

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および公衆浴場等の衛生状態を確認するためのレジオネラ検査法の改良、評価を行い、以下のような成果を挙げた。

(1) レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、LAMP法、qPCR法、PALSAR法について、浴槽水などの実検体 906 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。LAMP法、qPCR法についてはEMA処理を併用すると、より平板培養法との相関が高くなった。LAMP法において、Chelex抽出法は偽陰性を減らすのに有効な抽出法であると考えられた。RT-qPCRにより、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。

(2) モノクロラミン消毒のレジオネラ属菌への消毒効果が、実証試験をにより確認された。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。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。また、水泳プールへのモノクロラミン消毒の適用が確認できた。

(3) 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。

(4) 入浴施設及び医療機関の給水系及び給湯系のレジオネラ汚染調査の結果、使用頻度の低い蛇口や配管における遊離残留塩素濃度の低下、給湯系における配管中の温度の低下がその汚染の原因であると推測された。検討すべき対策として、使用頻度の低い蛇口での流水（フラッシング）、塩素濃度・温度の維持、定期的な配管の消毒、使用頻度の低い蛇口の廃止、レジオネラ対策を踏まえた系の設計・管理等が挙げられる。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。

(5) 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 *Legionella pneumophila* (Lp) 血清群 1 を含む 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。

(6) 道路沿い12箇所のエアロゾルからレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。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。

(7) 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 MLVA 法について、そのプロトコルを最適化し、*L. pneumophila* SG1、439 株および SG1 以外の *L. pneumophila* 187 株についてタイピングを実施したところ、それぞれ、233 種類、131 種類の MLVA 型に分類され、その分解能は SBT 法と同等の値を示した。過去の集団事例 7 事例について MLVA 型を決定したところ、PFGE パターンおよび SBT 型別と概ね相関した。

(8) 患者検体から最も多く分離されている *L. 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た。

(9) 高分子多糖類である硫酸化多糖類に含まれるヘパリン、コンドロイチン硫酸およびデキストラン硫酸には、レジオネラ属菌のアメーバ感染促進作用が認められた。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塩基性アミンのクロロキンならびに塩化アンモニウムはアメーバ感染率を増加させ、取り込まれた VNC 菌を生存させる可能性があることが示された。ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験により、水系環境で定量的に VNC 菌の確認が可能であった。

(10) 静岡県内の検査機関及び行政担当者を対象に「レジオネラ属菌検査研修会」を 3 年間にわたり開催した。初年度は検査機関 19 機関 26 名、2 年目は検査機関 19 機関、県内の保健所等行政関係職員（静岡市及び浜松市を含む）24 名、3 年目は検査機関 15 機関、県内の行政関係職員 24 名が参加した。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。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。

(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。本研究班からは、地方衛生研究所等が平成 28 年度、29 年度 71 機関、平成 30 年度 70 機関が参加した。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。

(12) 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。

(13) 昨年度改訂された ISO 11731（水検体のレジオネラ検査法）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。

#### 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

河川や土壌に生息する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て、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。その制御が、公衆浴場をはじめとする種々の水系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、遊離塩素消毒が困難な温泉水を使用している入浴施設を対象とし

表1 研究協力者一覧

青木信和	ケイ・アイ化成株式会社	下田貴宗	シモダアムニティ株式会社	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
赤地重宏	三重県保健環境研究所	新道欣也	株式会社 お風呂のシンドー	松田宗大	株式会社ヘルスケミカル
縣 邦雄	アクス株式会社	陳内理生	神奈川県衛生研究所	松田尚子	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	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衛生課	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所	三津橋和也	北海道立衛生研究所
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	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	田中慶郎	株式会社マルマ	村田学博	静岡県環境衛生科学研究所
漆畑 健	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課	千田恭子	仙台市衛生研究所	森 健	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
江川英明	大分県南部保健所	土屋祐司	浜松市保健環境研究所	森 康則	三重県保健環境研究所
枝川亜希子	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所	永井佑樹	三重県保健環境研究所	森中りえか	株式会社ファスマック
江口大介	ケイ・アイ化成株式会社	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	森主博貴	静岡県環境衛生科学研究所
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	森川正浩	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
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	八木樹里奈	花王株式会社 ハウスホールド研究所
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	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
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	山上隆也	山梨県衛生環境研究所
壁谷美加	浜松市保健所	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
川野みどり	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	山本哲司	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	久田美子	山梨県衛生環境研究所	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	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター	吉田光範	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
小坂浩司	国立保健医療科学院	藤井 明	株式会社ヘルスケミカル	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
小嶋裕子	長崎県環境保健研究センター	星野仁彦	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター	米澤武志	神戸市環境保健研究所
後藤高志	大分県衛生環境研究センター	堀内雅人	山梨県衛生環境研究所	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所
蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター				

たモノクロラミン消毒を実践し、その有効性を実証する。また、その衛生状態を担保するレジオネラ検査法については、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。迅速検査法の妥当性の検証およびさらなる改良を行う。研究会等により検査法の普及を目指す。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、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、LAMP 法は、Loopamp レジオネラ検査キット E (栄研化学) を使用し、PALSAR 法はレジオネラ属菌迅速検査キット (ファスマック) を使用し、それぞれ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 6 か所の地方衛生研究所において、平成 28～30 年度に浴用施設などから 906 検体の試料を採取した。検体の内訳は、浴槽水が 616 検体 (68.0%)、シャワー水が 91 検体 (10.0%)、採暖槽水が 68 検体 (7.5%)、湯口水が 62 検体 (6.8%)、カラン水が 30 検体 (3.3%)、その他の検体(プール水、冷却塔水など)が 39 検体 (4.3%) であった。

(EMA-) LAMP 法、(EMA-) qPCR 法、PALSAR 法は添付の取扱説明書に従い実施した。RT-qPCR 法は、烏谷らの方法 (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平成 24 年度分担研究報告書、p.71) に従って実施した。*L. pneumophila* 長崎 80-045 株の菌液 (約  $10^9$  CFU/ml) を 10 倍段階希釈し、EMA 処理後に DNA を抽出して EMA-qPCR に用いる検量線を作成した。RT-qPCR に用いる検量線は長崎 80-045 株の 10 倍段階希釈菌液から RNA を抽出して作成した。

## 2. LAMP 法と比色系パルサー法の検討

LAMP 法は平成 28～30 年に搬入された浴槽水および湯口水、70 施設 136 検体を対象とし、比色系パルサー法は、上記検体に浴槽水や採暖槽水等 39 検体を加えて実施した。比色系パルサー法は、濃縮検体 1 mL あるいは 2 mL を用いた常法の他に、検水 50 mL あるいは 100 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  $\mu\text{m}$ 、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  $\mu$ L で溶出する方法、あるいは検水 100 mL または 200 mL 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 mL の場合は、溶出液の半量を用いる方法の 6 法で検体を調製し、実施、比較した。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。

### 3. 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(パイロスタット社、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。実検体としては、1 週間毎に高濃度塩素洗浄処理(20 mg/L  $\times$  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、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

*L. pneumophila* 血清群 1 の 439 株(臨床分離株 256 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 49 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)、血清群 1 以外の *L. pneumophila* 187 株(臨床分離株 68 株、浴槽水

由来 64 株、冷却塔水由来 31 株、土壌由来 22 株、給湯水由来 2 株) および過去の 7 集団感染事例に由来する 153 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

(1) 検体:平成 28~30 年度に 34 施設から浴槽水 128 検体、シャワー水 89 検体、カラン水 30 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  $^{\circ}$ C に設定後、約 10 秒間流出させた後、容器に採取した。平成 28、29 年の 3~11 月に富山市街中心部を流れる 4 河川 5 地点から河川水 40 検体を採取した。2016 年 6 月~2018 年 2 月に、液体サイクロン式エアサンプラー(コリオリス  $\mu$ ) を用いて、主に雨天の日の道路沿い 151 検体、浴用施設の浴室内 21 検体(17 施設) および屋内 30 検体(2 施設および民家 2 軒) のエアロゾルを捕集した。うち浴室内 16 検体は稼働中のミスト発生装置周辺で捕集した。2018 年 5~8 月に道路沿いの 6 地点で、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、エアロゾルを計 46 サンプル捕集した。

(2) 16S メタゲノム解析: 道路沿い 23 検体および浴室内 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: 100 倍濃縮された浴槽水 128 検体、シャワー水 60 検体、カラン水 30 検体、計 218 検体について、デンカ生研で作製した Lp1-IMB を 25  $\mu$ l

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 $\mu$ lあるいは100 $\mu$ lに懸濁、ポルテックスでよく混和し、IMB検体とした。このIMB検体100 $\mu$ lをGVPC培地にコンラージ棒で拡げるだけとし、表面に接種した検体が確認できなくなってから35 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。平成30年度分の92検体については、滅菌生理食塩水で5倍希釈した希釈検体1mlについても検査を行った。平成29年度に採取された浴用水39検体、シャワー水32検体およびカラん水15検体については、培養前に熱または酸にて処理し、未処理検体と併せてBCYE- $\alpha$ 培地、GVPC培地の両方にコンラージ棒で拡げ、35 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。

(4) Lp1 特異的遺伝子の検出：Méraultら（Appl Environ Microbiol. 2011. 77:1708）の報告に従い、コンベンショナルPCR法あるいはqPCR法にて検出した。

#### 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の貯湯槽と高置貯湯槽と、2つの浴室の浴槽水、湯口水及び蛇口とシャワーからの水を試料として採取した。神奈川県内の3医療機関の洗面台等の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。水試料のレジオネラ属菌検査、従属栄養細菌数、理化学検査を常法により測定した。

#### 7. 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

水試料からのレジオネラ属菌検出のための試験法について研修等で活用できるマニュアルの作成を試みた。本研究班を含めて、これまで複数の研究班の研究活動により得られた成果を見直し、また関連する通知等を参照して、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。

#### 8. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

実施母体を日水製薬株式会社とし、公的、民間合わせて、平成28年度165機関（延べ171試料配付）、平成29年度173機関（延べ176試料

配付）、平成30年度148機関（延べ151試料配付）に対し実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所等が平成28年度、29年度71機関、平成30年度70機関が参加した。メーカーにより品質と多施設への発送が保証されるバイオメリュウ社のBioBalk（特注品）を配付した。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、目標良好範囲を設定した。平成29年度から、濃縮検体については回収率による判定を行った。目標とした回収率は、平成28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。

#### 9. レジオネラ感染とアメーバ

(1) アメーバを利用したレジオネラ属菌増殖：PYGCで培養したアメーバ（*A. castellanii* 1501/10株）を24ウェルマイクロプレートウェル内にはほぼ単層になるように接着させた後、被検物質（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、アポシニン、クロロキン、塩化アンモニウム）を含む10 $\times$ AS 300 $\mu$ Lを加え、さらに30 $^{\circ}$ Cで培養したレジオネラ属菌（*L. pneumophila* 血清群1 378株）を0.01ODになるように加え、30 $^{\circ}$ Cで3時間培養し、gentamycinを添加した。所定の培養時間後、氷水上でアメーバを剥離し、濃縮されたアメーバ浮遊液をスライドガラスに塗布後、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。細胞はランダムに約500個を調べた。

(2) レジオネラ属菌 VNC ( Viable but not culturable )菌モデル:5 mM のリン酸バッファー溶液( pH 7.1 )をフィルターろ過し、その 200 ml を滅菌メディウムボトルに入れ、3 日間培養した *L. pneumophila* 血清群 1 378 株を  $10^{-5}$ OD となるように無菌的に添加し、密栓して室温ならびに 4 で低速スターラーを用いて攪拌培養した。菌の生残性は、蛍光染色試薬 LIVE/DEAD BacLight ( Thermo Fisher ) を用いて、蛍光染色した菌をポリカーボネートフィルター ( 0.2  $\mu$  m、25 mm、ADVANTEC ) 上に吸引固定し、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。

#### 10. モノクロラミン消毒の応用

pH8 から 10 のアルカリ性の浴槽水を有する 4 営業施設の協力を得て、2 箇所はモノクロラミン生成装置を設置し、2 箇所は手投入を行った。いずれもモノクロラミン濃度が 3 mg/L を下回らないように制御した。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。一営業施設の協力を得て、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にモノクロラミン消毒を行った。モノクロラミン生成装置を設置し、タイマー式の制御で管理した。比較として行った遊離塩素消毒では、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。

廃止予定となっていた国立健康栄養研究所内の 270m<sup>3</sup> の屋内水泳プールを借用し、モノクロラミン消毒を行った。プールの利用はなかったが、遊離塩素消毒が続けられており、朝の 9 時に水の循環による砂ろ過を開始し、夕方の 17 時頃に停止していた。循環ポンプの性能は、135 分ないし 270 分で 270m<sup>3</sup> 相当であった。遊離塩素濃度が下がってから、同じ水でモノクロラミン消毒を行った。プールサイドに生成装置を設置して、モノクロラミンをプール底の吸引口に注入した。吸引る過後の水は循環ポンプでプール槽の全体に分布する吐出口から戻るので、モノクロラミンをプール全体に行き渡らせることが出来る。モノク

ロラミン消毒を開始した直後と終了時に、成人男性 2 名が泳いだ。消毒期間中に成人男女数名が臭気を確認した。

水試料はチオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に採水し、各種測定は、定法に従い行った。レジオネラ属菌、大腸菌群、一般細菌数、従属栄養細菌数、アメーバを検査した。遊離残留塩素、全残留塩素、モノクロラミン、アンモニア態窒素、pH、水温、濁度、過マンガン酸カリウム消費量、TOC を測定した。

#### 11. 公衆浴場施設におけるモノクロラミンによる消毒効果の検討

3 か所の入浴施設 ( 静岡県内東部地域 S 施設、中部地域 I 施設、西部地域 D 施設 ) および社会福祉施設の入浴設備で、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、社会福祉施設は水道水を循環し、炭酸カルシウム天然石入りの人工温泉装置を備えていた。全施設とも、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、入浴施設については、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 箇所、D 施設 10 箇所から採水した。社会福祉施設は毎週水曜日の朝に、浴槽水、配管滞留水および配管水 ( 2 分排水後に採水 ) を採水した。

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。

( 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

626 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 81.5%、特異度は 79.6%、一致率は 80.0%であり、平板培養法と相關する迅速検査法であった。205 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 69.1%、特異度は 85.3%、一致率は 81.0%であった。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。

604 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 97.6%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 46.6%、一致率は 57.0%であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、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。

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。シャワーおよび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、シャワー水およびカラン水検体においては、感度が 37.5%と低かった。

### 2. 斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査および実検体を用いた LAMP 法と比色系パルサー法の検討

136 検体中 59 検体 (43%) からレジオネラ属菌が検出された。59 検体中 58 検体は、培養 3 日後の斜光法でレジオネラ様菌を確認することができた。検水 100mL あたり 1000cfu 以上検出された検体が 16 検体あり、菌数は最も多い検体で 23500cfu/100mL であった。L. pneumophila SG1 株が 10 施設の 15 検体から検出され、その

うち平成 28 年度 1 施設の 2 検体から lag-1 遺伝子を保有する株が検出された。

20 検体について Chelex 抽出法と常法で LAMP 法を実施したところ、全検体間では有意差が見られなかったが、培養で検出された菌数が 50cfu/100mL 以上の 9 検体では、Chelex 抽出法の Tt 値が有意に低下した (対応のある t 検定、片側検定で  $p=0.012$ )。

比色系パルサー法のろ過濃縮法の検討については、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。

### 3. 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

現場検査への実用化を目指して、迅速検出法 (RDM) に携帯型フローサイトメーターとレジオネラ属菌用特異染色試薬を適用して改良型 (I-RDM) とし、そのレジオネラリスク評価方法としての有効性を調査した。I-RDM はレジオネラ・ニューモフィラ (LP) SG1 を用いた添加回収実験において、約  $10^2 \sim 10^5$  CFU/mL の範囲で培養法と高い相関 ( $y = 8.1799x^{0.8732}$ ,  $R^2 = 0.9544$ ) を示し、LP SG1 のほかに SG3、SG4、SG5、SG6、SG9、SG10 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 1,300 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。現地調査において浴槽水 76 試料を I-RDM 法と培養法で処理し、本方法の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、その感度は 93.3%、特異度は 95.1%を示した。浴槽水を用いた LP の定量性については、I-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い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

Sobral ら (2011) により報告された 12 領域について 4 領域を 1 セットとした 3 種類の

multiplex PCR に改変し、4 領域が増幅されるよう primer 濃度を最適化した。

164 種類の ST (sequence type) を含む *L. pneumophila* SG1、439 株は、233 種類の MLVA 型に分類された。119 種類の ST (sequence type) を含む SG1 以外の *L. pneumophila* 187 株は、131 種類の MLVA 型に分類された。MLVA の分解能は、SBT 法と比較して同等の値を示し、SBT のタイピングと概ね相関した。

過去の集団事例 7 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。どの事例においても、患者株と一致または 1 ローカス違いの MLVA 型の株が浴槽水等の感染源とされる環境から分離されており、ST および PFGE パターンと概ね相関した。

プロトコルを提供した 4 自治体で MLVA 法を実施したところ、MLVA 型が PFGE と SBT タイピングと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* 属菌の通常の培養法による検出率は、浴槽水では 20.3%、シャワー水では 24.7%、カラン水では 30.0% で、陽性検体の約 6 割が 10 ~ 99 CFU/100 ml であった。河川水においては、アメーバ培養法により 30.0% (12/40 検体) から *Legionella* 属菌が検出された。道路沿いのエアロゾル調査では、調査した 12 地点のいずれからも *Legionella* 属菌は検出されなかったが、遺伝子検査法では、12 地点すべてから気候に関係なく *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。

免疫磁気ビーズ (*Lp1*-IMB) 法については、接種菌の回収率は *L. bozemanii* や *L. cherii*、*L. anisa* では、0.0 ~ 0.01% と低かったのに対し、*Lp1* では 25.0 ~ 50.0% となった。また、*Lp1* とそれ以外の *Legionella* 属菌懸濁液を等量混合した場合の *Lp1* の回収率は、12/16 試験 (75.0%) で 40.0% 以上を示し、*Lp1* 以外の菌の回収率より高かった。

*Lp1* を特異的に検出する遺伝子検査法 (プローブ法) は、実検体において *Lp1*-IMB 法、通常培養法いずれよりも感度が高かった。

#### 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、カラン及び

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、施設により対策が講じられ、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。しかし、この効果は持続しなかったため、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、平成 30 年度に調査を行ったところ、再度レジオネラ属菌が検出された。

医療機関については、平成 28 年度は医療機関の給水系・給湯系の状況及び給水系の理化学項目の測定結果とレジオネラ属菌による汚染の関連性を明らかにすることを試みたが、関連性を明らかにすることはできなかった。医療機関の洗面台の蛇口は混合栓が多く使用されているため、平成 29 年度は給水系と給湯系から別々に試料を採取して調査を行った。その結果、いずれもがレジオネラ属菌により汚染されていた。蛇口の初流水に比して、3L 流水後及び 3 分間 (9L) 流水後に採取した試料のレジオネラ属菌数及び従属栄養細菌数は減少していた。1 医療機関に塩素添加装置を設置し、レジオネラ汚染に対する塩素消毒の効果を検証した。別の医療機関では独自に添加装置を設置していたが、レジオネラ汚染があるため、塩素濃度の効果を検証した。装置の設置あるいは添加量の増加により給水系の遊離残留塩素濃度が上昇し、一定の効果は見られたが、汚染を完全に除くには至らなかった。

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平成 30 年に開催した。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

研修等で使用する場合に見やすく使いやすいことを配慮して、フォント、行数、図の配置、注

釈の位置等を検討したマニュアルを試験的に作成した。

公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言については、平成 28 年度は原水等の水質基準を大腸菌群から大腸菌に変更することを検討し、平成 29 年度は、管理方法等の記載を検討し、平成 30 年度は、衛生等管理要領の改訂を提言する根拠を明らかにし、これを整理した。

## 8. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

外部精度管理について 4 年連続で参加した機関は 55 機関であった。総合的に見ると、検査結果が安定する方向に向かっているが、4 回の外部精度管理中複数回目標準良好範囲外を報告していたのは 28 機関あった。

平成 29 年 5 月に改訂された ISO 11731 (水検体のレジオネラ検査法)で示された方法との調整を行い、公衆浴場の水質を担保するため、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(案)」を提示した。

地方衛生研究所等を対象として、平成 28、30 年度に、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、実習を伴ったレジオネラ検査研修会を行った。

## 9. レジオネラ感染とアメーバ

高分子多糖類である硫酸化多糖類に含まれるヘパリン、コンドロイチン硫酸およびデキストラン硫酸には、レジオネラ属菌のアメーバ感染促進作用が認められた。

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塩基性アミンのクロロキンならびに塩化アンモニウムはアメーバ感染率を増加させ、取り込まれた VNC 菌を生存させる可能性があることが示された。

ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験により、水系環境で定量的に VNC 菌の確認が可能であった。

## 10. モノクロラミン消毒の応用

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。換水頻度が低くても、レジオネラ属菌を抑制できていた。

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。モノクロラ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。

屋内水泳プールは、塩素添加を止めて塩素濃度が 0.2mg/L を下回った後にモノクロラミン消毒を開始し、3 時間程度でモノクロラミンの濃度が 4mg/L に達した。1 週間の短期ではあったが濃度管理に問題なく、レジオネラの発生もなく、いわゆる典型的な塩素臭のプール臭がほぼなかった。

## 11. 公衆浴場施設におけるモノクロラミンによる消毒効果の検討・レジオネラ属菌検査研修会の開催

社会福祉施設の入浴設備は、6 週間のモノクロラミン消毒試験期間中、モノクロラミン濃度は約 3mg/L に安定して維持され、それらの検体すべてからレジオネラ属菌、アメーバは検出されなかった。また、ジクロラミン濃度は 0.45mg/L と低く、塩素消毒臭の原因であるトリクロラミンは定量下限値未満であった。モノクロラミン消毒実証試験の終了約 1 ヶ月後、遊離塩素管理時の浴槽水から *L. pneumophila* 血清群 5 が 20 CFU/100mL 検出された。その後の循環系統内の拭き取り検査でも *L. pneumophila* 血清群 1、5、8、10 が検出された。

S 施設は、6 週間のモノクロラミン消毒期間中、モノクロラミン濃度は比較的安定で、ほぼ 3mg/l を維持することができた。3 箇所全ての採水場所

からレジオネラ属菌は検出されなかった。

I 施設は導入時 1 週目までは濃度の変動が激しかったが、2 週目以降は安定し、3mg/l を維持することができた。6 箇所の浴槽水のうち、2 箇所は 4 回目と 6 回目、2 箇所は 3 回目と 6 回目の検体からレジオネラ属菌が検出された。

D 施設は 1 日内のモノクロラミン濃度変動が激しく、採水場所によっても濃度の安定性に差が見られた。10 箇所中 4 箇所の浴槽水からレジオネラ属菌が検出されたが、6 週間後までには検出されなくなった。

静岡県内の検査機関及び行政担当者を対象に「レジオネラ属菌検査研修会」を 3 年間にわたり開催した。初年度は検査機関 19 機関 26 名、2 年目は検査機関 19 機関、県内の保健所等行政関係職員（静岡市及び浜松市を含む）24 名、3 年目は検査機関 15 機関、県内の行政関係職員 24 名が参加した。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。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

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。一方で、現状の平板培地培養には様々な発育条件の制約があり、生きているが培養できない VNC 菌の存在が知られている。レジオネラ症の把握のためにも、VNC 菌の実態の解明と VNC 菌培養促進技術の開発が必要である。

迅速検査法（LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法および 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、平板培養法とより相関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。RT-qPCR により、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ため、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。

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 *L. pneumophila* (*Lp*) 血清群 1 を含む *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。

モノクロラミン消毒について、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る。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。また、水泳プールへのモノクロラミン消毒の適用が確認できた。長期換水を行わない場合は従属栄養細菌数の増加が心配されるため、週に 1 回の完全換水や洗浄をしない大型のプールにはその適用を考えず、換水洗浄ができる小型のプールにモノクロラミン消毒の適用が可能と考えられた。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。

入浴施設及び医療機関の給水系及び給湯系のレジオネラ汚染の原因は 使用頻度の低い蛇口や配管における遊離残留塩素濃度の低下、給湯系における配管中の温度の低下が推測された。こうした汚染に対して種々の対策を検討してきたが、効果が限定的であり、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。今後さらに検討すべき対策として、使用頻度の低い蛇口での流水（フラッシング）、塩素濃度・温度の維持、定期的な配管の消毒、使用頻度の低い蛇口の廃止、レジオネラ対策を踏まえた系の設計・管理等が挙げられる。さらに汚染状況の把握と対策の検証を行い、効果的な対策の追求を行っていく必要があると考えられる。

道路沿いのエアロゾルからレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。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。

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る。

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。

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り、今後さらに調査システムの検討を重ね、継続的かつ安定した外部精度管理調査ができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要と思われた。本研究班で提示された「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」については、今後は、本法の普及・周知とともに、本法に沿った内部精度管理が各検査機関で実施できるよう、その対応方法を検討する必要がある。

レジオネラ検査法研修会の実施により、その必要性が明らかになった。検査担当者の検査技術レベルの維持・向上のために、全国レベルでの研修会実施システムの構築が望まれる。

## 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、湯口、貯湯槽、シャワー、カラン、プール、採暖槽、冷却塔、河川等からの検水および道路沿い、屋内、浴室内の空気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、手法の確立、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 法の確立と普及を図った。

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

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. *Epidmiol. 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：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.
  - 8) 今野貴之、高橋志保、鈴木純恵、榎尾拓子、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.
  - 9) 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．
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 田中忍、中西典子、野本竜平、有川健太郎、瀨夏樹、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.
  - 13) 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．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.
  - 2) 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.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) 倉文明：トラブル解決編、水に関するトラブル．Infection Control、27(8):763-8、2018.
  - 9) 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. 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、松鶴さとみ、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) 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) 下郷晶子、水落慎吾、菓子田充明、森本 洋：各社 BCYE 寒天培地における *Legionella pneumophila* の発育性と培地接種方法による発育菌数への影響、日本防菌防黴学会第43回年次大会、2016年9月、東京
- 4) 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
- 5) 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。
- 6) 牧田幸久、鈴木秀紀、森主博貴、松橋平太、柴田真也、長岡宏美、川森文彦、小澤匡宏、山内薫明、森 健、市村祐二、青木信和：モノクロラミンの浴槽水消毒条件の検討、静岡県公衆衛生研究会、静岡（2016）
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 田中忍、中西典子、有川健太郎、岩本朋忠、都倉亮道：人工水系におけるレジオネラ属菌の分布状況と宿主アカントアメーバ中での増殖様式。第43回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会。平成28年12月、大阪。
- 10) 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。
- 11) 中西典子、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：レジオネラ属菌の生活環境における分布状況と遺伝学的特徴。環境微生物系学会合同大会2017。平成29年8月、仙台。
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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）
- 20) 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）
- 21) 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
- 22) 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。
- 23) 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。
- 24) 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。
- 25) 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。
- 26) 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。
- 27) 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。
- 28) 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
- 29) 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.
- 30) 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
- 31) 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
- 32) Fumiaki Kura and Junko Amemura-Maekawa. Sources of infection and settings in outbreaks of legionellosis --- Japan, 2000-2017. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) 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) 森本 洋：レジオネラ検査研修会、北海道立保健所試験検査課研修、2016 年 6 月、北海道
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 長岡宏美：平成 27 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主催、2016 年 2 月 5 日、東京都千代田区
- 7) 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.
- 8) 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。
- 9) 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。
- 10) 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。
- 11) 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。
- 12) 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。
- 13) 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。
- 14) 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。
- 15) 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。
- 16) 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。
- 17) 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。
- 18) 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。
- 19) 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。
- 20) 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。
- 21) 森本 洋：レジオネラ感染症とその衛生対策について、平成 29 年度道南獣医師会公衆衛生講習会、2018 年 2 月、北海道。
- 22) 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。
- 23) 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。
- 24) 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。
- 25) 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。
- 26) 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。
- 27) 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。
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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  
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