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

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

（課題番号：H28-健危-一般-006）

平成 28 年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　　前川　純子

平成 29（2017）年　3 月

目　次

I. 総括研究報告

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----------2
前川純子

II. 分担研究報告

1. 社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と
浴槽水から分離される従属栄養細菌について----------13
長岡宏美、泉山信司、八木田健司、杉山寛治、小坂浩司、壁谷美加、土屋祐司、市村祐二、
青木信和

2. 水泳プールのモノクロラミン消毒----------23
泉山信司、長岡宏美、青木信和、市村祐二、江口大介、杉山寛治

3. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査----------31
黒木俊郎、泉山信司、縣　邦雄、大屋日登美、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹

4. 感染源解明のための環境調査----------39
磯部順子、金谷潤一、小澤賢介

5. レジオネラ生菌迅速検査法の評価----------51
磯部順子、佐々木麻里、金谷潤一、川野みどり、田栗利紹、武藤千恵子、山口友美、淀谷雄亮、
中筋　愛、吉崎美和、原口浩幸、森中りえか

6. 斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査と比色系パルサー法感度向上のための検討----------62
佐々木麻里、一ノ瀬和也、神田由子、緒方喜久代

7. MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴----------68
中西典子、田中　忍、野本竜平、前川純子

8. 原湯等の糞便汚染指標菌及び検査法について----------73
黒木俊郎、森本　洋、磯部順子、緒方喜久代、倉　文明、前川純子

9. レジオネラ感染とアメーバ　アメーバのレジオネラ受容体の解析----------79
八木田健司、泉山信司

10. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み----------85
森本　洋、磯部順子、黒木俊郎、佐々木麻里、大屋日登美、緒方喜久代、小川恵子、金谷潤一、
倉　文明、田中　忍、千田恭子、平塚貴大、武藤千恵子、山口友美、吉野修司、渡邉涼太、

11. 検査機関へのレジオネラ属菌検査研修会の開催について----------105
長岡宏美

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----------109

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）

総括研究報告書

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

研究代表者　　前川純子　国立感染症研究所　細菌第一部　主任研究官

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A. 研究目的

水環境で増殖するレジオネラ属菌は、そこから生じるエアロゾルを介して感染し、重篤な肺炎やポンティアック熱を引き起こすため、特に公衆浴場を中心とした水環境で問題となっている。公衆浴場等のレジオネラ症対策の向上のために、レジオネラ検査法と消毒法の改善、開発、およびその普及が急務である。従来の 1〜2 週間を要する培養法に対して、1〜2 日で結果が得られる迅速検査法が期待されることから、迅速検査法の妥当性を検証する。培養法についても、実検体での検査を重ね、改善を目指す。モノクロラミン消毒等による入浴施設等の衛生管理を実践して、問題点を明らかにして、有効な消毒法を示す。汚染源は半数が入浴施設に関連し、残り半分は不明とされることから、並行してレジオネラ属菌汚染実態調査、さらにレジオネラ分離株の特徴付けを行なう。レジオネラ検査実施機関に対して、外部精度管理や研修を行うことで、レジオネラ検査の質の向上を図る。研究成果を通じて、レジオネラ症対策が進み、安心して入浴できる施設が増えることが期待される。

B. 研究方法

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

表1　研究協力者一覧

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

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

1. モノクロラミン消毒実証試験

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

(2) 微生物検査法：レジオネラ属菌の増殖の場となる自由生活性アメーバ（大腸菌塗布無栄養寒天培地）、および従属栄養細菌（R2A 寒天培地（ニッスイ））や一般細菌数（標準寒天培地（栄研化学））については常法により定量したが、従属栄養細菌の培養については浴槽水に近い温度の 37℃で、7 日間とした。

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

2. 水泳プールのモノクロラミン消毒

廃止予定となっていた国立健康栄養研究所内の水温約 30℃、270m^3 の屋内水泳プールを借用した。利用はなかったが、循環ポンプによる遊離塩素消毒管理が行われていたので、次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加を中止し、遊離塩素濃度が 0.2mg/L を下回った後に、モノクロラミン消毒を開始した。水道水に次亜塩素酸ナトリウム溶液と硫酸アンモニウム溶液を加えて混合し、モノクロラミンの自動生成と添加をするクロラクター装置（ケイアイ化成）をプールサイドに設置した。ポーラログラフ法による全塩素濃度の測定を行い、フィードバック制御により必要に応じて追加塩素を行い、全塩素濃度（モノクロラミン濃度）が維持される様に設定した。注入するモノクロラミンは、プール全体に行き渡るように、プール底の吸引口に導入した。モノクロラミン、アンモニア態窒素、遊離塩素濃度、全塩素濃度、濁度、過マンガン酸カリウム消費量を採水して測定した。微生物検査は上記 1. (2)と同様に行なった。

3. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

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

4. 感染源解明のための環境調査

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

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

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

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

5. レジオネラ生菌迅速検査法の評価

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

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

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

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

比色系パルサー法は、100 倍濃縮検体 4 mL を遠心後、上清を除去し、添付の取扱説明書に従い実施した。当日中に測定しない場合は、RNA 抽出後の検体を−20℃で保存した。

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

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

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

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

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

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

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

8. 原湯等の糞便汚染指標菌及び検査法について

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

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

9. レジオネラ感染とアメーバ　レジオネラ属菌感染促進物質の探索

PYGCで培養したアメーバ（*A. castellanii* 1501/10株）をフラスコから剥離し、遠心洗浄後、10xASで1x10^5/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、10xASで濃度を調整した被検物質（低分子：Triton X-100、DMSO、サポニン、タウリン、グルタチオン、高分子：ヘパリン、コンドロイチン硫酸BおよびC、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸溶液）300 μLをマイクロプレート内の10xASと置換し、さらに1時間培養した。BCYEα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10xASで0.1ODに調整し、その30 μLをマイクロプレートのアメーバ培養ウェルに加え、静かに撹拌してから30℃で3時間培養した。その後50 μg/mLとなるようにgentamycinを添加し、未感染のアメーバ外にある菌を不活化した。感染18時間後にプレート底面全体を氷水上につけアメーバを剥離し、アメーバ浮遊液を回収、遠心（500 rpmx3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、あるい単独で存在する菌が明確であるアメーバを感染細胞として、その数を測定し、感染率を求めた。なお細胞はランダムに約500個を調べた。

10. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

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

（倫理面への配慮）

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがい、個人情報保護に充分に配慮して行われた。利益相反委員会の指導・管理に従って、研究協力関係にある企業等について、研究班内で情報共有を行った。開示すべき企業からの経済的利益は受けていない。

C. 研究結果

1. モノクロラミン消毒実証試験

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

レジオネラ属菌やアメーバは検出されなかった。

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

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

2. 水泳プールのモノクロラミン消毒

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

3. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

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

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

4. 感染源解明のための環境調査

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

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

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

5. レジオネラ生菌迅速検査法の評価

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

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

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

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

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

大分県内施設の浴場水 39 検体を用いて迅速培養法（斜光法を取り入れた培養法）を実施したところ、より短い期間で正確な培養結果が得られた。浴場水由来の *L. pneumophila* 血清群 1 株について、調査を始めた平成 24 年度以降初めて *lag-1* 遺伝子保有株が検出された。

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

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

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

8. 原湯等の糞便汚染指標菌及び検査法について

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

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

9. レジオネラ感染とアメーバ　アメーバのレジオネラ受容体の解析

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

10. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

外部精度管理に参加した地方衛生研究所において、300～9000cfu/100ml の目標値（良好範囲）を報告した機関は、非濃縮試料①では 71 機関中 68 機関（約 96%）、非濃縮試料②では 71 機関中 66 機関（約 93%）、ろ過濃縮試料では 62 機関中 47 機関（約 76%）、遠心濃縮試料では 9 機関中 5 機関（約 56%）あった。濃縮試料では、昨年度同様ろ過濃縮による報告結果が良い傾向にあった。昨年度、今年度とも参加し、今年度良好範囲外の結果を報告した 16 機関中 11 機関（約 69%）は、2 年連続で同様の結果を報告していた。またこれら 11 機関中 4 機関（約 36%）は、複数項目で良好範囲外の結果を報告していた。

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

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

管洗浄方法の検討が必要と考えられた。

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

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

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

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

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 神田 隆, 久保田 明, 縣 邦雄, 小坂浩司, 前川純子, 遠藤卓郎, 倉 文明, 八木田健司, 泉山信司, モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策, 日本防菌防黴学会誌, 2017 年 1 月受理.

2) Kanatani JI, Isobe J, Norimoto S, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M. 2017. Prevalence of *Legionella* Species Isolated from Shower Water in Public Bath Facilities in Toyama Prefecture, Japan. J Infect Chemother. Epub ahead of print. doi: 10.1016/j.jiac.2017.01.002.

3) Kuroki T, Amemura-Maekawa J, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee K, Ohnishi M, Kura F. 2017. Outbreak of Legionnaire's disease caused by *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 13. Emerg Infect Dis. 23:349-351.

4) Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. 2017. Epub ahead of print. doi: 10.1017/S0950268817000036.

5) 磯部順子, 金谷潤一, 他：富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況（2015 年）富山県衛生研究所年報. 39:61-67, 2016.

6) 今野貴之, 髙橋志保, 鈴木純恵, 樫尾拓子, 熊谷優子, 木内 雄, 石井 淳, 前川純子, 大西 真, 倉 文明：2016 年に多発傾向がみられたレジオネラ症の解析－秋田県. 2017. 病原微生物検出情報. 38:22.

2. 総説

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

3. 学会発表

1) 黒木俊郎, 泉山信司, 大屋日登美, 鈴木美雪, 前川純子, 倉文明, 医療機関の給水系におけるレジオネラ属菌汚染調査, 日本水道協会水道研究発表会, 2016 年 11 月, 京都市.

2) 杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 和田裕久, 土屋祐司, 市村祐二, 青木信和, 神野透人, 小坂浩司, 泉山信司, 八木田健司, 縣邦雄, 田中慶郎, 前川純子, 倉文明, モノクロラミン消毒の事前適合性試験の提案, 防菌防黴学会, 2016 年 9 月, 東京都.

3) 泉山信司, 倉文明, 大屋日登美, 黒木俊郎, 病院の蛇口におけるレジオネラ汚染の検出, 環境技術学会, 2016 年 9 月, 姫路市

4) 黒木俊郎, 大屋日登美, 鈴木美雪, 政岡智佳, 古川一郎, 前川純子, 倉 文明. 医療機関の給水系におけるレジオネラ属菌汚染実

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

5) T. Kuroki, Y. Watanabe, H. Teranishi, S. Izumiyama, J. Amemura-Maekawa, and F. Kura. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. ESGLI 2016. Amsterdam, September 2016.

6) Amemura-Maekawa J, Chida K, Ohya H, Isobe J, Kanatani JI, Tanaka S, Nakajima H, Yoshino S, Ohnishi M, and Kura F: Characterization for clinical *Legionella* species by *Legionella* Reference Center in Japan. ESGLI 2016. Amsterdam, September 2016.

7) 中西典子, 田中忍, 有川健太郎, 岩本朋忠：温泉環境由来レジオネラ属菌の遺伝学的特徴と病原性遺伝子保有状況. 第 90 回日本細菌学会総会. 平成 29 年 3 月, 仙台.

4. 研修会

1) 杉山寛治：平成 28 年度第 2 回衛生環境研究所感染症等研修会, 山梨県衛生環境研究所主催, 2016 年 12 月 7 日, 山梨県甲府市.

2) 杉山寛治:平成 28 年度神戸市保健所研修会, 神戸市保健福祉局健康部生活衛生課主催, 2017 年 2 月 16, 17 日, 兵庫県神戸市.

3) 杉山寛治：南加賀モノクロラミン講習会, 石川県南加賀保健福祉センター主催, 2017 年 3 月 2 日, 石川県加賀市, 3 月 3 日, 石川県小松市.

4) 杉山寛治：千葉市保健所研修会, 2017 年 3 月 13 日, 千葉県千葉市.

5) 佐々木麻里：レジオネラ症に係る最近の知見と検査の取り組み, 平成 28 年度環境監視員担当者会議, 2016 年 4 月, 大分.

6) 前川純子, 森本 洋, 金谷潤一, 八木田健司, 倉 文明, 磯部順子, 佐々木麻里, 緒方喜久代, 他:レジオネラ検査法, レジオネラ属菌培養法概論, 迅速診断検査法概論, 環境中のアメーバとレジオネラ感染, レジオネラ感染症総論, 臨床検体（喀痰）検査法, 他：国立保健医療科学院平成 28 年度短期研修新興・再興研修, 2016 年 10 月 3-7 日, 東京.

7) 倉 文明, 森本 洋, 縣 邦雄, 他：レジオネラ症の国際動向, レジオネラの検査法と外部精度管理, 配管洗浄の方法, 他：平成 28 年度生活衛生関係技術担当者研修会, 2017 年 2 月 6 日, 東京.

8) 倉 文明：レジオネラ属菌の検査と対策, 平成 28 年度短期研修環境衛生監視指導, 2016 年 11 月 17 日, 東京.

9) 倉 文明:レジオネラ症の最近の話題と動向, 岡山県レジオネラ属菌対策研修, 2016 年 7 月 15 日, 岡山.

10) 前川純子, 森本 洋, 他:レジオネラ属菌検査の現状と今後の方向性, レジオネラ属菌検査における結果の変動要因と手技のポイント, 他：レジオネラ属菌検査セミナー（主催：日水製薬株式会社）, 2016 年 7 月 14 日, 東京.

11) 倉 文明, 森本 洋, 他：ISO11731 の改訂とレジオネラ属菌検査外部精度管理の動向, レジオネラ属菌培養法について, 他：レジオネラ属菌検査セミナー（主催：日水製薬株式会社）, 2017 年 3 月 10 日, 東京.

12) 前川純子：レジオネラ症集団感染事例, 平成 28 年度レジオネラ対策講習会, 東京都多摩府中保健所主催, 2016 年 2 月 27, 28 日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

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

実用新案登録, その他

なし

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）
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
研究代表者：前川純子　国立感染症研究所 細菌第一部

平成 28 年度　分担研究報告書

社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について

研究分担者　○長岡宏美　静岡県環境衛生科学研究所　微生物部
泉山信司　国立感染症研究所 寄生動物部
八木田健司　国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者　杉山寛治　株式会社マルマ　研究開発部
小坂浩司　国立保健医療科学院　生活環境研究部
壁谷美加　浜松市保健所
土屋祐司　浜松市保健環境研究所
市村祐二　ケイ・アイ化成株式会社
青木信和　ケイ・アイ化成株式会社

（研究要旨）
公衆浴場等の入浴施設で実績を上げてきたモノクロラミン消毒について，社会福祉施設の浴槽へ適用した。レジオネラ症患者が利用したとの届出があった社会福祉施設の循環式浴槽において，モノクロラミン濃度を 3 ㎎/L に維持する 6 週間の消毒実証試験を行なった。本施設は沸かした水道水を循環し，ろ過器と，気泡発生装置と，炭酸カルシウム天然石入りの人工温泉装置を備えていた。モノクロラミン消毒を実施した男浴槽水，循環水を掛け流し的に使用するデイサービス個浴槽、それらの配管において，モノクロラミン濃度はほぼ 3㎎/L に安定して維持され，レジオネラ属菌やアメーバは検出されなかった。
実証試験終了後、遊離塩素消毒の管理に戻した浴槽水から *Legionella pneumophila* 血清群 5，拭き取り検査から *L. pneumophila* 血清群 1，5，8，10 が検出された。本施設の浴槽水の消毒方法は,遊離塩素よりもモノクロラミンが適していると判断された。
本施設のモノクロラミン消毒の 3 週目以降に，浴槽水における従属栄養細菌数の増加がみられ，この菌は 16S rDNA 塩基配列が *Mycobacterium phlei* と 100%（466/466bp, CP014475）一致した。本菌は、常時維持していたモノクロラミン濃度の 3㎎/L や， 10㎎/L 濃度で 2 時間循環する消毒洗浄では抑制できなかったことになる。同様の管理をしていた他の施設の浴槽水からも，*M. phlei* の増殖が確認された。一方で，週 1 回 8 時間、20㎎/L のモノクロラミン消毒洗浄を実施している施設では検出されていなかった。浴槽水から分離された *M. phlei* に対する試験管内の消毒試験では，10㎎/L のモノクロラミンでは消毒の不足があり，20㎎/L の 30 分以上で消毒が可能であった。濃度や時間についてはまだ検討の余地があるが，現時点で週 1 回，20㎎/L 以上での消毒洗浄が必要と考えられた。

A．研究目的

以前の研究班では，結合塩素の一種であるモノクロラミンの浴槽水に対する消毒効果を検証してきた。その結果，モノクロラミン消毒は，遊離塩素消毒では十分な殺菌効果が期待できない，高pHや，アンモニア態窒素，臭化物イオン，鉄，マンガンを含む泉質の温泉においても，レジオネラ属菌やその増殖宿主であるアメーバの殺菌・増殖抑制効果が高いことを確認した[1,2,3,4]。それらの研究成果を踏まえ，平成27年3月に，公衆浴場の浴槽水のレジオネラ汚染対策としてモノクロラミン消毒が有効であることが，厚生労働省健康局生活衛生課長通知「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」に盛り込まれた[5]。

今年度は，高齢者の利用が多くレジオネラ感染リスクが高いと思われる社会福祉施設の浴槽設備へのモノクロラミン消毒の適用を検討した。

また，モノクロラミン消毒時に，増殖が確認されることがある従属栄養細菌について，塩基配列解析による同定と，各種薬剤による殺菌効力試験を実施し，その増殖抑制方法について検討した。

B．研究方法

1 社会福祉施設の入浴設備へのモノクロラミン消毒の適用

レジオネラ症患者発生に係る関連施設とされた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。本施設は，**図1**に示したように，沸かした水道水を循環し，公衆浴場の男女浴槽に使用するとともに、その一部を社会福祉施設のデイサービス個浴槽に配湯し，掛け流し的な利用を行っていた。男女浴槽にはジェットと気泡発生装置があり，循環系内には，炭酸カルシウム天然石入りのタンクと壁付けの人工温泉装置を備えていた。浴槽水の消毒薬はろ過器前に注入していたが，夜間（午後7時半～翌日の午前8時）は循環と消毒を停止していた。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，その後換水していた。

検体は，毎週水曜日の朝9時に，**図1**の＊で示した男浴槽，デイサービスの個浴槽配管水(配管内水を2分排水後に採水)，デイサービスの配管滞留水（配管内水の排水なしで採水）の3カ所から採水した。

レジオネラ属菌の定量は，浴槽水500mLをメンブランフィルター法により100倍濃縮後,GVPC寒天培地に分離培養し,100mLあたりのCFU（Colony Forming Unit）を算出した。また，レジオネラ属菌の増殖の場となる自由生活性アメーバ（大腸菌塗布無栄養寒天培地)，および従属栄養細菌（R2A寒天培地（ニッスイ））や一般細菌数（標準寒天培地（栄研化学））についても常法により定量したが,従属栄養細菌の培養については浴槽水に近い温度の37℃で，7日間とした。

男浴槽水の一部はガラス容器に入れて冷蔵で輸送し，DPD/FAS滴定法で遊離塩素，モノクロラミン，ジクロラミンの濃度を国立保健医療科学院において測定（定量下限値：0.1mg/L）した[6]。悪臭の原因となるトリクロラミンはHS-GC/MS法(ヘッドスペース- ガスクロマトグラフ質量分析法,Agilent 6890N/5975C，Agilent Technologies社）で測定（定量下限値：15μg/L）した[7]。

また，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PCⅡ（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が問題なく行われていることを確認した。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　モノクロラミン消毒時の従属栄養細菌検出状況との各種薬剤を用いた殺菌効力試験

(1) モノクロラミン消毒時の従属栄養細菌検出状況

モノクロラミン消毒を実施中，または過去に実

施したK，H，M，Dの4施設の循環式浴槽水8検体の従属栄養細菌数を検査した。また，各施設で実施したモノクロラミンによる配管洗浄時の濃度と時間，配管洗浄/換水から採水までの日数，使用している浴槽水の泉質などを調査した。さらに，K，H，M施設の浴槽水から分離された従属栄養細菌の代表株について，16S rDNA塩基配列解析を実施し，菌種を同定した。

(2) 従属栄養細菌に対する殺菌効力試験

浴槽水からの従属栄養細菌の検出菌数が 10^2 CFU/mL以下と少なかったK施設と，検出菌数が 10^5 CFU/mL以上と高かったH施設のそれぞれから分離された菌株に対して，モノクロラミン，遊離塩素および過酸化水素の濃度を変えた殺菌効力試験を行った。

試験菌はR2A培地で画線培養した増殖菌を滅菌水中で懸濁後，リン酸緩衝液(pH7.2)で 10^5～10^6 に希釈したものを用いた。この菌液10mLに対し各薬剤を所定濃度添加し，30℃撹拌条件下で30分および120分後の菌数を測定した。なお，菌数測定にあたっては，試験菌液1mLに薬剤不活化液（滅菌したSCDLP培地にカタラーゼを0.2%添加したもの）9mLを添加し消毒剤を失活させた後に，滅菌水で段階希釈してR2A培地に接種し，37℃，7日間培養した。

モノクロラミン添加系の試験液濃度は，その1mLを滅菌水9mLで希釈し，その全量をインドフェノール法で測定した。一方，遊離塩素添加系については,試験液0.5mLを滅菌水9.5mLで希釈し，その全量をDPD法で測定した。

C．結果

1 社会福祉施設の入浴設備へのモノクロラミン消毒の適用

遊離塩素管理時（遊離塩素濃度0.4 mg/L）の浴槽水のpHは7.8で，全硬度は65 mg/Lであった。なお，当施設の水道水のpHは7.4，全硬度は45 mg/Lで，人工温泉と称する浴槽水の全硬度がやや高い値であった。

この人工温泉水を使用した社会福祉施設の循環式の入浴設備におけるモノクロラミン消毒の実証試験結果を**表1**に示した。6週間のモノクロラミン消毒試験期間中の浴槽水，デイサービス個浴槽配管水，デイサービス配管滞留水における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。現場で測定した全塩素濃度はモノクロラミン濃度とほぼ同等の値を示した。

従属栄養細菌数はモノクロラミン開始3週目以降に増加し，試験終了時まで 10^3 から 10^4 CFU/mLの高い菌数で推移した。R2A寒天平板上に発育した従属栄養細菌のコロニーの写真を**図2**に示した。本菌は発育が遅く，37℃，7日間培養でも小コロニーの形成にとどまった。本菌の16S rDNAの塩基配列は *Mycobacterium phlei* と100 %（466/466bp，CP014475）一致した。

なお,モノクロラミン消毒実証試験の終了約1ヶ月後の，同施設の遊離塩素管理時の男浴槽水から *Legionella pneumophila*（以下，*L. p.*と略す）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. p.* 血清群1，5，8，10が検出された.

2 モノクロラミン消毒時の従属栄養細菌検出状況との各種薬剤を用いた殺菌効力試験

(1) モノクロラミン消毒時の従属栄養細菌検出状況

モノクロラミン消毒実施4施設の循環式浴槽水8検体からの従属栄養細菌数検出状況を**表2**に示した。これらの従属栄養細菌数と，各施設で実施されるモノクロラミンによる配管洗浄の濃度・時間を比較すると，従属栄養細菌数が 10^2 CFU/mL以下と少なかったK施設では，モノクロラミンによる配管洗浄濃度は23mg/Lと高く，洗浄時間も8時間と長かった。一方，従属栄養細菌数が 10^3 CFU/mL以上の浴槽水がみられたH施設とM施設では，モノクロラミンによる配管洗浄濃度は10mg/Lで，洗浄時間も2時間と短かった。また，配管洗

浄を実施しないD施設の浴槽水の従属栄養細菌数は10^3 CFU/mL以上と高かった。

従属栄養細菌数が10^2 CFU/ mL以下と少なかったK施設の従属栄養細菌の代表3菌株は,16S rDNAシークエンス解析により，それぞれ*Staphylococcus epidermidis*，*Rheinheimera* sp.，*Rhodobacter* sp.と同定された。一方，従属栄養細菌数が10^3 CFU/mL以上と高菌数で検出されたH施設とM施設の菌株はいずれも*Mycobacterium phlei*と同定された（**表2**）。

(2) 従属栄養細菌に対する殺菌効力試験

K施設の浴槽水から分離された従属栄養細菌（未同定）の1菌株に対するモノクロラミン，遊離塩素および過酸化水素の殺菌効力試験の結果を**表3**に示した。本菌株は5 mg/L濃度のモノクロラミンの30分間の感作で完全に殺菌された。遊離塩素および過酸化水素でも，実施したすべての処理濃度で殺菌可能であり，本菌株が消毒薬に対して感受性が高いことが示された。

一方，*Mycobacterium phlei*と同定されたH施設の浴槽水から分離された従属栄養細菌の1菌株に対する各種薬剤の殺菌効力試験の結果を**表4**に示した。本菌を完全に殺菌するためには,モノクロラミンは20mg/L，30分間以上の,遊離塩素では15mg/L，2時間以上の薬剤処理が必要で，過酸化水素は1.5%､2時間以上の処理が必要であった。本菌株はK施設分離株とは異なり各消毒薬に対し抵抗性が高いことが示された。

D．考察

レジオネラ症の患者発生が疑われた人工温泉水を使用する社会福祉施設の浴槽設備に，モノクロラミン消毒を6週間にわたり適用した結果，循環系統内の浴槽水と，そこから掛け流し的に給湯されるデイサービス浴槽用の配管水や,前日からの配管内の滞留水のいずれからもレジオネラ属菌やレジオネラの増殖宿主であるアメーバは一切検出されず，モノクロラミン消毒はレジオネラ対策として優れた消毒法であることがわかった（**表1**）。

本施設は営業終了後の夜間に，循環と消毒を停止しているが，午前9時に採水した浴槽水のみならず，前日から湯の動きがなかったデイサービス用の配管滞留水においても，モノクロラミン濃度は3mg/L程度を保持していた。この薬剤濃度の持続性と安定性がモノクロラミンの優れた消毒効果を担保していると考えられた。

一方,モノクロラミン消毒から遊離塩素消毒に戻して約1ヶ月後の男浴槽水から*L. p.*血清群5が20 CFU/100mL検出され，循環系統内の拭き取り検査で*L. p.*血清群1，5，8，10の検出をみた。遊離塩素消毒時の夜間（約12時間）の装置停止による循環系内の遊離塩素濃度の失活が系内のレジオネラ属菌のバイオフィルム形成につながり,遊離塩素による消毒効果が十分でない営業開始時の採水でバイオフィルム由来のレジオネラ属菌が検出されたのではないかと考えられた。

本施設の従属栄養細菌数に関しては,モノクロラミン消毒開始3週目以降に10^3から10^4 CFU/mLに増加した（**表1**）。それ以降の毎週実施したモノクロラミン濃度10mg/Lによる2時間の配管洗浄にもかかわらず本菌の減少はみられず，この配管洗浄濃度での本従属栄養細菌の殺菌は期待できないと思われた。

一方，K施設の浴槽水からの従属栄養細菌の検出菌数は10^2CFU/mL以下と低い数値であった（**表2**）。K施設で週1回実施している配管洗浄時のモノクロラミン濃度は23mg/L,処理時間は8時間であり,他施設より,高濃度で長時間であったことが従属栄養細菌の低減をもたらしたと考えられた。K施設から分離された従属栄養細菌の同定成績（*Staphylococcus epidermidis*，*Rheinheimera* sp.，*Rhodobacter* sp.）は,ヒトの皮膚の常在菌や環境菌の一時的な混入の可能性を示しており、本菌群の入浴者に与える健康上の問題はないと考えられる。

しかし，配管洗浄濃度が10mg/L，2時間のH,M施設と，配管洗浄を実施しないD施設では10^3 CFU/mL以上の従属栄養細菌数が検出される浴槽水があった（**表2**）。H,M,D施設から分離された従

属栄養細菌は *Mycobacterium phlei* と同定され，土壌、塵や植物などに広く分布する菌であるが，日和見感菌を起こすとの報告[8]もあり、その病原学的な意義の検討が必要と思われた。

従属栄養細菌の殺菌効力試験では，菌数が高く *Mycobacterium phlei* と同定された菌は，20mg/L 以上のモノクロラミン濃度で完全に殺菌され，遊離塩素や過酸化水素に対する抵抗性も高かった（**表 4**）。本菌のような薬剤に抵抗性の高い従属栄養細菌の循環系内での増殖を防ぐためには，週 1 回のモノクロラミン濃度 20mg/L 以上の配管洗浄などが効果的と考えられた。今後，モノクロラミン消毒時に発生・増殖する可能性がある従属栄養細菌に留意し，その制御に必要な配管洗浄方法の確立を求めていきたい。

E．結論

公衆浴場等の入浴施設で実績を上げてきたモノクロラミン消毒を，社会福祉施設の浴槽へ適用した結果，消毒期間中の循環系内の男浴槽水，循環水を掛け流し的に使用するデイサービス個浴槽用配管水とデイサービス配管内滞留水のモノクロラミン濃度は，ほぼ 3mg/L に安定して維持され、レジオネラ属菌やアメーバは一切検出されなかった。その後の遊離塩素管理時の浴槽水からレジオネラ属菌が検出されたことから，本施設の浴槽水の消毒には遊離塩素よりもモノクロラミンが適していると判断された。

一方，本施設では，モノクロラミン消毒開始 3 週目以降に，浴槽水における従属栄養細菌数の増加がみられ，その菌種は，*Mycobacterium phlei* と同定された。本菌はモノクロラミンの通常管理濃度の 3mg/L や，週 1 回実施している配管洗浄濃度の 10mg/L と処理時間の 2 時間では殺菌されなかった。同様なモノクロラミン消毒中の浴槽水での従属栄養細菌数の増加は他の施設でも確認された。本菌種に対する殺菌効力試験の結果から，モノクロラミンでは 20mg/L 以上の薬剤処理が必要とのデータが得られた。今後，これらの従属栄養細菌の増殖を抑制するためには，配管洗浄濃度を 20mg/L 以上に引き上げるなどの対策が必要と思われた。

F．参考文献

1) 杉山寛治：モノクロラミン消毒による浴槽水の衛生対策，ビルと環境，No.148， 34-41 (2015)
2) 佐原啓二，縣 邦雄，神野透人，八木田健司，杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，片山富士男，富田敦子，江口大介，市村祐二，道越勇樹，八木美弥：公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究，モノクロラミン消毒による循環式浴槽の消毒効果について　営業施設における検証，平成 24 年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）分担研究報告書（研究代表者 倉文明）
3) 長岡宏美，縣邦雄，神野透人，八木田健司，杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，片山富士男，和田裕久，榎原広里，市村祐二，青木信和：レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究，各種泉質及び形態の温泉施設におけるモノクロラミンによるレジオネラ属菌消毒効果の検証，平成 26 年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）総括・分担研究報告書.（研究代表者　倉文明）
4) 長岡宏美，縣 邦雄，八木田健司，杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，前林公男，加藤千裕，和田裕久，鈴木史恵，寺田善直，壁谷美加，土屋祐司，市村祐二，青木信和：レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究，マンガンイオンを含む浴槽水へのモノクロラミン消毒の適用，平成 27 年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）総括・分担研究報告書.（研究代表者　倉文明）
5) 健衛発 0331 第 7 号 平成 27 年 3 月 31 日 厚生労働省健康局生活衛生課長通知，「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」の改正について http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujo

uhou-10900000-Kenkoukyoku/0000085122.pdf

6) Standard Methods Committee (2005) DPD ferrous titrimetric method. In *standard methods for the examination of water & wastewater,* 21th edition, pp. 4-64 - 4-66, American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation publication, Washington D.C.

7) Kosaka, K., Seki, K., Kimura, N., Kobayashi, Y., and Asami, M. (2010) Determination of trichloramine in drinking water using head space gas chromatography/mass spectrometry. *Water Sci. Technol. Water Supply,* **10**, 23-29.

8) Abdallah, M. A., Mamoon Rashid, Sabir A. A., Marc A., Shahjahan A., Dick van Soolingen, Wilbert B., and Arnab P.(2012) Complete Genome Sequence of *Mycobacterium phlei* Type Strain RIVM601174. *J. Bacteriol.***194**, 3284-85.

G.研究発表

論文発表

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，防菌防黴．（印刷中）

学会発表

1) **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，日本防菌防黴学会第 43 回年次大会，東京（2016）**

研修会

1) **杉山寛治：平成 28 年度第 2 回衛生環境研究所感染症等研修会，山梨県衛生環境研究所主催，2016 年 12 月 7 日，山梨県甲府市**
2) **杉山寛治：平成 28 年度神戸市保健所研修会，神戸市保健福祉局健康部生活衛生課主催，2017 年 2 月 16、17 日,兵庫県神戸市**
3) **杉山寛治：南加賀モノクロラミン講習会，石川県南加賀保健福祉センター主催，2017 年 3 月 2 日,石川県加賀市，3 月 3 日，石川県小松市**
4) **杉山寛治:千葉市保健所研修会,2017 年 3 月 13 日，千葉県千葉市**

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1 社会福祉施設浴槽水のモノクロラミン消毒実証試験の結果

検査項目		モノクロラミン管理時 (9/12~10/21)																		遊離塩素管理時			
		9月14日			9月21日			9月28日			10月5日			10月12日			10月19日			9月9日			12月1日
		男湯	ディサービス個浴槽1配管水	ディサービス配管掛け水	男湯	ディサービス個浴槽1配管水	ディサービス配管掛け水	男湯	ディサービス個浴槽1配管水	ディサービス配管掛け水	男湯	ディサービス個浴槽1配管水	ディサービス配管掛け水	男湯	ディサービス個浴槽1配管水	ディサービス配管掛け水	男湯	ディサービス個浴槽1配管水	ディサービス配管掛け水	男湯	ディサービス個浴槽1配管水	ディサービス配管掛け水	男湯
微生物検査	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20 (*L.p.* SG5)
	一般細菌数 (CFU/mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	13	<1	<1	<1	<1	<1	10	1	110	15
	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	<1	4	1	<1	2	21	16	13	12	1.5×10^4	1.4×10^4	1.1×10^4	2.5×10^4	2.5×10^4	1.0×10^4	9.2×10^3	8.4×10^3	6.8×10^3	120	180	220	76
	アメーバ数 (個/50mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	大腸菌群数 (CFU/mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
現場測定	モノクロラミン (mg/L)	3.86	3.91	4.01	3.70	3.78	7.52	3.85	3.21	4.39	2.95	3.01	3.39	2.80	3.02	3.51	2.80	2.39	3.36	-	-	-	-
	全塩素 (mg/L)	3.82	4.18	3.71	5.07	3.87	6.53	3.43	3.40	4.06	3.58	3.40	3.19	2.82	2.91	3.29	2.29	2.42	3.43	-	-	-	-
	遊離塩素 (mg/L)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.4	0.7	0.3	0.3
	遊離アンモニア (mg/L)	>0.55	-	-	-	>0.55	-	1.30	-	-	1.40	-	-	1.95	-	-	1.60	-	-	-	-	-	-
塩素濃度	モノクロラミン (mg/L)							3.3															<0.1
	ジクロラミン (mg/L)							0.45															0.25
	トリクロラミン (μg/L)							<15															<15
	遊離塩素 (mg/L)							<0.1															<0.1
		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	

−：検査せず

表2 モノクロラミン消毒実施中の循環式浴槽水からの従属栄養細菌検出状況

入浴施設名	浴槽名（循環系統毎）	従属栄養細菌数（CFU/mL）	菌種同定	配管洗浄濃度・時間	配管洗浄／換水から採水までの日数	泉質
K	露天風呂	2.2×10	*Staphylococcus epidermidis* *Rheinheimera sp.* *Rhodobacter sp.*	23mg/L 8 時間	4 日	ナトリウム・炭酸水素塩泉
	内風呂	8.0×10	*Staphylococcus epidermidis*	同上	同上	同上
H	内風呂（気泡発生装置付）	1.2×10^5	*Mycobacterium phlei*(2 株)	10mg/L 2 時間	7 日以内	マンガンイオン 1.1mg/L を含む地下水
	ひのき風呂	1.0×10^3	*Mycobacterium phlei*	同上	同上	同上
	男露天風呂	6.1×10^2	*Mycobacterium phlei*	同上	同上	同上
	女露天風呂	4.0×10	*Mycobacterium phlei*	同上	同上	同上
M	浴槽水	9.2×10^3	*Mycobacterium phlei*(2 株)	10mg/L 2 時間	4 日	人口温泉（炭酸カルシウム天然石入）
D	女シルク湯	2.4×10^3	*Mycobacterium phlei*	実施なし	64 日	ナトリウム・カルシウム塩化物泉

各施設のモノクロラミン注入店はろ過器前で、浴槽水の濃度は 3mg/L を保持

表3　K施設から分離された従属栄養細菌に対する各種薬剤の殺菌効力試験

薬剤	濃度	30分後		120分後	
		菌数	最終濃度	菌数	最終濃度
モノクロラミン	5 mg/L	＜10	4.7	＜10	4.5
	10 mg/L		9.3		9.3
	15 mg/L		14.0		13.5
	20 mg/L		18.3		18.2
	25 mg/L		22.5		22.3
	30 mg/L		28.0		26.9
遊離塩素	5 mg/L	＜10	2.0	＜10	2.0
	10 mg/L		8.0		8.0
	15 mg/L		12.0		12.0
	20 mg/L		15.0		15.0
	25 mg/L		20.0		20.0
	30 mg/L		24.0		24.0

薬剤名	濃度	30分後 菌数	120分後 菌数
過酸化水素	0.5%	＜10	＜10
	1.0%		
	1.5%		
	2.0%		
	2.5%		
	3.0%		
対照		2.0×10^5	5.6×10^5

表4　H施設から分離された従属栄養細菌に対する各種薬剤の殺菌効力試験

薬剤	濃度	30分後		120分後	
		菌数	最終濃度	菌数	最終濃度
モノクロラミン	5 mg/L	7.1×10^5	5.1	3.4×10^5	4.6
	10 mg/L	1.9×10^5	9.8	1.5×10^4	9.0
	15 mg/L	1.9×10^3	14.7	4.0×10	14.0
	20 mg/L	＜10	19.0	＜10	18.6
	25 mg/L		24.2		23.4
	30 mg/L		28.6		27.8
遊離塩素	5 mg/L	3.6×10^5	4.6	1.4×10^4	4.0
	10 mg/L	6.1×10^4	8.0	1.9×10^4	8.0
	15 mg/L	5.1×10^4	12.7	＜10	10.8
	20 mg/L	1.0×10^4	17.3		15.0
	25 mg/L	4.6×10^4	22.5		21.9
	30 mg/L	3.0×10^4	26.9		26.5

薬剤名	濃度	30分後 菌数	120分後 菌数
過酸化水素	0.5%	6.3×10^3	3.6×10^2
	1.0%	5.9×10^2	3.0×10
	1.5%	1.2×10^2	＜10
	2.0%	＜10	
	2.5%		
	3.0%		
対照		3.4×10^5	3.6×10^5

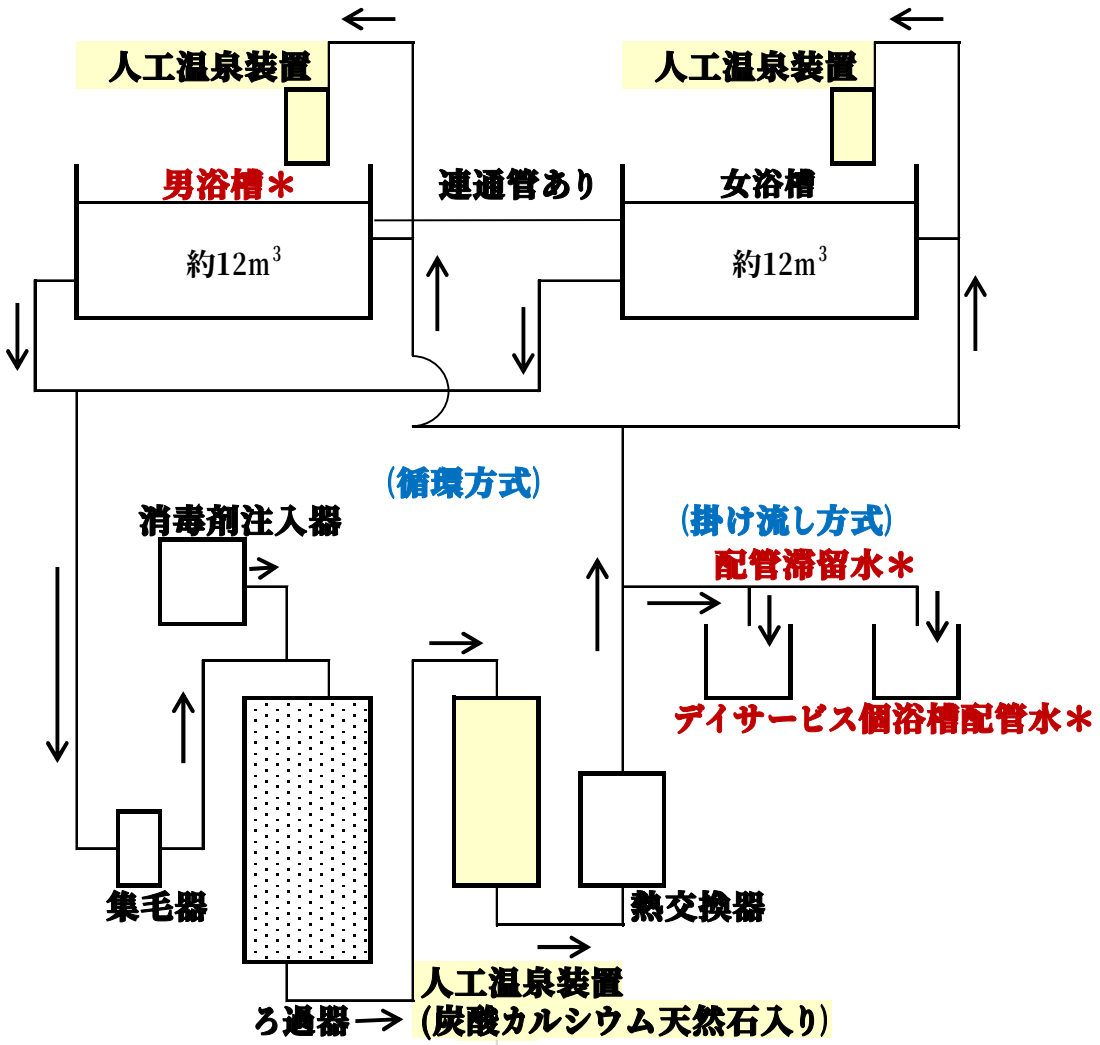


図1 社会福祉施設入浴設備の循環系統図

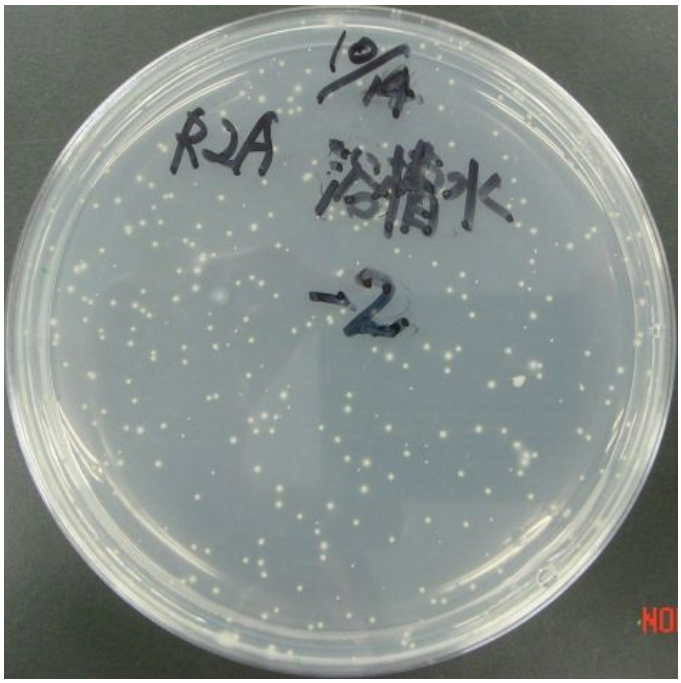


図 2　社会福祉施設の浴槽水から分離された従属栄養細菌
（R2A 寒天平板，37℃，7 日間培養）

平成 28 年度厚生労働科学研究 （健康安全・危機管理対策総合研究事業）
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
研究代表者　　前川　純子（国立感染症研究所　細菌第一部）

分担研究報告書
水泳プールのモノクロラミン消毒

研究分担者　泉山　信司　（国立感染症研究所　寄生動物部）
研究分担者　長岡　宏美　（静岡県環境衛生科学研究所　微生物部）
研究協力者　青木　信和　（ケイ・アイ化成株式会社　機能性薬品部）
研究協力者　市村　祐二　（ケイ・アイ化成株式会社　機能性薬品部）
研究協力者　江口　大介　（ケイ・アイ化成株式会社　機能性薬品部）
研究協力者　杉山　寛治　（株式会社マルマ　研究開発部）

研究要旨
入浴施設を原因としたレジオネラの集団感染が発生し、水泳プールの管理に倣って浴槽水に遊離塩素消毒が導入された過去の経緯があった。ところが温泉や井戸水で遊離塩素消毒の効果が得られない場合があり、追加の対策として結合塩素消毒（モノクロラミン消毒）を浴槽水に導入し、効果が得られている。モノクロラミン消毒の発展を目的に、水泳プールへの逆の応用として、水泳プールのモノクロラミン消毒を試みた。水温が 30℃程度の 270m³ の水泳プールにモノクロラミン消毒を適用した。1 週間の短期であったが、塩素濃度はほとんど減少せず、追加塩素は必要なかった。消毒管理に問題が生じることなく、レジオネラの発生もなかった。実際に泳いでみたが、いわゆる典型的な塩素臭（プール臭）がほとんどなかった。短期間に完全換水して消毒洗浄を行う、小規模なプールへのモノクロラミン消毒の応用が期待された。

A. 研究目的

入浴施設を原因としたレジオネラの集団感染が発生し、対策を目的に、水泳プールの管理に倣って浴槽水に遊離塩素消毒が導入された過去の経緯があった。ところが温泉や井戸水で遊離塩素消毒の効果が得られなかったり、不安定な場合があり、真面目に対策をしている施設であってもレジオネラ汚染に苦慮していると聞かれる。これに対して代替の対策方法として結合塩素消毒(モノクロラミン消毒)を浴槽水に導入し、レジオネラを消毒し不検出にする効果が得られている。多くの水道では遊離塩素消毒がなされているが、国内外の一部の水道では結合塩素消毒（モノクロラミン消毒）が利用されており、この消毒方法に着目して浴槽水への応用を進めている[1)]。

実際に本研究班では浴槽水でのモノクロラミン消毒とレジオネラ対策の発展を目的に、効果検証を続けている（長岡ら、本研究班 H28 年度分担研究報告書)。そこで本研究では、水泳プールへの逆の応用、水泳プールへのモノクロラミン消毒を試みた。水は有機物の汚染を受けると遊離塩素と反応して、臭気や、発がん性で知られているトリハロメタン等の消毒副生成物が生じる。すなわち、水泳利用に伴って常に有機物の汚染が続き、臭気やトリハロメタン等が生じ続けている。言い換えると、消毒効果を維持するには過剰量の遊離塩素消毒が必要で、塩素より少ない有機物がブレークポイント処理され続けている。

ところがモノクロラミン消毒の場合、有機物の汚染が続いても、臭気やトリハロメタン等がほとんど生じない利点がある。一般に水道水の塩素消毒と塩素臭は嫌われているが、水泳プールは消毒がなければ病原微生物による汚染を受けて、細菌ウイルスによる様々な水系感染症が生じうるので、臭気やトリハロメタンがあっても仕方なく遊離塩素消毒が許容されてきたのかもしれない。水泳プールでも安全性を維持しながら、臭気等を抑えることができれば、それに越したことはない。つまり、水泳プールにおけるモノクロラミン消毒は、遊離塩素消毒の代替法の一つになりえると考えられる。なお、PubMed や Google 検索で調べた範囲では、国内外で水泳プールのモノクロラミン消毒は実験的に行われた古い例しか見当たらなかった[2)]。

研究班では、これまで浴槽水の 10m³ 単位の水量に対するモノクロラミン消毒を行ってきたが、水泳プールは 100m³ 単位となる。単純なスケールアップは容易ではなく、想定外のことが生じるかもしれず、そのような大容量であっても安定した消毒が可能であるのかが当初の課題であった。

本研究の後に、入浴施設において判明したこととして、モノクロラミン消毒を数週間続けて水を交換しないと、多数の従属栄養細菌数が検出されるようになった（長岡ら）。大容量の水泳プールは水を交換しないので、従属栄養細菌数の増加が懸念された。雑菌の増加を回避するためには、定期的な洗浄と換水が欠かせないと考えられた。結果として、洗浄や換水が容易な小規模なプールであれば、モノクロラミン消毒の応用が可能と期待された。

B. 研究方法

水泳プールは、国立健康栄養研究所に設置の屋内プール、270m³ の 25m×4 コースで行った（図 1）。なおこの建物には、国立感染症研究所も入居している。当該プールは利用が無く廃止の予定であったことから、実験目的に借用できた。実験は 2014 年の 6 月に実施した。プール管理を止めると衛生状態が悪くなることから、利用はしていなかったが遊離塩素消毒を続けており、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。循環ポンプは機器に掲示されていた性能表示によると、1～2m³/min の吐出量の能力があり、135 分ないし 270 分で 270m³ の 1 回転に相当する計算であった。遊離塩素濃度の管理は、DPD 法による測定と次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加により行われ、利用がないことから通常よりも高い濃度で管理されていた。完全換水には十数万円（例えば 400 円/m³×270m³）の上下水道料を要すると予想され、経費負担の手続きが困難であったことから換水はせず、遊離塩素濃度が自然に下がってから同じ水でモノクロラミン消毒を行った。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。

モノクロラミン消毒には、クロラクター装置（ケイアイ化成）を用いた。これは水道水に次亜塩素酸ナトリウム溶液と硫酸アンモニウム溶液を加えて混合することによって、モノクロラミンの自動生成と添加をする装置で、プールサイドに設置した（図 2）。この装置は pH やポンプの動作を監視し、異常時には動作を停止する安全装置が内蔵されている。ポーラログラフ法による全塩素濃度の測定を行い、フィードバック制御により必要に応じて追加塩素を行い、全塩素濃度（モノクロラミン濃度）が維持される様に設定した。プールサイドからプール水を水流ポンプで全塩素計に送り、塩素濃度を連続監視した。注入するモノクロラミンは、プール全体に行き渡るように、プール底の吸引口に導入した。循環ポンプが作動中であれば、ろ過後の水は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。

上記の連続全塩素濃度計とは別に、手動で各種塩素濃度を測定した。モノクロラミンとアンモニア態窒素の濃度は、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）

を用いて測定した。遊離塩素濃度と全塩素濃度は、DPD 法によるポケット残留塩素計（HACH 社）を用いて測定した。

水温の測定は、水泳プール内に吊り下げられているアルコール式温度計を用いた。pH はガラス電極式 pH メーター（堀場）を用いた。濁度は、積分球光電光度法で測定した [3]。過マンガン酸カリウム消費量は、酸性法で測定した [4]。

微生物検査用の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た。試料は冷蔵にて搬送・保存した。レジオネラ属菌の定量は，浴槽水 500mL をメンブランフィルター法により 100 倍濃縮後，酸処理した後に GVPC 寒天培地に分離培養し，100mL あたりの CFU（Colony Forming Unit）を算出した [5]。また，レジオネラ属菌の増殖の場となる自由生活性アメーバ（大腸菌塗布無栄養寒天培地），および従属栄養細菌（R2A 寒天培地（ニッスイ））や一般細菌数（標準寒天培地（栄研化学））についても常法により定量した [6]。ただし，従属栄養細菌については 37℃で，7 日間培養した。

C. 研究結果および考察

遊離塩素濃度は、当初 3mg/L 程度と、通常の水泳プールより高めであった（図 3A）。塩素添加を止めてから 6 月 23 日までに徐々に濃度の減少が進み、この間に装置を設置して待機した。塩素濃度が 0.2mg/L を下回った 6 月 24 日にモノクロラミン消毒を開始した。装置の運転開始から 3 時間程度でモノクロラミンの濃度が 4mg/L に達し、プール水の混合が速やかであることを確認した（図 4）。モノクロラミン添加装置に最も近い位置で採水した場合の塩素濃度の立ち上がりが早く（図 4 の A 地点）、対角線上の最も遠い位置での濃度は遅れて上がって来た（図 4 の B 地点）。このグラフから見て、3 時間あれば濃度は均一になると考えられた。270m³ と水量が多かったが、塩素添加は 1〜2 時間程度と速やかに完了することができた。

モノクロラミン濃度は、6 月 24 日から 6 月 30 日まで徐々に減少したが、機器に設定した下限値 2mg/L に達しなかったので、追加塩素はされなかった（図 3B）。人の利用や、溢水や水の追加がないので、この 1 週間に 1mg/L 程度の自然な低下しかなく、モノクロラミン濃度は安定であった。この間に加温はしていなかったが、水温は約 30℃と安定していた。予想と異なり、モノクロラミン濃度より遊離塩素濃度の減少が遅かった。ただし、単純比較はできないことに後から気がついた。というのは、遊離塩素の管理の際は、ブルーシートで水面全面が覆われて、揮発や光が遮られていた。モノクロラミンでの管理の際は、ブルーシートを取り除き、揮発や光は遮られていなかった。

アンモニア態窒素は過剰量を維持し、トリクロラミンの発生の心配はなかった。モノクロラミン消毒に切り替える最中と、試験終了時に遊泳し、また、室内に時々入って臭気を確認した。モノクロラミン消毒中に、塩素臭（いわゆるプール臭）は特に感じなかった。pH はモノクロラミン消毒開始直後の 6 月 24 日に 7.5、終了直前の 6 月 30 日に 7.7 と、変動している様子はなかった。

遊離塩素消毒とモノクロラミン消毒のいずれにおいても、レジオネラ属菌、従属栄養細菌数、一般細菌数のいずれもが不検出であった（表 1）。通常、消毒効果がなければ水の雑菌は一晩でも多数になることから、消毒効果は十分にあったと考えられた。なお、濁度と過マンガン酸カリウム消費量は、遊泳プールの基準値未満と問題なかった。

以上の水泳プールとは別の研究である浴槽水のモノクロラミン消毒において、何週間か経過すると高い従属栄養細菌数の検出を経験した（長岡ら）。雑菌の増加は、雑菌を捕食する自由生活性アメーバの増加や、アメーバに感染するレジオネラ属菌の増加につながることから、好ましくない。週に 1 回、20mg/L 程度の高濃度モノクロラミン消毒を 12 時間程度行うと雑菌が検出されず、10mg/L の 2 時間では検出されることが現時点までに判明している。水泳プールの場合、週に 1 回の完全換水や洗浄は行われないので、従属栄養細菌数の増加が心配される。つまり、

週に 1 回の完全換水や洗浄をしない大型のプールにはモノクロラミン消毒の適用を考えず、換水消毒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。

D. 結論

水温が 30℃程度の 270m³の水泳プールにモノクロラミン消毒を適用した。1 週間の短期であったが、塩素濃度はほとんど減少せず、追加塩素は必要なかった。消毒管理に問題が生じることなく、レジオネラの発生もなかった。実際に泳いでみたが、いわゆる典型的な塩素臭、プール臭がほとんどなかった。短期間に完全換水と消毒洗浄が可能な小規模プールへのモノクロラミン消毒の応用が期待された。

E. 参考文献

1. 杉山寛治、小坂浩司、泉山信司、縣邦雄、遠藤卓郎、モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策、保健医療科学 2010 Vol.59 No.2 p.109－115
2. Chanlett ET, Gotaas HB. The Time Factor in the Chlorine and Chloramine Disinfection of Contaminated Swimming Pool Water. Am J Public Health Nations Health. 1942 Apr;32(4):355-64.
3. 日本水道協会：上水試験方法（理化学編）、pp.47～49、2011
4. 日本水道協会：上水試験方法（理化学編）、pp.117～119、2011
5. レジオネラ症防止指針作成委員会：レジオネラ症防止指針（第 3 版）、pp.28～36、2009、（財）ビル管理教育センター
6. 日本水道協会：上水試験方法（微生物編）、pp.43～51、2011

F. 研究発表

誌上発表

1. **杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 神田 隆, 久保田 明, 縣 邦雄, 小坂浩司, 前川純子, 遠藤卓郎, 倉 文明, 八木田健司, 泉山信司, モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策, 日本防菌防黴学会誌,** 2017 年 1 月受理

口頭発表

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

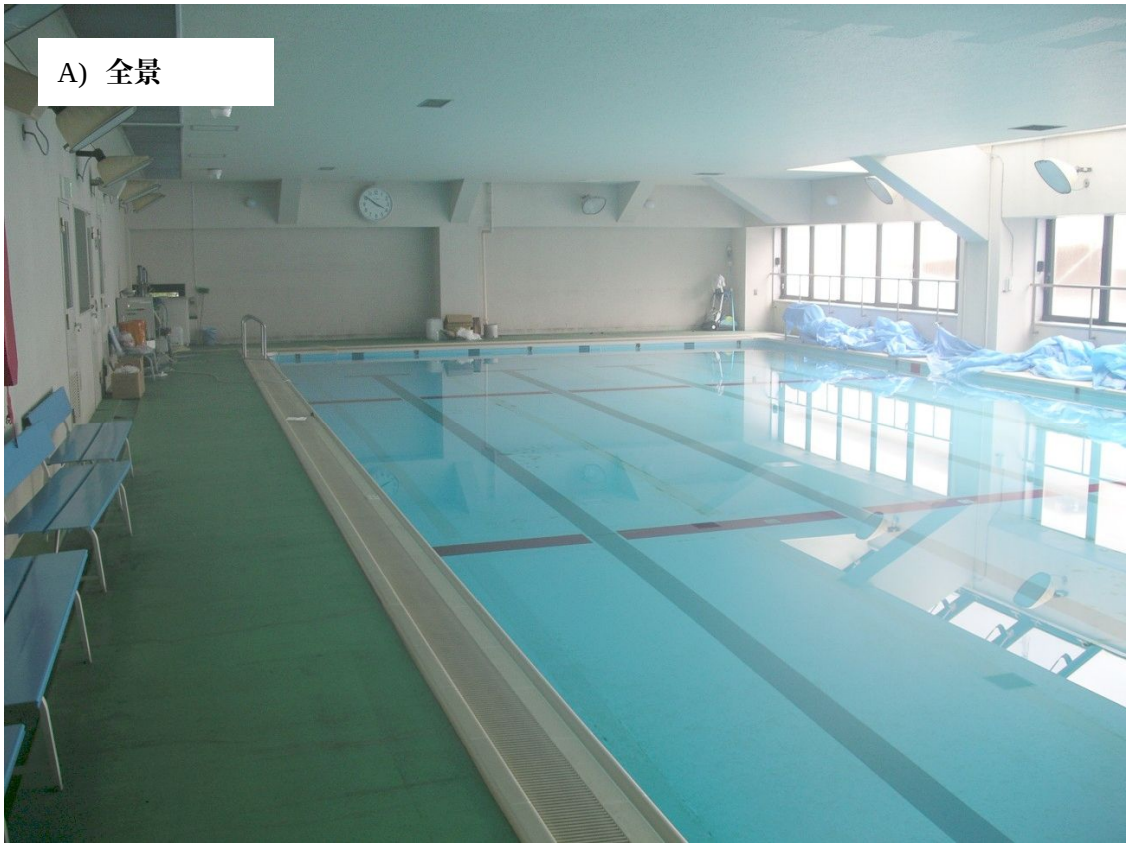
G. 知的所有権の取得状況

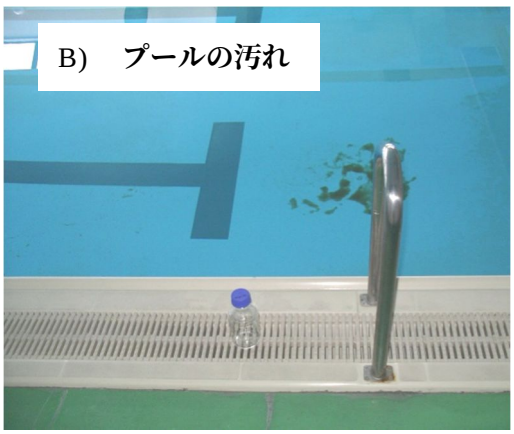
特許申請

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





C) 位置関係

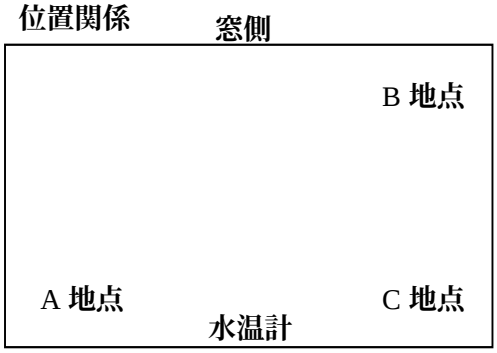


図 1　国立健康栄養研究所に設置の屋内プール

A) 全景：水量は 270m³ あり、大きさは 25m×4m（4 コース）×約 1.2m であった。**左奥に水道の流しがあり、その少し手前にモノクロラミン添加装置を設置した。写真左側プールサイドの丁度中央付近から、水中に水温計が設置されている。窓は西向きで、午後になると直射日光が入る。窓枠の下にブルーシートがあり、遊離塩素消毒の間はこのシートで水面を覆っていた。**B) **プールの汚れ：手すりの影になっているが、プールの底に汚れが見える。塩素濃度測定用の** 500mL **のガラスボトルが手前に写っている。**C) **位置関係：A 地点が塩素注入点、図 4 プロット A と全塩素計に対応する。B 地点が図 4 プロット B に対応する。C 地点が図** 1B **の汚れ、図** 3 **の遊離塩素濃度とモノクロラミン濃度、および表** 1 **の各種測定値の測定地点に対応する。**

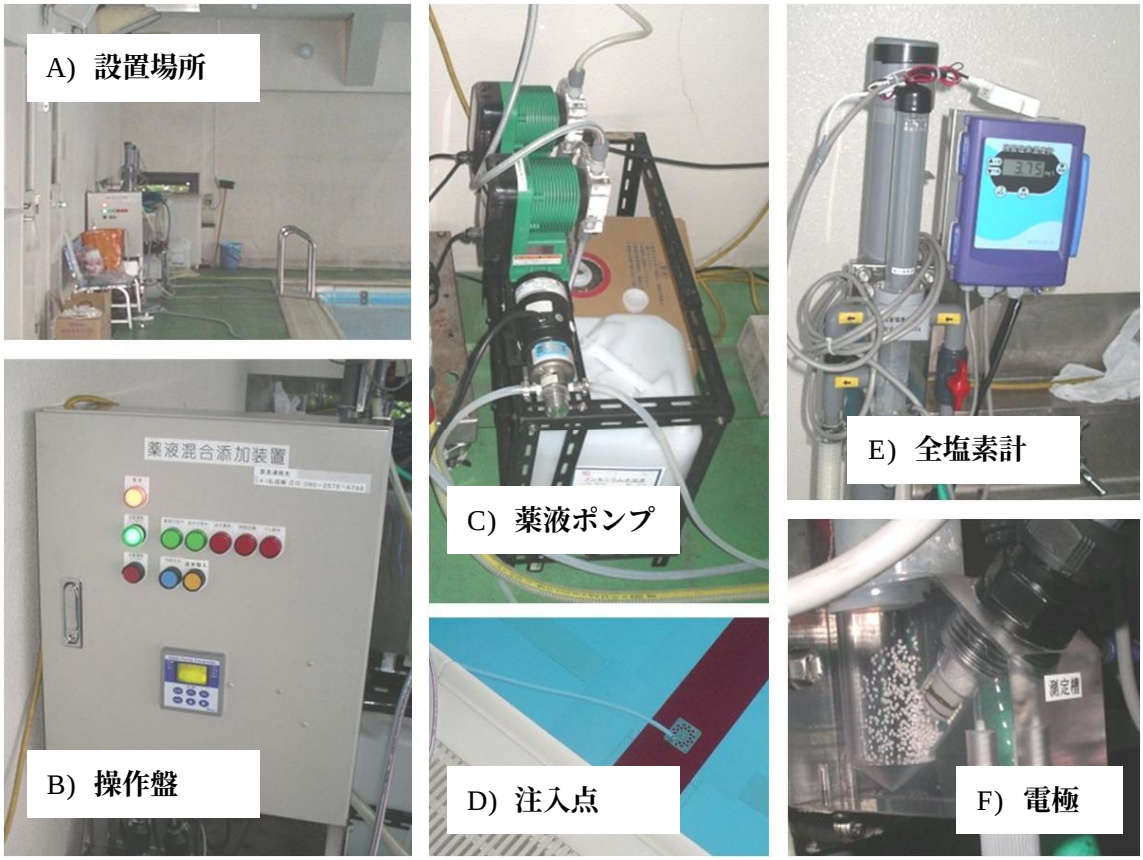


図 2　モノクロラミン生成添加装置

A) **設置場所：通常このような機器は機械室に設置するが、一時的な利用であったのでプールサイドに設置した。左奥にある水道水をモノクロラミンの生成と添加に用いた。ポンプを使って全塩素計にプール水を導入し、測定後の水はプールに返送した。**

B) **操作盤：複数台のポンプの連動動作させて、モノクロラミンを生成している。全塩素計からの信号に従って動作を設定した。**

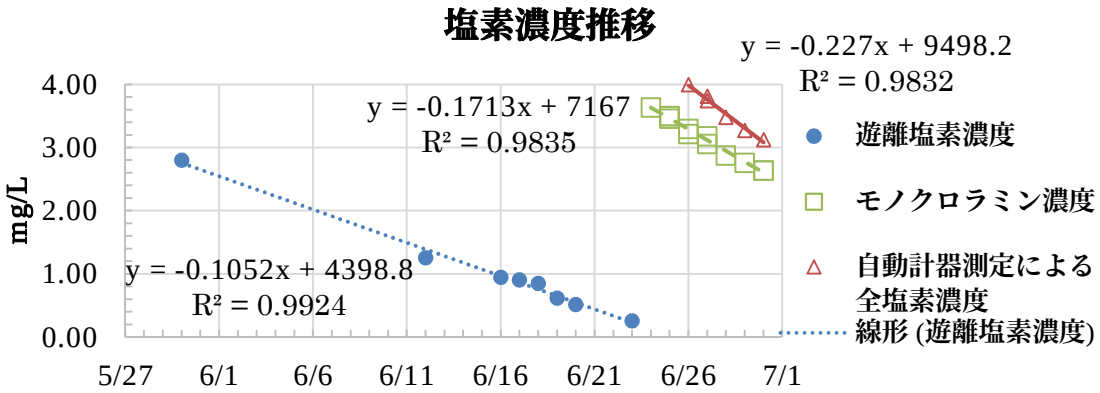
C) **薬液ポンプ：水道水に硫酸アンモニウム溶液と次亜塩素酸ナトリウム溶液を混合してモノクロラミンを生成した。**

D) **注入点：プール底にある循環の吸引口に生成したモノクロラミンを添加した。**

E) **全塩素計：全塩素濃度を測定し、フィードバック制御を設定した。**

F) **電極：ポーラログラフ電極は、スケールの付着を防ぐために、白く小さなプラスチック粒子が測定セル中に含まれており、これが水流によって動いて電極に衝突することで、電極を常時洗浄している。**

A) 遊離塩素濃度の推移



B) モノクロラミン濃度の推移

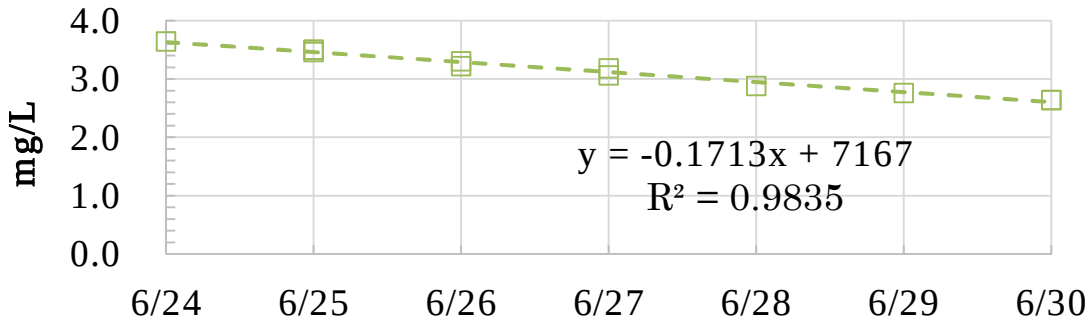


図 3　塩素濃度の推移

A) 遊離塩素濃度の推移：5 月末から遊離塩素濃度の監視を開始した。6 月中旬に塩素濃度がなくなることが予想されたことから、それまでに装置を設置し、遊離塩素濃度の低下を待って、モノクロラミン消毒に切り替えた。参考として、モノクロラミン濃度も同じグラフ上にプロットしてある。自動計器測定による全塩素濃度と、手測定によるモノクロラミン濃度は測定場所が異なり、測定値が若干離れている。

B) モノクロラミン濃度の推移： 6 月 24 日から 6 月 30 日までのモノクロラミン濃度、A のプロットの再掲

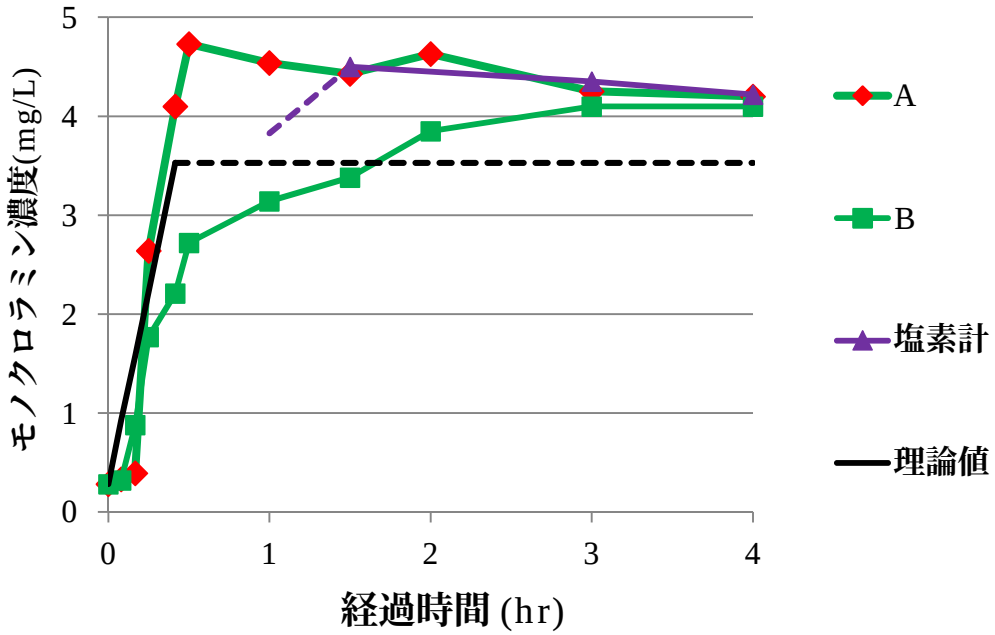


図 4　モノクロラミン消毒を開始した直後の濃度推移

3.5mg/L の濃度を目標に、モノクロラミンの添加を開始した。プロットの A は、添加装置近くから採水した値で、速やかに濃度が立ち上がった。プロット B は、装置から最も遠く離れた対角線上の位置から採水した値で、徐々に濃度が高まった。塩素計は 1 時間経過後に手動でキャリブレーション調整をしているので、それ以前の測定値は反映させていない。プロット A、B と図 3 のモノクロラミン濃度は測定方法が同じだが、測定地点、測定者、試薬ロットが異なり、若干の違いが生じている。

表 1　レジオネラ属菌等の検査結果

検体名	一般細菌* (CFU/mL)	従属栄養細菌** (CFU/mL)	レジオネラ属菌 (CFU/100mL)	濁度 (度)	過マンガン酸カリウム消費量 (mg/L)
6月18日採水 (遊離塩素管理時)	＜10	＜10	＜10	＜0.2	1.1
6月30日採水 (モノクロラミン管理時)	＜10	＜10	＜10	＜0.2	2.9
遊泳用プールの水質基準	＜200	-	(＜10)***	＜2	＜12

*一般細菌：35℃, 2日培養.　**従属栄養細菌：35℃, 7日培養.

***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準ずる.

平成 28–30 年度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
「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」
平成 28 年度分担研究報告書

「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」

○	研究分担者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
	研究分担者	泉山信司	国立感染症研究所
	研究協力者	縣　邦雄	アクアス株式会社
	研究協力者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所

研究要旨

入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染の実態を明らかにし、汚染予防対策を確立することを目的として調査を行った。神奈川県内の 1 入浴施設において、カラン・シャワーにレジオネラ属菌による汚染があり、段階的に対策を実施し、その効果を検証した。カラン・シャワーの営業前の流水とシャワーヘッドの消毒ではレジオネラ属菌の汚染を取り除くことはできなかった。続いてカランおよびシャワーの交換を行ったが、検査によりレジオネラ属菌が検出された。さらに、高置貯湯槽とカラン・シャワー及びその間の配管に高濃度塩素消毒を施したところ、レジオネラ属菌は培養にて検出されなくなった。医療機関については、これまでの調査により給水系がレジオネラ属菌に汚染されていることが明らかとなっている。そこで、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。その結果、今年度の調査では関連性を明らかにすることはできなかった。

A. 研究目的

本調査は、入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染を調査し、汚染予防対策ならびに感染症予防対策を策定するための基礎的情報を得ることを目的として実施した。調査の対象は入浴施設ならびに医療機関の給水・給湯設備とした。

B. 研究方法

１）試料の採取

調査の対象は、神奈川県内の 1 入浴施設、3 医療機関とし、医療機関との比較対象と

して 1 研究機関を加えた。調査の試料は水試料とした。

入浴施設では浴槽水、湯口水、蛇口水、シャワー水を水試料として採取した。医療機関及び研究機関では、洗面台の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。レジオネラ属菌及び従属栄養細菌用水試料は、25%チオ硫酸ナトリウム 1.0ml を添加した滅菌容器に 500ml を採取した。シャワーや蛇口からの水は放水直後に採取した。水試料は温度を採取時に、pH を実験室に搬入時にガラス電極法で測定した。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりハンディ水質計“アクアブ”AQ-101 型（柴田科学）を用いて実験室に搬入時に測定した。各試料は冷蔵にて実験室に搬送し、搬入当日に実施する検査まで冷蔵保存した。

２）理化学項目の測定

水質とレジオネラ汚染の関連性を解析するために、医療機関及び建築物の蛇口水と受水槽から採取した水試料を対象に、以下の理化学項目を常法により測定した。

全有機炭素（TOC）：湿式酸化法

アンモニア態窒素：グルタミン酸脱水素酵素法

塩化物イオン:アミラーゼ酵素法

カルシウムイオン: フレーム原子吸光法（JISK 0101-15.2.2）

マグネシウムイオン: フレーム原子吸光法（JISK 0101-15.3.2）

鉄: フレーム原子吸光法（JISK0101-60.2）

マンガン: フレーム原子吸光法（JISK0101-58.2）

亜鉛: フレーム原子吸光法（JISK0101-52.1）

銅：フレーム原子吸光法（JISK0101-51.2）

ニッケル:ICP 発光分光分析法（JISK0101-54.3）

３）*Legionella* 属菌の分離

試料は直径 47mm、孔径 0.2μm のポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、5ml の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した。試料の浮遊液は 0.5ml を 50℃、20 分の加熱処理を行った。別の 0.5ml に同量の pH2.2 緩衝液を加え、4 分間酸処理した。未処理の試料及び処理後の浮遊液を 50 倍希釈 PBS で 10 倍段階希釈し、原液と 10 倍および 100 倍希釈液の各 100μl を MWY 寒天平板培地（Oxoid）及び GVPC 寒天平板培地（日水製薬）に塗抹し、36℃で 7 日間培養した。*Legionella* 属菌を疑う集落を BCYEα 寒天平板培地（Oxoid）に転培し、性状により鑑別を行った。

４）LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出

LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E（栄研化学）により行った。メンブランフィルターでろ過濃縮後、5ml の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した試料に対して、キット添付の説明書に従って実施した。

５）*Legionella* 属菌の同定

調査試料から分離された *Legionella* 属菌は、LEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene)および *Lmip* (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene)のプライマーを用いた PCR により *Legionella* 属菌と *L. pneumophila* であることを決定した [1, 2]。さらに、型別用血清（デンカ生研）より種の

鑑別を行った。

５）従属栄養細菌数

医療機関から採取した水試料を 50 倍希釈 PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の試料の 1.0ml を R2A 寒天培地（BD）に接種し、混釈培養法により 25℃で 7 日間培養した。培養後、集落数を計数した。

６）給水系への次亜塩素酸ナトリウム添加実験

医療機関における給水系のレジオネラ汚染対策として、給水系に次亜塩素酸ナトリウムを添加し、レジオネラ汚染への効果を検証した。調査対象医療機関の受水槽に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置した。添加量は水道水使用量から計算し、受水槽に一定量の次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し、受水槽での遊離残留塩素濃度が 0.5mg/L となるようにした。

C. 結果及び考察

１）入浴施設

平成 27 年度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「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」において、3 か所の入浴施設におけるレジオネラ属菌による汚染状況調査を実施したところ、１か所の入浴施設においてカランとシャワーがレジオネラ属菌に汚染されていることが明らかになった。表１では 2015 年 11 月 17 日の結果として示した。この結果を受けて当該施設では、まず対策として①毎日、カランとシャワーの営業前の流水と定期的なシャワーヘッドの塩素による消毒を行った。この対策の効果を調べるために、2016 年 3 月 17 日にレジオネラ検査を実施した。その結果、2015 年 11 月 17 日と同様にカランとシャワーからレジオネラ属菌が検出された。そこで、施設では②カランとシャワーの新品の交換を合わせて実施した。2016 年 7 月 26 日に再度レジオネラ検査を行ったところ、レジオネラ属菌の除去はできていなかった。そこで、施設ではさらに③高置水槽からカランとシャワーまでの配管の高濃度塩素による消毒を 2016 年 11 月 25 日に専門業者に依頼して実施した。2016 年 11 月 26 日にレジオネラ検査を実施したところ、レジオネラ属菌は検出されなかった（表 1）。

当該施設は、源泉からの原湯を地下の貯湯槽に受け、高置水槽に上げて、そこからカランやシャワーに配水するとともに、循環装置の設置された浴槽水の補充に用いている。原湯は約 60℃あり、カランとシャワーでは原湯と水道水を混合して温度を調整している。水道水は公共水道で、塩素濃度は 0.5mg/L で供給されている。高置貯湯槽からカラン・シャワーまでを消毒したことでレジオネラ属菌が検出されなかった。これにより高置水槽からカラン・シャワーの間にレジオネラ汚染があったことが推測された。夜間や休日に高置貯湯槽とその先の配管中の温度が低下し、それによりレジオネラ属菌が増殖したと推測された。

継続的にレジオネラ属菌の汚染を確認するために、2016 年 11 月 25 日の消毒から 3 か月が経過した 2017 年 2 月 28 日にレジオネラ検査を実施した。

２）医療機関

(1) 理化学項目とレジオネラ汚染の関連性

3 医療機関と 1 研究機関の給水系・給湯系の状況を表 2 に示した。医療機関 A で使用している水道水の原水は井水で、その他の機関で使用している水道水の原水は表流水であった。医療機関 C では水道水に加え、井水を RO 処理して水道水に加えて利用していた。医療機関 A 及び研究機関 D は独自の塩素添加は行っていなかった。医療機関 B 及び C は独自に塩素添加装置を設置し、給水系の残留塩素濃度を 0.5 及び 0.8mg/L に設定していた。3 医療機関の受水槽の容量は 180～290m^3 あった。給湯方式は医療機関 A 及び B は集中方式を採用し、医療機関 C と研究機関 D は複数の建物があり、局所方式と集中方式の両方を採用していた。

各機関の給水系の理化学項目の測定結果をレジオネラ検査の結果を合わせて表 3 に示した。医療機関 A では、後述のように次亜塩素酸ナトリウムの給水系への添加実験を行ったが、理化学項目の測定は添加実験開始前に実施した。3 医療機関の給水系からレジオネラ属菌が検出されているが、検出菌種は異なっていた。研究機関からはレジオネラ属菌は検出されなかった。レジオネラ汚染の有無あるいはその頻度の差と関連すると考えられる項目は、塩素濃度以外には明らかとならなかった。今後、さらに検討を重ねる必要があると考えられる。

(2) 給水系のレジオネラ汚染に対する次亜塩素酸ナトリウムの添加効果

2016 年 12 月 14 日から、医療機関 A の受水槽への次亜塩素酸ナトリウムの添加を開始した。受水槽での遊離残留塩素濃度は、0.6～0.8mg/L で推移した。末端の蛇口での遊離残留塩素濃度は、0.2～0.4mg/L であった。5 か所の末端の蛇口での初流水の遊離残留塩素濃度を日を変えて 2 回測定したところ、初流水でも 0.1～0.4mg/L（平均 0.26 及び 0.28mg/L）であった。

次亜塩素酸ナトリウム添加前の 2016 年 10 月 6 日に 6 か所の蛇口から採取した水試料では、遊離残留塩素濃度は 0.1mg/L 以下（平均 0.07mg/L）で、3 か所からレジオネラ属菌が検出された。次亜塩素酸ナトリウム添加を開始し、その効果を判定するための検査は、安定した濃度が継続したと考えられる、開始から 2 か月後の 2017 年 2 月 21 日に実施した。受水槽から採取した 1 水試料及び初流水を採取した 5 水試料では、遊離残留塩素濃度は 0.1～0.4mg/L（平均 0.25mg/L）であった。

当該医療機関は、給湯系は集中方式を採用しており、60℃で供給されていた。混合栓の蛇口（4 か所）では、給水系と給湯系から別々に水試料を採取し、給湯系の遊離残留塩素濃度は 0.05～0.1mg/L（平均 0.09mg/L）であった。

次亜塩素酸ナトリウムの給水系への添加開始後のレジオネラ属菌汚染への効果を検証するために、水試料を採取し、現在調査を進めている。

D. 結論

入浴施設のカラン・シャワーから採取した水試料のレジオネラ属菌による汚染は、高置貯湯槽からカラン・シャワー間でのレジオネラ属菌の増殖が原因であると推測された。塩素消毒後のレジオネラ属菌の再増殖を継続して観察することとしている。

医療機関のレジオネラ属菌による汚染と、

医療機関の給水・給湯系の状況との関連性は明らかにならなかった。また、給水系の理化学項目の測定結果とレジオネラ属菌汚染との関連性も、明らかにならなかった。今後、対象とする医療機関を増やし、レジオネラ属菌汚染と関連する要因を明らかにすることが、予防対策を策定するうえで重要であると考えられる。

E. 文献

1. 山本啓之: PCR 法による *Legionella* 属細菌の検出・同定. 日本臨床, 50 特別号: 394-399, 1992.

2. Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, and Atlas RM：Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular Probes, 4: 175-187, 1990.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1　入浴施設の *Legionella* 属汚染調査

検体	採取日											
	2015年11月17日			2016年3月17日			2016月7月26日			2016年11月26日		
	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数
浴室A 内湯湯口	＋	－		＋	*L. pneumophila* SG1	30	－	－		＋	－	
浴室A シャワー	－	－		＋	－		－	*L. pneumophila* SG9	10	＋	－	
浴室A カラン1	＋	*L. pneumophila* SG9	530	＋	*L. pneumophila* SG1, SG6, SG9	100	＋	*L. pneumophila* SG6, SG9	40	＋	－	
浴室A カラン2	＋	*L. pneumophila* SG1	110	＋	*L. pneumophila* SG9	120	－	*L. pneumophila* SG9	20	＋	－	
浴室B 内湯湯口	＋	－		－	－		－	－		＋	－	
浴室B カラン1	＋	*L. pneumophila* SG9	80	＋	*L. pneumophila* SG9	10	＋	*Legionella* sp.	100	＋	－	
浴室B カラン2	＋	*L. pneumophila* SG1	690	＋	*L. pneumophila* SG1	120	－	*Legionella* sp.	20	－	－	
浴室B シャワー	＋	*Legionella* sp., *L. pneumophila* SG1	60	ND	ND		－	－		＋	－	

菌数：CFU/100ml　　SG：血清群　　ND：実施せず

2015年12月以降、毎日、カランとシャワーの営業前の流水と定期的なシャワーヘッドの塩素による消毒

2016年3月17日以降、カランとシャワーの新品の交換

2016年11月25日に専門業者による高置水槽からカランとシャワーまでの配管の高濃度塩素による消毒

表２　各機関における給水系及び給湯系の状況

機関	A	B	C	D
配管の材質				
給水	硬質塩化ﾋﾞﾆﾙﾗｲﾆﾝｸﾞ鋼管(VA) 埋設部（HIVP)	水道用内外面硬質塩化ﾋﾞﾆﾙﾗｲﾆﾝｸﾞ鋼管 水道用硬質塩化ﾋﾞﾆﾙﾗｲﾆﾝｸﾞ鋼管	ﾋﾞﾆﾙﾗｲﾆﾝｸﾞ鋼管(SGP-VA)	塩化ﾋﾞﾆﾙﾗｲﾆﾝｸﾞ鋼管(VLP) 水道用硬質塩化ﾋﾞﾆﾙﾗｲﾆﾝｸﾞ鋼管(SGP-VA)
給湯	耐熱性硬質塩化ﾋﾞﾆﾙﾗｲﾆﾝｸﾞ鋼管（HTLP)	屋内配管用ｽﾃﾝﾚｽ鋼管 ﾎﾟﾘﾌﾞﾃﾞﾝ管	銅管	耐熱性硬質塩化ﾋﾞﾆﾙﾗｲﾆﾝｸﾞ鋼管
塩素の添加	なし	あり	あり	なし
受水槽の容量(m^3)	250	291	180	5, 58
高置水槽の容量(m^3)	18.75×2	33, 17	なし	1.5, なし
貯湯槽の容量(m^3)	4.5×2, 1.5×2	6.0	5.0×2	なし, 1.2×2
水道原水の種類	井水	表流水	表流水	表流水
井水使用の有無	―	なし	あり	なし
給湯方式	集中	集中	局所、集中	局所、集中
温度				
往き（℃）	60	60	60	60
返り（℃）	55	55	55	55

機関Ｄは２棟

配管の材質は各協力機関からの回答をそのまま掲載した

表３　医療機関等の給水系における *Legionella* 属汚染と理化学項目及び従属栄養細菌数

機関名	A		B		C		D	
検体数	6		6		6		6	
レジオネラ属菌								
検出(%)	3 (50.0)		4 (66.7)		1 (16.7)		0	
検出菌種	*L. pneumophila* SG5, *L. anisa*, *Legionella* sp.		*L. micdadei*, *L. feeleii* SG2, *Legionella* sp.		*L. pneumophila* SG1			
菌数 (CFU/100ml)	20, 920, 2160		200,200,300,2900		20			
	平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲
温度(℃)	27.6	21.2-39.7	28.3	19-37.3	22.6	21.1-25.1	23.6	21.7-26.5
pH	7.8	7.7-7.8	7.4	7.4-7.5	7.2	7.0-7.2	7.4	7.3-7.6
TOC(mg/L)	0.07	<0.3-0.4	0.45	0.4-0.5	0.9	0.6-1.2	<0.3	<0.3
NH_4^+ (mg/L)	<0.1	<0.1	0.03	<0.1-0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Ca^{2+} (mg/L)	19.2	19.0-20.0	20	18.0-25.0	4.2	4.0-5.0	16.2	15.0-17.0
Mg^{2+} (mg/L)	6.0	6.0	7.0	7.0	1.0	1.0	4.0	4.0
Cl^-(mg/L)	4.3	4.0-5.0	9.0	9.0	1.8	1.0-2.0	7.2	7.0-8.0
Fe (mg/L)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.01	<0.05-0.06	<0.05	<0.05
Mn (mg/L)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Zn (mg/L)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.04	<0.05-0.18
Cu (mg/L)	<0.05	<0.05	0.01	0.05-0.06	0.01	<0.05-0.05	0.04	<0.05-0.25
Ni (mg/L)	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
遊離残留塩素(mg/L)	0.07	0.02-0.1	0.15	0.03-0.4	0.83	0.68-0.87	0.38	0.03-0.57
HPC(CFU/ml)	41	11-143	5253.4	125-20000	1.2	0-3.0	13.2	0-79400

TOC：総有機炭素、HPC：従属栄養細菌

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）
研究報告書
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

感染源解明のための環境調査

研究分担者　磯部　順子　富山県衛生研究所
研究協力者　金谷　潤一　富山県衛生研究所
研究協力者　小澤　賢介　デンカ生研株式会社

研究要旨　本研究では，浴槽水，シャワー水および市中河川水における *Legionella* 属菌の汚染状況調査と，感染源となり得る環境検体周辺の空気中の *Legionella* 属菌の棲息状況について，直接平板培養法だけでなく，アメーバ共培養法も併用して調査した．また，患者検体から最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群 1（以下 Lp1）を環境検体から効率よく検出するため，抗 Lp1 抗体で感作した免疫磁気ビーズ（LP1 IMB）を用いて Lp1 を選択的に濃縮する方法について検討した．

Legionella 属菌の検出率は，浴槽水で 8/40 検体（20.0%），シャワー水で 10/29 検体（34.5%）であった．アメーバ共培養法による分離結果は，浴槽水，シャワー水あわせた 69 検体中 10 検体（14.5%）で，平板培養法の 18 検体（26.1%）に比べ，アメーバ共培養法で低かった．河川水からは 3/4 回の調査で *Legionella* 属菌が分離され，その検出率は浴槽水やシャワー水より高かった．エアロゾルの調査については，道路沿い 99 検体，浴室内 16 検体から，直接培養法およびアメーバ共培養法において *Legionella* 属菌は分離されなかった．しかしながら，遺伝子検査法では道路沿い検体で 69.7%（69/99 検体），浴室内検体で 75.0%（12/16 検体）から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された．その 16S rRNA 遺伝子のコピー数（copies/m^3）は，道路沿い検体で 60.6，浴室内検体で 71.0 であった．降水量が 10 mm 以上の日で遺伝子量が多い傾向であった（t 検定 = 0.073）．Lp1 IMB を用いた Lp1 の選択的濃縮については，Lp1 の回収率が 25.0～50.0%であったのに対し，Lp6，Lp5 では 7.1%，9.6%，*L. bozemanii* や *L. cherii*，*L. anisa* については，0.0～0.01%と，Lp1 で高かった．また，直接平板培養法で Lp1 が分離されなかった実際の浴槽水検体から，IMB 法で Lp1 を分離することができた．

以上の結果から，道路沿いのエアロゾルは浴室内のそれと同様のリスクを含むことを示したものと考える．今後，条件を変えながら検討することで，レジオネラ症の罹患のリスクの一端が明らかになるものと期待できる．一方，Lp1 IMB 法については，Lp1 の選択的濃縮に有用であることが示された．雑菌を除去する工程を加えるなど，検出感度をあげることができれば，感染源の特定に有用な方法となることが期待される．

A．研究目的

レジオネラ症は，感染症発生動向調査によると，平成 27 年の全国での届出数が 1,587 件と，統計を取り始めた 2000 年からの 16 年間でもっとも多かった．本疾患は 2003 年の尿中抗原検査の保険適用により全国的に届出数が増加傾向を示し始めたが，それから既に 10 年以上が経過した現在でも増加傾向は続いている[1)]．一方，富山県におけるレジオネラ症の発生状況は全国と同様の傾向であるだけでなく，その罹患率は全国の中でもっとも高い状況が続いている[1)]．そして，本疾患の感染源は，富山県でも，全国でも特定された事例は多くはない．

そこで，レジオネラ症の発生を予防するため，感染源を明らかにすることを目的として，富山県の公衆浴場の浴槽水とシャワー水，河川水中の *Legionella* 属菌の棲息状況を調査した．今年度はアメーバ共培養法についても検討した．また，これまでの調査で *Legionella* 属菌が検出された環境検体からの感染様式を明らかにするため，検体採取近辺で空気中に浮遊する *Legionella* 属菌を調査した．一方，患者検体から最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群 1（以下 Lp1）を環境検体から効率よく検出するため，抗 Lp1 抗体で感作した免疫磁気ビーズ（IMB）を用いて選択的濃縮法による Lp1 の分離について検討した．

B．研究方法

1．感染源調査（浴槽水・シャワー水・河川水）

①検体

調査対象は，公衆浴場の浴槽水，シャワー水および河川水とした．浴槽水とシャワー水については，対象施設の選定と採水を厚生センター職員に依頼した．河川水については，富山市の街の中心部を流れる 4 河川を対象とした．

②調査期間と試料

浴槽水とシャワー水の試料は，平成 28 年 9 月～12 月に 11 施設で採取された 40 検体および 29 検体である．シャワー水については，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．河川水の試料は，富山市内を流れる 4 河川 5 地点（図１）で 5，6，9，10 月に採取した 20 検体である．

③*Legionella* 属菌の分離

Legionella 属菌の分離は，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）「公衆浴場等における *Legionella* 属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」の精度管理ワーキンググループが推奨する浴用水の方法[2)]に準じて行なった．

濃縮方法：浴用水 1,200 ml，シャワー水 500 ml，河川水 1,000 ml は，メンブランフィルター（直径 47 mm，0.2 μm，ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE）で吸引ろ過し，フィルターを 100 倍濃縮量となる滅菌蒸留水で１分間ボルテックスしたものを試料とした．

培養法：浴槽水，シャワー水は濃縮，非濃縮検体いずれについても，未処理，酸処理（0.2M KCl-HCl，pH2.2 で等量混合後 5 分間静置），加熱処理（50℃20 分アルミバスで加熱）を行い，その 100 μl を GVPC 培地（日水製薬）にコンラージ棒で広げて 35℃で培養した．ただし，酸処理検体は，200 μl

について同様に培養した. また, 濃縮液 1 ml に PYGC 培地で 30℃１週間培養したアメーバ増菌液（古畑らの報告 [3]）を添加し, 35℃で１か月培養した（アメーバ共培養法）. 培養液を酸処理液（0.2M KCl-HCl, pH2.2）と等量混合後, 室温で 15 分静置した. 混合液 200 µl を GVPC 培地にコンラージ棒で広げて, 35℃で 7 日間培養した. 河川水は, 濃縮検体 5 ml について, 上記に示したアメーバ共培養法を実施した.

④分離された *Legionella* 属菌の同定

同定は, 平板に発育した *Legionella* 属菌様のコロニーについて, 森本の報告 [4] した斜光法で特異的な形態を観察し, 血液寒天培地と BCYE-α 培地（ビオメリュー）に移植し, システインの要求性を確認した. 次に, BCYE-α 培地にのみ発育したコロニーについて, レジオネララテックステスト（OXIDO）とレジオネラ免疫血清（デンカ生研）により血清群を決定した.

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

２．エアロゾル調査

主に雨天の日の道路沿い 99 検体および浴用施設の浴室内 16 検体について, エアーサンプラ（コリオリスµ）を用いてエアロゾルを捕集した. 道路沿いのエアロゾルについては, 6 月～11 月にかけて, 県内 12 地点で捕集した. 浴室内のエアロゾルについては, 10 月～12 月にかけて 12 施設で捕集した. なお, 12 検体は 9 施設のミスト発生装置（稼働中）周辺の浴槽水付近で捕集した. 15 ml の溶液（0.005% Tween 80 液）中に 300 l/min の条件で 10 分間捕集した.

遺伝子検査法は, 捕集液 2 ml を用いて行った. 15,000 rpm で 5 分間遠心後の沈殿に 100 µl のキレックス溶液を添加し, 100℃で 10 分加熱後, 遠心上清を DNA 溶液とした. 定量 PCR は, Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を用いた.

直接培養法による検査は, 捕集液 100 µl を GVPC 培地（日水製薬）にコンラージ棒で広げて, 35℃で 7 日間培養した.

アメーバ共培養法による検査は, 浴用水・シャワー水・河川水と同様に行った.

３．免疫磁気ビーズによる Lp1 の選択的濃縮法の検討

①免疫磁気ビーズ作製方法

Lp1 IMB はデンカ生研で作製した. Lp1 以外の血清群に対する交差反応を吸収後, 硫安分画にて粗精製し, 至適感作濃度（ビーズに結合しやすい抗体の濃度）とした抗体を磁気ビーズに感作し, Lp1 免疫磁気ビーズ（Lp1 IMB）とした.

②使用菌株と菌懸濁液作製法

菌株は表１に示した. これらの菌を滅菌生理食塩水にてマックファーランド 2.0 に調整し, その－5 乗もしくは－6 乗まで 10 倍段階希釈し, 検体とした. 菌懸濁液 100 µl を BCYE-α 培地（ビオメリュー）にコンラージ棒で拡げ, 35℃で 7 日間培養し, 菌数を測定した.

③IMB による Lp1 濃縮法

浴槽水検体もしくは菌懸濁液 1 ml に IMB 1 滴（およそ 25 µl）を滴下し, 10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸着させた.

ビーズを磁石で集め，滅菌生理食塩水で洗浄した．この操作（洗浄）を 2 回実施した後，最終的に生食 100 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 BCYE-α 培地，GVPC 培地のどちらか１枚もしくは両方にコンラージ棒で拡げ，35℃で 7 日間培養した.

④IMB の性能試験

－5 乗, －6 乗希釈したレジオネラ菌懸濁液 1 ml を③の方法で濃縮分離した（単一血清群での回収率）．また，*L. pneumophila* の 2 血清群または *L. pneumophila* と他の菌種の懸濁液をそれぞれ 1：1, あるいは 1：9 に混合したものを検体とし，③の方法で Lp1 を濃縮分離した(混合血清群での回収率). 分離平板に発育した菌数を数え，②で求めた推定菌数に対する回収率を比較した. 菌数が多い場合には 12～24 個のコロニーについて，レジオネラ免疫抗血清を用いて血清群別を行い，その比率から発育菌数を求めた．また，平板上で蛍光を発する菌については蛍光を指標として菌数を区別して数えた.

⑤Lp1 IMB による浴槽水からの Lp1 検出

浴槽水検体を用いて，③に従い，Lp1 の分離を試みた.

（倫理面への配慮）

本研究は，研究機関内外の倫理委員会等における承認手続きが必要となる研究には該当しない.

C．研究結果

１. 浴槽水・シャワー水における *Legionella* 属菌検出状況

浴槽水及びシャワー水から検出された *Legionella* 属菌の菌数および菌種（血清群）を表 2 に示した．*Legionella* 属菌が検出されたのは，浴槽水で 4/11 施設（36.4%）から 8/40 検体（20.0%），シャワー水で 5/11 施設（45.5%）から 10/29 検体（34.5%）であった．*Legionella* 属菌数が 1,000 CFU/100 ml を越えたものは浴槽水 2 検体で，いずれも塩素注入されていない施設であった．*Legionella* 属菌が分離されたシャワー水の水質は 8 検体（80%）が井戸水であった．その菌数が最も多かったのは温泉水を利用し，遊離残留塩素濃度（以下残塩濃度：mg/l）が 0.2 以下のシャワー水であった．浴槽水から分離された *Legionella* 属菌で最も多かったのは Lp6，次いで Lp1 であった．シャワー水で最も多かったのは Lp5 と Lp15 であった.

次に，今年度実施したアメーバ共培養法による *Legionella* 属菌の分離結果について，通常の直接平板培養法と比較した結果を表 3 ①～③に示した．*Legionella* 属菌の検出率（表 3①）は，69 検体中，平板培養法で 18 検体（26.1%），アメーバ共培養法で 10 検体（14.5%）と平板培養法で高かった．*L. pneumophila* では，アメーバ共培養法でのみ検出された血清群は認められなかった（表 3②）．これ等の結果について表 3③で相関を見ると，平板培養法で *Legionella* 属菌のみ分離された検体が 10 件で，アメーバ共培養のみ陽性となった 2 検体はどちらもシャワー水で，分離されたのは Lp6 と UT であった.

河川水における *Legionella* 属菌の月別の検出率と分離された菌を表 4 に示す．6 月を除き，*Legionella* 属菌が検出され，その

検出率は浴槽水やシャワー水よりも高かった．データは示していないが，地点 1 で検出率（3/4 検体，75%）が高かった．また，分離されたのは，*L. pneumophila* が多かった．分離された Lp1 の ST は，ST127 であった．

２．バイオエアロゾル *Legionella* 属菌検出状況

道路沿い 99 検体，浴室内 16 検体について調査した結果，直接培養法およびアメーバ共培養法において *Legionella* 属菌は分離されなかった（表 5）．しかしながら遺伝子検査法においては，道路沿い検体で 69.7%（69/99 検体），浴室内検体で 75.0%（12/16 検体）から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された．16S rRNA 遺伝子のコピー数（copies/m^3）は，道路沿い検体で 60.6，浴室内検体で 71.0 であった．

道路沿い検体について，降水量，平均気温，平均湿度ごとの検出率などを比較した（表 6）．エアロゾル捕集当日の降水量が 10 mm 未満と以上の日で，コピー数の幾何平均が 49.7 と 88.1 となり，10 mm 以上の日で遺伝子量が多い傾向であった（t 検定 = 0.073）．

３．免疫磁気ビーズによる Lp1 の選択的濃縮法の検討結果

Lp1 を含む供試菌（表 1）の Lp1 IBM による回収率結果を表 7 に示した．全体としてみると，Lp1 の回収率が 25.0～50.0%であったのに対し，Lp6, Lp5 では 7.1%, 9.6%, *L. bozemanii* や *L. cherii*, *L. anisa* については，0.0～0.01%と低かった．－5 乗より－6 乗希釈液での回収率が高い菌株が多く，50%を超える回収率が，菌株 No. 3，4，5 の希釈液で認められた．

Lp1 とそれ以外の *Legionella* 属菌懸濁液を混合した場合の結果は図 2，3 に示した．等量混合した場合（図２）では、Lp1 の回収率は 16 回中 12 回（75.0%）で 40.0%以上を示し、他の菌の回収率より高かった．しかしながら，7 回目，15 回目では，これらは同一日に実施しているが，Lp1 は平板上にそれぞれ 6 個，2 個のみ発育が認められただけで，その回収率は 2%以下と低かった．

一方，Lp1 と他の *Legionella* 属菌懸濁液を 1:9 で混合した場合, 1～11 回目（11/17, 64.7%）で Lp1 の回収率は 40.0%以上であったが，14 回目を除き、12～17 回目の試験では回収率は 10%以下と低かった．12, 13 回目は前述の等量混合の 7, 15 回目と同一日に実施した．6 回目の実験も同一日に実施したが、Lp1 の回収率は 10.6%と高くはなかった。表には記載していないが、13 回目の実験は 2 重測定したが、もう一方の結果も 9.1%と、10%以下の回収率であった。

次に，実際の浴槽水の 100 倍濃縮水に Lp1 IMB を用いたときの培養結果について，直接培養法と比較した結果を表 8 に示した．IMB を用いた場合に Lp1 が分離されたのは 2 検体で，逆に直接培養法のみで Lp1 が分離されたのも 2 検体であった．結果が異なった 4 検体の詳細を改めて表 8 の下段に示した. IMB 法のみで Lp1 が分離された検体では，直接培養法の結果は，１検体が *Legionella* 属菌陰性，１検体（590 CFU/100 ml）は Lp1 は分離されなかったものの, Lp3, Lp4，Lp5 が分離された．直接培養法のみで Lp1 が分離された 2 検体はどちらも *Legionella* 属菌の菌数は少なかった．

D．考察

2007 年から 2016 年にわが国におけるレジオネラ症患者から分離され，レファレンスセンターで解析されたレジオネラ属菌は，85.1%が Lp1 であった．そして，この Lp1 の SBT の遺伝子型を Minimum Spanning Tree で解析すると，129/410 株（31.4%）は浴槽水グループに，165/410 株（40.2%）は土壌・水溜り分離株グループに近いことがわかっている [5]．しかしながら，実際には感染源が判明した事例は極めて少ない状況である. 平成 26 年度のレファレンスセンター収集株の中で，推定感染源からの環境検体分離株の PFGE が臨床検体分離株と一致したのは 6 例のみであった [6].

このような背景を踏まえ，本研究では，実際に感染源となり得る環境検体中のエアロゾルまたはミスト中の *Legionella* 属菌を証明し，とりわけ，水溜りなど，これまで直接的な感染源とは証明されていない環境のリスクを明らかにしようと試みた．残念ながら, 直接平板培養, アメーバ共培養法, どちらの培養法でも *Legionella* 属菌を分離することはできなかった．しかしながら，遺伝子検出法では 60～70%の検体で陽性となり，空気中に *Legionella* 属菌が浮遊していることが示唆された．また，興味あることに，道路沿いで採取した検体（69.7%）における *Legionella* 属菌の遺伝子の検出率は，浴室内のミスト発生装置周辺で採取した検体（75.0%）と比較して大きな差は認められなかった．このことは，道路沿いのエアロゾルは浴室内のそれと同様のリスクを含むことを改めて示したものと考える．今後，晴天の日やエアロゾルの発生のない屋内における検出率や遺伝子量と比較することで，雨天の日の道路沿いや浴用施設の浴室内におけるレジオネラ症罹患のリスクが明らかとなる可能性が示唆された．なお，アメーバ共培養については，これまでの報告 [7] でも直接培養法に比べ，検出率が低いと報告されており，本年の結果もそれと同様の結果であった．この原因は明らかではないが，環境中ではアメーバへの感染が増殖の重要な過程となっていることから，共培養については検査法の検討が必要であると思われる．

レジオネラ症の感染源を特定することは，感染拡大を防止するために重要となる．そのためには，患者喀痰から多く分離される Lp1 を標的として分離を試みる必要がある．しかしながら，感染源となるような，すなわち衛生管理の不十分な浴槽水は Lp1 だけでなく，他の血清群の *L. pneumophila* をはじめ，いわゆる雑菌も多く検出される場合が多いため，標的とする Lp1 の検出が困難となる場合が多い．一部の *Legionella* 属菌は選択分離培地上で蛍光を発するなど，視覚的に鑑別可能であるが，多くはコロニー形状だけで Lp1 と特定することはできない．そのため，Lp1 を検出するには多くのコロニーについて血清群を調べるなど，時間と労力がかかることが大きな課題である．本年度, Lp1 を標的とした IMB を用いた選択的濃縮分離法は，一部で十分な回収率が得られなかったが，多くの場合で本法が有用であることを示した．回収率が低かった実験結果の原因は不明であるが，ある特定の日の実験では，ビーズ濃縮法を用いない培養平板でも菌数が少なく、菌の状態に問題があった可能性があり、結果として回収率が低くなったのかもしれない。IMB 法は

これまでにも様々な菌種での検査法[8]に採用されている事からも，その有用性が高いという結果は信頼できるものと考える．本年の実際の浴槽水において Lp1 IMB を使用した培養法で，従来の直接平板培養法で検出できなかった Lp1 を検出した意義は大きい．残念ながらこの Lp1 は患者由来株と SBT が異なっていたため，感染源特定には至らなかったが，この IMB 法はレジオネラ症の感染源の特定に一助となることが明らかとなった．さらに検出感度を高めるため，Lp1 以外の菌を除去する方法として，酸処理法や熱処理法などを検査工程に加える検討が必要と思われる．

結語

感染源となり得る環境（エアロゾル）検体から *Legionella* 属菌の遺伝子を検出し，ヒトへの感染経路の一端を証明することができた．しかしながら，直接，菌を分離することはできなかったため，継続した調査が必要である．一方，IMB については，感染源調査に有用と思われるため，検出感度の向上を目指し，実用化に向けて具体的な使用手順などの検討が必要である．

謝辞

本実態調査を実施するにあたり，富山県生活衛生課，各厚生センター，富山市保健所の担当者および採水にご協力いただいた浴用施設の皆様に深謝いたします．

E. 参考文献

1) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報．
http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/239-idwr/data/6998-idwr-sokuho-data-j-1652.html.

2) 森本　洋，他．*Legionella* 属菌検査法の安定化に向けた取り組み．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)「公衆浴場等における Legionella 属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」　平成 24 年度総括・分担研究報告書　93-131．

3) 古畑　勝則，他．2002．土壌からの *Legionella* 属菌の分離状況．日本防菌防黴学会誌．30:555‐561．

4) 森本　洋．2010．分離集落の特徴を利用した *Legionella* 属菌分別法の有用性．日本環境感染誌　25:8-14．

5) レジオネラレファレンスセンター会議報告．2016 年．衛生微生物技術協議会第 37 回研究会．
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H28_Legionnaires.pdf.

6) レジオネラレファレンスセンター会議報告．2015 年．衛生微生物技術協議会第 36 回研究会．
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H27_Legionnaires_2.pdf.

7) Akiko Edagawa et al. 2015. Investigation of *Legionella* Contamination in Bath Water Samples by Culture, Amoebic Co-Culture, and Real-Time Quantitative PCR Methods. Int J Environ Res Public Health. 12:13118-13130.

8) 工藤由起子，他．2015．腸管出血性大腸菌 O26，O103，O111，O121，O145 および O157 の食品からの検出における選択増菌培地および酵素基質培地の検討．日本食

品微生物学会誌. 32:60-66.

F. 研究発表

論文発表

Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, et al. 2017. Prevalence of *Legionella* Species Isolated from Shower Water in Public Bath Facilities in Toyama Prefecture, Japan. J Infect Chemother. Epub ahead of print. doi: 10.1016/j.jiac.2017.01.002.

報告

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.

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

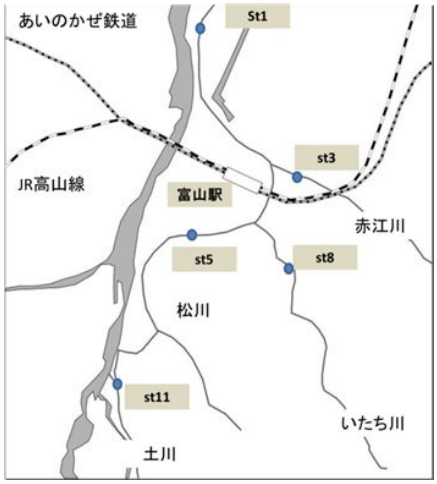


図 1 平成 28 年度市中河川水採水地点

表1. 免疫磁気ビーズ法の検討に供試した菌株

	Legionella spp. (serogroup)	*lag1* 遺伝子	SBT
1	*L. pneumophila* (1)	＋	ST 505
2	*L. pneumophila* (1)	＋	ST 644
3	*L. pneumophila* (1)	＋	ST UT
4	*L. pneumophila* (1)	－	ST 644
5	*L. pneumophila* (1)	－	ST 1094
6	*L. pneumophila* (1)	－	ST UT
7	*L. pneumophila* (6)	NT	
8	*L. pneumophila* (5)	NT	
9	*L. bozemanii*	NT	
10	*L. cherii*	NT	
11	*L. anisa*	NT	

表2. 浴槽水・シャワー水における*Legionella*属菌検出状況

		浴槽水	シャワー水	計
	施設数	11	11	11
	検体数	40	29	69
	陽性数	8	10	18
	検出率(%)	20.0	34.5	26.1
レジオネラ属菌数別検体数	10 未満*1	32	19	51
	10 – 99	4	4	8
	100 – 999	2	6	8
	> 1000	2	0	2
分離されたレジオネラ属菌の血清群	Lp1*2	3	1	4
	Lp3	2		2
	Lp5		4	4
	Lp6	4	3	7
	Lp9	1		1
	Lp15		4	4
	UT		1	1

*1 : CFU/100ml
*2 : *Legionella pneumophila* serogroup1

表3. 浴槽水・シャワー水における平板培養法とアメーバ共培養法との比較

①レジオネラ属菌の検出率

	検体数	陽性数	検出率(%)
平板培養法	69	18	26.1
アメーバ共培養法	69	10	14.5

②分離されたレジオネラ属菌の血清型

	Lp1*1	Lp3	Lp5	Lp6	Lp9	Lp15	UT
平板培養法	4	2	4	7	1	4	1
アメーバ共培養法	1		1	5			3

*1 : *L. pneumophila* serogroup1

③両法の相関

		アメーバ共培養法		
		陽性	陰性	計
平板培養法	陽性	8	10	18
	陰性	2	49	51
	計	10	59	69

表4. 市中河川水におけるアメーバ共培養法による*Legionella*属菌の月別検出率

調査月	陽性数／検体数（陽性率%）	分離された*Legionella*属菌
5 月	3/5 検体（60.0）	Lp 1[*1]、Lp 6、Lp 15
6 月	0/5 検体	
9 月	2/5 検体（40.0）	Lp 2、*L. waltersii*
10 月	1/5 検体（20.0）	Lp 2、*L. longbeachae*
	6/20検体（30.0）	

[*1]: *L. pneumophila* Serogroup1

表 5. エアロゾル中の *Legionella* 属菌検出状況

		道路沿い	浴室内
検体数		99	16
培養陽性検体数	直接法	0	0
	アメーバ増菌法	0	0
遺伝子陽性検体数	リアルタイムPCR法（%）	69 (69.7)	12 (75.0)
	コピー数の幾何平均（copies/m^3）	60.6	71.0

表 6. 道路沿いエアロゾルにおける *Legionella* 属菌検出状況

		リアルタイムPCR					
		n	陽性数	検出率（%）	カイ二乗検定	コピー数の幾何平均（copies/m^3）	t検定
降水量	10 mm未満	69	45	65.2	P=0.141	49.7	P=0.073
	10 mm以上	30	24	80.0		88.1	
平均湿度	70%未満	18	15	83.3	P=0.164	25.9	P=0.373
	70%以上	81	54	66.7		76.8	
平均気温	20度未満	24	19	79.2	P=0.246	58.5	P=0.990
	20度以上	75	50	66.7		61.5	

表7．IMB による *Legionella* 属菌（単一血清群）の回収率

	全体			-5希釈液			-6希釈液		
	測定回数	回収率平均	実測値平均	測定回数	回収率平均	実測値平均	測定回数	回収率平均	実測値平均
L. p. SG1 ST505 (+)	5	37.6%	506	2	38.2%	1032	3	37.2%	155
L. p. SG1 ST644 (+)	4	30.4%	304	2	15.3%	401	2	45.6%	21
L. p. SG1 ST:UT (+)	3	49.8%	248	1	34.7%	327	2	57.4%	208
L. p. SG1 ST644 (−)	2	50.2%	863	1	46.3%	1158	1	54.1%	569
L. p. SG1 ST1094 (−)	3	46.0%	593	1	34.6%	1348	2	51.7%	216
L. p. SG1 ST:UT (−)	3	25.0%	110	1	6.8%	125	2	34.1%	103
L. p. SG6	6	7.1%	58	1	3.8%	194	5	10.1%	31
L. p. SG5	3	9.6%	61				3	9.6%	61
L. bozemanii	1	0.0%	9						
L. cherii	1	0.0%	0						
L. anisa	4	0.1%	26	3	1.3%	35	1	0.0%	0

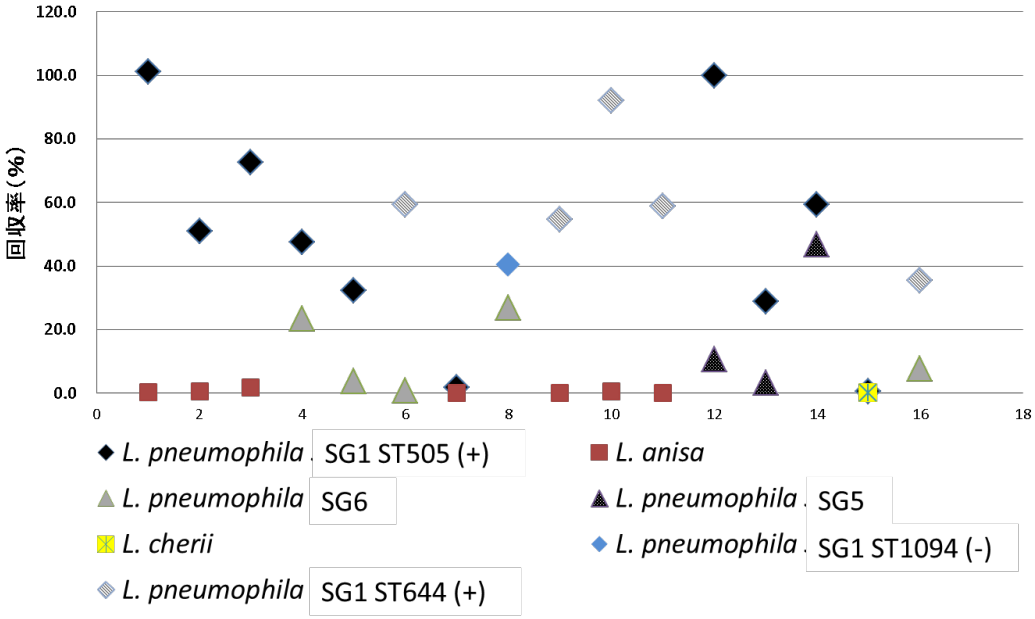


図2．2つの菌を等量混合した場合の回収率の比較

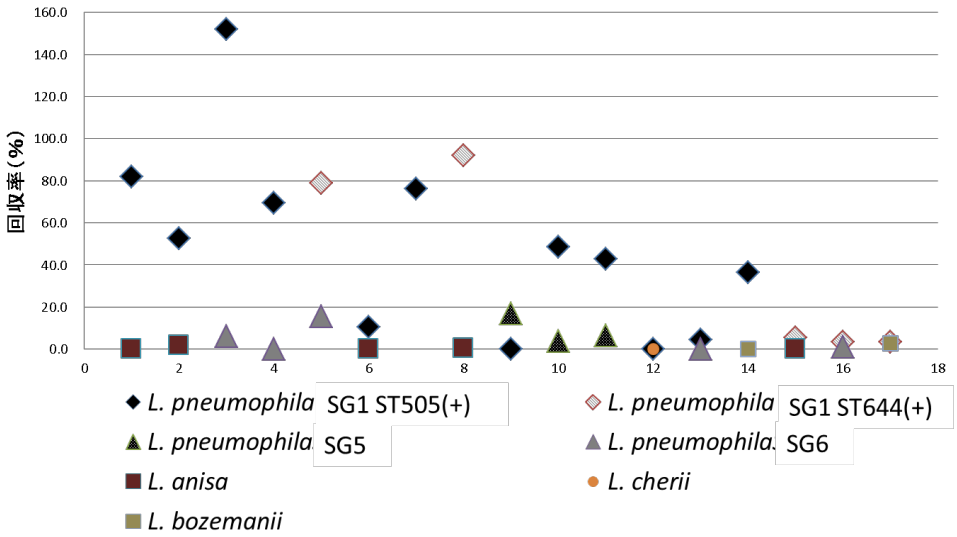


図 3．Lp1 菌の混合比を 1/10 にした場合の回収率の比較

表 8. 実検体（浴槽水）における Lp1 の分離状況
（免疫磁気ビーズと通常培養法との比較）

		ビーズ法	
		Lp1＋	Lp1－
培養法	Lp1＋	3	2*[3,4]
	Lp1－	2*[1,2]	47

*Legionella*属菌分離状況

	IMB法	直接培養法	菌数(cfu/100ml)
*1	Lp1, Lp5	Lp3,Lp4,Lp5	590
*2	Lp1	ND	<10
*3	ND	Lp1	20
*4	ND	Lp1,Lp9	10

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）
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
研究代表者　前川　純子　国立感染症研究所　細菌第一部　主任研究官

分担研究報告書
レジオネラ属菌迅速検査法の評価

研究分担者
○ 磯部 順子　富山県衛生研究所　　佐々木 麻里　大分県衛生環境研究センター
研究協力者
金谷　潤一　富山県衛生研究所　　川野 みどり　長崎県環境保健研究センター
田栗 利紹　長崎県環境保健研究センター　　武藤 千恵子　東京都健康安全研究センター
山口 友美　宮城県保健環境センター　　淀谷 雄亮　川崎市健康安全研究所
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
原口 浩幸　株式会社ファスマック　　森中 りえか　株式会社ファスマック

研究要旨

本研究では、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、qPCR 法、EMA qPCR 法、PALSAR 法、LAMP 法、LC EMA qPCR 法について、浴槽水などの実検体 349 検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

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

183 検体について PALSAR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 60.5%（26/43 検体）、特異度は 65.0%（91/140 検体）であった。PALSAR 法における偽陰性検体の多くはシャワー水検体であり、これらの検体については溶菌できていない可能性が考えられた。溶菌液の濃度、反応時間、温度などを検討し、RNA の抽出条件を改良する必要があると考えられた。

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

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

A　研究目的

現在、浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに 7〜10 日を要する。一方、濃縮検体から直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法［リアルタイム PCR（qPCR）法および LAMP 法］は、検査開始から数時間で結果を得られるため、配管洗浄などの効果確認に活用されている[1)]。これらの遺伝子検出法は簡便で迅速な手法であるが、死菌由来 DNA も検出するという課題があった。近年、死菌由来 DNA を Ethidium monoazide（EMA）で修飾して PCR 増幅を阻害する EMA qPCR 法が開発され、市販キットとして発売されている。平成 25 年には、液体培地による前培養を組み合わせた「生菌迅速検査法（LC EMA qPCR 法）」が開発され[2)]、市販されている。また近年、レジオネラ属菌特異的 16S rRNA を標的とし、プレート上の DNA プローブに結合させて検出する PALSAR 法が開発された。他の迅速検査法と同様に濃縮検体を用いる本検査は、特殊な機器が不要で肉眼による判定が可能であり、当日中に結果が判明する方法である。

これまで、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、qPCR 法、LAMP 法、LC EMA qPCR 法、PALSAR 法について評価し、PALSAR 法については感度の向上が必要であることが判明した[3)]。今回、主に EMA qPCR 法、改良した PALSAR 法について、浴槽水などの実検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

B　材料と方法

1　検査材料

全国 6 か所の地方衛生研究所において、平成 28 年度に浴用施設などから 349 検体の試料を採取し、検査法の検討に用いた（表 1）。検体の内訳は、浴槽水が 259 検体（74.2%）、湯口水が 15 検体（4.3%）、シャワー水が 30 検体（8.6%）、その他（採暖槽水、プール水など）が 45 検体（12.9%）であった。浴槽水の泉質は、温泉が 115 検体（44.4%）、白湯が 135 検体（52.1%）、薬湯が 4 検体（1.5%）、不明が 5 検体（1.9%）であった。

2　ATP 値測定

ATP 値は、検水 100 倍濃縮液にルシパックワイドまたはルシパック Pen（キッコーマン）の専用綿棒を浸して約 100 μl を吸い取り、携帯用簡易測定器を用いて検水 10 ml 当たりの RLU 値を測定した。

3　平板培養法

平板培養法は新版レジオネラ症防止指針に準じ、各機関の方法で実施し、10 CFU/100 ml 以上を陽性とした。

4　qPCR 法および EMA qPCR 法

qPCR 法は、Lysis Buffer for *Legionella*（タカラバイオ）、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。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。

5　EMA qPCR 法におけるレジオネラ属菌 1 CFU あたりの 16S rRNA 遺伝子コピー数の決定

L. pneumophila 長崎 80-045 株を BCYE α 寒天培地で 30℃4 日間培養後、生理食塩水で McFarland No. 2 濁度の菌液（約 10^9 CFU/ml）を調製した。その菌液を 10 倍段階希釈し、−1〜−6 乗段階の希釈液を EMA 処理後、Lysis Buffer for *Legionella*、NucleoSpin Tissue XS（タカラバイオ）でそれぞれ DNA 抽出し、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いて N = 3 で測定した。

機器別の検量線作成には、上述の方法で DNA を抽出後、N = 2 で実施し、その平均値を用いて作成した。

6　Thermal Cycler Dice Real Time System III (TP950)を用いた検討

近年発売された TP950 について、Thermal Cycler Dice Real Time System II (TP900)との相関を

見るため、上述した 16S rRNA 遺伝子コピー数決定のための DNA 検体と、平成 27 年度に抽出した LC EMA qPCR 用 DNA 検体、今年度抽出した qPCR、EMA qPCR 用 DNA 検体をそれぞれ 20 検体ランダムに選択し、両方の機器で測定した（TP900 は fast mode、TP950 は normal および fast mode で実施）。なお、TP950 の fast mode では、アニーリング時間を 10 秒から 20 秒に変更して実施した。

7　PALSAR 法

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。当日中に測定しない場合は、RNA 抽出後の検体を－20℃で保存した。

8　LAMP 法

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。一部の検体は、DNA 抽出に Lysis Buffer for *Legionella* を用いた。

9　LC EMA qPCR 法

LC EMA qPCR 法は、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR（タカラバイオ）、*Legionella* LC Medium base（タカラバイオ）、Lysis Buffer for *Legionella*、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。リアルタイム PCR 実施後、添付の取扱説明書に記載された方法で 16S rRNA 遺伝子領域を組み込んだプラスミド溶液のコピー数から CFU に換算した。

（倫理面への配慮）

本研究は、研究機関内外の倫理委員会等における承認手続きが必要となる研究には該当しない。

C　結果

1　平板培養法による結果

349 検体について検査した結果、69 検体（19.8%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された（表 2）。菌数別に見ると、10～99 CFU/100 ml が 43 検体（12.3%）、100～999 CFU/100 ml が 23 検体（6.6%）、1,000 CFU/100 ml 以上が 3 検体（0.9%）であった。最も多かった検体では、58,000 CFU/100 ml のレジオネラ属菌が検出された。分離菌の血清群別を実施した結果、*L. pneumophila* 血清群（SG）6 が 21 検体から分離され、最も多かった（表 3）。次に多かったのは、*L. pneumophila* SG 1（19 検体）、*L. pneumophila* SG 3（24 検体）、*L. pneumophila* SG 5（18 検体）であった。また、*L. pneumophila* 以外の菌種が 4 検体から分離された。

2　qPCR 法および EMA qPCR 法による結果

（1）平板培養法との比較

qPCR 法および EMA qPCR 法を使用した 310 検体について、平板培養法の結果と比較した（表 4）。qPCR 法および EMA qPCR 法では、遺伝子の増幅が認められた場合に陽性と判定した。平板培養法では 56/310 検体（18.1%）から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。qPCR 法では、167/310 検体（53.9%）の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。qPCR 法の平板培養法に対する感度は 96.4%（54/56 検体）、特異度は 55.5%（141/254 検体）であった。EMA qPCR 法では、152/310 検体（49.0%）の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 92.9%（52/56 検体）、特異度は 60.6%（154/254 検体）であった。

（2）qPCR 法および EMA qPCR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性（10 CFU/100 ml 以上）となったが qPCR 法および EMA qPCR 法で陰性となった 6 検体のうち、4 検体が平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml であった（表 5）。分離菌の血清群別を実施した結果、すべて *L. pneumophila* であった。

（3）qPCR 法および EMA qPCR 法における偽陽性検体

平板培養法の結果が陰性（10 CFU/100 ml 未満）となったが qPCR 法および EMA qPCR 法で陽性となったのは、qPCR 法で 113/310 検体（36.5%）、

EMA qPCR 法で 100/310 検体（32.3%）であった（表 6）。これらの検体における 16S rRNA 遺伝子コピー数の分布を見ると、qPCR 法と EMA qPCR 法で顕著な差は見られなかった。

（4）機関別、検体別における結果

5 機関における qPCR 法および EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度・特異度を表 7 に示した。4 機関においては、EMA 処理をすることで特異度が向上した。検体別の結果では、温泉水、シャワー水については EMA 処理を実施することで特異度が向上したが、白湯、その他の検体については差が見られなかった（表 8）。

（5）EMA qPCR 法におけるレジオネラ属菌 1 CFU あたりの 16S rRNA 遺伝子コピー数の決定

平板培養レジオネラ属菌の 10 倍段階希釈液を EMA 処理して作成した検量線を図 1 に示した。プラスミド DNA と、Lysis Buffer for *Legionella*、NucleoSpin Tissue XS で抽出した DNA の回帰直線を比較すると、傾きはほぼ平行関係にあり、増幅効率に大きな差がないことが確認された。得られた切片の差が Lysis Buffer for *Legionella* で 2.426、NucleoSpin Tissue XS で 1.846 であったことから（プラスミドの切片と抽出 DNA の切片の差）、各キットを用いて 30℃培養 4 日目の菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、抽出効率や増幅効率を含めてプラスミド 3 コピー（$2^{1.662}$ = 3.2、Lysis Buffer for *Legionella*）および 4 コピー（$2^{1.846}$ = 3.6、NucleoSpin Tissue XS）に相当するものと計算された。実検体を用いた EMA qPCR 法と平板培養法との菌数（定量値）の相関は、R^2 = 0.1975 であった（図 2）。

（6）TP900 と TP950 を用いた測定値の比較

平板培養レジオネラ属菌の 10 倍段階希釈液を用いて作成した検量線を図 3 に示した。機器、測定モード、DNA 抽出法による大きな差は見られなかった。実検体を用いた比較を図 4 に示した。全体としては概ね相関していたが、qPCR 法および EMA qPCR 法では、TP900 よりも TP950 の normal mode および fast mode の方がやや定量値が高くなった。

3　PALSAR 法による結果

（1）平板培養法との比較

PALSAR 法を使用した 183 検体について、平板培養法の結果と比較した（表 9）。平板培養法では 43/183 検体（23.5%）の検体から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、PALSAR 法では 75/183 検体（41.0%）の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 60.5%（26/43 検体）、特異度は 65.0%（91/140 検体）であった。検体別に見ると、浴槽水検体のみを対象とした場合、感度 76.2%（16/21 検体）、特異度 65.0%（65/100 検体）であり、その他の検体の場合、感度 45.5%（10/22 検体）、特異度 65.0%（26/40 検体）であった。

（2）PALSAR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性（10 CFU/100 ml 以上）となったが PALSAR 法で陰性となった 17 検体のうち、10 検体（58.8%）はシャワー水検体であり、平板培養法での菌数が 30〜540 CFU/100 ml であった（表 10）。残りの 7 検体における平板培養法の菌数は、500 CFU/100 ml の 1 検体を除くと 10〜30 CFU/100 ml であった。

4　LAMP 法による結果

（1）平板培養法との比較

LAMP 法を使用した 229 検体について、平板培養法の結果と比較した（表 11）。平板培養法（10 CFU/100 ml 以上を陽性）および LAMP 法では、43/229 検体（18.8%）の検体が陽性となった。LAMP 法の平板培養法に対する感度は 65.1%（28/43 検体）、特異度は 91.9%（171/186 検体）であった。

EMA qPCR 法および LAMP 法を実施した 190 検体について平板培養法の結果と比較すると、EMA qPCR 法は感度 93.3%、特異度 66.9%であり、LAMP 法は感度 53.3%、特異度 93.1%であった。

（2）LAMP 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性（10 CFU/100 ml 以上）

となったが LAMP 法で陰性となった 15 検体のうち、13 検体（86.7%）は平板培養法での菌数が 10～40 CFU/100 ml であり、残りの 2 検体はそれぞれ 220、500 CFU/100 ml であった。LAMP 法で偽陰性となった 15 検体のうち、8 検体について、DNA 抽出液を 5 倍希釈して再度実施した結果、2/8 検体（25.0%）が陽性となった。これらの検体は、それぞれ培養法で 20、30 CFU/100 ml であった。

5　LC EMA qPCR 法による結果

（1）平板培養法との比較

平成 26 年度の検討結果 [4]を参考に、平板培養法による 10 CFU/100 ml 以上の検体を陽性とするカットオフ値として 1 CFU/100 ml 相当を用いて解析を行った。LC EMA qPCR 法を使用した 37 検体について、平板培養法の結果と比較した（表 12）。平板培養法では 13/37 検体（35.1%）の検体から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、LC EMA qPCR 法では 15/37 検体（40.5%）の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。LC EMA qPCR 法の平板培養法に対する感度は 76.9%（10/13 検体）、特異度は 79.2%（19/24 検体）であった。

（2）LC EMA qPCR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性（10 CFU/100 ml 以上）となったが LC EMA qPCR 法で陰性（1 CFU/100 ml 相当未満）となった 3 検体のうち、2 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml、1 検体は 30 CFU/100 ml であった。

D　考　察

今年度は、5 種類の迅速検査キット（qPCR 法、EMA qPCR 法、PALSAR 法、LAMP 法、LC EMA qPCR 法）について、平板培養法の結果と比較し、評価した。

qPCR 法および EMA qPCR 法では、どちらも平板培養法に対する感度は 90%以上であり、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のほとんどを検出できる検査法であることが明らかとなった。qPCR 法および EMA qPCR 法で検出できなかった平板培養陽性検体についても、多くは菌数が 10 CFU/100 ml であった。一方、特異度は約 50～60%であり、平板培養陰性検体（10 CFU/100 ml 未満）の半数近くが qPCR 法および EMA qPCR 法で陽性となった。死菌 DNA の PCR 増幅を阻害する EMA 処理を実施した場合でも、特異度はあまり上がらなかった。反応チューブあたりの 16S rRNA 遺伝子コピー数を qPCR 法と比較しても、顕著な差は見られなかった。しかしながら、機関別、検体別にみると、多くの機関では EMA 処理を実施することで特異度が向上した。また、浴槽水（温泉、薬湯など）やシャワー水を検体とした場合に、特異度が向上した。浴槽水（白湯）については、qPCR 法においても特異度が 70%以上あったため、検体中の死菌が少ないために EMA 処理の効果が見られなかった可能性は考えられた。これらの検体については、現行の平板培養法では検出できない生菌が存在している可能性も考えられた。したがって、EMA 処理を実施することで特異度は向上するが、検体によってはその効果が見られない場合もあると考えられる。

EMA qPCR 法と平板培養法における菌数（定量値）の比較は $R^2 = 0.1948$ であり、昨年度検討した LC EMA qPCR 法と平板培養法における値（$R^2 = 0.6874$）[4]よりも低かったため、平板培養法の菌数を反映する方法としては、LC EMA qPCR 法の方が優れていた。

近年、タカラバイオから新しいリアルタイム装置（TP950）が発売された。従来の機器（TP900）では PCR 反応時間に約 1 時間半を要したが、本装置の fast mode では約 1 時間で反応が終了する。実検体を用いた結果では、どちらの機器を用いた場合でも結果は概ね相関していたため、TP950（fast mode）を用いることで検査時間を短縮することができる。

PALSAR 法に関しては、昨年度の結果 [4]をもとに、感度を向上させるため、検査に用いる検体量を 100 倍濃縮液 1 ml から 4 ml に変更した。また、

当日中に測定しない場合は、濃縮検体の保存によるRNAの分解を防ぐため、RNA抽出まで実施後、−20℃で保存することとした。その結果、平板培養法に対する感度は 60.5%となり、昨年度の47.0%から向上した。浴槽水検体のみについて見ると、感度は76.2%まで上がった。一方、PALSAR法で偽陰性となった検体の多くはシャワー水であった。平板培養で分離された菌はすべて *L. pneumophila* であり、PALSAR 法で検出できる菌種であると考えられる。シャワーヘッドを通過することによるレジオネラ属菌の形態への影響は不明であるが、本プロトコルでは、シャワー水検体については溶菌できていない可能性が考えられた。溶菌液の濃度、反応時間、温度などを検討し、RNA の抽出条件を改良する必要があると考えられた。

LAMP 法では、平板培養法に対する特異度は91.9%と高かったが、感度は 65.1%と低かった。EMA qPCR 法および LAMP 法を実施した 190 検体について比較しても、LAMP 法の感度は EMA qPCR 法より低かった。LAMP 法で偽陰性となった検体の一部は 5 倍希釈液で陽性となったため、一部の検体においては、反応阻害物質の存在が考えられた。また、多くの偽陰性検体は、平板培養法の菌数が 10〜40 CFU/100 ml と低濃度であったため、低濃度培養陽性検体においては、LAMP 法の感度はやや低下すると考えられた。

LC EMA qPCR 法では、今年度は実施検体数が少ないものの、平板培養法に対する感度、特異度はともに約 80%に近かった。昨年度の結果（342検体実施、感度 89.2%、特異度 80.3%、R^2 = 0.6874）[4]からも、全体として平板培養法の菌数を反映している方法であると考えられた。

E 結 論

各種迅速検査法（qPCR 法、EMA qPCR 法、LAMP 法、PALSAR 法、LC EMA qPCR 法）について、浴槽水などの実検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

qPCR 法および EMA qPCR 法では、どちらも平板培養法に対する感度は 90%以上であり、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のほとんどを検出できる検査法であることが明らかとなった。また、EMA 処理を実施することで特異度は向上するが、検体によってはその効果が見られない場合もあった。これらの検体については、現行の平板培養法では検出できない生菌が存在している可能性も考えられた。

EMA qPCR 法と平板培養法における菌数（定量値）の比較値（R^2 = 0.1975）は、昨年度検討した LC EMA qPCR 法と平板培養法における値（R^2 = 0.6874）よりも低かったため、平板培養法の菌数を反映する方法としては、LC EMA qPCR 法の方が優れていた。

TP900 と TP950 を用いた測定値の比較では、実検体を用いた結果（定量値）は概ね相関していたため、TP950（fast mode）を用いることで検査時間（増幅反応時間）を短縮することができる。

PALSAR 法では、平板培養法に対する感度は60.5%（浴槽水検体のみでは 76.2%）であったが、特にシャワー水検体について感度が低かったため、溶菌液の濃度、反応時間、温度などを検討し、RNA の抽出条件を改良する必要があると考えられた。

LAMP 法では、平板培養法に対する特異度は91.9%と高かったが、感度は 65.1%と低く、低濃度の平板培養陽性検体においては、LAMP 法の感度はやや低下すると考えられた。

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

参考文献

1) 浅野陽子、核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について、生活と環境、2007、52 (1)、89-91.

2) 烏谷　竜哉　他、液体培養（Liquid Culture）

EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討、公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究、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　総括・分担研究報告書、71-84.
3) 磯部　順子　他、レジオネラ属菌迅速検査法の評価、レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究、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 27 年度　総括・分担研究報告書、61-70.
4) 磯部　順子　他、Liquid Culture EMA qPCR におけるレジオネラ生菌迅速検査法の改良と評価、レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究、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 26 年度　総括・分担研究報告書、63-76.

F　研究発表

なし

G　知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 検体内訳と検査方法

		機関						
		A	B	C	D	E	F	計
浴槽水	**温泉**	16		41	15	21	22	115
	白湯	20	12	4	4	16	79	135
	薬湯	4						4
	不明				5			5
湯口水					15			15
シャワー水		29	1					30
その他（採暖槽水、プール水など）			25				20	45
計		69	38	45	39	37	121	349
検査方法								
qPCRおよびEMA qPCR		○	○	○		○	○	
PALSAR		○	○	○	○			
LAMP		○	○		○		○	
LC EMA qPCR						○		

表2. 平板培養法による検出率

菌数（CFU/100 ml）	検体数	（%）
10未満	280	(80.2)
10-99	43	(12.3)
100-999	23	(6.6)
1,000以上	3	(0.9)
計	349	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
L. pneumophila	
SG 6	21
SG 1	19
SG 5	18
SG 3	12
SG 15	11
SG 4	6
SG 2	5
SG 8	5
SG 9	5
SG 7	3
SG 12	1
UT	16
Legionella spp.	4

表4. 平板培養法とEMA qPCR法との比較

a. EMA処理無し

		平板培養法		
		≧10	＜10	**計**
qPCR	陽性	54	113	167
	陰性	2	141	143
計		56	254	310

感度 96.4%、 特異度 55.5%

b. EMA処理有り

		平板培養法		
		≧10	＜10	**計**
EMA qPCR	陽性	52	100	152
	陰性	4	154	158
計		56	254	310

感度 92.9%、 特異度 60.6%

表5. EMA qPCR法における偽陰性検体

No.	EMA 処理	検体	泉質など	湯温 (℃)	残塩 (mg/L)	pH	ATP値 (RLU/10 ml)	平板培養法 (CFU/100 ml)	菌種	血清群	LAMP法	PALSAR法
1	−	浴槽水	井水	38	1.3	6	6	10	*L. pneumophila*	4,8		−
2	−	浴槽水	白湯	38.6	1	7.67		10	*L. pneumophila*	6		−
3	＋	浴槽水	井戸水	41	0	8.04	9	10	*L. pneumophila*	1,9	＋	−
4	＋	浴槽水	白湯	38.6	1	7.67		10	*L. pneumophila*	6		−
5	＋	採暖槽水		36.7	0.6	7.27		30	*L. pneumophila*	6		−
6	＋	シャワー水	水道水			7.5	2	40	*L. pneumophila*	6	−	−

表6. EMA qPCR法における偽陽性検体のコピー数

Copies of plasmid/5 µl	qPCR n	qPCR (%)	EMA qPCR n	EMA qPCR (%)
0-0.9	4	(3.5)	6	(6.0)
1-9	38	(33.6)	38	(38.0)
10-99	39	(34.5)	32	(32.0)
100-999	20	(17.7)	18	(18.0)
>1,000	12	(10.6)	6	(6.0)
	113	(100.0)	100	(100.0)

表7. 各機関における培養法に対するEMA qPCR法の感度･特異度

機関	qPCR n	qPCR 感度 (%)	qPCR 特異度 (%)	EMA qPCR n	EMA qPCR 感度 (%)	EMA qPCR 特異度 (%)
A	69	100.0	60.8	69	88.9	84.3
B	38	88.9	55.2	38	77.8	72.4
C	45	75.0	22.0	45	100.0	36.6
E	37	100.0	25.0	37	100.0	50.0
F	121	100.0	72.5	121	100.0	57.8
5機関	310	94.6	55.1	310	92.9	60.6

表8. 検体別におけるEMA qPCR法の感度･特異度

	n	qPCR 感度 (%)	qPCR 特異度 (%)	EMA qPCR 感度 (%)	EMA qPCR 特異度 (%)
浴槽水　白湯	131	88.9	74.3	88.9	75.2
浴槽水　その他 (温泉、薬湯など)	104	100.0	28.2	100.0	41.2
シャワー水	30	100.0	50.0	90.0	70.0
その他（採暖槽水、プール水など）	45	100.0	63.9	88.9	55.6

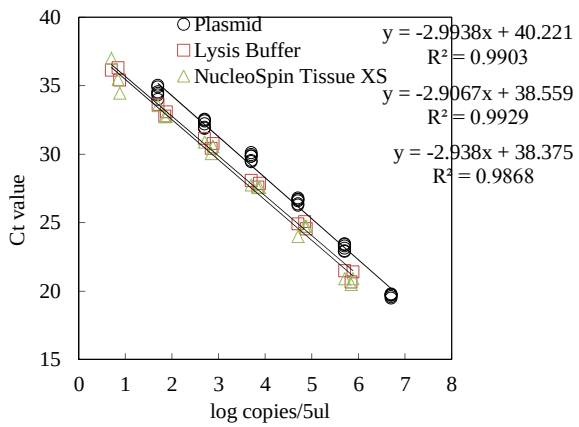


図 1　各種キットを用いて EMA 処理した菌液から抽出した DNA の検量線

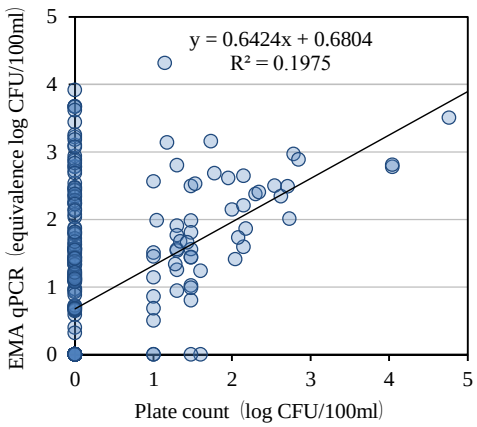


図 2　平板培養法と EMA qPCR 法との相関

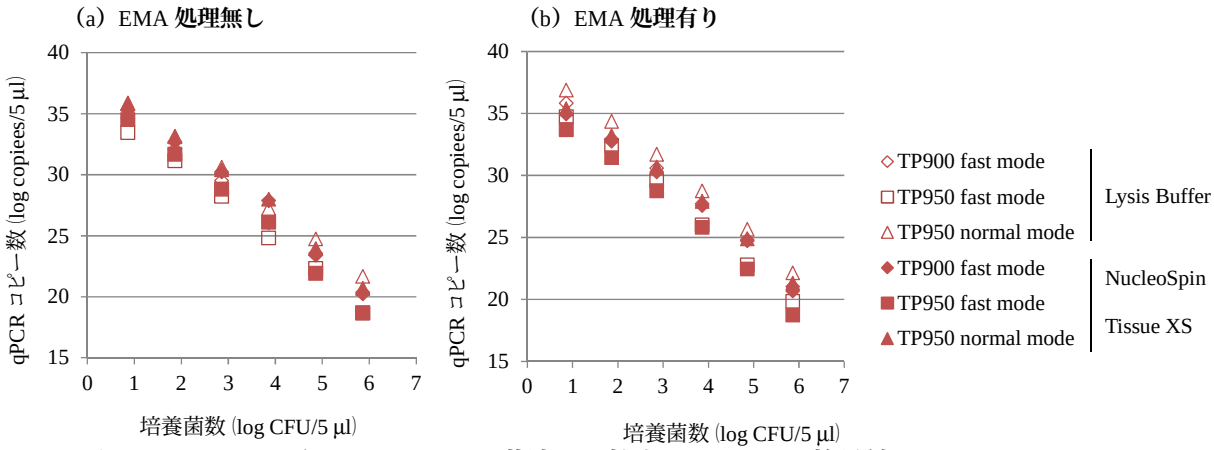


図 3　TP950 および TP900 における菌液から抽出した DNA の検量線

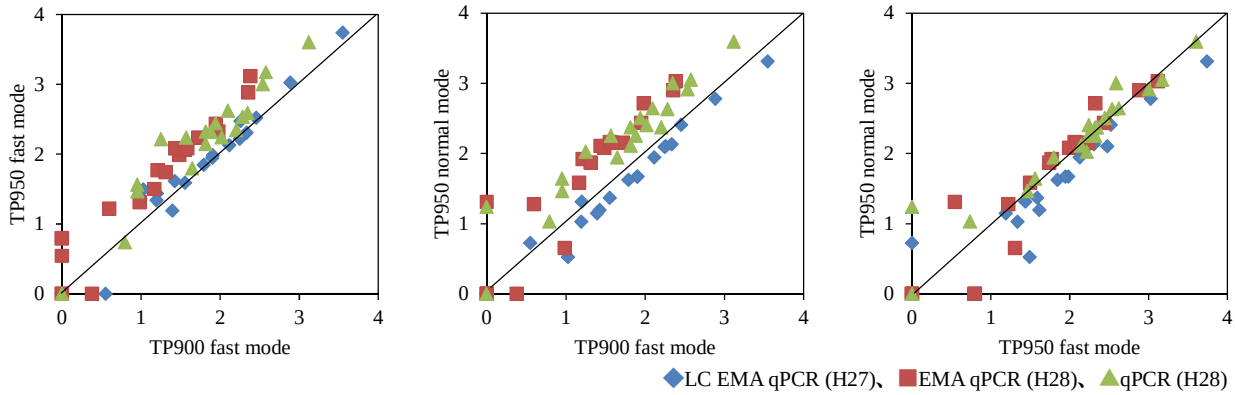


図 4　　TP950 および TP900 における実検体を用いた定量値（equivalence log CFU/100 ml）の比較

表9. 平板培養法とPALSAR法との比較

a. 全検体

		平板培養法		
		≧10	＜10	計
PALSAR法	陽性	26	49	75
	陰性	17	91	108
計		43	140	183

感度　60.5%、　特異度　65.0%

b. 浴槽水検体のみ

		平板培養法		
		≧10	＜10	計
PALSAR法	陽性	16	35	51
	陰性	5	65	70
計		21	100	121

感度　76.2%、　特異度　65.0%

c. 浴槽水以外の検体

		平板培養法		
		≧10	＜10	計
PALSAR法	陽性	10	14	24
	陰性	12	26	38
計		22	40	62

感度　45.5%、　特異度　65.0%

表10. PALSAR法における偽陰性検体

No.	検体	泉質など	湯温（℃）	残塩（mg/L）	pH	ATP値（RLU/10 ml）	平板培養法（CFU/100 ml）	菌種	血清群	EMA qPCR法	LAMP法
1	浴槽水	井戸水	41	0.26	8.04	9	10	*L. pneumophila*	1,9	＋	＋
2	浴槽水	井水	38	1.3	6	6	10	*L. pneumophila*	4,8	＋	
3	浴槽水	白湯	38.6	1	7.67		10	*L. pneumophila*	6	＋	
4	浴槽水	井戸水	41	0.46	7.88	158	20	*L. pneumophila*	1	＋	－
5	採暖槽水		36.4	2	7.74		20	*L. pneumophila*	1,5	＋	
6	シャワー水	井戸水			7.07	9	30	*L. pneumophila*	5,UT	＋	－
7	シャワー水	井戸水			8.26	8	30	*L. pneumophila*	15	＋	－
8	シャワー水	井戸水			8.27	7	30	*L. pneumophila*	15	＋	－
9	採暖槽水		36.7	0.6	7.27		30	*L. pneumophila*	6	＋	
10	シャワー水	水道水			7.5	2	40	*L. pneumophila*	6	＋	－
11	シャワー水	井戸水			8.28	9	100	*L. pneumophila*	15	＋	＋
12	シャワー水	井戸水			8.11	6	110	*L. pneumophila*	5	＋	＋
13	シャワー水	井戸水			8.26	9	120	*L. pneumophila*	5,15	＋	＋
14	シャワー水	井戸水			7.17	10	140	*L. pneumophila*	1,6	＋	＋
15	シャワー水	井戸水			7.18	9	220	*L. pneumophila*	5	＋	－
16	浴槽水	温泉水					500	*L. pneumophila*	2,3	＋	＋
17	シャワー水	温泉水			7.55	5	540	*L. pneumophila*	6	＋	＋

表11. 平板培養法とLAMP法との比較

		平板培養法		
		≧10	＜10	計
LAMP法	陽性	28	15	43
	陰性	15	171	186
計		43	186	229

感度 65.1%、 特異度 91.9%

表12. 平板培養法とLC EMA qPCR法との比較

		平板培養法		
		≧10	＜10	**計**
LC EMA qPCR法	≧1	10	5	15
（カットオフ値1 CFU/100 ml相当）	＜1	3	19	22
計		13	24	37

感度 76.9%、 特異度 79.2%

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）
「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」

平成 28 年度分担研究報告書

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

研究分担者　佐々木　麻里　大分県衛生環境研究センター
研究協力者　一ノ瀬　和也、神田　由子　大分県衛生環境研究センター
研究協力者　緒方　喜久代　公益社団法人大分県薬剤師会検査センター

研究要旨：　標準的な検査法を提示する一助として、迅速培養法（斜光法を取り入れた培養法）について平成 21 年度から検討を行っている。今年度は大分県内施設の浴場水 39 検体を用いて実施したところ、培養検査に斜光法を取り入れることにより、より短い期間で正確な培養結果が得られた。浴場水由来の *Legionella pneumophila* SG1 株について、調査を始めた平成 24 年度以降初めて *lag-1* 遺伝子保有株が検出された。県内の臨床検体由来株の多くが保有している因子であるので、今後動向に留意したい。

また、比色系パルサー法については、特殊な機器を必要としないことから、保健所等監視指導機関等での活用が期待される。検水をフィルターでろ過後、そのフィルターごと溶菌処理する方法について検討し、良好な結果を得たが、ろ過に長時間かかる検体があり、その解消に向けてさらに検討を進める。

A．研究目的

浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として広く用いられている培養法は結果を得るまでに 7 日から 10 日の長い時間を要する。患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時やレジオネラ属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中のレジオネラ属菌の存在あるいは菌数を速やかに把握する必要がある場合は、監視現場からより迅速で、かつ正確な検査が求められている。そこで、様々な泉質を有する温泉水等を対象に、正確・簡便・迅速な培養結果を得る方法としての斜光法（分離培地上の出現コロニーに 2 方向から斜光をあて、実体顕微鏡下で観察をするとレジオネラ属菌は特徴的なモザイク様の形態を示すことを利用した方法 [1)] をレジオネラ属菌検査の標準法に導入することを目的に従来の培養法との比較検討を行った。

また、LAMP 法については、迅速に結果が得られるため当県で多用しているが、様々な泉質を有する温泉水等を利用した公衆浴場等においては、培養（+）LAMP（－）の不一致の結果が得られることがあり、その原因の解決が課題となっている。培養法と LAMP 法の不一致検体について、検討を行った。

比色系パルサー法（Fig. 1）については、測定に特殊な機器を必要としないことから、試験検査機関のみならず監視指導機関等での活用が期待される。100 倍濃縮検体 1mL を用いて実施された過去の結果では、培養法に対して感度が低かった [2)] ので、感度向上のための検討を行った。

B．研究方法

1.　材料および検査法

平成 28 年 8 月から 11 月に搬入された浴槽水および湯口水、20 施設 39 検体を対象とした。

検査法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した。すなわち、検水 1200mL をメンブランフィルター（直径 47mm、孔径 0.2μm、ADVANTEC 社、POLYCABONATE）で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 12mL 入りの滅菌コニカルビーカー（100mL 容量）に移し、ボルテックスミキサーにて 1 分間洗い出しをした。ろ過濃縮後の濃縮検体（未加熱と表記）と 50℃で 20 分加熱後、急冷した濃縮検体（加熱処理と表記）をそれぞれ濃縮試料（100 倍濃縮）とした。

2. 培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYOα 寒天平板（栄研化学）、GVPC 寒天平板（日研生物）、MWY 寒天平板（自家製；Oxoid）を用い、非濃縮処理の検水および各濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、その 200μL を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布し、これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36℃で培養した。本法における検出感度は 5cfu/100mL である。

培養 3 日目に、2 方向から光を照射し、実体顕微鏡下で各分離培地を観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYEα 寒天培地（自家製）及び血液寒天培地（ウマ血，自家製）に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、PCR 法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は 36℃で 7 日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、同様の同定検査を行った。最終的に同定されたコロニー数をもって検水 100mL あたりのレジオネラ属菌数に換算した。分離した菌株は、Legionella Latex Test Kit（OXOID）及びレジオネラ免疫血清（デンカ生研）を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

また、*L. pneumophila* SG1 と確認された分離株については *lag-1* 遺伝子の保有の有無について、Kozak ら [3)] のプライマーlag-F と lag-R を用い、PCR 法にて確認した。

3. LAMP 法

濃縮検体について、Legionella Detection Kit *E*（栄研化学）を用い、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行った。

培養陽性かつ LAMP 陰性であった検体については、当該抽出液に 1/10 量の陽性コントロールを添加し、蒸留水に同様にコントロールを添加したものと併せて再度測定を実施し、Tt 値を比較した。

4. 比色系パルサー法

次の 3 法で調製した溶菌液を用いて、添付の取扱説明書に従い、測定を実施した。方法①及び②の溶菌液については即日測定、方法③の溶菌液については、測定するまで 1 日～7 日間、－30℃で冷凍保存した。

（方法①）濃縮検体（未加熱）39 検体について、1mL を 12,000rpm（13,000×g）で 10 分遠心後、70μL を残して上清を除去し、変性液を 30μL 加えてボルテックスミキサーにて 1 分間混和後、37℃15 分間静置し、その後 10μL の中和液を加えて溶菌液を調製した（濃縮 1mL 溶菌液と表記）。

（方法②）濃縮検体（未加熱）39 検体について、2mL を 12,000rpm（13,000×g）で 10 分遠心後上清を除去し、さらに濃縮検体 2mL を加えて同条件で遠心後、70μL を残して上清を除去し、変性液 30μL を加えた後、方法①と同様に調製した（濃縮 4mL 溶菌液と表記）。

（方法③）濃縮検体に対応する非濃縮検水 39 検体について、各 100mL を注射筒を用いてメンブランフィルター（直径 13mm、孔径 0.22μm、Merck 社、混合セルロースアセテート）でろ過し、ろ過後のフィルターを 2mL チューブに移し、100/30 倍に希釈した変性液 100μL を加えてボルテックスミキサーで 1 分間混合後、フィルターを下にした状態で 37℃15 分間静置し、その後 10μL の中和液を加えて溶菌液を調製した（フィルター溶菌液と表記）。

C. 研究結果

1. 培養法

培養結果の概要を Table 1 に示した。39 検体中 15 検体（38%）からレジオネラ属菌が検出された。内訳は「掛け流し・非循環式施設」では浴槽水 12 施設 12 検体中 6 施

設 6 検体（50%）、湯口水 11 施設 11 検体中 4 施設 4 検体（36%）で、「循環式施設」では浴槽水 8 施設 12 検体中 2 施設 3 検体（25%）、湯口水 4 施設 4 検体中 2 施設 2 検体（38%）であった。

浴槽水と湯口水ともにレジオネラ属菌が検出された施設は 5 施設であった。浴槽水（＋）湯口水（－）となった施設、浴槽水（－）湯口水（＋）となった施設は各 1 施設であった（Table 2）。

検出された菌数を Table 3 に示す。菌数は最も多い検体で 500cfu/100mL であり、例年に比べて検出菌数は少なかった。

斜光法は培養 3 日目を判定日とし、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 15 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。一方、斜光法における検出菌と異なる種類・血清群の菌が継続培養後に検出された検体もあった。検出菌の血清群別の結果を Table 4 に示した。SG1 株が 1 施設の 2 検体から検出され、検査した 18 株全てが *lag-1* 遺伝子を保有していた。これは、平成 24 年から大分県の浴場水由来株の *lag-1* 保有調査を開始して以来、初めてのことである（Table 5）。

2. LAMP 法

濃縮検体 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行い、1 回でも陽性となった場合は、その結果を採用した（Table 6）。2 検体が培養（＋）LAMP（－）の不一致の結果となった。2 検体のレジオネラ属菌数は 5cfu/100mL、500cfu/100mL であり、共に *L. pneumophilla* が検出された。これら 2 検体について、陽性コントロールを添加した抽出液と蒸留水とで Tt 値に差はなかった。

3. 比色系パルサー法

濃縮 1mL 溶菌液（方法①）について実施した結果、39 検体中、培養法とパルサー法でともに陽性となったのは 12 検体、培養（－）パルサー（＋）となったのは 9 検体、培養（＋）でパルサー（－）の不一致の結果となったのは 3 検体であった（Table 7-1）。不一致の結果となった 3 検体は、フィルター溶菌液（方法③）で測定したところ、すべてパルサー法陽性となった。

濃縮 4mL 溶菌液（方法②）については、39 検体中、培養法とパルサー法でともに陽性となったのは 14 検体、培養（－）パルサー（＋）となったのは 10 検体、培養（＋）パルサー（－）の不一致の結果となったのは 1 検体であった（Table 7-2）。不一致の結果となった 1 検体は濃縮 1mL 溶菌液（方法①）においても陰性であった。この検体からは 500cfu/100mL のレジオネラ属菌が検出され、血清群は *L. pneumophilla* SG2 及び SG3 であった。

フィルター溶菌液（方法③）については、培養法陽性の検体は全てパルサー法陽性で不一致の検体はなく（Table 7-3）、濃縮検体 1mL に相当する非濃縮検水 100mL の使用で、非常に感度良く検出できた。しかし、ろ過に際して目詰まりが起こりやすく、多大な労力を要する検体が存在した。

D. 考察

斜光法は高価かつ特殊な機器を必要とせず、簡便で迅速な結果が得られる培養法として、非常に有用な方法である。培養 7 日以降で発育を認めるレジオネラ集落もあるため、培養 3 日目での陰性の判定はできないが、3 日目の時点で観察・同定し、速報することで、速やかな行政対応につなげることが可能となる。県保健所の適切な指導により、浴場水のレジオネラ属菌検出率、検出菌数は減ってきているものと思われる。少ない菌数のレジオネラ属菌が他の多数の菌に紛れているような状況でも、斜光法における特徴的なモザイク様の形態は、平板上に発育したコロニーを見分ける際の分かりやすい手がかりとなり、検査の迅速化だけでなく精度向上にもつながると考える。

浴場水由来の *L. pneumophila* SG1 株について、調査を始めた平成 24 年度以降初めて *lag-1* 遺伝子保有株が検出された。*lag-1* は県内のレジオネラ症患者由来株の多くが保有している因子である（データ非公表）。当該施設周辺に患者が増えているという状況はないが、今後動向に留意したい。

LAMP 法については、培養結果との不一致の原因について、陽性コントロールを添加した抽出液と蒸留水とで Tt 値に差はなく、今回の不一致の要因は検水による反応阻害ではないと考えられた。

比色系パルサー法については、濃縮水 1mL を測定した場合と比較して、使用する検水の量を増やした濃縮水 4mL 測定の場合は感度が良かった。フィルター溶菌液で実施した場合には、濃縮水 1mL に相当する非濃縮検水 100mL の測定で、濃縮 4mL 溶菌よりもさらに感度が良かった。濃縮溶菌液は調製の際に上清を除去するという工程が入るのに対し、フィルター溶菌液はフィルターに補足された菌をそのまま溶菌に供することができるため、ロスが生じにくかったと推察される。

比色系パルサー法の感度向上に、フィルター溶菌は有効と思われた。注射筒を用いて検水を圧縮ろ過する方法は大量多検体を同時に処理するには不向きである。しかし、特殊な機器を必要としないというパルサー法の利点を活かすには、ろ過においても高価な機器を使用しない方法が望まれる。注射筒を用いたろ過であれば、検査機器の揃っていない施設においても利用でき、保健所の監視担当課や浴用施設等での検査も可能になることから、少数の検体の繰り返し検査による衛生担保や迅速な衛生管理につながると考える。一方で、今回ろ過自体に非常に時間がかかる検体が存在したため、労力を軽減する方法の検討を要する。

LAMP 法と比較して、比色系パルサー法は培養法陰性の検体が陽性となる擬陽性が多かった。その理由としては、検出ターゲットが DNA と RNA で異なること、菌量が少ない場合のバラツキ（1 回の測定に供試する溶菌液の量が異なる）が考えられた。

E. 結論

培養法の迅速化、精度向上を図るにあたって、斜光法は有用である。斜光法を含めた標準的検査法を提示し、精度の高いレジオネラ属菌検査を普及するための研修システム確立に向け、今後の検討を図っていきたい。

また、機器の揃った検査機関以外でもレジオネラ属菌の検査が可能になることは、公衆浴場等の衛生管理の一助となる。注射筒とフィルターを用いた溶菌法により、監視指導機関等でも感度良くレジオネラの検査を行うことが可能となることが考えられ、比色系パルサー法の検討をさらに進めていく。

参考文献

1 森本　洋：分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性．日本環境感染学会誌，2010．25（1）：8-14

2 磯部　順子　他：レジオネラ属菌迅速検査法の評価．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）「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」　平成 27 年度総括・分担研究報告書：61-69

3 Kozak et al. : Distribution of lag-1 alleles and equence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. J Clin Microbiol. 2009. 47(8) : 2525-2535

F. 研究発表等

1. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig. 1　比色系パルサー法（出典：検査キット取扱説明書）

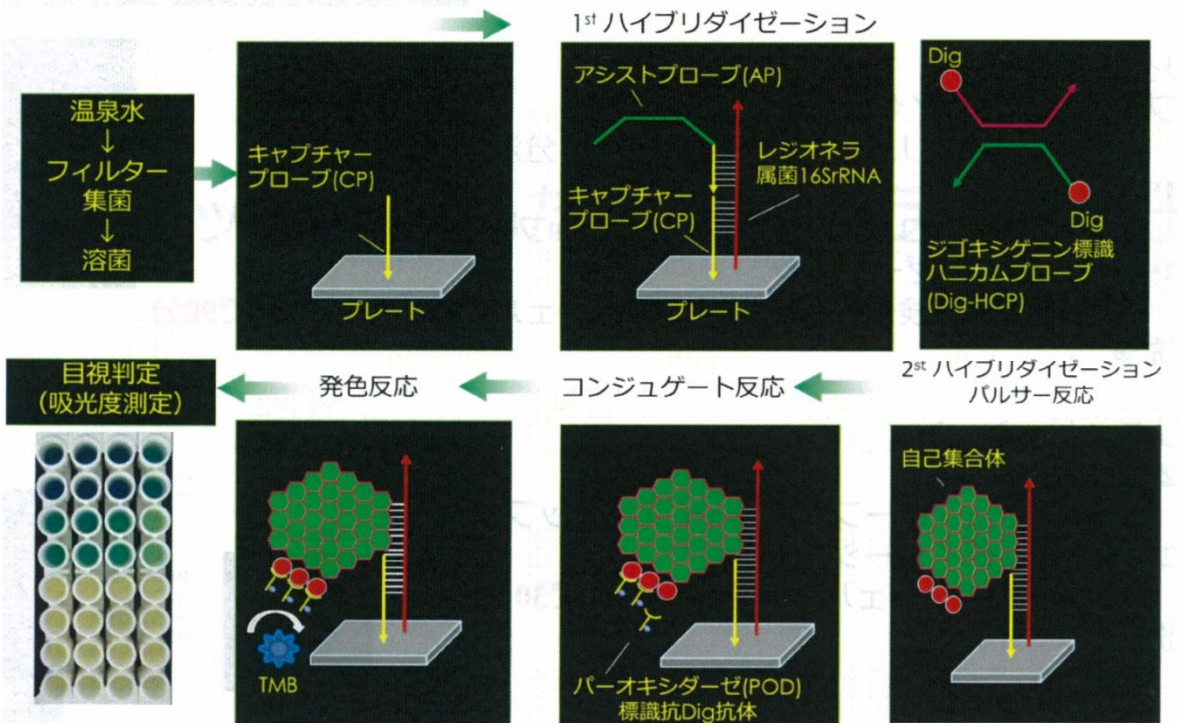


Table 1　培養法の結果

	採水箇所	検体数	検出数[a]	検出率
掛け流し式	浴槽水	12	6	50%
非循環式	湯口水	11	4	36%
循環式	浴槽水	12	3	25%
	湯口水	4	2	50%
計		39	15	38%

[a] 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 2　浴槽水と湯口水の検出状況　（n=15）

		浴槽水		計
		＋	－	
湯口水	＋	5	1	6
	－	1	8	9
計		6	9	15

10cfu/100mL によらない（定性）

Table 3　培養法の検出菌数別検体数（n=39）

菌数	検体数
5 未満	24
5－9	2
10－99	5
100－999	8
1000 以上	0
合計	39

Table 4 血清群別の陽性検体数（n=15）

血清群	検体数
SG1	2 (2)
SG2	4 (4)
SG3	4 (4)
SG4	1 (0)
SG5	1 (1)
SG6	2 (2)
SG7	1 (0)
SG8	2 (0)
SG9	1 (0)
SG12	1 (1)
SG15	5 (4)
SGUT	12 (12)

重複有り

( ) 内は斜光法で確認された検体数再掲

Table 5　**浴場水における 5 年間の *lag-1* 検出状況**

	***lag-1* 検出**		**SG1 検出**		**培養法検出**		**検査数**	
	施設数	**検体数**	**施設数**	**検体数**	**施設数**	**検体数**	**施設数**	**検体数**
H24 年	0	0	6	8	23	29	29	47
H25 年*	0	0	0	0	7	10	9	17
H26 年	0	0	4	4	15	22	28	56
H27 年	0	0	5	6	15	25	25	50
H28 年	1	2	1	2	8	15	20	39

*血清群データのある検体のみ計上

培養法は 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 6　LAMP 法と培養法の比較（n=39）

		LAMP		計
		＋	－	
培養法	＋	13	2	15
	－	3	21	24
計		16	23	39

培養法は 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 7-1　パルサー法（濃縮 1mL 溶菌液）と培養法の比較（n=39）（**方法①**）

		パルサー		計
		＋	－	
培養法	＋	12	3	15
	－	9	15	24
計		21	18	39

培養法は 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 7-2　パルサー法（濃縮 4mL 溶菌液）と培養法の比較（n=39）（**方法②**）

		パルサー		計
		＋	－	
培養法	＋	14	1	15
	－	10	14	24
計		24	15	39

培養法は 10cfu/100mL によらない（定性）

Table 7-3　パルサー法（フィルター溶菌液）と培養法の比較（n=39）（**方法③**）

		パルサー		計
		＋	－	
培養法	＋	15	0	15
	－	13	11	24
計		28	11	39

培養法は 10cfu/100mL によらない（定性）

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）

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究

平成 28 年度分担研究報告書

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

研究代表者　前川純子　　国立感染症研究所　細菌第一部
研究分担者　中西典子　　神戸市環境保健研究所　感染症部
研究協力者　田中忍　　神戸市環境保健研究所　感染症部
研究協力者　野本竜平　　神戸市環境保健研究所　感染症部

研究要旨：MLVA 法の特性として、安定性・迅速性・比較の容易性から、利便性の高い分子タイピング法となっている。*L.pneumophila* においても MLVA 法を適用し、従来の遺伝子型別法である SBT（Sequence based typing）法との比較を行うことで、MLVA 法の菌株の識別能力の評価し、感染源の特定のための迅速な遺伝子型別法としての有用性を検討することを目的とした。Sobral ら[1)]によって報告された 12 の MLVA 領域に関して、PCR 手法を改変し、利便性の高い MLVA タイピング手法を確立した。さらに、32 種類の ST(sequence type)の臨床分離株 47 株を用いて MLVA 法を行った結果、36 の MLVA タイプに分類され、MLVA 法は SBT 法と同等の識別能力があることが示唆された。また、MLVA 法によるタイピングは、SBT 法による ST と相関した樹形を描くことを見出した。以上の結果から、簡便な MLVA タイピングは、感染源の推定のための遺伝子型別の迅速なスクリーニングに期待できると考えられた。

A．研究目的

菌の遺伝子型別は感染源の解明に欠かすことはできない。従来、*L.pneumophila* の遺伝子型別は、SBT（Sequence based typing）法が用いられてきた。SBT法は、7つの遺伝子（*flaA*，*pliE*，*asd*，*mip*，*mompS*，*proA*，*neuA*）のシークエンスを行い、その塩基配列により型別を行う手法である。7遺伝子の中には、病原性遺伝子が含まれているため、他の細菌でのMLSTに比べ、菌株の識別能力は高い。しかしながら、SBT法は、時間・予算を要することが課題となっていた。そこで、SBT法よりも簡便で、かつSBT法と同等、あるいはそれ以上の識別能力をもつと期待されるMLVA法を導入することで、網羅的に*L.pneumophila*

の遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした。

B．研究方法

①菌株：リファレンスセンターで収集された既に ST(sequence type)が決定している臨床分離株を 47 株を用いた。32 種類の ST で分類されており、内訳は ST23:7 株、ST42:4 株、ST120:3 株、ST507:3 株、ST1:2 株、ST1187:2 株、その他 26 種類 ST:1 株である。

②MLVA： Sobral ら[1]によって報告された 12 領域(Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31,Lpms33, Lpms34,Lpms35, Lpms38,Lpms39, Lpms40, Lpms44)を用いた。表1のように蛍光標識したプライマーを用いて、4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR- A (Lpms01,Lpms31,Lpms33,Lpms35), PCR-B (Lpms03, Lpms13,Lpms19,Lpms34), PCR-C (Lpms38, Lpms39,Lpms40,Lpms44)とした(表 1)。PCR 反応は、QIAGEN Multiplex を用いた。PCR 条件は、95°C15 分後に 95°C 30 秒、60°C1 分、72°C70 秒を 35 サイクル行った。50 倍希釈した PCR 産物 1μl をサイズマーカー0.25μl(GeneScan 1200 LIZ Size Standard (PCR-A と PCR-B), GeneScan 600 LIZ Size Standard (PCR-C)) と Hi-Di Formamide(ABI)10μl に混合し、95°Cで 3 分加熱後、氷中条件で 2 分間急冷した。その後、AB3500 Genetic Analyzer にてフラグメント解析を行った。得られたデータは 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。また、フラグメント解析におけるリピート数のコントロールとして、ゲノム解読済みの *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* Philadelphia 1 の DNA を用いた。得られた MLVA 型による株間の類縁関係を明らかにするために、BioNumerics Ver4.2 を用いて、Minimum spanning tree (MST) を作成した。

C．研究結果

① MLVA 法の最適化

Sobral ら[1]によって報告された 12 領域に関して、4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR に改変した。さらに、primer 濃度を最適化することで、4 領域がきれいに増幅される条件を決定した（表 1)。

臨床分離株を用いた解析から、Lpms01 (repeat unit size:45bp), Lpms3 (repeat unit size:45bp), Lpms33 (repeat unit size:125bp)領域は、リピート数において intermediate-size の株が存在した。

② MLVA における臨床分離株の遺伝学的特徴

臨床分離株 47 株は 36 の MLVA 型に分類された。47 株中 16 株（34%）が、同一の MLVA 型 No.1 から No.5 に属していた（表 2)。MVA 型 No.1 から No.4 は、異なる ST が同一 MLVA 型を示した。47 株の MLVA 型の株間の類似性を Minimum

spanning tree（図 1）で示した。MLVA タイピングにおける樹形は、SBT 法による ST とある程度相関した樹形となった（図 1）。

MLVA 型 No.1 と MLVA 型 No.3 は 2 ローカス違いで存在していた（図 1）。これら MLVA 型に属する ST120，ST1187，ST1847，ST507 は、*mip* 遺伝子の 1 遺伝子座違いの菌株集団であった。さらに、MLVA 型 No.2 と MLVA 型 No.4 は 1 ローカス違いで存在していた（図 1）。MLVA 型 No.2 に属する ST23 と ST507 は、*asd* 遺伝子の 1 遺伝子座違いであった。しかし、MLVA 型 No.4 に属する ST555 と ST1924 は、*neuA* 遺伝子のみしか一致しておらず、6 遺伝子座が異なっていた。

ST23 は 4 種類の MLVA 型、ST507 は 3 種類の MLVA 型に分かれた。ST1 は、1 ローカス違いの 2 種類の MLVA 型が存在した。ST42 は、2 ローカス違いの 3 種類の MLVA 型に分かれた。

D. 考察

32 種類の ST の臨床分離株 47 株が 36 種類の MLVA 型に分類されたことから、MLVA 法は SBT 法と同等の識別能力があることが示唆された。類似性の高い ST の菌株は、MLVA 型における MST 解析でも近隣に存在していることから、ST と MLVA 型がある程度相関していると考えられる。SBT では、分離場所により遺伝子型の分布や頻度が異なることが見出されているが、MLVA タイピングにおいても同様の傾向が見られると考えられるが、今後サンプルを増やし検討する必要である。また、同一 ST においても、MLVA 型は細分化される可能性を示唆した。しかしながら、MLVA 型 No.4 に関しては、6 遺伝子座が異なる ST が同一 MLVA 型を示しており、遺伝子型別の手法間の相違点についても、検討していく必要があると考えられた。

E. 結論

MLVA 領域の特性明らかにし、利便性の高い MLVA タイピング手法を確立した。MLVA タイピングは従来法の SBT タイピングとある程度相関があり、感染源の推定の菌株の迅速なスクリーニングに期待できると考えられた。

謝辞

今回解析した分離株を分与くださった内田順子（香川県環境保健研究センター）、川上慶子（石川県保健環境センター）、金谷潤一（富山県衛生研究所）、小堀すみえ（さいたま市健康科学研究センター）、清水麻衣（京都市衛生環境研究所）、中嶋 洋（岡山県環境保健センター）、野田万希子（岐阜県保健環境研究所）、福司山郁恵（熊本県保健環境科学研究所）細谷美佳子（新潟県保健環境科学研究所）、松永典久（福岡市保健環境研究所）、宮下安子（川崎市健康安全研究所）、山口友美（宮城県保健環境センター）、吉野修司（宮崎県衛生環境研究所）、渡辺祐子（神奈川県衛生研究所）（敬称略）の諸氏に感謝いたします。

参考文献

1) Sobral D, Le Cann P, Gerard A, Jarraud S, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C. 2011. High-throughput typing method to identify a non-outbreak-involved Legionella pneumophila strain colonizing the entire water supply system in the town of Rennes, France. Appl Environ Microbiol. 77:6899-6907.

F. **研究発表**

1．学会発表

1）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.

G. **知的財産権の出願・登録状況**

なし

表1. 解析したMLVA領域とプライマー配列

Multiplex PCR	MLVA locus	primer	Sequence (5′→3′) (Labeling)	repeat size (bp)	Primer concn (pmol)
A	Lpms01	Lpms01F	(NED)-TGAATTTCTCCCTCTTGCTTG	45	5
		Lpms01R	GCATATGACAAAGCCTTGGC		
	Lpms31	Lpms31F	(FAM)-CCTCGCAAGCCTATGTGG	45	5
		Lpms31R	ATCGCCTAATTGCCGCCTA		
	Lpms33	Lpms33F	(VIC)-GACACCACAGCAGTTTGAAC	125	1.25
		Lpms33R	CGAGGAAATCTTCTTCAGCC		
	Lpms35	Lpms35F	(PET)-GAATCTGAAACAGTTGAGGATG	18	1.25
		Lpms35R	TATCAACCTCATCATCCCTG		
B	Lpms03	Lpms03F	(VIC)-GGACAAACAACCAATGAAGC	96	5
		Lpms03R	TGATGGTCTCAATGGTTCCG		
	Lpms13	Lpms13F	(NED)-CTCACCAGGATGCTTTGTCG	24	5
		Lpms13R	GCATCGGACTGAGCAAAGTA		
	Lpms19	Lpms19F	(PET)-GAACTATCAGAAGGAGGCGA	21	1.25
		Lpms19R	TCCAGAGGCTCTGGATTATC		
	Lpms34	Lpms34F	(FAM)-AAGGAATAAGGCGCAGCAC	125	1.25
		Lpms34R	ATGCAGGATGTTTGCGCATG		
C	Lpms38	Lpms38F	(NED)-CCTATCAACAGATGACGCTT	8	2
		Lpms38R	GGATTGCCTTGGGCATTAAT		
	Lpms39	Lpms39F	(PET)-CTTGACGAAGTAGGTGTGGG	6	2
		Lpms39R	CCAACTCCTCAACGCAACAA		
	Lpms40	Lpms40F	(FAM)-TAGATCTCTTGCCGAGCTTC	6	2
		Lpms40R	TTACCCAAGCCCTTATTGCG		
	Lpms44	Lpms44F	(VIC)-GCTACTGCAGCAACATCC	6	2
		Lpms44R	TTATGCGAGAGTTTCATGA		

表2：同一MLVA型を示した株のSTとMLVAプロファイル

MLVA No.	Size	ST(No. of isolate)	PCR-A				PCR-B				PCR-C			
			Lpms01	Lpms31	Lpms33	Lpms35	Lpms03	Lpms13	Lpms19	Lpms34	Lpms38	Lpms39	Lpms40	Lpms44
1	5	ST120 (3), ST1187(2)	7	13	4	25	7	5	4	3	19	20	5	9
2	5	ST23(4), ST507(1)	8	13	4	27	7	11	4	3	3	20	5	9
3	2	ST1847(1), ST507(1)	7	12	4	25	7	5	4	3	3	20	5	9
4	2	ST550(1), ST1924(1)	8	13	4	27	7	0	4	3	3	20	5	9
5	2	ST42(2)	7	12	3	12	8	9	5	1	3	0	4	9

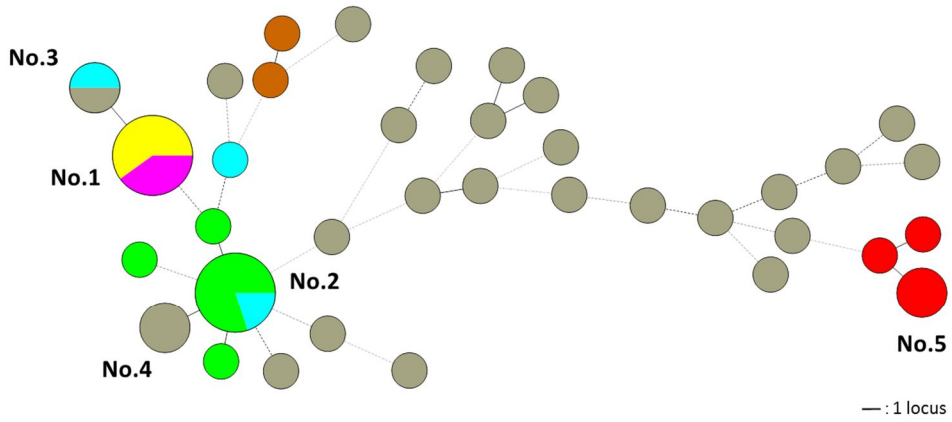


図1：Minimum spanning tree法による*L. pneumophila* 臨床分離株47株のMLVA型の類縁関係
一つの円が一つのMLVA型を示し、円の大きさはそれぞれのMLVA型を有する株数に比例している。枝の長さは、互いのMLVA型の遺伝子座の差異数に比例している。3ローカス以上の違いは、点線で示した。色分けは、ST 23（緑色）、ST42 （赤色）、ST120（黄色）、ST507（水色）、ST1（茶色）、ST1187（ピンク）、その他のST（灰色）とした。表2のMLVA型No.を示した。

平成 28–30 年度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
「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」
平成 28 年度分担研究報告書

「原湯等の糞便汚染指標菌及び検査法について」

研究代表者	前川純子	国立感染症研究所
○研究分担者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
研究分担者	森本　洋	北海道立衛生研究所
研究分担者	磯部順子	富山県衛生研究所
研究協力者	緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター
研究協力者	倉　文明	国立感染症研究所

研究要旨

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

A. 研究目的

公衆浴場における水質基準等に関する指針においては、原湯、原水、上り用湯及び上り用水（以下「原湯等」）の水質基準は、

ア 色度は、5 度以下であること。

イ 濁度は、2 度以下であること。

ウ 水素イオン濃度は、pH 値 5.8～8.6 であること。

エ 過マンガン酸カリウム消費量は、10mg/L 以下であること。

オ 大腸菌群（グラム陰性の無芽胞性の桿〈かん〉菌であって、乳糖を分解して、酸とガスを形成するすべての好気性又は通性嫌気性の菌をいう。）は 50mL 中

に検出されないこと。

カ レジオネラ属菌は、検出されないこと（10cfu/100mL 未満）。

と定められている。また、検査法は

ア 色度、濁度、水素イオン濃度、過マンガン酸カリウム消費量及び大腸菌群の検査方法は、それぞれ「水質基準に関する省令」（平成 4 年厚生省令第 69 号）で定める検査方法によること。

イ レジオネラ属菌の検査方法は、冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること。また、その具体的手順は、「新版レジオネラ症防止指針」の「＜付録＞１環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること。

とされている。

一方、水道法第４条に基づく水質基準は、平成 15 年 5 月 30 日に水質基準に関する省令（厚生労働省令第 101 号）が発出され、新たな基準が定められた。新しい基準では、大腸菌群は大腸菌に変更され、検査法も新たに規定された。

そこで、変更後の水質基準で規定された検査法を原湯等に適用することの妥当性を検討した。

B. 方法

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

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

C. 結果及び考察

１）水道の水質基準における「大腸菌群」から「大腸菌」への改定の経緯

水道水の水質基準の改定は、消毒副生成物として種々の化学物質の問題が提起されていること、クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原性微生物の問題が提起されていること、世界保健機関(WHO)が飲料水水質ガイドラインを全面的に改定すべく作業を進めていること、規制改革や公益法人改革の流れの中、水質検査についての見直しなど水道水質管理の分野においても、より合理的かつ効率的なあり方を検討すべきことが求められていることにより、平成 14 年 7 月 24 日に厚生労働大臣から厚生科学審議会に対して水質基準の見直し等についての諮問がなされた。これに対して厚生科学審議会生活環境水道部会の 4 回の開催と、厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会における 9 回の協議を経て、平成 15 年 4 月 28 日に厚生科学審議会から答申があり、これを踏まえて厚生労働省として水質基準等に係る制度の制定・改正が行われた。

水質基準の改定の協議を行った厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、糞便汚染指標菌としての大腸菌群、大腸菌のそれぞれの有用性等についての確認が行われ、大腸菌群を大腸菌に変更することについての検討が行われた。

第 2 回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、水質基準設定に当たっての考え方を再確認する目的で、微生物に係る基準項目についての基本的考え方を整理し、大腸菌群の定義と基準を以下のようにまとめた（文献 1）。

定義：グラム陰性、無芽胞の桿菌で乳糖を分解して酸とガスを生じる好気性または通性嫌気性の菌をいう。大腸菌群には人畜の糞便に由来するものと、土壌等に由来するものがある。従って、大腸菌群の存在自体が直ちに糞便性汚染を意味するものではないが、病原生物により汚染されている疑いを示している。

基準値：人畜の排泄物等による汚染度を示す指標であることから、病原生物により汚染されていることを疑わせない値として、現行どおり検出されないこと。

第 3 回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、水質に関する基準の見直し等に係る基本的考え方が提示された（文献 2)。水道水を介して伝播する病原微生物は主に腸管系の病原微生物であり、糞便による水の汚染が原因となる。そのため、糞便性汚染指標として「大腸菌群数」が、現存量指標（また塩素消毒が適正に行われているか否かの判定指標）として「一般細菌」が規定されているとした。さらに、最新の知見に照らして見直されるべきであるとし、専門委員会において指標としての「大腸菌群」の再評価を行うこととした。具体的には、「大腸菌群」に替えて糞便由来である「大腸菌」を水質基準とすることの是非を協議するという、微生物指標に関する委員会の方向性が示された。

第 4 回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、委員会委員以外の微生物学の専門家等の協力のもとに行われた微生物指標に関する協議の内容が提示された（文献 3)。以下にその概要を示す。

大腸菌群：*Escherichia* 属、*Citrobacter* 属、*Enterobactor* 属および *Klebsiella* 属からなる細菌群で、環境が整えば外界でも増殖することができる。そのため、糞便汚染としての特異性を欠き、糞便汚染との因果関係に乏しく、必ずしも糞便汚染の指標として精度が高いとはいえない。大腸菌群を糞便汚染指標とするのは大腸菌群の方が大腸菌あるいは他の糞便性指標微生物よりも多数存在するため、安全側の指標検査方法とされるからである、との意見がある。しかしながら、指標的価値の高さと数の多さのいずれかを選択するかは議論の余地がある。大腸菌群が検出される状況では、数の上で糞便性大腸菌群が大多数を占める場合が一般で、検出が容易である。菌量が多く、環境中で大腸菌よりも長命であることから、ある程度時間の経過した、あるいはより遠くの発生場所での糞便汚染を表現し得る。検査法としては、大腸菌群と大腸菌を同一の培地で同時に検出することができる。

大腸菌：人および動物の糞便から検出され、外界での増殖が無いことから糞便性の指標としての信頼性が高い。クリプトスポリジウムの暫定対策指針で、大腸菌が糞便汚染、ひいてはクリプトスポリジウム汚染の可能性を示す指標と位置付けられており、これらとの整合性を図る必要が

ある。他の糞便指標細菌と比べると環境中での生存期間が短く、塩素に対して感受性が高いことから用途が限られるとの説もある。他の糞便指標細菌と比べると環境中での生存期間が短いため、より特異的である。「特異性が高い分、検出量が少ない？」という問題点がある。

第 6 回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、「大腸菌群」を「大腸菌」に替えることについて、以下のように議論が行われた（文献 4)。水質基準項目である「大腸菌群」の再評価を行ったところ、「大腸菌群」に代えて直接的に糞便由来である「大腸菌」を水質基準とし、水質基準項目として「大腸菌」: 検出されないこと （ただし、検水量は 100ml）とすることが適当であるとされた。その理由として、大腸菌群が採用されたのは、単に旧来の培養技術が制約となっていたにすぎず、大腸菌群を代替指標として用いてきたが、糞便汚染の指標性は低い。水道水の品質保証という観点から糞便汚染の検知には高い精度が求められ、大腸菌は糞便汚染の指標として適当と判断される。今日では迅速・簡便な大腸菌の培養技術が確立されており、技術的問題は解決されている。大腸菌の検査方法は、(1)乳糖ブイヨン－ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地法、(2)特定酵素基質培地法のいずれかの方法によることが案として示された。この案に対して、委員会で特定酵素基質法による大腸菌の検査についての協議が行われた。特定酵素基質法はすでに複数のメーカーの製品が評価されており、試験法として問題がないことが確認され、特定酵素基質培地法を採用することが決定した（文献 5)。

2）「大腸菌」を基準として原湯等への適用とその検査法の妥当性

水道水の糞便汚染の指標菌を大腸菌群から大腸菌に変更した経緯は、厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会における議論に示されたとおりである。検査法が進歩した現在では、大腸菌を検出することが容易になり、糞便汚染指標として大腸菌の有無を水質基準とした。これを原湯等の水質基準とすることに問題はないと考えられる。

水道水及び水道原水・表流水を対象として、乳糖ブイヨン－ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地法（LB-BGLB 法）と特定酵素基質法を比較した場合、特定酵素基質法は LB-BGLB 法と同等あるいはそれ以上の感度で大腸菌群及び大腸菌を検出することができると報告されている（文献 6-9)。特に、大腸菌の検出は高い一致率を示している。さらに、特定酵素基質法は LB-BGLB 法に比較して操作が簡単で、結果が得られるまでの時間が短縮されるという利点も備えている。

水道水や水道原水、表流水を対象にした特定酵素基質法と従来法の比較による評価を行った調査は数多くあるが、温泉水を対象として LB-BGLB 法と特定酵素基質法を比較検証した報告は少ない。しかし、特定酵素基質法は温泉水を対象にしても LB-BGLB 法と同等の結果が得られることが報告されている。すなわち、渕らが飲用温泉水を対象にして検討した報告(文献 10)によれば、LB-BGLB 法と特定酵素基質法で

あるMMO法及びX-GAL法を比較したところ、飲用泉での3法の一致率は90.0%であった。

3）特定酵素基質法の適用の問題点

特定酵素基質法はLB-BGLB法と同等の性能を有していることが報告され、また、操作が容易であるという利点がある。その一方で、特定酵素基質法の問題点が指摘されている。原湯等のように様々な性状を示す水試料では使用に際して留意が必要である。既に報告されている留意点を記載する。

銅を20 ㎎/L あるいはH_2Sを52.6 ㎎/L を含む試料では、特定酵素基質法で大腸菌群及び大腸菌の発育が阻害され、発色反応を呈さなかった（文献10）。X-GAL法の場合、低pHあるいは高塩濃度の試料では発色反応が遅延する場合がある（文献9, 10）。判定が困難になるほどではないが、強い着色と強混濁を示した天然温泉水の検査では、大腸菌群の判定が困難になるケースがMMO法で数例認められた（文献10）。*Aeromonas*属や*Vibrio*属の海洋細菌を含む水試料を検査対象とすると、β－グルクロニダーゼ陽性菌があり、大腸菌群が偽陽性となることが報告されている（文献11, 12）。また、海水中にはβ－グルクロニダーゼ及びγ－ガラクトシダーゼ活性を持つ藻類等が含まれ、大腸菌が偽陽性となる場合がある（文献12）。

D. まとめ

糞便汚染の指標として大腸菌群を大腸菌に変更することは、検査技術の進歩に伴って妥当であるとされている。特定酵素基質法は、従来より用いられているLB-BGLB法と同等あるいはそれ以上の感度で大腸菌を検出することが可能であるとして、水道水の水質基準の微生物汚染（大腸菌）の検査法として採用されている。従って、原湯等における糞便汚染の指標として大腸菌群を大腸菌に変更することは、水道水の水質基準と同様に妥当であり、検査法も特定酵素基質法を適用することができると思われる。ただし、原湯等の性状は水道水よりも多様であり、その性状によっては偽陽性あるいは偽陰性を呈することがあり、注意を要する。

E. 参考文献

1. 第2回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成14年9月4日　資料 6-1　現行の水質基準の考え方について
2. 第3回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成14年10月7日　資料 2 水質に関する基準の見直し等に係る基本的考え方（素案）
3. 第4回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成14年11月8日　資料 2-1 微生物に係る基準の考え方（案）
4. 第6回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成15年2月3日　資料２ 微生物に係る基準について
5. 第6回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成15年2月3日　議事録
6. 高野敬志、他：「特定酵素基質法」および「LB-BGLB 法」による大腸菌群試験結果および陽性分離菌から考察した両試験方法の一致率について　北海道立

衛生研究所報　1995;45:54-57.
7. 上田修、他：水質検査における酵素基質培地の適用と本培地により検出された大腸菌群の菌種の検討　日本食品微生物学会雑誌　2003;20:111-116.
8. 渕祐一、他：飲料水大腸菌群試験における MMO-MUG 法と従来法との比較検討　大分県衛生環境研究センター　1993;21:50-53.
9. 勢戸和子、他：大腸菌群および大腸菌検査におけるフルオロカルト・ラウリル硫酸 X-GAL ブイヨンの評価　日本食品微生物学会雑誌　1996;13:69-73.
10. 渕祐一、他：発色酵素基質培地の飲用温泉水への適用　－LB-BGLB 法と発色酵素基質培地法との比較－　日本食品微生物学会雑誌　1998;15:153-160.
11. Palmer CJ, Tsai YL, Lang AL, Sangermano LR.: Evaluation of colilert-marine water for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in the marine environment. Appl Environ Microbiol. 1993;59(3):786-90.
12. 井山洋子、磯部順子：コリラート・MW による海水域の大腸菌群測定について　富山県衛生研究所年報　1995;18:143-150.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚労科研（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「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」
平成 28 年度　分担研究報告書

研究分担者　国立感染症研究所　寄生動物部　八木田健司
研究協力者　国立感染症研究所　寄生動物部　泉山信司

レジオネラ感染とアメーバ
レジオネラ属菌感染促進物質の探索

研究要旨：
1. レジオネラ属菌の宿主アメーバ感染における感染促進物質の探索を行った。
2. 探索物質の条件として、極性、荷電、親水性に影響を及ぼす可能性のあるものとし、単一あるいは数個の分子からなる低分子量のものから、高分子糖鎖（分子量数万以上）のものを調べた。
3. 低分子量の物質には感染性に対する影響が見られなかった一方、高分子糖鎖にヘパリンと同等の感染促進作用が認められた。この促進作用がみられたのは、ヘパリン、コンドロイチン硫酸およびデキストラン硫酸で、硫酸基を分子構造中に一定の割合で含む硫酸化多糖であった。同じ高分子糖鎖で非硫酸化多糖のヒアルロン酸は、逆に感染抑制の作用を示した。
4. 硫酸化多糖類には環境中の難培養性レジオネラ属菌をアメーバ培養法でサルベージできる効果があることが期待された。

A. 研究目的

これまでの研究で、レジオネラ属菌のアメーバ感染における各種の糖鎖分子および糖鎖特異的レクチンによる抑制および促進効果を明らかにし、糖鎖の関与する受容体を介した感染機構の存在を示唆する結果を得た。また糖鎖の中でも高分子糖鎖であるヘパリンに高い感染促進効果があるという興味深い知見も得た。ヘパリンは硫酸基をもつ多糖（硫酸化多糖）に分類され、負電荷、酸性そして親水性という性質をもつ。レジオネラ属菌はその菌体表面を覆う LPS（リポポリサッカライド）の特性から、菌体表面の強い疎水性が想定されている。ヘパリンの感染促進作用は、受容体反応を修飾し、これを強化するのか、あるいは別の非特異的な取り込み反応を促進するのか、あるいはその両者なのか、これまで不明である。作用機序は不明であるが、ヘパリンのような、レジオネラ属菌のアメーバ感染を促進する物質の存在は、アメーバを利用したレジオネラ属菌の環境からの分離、増殖法に大いに有用となることが期待される。そこで本年度はヘパリンと同様な感染促進効果を有する物質の探索を目的に研究を進めた。

B. 研究方法

1.　レジオネラ属菌株

L. pneumophila SG1 378 株（Lp と省略）を用いた。菌株は BCYE α 培地にて 30℃で培養し実験に供した。

2. アメーバ株

A. castellanii 1501/10 株を用いた。培養は無菌培養用 PYGC 培地を用い、30℃で、培地を 2-3 日毎に交換し新鮮な栄養体を実験に供した。

3.　菌のアメーバ感染性試験に用いた物質

親水性等を付与する可能性のある物質として以下の物質を用いた。低分子量：TritonX100、DMSO（ジメチルスルフォキシド）、サポニン、タウリン、グルタチオン、高分子量：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

4. アメーバに対する Lp 感染試験

PYGC で培養したアメーバをフラスコより剥離し、

PBS(-)で遠心洗浄後、さらに 10xAS で遠心洗浄を行い、10xAS で 1x10^5/ml に細胞浮遊液を調整した。24 ウェルマイクロプレートウェル内に浮遊液を 0.5ml 入れ、1 時間培養しアメーバをプレートに接着させた。被検物質は 10xAS で希釈し、試験濃度に調整した溶液 300μl をマイクロプレート内の 10xAS と置換し、1 時間 30℃でアメーバを培養した。なお、対照実験には 10xAS を用いた。

Lp は 10xAS で 0.1OD に調整し、その 30μl をマイクロプレートのアメーバ培養ウェルに加え、静かに撹拌し 30℃で 3 時間培養した。その後 50μg/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。さらに培養を継続し、感染 18 時間後にプレート底面全体を氷水上につけアメーバを剥離し、アメーバ浮遊液を回収、遠心(500rpmx3 分間)で浮遊する菌を分離除去した。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。

5. 死菌を用いた感染実験

10xAS で 0.1OD に調整した Lp の浮遊液 200μl を、ヒートブロックを用いて 90℃、15 分間加熱処理した。その 30μl を用いて、マイクロプレートのアメーバ培養ウェルに加え、静かに撹拌し 30℃で 3 時間培養した。その後 50μg/ml となるように gentamycin を添加した。なお菌の不活化をみるために BacLight による染色を行い、蛍光顕微鏡にて死菌の確認を行った。

6. gentamicin 存在下での感染実験

アメーバのレジオネラ属菌感染を 3 時間で終了させるために行う gentamicin 処理において、gentamicin 存在下での菌感染が生じないことを確認するために、10xAS を対照として、gentamycin 50μg/ml 存在下で上記同様の方法でレジオネラ属菌感染実験を行った。

C. 研究結果

低分子化合物の効果

今回用いた低分子物質の存在下でのレジオネラ属菌感染の結果(相対感染率)を表1にまとめた。界面活性作用等細胞膜作用のある物質を試験するため、予備実験でアメーバの生理的、形態的変化が生じない濃度を確認後、試験を行った。10xAS で 10-20%の感染率が見られた菌は、感染促進効果の比較対照として調べたヘパリン 1000U/ml の存在下で感染率は約 2 倍に上昇した。

この菌に対し、親水性と疎水性をつなぐ界面活性効果のある TritonX100 およびサポニン、極性溶媒で親水性を付加すると考えられるDMSO、ヘパリン同様分子内に硫黄を含む物質タウリン、グルタチオン(還元型)は、いずれも対照である 10xASとの間に感染率に差は認められなかった。

高分子多糖類の効果

今回用いた高分子多糖類の構造と分子量、またそれらの存在下でのレジオネラ属菌感染の結果(相対感染率)を表 2 にまとめた。10xAS で 10-20%の感染率が見られた菌は、ヘパリン 10mg/ml の存在下で感染率は約 2 倍に上昇した。その他に感染率の上昇がみられたのは 10mg/ml の条件でコンドロイチン硫酸 B およびコンドロイチン硫酸 C およびデキストラン硫酸であり、その感染率上昇の度合いはヘパリンとほぼ同様であった。いずれの多糖も 1mg/ml の条件では感染率に対照と差は見られなかった。一方、ヒアルロン酸 10 mg/ml は明らかに感染率の低下が認められ、しかし 1 mg/ml では対照と差は見られなかった。なお試験した各多糖類溶液のpH は 6.8-6.9 であり、培養中のアメーバに形態的な変化は認められなかった。また試験した多糖類には分子構造上粘性が生じ、ヒアルロン酸は特に強い粘性を生ずるが、マイクロプレートウェル内の試験溶液中のレジオネラ属菌の分散度合いは対照と各種多糖類溶液との間に大差は観察されず、粘性の影響は極めて低いものと推察された。

感染促進作用のみられるヘパリンの作用機序を知るために、アメーバとレジオネラ属菌を各々優先的にヘパリン処理した場合の感染率の結果を図 1 に示した。アメーバを 10 mg/ml のヘパリンで前処理後洗浄した場合、感染率は対照と差がなく、また 10 mg/ml でヘパリン処理したレジオネラ属菌を洗浄せずに感染させた場合、これとヘパリン濃度が同じ(1 mg/ml)であるアメーバ前処理の場合と感染率に差がみられなかった。

死菌を用いた感染実験

結果を表 3 に示した。10xAS に対し約 40%の感染率を示し、ヘパリン存在下では約 2 倍の感染率上昇を示した菌は、90℃で 15 分間の加熱処理後、

その感染率は0. 1%に減少し、ヘパリン存在下でも感染率の回復は認められなかった。加熱処理後の菌はBacLightによる染色ですべて赤色蛍光に染色されており、死菌と判断された。光学顕微鏡レベルでの形態的な変化は特に観察されなかった。

gentamicin 存在下での感染実験

結果を表 4 に示した。10xAS に対し約 64%の感染率を示し、ヘパリン存在下では約1.4倍の感染率上昇を示した菌は、菌の感染開始時から 50μg/ml gentamicin の存在下で菌を感染させたところ、感染率は約 0.2%であった。また感染率はヘパリンにより約1%に上昇した。

D. 考 察

前年度研究では、菌とアメーバの感染において、糖鎖分子の関与する受容体が感染の一端を担っていることが示唆された。また抗血液凝固作用が一般的に知られるヘパリンが感染促進効果を示すという結果は、その分子構造の巨大さから、一般的な受容体反応とは異なり、特異性の低い、いわゆるアメーバやマクロファージなどの貪食細胞の示す異物取り込み反応に近い感染の様式もある可能性が示唆するものであった。そこで本研究では効率的なレジオネラ属菌のアメーバ感染方法の確立という目的も踏まえ、このヘパリン様効果に注目し、これを有する物質のさらなる検索を進めた。特に親水性を付与する効果に関して、低分子、高分子物質を選択しその効果を調べた。その結果、低分子の被検物質は感染の抑制および促進のどちらの効果も明らかではなかったのに対し、高分子の被検物質の中にヘパリン同等の感染促進効果が認められるものを見出した。この促進効果の見られた物質は、一般的に硫酸化多糖と称されるもので、構成する単糖の種類は異なるものの、それらの連続した多糖分子構造の中に一定の割合で硫酸基を含むことにより、強い保水力、すなわち親水性を示すという共通した特徴がある。本研究では、硫酸基を含まない多糖としてヒアルロン酸のみ試験に供したが、ヒアルロン酸は逆に感染抑制の効果を示すという結果となった。この同じ高分子多糖類でありながら抑制という他の硫酸化多糖類とは正反対の結果について、部分的にではあるが説明を試みるならば、硫酸基を介した菌とアメーバの相互作用の不在と、ヒアルロン酸高分子構造による物理的な特異的受容体反応のマスク効果が考えられる。高分子糖鎖の硫酸基が感染に重要な影響を与える要因となるかどうかは、ヒアルロン酸以外の硫酸基をもたない糖鎖分子についての検証が必要であろう。

明らかに感染を促進するというヘパリンの作用が、アメーバか、あるいはレジオネラ属菌のどちらに働いているのかを調べた結果では、ヘパリンのアメーバおよび菌への結合力が低いことが原因と考えられるが、明確な答えは得られなかった。ヘパリンは抗血液凝固作用等にみられるタンパク質との結合が、その一般的な生理作用として知られ、pH やイオン環境がその作用に影響する。ヘパリン等硫酸化多糖類の作用機序を考えるには、タンパク質との結合性を想定した解析がさらに必要と考えられた。

アメーバに対するレジオネラ属菌感染では、菌の培養日数の増加とともに感染率が低下する。と同時に、感染した菌の細胞内での増殖性の低下も見られる。即ち単独あるいは分裂回数が少ない段階の菌として観察される。本研究で加熱処理した菌は取り込まれるとしても細胞内に残存しないこと、また Gentamicin 添加は菌の感染を極めて強力に抑えることが明らかにされたことから、感染後にアメーバ内に観察される多数の単独性の菌は生きており、ただ分裂を停止している状態と考えられる。これが所謂VNC (viable but not culturable) 状態の菌と考える証左は現状得られていないが、これまでの研究でのデータより、この単独で細胞内に存在する菌の割合を再解析したところ、ヘパリン存在下で、このようなアメーバ内に単個に感染 (あるいは単に取り込まれる可能性もあるが) する菌も多くなることが分かった (図 2)。分裂能力が衰え培養による検出が困難な菌であっても、アメーバを用いた培養によりアメーバ内にサルベージが可能で、これによりこれまで実態として把握が困難であった難培養性のレジオネラ属菌の検出、確保が可能となるのではないかと考えられる。今後はこのような単個に感染する菌の細胞内増殖を促進する因子を明らかにし、難培養性の菌のアメーバ内培養を可能にする方法を開発する。

E. 結 論

レジオネラ属菌のアメーバ感染において、分子内に硫酸基を含む硫酸化多糖類が感染促進効果を有することが示された。この硫酸化多糖類には、分裂能力が衰え難培養性に陥った菌をサルベージできる可能性があり、これをさらに応用開発する

ことにより、実態把握が困難であった難培養性レジオネラ属菌の実態が明らかになることが期待される。

F. 健康危険情報　なし

G. 研究発表

1.　論文発表 なし

2.　学会発表　なし

H. 知的財産権の出願･登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得　なし

2. 実用新案登録　なし

3. その他　なし

表 1、レジオネラ属菌のアメーバ感染における低分子物質の効果

試験物質	濃度	相対感染度	分子量
10xAS	—	1.0	—
ヘパリン*	1000U/ml	7.6	表 2 参照
Triton X100	0.001 %	0.7	647
DMSO	0.01%	0.5	78.13
	0.001%	0.5	
サポニン（大豆）	0.01%	0.3	943.12
	0.001%	0.5	
10xAS	—	1.0	—
ヘパリン	1000U/ml	2.9	表 2 参照
タウリン	100mM	1.1	125.15
グルタチオン	10mM	1.0	307.33

＊感染促進効果の比較対照として調べた

表 2、レジオネラ属菌のアメーバ感染における高分子物質の効果

試験物質	濃度	相対感染度	分子構造（ウロン酸･アミノ糖） 分子量
10xAS	—	1.0	
ヘパリン	10mg/ml	2.0	グルクロン酸/イズロン酸–グルコサミン 6,000～20,000
コンドロイチン硫酸 B （デルマタン硫酸）	10mg/ml	2.0	イズロン酸-アセチルガラクトサミン 60,000～150,000
	1mg/ml	0.8	
コンドロイチン硫酸 C	10mg/ml	1.5	グルクロン酸-アセチルガラクトサミン 60,000～150,000
	1mg/ml	0.8	
ヒアルロン酸	10mg/ml	0.3	グルクロン酸–グルコサミン 1,000,000 以下
	1mg/ml	0.7	
デキストラン硫酸	10mg/m	2.4	グルコース 36,000～50,000
	1mg/ml	0.8	

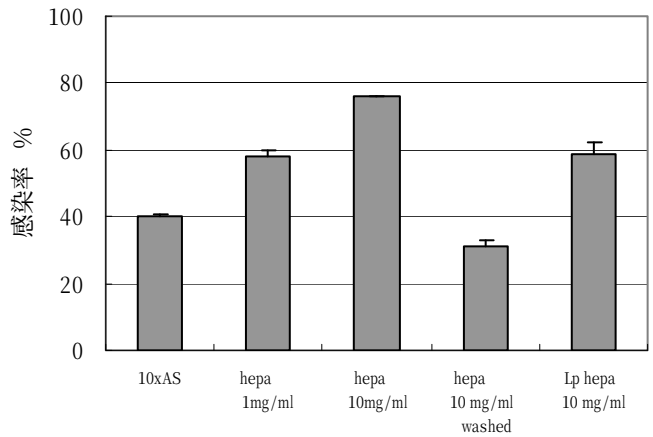


図 1、レジオネラ属菌のアメーバ感染におけるヘパリンの作用

hepa 10mg/ml wash はアメーバを 10mg/ml ヘパリンで前処理後 10xAS で 3 回洗浄し、10xAS で Lp を感染させた結果を、また Lp hepa 10mg/ml は菌をヘパリン 10mg/ml で前処理後、その菌浮遊液を用いて 10xAS で感染させた結果を示す

表 3、加熱処理によるレジオネラ属菌の感染性の変化

試験条件	試験条件	感染率%	相対感染度
未処理	10xAS	43.5	1.0
	ヘパリン (1000U/ml)	81.7	1.9
90℃15 分	10xAS	0.1	0.0
熱処理	ヘパリン (1000U/ml)	0.0	0.0

表 4、gentamicin によるレジオネラ属菌の感染性の変化

試験条件	感染率%	相対感染度
10xAS	63.5	1.0
ヘパリン (1000U/ml)	87.4	1.4
gentamicin (50 μg/ml)	0.2	0.0
gentamicin+ヘパリン*	0.9	0.0

*50 μg/ml gentamicin 処理した菌を 1000U/mlヘパリン存在下でアメーバに感染させた

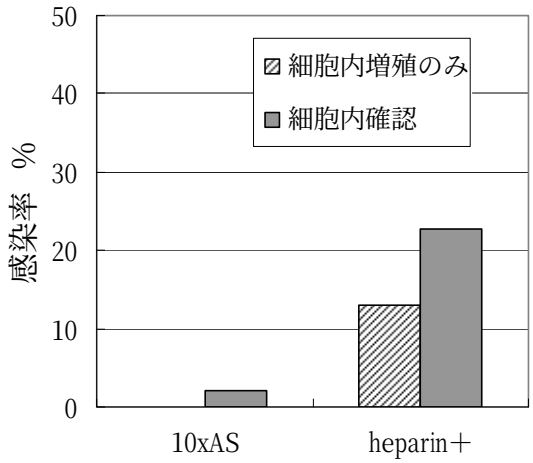


図 2、感染したレジオネラ属菌の細胞内増殖性とアメーバ感染率

細胞内増殖のみは、感染アメーバ細胞内で菌の増殖 (菌体分裂が明らか) が認められた結果を、また細胞内確認は、一個以上の菌が確認された結果を示す。また heparin+は 1000U/ml で感染させた結果を示す。なお感染させたレジオネラ属菌は培養 8 日後の菌で、BCYE α上での発育能がおよそ 1/1000 に低下していた。生死判別用 BacLight 染色では死菌率 40-60%であった。

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)
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
平成 28 年度分担研究報告書

レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

研究分担者	○森本　洋	北海道立衛生研究所
	磯部　順子	富山県衛生研究所
	黒木　俊郎	神奈川県衛生研究所
	佐々木麻里	大分県衛生環境研究センター
研究協力者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
	緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター
	小川　恵子	北海道立衛生研究所
	金谷　潤一	富山県衛生研究所
	倉　文明	国立感染症研究所
	田中　忍	神戸市環境保健研究所
	千田　恭子	仙台市衛生研究所
	平塚　貴大	広島県立総合技術研究所
	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
	山口　友美	宮城県保健環境センター
	吉野　修司	宮崎県衛生環境研究所
	渡邉　涼太	北海道立衛生研究所
研究代表者	前川　純子	国立感染症研究所

研究要旨

レジオネラ属菌検査法の標準化を目的とし、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの3点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下 WG)内で検討を行った。

外部精度管理は、WG サポートのもと、昨年度に引き続き実施母体を日水製薬株式会社とし、公的、民間を問わず全国 165 の検査機関(延べ 171 試料配付)に対し行われた。配付試料については、信頼性においてメーカーにより品質と多施設への発送が保証されることから、シスメックス・ビオメリュー社の BioBall(特注品)を使用した。検査法については、配付試料がより安定した性能を維持できる範囲内で、検査工程のどの部分に重きを置くかの定義付けを行い一部指定した。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、WG でも集計・解析を実施し、2015 年度の結果とも比較した。両年度参加し、今年度良好範囲外の結果を報告した 16 機関中 11 機関(約 69%)は、2 年連続で同様の結果を報告していた。またこれら 11 機関中 4 機関(約 36%)は、複数項目で良好範囲外の結果を報告していた。これらのことから、特定のいくつかの機

関については、特に検査手技の再確認が必要と思われた。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、今後も継続に向けた検討が必要である。標準的検査法は、現在 WG が推奨している方法と近々改定される ISO 法との調整を行う予定であり、その後、改訂版 WG 標準的検査法が提示できるよう準備を進めている。

A. 研究目的

レジオネラ属菌検査法の標準化を目的とし、1)精度管理、2)標準的検査法、3)研修システムの 3 点を柱とし、レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ(以下 WG)内で検討を行った。

B. 研究方法

1)精度管理

外部精度管理の実施

〈実施概要〉

昨年度に引き続き、実施母体を日水製薬株式会社(以下日水製薬)とし、公的、民間を問わず全国の検査機関に案内を発信し外部精度管理が実施された。

まず 2016 年 8 月上旬に日水製薬より「参加募集案内文、参加要件、指定法」(別紙参照)が示され参加募集が行われ、9 月 30 日(金)に締め切られた。その後、10 月 17 日(月)に試料、試料送付案内及び試料受領書兼承諾書(別紙参照)が参加者に向け発送された。回答期限は 11 月 18 日(金)17 時に指定された。解析結果は、2017 年 1 月下旬より、検査実施者が専用ホームページから個別の ID とパスワード(以下 PW)によりログインし閲覧可能となることが案内で示された。

〈参加機関〉

全国 165 の検査機関(延べ 171 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 71 機関が参加した。

〈結果集計と解析〉

全参加機関に対する集計・解析は日水製薬が実施した。地方衛生研究所等 71 機関については、WG でも集計・解析を実施し、2015 年度の結果とも比較した。なお報告値については、WG では 2013 年度から実施している研究報告と同じ換算値として集計することとした[1-3]。また、各機関の最終菌数は、コロニー数の平均値に換算のための定数(非濃縮試料①は×100、非濃縮試料②は×1000)を乗じたのち、小数第一位を四捨五入した数値を表示した。本調査での目標値(良好範囲)は、以下のように設定した。メーカー保証による 95%信頼区間(下限値 8867.9cfu/Ball、上限値 13028.1 cfu/Ball)をレジオネラ属菌検査で使用される、検体 100ml 中の cfu(colony forming unit)に換算すると、下限値 1773.58、上限値 2605.62 cfu/100ml となる。例えば、非濃縮検体においては、分離平板上の1集落を1000cfu/100ml と換算することから、結果は 1000cfu の整数倍となる。このことを勘案し、前述の 100ml 中の cfu を下限値については 100 の位を切り捨て、上限値については切り上げ 1000 ～ 3000cfu/100ml と補正した。さらにこの範囲に対し、国内における食品衛生外部精度管理で実績のある一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が統計処理で行っている「Xbar 管理図における管理線を理化学調査では添加量の 70%および 120%、微生物学調査では全体の平均値の 30%および 300%」という考え方を参考に、本外部精度管理では、「メーカー

保証されている菌数をベースに補正した範囲に対し、その下限値の 30％および上限値の300％」という考え方を導入することとした。その結果、本外部精度管理においては、良好範囲目標値を 300～9000cfu/100ml として設定することとした。

〈検査方法〉

昨年度に引き続き、日水製薬の実施要領に従った（別紙サーベイ指定法参照）。

2）標準的検査法および研修システム

現在 WG が推奨している方法[1, 4]と近々改定される ISO 法との調整を行い、改訂版 WG 標準的検査法が提示できるよう準備を進める。また、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、WG 推奨法に沿ったレジオネラ検査研修を行った（別紙参照）。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（別紙参照）、厚生労働省主催で開催された生活衛生関係技術担当者研修会（別紙参照）にも参加し、WG 推奨法の普及に努めた。

C. 研究結果及び考察

1）精度管理

本外部精度管理では、配付試料として特注品 BioBall を使用し[1-2]、検査手技の確認に重点を置くこととした。検査法については、配付試料がより安定した性能を維持できるよう、未処理のみで検査をする、BCYE α 培地の結果を報告値とする、非濃縮試料、濃縮試料について検査する、以上のことを指定した。なお、本年度は新たな試みとして、2 パターンの非濃縮試料（①:50ml の滅菌生理食塩水に配付試料を懸濁しよく混和したもの、②:①から 1ml 分取し残る 49ml に滅菌生理食塩水 441ml を加えよく混和したもの、別紙指定法参照）から報告を求める、BCYE α 培地を 1 検査項目につき 5 枚使用する、非濃縮試料①については参考値として各機関が一般的に使用している選択分離培地からの報告も求める、以上のことも指定した。全国の結果集計・解析は日水製薬で行い、2017 年 1 月 31 日（火）、検査実施者が専用ホームページから個別の ID と PW によりログインし、解析結果をダウンロードすることが可能となった。

一方 WG が集計した地方衛生研究所 71 機関の全判定結果を表 1 に示した。300～9000cfu/100ml の目標値（良好範囲）を報告した機関は、非濃縮試料①では 71 機関中 68 機関（約 96%）、非濃縮試料②では 71 機関中 66 機関（約 93%）、ろ過濃縮試料では 62 機関中 47 機関（約 76%）、遠心濃縮試料では 9 機関中 5 機関（約 56%）あった。一方、それぞれの検査項目でレジオネラ属菌を検出できなかった機関もあった。非濃縮①、②では、平均値、中央値において有意な差はなく、ともに 90％以上の機関が目標値（良好範囲）を報告していた。濃縮試料では、昨年度同様ろ過濃縮による報告結果が良い傾向にあった。WG ではこれまでにも検査者間差が少なく、回収率が比較的安定しているろ過濃縮法を推奨してきており、これを裏付ける結果が示された。以上の結果は、昨年度と同じ傾向であった。今年度参考値として報告を求めた選択分離培地による結果では、検査を実施した 69 機関中 60 機関（約 87％）が目標値（良好範囲）を報告していた。しかしながら、非選択分離培地である BCYE α 培地の結果と比較すると、報告菌数が平均値で約 60％、中央値で約 70％低い報告値となっ

ていた。このことは、選択分離培地による供試菌に対する発育抑制があったと考えられ、過去にもWGで報告している[1, 4-6]。

表2に2015、16年度の結果判定一覧を示した。2015 年度に参加したのは 68 機関、2016 年度は 71 機関あったが、両年度参加した 64 機関のうち、今年度良好範囲外の結果を報告した機関は 16 機関(非回答機関含む:25%)あった。これら16機関のうち、11機関(約69%)は、2 年連続で良好範囲外の結果を報告しており、そのうちの4機関(約36%)は、複数項目で良好範囲外の結果を報告していた。これらのことから、特定のいくつかの機関については、特に検査手技の再確認が必要と思われた。外部精度管理の結果は、検査機関の良し悪しを判断するためのものではなく、その時の結果を次に生かすためのものである。目標値(良好範囲)を報告した機関は、安定した検査環境を継続すること、良好範囲外の結果を報告した機関は検査法の再確認を行うこと、それぞれの立場に立った認識と対応が必要である。2 年連続で良好範囲外の結果を報告した機関は、改めて検査手技を再確認する必要があると思われた。

次に外部精度管理における回収率について検討してみた。このことを検討するに当たり、まず基準となる検査機関を選定した。選定基準は、報告を求めたすべての試料において目標値(良好範囲)を報告し、かつ回収率が100%以下であることとした。表 3 に非濃縮試料①、②及び濃縮試料ともに目標値(良好範囲)を報告し、かつ回収率が 100%以下の機関とその報告値を示した。71 機関中 48 機関(約 68%)がこれに該当した。これら 48 機関の報告値に基づき、表4-1に48機関の回収率を示した。回収率は、各機関について非濃縮①又は非濃縮②を分母とした場合の2通りを示した。表 4-2 に平均値等基本データを示した。ここで示した「全結果」は、前述 2 通りの合計から算出した(対象:延べ 96 機関)。また、濃縮別の結果についても同様に 2 通りの合計から算出した(ろ過濃縮対象:延べ 86 機関、遠心濃縮対象:延べ 10 機関)。これらのデータをもとに、表5に全結果(延べ96機関)の回収率(高い順)とそれら回収率が全体の中で占める割合(占有率)を示した。最も高かった回収率は84%、低かったのは 8%、平均回収率は34.79%、中央値は 31%、最頻値は 22%であった。占有率と回収率の関係では、占有率10.4%が回収率 67%以上、占有率 21.9%が回収率 48%以上、占有率 41.7%が回収率34%以上、占有率 52%が回収率 31%以上、占有率 61.5%が回収率 27%以上、占有率75%が回収率 22%以上、占有率 82%が回収率 20%以上、占有率 92.7%が回収率 16%以上、占有率100%が回収率8%以上であった。WG では、これまでにも試料を濃縮した際のレジオネラ属菌の効率的な回収について報告してきたところである[1, 4]。しかしながら、回収率については、検査機関ごとで差がある、あるいは同一の検査機関であっても安定しない場合がある、など今後も検討が必要な事項である。このような現状ではあるが、今回最低限達成すべき回収率について検討してみた。本項で指標とした 48 の検査機関(延べ 96 機関)は、すべての試料において目標値(良好範囲)を報告していたが、回収率については 8〜84%と大きな幅があった。ここで、今回最低限達成すべき回収率を、延べ96機関のうち80%の機関が達成していた回収率と仮定してみた。この考えでいくと 77 機関が達成していた回収率がそれに当たる。77 機関目が達成していた回収率

は 20%であったが、20%を報告していた機関は 3 機関あった。その結果、延べ 79 機関、82.3%が回収率 20%以上を報告していたことになる。今回の仮定では、外部精度管理における最低限達成すべき回収率が 20%以上となったが、今後はこれを検討のための基本データとし、引き続き WG 内で検討したいと考える。

ここまでの結果を解析した結果、以下に該当する検査機関(71 機関中 35 機関:重複あり)は、検査手技を再確認する必要があると思われた。 ・非濃縮試料①で目標値(良好範囲)を報告できなかった 3 機関。特にレジオネラ属菌が確認できなかった 2 機関(非回答機関含む)。 ・非濃縮試料②で目標値(良好範囲)を報告できなかった 5 機関(5 機関すべてがレジオネラ属菌を確認できなかった(非回答機関含む))。 ・ろ過濃縮で目標値(良好範囲)を報告できなかった 15 機関。特にレジオネラ属菌が確認できなかった 3 機関(非回答機関含む)。 ・遠心濃縮で目標値(良好範囲)を報告できなかった 4 機関。特にレジオネラ属菌が確認できなかった 1 機関。 ・非濃縮及び濃縮試料で目標値(良好範囲)を報告できなかった 6 機関。特に両試料ともにレジオネラ属菌を確認できなかった 3 機関(非回答機関含む)。 ・非濃縮と濃縮試料の判定結果を比較した時に、濃縮試料の結果の方が多い菌数を報告していた 6 機関。 ・2 年連続で良好範囲外の結果を報告していた 11 機関。 ・回収率が低かった機関(目標値(良好範囲)を報告していたが回収率が低かった機関も含む。低回収率参考値:20%未満)。

これまでにも報告してきたが、レジオネラ属菌検査においては、コンラージや濃縮時のいくつかの検査工程等が結果へ影響し、菌数減少の原因となるので丁寧な検査対応が必要である。特に遠心濃縮工程ではその影響を受けやすいと思われるので、より慎重な対応が必要と思われる。また 2 年連続で良好範囲外の結果を報告していた 11 機関は、試料の混ぜ方、培地への接種量、コンラージの力加減、濃縮操作等、改めて検査工程を見直し検証する必要があると思われる。

2)標準的検査法および研修システム

標準的検査法については、以下の考え方を柱に検討してきたところである。 ・ISO 11731:1998(E)に準じた方法。 ・検査結果のバラツキを無くす方法。 ・分離培地に発育したレジオネラを見逃さないようにする。つまり、ある精度以上を確保した基準となる方法、基本となる考え方を統一した方法、と定義することができる。中でも非濃縮試料の検査実施については、外部精度管理結果からもその重要性が改めて示唆された。しかしながら現行の「公衆浴場における衛生等管理要領」には非濃縮試料の検査実施は記載されていない。このことが検査精度の低下を招いている一因と思われる。濃縮法については、WG では、検査者間差が少なく、回収率が比較的安定しているろ過濃縮法を推奨してきた。一方で、この方法は、多検体処理や夾雑物の多い検体に対しては課題が多い。このような状況においては、遠心濃縮法での対応が求められる場合がある。レジオネラ症防止指針-第3版-では、培養法の基本を JIS K 0350-50-10:2006 に準拠しており、JIS 法では回収率を高めた遠心濃縮方法が提示されている。WG でも遠心濃縮を行う場合においては、この方法を推奨している。浴槽水の検査においては、適切な濃縮が行われ、かつその後の回収方法が、重要なポイントの一つであることから、ろ過濃縮、遠心濃縮を問わず、

濃縮工程中の注意点について提示できるよう引き続き検討したいと考える。なお、現在 ISO でも本検査法の改訂作業が進められていることを受け、今後はWG 推奨法との調整を行い、改めて標準的な検査法として提示したいと考える。

研修については、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修　新興再興感染症技術研修」内で、WG 推奨法に沿った実習を伴ったレジオネラ検査研修会を行った。本研修会は、2014 年度に続いて 2 度目であった。対象は、地方衛生研究所等の公的機関である。内容的には、充実したものであったが、その反面、準備、調整には大きな労力と時間を要した。一方、座学による研修会として、日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナー、厚生労働省主催で開催された生活衛生関係技術担当者研修会にも参加し、WG 推奨法の普及に努めたが、やはり実習を伴った研修会の要望が求められているように思われた。これらのことから、公的、民間等対象となる検査機関を区別することなく、実習を伴った研修会を開催するための検討が必要であると思われるが、例えば、厚生労働省が主体となって国立保健医療科学院主催での開催を検討するのか、新たなシステムを必要とするかを含め、主催者、場所、条件、予算、講師の養成等クリアすべき課題が多く、目立った進展が見られていない。このことについては、研究班内外からの幅広い意見を求め方策を検討する必要があると思われる。

D.結論

1）精度管理

昨年度に引き続き、外部精度管理調査実施主体を民間会社とし、官民問わず幅広い調査を試みた。これにより、感染症法の検査対象となる病原体を用いた、全国規模での外部精度管理調査の一モデルを示すことができたと思われる。また2年連続して参加した検査機関のデータ解析から、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ることが確認された。このことからも、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る。

内部精度管理については、まずは標準的検査法を「公衆浴場における衛生等管理要領」で示し、基本となる検査法が全国的に周知、導入されることが重要であり、その対応を急ぐ必要がある。

2）標準的検査法および研修システム

WG 推奨法は精度の高い検査法である。今後は、現在改訂作業中の ISO 法との調整を行い、標準的な検査法として「公衆浴場における衛生等管理要領」内で適切に位置付けられることで、全国の検査機関で導入され、適切な内部精度管理実施に繋がり、その精度が安定していくと思われる。このことが、公衆浴場施設の日常の衛生管理対策に繋がり、レジオネラ症発生予防に寄与すると考える。

研修会については、実施母体、講師養成、経費等を含めクリアすべき課題が多く、研究班内外からの幅広い意見を求め方策を検討する必要があると思われる。その一方で、外部精度管理実施母体において、簡易な実習（例えば斜光法のみ）を伴ったセミナー開催ができれば理想的であり、このことについても今後の検

討課題にしたいと考える。

なお、内部精度管理や日常検査に役立てるためのマニュアル作成については、検討を重ねているところである。

E. 参考文献

1) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 25 年度総括・分担研究報告書 pp.105-132. 1

2) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 26 年度総括・分担研究報告書 pp.77-101. 2

3) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 27 年度総括・分担研究報告書 pp.71-95. 3

4) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 24 年度総括・分担研究報告書 pp.93-130. 4

5) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討-レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループの発足及び地方衛生研究所を対象としたレジオネラ属菌検査法アンケート調査結果-,-外部精度管理試料安定化に向けた取り組み-: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)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 22 年度総括・分担研究報告書 pp.101-161.

6) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 23 年度総括・分担研究報告書 pp.113-134.

F. 研究発表

研修会

1) 森本 洋: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、2016 年度レジオネラ属菌検査セミナー、2016 年 7 月、東京

2) 森本 洋:レジオネラ培養法概論ほか、平成 28 年度 短期研修 新興再興感染症技術研修、2016 年 10 月、東京

3) 森本 洋:レジオネラの検査法と外部精度管理、生活衛生関係技術担当者研修会、2017 年 2 月、東京

4) 森本 洋:レジオネラ属菌培養検査について、2016 年度レジオネラ属菌検査セミナー、2017 年 3 月、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1　全判定結果　　cfu/100ml

施設No.	非濃縮①	非濃縮①*	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮	施設No.	非濃縮①	非濃縮①*	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮
1	2360	740	1600	646		41	3000	500	3400	970	
2	1780	600	1200		0	42	2225	1750	3200		296
3	1500	300	1600		200	43	500	350	2300	360	
4	800	200	1000	80		44	非回答	600	非回答	非回答	
5	2400	800	1000	520		45	60	0	800	46	
6	3200	1000	3000	540		46	2700	1400	4200	870	
7	1700	非回答	2800	690		47	1000	300	2000	360	
8	2200	600	1000	670		48	2800	1400	2000	1340	
9	2740	800	2200		304	49	2100	200	2000	420	
10	2100	1500	2400		340	50	720	650	1000		370
11	2100	700	3000	160		51	2500	300	3000	950	
12	360	150	0	74		52	400	375	400		84
13	2980	900	1800	1252		53	1700	500	1600	130	
14	3000	2300	2600		840	54	2400	600	1000	720	
15	2480	1400	2400	184		55	3300	1100	3000	670	
16	2500	800	3000	560		56	1940	830	1400	542	
17	2880	850	2400		454	57	620	50	600	46	
18	1600	900	4000	410		58	2460	1400	2800	704	
19	2300	350	2000	1100		59	1000	430	400	840	
20	2100	870	2200	640		60	1780	非回答	1600	800	
21	3700	1200	4000	1000		61	1600	2100	600	630	
22	2900	600	3000	1370		62	2900	470	3800	730	
23	2520	1250	2600	518		63	1400	100	600	870	
24	900	700	1000	760		64	3500	1300	4000	320	
25	3200	1600	3000	1000		65	1900	650	3200	980	
26	3200	1800	3600	1100		66	1800	1100	1000	240	
27	1080	625	400	500		67	2120	925	1600	276	
28	2320	1200	2000	954		68	1400	600	1000	370	
29	1720	600	1600	642		69	3900	2200	3000	2110	
30	2140	1450	2600	504		70	1500	300	2000	260	
31	0	500	0	0		71	1800	200	5000	560	
32	2120	360	1400	858							
33	680	450	2200	10							
34	1100	650	1600	350		平均値	1950	783	2033	616	321
35	400	0	0	50		最大値	3900	2300	5000	2110	840
36	1000	200	0	0		最小値	0	0	0	0	0
37	1500	800	4800	1124		中央値	2100	650	2000	630	304
38	1700	150	1800	380		対象機関	71	69	71	62	9
39	2680	850	1400	1080		良好機関	68(96%)	60(87%)	66(93%)	47(76%)	5(56%)
40	1500	600	1600	730							

＊選択分離培地による結果

表2　2015、2016年度結果一覧（2015/2016、良好範囲※○、範囲外＊、検査項目外又は昨年度不参加－）

施設No.	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮	施設No.	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮
1	○／○	－／○	○／○	○／－	37	＊／○	－／○	＊／○	
2	－／○	－／○		－／＊	38	○／○	－／○	○／○	＊／－
3	－／○	－／○		－／＊	39	－／○	－／○	－／○	
4	○／○	－／○	＊／＊		40	○／○	－／○	＊／○	＊／－
5	○／○	－／○	○／○		41	○／○	－／○	○／○	
6	○／○	－／○	○／○		42	○／○	－／○		＊／＊
7	○／○	－／○	○／○		43	○／○	－／○	○／○	
8	○／○	－／○	○／○		44	○／非回答	－／非回答	○／非回答	
9	○／○	－／○		＊／○	45	＊／＊	－／○	＊／＊	
10	○／○	－／○	○／－	○／○	46	○／○	－／○	＊／○	
11	○／○	－／○	＊／＊		47	＊／○	－／○	＊／○	
12	＊／○	－／＊	＊／＊		48	○／○	－／○	＊／○	
13	○／○	－／○	○／○		49	○／○	－／○	○／○	＊／－
14	○／○	－／○		＊／○	50	○／○	－／○		○／○
15	○／○	－／○	＊／＊		51	○／○	－／○	○／○	＊／－
16	○／○	－／○	＊／○		52	－／○	－／○		－／＊
17	○／○	－／○		○／○	53	○／○	－／○	○／＊	
18	○／○	－／○	＊／○	○／－	54	○／○	－／○	○／○	＊／－
19	○／○	－／○	○／○	○／－	55	○／○	－／○	○／○	＊／－
20	○／○	－／○	＊／○		56	○／○	－／○	○／○	
21	○／○	－／○	○／○		57	○／○	－／○	＊／＊	
22	－／○	－／○	－／○		58	○／○	－／○	○／○	
23	○／○	－／○	○／○		59	○／○	－／○	○／○	
24	－／○	－／○	－／○		60	＊／○	－／○	＊／○	＊／－
25	○／○	－／○	○／○		61	○／○	－／○	－／○	＊／－
26	○／○	－／○	○／○		62	○／○	－／○	＊／○	＊／－
27	○／○	－／○	○／○	○／－	63	○／○	－／○	＊／○	
28	○／○	－／○	○／○		64	○／○	－／○	＊／○	
29	○／○	－／○	○／○		65	○／○	－／○	－／○	
30	○／○	－／○	○／○		66	○／○	－／○	－／＊	＊／－
31	○／＊	－／＊	＊／＊	○／－	67	○／○	－／○	○／＊	
32	○／○	－／○	○／○		68	○／○	－／○	－／○	＊／－
33	○／○	－／○	＊／＊		69	○／○	－／○	○／○	
34	○／○	－／○	＊／○		70	○／○	－／○	○／＊	
35	○／○	－／＊	○／＊		71	－／○	－／○	－／○	
36	○／○	－／＊	＊／＊						

表3　非濃縮①・②、濃縮すべてで目標値（良好範囲）を報告かつ非濃≧濃を報告した48機関の判定結果　　cfu/100ml

施設No.	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮	施設No.	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮
1	2360	1600	646		39	2680	1400	1080	
5	2400	1000	520		40	1500	1600	730	
6	3200	3000	540		41	3000	3400	970	
7	1700	2800	690		43	500	2300	360	
8	2200	1000	670		46	2700	4200	870	
9	2740	2200		304	47	1000	2000	360	
10	2100	2400		340	48	2800	2000	1340	
13	2980	1800	1252		49	2100	2000	420	
14	3000	2600		840	50	720	1000		370
16	2500	3000	560		51	2500	3000	950	
17	2880	2400		454	54	2400	1000	720	
18	1600	4000	410		55	3300	3000	670	
19	2300	2000	1100		56	1940	1400	542	
20	2100	2200	640		58	2460	2800	704	
21	3700	4000	1000		60	1780	1600	800	
22	2900	3000	1370		62	2900	3800	730	
23	2520	2600	518		64	3500	4000	320	
24	900	1000	760		65	1900	3200	980	
25	3200	3000	1000		68	1400	1000	370	
26	3200	3600	1100		69	3900	3000	2110	
28	2320	2000	954		71	1800	5000	560	
29	1720	1600	642						
30	2140	2600	504		平均値	2289	2452	771	462
32	2120	1400	858		最大値	3900	5000	2110	840
34	1100	1600	350		最小値	500	1000	320	304
37	1500	4800	1124		中央値	2340	2350	704	370
38	1700	1800	380		対象機関	48	48	43	5

表4-1 非濃縮①・②、濃縮すべてで目標値（良好範囲）を報告かつ
非濃≧濃を報告した48機関別回収率(%)

施設No.	濃/非濃①	濃/非濃②	施設No.	濃/非濃①	濃/非濃②
1	27	40	34	32	22
5	22	52	37	75	23
6	17	18	38	22	21
7	41	25	39	40	77
8	30	67	40	49	46
9*	11	14	41	32	29
10*	16	14	43	72	16
13	42	70	46	32	21
14*	28	32	47	36	18
16	22	19	48	48	67
17*	16	19	49	20	21
18	26	10	50*	51	37
19	48	55	51	38	32
20	30	34	54	30	72
21	27	25	55	20	22
22	47	46	56	28	39
23	21	20	58	29	25
24	84	76	60	45	50
25	31	33	62	25	19
26	34	31	64	9	8
28	41	48	65	52	31
29	37	40	68	26	37
30	24	19	69	54	70
32	40	61	71	31	11

＊遠心濃縮対応施設

表4-2 基本データ

	濃/非濃①	濃/非濃②	全結果	ろ過濃縮	遠心濃縮
平均値	34.54	35.04	34.79	36.07	23.8
最大値	84	77	84	84	51
最小値	9	8	8	8	11
中央値	31	31	31	31.5	17.5
最頻値	22	19	22	22	16
対象機関	48	48	96	86	10

表5 非濃縮①・②、濃縮すべてで目標値（良好範囲）を報告かつ
非濃≧濃を報告した48機関の全回収率と占有率（%）

占有率	回収率	占有率	回収率	占有率	回収率	占有率	回収率
	84		45		31		21
	77		42	52	31		21
	76		41		30		21
	75		41		30		21
	72		40		30		20
	72		40		29		20
	70		40		29	82.3	20
	70	33.3	40		28		19
	67		39		28		19
10.4	67		38		27		19
	61		37	61.5	27		19
	55		37		26		18
	54		37		26		18
	52		36		25		17
	52		34		25		16
	51	41.7	34		25		16
	50		33		25	92.7	16
	49		32		24		14
	48		32		23		14
	48		32		22		11
21.9	48		32		22		11
	47		32		22		10
	46		31		22		9
	46		31	75	22	100	8

2016年8月吉日

レジオネラ属菌検査実施施設様各位

2016年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ のご案内

日頃は弊社製品のご愛顧を賜り厚く御礼申しあげます。

さて、この度レジオネラ属菌検査を実施されている施設様を対象に、下記の要領で「2016年度 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」を実施致します。

日常の検査精度の確認のため、奮ってご参加いただきますようお願い申しあげます。

■参加要件

別紙 1.「参加要件」を満たし、かつ、別紙 2.「2016 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」による検査対応が可能な施設様

■実施概要

検査試料	レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料（凍結乾燥品、-18～-33℃保存） 同封書類：①試料送付のご案内、②試料の使用方法・操作手順、③結果記入用メモ、④試料受領書兼承諾書
実施方法について	本サーベイは「厚生労働省科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」において、平成23年～26年に検討され報告された方法に基づいて実施します。検査方法は、別紙2.「2016年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」に従って実施お願いします。
参加費	1 セット　25,000 円（消費税別）
参加募集数	300 セット（募集数に達し次第、締め切らせていただきますのでご了承ください。）

■実施スケジュール（予定）

8月 上旬	参加募集開始 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)の2016年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ申込フォームから申込手順に従いお申込ください。 ● 1施設複数名のお申込みも可能です。検査試料はそれぞれの試験実施者様へお送りさせていただきます。
9月 30日（金）	参加募集締切
10月17日（月）	試料発送 ● 検査試料到着後は直ちに-18～-33℃で保管願います。
10月末日	請求書送付 ● 請求書はお申込み者様へ一括でお送りさせていただきます。
10月18日（火）～ 11月18日（金）	検査実施 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)にてIDとパスワードでログイン後、結果を入力していただきます。 ● 成績入力方法は検査試料に同封の資料を参照してください。
11月18日（金）17時	回答締切
12月末日	参加費お支払い期限 ● 振込用紙をご利用いただくか、弊社指定の口座にお振り込みいただきます。なお、振込手数料は貴施設ご負担でお願い致します。銀行振り込みの控えをもって領収書とさせていただきます。
1月下旬	解析結果返却 ● 弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)にて ID とパスワードでログイン後、結果を表示・ダウンロードができます。

日水製薬株式会社

■お問い合わせ先
日水製薬株式会社　レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局
〒110-8736　東京都台東区上野3丁目23番9号
TEL：03-5846-5729　　FAX:03-5846-5679
E-mail: legi-srvy@nissui-pharm.jp

別紙 1.

参加要件

2016 年 8 月吉日

日水製薬株式会社

レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局

下記の 1. 使用要件、2. 使用承諾、および 3. 注意事項について了承頂けるご施設様に参加をお願いいたします。

1. 使用要件

1）病原体のバイオセーフティ―レベル（以下 BSL）規定について

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では、病原体を病原性の最も高いものを一種病原体として、四種病原体まで規定しています。

また、病原体の規定とは別に、病原体の取扱者に対しての感染被害などの健康影響に基づき、BSL が規定されています。この BSL にも基づき、最も低リスクの病原体を扱うリスク群を BSL1 として、BSL4 までのリスク群を規定しています。

本菌種は BSL2 に分類されます。BSL2 の微生物に対して設備・技術に対する要件を以下に記載いたします。

2）施設要件

1. 実験室内に、適切に管理された微生物試験を行う管理区域を有すること。管理区域の出入口にはバイオハザードマークを標示すること。
2. 管理区域の出入口及び病原体保管庫は施錠が出来る構造であること。保管設備にはバイオハザードマークを標示すること。
3. 消毒用の薬剤が常備されており、壁・床等の消毒が可能であること。
4. 管理区域内もしくは実験施設内に、高圧蒸気滅菌装置、もしくはそれに準ずる滅菌設備を有すること。
5. 本サーベイでは、検査工程上エアロゾル発生の危険があることから、生物学用安全キャビネットが必要です。

3）作業従事者要件

作業従事者に求められる基本的な要件について以下に記載します。

1. 1 年に 1 回以上、病原体に関するセキュリティ及びセーフティに関して教育を受けていること。
2. 1 の要件を満たさない場合には、微生物試験に習熟しており十分な知識・技能を有すること。あるいは微生物試験に習熟した人の指導のもとで試験を行うこと。

2. 精度管理サーベイ試料の使用承諾

1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

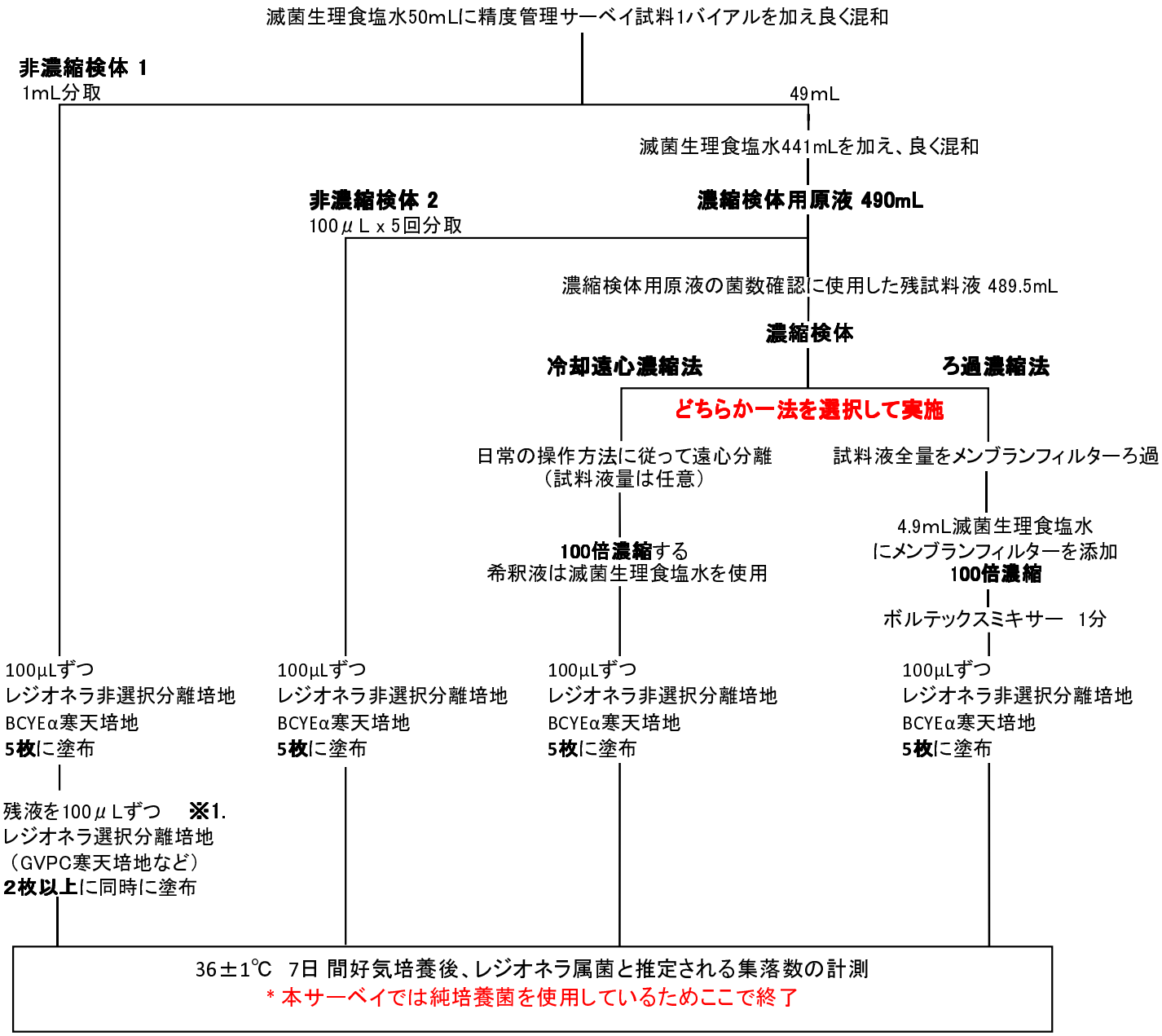
3. 注意事項

予告なく実施スケジュールが変更となることがあります。変更後のスケジュールは、メール等にてご連絡をいたします。

以上

別紙2.

2016年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法



■ 2016年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、「厚生労働省科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」（以下、レジオネラ研究事業）において平成23年度より検討され、報告された方法に基づき、本精度管理サーベイ用に変法したものです。

■ 本精度管理サーベイ試料は、平成26度のレジオネラ研究事業において、加熱処理または酸処理によるダメージにより菌数が極端に減少することが報告されています。2016年度サーベイにおいては、濃縮操作法や培地接種操作などの手技の精度確認に主眼を置くこととし、日常検査において濃縮加熱処理もしくは酸処理を実施している施設におかれましても、上記指定法に従って行った検査法での結果の報告をお願いします。

■ 指定法に記載されていない手技、使用器材（例：冷却遠心濃縮液量、メンブランフィルター材質、培地メーカー、レジオネラ選択分離培地の種類、など）は、各施設の操作方法で行ってください。

■ 各法におけるレジオネラ属菌数は、レジオネラ非選択分離培地BCYEα寒天培地から得られた集落数から算出し、報告してください。

※1. 日常の試験にレジオネラ選択分離培地を使用している施設におきましては、参考値として、同培地における集落数も計測してください。なお、レジオネラ研究事業において、レジオネラ選択分離培地における集落数は、組成中の選択剤による影響等により、レジオネラ非選択分離培地における集落数に比べ減少することが報告されています。

２０１６年１０月１７日
日水製薬株式会社

2016年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試料送付のご案内

謹啓

日頃は弊社製品をご愛顧賜り厚く御礼申しあげます。

この度は、2016年度レジオネラ属菌細菌検査精度管理サーベイにお申し込み頂きましてありがとうございます。精度管理サーベイ試料を送付させて頂きますのでご査収のほど、よろしくお願い申しあげます。

謹白

記

1. 送付内容一覧

・試料送付のご案内（本案内状）
・試験概要・・・

2016 年 10 月 17 日
日 水 製 薬 株 式 会 社

2016 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試料受領書兼承諾書

今回使用する菌株は、バイオセーフティ―レベル 2 に該当する菌種ですので、レジオネラ属菌精度管理サーベイ試料受領書兼承諾書を以て、サーベイ試料受領と菌株取扱いに関する承諾の確認とさせていただいております。

精度管理サーベイ試料の内容をご確認いただき、下記サーベイ試料受領書兼承諾書に必要事項をご記入のうえ、**10 月 20 日(木)まで**に、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局宛に FAX してください。

FAX:03－5846－5679

日水製薬株式会社　レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局宛

レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料受領書兼承諾書

受領日：　2016 年　　10 月　　日

貴 社 名 :	
ご所属部署:	
ご担当者名: ㊞	
受領数	ID 番号 注

注:弊社より、別途送付したはがきに記載した ID 番号をご記入ください。

本サーベイ試料の取扱いについては、バイオハザード防止のために以下のことを確認、承諾いたします。

1. 試料は、精度管理サーベイの目的以外には使用しません。
2. 試料は、使用要件及び検査実施上の注意事項を厳守し使用します。
3. 試料及び使用後の容器類は、検査終了後、直ちに滅菌してから廃棄し、他への分与・放置・保存はしません。
4. 直接または間接的に発生する全ての出費・行動・環境汚染・健康被害・その他損失については、日水製薬株式会社の責に基づく過失により発生した場合を除き、いかなる場合においても日水製薬株式会社は責任を負いません。
5. 使用者は、菌種の所持・使用に関する日本国内で適用される全ての法令・条例及び規則を順守する責任を負うことに同意します。

以 上

平成 28 年度　短期研修 新興再興感染症技術研修講師名簿

（順不同）

講　師　名	所属・職
村上　光一	国立感染症研究所感染症疫学センター　第五室長 （国立保健医療科学院併任　短期研修 新興再興感染症技術研修主任）
木村　博一	国立感染症研究所感染症疫学センター　第六室長 （国立保健医療科学院併任　短期研修 新興再興感染症技術研修副主任）
大石　和徳	国立感染症研究所感染症疫学センター　センター長 （国立保健医療科学院併任）
片山　朝子	国立感染症研究所感染症疫学センター　技術補助員
棚林　清	国立感染症研究所バイオセーフティー管理室　室長
倉　文明	国立感染症研究所バイオセーフティー管理室　主任研究官
前川　純子	国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官
八木田　健司	国立感染症研究所寄生動物部 主任研究官
緒方　喜久代	国立感染症研究所細菌第一部　協力研究員
森田　幸雄	東京家政大学家政学部栄養学科　教授
森本　洋	北海道立衛生研究所感染症部 細菌グループ 主幹
石岡　大成	高崎市保健所生活衛生課食品衛生担当　係長
磯部　順子	富山県衛生研究所　副主幹研究員
金谷　潤一	富山県衛生研究所　主任研究員
久保田　寛顕	東京都健康安全研究センター微生物部病原体細菌研究科　主任
佐々木　麻里	大分県衛生環境研究センター　主任研究員
高橋　幸雄	台東区立根岸図書館　主任主事
甲斐　清孝	宮崎県日向保健所衛生環境課　課長

平成28年度　新興再興感染症技術研修

		10:00		12:00 13:00		15:00	16:00	17:00
2016/10/3	月	開講式/オリエンテーション （村上、木村、土井、大石）	講義：バイオリスク管理総論、病原体輸送 (国立感染症研究所　棚林）	講義 レジオネラ属菌検査診断実習概要 （森本）	講義 迅速診断法について （金谷）	レジオネラ属菌培養法実習 （前川、森本、緒方、磯部、金谷、石岡、佐々木、村上、土井）		
2016/10/4	火	迅速検査診断法実習 （LC EMA-qPCR法） （金谷、森本、緒方、磯部、前川、倉、石岡、佐々木、久保田、村上、土井）		迅速検査診断法実習 （LC EMA-qPCR法） （金谷、森本、緒方、磯部、前川、倉、石岡、佐々木、久保田、村上、土井）			講義 宮崎県日向市（日向サンパーク温泉「お舟出の湯」）の事例とその後の対応について （甲斐）	レジオネラ属菌培養法実習 (前川、森本、緒方、磯部、金谷、倉、石岡、佐々木、久保田、村上、土井）
2016/10/5	水	喀痰からのLAMP法による検査診断法実習 （磯部、金谷、森本、緒方、前川、石岡、佐々木、久保田、村上、土井）		喀痰からのLAMP法による検査診断法実習 （磯部、金谷、森本、緒方、前川、石岡、佐々木、久保田、村上、土井）	講義 環境中のアメーバとレジオネラ感染 （八木田）	喀痰からのLAMP法による検査診断法実習 （磯部、金谷、森本、緒方、前川、石岡、佐々木、久保田、村上、土井）		レジオネラ属菌培養法実習 (前川、森本、緒方、磯部、金谷、石岡、佐々木、久保田、村上、土井）
2016/10/6	木	講義 保健所監視員からみたレジオネラ感染症対策 （高橋）	講義 レジオネラ培養法概論 （森本）	斜光法によるレジオネラ属菌検査診断実習 （森本、磯部、金谷、緒方、前川、石岡、佐々木、村上、土井）				レジオネラの紫外線での確認実習 （森本、磯部、金谷、緒方、前川、石岡、佐々木、村上、土井）
2016/10/7	金	講義 レジオネラ感染症概論 （倉）	講義 レジオネラ検査法 （前川）	講義 検査総論・検査精度とその管理 （木村）	ラボカンファレンス （村上）	まとめ （村上・木村、土井、大石）	開講式 （大石、村上・木村、土井）	

2016年度 レジオネラ属菌検査セミナー 開催のご案内

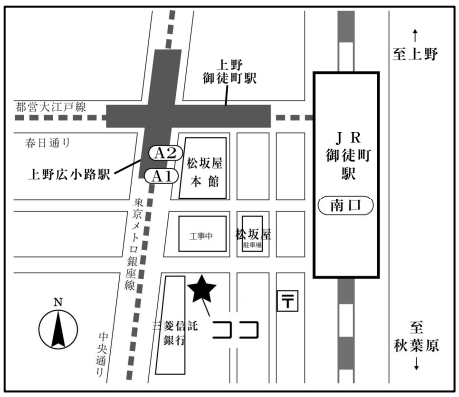
主催：日水製薬株式会社

平素は格別なるお引き立てを賜り、厚く御礼申しあげます。
この度、弊社では下記の内容にてレジオネラ属菌検査に関するセミナーを開催致します。
ご多用中とは存じますが、是非ご参加頂きますようご案内申しあげます。

記

■開催日時　2017年3月10日(金)　13:30～17:00　(受付け開始 13:00)

■開催場所　日水製薬株式会社　本社ビル　3階コンベンションルーム
〒110-8736　東京都台東区上野3丁目23番9号
※JR御徒町駅より徒歩1分



■定員　100名(定員に達し次第、受付けを終了させていただきます)

■内容

13:00~　受付開始
13:30~14:30　講演 1.　「ISO11731 の改訂とレジオネラ属菌検査外部精度管理の動向（仮題)」
国立感染症研究所　バイオセーフティ管理室（細菌第一部併任）
主任研究官　倉文明先生
14:30~15:00　報告　「2016 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ結果報告」
日水製薬株式会社　産業試薬営業部　辻彩香
15:00~15:15　休憩
15:15~16:25　講演 2.　「レジオネラ属菌培養検査について」
北海道立衛生研究所 感染症センター 感染症部 細菌グループ　森本洋先生
16:25~17:00　事前質問回答・質疑応答
17:15~18:30　意見交換会

■参加費　セミナー　：　無料
意見交換会　：　1,000円

■締切り　2017年2月28日(火)

■お問合せ先　日水製薬株式会社 レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局
TEL 03-5846-5729　E-mail：legi-srvy@nissui-pharm.jp

送付先　FAX：**03-5846-5629**　E-mail：**legi-srvy@nissui-pharm.jp**

参加申込書

※お申込みは**FAX**または**メール**にてお願いします。メールの場合は下記内容をお送りください。
※受付返信につきましては受付け 1 週間を目安に受付番号と共にメールにてご連絡させて頂きます。

お名前	①　②　③		
貴社名		ご所属	
ご住所	〒		
TEL		FAX	
E-mail (申込代表者様)	(必須) @		
意見交換会	参加　・　不参加　(参加費:1,000円)		
ご質問 事項	(セミナー当日、分野別に分類してお答えします。ご質問かありましたらご記入ください。)		

平成 28 年度生活衛生関係技術担当者研修会次第

平成 29 年 2 月 6 日（月）
厚 生 労 働 省 ２ 階 講 堂

時 間	氏名 (敬称略)	所　　属	内　　容（仮）
10:00	開会・生活衛生課長挨拶		
10:05	林　基哉	国立保健医療科学院	建築物環境衛生管理に係る行政監視等に関する研究について
11:00	興膳　慶三	(公社)全国ビルメンテナンス協会	清掃インスペクター及びエコチューニングについて
11:45	質疑応答		
12:00	（　　休　　憩　　・　　昼　　食　　）		
13:10	有馬　雄三	国立感染症研究所	最近のレジオネラ症の発生動向
13:30	倉　文明	国立感染症研究所	レジオネラ症の国際動向
13:50	森本　洋	北海道立衛生研究所	レジオネラの検査法と外部精度管理
14:20	（　　休　　憩　　）		
14:30	田中　尚	奈良県中和保健所	温泉施設におけるレジオネラ症発生予防対策について ～管内公衆浴場への指導を顧みて～
14:50	齋藤　利明	株式会社ヤマト	温浴施設における安全上の危険部位と対策
15:15	縣　邦雄	アクアス株式会社	配管洗浄の方法
15:40	質疑応答		
16:00	閉会		

※現時点での予定であり、内容の変更等あり得ますので、その旨ご了承願います。

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）
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
研究代表者：前川純子　国立感染症研究所 細菌第一部

平成 28 年度　分担研究報告書

検査機関へのレジオネラ属菌検査研修会の開催について

研究分担者　○長岡宏美　　静岡県環境衛生科学研究所　微生物部

（研究要旨）
レジオネラ属菌の検査を行っている検査機関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。参加者は検査機関 19 機関 26 名であった。
研修は、座学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、検査の解説のほか、静岡県行政担当による「レジオネラ防止対策について」の解説の時間を設けた。
実習では、検体の前処理方法、接種、同定方法についての研修を行った。
事後アンケートでの参加者の評価は概ね良好で、来年度以降も開催を望む意見が多かった。
なお、この研修会は静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課の主催で開催した。

A．研究目的

入浴施設のレジオネラ防止対策において最も重要なのは自主管理であり、自主管理は日常のレジオネラ検査がベースとなっている。すなわち、自主検査のレベルアップが自主管理の向上につながっていくことになる。しかし、現状では検査法が多様であることから、検出率は検査機関によって大きな差が生じているのが実情である。そこで、検査方法の違いによる問題点の認識を共有するとともに、検体採取から同定・定量に至る検査技術の標準化を図るため研修会を開催した。

B．研修内容

１．研修対象

静岡県内の保健所に提出されるレジオネラ属菌の自主検査結果にて確認できる検査機関を調査し、県内検査機関の概要を把握した。

研修会の開催はホームページに掲載し（資料１）、参加希望機関を公募した。

２．研修参加機関

19 機関、26 名が参加した。

３．研修内容（資料２）

①座学　（１時間 20 分）

健康福祉部生活衛生局の行政担当からレジオネラ防止対策について、2016 年３月に行った規則改正を含めた解説を行った。

続いて、レジオネラ検査の現状と静岡県環境衛生科学研究所の SOP に基づく検査方法及び午後の実習について解説した。

最後に、実習時にはバイオハザード区域に入室するため、バイオセーフティー講義を行った。

②実習（４時間）

検体の前処理、検体の接種、同定方法について実習した。

・ 検体の前処理及び前処理

濃縮ろ過法、酸処理、熱処理の３法をデモンストレーション後に研修生が実習した。

それぞれの検体は、GVPC 培地に塗抹した。

・ 同定方法

あらかじめ準備したレジオネラ属菌を塗抹した GVPC 培地で、典型コロニーを観察した。

また、斜光観察を行い、レジオネラ属菌と他の菌との違いを観察した。

鑑別培地への塗抹を実習し、あらかじめ準備した鑑別培地でシステイン要求性の違いによるレジオネラ属菌の同定方法を実習した。

レジオネラ属菌と同定された株について、ラテックス凝集反応による血清型別試験を実習した。

PCR については、今回は説明のみにとどめた。

C．考察

事後アンケートの結果、研修は概ね好評であった。すべての参加者が次年度の開催を希望しており、検査技術レベルを維持するためにも、研修は必要であると思われた。

しかし、研修の実施にあたっては検査法の選択の問題が生じる。

今回は静岡県の SPO に基づく検査法により研修を実施したが、今後研修を継続して実施するにあたっては、現在のレジオネラ症防止指針に準拠するのか、或いは ISO に準ずる方法を取り入れるかなど早急に検討すべき課題である。

また、研修の成果を検討するには精度管理体制の構築も不可欠であると思われる。すなわち、標準検査法の確立と研修制度及び精度管理体制の構築を並行して推し進めることが、今後の検査精度向上のためには重要であることが示唆された。

資料１　静岡県ホームページ掲載記事

提 供 日　2016/08/
タイトル　レジオネラ属菌検査研修会の開催
担　　当　健康福祉部生活衛生局衛生課
連 絡 先　生活衛生班
　　TEL 054-221-3281

富国有徳の理想郷－しずおか
ふじのくに
Shizuoka Prefecture

レジオネラ属菌検査研修会を開催します。

１　要旨

静岡県では、旅館業法、公衆浴場法に基づく条例において、営業者に対して入浴施設の消毒やレジオネラ属菌の自主検査を義務付けています。

レジオネラ属菌の検査方法については、「新版レジオネラ症防止指針第３版」等で複数の方法が示されていますが、検査機関が選択した方法により、検査結果に相違が生ずることが指摘されています。

そのため、検査方法の違いによる問題点の認識を共有するとともに、検体採取から同定・定量に至る検査技術の標準化を図るため、今年度初めて、県内で従事するレジオネラ属菌検査事業者を対象とした研修会を開催します。

２　研修会の内容

(1)　日　時　【第１回】平成28年９月12日（10時30分～17時）
　　【第２回】平成28年９月15日（10時30分～17時）
(2)　場　所　静岡県環境衛生科学研究所（静岡市葵区北安東４-27-２）
(3)　参加者　県内でレジオネラ属菌の検査業務に携わる者
　　各回10～12名
(4)　内　容　【午前】講義　・レジオネラ防止対策及び検査方法等の説明
　　【午後】実技　・検体の前処理方法１（ろ過法、冷却遠心法）
　　・検体の前処理方法２（熱処理、酸処理等）
　　・検体の接種
　　・同定方法（斜光法、鑑別培地による同定、PCR）

※　環境衛生科学研究所の微生物検査担当者が指導にあたります。

＜参考＞

１　レジオネラ属菌は、土・川・湖沼など自然環境に広く生息しています。入浴施設の衛生管理が徹底されていない場合、レジオネラ属菌が繁殖する場合があります。

２　レジオネラ症は、レジオネラ属菌を含んだ目に見えない水滴（エアロゾル）を吸い込むことによって感染します。症状は発熱、全身倦怠感、頭痛、筋肉痛、咳、肺炎症状などで、潜伏期間は２～10日間程度です。

レジオネラ症発生件数

年度	H25	H26	H27
全国件数			
県内件数			

資料２　研修会次第

平成 28 年度　レジオネラ属菌検査研修会

日　時：平成 28 年９月 12 日（月）　10：00～17：00
場　所：静岡県環境衛生科学研究所
別館会議室及び４階微生物部実験室

－研修次第－

10:00～	受　付
10：30～10：40	開　会　（挨拶）
10：40～11：00	静岡県のレジオネラ防止対策について 健康福祉部生活衛生局　衛生課
11：00～11：30	レジオネラ検査について 環境衛生科学研究所　微生物部
11：30～11：40	バイオセーフティー講義 環境衛生科学研究所　微生物部
11：40～12：00	質　　疑
【昼　　食】	
13：00～16：00	実　　習 ・検体の前処理方法１（ろ過法、冷却遠心法） ・　　〃　　２（熱処理、酸処理等） ・検体の接種 ・同定方法（斜光法、鑑別培地による同定、PCR）
16：00～17：00	質　　疑
17：00	閉　　会

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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		http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2017.01.002	2017
Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F.	*Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households.	Epidemiol Infect		https://doi.org/10.1017/S0950268817000036	2017
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
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**	**印刷中**	**2017年1月受理**	2017