

研究代表者 前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨： 次亜塩素酸による消毒が困難な2施設の高 pH 温泉および1施設の有機物が含まれている温泉でモノクロロミン消毒が有効であることが確認できた。モノクロロミン消毒下での増殖が問題となっている *Mycobacterium phlei* に対する消毒剤の効果を試験管内で確認したところ、実際は遊離塩素よりモノクロロミンの方が有効であることが示され、高頻度の配管洗浄、高濃度の配管消毒等のバイオフィーム対策を徹底することの重要性が改めて示唆された。過炭酸ナトリウムに助剤を併用することで、薬剤の使用量が従来の3割ですむ新規の配管洗浄方法を開発した。洗浄効果が高く、洗浄後のすすぎの回数も減り、これまでより少ない労力で洗浄することができるようになったので、洗浄頻度が増えることで、有効なバイオフィーム対策となることが期待される。毎日のろ過器逆洗に電解オゾン水供給を組み合わせる方法は、浴槽水の消毒剤濃度を維持しやすくし、継続して逆洗水のレジオネラ属菌を不検出とすることが可能であった。公衆浴場における適切な遊離塩素消毒で、SARS-CoV-2 は短時間に不活化されることが明らかとなった。

遊離塩素により浴槽水が十分に消毒された細菌の状態をフローサイトメトリーで検出することで「清浄」か「細菌増殖」か、5分で判定する迅速評価法を開発し、実証してきたが、モノクロロミン消毒の評価も行えるようになった。本法の共同調査を4つの協力機関で実施して技術の標準化を図った。同法により、オゾンを用いた逆洗方法の有効性を確認した。

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水等について培養検査および迅速検査を行い、レジオネラ属菌による汚染実態を明らかにした。これまで得られた知見から、入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査のガイドラインを作成した。レジオネラ属菌の検出率および病原性との関連が示唆されている *lag-I* 遺伝子の検出率は、地域によって差が認められた。新しい培養検査法であるレジオラート/QT法は、検体の処理や結果の判定が容易で、平板培養法との結果一致率も高いことから、日常の衛生管理に有用な検査法であることが示されたが、3日以前に陽性となった場合、偽陽性である可能性が高いことが分かった。また、検水を加熱処理することで、定性試験も可能となった。モバイル型 qPCR 装置でのレジオネラ属菌の検出率は、プロトコルの改良で感度が LAMP 法と同等になったが、今後現場で活用できるように濃縮法のプロトコルを工夫する必要があると思われた。感染源を特定するためには、環境検体から患者由来株の大半を占める *Legionella pneumophila* 血清群 1 (Lp1) を分離することが重要となるため、Lp1 で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) による選択的濃縮法を検討した。平板培養法と併用することで Lp1 の検出頻度が上昇した。

次世代シーケンサーを用いて浴槽水とシャワー水の菌叢解析を行ったところ、検水の種類によって菌叢が異なっていた。菌叢の多様性が高い検水からレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい条件下でレジオネラ属菌も増殖しやすい可能性がある。次世代シーケンサーを用いて、集団感染事例に由来する Lp 株の SNPs 解析を行った。MLVA 法は施設から検出される菌株の同一性（定着性）や新規性を継続的に調べることができ、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染を調査した。

公衆浴場等の衛生管理を計画的、体系的に行うための体制づくりに資するための総合衛生管理プログラムと、公衆浴場の浴槽並びに関連設備の具体的な衛生管理を記述した一般衛生管理の2つのパートからなる「入浴施設における衛生管理の手引き」を作成した。「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査の手引き」を作成し、研究班のホームページ上に公開した。レジオネラ外部精度管理サーベイの継続実施をサポートし、本研究班からは地方衛生研究所等70～73機関が参加した。「レジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引き」を作成し、検証した。

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
 金谷潤一・富山県衛生研究所主任研究員
 黒木俊郎・岡山理科大学教授
 佐々木麻里・大分県衛生環境研究センター主任研究員
 田栗利紹・長崎県環境保健研究センター部長
 長岡宏美・静岡県環境衛生科学研究所部長
 中西典子・神戸市環境保健研究所研究員
 森 康則・三重県保健環境研究所主査研究員
 森本 洋・北海道立衛生研究所主幹
 柳本恵太・山梨県衛生環境研究所研究員
 淀谷雄亮・川崎市健康安全研究所技術職員

属菌検査方法（以下、標準法）について」の通知（薬生衛発0919第1号）が出されたのは、前研究班（公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究班）を初めとするこれまでのレジオネラ研究班の成果によるものである。本研究班は改正された衛生等管理要領をより実効あるものにするために研究を遂行する（図1）。

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。レジオネラ属菌平板培養は原則として「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法（薬生衛発0919第1号）」に準じた各検査施設の方法で実施した。各研究項目の研究方法をいかに記す。

1. 高pH温泉、有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

高pH温泉水を利用する2施設、有機物を含む温泉を利用する1施設の循環式浴槽について

A. 研究目的

公衆浴場のレジオネラ症対策の向上のためには適切な衛生管理が要求される。そのための消毒法等の開発・評価およびレジオネラ検査法の改善・普及等を行う。令和元年9月に「公衆浴場における衛生等管理要領等」が改正され、また、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ

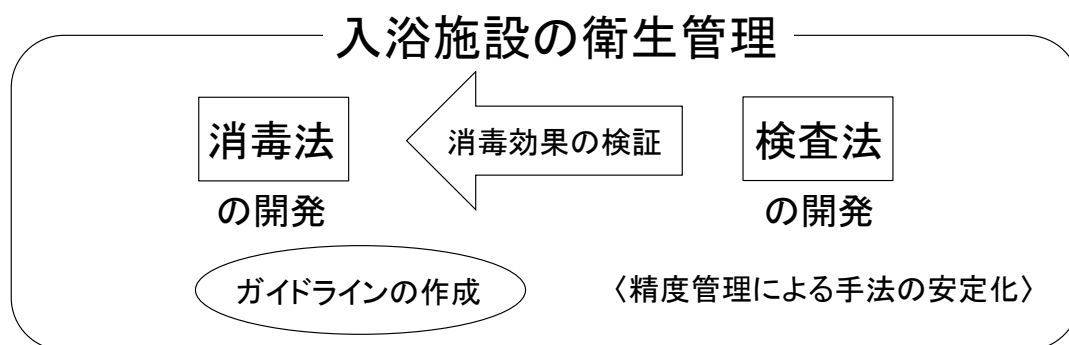


図1 本研究班の研究の流れ

表1

研究協力者一覧

赤地重宏	三重県保健環境研究所	小森正人	株式会社ヤマト	野本竜平	神戸市環境保健研究所
青木信和	ケイ・アイ化成株式会社	蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	花田祐一	アイデックスラボトリーズ株式会社
縣 邦雄	アクアス株式会社	斎藤利明	株式会社ヤマト	久田美子	山梨県衛生環境研究所
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所	茶山忠久	ケイ・アイ化成株式会社	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
磯部順子	富山県衛生研究所	佐藤大輝	三重県保健環境研究所	藤井 明	株式会社ヘルスビューティー
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	塩崎晋啓	日本板硝子株式会社	藤江香予	愛媛県今治保健所
稲窪大治	日本板硝子株式会社	島崎信夫	国際親善総合病院	細川賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
井上浩章	アクアス株式会社	下田貴宗	シモダアメニティ株式会社	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
井原 基	長崎県環境保健研究センター	陳内理生	神奈川県衛生研究所	溝腰朗人	大分県衛生環境研究センター
植松香星	山梨県衛生環境研究所	新道欣也	株式会社お風呂のシンダー	水谷幸仁	日本板硝子株式会社
江川英明	大分県南部保健所	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
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	高野真実	大分県衛生環境研究センター	三津橋和也	北海道立衛生研究所
大市真梨乃	三重県保健環境研究所	高橋直人	静岡市環境保健研究所	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター
大森恵梨子	仙台市衛生研究所	田中 忍	神戸市環境保健研究所	村尾拓哉	日本板硝子株式会社
大森雄貴	山梨県衛生環境研究所	田中孝典	花王株式会社 ハウスホールド研究所	森川 茂	岡山理科大学
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	田中奈緒美	アイデックスラボトリーズ株式会社	森中えりか	株式会社ファスマック
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	田中慶郎	株式会社マルマ	望月映希	山梨県衛生環境研究所
小川恵子	北海道立衛生研究所	鳥井良太	株式会社お風呂のシンダー	山上隆也	山梨県衛生環境研究所
小澤賢介	デンカ株式会社	永井佑樹	三重県保健環境研究所	山口友美	宮城県保健環境センター
木村哲也	株式会社ヤマト	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
倉 文明	国立感染症研究所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	湯澤栄子	川崎市健康安全研究所
小坂浩司	国立保健医療科学院	中臣昌広	日本環境衛生センター	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
小林章人	三重県保健環境研究所	中村麻子	国際親善総合病院	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
小松頌子	神戸市環境保健研究所	成松浩志	大分県衛生環境研究センター		

て、モノクロラミン消毒の実証試験を実施した。モノクロラミン生成装置（クロラクター、ケイ・アイ化成）を用いて、遊離塩素製剤（ケイミックス SP、ケイ・アイ化成）とアンモニウム製剤（レジサイド、ケイ・アイ化成）により用時調製されたモノクロラミン溶液を、循環ろ過系統内に添加した。週1回、完全換水直前に高濃度モノクロラミンで配管を消毒した。採水時に pH および遊離塩素、全塩素、モノクロラミン濃度を測定した。水試料の各種微生物試験は、定法に従い実施した。有機物を含む温泉水については、16S rRNA 遺伝子の定量、同遺伝子の V3/V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンスによる菌叢解析を行った（生物技研）。

2. モノクロラミンと遊離塩素による

Mycobacterium phlei の試験管内不活化試験

アルカリ泉あるいは PBS に浴用水由来の *M. phlei* を添加し、モノクロラミンあるいは遊離塩素を低濃度（約 5 ppm）、中濃度（約 10 ppm）、高濃度（約 20 ppm）の3段階になるよう各々添加した。消毒剤添加後 15 分、30 分、60 分、90 分の菌数を測定した。

3. 省力化洗浄方法の開発と営業施設における実地試験

過炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、酒石酸を混合して量比による洗浄効果の違いを試験管内で検討した。連続培養システム（アート科学社製）中に 15mm×20mm（厚さ 1.5mm）のステンレス製の試験片を設置し、某施設から採取した浴槽水を 40°C で 14 日間循環させてバイオフィルムを発生させた後、試験片を各種洗浄剤 5mL に浸漬し、バイオシェーカーで回転させて洗浄した。蒸留水ですすいだ試験片をクリスタルバイオレットで染色し、吸光度（波長 570 nm）を測定して、残存バイオフィルム量を求め、バイオフィルム除去率を求めた。

4 入浴施設の協力を得て、洗浄試験を実施した。新規の洗浄方法として、浴槽水 1m³ あたり過炭酸ナトリウム 1kg（終濃度 0.1%）にアスコルビン酸 1kg と酒石酸 1kg を助剤として用いた。浴槽水量を循環可能な最低限に減らし、上記の3化合物を同時に浴槽水に添加し、浴槽水を循環させた。60 分後に、1 m³ あたり炭酸ナトリウム 0.5 kg 程を添加して排水可能な pH に調整し、排水後、循環可能な水量まで給水し、1 循環後、すすぎ水に次亜塩素酸ナトリウムまたはモノクロラミンを添加して、対照コントロールの精製水と同じ塩素濃度を示すまで、排水、

すすぎを繰り返した。

従来の洗浄方法として、浴槽水 1 m³あたり過炭酸ナトリウム 6 kg およびクエン酸 4 kg からなる市販の洗浄剤を用いた。新規の方法と同様に、浴槽の水量を循環可能な最低限に減らした後、先にクエン酸を浴槽水に添加して 30 分間循環、次に過炭酸ナトリウムを添加して 90 分間循環した。1 m³あたり亜硫酸ナトリウム 1.2 kg によって過炭酸ナトリウムを中和し、すすぎの工程に移行した。

洗浄前後に、ヘアキャッチャー近傍の配管 2 か所 (5cm×5cm) を拭き取り、ATP 検査および細菌検査を行った。

4. 酸性側モノクロラミン消毒の検討

営業 3 施設の協力を得て、人工炭酸泉の 4 浴槽 (pH はそれぞれ 5.6、5.1、5.0、5.2) で、モノクロラミン生成・注入装置を設置し、モノクロラミン濃度を 3 mg/L 以上に維持する消毒試験を行なった。週 1 回、モノクロラミン濃度 10 mg/L で 2 時間循環させ、配管消毒を実施後、換水した。消毒効果の確認用に浴槽水を換水日前日の夜間に採取した。1 施設の 2 浴槽水については、フローサイトメトリーにより全菌数を測定した。

5. オゾン消毒の検討

スーパー銭湯 1 施設の協力を得て、オゾン供給装置を設置し、毎日のろ過器逆洗前にろ過槽の有効容量分以上の電解オゾン水を自動注入した。週 1 回、オゾン供給前に浴槽水および逆洗水を採水した。

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

フローサイトメーターは、miniPOC (シスメックスパルテック社) を使用した。PI 染色により検水 1 mL の全細菌数 (Total Bacterial Counts, TBC) 、および *Legionella pneumophila* (Lp) 抗体 (FL lp SG1 (V6051, Virostat) と FL ARK_lp (ARK resource) を Alexa fluor 532 protein labelling kit (A10236, Thermo Fisher) で標識し、等量を混合) 染色により、0.2 μm 孔フィルターでろ過濃縮した検水の Lp 数を測定した。消毒効果の判定は、試料中の TBC が判定基準値

1000 counts/mL を越えた場合は「非清浄」とし、続く Lp 定量検査で Lp が検出された場合は生菌と判定した。TBC が 1000 counts/mL に満たない試料は「清浄」と判定し、Lp が検出された場合でも死菌と判定した。モノクロラミン消毒時のフローサイトメトリーの散布図は次亜塩素酸消毒時のものとは異なるため、独自の測定領域を設定し、モノクロラミン消毒効果の判定も行えるようにした。A 研究所において標準作業書とワークシートを作製し、10⁵、10⁴、10³ cells/mL オーダーの Lp NIIB0058 株菌液および市販品の IDEXX-QC *Legionella pneumophila* (98-0009287-00, IDEXX) を用いたグルタルアルデヒド固定模擬試料を作製した。B~D 研究所協力者の技術研修を行った後に、A 研究所で動作確認した機器、準備した模擬試料を配布した。添加回収試験は、500 倍希釈した Lp 模擬試料を標準作業書にしたがって処理し、Lp 数を測定した。

実検体の調査は、主に循環ろ過式浴槽水を対象とし、一部かけ流し式浴槽水、貯湯タンク水および水風呂が含まれた。A 研究所では遊離塩素管理の 93 検体、モノクロラミン管理 28 検体、B 研究所は遊離塩素管理 29 検体、C 研究所は遊離塩素管理等 (二酸化塩素管理含む) 55 検体、モノクロラミン管理 6 検体、D 研究所では遊離塩素管理の 90 検体について、作業書に則ってフローサイトメーターで全菌数と Lp 数を測定した。Lp 培養は各研究所の方法で行った。

循環ろ過式浴槽のろ過器にオゾンを用いた逆洗消毒の有用性評価研究 (上記、5. オゾン消毒の検討) において逆洗水の全細菌数 (TBC) と Lp 数をフローサイトメーターで測定した。並行して、レジオネラ遺伝子検査 (CycleavePCR *Legionella* Detection Kit, CY240, Takara-bio) 、レジオラート/QT (IDEXX) 検査、レジオネラ培養検査を実施した。

7. 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT 法の有効性の検討

基礎的検討として、BCYE α 寒天培地に塗布し増菌した *L. pneumophila* SGUT の菌株について、滅菌水で 10 倍ごとの希釈系列を作成し、平板培養法及びレジオラート/QT 法を行った。3

施設において同一ロットの IDEXX-QC *Legionella pneumophila* を用いてレジオラート/QT 法及び平板培養法を実施し、得られた検出菌数を製品情報と比較するとともに検査室間の検出菌数を比較した。

公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 599 検体を対象として、レジオラート/QT 法を実施した。本法は飲料水用 10 mL プロトコールに従い実施し、most probable number (MPN) 値を求めた。頻回に観察して、ウェルの液体培地が変色して陽性となった日を記録した。陽性ウェルの液体培地をレジオネラ属菌選択分離培地に塗抹し、分離菌はシステイン要求性又は免疫血清により同定を行った。同時に平板培養法にて検体よりレジオネラ属菌を分離し、LAMP 法又はリアルタイム PCR 法によりレジオネラ属菌の遺伝子検出を実施した。レジオラート/QT 法で陽性と判定されたものの、ウェルの液体培地を塗布した GVPC α 寒天培地上でレジオネラ属菌が検出できなかった一部検体について、発育したコロニーから遺伝子を抽出し、16S rDNA により菌種を同定した。また、同定した菌についてレジオラート/QT 法で陽性を示すか確認した。

8. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法の評価、レジオラートを用いた定性試験法の検討、比色系パルサー法の改良

令和元年 5 月から令和 3 年 11 月に搬入された浴槽水および湯口水 75 施設分 144 検体を対象とし、標準法に準じて濃縮、前処理を行い、大分法と標準法で平板培養を実施した。

レジオラート定性試験法として、非濃縮の 58 検体（令和 3 年採水分）の各試料 10 mL を 50°C 水浴中で 20 分間加熱処理して、レジオラート液（レジオラート 1 包（100 mL 用）を 80 mL の滅菌蒸留水に溶かした溶液）40mL が入ったペントフィルター付きフラスコ（CELLSTAR フラスコ Advanced TC、青 FT キャップ 250 mL 滅菌：Greiner Bio-One）に加え、36°C で 7 日間培養し、茶色化または濁りの一方か両方が見られたものを陽性とした。陽性のフラスコから採取した培養液を GVPC 寒天培地に画線塗抹し、レジ

オネラ属菌の分離同定を行った。

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

9. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

8 か所の地方衛生研究所（機関 A～H）において、2016 年以降に公衆浴場などから採水した試料を用いた。試料は、浴槽水、シャワー水、カラン水、採暖槽水、プール水であった。平板培養を実施し、分離された *L. pneumophila* 血清群 1 (Lp1) 株については、*lag-1* 遺伝子を検出する PCR を施行した。迅速検査として、LAMP 法、LC EMA-qPCR 法、PALSAR 法、モバイル qPCR 法を実施した。Lp で感作した免疫磁気ビーズ（Lp-IMB）を用いた選択的濃縮法を実施した。

16S アンプリコン解析は、令和元年～2 年度に採水した浴槽水 59 検体およびシャワー水 34 検体について実施した。検水 1,200 mL をフィルターろ過し（ポリカーボネート、0.22 μm 、47 mm）、ビーズでフィルターを破碎後、Dneasy PowerBiofilm Kit（キアゲン）を用いて DNA を抽出した。イルミナ社のプロトコールに従い、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 RUN を実施し、QIIME2 で解析した。

10. 入浴施設における衛生管理の手引きおよび公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査の手引きの作成

研究班の分担研究者及び研究協力者で構成す

る2つのワーキンググループを形成し、検討した。

「入浴施設における衛生管理の手引き」の総合衛生管理のパートは、平成16～18年度厚生労働科学研究費補助金健康総合科学研究事業「循環式浴槽における浴水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」の分担研究報告書「HACCPシステムの導入を伴う循環式浴槽の管理について」並びに米国CDCが発行した”Toolkit: developing a water management program to reduce *Legionella* growth and spread in buildings”を参考にした。一般的衛生管理のパートは、「公衆浴場における衛生等管理要領」及び「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」に基づいて、衛生管理方法の検討を行い、その内容を記載した。

「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査の手引き」は、大分県においてレジオネラ症に関する調査に用いられている対応要領を基に、腸管出血性大腸菌感染症等に対する調査マニュアルの調査手法を取り入れて、「入浴施設におけるレジオネラ症防止のための日常的な維持管理指針」（平成26年3月第2版発行；NPO法人入浴施設衛生管理推進協議会、大分県監修）、「レジオネラ症防止指針 第4版」（公益財団法人日本建築衛生管理教育センター）等を参考に検討した。

両案を研究班の分担研究者及び研究協力者に配付するとともに、所属する自治体の環境衛生担当者や感染症担当者に提示し、項目・内容・使い勝手等に対する意見を求めた。ワーキンググループでは寄せられた意見に基づいてガイドライン案の内容を修正した。

令和3年度は、「入浴施設における衛生管理の手引き（案）」については研究班の分担研究者及び研究協力者並びに全国の衛生研究所を有する自治体の環境衛生担当者に配付し、試験的に使用した感想や意見を募った。集められた意見を参考にしてワーキンググループで修正した。「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査の手引き（案）」については研究班の分担研究者及び研究協力者から意見を募

り、それらに基づいて修正した。

11. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

MLVAのprimer評価はLp1菌株439株を対象として、Sobralら（AEM, 77:6899, 2011）によって報告されたMLVAの12領域のうち7領域についてフラグメントが得られなかった菌株について、Pourcelら（JCM, 45:1190, 2007）によるprimerを2nd primerとしてMLVA解析を行った。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。全ゲノム解析は、QIAseqFX(QIAGEN)を用いてDNAライブラリを調製し、Miseq regent Kit v.3を用いてリードデータを取得した。A5-Miseqでアセンブリし、PROKKAでアノテーションを行った。全ゲノム配列による系統解析にはkSNP3を用いて解析した。完全長ゲノム配列は、MinION (Nanopore社)から得られたロングリードとMiseqのショートリードデータをUnicyclerによりHybrid assemblyして決定した。

12. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

2015年から実施されている外部精度管理は、実施母体を日水製薬株式会社とし、レジオネラ属菌配付試料として、シスメックス・ビオメリュー社のBioBall（特注品）を使用する。令和3年度から供試菌株が*L. pneumophila* ACM 5197から、*L. pneumophila* NCTC 11986に変更された。令和元年度161機関（延べ164試料配付）、令和2年度171機関（延べ180試料配付）、令和3年度184機関（延べ191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令和元年度73機関、令和2年度72機関、令和3年度70機関が参加した。配付試料を受け取った各機関は、50 mLの滅菌生理食塩水に懸濁混和した「非濃縮試料①」と、そこから試験用に1 mL分取した残りにさらに441 mLの滅菌生理食塩水を加え、混和した「非濃縮試料②」、さらに各機関が行なっているろ過濃縮、あるいは遠心濃縮を実施して得られる「濃縮試料」について、それ

ぞれレジオネラ分離培地 5 枚に 100 μ L ずつ塗布し、各試料中のレジオネラ菌数を算出した。目標回収率は 20%以上 100%未満とした。

浴用水やシャワー水などの環境水試料を濃縮し、レジオネラ属菌を検出する手順の内部精度管理のための手引きを作成した。研究班の構成メンバーに対し、手引きに従った内部精度管理の試行を依頼したところ、令和 3 年度に計 10 機関で内部精度管理が実施された。

13. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

令和 2 年度は、低濃度の次亜塩素酸ナトリウムあるいはモノクロラミンの SARS-CoV-2 ウイルスと FeCoV-2 に対する効果を評価した。ウイルス液を PBS で 100 倍に希釈し、その 1 mL に予め決定しておいた 0.1~0.2 mg/L となるのに必要な量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えて 25°C あるいは 41°C で 1、5、10 及び 20 分間曝露した。モノクロラミンについては、結合塩素濃度が 1、3、6 mg/L になるように PBS で希釈したモノクロラミン液 1 mL に 10 μ L のウイルス液を加え、1、5 及び 10 分間曝露した。曝露後に直ちに 0.1M チオ硫酸ナトリウムで中和し、1% FCS 加 D-MEM 培地 (SARS-CoV-2) または 5% FCS 加 D-MEM 培地 (FeCoV-2) で 10 倍段階希釈し、感受性細胞 (SARS-CoV-2 は VeroE6/TMPRSS2 細胞 ; FeCoV-2 は fcwf-4 細胞) に接種し、5%CO₂ 下、37°C で 4 日間 (SARS-CoV-2) あるいは 2 日間 (FeCoV-2) 培養した。

令和 3 年度は、SARS-CoV-2 ウイルスを Vero E6/TMPRSS2 細胞を用いて fetal calf serum (FCS) 非添加 D-MEM 培地 (高グルコース) (L-グルタミン、フェノールレッド不含) (富士フィルム和光純薬) に L-グルタミンを添加した培地で 5%CO₂ 下、37°C で CPE が 80%になるまで培養し、培養上清を 3,000 rpm, 10 min 遠心し、PD-10 脱塩カラム (Sigma-Aldrich) でゲルろ過して生理食塩水に置換したのちに -80°C に保存したものをウイルス液として用いた。関東、北陸、四国及び九州地区の温泉水を実験に用いた。温泉水の試料 9 mL に対してウイルス液 1 mL を加えた実験液に次亜塩素酸ナトリウム液を加え、所定

の遊離残留塩素濃度 (0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L) となるのに必要な次亜塩素酸ナトリウム液の量を決めた。ウイルス液 100 μ L に上記で決定した所定量の次亜塩素酸ナトリウム液を加えた浴槽水 900 μ L を加えて、25°C で 5 分間曝露した後、0.1M チオ硫酸ナトリウムを加えて塩素を中和し、10 倍量の 1%FCS 加 D-MEM 培地で 10⁷ まで 10 倍段階希釈し、各希釈段階の液 40 μ L を VeroE6/TMPRSS2 細胞を培養した 96 ウェルプレート の 4 ウェルずつに接種し、5%CO₂ 下、37°C で 4 日間培養した。

各ウェルの細胞変性を観察し、TCID₅₀ (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量) を計算し、未処理群と比較し生存率を求め、100-生存率 (%) を不活化率として算出した。

14. 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および次世代シークエンサーを用いたレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

緊急事態宣言により約 1 か月休業した神奈川県内の入浴施設において、2020 年 5 月の営業再開前日、再開後の 7 月、9 月、11 月に 2 つの浴室の浴槽水、湯口水、カラン並びにシャワーの温水及び地下タンクと高置タンクの温水を採取、10 月にはカランから給水系のみを採取した。2019 年と 2021 年には 9 月と 10 月のそれぞれ 1 回採取を行った。神奈川県内の 1 医療機関において、2019 年 9 月、2020 年 10 月、および 2021 年 7 月に、地下控室 1 か所、倉庫内 1 か所、病室洗面台 4 か所の洗面台等の蛇口水を放水直後及び 3L 流水後に採取し、その間に自動排水装置を設置した 4 か所については 2021 年 8 月および同 9 月にも採取した。採取した検水について、レジオネラ属菌分離培養・遺伝子検査、遊離残留塩素濃度の測定を行った。分離されたレジオネラ属菌は PCR 法およびレジオネラ免疫血清により同定した。

レジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した入浴施設から分離された Lp (SG1: 8 株、SG6: 5 株) 株および 2015 年に神奈川県内の 1 入浴施設で発生したレジオネラ症集団事例 (患者 7 名) において、4 名の患者および 2 つの浴槽水から分離された Lp (SG1: 8 株、SG13: 3 株) 株を供試

して、DNA を抽出し、SBT 解析、SNPs 解析を行った。SNPs 解析については、QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN)を用いてライブラリを調製し、iSeq100 System (illumina)によりリードデータを得た。入浴施設から分離された株に対するレファレンス配列は Philadelphia 1 (アクセッション番号: AE017354) とし、集団感染事例株については、Corby (アクセッション番号: CP000675) をレファレンス配列として、マッピングは Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>)を用いて、SNPs の抽出は Genome Analysis Toolkit (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>)を用いた。抽出した SNPs を CLC Genomics Work-bench (QIAGEN)を用いてアライメントし、比較した。(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 高 pH 温泉、有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

いずれの施設とも、モノクロラミン濃度は安定に推移し、レジオネラ、自由生活アメーバ、大腸菌群は陰性であったが、従属栄養細菌数の増加が確認された。有機物を含む温泉における菌叢解析の結果は *Methylomonas* 属菌、*Cloacibacterium* 属菌が優占菌種で、*Mycobacterium phlei* はモノクロラミン消毒時に減少傾向にあった。

2. モノクロラミンと遊離塩素による

Mycobacterium phlei の試験管内不活化試験

PBS における *M. phlei* の 3-Log 不活化に必要な CT 値は、モノクロラミンがおおよそ 500 mg/L・min であるのに対し、遊離塩素はおおよそ 1,200 mg/L・min となった。アルカリ泉中では、モノクロラミンの *M. phlei* の 3-Log 不活化の CT 値はおおよそ 800 mg/L・min であったのに対し、

遊離塩素は 1-Log 不活化でも CT 値はおおよそ 2,000 mg/L・min が必要であった

3. 省力化洗浄方法の開発と営業施設における実地試験

試験管内で洗浄条件を検討した結果、過炭酸ナトリウムにアスコルビン酸と酒石酸をそれぞれ 0.1%となるよう等量で混合した場合、バイオフィルムの除去率は 80 ないし 90%程度と従来法を上回ることができた。薬剤の重量が従来法の 3 割となった。4 浴場施設で新規の洗浄方法を実施したところ、配管内部およびろ過器内部のふき取りにおいて、ATP 値、一般細菌数、従属栄養細菌数の減少が見られ、高い洗浄効果を示した。すすぎは 1-3 回で完了した。

4. 酸性側モノクロラミン消毒の検討

いずれの浴槽水も、全塩素濃度は試験期間を通じて 3mg/L 以上と安定して維持されており、レジオネラ属菌、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌群の検出はなかった。一部浴槽水についての消毒効果を判定するフローサイトメトリーによる全菌数測定結果は、1,000 counts/mL 未満となり、「清浄」と判定された。

5. オゾン消毒の検討

オゾン利用前は、浴槽水で 10~60 CFU/100 mL、逆流水で 30~330 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出されていた。水質測定開始後 56 日目のオゾン供給開始当初は、電解オゾン水の供給量を 10 L/min で 10 min (100 L)としたが、63 日目の逆流水からレジオネラ属菌が 240 CFU/100 mL 検出されたため、66 日目の配管洗浄を挟んで、77 日目より電解オゾン水の供給量を 10 L/min で 20 min (200 L)と倍に増やした。それ以降は、91 日目に浴槽水のレジオネラ属菌 10 CFU/100 mL が検出された以外は、2 か月以上継続して不検出であった。この検出は、生物膜の塊を偶然に測定したと考えられた。逆流水のレジオネラ属菌は、オゾン利用中の約 3 か月間不検出であった。浴槽中の残留塩素濃度は増加傾向となった。一般細菌は $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL から、 $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL 程度まで減少した。

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

4 研究所で実施した添加回収実験の回収率は

概ね 80-130%と良好だった。培養法と比較した実検体における消毒効果判定結果の感度と特異度は研究所間でばらつきがあったが、全体で感度 83.1%、特異度 79.6% (N=267) と一定の成果が認められた。レジオネラ以外の細菌が多いと推察される貯湯タンク水や水風呂等の検体では偽陽性が多かった。一部の検体では計測障害と考えられる現象があり前処理（ビーズによる粉碎と超音波処理）による改善が認められた。

モノクロラミン消毒下の 28 サンプルの浴槽水について、「清浄」と判定された 19 浴槽からは培養法においてもレジオネラ属菌は検出されなかった。「細菌増殖」と判定された 9 浴槽からも培養法でレジオネラ属菌は検出されず、レジオネラ属菌遺伝子と Lp 細胞数は「清浄」と判定された検体と有意差はなかったが、BCYE α 培地表面に中程度～大量の細菌が確認され、*Mycobacterium phlei* と同定された。

循環式浴槽のろ過器の配管洗浄かつオゾン強化の前後で TBC を比較したところ、処理前の平均値 (\pm 標準偏差、試料数 N) は、446,163 (\pm 306,659、N=10) counts/mL に対して、処理後が 71,693 (\pm 137,891、N=16) counts/mL となり、有意差を認めた (t 検定, $p=0.004$)。

7. 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT 法の有効性の検討

L. pneumophila SGUT の菌株について、10 倍ごとの希釈系列を作成し、平板培養法及びレジオラート/QT 法を行ったところ、レジオラート/QT 法における検出菌量は、平板培養法とほぼ同等で、平板培養法と同様に概ね 10 倍ごと段階的に減少していった。精度管理品を用いた 3 検査施設間におけるレジオラート/QT 法の検査精度の比較検討を実施したところ、全施設で許容範囲内の値が得られ、本法の安定性が確認できた。実検体 (N=599) におけるレジオラート/QT 法と平板培養法の結果一致率は 83.6% と高かった。両法で陽性であった 136 検体の検出菌量について相関を検討したところ、回帰直線の R^2 は 0.748 となり、強い相関が認められた。頻りに観察して陽性となった日を記録した 80 検体 (7 日間培養) のうち、20 検体は培養 3 日目

ウェルの変色が確認され、培養 5 日目までには 70 検体の変色が確認された。2 日目で変色が見られた 2 検体のレジオラート培養液からはレジオネラ属菌が検出されず、平板培養法不検出かつ LAMP 法陰性であったため、偽陽性と考えられた。レジオラート/QT 法及び平板培養法で結果が不一致であった 98 検体のうち 73 検体が、検出菌量が 30 MPN 又は CFU/100 mL 未満であった。

レジオラート/QT 法のみ陽性であった 37 検体中 17 検体でレジオラート培養液から *L. pneumophila* が検出された。*L. pneumophila* が検出されなかった 4 検体において、培地上で発育が見られたコロニーから遺伝子抽出し、16S rDNA の塩基配列により同定したところ、それぞれ *Brevundimonas naejangsanensis*、*Pseudomonas otitidis*、*Pseudomonas* sp.、*Aeromonas hydrophila* であった。これら単離した菌株をそれぞれ滅菌水に懸濁し、レジオラート/QT 法を実施したところ、茶色の発色を示し、陽性反応が見られた。

8. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法の評価、レジオラートを用いた定性試験法の検討、比色系パルサー法の改良

平板培養の結果は、大分法では 144 検体中 62 検体、標準法では 56 検体からレジオネラ属菌が検出された。3 検体は非濃縮検体のみからレジオネラ属菌が検出された。レジオネラ属菌数は、大分法と標準法でそれぞれ 5~44500、10~31500 (濃縮試料のみでは 10~16640) CFU/100mL であった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.8541$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8579$ であった。検体を加熱処理後にレジオラート定性試験法を行ったところ、58 検体中 13 検体が陽性と判定された。うち、11 検体の培養液から Lp が分離された。レジオラート定性試験法と平板培養法の検出/不検出の一致率は大分法で 87.9% (10 以上検出された検体に限ると 93.1%)、標準法で 91.4% と高かった。

比色系パルサー法については、使用したセルロース混合エステルフィルターの孔径が 0.45 μm (14/17 検体が陽性) でも、0.22 μm (12/17 検体

が陽性)と同等以上の結果となった。保健所で実施した4検体は2検体が陽性となった。

9. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

318検体中、78検体(24.5%)から10 CFU/100 ml以上のレジオネラ属菌が検出された。10~99 CFU/100 mlが52検体(16.4%)、100~999 CFU/100 mlが19検体(6.0%)、1,000 CFU/100 ml以上が7検体(2.2%)であった。血清群別の結果、Lp6が38検体から分離され、最も多かった。次に多かったのは、Lp1(28検体)であった。また、Lp以外の菌種が12検体から分離された。

PALSAR法において、シャワー・カラン水を対象とした場合、浴槽水などを対象とした場合と比較し、感度が低かったが、MWY液体培地で一晚増菌する方法で、平板培養法に対する感度が100%となった。

モバイル型qPCR装置を使用した迅速検査法は、これまでのプロトコルを改良した結果、平板培養法に対する感度はLAMP法と同等となった。カットオフ値を40に設定すると偽陽性検体を減らすことができた。LC EMA-qPCR法は、Lysis Buffer for *Legionella* Type2を用いた場合、平板培養法に対する感度(91.2%)、特異度(78.3%)、陽性的中率(55.4%)、陰性的中率(96.8%)、一致率(81.2%)の全てにおいて、NucleoSpin Tissue および Lysis Buffer for *Legionella*を用いた方法と比較し、最も高かった。平板培養法に加えて、Lp1で感作した免疫磁気ビーズ(Lp1-IMB)法を併用すると、検出率が7.8%(18/230検体)から11.3%(26/230検体)となった。

8か所の地方衛生研究所において、2016~2020年に浴槽水から分離されたレジオネラ属菌の検出状況を調査した結果、レジオネラ属菌の陽性率は11.5~75.0%と機関によって差があった。Lp1陽性率は0~12.6%、Lp1の病原性との関連が示唆されている*lag-1*遺伝子陽性率も0.3~4.4%と機関によって差があった。分離されたLp1菌株に占める*lag-1*遺伝子の陽性率(*lag-1*/Lp1)も、7.7%~50.0%と機関によって差が

あった。

16Sアンプリコン解析の結果、各検体に占める菌種別リード割合の平均値は、浴槽水検体では*Pseudomonas*(14.5%)、シャワー水検体では*Phreatobacter*(15.1%)が最も高かった。レジオネラ属菌のリードの割合は、浴槽水検体では0.8%、シャワー水検体では0.1%であった。

また、これまで得られた知見から、入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査のガイドラインを作成し、研究班のホームページに掲載した(<https://sites.google.com/view/legionella-resgr/>)。

10. 入浴施設における衛生管理の手引きおよび公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査の手引きの作成

レジオネラ属菌による汚染を防ぐために衛生管理を計画的に実施し、その効果を評価して向上・改善する体制を確立するための総合衛生管理プログラムと、浴槽並びに関連設備の具体的な衛生管理を記述した一般衛生管理の2つのパートからなる「入浴施設における衛生管理の手引き」を作成した。一般衛生管理のパートは、具体的な管理方法を記述し、図を多用した。

「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査の手引き」は、本文に患者調査票、施設調査票、施設調査必要物品チェックリストを加えて構成した。また、レジオネラ症が弧発事例であっても集団発生であっても第一報からの調査方法に違いはなく、弧発事例であっても詳細な施設調査を行う場合もあるため、当初は、「公衆浴場等入浴施設を原因とするレジオネラ症集団発生時調査ガイドライン(案)」としていたものを「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査の手引き」に名称変更し、研究班のホームページで公開した

(<https://sites.google.com/view/legionella-resgr/>)。

11. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

439株のMLVAプロファイル中で、増幅されなかった領域が、のべ115あったが、2nd primerにより、そのうち79領域が増幅され、MLVA

型が確定できる株が増えた。

PFGE、MLVA、SBT で相違が見いだされた集団事例に由来する株について、ゲノム系統解析の結果と各分子疫学手法の解析結果との比較検討を行った。その結果、コアゲノム SNPs 解析に基づいた系統樹は、PFGE、SBT、MLVA の結果と矛盾がなく、SNP 数 300 個程度までの菌株が、各分子疫学手法で clonal complex として認識されると考えられた。

昨年の緊急事態宣言後に営業再開した 3 施設において 10,000 CFU/100 mL 以上の Lp が検出された。MLVA 型別を行い、平成 24 年からの継続的なモニタリング検査で当該施設から分離されている菌株の MLVA 型と比較した。2 施設の菌株の MLVA 型は、過去にそれぞれの施設から分離されていた株の MLVA 型の 1 つと一致した。1 施設で分離された 2 株のうち、1 株は過去に分離されたものと同じ MLVA 型であったが、もう 1 株は初めての MLVA 型であった。

ゲノムデータを利用した SBT の解析フローを構築した。リードデータのマッピングによる解析手法として SRST2 (<https://github.com/katholt/srst2>) を、アセンブリしたドラフトゲノム配列から ST を決定する手法として Legsta (<https://github.com/tseemann/legsta>) を、更に mompS が正確に決定できなかった場合に利用するツール (<https://github.com/bioinfo-core-BGU/mompS>) の 3 種類を提案した。それぞれの SBT データベースを最新のものに更新し、特に SRST2 については SBT を解析するための条件を最適化し、ツールのインストール方法も含めた汎用的なマニュアルを作成して協力機関に提供した。

12. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

外部精度管理に 7 年連続で参加した機関は 43 機関あった。菌数、回収率ともに良好範囲外を報告している機関は、特定の機関に偏る傾向があった。令和元年度には外部精度管理において不安定な結果を複数回報告していた 3 機関に対し技術指導を行い、一定の成果が得られた。令和 2-3 年度は、コロナ禍の影響により技術指導が行えなかった。

令和 3 年度に 10 機関で内部精度管理が実施された。選択分離培地で測定した接種菌数は非選択分離培地で測定した接種菌数のおよそ 7 割で、培地の種類（メーカー）による大きな差は認められなかった。非選択培地で求めた接種菌数（A）に対する非選択分離培地における回収率（B/A）は、10.8～151.6%、平均 64.8%、中央値 71.0%であった。これに対し、選択分離培地での回収率（B/A）は、1.3～78.0%、平均 35.7%、中央値 31.9%と、低くなった。いずれの分離培地でも添加菌数が多くなるにつれ、回収率が高くなる傾向であった。

13. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

PBS 中での SARS-CoV-2 の次亜塩素酸ナトリウムとモノクロラミンによる消毒の効果を調べたところ、25°C で、次亜塩素酸ナトリウムの遊離塩素濃度が 0.1mg/L では 20 分後に検出限界未満（99.99%以上）まで不活化され、0.13mg/L では 1 分で検出限界未満（99.99%以上）まで不活化された。さらに、41°C では 0.10mg/L、0.11mg/L で 5 分後に検出限界未満（99.99%以上）まで不活化された。FeCoV-2 は、0.16mg/L で 5 分後に検出限界未満（98.89%以上）まで不活化された。

関東、北陸、四国及び九州地区の温泉水 5 検体のうち、3 検体（北陸地区由来 2 検体、九州地区由来 1 検体）は次亜塩素酸ナトリウムを用いて遊離残留塩素濃度を所定の濃度（0.4 mg/L、1.0 mg/L）に設定することができなかったため、関東及び四国地区の入浴施設の浴槽水を用いて次亜塩素酸ナトリウムによる残留塩素の SARS-CoV-2 ウイルスに対する効果を調べた。遊離残留塩素濃度が 0.4 mg/L と 1.0 mg/L の場合の不活化率は関東地区の入浴施設の浴槽水では 96.8%（不活化度 $10^{-1.5}$ ）及び >99.9%（不活化度 $<10^{-4.7}$ ；検出限界未満まで不活化）、四国地区の入浴施設の浴槽水では 99.5%（不活化度 $10^{-2.3}$ ）及び >99.9%（不活化度 $<10^{-4.0}$ ；検出限界未満まで不活化）であった。入浴施設の浴槽水の通常の遊離残留塩素濃度であれば、SARS-CoV-2 は 4 分程度の時間でほとんど不活化され

ることが示された。

14. 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および次世代シークエンサーを用いたレジオネラ属菌の分子疫学的解析法の検討

2015年からレジオネラ属菌の汚染実態調査を継続している神奈川県内の1入浴施設において、2015～2018年度には調査対象である8カ所中5カ所から最大3,000 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されていた。この間に、不要配管の切除や次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置などの対策を実施した結果、2019年度の調査では、10～200 CFU/100 mLのレジオネラ属菌の検出となった。さらに、2020年度の新型コロナウイルス感染症に伴う緊急事態宣言に基づく休業期間における衛生管理を経て、2021年度には1カ所から20 CFU/100 mLの *L. pneumophila* SG6が検出されるのみとなった。

1医療機関を継続して調査しており、これまで塩素添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシング、一部蛇口においてはフラッシングを定期的に行う自動排水装置の導入などの対策を実施してきた。一部蛇口からレジオネラ属菌が検出されたものの20 CFU/100 mLと少ない菌数であった。

次世代シークエンサーによる分子疫学的解析法の検討として、入浴施設において分離されたレジオネラ属菌のSNPs解析および2015年に発生したレジオネラ症集団事例のSNPs解析を実施した。入浴施設分離株のSBT解析では同じSequence Type (ST) とされた複数の菌株において、SNPs解析でも同一もしくは数SNPsの違いであった。これらの菌株には、この施設において、一年以上にわたり検出されているものや、異なる浴室から検出されたものが含まれていた。集団事例の株を用いたSNPs解析では、この集団事例は遺伝的関連のある2タイプの *L. pneumophila* SG1と1タイプの *L. pneumophila* SG13によって引き起こされた可能性が明らかとなった。

D. 考察

3年間の研究実施機関のうち、後ろ2年間は新型コロナウイルス感染症蔓延下での研究遂行となり、現地調査、消毒実験、研修等の実施が一部困難となったが、その一方で、入浴施設の長期休業がレジオネラ汚染に与えた影響の調査や、新型コロナウイルスへの消毒効果の確認等、新たに設定された研究を行うことができた。班会議や関連会議は滞りなくwebで行われた。

本研究期間を通じた実証試験により、令和元年に発出された「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」が定期的な水質検査に適した方法であることが確認できた。併せて実施するよう明記された非濃縮検体の検査の重要性も示された。

次亜塩素酸による消毒が困難な高pH温泉で有効であるモノクロラミン消毒実施例を積み重ねることができた。有機物が含まれている温泉においてもレジオネラの抑制が可能であったが、いずれの温泉でも、従属栄養細菌への対策は必要であると考えられた。従属栄養細菌対策の基礎データ取得のため、*M. phlei* に対する消毒剤の効果を緩衝液中で試験したところ、遊離塩素よりモノクロラミンの方が有効であった。アルカリ泉ではその優位性がさらに顕著であった。実地のモノクロラミン消毒下で *M. phlei* が増加する理由を推測すると、*M. phlei* はバイオフィーム中にあることで、モノクロラミン消毒に対する抵抗性を発揮しているものと考えられた。モノクロラミン消毒で *M. phlei* を制御するには、こまめな浴槽清掃はもとより、配管洗浄、高頻度の高濃度消毒等のバイオフィーム対策を徹底することの必要性が改めて示唆された。ろ過器や配管は、ブラシを使った物理的な洗浄ができず、過酸化水素や過炭酸ナトリウムを使用した化学的な洗浄が行われている。これらの物質は劇物や危険物としての管理を要し、多量の薬剤を使った定期的かつ頻回の洗浄は容易ではない。そこで、使用する薬剤量の低減を目的として、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法を開発した。その結果、薬剤の使用量が重量にして従来の3割と低減し、9

割以上の微生物が除去される洗浄効果も確認された。洗浄後のすすぎの回数も多くなく、これまでより少ない労力で洗浄することが可能となった。この方法により、洗浄頻度と衛生状態の向上が期待される。

人工炭酸温泉において、モノクロミン消毒下でレジオネラ属菌、一般細菌数、大腸菌群数のみならず、従属栄養細菌の検出もみられなかった。これまでは酸性の浴槽水に対してモノクロミン消毒を積極的に応用することがなかったが、トリハロメタン等の消毒副生成物が生じず、アンモニア等の存在下でも濃度の制御がしやすく、塩素臭が抑えられるといった利点からも、アルカリに限らず酸性側の浴槽水においても、モノクロミン消毒の利用が有用と考えられた。人工炭酸泉に溶存している 1,000 mg/L を超える炭酸ガスと消毒剤の相乗効果が細菌増殖を抑制した可能性もあり、今後の検証が待たれる。

高い酸化力を有するオゾンによる温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験を実施した。毎日のろ過器逆洗前に、電解オゾン水を自動注入するシステムを構築したところ、オゾン漏洩のリスクがほとんど無く、ろ過器を清浄化させ、浴槽水の消毒剤濃度を維持しやすくし、継続して逆洗水のレジオネラ属菌を不検出とすることが可能であった。

オゾンによる逆洗の効果は、レジオネラ汚染の迅速検出法の一つとして開発したフローサイトメトリー法によっても確認することができた。モノクロミン消毒下で増殖する従属栄養細菌は本法で迅速に検知できることが明らかになった。本法を 4 機関で実施して技術の標準化を図ることができた。今後は、検査の迅速性を利用して、施設衛生管理者等との対話に活用するなど現地への適用方法を検討し、技術の普及に努める。

ヒトから検出されるレジオネラ属菌のほとんどを占め公衆衛生上重要な菌種である Lp を選択的に検出・定量できるレジオラート/QT 法は、検体の濃縮工程や菌の確定試験が不要であるため、検体の処理や結果の判定が容易で、検査者の手技による差異が生じにくいと考えられ

る。検査精度試薬の使用はその確認に有用であった。平板培養法との結果一致率が高かったことから、本法は、日常の衛生管理に非常に有用な検査法と考えられた。本法は 7 日間培養して、液体培地の変色で陽性を確認するが、培養 3 日目以前にウェルの変色が確認される場合は偽陽性である可能性が高いことが判明し、2 日目までの検体の確認が偽陽性の低減に有効であることがわかった。また、検体を 50°C で 20 分間加熱し、培養温度を検討の結果、36°C とすることで、定量検査のためには必要な高価な専用トレイとシーラーを使用しない定性検査法を確立することができた。

モバイル型 qPCR 装置を使用した迅速検査法の検討では、プロトコルを改良した結果、LAMP 法と同等の感度となった。採水現場で濃縮・測定が実施できるように、より簡便な濃縮方法などについて検討し、プロトコルを更に改良することが望ましい。

感染源を特定するためには、環境検体から患者由来株の大半を占める Lp1 を分離することが重要となるが、主な感染源である浴槽水からは、複数の血清群のレジオネラ属菌が分離される場合がある。IMB により Lp1 を選択的に濃縮分離する方法を平板培養法と併用することで Lp1 の検出率を最も高くできた。感染源調査など Lp1 の検出が求められる際には有用な方法であると考えられた。

浴槽水におけるレジオネラ属菌の検出率および病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子の検出率は、地域によって差が認められた。浴槽水のレジオネラ属菌汚染実態の地域による差異が、国内におけるレジオネラ症患者の罹患率の地域差の要因となっている可能性について、今後検証する必要がある。

16S アンプリコン解析では、検水の種類によって菌叢が異なっていた。菌叢の多様性が高い検水からレジオネラ属菌が分離されており、多様な細菌が増殖しやすい条件下でレジオネラ属菌も増殖しやすい可能性がある。

研究班で作成した「入浴施設における衛生管理の手引き」が入浴施設の効果的な衛生管理に

活用され、また「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査の手引き」が入浴施設関連レジオネラ症発生時の疫学・環境調査の実施時に活用されて迅速・的確に原因を究明して適切な措置することでレジオネラ属菌の増殖・定着を防ぐことができ、入浴施設関連レジオネラ症の減少につながる事が期待される。

MLVA 法は利便性の高い分子タイピング法だが、primer のミスマッチにより増幅されなかった一部領域が、2nd primer の使用によりその多くが増幅され、大幅に改善することが明らかとなった。現状の MLVA プロトコルの改変も念頭に入れ、2nd primer をさらに評価、検討する必要がある。また、継続的にモニタリングしている施設において、増加した菌がもともと施設に定着している菌か、あるいは新規の株なのか、MLVA を用いて簡便に判断することができた。本法は、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。全ゲノム系統解析から、MLVA と SBT の結果は全ゲノム配列の傾向を十分に反映していると考えられた。Miseq リードデータやコンティグ配列から ST を決める方法を確立した。サンガー法で決定した配列でも利用可能となっており、迅速で有用な解析ツールと考えられた。解析フローを作成し、複数の連携機関に提供し、実際の Web 研修で解析できるような環境を構築することができた。

外部精度管理は、検査機関の良し悪しを判断するためのものではなく、その結果を次に活かすためのものである。良好な結果を報告した機関は、安定した検査環境を継続すること、そうでなかった機関は検査法の再確認を行うこと等、それぞれの結果に応じた認識の共有と対応が必要である。また、自施設で内部精度管理を実施するための手引きを作成し、10 機関で手順書に従った内部精度管理が実施された。その結果からは、回収率の良好範囲を設定するのは困難であった。自施設で安定した回収率が継続できるよう、本手引きを基に標準作業書を作成し、内部精度管理を遂行することで、正しい検査結果が得られ、それに基づく衛生指導も適確

になり、公衆浴場が適正に管理されるものと思われる。

SARS-CoV-2 は遊離塩素に感受性が高く、これまでに報告があった SARS-CoV 同様、比較的短時間で不活化されることが示された。関東と四国の入浴施設の浴槽水において次亜塩素酸ナトリウムによる遊離残留塩素濃度を 0.4 mg/L 及び 1.0 mg/L として SARS-CoV-2 ウイルスの不活化を検討したところ、短時間に高い率で不活化されることが明らかとなった。一方で、温泉を利用する浴槽水では遊離塩素濃度を設定値に安定させることが困難な場合があり、実際の入浴施設の現場において遊離残留塩素濃度の維持が新型コロナウイルス対策においても課題であることが推測された。

神奈川県において 2015 年に発生したレジオネラ症集団事例の株を用いた SNPs 解析により、この集団事例は遺伝的関連のある 2 タイプの *L. pneumophila* SG1 と 1 タイプの *L. pneumophila* SG13 によって引き起こされた可能性が明らかとなった。本事例を引き起こしたと推察されるこれら 3 タイプの株間内の SNPs の差は 21 SNPs 以内であった。このデータはレジオネラ症集団事例の SNPs 解析を行政検査として実施する上で、遺伝的関連性を判断する SNPs の値として一つの目安になると考えられた。行政検査としてレジオネラ症集団事例への全ゲノム解析の利用を検討するためには、本研究のような集団事例株の全ゲノム解析を実施し、データを蓄積していくことが必要である。

神奈川県内の入浴施設において、新たに導入された対策により、高い遊離残留塩素濃度が維持されたことでレジオネラ属菌数が減少したもののレジオネラ属菌の完全な排除には至っておらず、衛生管理方法によっては、再び増加する可能性がある。今後は配管の個別洗浄や消毒方法の変更などの対策を追加するとともに、モニタリングを継続することが重要と考えられた。

神奈川県内の協力医療機関では、毎日フラッシングを実施しており、2021 年度の調査でも遊離残留塩素濃度が 0.67 mg/L 以上と高く維持されていた。少ない菌数のレジオネラ属菌が断続

的に異なる蛇口から検出されていることから、蛇口付近で定着しているのではなく、配管の深部に存在するレジオネラ属菌のバイオフィルムの一部が剥がれ落ちるなどしたものが検出されたと考えられた。

E. 結論

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

毎日のろ過器逆洗に電解オゾン水供給を組み合わせる洗浄・消毒方法を開発した。過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の配管洗浄方法を開発した。高 pH 温泉だけでなく、人工炭酸泉や有機物が含まれている温泉でモノクロミン消毒が有効であることが確認できた。公衆浴場における適切な遊離塩素消毒で、SARS-CoV-2 は短時間に不活化されることが明らかとなった。

浴槽水、湯口水、シャワー水、カラン水、採暖槽水等について培養検査および迅速検査を行い、レジオネラ属菌による汚染実態を明らかにした。レジオネラ属菌の検出率および病原性との関連が示唆されている *lag-1* 遺伝子の検出率は、地域によって差が認められた。レジオラート/QT 法の平板培養法との比較、定性試験法の開発、モバイル型 qPCR 装置のプロトコルの改良を行った。レジオネラ迅速検査のガイドラインを作成した。Lp1-qPCR スクリーニングを併用した Lp1-IMB による Lp1 の選択的検出法を検証した。レジオネラ汚染の迅速検出法の一つであるフローサイトメトリー法の共同調査を 4 つの協力機関で実施して技術の標準化を図った。同法により、オゾンを用いた逆洗方法の有効性を確認した。次世代シーケンサーを用いて浴槽水とシャワー水の菌叢解析を行った。次世代シーケンサーを用いて、集団感染事例に由来する菌株の SNPs 解析を行った。MLVA 法は施設から検出される菌株の同一性（定着性）や新規性を継続的に調べることができ、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。

医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染を調査した。

「入浴施設における衛生管理の手引き」および「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジオネラ症調査の手引き」を作成した。「レジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引き」を作成し、検証した。

レジオネラ外部精度管理サーベイを継続実施した。

F. 健康危険情報

(1) 健康危険情報

新型コロナウイルス感染症対策で使用停止した建物や施設の再開時にレジオネラ感染の危険性がある。（令和 2 年 5 月 12 日報告済み）

(2) 情報源

Hospital Water Hygiene 研究会のホームページ

（URL: <https://fs.lck-cloud.jp/u13673/>）中の研究会からのお知らせ・最新情報（URL: <https://fs.lck-cloud.jp/u13673/>）にある「新型コロナウイルス感染症対策で使用停止した建物や施設の再開時のレジオネラ感染の危険性」（2020 年 5 月 11 日（月） 10 時 00 分掲載）

(3) 情報に関する評価・コメント

グレード A 情報：重要情報

○本邦においてなんらかの健康への影響がある可能性があり、緊急性が高く、国外の関係機関*が重大な健康問題として警告している場合。

・情報源にリンクされている記事（ワシントン発ロイター通信、2020 年 4 月 24 日）によると、米国疾病対策予防センターが長時間閉鎖された建築物の給水システムを再開するためのガイダンスを出している（URL:

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/building-water-system.html>、2020 年 5 月 7 日更新）。

・本邦に即した対応とするために、情報源中に「建物や施設の再開時の留意点（HWH 研究会からの提言）」が述べられている（URL: <https://fs.lck-cloud.jp/u13673/>）研究会からの提言・推奨）。閉鎖されている施設の再開にあたり、

給水・給湯系、冷却塔系について、洗浄・消毒による安全性の確保が必要である。本邦における特徴的な施設である、入浴施設の循環式浴槽系やシャワー系についても注意が必要である。諸施設の再開にあたっては本提言を参考にすることが望まれる。

(4) その他

ESGLI (ESCMID- Study Group for *Legionella* Infections: 欧州レジオネラ研究会、ESCMID は Europe's leading society in clinical microbiology and infectious diseases の略称) からも、「COVID-19 大流行下におけるレジオネラ感染制御のための菌科、高齢者施設、建築物、病院の水系システムのガイドライン」が出されている (URL: https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/legionella_infections/)。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jiang L*, Amemura-Maekawa J*, Ren H, Li Y, Sakata M, Zhou H, Murai M, Chang B, Ohnishi M, Qin T (*: contributed equally). Distribution of *lag-1* alleles, *ORF7*, and *ORF8* genes of lipopolysaccharide and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates in Japan and China. *Front Cell Infect Microbiol.* 9:274. 2019.
- 2) 森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 西 智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司. 次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証ー三重県津市の榊原温泉における検討ー. *温泉科学.* 69:90-102. 2019.
- 3) 磯部順子, 金谷潤一, 木全恵子, 内田 薫, 加藤智子, 綿引正則. 富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況. *富山県衛生研究所年報.* 42:39-43. 2019.
- 4) Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine

Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. *Journal of Hot Spring Sciences,* 2020, 70, 50-60.

- 5) 森 康則, 赤地重宏, 永井佑樹, 吉村英基, 泉山信司. 温泉付随ガス分離設備におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策. *温泉科学,* 69, 192-201 (2020)
- 6) 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子, 紙上ミニシンポジウム I~水の衛生管理~3.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, *日本防菌防黴学会誌,* 2020, 48(8), 377-382.
- 7) Nakamura I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kobayashi T, Sato A, Watanabe H, Matsumoto T. Persistent *Legionella* contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan. *Int J Infect Dis.* 93:300-304. 2020.
- 8) 金谷潤一、磯部順子、山口友美、武藤千恵子、淀谷雄亮、飯高順子、佐々木麻里、田栗利紹、蔡 国喜、川野みどり、倉文明、前川純子. 環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価. *日本防菌防黴学会誌.* 2020, 48, 515-522.
- 9) Inoue H, Baba M, Tayama S. Evaluation of Legiolert for Quantification of *Legionella pneumophila* from Bath Water Samples. 2020. 25:179-182.
- 10) 柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司: 山梨県のアルカリ性 (pH10 程度) 温泉におけるモノクロラミン消毒の有効性の検討, *日本防菌防黴学会誌,* 49, (2021), 261-267.
- 11) Edagawa A, Matsuda N, Ogura T, Uezono K, Izumiyama S, Fujii A, Microbial Contamination of Rubber Ducks Floating in Bathtubs of Bathing Facilities, and an Evaluation of Their Washing Methods, *Biocontrol Sci.,* 2021, 26, 187-192.

- 12) 森 康則, 井上源喜, 日本の温泉の利用状況と経年変化—行政科学的アプローチを中心として, 2021, 地球化学, **55**, 43-56.
- 13) Kanatani JI, Watahiki M, Kimata K, Kato T, Uchida K, Kura F, Amemura-Maekawa J, Isobe J. Detection of *Legionella* species, the influence of precipitation on the amount of *Legionella* DNA, and bacterial microbiome in aerosols from outdoor sites near asphalt roads in Toyama Prefecture, Japan. BMC Microbiol. 2021, 21(1):215. doi: 10.1186/s12866-021-02275-2.
- 14) 小松頌子、中西典子、岩本朋忠. 市内温泉施設における緊急事態宣言後のレジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移. 神戸市健康科学研究所報 第 49 巻 39-42 頁 2021.
- 15) Seto J, Amemura- Maekawa J, Sampei M, Araki K, Endo M, Kura F, Ikeda T, Kato T, Ohnishi M, Mizuta K. Investigation of a Legionnaires' disease outbreak using direct sequence-based typing in Yamagata City, Japan, 2019. Jpn J Infect Dis. 2021. doi:10.7883/yoken.JJID.2020.815.
- 16) Nakaue R, Qin T, Morita M, Ren H, Chang B, Murai M, Amemura-Maekawa J, Ohnishi M. Development of a Multiplex-PCR Serotyping Assay for Characterizing *Legionella pneumophila* Serogroups Based on the Diversity of Lipopolysaccharide Biosynthetic Loci. J Clin Microbiol. 59: e0015721. 2021.
- 17) Morita M, Harada N, Shinohara Y, Murai M, Ishii N, Amemura-Maekawa J, Akeda Y. Complete Genomic Sequence of the Clinical Isolate *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strain 80-045 from Japan. Microbiol Resour Announc. 10: e0082221. 2021.
- る血清群別に向けて— 保健医療福祉科学. 8:40-47. 2019.
- 2) 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 8 浴槽のレジオネラ対策 1 浴槽のどこで、どのように増えるのか」、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 83-89.
- 3) 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 9 浴槽のレジオネラ対策 2 浴槽水の各種消毒方法の効果」、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 117-123.
- 4) 杉山寛治、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 10 浴槽のレジオネラ対策 3 モノクロラミンによる消毒方法について、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 159-166.
- 5) 倉 文明：給湯・給水系に潜むレジオネラ感染症. 感染症. 287:10-17. 2019.
- 6) 枝川亜希子、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 12 レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 229-232.
- 7) 井上浩章、枝川亜希子、「講座、環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御 13 アメーバ共培養法を用いたレジオネラ属菌の検出、日本防菌防黴学会誌、2019, 47, 273-277.
- 8) 倉 文明：special feature 知る・学ぶ・実践する 水回りの感染制御、水回りの環境調査の実践 — 検査の方法・対象・頻度とその活用術. 感染対策 ICT ジャーナル、15(4):301-5, 2020.
- 9) 倉 文明：IV. 感染症-22 レジオネラ症. 小児内科増刊号 52(653):925-30. 2020

2. 総説

- 1) 中植竜大、前川純子、村井美代：グラム陰性菌のリポ多糖の構造と合成経路の多様性—*Legionella pneumophila* の遺伝子検査によ

3. 学会発表

- 1) 中西典子、野本竜平、田中忍、岩本朋忠：冷却塔に定着する *L. pneumophila* が保有するプラスミドの遺伝的特徴. 第 14 回日

- 本ゲノム微生物学会年会. 2020年3月、愛知.
- 2) 藤井明、松田宗大、小倉徹、小倉諒太、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、モノクロラミン管理下の循環浴槽におけるろ材付着バイオフィルムに対する各種消毒剤の効果、第47回建築物環境衛生管理全国大会、2020年1月、東京都.
 - 3) Mori, Yasunori., Nagai, Yuki., Akachi, Shigehiro., Nishi, Tomohiro., Hamaguchi, Maho., Yoshimura, Hideki., Sugiyama, Kanji., Tanaka, Yoshirou., Sayama, Tadahisa., Izumiyama, Shinji. Field test of monochloramine disinfection for alkaline hot spring water that cannot sufficiently be disinfected with sodium hypochlorite because of its high pH - A case study in Sakakibara hot spring area of Tsu City, Mie Prefecture -. The 72th Annual Meeting of the Japanese Society of Hot Spring Sciences. Taichung, November 2019.
 - 4) 森中理慧馨、前川純子、金谷潤一、磯部順子、加藤尚之、大野章、高崎一人、原口浩幸、布藤聡、倉文明. 日本温泉科学会第72大会. レジオネラ属菌の迅速検出法として比色系パルサー法の有用性の評価について. 2019年11月. 台中市.
 - 5) 森 康則、赤地重宏、永井佑樹、吉村英基、泉山信司、温泉付随ガス分離設備のレジオネラ属菌による汚染実態と対策、日本温泉科学会第72大会、2019年11月、台中市
 - 6) 森本 洋、小川恵子、三津橋和也：レジオネラ症患者の喀痰からいかにしてレジオネラ属菌を検出するか、第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2019年10月、仙台.
 - 7) 淀谷雄亮、原 俊吉、湯澤栄子、本間幸子、前川純子、森田昌知、大西 真、岡部信彦. レジオネラ症患者から分離された菌株等における SBT 法による遺伝子型別について. 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2019年10月. 仙台.
 - 8) 田栗利紹、蔡 国喜、新道欣也、下田貴宗、倉文明、前川純子. レジオネラニューモフィラの定量検査が現地で可能となるフローサイトメトリー技術の有用性評価. 日本防菌防黴学会第46回年次大会. 2019年9月、大阪.
 - 9) 松田宗大、枝川亜希子、泉山信司、小倉徹、植園健一、松田尚子、藤井 明、循環式浴槽から分離された *Mycolicibacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果、日本防菌防黴学会第46回年次大会、2019年9月、大阪.
 - 10) 小倉 徹、植園健一、枝川亜希子、泉山信司、松田宗大、松田尚子、藤井 明、モノクロラミン管理下の浴槽循環ろ過装置内のろ材バイオフィルムに対する各種消毒剤の消毒効果の検討、日本防菌防黴学会第46回年次大会、2019年9月、大阪.
 - 11) 前川純子. 「レジオネラ症発生事例について-作業環境を中心に-」. 第29回日本衛生産業学会全国協議会シンポジウム「生物学的ハザードと作業環境」. 2019年9月. 仙台.
 - 12) Jun-ichi Kanatani, Masanori Watahiki, Keiko Kimata, Tomoko Kato, Kaoru Uchida, Fumiaki Kura, Junko Amemura, Maekawa, and Junko Isobe. *Legionella* Species in Aerosols from Outdoor Sites near Asphalt Roads in Toyama Prefecture, Japan: Detection, Identification and Correlation with Precipitation. ESGLI 2019. Athens, Sep, 2019.
 - 13) 前川純子. 「*Legionella pneumophila* の遺伝子型別から分かること」. 第92回日本細菌学会総会ワークショップ「レジオネラをめぐる新展開」. 2019年4月. 札幌.
 - 14) 前川純子. レジオネラ症の疫学. 第94回日本感染症学会総会・学術講演会シンポジウム22. 2020年8月. 東京.

- 15) 淀谷 雄亮、原 俊吉、小嶋 由香、本間幸子、前川 純子、森田 昌知、大西真、岡部 信彦. 川崎市におけるレジオネラ症患者からのレジオネラ属菌の分離及び解析状況. 第 32 回日本臨床微生物学会総会・学術集会. 2021 年 1 月. Web 開催.
 - 16) 森 康則, 温泉の利用状況と環境省「新・湯治」プロジェクトへの期待、第 58 回日本リハビリテーション医学会学術集会, 2021 年 6 月, 京都府.
 - 17) 森 康則, 井上源喜, 日本における単位面積・人口あたりの源泉数の経年変化と地域的特徴, 日本温泉科学会第 74 回大会, 2021 年 11 月, 群馬県.
 - 18) 淀谷雄亮、佐々木麻里、増輪文治、井原基、田栗利紹、緒方喜久代、武藤千恵子、田中奈緒美、湯澤栄子、小嶋由香、前川純子、岡部信彦：新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT 法の有効性の検討. 日本防菌防黴学会第 48 回年次大会. 2021 年 9 月. Web 開催.
 - 19) 中臣昌広、井上浩章：令和元年度東日本台風（台風 19 号）被災地の泥から検出されたレジオネラ属菌について. 日本防菌防黴学会第 48 回年次大会. 2021 年 9 月. Web 開催.
3. 研修会
- 1) 黒木俊郎：公衆浴場の衛生等管理要領の改正につながった研究成果について、厚生労働省 令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020 年 2 月、東京都.
 - 2) 森本 洋：公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について、厚生労働省 令和元年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020 年 2 月、東京都.
 - 3) 佐々木麻里：レジオネラ属菌検査について、令和元年度環境監視員担当者会議、2019 年 6 月、大分.
 - 4) 佐々木麻里 他：レジオネラ症総論と培養法の注意点、レジオネラ web 研修会、2021 年 1 月、大分 (web 開催) .
 - 5) 佐々木麻里 他：環境水等からのレジオネラ属菌の検査法について、レジオネラ実技研修会、2019 年 4 月、福岡.
 - 6) 倉 文明：レジオネラ症の最新の動向と ATP 測定を活用した衛生管理、第 123 回ルミテスターセミナー (web セミナー) 、2020 年 6 月、東京都.
 - 7) 倉 文明：レジオネラについて (その正体、いかに対処するか) 、第 78 回ウォーター研究会セミナー、機能水研究振興財団令和 2 年度第 1 回研修会、2020 年 6 月、東京都.
 - 8) 前川純子：新通知法に基づくレジオネラ属菌検査. 専門研修「検査技術」. 2020 年 10 月. 東京都.
 - 9) 森本 洋：レジオネラ属菌培養検査について、令和 3 年度 短期研修 新興再興感染症技術研修、2021 年 9 月、web 対応.
 - 10) 前川純子：レジオネラ属菌の検査と対策、令和 3 年度 短期研修 環境衛生監視指導研修、2021 年 11 月、web 対応.
 - 11) 前川純子：レジオネラ症とレジオネラ属菌検査法、令和 3 年度 レジオネラ属菌検査研修会、2021 年 12 月、静岡県.
 - 12) 前川純子：レジオネラ対策の基礎知識、第 7 回保健所環境衛生監視員講座、2021 年 11-12 月、e-ラーニング.
 - 13) 公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究班：公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究、厚生労働省 令和 3 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2020 年 2 月、web 対応.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) モノハロゲノアミン製造用組成物、特許、第 6875111 号、平成 28 年 12 月 1 日出願、令和 3 年 4 月 26 日登録、藤野敬介、泉山信司