

研究要旨：公衆浴場のレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等について、効果的な手法の検討を行った。

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水等 149 検体中 34 検体 (22.8%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。シャワー・カラン水について見ると、14.3% (5/35 検体) が 1,000 CFU/100 ml 以上の菌数であった。滞留水において、塩素濃度及び温度が低下し、生物膜が形成されることが原因の一部であると推測される。エアロゾルが発生しやすいシャワー水の衛生管理の重要性について、改めて周知の必要性が示された。令和元年 9 月に通知された「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」の妥当性を検証し、非濃縮検体検査の併用実施は有用であることが示された。平易な培養法である *Legionella pneumophila* を検出するレジオラート/QT 法を検討したところ、浴槽水の培養では、従来の平板培養法と相関のある結果が得られた。平板培養法で *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が検出された蛇口水では陰性となった。入浴施設のイベント風呂に用いられることがある柑橘系果物を実験的に浴槽に投入し、経時的に微生物検査を行ったところ、投入前に用具を用いた物理的洗浄が有効であることが示された。

迅速検査法である比色系パルサー法については現場で行えるように方法の改良を行い、実践した。携帯型フローサイトメーターを使用したレジオネラリスク評価法については、標準作業書・ワークシート作成を行い、複数の協力機関で実施した。モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、DNA を抽出せずに浴水の濃縮液をそのまま qPCR 反応に用いると感度が低下したため、現場で行えるような工程の工夫が求められる。

分子疫学的手法としての MLVA と SBT は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していることが示され、利便性の高い MLVA は菌株のスクリーニングに有用であると考えられた。

令和元年 9 月に改正された「公衆浴場における衛生等管理要領」に基づき、指導及び衛生管理実施の現場において利用できるように具体的な作業手順等を示した「入浴施設の衛生管理ガイドライン」並びに、毎年のように発生している入浴施設が関連するレジオネラ症集団感染事例における一連の患者調査及び環境調査を適切に実施するための「集団発生時調査ガイドライン」作成の 2 つのワーキンググループを立ち上げ、ガイドラインを作成した。

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。アンケート調査や直接の技術指導により、より一層の改善、安定化を目指している。

高 pH の温泉水を循環利用している 2 箇所の営業施設で、モノクロラミン消毒を行った。モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の制御に有用だが、従属栄養細菌数が増加する問題が再現され、循環式浴槽には、より強力な洗浄・消毒が必要と考えられた。

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
 金谷潤一・富山県衛生研究所主任研究員
 黒木俊郎・岡山理科大学教授
 佐々木麻里・大分県衛生環境研究センター
 主任研究員
 田栗利紹・長崎県環境保健研究センター科長
 長岡宏美・静岡県環境衛生科学研究所部長
 中西典子・神戸市環境保健研究所研究員
 森本 洋・北海道立衛生研究所主幹

における衛生等管理要領等」が改正され、また、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」の通知（薬生衛発 0919 第 1 号）が出されたのは、前研究班（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班）を初めとするこれまでのレジオネラ研究班の成果によるものである。本研究班は改正された衛生等管理要領をより実効あるものにするために研究を遂行する（図 1）。

A. 研究目的

公衆浴場のレジオネラ症対策の向上のためには適切な衛生管理が要求される。そのための消毒法等の開発・評価およびレジオネラ検査法の改善・普及等を行う。令和元年 9 月に「公衆浴場に

