

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： 有機物が含まれている温泉でモノクロアミン消毒が有効であることが確認できた。モノクロア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ア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。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。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易くし、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。

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」かを5分で判定する迅速評価法を開発し、実証してきたが、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。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。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、1つの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이의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  
 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  
 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

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以下に記す。

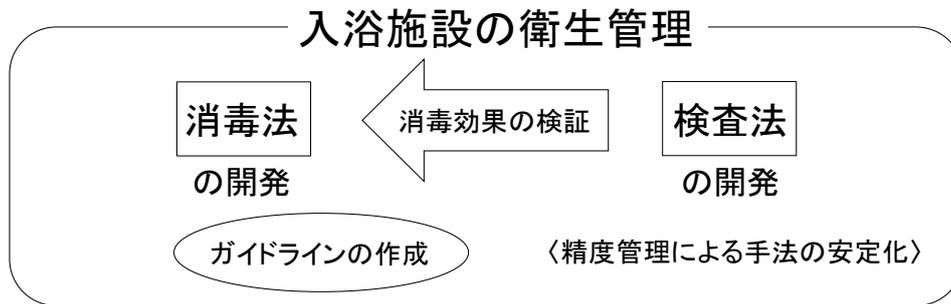


図1 本研究班の研究の流れ

表1

研究協力者一覧

縣 邦雄	アクアス株式会社	小森正人	株式会社ヤマト	中臣昌広	日本環境衛生センター
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所	蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	中村麻子	国際親善総合病院
磯部順子	富山県衛生研究所	斎藤利明	株式会社ヤマト	野本竜平	神戸市環境保健研究所
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	茶山忠久	ケイ・アイ化成株式会社	花田祐一	アイデックスラボラトリーズ株式会社
稲窪大治	日本板硝子株式会社	佐藤大輝	三重県保健環境研究所	久田美子	山梨県衛生環境研究所
井上浩章	アクアス株式会社	島崎信夫	国際親善総合病院	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
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	藤井 明	株式会社ヘルスビューティ
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ドー	藤江香予	愛媛県今治保健所
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	杉山寛治	株式会社マルマ	細川賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
大市真梨乃	三重県保健環境研究所	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
大森恵梨子	仙台市衛生研究所	高野真実	大分県衛生環境研究センター	増輪文治	長崎県環境保健研究センター
大森雄貴	山梨県衛生環境研究所	高橋直人	静岡県環境保健研究所	溝腰明人	大分県衛生環境研究センター
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	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
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	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
小川恵子	北海道立衛生研究所	田中奈緒美	アイデックスラボラトリーズ株式会社	森本 洋	北海道立衛生研究所
小澤賢介	デンカ株式会社	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
木村哲也	株式会社ヤマト	鳥井良太	株式会社お風呂のシンドー	山上隆也	山梨県衛生環境研究所
倉 文明	国立感染症研究所	永井佑樹	三重県保健環境研究所	山口友美	宮城県保健環境センター
小坂浩司	国立保健医療科学院	長岡宏美	静岡県環境衛生科学研究所	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
小林章人	三重県保健環境研究所	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
小松頌子	神戸市環境保健研究所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	吉野修司	宮城県衛生環境研究所

## 1. 有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

TOC が 9.2 mg/L、腐植質 0.2 mg/L、アンモニア態窒素 2.0 mg/L を含む、pH7.9 の源泉水を利用しての入浴施設の約 22 m<sup>3</sup> の内湯を対象とし、モノクロラミン消毒の実証試験を実施した。モノクロラミン導入前後 4 週間の計 8 週間で試験期間とした。2 台のモノクロラミン生成装置（クロラクター、ケイ・アイ化成）を設置し、浴槽水で概ね 3~5 mg/L の濃度となるように、モノクロラミンを循環系統および貯湯槽に添加した。週 1 回、営業終了後にモノクロラミン濃度を 20 mg/L 程度に上昇させ、翌朝まで約 9 時間の循環を行い、配管を消毒した。消毒後、浴槽水は全て排水し、浴槽を洗浄した。浴槽水の採水は週に 1 回、最終換水日から最も日数の経過した日の営業開始前に実施した。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。水試料 1L をろ過したフィルターから、DNeasy PowerSoil Pro kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、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、および菌叢の変化を比較する群間比較解析を行った（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

滅菌カップに 121°C、15 分間オートクレーブ処理したアルカリ泉あるいは PBS を 150 mL 入れ、浴用水由来の *M. phlei* を 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>CFU/mL になるように添加し、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。モノクロラミンは、次亜塩素酸ナトリウム溶液（ケイ・アイ化成、ケイミックス SP）と硫酸アンモニウム溶液（同社、レジサイド）を混合して用時調製した。菌数測定用検液と消毒濃度測定用検液は、消毒剤添加後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分に同一カップからサンプリングした。菌数測定用検液はチオ硫酸ナトリウム（関東化学）にて中和した後、適宜希釈してから、R2A 寒天培地（栄研化学）に混釈し、7 日間 37°C で培養した。

モノクロラミン濃度は、ポケットモノクロラミン/遊離アンモニア計（HACH DR300 Pocket Colorimeter、インドフェノール法）、遊離塩素濃度は、ポケット残留塩素計（HACH Pocket Colorimeter II、DPD 法）で測定した。

## 3. オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

オゾンの生成方法、ろ過器への供給方法および対象施設を変え、RUN1~RUN3 の 3 条件で行った。

**RUN1 (A 温泉旅館で気相オゾン)**：入館者数 30-100 人/日の弱アルカリ泉質の露天風呂系統（約 10 m<sup>3</sup>）の循環式ろ過器（砂ろ過槽、直径約 0.7 m×高さ約 0.3 m）に、ラインポンプ、オリフィス混合器、オゾン生成装置（CAP-10A、(株)石森製作所）等の洗浄・消毒用循環配管を接続した。週 1 回（合計 3 回）、主配管のバルブを閉め、当該循環配管のバルブを開けて、約 100 L/min で 120 分間循環しながら、無声放電により生成したオゾンガスを初回は 10 g、次の 2 回は 20 g 供給した。オゾンを供給している間、ろ過器通過前後の水中オゾン濃度を測定した。オゾン供給日の後に 1~3 日間隔で、浴槽水およびろ過水（ろ過器通過後）の水質を分析した。

**RUN2 (A 温泉旅館で電解オゾン)**：RUN1 と同じ循環式ろ過器に対して、オゾンガスに代えて、オゾン生成電極（オゾンバスター、オゾンマート）を使用して週 2 回電解オゾン水を供給した。2 分間の逆洗を行い、逆洗水採水後、電解オゾン水を 120 分間供給した。オゾン供給後は再度逆洗を行い、続いて 2 分間のすすぎ（捨水）を行った。

**RUN3 (B スーパー銭湯で電解オゾン)**：入館者数が 1000-2000 人/日と多いことから、毎日のろ過器逆洗前に、ろ過槽の有効容量分（ろ材充填量）以上の電解オゾン水を自動注入するシステムを構築した。供給量は 10 L/min で 10 min（100 L）としたが、66 日目の施設側による配管洗浄（過酸化水素+塩素化イソシアヌル酸塩）を挟んで、77 日目より供給量を 10 L/min で 20 min（200 L）と倍に増やした。週 1 回オゾン供給前に、ろ過器をブローによりエアレーションし（約 200 L/min、約 5 分間）、ろ過器の汚れを含んだ逆洗水および

浴槽水を採水し、水質を分析した。オゾン生成に井水を用いており、陰極や電解槽内へのスケール付着が多いため、1回/月の頻度で、100g/L クエン酸溶液による漬け置き洗浄を行った。

#### 4. 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。A 研究所において標準作業書とワークシートを作製し、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup> 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、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（前項の RUN3）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。

#### 5. 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

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。

5 地方衛生研究所に搬入された公衆浴場等の温泉水、浴槽水、プール採暖槽水等計 290 検体を対象とした。レジオラート/QT 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。

#### 6. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT法の評価、レジオラートを用いた定性試験法の検討

令和 3 年 6 月から 11 月に搬入された浴槽水および湯口水 30 施設分 58 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）40 mL が入ったベ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。

#### 7. 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。遺伝子検査（LAMP、モバイル qPCR）は機関 D・F、Lp1 で感作した免疫磁気ビーズ（Lp1-IMB）を用いた選択的濃縮法は機関 A・E・F、16S アンプリコン解析には機関 F の試料を用いた。

モバイル qPCR には、Picogene PCR1100（日本板硝子）を使用した。検水 500 mL をフィルターろ過後（ポリカーボネート、0.2 μm、47 mm）、核酸抽出試薬 500 μL を添加した手もみ式簡易破砕容器に入れ、室温で 1 分間手もみして、得られた核酸抽出液 5 μL を鋳型として用いた。

IMB による選択的濃縮法には、検水の 100 倍濃縮液または 5 倍希釈液を供試した。試料 1 mL に Lp1-IMB 25 μL を接種し、10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸着させ、ビーズを磁石で集め、PBS で 2 回洗浄した後、PBS 100 μL に懸濁、混和して、GVPC 寒天培地（日水製薬）に塗布し、35°C で 7 日間培養した。

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砕後、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。

## 8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成

昨年度までに作成した「入浴施設における衛生管理ガイドライン（案）」を全国の衛生研究所を有する自治体に配付し、保健所の衛生指導に試験的に利用することを依頼し、本案の内容に対する

意見を求めた。

「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）」は当研究班メンバー及びメンバーが所属する自治体の感染症担当者、環境衛生担当者に提示して、項目・内容・使い勝手などに対して意見を求めた。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、さらに修正案を分担研究者及び研究協力者で構成するワーキンググループに諮り、修正を加えた。

## 9. 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。施設の衛生管理における MLVA の活用では、神戸市の 3 施設において平成 24 年から令和 2 年度に分離された Lp を解析対象とした。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。

## 10. 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）を使用し、今年度は全国 184 の検査機関（191 名）が参加した。今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。配付試料を受け取った各機関は、50 mL の滅菌生理食塩水に懸濁混和した「非濃縮試料①」と、そこから試験用に 1 mL 分取した残りにさらに 441 mL の滅菌生理食塩水を加え、混和した「非濃縮試料②」、さらに各機関が行なっているろ過濃縮、あるいは遠心濃縮を実施して得られる「濃縮試料」について、それぞれレジオネラ分離培地 5 枚に 100 μL ずつ塗布し、各試料中のレジオネラ菌数を算出した。メーカー保証値および微生物学調査の考え方

から、回答の良好範囲を 600~15,000 CFU/100 mL と設定した。濃縮検体については、目標回収率を 20%以上 100%未満とした。回答および解析結果の閲覧は専用ホームページにて行われた。研究班の協力機関として参加した地方衛生研究所等 70 機関については、サーベイ指定法に加え、日常業務で行う検査条件による結果も求め、独自に集計・解析を実施し、過去 6 年間の結果とも比較した。

#### 11. 入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引きの作成

「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）」を参照し、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、計 10 機関で内部精度管理が実施された。解析には、同じ施設で複数回実施したデータも使用した。

#### 12. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

SARS-CoV-2 ウイルス (AI/I-004/202 株; 国立感染症研究所より分与) を Vero E6 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) (富士フイルム和光純薬) に L-グルタミンを添加した培地で 5 %CO<sub>2</sub> 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。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりアクアブ AQ-201 (柴田科学) を用いて測定した。ウイルス液 100 µL 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 µL 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 10<sup>7</sup> まで 10 倍段階希釈し、各希釈段階の液 40 µL 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%CO<sub>2</sub> 下、37°C で 4 日間培養した。各ウェルの細胞変性効果でウイルス増殖を確認し、Reed-Muench 法で TCID<sub>50</sub> (Median Tissue culture Infectious Dose, 50%感染量)を計算した。未処理群と比較した処理群の TCID<sub>50</sub> に基づいてウイルスの生存率を求め、100—生存率 (%) を不活化率として算出した。

#### 13. レジオネラ症集団事例における全ゲノム解析

2015 年に神奈川県 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) を供試した。菌株から DNA を抽出し、SBT 解析、Single Nucleotide Polymorphisms (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。Genbank に complete genome が公開されている代表的な 6 株の Lp1、すなわち Alcoy、Corby、Lens、Paris、Philadelphia 1 および 130b (各アクセッション番号: CP001828, CP000675, NC006369, NC006368, AE017354, FR687201) と供試菌株のリードデータを KmerID (<https://github.com/phe-bioinformatics/kmerid>) により比較し、供試菌株とゲノムの類似性が最も高い株をレファレンス配列とした。マッピングは Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) を用い、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。

#### 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

神奈川県内の 1 入浴施設において、2021 年 10 月に試料を採取した。2 つの浴室のそれぞれの浴槽水、湯口水、カラン並びにシャワー水、地下タ

ンクおよび高置タンクの温水の計 14 試料を採取した。シャワーやカランからの水は放水直後に採取するとともに一部のカランについては放水 3 分後にも採取した。

神奈川県内の 1 医療機関において、令和 3 年 7 月に 6 ヶ所（地下控室 1 か所、倉庫内 1 ヶ所、病室洗面台 4 ヶ所）の洗面台等の蛇口水を放水直後及び 3L 流水後、合わせて 12 試料を採取した。この 6 ヶ所のうち自動排水装置を設置した 4 ヶ所については 2021 年 8 月および同 9 月にも同様にして試料を採取した。

採取した試料を用いて、レジオネラ属菌の分離培養・遺伝子検査、従属栄養細菌数の測定、一般細菌数の測定、温度測定、pH 測定及び遊離残留塩素濃度の測定を実施した。試料は採取当日に検査を開始した。

（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. 有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

消毒の状況としては、モノクロラミン消毒導入前から結合塩素が確認されており、導入前後ともレジオネラ、自由生活アメーバ、大腸菌群は陰性であった。導入前には定量値が高かった従属栄養細菌数は減少し、一般細菌数に増減はなく、16S rRNA 遺伝子量は増加した。塩素の使用量は、導入後わずかに減少した。菌叢解析の結果、*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、モノクロラミンではおよそ 500 mg/L・min だったのに対し、遊離塩素ではその

2.5 倍の 1,200 mg/L・min だった。アルカリ泉における *M. phlei* の 3-Log 不活化は、モノクロラミンは CT 値およそ 800 mg/L・min だったのに対し、遊離塩素は CT 値およそ 2,000 mg/L・min でも 1-Log 程度しか不活化されなかった。

### 3. オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

**RUN1 (A 温泉旅館で気相オゾン)** : 初回のオゾン供給時、ろ過器通過前後のオゾン濃度はそれぞれ 0.6 mg/L、0.2 mg/L だった。供給量を倍増したところ、ろ過器通過前後のオゾン濃度はそれぞれ 1.4 mg/L、0.6 mg/L となった。入館者数が増える休日（土日祝日）の後に、レジオネラ属菌が検出されることがあったものの、オゾン供給後 5 日間程度は浴槽水およびろ過水からレジオネラ属菌は不検出となった。オゾン供給量を倍増してからは、0.1 mg/L で管理されていた浴槽水の残留遊離塩素は最大で 0.6 mg/L と増加傾向となり、一般細菌は概ね 10 CFU/mL 未満まで減少した。しかしながら、設置装置周辺でオゾン臭が微かに認められ、気相中のオゾン濃度は、作業環境基準 0.1 ppm 未満に対して、0.05~0.1 ppm になる場所があった。

**RUN2 (A 温泉旅館で電解オゾン)** : オゾンガスの代わりに 0.9 mg/L 程度の電解オゾン水を週 2 回ろ過器に供給した。作業環境中へのオゾン漏洩は認められなかった。電解オゾン水供給開始前は浴槽水・逆洗水から 10~60 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出されていた。供給開始後、レジオネラ属菌が継続して不検出となるまでに 3 週間を要した。一般細菌は、電解オゾン水供給開始後に浴槽水で減少傾向が伺えるものの、逆洗水では特に減少傾向は認められなかった。

**RUN3 (B スーパー銭湯で電解オゾン)** : オゾン利用前は、浴槽水で 10~60 CFU/100 mL、逆洗水で 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 日目の逆洗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。91 日目の検出は、生物膜の塊を偶然に測定したと考えられた。逆洗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。

#### 4. 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。

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、 $p=0.004$ )。

#### 5. 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT 法の有効性の検討

レジオラート/QT 法について精度管理品を用いた 3 検査施設間における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。5 施設で実施した実検体 (N=290) 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 85.5%と高く、検出菌量は強い相関が認められた。レジオラート/QT 法で陽性であった 80 検体 (7 日間培養) は、培養 3 日目まで 20 検体のウェルの変色が確認され、培養 5 日目までに 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 42 検体のうち 31 検体が、検出菌量が 30 MPN 又は CFU/100 mL 未満であった。

#### 6. 大分県の浴場水を用いた標準的検査法とレジオラート/QT 法の評価、レジオラートを用いた定性試験法の検討

平板培養の結果は、大分法では 58 検体中 18 検体、標準法では 16 検体からレジオネラ属菌がそれぞれ検出された。レジオネラ属菌数は、大分法と標準法でそれぞれ 5~2000、10~1500 (濃縮試料のみでは 10~890) CFU /100mL であった。大分法と標準法の菌数の相関は、 $R^2=0.9184$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は  $R^2=0.8185$  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。

#### 7. 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

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 (75%、3/4 検体) となった。平板培養法に加えて、Lp1 で感作した免疫磁気ビーズ (Lp1-IMB) 法を併用することで、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認められた。同様に、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* 遺伝子陽性率は 0.3~4.4%と、これらの値も機関によって差が認められた。分離された Lp1 菌株に占める *lag-1* 遺伝子の陽性率 (*lag-1*/Lp1) は最も低い機関は 7.7%であったのに対し、最も高い機関は 50.0%であった。

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。

## 8. 入浴施設の衛生管理及び集団発生疫学調査ガイドライン作成

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衛生管理ガイドライン案に対して研究班の構成メンバー並びに17自治体から160余りの意見が寄せられ、それらの意見を基にして衛生管理ガイドライン案を修正した。その名称を「入浴施設における衛生管理の手引き」に変更することとした。

疫学調査ガイドライン案は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を加え、さらに本文に「別添1患者調査票」、「別添2-1、別添2-2施設調査票」、「別添3持ち物チェックリスト」を加えて構成した。その名称を「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」とし、研究班のホームページ上に公開した (<https://sites.google.com/view/legionella-resgr/>)。

## 9. 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。

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遺伝子型の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一遺伝子型であったが、もう1株は初めての遺伝子型であった。

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。

## 10. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

研究班で集計した地方衛生研究所等70機関のうち、69機関が非濃縮検体における設定良好範囲内の菌数を報告した。濃縮検体は、本年度は全ての機関で検出された。過去の報告で、20%以上100%未満の目標回収率を達成した機関の割合をみると、2018年度は74.3%だったのが、その後の2回は50%台となっていたのが、菌株変更が行われた今年度は、78.6% (55機関) と多くの機関で良好となった。

## 11. 入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引きの作成

内部精度管理手引きとその検査手順フローチャートを作成した。概要は次の通りである。レジオネラ属菌を30°C 3日間培養し、それを滅菌生理食塩水に懸濁し、接種菌液とする。これを希釈して、滅菌生理食塩水に接種し、試料水とする。同時に接種菌数を測定する(A)。その後、自施設の標準作業書に従い、濃縮検体のレジオネラ属菌数を測定する(B)。B/Aの値に濃縮率を勘案し、最終的な回収率とする。

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割となり、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。1 機関で、BCYE  $\alpha$  寒天培地での回収率が 100%であったのに対し、GVPC 寒天培地での回収率は 1.3%と低かった。聞き取りしたところ、添加したレジオネラ属菌株は、濃縮前から選択分離培地での発育が良くない事実が認められた。

## 12. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

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つたため、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。

## 13. レジオネラ症集団事例における全ゲノム解析

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 11 株を用いて、SBT 解析および全ゲノム解析法の一つである SNPs 解析を実施した。SBT 解析の結果、*L. pneumophila* SG 1 (Lp1) の 7 株は ST2114、1 株は ST2121 だった。ST2114 と ST2121 は *neuA* 遺伝子の 1 塩基のみが異なっていた。*L. pneumophila* SG13 (Lp13) は 3 株すべてが ST2113 だった。供試した 11 株すべてが Corby 株とのゲノム類似性が最も高く（kmer similarity 89.9%~91.2%）、これをレファレンス配列としてマッピングした。SNPs 解析により、Lp1 は 4 株（うち患者由来株は 3 株）から成るクラスター A（株間の SNPs 数は 8~21）と同じく 4 株（うち患者由来株は 2 株）からなるクラスター B（株間の SNPs 数は 3~6）に分けられた。浴槽水由来の

ST2121 株はクラスター B に含まれた。クラスター A、B 間の SNPs は最大で 744 SNPs だった。Lp13 の 3 株（患者由来株 1 株、浴槽水由来株 2 株）間の SNPs は 16~21 SNPs だった。Lp1 と Lp13 の株間の SNPs は 1833~2562 SNPs だった。クラスター A に属する浴槽水由来 Lp1 株 1 株とクラスター B に属する浴槽水由来 Lp1 株 2 株は、それぞれ異なる浴槽から分離されていた。

## 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

神奈川県内の 1 入浴施設においてレジオネラ属菌の汚染実態調査を 2015 年度から継続してきた。2015~2018 年度には調査対象である 8 ヶ所中 5 ヶ所から最大 3,000 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出されていたが、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、2020 年度には最終的に 2 ヶ所から 60 CFU/100 mL が検出されるのみとなった。この調査ののち、配管内の温泉水の停滞を防ぐことを目的として常時くみ上げポンプを稼働させ、定休日前に原湯の貯蔵タンクに次亜塩素酸ナトリウムを添加する対策が追加された。この対策の評価を目的としてレジオネラ属菌汚染実態調査を実施した。その結果、8 ヶ所中 1 ヶ所のみから 20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 が検出された。

神奈川県内の 1 医療機関では、これまで次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシングなどの対策を実施してきた。今年度新たな対策として、フラッシングを定期的に行う自動排水装置が導入されたことから、その評価を目的としてレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した。6 箇所、3 回の検査で、20 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が 3 箇所の蛇口から 1 回ずつ検出された。

## D. 考察

今年度も昨年度に引き続き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、班会議や関連会議は滞りなく web で行われた。全体的には、最終年度にふさわしい数々の研究成

果を得ることができた。以下に各研究項目についての考察を述べる。

モノクロラミン消毒は、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、従属栄養細菌への対策は必要であると考えられた。

*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、オーバーナイト洗浄等のバイオフィーム対策を徹底することの必要性や重要性が改めて示唆された。

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。コスト、労力および安全性等の観点から、オゾンガスより電解オゾン水の利用が望ましいと考えられた。週1-2回の高濃度塩素消毒に代わり、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、簡便で消毒効果が認められた。

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。また、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、本法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、技術の普及に努めたい。

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を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℃で20分間加熱し、検討の結果、培養温度を36℃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することができた。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。

自治体から寄せられた多くの意見を基にして、「公衆浴場における衛生等管理要領」に基づく管理方法を具体的に実践するのに参考となる「入浴施設の衛生管理の手引き」を完成させた。Q&A、チェックリスト、記録簿の例を示してほしいといった要望もあり、それらは今後の課題としたい。

「公衆浴場等入浴施設が原因と疑われるレジ

「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。レジオネラ症に関する行政の調査は主に保健所が行うが、人員削減に加え頻繁な人事異動のために調査技術の継承に困難を生じている。本手引きは、調査手法の一例を示し、レジオネラ症発生時の原因究明に資するものとする。

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。

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。

入浴施設の水環境におけるレジオネラ属菌検査の信頼性を担保するため、検査精度を確認し、検査担当者の技術水準を維持、向上させることを目的として、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た。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、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。

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と考えられた。一方で入浴施設の温泉水が pH 8.0~8.3 であることから、次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が低くなっていると考えられた。*L. pneumophila* SG 6 が検出されたカランからは、2018~2020 年度も *L. pneumophila* SG 6 が検出されており、この入浴施設では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、これまでも毎日フラッシングを実施しており、今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。レジオネラ属菌は、自動排水装置設置後、一度不検出となり、その後、少ない菌数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方法は、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。有機物が含まれている温泉でモノクロラ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。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、1 つの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

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
  - 8) 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.
2. 学会発表
- 1) 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.
  - 2) 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.
  - 3) 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.
  - 4) 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) 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.
  - 2) 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.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) 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