽に受け、高置貯湯槽に上げてから配水しているので、地下貯湯槽と高置貯湯槽の間に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置したが、給湯栓およびシャワーから採取した試料からレジオネラ属菌が検出された。

医療機関 A では、採水場所は 5 か所 (病室洗面台、トイレ洗面台、手術準備室、手術準備室手指洗浄場、受水槽) 13 試料をに採取した。受水槽を除く 4 か所から採取した 10 試料から、10~2100 CFU/100ml のレジオネラ属菌が検出された。初流水と 3L 流水後の試料では、レジオネラ属菌および従属栄養細菌数の減少が観察された。医療機関 A では実験的に受水槽に次亜塩素酸添加装置を設置し、効果を検証中であるが、添加装置設置前と比較して 1 箇所レジオネラ属菌検出数の減少がみられた。

医療機関 B では、6 か所 (談話室洗面台 1、談話室洗面台 2、浴室給湯栓、浴室洗面台、病室 1 洗面台、病室 2 洗面台) 20 試料を採取し、レジオネラ属菌は 4 か所から採取した 11 試料から検出され、菌数は 40~2000 CFU/100ml であった。医療機関 B においても初流水と 3L 流水後の試料では、菌数の減少が観察された。

医療機関 D では、2017 年 8 月 22 日に採取した 6 か所中 2 か所、18 試料中 4 試料からレジオネラ属菌が採取された。

医療機関 A と B では、給水系試料と給湯系試料を同一の蛇口から分けて採取することが可能であったが、両方の系からレジオネラ属菌が検出された。

### 4. レジオネラ検査法のマニュアル作成および入浴施設の衛生管理に関する研究成果の活用

#### 1) マニュアルの作成

現時点で表形式の推奨法は、このままではマニュアルとして利用することはできないため、文章化を試みている。

#### 2) 研究成果の検討

公衆浴場における衛生管理要領等に記載され

ている、シャワー、集毛器、貯湯槽、調整箱、気泡発生装置等について、衛生管理の徹底強化の必要性等を研究成果に基づいて検討した。

#### 5. 空気洗浄と高濃度塩素消毒を併用した砂ろ過器のろ材の洗浄方法（エアレーション・リフレッシュ法）の提案

1 回目の実験では、従来法の逆洗水の濁度は 6.5 度、SS は 3.8 mg/L に対して、エアレーション・リフレッシュ法後は濁度 97 度、SS は 160 mg/L と高く、エアレーション・リフレッシュ法による汚れの排出効果が大きかった。砂ろ過器内水は、従来の逆洗後の濁度は 100 度、SS は 170 mg/L で、エアレーション・リフレッシュ後は濁度 7.0 度、SS は 12 mg/L と低くなった。2 回目の実験でも同様の結果が得られた。

2 回目の実験において、レジオネラ属菌、大腸菌群は検出されなかったが、一般細菌数は、従来法の逆洗後の砂ろ過器内水が 740 CFU/mL に対して、エアレーション・リフレッシュ法後は 3,600 CFU/mL と高く、洗い出されてきた。その後、一般細菌数は逆洗工程 2 回目（逆洗計 10 分間）実施後までは増加したが、3 回目（逆洗計 15 分間）実施後には減少した。

#### 6. 感染源解明のための環境調査

レジオネラ属菌が検出されたのは、浴槽水で 8/39 検体（20.5%）、シャワー水で 8/32 検体（25.0%）、カラン水で 4/15 検体（26.7%）であった。河川水については、9 月および 11 月の 6 検体からレジオネラ属菌が検出された（検出率 30.0%、すべて *L. pneumophila*）。昨年度分も含め、道路沿い 151 検体、浴室内 21 検体および屋内 20 検体のエアロゾル補集の結果、直接培養法およびアメーバ共培養法においてレジオネラ属菌は分離されなかった。しかし、遺伝子検査法（qPCR 法）では道路沿い検体で 75.5%（114/151 検体）、浴室内検体で 71.4%（15/21 検体）および屋内検体で 45.0%（9/20 検体）からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。16S rRNA 遺伝子の平均コピー数（copies/m<sup>3</sup>）は、道路沿い検体で 81.0、浴室内検体で 72.0、屋内で 19.5 であった。滅菌水で捕集した道路沿い 30 検体についても、レジオネラ属菌は分離されなかったが、

86.7%（26/30 検体）からレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子が検出され、平均コピー数（copies/m<sup>3</sup>）は 31.9 であった。また、生菌を検出する EMA-qPCR 法においても、66.7%（20/30 検体）からレジオネラ属菌遺伝子が検出され、平均コピー数（copies/m<sup>3</sup>）は 20.0 であった

16S メタゲノム解析で取得したリード数は、道路沿い検体で中央値 121,351（66,803～975,202）、浴室内で中央値 115,879（68,986～1,110,988）であった。道路沿い 22/23 検体および浴室内 9/9 検体からレジオネラ属菌のリードが検出され、各検体に占めるレジオネラ属菌のリードの割合の平均値は、道路沿い検体で 0.23%、浴室内検体で 0.10%であった。また、道路沿い 4/23 検体および浴室内 2/9 検体から *L. pneumophila* のリードが検出され、各検体に占める *L. pneumophila* のリードの割合の平均値は、道路沿い検体で 0.0033%、浴室内検体で 0.0337%であった。

Lp1-IMB 濃縮法により、Lp1 は浴槽水 35 検体中 5 検体から分離された。平板培養法では 6 検体から分離された。両法で Lp1 が分離されたのは 3 検体で、それらの菌数は平板培養法で 100～890 CFU/100 ml であったのに対し、Lp1-IMB 濃縮法でのみ分離された Lp1 の菌数は 100 ml 中 13 CFU、2 CFU、平板培養法のみで分離された 3 検体の Lp1 の菌数はいずれも 10 CFU/100ml と少なかった。なお、加熱処理や酸処理により、夾雑菌によるマスキング回避を検討したが、実際の検体からの分離でも添加回収実験においても、これらの処理は有用ではなかった。

#### 7. レジオネラ生菌迅速検査法の評価

浴槽水などの実検体 324 検体を用いて、PALSAR 法、LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法および EMA-qPCR 法について、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

216 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 77.2%、特異度は 74.8%、一致率は 75.5%であった。シャワー水・カラン水以外の検体においては感度 83.7%、特異度 68.3%、一致率 72.6%であり、平板培養法と相關する迅速検査法であった。しかしながら、シャワー水・カラン水検体においては感度が 37.5%

と低かった。

283 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 84.4%、特異度は 77.7%、一致率は 79.5%であり、平板培養法と相關する迅速検査法であった。このうち 86 検体について EMA-LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 60.0%まで低下したため、EMA 処理濃度を再検討する必要があると考えられた。

168 検体について qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 97.0%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迅速検査法であったが、特異度は 37.8%、一致率は 49.4%であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、177 検体について EMA-qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 82.4%、特異度は 61.5%、一致率は 65.5%であり、EMA 処理を実施することで死菌 DNA の増幅を抑制することができ、より平板培養法と相關する方法となった。

各種迅速検査法は、いずれの方法においても陰性的中率が 90%以上 (シャワー・カラン水検体における PALSAR 法および EMA-LAMP 法は除く) であり、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であると考えられた。また、適切な濃度で EMA 処理を実施することで死菌 DNA の増幅を抑制することができ、より平板培養法と相關する方法となることも明らかとなった。

#### 8. 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

選択培地での培養の結果、49 検体中 20 検体 (41%) からレジオネラ属菌が検出された。検水 100 mL あたり 1000 cfu 以上検出された検体が 10 検体あり、最も菌数が多い検体で 23,500 cfu/100 mL であった。

斜光法は培養 3 日後を判定日とし、特徴あるモザイク様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 20 検体は、継続培養後に菌数が増加することはあったが、全て斜光法で陽性を確認することができた。選択培地と非選択培地の培養結果を比較したところ、

非選択培地上には非常に多くの雑菌が発育し、非選択培地のみでレジオネラ属菌が検出された検体は無かった。

比色系パルサー法については、フィルターの面積にかかわらず結果は同等で、面積の大きいフィルターを用いた方がろ過に係る労力が軽減され、また、検水量を増やした方が検出率は高かった。

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

117 種類の ST (sequence type) を含む計 315 株は、167 種類の MLVA 型に分類された。得られた 315 株の MLVA 型を Minimum spanning tree で示すと、その樹形は、SBT 法による ST とある程度相關した樹形となった。さらに、315 株における SBT 法と MLVA 法の分解能を比較したところ、それぞれ 0.9351、0.9528 となり、ほぼ同等の値を示した。また、各 MLVA 領域における PCI 値は、Sobral ら (Appl Environ Microbiol 2011, 77:6899) の報告とほぼ同等の値を示した。

過去の 1 集団感染事例に由来する臨床分離株 45 株、浴槽水由来 21 株、浴槽ふきとり由来 22 株の MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相關した。