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。各研究項目の研究方法を以下に記す。

1. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

3 か所の地方衛生研究所において、令和元年度

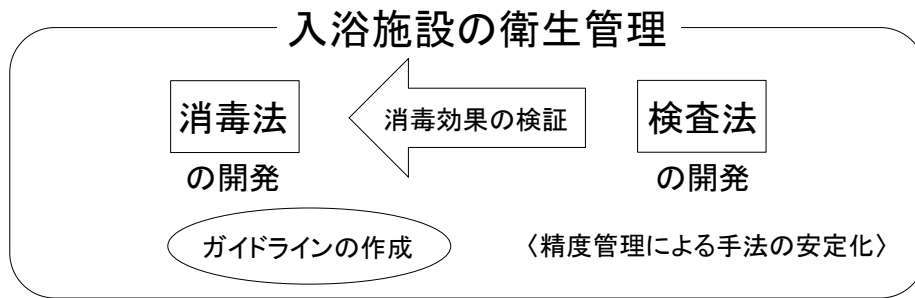


図1 本研究班の研究の流れ

表1

研究協力者一覧

赤地重宏	三重県保健環境研究所	小坂浩司	国立保健医療科学院	久田美子	山梨県衛生環境研究所
縣 邦雄	アクアス株式会社	蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所	斎藤利明	株式会社ヤマト	藤井 明	株式会社ヘルスビューティ
磯部順子	富山県衛生研究所	茶山忠久	ケイ・アイ化成株式会社	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	塩崎晋啓	日本板硝子株式会社	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
井上浩章	アクアス株式会社	陳内理生	神奈川県衛生研究所	溝腰朗人	大分県衛生環境研究センター
植松香星	山梨県衛生環境研究所	杉山寛治	株式会社マルマ	水谷幸仁	日本板硝子株式会社
江川英明	大分県南部保健所	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
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	高橋直人	静岡市環境保健研究所	三津橋和也	北海道立衛生研究所
大越 魁	静岡県環境衛生科学研究所	田中 忍	神戸市環境保健研究所	森 康則	三重県保健環境研究所
大森恵梨子	仙台市衛生研究所	田中奈緒美	アイデックスラボラトリーズ株式会社	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	田中慶郎	株式会社マルマ	山上隆也	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	永井佑樹	三重県保健環境研究所	山口友美	宮城県保健環境センター
小川恵子	北海道立衛生研究所	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
小澤賢介	デンカ株式会社	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
鳥谷竜哉	愛媛県今治保健所	中臣昌広	日本環境衛生センター	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
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	湯澤栄子	川崎市健康安全研究所
倉 文明	国立感染症研究所	野本竜平	神戸市環境保健研究所	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所

に浴用施設などから 149 検体(浴槽水:104 検体、シャワー水:19 検体、カラン水:16 検体、採暖槽水:10 検体)を採取した。平板培養法は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法(以下、標準法)」に準じて各機関の方法で実施し、10 CFU/100 ml 以上を検出とした。

LAMP 法は Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) を用いて、取扱説明書に従い実施した。LC EMA-qPCR 法は、使用する各種試薬の取扱説明書に従い実施し、定量値 1 CFU 相当/100 ml 以上を陽性と判定した。モバイル qPCR は、KAPA3G Plant PCR Kit (KAPA) を用いて、モバイル qPCR 装置 Picogene PCR1100 (日本板硝子) により実施した。

Legionella pneumophila の血清群 1~3 を対象とした選択的濃縮を行う免疫磁気ビーズ (Lp-IMB) の回収率の検討には、培養菌株を用いて、デンカ生研調製ビーズ、および市販ビーズ粒子 (Dynabeads™ M-280 Sheep anti-Rabbit IgG) をレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) で感作した自家調製ビーズによる添加回収実験を行った。実検体については、*L. pneumophila* 血清群 1 を回収対象とし、どちらかのビーズを用いて、平板培養法と比較した。

2. 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT 法の有効性の検討

レジオラート/QT 法は、公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 138 検体を対象とし、*L. pneumophila* を特異的に検出する特定酵素基質培地レジオラートと専用トレイの Quanti-Tray/Legiolert (いずれも IDEXX) を用い、添付の取扱説明書に示された飲料水用 10mL プロトコールに従って測定した。本法の検出限界は 10MPN/100mL である。同時に各検査機関の方法で平板培養法にてレジオネラ属菌の分離を実施した。それに先立ち、BCYE α 寒天培地に塗布し増菌した *L. pneumophila* SGUT の菌株について、滅菌水で 10 倍ごとの希釈系列を作成し、平板培養法及びレジオラート/QT 法を行った。

3. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT 法の評価、比色系パルサー法の検討

令和元年 5 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水 24 施設分 45 検体を対象とし、前述のレジオラート/QT 法ならびに標準法あるいは大分県衛生環境研究センターの従来法(以下、大分法)で平板培養を実施した。大分法では、熱処理濃縮試料および未加熱濃縮試料を 10 倍および 100 倍希釈し、3 段階希釈試料 200 μ L それぞれを WYO α 寒天培地 (栄研化学)、GVPC 寒天培地 (日研生物) および MWY 寒天培地 (自家製; Oxoid) 各 1 枚に塗布した。標準法では、酸処理濃縮試料 200 μ L、熱処理濃縮試料 100 μ L、濃縮処理を行わない検体 200 μ L を各分離平板 1 枚に塗布した。

比色系パルサー法については、令和元年 8 月に搬入された非濃縮検体 17 検体 100 mL あるいは 200 mL を 2 種類の孔径のセルロース混合エステルフィルター (Merck 社、0.22 μ m および 0.45 μ m) を用いてそれぞれろ過後、フィルターを移したチューブに、希釈した変性液を加えて直接 1000 倍濃縮溶菌液を調製し、レジオネラ属菌迅速検査キット (ファスマック) を用いて添付の取扱説明書に従って実施した。それらとは別に採水した浴槽水および湯口水計 4 検体 (各 100 mL) について、保健所で環境衛生監視員が上述の方法 (フィルター孔径は 0.45 μ m) で比色系パルサー法を実施した。

4. 公衆浴場等のイベント風呂で使われる柑橘系果物の清浄度試験の結果について

甘夏みかんを複数の方法 (中性洗剤でスポンジ洗い、水道水で手こすり洗い、歯ブラシによるこすり洗い、タワシによるこすり洗い) で洗浄した後、それぞれ自宅の浴槽に浮かべ、表面の微生物汚染度の経時変化をみた。前もって表面に縦に 4 分割の印を付けておき、洗浄前、洗浄後、浴槽投入 1 日後、浴槽投入 2 日後に、それぞれ 4 分割面から一定面積を拭き取り、ATP 値 (ルミテスター PD-30) および一般細菌数 (標準寒天培地で 37 $^{\circ}$ C、24h)、従属栄養細菌数 (R2A 培地で 20 $^{\circ}$ C、7d)、真菌数 (PDA 培地で 25 $^{\circ}$ C、7d) を測定した。比較試験として未洗浄の甘夏みかんを湯を張ったバケツに投入し、投入前、バケツ投入 1 日後、バケツ投入 2 日後に同様に測定した。

5. 携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化

フローサイトメーターminiPOC（シスメックスパルテック社）を使用したレジオネラリスク評価法（RDM）の標準化のため、大腸菌およびレジオネラ属菌株を用いた菌量調整済み模擬試料の作製方法、添加回収実験、実際の検査についての標準作業書およびワークシートを作成し、2施設の地方衛生研究所と1施設の民間研究所の4名に技術研修を実施した。2施設に各種模擬試料および試薬等を配布して、回収実験を実施した。1施設で、34検体の循環ろ過式浴槽水を採水し、培養検査を行うとともに、14検体は当該施設でRDMを実施し、20検体は長崎県環境保健研究センターに冷蔵郵送し、RDMを実施した。

6. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

国内で分離されたSTが一致してMLVA型が異なる、あるいはMLVA型が一致してSTが異なる28株の*L. pneumophila* 菌株を用いた。MLVA型あるいはST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。QIAseqFX(QIAGEN)で調製した菌株DNAライブラリからMiseq regent Kit v.3によりリードデータを取得し、A5-Miseqでアセンブリし、PROKKAでアノテーションを行った。全ゲノム配列による系統解析にはkSNP3を用いた。

7. 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、微生物検査（レジオネラ属菌、従属栄養細菌、一般細菌数）を行った。分離されたレジオネラ属菌はPCR法およびレジオネラ免疫血清により同定した。検水のLAMP法、レジオラート/QT法も併せて実施した。

8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成

「入浴施設における衛生管理ガイドライン」及

び「公衆浴場等入浴施設を原因とするレジオネラ症集団発生時調査ガイドライン」を作成するために、研究班の分担研究者及び研究協力者で構成する2つのワーキンググループを形成し、検討した。衛生管理ガイドラインの総合衛生管理のパートは、平成16～18年度厚生労働科学研究費補助金健康総合科学研究事業「循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」の分担研究報告書「HACCPシステムの導入を伴う循環式浴槽の管理について」並びに米国CDCが発行した”Toolkit: developing a water management program to reduce *Legionella* growth and spread in buildings”を参考にした。一般的衛生管理のパートは、「公衆浴場における衛生等管理要領」及び「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」に基づいて、衛生管理方法の検討を行い、その内容を記載した。集団発生時調査ガイドライン案は、大分県においてレジオネラ症に関する調査に用いられている対応要領等、腸管出血性大腸菌感染症等に対する調査マニュアル、「入浴施設におけるレジオネラ症防止のための日常的な維持管理指針」（平成26年3月第2版発行；NPO法人入浴施設衛生管理推進協議会、大分県監修）、「レジオネラ症防止指針 第4版」（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター）等を参考に検討した。

9. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

外部精度管理は、実施母体を日水製薬株式会社とし、レジオネラ属菌配付試料として、シスメックス・ビオメリュー社のBioBall（特注品）を使用し、全国161の検査機関（延べ164試料配付）が参加した。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①」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②」、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 µL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

600~15,000 CFU/100 mLと設定した。濃縮検体については、良好範囲を回収率により判定した。目標回収率は、20%以上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73機関については、独自に集計・解析を実施し、過去の結果と比較した。

地方衛生研究所レジオネラ・レファレンスセンターを通じ、昨年度の精度管理サーベイに参加した施設に対し、アンケート調査を実施した。

10. モノクロラミン消毒を導入した循環式浴槽を洗浄する必要性

温泉水（pH9.5あるいはpH10.0）を循環利用している2箇所の入浴施設で、モノクロラミン消毒を行い、洗浄、消毒、換水をしながら6~7週間の試験を行った。入浴中のモノクロラミン濃度は、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）により測定し、3~6 mg/Lとなるよう、設定・調整した。週に1~3回の完全換水と浴槽の清掃、ろ過器の10~30分間の逆洗、10~20 mg/Lの高濃度消毒を行った。各種微生物試験は、定法に従い実施した。（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. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

149検体中、34検体（22.8%）から10 CFU/100 ml以上のレジオネラ属菌が検出された。*L. pneumophila* 血清群6が20/34検体（58.8%）から分離され、最も多かった。シャワー・カラん水について見ると、14.3%（5/35検体）が1,000 CFU/100 ml以上の菌数であった。

LC EMA-qPCR法では、カラムを使用した新たな簡易抽出法（Lysis Buffer for *Legionella* Type2）を用いた場合においても、平板培養法に

対する感度などは、従来の簡易抽出法（Lysis Buffer for *Legionella*）と同等の結果であった。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、浴水の濃縮液をそのまま qPCR 反応に用いた場合、平板培養法に対する感度は、抽出した DNA を鋳型とした場合よりも優位に低かった（ $P < 0.05$ ）。各抽出法のコピー数を qPCR 法のコピー数と比較した結果においても、濃縮液を qPCR 反応に用いた場合は、全体的に定量値が低かった。

水検体における免疫磁気ビーズ（IMB）を用いた選択的濃縮法の検討の結果は、自家調製した IMB は、デンカ生研で調製した IMB に比べ、濃縮分離の性能はかなり劣っていた。

2. 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT法の有効性の検討

BCYE α 寒天培地に塗布し増菌した *L. pneumophila* SGUT の菌株を滅菌水で10倍ごとに希釈系列を作成し、レジオラート/QT法を行ったところ、概ね10倍ごと段階的に減少していき、同時に実施した平板培養法とほぼ同等の検出菌量を示した。

温泉水、浴槽水等計138検体についてレジオラート/QT法を実施したところ、平板培養法と比較したレジオラート/QT法の感度は75.6%、特異度81.7%であり、結果一致率は79.7%であった。結果が不一致であったものは28検体あり、比較的検出菌量の少ない検体が多かった。レジオラート/QT法のみ検出であった17検体について、陽性となったウェルの液体培地からレジオネラ属菌の分離を試みたところ、14検体で *L. pneumophila* が検出されたが、3検体についてはレジオネラ属菌が分離できなかった。レジオラート/QT法及び平板培養法ともに検出となった34検体について検出菌量の比較を行ったところ、レジオラート/QT法の方が検出菌量の多い傾向があるものの回帰直線の R^2 は0.778であり、強い相関が認められた。

3. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT法の評価、比色系パルサー法の検討

45検体中、大分法では25検体（5~44,500 CFU/100 mL）、標準法では22検体（10~31,500

CFU/100 mL) からレジオネラ属菌が検出された。レジオラート/QT 法では、45 検体中 17 検体から 10~22,726 MPN/100 mL の *L. pneumophila* が検出された。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.8553$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8607$ (標準法で検出不能となった 1 検体のデータを除く) であった。平板培養法とレジオラート/QT 法との菌数の相関は大分法で $R^2=0.8712$ 、標準法で $R^2=0.7844$ であった。

比色系パルサー法については、使用したセルロース混合エステルフィルターの孔径が 0.45 μm (14/17 検体が陽性) でも、0.22 μm (12/17 検体が陽性) と同等以上の結果となった。保健所で実施した 4 検体は 2 検体が陽性となった。

4. 公衆浴場等のイベント風呂で使われる柑橘系果物の清浄度試験の結果について

未洗浄の甘夏みかんは 1 日後に表面の微生物数が増加したが、2 日後には減少した。水道水での手こすり洗いにより表面の微生物数は一律減少したが、浴槽の湯に浸けて 1 日後には細菌数は増加し、2 日後には大きく減少した。中性洗剤でスポンジ洗い、歯ブラシによるこすり洗い、タワシによるこすり洗いは、いずれも表面を洗った後の微生物量は減少傾向にあり、1 日後、2 日後にさらに減少し、歯ブラシとタワシのこすり洗いでは、2 日後により減少した。

5. 携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化

協力機関の全体の回収率は大腸菌で 70%~90%、*L. pneumophila* で 70%~130% であった。一つの協力機関の現地調査において、浴槽水 34 試料を 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、RDM 法の培養法に対する感度は 85.7%、特異度は 96.3% を示した。供試試料の LP 数の定量性について、RDM 法は培養法との間に相関は認められなかったが ($R^2 = 0.0104$)、定性的には妥当な成績を示した。

6. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

公開されている配列情報から 7 遺伝子 (*flaA*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) の SBT

データベースを作成した。そのデータベースに対して、Miseq で得られたリードデータを、SRST2 を用いてマッピングを行い、得られたアシルプロファイルを既知の ST データベースと照合し、ST を決定するパイプラインをおおむね構築した。

ST が一致して MLVA 型が異なる菌株、あるいは MLVA 型が一致して ST が異なる菌株のコアゲノム SNPs の系統解析を行ったところ、MST で示される MLVA 型あるいは ST による株間の類縁関係は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していた。

7. 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

入浴施設の浴槽水、湯口水、カラン並びにシャワーの温水及び地下タンクと高置タンクの温水の計 14 試料のうち、2 つの初流水のカラン水試料および 3 分間流水後採取したカラン水試料からレジオネラ属菌が検出された。

3 医療機関において給水・給湯系からレジオネラ属菌が検出された。全機関で受水槽に次亜塩素酸ナトリウムを独自に添加し、給水系の遊離残留塩素濃度を高くして管理していたが、蛇口の初流水の塩素濃度が低い試料があり、レジオネラ属菌の検出と関連していた。医療機関の給水系の蛇口水 32 試料 (培養法では 17 試料から最高 10^4 CFU/100 mL の *Legionella feeleii* SG1、*Legionella anisa* 及び *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が検出、4 試料からは 10~20 CFU/100ml の *L. pneumophila* が検出) を用いてレジオラート/QT 法を行ったが全て陰性であった。

8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成

総合衛生管理と一般的衛生管理の 2 つのパートで構成されている衛生管理ガイドライン案を作成した。総合衛生管理のパートは今年度は検討中のため、概要のみを示した。

集団発生時調査ガイドライン案を作成した。集団発生であっても第一報は散发例と区別できないことが多いため、集団発生時調査ガイドライン案は感染症法に基づく届出の受理から開始し、患者の調査方法についても記述することにした。施

設から分離されたレジオネラ属菌と患者から分離されたレジオネラ属菌の異同は、原因究明のための大きな情報となるので、患者由来株の収集についての手法についても併せて記述した。施設の調査及び施設のレジオネラ属菌検査については、レジオネラ属菌が増殖しやすい場所、感染源となりやすいエアロゾルが発生する場所を示した。具体的なレジオネラ属菌検査手法は「病原体検出マニュアル」を参照することとした。また、検査結果の解釈についても記述した。

9. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

外部精度管理に参加した地方衛生研究所において、5年連続参加した機関は50機関あったが、特定のいくつかの機関が連続して目標良好範囲外となっていた。本年度の回収率は、判定を開始した過去2年と比較し、全体的に低い傾向にあった。特に回収率0～10%未満の施設が全体の3割(30.1%)あり、過去2年(16.9%、8.5%)を大きく上回ったが、配付試料の確認実験において問題は認められなかった。

外部精度管理に係るアンケート調査の結果、ろ過法の変更、ろ過フィルターの変更、フィルターの洗い出し工程の追加、培地の変更、記載ミスの改善、工程全体の見直し等により、結果の改善が認められた機関がある一方で、明確な改善点が見つからず苦慮している機関もあった。

これまでの外部精度管理において不安定な結果を複数回報告していた機関のうち、3機関に対し研究班員が訪問し検査工程の確認を行い、その場で検討会を行った。

10. モノクロラミン消毒を導入した循環式浴槽を洗浄する必要性

高pHの温泉水を循環利用している2箇所の入浴施設での6～7週間にわたるモノクロラミン消毒の実地試験の結果、モノクロラミン濃度はほぼ安定的な濃度推移が認められ、レジオネラ属菌、大腸菌群ともに陰性で、一般細菌数も低く抑えられた。一方、従属栄養細菌数はいずれの施設でも遊離塩素管理時より増加した。1施設において、第5週から高濃度モノクロラミンによる消毒を1時間から一晩に延長したところ、従属栄養細菌数

は1/100程度に減少したものの、第6週以降は再び同様のオーダーにまで増加した。

D. 考察

入浴施設のシャワー・カラン水の約2割からレジオネラ属菌が検出された。レジオネラ属菌の検出は、水が滞留した際に、塩素濃度及び温度が低下し、生物膜が形成されることが原因の一部であると推測される。エアロゾルが発生しやすいシャワー水の衛生管理の重要性について、改めて周知していく必要性が示された。

レジオネラ症の感染源となるような浴用水からは、多くの種類のレジオネラ属菌が分離される場合が多く、目的とするレジオネラ属菌をIMBにより選択的に濃縮分離することは意義がある。血清群1以外の*L. pneumophila*を起因菌とするレジオネラ症も診断できる新しい尿中抗原検査試薬が保険適用となり、患者が増加することが予想される。様々な血清群のIMBを自家調製し、対応することが望ましい。自家調製IMBの回収率の向上に向けて、さらに改良、検討が必要である。

モバイル型qPCR装置による浴用水からのレジオネラDNA検出の検討では、従来のDNA抽出においては、既存の機器でのLAMP法、qPCR法と同等の結果が得られた。今後、モバイル型qPCR装置を採水現場で測定することを想定して、ろ過濃縮工程、DNA抽出法について、採水現場での実施に適したプロトコルを検討する必要がある。

温泉水、浴槽水等計138検体について、*L. pneumophila*を特異的に検出するレジオラート/QT法を平板培養法と併せて実施したところ、検出菌量の比較的少ない一部検体で、それぞれ一方のみ検出されるという結果の不一致が起こったが、ほぼ同等の検査結果が得られた。給水系の蛇口水17試料からは、*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌が平板培養法で検出されたが、すべてレジオラート/QT法では陰性となり、本法は特異性が高いことが示された。レジオラート/QT法の手技は、平板培養法と比較し非常に簡易であり、レジオネラ症患者の主要起因菌であり、浴槽水の

優占種として分離される *L. pneumophila* を特異的に検出するので有用な検査法であると考えられる。

特殊な機器を必要としない比色系パルサー法については、検体濃縮工程の工夫ができたので、保健所等監視指導機関等での活用が期待できる。

浴槽水の平板培養検査において、濃縮試料だけではレジオネラ属菌が検出できない検体があり、通知に基づく標準法で推奨されている非濃縮検体検査の併用実施により検出率が向上することが示された。非濃縮検体の塗抹量は 100 μ L よりも 200 μ L の方が望ましいと思われた。

入浴施設のイベント風呂に柑橘系果物が使われることがある。柑橘系果物の表面には凹凸が多いので、衛生管理上、浴槽水を清浄に保ちレジオネラ属菌の増殖を抑制するためには浴槽に投入する前に、スポンジ、ブラシ、タワシなどを使用した物理的洗浄の実施を提案した。

利便性の高い分子タイピング法である MLVA 法は、SBT と同様全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していて、菌株のスクリーニングに用いることは、有用であると考えられた。

「公衆浴場における衛生等管理要領」は令和元年 9 月に改正され、入浴施設の設備に対して新たに実施すべき衛生管理項目等が加えられたが、当管理要領には衛生管理の具体的な作業手順等に関する記述が少ないため、指導及び衛生管理実施の現場において利用できる、実践的な内容を示したガイドラインの作成が求められる。また、入浴施設が関連するレジオネラ症の集団感染事例は毎年のように発生している。患者発生と施設の関連性を解明して感染の拡大を阻止し、その後の集団感染事例を予防することは、公衆衛生上の重要な課題である。一連の患者調査及び環境調査を適切に実施するためには、レジオネラ属菌やレジオネラ症に関する知識や情報に基づいた手法を用いることが求められる。そこで研究班内に入浴施設の衛生管理ガイドライン作成並びに集団発生時調査ガイドライン作成の 2 つのワーキンググループを立ち上げ、ガイドラインを作成した。

外部精度管理については、これまで同様特定のいくつかの機関に検査手技の再確認が必要と判

定される傾向が認められた。不安定となる要因は、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。今回、直接技術指導を行った機関では、明確な改善ポイントが不明だった場合でも、検査工程全体に対し改めて注意を払い、一つ一つの作業を丁寧に対応することで改善方向に進んでいると思われた。一方、本年度の回収率は、判定を開始した過去 2 年と比較し、全体的に低い傾向にあった。配付試料の確認実験において問題は認められなかったが、参加機関側、配付試料側、双方について改めて検証したいと考える。今後も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。次年度もアンケート調査を実施し、情報の共有に努めたいと考える。

pH9 以上の高 pH の温泉水に対しては、次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が減弱し、レジオネラ属菌の増殖が問題となることがある。高 pH においてもレジオネラ属菌への消毒効果が発揮されるモノクロラミン消毒の活用が進められている。高 pH の温泉水を循環利用している 2 箇所の営業施設で、モノクロラミン消毒を行った。モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の制御に有用だが、従属栄養細菌数が増加する問題が再現され、循環式浴槽には、より強力な洗浄・消毒が必要と考えられた。

E. 結論

公衆浴場のレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等について、効果的な手法の検討を行った。

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た。令和元年 9 月に通知された「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」の妥当性を検証した。平易な培養法であるレジオラート/QT 法を検討したところ、浴槽水の培養では、従来の平板培養法と相関のある結果が得られた。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が現場で行えるように、モバイル型 qPCR 装置の試用や比色系パルサー法の改

良を行った。携帯型フローサイトメーターを使用したレジオネラリスク評価法については、標準作業書・ワークシート作成を行った。

分子疫学的手法としてのMLVAとSBTは全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していることが示され、MLVAは菌株のスクリーニングに有用であると考えられた。

入浴施設の衛生管理ガイドライン作成並びに集団発生時調査ガイドライン作成の2つのワーキンググループを立ち上げ、ガイドラインを作成した。

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。

高pHの温泉水を循環利用している2箇所の営業施設で、モノクロラミン消毒を行った。モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の制御に有用だが、従属栄養細菌数が増加する問題が再現され、循環式浴槽には、より強力な洗浄・消毒が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jiang L*, Amemura-Maekawa J*, Ren H, Li Y, Sakata M, Zhou H, Murai M, Chang B, Ohnishi M, Qin T (*: contributed equally). Distribution of *lag-1* alleles, *ORF7*, and *ORF8* genes of lipopolysaccharide and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates in Japan and China. *Front Cell Infect Microbiol.* 9:274. 2019.
- 2) Nakamura I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kobayashi T, Sato A, Watanabe H, Matsumoto T. Persistent *Legionella* contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan. *Int J Infect Dis.* 93:300-304. 2020.
- 3) 森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛治,

田中慶郎, 茶山忠久, 西 智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司. 次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証—三重県津市の榊原温泉における検討—. *温泉科学.* 69:90-102. 2019.

- 4) 磯部順子, 金谷潤一, 木全恵子, 内田 薫, 加藤智子, 綿引正則. 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況. *富山県衛生研究所年報.* 42:39-43. 2019.

2. 総説

- 1) 中植竜大, 前川純子, 村井美代: グラム陰性菌のリポ多糖の構造と合成経路の多様性—*Legionella pneumophila* の遺伝子検査による血清群別に向けて—. *保健医療福祉科学.* 8:40-47. 2019.
- 2) 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 1 浴槽のどこで、どのように増えるのか」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019, 47, 83-89.
- 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 9 浴槽のレジオネラ対策 2 浴槽水の各種消毒方法の効果」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019, 47, 117-123.
- 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 10 浴槽のレジオネラ対策 3 モノクロラミンによる消毒方法について」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019, 47, 159-166.
- 5) 倉 文明: 給湯・給水系に潜むレジオネラ感染症. *感染症.* 287:10-17. 2019.
- 6) 枝川亜希子, 「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 12 レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019, 47, 229-232.
- 7) 井上浩章, 枝川亜希子, 「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 13 アメーバ共培養法を用いたレジオネラ属菌の検出」、*日本防菌防黴学会誌*, 2019,

3. 学会発表

- 1) 中西典子、野本竜平、田中忍、岩本朋忠：冷却塔に定着する *L. pneumophila* が保有するプラスミドの遺伝的特徴. 第14回日本ゲノム微生物学会年会. 2020年3月、愛知.
- 2) 藤井明、松田宗大、小倉徹、小倉諒太、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、モノクロラミン管理下の循環浴槽におけるろ材付着バイオフィームに対する各種消毒剤の効果. 第47回建築物環境衛生管理全国大会、2020年1月、東京都.
- 3) Mori, Yasunori., Nagai, Yuki., Akachi, Shigehiro., Nishi, Tomohiro., Hamaguchi, Maho., Yoshimura, Hideki., Sugiyama, Kanji., Tanaka, Yoshirou., Sayama, Tadahisa., Izumiyama, Shinji. Field test of monochloramine disinfection for alkaline hot spring water that cannot sufficiently be disinfected with sodium hypochlorite because of its high pH - A case study in Sakakibara hot spring area of Tsu City, Mie Prefecture -. The 72th Annual Meeting of the Japanese Society of Hot Spring Sciences. Taichung, November 2019.
- 4) 森中理慧馨、前川純子、金谷潤一、磯部順子、加藤尚之、大野章、高崎一人、原口浩幸、布藤聡、倉文明. 日本温泉科学会第72大会. レジオネラ属菌の迅速検出法として比色系パルサー法の有用性の評価について. 2019年11月. 台中市.
- 5) 森 康則、赤地重宏、永井佑樹、吉村英基、泉山信司、温泉付随ガス分離設備のレジオネラ属菌による汚染実態と対策. 日本温泉科学会第72大会、2019年11月、台中市
- 6) 森本 洋、小川恵子、三津橋和也：レジオネラ症患者の喀痰からいかにしてレジオネラ属菌を検出するか. 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2019年10月、仙台.
- 7) 淀谷雄亮、原 俊吉、湯澤栄子、本間幸子、前川純子、森田昌知、大西 真、岡部信彦. レジオネラ症患者から分離された菌株等における SBT 法による遺伝子型別について. 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2019年10月. 仙台.
- 8) 田栗利紹、蔡 国喜、新道欣也、下田貴宗、倉文明、前川純子. レジオネラニューモフィラの定量検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の有用性評価. 日本防菌防黴学会第46回年次大会. 2019年9月、大阪.
- 9) 松田宗大、枝川亜希子、泉山信司、小倉 徹、植園健一、松田尚子、藤井 明、循環式浴槽から分離された *Mycolicibacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果. 日本防菌防黴学会第46回年次大会、2019年9月、大阪.
- 10) 小倉 徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、松田宗大、松田尚子、藤井 明、モノクロラミン管理下の浴槽循環ろ過装置内のろ材バイオフィームに対する各種消毒剤の消毒効果の検討. 日本防菌防黴学会第46回年次大会、2019年9月、大阪.
- 11) 前川純子. 「レジオネラ症発生事例について -作業環境を中心に-」. 第29回日本衛生産業学会全国協議会シンポジウム「生物学的ハザードと作業環境」. 2019年9月. 仙台.
- 12) Jun-ichi Kanatani, Masanori Watahiki, Keiko Kimata, Tomoko Kato, Kaoru Uchida, Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, and Junko Isobe. *Legionella* Species in Aerosols from Outdoor Sites near Asphalt Roads in Toyama Prefecture, Japan: Detection, Identification and Correlation with Precipitation. ESGLI 2019. Athens, Sep, 2019.
- 13) 前川純子. 「*Legionella pneumophila* の遺伝子型別から分かること」. 第92回日本細菌学会総会ワークショップ「レジオネラをめぐる新展開」. 2019年4月. 札幌.

4. 研修会

- 1) 黒木俊郎：公衆浴場の衛生等管理要領の改正につながった研究成果について、厚生労働省 令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020年2月、東京都.
- 2) 森本 洋：公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について、厚生労働省 令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020年2月、東京都.
- 3) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、令和元年度環境監視員担当者会議、2019年6月、大分.
- 4) 佐々木麻里 他：環境水等からのレジオネラ属菌の検査法について、レジオネラ実技研修会、2019年4月、福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし