

---

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～30 年度 総合研究報告書

研究代表者 前川 純子

令和元（2019）年 5 月

---

## 目次

### I. 総合研究報告

- 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. 資料

1. レジオネラ属菌迅速検査法の評価-----19  
磯部順子、佐々木麻里、田栗利紹、金谷潤一、川野みどり、武藤千恵子、山口友美、  
淀谷雄亮、上野潤二、東出誠司、中筋 愛、吉崎美和、原口浩幸、森中りえか
2. 斜光法を取り入れた大分県の浴場水調査および  
実検体を用いた LAMP 法と比色系パルサー法の検討-----34  
佐々木麻里、神田由子、後藤高志、成松浩志、淀谷雄亮、江川英明、緒方喜久代
3. レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発-----44  
田栗利紹、倉 文明、蔡 国喜、小嶋裕子、下田貴宗、新道欣也
4. MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴-----55  
中西典子、田中 忍、野本竜平、米澤武志、平塚貴大、水本嗣郎、前川純子
5. 感染源解明のための環境調査-----66  
磯部順子、金谷潤一
6. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査-----83  
黒木俊郎、泉山信司、縣 邦雄、大屋日登美、陳内理生、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹
7. レジオネラ検査法のマニュアル作成および入浴施設の衛生管理に関する研究成果の活用----89  
黒木俊郎、森本 洋、磯部順子、緒方喜久代、倉 文明、前川純子
8. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み-----92  
森本 洋、磯部順子、黒木俊郎、佐々木麻里、田栗利紹、中西典子、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、  
三津橋和也、武藤千恵子、山口友美、吉野修司、前川純子
9. 高 pH 浴槽水、薬湯、並びに水泳プールへの、モノクロラミン消毒の応用-----120  
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、  
赤地重宏、永井佑樹、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、青木信和、江口大介、西尾正也、  
山本哲司、八木樹里奈、藤井 明、松田宗大、松田尚子、枝川亜希子、吉田光範、星野仁彦
10. レジオネラ感染とアメーバ アメーバならびに BCYE  $\alpha$  を用いた検出-----138  
八木田健司、泉山信司

11. 公衆浴場施設におけるモノクロラミンによる消毒効果の検討	
レジオネラ属菌検査研修会の開催について-----	145
長岡宏美、泉山信司、八木田健司、小坂浩司、壁谷美加、土屋祐司、森主博貴、水本嗣郎、 村田学博、杉山寛治、市村祐二、青木信和、森 健、漆畑 健、森川正浩、稲葉尋高	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	159
--------------------------	-----

研究要旨：公衆浴場等の適切な衛生管理のための効果的な手法の検討および公衆浴場等の衛生状態を確認するためのレジオネラ検査法の改良、評価を行い、以下のような成果を挙げた。

(1) レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、LAMP法、qPCR法、PALSAR法について、浴槽水などの実検体 906 検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。各種迅速検査法は、検体中のレジオネラ属菌の陰性を判定する迅速法として有用であることが確認できた。LAMP法、qPCR法についてはEMA処理を併用すると、より平板培養法との相関が高くなった。LAMP法において、Chelex抽出法は偽陰性を減らすのに有効な抽出法であると考えられた。RT-qPCRにより、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌RNA量は浴槽水より全体的に低い傾向にあることが分かったので、RNAを検出するPALSAR法は、現時点ではシャワー水およびカラン水以外を対象として使用するのが望ましいと考えられた。また、特殊な機器を必要としないPALSAR法は、現場での活用が期待されるが、今後時間を要する濃縮工程の再検討が必要である。

(2) モノクロラミン消毒のレジオネラ属菌への消毒効果が、実証試験をにより確認された。モノクロラミンの濃度は、泉質、入浴者数、施設の配管の状態等に大きく影響を受けることから、実際の運用に当たってはそれぞれの施設に応じた対応をする必要があると思われた。pH8から10のアルカリ性の浴槽水および生薬あるいは無機塩薬湯において、モノクロラミン消毒の効果を確認できた。換水頻度が低い場合は、雑菌の増殖、すなわちバイオフィームの蓄積が心配されることから、換水と洗浄を徹底する必要性が示唆された。また、水泳プールへのモノクロラミン消毒の適用が確認できた。

(3) モノクロラミン消毒についてのこれまでの研究成果を一般利用者と営業者に向けて平易な表現で記述したWebページを公開した。

(4) 入浴施設及び医療機関の給水系及び給湯系のレジオネラ汚染調査の結果、使用頻度の低い蛇口や配管における遊離残留塩素濃度の低下、給湯系における配管中の温度の低下がその汚染の原因であると推測された。検討すべき対策として、使用頻度の低い蛇口での流水（フラッシング）、塩素濃度・温度の維持、定期的な配管の消毒、使用頻度の低い蛇口の廃止、レジオネラ対策を踏まえた系の設計・管理等が挙げられる。また、給水・給湯系におけるレジオネラ汚染についてのシンポジウムには、160名を超える参加者があり、関心の高さと、アンケート回答から参加者がその対応に苦慮している実情が明らかとなった。

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

(6) 道路沿い12箇所のエアロゾルからレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。道路沿い検体におけるレジオネラ属菌遺伝子の検出率および遺伝子量は、浴室内検体と同等かつ屋内検体より高かった



ことから、道路沿いのエアロゾルは浴室内のそれと同様のリスクがある可能性が考えられた。

(7) 感染源推定のための菌株の迅速なタイピング方法として期待できる MLVA 法について、そのプロトコルを最適化し、*L. pneumophila* SG1、439 株および SG1 以外の *L. pneumophila* 187 株についてタイピングを実施したところ、それぞれ、233 種類、131 種類の MLVA 型に分類され、その分解能は SBT 法と同等の値を示した。過去の集団事例 7 事例について MLVA 型を決定したところ、PFGE パターンおよび SBT 型別と概ね関連した。

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

(9) 高分子多糖類である硫酸化多糖類に含まれるヘパリン、コンドロイチン硫酸およびデキストラン硫酸には、レジオネラ属菌のアメーバ感染促進作用が認められた。ファゴソーム内活性酸素産生を阻害するアポシニン、およびリソゾームの内部 pH を中性化しその加水分解酵素作用を阻害する塩基性アミンのクロロキンならびに塩化アンモニウムはアメーバ感染率を増加させ、取り込まれた VNC 菌を生存させる可能性があることが示された。ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験により、水系環境で定量的に VNC 菌の確認が可能であった。

(10) 静岡県内の検査機関及び行政担当者を対象に「レジオネラ属菌検査研修会」を 3 年間にわたり開催した。初年度は検査機関 19 機関 26 名、2 年目は検査機関 19 機関、県内の保健所等行政関係職員（静岡市及び浜松市を含む）24 名、3 年目は検査機関 15 機関、県内の行政関係職員 24 名が参加した。研修は講義と実習から成り、実習については検体の前処理法、接種、同定方法、遺伝子検査法を実施した。事前アンケートを実施したところ、各検査機関が実施している検査方法は検査機関ごとに大きく異なっていた。

(11) 民間会社が実施した外部精度管理サーベイについて、助言を行い、方法の改善を図った。本研究班からは、地方衛生研究所等が平成 28 年度、29 年度 71 機関、平成 30 年度 70 機関が参加した。本外部精度管理は、検査手技の安定性を確認し、不安定な機関へ検査手技の検証を促すことができる方法であり、今後も、継続的な外部精度管理サーベイができるよう、引き続き実施主体となる民間会社との連携が必要である。

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

(13) 昨年度改訂された ISO 11731（水検体のレジオネラ検査法）との調整を図った「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示した。

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

#### A. 研究目的

河川や土壌に生息する環境細菌であるレジオネラ属菌は、人工水系の衛生管理に不備があると増殖して、そこから生じるエアロゾルを介して感染し、重篤な肺炎やポンティアック熱を引き起こす。その制御が、公衆浴場をはじめとする種々の水系設備で課題となっている。公衆浴場等のレジオネラ症対策の向上のために、遊離塩素消毒が困難な温泉水を使用している入浴施設を対象とし

表1 研究協力者一覧

青木信和	ケイ・アイ化成株式会社	下田貴宗	シモダアムニティ株式会社	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
赤地重宏	三重県保健環境研究所	新道欣也	株式会社 お風呂のシンドー	松田宗大	株式会社ヘルスケミカル
縣 邦雄	アクス株式会社	陳内理生	神奈川県衛生研究所	松田尚子	株式会社ヘルスケミカル
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	杉山寛治	株式会社マルマ	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所
稲葉尊高	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所	三津橋和也	北海道立衛生研究所
上野潤二	栄研化学株式会社	田中 忍	神戸市環境保健研究所	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
植松香星	山梨県衛生環境研究所	田中慶郎	株式会社マルマ	村田学博	静岡県環境衛生科学研究所
漆畑 健	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課	千田恭子	仙台市衛生研究所	森 健	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
江川英明	大分県南部保健所	土屋祐司	浜松市保健環境研究所	森 康則	三重県保健環境研究所
枝川亜希子	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所	永井佑樹	三重県保健環境研究所	森中りえか	株式会社ファスマック
江口大介	ケイ・アイ化成株式会社	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	森主博貴	静岡県環境衛生科学研究所
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	森川正浩	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	成松浩志	大分県衛生環境研究センター	八木樹里奈	花王株式会社 ハウスホールド研究所
小川恵子	北海道立衛生研究所	西尾正也	花王株式会社 ハウスホールド研究所	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
金谷潤一	富山県衛生研究所	野本竜平	神戸市環境保健研究所	山上隆也	山梨県衛生環境研究所
壁谷美加	浜松市保健所	原口浩幸	株式会社ファスマック	山口友美	宮城県保健環境センター
川野みどり	長崎県環境保健研究センター	東出誠司	栄研化学株式会社	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
神田由子	大分県衛生環境研究センター	久田美子	山梨県衛生環境研究所	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
倉 文明	国立感染症研究所	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター	吉田光範	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
小坂浩司	国立保健医療科学院	藤井 明	株式会社ヘルスケミカル	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
小嶋裕子	長崎県環境保健研究センター	星野仁彦	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター	米澤武志	神戸市環境保健研究所
後藤高志	大分県衛生環境研究センター	堀内雅人	山梨県衛生環境研究所	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所
蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター				

たモノクロラミン消毒を実践し、その有効性を実証する。また、その衛生状態を担保するレジオネラ検査法については、実検体での検証を重ね、「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提唱する。迅速検査法の妥当性の検証およびさらなる改良を行う。研究会等により検査法の普及を目指す。感染源の同定に必要な分子疫学法の検証や、効率的にレジオネラ属菌を分離する方法の開発、そのための基礎的検討を行う。レジオネラ検査実施機関に対して、外部精度管理や研修を行うことで、レジオネラ検査の質の向上を図る。以上のような研究を実施することで、その成果を通じて、レジオネラ症対策が進み、安心して入浴できる施設が増えることが期待される。

## B. 研究方法

各研究項目は、1 から数名の研究分担者および研究協力者（表 1）が参加し、実施された。レジオネラ属菌の検出・定量は新版レジオネラ症防止指針に準じて行ない、実体顕微鏡を用いた斜光法による分離培地の観察を行った。遺伝子検査法は、複数の研究項目で実施された。qPCR 法は、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を使用し、LAMP 法は、Loopamp レジオネラ検査キット E (栄研化学) を使用し、PALSAR 法はレジオネラ属菌迅速検査キット (ファスマック) を使用し、それぞれ添付の取扱説明書に従い実施した。各研究項目の研究方法を以下に記した。

## 1. レジオネラ属菌迅速検査法の評価

全国 6 か所の地方衛生研究所において、平成 28～30 年度に浴用施設などから 906 検体の試料を採取した。検体の内訳は、浴槽水が 616 検体 (68.0%)、シャワー水が 91 検体 (10.0%)、採暖槽水が 68 検体 (7.5%)、湯口水が 62 検体 (6.8%)、カラン水が 30 検体 (3.3%)、その他の検体(プール水、冷却塔水など)が 39 検体 (4.3%) であった。

(EMA-) LAMP 法、(EMA-) qPCR 法、PALSAR 法は添付の取扱説明書に従い実施した。RT-qPCR 法は、烏谷らの方法 (厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業平成 24 年度分担研究報告書、p.71) に従って実施した。*L. pneumophila* 長崎 80-045 株の菌液 (約  $10^9$  CFU/ml) を 10 倍段階希釈し、EMA 処理後に DNA を抽出して EMA-qPCR に用いる検量線を作成した。RT-qPCR に用いる検量線は長崎 80-045 株の 10 倍段階希釈菌液から RNA を抽出して作成した。

## 2. LAMP 法と比色系パルサー法の検討

LAMP 法は平成 28～30 年に搬入された浴槽水および湯口水、70 施設 136 検体を対象とし、比色系パルサー法は、上記検体に浴槽水や採暖槽水等 39 検体を加えて実施した。比色系パルサー法は、濃縮検体 1 mL あるいは 2 mL を用いた常法の他に、検水 50 mL あるいは 100 mL を注射筒に入れてメンブランフィルター (直径 13 mm、孔径 0.22  $\mu$ m、Merck 社、セルロース混合エス

テル)でろ過し、ろ過後のフィルターから、100/30 倍に希釈した変性液 100  $\mu$ L で溶出する方法、あるいは検水 100 mL または 200 mL を直径 25 mm のセルロース混合エステルフィルターでろ過し、200 mL の場合は、溶出液の半量を用いる方法の 6 法で検体を調製し、実施、比較した。一部検体の LAMP 法実施時に、Chelex 抽出法を行い常法と比較した。

### 3. フローサイトメトリー技術の開発

抗レジオネラ・ニューモフィラ抗体(パイロスタット社、アークリソース社)、抗レジオネラ属菌抗体(アークリソース社)を Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236、Thermo Fisher) を使って処理し、抗レジオネラ染色試薬を作製した。*Legionella pneumophila* 血清群 1 を 3 株、*L. pneumophila* の血清群 3、血清群 4、血清群 5、血清群 6、血清群 9、および血清群 10 を各 1 株、型別不能 2 株、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌 11 株、*Escherichia coli* 1 株を使用して、携帯型フローサイトメーター miniPOC (シスメックスパルテック社、励起/蛍光波長は 532 nm/570 nm、610 nm、重量 6.5 kg) による抗レジオネラ染色試薬を用いたレジオネラ属菌の検出限界と特異性を調査した。実検体としては、1 週間毎に高濃度塩素洗浄処理 (20 mg/L  $\times$  1 時間) を行っている入浴施設の処理前後の浴槽から、5 週間にわたり採水された 30 検体、3 社会福祉施設の循環ろ過式浴槽からオゾン処理前後および濯ぎ後に採水した合計 16 検体の浴槽水、研究協力者から郵送された検査を委託された 30 種類の循環ろ過式浴槽水について、細菌数を測定した。また、検水を濃縮後、*Legionella pneumophila* (LP) 血清群 1 染色試薬および LP 非血清群 1 染色試薬で染色し、フローサイトメーターで計測し、検量線から LP 数を算出した。

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

*L. pneumophila* 血清群 1 の 439 株 (臨床分離株 256 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 49 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 25 株、土壌由来 36 株)、血清群 1 以外の *L. pneumophila* 187 株 (臨床分離株 68 株、浴槽水

由来 64 株、冷却塔水由来 31 株、土壌由来 22 株、給湯水由来 2 株) および過去の 7 集団感染事例に由来する 153 株を用いて、Sobral ら (Appl Environ Microbiol. 2011. 77:6899) により報告された 12 領域について、蛍光標識したプライマーによる 4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR を行い、AB3500 Genetic Analyzer および GeneMapper Ver. 4 (Applied Biosystems) を用いて、フラグメントサイズおよびリピート数を測定した。得られた MLVA 型から BioNumerics Ver7.6 を用いて、Minimum spanning tree (MST) を作成した。

### 5. 感染源解明のための環境調査

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

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

(3) 免疫磁気ビーズ (IMB) による *Legionella pneumophila* 血清群 1 (以下 Lp1) の選択的濃縮: 100 倍濃縮された浴槽水 128 検体、シャワー水 60 検体、カラン水 30 検体、計 218 検体について、デンカ生研で作製した Lp1-IMB を 25  $\mu$ l

接種し、10分毎に転倒混和しながら30分間吸着させた。ビーズを磁石で集め、滅菌生理食塩水で洗浄した。この操作（洗浄）を2回実施した後、最終的に生食200 $\mu$ lあるいは100 $\mu$ lに懸濁、ポルテックスでよく混和し、IMB検体とした。このIMB検体100 $\mu$ lをGVPC培地にコンラージ棒で拡げるだけとし、表面に接種した検体が確認できなくなってから35 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。平成30年度分の92検体については、滅菌生理食塩水で5倍希釈した希釈検体1mlについても検査を行った。平成29年度に採取された浴用水39検体、シャワー水32検体およびカラん水15検体については、培養前に熱または酸にて処理し、未処理検体と併せてBCYE- $\alpha$ 培地、GVPC培地の両方にコンラージ棒で拡げ、35 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。

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

#### 6. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

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

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

水試料からのレジオネラ属菌検出のための試験法について研修等で活用できるマニュアルの作成を試みた。本研究班を含めて、これまで複数の研究班の研究活動により得られた成果を見直し、また関連する通知等を参照して、公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言を行った。

#### 8. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

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

配付）、平成30年度148機関（延べ151試料配付）に対し実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所等が平成28年度、29年度71機関、平成30年度70機関が参加した。メーカーにより品質と多施設への発送が保証されるバイオメリュウ社のBioBalk（特注品）を配付した。配付試料を受け取った各機関は、50mL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1mL分取した残りにさらに441mLの滅菌生理食塩水を加え、混和した「非濃縮試料」、さらに各機関が行なっているろ過濃縮、あるいは遠心濃縮を実施して得られる「濃縮試料」について、それぞれレジオネラ分離培地100 $\mu$ Lずつ塗布し、各試料中のレジオネラ菌数を算出した。メーカー保証値および微生物学調査の考え方から、目標良好範囲を設定した。平成29年度から、濃縮検体については回収率による判定を行った。目標とした回収率は、平成28年度の外部精度管理で報告を求めたすべての試料（非濃縮、濃縮）において目標良好範囲を報告し、かつ非濃縮の菌数が濃縮の菌数以上を報告した機関のうち、80%以上の機関がクリアしていた20%を下限とし、上限を100%未満とした。

#### 9. レジオネラ感染とアメーバ

(1) アメーバを利用したレジオネラ属菌増殖：PYGCで培養したアメーバ（*A. castellanii* 1501/10株）を24ウェルマイクロプレートウェル内にはぼ単層になるように接着させた後、被検物質（ヘパリン、コンドロイチン硫酸BおよびC、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸、アポシニン、クロロキン、塩化アンモニウム）を含む10 $\times$ AS 300 $\mu$ Lを加え、さらに30 $^{\circ}$ Cで培養したレジオネラ属菌（*L. pneumophila* 血清群1378株）を0.01ODになるように加え、30 $^{\circ}$ Cで3時間培養し、gentamycinを添加した。所定の培養時間後、氷水上でアメーバを剥離し、濃縮されたアメーバ浮遊液をスライドガラスに塗布後、ギムザ染色を行った、細胞内に分裂増殖像を示す、あるいは単独で存在する菌が明確であるアメーバを感染細胞として、その数を測定し感染率を求めた。細胞はランダムに約500個を調べた。

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

#### 10. モノクロラミン消毒の応用

pH8 から 10 のアルカリ性の浴槽水を有する 4 営業施設の協力を得て、2 箇所はモノクロラミン生成装置を設置し、2 箇所は手投入を行った。いずれもモノクロラミン濃度が 3 mg/L を下回らないように制御した。利用者への配慮として、モノクロラミン消毒を実施している旨を掲示した。一営業施設の協力を得て、井戸水を張った露天ひのき風呂において、生薬又は無機塩の薬湯にモノクロラミン消毒を行った。モノクロラミン生成装置を設置し、タイマー式の制御で管理した。比較として行った遊離塩素消毒では、退色が進むのに合わせて薬湯を追加投入した。浴槽水の湯色は目視又は吸光光度法により評価し、湯の香りは官能評価した。

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

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

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

#### 11. 公衆浴場施設におけるモノクロラミンによる消毒効果の検討

3 か所の入浴施設 ( 静岡県内東部地域 S 施設、中部地域 I 施設、西部地域 D 施設 ) および社会福祉施設の入浴設備で、モノクロラミン濃度を 3 mg/L に維持する 6 週間の消毒実証試験を行なった。それぞれの施設の泉質は S 施設が Na/塩化物泉 ( pH7.2 )、I 施設が Na/塩化物泉 ( pH7.8 )、D 施設が I /アンモニア態窒素/フミン質有機物/臭化物イオンを含む塩化物泉 ( pH8.1 )で、社会福祉施設は水道水を循環し、炭酸カルシウム天然石入りの人工温泉装置を備えていた。全施設とも、浴槽水の消毒薬はろ過器前に注入した。モノクロラミンは営業日の循環開始後から、ほぼ 1 時間 30 分間隔で計 8 回、営業終了時までタイマーで間欠的に注入された。また、毎週土曜日にはモノクロラミン濃度 10mg/L、2 時間循環による配管洗浄を実施し、その後換水した。

検体は、入浴施設については、毎週 1 回換水時の排水を S 施設 3 箇所、I 施設原泉、貯湯槽、浴槽水 6 箇所、D 施設 10 箇所から採水した。社会福祉施設は毎週水曜日の朝に、浴槽水、配管滞留水および配管水 ( 2 分排水後に採水 ) を採水した。

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

( 倫理面への配慮 )

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理

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

## C. 研究結果

### 1. レジオネラ属菌迅速検査法の評価

626 検体について LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 81.5%、特異度は 79.6%、一致率は 80.0%であり、平板培養法と相關する迅速検査法であった。205 検体について EMA-LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 69.1%、特異度は 85.3%、一致率は 81.0%であった。温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であった。

604 検体について qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 97.6%であり、平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のほとんどを検出できる迅速検査法であったが、特異度は 46.6%、一致率は 57.0%であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、EMA 処理を 2 回実施すると、特異度は 68.5%、一致率は 75.4%まで上昇した。

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

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

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

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

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

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

### 3. レジオネラ属菌検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の開発

現場検査への実用化を目指して、迅速検出法 (RDM) に携帯型フローサイトメーターとレジオネラ属菌用特異染色試薬を適用して改良型 (I-RDM) とし、そのレジオネラリスク評価方法としての有効性を調査した。I-RDM はレジオネラ・ニューモフィラ (LP) SG1 を用いた添加回収実験において、約  $10^2 \sim 10^5$  CFU/mL の範囲で培養法と高い相関 ( $y = 8.1799x^{0.8732}$ ,  $R^2 = 0.9544$ ) を示し、LP SG1 のほかに SG3、SG4、SG5、SG6、SG9、SG10 および型別不能株ならびにレジオネラ・デュモフィを検出することができた。本検査法の検出限界と定量限界はそれぞれ約 1,300 counts/100 mL および約 1,300 counts/mL と決定され、生菌数として 32 CFU/100 mL および 235 CFU/mL に相当していた。現地調査において浴槽水 76 試料を I-RDM 法と培養法で処理し、本方法の培養法に対するスクリーニングとしての有効性を検証したところ、その感度は 93.3%、特異度は 95.1%を示した。浴槽水を用いた LP の定量性については、I-RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し ( $R^2 = 0.65$ )、培養法の検出限界値 (10 CFU/100mL) 付近においてはやや高い値を示したものの定性的には妥当な成績を示した。

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

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

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

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

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

プロトコルを提供した 4 自治体で MLVA 法を実施したところ、MLVA 型が PFGE と SBT タイピングと相関する結果が得られた。

#### 5. 感染源解明のための環境調査

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

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

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

#### 6. 入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査

神奈川県内の 1 入浴施設において、カラン及び

シャワーにレジオネラ属菌による継続的な汚染が検出された。そこで、施設により対策が講じられ、その効果を検証した。カラン・シャワーの営業前の流水とシャワーヘッドの消毒ではレジオネラ属菌の汚染を取り除くことはできなかった。続いてカランおよびシャワーの交換を行ったが、検査によりレジオネラ属菌が検出された。さらに、高置貯湯槽とカラン・シャワー及びその間の配管に高濃度塩素消毒を施したところ、レジオネラ属菌は培養にて検出されなくなった。しかし、この効果は持続しなかったため、高置貯湯槽に入る配管に塩素添加装置を設置し、貯湯槽と配管中の温水を消毒する対策を行った。消毒開始後の調査では、培養によりレジオネラ属菌が検出されたため、平成 30 年度に調査を行ったところ、再度レジオネラ属菌が検出された。

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

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染問題に関するシンポジウムを平成 30 年に開催した。参加者に対してアンケート調査を実施した。

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

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

釈の位置等を検討したマニュアルを試験的に作成した。

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

## 8. レジオネラ属菌検査法の標準化に向けた取り組み

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

平成 29 年 5 月に改訂された ISO 11731 (水検体のレジオネラ検査法)で示された方法との調整を行い、公衆浴場の水質を担保するため、国から自治体に技術的助言として示すための検査法として「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法(案)」を提示した。

地方衛生研究所等を対象として、平成 28、30 年度に、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修 新興再興感染症技術研修」内で、実習を伴ったレジオネラ検査研修会を行った。

## 9. レジオネラ感染とアメーバ

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

ファゴソーム内活性酸素産生を阻害するアポシニン、およびリソゾームの内部 pH を中性化しその加水分解酵素作用を阻害する塩基性アミンのクロロキンならびに塩化アンモニウムはアメーバ感染率を増加させ、取り込まれた VNC 菌を生存させる可能性があることが示された。

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

## 10. モノクロラミン消毒の応用

pH8 から 10 の浴槽水において、機械的な添加

と手投入のいずれによっても、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌を抑制し、遊離塩素管理に比較して、衛生状態を良好に維持できた。換水頻度が低くても、レジオネラ属菌を抑制できていた。

生薬及び無機塩薬湯使用時にモノクロラミンは総残留塩素濃度 3mg/L 以上の維持が可能で、レジオネラ属菌は検出されなかった。薬湯の退色や香りの変化は認められず、薬湯の追加投入の必要がなかった。次亜塩素酸ナトリウムでは、薬湯の色を保持しながら、遊離残留塩素濃度を 0.4mg/L 以上に安定的に維持することは困難であった。モノクロラミン消毒を継続しておよそ 3 週目以降に従属栄養細菌数が増加し、 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL の濃度で推移した。R2A 寒天培地より釣菌した優占 3 コロニーのうち、2 株は *Mycobacterium phlei*、1 株は *Microbacterium aurum* (99.4% = 466/469) に近縁な *Microbacterium sp.* と同定された。

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

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

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

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



からレジオネラ属菌は検出されなかった。

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

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

静岡県内の検査機関及び行政担当者を対象に「レジオネラ属菌検査研修会」を 3 年間にわたり開催した。初年度は検査機関 19 機関 26 名、2 年目は検査機関 19 機関、県内の保健所等行政関係職員（静岡市及び浜松市を含む）24 名、3 年目は検査機関 15 機関、県内の行政関係職員 24 名が参加した。研修は講義と実習から成り、実習については検体の前処理法、接種、同定方法、遺伝子検査法を実施した。事前アンケートを実施したところ、各検査機関が実施している検査方法は検査機関ごとに大きく異なっていた。

#### D. 考察

レジオネラ属菌平板培養時に行う斜光法は高価かつ特殊な機器を必要とせず、培養 3 日後の時点で観察・同定し、速報することが可能となり、また、精度向上にもつながることから非常に有用な方法であることが確認できた。一方で、現状の平板培地培養には様々な発育条件の制約があり、生きているが培養できない VNC 菌の存在が知られている。レジオネラ症の把握のためにも、VNC 菌の実態の解明と VNC 菌培養促進技術の開発が必要である。

迅速検査法（LAMP 法、EMA-LAMP 法、qPCR 法および EMA qPCR 法、PALSAR 法）について、平板培養法の結果と比較し、評価した。温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。あるいは、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係ないと想定すれば、温泉検体

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

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

モノクロラミン消毒について、実証試験を行い、レジオネラ属菌に対して消毒効果がある結果が得られたが、モノクロラミンの濃度は、泉質、入浴者数、施設の配管の状態等に大きく影響を受けることから、実際の運用に当たってはそれぞれの施設に応じた対応をする必要があると思われる。pH8 から 10 のアルカリ性の浴槽水および生薬あるいは無機塩薬湯において、モノクロラミン消毒の効果を確認できた。換水頻度が低い場合は、雑

菌の増殖、すなわちバイオフィルムの蓄積が心配されることから、換水と洗浄を徹底する必要性が示唆された。また、水泳プールへのモノクロラミン消毒の適用が確認できた。長期換水を行わない場合は従属栄養細菌数の増加が心配されるため、週に1回の完全換水や洗浄をしない大型のプールにはその適用を考えず、換水洗浄ができる小型のプールにモノクロラミン消毒の適用が可能と考えられた。モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムと比較して、DNAを分解（あるいは変性）しないことから、モノクロラミン消毒下では、レジオネラが培養不検出であっても、LAMP法で高率に陽性となることがわかった。

モノクロラミン消毒についてのこれまでの研究成果を一般利用者と営業者にに向けて平易な表現で記述したWebページを公開した。モノクロラミン消毒の活用が期待される。

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

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

患者検体から最も多く分離されている *Legionella pneumophila* 血清群1 (*Lp1*) に対する抗血清で感作した免疫磁気ビーズ (*Lp1*-IMB) を用いた検体の選択的濃縮は、*Lp1* を検出する qPCR によるスクリーニングと組み

合わせることで、感染源調査に有用となると思われる。

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

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

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

## E. 結論

公衆浴場等施設の衛生管理の向上を目指して、研究を実施した。

浴槽、湯口、貯湯槽、シャワー、カラン、プール、採暖槽、冷却塔、河川等からの検水および道路沿い、屋内、浴室内の空気について培養検査および迅速検査を行い、レジオネラ属菌による汚染実態を明らかにし、その対策法を検討した。レジオネラ培養には斜光法を取り入れ、一部の検体には免疫磁気ビーズによる選択的濃縮法を適用した。レジオネラ属菌 DNA・RNA・表層抗原等を検出対象とする各種迅速検査法を検討し、手法の確立、感度の向上、時間の短縮を図った。

感染源の迅速な特定への有用性が期待される型別法である MLVA 法の確立と普及を図った。

pH8 から 10 のアルカリ性の浴槽水および生薬あるいは無機塩薬湯において、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌を抑制し、遊離塩素管理に比較して、衛生状態を良好に維持できた。モノクロ

ラミン消毒について、研究成果をわかりやすく記述し、Web ページで公開した。

レジオネラ外部精度管理サーベイを継続することで、各検査機関が継続してサーベイに参加する必要性を確認することができた。各種研修会でレジオネラ検査法の普及、検査精度の向上に努めた。

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

#### F. 健康危険情報

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

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

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yoshida M, Izumiyama S, Fukano H,

Sugiyama K, Suzuki M, Shibayama K, Hoshino Y. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium* sp. Strain shizuoka-1, a Novel *Mycobacterium* Isolated from Groundwater of a Bathing Facility in Shizuoka, Japan. *Genome Announc.* 2017 Nov 22;5(47).

- 2) 杉山寛治、長岡宏美、佐原啓二、神田 隆、久保田 明、縣 邦雄、小坂浩司、前川純子、遠藤卓郎、倉 文明、八木田健司、泉山信司、モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策、日本防菌防黴学会誌、295-300、Vol.45、No.6 (2017)
- 3) Ito A, Ishida T, Tachibana H, Ito Y, Takaiwa T, Fujii H, Hashimoto T, Nakajima H, Amemura-Maekawa J. A case of community-acquired pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 9 in which initial treatment with single-dose oral azithromycin appeared useful. *Jpn J Infect Dis.* 70:660-662, 2017.
- 4) Kanatani JI, Isobe J, Norimoto S, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M. Prevalence of *Legionella* species isolated from shower water in public bath facilities in Toyama Prefecture, Japan. *J Infect Chemother.* 23:265-270, 2017
- 5) Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. *Epidmiol. Infect.* 145:1398-1408, 2017.
- 6) Kuroki T, Amemura-Maekawa J, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee KI, Ohnishi M, Kura F. Outbreak of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella pneumophila* Serogroups 1 and 13. *Emerg Infect Dis.* 23(2): 349-351,

- 2017.
- 7) 磯部順子、金谷潤一、他：富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況（2015年）富山県衛生研究所年報．39:61-67、2016.
  - 8) 今野貴之、高橋志保、鈴木純恵、榎尾拓子、熊谷優子、木内雄、石井淳、前川純子、大西真、倉文明：2016年に多発傾向がみられたレジオネラ症の解析 秋田県．2017．病原微生物検出情報．38:22.
  - 9) 磯部順子、金谷潤一、他．2017．富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況（2016年）．富山県衛生研究所年報．40:61-66．
  - 10) 大屋日登美、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、古川一郎、前川純子、倉文明、泉山信司、黒木俊郎（2018）：医療機関の給水設備におけるレジオネラ属菌の汚染実態 日本感染症学雑誌 92:678-685.
  - 11) Amemura-Maekawa J、Kura F、Chida K、Ohya H、Kanatani J、Isobe J、Tanaka S、Nakajima H、Hiratsuka T、Yoshino S、Sakata M、Murai M、Ohnishi M、the Working Group for *Legionella* in Japan: *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. Appl Environmental Microbiol. 2018. 84(18). pii: e00721-18.
  - 12) 田中忍、中西典子、野本竜平、有川健太郎、瀨夏樹、岩本朋忠．温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証．神戸市環境保健研究所報 46: 39-42、2018.
  - 13) 磯部順子、金谷潤一、他．2018．富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況（2017年）．富山県衛生研究所年報．41:32-37
2. 総説
- 1) 倉文明．入浴施設等のレジオネラ対策にATP検査法を活用する．クリーンテクノロジー．2017. 27:27-31.
  - 2) 倉文明．環境におけるレジオネラの存在と感染予防策．最新医学．72:520-527、2017.
  - 3) 倉文明．レジオネラ感染．日本医師会雑誌．146．特別号(2)環境による健康リスク: S202-294、2017.
  - 4) 倉文明：講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 3. レジオネラ症の国内外の動向．防菌防黴誌 46(8):365-76、2018.
  - 5) 前川純子：講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 7. レジオネラ属菌の同定法と SBT (Sequence-Based Typing)．防菌防黴誌 47(1):29-35、2019.
  - 6) 杉山寛治：講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 8. 浴槽のレジオネラ対策 浴槽のどこで、どのように増えるのか．防菌防黴誌 47(2):83-89、2019.
  - 7) 杉山寛治：講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 9. 浴槽のレジオネラ対策 浴槽水の各種消毒方法の効果．防菌防黴誌 47(3):117-123、2019.
  - 8) 倉文明：トラブル解決編、水に関するトラブル．Infection Control、27(8):763-8、2018.
  - 9) 倉文明：いま公衆衛生を考える レジオネラ対策、環監未来塾．生活と環境 755:42-8、2018.
3. 書籍
- 1) 赤井仁志、井上浩章、枝川亜希子、小澤匡弘、倉文明、小瀬博之、関雅文、高貝健治、高橋佳代子、高橋幸雄、館田一博、長岡宏美、比嘉太、古畑勝則、前川純子、松鶴さとみ、松村佳明、宮下修行、柳宇．第4版レジオネラ症防止指針．公益財団法人日本建築衛生管理教育センター．平成29年7月．

#### 4. 学会発表

- 1) 黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、鈴木美雪、前川純子、倉文明、医療機関の給水系におけるレジオネラ属菌汚染調査、日本水道協会水道研究発表会、2016年11月、京都市。
- 2) 杉山寛治、長岡宏美、佐原啓二、和田裕久、土屋祐司、市村祐二、青木信和、神野透人、小坂浩司、泉山信司、八木田健司、縣邦雄、田中慶郎、前川純子、倉文明、モノクロラミン消毒の事前適合性試験の提案、防菌防黴学会、2016年9月、東京都。
- 3) 下郷晶子、水落慎吾、菓子田充明、森本 洋：各社 BCYE 寒天培地における *Legionella pneumophila* の発育性と培地接種方法による発育菌数への影響、日本防菌防黴学会第43回年次大会、2016年9月、東京
- 4) 泉山信司、倉文明、大屋日登美、黒木俊郎、病院の蛇口におけるレジオネラ汚染の検出、環境技術学会、2016年9月、姫路市
- 5) 黒木俊郎、大屋日登美、鈴木美雪、政岡智佳、古川一郎、前川純子、倉文明。医療機関の給水系におけるレジオネラ属菌汚染実態調査。第90回日本感染症学会学術講演会。2016年4月、仙台。
- 6) 牧田幸久、鈴木秀紀、森主博貴、松橋平太、柴田真也、長岡宏美、川森文彦、小澤匡宏、山内薫明、森 健、市村祐二、青木信和：モノクロラミンの浴槽水消毒条件の検討、静岡県公衆衛生研究会、静岡（2016）
- 7) T. Kuroki、 Y. Watanabe、 H. Teranishi、 S. Izumiyama、 J. Amemura-Maekawa、 and F. Kura. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. ESGLI 2016. Amsterdam、 September 2016.
- 8) Amemura-Maekawa J、 Chida K、 Ohya H、 Isobe J、 Kanatani JI、 Tanaka S、 Nakajima H、 Yoshino S、 Ohnishi M、 and Kura F: Characterization for clinical *Legionella* species by *Legionella* Reference Center in Japan. ESGLI 2016. Amsterdam、 September 2016.
- 9) 田中忍、中西典子、有川健太郎、岩本朋忠、都倉亮道：人工水系におけるレジオネラ属菌の分布状況と宿主アカントアメーバ中での増殖様式。第43回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会。平成28年12月、大阪。
- 10) 中西典子、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：温泉環境由来レジオネラ属菌の遺伝学的特徴と病原性遺伝子保有状況。第90回日本細菌学会総会。平成29年3月、仙台。
- 11) 中西典子、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：レジオネラ属菌の生活環境における分布状況と遺伝学的特徴。環境微生物系学会合同大会2017。平成29年8月、仙台。
- 12) Morinaka R、 Amemura-Maekawa J、 Kanatani J、 Isobe J、 Sasaki M、 Haraguchi H、 Futo S、 Kura F: Detection of *Legionella* spp. by new colorimetric PALSAR method. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
- 13) Amemura-Maekawa J、 Kuroki T、 Ohya H、 Furukawa I、 Suzuki M、 Masaoka T、 Aikawa K、 Hibi K、 Morita M、 Lee K、 Ohnishi M、 Kura F: Molecular and epidemiological analysis of *Legionella pneumophila* strains in an outbreak at bath facilities in Japan. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
- 14) Kura F、 Amemura-Maekawa J: *Legionella* detections in environments and their impacts on the occurrence of legionellosis in Japan. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
- 15) Kanatani J、 Isobe J、 Norimoto S、 Kimata K、 Uchida K、 Kura F、 Amemura-Maekawa J、 Watahiki M: Detection and identification of *Legionella*

- species in aerosols from the area nearby asphalt roads and bath water in public bath facilities in Toyama Prefecture、Japan. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
- 16) Isobe J、Kanatani J、Kimata K、Amemura-Maekawa J、Kura F、Watahiki M: Distribution of *Legionella* species in windshield washer fluid of motor vehicles in Toyama、Japan. 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
- 17) Taguri T、Cai G、Ebisu-Ojima H、Amemura-Maekawa J、Kura F: Breakpoint Chlorination as Control of *Legionella* (Leg) in Bath Water using flow cytometry 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Roma. September 2017.
- 18) Noriko Nakanishi、Shinobu Tanaka、Kentaro Arikawa、Tomotada Iwamoto: Distribution and molecular characteristics of *Legionella* spp. strains isolated from cooling tower and hot spring in Kobe City、Japan. The 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella. 平成 29 年 9 月、Italy Roma.
- 19) 柳本恵太、堀内雅人、植松香星、山上隆也、久田美子、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、泉山信司：アルカリ性温泉におけるモノクロラミン消毒の実証試験、第 20 回山梨県公衆衛生研究発表会、山梨県 (2018)
- 20) 柳本恵太、堀内雅人、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、山上隆也、植松香星、久田美子、泉山信司：アルカリ性温泉におけるモノクロラミン消毒の実証試験、平成 29 年度山梨県衛生環境研究所成果発表会、山梨県 (2018)
- 21) 泉山信司、市村祐二、青木信和、江口大介、杉山寛治、長岡宏美、水泳プールのモノクロラミン消毒の試み、環境技術学会、2017 年 7 月、東大阪市
- 22) 泉山信司、倉 文明、大屋日登美、黒木俊郎：病院の蛇口におけるレジオネラ汚染と対策、第 100 回日本細菌学会関東支部総会、2017 年 9 月、東京都。
- 23) 倉 文明：レジオネラ院内感染の国内外の動向、ランチタイム講演、講演会・シンポジウム「医療機関の給湯・給水系に潜むレジオネラ感染リスク～実態と予防策～」、2018 年 10 月、東京都。
- 24) 森中りえか、前川純子、加藤尚之、大野章、原口浩幸、高崎一人、布藤聡、倉文明。比色系パルサー法によるレジオネラ属菌検出の特異性について。日本防菌防黴学会第 45 回年次大会。2018 年 11 月、東京。
- 25) 磯部順子、金谷潤一、木全恵子、内田薫、綿引正則、小澤賢介、権平文夫、倉文明、前川純子。浴用水から *Legionella pneumophila* 血清群 1 を検出するための免疫磁気ビーズによる濃縮分離法の検討。日本防菌防黴学会第 45 回年次大会。2018 年 11 月、東京。
- 26) 田栗利紹、蔡国喜、下田貴宗、倉 文明、前川純子。遊離塩素消毒下の入浴施設におけるレジオネラニューモフィラの生死スクリーニングを伴ったオンサイト半定量解析。日本防菌防黴学会第 45 回年次大会。2018 年 11 月、東京。
- 27) 金谷潤一、綿引正則、木全恵子、加藤智子、内田 薫、倉 文明、前川純子、磯部順子。大気エアロゾル中のレジオネラ属菌検出状況。日本防菌防黴学会第 45 回年次大会。2018 年 11 月、東京。
- 28) 柳本恵太、堀内雅人、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、山上隆也、植松香星、久田美子、泉山信司：pH10 のアルカリ性温泉におけるモノクロラミンの消毒効果、日本防菌防黴学会第 45 回年次大会、2018 年 11 月、東京都
- 29) 大河内由美子、前川純子、泉山信司。貯

- 水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会. 2018 年 11 月、東京.
- 30) 渡邊貴明、松田宗大、小倉徹、植園健一、松田尚子、枝川亜希子、泉山信司、藤井明、循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について、日本防菌防黴学会、2018 年 11 月、東京都
- 31) 小倉徹、植園健一、渡邊貴明、松田宗大、原口浩幸、森中りえか、枝川亜希子、藤井明、モノクロラミン及び次亜塩素酸ナトリウム消毒下におけるレジオネラ属菌の LAMP 法結果に及ぼす影響、日本防菌防黴学会、2018 年 11 月、東京都
- 32) Fumiaki Kura and Junko Amemura-Maekawa. Sources of infection and settings in outbreaks of legionellosis --- Japan, 2000-2017. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.
- 33) Toshitsugu Taguri、Cai Guoxi、Hiroko Ebisu-Ojima、Fumiaki Kura、and Junko Amemura-Maekawa. On-site inspection method for *Legionella pneumophila* in bath water. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.
- 34) Junko Isobe、Jun-ichi Kanatani、Keiko Kimata、Kaoru Uchida、Masanori Watahiki、Fumiaki Kura、Junko Amemura-Maekawa. Evaluation of an immunomagnetic separation method to detect *Legionella pneumophila* serogroup 1 from environmental specimens. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.
- 35) 倉 文明：レジオネラ症に関する最近の話題、特別講演、平成 30 年度（第 40 回）全国環境衛生職員団体協議会関東ブロック会研究発表会、2019 年 2 月、高崎.
- 36) 倉 文明：わかりやすいレジオネラの話：医療機関に潜む感染リスク、教育講演（モーニングセミナー）、第 34 回日本環境感  
染学会総会、2019 年 2 月、神戸.
- 37) 佐々木麻里、神田由子、後藤高志、成松浩志：あるレジオネラ症集団発生における積極的疫学調査、第 64 回大分県公衆衛生学会、2019 年 3 月、大分.
- 38) 中西典子、野本竜平、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：冷却塔に定着する *Legionella pneumophila* のゲノム分子疫学. 第 13 回日本ゲノム微生物学会.平成 31 年 3 月、東京.
- 39) 藤井明、渡邊貴明、松田宗大、松田尚子、小倉徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、薬湯使用時におけるモノクロラミン消毒の有用性評価、第 46 回建築物環境衛生管理全国大会、2019 年 1 月、東京.
- 40) 前川純子：レジオネラ. 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会シンポジウム「不思議なミクロの世界 目からウロコの微生物学講座」, 2019 年 2 月、東京.

#### 4. 研修会

- 1) 森本 洋：レジオネラ検査研修会、北海道立保健所試験検査課研修、2016 年 6 月、北海道
- 2) 杉山寛治：平成 28 年度第 2 回衛生環境研究所感染症等研修会、山梨県衛生環境研究所主催、2016 年 12 月 7 日、山梨県甲府市.
- 3) 杉山寛治：平成 28 年度神戸市保健所研修会、神戸市保健福祉局健康部生活衛生課主催、2017 年 2 月 16、17 日、兵庫県神戸市.
- 4) 杉山寛治：南加賀モノクロラミン講習会、石川県南加賀保健福祉センター主催、2017 年 3 月 2 日、石川県加賀市、3 月 3 日、石川県小松市.
- 5) 杉山寛治：千葉市保健所研修会、2017 年 3 月 13 日、千葉県千葉市.
- 6) 長岡宏美：平成 27 年度生活衛生関係技術担当者研修会、厚生労働省健康局生活衛生課主催、2016 年 2 月 5 日、東京都千代田区
- 7) 佐々木麻里：レジオネラ症に係る最近の知見と検査の取り組み、平成 28 年度環境監視員担当者会議、2016 年 4 月、大分.
- 8) 前川純子、森本 洋、金谷潤一、八木田健

- 司、倉 文明、磯部順子、佐々木麻里、緒方喜久代、他：レジオネラ検査法、レジオネラ属菌培養法概論、迅速診断検査法概論、環境中のアメーバとレジオネラ感染、レジオネラ感染症総論、臨床検体（喀痰）検査法、他：国立保健医療科学院平成 28 年度短期研修新興・再興研修、2016 年 10 月 3-7 日、東京。
- 9) 倉 文明、森本 洋、縣 邦雄、他：レジオネラ症の国際動向、レジオネラの検査法と外部精度管理、配管洗浄の方法、他：平成 28 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2017 年 2 月 6 日、東京。
- 10) 倉 文明：レジオネラ属菌の検査と対策、平成 28 年度短期研修環境衛生監視指導、2016 年 11 月 17 日、東京。
- 11) 倉 文明：レジオネラ症の最近の話題と動向、岡山県レジオネラ属菌対策研修、2016 年 7 月 15 日、岡山。
- 12) 前川純子、森本 洋、他：レジオネラ属菌検査の現状と今後の方向性、レジオネラ属菌検査における結果の変動要因と手技のポイント、他：レジオネラ属菌検査セミナー（主催：日水製薬株式会社）2016 年 7 月 14 日、東京。
- 13) 倉 文明、森本 洋、他：ISO11731 の改訂とレジオネラ属菌検査外部精度管理の動向、レジオネラ属菌培養法について、他：レジオネラ属菌検査セミナー（主催：日水製薬株式会社）2017 年 3 月 10 日、東京。
- 14) 前川純子：レジオネラ症集団感染事例、平成 28 年度レジオネラ対策講習会、東京都多摩府中保健所主催、2016 年 2 月 27、28 日、東京。
- 15) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 29 年度環境監視員担当者会議、2017 年 4 月、大分。
- 16) 佐々木麻里：大分県のレジオネラ症とレジオネラ検査について、レジオネラ症防止対策講習会、2017 年 11 月、大分。
- 17) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 29 年度第 2 回保健所等検査技師研修会、2018 年 2 月、大分。
- 18) 倉 文明、平塚貴大、黒木俊郎、他：最近のレジオネラ症の発生動向と検査方法、2017 年に広島県内で発生したレジオネラ症集団感染事案について、給水・給湯系におけるレジオネラ汚染の実態、他：平成 29 年度生活衛生関係技術担当者研修会（厚生労働省健康局生活衛生課）2018 年 2 月 1 日、東京。
- 19) 倉 文明：レジオネラ属菌の検査と対策 - 温泉入浴施設・迅速検査・取組状況 -、国立保健医療科学院平成 29 年度短期研修環境衛生監視指導、2017 年 11 月、和光市。
- 20) 倉 文明：冷却塔等のレジオネラ症対策について、平成 29 年度東京都ビル衛生検査技術研修、2018 年 3 月、東京。
- 21) 森本 洋：レジオネラ感染症とその衛生対策について、平成 29 年度 道南獣医師会公衆衛生講習会、2018 年 2 月、北海道。
- 22) 前川純子、森本 洋、他：レジオネラ属菌検査法の現状、レジオネラ属菌培養検査について、他：レジオネラ属菌検査セミナー（主催：日水製薬株式会社）2018 年 3 月 14 日、東京。
- 23) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 30 年度環境監視員担当者会議、2018 年 4 月、大分。
- 24) 佐々木麻里：大分県のレジオネラ症とレジオネラ検査について、レジオネラ症防止対策講習会、2018 年 9 月、大分。
- 25) 柳本恵太：県内の公衆浴場におけるモノクロラミン消毒検証について、山梨県衛生環境研究所感染症等研修会、2018 年 11 月。
- 26) 佐々木麻里：加湿器を原因とした老人福祉施設でのレジオネラ症集団発生事例～検査について～、平成 30 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2019 年 2 月、東京。
- 27) 倉 文明：いま公衆衛生を考える レジオネラ対策、環監未来塾、2018 年 7 月、東京都。
- 28) 倉 文明：レジオネラ属菌の検査と対策、国立保健医療科学院平成 30 年度短期研修



- 環境衛生監視指導研修、2018年11月、和光.
- 29) 倉 文明：宿泊施設のレジオネラ対策、日本環境衛生センター第1回保健所環境衛生監視員講座、2018年11月、東京都.
- 30) 前川純子、森本 洋、磯部順子、佐々木麻里、金谷潤一、倉 文明、緒方喜久代、他：レジオネラ検査法、レジオネラ培養法概論、迅速診断法、レジオネラ分子疫学、レジオネラ感染症総論、他：国立保健医療科学院平成30年度短期研修新興・再興研修、2018年10月15-19日、東京.
- 31) 前川純子：培養法と遺伝子検査法の特徴と実際の検査事例. 第34回レジオネラ対策シンポジウム(主催：NPO 法人入浴施設衛生管理推進協議会)、2018年6月、東京.
- 32) 前川純子、森本 洋、他：レジオネラ検査法の現状と今後の展望、レジオネラ属菌培養検査について、他：レジオネラ属菌検査セミナー(主催：日水製薬株式会社)、2019年3月、東京.
- 33) 前川純子、倉 文明：最近のレジオネラ症の発生動向と検査方法. 抗レジオネラ用空調水処理剤協議会講演会. 2019年1月、東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特許申請
1. 藤野敬介、泉山信司、特願 2016-233947、モノハロゲノアミン製造用組成物
  2. 花王、特願 2016-225469、モノハロゲノアミンの製造方法
  3. 花王、特願 2016-225470、モノハロゲノアミン製造用固体組成物
  4. 花王、特願 2016-225471、モノハロゲノアミン製造用被覆粒子群
  5. 花王、特願 2016-225472、モノハロゲノアミン製造用組成物
- 実用新案登録、その他  
なし

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

総合研究報告書  
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	川野 みどり	長崎県環境保健研究センター
武藤 千恵子	東京都健康安全研究センター	山口 友美	宮城県保健環境センター
淀谷 雄亮	川崎市健康安全研究所	上野 潤二	栄研化学株式会社
東出 誠司	栄研化学株式会社	中筋 愛	タカラバイオ株式会社
吉崎 美和	タカラバイオ株式会社	原口 浩幸	株式会社ファスマック
森中 りえか	株式会社ファスマック		

研究要旨

本研究では、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、(EMA-) LAMP 法、(EMA-) qPCR 法(EMA 処理を 0、1 および 2 回実施)、PALSAR 法および RT-qPCR 法について、浴槽水などの実検体 906 検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。

626 検体について LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 81.5%、特異度は 79.6%、一致率は 80.0% であり、平板培養法と相関する迅速検査法であった。205 検体について EMA-LAMP 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 69.1%、特異度は 85.3%、一致率は 81.0% であった。温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法は、感度の低下を防ぐために、N = 2 で実施するのが望ましいと考えられた。

604 検体について qPCR 法を実施した結果、平板培養法に対する感度は 97.6% であり、平板培養陽性検体 (10 CFU/100 ml 以上) のほとんどを検出できる迅速検査法であったが、特異度は 46.6%、一致率は 57.0% であり、死菌 DNA を検出している検体が多かった。一方、EMA 処理を 2 回実施すると、特異度は 68.5%、一致率は 75.4% まで上昇したため、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。ただし、EMA 処理回数は、1 回と 2 回で結果に有意な差はなかったことから、実用上 EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。

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

カラン水検体においては、感度が 37.5%と低かった。

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

## 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>、市販されている。ただし、LAMP法については、EMA処理による検討はあまり報告されていない。

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。しかしながら、これまでの結果から、PALSAR法については、感度の向上が必要であることが判明している<sup>3)</sup>。

今回、レジオネラ属菌迅速検査法の標準化のため、(EMA-) LAMP法、(EMA-) qPCR法およびPALSAR法について、浴槽水などの実検体を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行った。また、実検体から抽出したRNAを用いて定量逆転写PCR (RT-qPCR) を行い、PALSAR法における感度低下の原因を調査した。

## B 材料と方法

### 1 検査材料

全国6か所の地方衛生研究所 (機関A~F) に

おいて、平成28~30年度に浴用施設などから906検体の試料を採取し、迅速検査法の検討に用いた (表1)。検体の内訳は、浴槽水が616検体 (68.0%)、シャワー水が91検体 (10.0%)、採暖槽水が68検体 (7.5%)、湯口水が62検体 (6.8%)、カラシ水が30検体 (3.3%)、その他の検体 (プール水、冷却塔水など) が39検体 (4.3%) であった。

### 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 (EMA-) LAMP法

LAMP法は、Loopampレジオネラ検出試薬キットE (栄研化学) を使用し、添付の取扱説明書に従い実施した。EMA-LAMP法は、図1に従って実施した。いずれの方法においても、遺伝子が検出された場合を陽性と判定した。また、EMA-LAMP法は、124/205検体 (60.5%) はN=2で実施した。

### 4 (EMA-) qPCR法

qPCR法は、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) および 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) および LED Crosslinker 12 (タカラバイオ) を用いて、EMA処理を1および2回実施した。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。なお、qPCR法におけるレジオネラ属菌1 CFU相当から得られる16S rRNA遺伝子量は、取扱説明書を参照した。

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

*L. pneumophila* 長崎80-045株をBCYE 寒天培地で30~4日間培養後、生理食塩水でMcFarland No. 2濁度の菌液 (約10<sup>9</sup> CFU/ml) を調製した。その菌液を10倍段階希釈し、-1~-6乗段階の

希釈液を EMA 処理後、Lysis Buffer for *Legionella*、NucleoSpin Tissue XS (タカラバイオ) でそれぞれ DNA 抽出し、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いて N = 3 で測定した。

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

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

近年発売された TP950 について、Thermal Cycler Dice Real Time System II (TP900)との相関を見るため、上述した 16S rRNA 遺伝子コピー数決定のための DNA 検体と、平成 27 年度に抽出した LC EMA-qPCR 用 DNA 検体、平成 28 年度に抽出した qPCR および EMA-qPCR 用 DNA 検体をそれぞれ 20 検体ランダムに選択し、両方の機器で測定した (TP900 は fast mode、TP950 は normal および fast mode で実施) 。なお、TP950 の fast mode では、アニーリング時間を 10 秒から 20 秒に変更して実施した。

#### 7 PALSAR 法

PALSAR 法は、100 倍濃縮検体 4 ml を遠心後、上清を除去し、添付の取扱説明書に従い実施した。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。

#### 8 RT-qPCR 法

RT-qPCR 法は、烏谷らの方法に従って実施した<sup>4)</sup>。検量線は、*L. pneumophila* 長崎 80-045 株を用いて作成した。菌株を BCYE 寒天培地で 30 4 日間培養後、生理食塩水で調製した McFarland No. 2 濁度の菌液 (約  $10^9$  CFU/ml) を 10 倍段階希釈し、 $10^{-1}$  ~  $10^{-8}$  乗段階の希釈液を用いて RNA を抽出した。

(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

906 検体について検査した結果、213 検体 (23.5%) 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 117 検体 (12.9%)、100 ~ 999 CFU/100 ml が 65 検体 (7.2%)、1,000 CFU/100 ml 以上が 31 検体 (3.4%) であった。最も多かった検体では、58,000 CFU/100 ml のレジオネラ属菌が検出された。分離菌の血清群別を実施した結果、*L. pneumophila* 血清群 (SG) 6 が 72 検体から分離され、最も多かった (表 3)。次に多かったのは、*L. pneumophila* SG 1 (68 検体)、*L. pneumophila* SG 5 (57 検体)、*L. pneumophila* SG 3 (46 検体) であった。また、*L. pneumophila* 以外の菌種が 48 検体から分離された。このうち、1 検体からは 3 菌種、9 検体からは 2 菌種が分離された。

#### 2 LAMP 法による結果

LAMP 法を用いた 626 検体について、平板培養法と比較した (表 4a)。LAMP 法は平板培養法に対して、感度 81.5%、特異度 79.6%、陽性的中率 54.8%、陰性的中率 93.4%、一致率 80.0% であった。

#### 3 EMA-LAMP 法による結果

205 検体について、EMA-LAMP 法を実施した (表 4b および 4c、EMA 未処理は 76 検体について実施)。EMA 未処理の場合、平板培養法に対して感度 86.7%、特異度 54.1%、陽性的中率 31.7%、陰性的中率 94.3%、一致率 60.5% であった。EMA 処理を実施することで、感度 69.1%、特異度 85.3%、陽性的中率 63.3%、陰性的中率 88.3%、一致率 81.0% となった。

#### 4 (EMA-) 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数は 27 であった (表 5)。このうち、12 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml と検出下限値であった。一方、平板培養法での菌数が 50 CFU/100 ml 以上であった 7 検体のうち、5 検体は温泉であり、6 検体は機関 D で実施した浴槽水および湯口水であった。

平板培養法で陽性となったが、EMA-LAMP 法

で陰性となった検体数は 17 であった (表 6)。このうち、8 検体は平板培養法での菌数が 10 CFU/100 ml と検出下限値であった。一方、平板培養法での菌数が 50 CFU/100 ml 以上であった 7 検体は、すべて温泉であった。また、6 検体は機関 D で実施した浴槽水および湯口水であった。

泉種別に結果を見ると、温泉を対象とした場合、LAMP 法の感度は 91.7% であったのに対し、EMA-LAMP 法の感度は 70.6% であった (表 7)。一方、水道水などを対象とした場合、LAMP 法の感度は 70.0%、EMA-LAMP 法の感度は 66.7% であった。

#### 5 (EMA-) qPCR 法による結果

(EMA-) qPCR 法を用いた各検体について、それぞれ平板培養法と比較した (表 8)。604 検体について qPCR 法を検討した結果、平板培養法に対する感度は 97.6%、特異度は 46.6%、陽性的中率は 31.8%、陰性的中率は 98.7%、一致率は 57.0% であった。613 検体について EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) を検討した結果、平板培養法に対する感度は 91.1%、特異度は 61.1%、陽性的中率は 37.3%、陰性的中率は 96.5%、一致率は 67.2% であった。126 検体について EMA-qPCR 法 (EMA 処理 2 回) を検討した結果、平板培養法に対する感度は 94.1%、特異度は 68.5%、陽性的中率は 52.5%、陰性的中率は 96.9%、一致率は 75.4% であった。

平板培養レジオネラ属菌の 10 倍段階希釈液を EMA 処理して作成した検量線を図 2 に示した。プラスミド DNA と、Lysis Buffer for *Legionella*、NucleoSpin Tissue XS で抽出した DNA の回帰直線を比較すると、傾きはほぼ平行関係にあり、増幅効率に大きな差がないことが確認された。得られた切片の差が Lysis Buffer for *Legionella* で 1.662、NucleoSpin Tissue XS で 1.846 であったことから (プラスミドの切片と抽出 DNA の切片の差) 各 DNA 抽出キットを用いて 30 培養 4 日目の菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、抽出効率や増幅効率を含めてプラスミド 3 コ

ピー ( $2^{1.662} = 3.2$ 、Lysis Buffer for *Legionella*) および 4 コピー ( $2^{1.846} = 3.6$ 、NucleoSpin Tissue XS) に相当するものと計算された。

実検体を用いた qPCR 法および EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) と平板培養法との菌数 (定量値) の相関は、 $R^2 = 0.2316$  および  $R^2 = 0.2426$  であった (図 3)。

#### 6 TP900 と TP950 を用いた測定値の比較

平板培養レジオネラ属菌の 10 倍段階希釈液を用いて作成した機器別の検量線を図 4 に示した。機器、測定モード、DNA 抽出法による大きな差は認められなかった。実検体を用いた比較を図 5 に示した。qPCR 法および EMA-qPCR 法では、TP900 よりも TP950 の normal mode および fast mode の方がやや定量値が高い傾向であったが、概ね同等の定量値であった。

#### 7 PALSAR 法による結果

PALSAR 法を用いた 216 検体について、平板培養法と比較した (表 9)。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、シャワー水および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。

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 10 に示した。シャワー水およびカラン水以外の 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反応を阻害する要因の存在が示唆された。シャワー水およびカラン水検体については、平板培養法の菌数が 50 CFU/100 ml 以下の 5 検体全てで PALSAR 法が陰性となった。

#### 8 RT-qPCR 法による結果

RT-qPCR 法を用いた 92 検体について、平板培

養法と定量値および菌数を比較した(図6)。検体別に見ると、浴槽水49検体を対象とした場合、 $R^2$ 値は0.3842であった。一方、シャワー水およびカラン水43検体を対象とした場合、 $R^2$ 値は0.1775であった。

#### D 考察

3年間で、各種迅速検査法[(EMA-) LAMP法、(EMA-) qPCR法(EMA処理0、1および2回)、PALSAR法およびRT-qPCR法]について、平板培養法の結果と比較し、評価した。また、EMA-qPCR法(EMA処理1回)におけるレジオネラ属菌1CFUあたりの16S rRNA遺伝子コピー数の決定、近年発売されたThermal Cycler Dice Real Time System III (TP950)とThermal Cycler Dice Real Time System II (TP900)との性能比較も行った。

LAMP法では、平板培養法に対する感度は81.5%であった。LAMP法における偽陰性検体の半数近く(12/27検体)は、平板培養法での菌数が検出下限値の10CFU/100mlであったことから、各種検査に検体を分取する際のばらつきの影響が考えられた。LAMP法は、一致率80.0%、陰性的中率93.4%であることから、迅速検査法として有用であると考えられた。しかしながら、2検体においては、平板培養法で1,000CFU/100ml以上のレジオネラ属菌数が検出されたが、LAMP法は陰性であった。ただし、これらの検体には、LAMP法では検出できない*L. londiniensis*や、感度の低い*L. micdadei*が含まれていた。*L. micdadei*が検出された検体は、菌数が7,520CFU/100mlであったが、その他の菌種としては、Lp1が1コロニー検出されたのみであった(10CFU/100ml相当、データ未掲載)。したがって、LAMP法で検出できない(感度が低い)菌種が多く生息しており、陰性となった可能性が考えられた。また、特定の地域の温泉検体においては、反応阻害などの影響が考えられる結果であったため、LAMP法実施の際には、反応阻害の有無の確認が重要であ

る。

EMA-LAMP法については、平成28~29年度の検討結果から、濃縮倍率、EMA処理濃度などプロトコルを改良し、平成30年度に実検体を用いて評価した。その結果、感度は69.1%とLAMP法より低かったものの、特異度は85.3%まで上昇した。LAMP法と同様に、EMA-LAMP法における偽陰性検体の約半数(8/17検体)は、平板培養法での菌数が検出下限値の10CFU/100mlであった。それ以外の偽陰性検体のほとんど(7/9検体)は、機関Dで温泉検体を対象に検査した結果であった。全体として、温泉を対象とした場合、EMA-LAMP法の感度が低下する傾向であった。温泉成分がEMA処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対するEMA処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP法に用いるDNAが抽出されやすかったため、LAMP法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP法をN=2で実施し、EMA-LAMP法および平板培養法が陽性となった24検体のうち、9検体(37.5%)は1回のみ増幅反応が認められた(データ未掲載)。EMA-LAMP法の感度低下を防ぐためには、N=2で実施するのが望ましいと考えられた。

qPCR法は、平板培養法に対する感度は97.6%であり、平板培養陽性検体(10CFU/100ml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46.6%、一致率は57.0%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処理を1および2回と実施することで、特異度は68.5%、一致率は75.4%まで上昇したため、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關する迅速検査法となったと考えられた。EMA処理回数は、1回と2回で、一致率に差がある傾向(カイ二乗検定、 $P = 0.07$ )はあったが、同一検体(126検体)での比較において有意な差はなかつ

たことから（カイ二乗検定、 $P = 0.48$ 、データは H30 分担研究報告書に記載）実用上 EMA 処理回数は 1 回で十分であると考えられた。

EMA-qPCR 法（EMA 処理 1 回）と平板培養法における菌数（定量値）の比較は、 $R^2 = 0.2426$  であり、qPCR 法（ $R^2 = 0.2316$ ）と同等であった。これらの値は、過去に検討した LC EMA-qPCR 法と平板培養法における値（ $R^2 = 0.6672$ ）<sup>5)</sup>よりも低かったため、平板培養法の菌数を反映する方法としては、LC EMA-qPCR 法の方が優れていた。

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

PALSAR 法については、平成 28 年度の検討結果から、濃縮倍率、溶菌条件などプロトコルを改良（取扱説明書にも反映）し、平成 29 年度に実検体を用いて評価した。その結果、平板培養法に対する感度は 77.2% となった。とりわけシャワー水および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 法と同等であった。特異度および一致率は約 7 割、陰性的中率は約 9 割であったため、シャワー水およびカラン水以外の検体を対象とした場合は、PALSAR 法は平板培養法と相関していると考えられた。

一方、シャワー水およびカラン水については、感度が 37.5%（3/8 検体）と低かった。また、RT-qPCR 法の結果から、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 RNA 量は、浴槽水より全体的に低い傾向であった。したがって、シャワー水およびカラン水中のレジオネラ属菌 1 CFU あたりの RNA 量は、浴槽水より少ない可能性が考えられた。検査に用いたシャワー水およびカラン水は、80% 以上（36/43 検体）が混合水栓であり、

レジオネラ属菌の増殖に適した温度である 37 付近で滞留している検体が少ないと考えられた。そのため、レジオネラ属菌の遺伝子発現量が低かった可能性が考えられた。PALSAR 法は、現時点では、シャワーおよびカラン水以外を対象として使用するのが望ましい。

LAMP 法、(EMA-) qPCR 法、PALSAR 法（シャワーおよびカラン水以外を対象）は、いずれの方法においても陰性的中率が 90% 以上であり、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、EMA-LAMP 法は、LAMP 法と比較し、感度はやや低下するが、特異度および一致率は上昇する方法であった。

## 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。

LAMP 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。EMA-LAMP 法は、LAMP 法より平板培養法と相関する方法であったが、感度はやや低下した。

温泉を対象とした場合、EMA-LAMP 法の感度が低下する傾向であったため、温泉成分が EMA 処理やその後の遺伝子増幅反応に影響を与えている可能性が考えられた。一方で、死菌に対する EMA 処理効果は泉質に関係なく一定であると想定した場合、温泉検体には、膜構造が損傷しているレジオネラ属菌が多く、LAMP 法に用いる DNA が抽出されやすかったため、LAMP 法の感度が高かった可能性も考えられた。また、EMA-LAMP 法の感度低下を防ぐために、 $N = 2$  で実施するのが望ましいと考えられた。

qPCR 法は、平板培養陽性検体（10 CFU/100 ml 以上）のすべてを検出できる迅速検査法であったが、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。実用上、



EMA 処理回数は1回で十分であると考えられた。

EMA-qPCR 法 (EMA 処理 1 回) と平板培養法における菌数 (定量値) の比較値 ( $R^2 = 0.2426$ ) は、過去に検討した LC EMA-qPCR 法と平板培養法における値 ( $R^2 = 0.6672$ ) よりも低かったため、平板培養法の菌数を反映する方法としては、LC EMA-qPCR 法の方が優れていた。

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

PALSAR 法は、シャワーおよびカラン水以外を対象として使用することで、平板培養法と関連する方法であることが明らかとなった。

#### 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、レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究、厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業 平成 27 年度 総括・分担研究報告書、61-70.
- 4) 烏谷 竜哉 他、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の改良、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、59-69.

5) 磯部 順子 他、レジオネラ属菌迅速検査法の評価、レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究、厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業 平成 25-27 年度 総合研究報告書、53-60.

#### 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	F	
検体内訳	浴槽水	128	56	84	74	173	101	616
	湯口水				62			62
	採暖槽水		68					68
	シャワー水	89	2					91
	カラン水	30						30
	その他		5	14			20	39
	計		247	131	98	136	173	121
検査方法	LAMP							
	EMA-LAMP (EMA未処理)							
	EMA-LAMP (EMA処理)							
	qPCR							
	EMA-qPCR (EMA処理1回)							
	EMA-qPCR (EMA処理2回)							
	PALSAR RT-qPCR							

図1. EMA-LAMP法プロトコル

100倍濃縮液1.5 ml×2本

遠心(13,000×g, 4、5分)

上清1 ml除去

残った500 µlを用いて懸濁後、1本にまとめる(300倍濃縮液1 ml)

遠心(13,000×g, 4、5分)

上清950 µl除去

2% Yeast Extractを50 µl添加後、ピペティングで懸濁

EMA溶液(302.5 µg/ml)を10 µl添加後、十分に混和(終濃度27.5 µg/ml)  
(7回タッピング後、スナップを利かせて1回だけ手で振り落とす)

遮光して室温放置15分  
(4分毎に7回タッピングし、スナップを利かせて1回だけ手で振り落とす)

光照射15分(LED Crosslinker 12使用)

遠心(13,000×g, 4、5分)

10 µl程度残して上清除去

10% Chelex溶液を40 µl添加(添加後はピペティング禁止)

ボルテックス後、スピンドウン

加熱(95、10分)

氷上静置2分

ボルテックス後、遠心(13,000×g, 4、10分)

上清25 µl回収

EMA未処理の場合は実施せず

表2. 平板培養法による検出率

菌数 (CFU/100 ml)	検体数	(%)
10未満	693	(76.5)
10-99	117	(12.9)
100-999	65	(7.2)
1,000以上	31	(3.4)
計	906	(100)

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L. pneumophila</i>	
SG 6	72
SG 1	68
SG 5	57
SG 3	46
SG 4	35
SG 9	21
SG 8	18
SG 15	18
SG 2	12
SG 7	7
SG 13	5
SG 10	2
SG 12	2
SG 14	1
UT	64
<i>L. micdadei</i>	7
<i>L. londiniensis</i>	5
<i>L. gormanii</i>	3
<i>L. dumoffii</i>	2
<i>L. bozemanii</i>	1
<i>L. oakridgensis</i>	1
<i>Legionella</i> spp.	40

表4. 平板培養法と (EMA-) LAMP法との比較

a. LAMP法

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	119	98	217
陰性	27	382	409
計	146	480	626

感度81.5%、特異度79.6%、陽性的中率54.8%、陰性的中率93.4%、一致率80.0%

b. EMA-LAMP法 (EMA未処理)

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	13	28	41
陰性	2	33	35
計	15	61	76

感度86.7%、特異度54.1%、陽性的中率31.7%、陰性的中率94.3%、一致率60.5%

c. EMA-LAMP法 (EMA処理)

	平板培養法 (CFU/100 ml)		計
	10	< 10	
陽性	38	22	60
陰性	17	128	145
計	55	150	205

感度69.1%、特異度85.3%、陽性的中率63.3%、陰性的中率88.3%、一致率81.0%

表5. LAMP法における偽陰性検体

No.	施設	年	検体	泉質など	湯温 ( )	残塩 (mg/l)	pH	ATP (/10 ml)	平板培養法 (CFU/100 ml)	血清型	LAMP法 (EMA処理)	EMA-LAMP法 (EMA未処理)	EMA-LAMP法 (EMA処理)	EMA-LAMP法 (EMA未処理)	qPCR法	EMA-qPCR法 (1回)	EMA-qPCR法 (2回)	PALSAR法
1	A	H29	シャワー水	水道水	40	0.1	7.58	10	10	Lp UT	-	NT	NT	NT	+	+	NT	NT
2	A	H29	浴槽水	温泉	45.3	0.05未満	7.19	10	10	Lp 5	-	NT	NT	NT	+	-	NT	-
3	E	H29	浴槽水	温泉	35.8	<0.1	7.79	10	10	Lp UT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
4	B	H29	採暖槽水	白湯	36.8	0.8	8.27	10	10	Lp 1	-	NT	NT	NT	-	-	NT	+
5	B	H29	採暖槽水	白湯	42	2	7.98	12	10	Lp 1	-	-	-	-	+	+	NT	-
6	A	H30	浴槽水	温泉	32.5	2	7.98	11	10	Lp 1	-	-	-	-	+	+	NT	NT
7	B	H30	採暖槽水	水道水	39	0.5		11	10	Lp 1	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8	A	H30	浴槽水	白湯	40	0		12	10	Lp 3	-	+	+	+	+	+	+	NT
9	A	H30	カラシ水	井戸水	42.0	0.2		20	10	Lp 5	-	+	+	+	+	+	+	NT
10	A	H30	シャワー水	水道水	37.2	0.0		24	10	Lp 5	-	+	+	+	+	+	+	NT
11	A	H30	カラシ水	水道水	31.0	0.6		11	10	Lp 3	-	NT	NT	NT	+	+	+	NT
12	F	H28	浴槽水	井戸水	42.0	0.5	7.41	20	20	Lp 5	-	NT	NT	NT	+	+	+	NT
13	F	H28	その他	ブルー水	41.5	0.1		22	22	Lp 1, Lp 5, Lp 6	-	NT	NT	NT	+	+	+	NT
14	A	H29	カラシ水	水道水	40.0	1.5		27	27	Lp 5, Lp 6, L. sp	-	NT	NT	NT	+	+	+	NT
15	F	H28	浴槽水	水道水	39.7	0.5		30	30	Lp 3, Lp 5	-	NT	NT	NT	+	+	+	NT
16	F	H28	浴槽水	水道水	42.0	0.07	8.22	7	30	Lp UT	-	NT	NT	NT	+	+	+	NT
17	F	H28	浴槽水	井戸水	42.0	0.1		34	34	Lp 5, Lp 6	-	+	+	+	+	+	+	NT
18	A	H29	シャワー水	井戸水	40.4	0.8		50	50	Lp 4, Lp 9, L. oakridgensis	-	NT	NT	NT	+	+	+	NT
19	A	H30	カラシ水	井戸水	44	0.27		50	50	Lp 3	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+
20	F	H28	浴槽水	水道水	39.7	0		55	55	Lp 6, Lp UT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+
21	D	H29	浴槽水	自家ボーリング水	44	0.27		50	50	Lp 1, Lp 8, Lp 12, Lp UT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+
22	D	H29	浴槽水	水道水	39.7	0	8.8		50	Lp 4, L. sp	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+
23	D	H29	湯口水	温泉	40.5	0.4		261	10	Lp 1	-	+	+	+	+	+	+	NT
24	D	H30	浴槽水	温泉	43.7	0.05	6.9	980	60	Lp 3, Lp 5	-	-	-	-	+	+	+	NT
25	D	H29	湯口水	温泉	43.7	0.05	8.8		100	Lp 1, Lp 4, L. mitchdei, L. sf NT	-	-	-	-	+	+	+	NT
26	D	H29	湯口水	温泉	43.7	0.6	7.2		500	Lp 3, Lp 4, Lp 6, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT
27	A	H29	浴槽水	温泉	43.7	0	8.2		500	Lp 2, Lp 3, Lp 13, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT
									500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT

表6. EMA-LAMP法における偽陰性検体

No.	施設	年	検体	泉質など	湯温 ( )	残塩 (mg/l)	pH	ATP (/10 ml)	平板培養法 (CFU/100 ml)	血清型	LAMP法 (EMA処理)	EMA-LAMP法 (EMA未処理)	EMA-LAMP法 (EMA処理)	EMA-LAMP法 (EMA未処理)	qPCR法	EMA-qPCR法 (1回)	EMA-qPCR法 (2回)	PALSAR法
1	A	H30	浴槽水	温泉	42	2	7.98	12	10	Lp 1	-	-	-	-	+	+	+	NT
2	B	H30	採暖槽水	水道水	32.5	2	7.98	9	10	Lp 1	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT
3	E	H30	浴槽水	白湯	39.3	0.1		52	10	Lp 5	-	NT	NT	NT	+	-	-	NT
4	E	H30	浴槽水	温泉	41.3	0.1		8	10	Lp 1	-	NT	NT	NT	+	+	+	NT
5	A	H30	シャワー水	井戸水	37.4	1	8.12		10	Lp 4	-	+	+	+	+	+	+	NT
6	B	H30	採暖槽水	水道水	35.9	0.2	7.96		10	Lp 6	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT
7	B	H30	浴槽水	水道水	40.5	0.4		17	30	Lp 1	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT
8	D	H30	浴槽水	自家ボーリング水	40.5	0.05	9		50	Lp 3, Lp 6	-	-	-	-	+	+	+	NT
9	A	H30	カラシ水	井戸水	43.7	0.05	8.8		100	Lp 3, Lp 5	-	-	-	-	+	+	+	NT
10	A	H30	カラシ水	温泉	43.7	0.05	8.8		100	Lp 4, L. sp	-	-	-	-	+	+	+	NT
11	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0.6	7.2		500	Lp 3, Lp 4, Lp 6, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT
12	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0	8.2		500	Lp 2, Lp 3, Lp 13, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT
13	E	H30	浴槽水	温泉	43.7	0	8.2		500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT
14	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0	8.2		500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT
15	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0	8.2		500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT
16	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0	8.2		500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT
17	D	H30	湯口水	温泉	43.7	0	8.2		500	Lp 2, Lp 4, Lp UT	-	-	-	-	+	+	+	NT

表7. 泉種別における(EMA-) LAMP法の感度、特異度および一致率

検体	由来	方法	n	培養陽性	感度 (%)	特異度 (%)	一致率 (%)
温泉	浴槽水、湯口水	LAMP法	63	24	91.7	66.7	76.2
		EMA-LAMP法 (EMA処理)	82	34	70.6	83.3	78.0
その他(水道水、井戸水)	浴槽水、湯口水、シャワー水、カラシ水、採暖槽水、冷却塔水など	LAMP法	120	20	70.0	71.0	70.8
		EMA-LAMP法 (EMA処理)	123	21	66.7	86.3	82.9

表8. 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)		
		10	< 10	計
qPCR	陽性	120	257	377
	陰性	3	224	227
計		123	481	604

感度97.6%、特異度46.6%、陽性的中率31.8%、陰性的中率98.7%、一致率57.0%

b. EMA処理(1回)

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
EMA-qPCR	陽性	113	190	303
	陰性	11	299	310
計		124	489	613

感度91.1%、特異度61.1%、陽性的中率37.3%、陰性的中率96.5%、一致率67.2%

c. EMA処理(2回)

		平板培養法 (CFU/100 ml)		
		10	< 10	計
EMA-qPCR	陽性	32	29	61
	陰性	2	63	65
計		34	92	126

感度94.1%、特異度68.5%、陽性的中率52.5%、陰性的中率96.9%、一致率75.4%

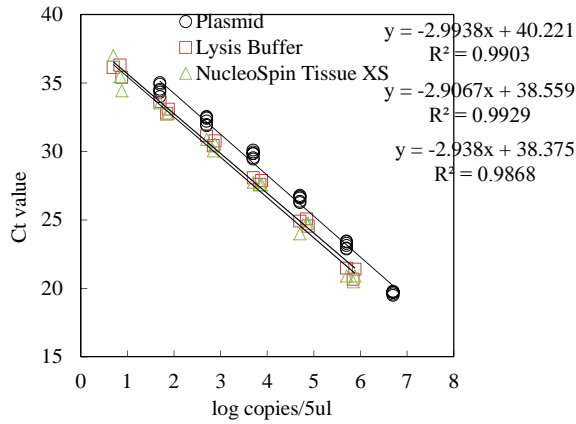


図2. DNA抽出キットを用いてEMA処理を1回実施した平板培養レジオネラ属菌液から抽出したDNAおよびプラスミドDNAの検量線

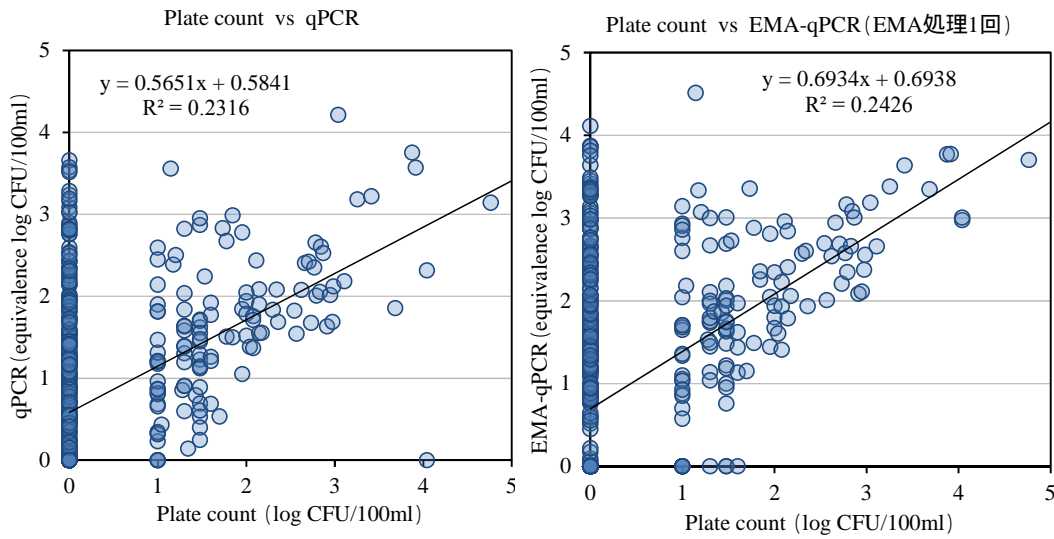


図3. 平板培養法とqPCR法およびEMA-qPCR法(EMA処理1回)との相関

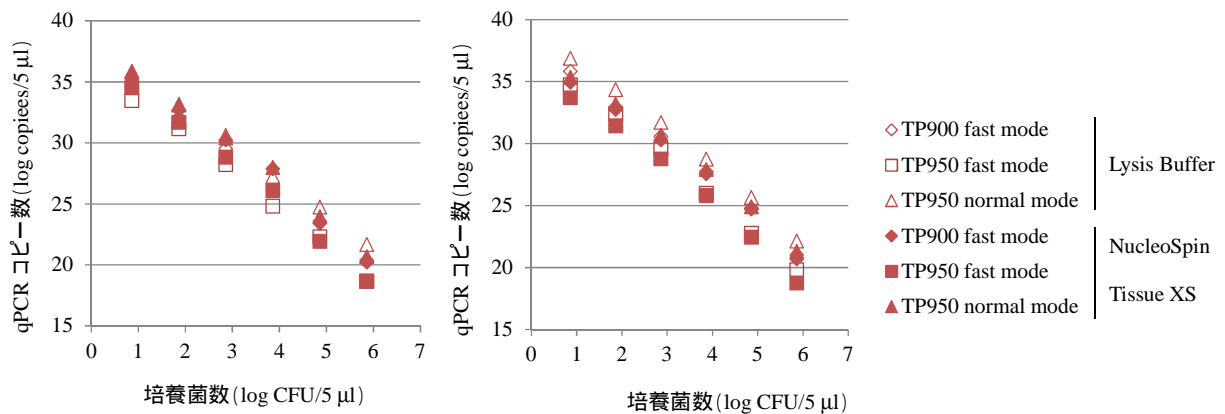


図4. TP950およびTP900における平板培養レジオネラ属菌液から抽出したDNAの検量線

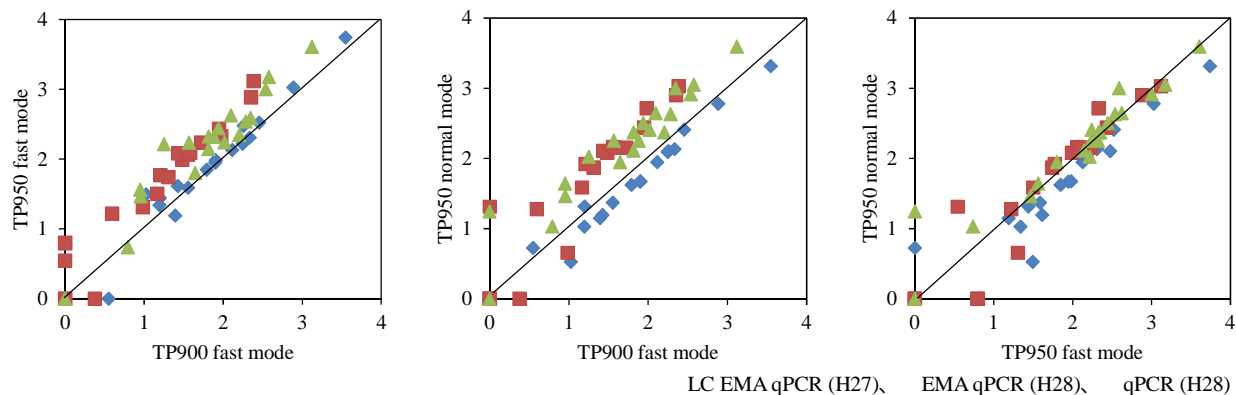


図5. TP950 および TP900 における実検体を用いた定量値 (equivalence log CFU/100 ml) の比較

表9. 平板培養法とPALSAR法との比較

a. 全検体

		平板培養法 (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10. 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 泉質など ( )	残塩 (mg/L)	平板培養法		血清群	PALSAR法	EMA-qPCR法	LAMP法	
				pH	(CFU/100 ml)					
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 泉質など ( )	残塩 (mg/L)	平板培養法		血清群	PALSAR法	EMA-qPCR法	LAMP法	
				pH	(CFU/100 ml)					
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	+	+	+

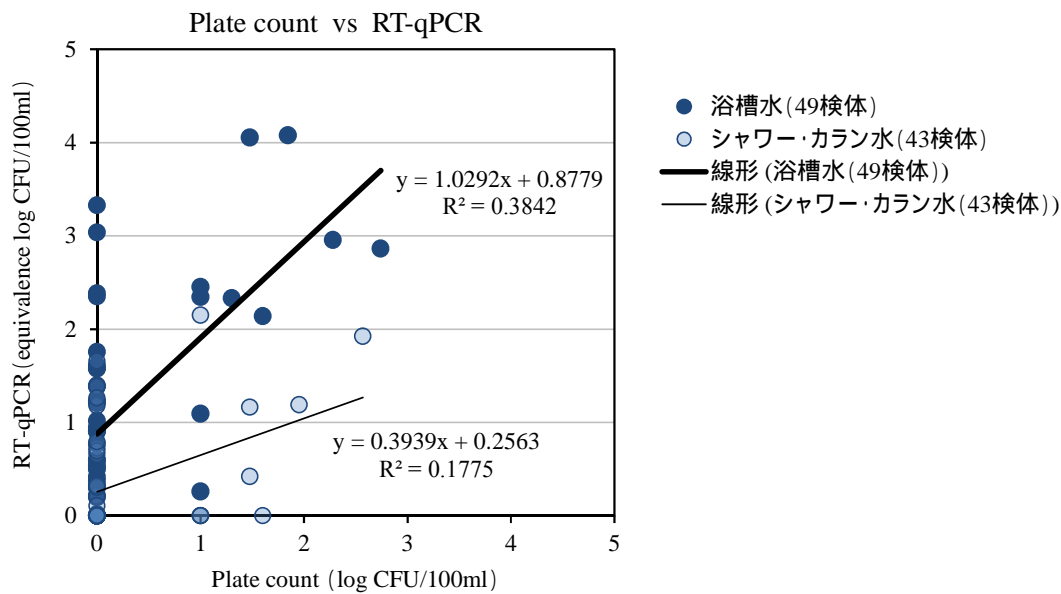


図6. 平板培養法と RT-qPCR 法との相関



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」

## 総合研究報告書

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

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 淀谷 雄亮 川崎市健康安全研究所  
研究協力者 江川 英明 大分県南部保健所  
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：浴場水からのレジオネラ属菌の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。平成 28～30 年度は大分県内施設の浴場水 136 検体を対象に迅速培養法を実施した。その結果、短時間で正確な培養結果を得ることができた。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。

迅速培養法と併せて、遺伝子検査法（LAMP 法および比色系パルサー法）についても検討を行った。LAMP 法は、培養法でレジオネラ属菌が検出されるにもかかわらず LAMP 陰性となる不一致の結果が散見されていたが、抽出法を変更することにより改善が見られた。比色系パルサー法は、特殊な機器を必要としないため、保健所等監視指導機関等での活用が期待できる方法である。検水をろ過した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が、同一検水を用いて当所の培養検査と並行して保健所にて浴場水のパルサー法によるレジオネラ属菌検査を行なったところ、培養法ではレジオネラ属菌が検出されたが、パルサー法では陰性の結果となった。

#### 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）<sup>1)</sup>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ことから、大分県において多用しているが、様々な泉質を有する温泉水等を利用した公衆浴場水等では、培養法でレジオネラ属菌が検出されるにもかかわらず LAMP 法で陰性となる不一致の結果が得られることが多々あり、その解決が課題となっていた。そこで、培養法と LAMP 法の結果不一致検体について、抽出法を変更し、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 16S rRNA 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。100 倍濃縮検体 1mL を用いて実施された過去の結果では、培養法に対しての感度が低かった<sup>2)</sup>ので、平成 28、29 年度は溶菌方法について検討した。検討結果をもとに、平成 30 年度の実検体に適用し、併せて川崎市健康安全研究所 (以下、川崎市衛研) 監視指導機関である大分県南部保健所衛生課 (以下、保健所) においても同様の方法で実施し、検討した。

以下、培養法でレジオネラ属菌が検出されたこと、LAMP 法・パルサー法で陽性であったことを「(+)」と表記し、培養法でレジオネラ属菌が検出されなかったこと、LAMP 法・パルサー法で陰性であったことを「(-)」と表記する。

## B. 研究方法

### 1. 材料および検査法

平成 28~30 年に搬入された浴槽水および湯口水、70 施設 136 検体を対象とした。

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 $\mu$ 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 $\alpha$  寒天培地 (栄研化学)、GVPC 寒天培地 (日研生物) および MWY 寒天培地 (自家製; Oxoid) 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 $\mu$ 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 $\alpha$  寒天培地 (自家製; Oxoid) および血液寒天培地 (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、EnviroAmp Legionella Kit のプライマー配列<sup>3)</sup>を用いた 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) およ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、*Legionella 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<sup>4)</sup>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 136 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 (+) で LAMP (-) とな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

ルを添加したものについて、再度測定し、Tt (Threshold time) 値\*を比較した。

さらに、平成 30 年度に培養(+)で LAMP (-)となった 2 検体、菌数が多い(100cfu 以上/100mL)にも関わらず LAMP3 回中 2 回(-)であった 4 検体を含めた 20 検体について、以下の抽出法(Chelex 抽出法)で再度濃縮検体から抽出、測定し、キットの説明書どおりの抽出法(常法)と Tt 値を比較した。抽出は同じ濃縮検体からで、測定は 3 回繰り返した。また、平成 29 年度に、レジオネラ属菌数が 1500cfu/100mL で LAMP(-)であった 1 検体と、6000cfu/100mL で LAMP3 回中 2 回(-)であった 1 検体についても、Chelex 抽出法を適用した。

Chelex 抽出法：予め Chelex 100 Chelating Resin (BioRad) を 10% w/v になるよう滅菌蒸留水(遺伝子工学用)に懸濁させ、Chelex 液を調製した。濃縮検体 2mL をチューブに採取し 13,000g で 10 分間遠心した後、50 $\mu$ L を残して上清を除去、10% Chelex 液を 50 $\mu$ L 添加し、十分に混和した。沸騰水中で 10 分間加熱後、13,000g で 5 分間遠心した上清をサンプルとした。

\*Tt 値: LAMP 法で一定の濁度に達するまでの時間(分)。菌数が多いほど値が小さい傾向にある。

#### 4. 比色系パルサー法

レジオネラ属菌迅速検査キット(ファスマック)を用い、以下に示す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。

平成 28 年度は、39 検体について、次の 3 法( ~ )で調製した溶菌液を用いた。方法 及び の溶菌液については即日測定、方法 の溶菌液については、測定するまで 1~7 日間、-30 で冷凍保存した。

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

方法 : 濃縮検体(未加熱)2mL を 12,000rpm (13,000 $\times$ g)で 10 分遠心後上清を除去し、さらに濃縮検体 2mL を加えて同条件で遠心後、

70 $\mu$ L を残して上清を除去し、変性液 30 $\mu$ L を加えた後、方法 と同様に調製した(濃縮 4mL 溶菌液と表記)。

方法 : 非濃縮検水各 100mL を注射筒を用いてメンブランフィルター(直径 13mm、孔径 0.22 $\mu$ m、Merck 社、混合セルロースアセテート)に押出または吸引してろ過し、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 $\mu$ 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 $\mu$ L の中和液を加えて溶菌液を調製した(フィルター溶菌液と表記)。

平成 29 年度は、非濃縮検水 49 検体について、次の 3 つの方法( ~ )で溶菌液を調製した溶菌液を用いた。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 1~4 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 $\mu$ m、Merck 社、セルロース混合エステル; 以下「13mm フィルター」)に押出または吸引してろ過し、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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ m、Merck 社、セルロース混合エステル; 以下「25mm フィルター」)に押出または吸引してろ過し、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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L の溶菌液を用いた。

平成 30 年度は、大分県衛生環境研究センター（大分衛研）では浴槽水および湯口水 48 検体について方法 または方法（方法 で目詰まりを起こす場合）で、川崎市衛研では浴槽水や採暖槽水等 39 検体、保健所では浴槽水および湯口水 4 検体について、方法 で溶菌液を調製し、測定を実施した。即日測定できなかった溶菌液については、測定するまで 1~4 日間、-30 で冷凍保存した。

## C. 研究結果

### 1. 培養法

培養結果の概要を Table 1 に示した。136 検体中 59 検体（43%）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 47 検体中 26 検体（55%）、湯口水 46 検体中 19 検体（41%）で、「循環式施設」では浴槽水 27 検体中 8 検体（30%）、湯口水 16 検体中 6 検体（50%）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 21 施設であった。浴槽水（+）で湯口水（-）となった施設は 8 施設、浴槽水（-）で湯口水（+）となった施設は 3 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 16 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。継続培養後に菌数が増加することはあったが、レジオネラ属菌が検出された 59 検体中 58 検体については、斜光法で（+）を確認することができた。一方、その中には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。斜光法の段階で（+）を確認できなかった 1 検体からは、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が 1 株のみ（5cfu/100mL に相当）検出された。検出された *L. pneumophila* の血清群別の結果を Table 4 に示した。SG1 株が 10 施設の 15 検体から検出され、そのうち平成 28 年度 1

施設の 2 検体から *lag-1* 遺伝子を保有する株が検出された。大分県の浴場水由来株の *lag-1* 保有調査を開始した平成 24 年以降、*lag-1* 検出はこの 2 検体のみである（Table 5）。

### 2. LAMP 法

濃縮検体 1 検体につき 3 回繰り返し測定を行い、1 回でも検出された場合は（+）と判定した。常法による結果は Table 6 のとおりで、11 検体が培養（+）で LAMP（-）の不一致の結果となった。11 検体中 10 検体（グループ A）のレジオネラ属菌数は 5~500cfu/100mL（うち 9 検体は 100mL あたり 60cfu 未満）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 11 検体中、グループ A の 2 検体（それぞれ 5cfu/100mL、55cfu/100mL のレジオネラ属菌が検出された）を除く 8 検体とグループ B の 1 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 8 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）。

Chelex 抽出法による 20 検体の結果については Table 7 のとおりであった。常法と Chelex 抽出法について、陰性の Tt 値を 60 分として t 検定を実施したところ、全検体間では有意差が見られなかった。しかし、培養で検出された菌数が 50cfu/100mL 以上の 9 検体間では、Tt 値の平均値と標準偏差は、常法で  $45.8 \pm 9.9$  分、Chelex 抽出法で  $36.0 \pm 10.7$  分であり、Chelex 抽出法の Tt 値が有意に低下した（ $p=0.012 < 0.05$ ）。t 検定は対応のある 2 標本間の片側検定で実施した。

また、グループ B の 1 検体と、6000cfu/100mL で LAMP 3 回中 2 回陰性であった 1 検体については、Chelex 抽出法で LAMP 3 回中 3 回とも（+）であった。

### 3. 比色系パルサー法

平成 28 年度に方法 から で実施した結果を Table 8-1、8-2、8-3 に示した。濃縮 1mL 溶菌液（方法 ）について実施した結果、39 検体中、培養法とパルサー法でともに（+）となったのは 12 検体、培養（-）でパルサー（+）となったのは 9 検体、培養（+）でパルサー（-）の不一致の結果となったのは 3 検体であった（Table 8-1）。不一致の結果となった 3 検体は、フィルター溶菌液（方法 ）で測定したところ、すべてパルサー法（+）となった。

濃縮 4mL 溶菌液（方法 ）については、39 検体中、培養法とパルサー法でともに（+）となったのは 14 検体、培養（-）でパルサー（+）となったのは 10 検体、培養（+）でパルサー（-）の不一致の結果となったのは 1 検体であった（Table 8-2）。不一致の結果となった 1 検体は濃縮 1mL 溶菌液（方法 ）においても陰性であった。この検体からは 500cfu/100mL のレジオネラ属菌が検出され、血清群は *L. pneumophilla* SG2 及び SG3 であった。

フィルター溶菌液（方法 ）については、培養法（+）の検体は全てパルサー法（+）で不一致の検体はなく（Table 8-3）、濃縮検体 1mL に相当する非濃縮検水 100mL の使用で、非常に感度良く検出できた。しかし、ろ過に際して目詰まりが起りやすく、多大な労力を要する検体が存在した。

平成 29 年度に方法 から で実施した結果を Table 9-1、9-2、9-3 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（+）でパルサー法（-）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 9-1）、25mm-50mL 溶菌液（方法 ）についても 6 検体（Table 9-2）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 検体およ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（-）、2 回（-）で、泉質は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 9-3）培養（+）でパルサー（-）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、平成 28 年度に 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て済み、短時間でろ過できた。

平成 30 年度に実施した各機関の結果を Table 10、Table 11、Table 12 に示した。大分衛研で実施した 48 検体については、培養法（+）でパルサー法（-）の不一致の結果となったのは 2 検体（Table 9）で、*L. pneumophila* が分離され、菌数は 10cfu/100mL と 100cfu/100mL であった。

川崎市衛研で実施した 39 検体中、培養（+）（川崎市衛研の方法で実施、100mL あたり 10cfu 以上を（+）とした。）の検体は 4 検体あり、全てパルサー法は（-）であった（Table 10）。いずれも *L. pneumophila* が分離され、菌数は 3 検体が 10cfu/100mL、1 検体が 120cfu/100mL であった。一方、パルサー法（+）となった 5 検体のうち 2 検体は温泉水を使用した浴槽水で、非常に濃い色を呈した。なお、パルサー法に供した 39 検体のうち、この 2 検体を除く 37 検体は水道水を原水とする検体であった。

保健所で実施した 4 検体の結果は、Table 11 のとおりで、全て培養（+）パルサー（-）の結果となった。

#### 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の分かりやすい手がかりとなり、検査の迅速化だけでなく精度向上にもつながると考える。

LAMP 法について、50cfu/100mL 以上のレジオネラ属菌数が検出された検体については、Chelex 抽出法を用いることで Tt 値が有意に低下した。これは、LAMP ( + ) となる回数が増えたことを反映している。常法と Chelex 抽出法による抽出物について、レジオネラ 16S rRNA 遺伝子コピー数を測定したところ、Chelex 抽出物のコピー数の方が少なかった(データ未掲載)。このことから、Chelex 抽出法により抽出された遺伝子コピー数が増えたからではなく、何らかの反応阻害を低減できたために LAMP ( + ) の回数が増え、Tt 値が低下したと考えられる。レジオネラ属菌数が 5cfu/100mL の 3 検体については全く改善されなかったが、LAMP キット添付の説明書では 60cfu/test が検出限界とされており、また、菌数が非常に多いにもかかわらず LAMP ( - ) であった検体についても Chelex 抽出法では ( + ) となったことから、Chelex 抽出法は偽陰性を減らすのに有効な抽出法であると考えられる。

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

おいても高価な機器を使用しない方法が望まれることもあり、注射筒を用いて検水を圧縮ろ過する方法を検討した。

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のが適した方法であると考えた。

さらに、機器の揃った検査機関以外でパルサー法を実施することを想定し、フィルター溶菌法を用いて実際に保健所での検査を行ったが、培養 ( + ) にもかかわらずパルサー法では全て ( - ) となった。川崎市衛研においても、培養 ( + ) の検体がパルサー法では ( - ) となった。保健所においては、溶菌液調製後に窓口対応が生じ、測定を開始するまで約 1 時間冷蔵保存した。パルサー法は RNA を検出する方法で、溶菌液中の RNA は時間の経過とともに加水分解されて減少するが、1 時間冷蔵保存による影響の有無については未検証である。一方、大分衛研で実施した 48 検体については、培養 ( - ) でもパルサー ( + ) となる検体が多かった。大分衛研の検体は温泉水が多く、保健所の検体および川崎市衛研の多くの検体は水道水である。川崎市衛研において温泉水の検体が濃い発色を呈したことから、水質の違いが発色に關与している可能性もあるが、今後の検討課題としたい。また、パルサー法の溶菌工程は、検水をろ過したフィルターを直接溶菌処理するが、ろ過をするにはその場でシリンジを長時間押し続ける必要があり、窓口対応等で中座の多い保健所監視員の実施には困難が予想され、濃縮工程の再検討が必要である。

## 結論

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

LAMP 法については、抽出法を変更することにより、培養 (+) で LAMP (-) の不一致が解消されることが示唆された。多様な泉質を有する大分県の浴場水検査において Chelex 抽出法を導入する予定である。

一方、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。パルサー法が有効に活用できるよう、今後の検討を図っていききたい。

## 参考文献

- 1) 森本洋：分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性．日本環境感染学会誌，2010．25（1）：8-14
- 2) 磯部順子 他：レジオネラ属菌迅速検査法の評価．厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 27 年度総括・分担研究報告書：61-69
- 3) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル（レジオネラ症）平成 23 年 10 月 7 日改訂，
- 4) 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

1. 学会発表
  - 1) 佐々木麻里、神田由子、後藤高志、成松浩志：あるレジオネラ症集団発生における積極的疫学調査、第 64 回大分県公衆衛生学会、2019 年 3 月、大分.
2. 研修会
  - 1) 佐々木麻里：レジオネラ症に係る最近の知見と検査の取り組み、平成 28 年度環境監視員担当者会議、2016 年 4 月、大分.
  - 2) 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.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、平成 30 年度環境監視員担当者会議、2018 年 4 月、大分.
  - 6) 佐々木麻里：大分県のレジオネラ症とレジオネラ検査について、レジオネラ症防止対策講習会、2018 年 9 月、大分.
  - 7) 佐々木麻里：加湿器を原因とした老人福祉施設でのレジオネラ症集団発生事例～検査について～、平成 30 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2019 年 2 月、東京.

- 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)

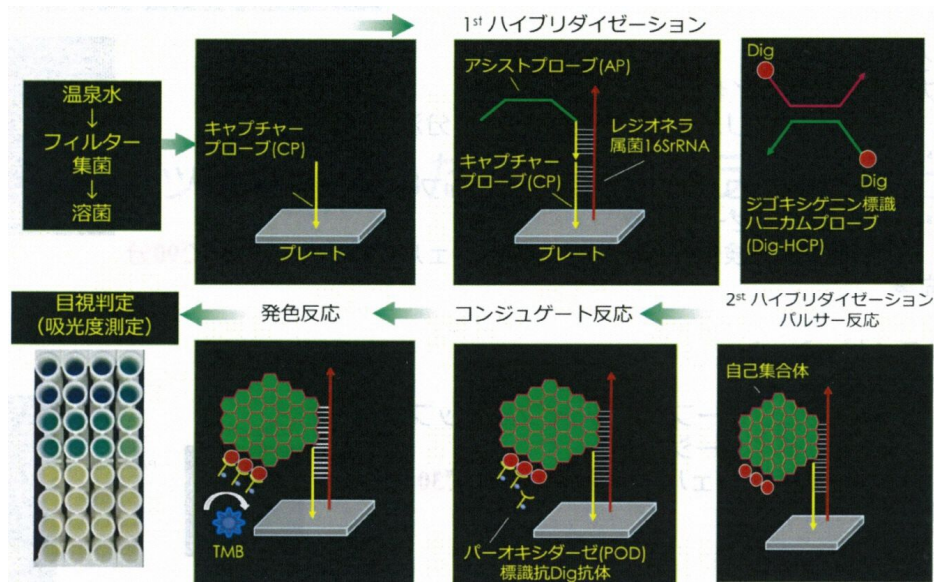


Table 1 培養法の結果

採水箇所		検体数	検出数 <sup>a</sup>	検出率
掛け流し式	浴槽水	47	26	55%
	湯口水	46	19	41%
循環式	浴槽水	27	8	30%
	湯口水	16	6	38%
計		136	59	43%

<sup>a</sup> 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 2 浴槽水と湯口水の検出状況 (n=62)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	21	3	24
	-	8	30	38
計		29	33	62

+ 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=136)

菌数	検体数
5 未満	77
5 - 9	9
10 - 99	13
100 - 999	21
1000 以上	16
合計	136

Table 4 血清群別の陽性検体数 (n=59)

血清群	検体数
SG1	15 (15)
SG2	9 (8)
SG3	22 (21)
SG4	15 (13)
SG5	12 (9)
SG6	18 (17)
SG7	3 (2)
SG8	3 (1)
SG9	3 (2)
SG12	2 (2)
SG13	4 (4)
SG15	8 (6)
SGUT	36 (35)

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7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
H30年	0	0	2	3	15	24	25	48

\*血清群データのある検体のみ計上  
培養法は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 6 LAMP 法と培養法の比較 (n=136)

	LAMP		計
	+	-	
培養法	+	48	59
	-	21	77
計	69	67	136

培養法+は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 7 Chelex 抽出法と常用による LAMP 法結果 (20 検体 60 テスト)

培養結果 菌数 (/100mL)	Chelex 抽出法 LAMP		常法 LAMP
	検体数	陽性検体数	陽性検体数
	テスト数	陽性テスト数	陽性テスト数
5cfu 未満	8	2	3
	24	6	5
5cfu	3	1	2
	9	1	4
50cfu 以上	9	8	8
	27	22	13
合計	20	11	13
	60	29	22

Table 8-1 パルサー法(濃縮 1mL 溶菌液)と培養法の比較(n=39)(方法 )

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

培養法+は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 8-2 パルサー法(濃縮 4mL 溶菌液)と培養法の比較(n=39)(方法 )

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

培養法+は 10cfu/100mL によらない(定性)

Table 8-3 パルサー法(フィルター溶菌液)と培養法の比較(n=39)(方法)

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

培養法+は10cfu/100mLによらない(定性)

Table 9-1 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 9-2 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 9-3 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)

Table 10 パルサー法と培養法の比較(大分衛研 n=48)

	パルサー		計	
		+		-
培養法	+	22	2	24
	-	15	9	24
計		37	11	48

培養法+は10cfu/100mLによらない(定性)

Table 11 パルサー法と培養法の比較(川崎市衛研 n=39)

	パルサー		計	
		+		-
培養法	+	0	4	4
	-	5	30	35
計		5	34	39

培養法+は10cfu/100mL以上

Table 12 保健所実施パルサー法結果

	採水年月	種類	泉質	培養結果	パルサー法	
				菌数(/100mL)	結果	
1	2019年1月	掛け流し	浴槽水	水道水	25cfu	陰性
2	2019年1月	掛け流し	湯口水	水道水	15cfu	陰性
3	2019年1月	掛け流し	浴槽水	水道水	85cfu	陰性
4	2019年1月	掛け流し	湯口水	水道水	85cfu	陰性

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）  
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

### 総合研究報告書

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

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  
研究協力者： 下田 貴宗 シモダアメニティ株式会社  
研究協力者： 新道 欣也 株式会社 お風呂のシンダー

#### 研究要旨

現場検査への実用化を目指して、迅速検出法(RDM)に携帯型フローサイトメーターとレジオネラ属菌用特異染色試薬を適用して改良型(I-RDM)とし、そのレジオネラリスク評価方法としての有効性を調査した。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。I-RDM はレジオネラ・ニューモフィラ(LP) SG1 を用いた添加回収実験において、約  $10^2 \sim 10^5$  CFU/mL の範囲で培養法と高い相関 ( $y = 8.1799x^{0.8732}$ ,  $R^2 = 0.9544$ ) を示し、LP SG1 のほかに SG3、SG4、SG5、SG6、SG9、SG10 および型別不能株ならびにレジオネラ・デュモフィを検出することができた。本検査法の検出限界と定量限界はそれぞれ約 1,300 counts/100 mL および約 1,300 counts/mL と決定され、生菌数として 32 CFU/100 mL および 235 CFU/mL に相当していた。現地調査において浴槽水 76 試料を I-RDM 法と培養法で処理し、本方法の培養法に対するスクリーニングとしての有効性を検証したところ、その感度は 93.3%、特異度は 95.1% を示した。浴槽水を用いた LP の定量性については、I-RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し ( $R^2 = 0.65$ )、培養法の検出限界値 (10 CFU/100mL) 付近においてはやや高い値を示したものの定性的には妥当な成績を示した。I-RDM 法は、5 分間の消毒効果判定と約 1 時間の LP 定量評価により、遊離塩素消毒下の入浴施設において現場でのレジオネラリスク監視の有用なツールとして利用可能であるといえる。

#### A. 研究目的

*Legionella pneumophila* (LP) はレジオネラ症の主要な起因菌種であり、我国では特に入浴施設において大きな社会的影響を及ぼしている。LP を含むレジオネラ属菌は、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) <sup>1)</sup> 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<sup>1)</sup>。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、ヒト HIV 診断用の携帯型フローサイトメーター (6.5 kg) を細菌測定による消毒効果判定に応用するとともに、濃縮水を用いて LP を特異的に定量する改良型 RDM 法 (improved-RDM, I-RDM) を作成し、その有効性を証明したので報告する。

## 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、LP SG1 を 3 株 (以上 A グループ)、LP の SG3、SG4、SG5、SG6、SG9、および SG10 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)、LP 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、LP SG1 (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) LP の各血清群および他のレジオネラ属菌は、 $-80^{\circ}\text{C}$  保存株を BCYE $\alpha$  培地に接種後、 $30^{\circ}\text{C}$  で 3 日間培養したものを供試した。*E. coli* は TSA 培地に接種後、 $30^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養したものを供試した。

3) 培養した各細菌は孔径  $0.2\ \mu\text{m}$  のステリカカ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  $37^{\circ}\text{C}$ 、18 時間培養したものを初期調製菌液とした。

### 2. 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 I-RDM 法への適用

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、内蔵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/ $\mu\text{L}$ ) 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. レジオネラ染色試薬の特異性の証明

1) 初期調製菌液の  $1000$  倍希釈液を約  $10^5$  CFU/mL として I-RDM と平板培養法に供した。I-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 (ピオメリユー) を使用し、塗抹後  $35^{\circ}\text{C}$  で  $3\sim 7$  日間培養し、計数した。

3) I-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%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  $\mu$ 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ャッタグラムの範囲を設定して、染色試薬用特定エリアとした。細菌細胞から得られる側方散乱光強度（SSC）と蛍光強度（FL）を 2 つの指標としてエリア内の細胞を計数し、装置独自の補正値を掛け合せて細菌数（Total Bacterial Counts）とした。

#### 5. I-RDM の LP 染色における検出限界の決定

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（pH7.2, 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）、最終濃度 1 CFU/mL、10 CFU/mL、および 100 CFU/mL となるように LP SG1 の初期調製菌液を添加した模擬サンプルを各 6 本作製した。同サンプル 0.1 mL を 2 枚の BCYE 培地に塗抹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 培地に塗抹した。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  $\mu$ m ポリカーボネートメンブレンフィルターを用いて模擬サンプルを 100 倍に濃縮したものの 0.1 mL を BCYE 培地 2 枚に塗抹して、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) I-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。I-RDM 値と培養法の値を比較して検出限界値を決定した。

#### 6. I-RDM のレジオネラ染色における定量限界の決定

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 I-RDM 法で比較した上で定量限界値を決定した。

#### 7. 現地調査

##### 1) 高濃度塩素処理前後浴槽水の調査（第 1 回）

I-RDM 法は、レジオネラ属菌検査法のスクリーニング法として位置づけられ、その有効性検証にあたり、培養検査の検出限界（10 CFU/100mL）程度の浴槽水を検出する必要がある。その成績を満たす浴槽水を予測して採水することは困難なので、比較的厳格な塩素消毒を行っている入浴施設において、塩化物泉および井水を利用している 3 種の循環ろ過式浴槽を繰り返し調査した。当該施設の 1 日あたり利用者数は 700 人~1000 人で毎日営業しており、一週間毎に高濃度塩素洗浄処理（20 mg/L  $\times$  1 時間）を行っている。この処理前後の浴槽から 5 週にわたって合計 30 検体のサンプルを採水した。

##### 2) オゾン処理前後の浴槽水の調査（第 2 回）

異なる 3 施設 5 循環ろ過式浴槽から採水した浴槽水に発泡式オゾン処理（ナノバブル発生装置およびオゾン発生装置はシモダアメニティ株式会社製）を施し、処理前後および 1 回濯ぎ後（1 浴槽のみ濯ぎ 2 回実施）の合計 16 検体の浴槽水を供試した。これらの施設は社会福祉施設であり、1 日あたり 50~100 名の利用者を有し、原水として水道水を利用して塩素消毒を行い、7 日に 1 回換水している。

##### 3) その他の入浴施設の調査（第 3 回）

研究協力者が検査を委託された入浴施設において 30 種類の循環ろ過式浴槽水を冷蔵郵送により長崎県環境保健研究センターに搬入し調査し

た。採水後の検体は冷蔵保存して遅くとも1週間以内に試験に供した。本調査における浴槽水は循環ろ過式で塩素消毒を行っていることを除いて施設ごとの衛生管理状況のデータはない。

#### 8. I-RDM法による浴槽水の処理方法

1) 非濃縮浴槽水を用いた塩素消毒効果の判定  
供試した浴槽水は表4のとおり処理した。最初に miniPOC を用いて浴槽水中の塩素消毒効果を判定した。即ち、検体 1 mL を 5 mL チューブ(イナオプティカ)に分取し、0.1% myristyl trimethyl ammonium bromide (MTAB)を含む希釈液 1 mL と混合し、0.1%の蛍光色素 propidium iodide (Wako chemicals) 10  $\mu$ L を加えた後、miniPOC にセットして試験に供した。予め測定ノイズを除いた特定エリアを設定し、細菌細胞から得られる側方散乱光強度(SSC)と蛍光強度(FL)を2つの指標としてエリア内の細胞を計数し、装置独自の補正値を掛け合せて細菌数(Total Bacterial Counts)とした。この時、試料中の細菌数が後述の基準値 1000 counts/mL を越した場合は「消毒効果なし」と判定して続く LP 特異検査で LP が検出された場合は生菌と判断した。一方で、同値に満たない試料は「消毒効果有り」と判定し、LP が検出された場合でも死菌と判断した。

#### 2) LP の特異的定量

施設調査における LP 定量は、前述の方法(B.2.1)に準拠して、LP SG1 用染色試薬(FL Ip SG1)と LP 非 SG1 染色試薬(FL ARK<sub>Ip</sub>)を調製して実施した。検水 1 L を携帯用ろ過器でろ過した後、フィルターを剪刀にて細かく破断しながら 50 mL プラスティック遠心管に入れた。これに 1 mL PBS を加え、1 分間ホモジナイズして濃縮懸濁液とした。RDM 計測に際して、各懸濁液を 2 本の 5 mL サンプル管(イナオプティカ)に 0.5 mL ずつ分注し、等量の 0.1% BSA(ミルテニーバイオテク社)入り PBS および 0.75  $\mu$ L の FL Ip SG1 又は FL ARK<sub>Ip</sub> を加えて常温で 30 分間染色したものを miniPOC にセットして計測した。特定エリア内の粒子数に装置独自の補正値を掛

け合わせて RDM 値を算出し、その測定値を前述の B.6 で作成した検量線により濃度換算して LP 数とした。

#### 3) 平板培養法によるレジオネラ属菌数の測定

レジオネラ属菌検査は当研究班の標準試験法に準拠した。即ち、培地は GVPC 培地(ビオメリュー)を使用し、100 倍ろ過濃縮した検水を塗沫後 35°C で 3~7 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。検出したレジオネラ属菌は定法により血清型別試験を行った。

### C. 結果及び考察

#### 1. レジオネラ染色試薬の特異性

1) 約 10<sup>5</sup> CFU/mL に調製した 23 株の細菌からなる試験液を培養法と I-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<sub>Ip</sub> の反応性は低かった(図1)。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<sub>Ip</sub> 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 LP SG1 に高い反応性を示し、FL ARK<sub>Ip</sub> は B グループの LP SG3、SG4、SG5、SG6、SG9、SG10、及び 2 株の型別不能株に特異的であると考えられた(図1)。メーカーによると、FL Ip SG1 に用いた抗体は SG1 以外の LP にも反応性があるとされているが I-RDM ではほとんど反応が認められなかった。一方で、FL ARK<sub>Ip</sub> は LP SG1 への反応性は低かったものの、供試した非 SG1 の LP 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<sub>spp</sub> は FL ARK<sub>Ip</sub> 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<sub>Ip</sub> 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<sub>spp</sub> 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. I-RDM のレジオネラ染色における検出限界値と定量限界値

1) 標的とする LP SG1 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  $0 \pm 0$  CFU/mL、 $0 \pm 0$  CFU/mL、 $12 \pm 4$  CFU/mL、及び  $25 \pm 19$  CFU/mL であった。I-RDM により計測したところ、 $421 \pm 63$  counts/mL、 $556 \pm 153$  counts/mL、 $667 \pm 215$  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  $0 \pm 0$  CFU/100mL、 $32 \pm 29$  CFU/100mL、 $562 \pm 200$  CFU/100mL、及び  $3,470 \pm 1,248$  CFU/100mL であり、I-RDM は、 $516 \pm 70$  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 2)。1 CFU/mL を 100 倍濃縮したサンプルの I-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 I-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。

2) 特異性実験で FL Ip SG1 又は FL ARK Ip に反応性があった 11 株の *L. pneumophila*、及び FL ARK 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 I-RDM で測定した。全ての成績をまとめると、I-RDM は培養法

との間に回帰式  $y = 8.1799x^{0.8732}$  ( $R^2 = 0.9544$ ) からなる相関関係を示した (図 3)。供試 11 菌株の定量性を示す最小値を平均した値は 1,261 counts/mL を示したことから、I-RDM の定量下限を約 1,300 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。

### 3. 現地調査の結果

1) 表 5 に施設調査結果の概要を示した。RDM 法は前述のとおり最初に非濃縮検体を用いて消毒効果を判定し、検体を濃縮した後に LP 数を判定する 2 段階判定を行い、消毒効果を基に LP の生死を判別する。第 1 回目の調査で得られた培養陽性サンプルの最低 TBC 値 (1260 counts/mL) に基づき、1000 counts/mL を消毒効果の暫定的な判定閾値として設定した (図 4)。この調査で I-RDM 法により LP SG1 が 21 回検出され (カットオフ:  $< 10$  cells/100 mL)、その平均値は 10 ~ 146 cells/100 mL であった。このうち 5 回の細菌数は基準値以上を示したが、16 回は消毒効果が認められたために死菌と判定し、培養法も全て不検出であった (図 4)。LP 生菌と判定された 5 回のうち 3 回は、培養検査で 10 CFU/100 mL の LP SG1 が検出され、残る 2 回の細菌数は全て基準値以上を示したために、生菌と判定された (表 5)。この時、本方法の性質から全ての値が生 LP 数を示すのではなく、死菌を含む菌数を示すと考えられた。

このように本調査における 30 検体中 2 検体は偽陽性であったが、他の培養陽性検体のコロニー数が検出限界ぎりぎりの検体であったことから確率的な問題と思われる。少なくとも RDM 法において、培養検査で 10 CFU/100 mL を示した 3 浴槽水は全て生 LP 菌として定量できたために、感度のよい検査といえる。

2) 第 2 回目の調査においては、培養検査でレジオネラ属菌を認めたのは 1 検体のみで、その菌数は 10 CFU/100 mL で LP SG5 と同定された。この時の RDM 値は非 SG1 の生 LP 菌として 112 細胞/100 mL を示した。他に RDM により 7 回 LP

非 SG1 が検出されたが、これらの塩素消毒は有効であったために全て死菌と判定され、培養法においても LP は不検出であった（表 5、図 4）。

3) 第 3 回目の調査においては、培養検査では 30 検体中 11 検体がレジオネラ属菌陽性を示し、その菌数は 10~23,000 CFU/100 mL であった。菌種は全て LP で、血清群は SG3、SG5、SG6、および SG untypable であった。このときの I-RDM 値は生きた非 SG1 の LP として 15~34,310 cells/100 mL と計測された。I-RDM により 2 回 LP SG1 が検出されたが（図 4: 65 回と 66 回）培養検査では SG1 は検出されず、SG5 が多数検出されていた（ともに 10,000 CFU/100 mL 以上）ために FL Ip SG1 の交差反応とも考えられるが、培養検査で分離できなかった可能性も否定できない。I-RDM により LP 非 SG1 が検出された 51 回、59 回、73 回および 74 回の検体（図 4）は消毒効果が認められ全て死菌と判定されたが、培養検査でも LP は検出されておらず判定を支持する結果であった。RDM により死菌と判定されたが培養法でレジオネラが検出された 69 回（図 4）については次項で考察する。第 3 回目の調査施設における衛生管理状態が不明なために比較することは困難であるが、今回の LP 死菌の検出率が他 2 回と比べて明らかに少なかったことは興味深い（表 5）。

## 2. I-RDM の培養法スクリーニングとしての妥当性

今回供試した 76 検体について、レジオネラ属菌の平板培養法に対する I-RDM 法のスクリーニングとしての妥当性を評価したところ（表 3）その感度は 93.3%、特異度は 95.1%であった。培養法で陽性であった 15 例のうち 1 例（図 4、69 回）は偽陰性を示した。これは細菌数が 127 counts/mL と基準値より明らかに低くて消毒効果ありと判定されたにもかかわらずレジオネラが検出された例である。この時の I-RDM 法は非 SG1 の LP として 79 細胞/100 mL を示していたが、培養法が 10 CFU/100 mL で検出限界ぎりぎ

りであったことから確率的な問題と思われる。平板培養法で陰性であった 61 例のうち 58 例は陰性と正しく判定された。偽陽性であった 5 例のうち 3 例の I-RDM による LP 数は非 SG1 として 54~246 cells/100mL であり死菌を検出した可能性もあるが、TBC が  $10^3 \sim 10^4$  counts/mL と高値を示したことを考慮すると培養法に原因があった可能性が示唆された。なお、これらの他に TBC が基準値を超えた 2 例が認められていたが、培養法でレジオネラが不検出であり、RDM による LP 数は SG1 も非 SG1 も不検出（ $< 10$  cells/100 mL）であったため陰性と評価した。

## 3. 施設調査における I-RDM 法測定値の定量性

図 5 に培養法で検出されたレジオネラ属菌数と I-RDM 法による LP 数の相関を示した。全体的に I-RDM 法が培養法よりも高い値を示す傾向にあったものの、I-RDM 法は培養法と菌数において比較的高い相関を示した（ $R^2 = 0.65$ ）。I-RDM 値による LP 数がレジオネラ属菌数よりも高い値を示す傾向が認められたが、その理由のひとつに、I-RDM 法が死菌を含む菌数であったことが考えられた。

## 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、主に *L. pneumophila* を特異的に検出することが可能となった。浴槽水からの LP 定量については、I-RDM 法は培養法と比較的高い相関を示し（ $R^2 = 0.65$ ）、その検出限界値（10 CFU/100mL）を含めてレジオネラスクリーニング法としての高い感度（93.3%）と特異度（95.1%）を示した。即ち、遊離塩素消毒下の現場において、浴槽水の消毒効果判定と SG1 型別判定を含めた LP 定量が可能であるために、I-RDM 法は入浴施設におけるレジオネラリスクの監視ツールとして有用であるといえる。

## 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.
- 3) 田栗 利紹ら, 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, 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, 研究代表者: 前川純子, 87-93, 2018.

#### G. 学会発表

- 1) 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 9<sup>th</sup> International Conference on *Legionella*. Rome, 26<sup>th</sup> – 30<sup>th</sup> September, 2017.
- 2) Taguri, T, Cai, G, Ebisu-Ojima, H, Kura, F and Amemura-Maekawa, J, On-site inspection method for *Legionella pneumophila* in bath water, The 5<sup>th</sup> meeting for ESGLI, Lyon, France, August 30<sup>th</sup>, 2018.

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 <sup>a</sup>	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 santicrucis</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

<sup>a</sup> 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 <sup>a</sup>	Alexa fluor 532 <sup>c</sup>	<i>Legionella pneumophila</i>
2 FL ARK_Ip	Rabbit anti- <i>Legionella pneumophila</i> antibody <sup>b</sup>	Alexa fluor 532 <sup>c</sup>	<i>L. pneumophila</i>
3 FL ARK_spp	Rabbit anti- <i>Legionella</i> antibody <sup>b</sup>	Alexa fluor 532 <sup>c</sup>	<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 <sup>a</sup>	半導体レーザー	532 nm/570 nm, 610nm	側方散乱光 蛍光強度 <sup>b</sup>	PMT <sup>c</sup> PMT <sup>c</sup>	5 min.	6kg

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

表4. I-RDM法の作業工程

工程	ステップ	対象物	操作方法	目的	操作時間 (分)
1	細菌計数	非濃縮水試料	等量の希釈液とサンプルとを混合して核酸染色液を加えてシリンジに吸引後、装置にセットして計測	消毒効果判定	5
2	濃縮	非濃縮水試料	携帯型ろ過器を用いて1000 mLを1 mLに濃縮	水試料の1000倍濃縮	~ 30
3	菌の懸濁	濃縮試料	フィルターを剪刀で破砕して混釈	フィルターからの菌分離と混釈	2
4	染色	濃縮試料	懸濁液を2本の5mLサンプル管に0.5 mLずつ分注して、等量のBSA入りPBSを加えて、FL lp SG1 又はFL ARK_lpにより染色	特異染色	30
5	レジオネラ計数	濃縮試料	シリンジに吸引後、装置にセットして計測	レジオネラ菌計数	5

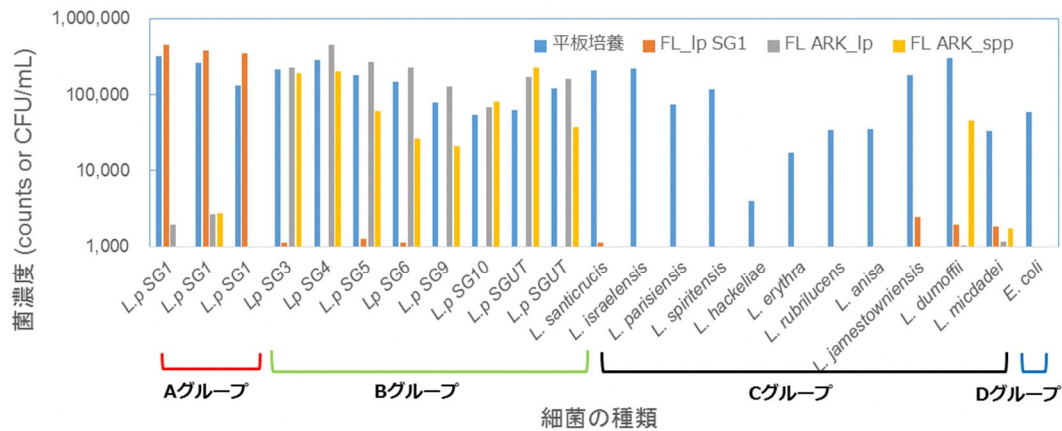


図1. 培養法とフローサイトメトリーの供試細菌株に対する定量性の比較

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.

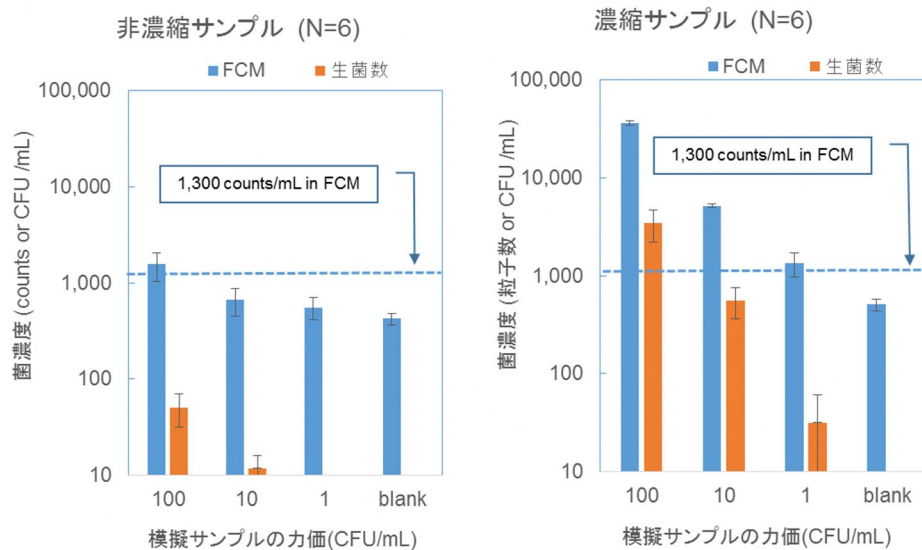


図2. 濃縮処理試料によるFCMの検出限界 (生菌数相当値) の決定

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.

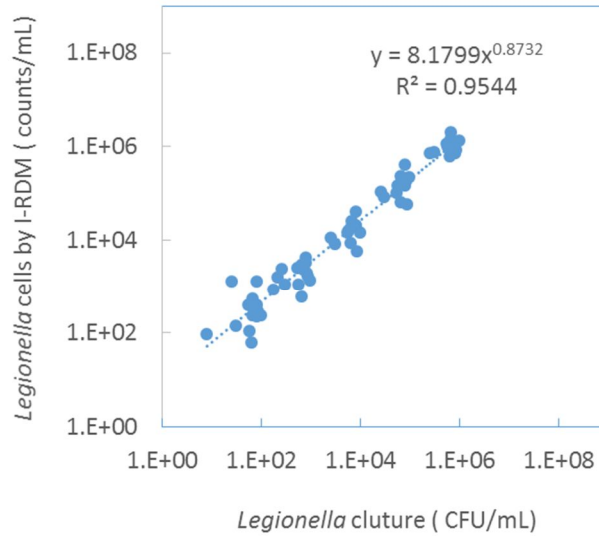


図3. 培養法と迅速検出法の相関

表5 施設調査結果の概要

調査	検体数/ 浴槽数	培養法				I-RDM法				
		SG1陽性 検体数	非SG1陽 性検体数	陰性検体数 (<10 CFU/100mL)	定量値の範囲 (CFU/100mL) (検出された血清群)	SG1陽性 検体数 (生菌)	非SG1陽 性検体数 (生菌)	陰性検体数 (<10 cells/100mL)	定量値の範囲 (cells/100mL)	
									FL lp SG1	FL ARK_lp
第1回	30/3	3	0	27	10 (SG1)	21 (5)	0	9	10 ~ 146	-
第2回	16/5	0	1	15	10 (SG5)	0	8 (1)	8	-	10 ~ 112
第3回	30/30	0	11	19	10 ~ 23,000 (SG3, SG5, SG6, SGUT)	2	16 (12)	14	380 ~ 570	15 ~ 34,310

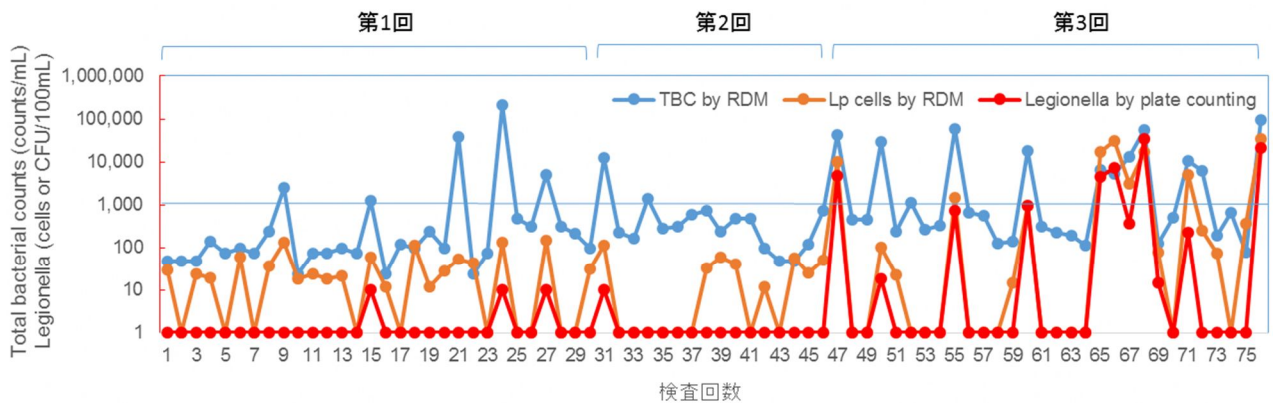


図4. 施設調査におけるI-RDM法閾値と測定値ならびにレジオネラ生菌数の比較

※ 青線はI-RDM法における閾値(TBCとして1000 counts/mL)を表す. LP cellsのカットオフ値は10 cells/100mL.

表6 レジオネラ属菌培養法とI-RDM法との定性結果の比較 (n =76)

	平板培養法(CFU/100ml)			
		10	< 10	
Improved Rapid Detection Method (cells/100mL)	10	14	3	17
	< 10	1	58	59
		15	61	76
感度	93.3%	特異度	95.1%	
うち3検体はSG1, うち27検体はLP死菌と判定				

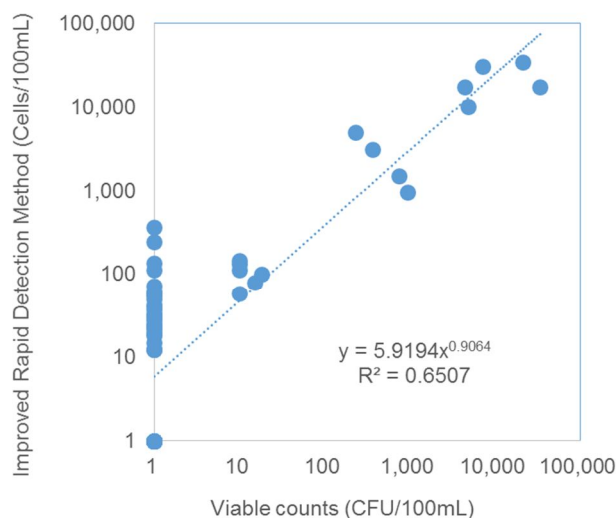


図5. 培養法とI-RDM法のレジオネラ菌数の相関

※ I-RDMは10 cells/100mL未満を不検出。両方法ともに不検出は1 cells or CFU/100 mLで表示した。

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）

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

平成 28-30 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	米澤武志	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
研究協力者	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨：MLVA 法は、その特性として、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) 法やパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) 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本研究の目的とした。

*L. pneumophila* 血清群 1 の菌株コレクション 439 株 (臨床分離株 256 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 49 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 25 株、土壌由来 36 株) の MLVA 型を決定した。さらに、血清群 1 以外の *L. pneumophila* についても、187 株の MLVA 型を決定した。その結果、MLVA の分解能は、SBT 法と比較して同等の値を示し、SBT のタイピングと概ね相関した。また、過去の集団事例 8 事例について、MLVA を適用し、PFGE および SBT との比較を行ったところ、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関していた。

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) 法である。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、これらの課題を克服できることが期待される。

そこで、本研究では、*L. pneumophila* のMLVAの網羅的データ蓄積を行い、従来法との比較をすることで、MLVAのタイピング法としての有用性を評価することを目的とした。

## B. 研究方法

### 菌株：

(1) *L. pneumophila* 血清群(SG)1 の菌株コレクション

*L. pneumophila* SG1 の菌株コレクション計 439 株 (臨床分離株 256 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 49 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 25 株、土壌由来 36 株) を用いて解析を行った(表 2)。

(2) SG1 以外の他の血清型

SG1 以外の *L. pneumophila* 187 株を用いた(表 3)。内訳は、SG2(14 株)、SG3(30 株)、SG4(12 株)、SG5(21 株)、SG6(27 株)、SG7(10 株)、SG8(13 株)、SG9(18 株)、SG10(16 株)、SG11(3 株)、SG12(5 株)、SG13(12 株)、SG14(3 株)、SG15(2 株)、SGUT(1 株)を用いた。分離由来別には、

臨床分離株(P)68 株、浴槽水由来(B)64 株、冷却塔水由来(C)31 株、土壌由来(SO)22 株、給湯水由来(K)2 株となる。

### (3) 過去の集団事例

過去の集団事例については、7 事例を用いた。7 事例の中で、一番大きな集団事例である菌株は図 2a の通りである(図 2a)。臨床分離株 45 株、3 つの浴槽水由来 (B1, B3, B5) 21 株、浴槽ふきとり由来 (B1, B3, B5) 22 株を用いた(図 2a)。浴槽水 B1 の拭き取りは F13, F16, F21、浴槽水 B3 の拭き取りは F11, F23、浴槽水 B5 の拭き取りは F19 に対応している。

残り 6 事例 (事例 A~事例 F) に関して、表 4 に示した。

MLVA: Sobral ら<sup>1)</sup> 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(表 1)。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 1μl をサイズマーカー 0.25μl (GeneScan 1200 LIZ Size Standard (PCR-A と PCR-B), GeneScan 600 LIZ Size Standard (PCR-C))

と Hi-Di Formamide(ABI) 10 $\mu$ 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<sup>2)</sup>。また、各 MLVA 領域の多様性評価には、PIC (polymorphic information content) を算出した<sup>3)4)</sup>。

## C. 研究結果

### MLVA 法の最適化

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

臨床分離株を用いた解析から、Lpms01 (repeat unit size:45bp), Lpms31 (repeat unit size:45bp), Lpms33 (repeat unit size:125bp) 領域は、リピート数において Intermediate-size の株が存在した。

### *L. pneumophila* SG1 の菌株コレクションの MLVA 型

164 種類の ST (sequence type) を含む計 439 株は、233 種類の MLVA 型に分類

された。439 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 とある程度関連した樹形となった(図 1)。同一 ST において、MLVA 型が細分化される例も見られた一方で、異なる ST が同一 MLVA 型を示した例も存在した(図 1 矢印)。

さらに、439 株における SBT 法と MLVA 法の分解能 (HGDI) を比較したところ、それぞれ 0.9599、0.9717 となり、ほぼ同等の値を示した。また、各 MLVA 領域における PIC 値は、Sobral ら<sup>1)</sup>の報告とほぼ同等の値を示した(表 5)。

### SG1 以外の *L. pneumophila* の MLVA 型

119 種類の ST (sequence type) を含む計 187 株は、131 種類の MLVA 型に分類された。同一 ST 株は MLVA 型も 1、2 ローカス違いとなった(表 6)。しかしながら、3 つ以上の遺伝子が異なる ST68、ST114、ST537 において、MLVA 型が一致しており、ST によっては、現行の 12 VNTR 領域では菌株が識別できないことを示唆する結果となった(表 6)。

187 株における MLVA の分解能 (HGDI) は、0.9898 となり、SBT 法と同等の値を示した(表 5)。

### 過去の集団事例における MLVA の評価

7 事例についての MLVA 型を決定し、PFGE および SBT 型別との比較を行った(図 2 および表 4)。どの事例においても、患者株と一致または 1 ローカス違いの



MLVA 型の株が浴槽水等の感染源とされる環境から分離されており、ST および PFGE パターンとも概ね相関する結果となった。

#### MLVA の汎用性の評価

4 自治体に当所で作製した MLVA プロトコルを提供した。また、1 つの自治体は、5 月に研修を実施し、MLVA の汎用性の評価を行った。その結果、他の自治体においても、MLVA 型が PFGE と SBT タイピングと相関する結果が得られた。

#### D. 考察

国際的に普及しているタイピング法である SBT と MLVA の比較において、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。しかしながら、同一 ST でも MLVA 型が 3 ローカス以上異なる例、3 つ以上遺伝子の異なる ST で MLVA 型が一致する例、SG1 と他の SG の MLVA 型が一致した例など少数見出されており、遺伝子型別の手法間の相違点が示された。今後は、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れることにより、SBT と MLVA のタイピングの妥当性評価と、より最適な VNTR 領域の検討も必要になることが考えられる。

その一方で、MLVA 法は SBT 法と同等の識別能力があることが示唆された。また、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

関しており、MLVA タイピングが感染源特定のためのスクリーニングとして迅速なタイピング方法としての有用性を示唆している。また、施設の衛生管理の際には、菌株の定着性を調べるための評価にも有用であると考えられる。

また、他の自治体においても、当所のプロトコルで MLVA を活用し、有用性を評価することができた。その一方で、他の自治体間での比較の際に、フラグメントの大きさがずれる点や MLVA 領域によってリピート数換算の際に判断に迷う点等いくつかの課題も見出された。汎用性の高いタイピングとして MLVA を確立していくためには、見出された課題について、今後検討していく必要があると考えている。

#### 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、感染源の推定の菌株の迅速なタイピング方法として期待できると考えられた。

#### 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（宮城県衛生環境研究所）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.

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

1) 田中忍、中西典子、有川健太郎、岩本朋忠、都倉亮道：人工水系におけるレジオネラ属菌の分布状況と宿主アカントアメーバ中での増殖様式. 第43回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会. 平成28年12月、大阪.

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

3) 中西典子、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：レジオネラ属菌の生活環境における分布状況と遺伝学的特徴. 環境微生物系学会合同大会2017. 平成29年8月、仙台.

4) Noriko Nakanishi, Shinobu Tanaka, Kentaro Arikawa, Tomotada Iwamoto: Distribution and molecular characteristics of *Legionella* spp. strains isolated from cooling tower and hot spring in Kobe City, Japan. The 9<sup>th</sup> International Conference on *Legionella*. 平成29年9月, Italy Roma.

5) 中西典子、野本竜平、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：冷却塔に定着する *Legionella pneumophila* のゲノム分子疫学. 第13回日本ゲノム微生物学会. 平成31年3月、東京.

### 2. 誌上発表

1) 温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証. 神戸市環境保健研究所報 46; 39-42, 2018.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表1. 解析したMLVA領域とプライマー配列

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

表2. *L. pneumophila* SG1 439株のSequence type (ST)

Sequence type (ST)	No. of isolates	Sequence type (ST)	No. of isolates
ST1	77	ST905	3
ST23	23	ST954	3
ST48	15	ST2	2
ST120	15	ST52	2
ST89	13	ST86	2
ST739	11	ST122	2
ST42	10	ST127	2
ST138	9	ST154	2
ST507	9	ST211	2
ST22	8	ST256	2
ST505	8	ST278	2
ST384	6	ST445	2
ST550	6	ST493	2
ST59	5	ST553	2
ST353	5	ST593	2
ST502	5	ST599	2
ST876	5	ST604	2
ST129	4	ST644	2
ST132	4	ST763	2
ST142	4	ST788	2
ST566	4	ST973	2
ST609	4	ST977	2
ST679	4	ST1027	2
ST687	4	ST1186	2
ST701	4	ST1187	2
ST1346	4	ST2061	2
ST352	3	ST2128	2
ST448	3		
ST642	3	other STs	108

表3. SG1以外の*L. pneumophila* 187株のSequence type (ST)

Sero groups	No. of isolates	ST (No. of isolates)
SG2	14	ST354 (7), ST1354 (4), ST39(3)
SG3	30	ST93 (10), ST508(3), ST506(2), ST710(2), ST87 (1), ST305(1), ST392(1), ST430(1), ST465(1), ST995(1), ST1080(1), ST1712(1), ST2343(1), ST2394(1), ST2623(1), ST2650(1), ST2675(1)
SG4	12	ST1966(2), ST145 (1), ST246(1), ST392(1), ST643(1), ST1975(1), ST2586(1), ST2633(1), ST2649(1), ST2654(1), ST2671(1)
SG5	21	ST1032(3), ST1427(3), ST1413(2), ST114(1), ST313(1), ST1146(1), ST1424(1), ST1531(1), ST1628(1), ST1631(1), ST1632(1), ST1975(1), ST2397(1), ST2494(1), ST2651(1), ST2656(1)
SG6	27	ST114(4), ST537(4), ST68(3), ST242(2), ST1143(2), ST1945(2), ST64(1), ST1049(1), ST1341(1), ST1616(1), ST1992(1), ST2580(1), ST2661(1), ST2662(1), ST2665(1), ST2667(1)
SG7	10	ST1422(3), ST2626(3), ST1720(1), ST2641(1), ST2663(1), ST-(1)*
SG8	13	ST2617(4), ST2664(3), ST1376(2), ST1324(1), ST1866(1), ST2609(1), ST2629(1)
SG9	18	ST390(3), ST1808(2), ST73(1), ST484(1), ST512(1), ST768(1), ST1097(1), ST1136(1), ST1283(1), ST1817(1), ST2094(1), ST2415(1), ST2616(1), ST2666(1), ST2674(1)
SG10	16	ST1288(1), ST1409(2), ST1425(1), ST1426(1), ST1427(2), ST1516(1), ST2004(1), ST2618(1), ST2622(1), ST2624(1), ST2625(1), ST2668(1), ST2672(1), ST2673(1)
SG11	3	ST-(3)*
SG12	5	ST68 (3), ST461 (1), ST863(1)
SG13	12	ST2256(9), ST1826 (1), ST2113 (1), ST2603(1)
SG14	3	ST1374 (1), ST1638 (1), ST1873(1)
SG15	2	ST392 (1), ST1996 (1)
UT	1	ST1136 (1)

\* ST-: neuA(h)が増幅できず、ST番号が付与されなかった株

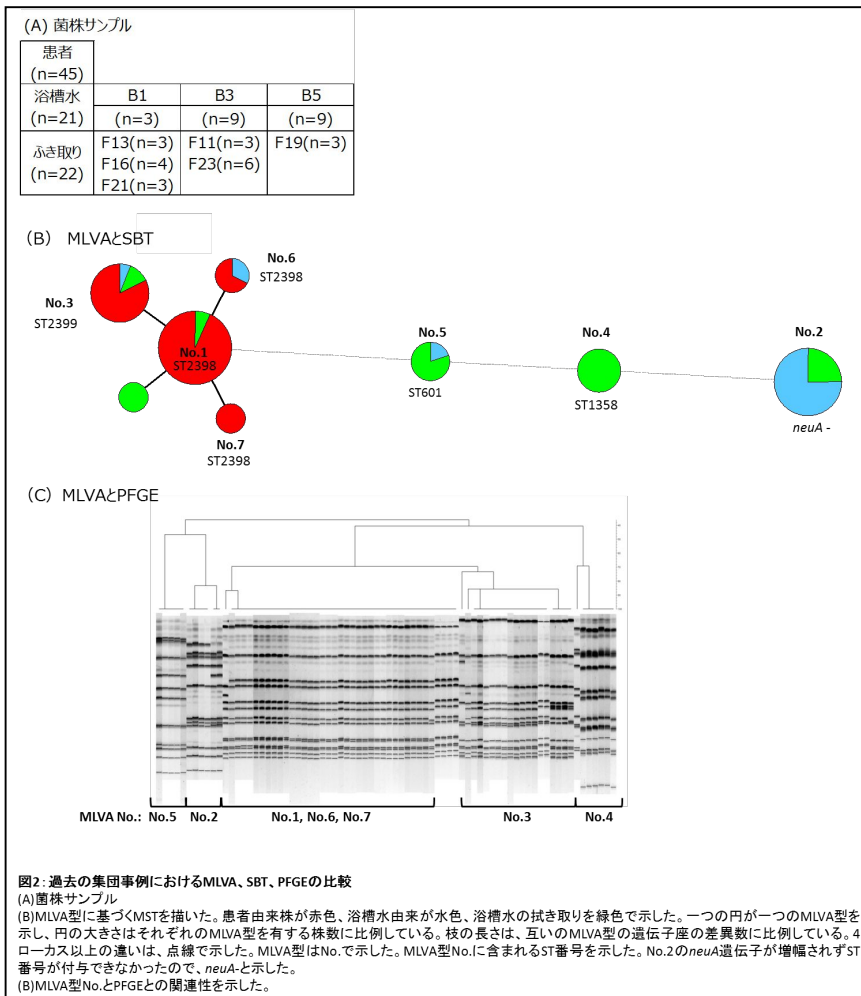
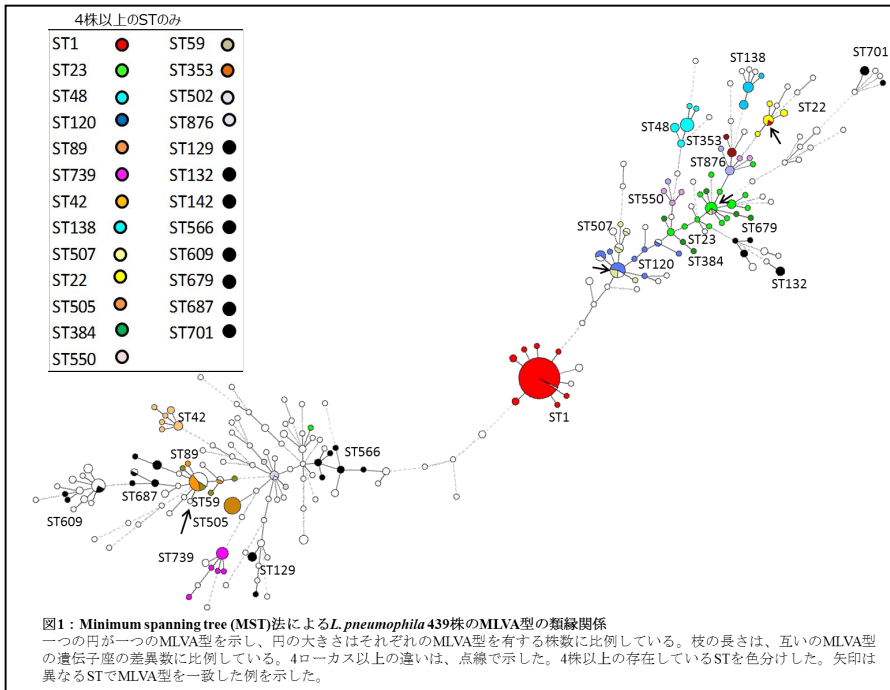


表4. 過去の集団事例A-FにおけるSBT, PFGE, MLVAの比較

事例	ID	Patient (P) Bath (B) shower (SH) 拭き取り(BS) ヘアークャップ チャー等(O)	SBT	MLVA type											PFGE	
				Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39		Lpms44
事例A	NIIB0281	B	23	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0282	B	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0284	BS	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0286	B	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0288	B	unknown	17	8	3	1	1	9	5	8	4	0	6	9	unknown
	NIIB0290	B	unknown	14	9.5	18	2	2	0	0	8	4	3	10	9	unknown
	NIIB0291	BS	unknown	15	8	13	1	1	11	4	8	4	3	0	9	unknown
	NIIB0292	P	23	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0293	P	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
事例B	NIIB0299	P	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
	NIIB0300	P	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
	NIIB0301	P	2	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
	NIIB0302	B	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	21	9	NIIB0299型
	NIIB0303	B	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
事例C	NIIB0374	P	23	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0375	P	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0376	P	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0377	P	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0378	B	unknown	13.5	8	25	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0379	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0380	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0381	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0382	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB2427	O	unknown	14	9	17	3	4	11	4	8	4	3	10	9	NIIB2427型
	NIIB2428	B	unknown	20	8	16	4	1	11	4	7	5	0	12	9	NIIB2428型
	NIIB2429	B	unknown	20	7.5	16	4	1	11	4	7	5	0	12	9	NIIB2428型類似
NIIB2430	F	unknown	20	7.5	16	4	1	11	4	7	5	0	12	9	NIIB2428型類似	
事例D	NIIB0390	P	1531	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	3	8	9	NIIB0390型
	NIIB0392	B	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	0	8	0	NIIB0390型
	NIIB0393	B	unknown	17	8	3	1	1	12	4	8	4	3	6	9	NIIB0393型
	NIIB0394	B	unknown	17	8	3	1	1	10	4	8	4	0	6	9	NIIB0394型
	NIIB0395	B	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	0	8	0	NIIB0390型
	NIIB0398	B	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	3	8	9	NIIB0390型
	NIIB0401	B	unknown	17	8	3	1	1	12	4	8	4	3	6	9	NIIB0393型
	NIIB0402	O	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	0	8	0	NIIB0390型
	事例E	NIIB3385	SH	679	16.5	8	18	4	3	12	0	7	5	3	17	7
NIIB3386		SH	23	13.5	0	18	4	0	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386型
NIIB3387		B	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
NIIB3388		B	23	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386型
NIIB3389		P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
NIIB3390		P	23	13.5	0	18	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386型
NIIB3391		P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
NIIB3392		P	23	13.5	0	18	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386型
NIIB3393		P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
NIIB3394		P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
事例F	NIIB3395	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3396	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3424	P	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3425	P	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3425型
	NIIB3426	B	2121	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3427	B	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3428	B	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	unknown
	NIIB3429	P	2113	14	9	24	2	3	8	4	8	4	0	0	9	NIIB3425型
	NIIB3430	B	2113	14	9	24	2	3	8	4	8	4	0	0	9	NIIB3425型
	NIIB3431	P	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3425型
	NIIB3432	P	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3434	BS	1447	14	9.5	24	2	2	9	4	8	4	19	0	9	NIIB3434型
	NIIB3435	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3436	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
NIIB3437	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型	
NIIB3438	BS	2113	14	9	24	2	3	8	4	8	4	0	0	9	NIIB3425型	
NIIB3439	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	12	9	NIIB3424型	
NIIB3440	BS	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3425型	
NIIB3441	BS	2115	15	8	13	4	1	12	4	8	4	0	6	9	NIIB3441型	
NIIB3442	BS	2115	25	8	13	4	1	12	4	8	4	0	6	9	NIIB3441型	

(注) 各事例毎におけるMLVA一致および1ローカス違い(太字)をハイライトで示した。

表5. MLVA-12のHGDIと各VNTR領域の polymorphic information content (PIC)

VNTR(s)	PIC			
	Sobral et al.	This study		
	SG1 (n=320)	SG1 (n=439)	SG2-SG15 (n=187)	all (n=626)
Lpms01	0.6501	0.6913	0.6323	0.6777
Lpms03	0.5054	0.5219	0.4901	0.5421
Lpms13	0.7790	0.8409	0.8401	0.8467
Lpms19	0.2936	0.2869	0.4628	0.3449
Lpms31	0.8563	0.8836	0.8517	0.8943
Lpms33	0.7020	0.6453	0.7714	0.7183
Lpms34	0.6649	0.6772	0.6557	0.6863
Lpms35	0.8815	0.9083	0.8744	0.9196
Lpms38	0.2710	0.4450	0.4760	0.5484
Lpms39	0.8301	0.7885	0.8350	0.8344
Lpms40	0.5054	0.5221	0.3601	0.5222
Lpms44	0.5391	0.4119	0.3327	0.3944
HGDI of MLVA-12	0.9534	0.9717	0.9898	0.9843
HGDI of SBT		0.9599	0.9887	0.9792

表6 . SG1以外の*L. pneumophila* における4株以上ある同一STによるMLVA型

菌株No.	serogroup	ST	Source*	MLVA型											
				Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39	Lpms44
NIIB2503	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2504	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2505	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2609	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2637	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2757	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2776	3	93	P	17	8	3	1	1	10	4	8	4	3	6	9
NIIB2914	3	93	P	17	8	5	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB3069	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	0	6	9
NIIB3859	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	0	6	9
NIIB0834	13	2256	C	7	7	10	2	1	11	4	7.5	4	0	7	7
NIIB1358	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1371	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1507	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	5	0	7	7
NIIB1620	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1656	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1820	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1929	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1534	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	4	3	7	7
NIIB2464	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB2495	2	354	P	16	7	3	3	2	8	4	8	4	3	6	9
NIIB2758	2	354	P	16	7	3	3	2	9	4	7	4	3	6	9
NIIB3017	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB3475	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB3654	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB3826	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB2791	6	68	P	0	8	5	1	1	18	4	8	4	3	6	9
NIIB2865	12	68	P	17	8	5	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1349	6	68	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1759	6	68	C	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2843	12	68	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2844	12	68	B	17	8	3	2	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2552	6	114	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB0815	6	114	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1786	6	114	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1794	6	114	C	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2046	5	114	C	17	8	3	1	1	11	4	8	4	0	6	9
NIIB2137	5	1427	P	17	7	3	1	1	10	4	8	4	0	6	9
NIIB2299	5	1427	P	17	7	3	1	1	10	5	8	4	3	6	9
NIIB2915	10	1427	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	0	6	9
NIIB2961	5	1427	P	17	8	3	1	1	10	4	8	4	0	6	9
NIIB1283	10	1427	B	17	7	3	1	1	11	4	8	4	0	6	9
NIIB2487	6	537	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2634	6	537	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2868	6	537	P	17	8	5	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB0864	6	537	B	17	8	3	1	1	9	4	8	4	3	6	9
NIIB0811	8	2617	B	17.5	7	18	4	3	8	4	7	5	0	22	7
NIIB0948	8	2617	B	17.5	8	17	4	3	10	4	7	5	0	29	9
NIIB1446	8	2617	B	17.5	7	18	4	3	10	4	7	5	0	22	7
NIIB2341	8	2617	SO	17.5	8	17	4	3	10	4	7	5	0	29	9

\*P : 患者, B : 浴槽水, C : 冷却塔水, SO : 土壌



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

総合研究報告書  
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 富山県で多く発生するレジオネラ感染症の感染源として、浴用水に加えて、それ以外の感染源を探求するため、環境中の *Legionella* 属菌の生息状況を調査した。3年間で調査対象としたのは、浴用施設関連では浴用水 168 検体、シャワー水 89 検体、カラン水 30 検体、計 287 検体である。河川水は、富山市内の市街地を流れる市中河川から採水した 40 検体である。*Legionella* 属菌の通常の培養法による検出率は、浴槽水では 20.3%、シャワー水では 24.7%、カラン水では 30.0%で、陽性検体の約 6 割が 10~99 CFU/100 ml であった。河川水においては、アメーバ培養法により 30.0% (12/40 検体) から *Legionella* 属菌が検出された。道路沿いのエアロゾル調査では、調査した 12 地点のいずれからも *Legionella* 属菌は検出されなかった。しかしながら、遺伝子検査法では、12 地点すべてから気候に関係なく *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、エアロゾル中に広く *Legionella* 属菌が浮遊していることが示唆された。また、浴室内と同等の遺伝子量が得られたことから、感染経路となりうることを示すものと思われる。

*L. pneumophila* 血清群 1 を目的とする免疫磁気ビーズ (*Lp1*-IMB) 法について、接種菌の回収率は *Lp1* では 25.0~50.0%であったのに対し、*Lp6*、*Lp5* では 7.1%、9.6%、*L. bozemanii* や *L. cherii*、*L. anisa* については、0.0~0.01%と低かった。また、*Lp1* とそれ以外の *Legionella* 属菌懸濁液を混合した場合の *Lp1* の回収率は、等量混合した場合で、12/16 試験 (75.0%) で 40.0%以上を示し、他の菌の回収率より高かった。*Lp1*-IMB 法は、*Lp1* を目的とする感染源特定のための検査法として有用であると思われた。一方、*Lp1* を特異的に検出する遺伝子検査法 (プローブ法) は、*Lp1*-IMB 法、通常培養法いずれよりも感度が高かったことから、感染源を特定するための詳細な培養検査の前にスクリーニング法として使用することが効率的であると思われた。

これまでの環境調査から、富山県におけるレジオネラ症発生が多い理由を明らかにすることはできなかったが、新たな感染源の探求と共に、患者への感染様式の解明と、患者から分離される *Lp1* に注目した検査法の検討を継続することが重要であると思われる。また、この *Lp1* については、感染源調査の中で、選択的に分離する必要があるため、*Lp1*-IMB 法が遺伝子検査と共に使用することが有用であると思われることから、今後はこの方法について検討し、効率を上げる必要があるであろう。

## 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、2018年の全国での届出数が2,130件と多く、統計を取り始めた2000年から増加傾向が続いている<sup>1)</sup>。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であるだけでなく、その罹患率(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。しかしながら、レジオネラ症の多くを占める散発事例での感染源は特定されることは極めて少ない。

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、富山県の浴用施設の浴槽水、シャワー水およびカラン水の*Legionella*属菌の棲息状況を調査した。また、これまでの調査で*Legionella*属菌が検出された環境検体について、ヒトへの感染様式を明らかにするため、検体採取近辺で空気中に浮遊する*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、浴用施設の浴槽水、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28~30年度に34施設で採取された128,89および30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、平成28~29年度にかけて、3~11月に計40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<sup>2)</sup>に準じて行なった。

濃縮方法：浴用水、シャワー水、カラン水および河川水(各500~1,500 ml)は、メンブランフィルター(直径47 mm, 0.2 μm, ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE)で吸引ろ過し、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 μlをGVPC培地(日水製薬)にコンラージ棒で広げて35℃で培養した。ただし、酸処理検体は、200 μlについて同様に培養した。非濃縮検体については、未処理の100 μlをGVPC培地にコンラージ棒で広げて、35℃で7日間培養し

た。河川水は、濃縮検体 5 ml のうち 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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水については、古畑らの報告を参考に、アメーバ共培養法を実施した<sup>3)</sup>。平成 28 年度は、濃縮液 1 ml に PYGC 培地で 30 1 週間培養したアメーバ増菌液を添加し、35 で 1 か月培養した。平成 29 年度は、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を添加し、35 で 1 か月培養した。河川水については、上記の培養法の残りの濃縮液にアメーバ増菌液を添加し、35 で 1 か月培養した。各培養液を酸処理液 (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  $\mu$ 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。

#### 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<sup>4)</sup>した斜光法で特異的な形態を観察し、血液寒天培地と BCYE- $\alpha$  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- $\alpha$  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

2016 年 6 月～2018 年 2 月にかけて、主に雨天の日の道路沿い 151 検体、浴用施設の浴室内 21 検体 (17 施設) および屋内 30

検体 (2 施設および民家 2 軒) について、液体サイクロン式エアサンプラー (コロリス  $\mu$ ) を用いてエアロゾルを捕集した。なお、浴室内 16 検体は施設のみスト発生装置 (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、Ethidium monoazide (EMA) 処理用の道路沿い 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、10 分毎に 15 ml にメスアップした。

### 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  $\mu$ l の 5% 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。qPCR 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 EMA 処理を実施した。DNA 抽出は、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) を用いた。

### 直接培養法

捕集液 100  $\mu$ 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、次世代シーケンシングを実施した。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 Tks Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ)を用いてPCR増幅した後、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。

#### BIOSAMP を用いたエアロゾル調査

2018年5~8月に道路沿いの6地点で、慣性衝突法によるエアサンプラー (BIOSAMP, ミドリ安全株式会社)を用いて、エアロゾルを計46サンプル捕集した。エアサンプラーにGVPC培地(日水製薬)を設置し、100 l/minの条件で5および15分間(各23検体)捕集した。捕集後、GVPC培地を35℃で7日間培養し、レジオネラ属菌を探索した。

### 3. 免疫磁気ビーズによる *Lp1* の選択的濃縮法の検討

#### 免疫磁気ビーズ作製方法

*Lp1*-IMB はデンカ生研で作製した。*Lp1* 以外の血清群に対する交差反応を吸収後、硫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 (*Lp1*-IMB) とした。

#### 使用菌株と菌懸濁液作製法

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

#### IMB による *Lp1* 濃縮法

浴槽水検体もしくは菌懸濁液 1 ml に *Lp1*-IMB 1 滴 (およそ 25  $\mu$ l) を滴下し、10分毎に転倒混和しながら30分間吸着させた。ビーズを磁石で集め、滅菌生理食塩水で洗浄した。この操作(洗浄)を2回実施した後、最終的に生食 100  $\mu$ l もしくは 200  $\mu$ 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  $\mu$ l を BCYE- $\alpha$  培地、GVPC 培地のどちらか1枚もしくは両方にコンラージ棒で拡げ、35℃で7日間培養した。

#### 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30~3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、 $10^{-5}$  の菌懸濁液 200  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 50  $\mu$ l を、それぞれ100倍濃縮液 800  $\mu$ l, 900  $\mu$ l, 950  $\mu$ l に接種、ビーズ処理に供する検水量を 1,000  $\mu$ 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)。

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、 $10^{-6}$  菌懸濁液 100  $\mu$ l を BCYE- $\alpha$  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*-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128検体、シャワー水60検体、カラン水30検体、計218検体であ

る。

*Lp1*-IMB 濃縮法：検体（100 倍濃縮液）を，希釈しない濃縮検体 1 ml と，平成 30 年度分の 92 検体については，滅菌生理食塩水で 5 倍希釈した希釈検体 1 ml についても検査を行った。これらの検体に *Lp1*-IMB 25  $\mu$ l を接種し，10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸着させた。ビーズを磁石で集め，滅菌生理食塩水で洗浄した。この操作（洗浄）を 2 回実施した後，最終的に生食 200  $\mu$ l あるいは 100  $\mu$ 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  $\mu$ l を GVPC 培地にコンラージ棒で拡げるだけとし，表面に接種した検体が確認できなくなってから 35  $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

平成 29 年度に採取された浴用水 39 検体，シャワー水 32 検体およびカラン水 15 検体については，培養前に熱または酸にて処理し，未処理検体と併せて BCYE- $\alpha$  培地，GVPC 培地の両方にコンラージ棒で拡げ，35  $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

#### *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 *Lp1* を検出する M $\acute{e}$ rault らの報告<sup>5)</sup>に従い，コンベンショナル PCR 法あるいは qPCR 法にて検出した。PCR は  $\times 2$  GoTaq Hot Start DNA Polymerase（プロメガ）12.5  $\mu$ l にプライマー（2  $\mu$ g/ $\mu$ l）各 1.25  $\mu$ l，滅菌蒸留水 8  $\mu$ l を混合し，これに検体濃縮液から抽出した DNA 2  $\mu$ l を接種し，94  $^{\circ}$ C 1 分加熱後，94  $^{\circ}$ C 30 秒，55  $^{\circ}$ C 30 秒，72  $^{\circ}$ C 30 秒の反応を 35 サイクル行い，72  $^{\circ}$ C 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。qPCR 法は，反応試薬として Premix Ex Taq（Probe qPCR）（タカラバイオ）を用いて実施した。

#### *Lp1* 特異的遺伝子の検出（sg1-qPCR 法）

DNA 抽出は，Loopamp レジオネラ検出試薬キット E（栄研化学）に添付の抽出試薬を用い，取扱説明書に従い実施した。sg1-qPCR は M $\acute{e}$ rault らの報告<sup>5)</sup>に従い，プライマーおよびプローブを作製し，反応試薬として Premix Ex Taq（Probe qPCR）（タカラバイオ）を用いて実施した。

#### ATP の測定

検水 100 倍濃縮液にルシパック Pen（キッコーマン）の専用綿棒を浸して約 100  $\mu$ l を吸い取り，携帯用簡易測定器を用いて検水 10 ml 当たりの RLU 値を測定した。

#### 4. 非濃縮検体を用いた培養法による *L. pneumophila* 最確数の検討

検水を付属の滅菌容器入れ，そこに Legiolert（アイデックスラボラトリーズ）培地を入れ，試薬が完全に溶解するまで混和した。検水 100 ml で検査する場合は，硬度試験紙にて硬度を測定し，度合いに応じてサプリメントを添加した。10 ml で検査する場合は，滅菌水 90 ml を付属の容器に入れ，そこに検水 10 ml を添加しよく混和し，10 倍希釈検体とした。それを定量用のトレイ（Quanti-Tray/Legiolert：QT-L）に入れ，専用のゴムシートに装着したのち，専用シーラーで密封した。それを湿潤箱に入れ，乾燥しないように水を含ませたペーパータオル等と共に密閉し，39  $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

（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 2 に示した。*Legionella* 属菌が検出されたのは、浴槽水で 26/128 検体（20.3%）、シャワー水で 22/89 検体（24.7%）、カラン水で 9/30 検体（30.0%）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*、シャワー水では菌種不明の *Legionella* 属菌（UT）、カラン水では *Lp5* であった。

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 3 に示した。*Legionella* 属菌の検出率は、平板培養法で 38/155 検体（24.5%）、アメーバ共培養法で 24/155 検体（15.5%）と平板培養法で高かった。平板培養法で陽性となった 38 検体からは、*Lp1* と UT がそれぞれ 10 検体から分離され、最も多かった。アメーバ共培養法で陽性となった 24 検体からは、*Lp6* と UT がそれぞれ 7 検体から分離され、最も多かった。4 検体はアメーバ共培養法でのみ陽性となったが、18 検体は平板培養法でのみ陽性となった。

河川水における *Legionella* 属菌の月別の検出率と分離された菌を表 4 に示した。12 検体から *Legionella* 属菌が検出された（検出率 30.0%）。*Lp2* と *Lp6* がそれぞれ 2 検体から分離され、最も多かった。

### 2. バイオエアロゾルにおける *Legionella* 属菌検出状況

道路沿い 151 検体、浴室内 21 検体および屋内 30 検体について調査した結果、直接培養法およびアメーバ共培養法において *Legionella* 属菌は分離されなかった（表 5）。しかしながら、遺伝子検査法においては、道路沿い検体で 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 36.7%（11/30 検体）から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。16S rRNA 遺伝子の幾何平均コピー数（copies/m<sup>3</sup>）は、道路沿い検体で 62.7、浴室内検体で 66.0、屋内で 23.2 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（表 6）。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 遺伝子の幾何平均コピー数（copies/m<sup>3</sup>）は 16.2 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 遺伝子の幾何平均コピー数（copies/m<sup>3</sup>）は 9.4 であった。

2016～2017 年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 遺伝子の幾何平均コピー数（copies/m<sup>3</sup>）は 35.5～106.4 であった。

サンプリングの 7 日前の気候と遺伝子量との関連を調査した結果、降水量と 16S rRNA 遺伝子のコピー数との間に、正の相

関が認められた(図2)。サンプリング当日および3日前の気候についても同様に調査したが、遺伝子量との有意な相関は認められなかった(データ未掲載)。

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7-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7-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た。当該リードが検出された各検体に占める *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7-c)。

BIOSAMP を用いたエアロゾル調査では、46 検体について検査した結果、いずれの検体からもレジオネラ属菌は分離されなかった。

### 3. *Lp1*-IMB による実検体からの *Lp1* 濃縮分離法

結果を表8に示した。*Lp1*-IMB および通常培養法の両法で *Lp1* が分離されたのは8検体、いずれからも分離されなかったのは196検体であった。*Lp1* が直接培養法で分離され、*Lp1*-IMB 法で分離されなかった検体の *Lp1* の菌数は 10 CFU/100 ml と少なかった。*Lp1* を含む供試菌(表1)の *Lp1*-IMB による回収率結果を表9に示した。全体としてみると、*Lp1* の回収率が 25.0 ~ 50.0%であったのに対し、*Lp6*、*Lp5* では 7.1%、9.6%、*L. bozemanii* や *L. cherii*、

*L. anisa* については、0.0 ~ 0.01%と低かった。 $10^{-5}$  より  $10^{-6}$  希釈液での回収率が高かった。*Lp1* とそれ以外の *Legionella* 属菌懸濁液を混合した場合の結果は図3,4に示した。等量混合した場合(図3)では、*Lp1* の回収率は 16 回中 11 回(68.8%)で 40.0%以上を示し、他の菌の回収率より高かった。一方、*Lp1* と他の *Legionella* 属菌懸濁液を 1:9 で混合した場合、6、9 回目を除く 1 ~ 11 回目(9/17, 52.9%)で *Lp1* の回収率は 40.0%以上であったが、14 回目を除き、12 ~ 17 回目の試験では回収率は 10%以下と低かった。回収率が低かった理由は不明であった。

次に、実検体における *Lp1* 添加回収試験の結果を表10に示した。添加した *Lp1* の回収率は、BCYE- $\alpha$  培地、GVPC 培地にそれぞれに発育した *Legionella* 属菌数を、BCYE- $\alpha$  培地で求めた推定接種菌数と比較した(表10-a)。処理法別による回収率を見ると、BCYE 培地では酸処理による回収率(35.9%)がわずかに高かった。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、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。これらの方法別、培地別の回収率の統計解析による比較には、BCYE- $\alpha$  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検体で行った。

未処理の BCYE- $\alpha$  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5-a)。加熱処理、酸処理の場合も同様に、BCYE- $\alpha$  培地と比

較するとGVPCでは回収率が有意に低かった ( $P < 0.01$ )。一方、処理方法について比較すると、BCYE- $\alpha$  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 5-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 5-c)。

*Lp1* 特異遺伝子の検出結果を表 11 に示した。遺伝子が検出されたのは平成 29 年度では 4 検体、平成 30 年度では 19 検体であった。これをそれぞれ、*Lp1*-IMB 法と通常培養法の 2 法と比較した (表 11-a, b)。

対象遺伝子を *wzm* としたコンベンショナル PCR 法では通常培養法との相関が良く、特異度感度ともに高かった。これに対し、*Lp1*-IMB 法は感度が低かった。また、平成 30 年度に実施した *sg1*-qPCR 法との比較では、*Lp1*-IMB 法も通常培養法も、遺伝子検査法に対し、特異度は高かったが、感度が低かった。

非濃縮検体を用いた培養法 (Legiolert) による *L. pneumophila* 最確数の検討については、*Lp* 陽性となったのは 100 ml 検体で 3/29 (10.3%) 検体、10 ml 検体で 8/63 (12.7%) 検体であった。100ml, 10ml 検体を用いた結果の特異度はそれぞれ 95.8%, 96.0%, 感度は 40.0%, 43% であった。感度は高くなかったが、特異度は高く、陰性をよく予想できる結果であった。(表 12-a, b)。

#### D. 考察

富山県におけるレジオネラ症の報告数は

2000 年以降、年間 20~30 名で推移していたが、2015 年、2018 年は 40 名を超える届出であった。本疾患については、患者のおよそ 4 割では浴用水との関連性が強く疑われたが、多くの事例で感染源が特定されないのが現状である。これまでの研究から、感染源が不明とされた患者喀痰から分離された *Lp1* の ST120 について、水たまりから同 ST の菌が分離されるなど、これまで報告されていない環境にも感染源の可能性のあることを示してきた<sup>6)</sup>。これらの事実から、この 3 年間では新たな感染経路を探求するとともに、実際に患者への感染経路を明らかにするため、これまでと異なる手法、すなわち直接吸入するリスクの高いと思われるエアロゾルについてレジオネラ属菌の汚染状況を調査した。

浴用水関連の浴槽水、シャワー水、カラン水では、検出率はカラン水がわずかに高かったが、それらの菌数は少なく、菌数が多かったのは浴用水であった。また、ヒトからもっとも多く分離される *Lp1* は、浴用水で多く検出され、感染源と疑われる背景を示した。アメーバ共培養法と平板培養法を比較すると、浴用施設関連の検体では、アメーバ共培養法の感度は低かったが、河川水の調査ではアメーバ共培養法での *Legionella* 属菌の検出率が高かった。アメーバ共培養について、浴用水の調査で検出率が低くなった理由は明らかではないが、アメーバ株の選定、共培養条件の変更などにより、改善する可能性もあると考えられる。

3 年間で新しく検討したエアロゾルにおける *Legionella* 属菌の汚染状況については、培養により検出することはできなかった。



しかしながら、遺伝子検査法においては、エアロゾル中に広く *Legionella* 属菌が浮遊していることが示唆された。レジオネラ属菌の増殖にはある程度日数が必要なため、7 日前の降水量とレジオネラ属菌の遺伝子量との間に、正の相関が認められたと考えられた。雨天によって土壌などに含まれるレジオネラ属菌が道路沿いに流れ出し、アメーバなどに寄生して増殖しているのかもしれない。海外では、降水量とレジオネラ症の発生率に、正の相関があることが報告されている<sup>7)</sup>。また、道路沿いから浴室内と同等のコピー数が得られたことも、感染経路となりうることを示すものと思われる。

レジオネラ患者を減少させるためには、まずは、およそ 4 割の感染源と推定されている浴用水の衛生管理を徹底的に行うことが、最も確実な方法であると思われる。レジオネラ症が発生したときに、行動調査に基づき、感染源と疑われる環境検体から *Legionella* 属菌を検出することは重要である。免疫磁気ビーズを用いて、目的とする菌を選択的に濃縮する方法について検討した結果、本法を使用することは有用であることが明らかとなった。とりわけ、濃縮検体を希釈する、すなわち、濃縮率を変更することでより検出率が高くなる傾向が認められた。これらの事実から、感染源を特定することが求められる行政検査などでは、検体の濃縮率などを変えながら、免疫磁気ビーズを使用することは有用であると思われる。加えて、*Lp1* に特異的な配列を検出する遺伝子検査法が有用であったことから、患者の起因菌が *Lp1* の場合には、PCR 法（プローブ法）によりスクリーニングすることで、陽性検体について丁寧な培養を行

うことも可能であると思われる。

#### 結語

これまでの環境調査から、富山県におけるレジオネラ症発生が多い理由を明らかにするためには、新たな感染源の探求と共に、患者から分離されている *Lp1* に注目した調査が必要であると思われる。

また、この *Lp1* については、感染源調査の中で、選択的に分離する必要がある、遺伝子検査と共に使用することが有用であると思われることから、今後はこの方法について検討し、効率を上げる事が必要であろう。

#### 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-sokuhou-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, 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) Kanatani J, et al. 2013. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 3959–66.
- 7) Hicks LA, et al. 2007. Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis. *Epidemiol. Infect.* 135:811–817.

#### F . 研究発表 報告

- 1) 磯部順子 , 金谷潤一 , 他 : 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2015 年) 富山県衛生研究所年報 .39,61-67 , 2016.
- 2) 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) 磯部順子 , 金谷純一 , 他 . 2018 . 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2017 年) . 富山県衛生研究所年報 . 41:32-37 .
- 論文発表
- 1) Kanatani J, et al. 2017. Prevalence of

*Legionella* Species Isolated from Shower Water in Public Bath Facilities in Toyama Prefecture, Japan. *J Infect Chemother.* 23:265-270. 2017.

#### 学会発表

- 1) Junko Isobe, Jun-ichi Kanatani, Keiko Kimata, Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Masanori Watahiki. Distribution of *Legionella* spp. in windshield washer fluid of motor vehicles in Toyama, Japan. ESGLI 2017. London. September. 2017.
- 2) Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Shiho Norimoto, Keiko Kimata, Kaoru Uchida, Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, Masanori Watahiki. Detection and identification of *Legionella* species in aerosols from the area nearby asphalt roads and from bath water in public bath facilities in Toyama Prefecture, Japan. ESGLI 2017. London. September. 2017.
- 3) Junko Isobe, Jun-ichi Kanatani, Keiko Kimata, Kaoru Uchida, Masanori Watahiki, Fumiaki Kura, Kensuke Ozawa, Fumio Gondaira, Junko Amemura-Maekawa. Evaluation of an immunomagnetic separation method to detect *Legionella pneumophila* serogroup 1 from environmental specimens. ESGLI 2018. Lyon. August 2018.
- 4) 磯部順子 , 金谷潤一 , 木全恵子 , 内田 薫 , 綿引正則 , 倉 文明 , 小澤賢介 , 権平文夫 , 前川純子 . 浴用水から *Legionella pneumophila* 血清群 1 を検出するための免疫磁気ビーズによる濃縮分離法の検討 第

45 回日本防菌防黴学会 2018 年 11 月 東京 .

5) 金谷潤一，綿引正則，木全恵子，加藤智子，内田 薫，倉 文明，前川純子，磯部順子 . 大気エアロゾル中のレジオネラ属菌検出状況 第 45 回日本防菌防黴学会 2018 年 11 月 東京 .

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 . Lp1-IMB 法の検討に供試した *Legionella* 属菌

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

表 2 . 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	33	128	26	20.3%	102	16	7	3
シャワー水	34	89	22	24.7%	67	10	11	1
カラン水	21	30	9	30.0%	21	9	0	0

b . 血清型別

	血清型別										
	Lp1	Lp3	Lp4	Lp5	Lp6	Lp8	Lp9	Lp15	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. micdadei</i>	UT
浴槽水	12	2	1	1	6	2	4			1	1
シャワー水	2	2	1	6	5			4			7
カラン水	1	1	1	4	1				1		3

表 3 . 浴用施設における平板培養法およびアメーバ共培養法との比較

a . 陽性数

	検体数	陽性数	検出率 (%)
平板培養法	155	38	24.5%
アメーバ共培養法	155	24	15.5%

b . 血清型別

	血清群								
	Lp1	Lp3	Lp5	Lp6	Lp9	Lp15	<i>L. micdadei</i>	<i>L. cherii</i>	UT
平板培養法	10	4	8	8	1	4	1		10
アメーバ共培養法	2	3	4	7			1	1	7

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	20	18	38
	陰性	4	113	117
	計	24	131	155

表 4 . 市中河川水における *Legionella* 属菌検出結果

		陽性数／検体数		血清型
		平板培養	アメーバ共培養	
2016年	5月	Not tested	3/5検体	<i>Lp1</i> 、 <i>Lp6</i> 、 <i>Lp15</i>
	6月	Not tested	0/5検体	
	9月	Not tested	2/5検体	<i>Lp2</i> 、 <i>L. waltersii</i>
	10月	Not tested	1/5検体	<i>Lp2</i> 、 <i>L. longbeache</i>
2017年	3月	0/5検体	0/5検体	
	9月	0/5検体	3/5検体	<i>Lp3</i> 、 <i>Lp6</i> 、 <i>Lp7</i> 、UT
	10月	0/5検体	0/5検体	
	11月	0/5検体	3/5検体	<i>Lp4</i> 、UT

表 5 . エアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果（捕集液；0.005% Tween 80）

採取場所	検体数	陽性数			16S rRNAコピー数の幾何平均 (copies/m <sup>3</sup> )
		平板培養	アメーバ共培養	qPCR (%)	
道路沿い	151	0	0	114 (75.5)	62.7
浴室内	21	0	0	15 (71.4)	66.0
屋内	30	0	0	11 (36.7)	23.2

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

表 6 . エアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果（捕集液；滅菌水）

	検体数	陽性数 (%)	16S rRNAコピー数の幾何平均 (copies/m <sup>3</sup> )
平板培養	30	0	
アメーバ共培養	30	0	
qPCR	30	26 (86.7)	16.2
EMA qPCR	30	20 (66.7)	9.4

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

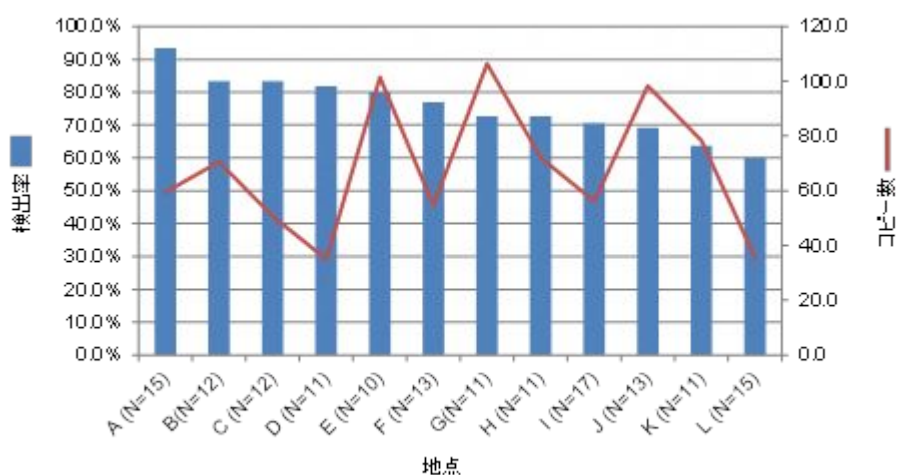


図 1 . 地点別のエアロゾル中における *Legionella* 属菌検出結果

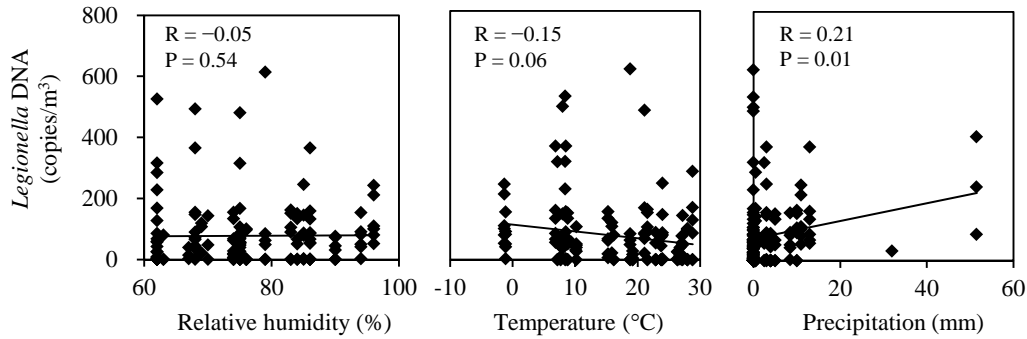


図 2 .サンプリングの 7 日前の気候とエアロゾル中における *Legionella* 属菌の遺伝子量

表 7 . 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 8 . IMB による *Legionella* 属菌 ( 単一血清群 ) の回収率

		Lp1-IMB法	
		+	
通常培養法	+	8	8
		6	196

表 9 . IMB による *Legionella* 属菌 ( 単一血清群 ) の回収率

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

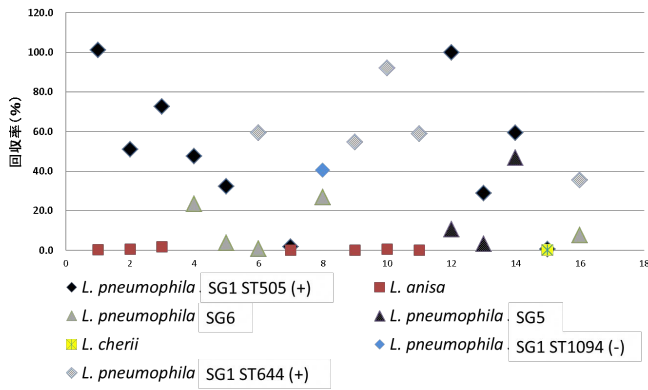


図 3 . 混合する菌を等量とした場合の回収率の比較

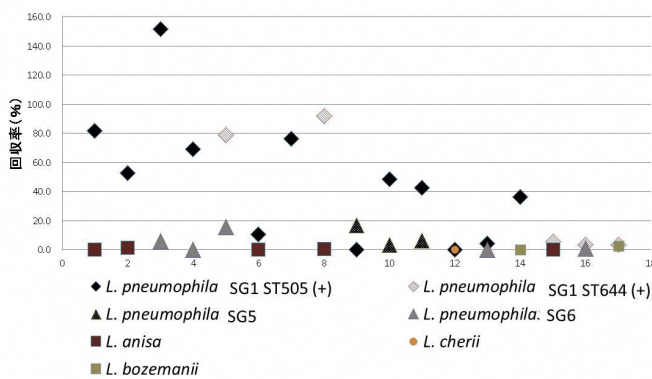


図 4 . Lp1 菌の混合比を 1/10 にした場合の回収率の比較

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

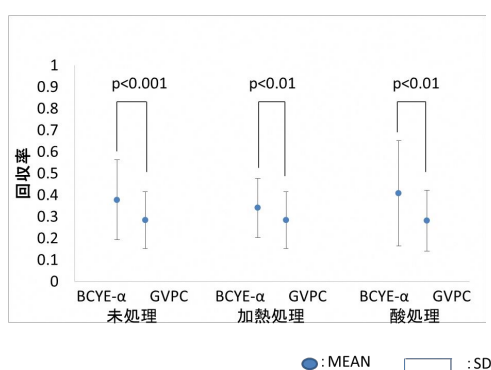


図 5-a . 添加回収実験における回収率の比較  
(BCYE-α 培地と GVPC 培地の比較)  
N=39 で実施した対応のある t 検定

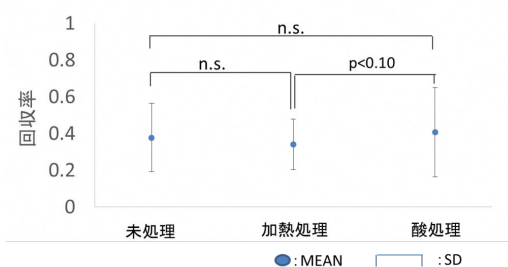


図 5b . 添加回収実験における回収率の比較  
(BCYE-α 培地での処理法の比較)  
N=39



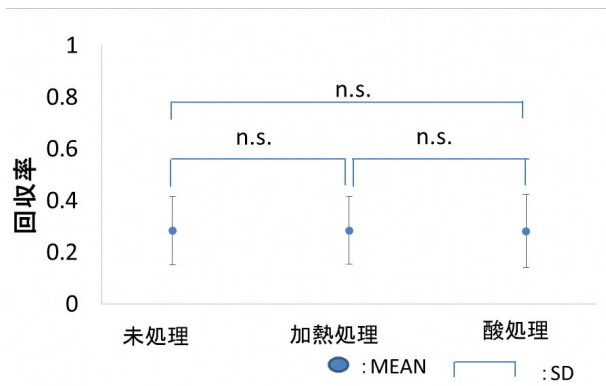


図 5-c . 添加回収実験における回収率の比較  
(GVPC 培地での処理法の比較)  
N=39

表 11 . *Lp1* 特異遺伝子と *Lp1*-IMB 法・通常培養法における *Lp1* の検出結果の比較

a.平成 29 年度実施

	qPCR ( <i>wzm</i> )		計
	+	-	
<i>Lp1</i> -IMB	+	2	2
	-	47	49
	4	47	51
通常培養法	+	4	5
	-	79	79
	4	80	84

b.平成 30 年度実施 (プローブ法)

	sg1-qPCR		計
	+	-	
<i>Lp1</i> -IMB	+	4	5
	-	72	87
	19	73	92
通常培養法	+	4	5
	-	72	87
	19	73	92

表 12 . Legiolert と通常培養法における *Lp* の検出結果の比較

a . 検水 100ml の場合

	通常培養法		
	+	-	計
Legiolert (100ml)	+	2	3
	-	23	26
	5	24	29

b . 検水 10 ml の場合

	通常培養法		
	+	-	計
Legiolert (10ml)	+	2	8
	-	47	55
	14	49	63

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」  
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	岡山理科大学
研究分担者	泉山信司	国立感染症研究所
研究協力者	縣 邦雄	アクアス株式会社技術顧問
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	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所
研究協力者	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
研究協力者	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所

研究要旨

汚染予防対策を確立することを目的として、入浴施設の浴槽、カラン並びにシャワー及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態調査を行った。

神奈川県内の 1 入浴施設において、カラン及びシャワーにレジオネラ属菌による継続的な汚染が検出された。そこで、施設により対策を講じられ、その効果を検証した。カラン・シャワーの営業前の流水とシャワーヘッドの消毒ではレジオネラ属菌の汚染を取り除くことはできなかった。続いてカランおよびシャワーの交換を行ったが、検査によりレジオネラ属菌が検出された。さらに、高置貯湯槽とカラン・シャワー及びその間の配管に高濃度塩素消毒を施したところ、レジオネラ属菌は培養にて検出されなくなった。しかし、この効果は持続しなかったため、高置貯湯槽に入る配管に塩素添加装置を設置し、貯湯槽と配管中の温水を消毒する対策を行った。消毒開始後の調査では、培養によりレジオネラ属菌が検出されたため、平成 30 年度に調査を行ったところ、再度レジオネラ属菌が検出された。医療機関については、平成 28 年度は医療機関の給水系・給湯系の状況及び給水系の理化学項目の測定結果とレジオネラ属菌による汚染の関連性を明らかにすることを試みた。その結果、関連性を明らかにすることはできなかった。医療機関の洗面台の蛇口は混

合栓が多く使用されているため、平成 29 年度は給水系と給湯系から別々に試料を採取して調査を行った。その結果、いずれもがレジオネラ属菌により汚染されていた。さらに、蛇口の初流水と 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。1 医療機関に塩素添加装置を設置し、レジオネラ汚染に対する塩素消毒の効果を検証した。別の医療機関では独自に添加装置を設置していたが、レジオネラ汚染があるため、塩素濃度の効果を検証した。装置の設置あるいは添加量の増加により給水系の遊離残留塩素濃度が上昇し、一定の効果は見られたが、汚染を完全に除くには至らなかった。フラッシング等の追加の効果が必要であることが示唆された。

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染問題に関するシンポジウムを平成 30 年に開催した。参加者に対してアンケート調査を実施し、レジオネラ汚染問題への認識ができた、新たな情報を得ることができた等の感想や要望が得られた。

#### A. 研究目的

本調査は、入浴施設の浴槽、カーン並びにシャワー及び医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染の実態を調査し、汚染予防対策並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並びに医療機関の給水・給湯設備とした。

医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染は、その実態を把握している医療機関において対策の実施等に関する関心が非常に高い。一方で、その実態を把握していない医療機関の多くは、給水・給湯系がレジオネラ属菌により汚染されるリスクが存在することさえ認識していない。そ

こで、医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染問題の存在を広く周知するとともに、問題の解決に向けた活発な議論を展開する場を設けることを目的として、シンポジウムを開催した。

#### 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と、2 つの浴室のそれぞれについて浴槽水、湯口水及び蛇口とシャワーからの水を試料として採取した。採取した試料の処理等については各年度の報告書に記載した。

医療機関では、洗面台等の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。採取方法や測定項目は各年度の報告書に記載した。

## 2) 理化学項目の測定

水質とレジオネラ汚染の関連性を解析するために、医療機関及び建築物の蛇口水と受水槽から採取した水試料を対象に、理化学項目を常法により測定した。測定法の詳細は平成28年度報告書に記載した。

## 3) レジオネラ属菌の分離

試料は直径47mm、孔径0.2 $\mu$ 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倍段階希釈し、原液と10倍および100倍希釈液の各100 $\mu$ 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で7日間培養した。*Legionella*属菌を疑う集落をBCYE $\alpha$ 寒天平板培地(Oxoid)に転培し、性状により鑑別を行った。

## 4) LAMP法によるレジオネラ属菌遺伝子の検出

LAMP法によるレジオネラ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) レジオネラ属菌の同定

調査試料から分離されたレジオネラ属菌は、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によりレジオネラ属菌と *L. pneumophila*であることを決定した。さらに、型別用血清(デンカ生研)より種の鑑別を行った。

## 6) 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。

## 7) 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、平成28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た。

## 8) *L. pneumophila* 計数用キットの評価

海外において、水道水における *L. pneumophila* 汚染を簡易に検出し、

計数も可能であるキットが市販されている。医療機関の給水系を対象にして、キットの評価を行った。

#### 9) シンポジウムの開催

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ属菌の汚染問題を扱ったシンポジウムを企画し、開催した。

### 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行った。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日及び10月2日に採水し、レジオネラ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レジオネラ属菌が増殖したと推測された。

#### 2) 医療機関

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

平成28年度は3医療機関と1研究機関の給水系の試料を対象に、理化学項目の測定を行い、レジオネラ汚染との関連性を解析したが、関連が見られる項目は見いだせなかった。

医療機関Aでは次亜塩素酸ナトリウムの添加装置を設置することの効果、また医療機関Bでは既に添加装置が設置されていたので、その添加量を増やすことによる遊離残留塩素

濃度の上昇のレジオネラ汚染に対する効果の検証を行った。

医療機関 A では手術室の手指洗浄場ではレジオネラ属菌が検出されなかったことから、次亜塩素酸濃度を上げたことの効果があったと考えられる(表 2)。その他の地点でもレジオネラ属菌数が減少していることから、添加量の増加の効果が表れたと思われる。定期的なフラッシングを実施することで効果がさらに上がることが期待された。

医療機関 B では、給水系の塩素濃度を上げたことにより遊離残留塩素濃度が上昇したが、レジオネラ属菌が検出された場所は減少せず、また菌数も減少しなかった。次亜塩素酸ナトリウム添加量を増やしたにもかかわらず、初流水の塩素濃度は 0.2mg/L 前後あるいはそれ以下であったことから、蛇口の使用頻度が低いことが原因である可能性が推定された。また、給湯系では 3L 流水後も水温が 50 に達しておらず、これも使用頻度が低いことが推測された。

浴室からはレジオネラ属菌は全く検出されなかったが、給水系の初流水の遊離残留塩素濃度は 0.4mg/L 前後であり、給湯系は 3L 流水後の水温が 55 であったことから、使用頻度が高いことが推測された。

医療機関 C は、末端給水栓の遊離残留塩素濃度を 0.9mg/L となるように添加量を設定し、さらに全病室の蛇口から毎日 1 分間のフラッシングを行う対策を実施している。平成 30

年度の調査ではレジオネラ属菌が検出されたのは 26 か所 32 試料のうち 2 か所から少数の *L. pneumophila* が検出されたにとどまった。給水系からレジオネラ汚染を完全に取り除くことはかなり困難であることが示されているが、感染のリスクを確実に減少させていると思われる。

### 3) *L. pneumophila* 計数用キットの評価

平成 30 年度に医療機関 B 及び C の試料を用いて、*L. pneumophila* 計数用キット(レジオラート:アイデックスラボラトリーズ)による *L. pneumophila* の評価を試みた。*L. pneumophila* 以外の菌種(*L. anisa* 及び *Legionella* sp.) では菌数が  $10^{2-4}$  であるにもかかわらずキットが陽性を示さなかったことから、特異性が高いことが示された。一方、*L. pneumophila* が検出されたにもかかわらずレジオラートが陽性反応を示さなかったのは検出菌数が 10 CFU/100ml と低かったことから、不一致が生じたものと思われた。

### 4) 講演会・シンポジウムの開催

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染問題の現状と課題を周知し、解決のための議論の場を提供することを目的として、講演会・シンポジウム「医療機関の給湯・給水系に潜むレジオネラ感染リスク - 実態と予防策 - 」を平成 30 年 10 月 27 日に国立感染症研究所にて開

催した。

#### D.まとめ

3年間の研究期間において、継続的に入浴施設及び医療機関の給水系及び給湯系を対象にしてレジオネラ汚染状況の調査を実施した。レジオネラ汚染の原因は使用頻度の低い蛇口や配管における遊離残留塩素濃度の低下、給湯系における配管中の温度の低下が推測された。こうした汚染に対して種々の対策を検討してきたが、効果が限定的であり、完全に汚染を除去するには追加の対策が必要であると推測された。今後さらに検討すべき対策として、使用頻度の低い蛇口での流水（フラッシング）、塩素濃度・温度の維持、定期的な配管の消毒、使用頻度の低い蛇口の廃止、レジオネラ対策を踏まえた系の設計・管理等が挙げられる。さらに汚染状況の把握と対策の検証を行い、効果的な対策の追及を行っていく必要があると考えられる。

#### E. 研究発表

T Kuroki, Y Watanabe, H Teranishi, S Izumiyama, J Amemura-Maekawa, F Kura (2017): Legionella prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. *Epidemiology and Infection* 145(7):1398-1408.

T Kuroki, J Amemura-Maekawa, H Ohya, I Furukawa, M Suzuki, T Masaoka, K Aikawa, K Hibi, M Morita, K Lee, M Ohnishi, F Kura (2017): Outbreak of Legionnaire's disease caused by *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 13. *Emerging Infectious Diseases* 23(2):349-351.

大屋日登美、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、古川一郎、前川純子、倉文明、泉山信司、黒木俊郎 (2018): 医療機関の給水設備におけるレジオネラ属菌の汚染実態 *日本感染症学雑誌* 92:678-685.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

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」  
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	岡山理科大学
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レジオネラ属菌検出のための標準的な検査法の検討を重ね、推奨法とすべき検査法を確定した。この推奨法に基づいて検査機関に対する研修を実施して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を試験的に作成した。

入浴施設におけるレジオネラ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することが求められている。本研究では、これまでの研究成果を見直し、あるいは関連する通知等を参照して、公衆浴場における衛生等管理要領のレジオネラ属菌等に関連した項目の改訂の提言を行った。

A. 研究目的

公衆浴場の浴槽水等の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には細心の注意と修得された技術等が必要である。そこで、OJT だけでは修得することが難しい検査法を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当研究班（研究分担者：森本 洋及びワーキンググループによる）で行った。さらに、この試験法を普及させるためには研修を開催することが重要であることが研究者間で認識されている。そこで、研修において利用するマニュアルの作成を検討した。

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が行われた。得られた研究成果に基づいて対策マニュアル等が改訂され、実際に活用されている。本研究では、これまでの研究成果を検証するとともに関連する通知等を参照して、公衆浴場における衛生等管理要領等のレジオネラ属菌に関連した項目の改訂の提言を行った。

## B. 研究方法

### 1. 検査法のマニュアルの作成

水試料からのレジオネラ属菌検出のための試験法についてステップごとにその内容を詳細に検討し、「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」（研究分担者：森本洋及びワーキンググループによる）案が提示された。そこで、この推奨法を基にして、研修等で活用できるマニュアルの作成を試みた。

### 2. 公衆浴場における衛生等管理要

## 領の改訂の提言

入浴施設におけるレジオネラ対策等を検討するために、「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」班を含めて、これまでに複数の研究班が研究活動を行った。これらの研究班により得られた成果を見直し、また関連する通知等を参照して、公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言を行った。

平成 28 年度は、公衆浴場の原水等の水質基準にある大腸菌群を大腸菌に変更することの適否を検証した。

平成 29 年度は、衛生管理等に関する事項、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。

平成 30 年度は、過去 2 年間の検討結果を踏まえ、さらに改訂することが望ましい項目を詳細に検討し、提言の作成を行った。

## C. 結果及び考察

### 1. 検査法のマニュアルの作成

ワーキンググループによって提示された検査法について、研修等で使用する場に見やすく使いやすいマニュアルを作成することを配慮して、フォントや行数等を検討した。これにより検査法の各項目が読みやすいようにした。

図はその説明がある項目のすぐ後に配置するようにして、図を見ることの利便性に配慮した。注釈はそれ

が必要な個所のできるだけ近くに配置できるよう、各ページを縦に２段に分けて、左側に本文、右側に注釈を配置した。

## ２．公衆浴場における衛生等管理要領等の改訂の提言

平成 28 年度は原水等の水質基準を大腸菌群から大腸菌に変更することの適否を検討し、妥当であるとの結論を得た。検査方法も特定酵素基質法を採用することとした。ただし、海洋細菌が含まれる試料について特定基質酵素法を用いて検査すると、海洋細菌の一部に大腸菌様性状を示すものがあり、偽陽性となることに留意する必要があることを示した。

平成 29 年度は、シャワー、集毛器、貯湯槽、調整箱並びに気泡発生装置等の衛生管理の強化を図ることとし、衛生等管理要領に管理方法等の記載を検討した。

平成 30 年度は、衛生等管理要領の改訂を提言する根拠を明らかにし、これを整理した。

## D. 発表

該当なし

## E. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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  
 平成 28-30 年度総括・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	
	田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター	
	中西 典子	神戸市環境保健研究所	
	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	
三津橋和也		北海道立衛生研究所	
武藤千恵子		東京都健康安全研究センター	
研究代表者	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	
	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、平成 27 年度以降、実施母体を日水製薬株式会社とし 4 年連続で行われてきた。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、バイオメュー社の BioBall(特注品)を使用した。検査法については、配付試料がより安定した性能を維持できる範囲内で、検査工程のどの部分に重きを置くかの定義付けを行い、一部指定した。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所等については、WG においても独自に集計・解析を実施し結果の比較を行った。平成 29 年度からは、濃縮検査結果について回収率による考え方を取り入れた。解析の結果、特定のいくつかの機関に検査手技の

再確認が必要と判定される傾向が認められた。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た。標準的検査法については、これまで WG が推奨している方法と改訂された ISO 法との調整を行い、「公衆浴場における衛生等管理要領」内の推奨検査法「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」として提示した。

#### 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〉

平成27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ており、本研究期間においても以下の手順で実施された。

まず日水製薬より「参加募集案内文、参加要件、指定法」(別紙(平成30年度実施分)参照)が示され参加募集が行われた。その後、試料、試料送付案内、試験概要、結果記入メモ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。結果回答は1カ月以内とされ、解析結果は、毎年1月末日に、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〉

平成28年度165機関(延べ171試料配付)、平成29年度173機関(延べ176試料配付)、平成30年度148機関(延べ151試料配付)に対し実施された。うち研究班への協力機関として地方衛生研究所等が平成28年度、29年度71機関、平成30年度70機関が参加した。

##### 〈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(平成30年度実施分)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。地方衛生研究所等については、WGにおいても独自に集計・解析を実施し、平成27年度以降の結果とも比較した。なお報告値について、WGでは平成25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<sup>1-4)</sup>。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(非濃縮検体①は×100、非濃縮検体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。

本調査での非濃縮検体の目標良好範囲は、以下のように設定した。メーカー保証による95%信頼区間の数値に対し、レジオネラ属菌検査で使用される、検体 100ml 中の cfu (colony forming unit) に換算し、下限値、上限値を計算。次に、実検体の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、前述計算した下限値については 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し、目標良好範囲を設定することとした。

平成 29 年度から、濃縮検体については、回収率により判定(平成 29 年度は参考)を行った。目標とした回収率は、平成 28 年度の外部精度管理で報告を求めたすべての検体(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%を下限とし、上限を 100%未満とした。

日水製薬で行った全国の結果集計・解析は、毎年 1 月末日に、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システムとなっている。

## 2) 標準的検査法および研修システム

これまで WG が推奨している方法<sup>1, 5)</sup>と平成 29 年 5 月に改訂された ISO 法との調整を行った。一部の検査工程(ろ過濃縮におけるろ過フィルターの洗浄時間)について、改訂 ISO 法との比較が必要であったことから、外部精度管理用の配付試料である BioBall を利用して検証を行った。検証方法を以下に示す。滅菌生理食塩水 1L に BioBall 2 個を入れ、十分混和後、外部精度管理の手法に従い非濃縮②による菌数を測定した。均質化された試料各 500mL をポリカーボネート製フィルターで同時にろ過後、それぞれのろ過フィルターをボルテックス 1 分、2 分により洗浄し菌数測定を行い、回収率の比較を行った。これらの比較を 10 試料について行った。培地は OXOID のアガーベースとサプリメントにより調製した BCYE  $\alpha$  培地を使用した。本検証後、「公衆浴場における衛生等管理要領」内の推奨検査法「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」について WG 内で検討した。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、適切な検査法の普及に努めた。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。

(倫理面への配慮)  
特になし。

## C. 研究結果及び考察

### 1) 精度管理

表 1 に平成 27~30 年度の結果判定一覧を示した。ここでは、過去 4 年間の比較をしやすくするために、平成 27~29 年度までに行っていた報告菌数から見た判定による結果も記載

した。参加機関は、平成27年度67機関、平成28、29年度71機関、平成30年度70機関、4年連続で参加した機関は55機関であった。回収率による判定では、今年度目標良好範囲外を報告したのは18機関あった。このうち14機関は参考的に回収率による判定を取り入れた昨年度も参加していたが、うち9機関は2年連続で良好範囲外を報告していた。一方、平成29年度までの報告菌数から見た判定を当てはめた場合、目標良好範囲外の結果を報告したのは28機関あり、うち4年連続が2機関、3年連続が2機関、2年連続が7機関、同様の結果を報告していた。これらの機関を含め4回の外部精度管理中複数回目標良好範囲外を報告していたのは28機関あった。総合的に見ると、検査結果が安定する方向に向かっている機関もあるが、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。特に複数年連続して目標良好範囲外の結果を報告している機関は、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。

これまでにも報告してきたが、レジオネラ属菌検査においては、コンラージや濃縮時のいくつかの検査工程等が結果へ影響し、菌数減少の原因となるので丁寧な検査対応が必要で

ある。また複数年連続で良好範囲外の結果を報告していた機関は、試料の混ぜ方、培地の状態、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

改訂ISO法では、ろ過攪拌時間を少なくとも2分としているが、WG推奨法では、これまで新版レジオネラ症防止指針に従い1分としてきた。今回ポリカーボネート製フィルターを対象に洗浄時間を1分及び2分で比較した。結果を表2に示した。洗浄時間1分の平均値と洗浄時間2分の平均値の差の有意性を確かめるために、有意水準5%で両側検定の $t$ 検定を行ったところ、 $t(9)=0.95$ 、 $p=0.37$  ( $p>0.05$ )であり、洗浄時間の違いによる平均値の差に有意差は見られなかった。そのため、WGでは、ポリカーボネート製フィルターを使用した場合、その洗浄時間を1分間とした。この結果を考慮したWG推奨法と平成29年5月に改訂されたISO11731で示された方法との調整を改めて行い、公衆浴場の水質基準を担保するため、国から自治体に技術的助言として示すための検査法として「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示した。

研修については、平成28、30年度に、国立保健医療科学院主催、国立感染症研究所村山庁舎で実施された「短期研修 新興再興感染症技術研修」内で、WG推奨法に沿った実習を伴ったレジオネラ検査研修会を行った。本研修会は、平成26年度に続いて3度目であった。対象は、地方衛生研究所等の公的機関である。内容的には、充実したものであったが、その反面、準備、調整には大きな労力と時

間を要した。一方、座学による研修会として、日水製薬主催で開催されたレジオネラ属菌検査セミナーに4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ねばならないと考える。

#### D. 結論

##### 1) 精度管理

平成27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4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、2)に記載する。

##### 2) 標準的検査法および研修システム

公衆浴場の水質基準を担保するため、国から自治体に技術的助言として示すための検査法として「浴槽水に関するレジオネラ属菌検出のための検査方法」を提示した。今後は、本検査法を適切に全国へ普及・周知させるとともに、本法に沿った内部精度管理が各検査機関で実施できるよう、その対応方法を検討する必要がある。

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ね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.

#### F. 研究発表

学会発表

1) 下郷晶子, 水落慎吾, 菓子田充明, 森本洋: 各社 BCYE  $\alpha$  寒天培地における *Legionella pneumophila* の発育性と培地接種方法による発育菌数への影響、日本防菌防黴学会第 43 回年次大会、2016 年 9 月、東京

研修会

1) 森本 洋:レジオネラ検査研修会、北海道立保健所試験検査課研修、2016 年 6 月、北海道

2) 森本 洋:レジオネラ属菌検査における結果の変動要因と手技のポイント、2016 年度レジオネラ属菌検査セミナー、2016 年 7 月、東京

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

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

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

6) 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

7) 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

8) 森本 洋:レジオネラ培養法概論ほか、平成 30 年度 短期研修 新興再興感染症技術研修、2018 年 10 月、東京

9) 森本 洋:レジオネラ属菌培養検査について、2018 年度レジオネラ属菌検査セミナー、2019 年 3 月、東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



表1 2015~2018年度結果一覧(2015/2016/2017/2018、良好範囲(菌数○、回収率(分母非濃縮② 2017/2018)黒字)、範囲外(菌数\*、回収率(2017/2018)赤字、検査項目外又は不参加)

No.	非濃縮①	非濃縮②	ろ過濃縮	遠心濃縮	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	-/○/○/○	-/○/*/○		-/*/○/○
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	○/○/○/○	-/*/○/○	*/*/○/*						
36	○/○/○/○	-/*/○/○	○/*/○/○						

表2 ポリカーボネート製フィルターを使用した洗浄時間の違いによる回収率の比較

条件		実験①	実験②	実験③	実験④	実験⑤	実験⑥	実験⑦	実験⑧	実験⑨	実験⑩	平均
非濃縮	菌数	3000	2600	3400	3000	5600	3600	4200	2400	3800	4600	3620
ろ過濃縮 洗浄1分	菌数	1964	1808	1670	1336	1934	1438	2142	1158	1546	1936	1693
	回収率	65.5	69.5	49.1	44.5	34.5	39.9	51	48.3	40.7	42.1	48.5
ろ過濃縮 洗浄2分	菌数	1450	1998	1452	1292	1766	1508	1702	1352	1350	2062	1593
	回収率	48.3	76.8	42.7	43.1	31.5	41.9	40.5	56.3	35.5	44.8	46.1

レジオネラ属菌検査実施施設様各位

2018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「2018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.「2018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ご施設様

## ■実施概要

検査試料	レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試料（凍結乾燥品、-18~-33℃保存） 同封書類：①試料送付のご案内、②試料の使用方法・操作手順、③結果記入用メモ、④試料受領書兼承諾書
実施方法について	「2018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）。 2018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「ISO11731:2017」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 35,000 円（消費税別） ※原材料の値上げにより昨年度の価格から変更となっております。
参加募集数	150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）

7月 下旬	参加募集開始 ● 弊社コスモ会ホームページ( <a href="https://cosmokai.com">https://cosmokai.com</a> )の2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ申込フォームから申込手順に従いお申込ください。 ● 1施設複数名のお申込みも可能です。検査試料はそれぞれの試験実施者様へお送りさせていただきます。
9月20日（木）	参加募集締切
10月15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（水）	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16日（火）～ 11月16日（金）	検査実施 ● 弊社コスモ会ホームページ( <a href="https://cosmokai.com">https://cosmokai.com</a> )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16日（金）17時	回答締切
12月21日（金）	参加費お支払い期限 ● 振込用紙をご利用いただくか、弊社指定の口座にお振り込みいただきます。なお、振込手数料は貴施設ご負担をお願い致します。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（木）	解析結果返却 ● 弊社コスモ会ホームページ( <a href="https://cosmokai.com">https://cosmokai.com</a> )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24番6号

TEL : 03-5846-5729 FAX:03-5846-5629

E-mail: legi-srvy@nissui-pharm.jp



日水製薬株式会社

# 参加要件

2018年7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

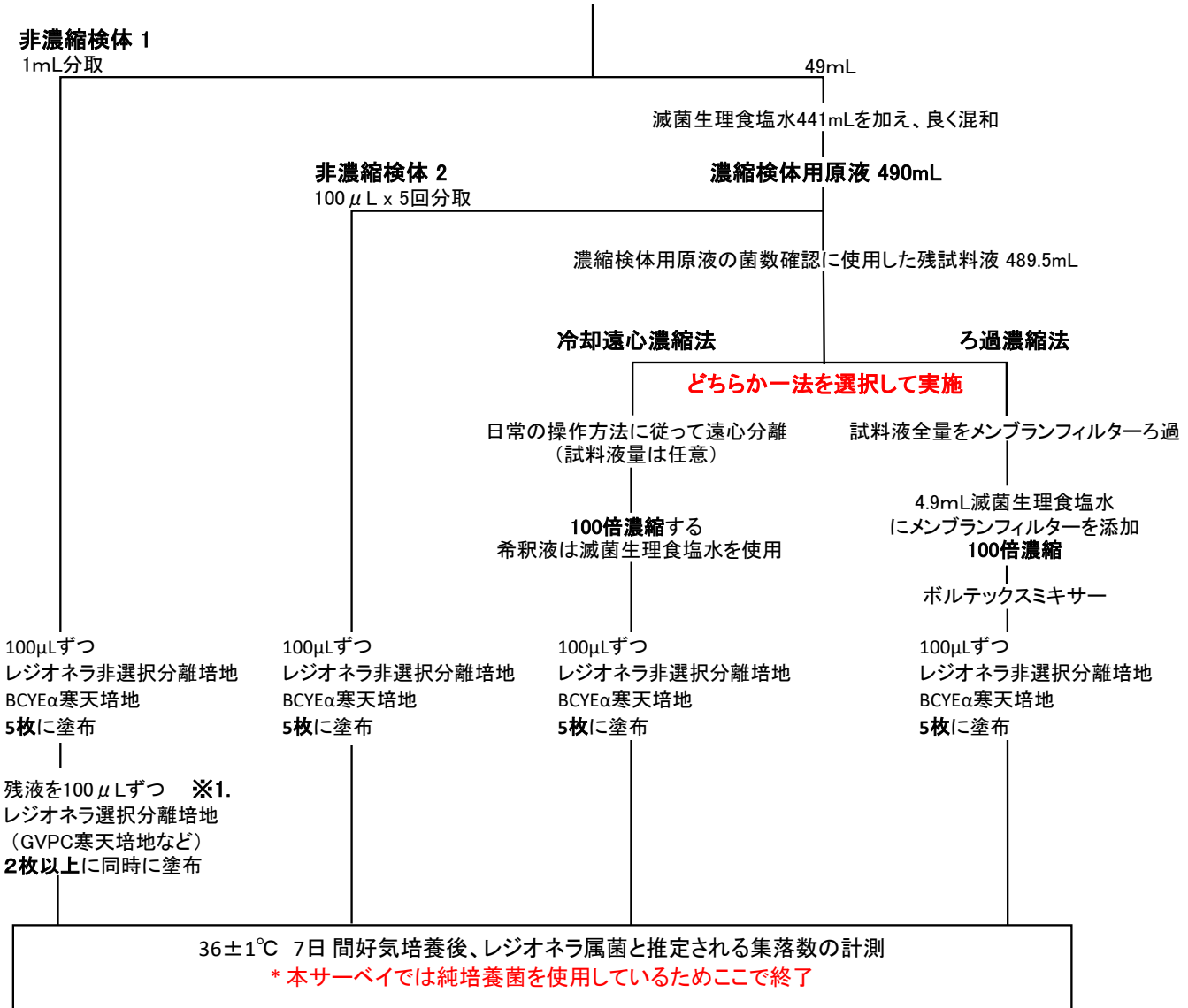
予告なく実施スケジュールが変更となることがあります。変更後のスケジュールは、メール等にてご連絡いたします。

以上

## 2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法

(参考：厚生科学研究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



■ 2018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BCYEα寒天培地から得られた集落数から算出し、報告してください。

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

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試料送付のご案内

謹啓 日頃は弊社製品をご愛顧賜り厚く御礼申しあげます。

この度は、2018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いただきますのでご査収のほど、よろしくお願ひ申しあげます。

謹白

記

1. 送付内容一覧

- ・ 試料送付のご案内（本案内状）
- ・ 試験概要・・6枚
- ・ 結果記入用メモ（Web入力する際にご活用ください）・・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
10/16(火)～17(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。
11/16(金) 17時	■ 回答締切 検査を実施し、上記結果入力手順にそって結果の入力をお願いいたします。 回答期限を11/16 (金) 17時とさせていただきます。
1/31(木)	■ 解析結果開示 解析結果はコスモ会HP ( <a href="https://cosmokai.com/">https://cosmokai.com/</a> ) 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 : 03-5846-5707 FAX : 03-5846-5629 E-mail : legi-srvy@nissui-pharm.jp

2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ

試験概要

1. レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ試験項目

試料名	試験項目
精度管理サーベイ試料A (1本)	レジオネラ属菌

精度管理サーベイ試料は、菌をボール状に凍結乾燥処理しバイアル瓶に封入したもので、レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ用に菌数を特別に調整しています。瓶ラベルには「A」と記載されています。

精度管理サーベイ試料Aの使用法・操作手順および結果入力をご確認のうえ、試験を実施してください。

2. 精度管理サーベイ試料Aの使用法・操作手順

非濃縮検体 1		非濃縮検体 2	冷却遠心濃縮法	ろ過濃縮法
非選択分離培地 (5枚)	選択分離培地 (2枚以上)	非選択分離培地 (5枚)	濃縮検体	
実施	実施 (参考値)	実施	冷却遠心濃縮法、ろ過濃縮法 どちらか一方を実施	

精度管理サーベイ試料Aは、「レジオネラ属菌」の【非濃縮検体】および【濃縮検体】の菌数試験に使用します。濃縮検体については、【冷却遠心濃縮法】または【ろ過濃縮法】のどちらか一方を実施してください。

以下の操作手順をよく読み、記載された方法に従って使用してください。

注1：本操作手順（2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ指定法）は、本精度管理サーベイ用のみの検査方法であり、サンプル量、濃縮倍率などにおいて、実検体の検査方法と異なる部分があります。

■ 試料液の調製

① 検査を開始する30分前に保管庫より取り出して室温に戻し、以下の操作を始めてください。

注2：精度管理サーベイ試料Aは、到着後から試験開始日までマイナス18℃～マイナス33℃で保管してください。

注3：室温に戻っていない瓶を開封した場合、瓶内壁の結露水により凍結乾燥処理したボールが瓶から取り出しにくい場合があります。

注4：精度管理サーベイ試料は1個のみですので、取扱いに十分注意のうえ試験を実施してください。

- ② 500mL以上の滅菌容器に滅菌生理食塩水 50mLを用意し、精度管理サーベイ試料を加え良く混和します。これを試料原液とします。

注 5：精度管理サーベイ試料の特性上、本サーベイにおいては、すべての溶解液、希釈液は、**滅菌生理食塩水**を使用してください。

注 6：完全に溶解したことを確認してください。この時、加温はしないでください。

注 7：溶解後の保存は測定誤差をもたらす原因となりますので、溶解後は直ちに試験を開始し、操作の流れを止めることなく試験を終了させてください。

- ③ 試料原液から 1mL を正確に分取してください。【非濃縮検体 1】の試験に使用します。

- ④ 残りの試料原液 49mL に、滅菌生理食塩水 441mL を加え良く混和します。これを【非濃縮検体 2】、【濃縮検体 冷却遠心濃縮法】、または【濃縮検体 ろ過濃縮法】の試験に使用します。

注 8：試料が均一になるよう十分に混和してください。

注 9：混和後フタを開ける場合には、エアロゾルが発生しているため安全キャビネット内で操作を行ってください。特に、転倒混和等を行った場合には、フタの開閉時における試料の飛散には十分注意してください。

## □非濃縮検体1

※非選択分離培地と選択分離培地に塗布します。

## ■非選択分離培地

- (1) 試料液の調整③で分取した 1mL の検体より、レジオネラ非選択分離培地 5 枚に、100 $\mu$ L ずつ塗布します。

■参考情報 「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 年度分担研究報告書 レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み」（以下、平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究）表 14 より抜粋

- ・検体の塗布方法は、コンラージ棒の力加減においてソフトタッチを意識すること。
- ・コンラージ棒の力加減が発育集落数に影響する可能性が示唆されたため（平成 24 年度厚労科研費「公衆浴場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データより」）。

- (2) 36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 7 日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。

注 10：「厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）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 年度分担研究報告書 レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み」（以下、平成 26 年度レジオネラ属菌検査法研究）において、GVPC 寒天培地等のレジオネラ選択分離培地へ接種した場合、レジオネラ非選択分離培地へ接種した場合に比べ集落数の減少が認められたため、レジオネラ非選択分離培地（BCYE $\alpha$ 寒天培地）を使用してください。

■参考情報 ISO11731：2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*

・雑菌が少ない場合の検体では、BCYE $\alpha$ 寒天培地の使用が必須となっています。

- (3) 試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。



本サーベイ用計算式 :  $100\text{mL}$  あたりの菌数 = 平均値  $\times$  1000

### ■選択分離培地(参考値)

※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。

- (1) 【非濃縮検体 1 非選択分離培地】(1)の残液を、レジオネラ選択分離培地 2 枚以上に、 $100\mu\text{L}$  ずつ塗布します。
- (2)  $36\pm 1^\circ\text{C}$  7日間 好気培養後、レジオネラ選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。培地から得た集落数の平均値を算出します。
- (3) 試料原液  $100\text{mL}$  あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式 :  $100\text{mL}$  あたりの菌数 = 平均値  $\times$  1000

### ■非濃縮検体2

- (1) 試料液の調整④の検体  $490\text{mL}$  より、 $500\mu\text{L}$  を分取して、非選択分離培地に  $100\mu\text{L}$  ずつ 5 枚に塗布します。
- (2) 試料原液  $100\text{mL}$  あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式 :  $100\text{mL}$  あたりの菌数 = 平均値  $\times$  10000

### □濃縮検体

※【冷却遠心濃縮法】、または【ろ過濃縮法】どちらか一方を実施してください。

### ■冷却遠心濃縮法

- (1) 試料液の調整④で作製した検体  $490\text{mL}$  より、日常の検査工程に従って、冷却遠心分離を行います。試料液量は任意で実施してください。

#### ■参考情報 平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 12 より抜粋

- ・遠心加速度と遠心時間は、 $6000\text{g}\times 10$  分または  $3000\text{g}\times 30$  分とする。ISO 11731: 1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 による。
- ・遠心加速度( $\text{g}$ )= $1118\times$ 回転半径 (cm)  $\times$ 回転速度<sup>2</sup> (rpm)  $\times 10^{-8}$  本来遠心加速度の統一が必要であって、回転数を統一しても使用機種により遠心加速度は異なる。遠心加速度が設定できない場合は、機種ごとに計算する必要がある。
- ・冷却設定温度は、 $15\sim 25^\circ\text{C}$  とする。

- (2) 【冷却遠心濃縮法】(1)で得られた検体を、希釈液に滅菌生理食塩水を用いて 100 倍濃縮します。

注 11 : 精度管理サーベイ試料の特性上、本サーベイにおいては、すべての溶解液、希釈液は、**滅菌生理食塩水**を使用

してください。

注 12：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るため、本サーベイにおいては、加熱処理および酸処理を行わないでください。

■参考情報 平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 12 より抜粋

- ・沈殿物を巻き上げないように注意して上清を滅菌ピペットで慎重に除去し、沈殿物を含めて残りの体積を 2mL にする。
- ・沈渣は大変浮遊しやすく、上清のデカンテーションによる除去や全量除去では、実験ロスにより回収率に大きく影響する場合が考えられる。(森本 洋ほか：濃縮法の違いによる温泉水中のレジオネラ属菌検出結果の比較. 北海道衛研所報, 59, 73-74, 2009 (厚労科研費「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」データより))。これらの実験ロスによる影響を防止するために、その手順は、ISO 11731: 1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 に従う。

- (3) 得られた検体を、レジオネラ非選択分離培地 5 枚に、100  $\mu$  L ずつ塗布します。
- (4) 36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 7日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。
- (5) 試料原液 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式 : 100mL あたりの菌数 = 平均値  $\times$  100

■ろ過濃縮法

- (1) 試料液の調整④で作製した検体 490mL より、【非濃縮検体 2】で非濃縮検体用に 500  $\mu$  L 分取した残液 489.5mL を、メンブランフィルターにてろ過を行います。

注 13：本サーベイにおいては、日常検査において異なる検水量をろ過している施設におかれましても 489.5mL の検水にて、ろ過を行ってください。

■参考情報 平成 25 年度レジオネラ属菌検査法研究 表 11 より抜粋

- ・ポリカーボネートタイプフィルターは、ろ過後の水の検査ではなく、フィルターに捕集されたレジオネラ属菌を回収することを目的としている。ポリカーボネートタイプフィルターは、均一な表示径の円筒状孔を持ち、その孔径分布が一定のため、サイズによる正確な分離が可能となる。他の材質のフィルターでは、膜の内部に菌が入り込んで回収されにくくなる場合がある。
  - ・包装製品ラベル側を補集面にする。(光沢度が高い側)。ポリカーボネートタイプフィルターは、その構造上表裏対象面となっているが、製法として電子銃で打ち抜き後片面をアルカリ処理することで作製されている。そのためアルカリ処理面の平滑性が若干低下している可能性がある。
  - ・新版レジオネラ症防止指針には、レジオネラ属菌体サイズを 0.3 $\sim$ 0.9 $\times$ 2 $\sim$ 20  $\mu$  m と記載されている。レジオネラ属菌がフィルターを縦に通過しようとした場合、状況によっては 0.40 や 0.45  $\mu$  m のポアサイズであればトラップされず、そのまま通過してしまう可能性がある。
- ISO11731 : 1998 を基礎として対比検討された JIS K 0350-50-10 では孔径 0.2  $\mu$  m と規定されている。

■参考情報 ISO11731 : 2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*

・フィルターの種類は、ポリカーボネートもしくは、ポリエーテルスルホンを、ポアサイズは  $0.2\mu\text{m}$  を使用する旨が記載されている。

- (2) 50mL の遠沈管等に 4.9mL の滅菌生理食塩水を用意します。
- (3) 吸引後のメンブランフィルターを剥がし、(2)で用意した遠沈管中の滅菌生理食塩水にメンブランフィルターを入れます。
- (4) ボルテックスミキサーで洗浄し、100 倍濃縮液とします。

注 14：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るため、本サーベイにおいては、加熱処理および酸処理を行わないでください。

- (5) 得られた検体を、レジオネラ非選択分離培地 5 枚に、 $100\mu\text{L}$  ずつ塗布します。
- (6)  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  7日間 好気培養後、レジオネラ非選択分離培地上に発育したレジオネラ属菌と推定される集落数を計測します。複数の培地から得た集落数の平均値を算出します。
- (5) 試料原液の 100mL あたりの菌数を算出します。

本サーベイ用計算式： $100\text{mL}$  あたりの菌数 = 平均値  $\times$  100

### 3. 結果入力方法

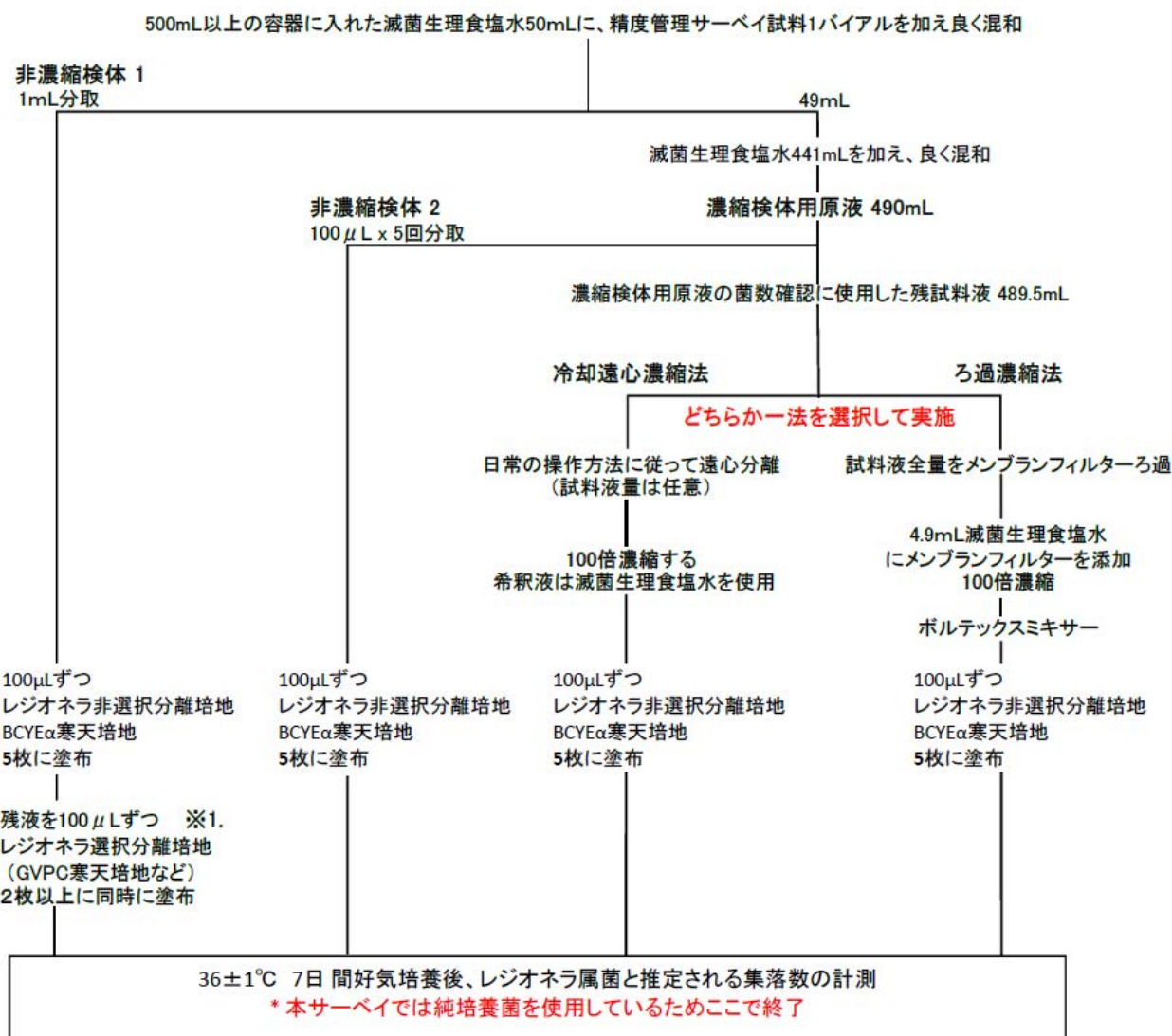
- (1) 結果の記入は、コスモ会HP (<https://cosmokai.com/>) より「レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ」専用HPをクリックし、IDとPW（別送ハガキ参照）を入力してログインしてください。
- (2) 登録画面が表示されますので、ご登録内容をご確認ください。ご確認後は、ページの下にあります【変更なし データ入力画面へ進む】をクリックしてください。
- (3) データ入力画面に進み結果の入力が完了したら、ページの下にあります【入力内容を確認】をクリックし入力内容を確認してください。入力に間違いがなければ、ページの下にあります【送信】をクリックしてください。

注 15：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。



## 2018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 / IS011731:1998 / IS011731:2017)



■ 2018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。2018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。

## 結果記入用メモ (Web 入力する際にご活用ください)

貴施設名	所属部署
氏名	I D

### ■ 共通設問

貴施設で行っている日常の検査方法に関してご回答ください。あてはまるものはすべて選択してください。

※半角英数（整数）で入力してください。指数表記および数式での入力は認識出来ません。

(1) 参考としている基準は何ですか。

- IS011731 : 2017       IS011731 : 1998       新版レジオネラ症防止指針 1999  
 第 3 版レジオネラ症防止指針 2009       上水試験法 2011       衛生試験法注解 2015  
 病原体検出マニュアル 2011（国立感染症研究所）       厚労科研レジオネラ研究班 WG 推奨法  
 その他

(2) 日常の検査法は何を採用していますか。

- 非濃縮       冷却遠心濃縮法       ろ過濃縮法  
 その他

(3) 日常検査の前処理は何を採用していますか。

- 処理なし       酸処理       熱処理       酸処理と熱処理       その他

(4) 冷却遠心濃縮法を採用している方にお聞きします。

1) 検水量は何 mL ですか。  mL

2) 遠心加速度は何 g ですか。  g

3) 回転数は何 rpm ですか。  rpm

4) 遠心時間は何分間ですか。  分

5) 設定温度は何℃ですか。  ℃

6) 冷却遠心機のローターは何ですか。

- 固定角ローター（アングルローター）  
 水平ローター（スウィングローター）  
 その他

7) 上清除去の方法は何ですか。

- デカンテーション       ピペット等による吸引  
 その他

8) 上清は全量除去しますか。

- 全量除去       一部残す  mL

9) 全量除去の場合、菌体回収のための溶液は何ですか。

滅菌精製水 滅菌生理食塩水

滅菌リン酸緩衝液 その他

10) 濃縮倍率は何倍ですか。

倍

(5) ろ過濃縮法を採用している方にお聞きします。

1) 検水量は何mLですか。

mL

2) フィルターから菌体を回収するための溶液は何ですか。

滅菌精製水 滅菌生理食塩水

滅菌リン酸緩衝液 その他

3) フィルターメーカーはどちらですか。

ミリポア アドバンテック

その他

4) フィルター表裏は統一して使用していますか。

している していない

5) フィルターの材質は何ですか。

ポリカーボネート ナイロン セルロースアセテート

セルロース混合エステル ポリエーテルスルホン

その他

6) フィルターの直径は何mmですか。

mm

7) フィルターのポアサイズは何 $\mu$ mですか。

$\mu$ m

8) ボルテックスミキサーは何分かけていますか。

分

(6) 酸処理を行っている方にお聞きします。

1) 酸処理剤は何を使用していますか。

0.2M・HCl KCl (pH2.2)

その他

2) 酸処理する量は何mLですか。

mL

3) 酸処理剤は市販品を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販品を使用 自家調製品を使用

4) 添加量は検体に対し何%ですか。

%

5) 処理温度は何度ですか。

室温 その他  °C

6) 処理時間は何分ですか。

分

(7) 加熱処理を行っている方にお聞きします。

1) 加熱処理には何を使用していますか。

ウォーターバス ヒートブロック

インキュベータ その他

2) 加熱処理する量は何 mL ですか。  mL

3) 処理温度は何度ですか。  °C

4) 処理時間は何分ですか。  分

(8) 使用している培地とメーカーは何ですか。

培地名 \ メーカー	日水製薬	栄研化学	関東化学 (OXOID)	日本 BD	日研生物医学	ビオメリュー・シバハイン	極東製薬工業	メルク	(その他)
BCYE $\alpha$ 寒天培地									
GVPC 寒天培地									
WYO $\alpha$ 寒天培地									
MWY 寒天培地									
その他 <input type="text"/>									
その他 <input type="text"/>									

(9) 培地は市販の生培地を使用していますか。 自家調製を使用していますか。

市販の生培地  自家調製

(10) 培地は 1 検体あたり合計何枚に接種していますか。  枚

(11) 月あたりの検体数はおよそどのくらいですか。 夏期 (5~10 月)  検体/月  
冬期 (11~4 月)  検体/月

## ■2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ結果回答

※試験を実際されていない場合は、空欄でお願いいたします。

※半角英数（整数）で入力してください。指数表記および数式での入力は認識出来ません。

### □非濃縮検体 1

※非選択分離培地と選択分離培地に塗布します。

### ■非選択分離培地

(1) 100mLあたりの菌数をご記入ください。

CFU/100mL (本サーベイ用計算式 =  $\frac{\text{平均値}}{100} \times 1000$ )

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。

BCYE  $\alpha$  寒天培地

その他

(4) 培地メーカーはどちらですか。

日水製薬

栄研化学

関東化学 (OXOID)

日本 BD

日研生物医学

ビオメリュー・ジャパン

極東製薬工業

メルク

その他

(5) どのような方法で試料を混和しましたか。

手

ミキサー

その他

(6) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販の生培地

自家調製

(7) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

検査当日

前日以前



■選択分離培地（参考値）

(1) 100mLあたりの菌数をご記入ください。

CFU/100mL （本サーベイ用計算式 = 平均値 × 1000）

(2) 使用した培地の枚数は何枚ですか。  枚

(3) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)	<input style="width: 100%; height: 100%;" type="text"/>	<input style="width: 100%; height: 100%;" type="text"/>	<input style="width: 100%; height: 100%;" type="text"/>	<input style="width: 100%; height: 100%;" type="text"/>	<input style="width: 100%; height: 100%;" type="text"/>	<input style="width: 100%; height: 100%;" type="text"/>

(4) 使用した培地は何ですか。

- GVPC 寒天培地   
 WYO $\alpha$  寒天培地   
 MWY 寒天培地   
 CCVC 寒天培地   
 PAC (BMPA $\alpha$ ) 寒天培地  
PAV 寒天培地   
 その他

(5) 培地メーカーはどちらですか。

- 日水製薬   
 栄研化学   
 関東化学 (OXOID)   
 日本 BD   
 日研生物医学  
バイオメリュー・ジャパン   
極東製薬工業   
メルク   
その他

(6) どのような方法で試料を混和しましたか。

- 手   
ミキサー   
その他

(7) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

- 市販の生培地   
自家調製

(8) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

- 検査当日   
前日以前

## ■非濃縮検体 2

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

--

CFU/100mL (本サーベイ用計算式 =  $\frac{\text{平均値}}{10000} \times 10000$ )

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。

BCYE  $\alpha$  寒天培地

その他

--

(4) 培地メーカーはどちらですか。

日水製薬

栄研化学

関東化学 (OXOID)

日本 BD

日研生物医学

ビオメリュー・ジャパン

極東製薬工業

メルク

その他

--

(5) どのような方法で試料を混和しましたか。

手

ミキサー

その他

--

(6) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販の生培地

自家調製

(7) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

検査当日

前日以前

□濃縮検体

【冷却遠心濃縮法】、もしくは【ろ過濃縮法】どちらか一方を実施してください。

■冷却遠心濃縮法

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

[Blank box for CFU/100mL]

CFU/100mL (本サーベイ用計算式 = 平均値 × 100 )

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。 □BCYE α 寒天培地 □その他 [Blank box]

(4) 培地メーカーはどちらですか。  
 日水製薬     栄研化学     関東化学 (OXOID 製品)     日本 BD     日研生物医学  
 ビオメリュー・ジャパン     極東製薬工業     メルク     その他 [Blank box]

(5) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。  
 市販の生培地     自家調製

(6) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。 □検査当日 □前日以前

(7) どのような方法で試料を混和しましたか。  
 手     ミキサー     その他 [Blank box]

(8) 遠心加速度は何 g ですか。 [Blank box] g

(9) 回転数は何 rpm ですか。 [Blank box] rpm

(10) 遠心時間は何分間ですか。 [Blank box] 分

(11) ブレーキをかけていますか。 □かけている □かけていない

(12) 設定温度は何℃ですか。 [Blank box] °C

(13) 冷却遠心機のローターは何ですか。  
 固定角ローター (アングルローター)  
 水平ローター (スウィングローター)  
 その他 [Blank box]

(14) 上清除去の方法は何ですか。  
 デカンテーション     ピペット等による吸引  
 その他 [Blank box]

(15) 上清は全量除去しますか。 □全量除去 □一部残す [Blank box] mL

## ■ろ過濃縮法

(1) 100mL あたりの菌数をご記入ください。

CFU/100mL (本サーベイ用計算式 =  $\frac{\text{平均値}}{100} \times 100$ )

(2) 培地 1 枚あたりの菌数をご記入ください。

培地	1 枚目	2 枚目	3 枚目	4 枚目	5 枚目	平均
菌数 (CFU/培地)						

(3) 使用した培地は何ですか。

BCYE  $\alpha$  寒天培地

その他

(4) 培地メーカーはどちらですか。

日水製薬

栄研化学

関東化学 (OXOID 製品)

日本 BD

日研生物医学

ビオメリュー・ジャパン

極東製薬工業

メルク

その他

(5) 培地は市販の生培地を使用していますか。自家調製を使用していますか。

市販の生培地

自家調製

(6) 自家調製の場合、培地はいつ調製しましたか。

検査当日

前日以前

(7) フィルターメーカーはどちらですか。

ミリポア

アドバンテック

その他

(8) フィルター表裏は、包装製品のラベル側を捕集面にして使用しましたか。

した

しない

(9) フィルターの材質は何ですか。

ポリカーボネート

ナイロン

セルロースアセテート

セルロース混合エステル

ポリエーテルスルホン

その他

(10) フィルターの直径は何 mm ですか。

 mm

(11) フィルターのポアサイズは何  $\mu\text{m}$  ですか。

  $\mu\text{m}$ 

(12) ボルテックスミキサーは何分かけていますか。

 分

以上

2018年10月15日

日水製薬株式会社

2018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18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： 2018年 10月 日

貴施設名
ご所属部署
ご担当者名 <span style="float: right;">(印)</span>
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

# 2018年度 レジオネラ属菌検査セミナー 開催のご案内

主催：日水製薬株式会社

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

記

- 開催日時 **2019年3月12日(火) 13:30～17:00** (受付開始 13:00)
- 開催場所 **文京シビックホール スカイホール (26階)**  
〒112-0003 東京都文京区春日1-16-21  
※東京メトロ後楽園駅徒歩1分、都営地下鉄春日駅徒歩1分、JR総武線水道橋駅徒歩9分
- 定員 **96名**  
※会場の都合により、定員に達し次第受講をお断りさせていただきますのでご了承くださいようお願いいたします。なお、お申込みは1施設あたり2名様までとさせていただきます。
- 内容
  - 13:00～ 受付開始
  - 13:30～14:30 講演 1. 「レジオネラ検査法の現状と今後の展望」  
国立感染症研究所 細菌第一部 前川純子先生
  - 14:30～15:00 報告 「2018年度レジオネラ属菌検査精度管理サーベイ結果報告」  
日水製薬株式会社
  - 15:00～15:15 休憩
  - 15:15～16:25 講演 2. 「レジオネラ属菌培養検査について」  
北海道立衛生研究所 感染症センター 感染症部 細菌グループ 森本洋先生
  - 16:25～17:00 事前質問回答・質疑応答
- 参加費 **無料**
- 申込方法 **E-mailにてお願いします。**  
下記内容を【E-mail：[legi-srvy@nissui-pharm.jp](mailto:legi-srvy@nissui-pharm.jp)】までお送りください。

《参加申込》

\*\*\*\*\*

お名前：  
貴社名：  
ご所属：  
ご住所： 〒  
TEL：  
E-mail：  
ご質問事項：

\*\*\*\*\*

※受付返信につきましては受付1週間を目安に受付番号と共にメールにてご連絡させていただきます。

- 締切り **2019年2月28日(木)**  
※2019年2月15日(金)までに受付した質問につきましては、セミナー当日に分野別に分類して回答させていただきます。

以上

---

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

平成 28～30 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）

総合研究分担報告書

高 pH 浴槽水、薬湯、並びに水泳プールへの、モノクロラミン消毒の応用

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	赤地 重宏	三重県保健環境研究所 微生物研究課
研究協力者	永井 佑樹	三重県保健環境研究所 微生物研究課
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
研究協力者	青木 信和	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
研究協力者	江口 大介	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
研究協力者	西尾 正也	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	山本 哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	八木樹里奈	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	藤井 明	株式会社ヘルスケミカル
研究協力者	松田 宗大	株式会社ヘルスケミカル
研究協力者	松田 尚子	株式会社ヘルスビューティー
研究協力者	枝川亜希子	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	吉田 光範	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
研究協力者	星野 仁彦	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター

## 研究要旨

入浴施設を原因としたレジオネラの集団感染が発生し、水泳プールの管理に倣って浴槽水に遊離塩素消毒が導入された過去の経緯があった。ところがアルカリ性の井戸水や温泉、有機物等を含む薬湯では遊離塩素消毒の効果が得られず、レジオネラ汚染に苦慮することが多かった。対策の一つとしてモノクロラミン消毒（結合塩素消毒）が着目され、アルカリ性の井戸や温泉の浴槽に導入した結果、レジオネラ対策として効果的であることがこれまでの研究で明らかとなっている。当該研究ではモノクロラミン消毒の発展を目的に、高 pH の浴槽、薬湯、それから水泳プールへの応用を試みた。モノクロラミン消毒は、pH10 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。遊離塩素が激しく消費される薬湯であっても、モノクロラミン消毒の濃度の維持と、レジオネラ抑制が両立した。水泳プールにモノクロラミン消毒を適用し、1 週間の短期ではあったが濃度管理に問題なく、レジオネラの発生もなく、いわゆる典型的な塩素臭のプール臭がほぼなかった。今後の、モノクロラミン消毒の応用が期待された。

### A. 研究目的

レジオネラ症の報告数は年々増加しており、2018 年の速報値では 2,000 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、アンモニア態窒素が存在している場合や、高 pH や薬湯の場合は消毒効果が減弱することから、その対策が必要となっている。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のうち pH9 以上の浴槽水でレジオネラ属菌の定量値が高いことが確認されている<sup>1)</sup>。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、アンモニア態窒素の存在下や、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<sup>2-3)</sup>。試験管内での消毒実験により、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と示唆されている<sup>4)</sup>。実際の営業施設においても通用するのか、期待さ

れるところであった。モノクロラミンは高濃度溶液の保存がきかないことから現場調製が必要となるが、経済的な負担のある自動装置だけでなく、初期投資が抑えられる手投入があればより好ましい。

薬湯は、有機物や無機物の薬剤を浴槽水に溶解、懸濁して使用するが、遊離塩素消毒と両立せず、レジオネラが問題となることがある。言い換えると、薬湯に次亜塩素酸ナトリウムのいわゆる遊離塩素消毒を加えると、塩素は激しく消費され、薬湯は退色し、両者の濃度管理は著しく困難になり、レジオネラの増殖を来すことがある。繰り返しになるが、モノクロラミンは温泉やアンモニア態窒素の存在下においても消毒効果が得られ、浴槽水中の安定性が高く消費量が少ないことから、薬湯にも通用するものか期待が持たれた。

入浴施設を原因としたレジオネラの集団感染が発生し、水泳プールの管理に倣って、浴槽水に遊離塩素消毒が導入された過去の経緯があった。本研究では、水泳プールへの逆の応用、水泳プールへのモノクロラミン消毒を試みた。水は有機物の汚染を受けると遊離塩素と反応して、臭気や、発がん性で知られているトリハロメタン等の消毒副生成物が生じる。すなわち、水泳利用に伴って常に有機物



の汚染が続き、臭気やトリハロメタン等が生じ続けている。言い換えると、消毒効果を維持するには過剰量の遊離塩素消毒が必要で、塩素より少ない有機物がブレイクポイント処理され続けている。ところがモノクロラミン消毒の場合、有機物の汚染が続いても、臭気やトリハロメタン等がほとんど生じない利点がある。一般に水道水の塩素消毒と塩素臭は嫌われているが、水泳プールは消毒がなければ病原微生物による汚染を受けて、細菌ウイルスによる様々な水系感染症が生じうるので、臭気やトリハロメタンがあっても仕方なく遊離塩素消毒が許容されてきたかもしれない。水泳プールでも安全性を維持しながら、臭気等を抑えることができれば、それに越したことはない。つまり、水泳プールにおけるモノクロラミン消毒は、遊離塩素消毒の代替法の一つになりえると考えられる。なお、PubMed や Google 検索で調べた範囲では、国内外で水泳プールのモノクロラミン消毒は実験的に行われた古い例しか見当たらなかった<sup>5)</sup>。

これまで浴槽水の 10m<sup>3</sup> 単位の水量に対するモノクロラミン消毒を行ってきたが、水泳プールは 100m<sup>3</sup> 単位となり、そのような大容量であっても安定した消毒が可能であるのが当初の課題であった。本研究の後に、入浴施設において判明したこととして、モノクロラミン消毒を数週間続けて水を交換しないと、多数の従属栄養細菌数が検出されるようになることが判明した<sup>6-7)</sup>。大容量の水泳プールは水を交換しないので、従属栄養細菌数の増加が懸念された。雑菌に病原性はなくても、バイオフィルムの発生はレジオネラ属菌等の病原性細菌の増殖を招く恐れがあることから、菌数は少ないほうが好ましい。雑菌の増加を回避するためには、定期的な洗浄と換水が欠かせないことから、洗浄と換水が容易な小規模なプールであれば、モノクロラミン消毒の応用が可能と期待された。

## B. 研究方法

### B1. アルカリ性の浴槽水におけるモノクロラミン消毒の応用

当該研究では4営業施設の協力を得た。いずれの施設においても、利用者への配慮として、モノクロラミン消毒を実施している旨を掲示した。2箇所はモノクロラミン生成装置を設置し、次亜塩素酸ナトリウムとアンモニウム塩溶液を用いてモノクロラミンを用時調製した。現場用に簡便なモノクロラミンの調製方法を考案して、2箇所は手投入を行った(図1)。アンモニア系顆粒と次亜塩素酸系顆粒を十分量の水道水に溶解し、生成したモノクロラミンを浴槽水に加えた。いずれもモノクロラミン濃度が3mg/Lを下回らないように制御した。

### B2. 薬湯へのモノクロラミン消毒の応用

一営業施設の協力を得て、実際の浴槽水を用いて、薬湯にモノクロラミン消毒を行った。施設の循環式浴槽は複数系統あるが、試験を行ったのは、露天ひのき風呂系統のみとし、他は従来の遊離塩素消毒で管理した。井戸水を張った露天ひのき風呂において、生薬又は無機塩の薬湯を使用した(図2)。モノクロラミン生成装置を設置し、タイマー式の制御で管理した。比較として行った遊離塩素消毒では、退色が進むのに合わせて薬湯を追加投入した。浴槽水の湯色は目視又は吸光光度法により評価し、湯の香りは官能評価した。

以上の浴場施設については、定期的にはろ過器の逆流洗浄や浴槽の洗浄、高濃度消毒、ならびに換水を行い、衛生の維持を心がけた。

### B3. 水泳プールへのモノクロラミン消毒の応用

水泳プールは、国立健康栄養研究所に設置の屋内プール、270m<sup>3</sup>の25m×4コースで行った。当該プールは利用が無く廃止の予定であったことから、実験目的に借用できた。実験は2014年の6月に実施した。プール管理を止めると衛生状態が悪くなることから、利用はしていなかったが遊離塩素消毒を続けており、朝の9時に水の循環による砂ろ過を開始し、夕方の17時頃に停止していた。循環ポンプの性能は、135分ないし270分で270m<sup>3</sup>に相当する計算であ

った。遊離塩素濃度が自然に下がってから、同じ水でモノクロラミン消毒を行った。プールサイドに生成装置を設置して、モノクロラミンをプール底の吸引口に注入した。循環ポンプが作動中であれば、3 過後の水はプール槽の全体に分布する吐出口から戻るため、モノクロラミンをプール全体に行き渡らせることが出来る。モノクロラミン消毒を開始した直後と終了時に、成人男性 2 名が泳いだ。消毒期間中に成人男女数名が臭気を確認した。

試料により測定項目に若干の違いはあるが、各種測定は、定法に従って行った。微生物については、レジオネラ属菌、大腸菌群、一般細菌数、従属栄養細菌数、アメーバについて検査した<sup>8-9)</sup>。従属栄養細菌数の R2A 寒天培地上で優占であった 3 コロニーを釣菌し、16S rDNA の塩基配列を確認した。水試料はチオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に採水した。塩素濃度は、遊離残留塩素と全残留塩素 (DPD 法、HACH 社他)、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、HACH 社) の測定を行った<sup>10-12)</sup>。その他の理化学項目については、pH (ガラス電極式 pH メーター)、水温 (アルコール式温度計)、濁度 (積分球光電光度法)<sup>13)</sup>、過マンガン酸カリウム消費量 (酸性法)<sup>14)</sup>、TOC (全有機炭素)<sup>15)</sup> も測定した。

## C. 研究結果および考察

### C1. アルカリ性の浴槽水におけるモノクロラミン消毒の応用

#### 施設 1 pH10 の公衆浴場に自動装置

湯温は 40 前後、pH は 9.42 ~ 10.06 であり、実証試験前における遊離残留塩素は 1 mg/L 程度、ただし全残留塩素濃度は 2.5 mg/L であった (表 1)。試験管内では、遊離塩素消毒に比べて、モノクロラミン消毒は安定であった (図 3)。ただし、180 分間で 3 ~ 4 mg/L 低下しており、全く消費しないわけではなかった。

モノクロラミン消毒試験の 6 日目に薬液不足、30 日目に停電、多くの入浴者の一度の入浴な

どの影響があり、全残留塩素濃度が 3 mg/L を下回ることがあった (図 4)。モノクロラミンは遊離塩素と比較して安定性はあったが、源泉水が常時供給されていたことから、濃度が低下する時間帯が生じた。

モノクロラミン濃度が一時的に低下することはあったが、レジオネラ属菌は試験期間中の全ての浴槽水、配管ふきとり検体において検出されなかった (表 1)。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、実証試験前と比較すると、濃度低下があった試験 6 日目に一時増加したものの、その後は適切な濃度管理や一晩での高濃度モノクロラミン消毒により、10 CFU/mL 未満を維持することができた。

#### 施設 2 pH10 の公衆浴場で手投入

湯温は 40 前後、pH は 9.85 ~ 10.94 であり、実証試験前における遊離残留塩素は 0.6 mg/L であった (表 2)。

浴槽水のモノクロラミン濃度は午前中 1 回、午後 2 回の追添加により、いずれの試験日においても 3 mg/L 以上を 10 時間維持することができた (図 5)。手投入によっても、モノクロラミン消毒を維持できた。

レジオネラ属菌は実証試験前の浴槽水から 100 CFU/100mL 検出されたが、試験期間中には全ての浴槽水において検出されなかった (表 2)。また、配管ふきとり検体については全ての検体でレジオネラ属菌は検出されなかった。さらに、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は、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。

#### 施設 3 pH8 の温泉施設で手投入

モノクロラミン濃度の推移は、日によって添加量とタイミングを検討しながら、営業時間内は 3 mg/L 以上を維持するようにした (図 6)。源泉の

pHは7.3と低かったが、遊離塩素消毒が困難な性質で、時間の経過とともに8.5まで上昇した(表3)。

モノクロラミン消毒中のレジオネラ属菌は、いずれも陰性であった(表3)。しかしながら、同一検体中の一般細菌数、従属栄養細菌数は、経日的な菌数の増加が認められた。レジオネラ属菌以外の何らかの細菌が、モノクロラミンに対して一定の抵抗性を有し、増加したと示唆された。

モノクロラミンの濃度管理に伴って、pHの上昇、アンモニウムイオン濃度の上昇、TOCの上昇がそれぞれ認められた。これらの濃度上昇は、モノクロラミンの添加と、入浴者の垢に由来するものと考えられた。浴槽水中の有機物濃度が高くなれば、その有機物を捕食する細菌の増殖リスクが考えられる。換水や洗浄等の衛生管理に留意する必要があると考えられた。

#### 施設4 pH10に自動装置、別施設

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3mg/L以上を維持することができた(図7)。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6mg/L程度まで高くなることもあった(表4)。その後、モノクロラミン注入量を調整し、終日4mg/L前後に維持することができた。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、1mg/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4)。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。

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

きた。換水頻度が低くても、レジオネラ属菌を抑制できていたが、雑菌の増殖、すなわちバイオフィルムの蓄積が心配されることから、洗浄はしっかり行う必要があると考えられた。

#### C2. 薬湯へのモノクロラミン消毒の応用

薬湯管理における塩素注入量と塩素濃度の推移、及び薬湯の状況を図8及び図9に示した。生薬及び無機塩薬湯使用時のいずれにおいても、モノクロラミンは総残留塩素濃度として3mg/L以上の維持が可能であり、レジオネラ属菌は検出されなかった(表5)。薬湯の退色や香りの変化は認められず、薬湯の追加投入の必要がなかった。

一方、次亜塩素酸ナトリウムでは、生薬による塩素の消費が激しく、薬湯の色を保持しながら、遊離残留塩素濃度を0.4mg/L以上に安定的に維持することは困難であった。無機塩薬湯使用時も同様で、遊離残留塩素濃度が上昇するに従って薬湯は顕著に退色した(図10)。適正な塩素濃度と薬湯の両立が極めて困難であった。

この施設では循環式浴槽に薬湯を実施することから、ろ過器と配管が汚れやすい難があった。この薬湯試験中も、一般細菌数が多くなり、ろ過器と配管のバイオフィルムが懸念された(表5)。図表には示さないが、モノクロラミン消毒を継続しておよそ3週目以降に従属栄養細菌数が増加し、 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mLの濃度で推移した。R2A寒天培地より釣菌した優占3コロニーのうち、2株は*Mycobacterium phlei*(1株の塩基配列が100%一致(466/466bp)、もう1株は99.8%一致(465/466))、1株は*Microbacterium aurum*(99.4% = 466/469)に近縁な*Microbacterium sp.*(100% = 469/469)と同定された。*M. phlei*は、モノクロラミン消毒の浴槽で以前にも報告され<sup>6-7)</sup>、病原性はないとされるが、バイオフィルムの蓄積は好ましくないと考えられた。モノクロラミン消毒をする場合であっても、洗浄、消毒、換水の徹底は必要と考えられた。

### C3. 水泳プールへのモノクロラミン消毒の応用

塩素添加を止めて、塩素濃度が 0.2mg/L を下回った6月24日にモノクロラミン消毒を開始した。270m<sup>3</sup>と水量が多かったが、装置の運転開始から3時間程度でモノクロラミンの濃度が4mg/Lに達し、プール水の混合が速やかであることを確認した。モノクロラミン濃度は、6月24日から6月30日まで徐々に減少したが、機器に設定した下限値2mg/Lに達しなかったため、追加塩素はされなかった(図11)。人の利用や、溢水や水の追加がないので、この1週間に1mg/L程度の自然な低下しかなく、モノクロラミン濃度は安定であった。

モノクロラミン消毒に切り替える最中と、試験終了時に遊泳し、また、室内に時々入って臭気を確認した。モノクロラミン消毒中に、塩素臭(いわゆるプール臭)は特に感じなかった。

遊離塩素消毒とモノクロラミン消毒のいずれにおいても、レジオネラ属菌、従属栄養細菌数、一般細菌数のいずれもが不検出であった(表6)。通常、消毒効果がなければ水の雑菌は一晩でも多数になることから、消毒効果は十分にあったと考えられた。

浴槽水のモノクロラミン消毒において、何週間か経過すると高い従属栄養細菌数の検出を経験した。雑菌の増加は、雑菌を捕食する自由生活性アメーバの増加や、アメーバに感染するレジオネラ属菌の増加につながることから、好ましくない。週に1回、20mg/L程度の高濃度モノクロラミン消毒を8時間程度行くと雑菌が検出されず、10mg/Lの2時間では検出されることを過去の実施例で経験している<sup>6)</sup>。水泳プールの場合、週に1回の完全換水や洗浄は行われないので、モノクロラミン消毒では従属栄養細菌数の増加が心配される。つまり、週に1回の完全換水や洗浄をしない大型のプールにはモノクロラミン消毒の適用を考えず、換水洗浄ができる小型のプールにモノクロラミン消毒の適用が可能と考えられた。

### D. 結論

pH8からpH10の浴槽水におけるモノクロラミン消毒を営業施設で行い、装置による機械的な生成と、手投入のいずれにおいても、モノクロラミン濃度の維持と、レジオネラ属菌の抑制が可能であった。遊離塩素が激しく消費される薬湯であっても、モノクロラミン消毒の濃度の維持と、レジオネラ抑制が両立した。モノクロラミン消毒では薬湯の色や香りに対する影響が少なく、薬湯の使用量が少なく済んだ。270m<sup>3</sup>の水泳プールにモノクロラミン消毒を適用し、1週間の短期であったが、レジオネラの発生もなく、プール臭がほとんどなかった。アルカリ性の浴槽水、薬湯、並びに小規模プールへのモノクロラミン消毒の応用が期待された。

### E. 参考文献

1. 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. Chanlett ET, Gotaas HB. The Time Factor in the Chlorine and Chloramine Disinfection of Contaminated Swimming Pool Water. Am J Public Health Nations Health. 1942 Apr;32(4):355-64.

6. 長岡宏美、泉山信司、八木田健司、「社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について」、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)」)より、平成 28 年度分担研究報告書
7. 田中忍、中西典子、野本竜平、有川健太郎、濱夏樹、岩本朋忠、温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証、神戸市環境保健研究所報、第 46 巻、39-42 頁、2018
8. 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
9. 日本水道協会:上水試験方法(微生物編)、pp.43~51、2011
10. 日本水道協会:上水試験方法(理化学編)、pp.216~222、2011
11. 日本水道協会:上水試験方法(金属類編)、pp.73~80、2011
12. Lee W, Westerhoff P, Yang X, Shang C. Comparison of colorimetric and membrane introduction mass spectrometry techniques for chloramine analysis. Water Res. 2007, 41, 3097-3102.
13. 日本水道協会:上水試験方法(理化学編)、pp.47~49、2011
14. 日本水道協会:上水試験方法(理化学編)、pp.117~119、2011
15. 日本水道協会:上水試験方法(理化学編)、pp.140~147、2011

#### 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,縣 邦雄,小坂浩司,前川純子,遠藤卓郎,倉 文明,八木田健司,泉山信司,モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策,日本防菌防黴学会誌,2017, 45, 295-300.
3. 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 8 浴槽のレジオネラ対策 1 浴槽のどこで、どのように増えるのか」、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 83-89.
4. 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 9 浴槽のレジオネラ対策 2 浴槽水の各種消毒方法の効果」、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 117-123.

##### 口頭発表

1. 柳本恵太、堀内雅人、杉山寛治、田中慶郎、市村祐二、山上隆也、植松香星、久田美子、泉山信司：pH10 のアルカリ性温泉におけるモノクロラミンの消毒効果、日本防菌防黴学会第 45 回年次大会、2018 年 11 月、東京都
2. 柳本恵太：県内の公衆浴場におけるモノクロラミン消毒検証について、山梨県衛生環境研究所感染症等研修会、2018 年 11 月 1 日
3. 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)
4. 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）
5. 藤井明、渡邊貴明、松田宗大、松田尚子、小倉徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、薬湯使用時におけるモノクロラミン消毒の有用性評価、第46回建築物環境衛生管理全国大会、2019年1月、東京都
  6. 渡邊貴明、松田宗大、小倉徹、植園健一、松田尚子、枝川亜希子、泉山信司、藤井明、循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について、日本防菌防黴学会、2018年11月、東京都
  7. 小倉徹、植園健一、渡邊貴明、松田宗大、原口浩幸、森中りえか、枝川亜希子、藤井明、モノクロラミン及び次亜塩素酸ナトリウム消毒下におけるレジオネラ属菌のLAMP法結果に及ぼす影響、日本防菌防黴学会、2018年11月、東京都
  8. 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
  9. 黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、鈴木美雪、前川純子、倉文明、医療機関の給水系におけるレジオネラ属菌汚染調査、日本水道協会水道研究発表会、2016年11月、京都市
  10. 杉山寛治、長岡宏美、佐原啓二、和田裕久、土屋祐司、市村祐二、青木信和、神野透人、小坂浩司、泉山信司、八木田健司、縣邦雄、田中慶郎、前川純子、倉文明、モノクロラミン消毒の事前適合性試験の提案、防菌防黴学会、2016年9月、東京都
  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の検出、環境技術学会、2016年9月、姫路市
- 知的所有権の取得状況
- 特許申請
1. 藤野敬介、泉山信司、特願2016-233947、モノハロゲノアミン製造用組成物
  2. 花王、特願2016-225469、モノハロゲノアミンの製造方法
  3. 花王、特願2016-225470、モノハロゲノアミン製造用固体組成物
  4. 花王、特願2016-225471、モノハロゲノアミン製造用被覆粒子群
  5. 花王、特願2016-225472、モノハロゲノアミン製造用組成物
- 実用新案登録、その他
- なし
- 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 1 における各種検査結果

検査項目	モノクロラミン 導入前 (10/15)	採水1回目 (10/22)	採水2回目 (10/29)	採水3回目 (11/5)	採水4回目 (11/12)	採水5回目 (11/26)
レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	<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
アメーバ数 ( / 50 mL)	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
一般細菌数 (CFU/mL)	0	1	1	2	0	0
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	5	370	6	6	4	4
pH	9.95	9.42	9.57	9.96	9.97	10.06
遊離残留塩素 (mg/L)	1.05	0.05	0.03	0.02	0.1	0.05
全残留塩素 (mg/L)	2.5	1.1	2.8	4.0	4.7	5.8
モノクロラミン (mg/L)	-	1.21	3.06	4.60	4.4	3.86
アンモニア態窒素 (mg/L)	-	3.0	1.7	3.9	0.93	8.7

\* - : 測定なし

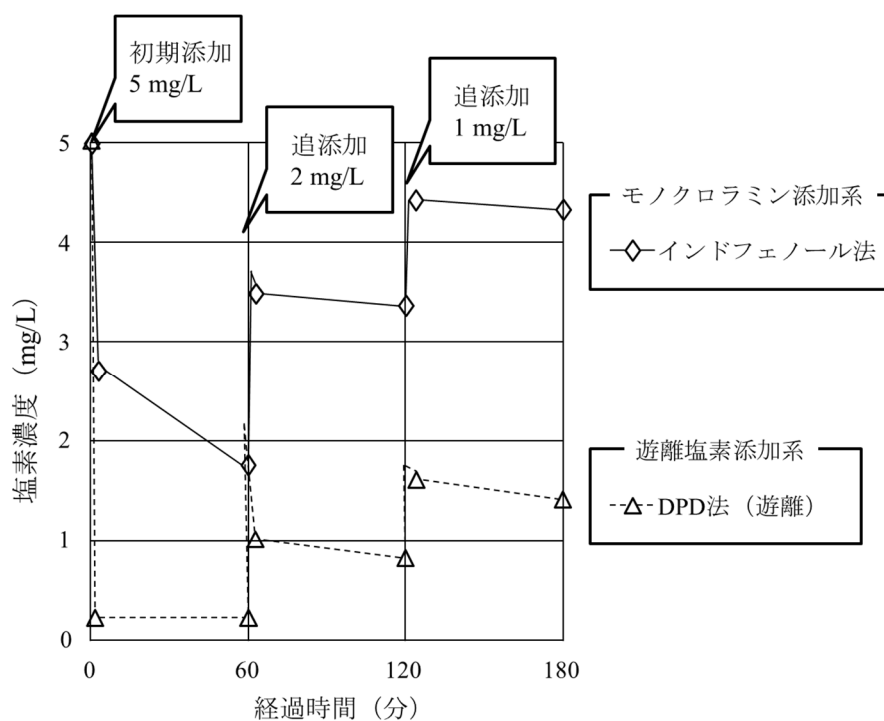


図 3 施設 1 源泉でのモノクロラミン安定性



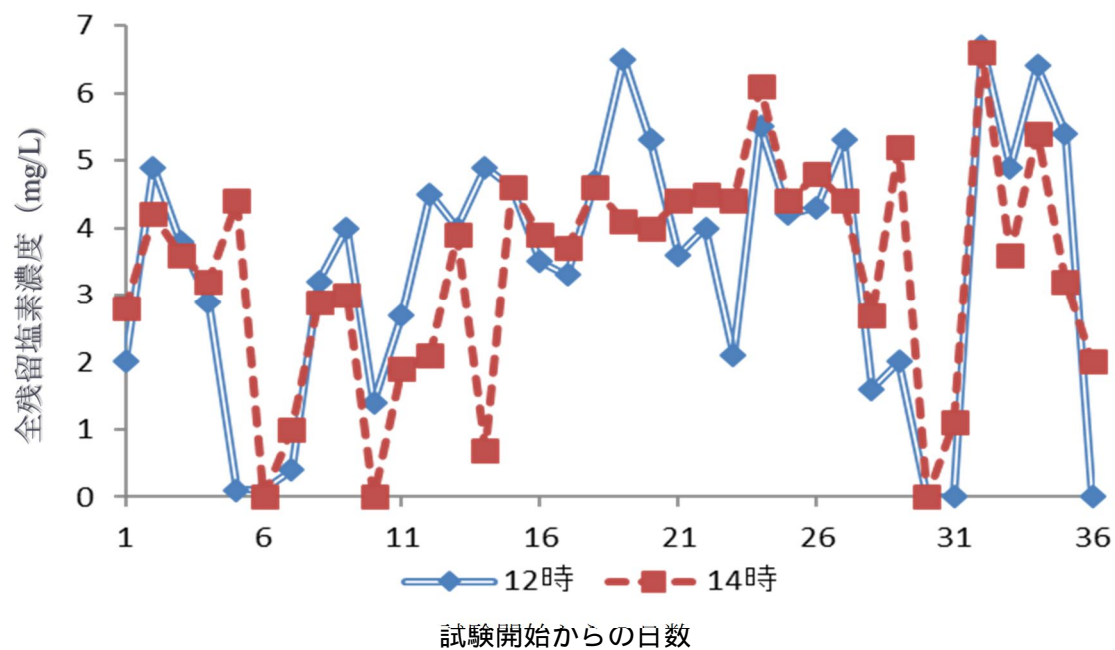


図4 施設1 浴槽水の全残留塩素濃度の推移

表2 施設2 における浴槽水、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 (7/29)	採水1回目 (7/30)	採水2回目 (7/31)	採水3回目 (8/2)	採水4回目 (8/3)
レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	100	不検出	不検出	不検出	不検出
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
アメーバ数 ( / 50 mL)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
大腸菌群 ( / 100 mL)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
一般細菌数 (CFU/mL)	15	1	9	6	5
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	118	0	5	1	9
pH	10.29	10.94	9.85	10.02	9.87
遊離残留塩素 (mg/L)	0.6	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
全残留塩素 (mg/L)	0.7	3.2	3.4	3	2.3
モノクロラミン (mg/L)	-	2.95	3	2.86	2.19
アンモニア態窒素 (mg/L)	-	0	0	0	0.04

\* - : 測定なし

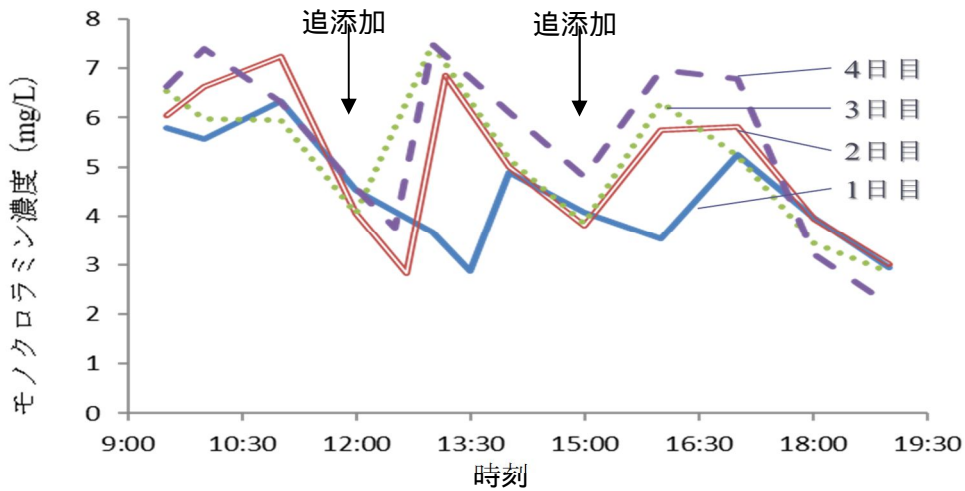


図5 施設2の浴槽水のモノクロラミン濃度

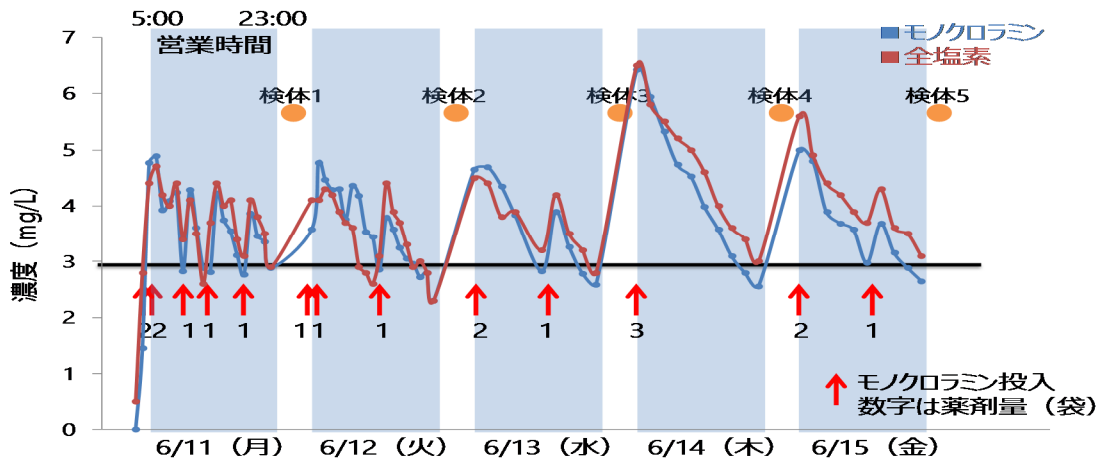
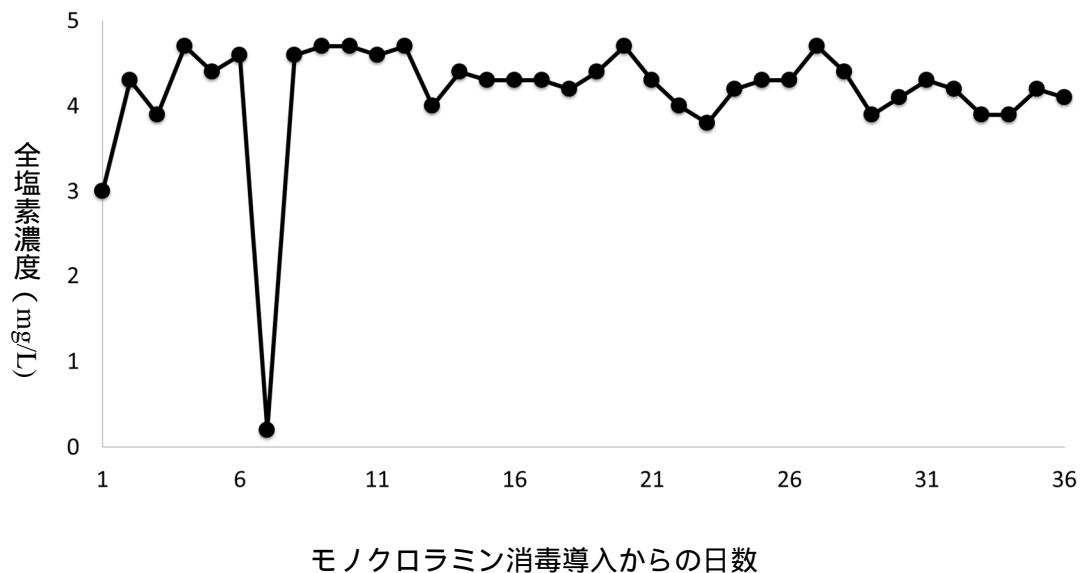


図6 施設3の浴槽水のモノクロラミン濃度

表3 施設3における分析結果

日数*	1日後	2日後	3日後	4日後	5日後
pH	8.15	8.34	8.44	8.50	8.54
NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	6.6	7.2	7.7	8.6	8.9
TOC (mg/L)	8.2	10.4	14.1	16.4	19.0
レジオネラ属菌数 (CFU/mL)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
一般細菌数 (CFU/mL)	不検出	27	16	4	1,080
従属栄養細菌 (CFU/mL)	4	31	14	26	210

日数は、実験開始（モノクロラミン消毒を開始）からの日数を示し、図6の検体1から5に対応する



モノクロラミン消毒導入からの日数  
 図 7 施設 4 における全塩素濃度の推移 (午前 11 時測定)

表 4 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

\* - : 測定なし

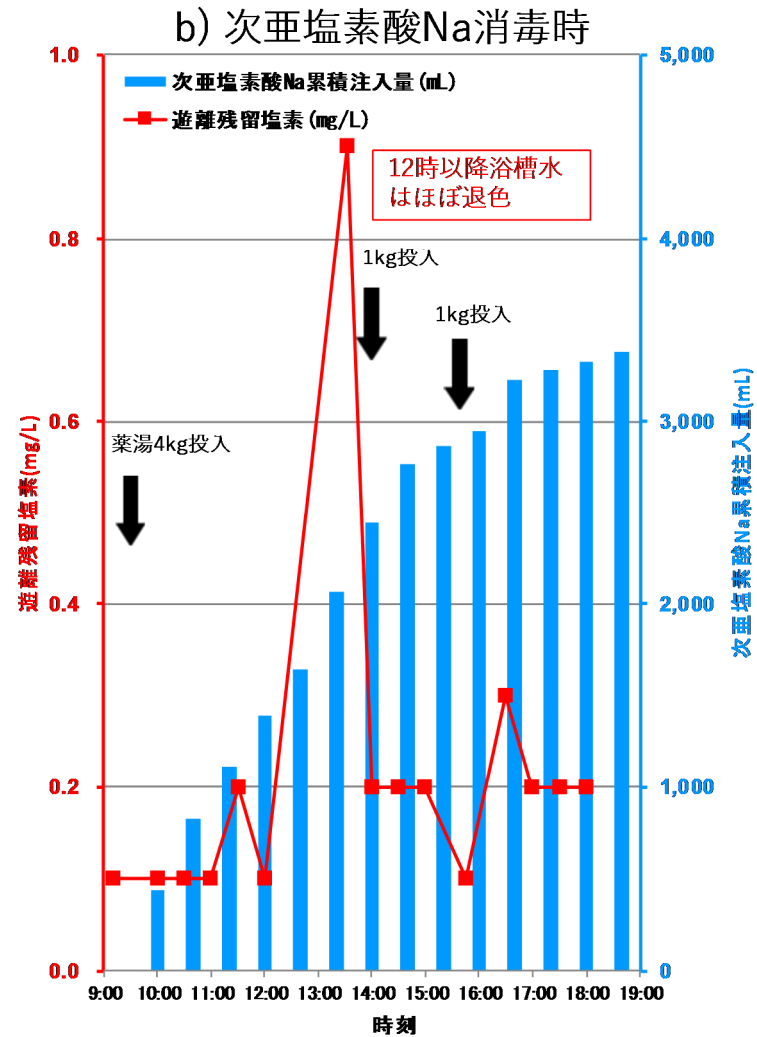
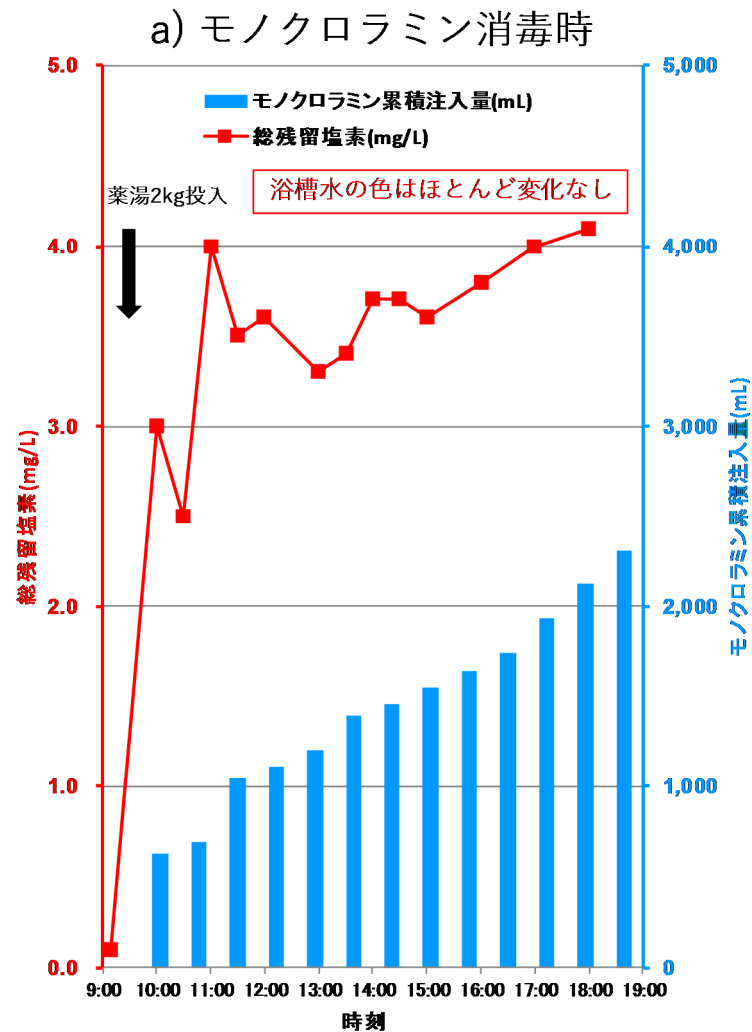


図8 生薬使用の薬湯に対する塩素消毒の推移

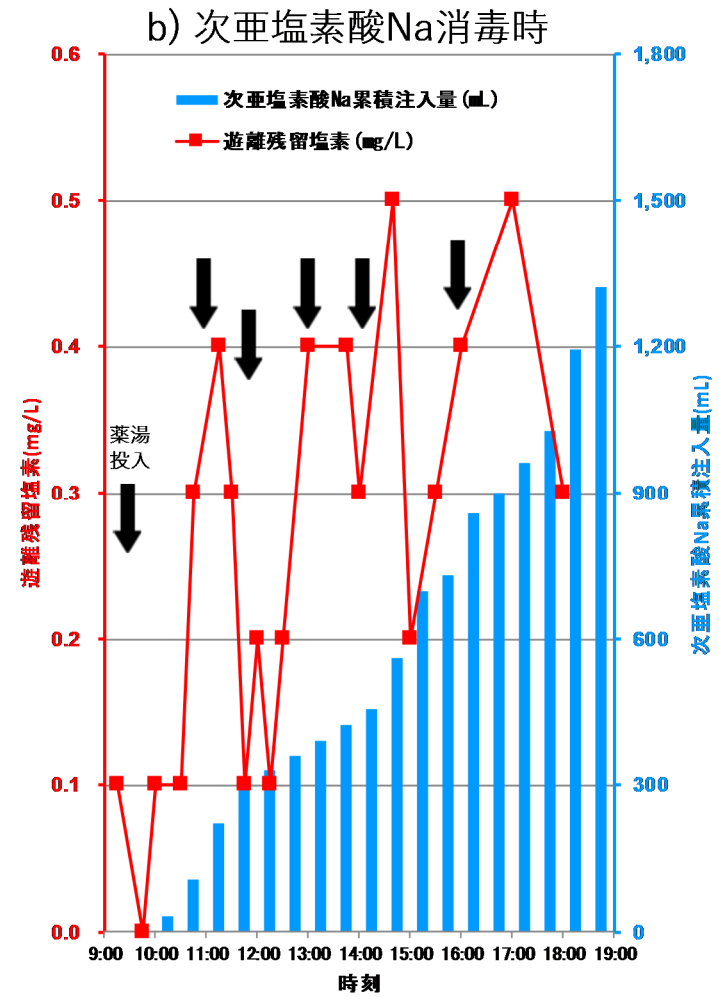
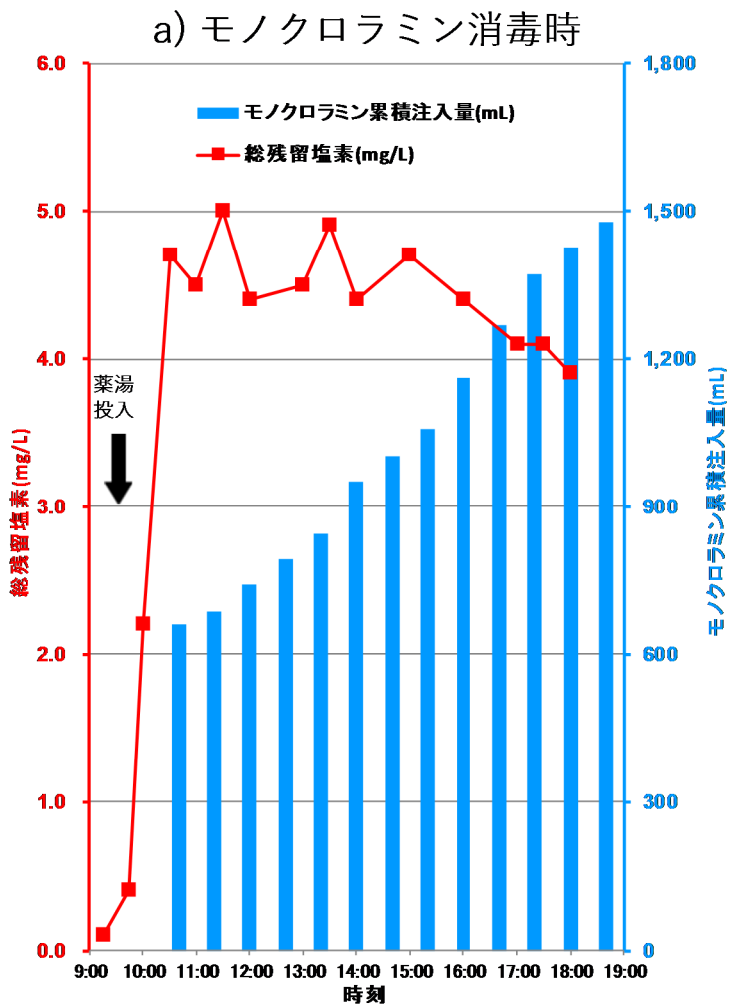
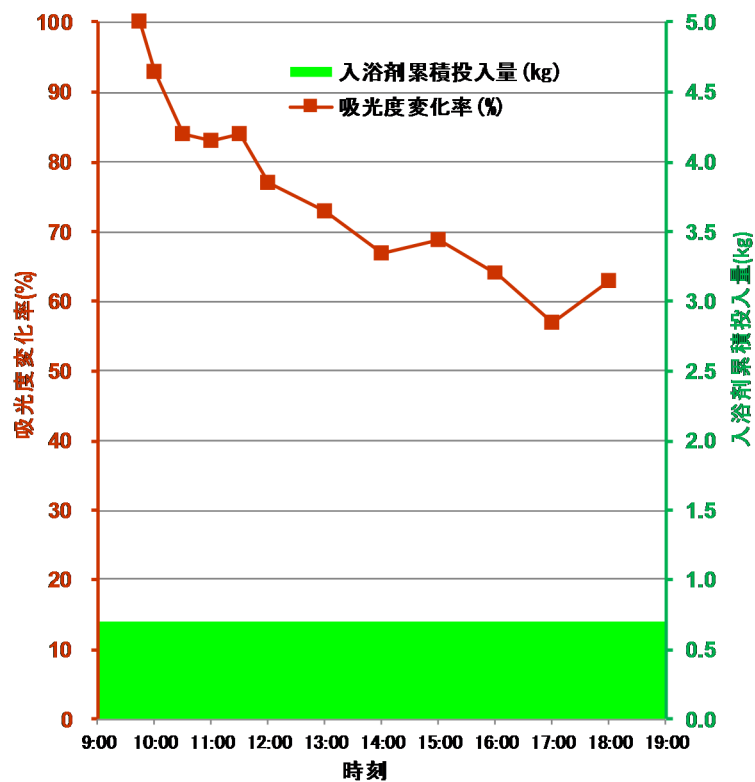
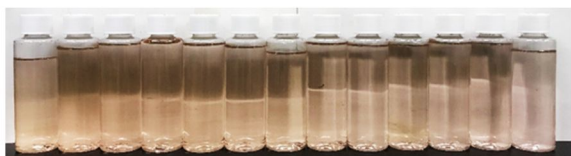


図9 無機塩の薬湯に対する塩素消毒の推移

a) モノクロラミン消毒時



b) 次亜塩素酸Na消毒時

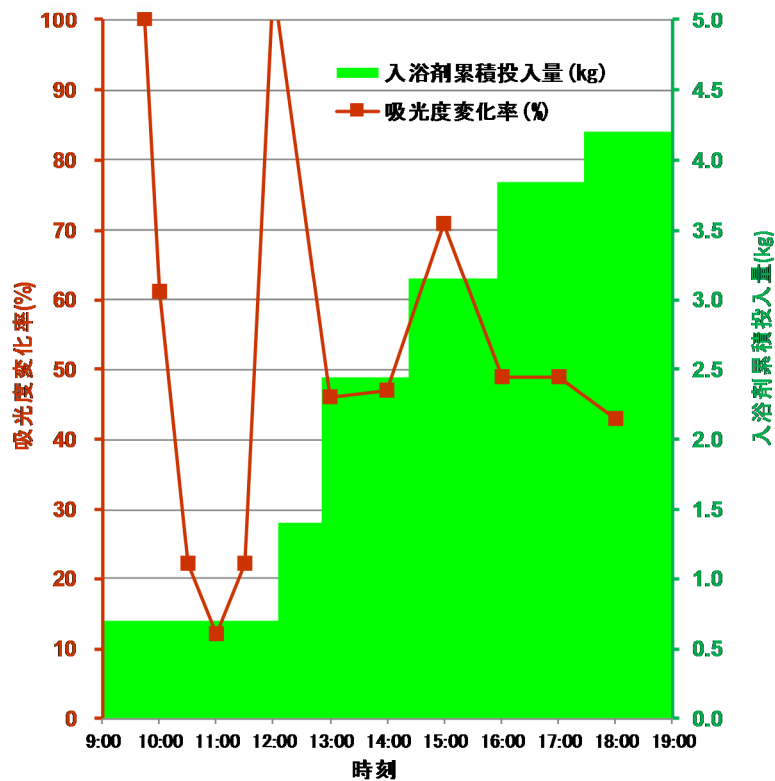


図 10 無機塩の薬湯の色調の変化

表5 薬湯使用時の微生物検査結果

薬湯	消毒剤	時刻	残留塩素(mg/L)		一般細菌 (CFU/mL)	大腸菌群 (CFU/mL)	レジオネラ属菌 (CFU/100mL)
			遊離	総*			
生薬	次亜塩素 酸 Na	10時	0.1	- **	6,500	1	-
		14時	0.2	-	194	0	不検出
		18時	0.2	-	620	0	-
	モノクロラ ミン	10時	-	3	10	0	-
		14時	-	3.7	14	0	不検出
		18時	-	4.1	20	0	-
無機塩	次亜塩素 酸 Na	10時	0.1	-	8	0	-
		14時	0.3	-	0	0	不検出
		18時	0.3	-	8	0	-
	モノクロラ ミン	10時	-	2.2	272	0	-
		14時	-	4.4	7	0	不検出
		18時	-	3.9	126	0	-

\* モノクロラミン濃度は、総塩素濃度として測定      \*\* 測定なし

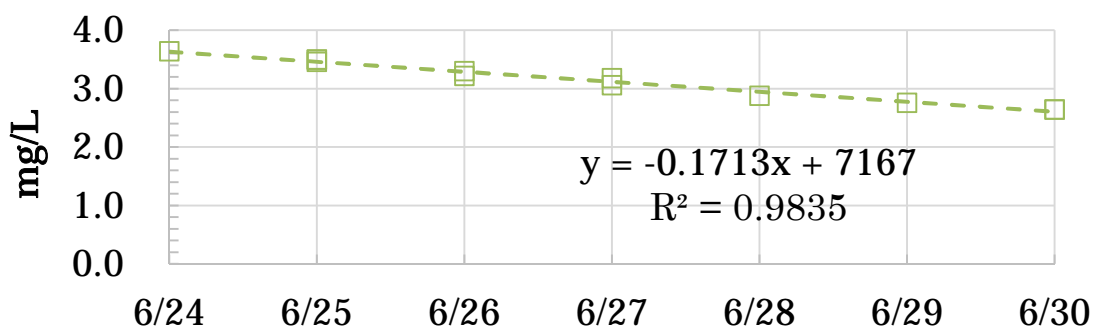


図 11 水泳プールにおけるモノクロラミン濃度の推移

表 6 水泳プールにおけるレジオネラ属菌等の検査結果

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

\* 一般細菌: 35℃, 2日培養. \*\* 従属栄養細菌: 35℃, 7日培養.

\*\*\* 循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルに準ずる.



厚労科研(健康安全・危機管理対策総合研究事業)  
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」  
平成 28-30 年度 総合分担研究報告書

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VNC菌のアメーバならびにBCYE αを用いた検出

### 研究要旨:

1. 高分子多糖類である硫酸化多糖類に含まれるヘパリン、コンドロイチン硫酸およびデキストラン硫酸には、レジオネラ属菌のアメーバ感染促進作用が認められた。
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塩基性アミンのクロロキンならびに塩化アンモニウムはアメーバ感染率を増加させ、取り込まれたVNC菌を生存させる可能性があることが示された。
3. ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験により、水系環境で定量的に VNC 菌の存在を知ることができることを確認した。
4. サプリメントの形 BCYE α のVNC菌発育促進を実現することはできなかったが、BCYE α の培地成分の質を換えることで、VNC 菌培養促進につながる可能性があることが示された。

### A. 研究目的

本研究では、通常の培養では検出の困難な環境中のレジオネラ属菌を、生菌として検出する方法を探究した。その一つは、環境中での自然宿主となるアメーバを利用し、菌を取り込ませ増殖させる方法である。高分子糖鎖であるヘパリンを中心とした硫酸化多糖の、アメーバ感染性促進の効果を解析し、また感染後期の段階ですすむファゴソーム形成およびライソゾーム融合に関連して、難培養化した菌が細胞内生存する可能性を検討した。さらに方法論としての汎用性を考慮し、レジオネラ属菌のVNC菌をBCYE αで発育させる培養法を開発するため、実験的なレジオネラ属菌VNC菌のモデルを作成し、それを利用してVNC菌のBCYE αにおける発育条件の解析を行った。

### 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°Cで培養し実験に供した。

#### 2. アメーバ株

*A. castellanii* 1501/10 株を用いた。培養は無菌培養用 PYGC 培地を用い、30°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. アメーバを利用したレジオネラ属菌増殖

##### 1) 試薬類

硫酸化多糖の効果を調べる試薬として、ヘパリン、コンドロイチン硫酸BおよびC、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸を用いた。ファゴソームの活性酸素産生に重要な NADPH オキシダーゼの阻害剤にアポシニン (Apocynin : 4'-Hydroxy-3'-methoxyacetophenone, SIGMA - ALDRICH)を用いた。ライソゾーム融合阻害剤にはクロロキン (Chloroquine diphosphate, SIGMA-ALDRICH) および塩化アンモニウム (NH<sub>4</sub>Cl,和光純薬)を用いた。これらの試薬は 10x

Amoeba saline (10xAS) で所定の濃度に調整して用いた。

## 2) アメーバに対する Lp 感染試験

アメーバ栄養体を 10xAS を用いて 24 ウェルマイクロプレートウェル内にはほぼ単層になるように接着させた。そこに被検物質を含む 10xAS 300  $\mu$ l を加え、さらにレジオネラ属菌が 0.01OD になるように加え、30°C で 3 時間培養した。gentamycin を添加し、未感染の菌の不活化、および雑菌汚染を防いだ。所定の培養時間後、氷水上でアメーバを剥離し、濃縮されたアメーバ浮遊液をスライドグラスに塗布後、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。

## 4. BCYE $\alpha$ 培地における難培養性レジオネラ属菌の培養

### 1) レジオネラ属菌 VNC 菌モデル

5mM のリン酸バッファー溶液 (pH 7.1、以下 PB と略す) をフィルターろ過し、その 200ml を滅菌メディウムボトルに入れ、3 日間培養した菌を  $10^{-5}$  OD となるように無菌的に添加し、密栓して室温ならびに 4°C で低速スターラーを用いて攪拌培養した。

菌の生残性は、蛍光染色試薬 LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fisher) を用いて、蛍光染色した菌をポリカーボネートフィルター (0.2  $\mu$  m、25mm  $\phi$ 、ADVANTEC) 上に吸引固定し、B 励起バンドパスフィルターで蛍光観察を行い、赤色蛍光菌体を死菌、緑色蛍光菌体を生菌としてその数を測定した。

### 2) BCYE $\alpha$ を用いた VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

コレラ菌の VNC 菌等で培地発育能回復の効果が認められているカタラーゼ (ナカライテスク) やピルビン酸 Na (ナカライテスク)、また加熱による菌体への物理的的刺激、レジオネラ属菌の発育に関わる栄養的因子となっている  $\alpha$  ケトグルタル酸 (Research Organic) など培地成分、また発育に制約を与える培地 pH、そして一般的に細胞内代謝および DNA 増幅に関与するスペルミジン (富士フィルム・和光純薬) などを BCYE  $\alpha$  にサプリメントの形で添加した。各種条件で調製した BCYE  $\alpha$  にボトル培養したレジオネラ属菌を接種した。またウォーターバス中で 40-50°C に加温処理した菌を、

BCYE  $\alpha$  に接種した。培地は培養 3-4 日後に CFU を測定した。

### 3) メーカーの異なる BCYE $\alpha$ を用いた VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

BD の BCYE  $\alpha$  に加え、市販されている製品 2 ブランドの BCYE  $\alpha$  生培地の計 3 種類の BCYE  $\alpha$  を用いて、ボトル培養で VNC 化したレジオネラ属菌の発育を比較した。菌の接種および培養条件は 4. と同様である。発育因子としてはカタラーゼ、 $\alpha$  ケトグルタル酸、スペルミジンと 4°C 培養菌では 50°C・5 分間の加温処理も因子として加えた。

## C. 研究結果

### 1. 硫酸化多糖類の効果

今回用いた高分子多糖類の構造と分子量、またそれらの存在下でのレジオネラ属菌感染の結果 (相対感染率) を表 1 にまとめた。10xAS で 10-20% の感染率が見られた菌は、ヘパリン 10mg/ml の存在下で感染率は約 2 倍に上昇した。その他に感染率の上昇がみられたのは 10mg/ml の条件でコンドロイチン硫酸 B およびコンドロイチン硫酸 C およびデキストラン硫酸であり、その感染率上昇の度合いはヘパリンとほぼ同様であった。一方、ヒアルロン酸 10 mg/ml には明らかに感染率の低下が認められた。培養中のアメーバに形態的な変化は認められなかった。

### 2. 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

長期培養で発育能が低下した菌に対する、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図 1 および 2 に示した。10xAS を用いた対照実験でアメーバ感染率は 1.3% であったのに対し、アポシニンおよびクロロキンは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。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。図 3 にはアポシニン存在下で感染した菌の細胞内増殖像を示した。取り込み後の増殖に進んでいることがわかる。

### 3. レジオネラ属菌の水環境における VNC 菌モデル

ボトル内 PB にレジオネラ属菌を添加した時点から D0 としたときの、経時的な CFU をモニタリングの結

果を図4に示した。培養開始直後 D1の CFUは 262、以後室温では 100-300CFU の間を推移し、D49 時点で 224CFU を検出した。D23 の時点で室温培養中の菌浮遊液の半量を 4℃で培養を開始した。その結果、D35 の時点でCFUは 83 に低下、D49 時点で約 53cfu まで培地発育菌数は低下した。Bac Light で生残性を調べたところ、室温培養菌は D21 時点で生菌数の 36.2%が BCYE $\alpha$  で発育した、即ち、残り 63.8%は VNC 状態と考えられた。一方、4℃培養の菌は D32 時点で、生菌数と発育数ほぼ同じで VNC 菌としては残存していなかったと考えられた(図5)

#### 4. BCYE $\alpha$ における VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

室温培養菌は D14 以後、4℃培養菌は D32 以後、適時サンプリングし発育試験を行った。レジオネラ属菌の一般的培地であるBCYE $\alpha$ の組成成分である $\alpha$ ケトグルタル酸、ピロリン酸鉄は濃度変化に対しCFUの変化はみられなかった。また培地 pHもpH6.6~7.8の間で、通常pH6.9以上にCFUが上昇する条件はみられなかった。

大腸菌の VNC 菌で発育促進の効果が認められているカタラーゼ、ピルビン酸は、室温培養菌においてカタラーゼに若干のCFU増加が見られたが、4℃培養菌では対照と比べてCFUの変化は見られなかった(図6)。ピルビン酸は 4℃培養菌に対し、発育促進効果を認めなかった。細胞内代謝活性化、DNA合成促進に関わるスペルミジン、Yeast RNAも調べた範囲でCFUの変化はみられなかった。

#### 5. メーカーの異なるBCYE $\alpha$ を用いた VNCレジオネラ属菌の培地発育能回復試験

自家調製した BCYE/BD と市販 BCYE $\alpha$  生培地(A社ならびにB社)の室温および4℃で培養したレジオネラ属菌(D49)の発育を調べた結果を図7に示した。室温培養菌の場合、自家調製BDの場合、対照と比較してカタラーゼ添加は若干の増加を認めるものの、全体として各因子と対照の間には大差がなかった。一方AならびにB社の場合はBDの結果と比較し、対照ならびにすべての因子についてCFUの減少が見られた。4℃培養菌の場合は、BDの対照が53 cfuであり、因子間のCFUは室温での結果と同様に大差がなかった。ただし4℃培養菌でのみ調べた50℃・5分間加温条件では、対照より明らかなCFUの減少が認められた。AならびにB社の場合は対照ならびにすべての因子についてBDよりも発育が抑制された。図8には室温ならびに

4℃培養したレジオネラ属菌の3種類のBCYE $\alpha$ 対照実験における菌の発育状況を示した。

#### D. 考察

環境で生きている微生物を検出する方法には、遺伝子検出法、蛍光染色法そして培養法がある。このうち培養は生菌を回収できる反面、様々な発育条件の制約があり、これが寒天平板培地を用いる *in vitro* 培養の場合、生きてはいるが培養できないVNC菌としてあらわれる。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VNC菌も含めたレジオネラ属菌の存在とその実態を解明することの重要性が増し、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必要と思われる。

本研究期間の中で、まずVNC化している難培養性のレジオネラ属菌をアメーバを用いて検出、分離確保する方法論を検討した。各種の物質の感染促進作用を試験した中で、高分子の硫酸化多糖類が菌の取り込みを促進させること、また菌の取り込み後の細胞内生残および増殖過程において、ファゴサイトーシスにおける活性酸素産生、またファゴリソゾーム形成の各段階を阻害する物質が、菌の生残に有効に働くことを明らかにした。アメーバを用いたレジオネラ属菌、特にVNC菌についても分離、回収可能な方法論が成り立つことが判明したことから、VNC菌の細菌学的な解析およびその野外における実態の解明が進むと思われる。さらに野外試料に関する有用性を明らかにすることが期待される

一方、アメーバを利用したレジオネラ属菌培養は、アメーバそのものの培養や感染実験が必要で、結果に定量性がないという点で汎用性の問題があると思われた。そこで、これまでの知見も応用して一般的に汎用されるBCYE $\alpha$ を用いたVNC菌培養の可能性を検討した。基本としたボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験により、水系環境で定量的に VNC 菌の存在を知ることができることを確認した。通常BCYE $\alpha$ では培養困難なVNC菌を培養で可視化するために、酸化ストレス抑制効果や細胞内代謝、DNA合成促進に関与する物質をサプリメントの形BCYE $\alpha$ に添加したが、調べた範囲ではVNC菌の発育を促進するものはなかった。しかしBCYE $\alpha$ 製品により菌の発育性が異なることが判明し、培地成分の質がVNC菌培養促進に関与する可能性はであると判断された。一方で現状のBCYE $\alpha$ に基づく検査ではレジオネラ属菌の過少評価につながる可能性があることが想起され

た。

より多くの生菌を検出する、可視化する(VNC菌を減らす)ことは、レジオネラ症問題の現状についてのより正確な理解につながる。培地発育能の高い菌(例えば実験室培養株)に加え、環境ストレス等で発育能の低下した菌も利用した評価と、それに基づく培養法、培地改良が必要であると考えられる、今後のレジオネラ症問題にその対策が活かされることを期待する。

#### E. 結論

現存する微生物のほとんどは培養が困難といわれる。レジオネラ属菌もその中の一つということは、多くの野外調査の結果、また本研究でも実験的に証明されている。レジオネラ症のより正確な理解と対策には、VNC菌も含めたレジオネラ属菌の存在を認識し、適切な方法でこれを検査、測定し、実態を把握し、汚染、感染の防止を図ることが重要と考えられる。

#### 参考文献

1. Ohkuma S et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA, 75(7), 3327-3331,1978
2. Wai S.N.et al., FEMS Microbiol. Lett, 136, 187-191, 1996
3. Mizunoe Y. et al., Arch Microbiol., 172, 63-67, 1999
4. Mizunoe Y. et al., FEMS Microbiology Letter, 186, 115-120, 2000
5. Beuerlein K. Et al., Br.J Pharmacol.,161(4), 885-898, 2010

F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. レジオネラ属菌のアメーバ感染における高分子物質の効果

試験物質	濃度	相対感染度	分子構造(ウロン酸-アミノ糖) 分子量
10xAS	—	1.0	
ヘパリン	10mg/ml	2.0	グルクロン酸/イズロン酸-グルコサミン 6,000 ~20,000
コンドロイチン硫酸 B (デルマトン硫酸)	10mg/ml	2.0	イズロン酸-アセチルガラクトサミン 60,000~150,000
	1mg/ml	0.8	
コンドロイチン硫酸 C	10mg/ml	1.5	グルクロン酸-アセチルガラクトサミン 60,000~150,000
	1mg/ml	0.8	
ヒアルロン酸	10mg/ml	0.3	グルクロン酸-グルコサミン 1,000,000 以下
	1mg/ml	0.7	
デキストラン硫酸	10mg/m	2.4	グルコース 1,000~9,000
	1mg/ml	0.8	

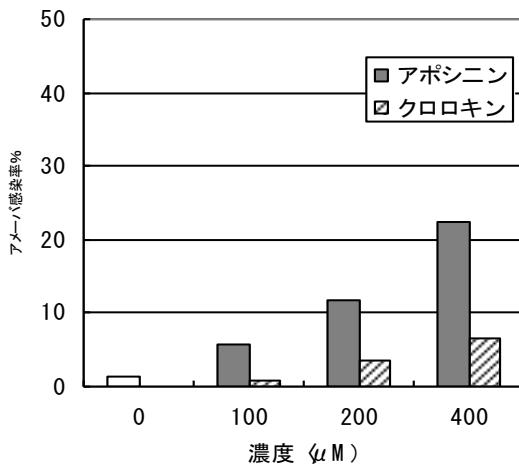


図1、アポシニンならびにクロロキンのレジオネラ属菌アメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養7日目を使用)

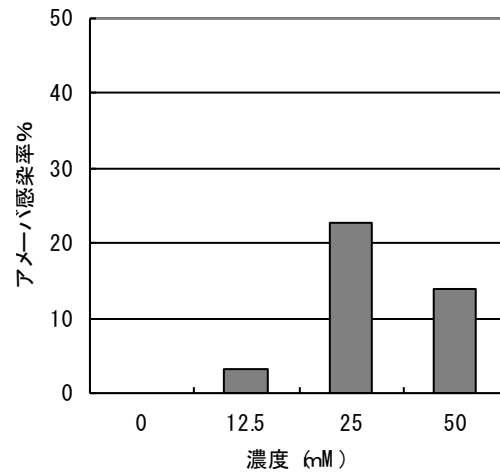


図2、塩化アンモニウムレジオネラ属菌アメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養7日目を使用)

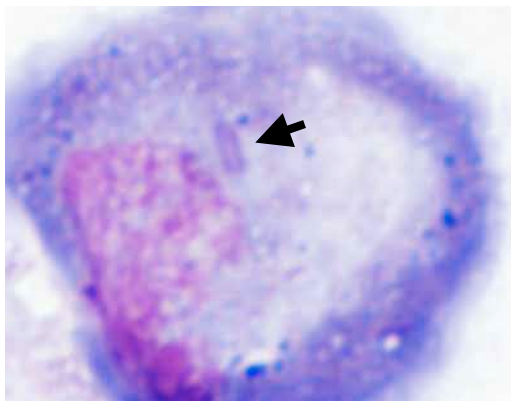


図3、100nM アポシニン添加条件のアメーバ感染で観察されたレジオネラ属菌の細胞内増殖像

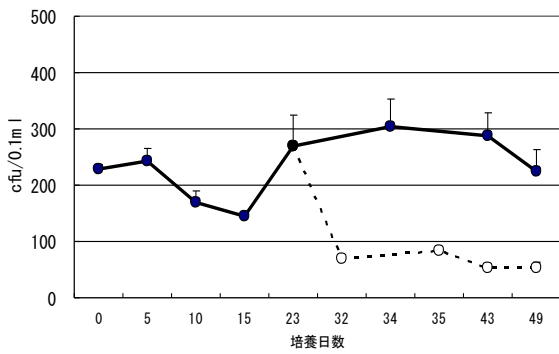


図4、ボトル水系環境におけるレジオネラ属菌の経時的CFUの変動  
実践は室温培養、破線は4°C培養

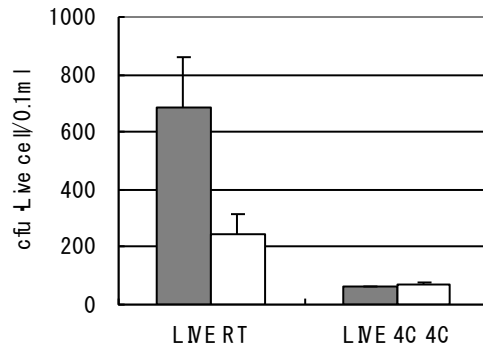


図5、ボトル水系環境での生菌数(Live)とCFU

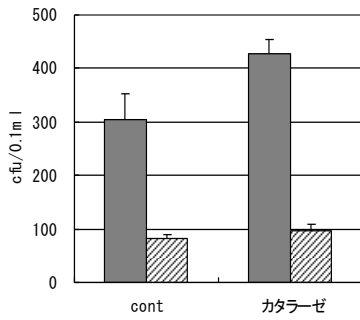


図6、カタラーゼ添加BCYE $\alpha$ における  
VNCレジオネラ属菌の発育  
■ 室温培養菌、▨ 4°C培養菌  
カタラーゼ量は2000U/plate

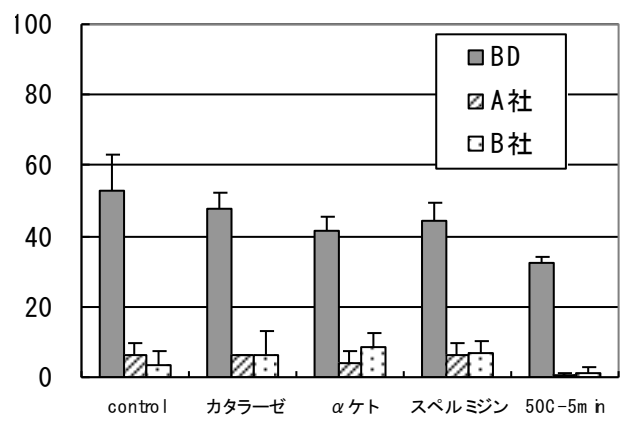
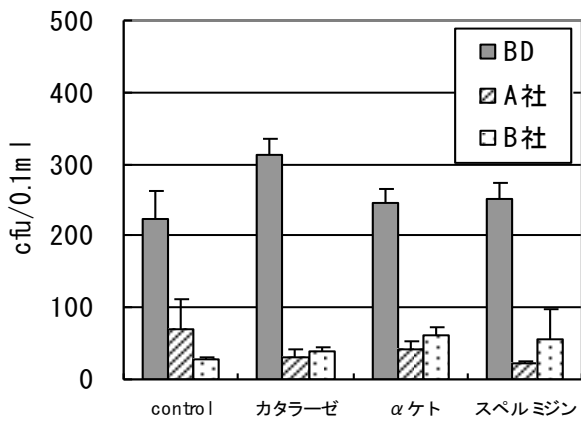


図7、市販BCYE $\alpha$ 生培地(AならびにB社)と自家調製BCYE $\alpha$ (BD社)におけるVNCレジオネラ属菌の発育  
左図:室温培養菌、右図:4°C培養菌、カタラーゼは2000U/plate、 $\alpha$ ケトグルタル酸は通常の2倍濃度、  
スペルミジンは2mMで使用

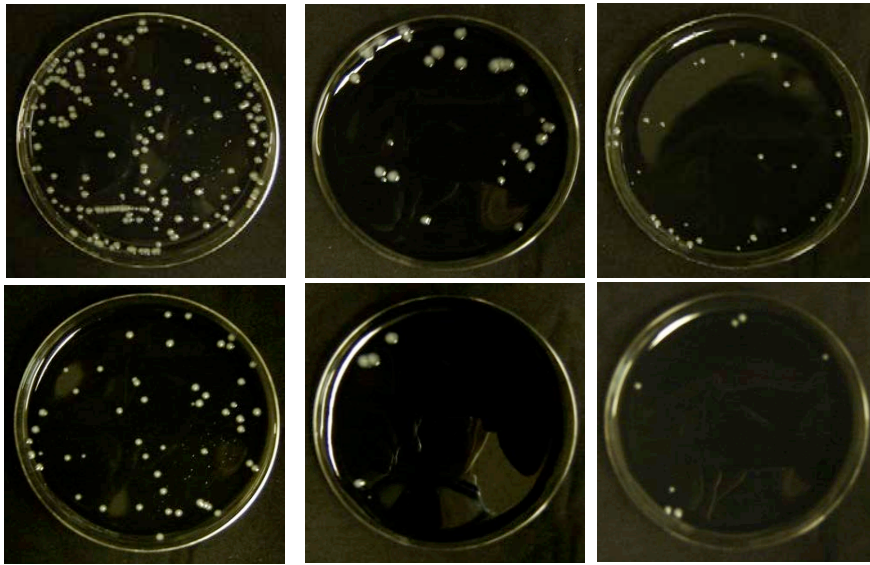


図8. VNClレジオネラ属菌の3種類のBCYE $\alpha$ を用いた対照実験における菌の発育  
左側:自家調製BCYE $\alpha$  (BD社)、中央:A社BCYE $\alpha$ 、右側:B社BCYE $\alpha$   
上段:室温培養菌、下段:4°C培養菌

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
（総合）研究報告書

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  
研究代表者：前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部

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

研究分担者	長岡宏美	静岡県環境衛生科学研究所
	泉山信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	小坂浩司	国立保健医療科学院 生活環境研究部
	壁谷美加	浜松市保健所
	土屋祐司	浜松市保健環境研究所
	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
	森 健	静岡県健康福祉部生活衛生局衛生課
	漆畑 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)

これまでの研究で、遊離塩素消毒の問題点を補う新たな消毒方法として、欧米で飲料水の消毒に用いられている結合塩素の一種であるモノクロラミンについて、種々の泉質及び形態の温泉施設における消毒効果について検証するとともに、モノクロラミン消毒を導入するにあたり必要な衛生管理手法の確立を目指して、実証試験を主体とした検証を行った結果、アンモニウムイオン、鉄イオン及びマンガンイオンを多く含む泉質やマンガンイオンを含む地下水を利用した循環式の入浴施設において、その有用性が実証された。

これを受けて、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、モノクロラミン消毒の普及を目的として営業施設が本消毒法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ところ、モノクロラミンの濃度保持がその消毒効果に大きく反映するため、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項目であることが示唆された。

今後、全国の入浴施設へモノクロラミン消毒法が導入されることにより、浴槽水の確実なレジオネラ防除がなされ、レジオネラ症患者発生の低減が期待される。

また、モノクロラミン消毒下での従属栄養細菌の検出状況について調べたところ、*Mycobacterium phlei* 等の細菌が検出された。今後、これらの従属栄養細菌の制御方法について検討することが必要であると思われる。

一方、レジオネラ防止対策において自主管理は重要な位置を占めるが、これは日常のレジオネラ検査がベースとなっている。そこで、自主検査のレベルアップを図り検査実施機関の検査技術の標準化を図ることを目的に静岡県内の検査機関及び行政担当者を対象に「レジオネラ属菌検査研修会」を開催した。事後アンケートでの参加者の評価は良好で、今後も開催の継続を望む意見が多かった。

#### A. 研究目的

これまでの研究成果で、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<sup>1,2,3,4)</sup>。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<sup>5)</sup>。

本研究初年度は、高齢者の利用が多くレジオネ

ラ感染リスクが高いと思われる社会福祉施設の浴槽設備へのモノクロラミン消毒の適用を検討した。

2 年目は、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。

3 年目は、モノクロラミン消毒導入のモデルスキームを用いて、引き続き、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。

また、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3年間にわたり開催した。

## B. 研究方法

### 1 社会福祉施設の入浴設備へのモノクロラミン消毒の適用

レジオネラ症患者発生に係る関連施設とされた社会福祉施設の入浴設備で、モノクロラミン濃度を3 mg/Lに維持する6週間の消毒実証試験を行なった。本施設は、図1に示したように、沸かした水道水を循環し、公衆浴場の男女浴槽に使用するとともに、その一部を社会福祉施設のデイサービス個浴槽に配湯し、掛け流し的な利用を行っていた。男女浴槽にはジェットと気泡発生装置があり、循環系内には、炭酸カルシウム天然石入りのタンクと壁付けの人工温泉装置を備えていた。浴槽水の消毒薬はろ過器前に注入していたが、夜間(午後7時半～翌日の午前8時)は循環と消毒を停止していた。モノクロラミンは営業日の循環開始後から、ほぼ1時間30分間隔で計8回、営業終了時までタイマーで間欠的に注入された。また、毎週土曜日にはモノクロラミン濃度10mg/L、2時間循環による配管洗浄を実施し、その後換水していた。

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

レジオネラ属菌の定量は、浴槽水500mLをメンブランフィルター法により100倍濃縮後、GVPC寒天培地に分離培養し、100mLあたりのCFU(Colony Forming Unit)を算出した。また、レジオネラ属菌の増殖の場となる自由生活性アメーバ(大腸菌塗布無栄養寒天培地)、および従属栄養細菌(R2A寒天培地(ニッスイ))や一般細菌数(標準寒天

培地(栄研化学))についても常法により定量したが、従属栄養細菌の培養については浴槽水に近い温度の37℃で、7日間とした。

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

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。

### 2 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。

### 3 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、浴槽水のモノクロロア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、モノクロロア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ロアミン濃度の測定値の比較を行った。

#### 4 モノクロロアミン消毒下における従属栄養細菌の検出状況

モノクロロアミン消毒を導入したK,H,M,Dの泉質の異なる4施設の循環式浴槽水8検体についてR2A培地を用いて従属栄養細菌を分離し、菌数を測定するとともに分離された代表株について、16SrDNA塩基配列解析を実施し、菌種を同定した。なお、検査対象とした4施設の泉質は表2に示すとおりである。

#### 5 研修会の研修対象

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。

#### 6 研修参加機関

初年度は検査機関19機関26名、2年目は検査機関19、県内の保健所等行政関係職員(静岡市及び浜松市を含む)24名、3年目は検査機関15機関、県内の行政関係職員24名が参加した。なお、参加者には実施している検査方法について事前アンケートを行った。

#### 7 研修内容

##### 講義

3年間を通し、静岡県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解説を行った。

また2年目は、「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。

あわせて、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。

3年目は、感染研で開催された「レジオネラ感染リスクシンポジウム」の伝達講習、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。

さらに、「レジオネラ対策について～現場からの報告～」と題し保健所担当職員が実際の指導状況等について事例紹介を含め解説した。

また、「レジオネラ属菌の細菌学的特徴と汚染対策」と題し麻布大学古畑勝則教授による特別講演を行った。

##### 実習

実習はバイオハザード区域で行うため、最初に、バイオセーフティー講義を行った後に、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、1年目に希望の多かったPCRについては2年目及び3年目に実習を行った。

## C. 結果

### 1 社会福祉施設の入浴設備へのモノクロラミン消毒の適用

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

この人工温泉水を使用した社会福祉施設の循環式の入浴設備におけるモノクロラミン消毒の実証試験結果を表1に示した。6週間のモノクロラミン消毒試験期間中の浴槽水、デイサービス個浴槽配管水、デイサービス配管滞留水におけるモノクロラミン濃度は約3mg/Lに安定して維持され、それらの検体すべてからレジオネラ属菌、アメーバは検出されなかった。また、ジクロラミン濃度は0.45mg/Lと低く、塩素消毒臭の原因であるトリクロラミンは定量下限値未満であった。現場で測定した全塩素濃度はモノクロラミン濃度とほぼ同等の値を示した。

なお、モノクロラミン消毒実証試験の終了約1ヶ月後の、同施設の遊離塩素管理時の男浴槽水から *Legionella pneumophila* (以下、*L. p.*と略す) 血清群5が20 CFU/100mL 検出された。その後の循環系統内の拭き取り検査でも、*L. p.* 血清群1, 5, 8, 10 が検出された。

### 2 導入モデルスキーム(図2)

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。

### 3 (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からもレジオネラ属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3)。

### 4 モノクロラミン消毒下での従属栄養細菌の検出状況を表2に示した。

調査対象とした4施設(K,H,M,R)からは *M. phlei*, *S. epidermidis*, *Rheinheimera sp.*, *Rhodobacter sp.*

が  $2.2 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$  検出された。

## 5 研修会におけるアンケート結果

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。検体採取では90%がチオ硫酸ナトリウム処理を行っていた。また81.8%が検体を濃縮しており、うち60%がろ過濃縮法を行っていた。前処理は酸処理を採用している機関が54.4%と最も多く、酸処理と熱処理を併用している機関が36.4%であった。同定では、30%が斜光観察を実施していた。また、77.8%がL-システイン要求性を鑑別項目とし、44.4%の機関が抗血清による同定をあわせて実施していた。また、遺伝子検査は87.5%の機関が実施していなかった。

今回のアンケート結果から、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。

## D. 考察

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

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

一方、モノクロラミン消毒から遊離塩素消毒に戻して約1ヶ月後の男浴槽水から *L. p.* 血清群5

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

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た。

## E. 結論

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

浴槽水のモノクロラミン管理時に必要な配管洗浄の方法も確立されたことから、今後、全国の地方自治体の公衆浴場法施行条例等へのモノクロラミン消毒法の採用が期待される。

また、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各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。

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

しかし、今後研修を継続して実施するにあたっては検査法の選択という問題が生じる。

本研究では「静岡県レジオネラ症検査標準作業書」に基づく検査法により研修を実施したが、今後は現在のレジオネラ症防止指針に準拠するのか、或いは ISO に準ずる方法を取り入れるかなど早急に検討すべき課題が残されている。

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

#### 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) 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）
- 3) Asami M., Oya M., Kosaka K.: A national survey of NDMA in raw and drinking water in Japan. Sci. Total Environ. 407 (11)

3540-3545 (2009)

- 4) 杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，縣邦雄，遠藤卓郎：モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策，保健医療科学 59 (2) 109-115 (2010)
- 5) 杉山寛治，神田隆，市村祐二，江口大介，泉山信司，八木田健司，小坂浩司，遠藤卓郎：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，モデル浴槽水におけるモノクロラミン生成・注入・測定の自動化の検証，平成 23 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）
- 6) 水質試験方法等調査専門委員会：上水試験方法 解説編 1993 p.262 日本水道協会
- 7) 縣邦雄，田栗利紹，杉山寛治，神澤啓：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入浴施設の衛生管理実際の入浴施設における注入・測定の自動化，平成 23 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）
- 8) 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）
- 9) 縣邦雄，神野透人，八木田健司，杉山寛治，小坂浩司，泉山信司，長岡宏美，片山富士男，和田裕久，富田敦子，市村祐二，江口大介：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，種々の温泉水におけるモノクロラミン消毒効果と高濃度洗浄の検証，平成 25 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）

#### G. 研究発表

##### 論文発表

なし

##### 学会発表

- 1) 牧田幸久，鈴木秀紀，森主博貴，松橋平太，  
柴田真也，長岡宏美，川森文彦，小澤匡宏，  
山内薫明，森 健，市村祐二，青木信和：モ  
ノクロラミンの浴槽水消毒条件の検討，静岡  
県公衆衛生研究会，静岡（2016）

##### 研修会

- 1) 長岡宏美：平成 27 年度生活衛生関係技術担当  
者研修会，厚生労働省健康局生活衛生課主催，  
2016 年 2 月 5 日，東京都千代田区

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1 社会福祉施設浴槽水のモノクロミン消毒実証試験の結果

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

- : 検査せず

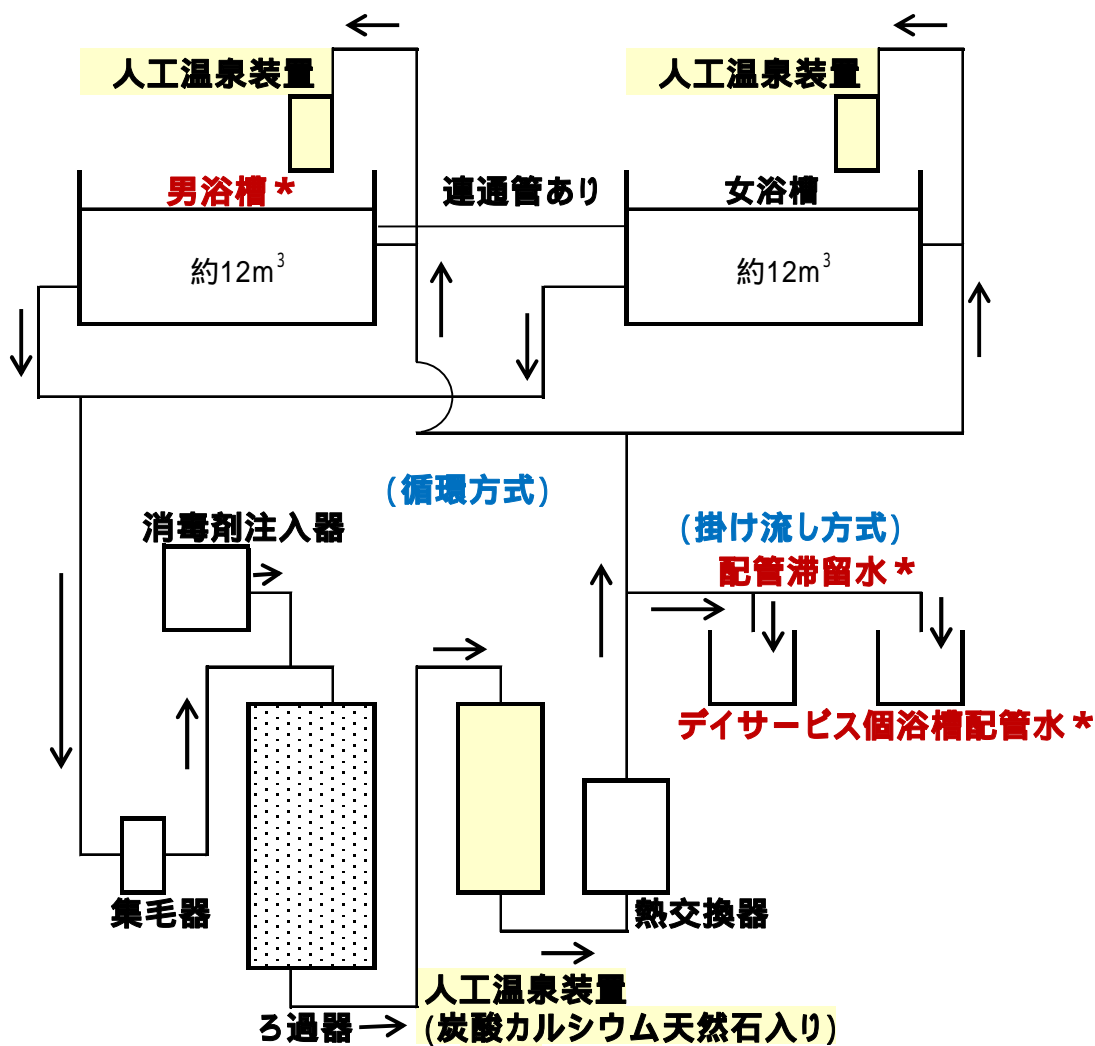


図1 社会福祉施設入浴設備の循環系統図



## 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ラ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ラ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)モノクロラミンの濃度安定性
- (2)微生物検査 ・レジオネラ属菌

2

図2 モノクロラミン消毒の導入スキーム

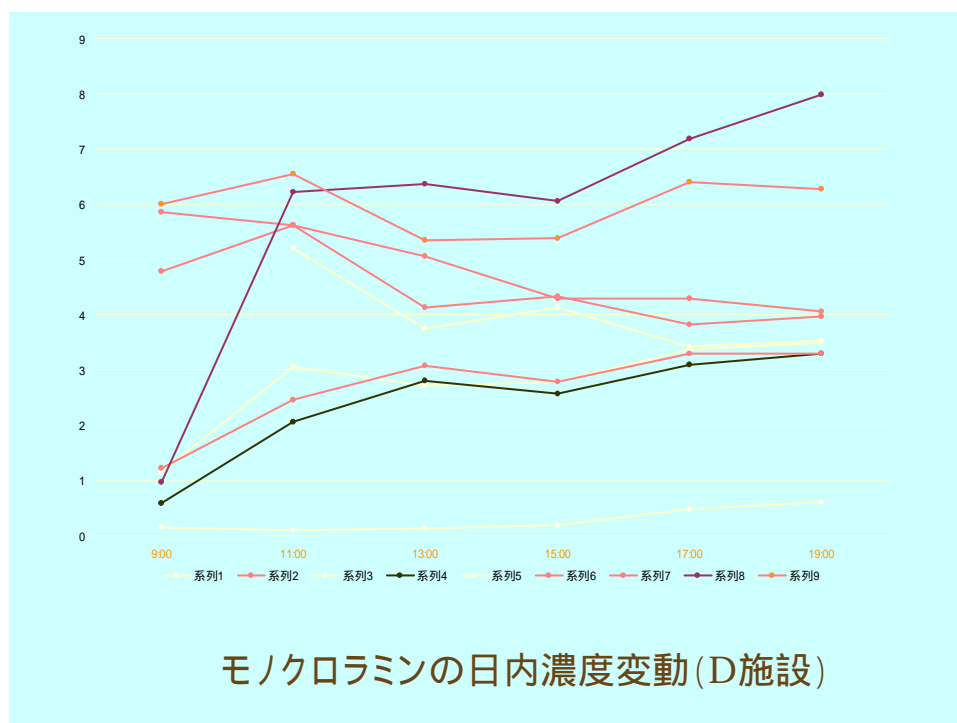
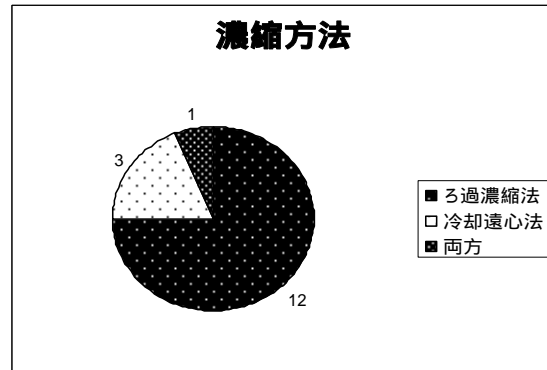
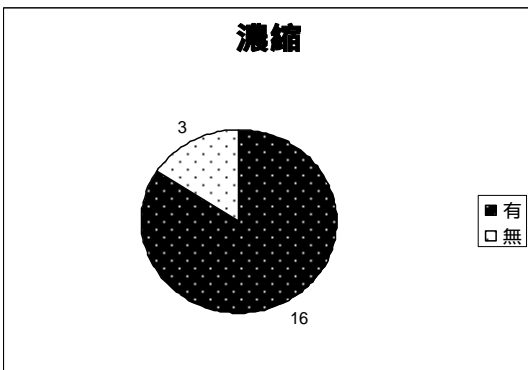
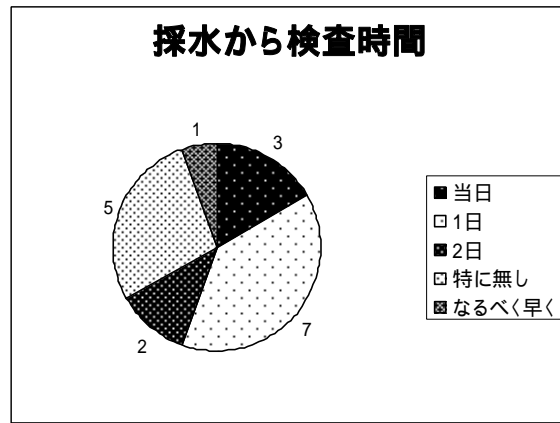
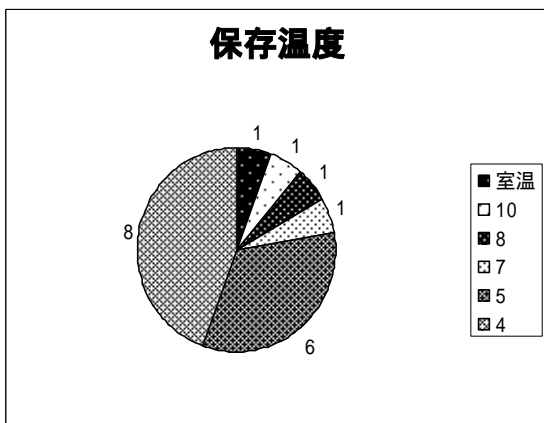
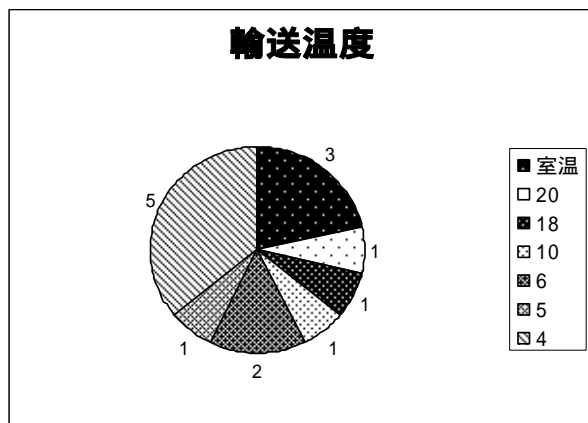
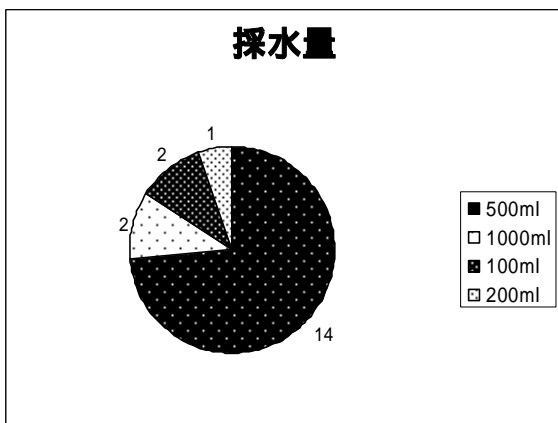
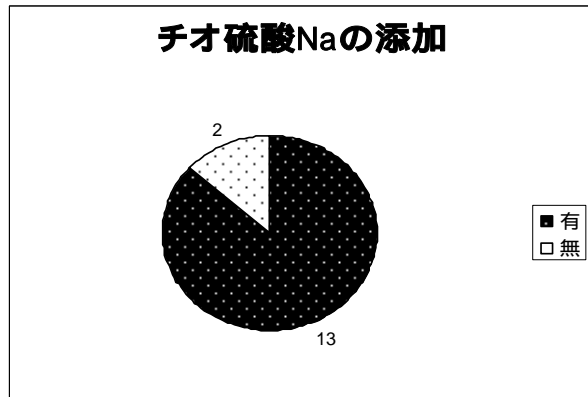
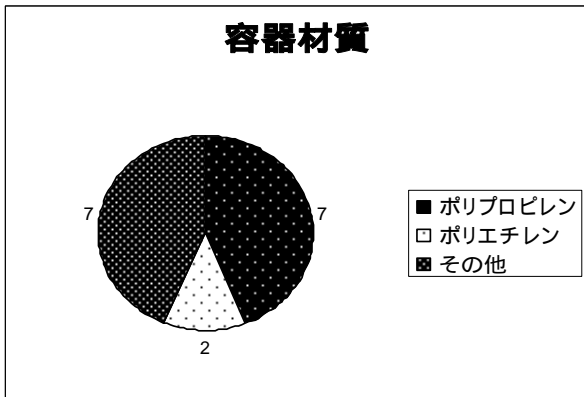


図3 D施設におけるモノクロラミンの日内濃度変動

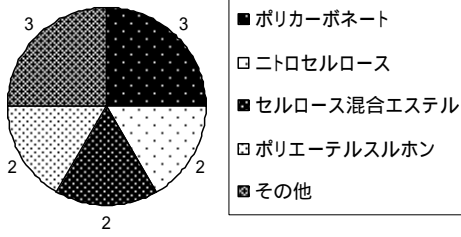
表2 モノクロラミン消毒下での従属栄養細菌の検出状況

施設	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	菌種	泉質
K - 1	2.2 × 10	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Rheinheimera sp.</i> <i>Rhodobacter sp.</i>	Na・炭酸水素塩
2	8.0 × 10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
H - 1	1.2 × 10 <sup>5</sup>	<i>Mycobacterium phlei</i>	マンガニオンを含む下水
2	1.0 × 10 <sup>3</sup>	<i>Mycobacterium phlei</i>	
3	6.1 × 10 <sup>2</sup>	<i>Mycobacterium phlei</i>	
4	4.0 × 10	<i>Mycobacterium phlei</i>	
M	9.2 × 10 <sup>3</sup>	<i>Mycobacterium phlei</i>	炭酸Ca天然石入
R	2.4 × 10 <sup>3</sup>	<i>Mycobacterium phlei</i>	Na・Ca塩化物

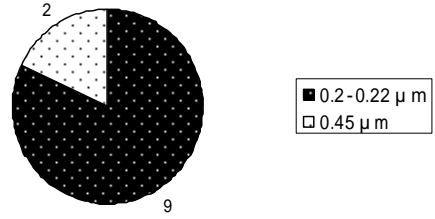
【資料】検査法に関する事前アンケート集計結果



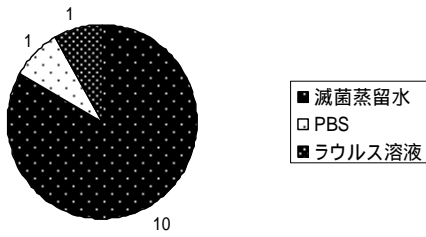
### ろ過フィルター素材



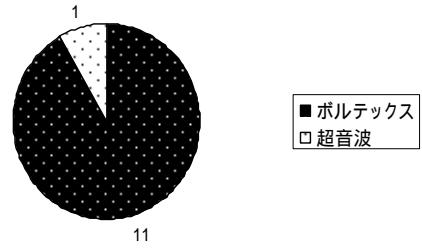
### ポアサイズ



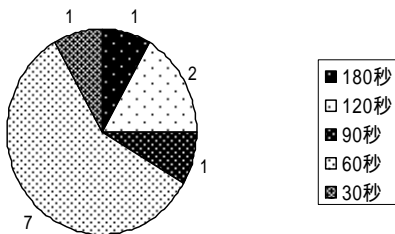
### 溶液



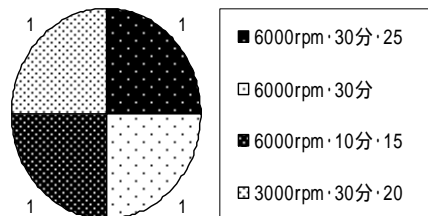
### 溶出方法



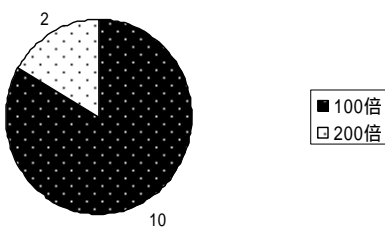
### 溶出時間



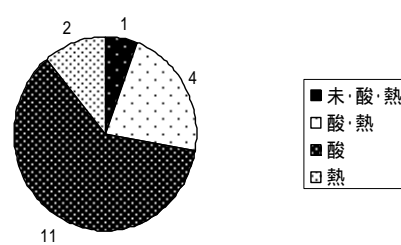
### 冷却遠心条件

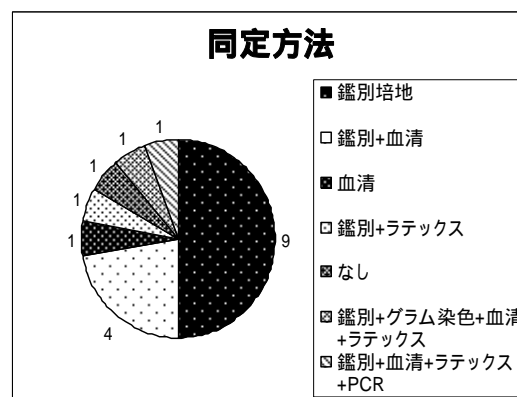
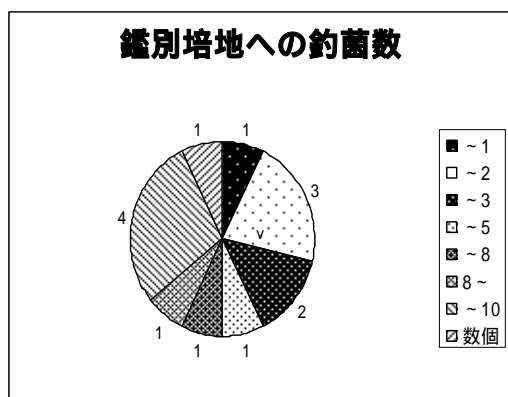
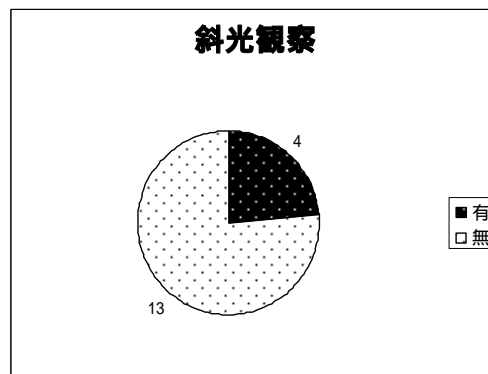
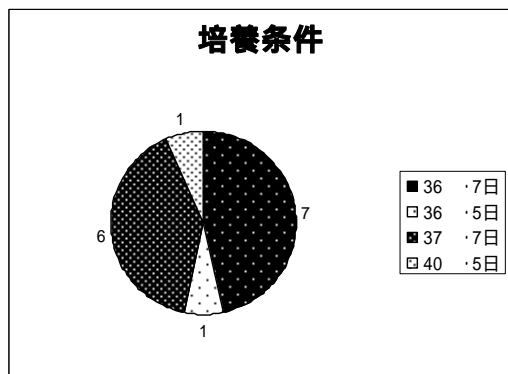
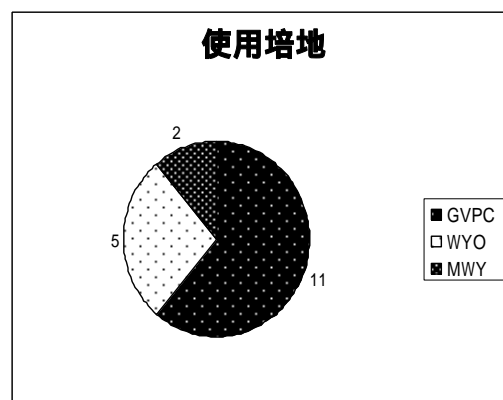
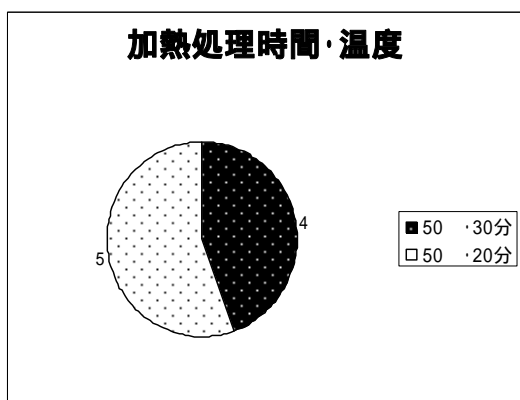
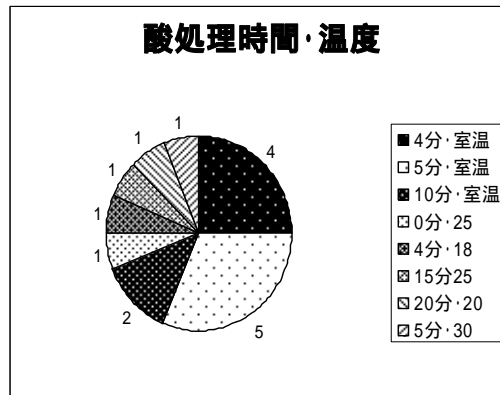
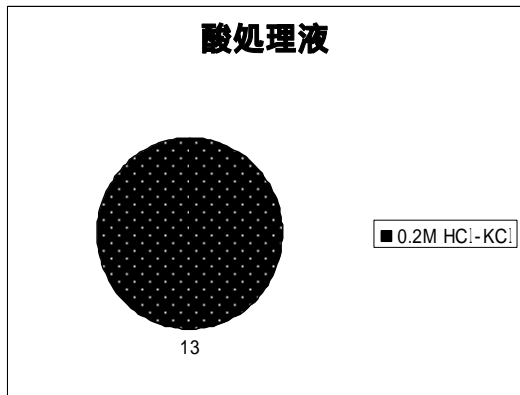


### 濃縮倍率



### 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, 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
大屋日登美、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、古川一郎、前川純子、倉文明、泉山信司、黒木俊郎	医療機関の給水設備におけるレジオネラ属菌の汚染実態	日本感染症学雑誌	92(5)	678-685	2018
Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani J, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M, the Working Group for <i>Legionella</i> in Japan	<i>Legionella pneumophila</i> and other <i>Legionella</i> species from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016.	Appl Environmental Microbiol.	84(18)	pii: e00721-18	2018
倉 文明	講座 環境水からのレジオネラ・宿主アムエバ検出とその制御 3. レジオネラ症の国内外の動向	防菌防黴誌	46(8)	365-76	2018

前川純子	講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 7. レジオネラ属菌の同定法とSBT (Sequence-Based Typing)	防菌防黴誌	47(1)	29-35	2019
杉山寛治	講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 8. 浴槽のレジオネラ対策 浴槽のどこで,どのように増えるのか	防菌防黴誌	47(2)	83-89	2019
杉山寛治	講座 環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 8. 浴槽のレジオネラ対策 浴槽水の各種消毒方法の効果	防菌防黴誌	47(2)	117-123	2019