#### 10. レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発

本迅速検出法は約  $10^2 \sim 10^5$  CFU/ mL の範囲で培養法と高い相關 ( $y = 409.26x^{0.8689}$ ,  $R^2 = 0.95113$ ) を示し、レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1、血清群 3、血清群 4、血清群 5、血清群 6、血清群 9、血清群 10 および型別不能株ならびにレジオネラ・デュモフィを検出することができた。本検査法の検出限界と定量限界はそれぞれ約 1,300 counts/100 mL および約  $4.00 \times 10^4$  counts/mL と決定され、生菌数として 32 CFU/100 mL および 235 CFU/mL に相当していた。

#### 11. レジオネラ感染とアメーバ

難培養性のレジオネラ属菌を用いて、菌のアメーバ内生残および分裂増殖におけるファゴソーム形成およびライソソーム融合の阻害剤効果を調べた。

ファゴソーム内活性酸素産生を阻害するアポシニン、およびリソゾームの内部 pH を中性化しその加水分解酵素作用を阻害するクロロキンならびに塩化アンモニウムは、いずれもアメーバ感染率を増加させる効果が認められた。

アポシニン 200  $\mu$ M と塩化アンモニウム 25mM による同時暴露実験では、アメーバ感染率増加に明確な相乗効果は認められなかった。一方へパリン 1,000U/ml にこれらの物質との相乗効果の可能性が示された。

## 12. 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、300～15,000cfu/100ml の目標値（良好範囲）を報告した機関は、非濃縮試料では回答のあった 70 機関中 69 機関（約 99%）、非濃縮試料では 70 機関中 65 機関（約 93%）、ろ過濃縮試料では 65 機関中 49 機関（約 75%）、遠心濃縮試料では 5 機関中 4 機関（約 80%）であった。濃縮試料において、ろ過濃縮では、昨年度良好範囲報告約 77% に対し本年度約 75% とほぼ変わらない結果であった。一方、遠心濃縮では、実施した機関数が少なかった（5 機関）が、目標良好範囲報告 80% であり、2015 年度（約 36%）、2016 年度（約 56%）と比較し、非常に高い結果であった。3 年連続で参加した 58 機関のうち、今年度目標良好範囲外であった 16 機関中 4 機関は 3 年連続で同様の結果で、7 機関は 3 回の外部精度管理中 2 回が目標良好範囲外であった。目標回収率 20% をクリアしたのは、有効回答のあった 66 機関中 34 機関（約 52%）であった。

2017 年 5 月に ISO 11731 の改訂がなされたため、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）推奨法との整合性を確認した。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に講師として参加し、WG 推奨法の普及に努めた。

## 13. レジオネラ属菌検査研修会の開催

静岡県が開催したレジオネラ属菌の検査を行っている検査機関を対象としたレジオネラ属菌同定法の研修会に協力した。研修は講義と実習から成り、実習についてはは検体の前処理法、接

種、同定方法、遺伝子検査法を実施した。事前アンケートを実施したところ、各検査機関が実施している検査方法は検査機関ごとに大きく異なっていた。

## D. 考察

モノクロラミン消毒について、3 施設で実証試験を行い、レジオネラ属菌に対して消毒効果がある結果が得られたが、モノクロラミンの濃度は、泉質、入浴者数、施設の配管の状態等に大きく影響を受けることから、実際の運用に当たってはそれぞれの施設に応じた対応をする必要があると思われた。pH10 を超える源泉の公衆浴場においてモノクロラミン消毒は適用可能で、従来の塩素消毒よりも高い消毒効果が得られた。pH10 程度の浴槽水においては、レジオネラ症防止の観点からモノクロラミン消毒が適していると考えられた。

レジオネラ属菌による継続的な汚染が見られる入浴施設において、高置貯湯槽の手前に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置したが、給湯水およびシャワー水からレジオネラ属菌が検出された。夜間や休日に高置貯湯槽とその先の配管中の遊離残留塩素濃度が低下するためレジオネラ属菌が増殖したと推測された。3 医療機関の給水・給湯系からレジオネラ属菌が検出された。初流水に比較して、3L 流水後および 3 分間（9L）流水後に採取した試料のレジオネラ属菌数および従属栄養細菌数が減少していたことから、レジオネラ属菌および従属栄養細菌が蛇口とその近辺の配管中で増殖していることが推測された。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が、レジオネラ属菌の検出数の変化が小さかったことから、添加量を増やして遊離残留塩素濃度を上げる等の検討が必要であると考察された。

公衆浴場において、空気洗浄用のポンプを接続し、手動操作で行う空気洗浄と高濃度塩素消毒を併用した砂ろ過器洗浄方法（エアレーション・リフレッシュ法）を適用したところ、エアレーション・リフレッシュ後は砂ろ過器内水の濁度、SS

の顕著な低下が見られ、従来の逆洗では砂ろ過器内がきれいにならなかったことが示唆された。一般細菌数については、エアレーション・リフレッシュ法後、長めの逆洗で若干の改善は得られたものの、衛生管理の徹底には高頻度な洗浄と消毒が必要と考えられた。

道路沿いのエアロゾルから EMA-qPCR 法でレジオネラ属菌の遺伝子が検出されたことから、エアロゾル中における生菌の存在が示唆された。また、道路沿い検体におけるレジオネラ属菌遺伝子の検出率および遺伝子量は、浴室内検体と同等かつ屋内検体より高かったことから、道路沿いのエアロゾルは浴室内のそれと同様のリスクがある可能性が考えられた。

直接平板培養法で検出できなかった 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検出することができたが、その際に夾雑菌除去のため加熱処理や酸処理を行っても感度の向上は得られなかった。この理由は、ビーズにより既に夾雑菌が除去されていることが考えられる。加熱や酸による処理は、Lp1 にもストレスとなることから、Lp1-IMB 法ではこれらの処理は必ずしも必要ではないように思われた。

今年度は、5 種類の迅速検査法 ( PALSAR 法、LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法および EMA qPCR 法 ) について、平板培養法の結果と比較し、評価した。PALSAR 法では、溶菌条件を 37 15 分から 70 5 分に変更した結果、平板培養法に対する感度は 77.2% となり、昨年度の 60.5% から向上した。感度、特異度とも LAMP 法および EMA-qPCR 法と同等となり、シャワー水・カラン水以外の検体においては、PALSAR 法は平板培養法と相関する迅速検査法であると考えられた。シャワー水・カラン水については感度が 37.5% ( 3/8 検体 ) と低かったため、RNA の定量、RNA 抽出条件の改良などを実施する必要があると考えられた。EMA-qPCR 法は EMA 処理を実施することで死菌 DNA の遺伝子増幅を抑制でき、qPCR 法と比較し、平板培養法とより相関する迅速検査法となったが、過去に検討した LC EMA-qPCR 法の方が平板培養法の菌数との相関

性が優れていた。一方 EMA-LAMP 法は、EMA 未処理の場合と比較し、平板培養法に対して、特異度は 80.3% から 100% に向上したが、感度は 85.0% から 60.0% に低下したため、EMA 処理濃度を再検討する必要があると考えられた。

特殊な機器を必要としない PALSAR 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。ろ過に時間がかかる検体は、13mm フィルターの代わりに 25mm フィルターを用いることで、その問題が解消された。

利便性の高い MLVA 法は従来の SBT 法や PFGE 法と相関があり、分解能は SBT 法と同等の値を示したことから、感染源推定のための菌株の迅速なタイピング方法として期待できると考えられた。

抗レジオネラ染色試薬を用いて携帯型フローサイトメーターにより、*L. pneumophila* と *L. dumoffii* を特異的に検出することが可能となった。その検出限界は現行の基準値を満たさないので、更なる濃縮方法の検討が必要である。

難培養性のレジオネラ属菌をアメーバを用いて検出、また分離確保する方法の開発のために、菌の取り込み後の細胞内生残および増殖過程に関与すると考えられる因子について検討を行った。アポシニンによるファゴソーム内の NADPH オキシダーゼ活性酸素産生阻害が菌の生残に有効に働くことを証明した。ファゴソームとリソゾームの融合により形成されるファゴリソゾーム内ではリソゾーム由来の加水分解酵素が菌の分解を行うが、リソゾームの酸性化を阻止し、加水分解酵素機能を抑制する塩化アンモニウムには菌の生残性向上効果が認められた。今回分裂像を示す菌の割合は極めて少なかったことから、菌の細胞内分裂に焦点をあてた研究をさらに進めることが今後の課題である。

外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ手技の検証を促すことができる方法であることが確認された。回収率については検査機関による差が見られたが、その要因は各検

査機関で異なると考えられ、内部精度管理により自施設の実態把握に努めることが肝要である。引き続きレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ（WG）内でも回収率の向上と安定に向け検討したいと考える。

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）推奨法について、ISO 11731 が 2017 年 5 月に改訂されたことも踏まえ、日本の浴槽水検査法としての妥当性を検証した。WG 推奨法について、今後は、「公衆浴場における衛生等管理要領」で標準的検査法として提示できるよう検討を進めていく予定である。

検査機関の検査精度の向上には、標準的検査法の確立を行い、精度管理体制および研修制度の構築を並行して推し進めることが必要であると考えられた。

#### E. 結論

公衆浴場等施設の衛生管理の向上を目指して、研究を実施した。

モノクロラミン消毒導入モデルスキームを構築し、3 施設において実証試験を行った。pH10 を超える源泉の入浴施設においてもモノクロラミン消毒が有効であることが確認できた。入浴施設の衛生管理のうえで重要な過器の洗浄について既存の施設に導入可能な実地試験を行ない、効果があった。

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水、河川水、屋内・浴室および道路沿いの空気等について培養検査および迅速検査を行い、レジオネラ属菌による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。レジオネラ属菌 DNA・RNA・表層抗原等を検出対象とする各種迅速検査法を検討し、感度の向上、時間の短縮を図った。

アポシニン、クロロキン、塩化アンモニウム存在下で、難培養性レジオネラの宿主アメーバへの感染が促進されることを見出した。遺伝子型別法として利便性の高い MLVA 法を過去の集団感染事例に適用し、従来法の PFGE 法や SBT 法との相関性が確認できた。

前研究班から引き継ぎ、レジオネラ外部精度管理サーベイを 3 年間継続することで、各検査機関が継続してサーベイに参加する必要性を確認することができた。また、機会をみて各種研修会でレジオネラ検査法の普及に努めている。

今後も、効果的な消毒法・検査法等の確立および普及、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

2017 年 9 月 26 日-30 日にローマで開催された第 9 回レジオネラ国際会議に前川らが参加し、the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) の内部組織である the European Legionnaires' disease Surveillance Network (ELDSNet) からの旅行関連レジオネラ症の報告として、2016 年 10 月以来ヨーロッパからドバイへの旅行者の間でレジオネラ症が多発しているとの情報を得た。2016 年 10 月から 2017 年 9 月までの間に、患者数は 78 人（うち 2 名死亡）となっている。滞在ホテルは 55 に及び、共通した訪問先なども見当たらず、感染源は不明である。患者分離菌の遺伝子型は ST616、ST2382、ST1327 であった。

わが国のレジオネラ症患者のほとんどは国内感染患者であり、海外渡航歴があり、国外で感染したと推定される患者は、例年、2%前後であることから、本情報が、ただちにわが国のレジオネラ症患者の増加につながるとは考えにくい。ドバイへの渡航歴がレジオネラ症感染のリスクにつながる可能性があるとして、報告するものである。（平成 29 年 10 月 31 日付で厚生労働省健康危機管理・災害対策室長に通報）

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshida M, Izumiyama S, Fukano H, Sugiyama K, Suzuki M, Shibayama K, Hoshino Y. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium* sp. Strain shizuoka-1, a Novel *Mycobacterium* Isolated from Groundwater of a Bathing Facility in

- Shizuoka, Japan. Genome Announc. 2017 Nov 22;5(47).
- 2) 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, 295-300, Vol.45, No.6 (2017)
  - 3) Ito A, Ishida T, Tachibana H, Ito Y, Takaiwa T, Fujii H, Hashimoto T, Nakajima H, Amemura- Maekawa J. A case of community-acquired pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 9 in which initial treatment with single-dose oral azithromycin appeared useful. Jpn J Infect Dis. 70:660-662, 2017.
  - 4) Kanatani JI, Isobe J, Norimoto S, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M. Prevalence of Legionella species isolated from shower water in public bath facilities in Toyama Prefecture, Japan. J Infect Chemother. 23:265-270, 2017
  - 5) Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. Epidemiol. Infect. 145:1398-1408, 2017.
  - 6) Kuroki T, Amemura-Maekawa J, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee KI, Ohnishi M, Kura F. Outbreak of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella pneumophila* Serogroups 1 and 13. Emerg Infect Dis. 23(2): 349-351, 2017.
  - 7) 磯部順子, 金谷潤一, 他. 2017. 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2016年). 富山県衛生研究所年報. 40:61-66.
2. 総説
    - 1) 倉 文明. 環境におけるレジオネラの存在と感染予防策. 最新医学. 72:520-527, 2017.
    - 2) 倉 文明. レジオネラ感染. 日本医師会雑誌. 146. 特別号(2)環境による健康リスク: S202-294, 2017.
  3. 書籍
    - 1) 赤井仁志, 井上浩章, 枝川亜希子, 小澤匡弘, 倉 文明, 小瀬博之, 関 雅文, 高貝健治, 高橋佳代子, 高橋幸雄, 舘田一博, 長岡宏美, 比嘉 太, 古畑勝則, 前川純子, 松鷲さとみ, 松村佳明, 宮下修行, 柳 宇. 第4版レジオネラ症防止指針. 公益財団法人日本建築衛生管理教育センター. 平成29年7月.
  4. 学会発表
    - 1) Morinaka R, Amemura-Maekawa J, Kanatani J, Isobe J, Sasaki M, Haraguchi H, Futo S, Kura F.: Detection of *Legionella* spp. by new colorimetric PALSAR method. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
    - 2) Amemura-Maekawa J, Kuroki T, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee K, Ohnishi M, Kura F.: Molecular and epidemiological analysis of *Legionella pneumophila* strains in an outbreak at bath facilities in Japan. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
    - 3) Kura F, Amemura-Maekawa J: *Legionella* detections in environments and their impacts on the occurrence of legionellosis in Japan. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
    - 4) Kanatani J, Isobe J, Norimoto S, Kimata K, Uchida K, Kura F, Amemura-Maekawa J, Watahiki M: Detection and identification of *Legionella* species in aerosols from the area nearby asphalt roads and bath water

- in public bath facilities in Toyama Prefecture, Japan. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
- 5) Isobe J, Kanatani J, Kimata K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watahiki M: **Distribution of Legionella** species in windshield washer fluid of motor vehicles in Toyama, Japan. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
- 6) Taguri T, Cai G, Ebisu-Ojima H, Amemura-Maekawa J, Kura F: Breakpoint Chlorination as Control of *Legionella* (Leg) in Bath Water using flow cytometry 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
- 7) Noriko Nakanishi, Shinobu Tanaka, Kentaro Arikawa, Tomotada Iwamoto: Distribution and molecular characteristics of *Legionella* spp. strains isolated from cooling tower and hot spring in Kobe City, Japan. The 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. 平成 29 年 9 月, Italy Roma.
- 8) 柳本恵太、堀内雅人、植松香星、山上隆也、久田美子、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、泉山信司：アルカリ性温泉におけるモノクロラミン消毒の実証試験、第 20 回山梨県公衆衛生研究発表会、山梨県（2018）
- 9) 柳本恵太、堀内雅人、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、山上隆也、植松香星、久田美子、泉山信司：アルカリ性温泉におけるモノクロラミン消毒の実証試験、平成 29 年度山梨県衛生環境研究所成果発表会、山梨県（2018）
- 10) 泉山信司、市村祐二、青木信和、江口大介、杉山寛治、長岡宏美、水泳プールのモノクロラミン消毒の試み、環境技術学会、2017 年 7 月、東大阪市
- 11) 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と対策，第 100 回日本細菌学会関東支部総会，2017 年 9 月，東京都。
4. 研修会
- 1) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 29 年度環境監視員担当者会議、2017 年 4 月、大分。
- 2) 佐々木麻里：大分県のレジオネラ症とレジオネラ検査について、レジオネラ症防止対策講習会、2017 年 11 月、大分。
- 3) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 29 年度第 2 回保健所等検査技師研修会、2018 年 2 月、大分。
- 4) 倉 文明，平塚貴大，黒木俊郎，他：最近のレジオネラ症の発生動向と検査方法，2017 年に広島県内で発生したレジオネラ症集団感染事案について，給水・給湯系におけるレジオネラ汚染の実態，他：平成 29 年度生活衛生関係技術担当者研修会（厚生労働省健康局生活衛生課），2018 年 2 月 1 日，東京。
- 5) 倉 文明：レジオネラ属菌の検査と対策 - 温泉入浴施設・迅速検査・取組状況-，国立保健医療科学院平成 29 年度短期研修環境衛生監視指導，2017 年 11 月，和光市。
- 6) 倉 文明：冷却塔等のレジオネラ症対策について，平成 29 年度東京都ビル衛生検査技術研修，2018 年 3 月，東京。
- 7) 前川純子，森本 洋，他：レジオネラ属菌検査法の現状，レジオネラ属菌培養検査について，他：レジオネラ属菌検査セミナー（主催：日水製薬株式会社），2018 年 3 月 14 日，東京。
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし