
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 29 年度 総括・分担研究報告

研究代表者 前川 純子

平成 30 (2018) 年 5 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-----1
前川純子

II. 分担研究報告

1. モノクロラミン消毒効導入スキームの構築と消毒効果の検証-----15
長岡宏美、泉山信司、森主博貴、水本嗣郎、村田学博、杉山寛治、市村祐二、青木信和
2. pH10の温泉におけるモノクロラミン消毒-----20
泉山信司、長岡宏美、柳本恵太、堀内雅人、山上隆也、植松香星、久田美子、森 康則、
杉山寛治、田中慶郎、市村祐二
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-----25
黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、陳内理生、政岡智佳、中嶋直樹
4. レジオネラ検査法のマニュアル作成および入浴施設の衛生管理に関する研究成果の活用-----33
黒木俊郎、森本 洋、磯部順子、緒方喜久代、倉 文明、前川純子
5. 空気洗浄と高濃度塩素消毒を併用した砂ろ過器のろ材の洗浄方法
(エアレーション・リフレッシュ法)の提案-----36
中臣昌広、斎藤利明、木村哲也、田中悠樹、小森正人、泉山信司
6. 感染源解明のための環境調査-----45
磯部順子、金谷潤一
7. レジオネラ生菌迅速検査法の評価-----62
磯部順子、佐々木麻里、田栗利紹、金谷潤一、山口友美、淀谷雄亮、上野潤二、東出誠司、
原口浩幸、森中りえか、中筋 愛、吉崎美和
8. 斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査と比色系パルサー法感度向上のための検討-----71
佐々木麻里、神田由子、後藤高志、成松浩志、緒方喜久代
9. MLVA法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴-----78
中西典子、田中 忍、野本竜平、平塚貴大、前川純子
10. レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発
携帯型フローサイトメーター用蛍光試薬の特異性の検討-----87
田栗利紹、倉 文明、蔡 国喜、小嶋裕子
11. レジオネラ感染とアメーバ レジオネラ属菌のアメーバ内生残性の実験的制御-----94
八木田健司、泉山信司
12. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み-----100
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、渡邊涼太、前川純子
13. レジオネラ属菌検査研修会の開催について-----116

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----123

研究要旨：公衆浴場等の適切な衛生管理のための効果的な手法の検討を行った。また、公衆浴場等の衛生状態を確認するためにレジオネラ検査は不可欠であり、そのための手法の改良、評価を行った。今年度実施した主な研究およびその成果は以下の通りである。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(10) 従来用いられてきた *L. pneumophila* の遺伝子型別法である SBT 法よりも簡便で、かつ同等以上の識別能力をもつと期待される MLVA 法の確立ができたので、117 種類の ST (sequence type) を含む *L. pneumophila* 血清群 1 の菌株コレクション 315 株の解析を行ったところ、168 種類の MLVA タイプに分類された。また、過去の集団事例株を解析したところ、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関し、感染源推定のための遺伝子型別の迅速なタイピング方法として期待できると考えられた。

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

(12) 今年度で 3 回目となる民間会社が実施した外部精度管理サーベイについて、助言を行い、方法の改善を図った。公的、民間合わせて全国 173 の検査機関が参加し、本研究班からは 71 地衛研が参加した。本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことができる方法であり、今後も、継続的な外部精度管理サーベイができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要である。標準的検査法については、現在ワキンググループが推奨している方法と今年度改訂された ISO との調整を図った結果、現時点ではワキンググループ推奨法が最も適当に対応できる方法と思われた。

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

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

本来環境細菌であるレジオネラ属菌は、人工水系の衛生管理に不備があると増殖し、そこから生じるエアロゾルを介して感染して、重篤な肺炎やポンティアック熱を引き起こす。その制御が、公衆浴場をはじめとする水系施設や設備で課題となっている。公衆浴場等のレジオネラ症対策の向上のために、レジオネラ検査法の改善、およびその普及が急務である。従来の 1~2 週間を要する培養法に対して、1~2 日で結果が得られる迅速検査法が期待されており、迅速検査法の妥当性の検証およびさらなる改良を行う。培養法についても、実検体での検証を重ね、標準的検査法を提唱する。入浴施設等の効果的な衛生管理を達成するため、これまでその有用性を明らかにしてきたモ

A. 研究目的

表1 研究協力者一覧

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

ノクロラミン消毒の実践、および入浴施設の設備構造上の問題を洗い出し、洗浄法の開発を行う。汚染源は半数が入浴施設に関連し、残り半分は不明とされることから、並行して入浴施設以外の環境のレジオネラ属菌汚染実態調査を行う。さらに感染源の同定に必要な分子疫学法の検証や、効率的にレジオネラ属菌を分離する方法の開発やそのための基礎的検討を行う。レジオネラ検査実施機関に対して、外部精度管理や研修を行うことで、レジオネラ検査の質の向上を図る。以上のような研究を実施することで、その成果を通じて、レジオネラ症対策が進み、安心して入浴できる施設が増えることが期待される。

B. 研究方法

各研究項目は、1 から数名の研究分担者および研究協力者（表1）が参加し、実施された。レジオネラ属菌の検出・定量は新版レジオネラ症防止指針に準じて行なった。遺伝子検査法であるqPCR法とLAMP法は、複数の研究項目で実施された。qPCR法は、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。LAMP法は、Loopamp レジオネラ検査キット E（栄研化学）を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。各研究項目の研究方法を以下に記した。

1. モノクロラミン消毒効導入スキームの構築と消毒効果の検証

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

浴施設（県内東部地域 S 施設、中部地域 I 施設、西部地域 D 施設）の湧泉水について、モノクロラミン及び比較対照として遊離塩素を添加後、40 で静置し、経時での系内濃度を測定し、その後、各施設においてモノクロラミン濃度を 3 mg/L に維持する6週間の消毒実証試験を行なった。それぞれの施設の泉質は S 施設が Na/塩化物泉（pH7.2）、I 施設が Na/塩化物泉（pH7.8）、D 施設が I-/アンモニア態窒素/フミン質有機物/臭化物イオンを含む塩化物泉（pH8.1）であった。3施設とも、浴槽水の消毒薬はろ過器前に注入した。モノクロラミンは営業日の循環開始後から、ほぼ1時間30分間隔で計8回、営業終了時までタイマーで間欠的に注入された。また、毎週土曜日にはモノクロラミン濃度 10mg/L、2時間循環による配管洗浄を実施し、その後換水した。

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

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

2. pH10の温泉におけるモノクロラミン消毒

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

mg/L を下回らないよう管理した。週に 1 回、10 mg/L の高濃度モノクロラミンで配管洗浄を行った。洗浄後は、チオ硫酸ナトリウムにより中和し、排水した。施設の浴槽は複数あるが、試験を行ったのは、男湯女湯それぞれ 1 つの浴槽（同一系統、容量計約 9m³）のみとし、他は従来の塩素消毒で管理した。浴槽水は砂ろ過の循環式で管理されていたが、毎日完全換水し、清掃も行われていた。入浴者への配慮として、結合塩素消毒（モノクロラミン消毒）を実施している旨を掲示した。

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

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

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

3. 入浴施設および医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

神奈川県内の 1 入浴施設の浴槽水、湯口水、蛇口水、シャワー水および貯湯槽水と高置貯湯槽水を、3 医療機関の洗面台の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。

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

マニュアルの作成のためのワーキンググルー

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

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

エアレーション・リフレッシュ法の実施にあたっては、容量 4.5 m³ の循環式浴槽を有する東京都文京区の A 銭湯に協力していただいた。砂ろ過器は直径 600 mm、最後のろ材交換は平成 25 年頃で、ろ過流量は 200～250 L/min、ターン数は約 3 ターン/h である。消毒薬剤は、通常営業時はトリクロロイソシアヌル酸を使用し、逆洗は毎日実施していた。平成 29 年 7 月 3 日、および同年 12 月 11 日の 2 回実験を実施した。常用圧力 20 kPa、風量 350 L/min の市販ブロワポンプを、循環ろ過ポンプの圧力計接続部に接続した。循環ろ過ポンプを停止し、砂ろ過器のバルブを閉め、12%次亜塩素酸ナトリウムを遊離塩素濃度が 50 mg/L になる様にヘアキャッチャーに投入した。バルブを逆洗ポジションに切り替えて、循環ろ過ポンプを 10 秒間稼働させ、塩素をろ過タンク内に移送し、設置したブロワポンプを稼働させ、30 分間ろ過タンク内にエアーを吹き込み、空気洗浄した後、逆洗を行った。

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

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

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

6. 感染源解明のための環境調査

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

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

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

(3) 免疫磁気ビーズ（IMB）による *Legionella pneumophila* 血清群 1（以下 Lp1）の選択的濃縮法：100 倍濃縮された浴槽水 35 検体、シャワー水 12 検体、カラン水 6 検体、計 53 検体について、デンカ生研で作製した Lp1-IMB を 25 μl 接種し、10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸着させた。ビーズを磁石で集め、滅菌生理食塩水で洗浄した。この操作（洗浄）を 2 回実施した後、最終的に生食 100 μl もしくは 200 μl に懸濁、ボルテックスでよく混和し、IMB 検体とした。この IMB 検体 100 μl を培養前に熱または酸にて処理し、未処理検体と併せて BCYE-α 培地、GVPC 培地の両方にコンラージ棒で拡げ、35 で 7 日間培養した。

7. レジオネラ生菌迅速検査法の評価

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

PALSAR 法は、100 倍濃縮検体 4 mL を遠心

後、上清を除去し、添付の取扱説明書に従い実施した。目視の発色確認により 16S rRNA が検出された場合を陽性と判定した。なお、溶菌条件を昨年度の 37 15 分から 70 5 分に変更した。

EMA-qPCR 法は、qPCR 法における DNA 抽出の前に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0（タカラバイオ）を用いて EMA 処理を実施した。EMA-LAMP 法は、1000 倍濃縮検体に EMA 処理を実施後、Chelex 溶液を用いて DNA を抽出し、LAMP 法に用いた。

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

平成 29 年 6 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水、25 施設 49 検体を対象とした。比色系パルサー法の検体調製は、検水 50 mL を注射筒に入れてメンブランフィルター（直径 13 mm、孔径 0.22 μm、Merck 社、セルロース混合エステル）でろ過し、ろ過後のフィルターから、100/30 倍に希釈した変性液 100 μL で溶出する方法（方法 1）、検水 100 mL（方法 2）、あるいは 200 mL（方法 3）を直径 25 mm のセルロース混合エステルフィルターでろ過し、200 μL の溶出液の半量を用いる方法の 3 法を実施し、比較した。

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

リファレンスセンターで収集された既に ST（sequence type）が決定している臨床分離株 133 株（内 48 株は昨年度解析済み）、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 48 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 25 株、土壌由来 36 株の計 315 株、および過去の 1 集団感染事例に由来する臨床分離株 45 株、浴槽水由来 21 株、浴槽ふきとり由来 22 株を用いた。

Sobral ら（Appl Environ Microbiol 2011、77:6899）によって報告された 12 領域の PCR を 4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR に改変して、QIAGEN Multiplex PCR Kit を用いて実施した。PCR 産物は AB3500 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）で泳動後、GeneMapper Ver. 4（Applied Biosystems）により、フラグメントサイズおよびリピート数を測

定し、MLVA 型を決定した。

得られた MLVA 型による株間の類縁関係を明らかにするために、BioNumerics Ver7.6 を用いて、Minimum spanning tree (MST) を作成した。MLVA の分解能評価には、HGDI (Hunter-Gaston Discrimination Index) を算出し、各 MLVA 領域の多様性評価には、PIC (polymorphic information content) を算出した。

10. レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発

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

11. レジオネラ感染とアメーバ

PYGC で培養したアメーバ (*A. castellanii* 1501/10 株) をプラスチックから剥離し、遠心洗浄後、 $10 \times AS$ で $1 \times 10^5/ml$ に調整した細胞浮遊液 0.5 mL を 24 ウェルマイクロプレートウェル内で、1 時間 30 で培養し、アメーバをプレートに接着させた後、 $10 \times AS$ で濃度を調整した被検物質 (後述) 300 μL をマイクロプレート内の $10 \times AS$ と置換し、さらに 1 時間培養した。BCYE α 培地にて 30 で培養したレジオネラ属菌 (*L. pneumophila* 血清群 1 378 株) を $10 \times AS$ で 0.1OD に調整し、その 30 μL をマイクロプレートのアメーバ培養ウェルに加え、静かに攪拌してから 30 で 3 時間培養した。その後 50 $\mu g/mL$ となるように gentamycin を添加し、未感染のア

メーバ外にある菌を不活化した。所定の培養時間後にプレート底面全体を氷水上につけアメーバを剥離し、アメーバ浮遊液を回収、遠心 ($500 \text{ rpm} \times 3$ 分間) して、濃縮されたアメーバ浮遊液をスライドガラスに塗布後、ギムザ染色を行った、細胞内に分裂増殖像を示す、あるいは単独で存在する菌が明確であるアメーバを感染細胞として、その数を測定し、感染率を求めた。なお細胞はランダムに約 500 個を調べた。用いた被検物質は、アポシニン (SIGMA-ALDRICH) は少量のエタノールで溶解後、クロロキン (SIGMA-ALDRICH) はそのまま $10 \times AS$ で 10 mM に調整し、塩化アンモニウム (和光純薬) は $10 \times AS$ で 100mM に調整し、ヘパリン (和光純薬) は、 $10 \times AS$ で 10,000U/ml に調整して、ストック溶液とし、用時濃度調整した。

12. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

外部精度管理は、2015 年、2016 年度と同様実施母体を日水製薬株式会社とし、公的、民間合わせて全国 173 の検査機関 (延べ 176 試料配付) が参加した。レジオネラ属菌配付試料として、メーカー保証が得られ、各施設へ直送可能なシスメックス・ピオメリユー社の BioBall (特注品) を使用した。配付試料を受け取った各機関は、50 mL の滅菌生理食塩水に懸濁混和した「非濃縮試料」と、そこから試験用に 1 mL 分取した残りにさらに 441 mL の滅菌生理食塩水を加え、混和した「非濃縮試料」、さらに各機関が行なっているろ過濃縮、あるいは遠心濃縮を実施して得られる「濃縮試料」について、それぞれレジオネラ分離培地に 100 μL ずつ塗布し、各試料中のレジオネラ菌数を算出した。メーカー保証値および微生物学調査の考え方から、回答の良好範囲を 300 ~15,000 CFU/100 mL と設定した。回収率についても解析した。目標とした回収率は、昨年度の外部精度管理で報告を求めたすべての試料 (非濃縮、濃縮) において目標良好範囲を報告し、かつ非濃縮の菌数が濃縮の菌数以上を報告した機関のうち、80% 以上の機関がクリアしていた 20% とした。回答および解析結果の閲覧は専用ホームページにて行われた。研究班への協力機関

として参加した地方衛生研究所等 71 機関については、独自に集計・解析を実施し、2015 年、2016 年度の結果と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがい、個人情報保護に十分に配慮して行われた。利益相反委員会の指導・管理に従って、研究協力関係にある企業等について、研究班内で情報共有を行った。開示すべき企業からの経済的利益は受けていない。

C. 研究結果

1. モノクロラミン消毒効導入スキームの構築と消毒効果の検証

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

2. pH10 の温泉におけるモノクロラミン消毒

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

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

3. 入浴施設および医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

神奈川県内の入浴施設において、カラン・シャワーにレジオネラ属菌による汚染があり、高置貯湯槽とカラン・シャワーおよびその間の配管への

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

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

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

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

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

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

1) マニュアルの作成

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

2) 研究成果の検討

公衆浴場における衛生管理要領等に記載され

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

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

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

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

6. 感染源解明のための環境調査

レジオネラ属菌が検出されたのは、浴槽水で 8/39 検体（20.5%）、シャワー水で 8/32 検体（25.0%）、カラン水で 4/15 検体（26.7%）であった。河川水については、9 月および 11 月の 6 検体からレジオネラ属菌が検出された（検出率 30.0%、すべて *L. pneumophila*）。昨年度分も含め、道路沿い 151 検体、浴室内 21 検体および屋内 20 検体のエアロゾル補集の結果、直接培養法およびアメーバ共培養法においてレジオネラ属菌は分離されなかった。しかし、遺伝子検査法（qPCR 法）では道路沿い検体で 75.5%（114/151 検体）、浴室内検体で 71.4%（15/21 検体）および屋内検体で 45.0%（9/20 検体）からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。16S rRNA 遺伝子の平均コピー数（copies/m³）は、道路沿い検体で 81.0、浴室内検体で 72.0、屋内で 19.5 であった。滅菌水で捕集した道路沿い 30 検体についても、レジオネラ属菌は分離されなかったが、

86.7%（26/30 検体）からレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子が検出され、平均コピー数（copies/m³）は 31.9 であった。また、生菌を検出する EMA-qPCR 法においても、66.7%（20/30 検体）からレジオネラ属菌遺伝子が検出され、平均コピー数（copies/m³）は 20.0 であった

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

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

7. レジオネラ生菌迅速検査法の評価

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

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

と低かった。

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

168 検体について qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 97.0%であり、平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のほとんどを検出できる迅速検査法であったが、特異度は 37.8%、一致率は 49.4%であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、177 検体について EMA-qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 82.4%、特異度は 61.5%、一致率は 65.5%であり、EMA 処理を実施することで死菌 DNA の増幅を抑制することができ、より平板培養法と相関する方法となった。

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

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

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

斜光法は培養 3 日後を判定日とし、特徴あるモザイク様のコロニーについて確認検査を行った。その結果、レジオネラ属菌が検出された 20 検体は、継続培養後に菌数が増加することはあったが、全て斜光法で陽性を確認することができた。選択培地と非選択培地の培養結果を比較したところ、

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

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

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

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

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

10. レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発

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

11. レジオネラ感染とアメーバ

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

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

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

12. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

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

2017 年 5 月に ISO 11731 の改訂がなされたため、本研究班のレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ（WG）推奨法との整合性を確認した。日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナーに講師として参加し、WG 推奨法の普及に努めた。

13. レジオネラ属菌検査研修会の開催

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

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

D. 考察

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

レジオネラ属菌による継続的な汚染が見られる入浴施設において、高置貯湯槽の手前に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置したが、給湯水およびシャワー水からレジオネラ属菌が検出された。夜間や休日に高置貯湯槽とその先の配管中の遊離残留塩素濃度が低下するためレジオネラ属菌が増殖したと推測された。3 医療機関の給水・給湯系からレジオネラ属菌が検出された。初流水に比較して、3L 流水後および 3 分間（9L）流水後に採取した試料のレジオネラ属菌数および従属栄養細菌数が減少していたことから、レジオネラ属菌および従属栄養細菌が蛇口とその近辺の配管中で増殖していることが推測された。1 医療機関の受水槽に遊離残留塩素濃度が 0.5mg/L となるように次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置したが、レジオネラ属菌の検出数の変化が小さかったことから、添加量を増やして遊離残留塩素濃度を上げる等の検討が必要であると考察された。

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

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

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

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

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

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

特殊な機器を必要としない PALSAR 法の利点を活かすには、ろ過においても高価な機器を使用しない方法が望まれる。注射筒を用いたろ過であれば、現場での検査も可能で、繰り返し検査ができ、迅速な衛生管理につながる。ろ過に時間がかかる検体は、13mm フィルターの代わりに 25mm フィルターを用いることで、その問題が解消された。

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

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

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

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

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

本研究班のレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ（WG）推奨法について、ISO 11731 が 2017 年 5 月に改訂されたことも踏まえ、日本の浴槽水検査法としての妥当性を検証した。WG 推奨法について、今後は、「公衆浴場における衛生等管理要領」で標準的検査法として提示できるよう検討を進めていく予定である。

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

E. 結論

公衆浴場等施設の衛生管理の向上を目指して、研究を実施した。

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

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水、河川水、屋内・浴室および道路沿いの空気等について培養検査および迅速検査を行い、レジオネラ属菌による汚染実態を明らかにした。レジオネラ培養には斜光法を取り入れ、一部の検体にはアメーバ共培養法、免疫磁気ビーズによる選択的濃縮法を適用した。レジオネラ属菌 DNA・RNA・表層抗原等を検出対象とする各種迅速検査法を検討し、感度の向上、時間の短縮を図った。

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

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

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

F. 健康危険情報

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

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

G. 研究発表

1. 論文発表

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

- Shizuoka, Japan. Genome Announc. 2017 Nov 22;5(47).
- 2) 杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 神田 隆, 久保田 明, 縣 邦雄, 小坂浩司, 前川純子, 遠藤卓郎, 倉 文明, 八木田健司, 泉山信司, モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策, 日本防菌防黴学会誌, 295-300, Vol.45, No.6 (2017)
 - 3) Ito A, Ishida T, Tachibana H, Ito Y, Takaiwa T, Fujii H, Hashimoto T, Nakajima H, Amemura- Maekawa J. A case of community-acquired pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 9 in which initial treatment with single-dose oral azithromycin appeared useful. Jpn J Infect Dis. 70:660-662, 2017.
 - 4) Kanatani JI, Isobe J, Norimoto S, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M. Prevalence of Legionella species isolated from shower water in public bath facilities in Toyama Prefecture, Japan. J Infect Chemother. 23:265-270, 2017
 - 5) Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. Epidemiol. Infect. 145:1398-1408, 2017.
 - 6) Kuroki T, Amemura-Maekawa J, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee KI, Ohnishi M, Kura F. Outbreak of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella pneumophila* Serogroups 1 and 13. Emerg Infect Dis. 23(2): 349-351, 2017.
 - 7) 磯部順子, 金谷潤一, 他. 2017. 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2016年). 富山県衛生研究所年報. 40:61-66.
2. 総説
 - 1) 倉 文明. 環境におけるレジオネラの存在と感染予防策. 最新医学. 72:520-527, 2017.
 - 2) 倉 文明. レジオネラ感染. 日本医師会雑誌. 146. 特別号(2)環境による健康リスク: S202-294, 2017.
 3. 書籍
 - 1) 赤井仁志, 井上浩章, 枝川亜希子, 小澤匡弘, 倉 文明, 小瀬博之, 関 雅文, 高貝健治, 高橋佳代子, 高橋幸雄, 舘田一博, 長岡宏美, 比嘉 太, 古畑勝則, 前川純子, 松鷲さとみ, 松村佳明, 宮下修行, 柳 宇. 第4版レジオネラ症防止指針. 公益財団法人日本建築衛生管理教育センター. 平成29年7月.
 4. 学会発表
 - 1) Morinaka R, Amemura-Maekawa J, Kanatani J, Isobe J, Sasaki M, Haraguchi H, Futo S, Kura F.: Detection of *Legionella* spp. by new colorimetric PALSAR method. 9th International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
 - 2) Amemura-Maekawa J, Kuroki T, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee K, Ohnishi M, Kura F.: Molecular and epidemiological analysis of *Legionella pneumophila* strains in an outbreak at bath facilities in Japan. 9th International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
 - 3) Kura F, Amemura-Maekawa J: *Legionella* detections in environments and their impacts on the occurrence of legionellosis in Japan. 9th International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
 - 4) Kanatani J, Isobe J, Norimoto S, Kimata K, Uchida K, Kura F, Amemura-Maekawa J, Watahiki M: Detection and identification of *Legionella* species in aerosols from the area nearby asphalt roads and bath water

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

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 29 年度 分担研究報告書

モノクロラミン消毒導入スキームの構築と消毒効果の検証

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
研究協力者	森主博貴	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
	村田学博	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
	杉山寛治	株式会社マルマ 研究開発部
	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）

平成 27 年 3 月 31 日、厚生労働省はレジオネラ防止対策マニュアルを改正し、浴槽水に対するモノクロラミンの消毒効果を初めて明記した。本研究では、本消毒法の普及を目的として営業施設がモノクロラミン消毒を導入する際に活用できるスキームを構築した。

構築したスキームを利用して、静岡県内の泉質の異なる 3 箇所の入浴施設においてモノクロラミン消毒を導入し、レジオネラ属菌に対する消毒効果の実証試験を実施した。その結果、モノクロラミンの濃度保持がその消毒効果に反映するため、導入スキームには対象となる泉質に対するモノクロラミンの濃度変化の検証を必須とすることが最重要綱目であることが示唆された。さらに、実証試験の結果、運用に当たっては施設ごとにモノクロラミンの注入方法を検討する必要があることが示された。

また、これまで遊離塩素での消毒効果が期待できず、モノクロラミンの消毒効果も難しいと思われたヨウ化物イオン、臭化物イオンを含むフミン質有機物泉においても注入方法を工夫することで一定の消毒効果を得ることが実証された。

A. 研究目的

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、モノクロラミン消毒導入のモデルスキームを構築し、実際の入浴施設において実証試験を行い、モノクロラミン消毒の適用を検討した。

B. 研究方法

1 導入モデルスキームの構築

これまで、モノクロラミン消毒効果の実証試験実施時に行っていた実験室レベルでの事前試験を盛り込んだスキームの構築を試みた。

2 入浴施設へのモノクロラミン消毒導入実証試験

静岡県内でモノクロラミン消毒の導入を検討したいと所轄保健所に相談のあった 3 か所の入浴施設（県内東部地域 S 施設、中部地域 I 施設、西部地域 D 施設）で、モノクロラミン濃度を 3 mg/L に維持する 6 週間の消毒実証試験を行なった。それぞれの施設の泉質は S 施設が Na/塩化物泉 (pH7.2)、I 施設が Na/塩化物泉 (pH7.8)、D 施設が I-/アンモニア態窒素/フミン質有機物/臭化物イオンを含む塩化物泉 (pH8.1) であった。

3 施設とも、浴槽水の消毒薬はろ過器前に注入していた。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 1 回換水時の排水を S 施設 3 箇所、I 施設原泉、貯湯槽、浴槽水 6 か所、D 施設 10 箇所から採水した。

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、浴槽水のモノクロラミン濃度と遊離アンモニア濃度を、ポケット水質計 PC (HACH 社) のインドフェノール法により測定し、モノクロラミンの生成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。

C. 結果

1 導入モデルスキーム (図 1)

まず、実証試験実施施設の源泉に対して、モノクロラミン及び比較対照として遊離塩素を添加後、40 の温浴槽内に静置し、経時での系内濃度を測定することで、濃度安定性を調べた。モノクロラミンを添加した系の測定にはインドフェノール法を、遊離塩素を添加した系の測定には DPD 法を使用した。その結果、モノクロラミンの濃度安定が確認された源泉を消毒適用可と判断した。つづいて、このスキームに準じ、実証試験を実施した。実証試験では、モノクロラミン濃度の安定性とレジオネラ属菌検出状況について調査した。

2 (1) モノクロラミン消毒時のレジオネラ属菌検出状況

S 施設

6 週間のモノクロラミン消毒期間中、3 箇所全ての採水場所からレジオネラ属菌は検出されなかった。

I 施設

源泉はモノクロラミン未添加の検体であり、6 週間すべてからレジオネラ属菌が検出された。貯湯槽では 5 週目までは検出されなかったが、6 週目の検体からレジオネラ属菌が検出された。6 箇所の浴槽水のうち 2 箇所はいずれの期間もレジオ

ネラ菌は検出されなかったが、2箇所は4回目と6回目、2箇所は3回目と6回目の検体からレジオネラ属菌が検出された。

D 施設

モノクロラミン消毒導入前は10箇所中4箇所の浴槽水からレジオネラ属菌が検出されたが、6週間後までには検出されなくなった。一方、源泉は6週間連続して検出された。

(2) モノクロラミンの濃度安定性

S 施設

6週間の実施期間内、浴槽水のモノクロラミン濃度は比較的安定で、ほぼ3mg/lを維持することができた。

I 施設

導入時1週目までは濃度の変動が激しかったが、2週目以降は安定し、3mg/lを維持することができた。

D 施設

1日内の濃度変動が激しく、採水場所によっても濃度の安定性に差が見られた(図2)。

D . 考察

構築したモノクロラミン消毒の導入スキームを用いて静岡県内3箇所の営業施設で実証試験を行ったところ、レジオネラ属菌に対して消毒に効果ある結果が得られた。しかしながら、その消毒効果はモノクロラミンの濃度に依存するところが大きく、モノクロラミンの濃度は、泉質の他入浴者数や施設の配管の状態に大きく影響を受けることから、それぞれの施設で安定性は異なっており、実際の運用に当たってはそれぞれの施設に応じた対応をする必要があると思われる。

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の導入スキームを構築し、それを用いて営業施設へ適用した結果、良好な消毒効果が得られたが、消毒効果の根幹であるモノクロラミンの濃度保持については施設ごとに検討が

必要であることが、今後モノクロラミン消毒を導入するにあたっての問題点であることが示唆された。

一方、今回実証試験を行った3施設は、3月までに遊離塩素消毒からモノクロラミン消毒に切り替えることとなった。

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>

G. 研究発表

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)

- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

導入のモデルスキーム

実験室レベルで源泉水へのモノクロアミン消毒適用の可否を調査



実証試験を行う源泉水にモノクロアミンや遊離塩素を加え経時的濃度変化を確認

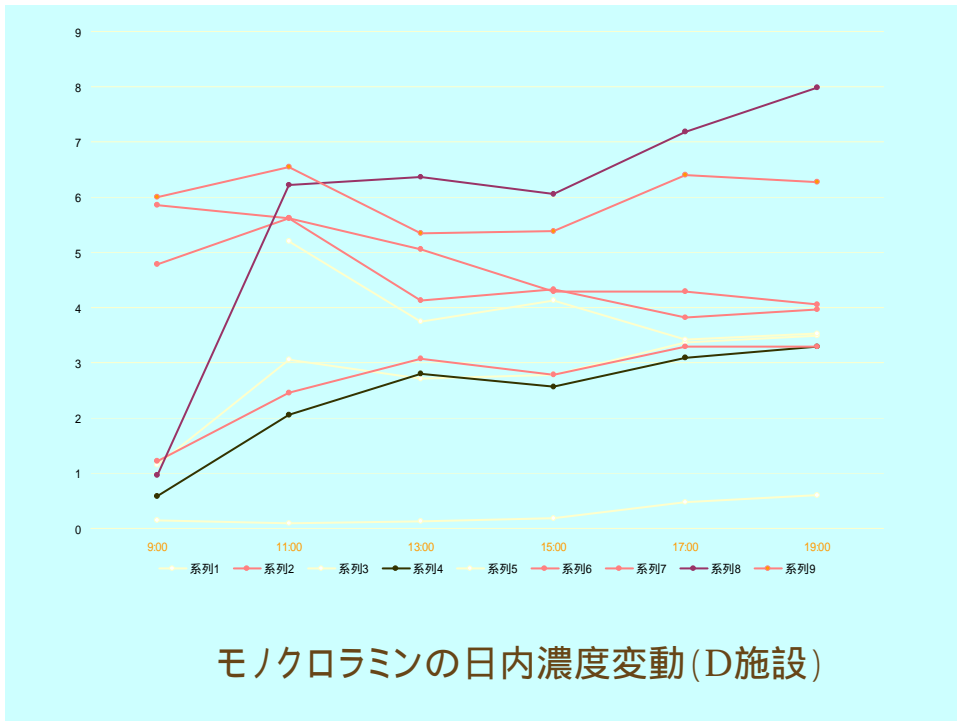
実証試験

調査項目

- (1)モノクロアミンの濃度安定性
- (2)微生物検査・レジオネラ属菌

2

図1 導入のモデルスキーム



モノクロアミンの日内濃度変動(D施設)

図2 D施設におけるモノクロアミンの日内濃度変動

平成 29 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

pH10 の温泉における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	柳本 恵太	（山梨県衛生環境研究所 微生物部）
研究協力者	堀内 雅人	（山梨県衛生環境研究所 環境科学部）
研究協力者	山上 隆也	（山梨県衛生環境研究所 微生物部）
研究協力者	植松 香星	（山梨県衛生環境研究所 微生物部）
研究協力者	久田 美子	（山梨県衛生環境研究所 微生物部）
研究協力者	森 康則	（三重県保健環境研究所 衛生研究課）
研究協力者	杉山 寛治	（株式会社マルマ 研究開発部）
研究協力者	田中 慶郎	（株式会社マルマ PC 営業部）
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）

研究要旨

pH が高い温泉では遊離塩素消毒に困難をきたしており、代替方法として、結合塩素（モノクロラミン）による消毒に期待が寄せられている。これまで、pH8 ないし 9 の浴場施設では消毒効果が確認されているが、さらに高 pH における効果は未確認である。本研究では、pH10 程度の温泉施設において、モノクロラミン消毒の実証試験を行った。試験期間は 6 週間とした。試験前に 1 回、期間中は 1 週間に 1 回、営業終了後に浴槽水の採水および配管のふきとりを行い、レジオネラ属菌は検出されなかった。レジオネラ属菌増殖の温床となるアメーバ、衛生指標菌である大腸菌群も不検出であった。一般細菌数と従属栄養細菌数は、モノクロラミン導入前後を比較すると、いずれも減少した。モノクロラミン消毒は、pH10 程度の高 pH であっても効果があり、良好な衛生状態を維持することができた。

A. 研究目的

レジオネラ症の報告数は年々増加しており、2017 年の速報値では 1,700 件を超えている。レジオネラ症の主な感染源は公衆浴場等の浴槽水とされ、次亜塩素酸ナトリウム（塩素）による浴槽水の消毒が指導されているが、鉄やマンガン、アンモニウムイオンが存在している場合や、高 pH の場合は消毒効果が減弱することから、その対策が急務となっている。実際、レジオネラ症の疫学調査によると、患者が利用した浴場は pH9 以上が多く、レジオネラ属菌の定量値が高いこと

が確認されている¹⁾。このため、レジオネラ症発生防止に、高 pH の浴槽水にも有効な消毒が必要である。

本研究で着目した結合塩素の一種であるモノクロラミンは、国内外の一部の水道で利用されており、鉄、マンガン、アンモニウムイオンの存在下や、pH9 程度のアルカリ性条件下においても消毒効果が高いこと、消毒副生成物やいわゆる塩素臭が少ないこと、浴槽水中の安定性が高く消費量が少ないことから、従来の遊離塩素消毒に代わる方法として期待されている²⁻³⁾。特に、

pH10 を超える浴用水での消毒効果の違いは顕著であり、モノクロラミンが有用な消毒剤であると、試験管内での消毒実験により示唆された⁴⁾。そこで本研究では、pH10 程度の浴槽水を有する営業施設において、モノクロラミン消毒の実証試験を行った。

B. 研究方法

1. 営業施設および試験期間

湧泉水の pH が 10 を超えており(表 1)、モノクロラミンの安定性(図 1)が確認されている公衆浴場 1 施設(以下施設)の協力を得た。モノクロラミン生成装置(ケイアイ化成)を設置し、6 週間の実証試験を行った。モノクロラミン濃度は、3 mg/L を下回らないよう、タイマー式の制御で管理した。週に 1 回、10 mg/L と高濃度のモノクロラミンで配管の消毒洗浄を行った。洗浄後は、チオ硫酸ナトリウムにより中和し、排水した。施設の浴槽は複数あるが、試験を行ったのは、男湯女湯それぞれ 1 つの浴槽(同一系統、容量計約 9m³)のみとし、他は従来の塩素消毒で管理した。浴槽水は砂ろ過の循環式で管理されていたが、毎日完全換水し、清掃も行われていた。入浴者への配慮として、結合塩素消毒(モノクロラミン消毒)を実施している旨を掲示した。

2. 採水および検査項目

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

浴槽水のレジオネラ属菌は 100 倍ろ過濃縮液を、ふきとり検体は懸濁した原液を、それぞれ熱処理または酸処理し、GVPC 寒天培地で 36、7 日間培養した⁵⁾。大腸菌群は浴槽水 100 mL を EC ブルー 100P「ニスイ」、一般細菌数は標準寒天培地を用いて 36、24 時間培

養した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 42、14 日間で求めた。アメーバは、浴槽水原液および 1000×g、5 分間で遠心 50 倍濃縮した浴槽水から、大腸菌塗布無栄養寒天培地を用いて、42 で 14 日間培養した。

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

C. 研究結果および考察

浴槽水の全残留塩素濃度は、コンセントの接触不良による電源トラブルがあった 7 日目を除いて、試験期間中 3 mg/L 以上を維持することができた(図 2)。ただし、試験期間前半の午後 5 時頃の時間帯において、濃度が 6 mg/L 程度まで高くなることもあった(表 2)。その後、モノクロラミン注入量を調整し、終日 4 mg/L 前後に維持することができた。結果には示さないが、施設における経時的な測定結果と、週に 1 回のモノクロラミン濃度測定に矛盾はなかった。浴槽水の水温は 40 前後、pH は 9.5~9.9 であった。実証試験前における遊離残留塩素濃度は、1 mg/L 程度であった。

レジオネラ属菌は、浴槽水と配管ふきとり検体のいずれにおいても、検出されなかった(表 2)。レジオネラ属菌増殖の温床となるアメーバ、衛生指標菌である大腸菌群についても、全て不検出であった。一般細菌数と従属栄養細菌数は、実証試験前後を比較すると、いずれも全ての検体において減少した。

モノクロラミン濃度や浴槽水の換水頻度といった衛生管理の条件が同一ではないことに留意する必要はあるが、モノクロラミンは pH10 程度であっても消毒効果があり、良好な衛生状態を維持できることが示された。従来の実証試験では pH9 程度に留まっていたが、より高 pH でも適用

可能であった。pH が高い浴槽水においてレジオネラ対応に苦慮している現状を鑑みると、そのような浴槽水でのレジオネラ症防止にはモノクロラミン消毒が適していると考えられた。試験管内の結果が再現され、実施設での適用前に実験室において試験することは有用と考えられた⁴⁾。

今回の結果は、消毒以外の衛生管理についても徹底して行っている営業施設における結果である。換水や清掃の頻度がより低い施設における効果は今回の結果とは異なる可能性があることから、今後も様々な営業施設で継続して実証試験を行い、データを蓄積していきたい。

D. 結論

pH10 程度の浴槽水におけるモノクロラミン消毒の実証試験の結果、良好な衛生状態を維持することができた。モノクロラミン消毒は、従来の塩素消毒よりも高い消毒効果が得られた。pH10 程度の浴槽水においては、レジオネラ症防止の観点からモノクロラミン消毒が適していると考えられた。

E. 参考文献

1. 柳本恵太, 山上隆也, 植松香星:レジオネラ症患者関連調査における山梨県内の公衆浴場等からのレジオネラ属菌検出状況について, 山梨衛環研年報, 60, (2016), 56~59
2. 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 懸邦雄, 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, 59, (2010), 109~115
3. 杉山寛治 長岡宏美, 佐原啓二, 神田隆, 久保田明, 懸邦雄, 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, 45, (2017), 295~300
4. 柳本恵太, 高村知成, 植松香星:山梨県内のレジオネラ属菌の消毒が困難な浴用水におけるモノクロラミンの消毒効果, 山

梨衛環研年報, 59, (2015), 55~57

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

F. 研究発表

誌上発表

1. Yoshida M, Izumiyama S, Fukano H, Sugiyama K, Suzuki M, Shibayama K, Hoshino Y. Draft Genome Sequence of Mycobacterium sp. Strain shizuoka-1, a Novel Mycobacterium Isolated from Groundwater of a Bathing Facility in Shizuoka, Japan. Genome Announc. 2017 Nov 22;5(47).
2. 杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 神田 隆, 久保田 明, 懸 邦雄, 小坂浩司, 前川純子, 遠藤卓郎, 倉 文明, 八木田健司, 泉山信司, モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策, 日本防菌防黴学会誌, 295-300, Vol.45, No.6 (2017)

口頭発表

1. 柳本恵太, 堀内雅人, 植松香星, 山上隆也, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 市村祐二, 泉山信司:アルカリ性温泉におけるモノクロラミン消毒の実証試験、第20回山梨県公衆衛生研究発表会、山梨県(2018)
2. 柳本恵太, 堀内雅人, 杉山寛治, 田中慶郎, 市村祐二, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 泉山信司:アルカリ性温泉におけるモノクロラミン消毒の実証試験、平成29年度山梨県衛生環境研究所成果発表会、山梨県(2018)
3. 泉山信司, 市村祐二, 青木信和, 江口大介, 杉山寛治, 長岡宏美, 水泳プールのモノクロラミン消毒の試み、環境技術学会、2017年7月、東大阪市

知的所有権の取得状況
特許申請、実用新案登録、その他
なし

謝辞
本研究実施にご協力いただいた浴場施設の
関係者の皆様、管轄保健所衛生課に深く感謝
いたします。

表 1 施設の源泉水

項目	分析値	項目	分析値	項目	分析値
pH	10.16	Cl ⁻	3.7 mg/L	硫黄	< 0.1 mg/L
ORP	+ 70 mV	Br ⁻	不検出	総鉄イオン	< 0.1 mg/L
一般細菌数	62 CFU/mL	I ⁻	不検出	アンモニア態窒素	< 0.1 mg/L
		S ₂ O ₃ ²⁻	不検出	マンガンイオン	< 0.1 mg/L

硫化水素(H₂S)、硫化水素イオン(HS⁻)、硫化物イオン(S²⁻)の合計値

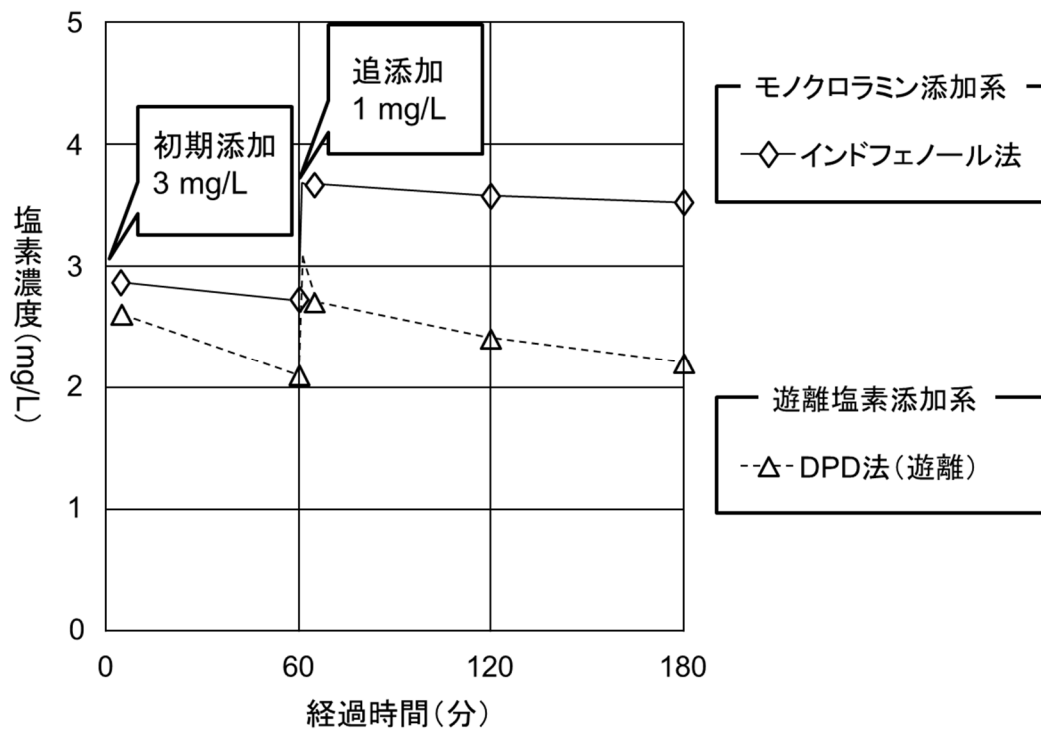


図 1 モノクロロミンおよび遊離塩素の源泉水における経時的濃度変化

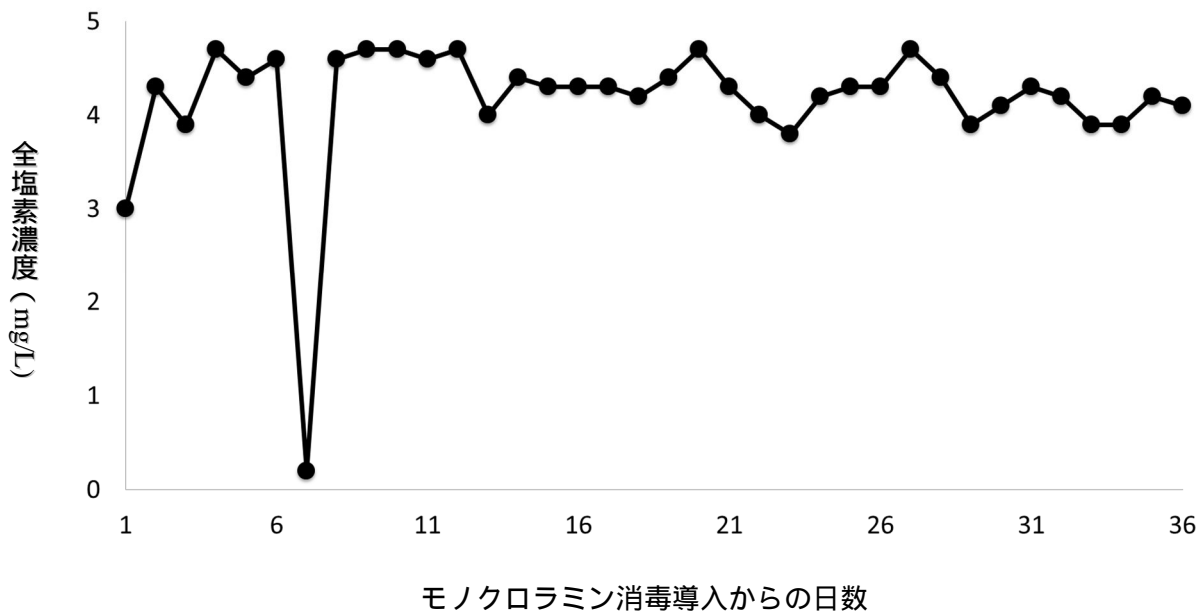


図2 午前11時における全塩素濃度

表2 浴槽水、配管ふきとり検体の検査結果

検査項目	モノクロラミン 導入前	採水1回目	採水2回目	採水3回目	採水4回目	採水5回目	採水6回目
レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
レジオネラ属菌 (ヘアキャッチャー配管ふきとり)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
アメーバ数 (/ 50 mL)	0	0	0	0	0	0	0
大腸菌群 (/ 100 mL)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
一般細菌数 (CFU/mL)	18	0	0	1	2	0	1
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	45	1	1	3	2	1	3
pH	9.58	9.72	9.72	9.81	9.75	9.85	9.78
遊離残留塩素 (mg/L)	1.04	0.12	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10
全残留塩素 (mg/L)	-	6.7	6.4	4.8	4.0	4.3	4.6
モノクロラミン (mg/L)	-	6.32	6.00	4.46	3.99	4.24	4.54
アンモニア態窒素 (mg/L)	-	0.84	1.08	0.92	0.86	0.80	0.88

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 29 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	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
研究協力者	陳内理生	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の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態調査を行い、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 入浴施設においては、カラン・シャワーにレジオネラ属菌による継続的な汚染が検出され、対策を実施して、効果を検証した。高置貯湯槽とカラン・シャワー及びその間の配管への高濃度塩素消毒を施したところ、施術後はレジオネラ属菌は培養にて検出されなくなったが、その後の経過を追ったところ、レジオネラ属菌が検出されるようになった。そこで、高置貯湯槽の前に塩素添加装置を設置し、貯湯槽と配管中の温水の消毒を行うこととした。消毒開始後の調査では、培養によりレジオネラ属菌が検出された。医療機関については、これまでの調査によりレジオネラ属菌汚染が明らかとなっている 3 医療機関の給水系・給湯系の汚染状況を詳細に調査した。その結果、給水系と給湯系のいずれもがレジオネラ属菌により汚染されていた。初流水と 3L 流水後及び 3 分間（9L）流水後に採取した試料のレジオネラ属菌数及び従属栄養細菌数が減少していたことから、レジオネラ属菌及び従属栄養細菌が蛇口とその近辺の配管中で増殖していることが推測された。

A. 研究目的

本調査は、入浴施設及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態を調査し、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入浴施設及び3医療機関とした。

入浴施設では地下の貯湯槽と高置貯湯槽からの各1試料と、男湯と女湯のそれぞれについて浴槽水、湯口水の各1試料を採取した。蛇口とシャワーは男湯と女湯の各2か所と1か所から放水直後に採取した。また、蛇口2か所のうち1か所からの水は3分間流水後にも採取した。レジオネラ属菌用水試料は、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。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。

医療機関では、洗面台の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。給水系の水と給湯系の温水を分けて採取できる蛇口では、水と温水を分けて採取した。蛇口からの放水直後、3L流水後及び3分間(9L)流水後に、*Legionella*

属菌と従属栄養細菌用の500mlとpH及び塩素濃度測定用の50mlの2本ずつを採取した。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。温度、pH、遊離残留塩素濃度の測定及び搬送は、上記の入浴施設のシャワー・カランの試料と同様に行った。

3) *Legionella* 属菌の分離

試料は直径47mm、孔径0.2 μ m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段階希釈し、原液と10倍および100倍希釈液の各100 μ l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 \pm 7日間培養した。*Legionella*属菌を疑う集落をBCYE α 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

調査対象とした 3 医療機関のうち、1 医療機関において、昨年度から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ている。

C. 結果及び考察

1) 入浴施設

調査対象とした入浴施設は、2015 年 11 月 17 日から汚染実態調査を継続的にしている。これまでの結果を整理して表 1 に示した。対策として 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が、2016 年 3 月 17 日にレジオネラ検査によりカランとシャワーからレジオネラ属菌 DNA が検出された。次に、カランとシャワーの新品

の交換を合わせて実施したが、2016 年 7 月 26 日のレジオネラ検査ではレジオネラ属菌の除去はできていなかった。そこで、さらに 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を用いた消毒を実施したところ、2016 年 11 月 2 日のレジオネラ検査ではレジオネラ属菌 DNA は検出されたが、培養では菌は検出されなかった。その後、経過観察として 2017 年 2 月 28 日と 5 月 9 日にレジオネラ検査を行ったところ、培養によりレジオネラ属菌が検出された。

当該施設は、源泉からの原湯を地下の貯湯槽に受け、高置水槽に上げて、そこからカランやシャワーに配水している。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。そこで、地下の貯湯槽と高置貯湯槽の間に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置して給湯水を消毒する対策を行った。この対策の効果を検証するために、2018 年 1 月 30 日に採水を行い、*Legionella* 属菌等の検査を実施した。その結果、給湯栓及びシャワーから採取した試料から *Legionella* 属菌が検出された。夜間や休日に高置貯湯槽とその先の配管中の温度が低下するとともに遊離残留塩素濃度が低下する、あるいは次亜塩素酸ナトリウムの添加が不十分等の原因となって *Legionella* 属菌が増殖したと推測される。今後、添加量を上げて遊離残留塩素濃度を高める等の対応が必要と考えられる。

2) 医療機関

調査に協力いただける神奈川県内の3か所の総合病院（A、B、D）を対象とした。

医療機関 A では、採水場所は5か所（病室洗面台、トイレ洗面台、手術準備室、手術準備室手指洗浄場、受水槽）とし、13試料を2017年8月15日に採取した。*Legionella* 属菌は受水槽を除く、4か所から採取した10試料から、*L. pneumophila* SG1、SG5、*L. feeleii* SG1 及び *Legionella* 属菌（菌種未同定）が検出され、菌数は10～2100 CFU/100mlであった。初流水と3L流水後の試料では、*Legionella* 属菌及び従属栄養細菌数の減少が観察された。医療機関 A では実験的に受水槽に次亜塩素酸添加装置を設置し、効果を検証中であるが、添加装置設置前と比較して手術準備室2での *Legionella* 属菌検出数の減少がみられたことから、一定の効果があったと考えられるが、その他の地点で *Legionella* 属菌の検出数の変化が小さいことから、添加量を増やして遊離残留塩素濃度を上げる等の検討が必要であると考察された。

医療機関 B では、6か所（談話室洗面台1、談話室洗面台2、浴室給湯栓、浴室洗面台、病室1洗面台、病室2洗面台）とし、20試料を2017年8月29日に採取した。*Legionella* 属菌は4か所から採取した11試料から検出され、菌数は40～2000 CFU/100mlであった。医療機関 B においても初流水と3L流水後の試料では、菌数の減少が観察された。

医療機関 D では、6か所（地下控室、倉庫内、病室1洗面台、病室2洗面台、病室3洗面台、病室4洗面台）とし、

18試料を2017年8月22日に採取した。*Legionella* 属菌は2か所から採取した4試料から採取された。

医療機関 A と B では、給水系試料と給湯系試料を同一の蛇口から分けて採取することが可能であったが、両方の系から *Legionella* 属菌が検出された。これは給水系及び給湯系のいずれにおいても *Legionella* 属菌に汚染されていたことが推測された。

D.まとめ

入浴施設及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染が検出され、汚染の原因は使用頻度の低い蛇口や配管における遊離残留塩素濃度の低下、給湯系における温度の低下が推測された。こうした汚染に対して種々の対策を検討してきたが、確実な効果を得ることができない。今後さらに検討すべき対策として、使用頻度の低い蛇口での流水（フラッシング）、塩素濃度・温度の維持、定期的な配管の消毒、使用頻度の低い蛇口の廃止、レジオネラ対策を踏まえた系の設計・管理等が挙げられる。今後の研究活動の中で継続的に汚染状況の把握と対策の検証を行い、効果的な対策の追及を行っていく必要がある。

E. 研究発表

該当なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 神奈川県内の入浴施設における湯口、シャワー及び給湯栓のレジオネラ属菌汚染状況

検体	2015年		2016年				2017年				2018年			
	11月17日 ¹		3月17日 ²		7月26日 ³		11月2日 ⁴		2月28日 ⁵		5月9日 ⁵		1月30日 ⁶	
	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養
男湯 湯口	+	-	+	<i>L.p.</i> SG1	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
男湯 シャワー	-	-	+	-	-	<i>L.p.</i> SG9	+	-	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG9	+	-
男湯 給湯栓 1	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG1, SG6, SG9	+	<i>L.p.</i> SG6, SG9	+	-	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG9, <i>L.</i> sp.
男湯 給湯栓 2	+	<i>L.p.</i> SG1	+	<i>L.p.</i> SG9	-	<i>L.p.</i> SG9	-	-	+	-	+	<i>L.p.</i> SG6, SG9	-	<i>L.p.</i> SG1
女湯 湯口	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
女湯 シャワー	+	<i>L.p.</i> SG1, <i>L.sp.</i>	ND	ND	-	-	+	-	+	-	-	<i>L.sp.</i>	+	<i>L.sp.</i>
女湯 給湯栓 1	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.sp.</i>	+	-	+	<i>L.sp.</i>	+	-	+	-
女湯 給湯栓 2	+	<i>L.p.</i> SG1	+	<i>L.p.</i> SG1	-	<i>L.sp.</i>	+	-	+	-	-	-	+	-

L. p. Legionella pneumophila、*L. sp. Legionella sp.*、SG 血清型

- 1 実態調査の初回、2 流水処置実施後、3 カラン・シャワー交換後、4 高濃度塩素による消毒後、5 経過観察、
6 次亜塩素酸添加装置設置後

表 2 医療機関 A における給水・給湯系の *Legionella* 属菌の汚染状況

採取場所	水系	採取時点	温度 ()	pH	遊離残留 塩素濃度 (mg/L)	<i>Legionella</i> 属菌			従属栄養細菌	
						LAMP	培養	菌種	菌数 (CFU/100ml)	菌数 (CFU/ml)
病室	給湯	初流水	31.7	7.8	0.1	+	+	<i>L.p.</i> .SG5, <i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	100	181
	給湯	3L 後	32.0	7.8	0.1	+	+	<i>L.sp.</i>	300	33
	給水	初流水	26.9	7.8	0.3	+	+	<i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	1000	31
	給水	3L 後	26.0	7.8	0.4	-	+	<i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	190	34
トイレ	混合	初流水	25.7	7.9	0.5	+	+	<i>L.p.</i> .SG1, <i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	1000	5300
	混合	3L 後	24.6	7.8	0.6	+	+	<i>L.p.</i> .SG1, <i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	300	870
手術準備室 1	給水	初流水	24.4	7.8	0.6	+	+	<i>L.p.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	2100	26
	給水	3L 後	23.7	7.8	0.6	-	+	<i>L.sp.</i>	70	10
	給湯	初流水	38.0	7.8	0.2	-	+	<i>L.sp.</i>	10	380
	給湯	3L 後	47.2	7.8	0.2	-	-			2
手術準備室 2	混合	初流水	28.8	7.9	0.2	-	+	<i>L.sp.</i>	10	4
	混合	3L 後	23.9	7.8	0.5	-	-			3
受水槽			21.1	7.8	0.7	-	-			9

L.p. *Legionella pneumophila*、*L.f.* *Legionella feeleii*、SG 血清型

表 3 医療機関 B における給水・給湯系の *Legionella* 属菌の汚染状況

採取場所	水系	採取時点	温度 ()	pH	遊離残留 塩素濃度 (mg/L)	<i>Legionella</i> 属菌			従属栄養細菌	
						LAMP	培養	菌種	菌数	
									(CFU/100ml)	(CFU/ml)
談話室 1	混合	初流水	30.4	7.5	0	+	+	<i>L.sp.</i>	1710	1160
	混合	3L 後	36.8	7.6	0.1	+	+	<i>L.sp.</i>	2000	219
談話室 2	混合	初流水	37.2	7.5	0	+	+	<i>L.sp.</i>	280	4200
	混合	3L 後	37.7	7.7	1.3	+	+	<i>L.sp.</i>	180	139
浴室給湯栓	給水	初流水	26.7	7.5	0	+	-			640
	給水	3L 後	26.5	7.5	1.3	-	-			6
	給湯	初流水	40.9	7.5	0.05	-	-			11
	給湯	3L 後	39.9	7.5	0.1	-	-			6
浴室洗面台	給水	初流水	26.0	7.5	0	-	-			209
	給水	3L 後	26.2	7.5	0.3	-	-			9
	給湯	初流水	26.3	7.5	0.05	-	-			22
	給湯	3L 後	45.9	7.4	0	-	-			12
病室 1 洗面台	給水	初流水	25.9	7.5	0	-	-	<i>L.sp.</i>	100	1100
	給水	3L 後	25.7	7.5	0	-	-	<i>L.sp.</i>	40	38
	給湯	初流水	25.8	7.4	0	+	+	<i>L.m., L.sp.</i>	500	2150
	給湯	3L 後	40.3	7.5	0	-	+	<i>L.m., L.sp.</i>	50	280
病室 2 洗面台	給水	初流水	26.1	7.5	0.2	+	+	<i>L.m., L.sp.</i>	50	257
	給水	3L 後	26.2	7.5	0.3	-	-			275
	給湯	初流水	33.7	7.5	0	+	+	<i>L.m., L.sp.</i>		710
	給湯	3L 後	41.7	7.5	0	+	+	<i>L.m., L.sp.</i>		269

L.m. Legionella micdadei, *L.sp. Legionella sp.*

表 4 医療機関 D における給水・給湯系の *Legionella* 属菌の汚染状況

採取場所	水系	採取時 点	温度 ()	pH	<i>Legionella</i> 属菌				従属栄養細菌	
					遊離残留		菌数		菌数	
					塩素濃度 (mg/L)	LAMP	培養	菌種	(CFU/100ml)	(CFU/ml)
地下控室	混合	初流水	26.6	7.3	1.0	-	-			110
	混合	3L 後	26.6	7.2	0.9	-	-			6
	混合	9L 後	25.5	7.2	1.0	-	-			2
倉庫	混合	初流水	25.6	7.0	0	+	-			35500
	混合	3L 後	25.5	7.2	0	-	-			1220
	混合	9L 後	25.6	7.1	0	-	-			1700
病室 1	混合	初流水	24.8	7.3	0.05	+	+	<i>L.p.SG1</i>	100	13400
	混合	3L 後	23.7	7.3	1.3	+	+	<i>L.p.SG1</i>	10	166
	混合	9L 後	22.5	7.1	1.4	-	-			37
病室 2	混合	初流水	25.9	7.3	0.05	-	-			5800
	混合	3L 後	22.6	7.3	1.2	-	-			3
	混合	9L 後	21.8	7.2	1.1	-	-			3
病室 3	混合	初流水	25.1	7.2	1.0	-	+	<i>L.p.SG1</i>	10	24
	混合	3L 後	25.7	7.3	1.3	+	-			2
	混合	9L 後	23.9	7.3	1.1	-	+	<i>L.p.SG1</i>	10	6
病室 4	混合	初流水	25.5	7.3	0.8	-	-			1
	混合	3L 後	23.9	7.3	1.3	-	-			4
	混合	9L 後	23.4	7.3	1.0	-	-			2

L.sp. Legionella sp.、SG 血清型

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 29 年度分担研究報告書

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

研究代表者	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

「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」班では、これまでに水試料からの *Legionella* 属菌検出のための標準的な検査法の検討を重ねてきた。これにより推奨法とすべき検査法が確定しつつある。この推奨法に基づいて、検査機関に対する研修を実施することで検査技術の普及と向上を図ることが当研究班の研究目的の 1 つとなっている。そこで、研修において使用することを前提に推奨法を解説したマニュアルの作成を検討した。

入浴施設における *Legionella* 属菌の汚染とこれに起因する感染症の発生を予防する目的で、これまでに複数の研究班により研究が実施されてきている。得られた研究成果は、入浴施設におけるレジオネラ汚染対策として活用されなければならない、実際に研究成果に基づいた各種の予防対策等を行われている。ここでさらに研究成果を見直し、入浴施設の衛生管理での活用の是非を検討した。

A. 研究目的

水試料を対象としたレジオネラ検査は、その工程と操作に種々の選択

肢が存在し、また操作も煩雑であるため、信頼性の高い試験結果を得ることが難しい。そこで、広く普及さ

せることを前提に、信頼性の高い試験結果を得るための試験法の検討を行った。

入浴施設のレジオネラ汚染とそれに起因する感染に関連して、これまでに複数の研究班において汚染実態の把握、衛生管理法・消毒法等の検討、水試料を対象にした試験法の検討等を行ってきた。得られた研究成果に基づいて対策マニュアル等が改定され、実際に活用されている。そこで、これまでの研究成果を検証し、さらに活用されるための検討を行った。

B. 研究方法

1) マニュアルの作成

「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」班では、ワーキンググループを立ち上げ、水試料からの *Legionella* 属菌検出のための試験法を、各ステップごとに検討し、広く普及することができる推奨法をこれまでに検討してきた。今回は、この推奨法を基にして、マニュアルの作成を試みた。

2) 研究成果の検討

入浴施設におけるレジオネラ対策等を検討するために、これまでに複数の研究班が研究活動を行ってきた。これらの研究班により得られた成果を見直し、入浴施設の衛生管理等に活用することを検証した。

C. 結果および考察

1) マニュアルの作成

推奨法は表形式で作成されているため、そのままではマニュアルとして利用することはできない。そこで、マニュアル用に文章化を試みている。

2) 研究成果の検討

入浴施設のレジオネラ汚染に関する複数の研究班が研究活動を行ってきた(表1)。これらの研究班で得られた研究成果に基づいて、すでに浴槽水等の消毒にモノクロラミンの導入が行われている。そこで、衛生管理等に関する事項、具体的にはシャワー、集毛器、貯湯槽、調整箱、気泡発生装置等について、衛生管理の徹底強化の必要性等を研究成果に基づいて検討した。

研究成果等とは別に水道の試験法の改定が行われ、これに伴って公衆浴場の水質検査法を検討する必要性が生じ、併せて検討を行った。

D. 発表

該当なし

E. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 Legionella 感染発生予防のための入浴施設等の衛生管理に関する研究事業

研究課題名	実施年度	研究代表者名
循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究	平成 16～18 年度	遠藤卓郎
掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究	平成 17～18 年度	井上博雄
温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究	平成 18 年度	倉 文明
公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究	平成 19～21 年度	遠藤卓郎
迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究	平成 19～21 年度	倉 文明
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 22～24 年度	倉 文明
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 25～27 年度	倉 文明

平成 29 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

空気洗浄と高濃度塩素消毒を併用した砂ろ過器のろ材の洗浄方法

（エアレーション・リフレッシュ法）の提案

研究協力者 中臣 昌広（文京区文京保健所）
研究協力者 斎藤 利明（株式会社ヤマト 温浴事業部）
研究協力者 木村 哲也（株式会社ヤマト 温浴事業部）
研究協力者 田中 悠樹（株式会社ヤマト 温浴事業部）
研究協力者 小森 正人（株式会社ヤマト 大和環境技術研究所）
研究分担者 泉山 信司（国立感染症研究所 寄生動物部）

研究要旨

温浴施設に一般的に導入されているろ過器の 1 つに砂ろ過がある。砂ろ過器の内部には微生物の餌となる汚れ（有機物）が蓄積する。その汚れを排出するために週に 1 回以上の逆洗浄を行っているが、逆洗効果が不十分であれば汚れが残留し、砂ろ過器がレジオネラ属菌の温床、供給装置に成りかねない。砂ろ過器の逆洗浄の効果を高めるために、既存施設の砂ろ過器において、手動操作で行う空気洗浄と高濃度塩素消毒を併用した砂ろ過器洗浄方法（エアレーション・リフレッシュ法）を適用し、効果を検証した。本エアレーション・リフレッシュ法は、逆洗後の排出液と砂ろ過器内部の濁度等に大きな改善が認められ、砂ろ過器内の汚れの排出効果が大きいことを確認した。これを短い周期で行い、砂ろ過器内の衛生状態を良好に保つことを提案したい。

A. 研究目的

水と熱量の節約を目的に、浴槽水が連続使用されるようになった。一方、入浴者の汚れにより濁度が上昇し、お風呂が不衛生な状態に陥らないように、濁度が 2 度以下に制限されている（公衆浴場における水質基準等に関する指針）。濁度 2 度を超えずに浴槽水を連続的に使用する目的で、ろ過器が使用されるようになった。

一般的に用いられる砂ろ過器では、水を

逆流させる簡易な洗浄（以下、逆洗）により濃縮された汚れを排出する（図 1）。ところが、ろ材の砂を年余に渡って使い続けるのが一般的で、砂に付着した汚れはいつまでも残って不衛生であり、レジオネラの温床となることから問題となる。管理状態の悪い砂ろ過は、汚れが固着してろ過層が水を通さず、割れたろ過層の隙間に水の通道（水みち、水筋）ができたり、汚れの玉（マッドボール）が生じたりする⁽¹⁾。その

ような状態でも塩素消毒が適切になさなければ、レジオネラ属菌の生きた菌は検出されない。しかし、濁質が塩素を消費して消毒の徹底が困難となり、塩素消毒が低下した際は大変に危険な状態となりえる。毎日砂ろ過器を高濃度塩素消毒する方法（フィルター・リフレッシュ法）がレジオネラ汚染の低減と塩素濃度の維持に有効ことが示されている⁽²⁾が、濁質の排除までは配慮されていなかった。一度設置された装置を交換、撤去したり、内部が見えない砂ろ過器の管理を徹底させたりするのは容易ではない。

砂ろ過器の洗浄効果を高めるには、単なる浴槽水の逆流では不足で、空気洗浄と高濃度塩素消毒の併用が、方法の一つとして提案できる。水道の急速ろ過池では、逆流洗浄と空気洗浄を組み合わせで行うことがある⁽¹⁾。空気洗浄は、ろ層の下部から空気を吹き込んで上昇気泡の振動により付着濁質を剥離し、逆流洗浄でろ層から濁質を排出する方法である。この空気洗浄を入浴施設向けに自動化した砂ろ過器洗浄システムがあり、高濃度塩素消毒が併用され、レジオネラ属菌の抑制効果が報告されている⁽³⁾。ただし、既設の砂ろ過器の改修は容易ではなく、別途対策を要する。

本研究では既存の砂ろ過器の対策として、空気洗浄と高濃度塩素消毒を併用した洗浄方法（以下エアレーション・リフレッシュ法）を手動操作で簡易的に行えるように考案し、効果の検証を目的とした。具体的には、空気洗浄用のポンプを増設し、手作業で回路を切り替えて、空気洗浄でろ過層をしっかりと攪拌しながら消毒を行き渡らせて、最後に逆洗浄を行う。結果として本法

は、従来の逆洗浄のみより、砂ろ過器内に蓄積する汚れの排出効果が大きいことを確認した。

B. 研究方法

実験施設は、東京都文京区 A 銭湯に協力していただいた。A 銭湯は循環式浴槽（図 2A）で浴槽容量 4.5 m³である。砂ろ過器は直径 600 mm であり（図 2B）最後にろ材の交換をしたのは平成 25 年頃であった。ろ過流量は 200～250 L/min 程度を想定し、ターン数は 3 ターン/h 程度と算出された。消毒薬剤は、通常営業時はトリクロロイソシアヌル酸を使用し、逆洗は毎日実施していた。空気洗浄には、常用圧力 20 kPa、風量 350 L/min の市販ブロウポンプを使用し、循環ろ過ポンプの圧力計接続部に接続した（図 3）。高濃度塩素消毒には食塩分 4%以下、有効塩素 12%の次亜塩素酸ナトリウムを使用した。実験日は平成 29 年 7 月 3 日と平成 29 年 12 月 11 日の計 2 日である。

エアレーション・リフレッシュ法の操作は以下の通り行った（図 4）。まず、循環ろ過ポンプを停止し、バルブ A、B を閉めた。ろ過タンク内の遊離塩素濃度が 50 mg/L になる様に、次亜塩素酸ナトリウム 50mL をヘアーキャッチャーに投入した。砂ろ過器の 5 方弁を逆洗ポジションに切り替えて、バルブ C、D を開け、循環ろ過ポンプを 10 秒間稼働させ、塩素をろ過タンク内に移送した。そしてバルブ E を閉め、ろ過ポンプに接続したブロウポンプを稼働させ、30 分間ろ過タンク内にエアーを吹き込み、空気洗浄した。最後にブロウポンプを止め、バルブ F を開け、逆洗を行い終了とした。

砂ろ過器内の衛生状況を確認するために、

以下の通り、水質分析を行った。1回目(平成29年7月3日)は、1.初めに従来の逆洗水を採水、2.続けて(空気洗浄を行い内部を攪拌してから)砂ろ過器内水を採水(以上、従来の逆洗の効果確認)、3.空気洗浄と高濃度塩素消毒後の逆洗時に採水(以後、本洗浄法の確認)、4.最後に砂ろ過器内水を採水した(表1)。

2回目(平成29年12月11日)は、A.従来の逆洗水、B.砂ろ過器内水を採水(以上、従来の逆洗効果を確認)、C.空気洗浄と高濃度塩素消毒後の逆洗時に採水(以後、本洗浄法の確認)、D.砂ろ過器内水を採水、E.からH.逆洗時間を検討するためにさらに2回の操作を追加し、その都度採水した(表2)。

分析項目はレジオネラ属菌、大腸菌群、一般細菌、濁度、SS(Suspended Solid、浮遊物質、懸濁物質)を計測した。分析方法は定法に従い、株式会社ヤマト分析センター(大和環境技術研究所)にて分析した⁽⁴⁻⁶⁾。

C. 研究結果及び考察

初めに平成29年7月3日に実験した時の水質分析データを示す(表1)。

逆洗水の状況は、従来の逆洗と、エアレーション・リフレッシュ法のいずれも一般細菌、大腸菌群、レジオネラ属菌は検出されなかった(表1)。逆洗に使用した浴槽水の塩素消毒が予定外に2mg/L以上あったことから、微生物が検出されなかった。

従来法の逆洗水の濁度は6.5度、SSは3.8mg/Lと高くないのに対して、エアレーション・リフレッシュ法では97度、SSは160mg/Lと桁違いに高かった。すなわち、エアレーション・リフレッシュ法による汚れの

排出効果が大きかった。

次に砂ろ過器内水は、従来の逆洗後の濁度は100度、SSは170mg/Lと高く、エアレーション・リフレッシュ後は濁度が7.0度、SSは12mg/Lと低かった。すなわち、従来の逆洗では砂ろ過器内がきれいにならなかったことが示唆された。

以上の通り、エアレーション・リフレッシュ法の洗浄効果は大きいと考えられた。追試として2回目(平成29年12月11日)を実施した(表2)。逆洗水からレジオネラ属菌、大腸菌群は検出されなかった。ただし前回と異なり一般細菌数が高かったが、浴槽水の塩素消毒が維持されない定休日に行われたのが理由であった(定休日であっても消毒を維持し、バイオフィルムの付着を避けたほうが良い)。エアレーション・リフレッシュ法後の逆洗水では、高濃度塩素消毒が理由で20CFU/mLと一旦低下するが、その後の逆洗には塩素消毒されていない井戸水を浴槽に補充しながら使い、2回目で64,000CFU/mL、3回目は88,000CFU/mLとなった。本試験で行った不定期な高濃度塩素消毒の条件では、砂ろ過器の消毒が不足で、毎日、あるいは毎週の洗浄の徹底が必要と考えられた。本研究では洗浄操作を研究者が行い、従業員は行わず、砂ろ過器の洗浄に施設の関心を得るまでには至らなかった。

濁度、SSについては従来の逆洗では19.0度、SSは18mg/Lと低いのに対して、エアレーション・リフレッシュ法では濁度71.0度、SSは150mg/Lと高く、1回目と同様の洗浄効果の高さを確認した。

追加して行った逆洗2回目と3回目の濁度とSSは低く、汚れの多くは1回目に除

かれると考えられた。

砂ろ過器内では、逆洗工程後にレジオネラ属菌、大腸菌群は検出されなかった（表2）。一般細菌数については、従来法の逆洗後の砂ろ過器内水が740 CFU/mLに対して、エアレーション・リフレッシュ法逆洗後は3,600 CFU/mLと高くなり、洗浄効果の改善に伴って、砂ろ過器内に潜んでいた菌が洗い出されたと考えられた。その後、砂ろ過器内の一般細菌は逆洗工程2回目（逆洗計10分間）実施後までは増加したが、3回目（逆洗計15分間）実施後は減少した。長めの逆洗で若干の改善は得られたものの、消毒の徹底には高頻度な洗浄と消毒が必要と考えられた。

以上のことから、エアレーション・リフレッシュ法は、砂ろ過器のろ材から汚れを排出し、洗浄効果があると考えられた。オーバーフロー水の再利用施設では、浴槽の水面付近の水質のわるい湯を処理するため、ろ過器への負荷が大きい。ろ材への有機物等の汚れの付着の可能性がある。そうしたオーバーフロー水再利用施設の砂ろ過器のろ材から汚れを取るには、エアレーション・リフレッシュ工程及び逆洗浄工程の施工が向いていると思うのである。本法を、公衆浴場、旅館などの砂ろ過器に対して、高頻度な使用を提案する。反対に本法を実施しなければ、汚れは砂ろ過器にいつまでも残ると推察される。濁質の排除の徹底は、重要と考えられる。現在、塩素消毒により浴槽水は見かけ上の安全性が維持されているが、砂ろ過器への注意が不足で、消毒の失敗により、一時的にでも入浴者の安全性が損なわれると危惧される。塩素消毒は、微生物増加とバイオフィーム定着の抑制、

並びに洗浄しきれずに残る危険に対する抑えであって、洗浄をサボるための手段ではないことを改めて強調しておく。本法は、比較的安価な装置の改修と手動の操作によって実施が可能である。

D. 結論

砂ろ過器内のろ材に対し、後付けで空気洗浄を行う装置を設置し、同時に高濃度塩素で消毒する、エアレーション・リフレッシュ法を実施した。本法は、砂ろ過器内に蓄積する汚れを排出する効果が大きいことを確認した。

E. 参考文献

1. 日本水道協会、5.6 急速ろ過池の 5.6.10 洗浄方式、水道施設設計指針 2012 より（厚生労働省、5. 浄水施設（抜粋版）<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000103930.pdf>、2018年5月1日現在）
2. 杉山寛治、循環式浴槽の衛生管理 フィルター・リフレッシュ法の有用性、温泉工学会誌 30 巻 2/3 号 pp.98-104 (2008)
3. 住谷敬太、木村哲也、齋藤利明、新井孝雄、高田勇人、吉住正和、横田陽子、藤田雅弘、小畑 敏、小澤邦寿、森田幸雄、野田雅博、木村博一、新たに開発した次亜塩素酸処理循環浴槽システムのレジオネラ属菌・大腸菌群及び一般細菌の制御、防菌防黴、Vol.39, No.12, pp.749 - 756 (2011)
4. 日本水道協会、II-3 一般理化学より、3. 濁度の 3.4 積分球式光電光度法、および

- | | |
|---|------------------------------------|
| <p>12.浮遊物質（懸濁物質） 上水試験方法
2011年版 II.理化学編より pp. 47-49,
92-93.</p> | <p>pp.28 ~ 32, 2009</p> |
| <p>5. 日本水道協会、V-2 現存量指標の 1.一般
細菌、および V-3 糞便性指標の 2.大腸菌
群、上水試験方法 2011 年版 V.微生物編
より pp. 43-47, 72-77.</p> | <p>F.研究発表
試上発表、口頭発表
なし</p> |
| <p>6. レジオネラ症防止指針（第 3 版）公益財
団法人日本建築衛生管理教育センター .</p> | <p>G. 知的所有権の取得状況
なし</p> |

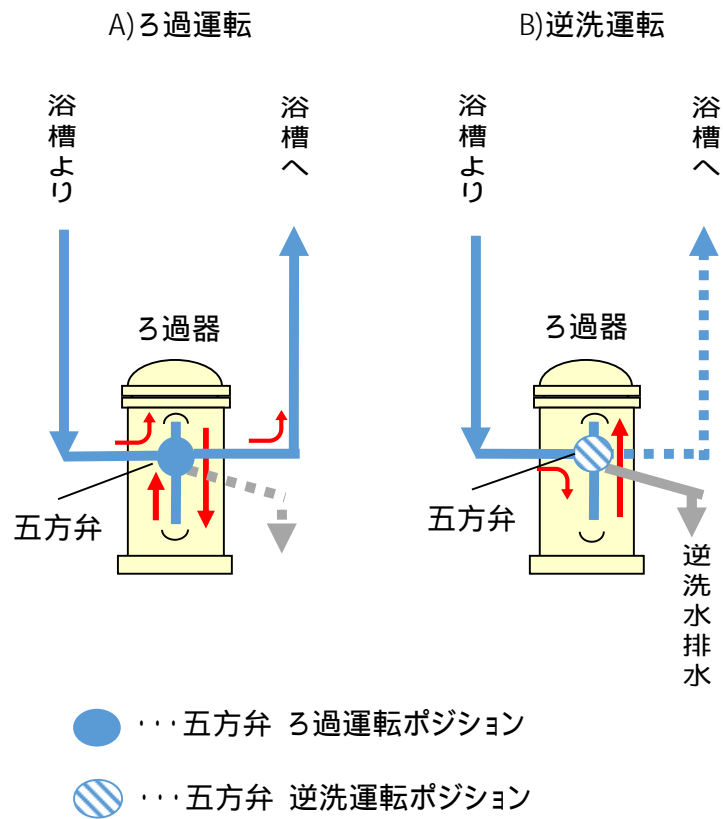


図 1. ろ過運転と逆洗運転

A)ろ過運転：浴槽水を砂ろ過器上部から底部に向け、通水しその後、浴槽へ戻す。B)逆洗運転：浴槽水を砂ろ過器底部から上部に向け、通水し砂ろ過器内のろ材を簡易に洗浄し、逆洗排水管より排水する。

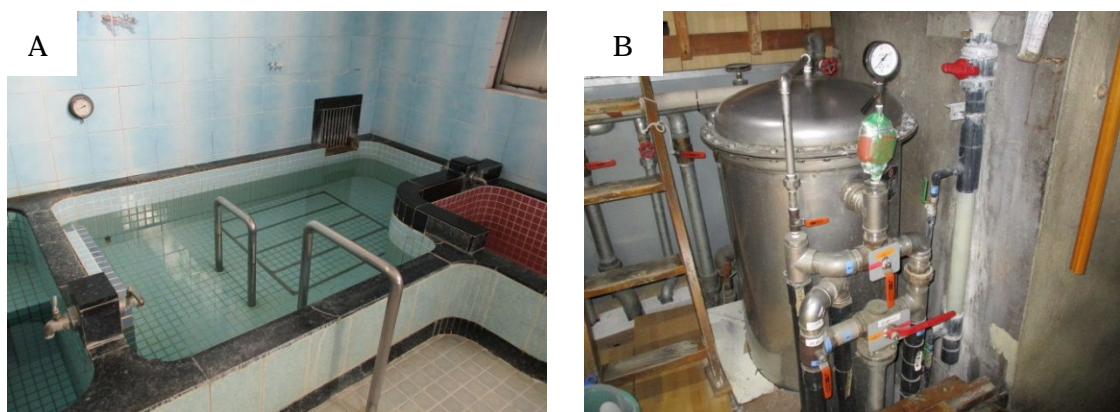


図 2. 浴槽 (A) と砂ろ過器 (B)

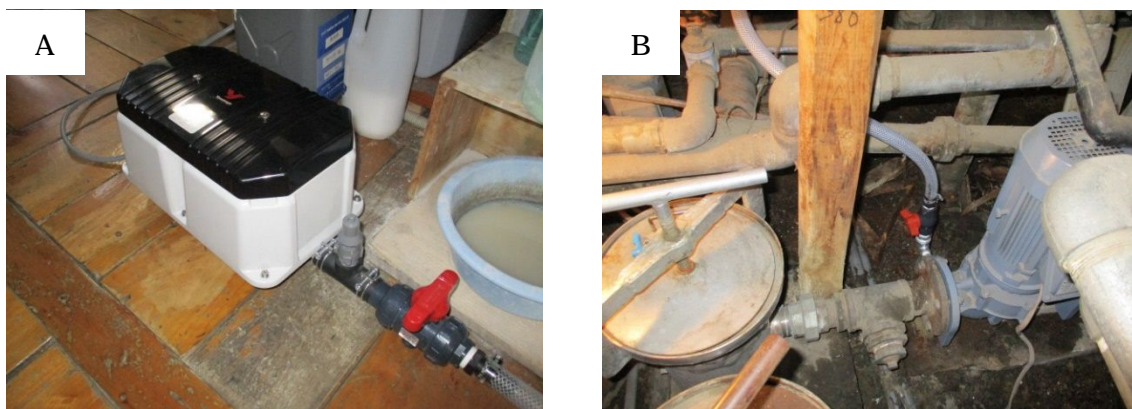


図 3. ブロワポンプの接続

A)ブロワポンプ、B)循環ろ過ポンプの圧力計部位へのブロワポンプの接続

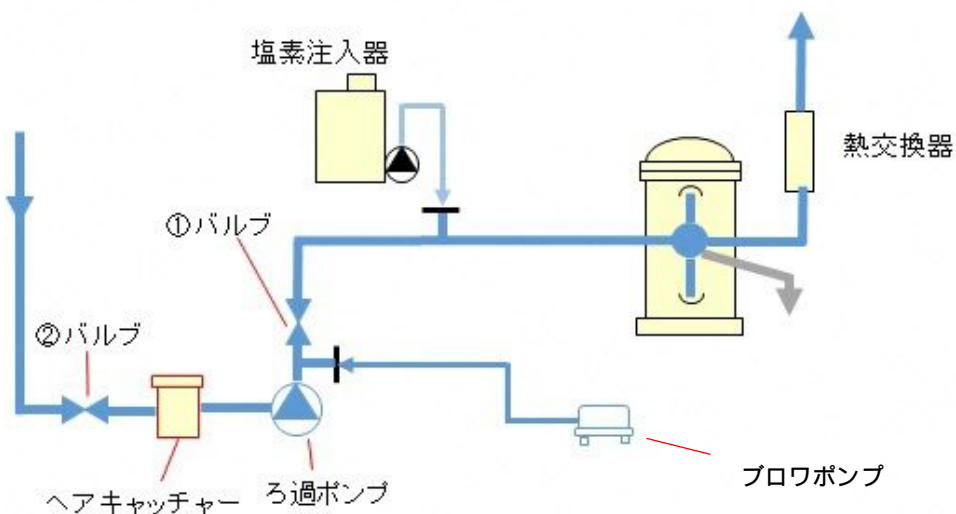


図 4. 循環配管の一部概略図とエアレーション・リフレッシュ法の手順

エアレーション・リフレッシュ法の操作の詳細は以下の通り。まず、循環ろ過ポンプを停止し、バルブ①、②を閉める。ヘアキャッチャーに次亜塩素酸ナトリウムを投入（A 銭湯の場合は 50 mL で砂ろ過器内が 50mg/L）。砂ろ過器の 5 方弁を逆洗ポジションに切り替えて、バルブ①、②を開け、循環ろ過ポンプを 10 秒間稼働させ、塩素を砂ろ過器内に移送する。そしてバルブ①を閉め、ブロワポンプを稼働させ、30 分間砂ろ過器内にエアを吹き込み、エア攪拌（空気洗浄）する。最後にブロワポンプを止め、バルブ①を開け、通常の逆洗・洗浄を行い終了となる。

表 1. 1 回目（平成 29 年 7 月 3 日）操作手順、採水タイミング、各種実測値

操作	採水タイミングと番号			実測値				
	逆洗(汚 れ排出)	ろ過器 内確認	目的、消毒の詳細	レジオネ ラ属菌 (CFU/1 00ml)	大腸菌 群 (個 /ml)	一般細菌 (個/ml)	濁度 (度)	SS (mg/ l)
逆洗工程 [逆洗3分、洗浄2分]	1		従来法の逆洗効果確認	10未満	不検出	30未満	6.5	3.8
エアレーション[5分]		2	従来法逆洗後のろ過器内確認	10未満	不検出	30未満	100	170
ヘアキャッチャーに塩素剤投入 ろ過ポンプ10秒運転 エアレーション[30分]			次亜塩素酸ナトリウム50mL投入、 ろ過器内残留塩素濃度40mg/L					
逆洗工程 [逆洗3分、洗浄2分]	3		エアレーション・リフレッシュ法の 逆洗効果確認	10未満	不検出	30未満	97	160
エアレーション[5分]		4	エアレーション・リフレッシュ法の ろ過器内状況確認	10未満	5	40	7	12

表 2. 2 回目 (平成 29 年 12 月 11 日) 操作手順、採水タイミング、及び各種実測値

操作	採水タイミングと番号			実測値				
	逆洗 (汚れ 排出)	ろ過器 内確 認	目的、消毒の詳細	レジオネラ 属菌 (CFU/10 0mL)	大腸菌群 (CFU/mL)	一般細菌 数 (CFU/mL)	濁度	SS (mg/L)
逆洗工程 [逆洗3分、洗浄2分]	A		従来法の逆洗効果確認	10未満	不検出	4.2E+03	19.0	18
エアレーション[5分]		B	従来法逆洗後のろ過器内確認	10未満	不検出	7.4E+02	26.0	40
ヘアキャッチャーに塩素剤投入 ろ過ポンプ10秒運転 ----- エアレーション[30分]			次亜塩素酸ナトリウム、70mL投入 ろ過器内残留塩素濃度60mg/L -----					
逆洗工程1回目 [逆洗3分、洗浄2分]	C		以下、エアレーション・リフレッシュ法の 逆洗効果確認	10未満	不検出	20	71.0	150
エアレーション[5分]		D	ろ過器内状況確認	10未満	不検出	3.6E+03	4.8	7.8
逆洗工程2回目 [逆洗3分、洗浄2分]	E		以下、洗浄時間による効果確認	10未満	不検出	6.4E+04	18.0	27
エアレーション[5分]		F		10未満	不検出	1.2E+05	7.7	13.4
逆洗工程3回目 [逆洗3分、洗浄2分]	G			10未満	不検出	8.8E+04	17.0	27
エアレーション[5分]		H		10未満	不検出	1.6E+02	4.6	8.4

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

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

研究要旨 本研究では、浴槽水、シャワー水、カラン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、Lp1 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 属菌の平板培養法による検出率は、浴槽水で 8/39 検体（20.5%）、シャワー水で 8/32 検体（25.0%）、カラン水で 4/15 検体（26.7%）であった。アメーバ共培養法による検出率は 14/86 検体（16.3%）であり、平板培養法の検出率（20/86 検体、23.3%）の方が高かった。河川水からはアメーバ共培養法により 9 月、11 月の 6 検体から *Legionella* 属菌が検出され（検出率 30.0%）、すべて *L. pneumophila* であった。エアロゾルの調査については、道路沿い 52 検体、浴室 5 検体および屋内 20 検体について調査し、平板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、道路沿い検体で 75.5%（114/151 検体）、浴室 71.4%（15/21 検体）および屋内検体で 45.0%（9/20 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/m³）は、道路沿い検体で 81.0、浴室 72.0、屋内 19.5 であった。湿度、気温および降水量と 16S rRNA 遺伝子のコピー数との相関は見られなかった。Lp1-IMB 濃縮法による Lp1 の分離では、Lp1 が浴槽水 35 検体中 5 検体から分離された。Lp1 の添加回収実験では、BCYE- α 培地での接種菌量を基に算出した回収率についてみると、GVPC 培地を用いた回収率は $28.4 \pm 13.1\%$ と有意に低かった（ $P < 0.01$ ）。また、処理方法について比較すると、BCYE- α 培地を用いた場合、未処理と加熱処理および酸処理との間に差は認められなかった。

以上の結果から、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が、継続した調査が必要である。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。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、2016年の全国での届出数が1,602件と、統計を取り始めた2000年からの17年間でもっとも多かった¹⁾。本疾患は2003年の尿中抗原検査の保険適用に続き、2005年には日本呼吸器学会において診断フローチャートに尿中抗原検査法が示されたことにより、全国的にその届出数が増加傾向を示したと推測されている。しかしながら、それから既に15年が経過した現在でも本疾患の増加傾向は続き、尿中抗原検査の普及だけで説明が難しい状況となっている。一方、富山県においてもレジオネラ症の届出は全国と同様な状況となっているが、加えて、レジオネラ症罹患率(対人口10万人)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、集団感染事例などでは特定されるが、散发事例において特定されることは極めて少ないという状況も続いている。

そこで、レジオネラ症の発生予防を目的とし、感染源を明らかにするため、富山県の公衆浴場の浴槽水、シャワー水およびカラン水に加えて、市中河川水中の*Legionella* 属菌の棲息状況を調査した。昨年度に引き続き、通常的人工培地での培養に加え、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、ヒトへの感染様式を明らかにするため、検体採取近辺で空气中に浮遊する*Legionella* 属菌を調査した。一方、感染源特定のために必要となる感染源疑いの環境検体から、患者検体で最も多く分離されている*Legionella pneumophila* 血清群1(以下Lp1)を効率

よく検出するため、Lp1で感作した免疫磁気ビーズ(Lp1-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・カラン水および河川水)

検体

調査対象は、公衆浴場の浴槽水、シャワー水、カラン水および河川水とした。浴槽水、シャワーおよびカラン水については、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5地点を対象とした。

調査期間と試料

浴槽水、シャワー水およびカラン水の試料は、それぞれ平成29年度に14施設で採取された39、32および15検体である。シャワー水およびカラン水については、温度を40℃に設定後約10秒間流出させた後、容器に採取した。河川水は、3、9、10、11月に計20検体を採取した。

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(1,500 ml)、シャワー水(1,500 ml)、カラン水(1,500 ml)および河川水(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)で吸引る過

し、そのフィルターを 100 倍濃縮液となるように滅菌蒸留水で 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、シャワー水およびカラン水は 100 倍濃縮液について未処理、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 μ l 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 μ l について同様に培養した。非濃縮検体については、未処理の 100 μ l 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 のうち 100 μ l を酸処理液と等量混合後、室温で 15 分静置した。混合液 200 μ l を GVPC 培地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：浴槽水、シャワー水およびカラン水については、濃縮液 1 ml を 10 \times AS Buffer (10 mg/ml ヘパリン添加) に置換後、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 μ l を GVPC 培地にコンラージ棒で広げて、35 で 7 日間培養した。河川水については、上記培養法の残りの濃縮液にアメーバ増菌液を添加して実施した。

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 (ピオメリュー) に塗抹し、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 (OXOID) 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。

2. エアロゾル調査

サンプリング

主に雨天の日の道路沿い 82 検体、浴用施設の浴室内 5 検体 (5 施設) および屋内 20 検体 (1 施設および民家 2 軒) について、エアースンプラー (コリオリス μ) を用いてエアロゾルを捕集した。なお、浴室内 4 検体は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 の捕集液 (0.005% Tween 80 液) 中に 300 l/min の条件で 10 分間捕集した。ただし、道路沿い 30 検体については、15 ml の捕集液 (滅菌水) 中に 300 l/min の条件で 30 分間捕集した。

遺伝子検査法

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 μ l のキレックス (Bio-Rad) 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。ただし、滅菌水で捕集した道路沿い 30 検体については、死菌 DNA の PCR 増幅を阻害するため、上記の DNA 抽出とは別に、DNA 抽出前に Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 (タカラバイオ) を用いて Ethidium monoazide (EMA) 処理を実施した。

直接培養法

捕集液 100 μ l 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

残った捕集液にアメーバ増菌液を添加して、浴用水などと同様にアメーバ共培養法を実施した。

16S メタゲノム解析

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

3 .IMB による Lp1 の選択的濃縮法の検討

Lp1-IMB 作製方法

Lp1-IMB はデンカ生研で作製した。Lp1以外の血清型に対する交差反応を吸収後、硫酸分画にて粗精製し、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 免疫磁気ビーズとした。

Lp1-IMB による実検体からの Lp1 濃縮分離法

供試検体は、前述の感染源調査で100倍濃縮された浴槽水35検体、シャワー水12検体、カラン水6検体、計53検体とした。Lp1-IMB濃縮法：検体(100倍濃縮液)1mlにIMB25 μ lを接種し、10分毎に転倒混和しながら30分間吸着させた。ビーズを磁石で集め、滅菌生理食塩水で洗浄した。この操作（洗浄）を2回実施した後、最終的に生食100 μ lもしくは200 μ l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 μ lを1- で記載した方法と同様に、培養前に熱または酸にて処理し、未処理検体と併せてBCYE- α 培地、GVPC培地の両方にコンラージ棒で拡げ、35 で7日間培養した。

実検体への Lp1 添加回収試験

接種菌は当所で分離、保管している Lp1 (LG626, LG643) と Lp9 (LG494) を用いた。これらの菌を30日間培養後、滅菌生理食塩水にてマックファーランド2.0に調整し、10倍段階希釈した。添加菌量による回収率の差をみるため、 $\times 10^{-5}$ の菌懸濁液200 μ l, 100 μ l, 50 μ lを、それぞれ100倍濃縮液800 μ l, 900 μ l, 950 μ lに接種、ビーズ処理に供する検水量を1,000 μ lとした。検体数は上述した浴槽水、シャワー水、カラン水のうち40検体を用い、平板培養実施日～1週間のうちに実施した（計6回）。ただし、5回目のみ、3週間後に添加実験を行った。Lp9についてはLp1-IMBの特異性を確認するため、初回のみ添加回収実験を行った。*Legionella*属菌を接種した100倍濃縮検体について、と同様、IMB濃縮法にてLp1を選択的に濃縮培養し、その菌数から回収率を求めた。接種した*Legionella*属菌数は、 $\times 10^{-6}$ 菌懸濁液100 μ lをBCYE- α 培地、GVPC培地にコンラージ棒で拡げ、35 で7日間培養後、それぞれ菌数を測定した（推定菌数）。

Lp1 特異的遺伝子の検出（PCR法）

濃縮検体からのDNA抽出は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。対象遺伝子は *wzm* を Mérault らが報告⁵⁾したSG1-P1 (5'-TTACCGCTTGCTTTTATGGA-3') とSG1-P2(5'-CCTATCAACGCTCTTGAAA-3')をプライマーとして、PCR法にて検出した。PCRは $\times 2$ GoTaq Hot Start DNA

Polymerase (プロメガ) 12.5 µl にプライマー (2 µg/µl) 各 1.25 µl, 滅菌蒸留水 8 µl を混合し, これに検体濃縮液から抽出した DNA 2 µl を接種し, 94 1 分加熱後, 94 30 秒, 55 30 秒, 72 30 秒の反応を 35 サイクル行い, 72 4 分保温した. 得られた増幅産物は 2% アガロース (和光純薬) ゲル電気泳動 (100V, 30 分) により確認した.

Lp1-IMB 濃縮法の洗浄方法の検討

に述べた添加菌数の測定において, 滅菌生理食塩水の他に, 緩衝液 ACES (同仁化学研究所) を用いて洗浄し, 生理食塩水による洗浄との比較を行った.

処理法および培地間の回収率の比較

統計解析は統計解析ソフト IBM SPSS 24 を用いた. 2 群間の比較は対応のある t 検定を行い, 多重比較は Bonferroni 法で調整した. 統計的有意水準は $P < 0.05$ とし, $P < 0.10$ を傾向有りとした.

(倫理面への配慮)

本研究は, 研究機関内外の倫理審査委員会等において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, カラン水および河川水における *Legionella* 属菌検出状況

浴槽水・シャワー水およびカラン水から検出された *Legionella* 属菌の菌数および菌種 (血清群) を表 1-a b に示した. *Legionella* 属菌が検出されたのは, 浴槽水で 8/39 検体 (20.5%), シャワー水で 8/32 検体 (25.0%), カラン水で 4/15 検体 (26.7%) であった. 浴槽水から分離された *Legionella* 属菌で最

も多かったのは Lp1, シャワー水およびカラン水では LpUT であった.

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, 通常の平板培養法と比較した結果を表 2 に示した. *Legionella* 属菌の検出率は, 平板培養法で 20/86 検体 (23.3%), アメーバ共培養法で 14/86 検体 (16.3%) と平板培養法で高かった (表 2-a). 平板培養法でのみ *Legionella* 属菌が分離された 8 検体 (浴槽水 4 検体, シャワー水 1 検体およびカラン水 2 検体) からは, Lp1, Lp5 および LpUT が検出された (表 2-b, c). アメーバ共培養法のみ陽性となった 2 検体 (浴槽水 1 検体およびカラン水 1 検体) からは, Lp3 と *L. cherrii* が検出された.

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 3 に示した. 9 月および 11 月の 6 検体から *Legionella* 属菌が検出された (検出率 30.0%). 分離されたのはすべて *L. pneumophila* であった.

2. バイオエアロゾルにおける *Legionella* 属菌検出状況

道路沿い 52 検体, 浴室内 5 検体および屋内 20 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 4, 平成 28 年度のデータも含む). しかしながら遺伝子検査法においては, 道路沿い検体で 75.5% (114/151 検体), 浴室内検体で 71.4% (15/21 検体) および屋内検体で 45.0% (9/20 検体) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された. 16S rRNA 遺伝子の平均コピー数 (copies/m³) は, 道路沿い検体で 81.0, 浴室内検体で 72.0, 屋内で 19.5 であった.

滅菌水で捕集した道路沿い 30 検体についても、平板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 (qPCR 法) においては 86.7% (26/30 検体) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、16S rRNA 遺伝子のコピー数 (copies/m³) は 31.9 であった。また、生菌を検出する EMA-qPCR 法においても、66.7% (20/30 検体) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、16S rRNA 遺伝子のコピー数 (copies/m³) は 20.0 であった (表 5)。

平成 28~29 年度に捕集した道路沿い 151 検体について、地点別の検出率を比較した (図 1)。すべての地点から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、検出率は 60.0~93.3%、16S rRNA 遺伝子のコピー数 (copies/m³) は 54.0~124.1 であった。また、気候とコピー数の相関も比較したが、本調査では、湿度、気温および降水量と 16S rRNA 遺伝子のコピー数との相関は見られなかった (図 2)。

16S メタゲノム解析で取得したリード数は、道路沿い検体で中央値 121,351 (66,803~975,202)、浴室内で中央値 115,879 (68,986~1,110,988) であった (表 6-a)。道路沿い 22/23 検体および浴室内 9/9 検体から *Legionella* 属菌のリードが検出され、各検体に占める *Legionella* 属菌のリードの割合の平均値は、道路沿い検体で 0.23%、浴室内検体で 0.10% であった (表 6-b)。また、道路沿い 4/23 検体および浴室内 2/9 検体から *L. pneumophila* のリードが検出され、各検体に占める *L. pneumophila* のリードの割合の平均値は、道路沿い検体で 0.0033%、浴室内検体で 0.0337% であった

(表 6-b)。

3. 免疫磁気ビーズによる Lp1 の選択的濃縮法の検討結果

実検体からの Lp1 の分離

Lp1-IMB 濃縮法による Lp1 の分離結果を表 7 に示した。Lp1 は浴槽水 35 検体中 5 検体から分離された。この 5 検体の他に浴槽水 1 検体から *L. micdadei* が、1 検体からは Lp5 が分離された。また、Lp1-IMB 濃縮法と平板培養法の両方、あるいはどちらか一方の方法で *Legionella* 属菌が陽性となった 10 検体について、分離結果を比較した (表 8)。この表に、Lp1 特異的遺伝子の PCR による検出結果も示した。Lp1-IMB 濃縮法において Lp1 が分離されたのは 5 検体、平板培養法では 6 検体であった。これらのうち、両法で Lp1 が分離されたのは 3 検体 (No. 1, 2, 5) で、それらの菌数は平板培養法で 100~890 CFU/100 ml であった。これに対し、Lp1-IMB 濃縮法でのみ分離された Lp1 の菌数は 100 ml 中 13 CFU, 2 CFU、平板培養法のみで分離された 3 検体の Lp1 の菌数はいずれも 10 CFU/100ml と少なかった。*Legionella* 属菌が分離できた処理法と培地の種類を見ると、Lp1-IMB 濃縮法ではどちらも差は認められなかった。この 10 検体において、アメーバ共培養法で *Legionella* 属菌が分離されたのは 2 検体 (No. 2, 3) と、他の培養法より少なかった。一方、Lp1 特異遺伝子が検出されたのは 4 検体 (No. 1, 2, 5, 8) で、No. 10 を除く 3 検体で Lp1-IMB 濃縮法、平板培養法で Lp1 が分離された。逆に、どちらかの培養法で Lp1 が分離されたにも関わらず、4 検体 (No. 3, 4, 7, 9) 本遺伝子は陰性であった。

実検体での Lp1 添加回収試験結果

推定菌数を求めるため、 $\times 10^6$ 菌懸濁液の菌数を表 9 に示した。2 回目の実験では GVPC 培地による添加菌の測定を行わなかった。菌数の平均値は BCYE- α 培地で 81.9 CFU/100 μ l であったのに対し、GVPC 培地では 46.6CFU/100 μ l で、BCYE- α 培地での発育菌数のおよそ 56.9%であった。菌株 LG494 (Lp9) も Lp1 同様で、GVPC 培地上の菌数は (46.0/100 μ l) で、BCYE- α 培地 (85.0/100 μ l) の 54.1%であった。

添加した Lp1 の回収率は、BCYE- α 培地、GVPC 培地にそれぞれに発育した *Legionella* 属菌数を、BCYE- α 培地で求めた推定接種菌数と比較した (表 10-a)。一方、GVPC 培地については、GVPC 培地で測定した推定接種菌数と回収率も示した (表 10-b)。はじめに BCYE- α 培地での接種菌量を基に算出した回収率についてみると、BCYE- α 培地での回収率は 10.7 ~ 75.0% (平均 33.2%) と大きなばらつきがみられた。接種菌別に見ると、回収率はいずれの実験回でも LG626 に比べ、LG643 で高かった。処理法別では酸処理による回収率 (35.9%) でわずかに高かった。GVPC 培地での回収率は 6.1 ~ 44.5% (平均 25.9%) で、BCYE- α 培地 (平均 33.2%) よりバラツキは小さかったが、回収率は全体に低かった。GVPC 培地においても、わずかではあるが、LG643 の回収率が高かった。処理法別では、加熱処理による回収率が高かった (26.8%)。一方、GVPC 培地で測定した接種菌量を基に算出した回収率 (表 10-b) については、13.7 ~ 80.2% とばらつきが大きかったが、未、加熱、酸いずれの処理法でも 40% 以上と高く、中でも未

処理による回収率 (42.3%) が高かった。

回収率の統計解析による比較には、BCYE- α 培地、GVPC 培地の両方で 3 種類の処理法のすべての培養結果が得られている 39 検体の回収率を用いた。

未処理の BCYE- α 培地を用いた Lp1 回収率は $37.8 \pm 18.5\%$ であったのに対し、GVPC 培地を用いた回収率は $28.4 \pm 13.1\%$ と有意に低かった ($P < 0.01$) (図 3-a)。加熱処理、酸処理の場合も同様に、BCYE- α 培地と比較すると GVPC では回収率が有意に低かった ($P < 0.01$)。これらは、BCYE- α 培地から算出した推定接種菌量に対する回収率であるが、GVPC 培地における回収率を GVPC 培地から算出した接種菌量について求めると、その回収率は大きく上昇し、処理の場合で $52.0 \pm 26.9\%$ となった。加熱処理、酸処理も同様で、GVPC 培地で回収率は上昇した。一方、処理方法について比較すると、BCYE- α 培地を用いた場合、未処理と加熱処理および酸処理との間に差は認められなかった。加熱処理と酸処理を比較すると、酸処理をしたものは加熱処理したものより回収率が高い傾向が認められた ($P < 0.10$) (図 3-b)。GVPC を用いた場合、各処理方法の間に回収率の差は認められなかった (図 3-c)。

洗浄液の検討

IMB 濃縮法の中のビーズ洗浄液の検討結果を表 11 に示した。計 6 回の検討を行ったが、回収率の平均に大きな差は認められなかった。

D. 考察

日本では、公衆浴場等を利用したレジオネラ症患者の場合、感染拡大防止のため、

生活衛生担当部局が浴槽水等を検査し、衛生管理の指導を行なうシステムがほぼできている。しかしながら、2015年の臨床分離株 Lp1 の SBT の遺伝子型を Minimum Spanning Tree で解析した結果では、土壌・水溜り分離株グループが 165/410 株 (40.2%) と浴槽水グループ 129/410 株 (31.5%) より多かったことが報告されている⁶⁾。これらのデータから、環境由来検体の絞り込みが困難で、感染源が特定できない事例が多いものと思われる。

このような背景を踏まえ、本研究では、これまで報告されていない感染源を探求している。そして、それらの環境検体から発生する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して試みた。

今年度の検討においても昨年度と同様に、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査法では採取地点に関わらず 6 割以上の検体が陽性となり、遺伝子量と気候には相関が見られなかった。EMA-qPCR 法において *Legionella* 属菌の遺伝子が検出されたことから、エアロゾル中における生菌の存在が示唆された。16S メタゲノム解析では、ほとんどの検体から *Legionella* 属菌のリードが検出され、*L. pneumophila* のリードも一部の検体から検出された。これらの結果から、エアロゾル中に広く *Legionella* 属菌が浮遊している可能性が示唆された。また、道路沿い検体における *Legionella* 属菌遺伝子の検出率および遺伝子量は、浴室内検体

と同等かつ屋内検体より高かったことから、道路沿いのエアロゾルは浴室内のそれと同様のリスクがある可能性が考えられた。

アメーバ共培養については、既知の報告⁷⁾を基に *Legionella* 属菌の感染を促進するヘパリンを添加して検討したが、これまでの報告^{8,9)}と同様に、直接培養法と比べ検出率が低かった。この原因は不明であるが、一部の検体では、夾雑菌の発育により斜光法による *Legionella* 属菌様コロニーの観察が困難であったため、夾雑菌抑制のための検討が必要であると考えられた。

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（臨床分離株）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 86.7%が Lp1 であった¹⁰⁾。従って、分子疫学的解析を実施し、感染源を特定するには、Lp1 を標的とした環境由来検体の検査が重要となる。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用水は Lp1 だけでなく、他の血清群の *L. pneumophila* をはじめ、夾雑菌も多く検出される場合が多い。培地上の *Legionella* 属菌を形状だけで Lp1 と特定できないため、時間と労力をかけ多くのコロニー調べることとなり、結果として Lp1 を見落とすことが懸念される。また、夾雑菌による Lp1 の発育阻害（マスキング）も見落としの要因となっている。本年度、実検体について Lp1-IMB により Lp1 を選択的に濃縮分離したところ、平板培養法では分離されなかった検体から Lp1 を分離することができた。また、他の血清群の *Legionella* 属菌を選択する確率が低く、Lp1 に特異的であることも明らかになった。しかし、検体によっては平板培養法で Lp1

を分離したにも関わらず、IMB 法で Lp1 を分離できなかった。これら平板培養法と IMB 法で結果が異なった検体では、Lp1 の菌数が 2~13 CFU/100 ml と検出限界に近いものであったことから、供試した検体に Lp1 が含まれる確率によることが考えられる。このことは、Lp1 の菌数が少ない検体で、PCR による Lp1 特異的遺伝子が不検出となっていることについても同様のことが推定される。IMB 法はこれまでも様々な菌種での検査法¹¹⁾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する。逆に、感染源を特定する検査において、この Lp1 特異遺伝子を検出する PCR 法をスクリーニング法として利用するのはリスクが高いと思われる。Mérault らのプローブを用いて qPCR 法として感度を上げることができれば、スクリーニング法として使用できるかも知れない。一方で、本年は加熱処理や酸処理により、夾雑菌によるマスキング回避を検討したが、実際の検体からの分離でも添加回収実験においても、これらの処理は有用ではなかった。この理由は、ビーズにより既に夾雑菌が除去されていることが考えられる。加熱や酸による処理は、Lp1 にもストレスとなる可能性が考えられることから、Lp1-IMB 法ではこれらの処理を必ず実施する必要性はないように思われる。*Legionella* 属菌の受けるストレスについては、GVPC 培地に含まれる抗生剤も同様である。本研究で添加菌を測定するために使用した GVPC 培地での発育菌数は BCYE- α 培地の 54~56% と低かった。添加回収実験においても、GVPC 培地での回収率は、基本となる菌数を BCYE- α とするか、GVPC 培地とするか

で異なった。この抑制力は、検体に含まれる夾雑菌の量によっては有用であり、考慮の上利用しなければならない。Lp1-IMB 法は Lp1 だけを捕集するのが目的であるが、実際には本年の結果のように他の血清群や菌種、夾雑菌も捕集された。処理法や抗生剤を使用しない Lp1-IMB 濃縮法となるような手技の確立が必要である。例えば、夾雑菌などが多い場合には検体を希釈し、夾雑菌を減らしてから IMB を使用する等の検討も必要である。Lp1-IMB 濃縮法は少ない菌数の Lp1 を検出するのが特徴のひとつであるから、濃縮検体の希釈、すなわち濃縮率での対応について、ATP と関連付けて確認することが必要と思われる。

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-sokuh-o-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) Mérault N, Rusniok C, et al. 2011. Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. *Appl Environ Microbiol.* 77:1708-1717.

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/H28_Legionnaires_2.pdf .6)

7) 八木田 健司, 他 . 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 . 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 79-84.

8) Edagawa A, 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.

9) 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) 「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 39-50 .

10) レジオネラレファレンスセンター会議報告 . 2017 . 衛生微生物技術協議会第 38 回研究会 .

http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H29_Legionnaires.pdf .

11) 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
報告

磯部順子, 金谷潤一, 他 . 2017 . 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2016 年) . 富山県衛生研究所年報 . 40:61-66 .

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 . 浴用施設における *Legionella* 属菌検出結果

a . 陽性数および菌数

	施設数	検体数	陽性数	検出率 (%)	菌数			
					10 未満	10 - 99	100 - 999	>1000
浴槽水	14	39	8	20.5%	31	4	3	1
シャワー水	14	32	8	25.0%	24	3	4	1
カラン水	14	15	4	26.7%	11	4	0	0

b . 血清型別

	血清型別					
	Lp1	Lp3	Lp5	Lp6	Lp UT	ミクダディ
浴槽水	6		1		1	1
シャワー水		2	1	1	5	
カラン水			2		3	

表 2 . 浴用施設における平板培養法およびアメーバ共培養法

a . 陽性数

	検体数	陽性数	検出率 (%)
平板培養法	86	20	23.3%
アメーバ共培養法	86	14	16.3%

b . 血清型別

	血清群						
	Lp1	Lp3	Lp5	Lp6	Lp UT	ミクダディ	<i>L.cherrii</i>
平板培養法	6	2	4	1	9	1	
アメーバ共培養法	1	3	3	2	4	1	1

c . 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	12	8	20
	陰性	2	64	66
	計	14	72	86

表 3 . 市中河川水における *Legionella* 属菌検出結果

	陽性数 / 検体数		血清群
	平板培養	アメーバ共培養	
3 月	0/5 検体	0/5 検体	
9 月	0/5 検体	3/5 検体	Lp 3, Lp 6, Lp 7, Lp UT
10 月	0/5 検体	0/5 検体	
11 月	0/5 検体	3/5 検体	Lp 4, Lp UT

表 4 . エアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果 1

採取場所	検体数	陽性数			16S rRNAコピー数の平均 (copies/m3)	備考
		平板培養	アメーバ共培養	qPCR (%)		
道路沿い	151	0	0	114 (75.5)	81.0	99検体はH28のデータ
浴室内	21	0	0	15 (71.4)	72.0	16検体はH28のデータ
屋内	20	0	0	9 (45.0)	19.5	

吸引量 3000 L (300 L/min, 10 min)
15 ml 0.005% Tween 80

表 5 . エアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果 2

	検体数	陽性数 (%)	16S rRNAコピー数の平均 (copies/m3)
平板培養	30	0	
アメーバ共培養	30	0	
qPCR	30	26 (86.7)	31.9
EMA qPCR	30	20 (66.7)	20.0

吸引量 9000 L (300 L/min, 30 min)
15 ml 滅菌水

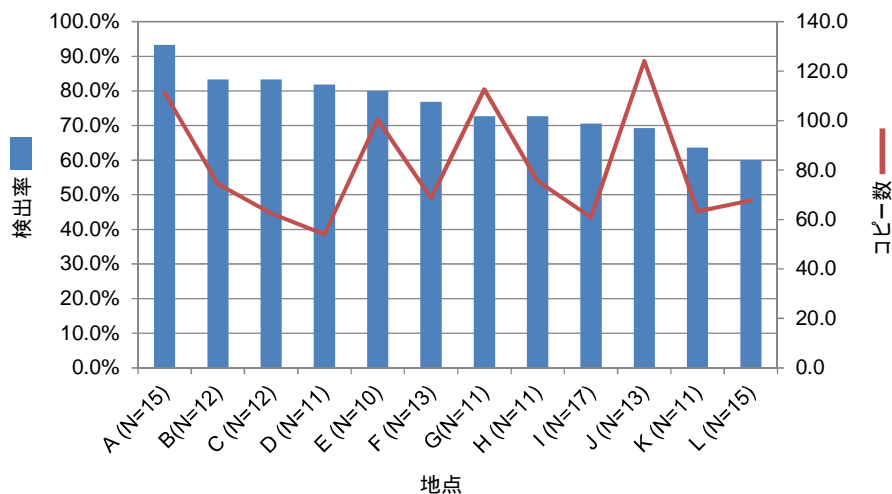


図 1 . 地点別のエアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果

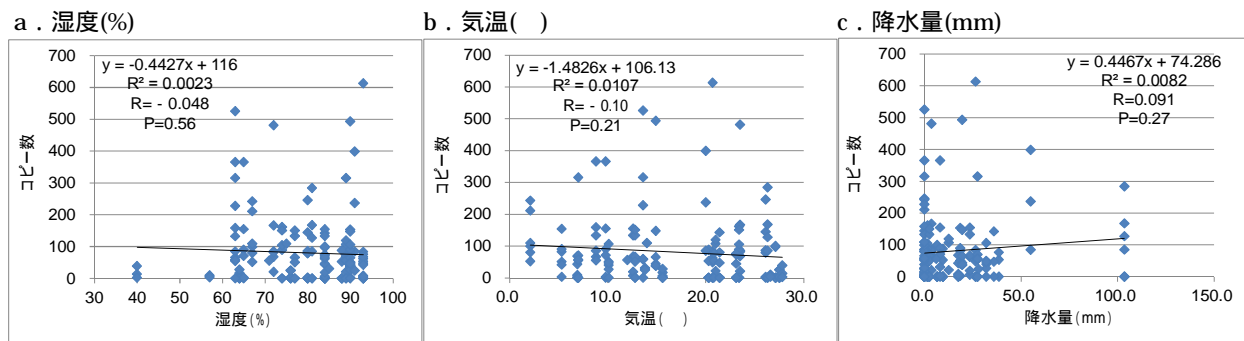


図 2 . エアロゾル中の *Legionella* 属菌遺伝子量と気候との相関

表 6 . 16S メタゲノム解析結果

a . 取得リード数

検体	検体数	No. of reads per sample	
		Median	(Range)
道路沿い	23	121,351	(66,803 975,202)
浴室	9	115,879	(68,986 1,110,988)

b . Genus

Road (N = 23)			Bath (N = 9)		
	N	%		N	%
<i>Sphingomonas</i>	23	15.67	<i>Sphingomonas</i>	9	22.51
<i>Streptococcus</i>	23	14.39	<i>Mycobacterium</i>	9	7.54
<i>Roseomonas</i>	23	2.81	<i>Pseudomonas</i>	9	5.28
<i>Methylobacterium</i>	23	2.48	<i>Methylocaldum</i>	9	5.27
<i>Bacillus</i>	23	1.99	<i>Acinetobacter</i>	9	1.87
<i>Calothrix</i>	23	1.85	<i>Pelomonas</i>	9	1.57
<i>Arthrobacter</i>	23	1.63	<i>Arthrobacter</i>	9	1.56
<i>Achromobacter</i>	23	1.62	<i>Vibrio</i>	9	1.53
<i>Pseudomonas</i>	23	1.6	<i>Methylobacterium</i>	9	1.52
<i>Vibrio</i>	23	1.17	<i>Ochrobactrum</i>	9	1.51
<i>Legionella</i>	22	0.23	<i>Legionella</i>	9	0.1
Others		38	Others		35.15
Unclassified		11.78	Unclassified		9.1
Total		100	Total		100

c . Species

Road (N = 23)			Bath (N = 9)		
	N	%		N	%
<i>L. shakespearei</i>	15	0.1158	<i>L. shakespearei</i>	5	0.0025
<i>L. cherrii</i>	14	0.0492	<i>L. taurinensis</i>	5	0.0013
<i>L. taurinensis</i>	12	0.0707	<i>L. cherrii</i>	5	0.0006
<i>L. sainthelensi</i>	11	0.0379	<i>L. rowbothamii</i>	4	0.0108
<i>L. waltersii</i>	10	0.0126	<i>L. sainthelensi</i>	4	0.0013
<i>L. rowbothamii</i>	9	0.0054	<i>L. waltersii</i>	3	0.0024
<i>L. worsleiensis</i>	8	0.0042	<i>L. tucsonensis</i>	3	0.0011
<i>L. fallonii</i>	6	0.0031	<i>L. pneumophila</i>	2	0.0337
<i>L. pneumophila</i>	4	0.0033	<i>L. fallonii</i>	2	0.0154
<i>L. moravica</i>	2	0.0013	<i>L. worsleiensis</i>	2	0.0013
<i>L. tucsonensis</i>	2	0.0003	<i>L. moravica</i>	1	0.0002
<i>L. cincinnatiensis</i>	2	0.0003	<i>L. anisa</i>	1	0.0001
<i>L. longbeachae</i>	2	0.0002	<i>L. cincinnatiensis</i>	1	0.0001
<i>L. steigerwaltii</i>	1	0.0002			
<i>L. anisa</i>	1	0.0001			

表 7 . Lp1-IMB による濃縮法による *Legionella* 属菌の分離結果

	IMB濃縮培養 検討数	<i>Legionella</i> 属菌 陽性検体数	IMBによる Lp1分離検体数
浴用水	35	7*	5
シャワー	12	0	
カラん水	6	0	

* : 1 検体から *L. micdadeii* , 1 検体から Lp5 分離された

表 8 . Lp1 が分離された検体の Lp1-IMB 法と平板培養法の *Legionella* 属菌の分離結果

	Lp1-IMB濃縮培養法		平板培養法		アメーバ 培養法	Lp1特異遺伝子 (PCR)
	(血清型/種別 菌数 CFU/100ml)	処理法 <i>Legionella</i> 属菌が分離された	培地	(血清型/種別 菌数 CFU/100ml)		
1陽性(Lp1;2, UT;2)	未処理 加熱	GVPC, BCYE	陽性(Lp1; 890)	未 加熱 酸	陰性	陽性
2陽性(Lp1 ; 3, UT ; 1)	未処理	GVPC	陽性(Lp1; 100)	未 加熱 酸	陽性 (Lp1)	陽性
3陽性 (<i>L. micdadeii</i> ; 2570)	未処理 加熱 酸	GVPC BCYE,GVPC BCYE,GVPC BCYE,GVPC	陽性(Lp1; 10) (<i>L. micdadeii</i> ; 7510)	未 加熱 酸 非濃縮	陽性 (<i>L. micdadeii</i>)	陰性
4陽性(Lp1;13)	未処理	BCYE	陰性		陰性	陰性
5陽性(Lp1;11)	未処理 加熱 酸	BCYE,GVPC BCYE,GVPC GVPC	陽性(Lp1; 820)	未 加熱 酸	陰性	陽性
6陽性(Lp5;3)	加熱 酸	BCYE BCYE	陽性(Lp5; 10)	加熱	陰性	陰性
7陽性(Lp1;2)	酸	GVPC	陰性		陰性	陰性
8陰性			陽性(Lp1; 10)	未	陰性	陽性
9陰性			陽性(Lp1; 10)	未 加熱	陰性	陰性
10陰性			陽性(Lp2-4; 10)	加熱	陰性	陰性

表 9. 添加菌 (菌懸濁液) の菌数

実験	1		3			4		5		6								
	A	C	A	B	A	A	B	A	B									
使用菌株名*																		
GVPC	58	57	39	53	39	52	80	129	46	43	21	20	13	21	34	45	43	44
BCYE- α	86	87	85	85	69	87	129	173	68	83	47	40	82	41	69	80	67	103

使用菌株名 : A (LG626.Lp1) , B(LG643.Lp1) , C(LG494.Lp9)

表 10-a . Lp1 添加回収実験結果(BCYE- α による添加菌数測定)

実験	検体数	添加菌	添加菌数 (BCYE- α) (CFU/100ml)	BCYE α による回収率(%)				GVPCによる回収率(%)			
				未処理	加熱処理	酸処理	平均	未処理	加熱処理	酸処理	平均
①	4	LG626	346	35.5	37.6	14.4	29.2	25.9	30.8	12.8	23.2
②	4	LG626	347	21.1	20.1	18.9	20.0	12.6	16.3	15.7	14.9
③	5	LG626	312	18.3	27.4	17.6	21.1	16.3	23.0	21.5	20.3
	4	LG643	604	23.6	25.0	23.9	24.1	19.6	22.6	20.6	20.9
④	10	LG626	75.5	35.2	29.9	34.2	33.1	27.0	24.9	24.2	25.4
⑤	3	LG626	21.8	10.7	13.8	13.8	12.8%	6.1	9.2	13.8	9.7
	2	LG643	25.4	43.4	37.5	75.0	51.9%	43.4	43.4	43.4	43.4
⑥	7	LG626	74.5	49.9	43.3	62.7	52.0%	33.9	35.2	35.0	34.7
	8	LG643	84.5	55.6	45.1	62.8	54.5%	41.0	36.2	44.5	40.6
		平均	210.1	32.6	31.1	35.9	33.2%	25.1	26.8	25.7	25.9

表 10-b . Lp1 添加回収実験結果(GVPC による添加菌数測定)

実験	検体数	添加菌数 (GVPC) (CFU/100ml)	GVPCによる回収率(%)		
			未処理	加熱処理	酸処理
①	2	230	39.0	46.3	19.2
③	5	182	28.3	32.7	29.8
	4	418	45.8	42.2	41.1
④	10	44.5	13.7	19.5	29.3
⑤	3	10.25	54.3	28.5	53.2
	2	9.55	72.6	74.2	77.8
⑥	7	39.5	64.0	78.1	77.0
	8	43.5	80.2	70.7	78.4
	41		42.3	40.6	41.7

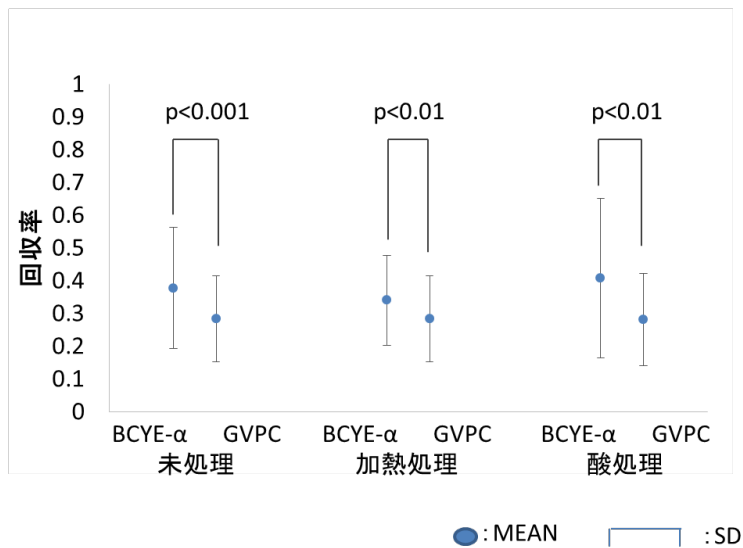


図 3-a . 添加回収実験における回収率の比較
(BCYE- α 培地と GVPC 培地の比較)
N=39 で実施した対応のある t 検定

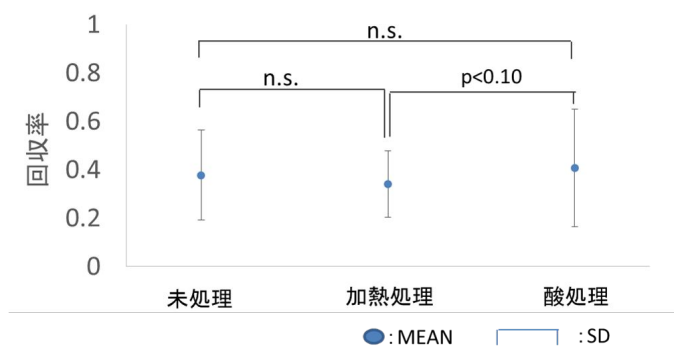


図 3-b . 添加回収実験における回収率の比較
(BCYE- α 培地での処理法の比較) n=39

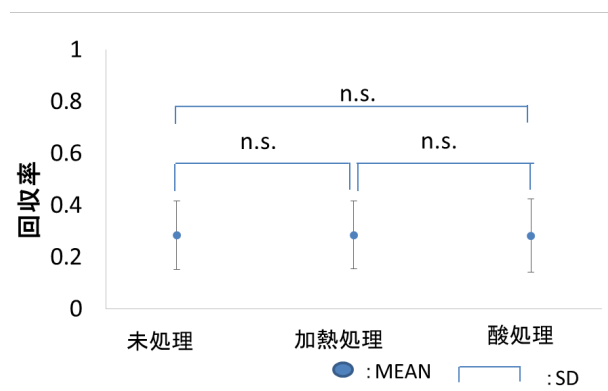


図 3-c . 添加回収実験における回収率の比較
(GVPC 培地での処理法の比較) n=39

表 11 . LP1-IMB 法における洗浄方法別回収率

実験回	添加菌数 (BCYE- α で測定)	生食	回収率 (%)	Buffer (ACES)	回収率 (%)
1	880	340	38.6	300	34.1
2	860	230	26.1	358	41.6
3	880	270	30.7	281	31.9
4	780	356	45.6	159	20.4
5	1510	618	40.9	634	46.0
6	750	88	11.7	75	10.0
7	750	128	17.1	110	14.7
平均	915.7	290	30.1	273	28.4

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
田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター		

研究協力者

金谷 潤一	富山県衛生研究所	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	上野 潤二	栄研化学株式会社
東出 誠司	栄研化学株式会社	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	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		

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

216 検体について PALSAR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 77.2%、特異度は 74.8%、一致率は 75.5%であった。シャワー水・カラン水以外の検体においては感度 83.7%、特異度 68.3%、一致率 72.6%であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。しかしながら、シャワー水・カラン水検体においては感度が 37.5%と低かった。

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

168 検体について qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 97.0%であり、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のほとんどを検出できる迅速検査法であったが、特異度は 37.8%、一致率は 49.4%であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、177 検体について EMA-qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 82.4%、特異度は 61.5%、一致率は 65.5%であり、EMA 処理を実施することで死菌 DNA の増幅を抑制することができ、より平板培養法と相関する方法となった。

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

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、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上記の迅速検査法について評価し、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⁾。EMA-qPCR法については、昨年度の検討ではqPCR法と比較し特異度があまり向上しなかったため³⁾、引き続き検討が必要であると考えられた。また、これまでLAMP法についてはEMA処理による検討は実施していない。そこで今回、改良したPALSAR法、(EMA-)LAMP法および(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。

B 材料と方法

1 検査材料

全国5か所の地方衛生研究所において、平成29年度に浴用施設などから324検体の試料を採取し、迅速検査法の検討に用いた(表1)。検体の内訳は、浴槽水が210検体(64.8%)、湯口水が24検体(7.4%)、採暖槽水が28検体(8.6%)、シャワー水が32検体(9.9%)、カラン水が15検体(4.6%)、その他(井戸水など)が15検体(4.6%)であった。

2 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。

3 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。目視の発色確認により16S rRNAが検出された場合を陽性と判定した。なお、溶菌条件を昨年度の37 15分から70 5分に変更した。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。一部の検体(29検体)については、100倍濃縮検体4 mlを遠心後、上清70 µlのみ残したRNA抽出前の時点で-20℃に保存した。

4 LAMP法およびEMA-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。遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。EMA-LAMP法は、1000倍濃縮検体にEMA処理を実施後、Chelex溶液を用いてDNAを抽出し、LAMP法に用いた。

平板培養法で陽性となったがLAMP法で陰性となった検体については、反応阻害物質の確認のため、DNAを5倍および10倍希釈した後、反応に用いた。また、DNA 4.5 µlに試薬に添付されている陽性コントロールを0.5 µl加えた検体についても、反応に用いた。

5 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。qPCR 法、EMA-qPCR 法ともに、遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。

(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

324 検体について検査した結果、81 検体(25.0%) 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 39 検体(12.0%)、100~999 CFU/100 ml が 23 検体(7.1%)、1,000 CFU/100 ml 以上が 19 検体(5.9%)であった。最も多かった検体では、23,500 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) 1 が 26 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 6 (20 検体)、*L. pneumophila* SG 5 (19 検体)、*L. pneumophila* SG 3 (16 検体)であった。また、*L. pneumophila* 以外の菌種が 16 検体から分離された。

2 PALSAR 法による結果

(1) 平板培養法との比較

PALSAR 法を用いた 216 検体について、平板培養法と比較した(表 4)。平板培養法では 57/216 検体(26.4%)、PALSAR 法では 84/216 検体(38.9%) が陽性となった。PALSAR 法は平板培養法に対して、感度 77.2%、特異度 74.8%、陽性的中率 52.4%、陰性的中率 90.2%、一致率 75.5%であった。

検体別に見ると、シャワー水・カラン水検体のみを対象とした場合、感度 37.5%、特異度 100%、陽性的中率 100%、陰性的中率 86.8%、一致率 87.8%であった。その他の検体を対象とした場合、

感度 83.7%、特異度 68.3%、陽性的中率 50.6%、陰性的中率 91.5%、一致率 72.6%であった。RNA 抽出前に凍結保存した 29 検体のみについて見ると、感度 90.9%、特異度 77.8%、陽性的中率 71.4%、陰性的中率 93.3%、一致率 82.8%であった。

(2) PALSAR 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となったが PALSAR 法で陰性となった検体を表 5 に示した。シャワー水・カラン水以外の 8 検体のうち、6 検体は平板培養法での菌数が 10~20 CFU/100 ml と低かった。残りの 2 検体は LAMP 法も陰性であり、反応阻害物質など遺伝子検査を阻害する要因の存在が示唆された。シャワー水・カラン水検体については、平板培養法の菌数が 100 CFU/100 ml 以下の 5 検体全てで PALSAR 法が陰性となった。

3 LAMP 法による結果

(1) 平板培養法との比較

LAMP 法を用いた 283 検体について、平板培養法と比較した(表 6)。平板培養法では 77/283 検体(27.2%)、LAMP 法では 111/283 検体(39.2%) が陽性となった。LAMP 法は平板培養法に対して、感度 84.4%、特異度 77.7%、陽性的中率 58.6%、陰性的中率 93.0%、一致率 79.5%であった。

(2) LAMP 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となったが LAMP 法で陰性となった検体を表 7 に示した。10 検体は、平板培養法での菌数が 10~50 CFU/100 ml であった。No. 12 については、陽性コントロールを添加した場合においても LAMP 法が陰性となったため、反応阻害物質の存在が考えられた。また No. 11 についても、陽性コントロールを添加した場合 Tt 値が 1~2 分遅れ(n=3 で実施)、スムーズな増幅曲線を描かなかつたため、ある程度反応阻害があると考えられた。

4 EMA-LAMP 法による結果

86 検体について EMA-LAMP 法を実施した(表 8)。EMA 未処理の場合、平板培養法に対して感度 85.0%、特異度 80.3%、陽性的中率 56.7%、陰性的中率 100%、一致率 81.4%であった。EMA 処

理を実施することで、感度 60.0%、特異度 100%、陽性的中率 100%、陰性的中率 89.2%、一致率 90.7%となった。平板培養陽性検体のうち、EMA 未処理で陽性となったが、EMA 処理を実施することで陰性となった検体は 5 検体であった。各検体の平板培養法の菌数は、10、10、10、100、120 CFU/100 ml であった。

5 qPCR 法および EMA-qPCR 法による結果

(1) 平板培養法との比較

qPCR 法を用いた 168 検体および EMA-qPCR 法を用いた 177 検体について、それぞれ平板培養法と比較した(表 9)。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。qPCR 法は平板培養法に対して、感度 97.0%、特異度 37.8%、陽性的中率 27.6%、陰性的中率 98.1%、一致率 49.4%であった。EMA-qPCR 法は、感度 82.4%、特異度 61.5%、陽性的中率 33.7%、陰性的中率 93.6%、一致率 65.5%であった。実検体を用いた qPCR 法および EMA-qPCR 法と平板培養法との菌数(定量値)の相関は、 $R^2 = 0.2216$ および $R^2 = 0.2279$ であった(図)。なお、レジオネラ属菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、取り扱い説明書および昨年³⁾の検討結果を参照した。

(2) qPCR 法および EMA-qPCR 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となったが qPCR 法および EMA-qPCR 法で陰性となった 7 検体は、平板培養法での菌数が 10~20 CFU/100 ml と低かった(表 10)。

D 考察

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

PALSAR 法では、昨年度の結果³⁾をもとに、感度を向上させるため溶菌条件を 37 15 分から 70 5 分に変更した。その結果、平板培養法に対

する感度は 77.2%となり、昨年度の 60.5%から向上した。とりわけシャワー水・カラン水以外の検体においては、感度は 83.7%まで上がり、検体数は異なるものの LAMP 法および EMA-qPCR 法と同等であった。特異度においても、PALSAR 法は LAMP 法および EMA-qPCR 法と同等であり、平板培養法との一致率も 7 割以上であったため、シャワー水・カラン水以外の検体においては、PALSAR 法は平板培養法と相関する迅速検査法であると考えられた。

一方、シャワー水・カラン水については感度が 37.5%(3/8 検体)と低かった。昨年度の検討においてもシャワー水検体の感度は 0%(平板培養法陽性 10 検体のうち、PALSAR 法陽性 0 検体)であった。今年度は溶菌条件を変更することで感度が多少向上したが、平板培養法での菌数が 100 CFU/100 ml 以下の 5 検体全てで PALSAR 法が陰性となった。これらの結果から、シャワー水・カラン水中のレジオネラ属菌 1 CFU あたりの RNA 量が少ない可能性が考えられた。あるいは、シャワー水・カラン水中のレジオネラ属菌の形態は不明であるが、本プロトコルでは溶菌できない可能性も考えられた。各種検体中の RNA の定量、RNA 抽出条件の改良などを実施する必要があると考えられた。

PALSAR 法は、現行のプロトコルでは当日中に測定しない場合は RNA 抽出後の検体を凍結保存することとなっているが、本検討では、RNA 抽出前の状態で凍結保存しても平板培養法に対する感度などは低下しなかったため、検査に用いても問題ないことが明らかとなった。

LAMP 法では、平板培養法に対する感度は 84.4%であり、昨年度の 65.1%より高かった。理由として、昨年度は一部の検体を添付の取扱説明書とは異なる方法で DNA を抽出していた点が考えられた。また、昨年度は 10~40 CFU/100 ml の低濃度培養陽性検体数が今年度の 15.4%(50/324 検体)より多かった(22.6%、79/349 検体)点も理由の一つとして考えられた。LAMP 法は平板培

養法との一致率が約 8 割であったことから、添付の取扱説明書に従い実施することで平板培養法と相関する迅速検査法であると考えられた。

EMA-LAMP 法では、EMA 未処理の場合と比較し、特異度は 80.3% から 100% に向上したが、感度は 85.0% から 60.0% に低下した。とりわけ、低濃度培養陽性検体 (10 CFU/100 ml) において EMA-LAMP 法が陰性となった。EMA は無傷な細胞膜を保持した生菌に対してもある程度透過し、核酸増幅を抑制するため、EMA 処理濃度を再検討する必要があると考えられた。

qPCR 法は、平板培養法に対する感度は 97.0% であり、昨年度の結果 (感度 96.4%)³⁾と同様に平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のほとんどを検出できる迅速検査法であった。しかしながら特異度は 37.8%、一致率は 49.4% であり、死菌 DNA を検出していると考えられる検体が多かった。

一方 EMA-qPCR 法では、平板培養法に対する感度は 82.4% であり qPCR 法と比較しやや低下したが、昨年度の検討では感度 92.9% であり、問題ないと考えられた。また、qPCR 法と比較し、特異度は 61.5%、一致率は 65.5% まで向上したため、EMA 処理を実施することで死菌 DNA の遺伝子増幅を抑制でき、全体として平板培養法とより相関する迅速検査法となったと考えられた。

qPCR 法および EMA qPCR 法と平板培養法における菌数 (定量値) の比較は $R^2 = 0.2216$ および $R^2 = 0.2279$ であり、過去に検討した 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。

各種迅速検査法は、いずれの方法においても陰性的中率が 90% 以上 (シャワー・カラン水検体における PALSAR 法および EMA-LAMP 法は除く) であり、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であると考えられた。また、適切な濃度で EMA 処理を実施することで死菌

DNA の増幅を抑制することができ、より平板培養法と相関する方法となることも明らかとなった。

E 結論

各種迅速検査法について、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。

PALSAR 法は、シャワー水・カラン水以外の検体においては平板培養法と相関する迅速検査法であったが、シャワー水・カラン水における感度低下の原因究明のため、各種検体中の RNA の定量、RNA 抽出条件の改良などを実施する必要があると考えられた。

LAMP 法は、添付の取扱説明書に従い実施することで平板培養法と相関する迅速検査法であると考えられた。EMA-LAMP 法では、EMA 処理濃度を再検討する必要があると考えられた。

qPCR 法は平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のほとんどを検出できる迅速検査法であったが、死菌 DNA を検出している検体が多かった。しかしながら EMA 処理を実施することで、全体として平板培養法とより相関する迅速検査法 (EMA-qPCR 法) となると考えられた。

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

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、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、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 28 年度分担研究報告書、51-61.

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					計
		A	B	C	D	E	
検体内訳	浴槽水	39	21	27	25	98	210
	湯口水				24		24
	採暖槽水		28				28
	シャワー水	32					32
	カラン水	15					15
	その他(井戸水、源泉など)		1	14			15
	計	86	50	41	49	98	324
検査方法	PALSAR	76	50		49	85	260
	LAMP	86	50		49	98	283
	EMA-LAMP	86					86
	qPCR	86	50	32			168
	EMA-qPCR	86	50	41			177

表2. 平板培養法による検出率

菌数(CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	243	(75.0)
10-99	39	(12.0)
100-999	23	(7.1)
1,000以上	19	(5.9)
計	324	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 1	26
SG 6	20
SG 5	19
SG 3	16
SG 9	10
SG 4	9
SG 8	7
SG 15	6
SG 13	4
SG 10	2
SG 2	1
SG 7	1
SG 12	1
UT	34
<i>Legionella</i> spp.	16

表4. 平板培養法とPALSAR法との比較

a. 全検体

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
PALSAR法	陽性	44	40	84
	陰性	13	119	132
計		57	159	216

感度77.2%、特異度74.8%、陽性的中率52.4%、陰性的中率90.2%、一致率75.5%

b. シャワー水・カラン水

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
PALSAR法	陽性	3	0	3
	陰性	5	33	38
計		8	33	41

感度37.5%、特異度100%、陽性的中率100%、陰性的中率86.8%、一致率87.8%

c. シャワー水・カラン水以外

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
PALSAR法	陽性	41	40	81
	陰性	8	86	94
計		49	126	175

感度83.7%、特異度68.3%、陽性的中率50.6%、陰性的中率91.5%、一致率72.6%

表5. PALSAR法における偽陰性検体

a. シャワー・カラン水以外 (偽陰性検体のみ)

No.	検体	湯温 (°C)	残塩 (mg/L)	pH	平板培養法 (CFU/100 ml)	血清群	PALSAR法	EMA-qPCR法	LAMP法	
1	浴槽水	白湯	41	0.6	7.43	10	Lp1	-	+	+
2	浴槽水	温泉	40	<0.05	7.19	10	Lp5	-	-	-
3	浴槽水	温泉	41	0.6		10	Lp9	-	NT	+
4	採暖槽水	白湯	38	1.3	8.3	10	Lp3	-	-	+
5	採暖槽水	白湯	36.8	0.8	8.27	10	Lp1	-	-	-
6	浴槽水	井戸水	42	0.4		20	Lp5	-	NT	+
7	湯口水	単純泉	39.7	0.5		50	Lp1, Lp8, Lp12, LpUT	-	NT	-
8	湯口水	温泉		0		1500	Lp3, Lp13, LpUT, <i>L. londiniensis</i>	-	NT	-

b. シャワー・カラン水 (平板培養陽性検体すべて記載)

No.	検体	湯温 (°C)	残塩 (mg/L)	pH	平板培養法 (CFU/100 ml)	血清群	PALSAR法	EMA-qPCR法	LAMP法
1	カラン水	井戸水	0.1	7.41	20	Lp5	-	+	-
2	シャワー水	井戸水	0.3	8.19	30	LpUT	-	+	+
3	シャワー水	井戸水	0.3	8.22	30	LpUT	-	-	-
4	カラン水	井戸水	0.3	8.17	30	Lp5, LpUT	-	+	+
5	カラン水	井戸水	0.3	8.27	50	LpUT	-	+	+
6	シャワー水	井戸水	0	7.21	100	Lp3	+	+	+
7	シャワー水	井戸水	0	7.26	120	Lp3, Lp6	+	+	+
8	シャワー水	井戸水	0.08	7.59	680	Lp5	+	+	+

表6. 平板培養法とLAMP法との比較

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
LAMP法	陽性	65	46	111
	陰性	12	160	172
計		77	206	283

感度84.4%、特異度77.7%、陽性的中率58.6%、陰性的中率93.0%、一致率79.5%

表7. LAMP法における偽陰性検体

No.	検体	湯温 (°C)	残塩 (mg/L)	pH	平板培養法 (CFU/100 ml)	血清群	EMA-qPCR法	PALSAR法	LAMP 検討		
									×5希釈	×10希釈	PC添加
1	浴槽水	温泉	40	<0.05	7.19	10	Lp5	-	-	-	+
2	採暖槽水	白湯	36.8	0.8	8.27	10	Lp1	-	-	-	+
3	シャワー水	水道水		0.1	7.58	10	LpUT	+	NT	-	+
4	採暖槽水	白湯	35.8	0	7.79	10	Lp1	-	+	-	+
5	浴槽水	温泉	45.3	<0.1		10	LpUT	NT	NT	-	+
6	カラン水	井戸水		0.1	7.41	20	Lp5	+	-	-	+
7	シャワー水	井戸水		0.3	8.22	30	LpUT	-	-	-	+
8	湯口水	温泉	39.7	0.5		50	Lp1, Lp8, Lp12, LpUT	NT	-	-	+
9	浴槽水	水道水	40.4	0.8		50	Lp3	NT	+	-	+
10	浴槽水	水道水	44	0.3		50	Lp6, LpUT	NT	+	-	+
11	湯口水	温泉		0		1500	Lp3, Lp13, LpUT, <i>L. londiniensis</i>	NT	-	-	+
12	浴槽水	温泉	39.5	0.5	7.09	7520	Lp1, <i>L. micdadei</i>	+	+	-	-

表8. 平板培養法とEMA-LAMP法との比較

a. EMA未処理

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	17	13	30
陰性	3	53	56
計	20	66	86

感度85.0%、特異度80.3%、陽性的中率56.7%、陰性的中率100%、一致率81.4%

b. EMA処理

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	12	0	12
陰性	8	66	74
計	20	66	86

感度60.0%、特異度100%、陽性的中率100%、陰性的中率89.2%、一致率90.7%

表9. 平板培養法と(EMA-) qPCR法との比較

a. EMA未処理

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
qPCR	陽性	32	84
	陰性	1	51
計	33	135	168

感度97.0%、特異度37.8%、陽性的中率27.6%、陰性的中率98.1%、一致率49.4%

b. EMA処理

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
EMA-qPCR	陽性	28	55
	陰性	6	88
計	34	143	177

感度82.4%、特異度61.5%、陽性的中率33.7%、陰性的中率93.6%、一致率65.5%

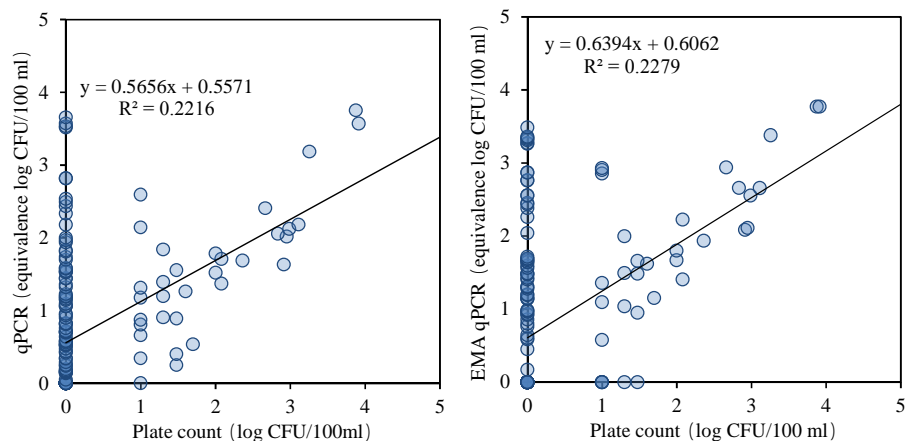


図 平板培養法と qPCR 法および EMA-qPCR 法との相関

表10. (EMA-) qPCR法における偽陰性検体

No.	EMA処理	検体	湯温	残塩	pH	平板培養法				
						泉質など ()	(mg/L)	(CFU/100 ml)	血清群	LAMP法
1	-	採暖槽水	白湯	35.8	0	7.79	10	Lp1	-	+
2	+	浴槽水	温泉	40	<0.05	7.19	10	Lp5	-	-
3	+	採暖槽水	白湯	38	1.3	8.3	10	Lp3	+	-
4	+	採暖槽水	白湯	35.8	0	7.79	10	Lp1	-	+
5	+	採暖槽水	白湯	36.8	0.8	8.27	10	Lp1	-	-
6	+	浴槽水		40.5	0.1	8	20	Lp6	-	NT
7	+	シャワー水	井戸水		0.3	8.22	30	LpUT	-	-

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 29 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 神田 由子、後藤 高志、成松 浩志
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 49 検体について検討を行った。昨年度までと同様、培養検査に斜光法を取り入れることによって、より短い期間で正確な培養結果が得られた。併せて、非選択培地の有用性についての検討を行ったが、浴場水からのレジオネラ属菌の分離には、非選択培地は適さなかった。

また、比色系パルサー法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。過去の検討では、検水をろ過してフィルターごと溶菌処理する方法で良好な結果が得られたものの、ろ過に長時間かかる検体があった。その解消法として、目詰まりする検水にはフィルター面積を大きくすることが有効であった。

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 7～10 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。レジオネラ属菌は、培養 3 日後に分離培地上に出現する小コロニーへ 2 方向から斜に光を照射し、実体顕微鏡下で観察をすると特徴的なモザイク様模様を示すことが報告されている¹⁾。そこで、この特徴をレジオネラ属菌の迅速スクリーニングに利用した方法（以下、斜光法¹⁾）をレジオネラ属菌検査のいわゆる『標準的検査法』に導入することを目的に、大分県内の浴場水の調査の中で、斜光法を取り入れた検査法を併行・継続し、様々な泉質に対する有用性と実効性についての検討を平成 21

年度から重ねている。

一方、ISO11731:2017 に示されたレジオネラ属菌分離手順の選択肢には非選択培地が含まれている。そこで、標準的検査法を提示する際の選択肢の一つとして、非選択培地を浴場水のレジオネラ属菌分離に用いることが妥当かどうか併せて検討した。

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) は、レジオネラ属菌特異的 16SrRNA に自己集合体を結合させることで、標的遺伝子を増幅させずに目視で検知する検査法である。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。昨年度、感度向上を目指して、検水ろ過後のフィルターを直接溶菌する方法を検討し、良好な結果を得た²⁾が、フィルターの目詰まりで、ろ過に多大な手間と時間を要する検体が存在したため、今年度はろ過の労力軽減を図った。

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 29 年 6 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水、25 施設 49 検体を対象とした。

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 0.2 μ m、ADVANTEC 社、POLYCARBONATE）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ピーカー（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 WYO α 寒天培地（栄研化学）GVPC 寒天培地（日研生物）MWY 寒天培地（自家製；Oxoid）及び非選択培地 BCYE 寒天培地（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 200 μ L 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 日後に、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、BCYE α 寒天培地及び血液寒天培地（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、LAMP 反応阻害を確認するため、当該抽出液に 1/10 量の陽性コントロールを添加したものと、陰性対照として用いるキット添付の抽出用試薬に 1/10 量の陽性コントロールを添加したものについて、再度測定をし、Tt 値を比較した。

4. 比色系パルサー法

非濃縮検水 49 検体について、レジオネラ属菌迅速検査キット（ファスマック）を用い、以下の 3 つの方法（～）で溶菌液を調製し、添付の取扱説明書に従って測定を実施した。なお、即日測定できなかった溶菌液については、測定するまで 1 日～4 日間、-30 で冷凍保存した。

方法：検水各 50mL を注射筒に入れてメンブランフィルター（直径 13mm、孔径 0.22 μ m、Merck 社、セルロース混合エステル；以下「13mm フィルター」）に押し出してろ過し、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 100 μ L 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 10 μ L の中和液を加えて溶菌液を調製した（13mm-50mL 溶菌液と表記）。測定にはこの溶菌液の全量 110 μ L を用いた。

方法：検水各 100mL を注射筒に入れてメンブランフィルター（直径 25mm、孔径 0.22 μ m、Merck 社、セルロース混合エステル；以下「25mm フィルター」）に押し出してろ過し、ろ

過後のフィルターを滅菌したピンセットで折り畳んで2mLチューブに移し、100/30倍に希釈した変性液をろ紙が漬かる量の200 μ L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20 μ Lの中和液を加えて溶菌液を調製した(25mm-50mL溶菌液と表記)。測定には、検水50mL分に相当する半量110 μ Lの溶菌液を用いた。

方法：検水各200mLを注射筒に入れ、方法と同様に調製した(25mm-100mL溶菌液と表記)。測定には、検水100mL分に相当する半量110 μ Lの溶菌液を用いた。

C. 研究結果

1. 培養法

選択培地での培養結果の概要をTable 1に示した。49検体中20検体(41%)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16検体中8検体(50%)、湯口水16検体中7検体(44%)で、「循環式施設」では浴槽水9検体中3検体(33%)、湯口水8施設中2検体(25%)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7施設であった。浴槽水(+)湯口水(-)となった施設は3施設、浴槽水(-)湯口水(+)となった施設は1施設であった(Table 2)。

検出された菌数をTable 3に示す。検水100mLあたり1000cfu以上検出された検体が10検体あり、高菌数の検体が多かった。菌数は最も多い検体で23500cfu/100mLであった。

斜光法は培養3日後を判定日とし、特徴あるモザイク様のコロニーについて確認検査を行った。その結果、レジオネラ属菌が検出された20検体は、継続培養後に菌数が増加することはあったが、全て斜光法で陽性を確認することができた。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7施設の10検体から検出され、平成24年度以降で最多であったが、検

査した全33株中*lag-1*遺伝子を保有する株はなかった(Table 5)。

選択培地と非選択培地の培養結果を比較したところ、非選択培地のみでレジオネラ属菌が検出された検体は無かった(Table 6)。両培地で検出された9検体のレジオネラ属菌数は、1検体を除いて選択培地の方が多かった。非選択培地上には非常に多くの雑菌が発育し、培養7日後には倒置培養したシャーレの蓋まで菌が流れだし、蓋を開けることが困難な検体が複数あった。

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 7)。7検体が培養(+)LAMP(-)の不一致の結果となった。7検体中6検体(グループA)のレジオネラ属菌数は5~50cfu/100mLで、*L. pneumophila*が分離された。残り1検体(グループB)は、レジオネラ属菌数が1500cfu/100mLで、*L. pneumophila*とLAMP法適用外の菌種である*L. londiniensis*が分離され、その泉質はマグネシウム・ナトリウム-炭酸水素塩・硫酸塩泉であった。

これら7検体について、陽性コントロールを添加した抽出液と陽性コントロールを添加した陰性対照とでTt値を比較したところ、グループAの6検体では差が見られなかったが、グループBの1検体では3回測定中3回とも抽出液のTt値の方が1~2分遅い値となった。(陰性対照平均Tt値27.7分、抽出液平均Tt値29.1分)。

3. 比色系パルサー法

各方法で実施した結果をTable 8-1、8-2、8-3に示した。検水50mL相当を測定した方法と方法では発色の薄い検体が多く、陰性が陽性が判定に迷う検体があった(表では「±」と記載)。

49検体中、培養法陽性でパルサー法陰性の不一致の結果となったのは、13mm-50mL溶菌液(方法)については6検体(Table 8-1)、25mm-50mL溶菌液(方法)についても6検体(Table 8-2)であった。この2種類の方法で両方とも不一致の結果となったのは5検体で、そのうちの3検体及び片

方が不一致の結果になった2検体から検出されたレジオネラ属菌数は5~50cfu/100mLと低菌数であったが、残り2検体から検出された菌数は、それぞれ1500cfu/100mL、6000cfu/100mLであった。なお、この高菌数の2検体のLAMP法の結果は、3回測定中それぞれ3回陰性、2回陰性で、泉質とともにマグネシウム・ナトリウム-炭酸水素塩・硫酸塩泉であった。

25mm-100mL溶菌液(方法)について(Table 8-3)培養(+)かつパルサー(-)の2検体から検出されたレジオネラ属菌数はともに5cfu/100mLであった。

13mmフィルターで50mL、25mmフィルターで200mLの検水をろ過した場合には、目詰まりする検体もあったが、昨年度13mmフィルターで100mLろ過した場合と比較して押出す力は少なく済み、短時間でろ過できた。

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日後での陰性の判定はできないが、3日後の時点で観察・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。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に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。

非選択培地については、選択培地と比較して、検出できた検体数も菌数も少なかった。これは非選択培地上に非常に多くの雑菌が発育し、レジオネラ属菌を覆い隠してしまったためと考えられる。浴場水はレジオネラ属菌以外の菌が含まれていることが多く、ISO11731:2017の想定する雑菌の少ない水を対象とした検査とは異なり、非選択培地の使用は適していないことが示された。

比色系パルサー法について、13mmフィルターと25mmフィルターを比較したところ、ろ過した検水量が同じであれば同等の結果であった。25mmフィルターの結果では、検水量を増やした方が検出率は高かった。発色の程度も考慮すると、測定量は検水100mL相当がよいと言える。フィルター面積が大きい方がろ過にかかる労力はかなり軽減されたが、フィルターを折り畳む手間と溶菌液を半量にする手間を要した。これらのことから、目詰まりしにくい検体については13mmフィルターで100mLをろ過し、13mmフィルターではろ過困難な場合については25mmフィルターを用いて同等の測定量にすることを推奨したい。

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。

同一の検体で培養法では高菌数なのにLAMP法とパルサー法ではともに陰性となったものがあり、温泉成分(マグネシウム等)の影響が疑われたが、原因の解明は今後の検討課題としたい。

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。浴場水のレジオネラ属菌分離に非選択培地は適さない。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に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。パルサー法において、検水に適したフィルターを用いて溶菌処理をすることで、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と考えられる。

参考文献

- 1 森本洋：分離集落の特徴を利用したレ

- 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 佐々木麻里 他：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．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）「公衆衛生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 年度総括・分担研究報告書：62-67
 - 3 Kozak et al. : Distribution of lag-1 alleles and sequence-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：レジオネラ属菌検査について、平成 29 年度環境監視員担当者会議、2017 年 4 月、大分.
 2. 佐々木麻里：大分県のレジオネラ症とレジオネラ検査について、レジオネラ症防止対策講習会、2017 年 11 月、大分.
 3. 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 29 年度第 2 回保健所等検査技師研修会、2018 年 2 月、大分.
- 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)

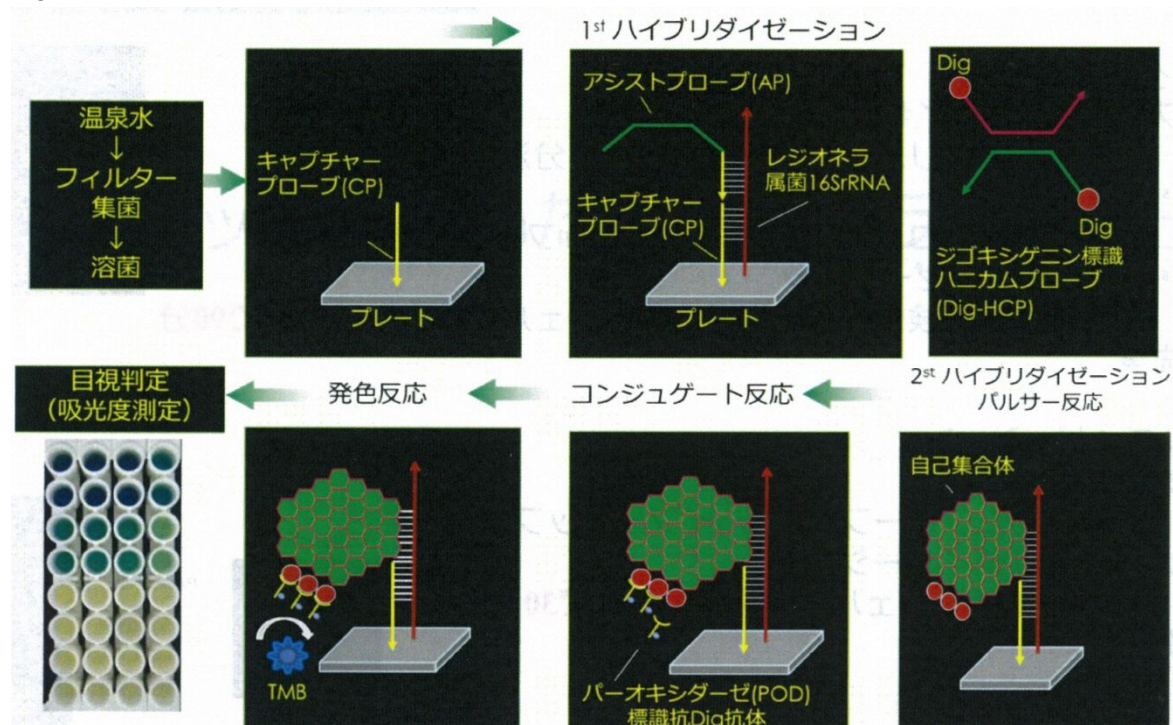


Table 1 培養法の結果

		採水箇所	検体数	検出数 ^a	検出率
掛け流し式 非循環式	浴槽水		16	8	50%
	湯口水		16	7	44%
循環式	浴槽水		9	3	33%
	湯口水		8	2	25%
計			49	20	41%

^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	+	7	1	8
	-	3	13	16
計		10	14	24

+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 3 培養法の検出菌数別検体数 (n=49)

菌数	検体数
5 未満	29
5 - 9	3
10 - 99	3
100 - 999	4
1000 以上	10
合計	49

Table 4 血清群別の陽性検体数 (n=20)

血清群	検体数
SG1	10(10)
SG2	1 (0)
SG3	8 (8)
SG4	6 (6)
SG5	6 (4)
SG6	9 (8)
SG8	1 (1)
SG9	2 (2)
SG12	1 (1)
SG13	3 (3)
SG15	2 (2)
SGUT	14 (14)

複数の血清群が同時に検出された検体あり

()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6年間の lag-1 検出状況

	lag-1 検出		SGI 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
H29年	0	0	7	10	12	20	25	49

*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 選択培地と非選択培地の比較 (n=49)

	非選択培地			計
		+	-	
選択培地	+	9	11	20
	-	0	29	29
計		9	40	49

+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 7 LAMP法と培養法の比較 (n=49)

	LAMP			計
		+	-	
培養法	+	13	7	20
	-	10	19	29
計		23	26	49

培養法+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 8-1 パルサー法 (13mm-50mL 溶菌液) と培養法の比較 (n=49)(方法)

	パルサー			計	
		+	±		-
培養法	+	13	1	6	20
	-	12	0	17	29
計		25	1	23	49

培養法+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 8-2 パルサー法 (25mm-50mL 溶菌液) と培養法の比較 (n=49)(方法)

	パルサー			計	
		+	±		-
培養法	+	12	2	6	20
	-	15	2	12	29
計		27	4	18	49

培養法+ は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 8-3 パルサー法 (25mm-100mL 溶菌液) と培養法の比較 (n=49)(方法)

	パルサー		計	
		+		-
培養法	+	18	2	20
	-	24	5	29
計		42	7	49

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 29 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
研究協力者 平塚貴大 広島県立総合技術研究所保健環境センター

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することを目的とした。

昨年度に確立した MLVA タイピング手法を用いて、117 種類の ST (sequence type) を含む *L. pneumophila* 血清群 1 の菌株コレクション 315 株 (臨床分離株 133 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 48 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 25 株、土壌由来 36 株) の解析を行ったところ、168 種類の MLVA タイプに分類された。MLVA の分解能は、SBT 法と比較して同等の値を示した。

また、過去の集団事例において、臨床分離株 45 株、浴槽水由来 21 株、浴槽ふきとり由来 22 株の MLVA を行い、PFGE および SBT のタイピング結果と比較したところ、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関した。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タイピング方法として期待できると考えられた。

A. 研究目的

感染源の特定には、レジオネラ症患者からの分離株と感染源と推定される環境分離株の遺伝子型を比較し、遺伝子型の一致を確認する必要がある。その際に用いられる方法として主流になっているのが、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) や

世界的に普及している SBT (Sequence based typing) 法となっている。SBT法は、7つの遺伝子 (*flaA*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) のシーケンスを行い、その塩基配列により型別を行う手法である。しかしながら、これら従来法は、多検体処理の煩雑さ、時間、予算を要する

ことが課題となっていた。そこで、他の細菌の遺伝子型別解析にも利用されている MLVA を *L. pneumophila* において導入することで、それらの課題を克服できることが期待される。昨年度は MLVA タイピング手法を確立した。今年度は *L. pneumophila* SG1 の菌株コレクションから解析サンプル数を増やし、MLVA 法の識別能の評価を行う。また、過去の集団事例について、MLVA 法と従来法の比較を行うことを目的とした。

B. 研究方法

菌株：

(1) *L. pneumophila* SG1 の菌株コレクション

117 種類の ST (sequence type) が決定している臨床分離株 133 株 (内 48 株は昨年度解析済み)、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 48 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 (SH) 25 株、土壌由来 (SO) 36 株の計 315 株を用いた (表 1)。

(2) 過去の集団事例

臨床分離株 45 株、3 つの浴槽水由来 (Bath1, Bath3, Bath5) 21 株、浴槽ふきとり由来 (Bath1, Bath3, Bath5) 22 株を用いた (表 2)。

MLVA : 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。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。PCR 反応は、QIAGEN Multiplex を用いた。PCR 条件は、95 15 分後に 95 30 秒、60 1 分、72 70 秒を 35 サイクル行った。50 倍希釈した PCR 産物 1 μ l をサイズマーカー 0.25 μ l (GeneScan 1200 LIZ Size Standard (PCR-A と PCR-B), GeneScan 600 LIZ Size Standard (PCR-C) と Hi-Di Formamide (ABI) 10 μ l に混合し、95 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。得られた MLVA 型による株間の類縁関係を明らかにするために、BioNumerics Ver7.6 を用いて、Minimum spanning tree (MST) を作成した。MLVA の分解能評価には、HGDI (Hunter-Gaston Discrimination Index) を算出した²⁾。また、各 MLVA 領域の多様性評価には、PIC (polymorphic information content) を算出した³⁾⁴⁾。

C. 研究結果

L. pneumophila SG1 の菌株コレクションの MLVA 型

117 種類の ST (sequence type) を含む

計 315 株は、167 種類の MLVA 型に分類された。315 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)。

さらに、315 株における SBT 法と MLVA 法の分解能を比較したところ、それぞれ 0.9351、0.9528 となり、ほぼ同等の値を示した。また、各 MLVA 領域における PCI 値は、Sobral ら¹⁾の報告とほぼ同等の値を示した (表 3)。

過去の集団事例

8 種類の MLVA 型に分かれた。患者由来株は 4 種類の MLVA 型 (MLVA 型 No.1, MLVA 型 No.3, MLVA 型 No.6, MLVA 型 No.7) に分かれた (図 2 (A))。MLVA 型 No.3, No.6, No.7 は No.1 と 1 ローカス違いで存在し、clonal complex を形成した。MLVA 型 No.1 には、Bath1 (B1) の拭き取り S13 の株が存在し、MLVA 型 No.3 には B1 と B1 の拭き取り S16 から分離された株が存在した。MLVA 型 No.6 は、B1 の株が存在した。B1 と B1 の拭き取り S16 と S21 からは、MLVA 型 No.5 の株も存在していた。B3 と B5 の浴槽水と拭き取り由来株は、患者由来の株とは異なる MLVA 型 No.4 と No.2 に存在していた。

また、MLVA 型と SBT 型の関連性については、MLVA 型 No.1, No.6, No.7 の患者株は ST2398 であった。MLVA 型 No.3 の患者株は ST2399 であった。MLVA 型

No.5 は ST601, MLVA 型 No.4 は ST1358, MLVA 型 No.2 は *neuA* 遺伝子が増幅できず、ST 番号が付与されなかった。

PFGE との関連性について、図 2 (B) に示した。MLVA 型 No.1, No.6, No.7 は PFGE で同一パターンを示した。MLVA 型 No.3 の株は No.1, No.6, No.7 とは異なる PFGE パターンを示したが、70%の相同性があった。MLVA 型 No.2, No.4, No.5 は患者由来株が含まれる MLVA 型 No.1, No.6, No.7 とは異なる PFGE パターンを示した。

D. 考察

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。さらに、過去の集団事例から、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関した。

E. 結論

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

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) 磯部順子・金谷潤一(富山県衛生研究所) 岩淵香織(岩手県環境保健研究センター) 奥野ルミ(東京都健康安全研究センター) 笠原ひとみ(長野県環境保全研究所) 勝川千尋(大阪府立公衆衛生研究所) 佐々木麻里(大分県衛生環境研究センター) 田村有美(相模原市衛生試験所) 富田望(福島県衛生研究所) 山本一成(新潟市衛生環境研究所) 菊地孝司・小堀すみえ(さいたま市健康科学研究センター) 金子紀子(山形県衛生研究所) 金澤祐子(和歌山市衛生研究所) 黒澤肇(群馬県衛生環境研究所) 小笠原準(大阪市立環境科学研究研究所) 上田ひろみ(長野県環境保全研究所) 清水寧(北九州市環境科学研究研究所) 田中忍(神戸市環境保健研究所) 鈴木匡弘(愛知県衛生研究所) 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研究所) 細谷美佳子(新潟県保健環境科学研究研究所) 吉田英弘・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) 河野喜美子・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) 田栗利紹(長崎県環境保健研究センター) 林千尋(尼崎市立衛生研究所) 佐々木林子・江川武(文京保健所) 井上浩章(アクアス筑波総合研究所) 藤田直久(京都府立医科大学附属病院) 伏脇猛司((財)結核予防会大阪府支部大阪病院) 古畑勝則(麻布

大学) 鈴木敦子((財)東京都予防医学協会) 高瀬佳彦(荒川区保健所) 川口定男(板橋区保健所)(敬称略)の諸氏に感謝いたします。

F. 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.
- 2) Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microb.* 26, 2465-2466.
- 3) Keim, P., Price, L.B., Klevtska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E., 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relations within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182, 2928-2936.
- 4) Iwamoto, T., Yoshida, S., Suzuki, K., Tomita, M., Fujiyama, R., Tanaka, N., Kawakami, Y., Ito, M., 2007. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly

proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol. Lett. 270, 67-74.

Kentaro Arikawa, Tomotada Iwamoto: Distribution and molecular characteristics of *Legionella* spp. strains isolated from cooling tower and hot spring in Kobe City, Japan. The 9th International Conference on Legionella. 平成29年9月, Italy Roma.

G . 研究発表

1 . 学会発表

- 1) Noriko Nakanishi, Shinobu Tanaka,

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 315株のST (Sequence type)

Sequence type	No. of isolates	Sequence type	No. of isolates
ST1	75	ST89	2
ST23	15	ST122	2
ST48	14	ST127	2
ST739	9	ST132	2
ST120	8	ST142	2
ST22	7	ST211	2
ST42	7	ST256	2
ST138	7	ST278	2
ST505	6	ST352	2
ST507	6	ST445	2
ST59	5	ST502	2
ST129	4	ST550	2
ST353	4	ST593	2
ST566	4	ST599	2
ST609	4	ST604	2
ST876	4	ST644	2
ST384	3	ST679	2
ST448	3	ST763	2
ST642	3	ST905	2
ST687	3	ST977	2
ST954	3	ST1187	2
ST2	2	ST2061	2
ST52	2		
ST86	2	other STs	71

表2 . 過去の集団事例におけるサンプル

P患者(n=45)			
B浴槽水(n=21)	B1 (n=3)	B3 (n=9)	B5 (n=9)
Sふき取り(n=22)	Bath1	Bath3	Bath5
	S13(n=3)	S11(n=3)	S19(n=3)
	S16(n=4)	S23(n=6)	
	S21(n=3)		

表3. MLVA-12のHGDIと各VNTR領域の polymorphic information content (PCI)

VNTR(s)	PCI	
	Sobral et al. (n=320)	This study (n=315)
Lpms01	0.6501	0.6690
Lpms03	0.5054	0.4949
Lpms13	0.7790	0.8153
Lpms19	0.2936	0.2581
Lpms31	0.8563	0.8798
Lpms33	0.7020	0.6214
Lpms34	0.6649	0.6720
Lpms35	0.8815	0.8770
Lpms38	0.2710	0.3865
Lpms39	0.8301	0.7614
Lpms40	0.5054	0.5151
Lpms44	0.5391	0.4704
HGDI of MLVA-12	0.9534	0.9528

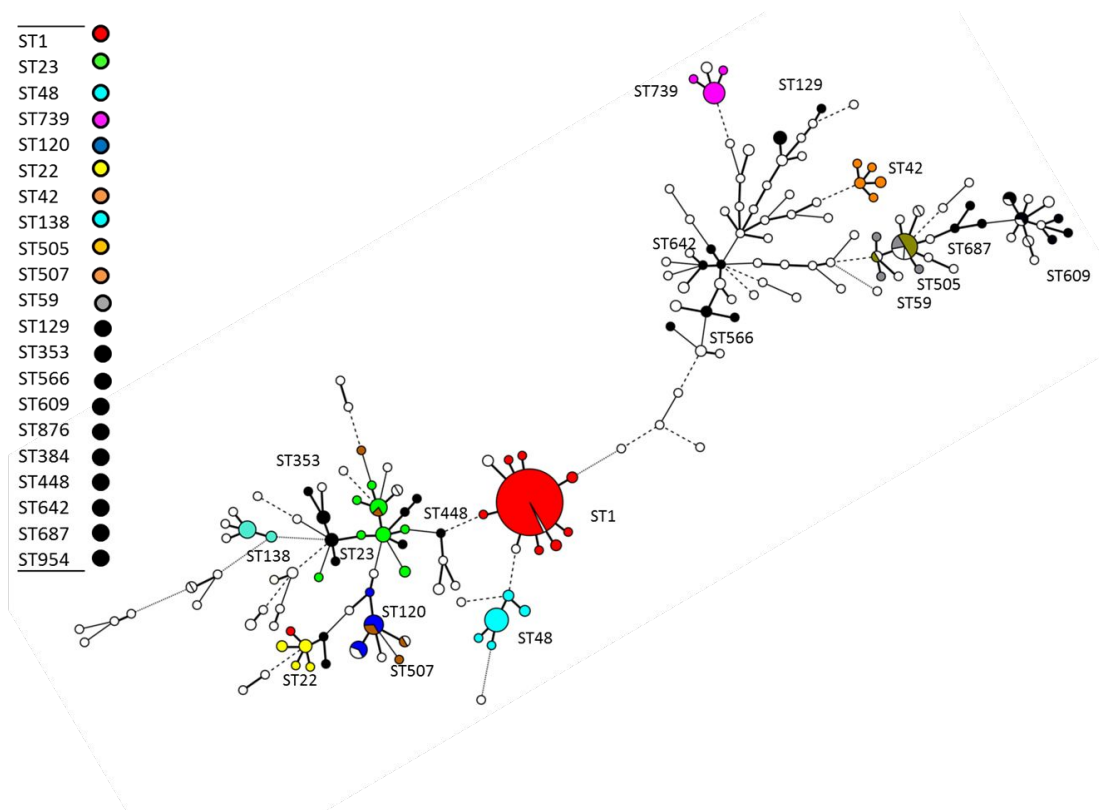


図1: Minimum spanning tree (MST) 法による *L. pneumophila* 315株のMLVA型の類縁関係
 一つの円が一つのMLVA型を示し、円の大きさはそれぞれのMLVA型を有する株数に比例している。枝の長さは、互いのMLVA型の遺伝子座の差異数に比例している。4ローカス以上の違いは、点線で示した。3株以上の存在しているSTを色分けした。

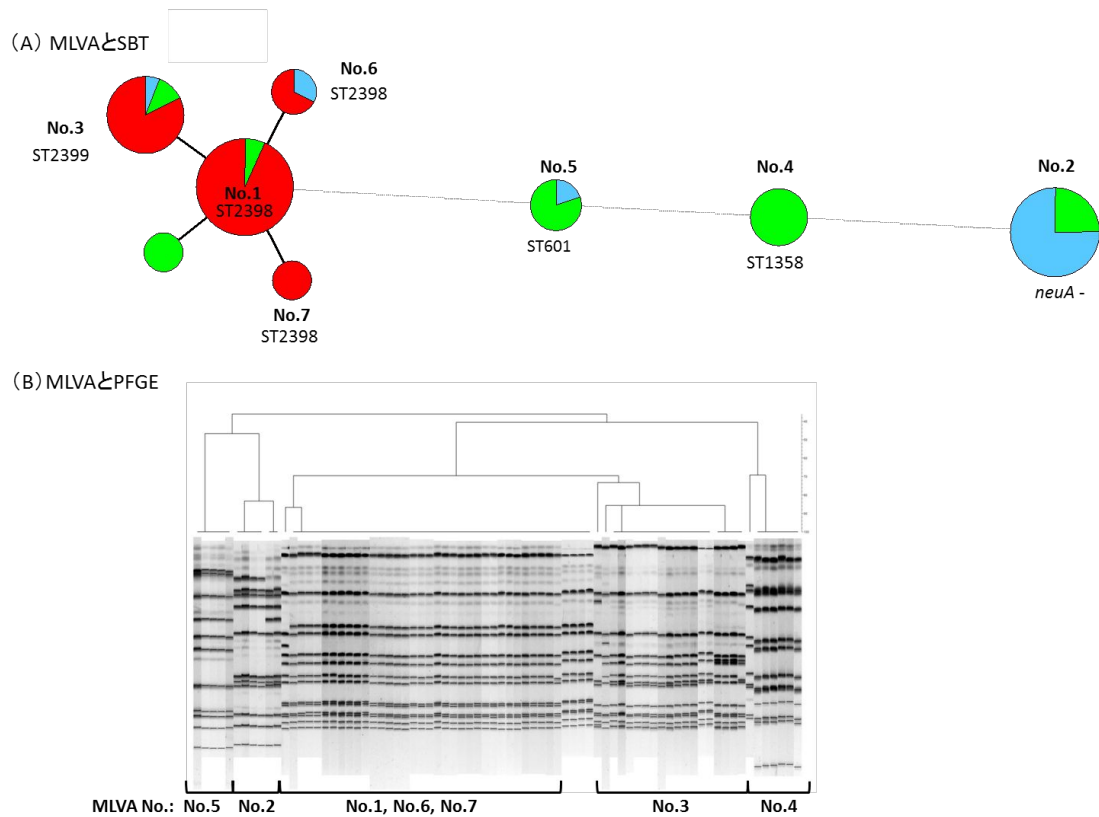


図2: 過去の集団事例におけるMLVA、SBT、PFGEの比較

(A) MLVA型に基づくMSTを描いた。患者由来株が赤色、浴槽水由来が水色、浴槽水の拭き取りを緑色で示した。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。4ローカス以上の違いは、点線で示した。MLVA型はNo.で示した。MLVA型No.に含まれるST番号を示した。No.2の*neuA*遺伝子が増幅されずST番号が付与できなかったため、*neuA*-と示した。

(B) MLVA型No.とPFGEとの関連性を示した。

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）

平成 29 年度（総括・分担）研究報告書

研究代表者： 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部

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

レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発
携帯型フローサイトメーター用蛍光試薬の特異性の検討

研究分担者： 田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター

研究協力者： 倉 文明 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室

研究協力者： 蔡 国喜 長崎県環境保健研究センター

研究協力者： 小嶋 裕子 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

現場検査への実用化を目指し、迅速検出法の検査に携帯型フローサイトメーターを適用してレジオネラ属菌用特異染色試薬による検出限界と特異性を調査した。本研究で使用した装置は、532 nm 半導体レーザーを備えた 6.5 kg の検出装置である。本迅速検出法は約 $10^2 \sim 10^5$ CFU/mL の範囲で培養法と高い相関 ($y = 409.26x^{0.8689}$, $R^2 = 0.95113$) を示し、レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1、血清群 3、血清群 4、血清群 5、血清群 6、血清群 9、血清群 10 および型別不能株ならびにレジオネラ・デュモフィを検出することができた。本検査法の検出限界と定量限界はそれぞれ約 1,300 counts/100 mL および約 4.00×10^4 counts/mL と決定され、生菌数として 32 CFU/100 mL および 235 CFU/mL に相当していた。この迅速検出法は遊離塩素処理条件下で、レジオネラ属菌で汚染された浴槽水と清浄な浴槽水とを区別することができることから、入浴施設等の現場において、特にレジオネラ・ニューモフィラのリスクを監視するために利用可能であると結論づけた。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は、バイオフィームやアメーバにより塩素の殺傷力をも回避できることが知られており、循環ろ過式入浴施設の浴槽水において繰り返し検出されることがある。このような施設において塩素消毒を行う場合、温泉の成分、入浴者の皮垢やバイオフィームは塩素の阻害物質として働くために、遊離塩素により浴槽水を安定的かつ効果的に消毒するためには高度な技術が必要である。この入浴施設における塩素消毒の問題を軽減するために考案されたフローサイトメトリーによる迅速検出法 (Rapid Detection Method, RDM)¹⁾ は、細菌汚染とレジオネラ汚染との強い関連性から、細菌計数によりレジオネラリスクを判定しており、僅かな試料から極短時間でスクリ

ーニングすることを可能とした技術である。この RDM 法では、完全に消毒された水の状態を清浄化ステージと定めて閾値を決定しており、この閾値により得られるレジオネラリスクの存否結果はレジオネラ属菌培養法と約 90%一致していた¹⁾。しかしながら、測定装置は重たく、携帯困難なことや、この検出方法がレジオネラ属菌に特異的でないことが課題としてあげられていた。

今回、この迅速検出法にレジオネラ属菌用特異染色試薬および携帯型フローサイトメーターを適用する機会を得たので報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌液の調製

1) 特異性実験に供した 23 株の概要を表 1 に示

した。即ち、*Legionella pneumophila* 血清群 1 を 3 株 (以上 A グループ)、*L. pneumophila* の血清群 3、血清群 4、血清群 5、血清群 6、血清群 9、および血清群 10 を各 1 株、並びに型別不能であった 2 株を用い (以上 B グループ)、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌 11 株 (C グループ)、レジオネラ属菌以外の細菌として *Escherichia coli* 1 株 (D グループ) を使用した。FCM の検出限界決定のための実験には、*L. pneumophila* 血清群 1 (表 1 No.1) を使用し、定量限界決定のための実験には上記特異性実験で反応性が認められた A グループ 3 株、B グループ 8 株および *Legionella dumoffii* を用いた。

2) *L. pneumophila* の各血清群および他のレジオネラ属菌は、 -80°C 保存株を BCYE α 培地に復元後、 30°C で 3 日間培養したものを供試した。*E. coli* は TSA 培地に復元後、 30°C で 24 時間培養したものを供試した。

3) 復元した各細菌は孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のステリカアップフィルターユニット (ミリポア) でろ過滅菌した PBS を用いて、マックファーランド濁度 $0.2\sim 0.5$ となるように懸濁した。懸濁液 $0.1\ \text{mL}$ をレジオネラ属菌は MWY 増菌培地 (*Legionella* LC Medium Base, タカラバイオ)、大腸菌は TSB 培地の各 $1.0\ \text{mL}$ に移植して 37°C 、18 時間培養したものを初期調製菌液とした。

2. RDM 用抗レジオネラ染色試薬の作製

1) 特異性が異なる 3 種類のレジオネラ属菌用ポリクローナル抗体を、Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) を使って、取扱説明書のとおり処理した。ここで、バイロスタット社の抗レジオネラ・ニューモフィラ抗体 (V6051) を使用した蛍光色素は FL Ip SG1、アークリソース社の抗レジオネラ・ニューモフィラ抗体を使用した試薬は FL ARK_{Ip}、アークリソース社の抗レジオネラ属菌抗体を使用した試薬は FL ARK_{spp} と標記した (表 2)。これらの試薬は抗レジオネラ抗体として約 $2\ \text{mg/mL}$ の濃度となるように調製した。

3. 携帯型フローサイトメーターの RDM への適用

1) 使用したフローサイトメーター、miniPOC (シスメックスパルテック社) はもともと HIV/AIDS 患者の血液細胞モニタリング用に市販されているものである。その光学的特長は表 3 のとおりで励起/蛍光波長が $532\ \text{nm}/570\ \text{nm}$, $610\ \text{nm}$ の半導体レーザーを搭載し、標的細胞へのレーザー照射で得られる側方散乱光と蛍光強度をフォトマルチプライヤー (光電子増幅管) により探知して、内臓の解析装置で細胞数として数値化される。本装置で自動的に表記される細胞数 (cells/ μL) は人白血球用キットに最適化されているために、ここでは細菌用に換算した数値を粒子数として記載する。装置重量は $6.5\ \text{kg}$ で測定時間は約 5 分間である。

4. 特異性の証明

1) 初期調製菌液の 1000 倍希釈液を約 10^5 CFU/mL として RDM と平板培養法に供した。RDM 用菌液は終濃度 0.05% となるようにグルタルアルデヒド溶液を加えて菌を固定して測定まで冷蔵保存した。

2) 平板培養法で、培地はシステイン添加 BCYE 培地 (ピオメリュー) を使用し、塗沫後 35°C で $3\sim 7$ 日間培養し、システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。

3) RDM 計測に際しては各試料 $1\ \text{mL}$ を $5\ \text{mL}$ チューブ (イナオプティカ) に分取し、等量の $0.1\% \text{BSA}$ (MACS BSA Stock Solution を希釈して使用, ミルテニーバイオテク社) および $1.5\ \mu\text{L}$ の抗レジオネラ属菌用染色試薬を加えて常温で 30 分間、振とうしたものを miniPOC にセットして特定エリア内の粒子数を算出した。あらかじめ染色試薬用の測定最適条件と試薬由来ノイズを検出しないスキッタグラムを範囲を設定して、染色試薬用特定エリアとした (図 1)。

5. RDM の検出限界の決定

1) 非濃縮検体と濃縮検体を用いた添加回収実験を行った。最初に、市販の PBS 粉末 ($\text{pH}7.2$,

和光純薬工業)を用いて作製したPBSをステリカップフィルターユニットにてろ過滅菌した後、メスシリンダーを用いて正確に500 mLを滅菌済みポリ容器に分注した。最終濃度が0 CFU/mL(ブランク、菌液の代わりに生理食塩水を添加)、1 CFU/mL、10 CFU/mL、および100 CFU/mLとなるように*L. pneumophila* 血清群 1の初期調製菌液を分注した模擬サンプルを各6本作製した。非濃縮サンプル0.1 mLを2枚のBCYE培地に塗沫してレジオネラの菌数を測定した。菌数を正確に掌握するために低濃度サンプル(1 CFU/mLと10 CFU/mL)については、追加で0.5 mLを2枚のBCYE培地に塗沫した。濃度ごとに6回実験を行った結果を解析した。

2) 濃縮検体については、孔径0.2 μmポリカーボネートメンブレンフィルターを用いて100倍に濃縮したものの0.1 mLをBCYE培地2枚に塗沫して、35°Cで3~7日間培養した。高濃度サンプル(100 CFU/mLの100倍濃縮液)については適切に希釈してレジオネラ菌数を計測した。濃度ごとに6回実験を行った結果を解析した。

3) RDM計測に際しては各サンプルをグルタルアルデヒドで固定した上で、上記4.3)と同様に処理した。RDM値と培養法の値を比較して検出限界値を決定した。

6. RDMの定量限界の決定

1) 特異性を示した12株の初期調製菌液を使用した。それぞれ、約 10^5 CFU/mLとなるよう希釈したものを原液として、5段階の10倍希釈列を作製して、平板法とRDM法で比較した上で定量限界値を決定した。

C. 結果及び考察

1. 抗レジオネラ染色試薬の特異性

1) 約 10^5 CFU/mLに調製した23株の細菌からなる試験液を培養法とRDMで計測して染色試薬ごとの成績を比較したところ、Aグループの3株について、FL Ip SG1は培養法の菌数と同等の値を示したが、FL ARK_Ipの反応性は低かった(図

2)。一方で、Bグループの8株において、FL Ip SG1の反応性は低かったが、FL ARK_Ipの反応性は培養法とほぼ同等の値を示した。FL Ip SG1は、Aグループの*L. pneumophila* 血清型 1に高い反応性を示し、FL ARK_IpはBグループの*L. pneumophila* 血清群 3、血清群 4、血清群 5、血清群 6、血清群 9、血清群 10、及び2株の型別不能株に特異的であると考えられた(図2)。メーカーによると、FL Ip SG1に用いた抗体は血清群 1以外の*L. pneumophila*にも反応性があるとされているがRDMではほとんど反応が認められなかった。一方で、FL ARK_Ipは*L. pneumophila* 血清群 1への反応性は低かったものの、供試した血清群 1以外の*L. pneumophila*には全ての株で培養法を上回る値を示しており高い反応性を持つと考えられた。レジオネラ属菌に反応性を持つとされるFL ARK_sppはFL ARK_Ipと類似しており、Aグループとは反応せず、Bグループに対する値はやや低めであったが一定の回収が認められた。FL Ip SG1とFL ARK_Ipのグループ C及びDに対する反応は認められなかった。FL ARK_sppのCグループ及びDに対する反応性も低かったが、*L. dumoffii*に対しては一定の反応が認められた。今回の大腸菌に対する反応性のみで供試した抗レジオネラ染色試薬の特異性を証明できたわけではないが、Cグループとの反応挙動を見る限りではFL Ip SG1とFL ARK_Ipの一般細菌に対する選択性の強さを期待できる結果であった。

2. 本RDMの検出限界値と定量限界値

1) 標的とする*L. pneumophila* 血清群 1の濃度(設定値)が0 CFU/mL(ブランク)、1 CFU/mL、10 CFU/mL、および100 CFU/mLとなるように調製した模擬サンプルの培養法の成績(実測値)はそれぞれ 0 ± 0 CFU/mL、 0 ± 0 CFU/mL、 12 ± 4 CFU/mL、及び 25 ± 19 CFU/mLであった。RDMにより計測したところ、 421 ± 63 counts/mL、 556 ± 153 counts/mL、 667 ± 215 counts/mL、及び $1,556 \pm 509$ counts/mLを示した。これらを100

倍に濃縮した結果は、培養法が 0 ± 0 CFU/100mL、 32 ± 29 CFU/100mL、 562 ± 200 CFU/100mL、及び $3,470 \pm 1,248$ CFU/100mL であり、RDM は、 516 ± 70 counts/100mL、 $1,357 \pm 379$ counts/100mL、 $5,230 \pm 220$ counts/100mL、及び $36,698 \pm 2,089$ counts/100mL であった (図 3)。1 CFU/mL を 100 倍濃縮したサンプルの RDM の結果がブランクと比較した最小値であったことから、今回用いた蛍光試薬を RDM で測定した時の検出限界を約 1,300 counts/100 mL と決定した。この値の生菌数は 32 CFU/100 mL に相当していた。我が国の塩素消毒条件でのレジオネラ属菌検査の検出限界は 10 CFU/100 mL であるので、浴槽水の検査に適用するためには追加の濃縮が必要であることが示唆された。ここで、RDM 法は遊離塩素処理条件下で非濃縮の浴槽水中の細菌数を計測することによって、レジオネラ属菌に汚染された浴槽水から清浄な水を区別することができることを考慮すると^{1, 2)}、非濃縮水のスクリーニングとの組み合わせにより有効性を高めることができると考えられた。

2) 特異性実験で FL Ip SG1 又は FLARK_Ip に反応性のあった 11 株の *L. pneumophila*、及び FLARK_spp に反応した *L. dumoffii* のそれぞれ約 10^5 CFU/mL の模擬サンプルを 5 段階 10 倍希釈した試験液を作製して、平板法と RDM で測定した。全ての成績をまとめると、RDM は培養法との間に回帰式 $y = 409.26x^{0.8689}$ ($R^2 = 0.95113$) からなる相関関係を示した (図 4)。供試 11 菌株の定量性を示す最小値を平均した値は 37,562 counts/mL を示したことから、RDM の定量下限を約 4.00×10^4 counts/mL と決定した。この値は生菌数として 235 CFU/mL に相当していた。

E. 結論

抗レジオネラ染色試薬と携帯型フローサイトメーターを RDM に適用することにより、*L. pneumophila* と *L. dumoffii* を特異的に検出する

ことが可能となった。その検出限界は現行の基準値を満たさないので、更なる濃縮方法の検討と非濃縮水のスクリーニングとの組み合わせが必要である。しかし、これらの改善により、入浴施設等の現場において、特にレジオネラ・ニューモフィラのリスクを監視するために利用可能となりうる。

F. 参考文献

- 1) Taguri, T, Oda, Y, Sugiyama, K, Nishikawa, T, Endo, T, Izumiyama, S, Yamazaki, M, and Kura, F. A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of Legionella in bath water. *Journal of Microbiological Methods*, **86**, 25–32, 2011.
- 2) 田栗 利紹ら, フローサイトメトリー法における不連続点を越えた塩素消毒の清浄化判定, 厚生労働科学研究補助金 (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 年度分担研究報告書, 研究代表者: 倉文明, 53-58, 2011.

G. 学会発表

Taguri, T, Cai, G, Ebisu-Ojima, H, Amemura-Maekawa, J, and Kura F. Breakpoint Chlorination as Control of Legionella in Bath Water using flow cytometry, The 9th International Conference on Legionella. Rome, 26th – 30th September, 2017.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 供試菌株の概要

	菌種	菌株 ^a	血清群	由来等
1	<i>Legionella pneumophila</i>	NIIB0058	SG 1	臨床分離株
2	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki290402	SG 1	環境分離株
3	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki474	SG 1	環境分離株
4	<i>Legionella pneumophila</i>	NIIB0138	SG 3	臨床分離株
5	<i>Legionella pneumophila</i>	NIIB0233	SG 4	環境分離株
6	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki487	SG 5	環境分離株
7	<i>Legionella pneumophila</i>	unknown	SG 6	-
8	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki435	SG 9	環境分離株
9	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki452	SG 10	環境分離株
10	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki448	SG UT	環境分離株
11	<i>Legionella pneumophila</i>	Nagasaki478	SG UT	環境分離株
12	<i>Legionella santicrocuis</i>	JCM7557		標準株
13	<i>Legionella israelensis</i>	JCM7560		標準株
14	<i>Legionella parisiensis</i>	JCM7561		標準株
15	<i>Legionella spiritensis</i>	JCM7562		標準株
16	<i>Legionella hackeliae</i>	JCM7563		標準株
17	<i>Legionella erythra</i>	JCM7564		標準株
18	<i>Legionella rubrilucens</i>	JCM7565		標準株
19	<i>Legionella anisa</i>	JCM7573		標準株
20	<i>Legionella jamestowniensis</i>	JCM7590		標準株
21	<i>Legionella dumoffii</i>	NIIB0091		臨床分離株
22	<i>Legionella micdadei</i>	NIIB0095		臨床分離株
23	<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3972		標準株

^a NIIB, National Institute of Infectious Diseases, Department of Bacteriology I.; NBRC, NITE Biological Resource Center; JCM, Japan Collection of Microorganism

表 2. フローサイトメトリーによる坑レジオネラ属菌用染色試薬の特性

	略名	抗体の名称	蛍光色素	特異性
1	FL Ip SG1	Rabbit anti- <i>Legionella pneumophila</i> antibody ^a	Alexa fluor 532 ^c	<i>Legionella pneumophila</i>
2	FL ARK_Ip	Rabbit anti- <i>Legionella pneumophila</i> antibody ^b	Alexa fluor 532 ^c	<i>L. pneumophila</i>
3	FL ARK_spp	Rabbit anti- <i>Legionella</i> antibody ^b	Alexa fluor 532 ^c	<i>Legionella</i> species

供給元 a: バイロスタット社, b: アークリソース社, c: サーマサイエンティフィック日本支社

表 3. フローサイトメーターの光学的特長

名称	光源	波長 励起/蛍光	パラメータ	検出方式	測定時間	装置重量
miniPOC ^a	半導体レーザー	532 nm/570 nm, 610nm	側方散乱光 蛍光強度 ^b	PMT ^c PMT ^c	5 min.	6kg

^a供給元 シスメックス社. ^b蛍光強度検出器はハイパスフィルターを使用, ^cPMT: 光電子増倍管(フォトマル)

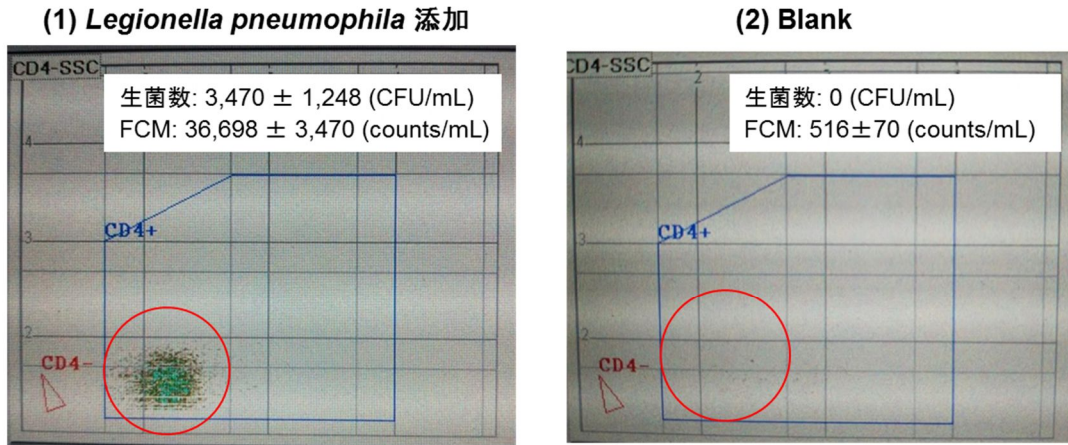


図 1. レジオネラ菌含有水 (1) と清浄水 (2) の比較

蛍光色素: FL Ip SG1, 菌株: *Legionella pneumophila* NIID0058

画面はフローサイトメーターの解析画面、青枠は計測エリア、(1)赤丸内はレジオネラ

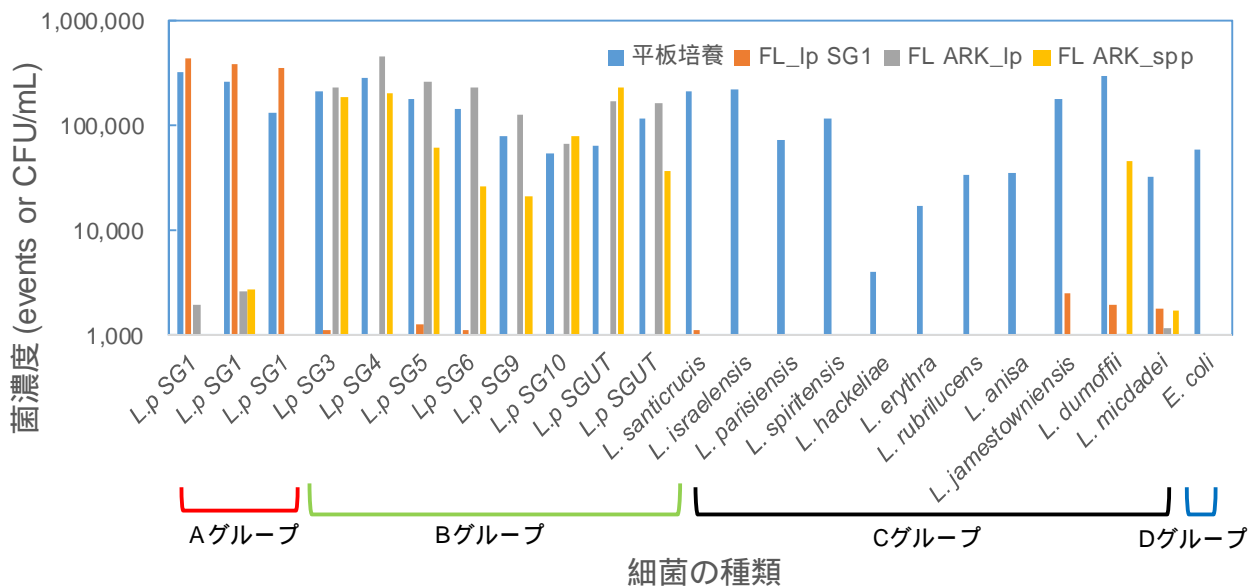


図 2. 培養法とフローサイトメトリー (蛍光試薬ごと) の供試細菌株
に対する定量性の比較

Aグループ: *Legionella pneumophila* 血清型1, Bグループ: *L. pneumophila* 血清型1以外, Cグループ: *Legionella* spp., Dグループ: レジオネラ以外の菌種.

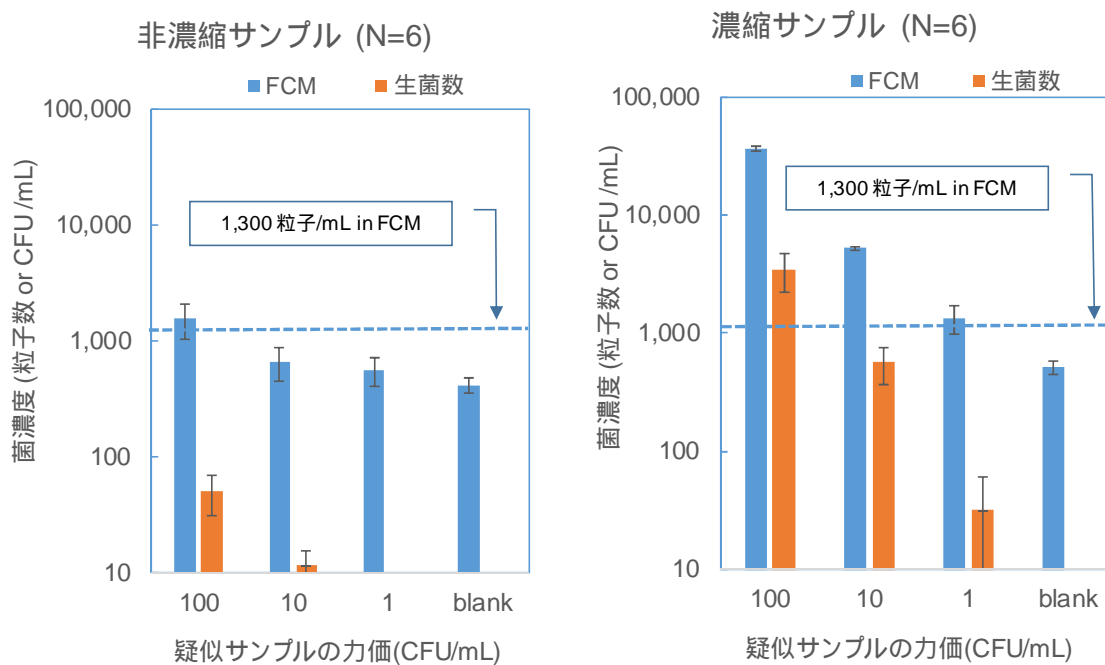


図3 . 濃縮処理試料によるFCMの検出限界（生菌数相当値）の決定

FCM:フローサイトメトリーによる細菌数, CFU:colony forming unit, 青色破線はFCMの検出限界値を示す.

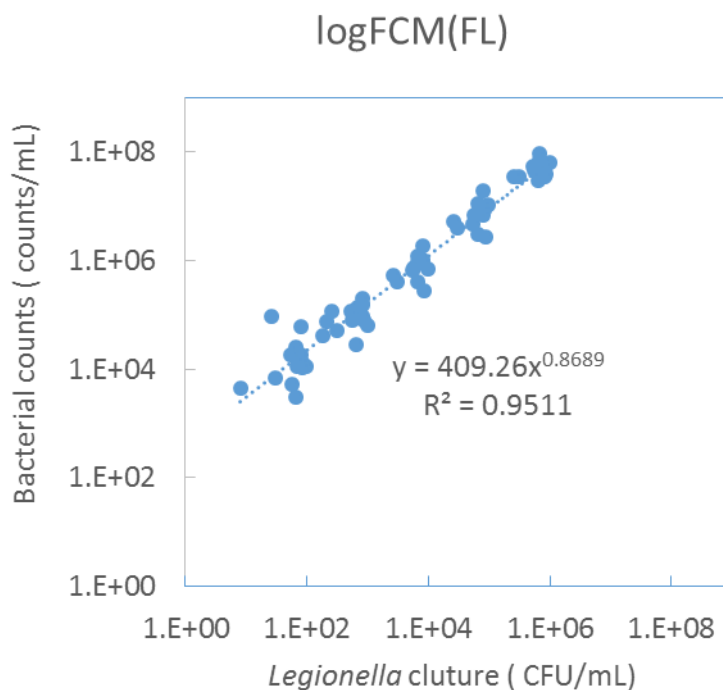


図4. 培養法と迅速検出法の相関

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 29 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
研究分担者 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

レジオネラ属菌のアメーバ内生残性の実験的制御

研究要旨:

1. 難培養性のレジオネラ属菌を用いて、菌のアメーバ内生残および分裂増殖におけるファゴソーム形成およびライソゾーム融合の阻害剤効果を調べた。
2. ファゴソーム内活性酸素産生を阻害するアポシニン、およびライソゾームの内部pHを中性化しその加水分解酵素作用を阻害するクロロキンならびに塩化アンモニウムは、いずれもアメーバ感染率を増加させる効果が認められた。
3. アポシニンと塩化アンモニウムによる同時暴露実験では、アメーバ感染率増加に明確な相乗効果は認められなかった。一方ヘパリンにこれらの物質との相乗効果の可能性が示された。
4. 本研究により、ファゴソーム形成およびライソゾーム融合の過程を実験的にコントロールすることで、難培養性レジオネラ属菌のアメーバ内増殖促進までは至らなかったが、その生残性を高めることが可能であることが示された。

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いて、初期段階である接着と取り込み二糖鎖分子が関与していること、さらにヘパリンに代表される硫酸基をもつ多糖(硫酸化多糖)にレジオネラ属菌の感染促進効果があることが示された。実験的(培養菌株)に発育性が低下し、またアメーバへの感染性も低下した菌であっても、硫酸化多糖類の存在下でアメーバへの感染性、さらには細胞内増殖性も向上する。

一方、BCYE α での培養日数(30℃培養)が1週間を超えると、レジオネラ属菌はアメーバ感染性が大きく低下し、感染しても細胞内増殖性がみられず、取り込まれた菌体は個々に観察されるようになる。このような菌の細胞学的特性の詳細は不明であるが、おそらく野外の環境中であって、栄養的に飢餓状態におかれたVNC(viable but not culturable)の状態に近いのではないかと考えられる。このような菌はさらに培養日数が進むと、硫酸化多糖の感染促進効果も表れにくくなる。このような難培養化した菌が環境中にあることは一

般的に想定されるものと思われる。その理由は、温泉浴槽水において培養陰性、遺伝子検査陽性という場合が少なくないという現状があるからである。実際の環境中には培養により容易に検出され病原性も明らかな菌のみならず、難培養性の菌も混在していることを考慮すれば、レジオネラ感染を理解する上では、難培養性の菌の解析も重要な課題になるものと考えられる。

本年度は、アメーバに取り込まれた後に細胞内で生残、そして増殖する過程に注目し、難培養化した菌に関して、実験的にファゴソーム形成およびライソゾーム融合を阻害することによる細胞内での動態変化を調べた。

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(ACと省略)を用いた。培養は無菌培養用 PYGC 培地を用い、30°C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. 試薬類

一般に細胞の貪食過程で起こるファゴソームでの活性酸素産生、ならびにその後続くライゾーム融合において阻害的に作用する以下の物質を用いた。アポシニン (Apocynin : 4'-Hydroxy-3'-methoxyacetophenone, SIGMA - ALDRICH) はファゴソーム形成において NADPH オキシダーゼの機能を阻害し活性酸素産生を抑制することが知られる。クロロキン (Chloroquine diphosphate, SIGMA-ALDRICH) および塩化アンモニウム(NH₄Cl, 和光純薬) はライゾームに取り込まれることでその内部pHを上昇させ、ライゾーム内の各種加水分解酵素反応を阻止することが知られる。使用にあたっては、アポシニンは少量のエタノールで溶解後、クロロキンはそのまま 10xAS で 10mM に調整し、ストック溶液とした。塩化アンモニウムは 10xAS で 100mM に調整し、ストック溶液とした。またこれまでに菌のアメーバ内取り込みに促進効果の見られたヘパリン (和光純薬) は、10xAS で 10,000U/ml に調整し、ストック溶液とした。

4. AC に対する Lp 感染試験

PYGC で培養した AC 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 1x10⁵/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 で単独あるいは混合して試験濃度に調整し、その溶液 300 μl をマイクロプレート内の 10xAS と置換し、1 時間 30°C 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 で菌濃度を調整し、原則として 0.1OD に調整した菌溶液を実験に用いた。感染に際してはその 30 μl をマイクロプレートのアメーバ培養ウェル(300 μl のメデイウム)に加え、静かに攪拌し 30°C 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、さらに培養を継続した。所定の培養時間においてプレート底面全体を氷水につけアメーバを剥離し、アメーバ浮遊

液を回収、遠心(500rpm x 3 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、あるいは単独で存在する菌が明確であるアメーバを感染細胞として、その数を測定し感染率を求めた。なお細胞はランダムに約 500 個を調べた。

C. 研究結果

アポシニン、クロロキンならびに塩化アンモニウムの、単独暴露による効果

図1および2に BCYE α 培養(以下、培養と略)7 日後(D7)の菌を用いたときの、アポシニン、クロロキンならびに塩化アンモニウムの効果を示した。結果はこれらの物質添加条件での培養1日目のアメーバ感染率で表している。10xAS のみの対照実験ではアメーバ感染率は 1.3%であった。アポシニンおよびクロロキンは 100 μM で効果が認められるという報告があり^{1,2)}、ややそれより高濃度まで調べたところ、400 μM まで濃度依存的にアメーバ感染率が増加した。その効果はアポシニンの方がクロロキンよりも高かった。ギムザ染色での所見は、10xAS ではアメーバあたり菌数は 1 だけであったが、アポシニン、クロロキン添加の場合、アメーバあたりの菌は複数の場合も見られた。アポシニン添加で細胞内増殖が確実にあったと考えられる分裂増を示す菌体が 1 アメーバだけであるが認められた(図3)。なお培養中に丸く浮遊する細胞が若干みられたが、細胞変性の様子はなく単に付着が不可能なだけで細胞毒性によるものではないと考えられた。一方塩化アンモニウムはやはり濃度依存的に感染率増加の効果がみられるものの、効果の発現にはアポシニン、クロロキンよりも高濃度を要した。また 50mM では効果の低下がみられたが、この濃度では空包化など細胞変性が観察され、アメーバに対する細胞毒性が一部生じたものと考えられた。

アポシニンと塩化アンモニウムの同時暴露の効果

図4には培養8日後(D8)の菌を用いて 200 μM アポシニンと 25mM 塩化アンモニウムを単独あるいは混合して、培養を3日間行ったときの結果を示した。10xAS のみの対照実験ではアメーバ感染率は 1-2%であった。これに対し単独で用いた場合、アポシニン、塩化アンモニウムともに培養1日目ではアメーバ感染率の増加がみられたが、3日目になるとアポシニンの場合は10%の感染率が大きく低下、一方塩化アンモニウムは感染率が 20%程度に維持された。アポシニンと塩化アンモニウムを混合し

最終濃度がそれぞれ 200 μ M と 25mM に調整された条件では、培養 1 日目は塩化アンモニウム単独の場合とほぼ同様の感染率が、培養 3 日目はさらに上昇し約 50%となった。アメーバあたりの菌数は数十の場合もあり、菌がランダムに取り込まれている像を呈した。菌は多数アメーバ内にあるものの、明確に細胞分裂を示す菌は観察されなかった。

ヘパリンの相乗効果

図 5 には培養 10 日後 (D10) の菌を用いて、400 μ M アポシニンと 25mM 塩化アンモニウムを単独あるいは混合して用いる条件に加え、1,000U/ml のヘパリンを加えたときの、培養 3 日後のアメーバ感染率を示した。この実験では培養 1 日目におけるアメーバ感染率がすべての試験で 0% であり、培養 3 日目でもアポシニンと塩化アンモニウム単独あるいは混合した条件では感染率は数%であった。一方、これらの条件にヘパリンがさらに加えられた条件では、アメーバ感染率の増加が認められた。ヘパリン単独におけるアメーバ感染率との比較からは、アポシニンとの相乗効果の可能性が示された。一方塩化アンモニウムとの相乗効果は不明であった。菌体はアメーバあたり複数個が個別に vacuole 内に存在する場合も見られたが、細胞内増殖を示す像は観察されなかった。

塩化アンモニウムの感染促進効果と暴露条件

図 6 には培養 11 日後 (D11) の菌を用いて 30mM 塩化アンモニウムの条件で培養を 4 日間行った結果を示した。この実験では、感染菌濃度が 0.01OD ではアメーバによる取り込みがほとんどないものと予想し、他の実験よりも 10 倍濃い 0.1OD で感染を行った。また多量の菌を添加したことから、培養 3 時間後に菌を洗浄除去し、その後の培養は抗生物質を含む 10xAS に置換して行った。10xAS のみの対照実験ではアメーバ感染率は 2.3% で、4 日間の感染率はそれ以下を示した。一方感染促進効果の期待できる 30mM 塩化アンモニウム L を添加した場合、培養 1 日目は約 50% の感染率を示したが、2 日目以後、感染率は大きく低下し、対照よりはわずかに多い 3-4% を示した。2 日目以後わずかにアメーバに感染する菌には、細部内増殖をうかがわせる菌の集塊がみられる場合があった (図 7)。

D. 考察

野外の環境中に存在するレジオネラ属菌は、本菌の栄養要求特異性、即ちブドウ糖非発酵性でアミノ酸を炭素源とする栄養要求性を考慮すると、

そのほとんどは栄養枯渇の飢餓状態にあると推測される。遺伝子レベルで存在を知ることができるが、培養による検出は難しい菌はこのような特徴のある菌ではないかと考えられる。レジオネラ症の現状を見る限り、このような検出・把握が難しい難培養性の菌もレジオネラ感染症に関与していることは想定内と考える、その実態を解明することでより正確なレジオネラ症の理解とその対策につなげることが本研究の課題である。

本年度は、難培養性のレジオネラ属菌をアメーバを用いて検出、また分離確保する方法論の開発の中で、菌の取り込み後の細胞内生残および増殖過程に関与すると考えられる因子について検討を行った。レジオネラ属菌の細胞内生残および増殖には、大きくファゴサイトーシスと、これにリゾソームが癒合したファゴリゾーム形成の 2 段階の菌分解過程が関与し、菌はこれらの危機に耐え生残しなければならない。まず感染の初期段階であるファゴサイトーシスにおいて、正常なレジオネラ属菌は活性酸素の攻撃を阻止する因子 (エフェクターと呼ばれる) 等を多数ファゴソーム内に放出する。活性酸素はファゴソーム膜上の NADPH オキシダーゼが産生するので実験的にこれを阻害することが可能である。その阻害剤の一つとして知られるアポシニンは、今回の実験により、本来アメーバにより取り込まれた後分解消失する菌の生残性を高める効果を示し、ファゴソーム内の活性酸素阻害が菌の生残に有効に働くことを証明した。アポシニン存在下ではリゾソーム融合は進行すると考えられるが、今回リゾソーム融合が正常に起こっているのかは確認していないので推論ではあるが、活性酸素阻害だけでも生残の可能性が高まるという結果となった。

次にファゴソームとリゾソームの融合過程について、両者の融合により形成されるファゴリゾーム内ではリゾソーム由来の加水分解酵素が菌の分解を行うが、正常なレジオネラ属菌では、ファゴソーム内に放出されたエフェクターの作用でファゴソームとリゾソームの融合が阻害されるという考えが出されている。これを実験的に再現するのは困難であるので、今回はリゾソームに直接的に作用する物質を試験した。クロロキシンと塩化アンモニウムは、酸性 (約 pH 4.7) に保たれるリゾソームに取り込まれると、その pH を上昇させ酸性で作用する加水分解酵素機能を抑制する効果を示す。今回調べたクロロキシンと塩化アンモニウムには菌の生残性向上効果が認められ、リゾソーム阻害が生残に有効に働くことを証明した。

今回明瞭な効果を示した塩化アンモニウムには VNC 化したコレラ菌の培養活性化の効果があることが知られている³⁾。今回の実験で、レジオネラ属菌に対してもその直接的な効果があったのかどうかは分からないが、塩化アンモニウムによるリソゾーム阻害効果は、培養日数が 11 日となる古い菌株でもみられたことから、塩化アンモニウム中での菌前培養がさらに生残性を高める可能性、そして *in vitro* でのレジオネラ属菌培養への塩化アンモニウム利用の可能性について、今後さらにその効果を明らかにしていきたい。

単独で有効な作用をもたらすこれらの物質を同時に作用させれば、理論的にはその相乗効果が期待されるが、アポシニンと塩化アンモニウムに関しては今回の実験ではその効果は明確ではなかった。一方、その作用機序が不明な点があるが、これまで難培養化した菌の感染性を向上させる効果をもつヘパリンに、その相乗効果がありそうだという結果を得た。ただ明確に相乗効果があると結論するには至っていない。最適な濃度の阻害剤・ヘパリンの組み合わせがあるはずで、その相乗効果を利用すれば難培養化した菌の環境からのサルベージは可能であると考えている。

培養日数が少ない 3-4 日の菌は感染率が高いと同時に高い分裂増殖能を示すので、本研究の結果は、この性質が培養が進むとともに喪失していき、生残すら不可能という状況に陥ることを示している。しかしこの生残条件は実験的にコントロールできる可能性がある。問題は難培養の菌を株として回収するために増殖させることであるが、今回分裂像を示す菌の割合は極めて少なかった。この点に関しては用いる菌の *viability* がある程度維持されていること、また野外の過酷な環境を考えると、生理学的回復にはアメーバ取り込み後の培養日数も相当必要なのかも知れない。また栄養や代謝面での回復促進因子を外部から与えることも考える必要がある。菌の細胞内分裂に焦点をあてた研究をさらに進めることが今後の課題である。

E. 結論

アメーバへの取り込み後のレジオネラ属菌の生残は、ファゴサイトーシスと、これにリソゾームが癒合したファゴリソゾーム形成という一連のプロセスを阻害することで保障される。本研究で、このプロセスが実験的に阻害可能であることが明らかとなった。野外から難培養菌を回収し、そして生残させる方法論について、具体的な技術開発の可能性が開かれた。

参考文献

1. Ohkuma S et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA, 75(7), 3327-3331,1978
2. Br.J Pharmacol.,161(4), 885-898,2010
3. Wai S.N.et al., FEMS Microbiol. Lett, 136:187-191, 1996

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

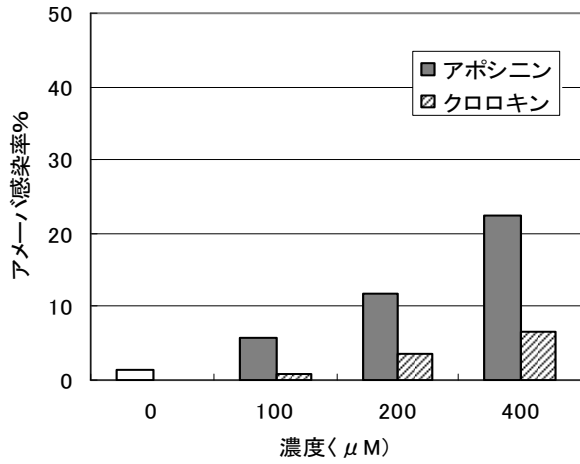


図1、アポシニンならびにクロロキンのレジオネラ属菌アメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養7日目を使用)

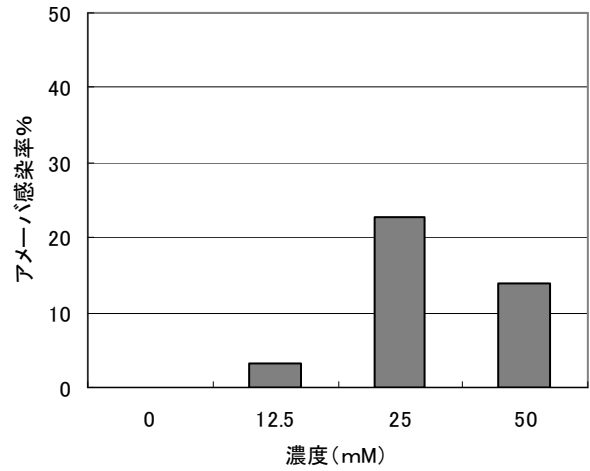


図2、塩化アンモニウムのレジオネラ属菌アメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養7日目を使用)

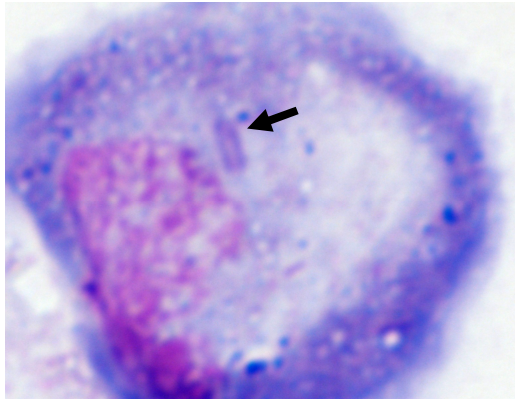


図3、100 μM アポシニン添加条件のアメーバ感染で観察されたレジオネラ属菌の細胞内増殖像

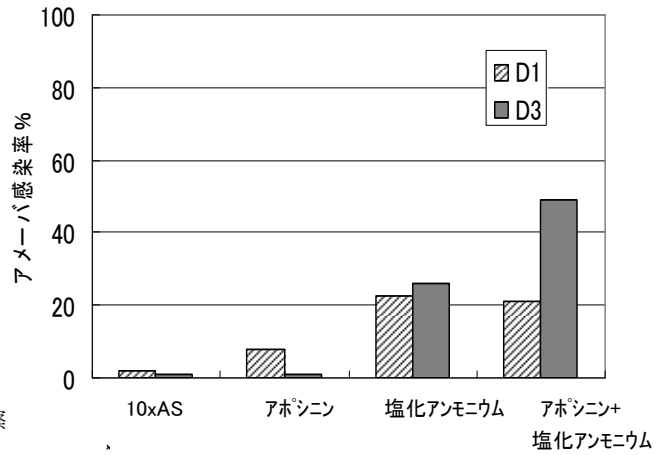


図4、アポシニンと塩化アンモニウムの同時暴露がアメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養8日目を使用)

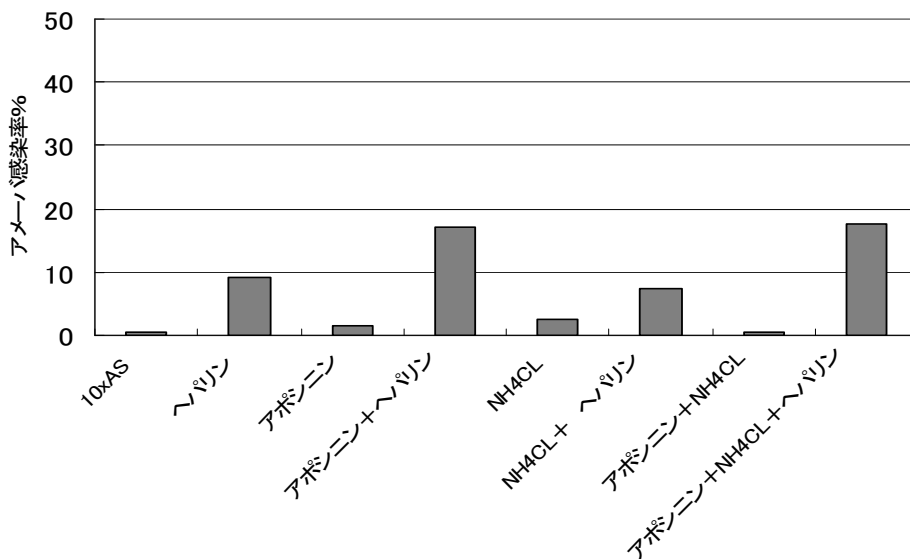


図5、アポシニン、塩化アンモニウムならびにヘパリンの同時暴露がアメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養10日目を使用)

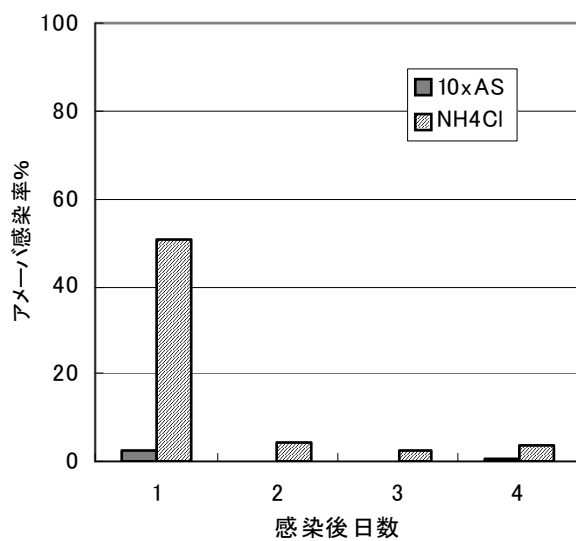


図 6、30mM 塩化アンモニウム添加条件で感染後、塩化アンモニウムを除去したときのアメーバ感染率の変化 (レジオネラ属菌は培養 11 日目を使用)

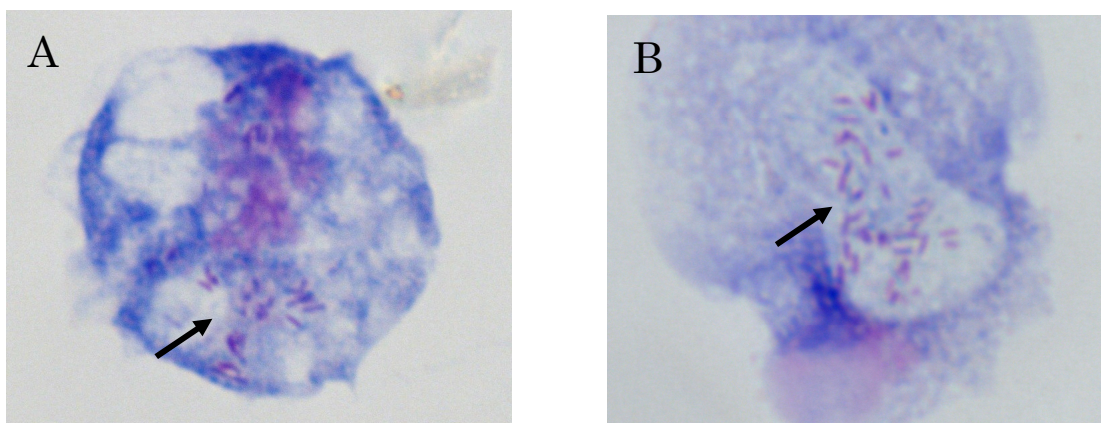


図7、30mM 塩化アンモニウム添加条件で感染後、1 日目 (A) ならびに 4 日目 (B) に観察された アメーバ内レジオネラ属菌 (感染させたレジオネラ属菌は培養 11 日目を使用)

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 29 (2017) 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
	渡邊 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、2015 年度以降、実施母体を日水製薬株式会社とし、2017 年度は公的、民間を問わず全国 173 の検査機関(延べ 176 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、ビオメリー社の 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 においても独自に集計・解析を実施し、2015、16 年度の結果とも比較した。3 年連続参加した機関は 58 機関あり、そのうち今年度目標良好範囲外の結果を報告した 16 機関中 4 機関は 3 年連続で同様の結果を報告し、7 機関は 3 回の外部精度管理中 2 回目標良好範囲外を報告していた。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。以上のことから、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り、今後さらに調査システムの検討を重ね、継続的かつ安定した外部精度管理調査ができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要と思われる。標準的検査法については、現在WGが推奨している方法と改訂されたISO法との調整を行った結果、現時点ではこれまでのWG推奨法が最も適当に対応できる方法と思われた。今後は、目的別に応じた検査法の提示のしかたを協議し、「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よう検討を進めていく。

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>

2015年度以降、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2017年6月中旬に日水製薬より「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29日(金)に締め切られた。その後、10月16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17日(金)17時に指定された。解析結果は、2018年1月31日(水)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173の検査機関(延べ176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。

<配付試料>

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、例年通りビオメリュー社のBioBall(特注品)を使用した。

<検査法>

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(別紙サーベイ指定法参照)。

<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においても独自に集計・解析を実施し、2015、16年度の結果とも比較した。なお報告値について、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¹⁻⁴⁾。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 8119.8cfu/Ball、上限値 24432.2 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 1623.96、上限値 4886.44 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 ~ 5000cfu/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、目標良好範囲を 300~15000cfu/100mlとして設定することとした。

なお、本年度は参考的に回収率についても解析した。目標とした回収率は、昨年度の外部精度管理で報告を求めたすべての試料(非濃縮①、②、濃縮)において目標良好範囲を報告し、かつ非濃縮の菌数が濃縮の菌数以上を報告した機関のうち、80%以上の機関がクリアしていた 20%とした。

日水製薬で行った全国の結果集計・解析は、2018年1月31日(水)、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。

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, 5)}と平成 29 年 5 月に改訂された 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検討した。また、外部精度管理に参加した施設を対象に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)において、WG 推奨法の普及に努めた。研修システムについては、WG 内でこれまでの課題について改めて検討した。

C. 研究結果及び考察

1) 精度管理

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、2015~17 年度の結果概要(良好施設比較)を表 2 に示した。今年度 300~15000cfu/100ml の目標良好範囲を報告した機関は、非濃縮試料①では回答のあった 70 機関中 69 機関(約 99%)、非濃縮試料②では 70 機関中 65 機関(約 93%)、ろ過濃縮試料では 65 機関中 49 機関(約 75%)、遠心濃縮試料では 5 機関中 4 機関(約 80%)であった。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、昨年度同様ともに 90%以上の機関が目標値(良好範囲)を報告していた。濃縮試料において、ろ過濃縮では、昨年度良好範囲報告約 77%に対し本年度約 75%とほぼ変わらない結果であった。一方、遠心濃縮では、実施した機関数が少なかった(5 機関)が、目標良好範囲報告 80%であり、2015 年度(約 36%)、2016 年度(約 56%)と比較し、非常に高い結果であった。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

63 機関(約 91%)が目標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 53%、中央値で約 57%低い報告値となっており、昨年度も同様の傾向が認められた。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, 5-7)}。

表 3 に 2015~17 年度の結果判定一覧を示した。参加機関は、2015 年度 67 機関、2016、17 年度 71 機関、3 年連続で参加した機関は 58 機関であった。58 機関のうち今年度目標良好範囲外の結果を報告した 16 機関中 4 機関は 3 年連続で同様の結果を報告し、7 機関は 3 回の外部精度管理中 2 回目標良好範囲外を報告していた。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、目標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。特に 3 年連続で目標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。

以上のことから、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。

次に参考値として算出した回収率について表 4 に示した。日水製薬による外部精度管理では、非濃縮試料②が 100 倍濃縮のスタート試料だったことから、非濃縮②の結果を分母として回収率を算出し、参考値として報告された

が、ここでは非濃縮①を分母とした場合も算出した。目標回収率 20%をクリアしたのは、非濃縮①を分母とした場合、全 71 機関のうち有効回答(非回答 1 機関を除く)のあった 70 機関中 45 機関(約 64%)、非濃縮②を分母とした場合、有効回答(非回答 1 機関、非検出 3 機関、濃縮後菌数が濃縮前菌数を上回った 1 機関を除く)のあった 66 機関中 37 機関(約 56%)であった。また両試料を分母とした場合では、両試料で有効回答のあった 66 機関(前述非濃縮②と同)中 34 機関(約 52%)が目標回収率をクリアしていたが、半数近くの機関がその回収率を下回る結果となった。WG では、これまで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, 5)}。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。その不安定となる要因は、各検査機関で異なると考えられ、内部精度管理により自施設の実態把握に努めることが肝要である。今回目標として設定した回収率 20%は、数値だけでみると低い回収率に思われるが、レジオネラ属菌の検査においては、前述のとおり各項目において半数近くの機関がクリアできていない数値であること、また計算上では 50CFU/100mL のレジオネラ属菌数の試料まで定性的に確認できる数値であることから、目標としては適当な回収率であると思われる。引き続き WG 内でも回収率の向上と安定に向け検討したいと考える。なお、非濃縮①と②の試料間で回収率に差が認められた要因の一つに、両試料間での報告菌数に有意な差が認められた機関が複数あったことが挙げられる。

ここまでの結果を解析した結果、以下の項

目に該当する検査機関(非回答 1 機関を除く 70 機関中 36 機関:重複項目機関あり)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で目標良好範囲外を報告した 1 機関。

- ・非濃縮試料②で目標良好範囲外を報告した 5 機関(3 機関はレジオネラ属菌非検出)。

- ・ろ過濃縮で目標良好範囲外を報告した 16 機関(1 機関はレジオネラ属菌非検出)。

- ・遠心濃縮で目標良好範囲外を報告した 1 機関。

- ・非濃縮及び濃縮試料で目標良好範囲外を報告した 11 機関。

- ・3 年連続で目標良好範囲外の結果を報告した 4 機関。

- ・本年度目標良好範囲外を報告し、3 回の外部精度管理中 2 回目目標良好範囲外を報告した 7 機関。

- ・回収率が低かった機関(目標良好範囲菌数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)。

- ・非濃縮①と②で報告菌数が大きく異なっていた機関。

これまでも報告してきたが、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。また 3 年連続で良好範囲外の結果を報告していた 4 機関は、試料の混ぜ方、培地の状態、5 枚の培地への各接種量が安定していたか、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)を基本とした新版レジオネラ症防止指針収載の方法(公衆浴場における衛生等管理要領で参照とされている方法)をベースに検討。

- ・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属菌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、第4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。

そのような中、2017 年 5 月に ISO 11731 の改訂がなされ、WG 推奨法との調整を行うこととなった。改訂版 ISO では、レジオネラ属菌の検査工程において、以下の 4 つの手順選択が

示された。手順の選択 1:検査試料について、雑菌が少ない、多い、極めて多い。さらに、レジオネラ属菌が多い場合と少ない場合。手順の選択 2:濃縮について、非濃縮、フィルター貼付、ろ過濃縮。手順の選択 3:前処理について、未処理、熱処理、酸処理、熱/酸処理。手順の選択 4:培地について、非選択培地、選択培地、高度選択培地。これら手順の選択 1~4 を、検査試料の状況に応じ、該当する必要項目を選択し、検査を進めて行く流れとなっている。これを日本の浴槽水検査に当てはめてみると、手順の選択 1 において、改訂 ISO の例示では、雑菌が少ない試料として水道水、多い試料として冷却塔水、極めて多い試料として工業用廃水としているが、浴槽水をどこに当てはめるのが妥当なのか判断が難しい状況であった。一般的に、事前に浴槽水の雑菌量を把握することは大変難しく、ここで項目を選択することは極めて困難である。さらにレジオネラ属菌量を事前に推定するのも一般的には極めて困難である。このため、その後進めて行く手順の選択 2~4 の必要項目を選ぶことも難しい状況である。さらに、手順の選択 4 における選択培地は日本では一般的ではなく、対応が難しい(非選択培地:BCYE α 、高度選択培地:GVPC、MWY、WYO α 等)。以上のことから、現状、日本における浴槽水のレジオネラ属菌検査においては、改訂 ISO に準拠した方法で対応するのは難しいと思われた。一方で、国際的な流れから大きく外れるのは問題がある。これらのことを踏まえ WG 推奨法との調整を行った結果、WG 推奨法が ISO 11731:1998(E)を基本とした新版レジオネラ症防止指針収載の方法(公衆浴場における衛生等管理要領で参照とされている方法)をベースに検討してきた方法であり、国際的な流れのポイントを押さえ

ていること、検査試料中のレジオネラ属菌数を予測できないので、濃縮検体と非濃縮検体を同時に検査するとしていること、改訂 ISO 同様のろ過濃縮方法を中心に検討していること、以上のことから、標準的な検査方法として適当な方法であると思われた。今後は、WG 推奨法について目的別に応じた提示のしかたを協議し、「公衆浴場における衛生等管理要領」で標準的検査法として提示できるよう検討を進めていく予定である。

研修については、日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナーに 3 年連続参加し、WG 推奨法の普及に努めた。しかしながら、座学のみであることから、毎年実習を伴った研修会についての要望を耳にしている。これまでも、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 WG 内でなされているが、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、本研究班において解決策を見出すのは困難と思われ、研究班内外からの幅広い意見を求め方策を検討していかなければならないと考える。

D. 結論

1) 精度管理

2015 年度以降、外部精度管理調査実施主体を民間会社とし、官民間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(積極的疫学調査における環境調査)の一モデルを示すことができたと思われる。また 3 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、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

現在 WG が推奨している方法と改訂された ISO 法との調整を行った結果、現時点ではこれまでの WG 推奨法が最も適切に対応できる方法と思われた。今後は、目的別に応じた検査法の提示のしかたを協議し、「公衆浴場における衛生等管理要領」で標準的検査法として提示できるよう検討を進めていく予定である。

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、本研究班において解決策を見出すのは困難と思われ、研究班内外からの幅広い意見を求め方策を検討していかなければならないと考える。

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.

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.

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.

4) 森本 洋 他:レジオネラ属菌検査法の標準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 年度総括・分担研究報告書 pp.85-104.

5) 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.

6) 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.

7) 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:レジオネラ感染症とその衛生対策について、平成 29 年度 道南獣医師会公衆衛生講習会、2018 年 2 月、北海道
- 2) 森本 洋:レジオネラ属菌培養検査について、2017 年度レジオネラ属菌検査セミナー、2018 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	3080	2420	3000	1964		41	860	150	1200	0	
2	880	700	140	60		42	3000	1000	800	860	
3	1140	450	800	84		43	2700	1400	2000	170	
4	1120	425	400		384	44	2360	1400	2400	604	
5	500	700	1000	80		45	2880	500	4200	1076	
6	1800	800	1800	520		46	3300	1600	2600	350	
7	1700	1000	3600	580		47	2180	1000	2800		750
8	2600	1600	3000	600		48	4320	1425	3400	1684	
9	1120	350	1200		200	49	1840	750	1800	32	
10	4220	2750	3600	624		50	920	330	800	330	
11	5780	4250	3200		1660	51	4760	2800	13800	748	
12	920	520	400	310		52	440	400	0		416
13	1440	450	1000	160		53	非回答	非回答	非回答	非回答	
14	6700	2100	5000	100		54	3940	1480	8600	430	
15	4300	1650	5000	792		55	4000	1700	4800	920	
16	2600	2400	2400	1900		56	300	0	0	188	
17	2860	1660	2000	664		57	860	680	200	8	
18	3160	1330	2000	1010		58	4520	1230	2800	1118	
19	1680	450	1000	708		59	1900	630	2000	950	
20	2660	1800	4200	682		60	1800	800	2000	930	
21	2940	600	2400	496		61	1080	280	1000	612	
22	2320	1100	2800	974		62	340	500	400	42	
23	4040	675	3800	852		63	1000	500	800	500	
24	1120	550	1800	62		64	3000	1400	2200	1230	
25	4500	1400	3200	280		65	3000	非回答	3000	1450	
26	1600	900	1400	630		66	2420	900	2200	382	
27	2760	1750	3200	778		67	3700	1400	4200	1200	
28	3800	1470	4800	390		68	2320	1350	3600	472	
29	60	25	0	18		69	1600	700	1000	340	
30	7800	4800	7000	1600		70	5980	3550	4400	2372	
31	3240	3000	5000	710		71	1980	1050	1800	374	
32	3600	900	3000	800							
33	4900	2900	6000	1090							
34	360	50	600	180		平均値	2534	1207	2613	640	682
35	3500	1050	2800	330		最大値	7800	4800	13800	2372	1660
36	2720	575	3400	1110		最小値	60	0	0	0	200
37	1940	1175	3000	456		中央値	2390	1000	2300	580	416
38	1340	700	1600	418		対象機関	70	69	70	65	5
39	820	900	1200	146		良好機関	69(99%)	63(91%)	65(93%)	49(75%)	4(80%)
40	460	50	400	38							

表2 2015～2017年度の結果概要

	2015	2016	2017
非濃縮①	91 (62/68)	97 (68/70)	99 (69/70)
非濃縮②	—	94 (66/70)	93 (65/70)
ろ過濃縮	62 (38/61)	77 (47/61)	75 (49/65)
遠心濃縮	36 (8/22)	56 (5/9)	80 (4/5)

% (良好施設数/参加施設数)

表3 2015、16、17年度結果判定一覧(2015/2016/2017、良好範囲※○、範囲外*、検査項目外又は不参加—)

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	○/○/○	-/○/○	-/—/○	* / * / —
9	○/○/○	-/○/○		* / ○ / *	45	○/—/○	-/—/○	○/—/○	
10	○/○/○	-/○/○	○/○/ *		46	○/○/○	-/○/○	* / ○ / ○	
11	○/○/○	-/○/○	○/—/—	○/○/○	47	-/—/○	-/—/○		-/—/○
12	○/○/○	-/○/○	○/○/○		48	○/○/○	-/○/○	○/○/○	
13	○/○/○	-/○/○	○/○/ *		49	* / ○ / ○	-/○/○	* / ○ / *	
14	○/○/○	-/○/○	* / * / *		50	○/○/○	-/○/○	○/○/○	* / — / —
15	○/○/○	-/○/○	* / ○ / ○	○/—/—	51	○/○/○	-/○/○	○/ * / ○	
16	-/○/○	-/○/○	-/○/○		52	-/○/○	-/○/ *		-/ * / ○
17	○/○/○	-/○/○	-/—/○	* / ○ / —	53	○/○/非	-/○/非	○/○/—	* / — / 非
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	○/○/○	-/○/○	* / ○ / ○	* / — / —					

非:非回答 ※ 厚労科研WGによる判定基準による

表4 全施設の回収率(%)

施設No.	分母 非濃縮①	分母 非濃縮②	施設No.	分母 非濃縮①	分母 非濃縮②	施設No.	分母 非濃縮①	分母 非濃縮②
1	63.8	65.5	25	6.2	8.8	49	1.7	1.8
2	6.8	42.9	26	39.4	45	50	35.9	41.3
3	7.4	10.5	27	28.2	24.3	51	15.7	5.4
4	96	96	28	10.3	8.1	52	94.5	-
5	16	8	29	30	-	53	非回答	非回答
6	28.9	28.9	30	20.5	22.9	54	10.9	5
7	34.1	16.1	31	21.9	14.2	55	23	19.2
8	23	20	32	22.2	26.7	56	62.7	-
9	17.9	16.7	33	22.2	18.2	57	0.9	4
10	14.8	17.3	34	50	30	58	24.7	39.9
11	27.7	51.9	35	9.4	11.8	59	50	47.5
12	33.7	77.5	36	40.8	32.6	60	51.7	46.5
13	11.1	16	37	23.5	15.2	61	56.7	61.2
14	1.5	2	38	31.2	26.1	62	12.4	10.5
15	18.4	15.8	39	17.8	12.2	63	50	62.5
16	73.1	79.2	40	8.3	9.5	64	41	55.9
17	23.2	33.2	41	0	0	65	48.3	48.3
18	32	50.5	42	28.7	107.5	66	15.8	17.4
19	42.1	70.8	43	6.3	8.5	67	32.4	28.6
20	25.6	16.2	44	25.6	25.2	68	20.3	13.1
21	16.9	20.1	45	37.4	25.6	69	21.3	34
22	42	34.8	46	10.6	13.5	70	39.7	53.9
23	21.1	22.4	47	34.4	26.8	71	18.9	20.8
24	5.5	3.4	48	39	49.5			

レジオネラ属菌検査実施施設様各位

2017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上げます。

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「2017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上げます。

■参加要件

別紙 1.「参加要件」を満たし、かつ、別紙 2.「2017 年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法」(参考：厚生労働省レジオネラ属菌検査推奨法 / ISO11731:1998 / ISO 11731:2017) による検査対応が可能なお施設様

■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・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	「2017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（参照：別紙2）。 2017年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、「ISO 11731:1998」の考え方を基本として平成23年度より検討されている「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」（以下、レジオネラ研究事業）において報告された方法に基づき、また「ISO 11731:2017」を参考に、本精度管理サーベイ用に変法したものです。
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）

6月中旬	参加募集開始 ●弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)の2017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しください。 ●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29日（金）	参加募集締切
10月16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31日（火）	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17日（火）～ 11月17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17日（金）17時	回答締切
12月31日（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けます。なお、振込手数料は貴施設ご負担をお願い致します。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31日（水）	解析結果返却 ●弊社コスモ会ホームページ(https://cosmokai.com)にてID番号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。

■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:03-5846-5629
E-mail: legi-srvy@nissui-pharm.jp

参加要件

2017年6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ーレベル(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

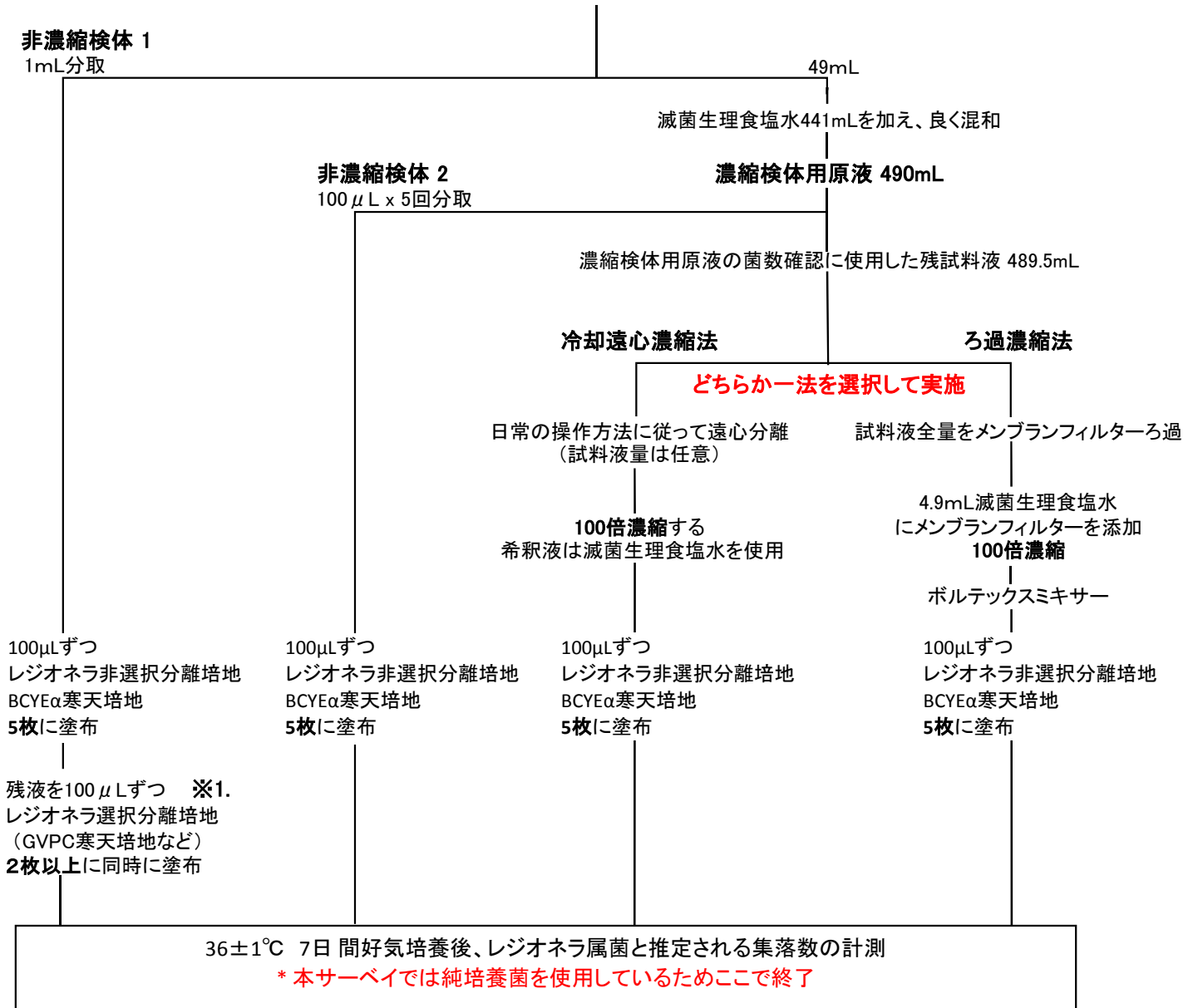
予告なく実施スケジュールが変更となることがあります。変更後のスケジュールは、メール等にてご連絡をいたします。

以上

2017年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

(参考：厚生科研費レジオネラ属菌検査推奨法 / ISO11731:1998 / ISO 11731:2017)

500mL以上の容器に入れた滅菌生理食塩水50mLに、精度管理サーベイ試料1バイアルを加え良く混和



■ 2017年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法は、“ISO 11731:1998”の考え方を基本として平成23年度より検討されている「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」(以下、レジオネラ研究事業)において報告された方法に基づき、また“ISO 11731:2017”を参考に、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年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。2017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BCYE α 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。

2017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上げます。

この度は、2017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上げます。

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6枚
- ・ 結果記入用メモ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4枚
- ・ 試料受諾書兼承諾書・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1枚
- ・ 精度管理サーベイ試料A（瓶ラベルに「A」と記載）・・・・・・・・・・・・1本

*** 到着後直ちにマイナス18℃～マイナス33℃で適切に保管してください。**
*** 到着後直ちに内容を確認し、書類の不備や精度管理サーベイ試料Aの破損等を認めた場合、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ事務局にご連絡ください。**

2. 結果入力手順

- 1) 結果の記入は、コスモ会HP (<https://cosmokai.com/>) より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPW（別送ハガキ参照）を入力してログインしてください。
- 2) 登録画面が表示されますので、ご登録内容をご確認ください。ご確認後は、ページの下にあります【変更なし データ入力画面へ進む】をクリックしてください。
- 3) データ入力画面に進み結果の入力が完了したら、ページの下にあります【入力内容を確認】をクリックし入力内容を確認してください。入力に間違いがなければ、ページの下にあります【送信】をクリックしてください。

注意：同じ PC で複数の方が入力・確認を行う際には、ユーザー毎に作業完了後、一度ブラウザを全て閉じ、再度結果入力画面にアクセスし、ログインしてください。
表示されている内容が試験担当者ご本人のものであるかご確認ください。

3. スケジュール

期 日	内 容
10/17(火)～18(水)	■精度管理試料到着 精度管理サーベイ試料 が到着します。送付内容を確認してください。
11/17(金) 17時	■回答締切 検査を実施し、上記結果入力手順に沿って結果の入力をお願いいたします。回答期限を11/17(金) 17時とさせていただきます。
1月31日(水)	■解析結果開示 解析結果はコスモ会HP (https://cosmokai.com/) より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPWを入力後、試験実施者様の画面にて解析結果の閲覧・印刷ができます。

4. 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
 TEL：03-5846-5729 FAX：03-5846-5629 E-mail：legi-srvy@nissui-pharm.jp

2017 年 10 月 16 日

日水製薬株式会社

2017 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、バイオセーフティーレベル 2 に該当する菌種ですので、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きます。

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 19 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:03-5846-5629

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： 2017 年 10 月 日

貴社名
ご所属部署
ご担当者名 (印)
ID 番号 <small>注</small>

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

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 29 年度 分担研究報告書

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
研究協力者	森 健	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
	森川正浩	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
	稲葉尋高	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課

（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、静岡県内の保健所（静岡市及び浜松市を含む）24 名であった。

研修は、講義と実習の二部構成で行った。

また、各検査機関が実施している検査方法を把握するため、事前アンケートを実施した。

講義では、検査の解説のほか、静岡県行政担当による「レジオネラ防止対策についての取組み」の解説の時間を設けた。また、本研究班前川純子研究代表者による「レジオネラ症とレジオネラ属菌を知る」と題した特別講演を行った。

実習では、検体の前処理方法、接種、同定方法、遺伝子検査法についての研修を行った。

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。

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参加希望機関を公募した。また、県内保健所に対しても開催を案内し参加を募った。

2．研修参加機関

検査機関 13 機関 23 名、静岡県内の保健所（静岡市及び浜松市を含む）24 名が参加した。

3．研修内容（資料 1 及び 2）

講義（4 時間）

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、汚染事例を例に挙

げて解説を行った。

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 に基づく検査方法について解説した。

また、検体の前処理方法、すなわち、ろ過濃縮法と冷却遠心法違いによる回収効率についての比較実験した結果を紹介した。

今回は、「レジオネラ症とレジオネラ属菌を知る」と題し本研究班前川純子研究代表者による特別講演を行った。

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。

実習(1日)

検体の前処理、同定方法及び遺伝子検査について実習した。

- ・ 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。

また、昨年度希望が多かった PCR についても実習を行った。

4. アンケート結果

参加した 13 の検査機関に対し、検体の採

取、濃縮、前処理、培養、同定、検体数について事前アンケートを行った。

アンケート項目及び結果を資料 3 に示した。検査機関ごとに実施している方法は様々であることが改めて確認された。

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。

事前の各機関で実施している検査法に関するアンケート結果から、レジオネラ属菌の検査方法は機関ごとに大きく異なっており、これがレジオネラ属菌の検査結果に差異を生じる原因の一つであると考えられた。今回の研修会では、静岡県環境衛生科学研究所の SPO に基づく検査法により研修を実施したが、斜光観察法は安価な機材を準備するだけで実施可能であり、同定に際しての形態観察には大変有用であるため導入を検討したいとする機関が多かった。しかし、今後も研修を継続して実施するにあたっては、標準的検査法を示すことが不可欠である。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と思われる。

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。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】平成29年度レジオネラ属菌検査研修会（講義）次第

平成29年度 レジオネラ属菌検査研修会（講義）

日 時：平成29年11月27日（月） 13：00～17：00

場 所：静岡県環境衛生科学研究所 別館会議室

- 研修次第 -

- | | |
|-------------|---|
| 13：00～ | 受 付 |
| 13：30～13：40 | 開 会 （挨拶） |
| 13：40～14：00 | 静岡県のレジオネラ防止対策についての取組み
～日帰り入浴施設におけるレジオネラ属菌汚染事例について～
健康福祉部生活衛生局衛生課 生活衛生班 稲葉尋高 |
| 14：00～14：30 | 静岡県環境衛生科学研究所におけるレジオネラ検査について
環境衛生科学研究所微生物部 細菌班 鈴木秀紀 |
| 14：30～14：45 | 検査方法と回収効率について
環境衛生科学研究所微生物部 細菌班 長岡宏美 |
| 14：45～15：00 | 休 憩 |
| 15：00～16：30 | 【特別講演】
レジオネラ症とレジオネラ属菌を知る
国立感染症研究所 細菌第一部 前川純子先生 |
| 16：30～16：50 | 質 疑 |
| 16：50～17：00 | 事務連絡 |
| 17：00 | 閉 会 |

【資料2】平成29年度レジオネラ属菌検査研修会（実習）次第

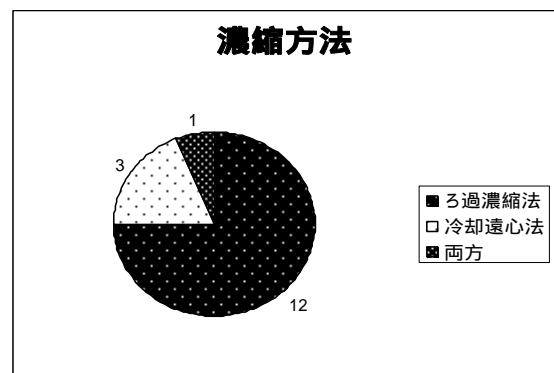
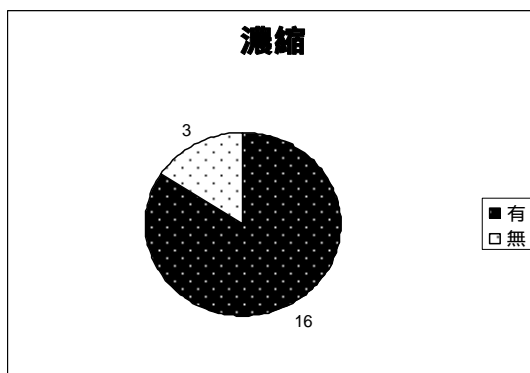
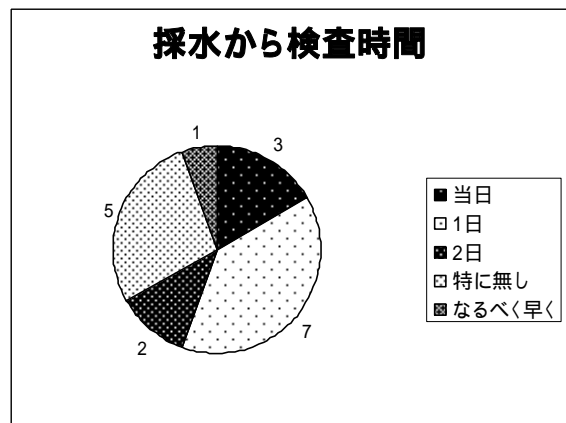
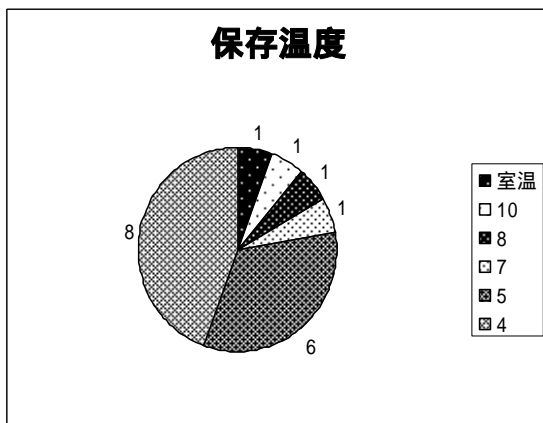
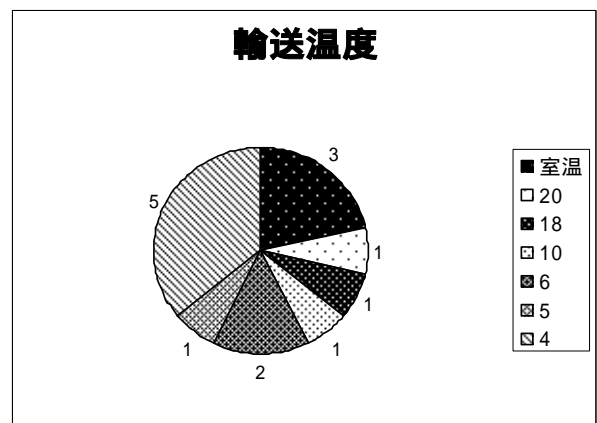
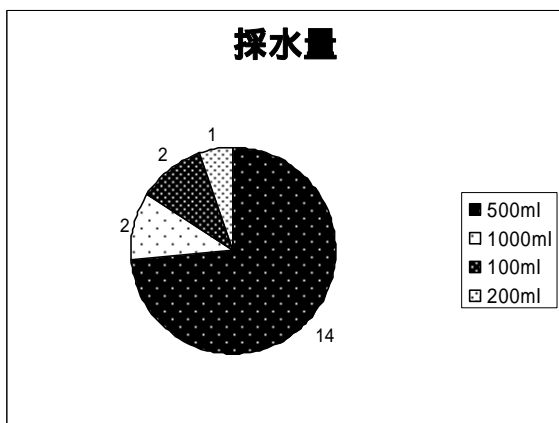
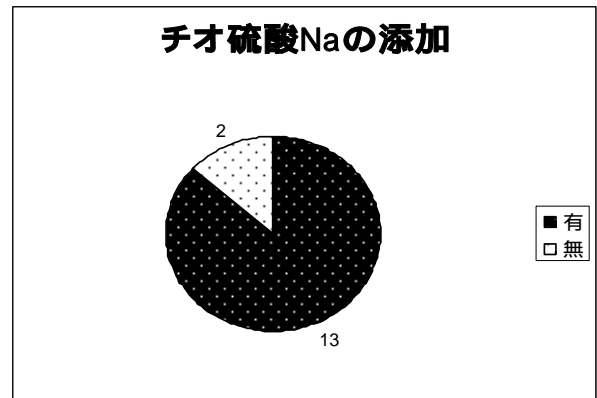
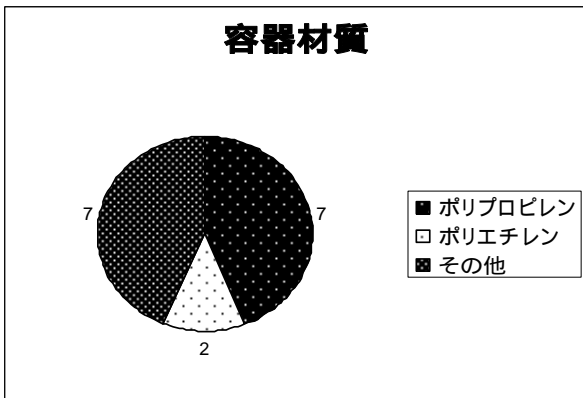
平成29年度 レジオネラ属菌検査研修会（実習）

日時：平成29年11月30日（木）、12月1日（金）10：00～17：00
場所：静岡県環境衛生科学研究所 4階環境微生物室

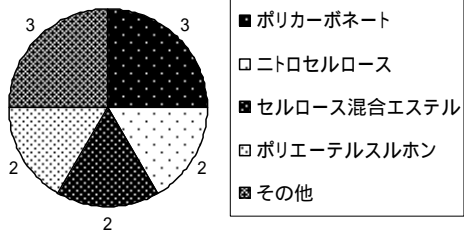
- 研修次第 -

10：00～	受付
10：05～10：15	バイオセーフティー講義
10：15～12：00	PCR（解説、サイクラーに入れるまで）
【昼食】	
13：00～14：30	ろ過濃縮、前処理、塗抹
14：30～15：00	PCR電気泳動
15：00～15：15	休憩
15：00～16：30	斜光観察、凝集（ラテックス、デンカ） PCR写真撮影
16：30～16：50	判定、質疑
16：50～17：00	閉会

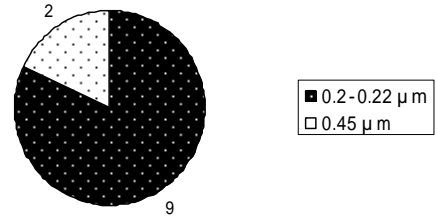
【資料3】検査法に関する事前アンケート集計結果



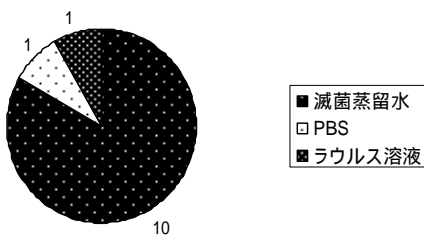
ろ過フィルター素材



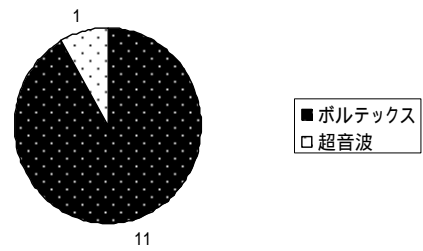
ポアサイズ



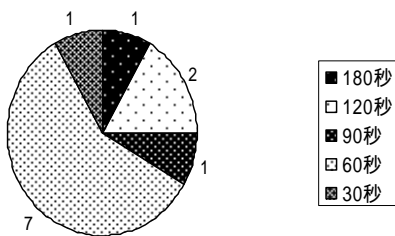
溶液



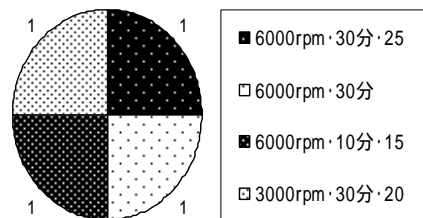
溶出方法



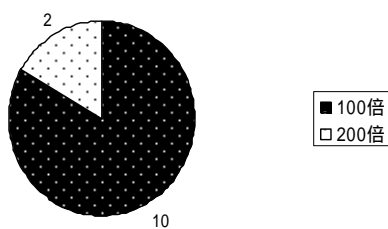
溶出時間



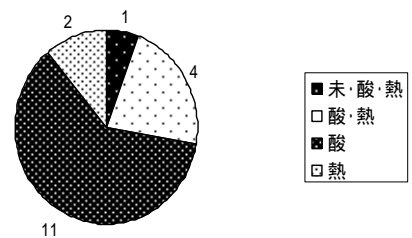
冷却遠心条件

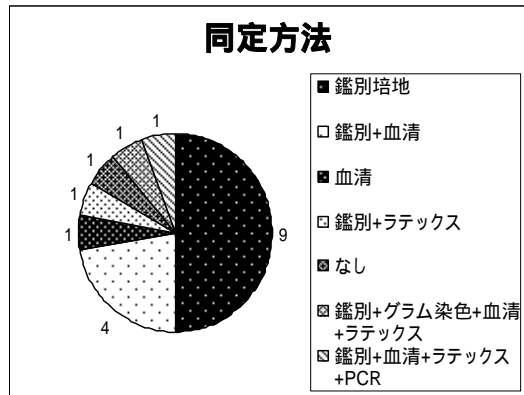
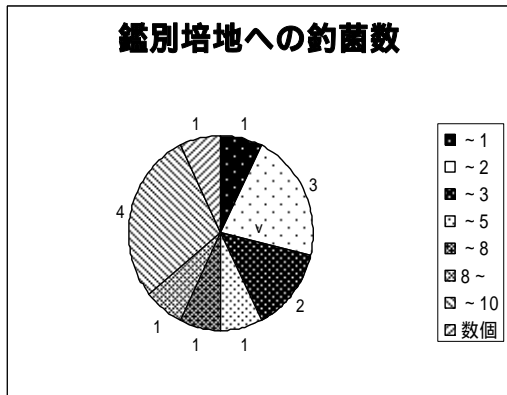
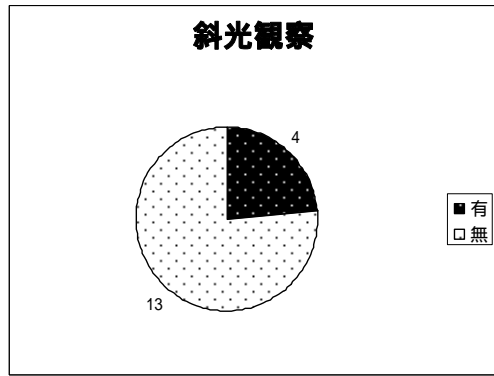
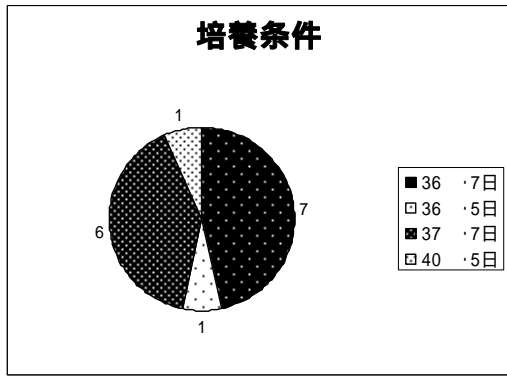
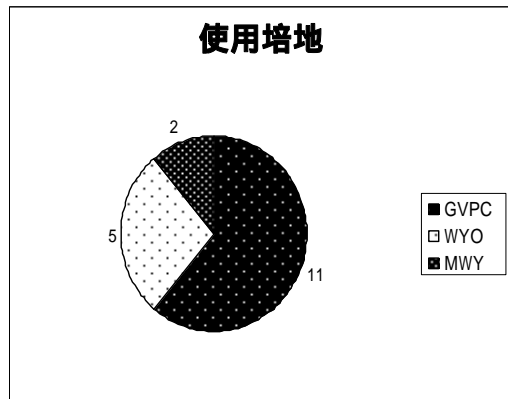
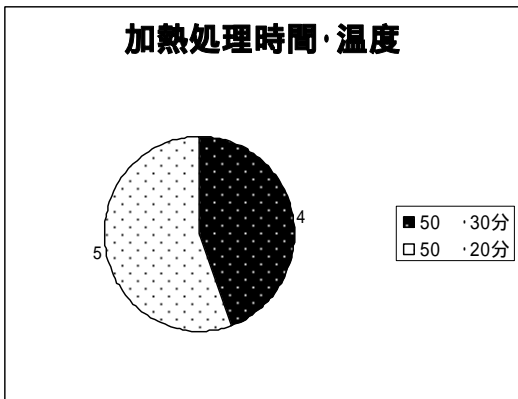
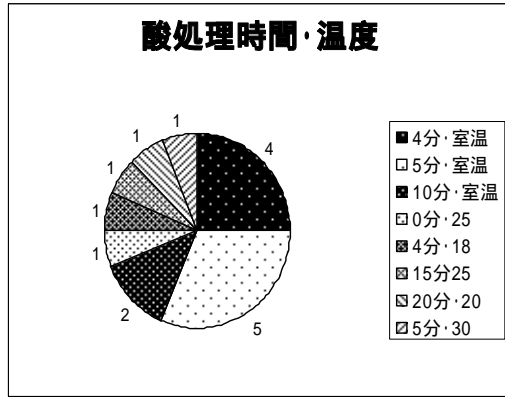
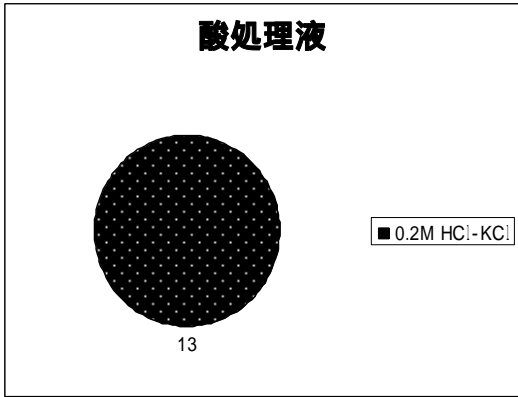


濃縮倍率



前処理法





研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
赤井仁志、井上浩章、枝川亜希子、小澤匡弘、倉文明、小瀬博之、関雅文、高貝健治、高橋佳代子、高橋幸雄、舘田一博、長岡宏美、比嘉太、古畑勝則、前川純子、松鶴さとみ、松村佳明、宮下修行、柳宇。	第2部、付録、他	レジオネラ症防止指針編集委員会（委員長舘田一博）	第4版レジオネラ症防止指針	公益財団法人日本建築衛生管理教育センター	東京	2017	全166ページ

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
Yoshida M, Izumiyama S, Fukano H, Sugiyama K, Suzuki M, Shibayama K, Hoshino Y.	Draft Genome Sequence of Mycobacterium sp. Strain shizuoka-1, a Novel Mycobacterium Isolated from Groundwater of a Bathing Facility in Shizuoka, Japan.	Genome Announc.	22;5	47	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	Vol.45, No.6	295-300	2017
倉文明	環境におけるレジオネラの存在と感染予防策	最新医学	72巻4号	520-527	2017
倉文明	環境による健康リスク	日本医師会雑誌	146巻・特別号(2)	S292-294	2017
Ito A, Ishida T, Tachibana H, Ito Y, Takaiwa T, Fujii H, Hashimoto T, Nakajima H, Amemura-Maekawa J.	A case of community-acquired pneumonia due to <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 9 in which initial treatment with single-dose oral azithromycin appeared useful.	Jpn J Infect Dis.	70(6)	660-662	2017

Kanatani JI, Isobe J, Norimoto S, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M.	Prevalence of Legionella species isolated from shower water in public bath facilities in Toyama Prefecture, Japan.	J Infect Chemother.	23(5)	265-270	2017
Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F.	<i>Legionella</i> prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. <i>Epidmiol. Infect.</i> 145:1398-1408, 2017.	Epidmiol. Infect.	145(7)	1398-1408	2017
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.	Outbreak of Legionnaire's disease caused by <i>Legionella pneumophila</i> serogroups 1 and 13.	Emerg Infect Dis.	23(2)	349-351	2017
Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F.	<i>Legionella</i> prevalence and risk of legionellosis in Japanese households.	Epidmiol. Infect	145(7)	1398-1408	2017