

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、評価を行い、その普及を目指した。以下にその成果を記す。

(1) 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 233 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。RT-qPCR 法の結果から、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。したがって、PALSAR 法は、現時点ではシャワー水およびカラン水以外を対象として使用するのが望ましいと考えられた。

(2) 大分県内施設の浴場水 48 検体を対象に迅速培養法（斜光法を取り入れた培養法）を実施し、短時間で正確な培養結果を得ることができた。多様な泉質を有する大分県の浴場水検査で、培養陽性、LAMP 法陰性の結果が不一致となる検体については、Chelex 抽出法を採用することによりその不一致が解消されることが示唆された。

(3) 携帯型フローサイトメーターを用いた細菌数測定と *Legionella pneumophila* 抗体による特異的検出を組み合わせることで、当該菌の生死スクリーニングを含んだオンサイト定量解析法を確立した。遊離塩素消毒下の入浴施設現場におけるレジオネラリスク監視の有用なツールとしての利用が期待できる。

(4) 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 MLVA 法を用いて、過去の集団事例 6 事例について、MLVA 型を決定し、PFGE および SBT 型別との比較を行った。患者株と同一の ST および PFGE パターンを示した浴槽水由来株および拭き取り由来株は MLVA 型も同一であった。

(5) 患者検体から最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群 1 (*Lp1*) に対する抗血清で感作した免疫磁気ビーズを用いた検体の選択的濃縮は、*Lp1* を検出する qPCR によるスクリーニングと組み合わせることで、感染源調査に有用となると思われる。

(6) 入浴施設の浴槽、カラン並びにシャワー及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態調査を継続的に行ったところ、配管中のレジオネラ汚染の除去には塩素の添加や水温を上げることが有効であるが、効果は限定的であり、完全に汚染を除去するには追加の対策が必要であると推測された。また、給水・給湯系におけるレジオネラ汚染についてのシンポジウムには、160 名を超える参加者があり、関心の高さと、アンケート回答から参加者がその対応に苦慮している実情が明らかとなった。

(7) ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC(Viable but not culturable)モデル系を構築した。室温で約 7 週間培養した時点で VNC 菌が約 64%存在した。BCYE 製品により菌の発育性が異なり、VNC 菌の評価に影響を与えること、また培養可能な菌の過少評価につながる可能性があることが示唆された。

(8) pH8 から 10 の浴槽水において、機械的な添加と手投入のいずれによっても、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌を抑制し、遊離塩素管理に比較して、衛生状態を良好に維持できた。これまでの研究で得られたモノクロラミン消毒の成果を、一般利用者と営業者に向けて平易な表現で記述し、Web ページで公開した。

(9) 生薬及び無機塩薬湯にモノクロラミン消毒を実施すると、薬湯の退色や香りの変化は認められず、総残留塩素濃度 3mg/L 以上の維持が可能で、レジオネラ属菌は検出されなかった。次亜塩素酸ナトリウムでは、薬湯の色を保持しながら、遊離残留塩素濃度を 0.4mg/L 以上に安定的に維持することは困難であった。モノクロラミン消毒を継続すると 3 週目以降に従属栄養細菌数が増加した。

(10) 本研究班を含め、これまでに複数の研究班が行ってきた研究成果を見直し、公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言を行った。

(11) 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。全国 148 検査機関が参加し、本研究班からは 70 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。また、昨年度改訂された ISO との調整を図った「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示した。

(12) 静岡県内のレジオネラ属菌の検査を行っている検査機関 15 機関 25 名、保健所（静岡市及び浜松市を含む）職員 23 名を対象にレジオネラ属菌同定法について研修会を開催した。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、同定方法及び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・岡山理科大学教授
 森本 洋・北海道立衛生研究所主幹
 磯部順子・富山県衛生研究所部長
 佐々木麻里・大分県衛生環境研究センター主任研究員
 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

A. 研究目的

公衆浴場をはじめとする水系施設の衛生管理に不備があるとレジオネラ属菌が増殖し、そこから生じるエアロゾルを介してヒトに感染して、レジオネラ症を発症する。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、およびその普及をこれまで実施してきた。1~2 日で結果が得られる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、「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提唱する。入

表1 研究協力者一覧

赤地重宏	三重県保健環境研究所	陳内理生	神奈川県衛生研究所	松田宗大	株式会社ヘルスケミカル
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	松田尚子	株式会社ヘルスケミカル
稲葉寿高	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所
上野潤二	栄研化学株式会社	田中 忍	神戸市環境保健研究所	三津橋和也	北海道立衛生研究所
江川英明	大分県南部保健所	田中慶郎	株式会社マルマ	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
植松香星	山梨県衛生環境研究所	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
漆畑 健	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課	永井佑樹	三重県保健環境研究所	森川正浩	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	八木樹里奈	花王株式会社 ハウスホールド研究所
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	成松浩志	大分県衛生環境研究センター	山上隆也	山梨県衛生環境研究所
小川恵子	北海道立衛生研究所	西尾正也	花王株式会社 ハウスホールド研究所	山口友美	宮城県保健環境センター
金谷潤一	富山県衛生研究所	野本竜平	神戸市環境保健研究所	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
神田由子	大分県衛生環境研究センター	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
倉 文明	国立感染症研究所	久田美子	山梨県衛生環境研究所	吉田光範	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
後藤高志	大分県衛生環境研究センター	平塚貴大	広島県総合技術研究所保健環境センター	吉野修司	宮城県衛生環境研究所
蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	藤井 明	株式会社ヘルスケミカル	米澤武志	神戸市環境保健研究所
下田貴宗	シモダアメニティ株式会社	星野仁彦	国立感染症研究所	米澤武志	神戸市環境保健研究所
新道欣也	株式会社 お風呂のシンドー	政岡智佳	ハンセン病研究センター	定谷雄亮	川崎市健康安全研究所
			神奈川県衛生研究所		

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ノクロミン消毒のさらなる実践を行う。また、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い、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し、その成果に基づき、公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言を行うことで、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い、実体顕微鏡を用いた斜光法による分離培地の観察を行った。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. レジオネラ属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 30 年度に浴用施設などから採取された 233 検体（浴槽水 147 検体、湯口水 23 検体、シャワー水 29 検体、採暖槽水 16 検体、カラン水 15 検体、冷却塔水 2 検体、プール水 1 検体）を用いた。

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 1 および 2 回実施した。EMA-LAMP 法は、3000 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。

2. LAMP 法と比色系パルサー法の検討

大分県衛生環境研究センターで、浴槽水および湯口水、25 施設 48 検体を対象とし、LAMP 法

および比色系パルサー法を実施した。一部検体の LAMP 法実施時に、Chelex 抽出法を行い常法と比較した。川崎市健康安全研究所で、浴槽水や採暖槽水等 39 検体について、比色系パルサー法を実施した。

3. フローサイトメトリー技術の開発

1 週間毎に高濃度塩素洗浄処理 (20 mg/L × 1 時間) を行っている入浴施設の処理前後の浴槽から、5 週間にわたり採水された 30 検体、3 社会福祉施設の循環ろ過式浴槽からオゾン処理前後および濯ぎ後に採水した合計 16 検体の浴槽水、研究協力者から郵送された検査を委託された 30 種類の循環ろ過式浴槽水について、フローサイトメーター miniPOC (シスメックスパルテック社) を使用し、細菌数を測定した。また、検水を濃縮後、*Legionella pneumophila* (LP) 血清群 1 染色試薬および LP 非血清群 1 染色試薬で染色し、フローサイトメーターで計測し、検量線から LP 数を算出した。

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

今年度は、*L. pneumophila* 血清群 1 の 124 株、血清群 1 以外の *L. pneumophila* 187 株および過去の 6 集団感染事例に由来する 65 株を用いて、Sobral ら (Appl Environ Microbiol. 2011. 77:6899) により報告された 12 領域について、蛍光標識したプライマーによる 4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR を行い、AB3500 Genetic Analyzer および GeneMapper Ver. 4 (Applied Biosystems) を用いて、フラグメントサイズおよびリピート数を測定した。得られた MLVA 型から BioNumerics Ver7.6 を用いて、Minimum spanning tree (MST) を作成した。

5. 感染源解明のための環境調査

浴槽水 49 検体、シャワー水 28 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。

検水 100 ml あるいは滅菌水で 10 倍希釈した検水を滅菌容器に入れ、そこに Legiolert (アイデックスラボラトリーズ) 培地を加え、試薬が完

全に溶解するまで混和した。検水 100 ml で検査する場合は、硬度試験紙にて硬度を測定し、度合いに応じてサプリメントを添加した。それを定量のトレイ (Quanti-Tray/Legiolert) に入れ、専用シーラーで密封したものを湿潤箱に入れ、39 で 7 日間培養した。

検体 100 倍濃縮液およびそれらを滅菌生理食塩水で 5 倍希釈した希釈検体について、デンカ生研で作製した Lp1-IMB 25 μ l を接種し、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 200 μ l に懸濁、ボルテックスでよく混和して、その 100 μ l を GVPC 培地に接種し、培養した。

2018 年 5~8 月に道路沿いの 6 地点で、GVPC 培地 (日水製薬) を設置した慣性衝突法によるエアサンプラー (BIOSAMP, ミドリ安全株式会社) を用いて、100 l/min の条件で 5 および 15 分間、各 23 回、計 46 サンプルのエアロゾルを捕集した。

sg1-qPCR は、Mérault ら (Appl Environ Microbiol. 2011. 77:1708) に従い、プライマーおよびプローブを作製し、反応試薬として Premix Ex Taq (Probe qPCR) (タカラバイオ) を用いて実施した。

6. 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の地下貯湯槽、高置貯湯槽、浴槽水、湯口水、蛇口水、シャワー水をおよび神奈川県内の 3 医療機関洗面台等の蛇口水、受水槽水を採取し、検査した。

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染問題に関するシンポジウムを開催した。参加者に対してアンケート調査を実施した。

7. レジオネラ属菌の VNC (Viable but not culturable) 菌モデルと BCYE での VNC 菌検出

BCYE で 3 日間培養した *L. pneumophila* SG1 378 株 (Lp と省略) を 10^{-5} OD となるように無菌的にボトル内 200 ml の 5 mM のリン酸バッファー溶液 (pH7.1) に添加し、密栓して室温ならびに 4 で攪拌培養を行った。培養液を

100 倍希釈し、LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fisher) で蛍光染色し、その 0.1 ml をポリカーボネートフィルター (0.2 μ m、25 mm、ADVANTEC) 中央にスポット (3-4 mm 径) し、フィルターから水分を吸引後、退色防止剤で封入し、FITC 用 B 励起バンドパスフィルターで蛍光観察を行い、赤色蛍光菌体を死菌、緑色蛍光菌体を生菌としてその数を測定した。BCYE に様々な因子や pH の変化で VNC レジオネラ属菌が培地発育能を回復するかどうかを試験するため、カタラーゼ (ナカライテスク)、ピルビン酸 Na (ナカライテスク)、ケトグルタル酸 (Research Organic)、スベルミジン (富士フィルム・和光純薬) を無菌的に BCYE 上に所定の濃度溶液 0.1 ml を塗布、乾燥させた。pH は BCYE オートクレーブ滅菌前に調整した。ボトル培養液を 100 倍希釈し、その 0.1 ml を平板に塗布し 37 で培養した。

8. モノクロラミン消毒のアルカリ性温泉への応用

以下に記す 3 営業施設の協力を得て、モノクロラミン消毒を実施した。利用者への配慮として、モノクロラミン消毒を実施している旨を掲示した。

施設 1 pH10 の温泉水を使用している循環式浴槽 (約 26 m³) で、モノクロラミン生成装置 (ケイ・アイ化成) を設置し、モノクロラミン濃度は 3 mg/L を下回らないよう、タイマー式の一定量添加で管理し、6 週間の実証試験を行った。浴槽水の全残留塩素を、毎日正午と 14 時頃に測定した。週 1 回の完全換水時に 15~20 mg/L の高濃度のモノクロラミンで一晩配管を消毒し、チオ硫酸ナトリウムで中和した。試験前に 1 回、期間中は週に 1 回、浴槽水の採水と配管のふきとりを行った。

施設 2 pH10 の温泉水を使用している公衆浴場の毎日換水している循環式の露天風呂 (約 3 m³) の浴槽水に、アンモニア系顆粒と次亜塩素酸系顆粒を十分量の水道水に溶解し、生成したモノクロラミンを加えた。モノクロラミン濃度は 1 時間に 1 回測定を行い、3 mg/L を下回らないよう濃度を管理した。試験前に 1 回、4 日間の試験

期間中は毎日、採水と配管のふきとりを行った。

施設 3 pH8 で約 4~5 mg/L のアンモニウムイオンが含まれ、遊離塩素消毒が困難な水質の浴槽 (5.6m³) について 5 日間モノクロラミン消毒を実施した。1 日目の朝から 5 日目の夜まで、同一温泉水による循環ろ過を継続し、手投入のモノクロラミンを用いて、浴槽水内のモノクロラミン濃度を 3 mg/L 以上を目安に調整した。通常は浴槽に温泉水を継ぎ足しながら利用していたが、研究期間中は継ぎ足しを停止し、換水も行わないこととした。浴槽水を、每晚営業終了後 (PM11:00 過ぎ) に採取した。

採水した検体は、レジオネラ属菌数、アメーバ数、大腸菌群数、一般細菌数、従属栄養細菌数、pH、遊離残留塩素、全残留塩素を測定し、ふきとり検体はレジオネラ属菌の検出に供した。

9. モノクロラミン消毒の薬湯への応用

神奈川県内に所在の一営業施設の協力を得て、実際の浴槽水を用いて検討を行った。井戸水を張った露天ひのき風呂において、生薬又は無機塩の薬湯を使用した。消毒には、モノクロラミンあるいは次亜塩素酸ナトリウムを用いた。モノクロラミン消毒時は、モノクロラミン生成装置を設置し、タイマー式の制御で、総残留塩素濃度 3mg/L 以上で管理した。次亜塩素酸ナトリウムは遊離残留塩素濃度 0.4mg/L 以上で管理した。退色が進むのに合わせて薬湯を追加投入した。浴槽水の湯色は目視又は吸光光度法により評価し、湯の香りは官能評価した。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) を測定し、レジオネラ培養検査を行い、一般細菌数を測定した。R2A 寒天培地を用いて従属栄養細菌数を測定し、優占であったコロニー形状を示す 3 コロニーの 16S rDNA 塩基配列を確認した。

10. 公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

本研究班を含めて、これまでに複数の研究班が行ってきた研究成果を見直し、公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言を行った。

11. 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、実施母体を日水製薬株式会社とし、全国 148 の検査機関(延べ 151 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「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 5 枚に 100 μ 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 900~18,000 CFU/100 mL と設定した。本年度から、濃縮検体については、回収率により判定を行った。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%を下限とし、上限を 100%未満とした。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 70 機関については、独自に集計・解析を実施し、過去 3 年間の結果と比較した。

(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. レジオネラ属菌迅速検査法の評価

183 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 81.8%、特異度は 69.8%、一致率は 72.7%であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。EMA-LAMP 法を実

施した結果、平板培養法に対する感度は 69.1% と LAMP 法より低かったものの、特異度は 85.3%、一致率は 81.0%まで上昇した。

126 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 100%であり、平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のすべてを検出できる迅速検査法であった。特異度は 34.8%、一致率は 52.4%であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。EMA 処理を 2 回実施すると、特異度は 68.5%、一致率は 75.4%まで上昇した。EMA 処理回数は、1 回と 2 回でほとんど結果に差はなかった。

92 検体について RT-qPCR 法を実施した結果、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。

2. LAMP 法と比色系パルサー法の検討

培養により浴槽水および湯口水 48 検体中 24 検体 (50%) からレジオネラ属菌が検出された。6 検体は検水 100 mL あたり 1,000 cfu 以上検出され、最も菌数が多い検体は 3,500 cfu/100 mL であった。レジオネラ属菌が検出された 24 検体中 23 検体については、培養 3 日後の斜光法でレジオネラ属菌を確認することができた。確認できなかった 1 検体からは、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が 1 コロニーのみ (5 cfu/100mL に相当) 検出された。

LAMP 法の DNA 抽出法について、常法と Chelex 抽出法を比較するため、対応のある 2 標本間の片側検定による t 検定を実施したところ、全検体間では有意差が見られなかったが、培養での菌数が 50 cfu/100 mL 以上の 9 検体間では、Tt 値の平均値と標準偏差は、常法で 45.8 ± 9.9 分、Chelex 抽出法で 36.0 ± 10.7 分となり、Tt 値が有意に低下した ($p=0.012$)。

大分県衛生環境研究センターにおいて、培養法が陽性でパルサー法が陰性となったのは 2 検体だけだったが、川崎市健康安全研究所において培養陽性だった 4 検体はすべてパルサー法陰性となる一方で、パルサー法陽性の 5 検体はすべて培養陰性であった。

3. フローサイトメトリー技術の開発

フローサイトメーターを用いるレジオネラリスクの現地迅速評価法 (RDM) をレジオネラ・ニューモフィラ (LP) の特異検出法と組み合わせることで、当該菌の生死スクリーニングを伴うオンサイト定量解析法として改良した。浴槽水 76 試料を現地で RDM 法を行い、培養法に対するスクリーニングとしての有効性を検証したところ、RDM 法の培養法に対する感度は 93.3%、特異度は 95.1%を示した。LP 数の定量性については、RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し ($R^2 = 0.65$)、培養法の検出限界値 (10 CFU/100mL) 付近においてはやや高めの値を示したものの定性的には妥当な成績を示した。

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

前年度までの結果も合わせると、SBT 法により 164 種類の ST (sequence type) に分類される 439 株の *L. pneumophila* SG1 は、233 種類の MLVA 型に分類された。分解能 (HGDI) は、SBT 法で 0.9599、MLVA 法で 0.9717 となり、ほぼ同等の値を示した。119 種類の ST を含む 187 株の SG1 以外の *L. pneumophila* は、131 種類の MLVA 型に分類された。

集団事例 6 事例について、MLVA 型を決定し、PFGE および SBT 型別との比較を行ったところ、患者株と同一の ST および PFGE パターンを示した浴槽水由来株および拭き取り由来株は MLVA 型も同一であった。

4 自治体に MLVA プロトコルを提供し、MLVA の汎用性の評価を行った。その結果、他の自治体においても、MLVA 型が PFGE と SBT タイピングと概ね相関する結果が得られた。

5. 感染源解明のための環境調査

Legionella 属菌が検出されたのは、浴槽水で 10/49 検体 (20.4%)、シャワー水で 4/28 検体 (14.3%)、カラン水で 5/15 検体 (33.3%) であった。エアロゾル 46 検体からは *Legionella* 属菌は分離されなかった。

Lp1-IMB 法において *Lp1* は浴槽水 3/49 (6.1%) 検体、シャワー水では 1/28 (3.6%) 検体、また、カラン水 1/15 (6.7%) 検体から分離された。検体の種類による *Lp1* の検出率に差は認められな

かった。また、qPCR 法による sg-1 特異的遺伝子は、全体で 19/92 検体 (20.6%) から検出された。その内訳は、浴用水 15/49 検体 (30.6%)、シャワー水 2/28 検体 (7.1%)、およびカラん水 2/15 (13.3%) で、浴用水での検出率が高かった。Lp1 について着目すると、通常培養法、Lp1-IMB 法、および sg1-qPCR 法の 3 法いずれにおいても Lp1 が検出されたのは、浴用水、シャワー水それぞれ 1 検体のみであった。濾過濃縮 (100 倍) を 5 倍希釈した検体 (20 倍濃縮液) を用いた Lp1-IMB 濃縮法による Lp1 の検出結果では、100 倍濃縮液で 2/8 (25.0%)、20 倍濃縮液では 5/8 (62.5%) と、20 倍濃縮液で検出率が高かった。一方、濃縮検体を用いない検査法である

「Legiolert」で Lp 陽性となったのは 100ml 検体で供試した場合 3/29 (10.3%) 検体、10ml 検体で供試した場合 8/63 (12.7%) 検体であった。

6. 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 入浴施設において、カラん・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た。そこで、営業者が高置貯湯槽に入る配管に塩素添加装置を設置し、貯湯槽と配管中の温水を消毒する対策を行った。消毒開始後の調査では、培養によりレジオネラ属菌が検出されたため、継続的に観察したところ、再度レジオネラ属菌が検出された。医療機関については、これまでの調査によりレジオネラ属菌汚染が明らかとなっている医療機関が塩素濃度を上げる対策を取り、その後の経過を調査した。その結果、採水した水試料の遊離残留塩素濃度は対策前と比較して上昇していた。それによりレジオネラ属菌の菌数の減少が観察されたが、菌数が増加した場所もあった。給水系では初流水における遊離残留塩素濃度が 0.2mg/L を下回るあるいは 0.2mg/L 付近の濃度の試料において、給湯系では水温が低い試料においてレジオネラ属菌が検出された。

演者 2 名 (うち 1 名は国外招聘) による講演会および演者 6 名によるシンポジウムから成る講演会・シンポジウム「医療機関の給湯・給水系に潜むレジオネラ感染リスク - 実態と予防策 -」を平成 30 年 10 月 27 日に国立感染症研究所にて

開催し、160 人ほどが参加した。アンケート調査を実施し、108 人から回答を得た。バイオフィルムやレジオネラ汚染の除去の難しさや対策の重要を知ることができた、汚染問題を認識することができた、事前に準備・対策を立てておくことが必要であることを知った、基礎から実践までの内容が満載だった、異なる分野の人と交流できた、対策があいまいで根本的な問題解決に至っていない、対応ガイドラインを作ってほしいなど多くの感想・意見が寄せられた。

7. レジオネラ属菌の VNC 菌モデルと BCYE での VNC 菌検出

ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験を行った。室温で約 7 週間培養した時点で VNC 菌が約 64% 存在した。4 での培養では、VNC 菌がほとんど確認できなかった。

酸化ストレス抑制効果や細胞内代謝、DNA 合成促進に関与する物質をサプリメントの形で BCYE に添加したが、VNC 菌の発育を促進するものはなかった。

BCYE 製品により菌の発育性が異なり、VNC 菌の評価に影響を与えること、また培養可能な菌の過少評価につながる可能性があることが示された。

8. モノクロラミン消毒のアルカリ性温泉への応用

pH8 から 10 の浴槽水において、機械的な添加と手投入のいずれによっても、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌を抑制し、遊離塩素管理に比較して、衛生状態を良好に維持できた。

これまで本研究で得られた成果を、一般利用者と営業者に向けて平易な表現で記述し、Web ページで公開した (https://sites.google.com/view/legionella-resgr/monochloramine_index)、

9. モノクロラミン消毒の薬湯への応用

生薬及び無機塩薬湯使用時にモノクロラミンは総残留塩素濃度 3mg/L 以上の維持が可能で、レジオネラ属菌は検出されなかった。薬湯の退色や香りの変化は認められず、薬湯の追加投入の必要がなかった。次亜塩素酸ナトリウムでは、薬湯の色を保持しながら、遊離残留塩素濃度を 0.4mg/L 以上に安定的に維持することは困難で

あった。モノクロアミン消毒を継続しておよそ3週目以降に従属栄養細菌数が増加し、 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mLの濃度で推移した。R2A寒天培地より釣菌した優占3コロニーのうち、2株は*Mycobacterium phlei*、1株は*Microbacterium aurum* (99.4% = 466/469)に近縁な*Microbacterium sp.*と同定された。高濃度塩素消毒を行ったが、従属栄養細菌数は一過性に減少しただけであった。次亜塩素酸ナトリウム消毒下においても、*M. phlei*が検出された。

培養法で60CFU/100mLのレジオネラを検出した試料水にモノクロアミン約3.5mg/L及び次亜塩素酸ナトリウム約0.5mg/Lを添加すると1時間後には培養法不検出となった。LAMP法は、モノクロアミン添加の24時間後でも陽性であった。次亜塩素酸ナトリウム添加では、3時間後に不検出となった。

10. 公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究

公衆浴場における衛生等管理要領等「別添1 公衆浴場における水質基準等に関する指針」において、原湯、原水、上り用湯及び上り用水の水質基準及び検査方法における過マンガン酸カリウム消費量を全有機炭素(TOC)量に、大腸菌群を大腸菌に変更し、レジオネラ属菌の検査方法については当研究班の推奨する検査法を参照することを提案した。「レジオネラ属菌検査の依頼にあたっては、精度管理を行っている検査機関に依頼することが望ましい。」を追記することを提案した。

「別添2 公衆浴場における衛生等管理要領」については、重複した内容を除き、新しい知見等を加え、また、循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルと整合するよう施設設備構造および衛生管理方法についての修正を提案した。

11. 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、4年連続参加した機関は52機関あった。今年度、目標良好範囲を報告した機関は、非濃縮試料では70機関中68機関(約97%)であった。

ろ過濃縮試料では目標回収率20%以上100%未滴をクリアしたのは、非濃縮を分母とした場合、70機関中52機関(約74%：昨年度は非回答及び非濃縮で非検出だった4機関を除く67機関中37機関、約55%)であった。目標良好範囲外を報告した18機関のうち14機関は昨年度も参加していたが、うち9機関は2年連続で良好範囲外を報告していた。

外部精度管理用の配付試料であるBioBallを利用して、ろ過濃縮におけるポリカーボネート製フィルターの洗浄時間を1分及び2分で比較したが、有意差は認められなかったことから、その洗浄時間を1分とし、国から自治体に技術的助言として示すための検査法として「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示する際の根拠とした。

12. レジオネラ属菌検査研修会の開催

レジオネラ属菌の検査を行っている検査機関を対象に研修会を開催した。参加者は検査機関15機関25名、静岡県内の保健所(静岡市及び浜松市を含む)23名であった。研修は、講義と実習の二部構成で行った。また、各検査機関が実施している検査方法を把握するため、事前アンケートを実施した。講義では、検査についての解説のほか、静岡県行政担当による「静岡県のレジオネラ防止対策についての取組み」の解説、麻布大学古畑勝則教授による「レジオネラ属菌の細菌学的特徴と汚染対策」と題した特別講演を行った。実習では、検体の前処理方法、接種、同定方法、遺伝子検査法についての研修を行った。

D. 考察

レジオネラ属菌平板培養時に行う斜光法は高価かつ特殊な機器を必要とせず、培養3日後の時点で観察・同定し、速報することが可能となり、また、精度向上にもつながることから非常に有用な方法であることが確認できた。レジオネラ属菌を実験室下で長期間水中培養すると、一部がVNC化し、平板培養による発育能を失うことがわかった。

4年間継続実施されてきた外部精度管理(レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ)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、今後さらに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連携が必要と思われた。検査機関における検査精度向上のためには実習を伴った研修会の開催が有用であると思われた。

迅速検査法(LAMP法、EMA-LAMP法、qPCR法、EMA qPCR法、PALSAR法)について、平板培養法の結果と比較し、評価した。温泉を対象とした場合、EMA-LAMP法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分がEMA処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。あるいは、死菌に対するEMA処理効果は泉質に関係ないと想定すれば、温泉検体には、膜構造が損傷している菌体が多く、DNAが抽出されやすかったため、LAMP法の感度が高かった可能性も考えられた。また、感度の低下を防ぐために、N=2で実施するのが望ましいと考えられた。Chelex抽出法を行うと、LAMP法において何らかの反応阻害が低減でき、50cfu/100mL以上の検体でTt値が有意に低下した。Chelex抽出法はLAMP法において偽陰性を減らすのに有効な抽出法であると考えられた。qPCR法は平板培養法に対する感度は100%だが、特異度が低かった。そこで、EMA処理を実施すると、死菌DNAの遺伝子増幅を抑制でき、平板培養法とより関連する迅速検査法となった。EMA処理回数は、1回と2回でほとんど結果に差はなく、実用上EMA処理回数は1回で十分であると考えられた。シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌RNA量は、浴槽水より全体的に低い傾向にあることが分かったので、RNAを検出するPALSAR法は、現時点ではシャワー水およびカラン水以外を対象として使用するのが望ましいと考えられた。また、特殊な機器を必要としないPALSAR法は、現場での活用が期待されるが、今後時間を要する濃縮工程の再検討が必要である。

患者検体から最も多く分離されている*Legionella pneumophila* 血清群1(*Lp1*)に対する抗血清で感作した免疫磁気ビーズ

(*Lp1*-IMB)を用いた検体の選択的濃縮は、*Lp1*を検出するqPCRによるスクリーニングと組み合わせることで、感染源調査に有用となると思われた。

MLVAタイピングは従来法のSBTタイピングやPFGEと関連があり、分解能はSBTタイピングと同等の値を示したことから、感染源の推定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。

携帯型フローサイトメーターを用いたレジオネラリスクの現地迅速評価法を*Lp1*判定を含めた*Lp*に対する抗体検出法と組み合わせることで、当該菌の生死スクリーニングを伴うオンサイト定量解析法として改良した。5分間の消毒効果判定と約1時間の*Lp*定量評価により遊離塩素消毒下の入浴施設現場におけるレジオネラリスク監視の有用なツールとして利用可能であるといえる。

入浴施設の浴槽、カラン並びにシャワー及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態調査を継続的に行ったところ、配管中のレジオネラ汚染の除去には塩素の添加や水温を上げることが有効であるが、効果は限定的であり、完全に汚染を除去するには追加の対策が必要であると推測された。また、給水・給湯系におけるレジオネラ汚染についてのシンポジウムには、多くの参加者があり、関心の高さと、アンケート回答から参加者がその対応に苦慮している実情が明らかとなった。

pH8から10のアルカリ性の浴槽水および生薬あるいは無機塩薬湯において、モノクロラミン消毒の効果を確認できた。換水頻度が低い場合は、雑菌の増殖、すなわちバイオフィルムの蓄積が心配されることから、換水と洗浄を徹底する必要性が示唆された。モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムと比較して、DNAを分解(あるいは変性)しないことから、モノクロラミン消毒下では、レジオネラが培養不検出であっても、LAMP法で高率に陽性となることがわかった。モノクロラミン消毒についてのこれまでの研究成果を一般利用者と営業者に向けて平易な表現で記述したWebページを公開した。モノクロラミン消毒の

活用が期待される。

E. 結論

公衆浴場等施設の衛生管理の向上を目指して、研究を実施した。

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水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、その対策法を検討した。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。

感染源の迅速な特定への有用性が期待される型別法である MLVA 法を多機関で実施した。

pH8 から 10 のアルカリ性の浴槽水および生薬あるいは無機塩薬湯において、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌を抑制し、遊離塩素管理に比較して、衛生状態を良好に維持できた。モノクロラミン消毒について、研究成果をわかりやすく記述し、Web ページで公開した。

レジオネラ外部精度管理サーベイを継続することで、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。各種研修会でレジオネラ検査法の普及、検査精度の向上に努めた。

これまでの研究成果を踏まえ、公衆浴場における衛生等管理要領等のレジオネラ属菌に関連した項目の改訂の提言を行うことができた。その参照検査法として、これまでの研究成果に基づいた「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法(案)」を提示することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大屋日登美、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、古川一郎、前川純子、倉文明、泉山信司、黒木俊郎 (2018) : 医療機関の給水設備

におけるレジオネラ属菌の汚染実態 日本感染症学雑誌 92:678-685.

- 2) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani J, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M, the Working Group for *Legionella* in Japan: *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. Appl Environmental Microbiol. 2018. 84(18). pii: e00721-18.
- 3) 田中忍、中西典子、野本竜平、有川健太郎、瀧夏樹、岩本朋忠. 温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証. 神戸市環境保健研究所報 46; 39-42, 2018.
- 4) 磯部順子, 金谷潤一, 他. 2018. 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2017 年). 富山県衛生研究所年報. 41:32-37.

2. 総説

- 1) 倉文明: 講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 3. レジオネラ症の国内外の動向. 防菌防黴誌 46(8):365-76, 2018.
- 2) 前川純子: 講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 7. レジオネラ属菌の同定法と SBT (Sequence-Based Typing). 防菌防黴誌 47(1):29-35, 2019.
- 3) 杉山寛治: 講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 8. 浴槽のレジオネラ対策 浴槽のどこで、どのように増えるのか. 防菌防黴誌 47(2):83-89, 2019.
- 4) 杉山寛治: 講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 9. 浴槽のレジオネラ対策 浴槽水の各種消毒方法の効果. 防菌防黴誌 47(3):117-123, 2019.
- 5) 倉文明: トラブル解決編、水に関するト

- ラブル. Infection Control, 27(8):763-768, 2018.
- 6) 倉 文明：いま公衆衛生を考える レジオネラ対策、環監未来塾. 生活と環境 755:42-8, 2018.
3. 学会発表
- 1) 森中りえか、前川純子、加藤尚之、大野章、原口浩幸、高崎一人、布藤聡、倉文明. 比色系パルサー法によるレジオネラ属菌検出の特異性について. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.
 - 2) 磯部順子、金谷潤一、木全恵子、内田 薫、綿引正則、小澤賢介、権平文夫、倉文明、前川 純子. 浴用水から *Legionella pneumophila* 血清群 1 を検出するための免疫磁気ビーズによる濃縮分離法の検討. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.
 - 3) 田栗利紹、蔡国喜、下田貴宗、倉 文明、前川純子. 遊離塩素消毒下の入浴施設におけるレジオネラニューモフィラの生死スクリーニングを伴ったオンサイト半定量解析. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.
 - 4) 金谷潤一、綿引正則、木全恵子、加藤智子、内田 薫、倉 文明、前川純子、磯部順子. 大気エアロゾル中のレジオネラ属菌検出状況. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.
 - 5) 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：pH10 のアルカリ性温泉におけるモノクロラミンの消毒効果、日本防菌防黴学会第 45 回年次大会、2018 年 11 月、東京都
 - 6) 大河内由美子、前川純子、泉山信司. 貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.
 - 7) 渡邊貴明、松田宗大、小倉徹、植園健一、松田尚子、枝川亜希子、泉山信司、藤井明、循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について、日本防菌防黴学会、2018 年 11 月、東京都
 - 8) 小倉徹、植園健一、渡邊貴明、松田宗大、原口浩幸、森中りえか、枝川亜希子、藤井明、モノクロラミン及び次亜塩素酸ナトリウム消毒下におけるレジオネラ属菌の LAMP 法結果に及ぼす影響、日本防菌防黴学会、2018 年 11 月、東京都
 - 9) 倉 文明：レジオネラ院内感染の国内外の動向、ランチタイム講演、講演会・シンポジウム「医療機関の給湯・給水系に潜むレジオネラ感染リスク～実態と予防策～」、2018 年 10 月、東京都.
 - 10) Fumiaki Kura and Junko Amemura-Maekawa. Sources of infection and settings in outbreaks of legionellosis --- Japan, 2000-2017. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.
 - 11) Toshitsugu Taguri, Cai Guoxi, Hiroko Ebisu-Ojima, Fumiaki Kura, and Junko Amemura-Maekawa. On-site inspection method for *Legionella pneumophila* in bath water. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.
 - 12) Junko Isobe, Jun-ichi Kanatani, Keiko Kimata, Kaoru Uchida, Masanori Watahiki, Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa. Evaluation of an immunomagnetic separation method to detect *Legionella pneumophila* serogroup 1 from environmental specimens. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.
 - 13) 佐々木麻里、神田由子、後藤高志、成松浩志：あるレジオネラ症集団発生における積極的疫学調査、第 64 回大分県公衆衛生学会、2019 年 3 月、大分.
 - 14) 中西典子、野本竜平、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：冷却塔に定着する *Legionella pneumophila* のゲノム分子疫学. 第 13 回

日本ゲノム微生物学会.平成 31 年 3 月、東京.

- 15) 倉 文明：レジオネラ症に関する最近の話題、特別講演、平成 30 年度（第 40 回）全国環境衛生職員団体協議会関東ブロック会研究発表会、2019 年 2 月、高崎.
- 16) 倉 文明：わかりやすいレジオネラの話：医療機関に潜む感染リスク、教育講演（モーニングセミナー）、第 34 回日本環境感染学会総会、2019 年 2 月、神戸.
- 17) 藤井明、渡邊貴明、松田宗大、松田尚子、小倉徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、薬湯使用時におけるモノクロラミン消毒の有用性評価、第 46 回建築物環境衛生管理全国大会、2019 年 1 月、東京.
- 18) 前川純子：レジオネラ. 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会シンポジウム「不思議なミクロの世界 目からウロコの微生物学講座」, 2019 年 2 月、東京.

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 30 年度環境監視員担当者会議、2018 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、2018 年 9 月、大分.
- 3) 佐々木麻里：加湿器を原因とした老人福祉施設でのレジオネラ症集団発生事例～検査について～、平成 30 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2019 年 2 月、東京.
- 4) 前川純子, 森本 洋, 磯部順子, 佐々木麻里, 金谷潤一, 倉 文明, 緒方喜久代, 他：レジオネラ検査法, レジオネラ培養法概論,

迅速診断法, レジオネラ分子疫学, レジオネラ感染症総論, 他：国立保健医療科学院平成 30 年度短期研修新興・再興研修, 2018 年 10 月 15-19 日, 東京.

- 5) 前川純子：培養法と遺伝子検査法の特徴と実際の検査事例. 第 34 回レジオネラ対策シンポジウム（主催：NPO 法人入浴施設衛生管理推進協議会）, 2018 年 6 月, 東京.
- 6) 倉 文明：いま公衆衛生を考える レジオネラ対策、環監未来塾、2018 年 7 月、東京都.
- 7) 倉 文明：レジオネラ属菌の検査と対策、国立保健医療科学院平成 30 年度短期研修環境衛生監視指導研修、2018 年 11 月、和光.
- 8) 倉 文明：宿泊施設のレジオネラ対策、日本環境衛生センター第 1 回保健所環境衛生監視員講座、2018 年 11 月、東京都.
- 9) 柳本恵太：県内の公衆浴場におけるモノクロラミン消毒検証について、山梨県衛生環境研究所感染症等研修会、2018 年 11 月
- 10) 前川純子, 森本 洋, 他：レジオネラ検査法の現状と今後の展望, 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）, 2019 年 3 月, 東京.
- 11) 前川純子, 倉 文明：最近のレジオネラ症の発生動向と検査方法. 抗レジオネラ用空調水処理剤協議会講演会. 2019 年 1 月, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし