

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： 今年度は新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言等のために、一部の研究実施が困難になったが、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。

入浴施設における省力化配管洗浄法を開発し、実地試験でその効果が検証できた。これまでアルカリ性や中性の泉質に適用されてきたモノクロラミン消毒が弱酸性の人工炭酸泉でも有効であることが確認できた。

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（FCM）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、モノクロラミン消毒では、FCMにより測定される散布図が遊離塩素消毒の場合と全く異なったことから、モデル実験でモノクロラミン消毒時のFCM特異領域を設定し、モノクロラミン消毒の迅速評価法の有効性を実検体で確認した。

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。これまでの成果を踏まえ、レジオネラ迅速検査ガイドラインを作成した。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、今後、偽陽性の発生実態を解析し、偽陽性を低減する方法を検討する必要がある。採水現場での濃縮・測定を想定して開発されたモバイル型qPCR装置でのレジオネラ属菌の検出率は、平板培養法に対する感度がLAMP法よりも低かったため、フィルターや濃縮率についてプロトコルを再検討する必要があると思われた。シャワー・カラン水で感度が低かったPALSAR法は、MWY液体培地による増菌培養を取り入れた結果、平板培養法に対する感度が100%となった。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。IMB処理前にLp1特異的なqPCRによるスクリーニングの実施が効率的で、平板培養法では分離されなかった検体からLp1が検出できた。

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、半数以上の検体からレジオネラ属菌、約9割の検体からマイコバクテリウム属菌のリードが検出された。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、あるいは1つの入浴施設の複数個所から長期にわたって検出されるLp株のSNPs解析を行い、他の分子疫学解析法とも比較した。次世代シーケンサーはMLVA法の検証にも活用した。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ガイドラインを作成した。入浴施設が関連するレジオネラ症発生時の調査の実施をサポートするガイドラインを作成した。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72機関が参加した。

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科長
 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
 森本 洋・北海道立衛生研究所主幹

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）。

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

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。各研究項目の研究方法を以下に記す。

1. 省力化配管洗浄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

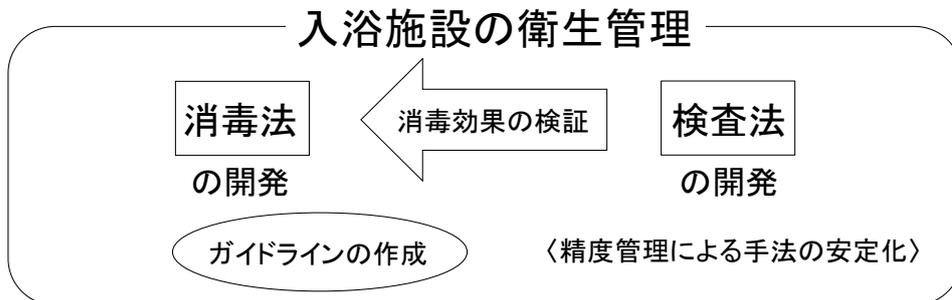


図1 本研究班の研究の流れ

表1

研究協力者一覧

青木信和	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
縣 邦雄	アクアス株式会社	陳内理生	神奈川県衛生研究所	細川賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
浅野由紀子	愛媛県立衛生環境研究所	杉山寛治	株式会社マルマ	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
磯部順子	富山県衛生研究所	鈴木美雪	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
市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社	高野真実	大分県衛生環境研究センター	水谷幸仁	日本板硝子株式会社
井上浩章	アクアス株式会社	高橋直人	静岡県環境保健研究所	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所
井原 基	長崎県環境保健研究センター	田中 忍	神戸市環境保健研究所	三津橋和也	北海道立衛生研究所
枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所	田中孝典	花王株式会社 ハウスホールド研究所	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	田中奈緒美	アイデックスラボトリーズ株式会社	村尾拓哉	日本板硝子株式会社
大屋日登美	神奈川県衛生研究所	田中慶郎	株式会社マルマ	森 康則	三重県保健環境研究所
緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター	永井佑樹	三重県保健環境研究所	森川 茂	岡山理科大学
小川恵子	北海道立衛生研究所	中尾 元	長崎県環境保健研究センター	森中えりか	株式会社ファスマック
小澤賢介	デンカ株式会社	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	柳本恵太	山梨県衛生環境研究所
倉 文明	国立感染症研究所	中筋 愛	タカラバイオ株式会社	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	中臣昌広	日本環境衛生センター	山本哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター	野本竜平	神戸市環境保健研究所	吉崎美和	タカラバイオ株式会社
斎藤利明	株式会社ヤマト	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
茶山忠久	ケイ・アイ化成株式会社	藤井 明	株式会社ヘルスビューティ	淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所

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570nm)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、1m³あたり炭酸ナトリウム0.5kg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1m³あたり過炭酸ナトリウム6kgおよびクエン酸4kg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。

1m³あたり亜硫酸ナトリウム1.2kg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。

2. 弱酸性の人工炭酸泉へのモノクロラミン消毒の適用

酸性下のモノクロラミン安定性の検討として、pH3~8のりん酸-クエン酸緩衝液に、3mg/Lになるようモノクロラミンを添加し、室温下で緩やかに攪拌し、添加後1分、5分、10分後に、DPD-硫酸アンモニウム鉄(II)滴定法で遊離塩素、モノクロラミン、ジクロラミン、トリクロラミンの塩素濃度を測定した。

営業3施設の井水について、モノクロラミン濃度の安定性を事前に確認した。100mLの井水にモノクロラミンを3mg/Lの濃度になるよう添加し、ウォーターバスで40°Cに保温し、モノクロラミン濃度を経時測定した。

上記営業3施設の人工炭酸泉の4浴槽で、モノクロラミン濃度を3mg/L以上に維持する消毒実証試験を行なった。モノクロラミン濃度10mg/L、2時間の循環により、週一回の配管消毒と換水を実施した。換水日前日の夜間に浴槽水を採取し、レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、一般細菌数を定量した。

3. フローサイトメトリー(FCM)によるモノクロラミンの消毒効果判定方法の開発

24Lの水道水を入れた水槽にバケツヒーターを投入して42~45°Cに加温し、循環させモデル浴槽とし、モノクロラミンを調製して終濃度3.0mg/Lあるいはその5倍量になるように添加した。モノクロラミン濃度が安定した後、大腸菌を投与し、PI(propidium iodide)染色及び抗大腸菌抗体染色を行って、フローサイトメーターminiPOC(シスメックスパルテック社)を使用して測定し、大腸菌がモノクロラミンで完全に消毒される条件下でのFCM測定散布図の特異領域を設定した。

モノクロラミン消毒を採用している2施設28浴槽水を採水し、モデル実験と同様にPI染色を行って、miniPOCを用いて測定を行った。同時に、*Legionella pneumophila* (Lp)特異染色試薬を作製し、濃縮した検水に添加し、予め作成した検量線によりLp数を求めた。併せて、レジオネラ属菌平板培養検査、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)によるレジオネラ属菌全DNA量、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0(タカラバイオ)によるレジオネラ属菌の生菌DNA量を求めた。

4. 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法は、Lp検出用培地レジオラートと専用トレイQuanti-Tray/Legiolert(いずれもIDEXX)を用いて、飲料水用10mLプロトコールに従い、浴槽水等の検体10mLに対して実施した。同時に平板培養法を実施し、レジオラート

/QT 法及び平板培養法における検出率を比較するとともに、レジオラート/QT 法で求められた MPN 値と平板培養法で求められた CFU 値を比較した。レジオラート/QT 法で陽性となった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、レジオネラ属菌の検出を試みた。非レジオネラ属菌のコロニーのみが生育した場合は、16S rDNA 配列決定により菌種を同定し、同定した菌がレジオラート/QT 法で陽性を示すか確認した。

5. 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 2 年 8 月から 11 月に搬入された浴槽水および湯口水 21 施設分 41 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、併せてレジオラート/QT 法を実施した。レジオラート/QT 法で 10MPN/100mL 以上となった検体について、専用トレイの代わりにベントフィルター付き滅菌フラスコ (650 mL) を用いて 39°C で 7 日間培養し、レジオラート定性試験を実施した。

6. 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

4 地方衛生研究所において、令和 2 年度に採取された 169 検体 (浴槽水 107 検体、シャワー水 26 検体、カラン水 17 検体、採暖槽水 15 検体、その他 (プール水など) 4 検体) について標準法に準じて各機関の方法で平板培養を実施し、一部の検体については、LAMP 法、モバイル qPCR 法を実施した。モバイル qPCR 法はモバイル qPCR 装置 Picogene PCR1100 (日本板硝子) を用いて、2 種類の核酸抽出試薬 (法) および LAMP 法の核酸抽出試薬の抽出効率を検討した。シャワー・カラン水についてのみ PALSAR 法を実施した。

LAMP 法の際に抽出した DNA を鋳型として、*L. pneumophila* 血清群 1 (Lp1) 特異的な qPCR を実施した (Lp1-qPCR)。

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。Lp1-qPCR が陽性となった検体の 100 倍濃縮液の 5 倍希釈試料 1 mL に Lp1-IMB 25 μ L を接種し、10 分毎に転倒混和しながら 30 分間吸

着させ、ビーズを磁石で集め、PBS での洗浄を 2 回実施した後、PBS 100 μ L に懸濁し、ボルテックスでよく混和後、GVPC 寒天培地 (日水製薬) に塗布し、35°C で 7 日間培養した。

浴槽水 31 検体およびシャワー水 17 検体について、検水 1,200 mL をフィルターろ過し (ポリカーボネート、0.22 μ m、47 mm)、ビーズでフィルターを破碎後、DNeasy PowerBiofilm Kit (キアゲン) で 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。

7. 入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン作成

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を形成し、ガイドラインの内容を検討した。

8. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

これまでに、約 800 株の Lp を用いて、その有用性について評価を行ってきた MLVA 法のプロトコル整備のため、Miseq および MinION を用いて、リピート数が 0 になったり、Intermediate-size を示したりする 12 株の完全長配列を決定し、計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 領域について解析した。

ある集団事例に由来する菌株 15 株について、コアゲノム SNPs の系統解析を行い、PFGE、MLVA、SBT 法の解析結果との比較検討を行った。

9. 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、全国 171 の検査機関 (180 名) 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。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 600~12,000 CFU/100 mL と設定した。濃縮検体については、良好範囲を回収率により判定した。目標回収率は、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。研究班への協力機関として参加した地方衛生研究所等 72 機関については、独自に集計・解析を実施し、過去 5 年間の結果と比較した。

10. 入浴施設の衛生管理及び疫学調査ガイドライン作成

昨年度に作成した「入浴施設における衛生管理ガイドライン(案)」(以下、衛生管理ガイドライン案)及び「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)」(以下、調査ガイドライン案)を当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。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。

11. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

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。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。

12. 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

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、令和 2 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、レジオネラ属菌検査、LAMP 法によるレジオネラ属菌遺伝子の検出、遊離残留塩素濃度の測定を行った。

神奈川県内の総合病院において、令和 2 年 10 月に 7 か所 (地下控室 1 か所、倉庫内 1 か所、病室洗面台 4 か所、授乳室 1 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、微生物検査 (レジオネラ属菌、従属栄養細菌、一般細菌数) 等を行った。

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。

13. レジオネラ属菌を対象とした次世代シーケンズ解析

神奈川県内の入浴施設において、2018 年 1 月から 2020 年 10 月までに検出された *L. pneumophila* SG1、8 株、同 SG6、5 株、同 SG9、5 株について、SBT 解析および SNPs 解析を行った。

(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. 省力化配管洗浄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、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。

2. 弱酸性の人工炭酸泉へのモノクロラミン消毒の適用

pH5から8の緩衝液に添加されたモノクロラミンは濃度が維持された。pH3と4では、遊離塩素とジクロラミンに変化して、モノクロラミン濃度が低下した。

人工炭酸泉を使用している3施設の原水である井水に添加されたモノクロラミンは安定して維持されることを確認した。当該3施設の4浴槽(pH値は、5.6、5.1、5.0、5.2)に対して、モノクロラミン消毒を実施した。全塩素濃度は3mg/L以上に維持され、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。入浴者からの臭気等に関する苦情もなかった。

3. フローサイトメトリー(FCM)によるモノクロラミンの消毒効果判定方法の開発

モデル実験により温浴水槽で 10^4 CFU/mLの大腸菌をモノクロラミンで完全に消毒する条件(14~26 mg/L、22~30時間)を明らかにして、同条件で得られるFCM測定散布図の特異領域を設定した。遊離塩素の消毒効果と同様に本方法をモノクロラミン消毒の迅速評価法(Rapid Detection Method, RDM法)と位置づけて、本測定領域において一定濃度以下(1000 cells/mL)を「清浄」と判定し、逸脱した場合を「細菌増殖」と判定した。現地調査では、モノクロラミン消毒を行っている循環ろ過式の2入浴施設から、計28サンプルの浴槽水を採取して、RDM法と、レジオネラ培養法、レジオネラ遺伝子量、FCMに

よるLp定量を行い、結果を比較した。RDM法により「清浄」と判定された19浴槽からは培養法においてレジオネラ属菌は検出されなかった。また、従属栄養細菌も検出されず、痕跡程度のレジオネラ属死菌遺伝子とLp細胞が残存していた。同じく「細菌増殖」と判定された9浴槽からは培養法でレジオネラ属菌は検出されず、レジオネラ属死菌遺伝子と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、*Mycolicibacterium phlei*と同定された。

4. 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

温泉水、浴槽水、プール採暖槽水、冷却塔水等計171検体についてレジオラート/QT法及び平板培養法を実施したところ、両方法で陽性となったものが37検体、両方法で陰性となったものは106検体であった。平板培養法と比較したレジオラート/QT法の感度は61.7%、特異度95.5%であり、結果一致率は83.6%であった。レジオラート/QT法及び平板培養法ともに陽性であった37検体について検出菌量を比較したところ、回帰直線の R^2 は0.397となり、弱い相関が認められた。レジオラート/QT法のみ陽性であった5検体について、陽性となったウェルの液体培地からレジオネラ属菌の分離を行ったところ、1検体で*L. pneumophila* SG3が検出されたが、4検体はレジオネラ属菌が検出されず、培地上で発育が見られたコロニーからDNAを抽出し、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。

5. 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

41検体中、大分法では19検体、標準法では18検体からレジオネラ属菌が検出された。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5~1000cfu/100ml、10~2000cfu/100mL(濃縮

試料のみでは 10~430CFU/100mL) であった。大分法と標準法の菌数の相関は $R^2=0.7521$ 、濃縮試料のみの菌数の相関は $R^2=0.8893$ であった。

レジオラート/QT 法では 41 検体中 12 検体から 11~1342 MPN/100mL の Lp が検出された。検出/不検出の一致率は大分法で 82.9% (10CFU/100mL 以上検出された検体に限ると 90.2%)、標準法で 85.4%、菌数の相関は大分法で $R^2=0.6682$ 、標準法で $R^2=0.6978$ (濃縮試料のみで $R^2=0.7134$) であった。

保存菌株を用いた希釈系列による検討では、レジオラート/QT 法及び BCYE α 寒天培地で検出限界となるまでレジオラート定性試験法でも陽性となった。実検体では、レジオラート/QT 法陽性の 12 検体中定性試験法で陽性となったのは 6 検体であった。

6. 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

公衆浴場などからの 169 検体中、44 検体 (26.0%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。最も多い菌数は、2,690 CFU/100 ml であった。Lp1 が 19/44 検体 (43.2%) から分離され、最も多かった。

モバイル qPCR 法は、2 種類のプロトコルで実施した (N = 59, 110) ところ、平板培養法に対する感度は 22.6% および 38.5% であり、LAMP 法 (N = 100, 94.1%) よりも低かった。

シャワー・カラン水 (N = 35) を対象とした PALSAR 法では、MWY 液体培地による増菌培養を取り入れた結果、平板培養法に対する感度は 100% となった。また、特異度および一致率は、それぞれ 60.7% および 68.6% であった。

浴槽水 31 検体、シャワー水 17 検体を用いて 16S アンプリコン解析を実施した結果、半数以上の検体からレジオネラ属菌、約 9 割の検体からマイコバクテリウム属菌のリードが検出され、Species level での解析では、レジオネラ症や非結核性抗酸菌感染症の原因菌である *L. pneumophila*、*M. gordonae* が検出された。

Lp1-qPCR スクリーニングを浴槽水など 76 検体について行った結果、12 検体が陽性となった。そのうち 5 検体について Lp1-IMB 法を実施した

ところ、4 検体から Lp1 が分離された。うち 3 検体は平板培養法では Lp1 が分離されなかった検体である。

7. 入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン作成

「入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン」を作成した。

ガイドラインでは、迅速検査を実施するにあたり、留意点すべき点を述べた。また、現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利であるという点から、各市販キットの特性などを一覧に示した。その上で、キットごとに、方法の概要、判定方法、平板培養法との結果の相関を示した。最後に、実検体を用いて迅速検査を使用する際の具体例を挙げた。

8. MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

Miseq および MinION を用いて、12 株の完全長配列を決定し、計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 領域について詳細に解析し特徴づけを行った。その結果、一部の菌株でフラグメントが検出されない MLVA 領域において、primer のミスマッチにより、存在する当該領域が増幅されない場合があることが明らかになった。また、Intermediate-size が出現する MLVA 領域で、primer からリピート開始上流域までの長さ最後のリピートの長さの両方が短くなっている場合があった。

さらに、PFGE、MLVA、SBT で相違が見いだされた 1 つの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。

また、2927 個の ST プロファイルからなるデータベースを用いて、Miseq リードデータやコンテイング配列から ST を決める方法を確立した。

9. レジオネラ属菌検査精度の安定に向けた取り組み

外部精度管理に参加した地方衛生研究所において、6年連続参加した機関は44機関あった。解析の結果、これまで同様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。回収率については、判定を開始した2017年度からの推移を見ると、良好範囲を報告した機関の割合は2018年度に大きく上がったものの(74.3%)その他の年では本年度含め55%前後であった。

10. 入浴施設の衛生管理及び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ガイドラインを作成した。一般衛生管理のパートでは、より具体的な内容にするとともに、図を追加した。また、入浴施設が関連するレジオネラ症発生時の調査の実施をサポートするガイドラインについては、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、名称から「集団発生時」の文字を削除し、「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ガイドライン」(案)とした。保健所等からの意見を取り入れ、本文の追加や削除を行い、施設調査票を大幅に変更した。

11. 新型コロナウイルスに対する塩素系消毒剤の効果

新型コロナウイルスは遊離塩素による消毒に感受性を示し、濃度が0.16mg/Lで25°Cでの1分後の不活化率は99.99%以上となり、0.11mg/L、41°Cでは5分後の不活化率が99.99%以上であった。モノクロラミンは遊離塩素と比較して相対的に効果が低く、6mg/Lでも25°Cで10分後の不活化率は98%であった。

12. 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

2015年からレジオネラ属菌の汚染実態調査と対策を継続してきた神奈川県内の1入浴施設において、営業再開前日及び再開後約1、3、5カ月

にそれぞれ調査を実施したところ、前年度では3つの採水箇所において、10~200 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されていたものが、休業期間中に定期的に配管内の原湯を入れ替え、循環させるとともに遊離残留塩素濃度を0.8~2.0 mg/Lと高濃度に保ったことにより、営業再開前日には1カ所から80 CFU/100 mLが、再開の1ヶ月後には同じ採水箇所において10 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されるのみとなった。

神奈川県内の総合病院において、調査した16試料中、2病室の洗面用蛇口3試料から、Lp1が検出され、菌数は10~20 CFU/100 mlであった。一般細菌数はいずれの試料でも不検出であった。従属栄養細菌は8カ所の蛇口のうち7カ所から採取した11試料で発育を認めた。この7カ所のうち給水系の6カ所の蛇口では、初流水と3L流水後の前後で最大2-log(100倍)の菌数の差がみられた。今回の結果では、従属栄養細菌の検出とLpの検出の間には相関がなかった(オッズ比1.077、95%信頼区間0.248-4.592)。

13. レジオネラ属菌を対象とした次世代シーケンシス解析

SBT解析において、SG1は1株がST1で、他の7株はすべてST552であった。SG6は5株すべてがST191であった。SG9の5株はすべてST2693であった。SNPs解析は*L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphiaをリファレンス配列として、血清群ごとに実施した。SG1では11,489のSNPsが得られた。ST552の7株のSNPsは全て一致した。ST1だった株は、他の株と7,176のSNPsが異なっていた。SG6では36,119のSNPsが得られ、5株は1~4つのSNPsが異なる3つの遺伝子型に分けられた。SG9では87,741のSNPsが得られ、5株は1~2つのSNPsが異なる3つの遺伝子型に分けられた

D. 考察

今年度は新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言等のために、予定された施設での実地調査や、消毒実験が行えなくなったり、多くの研修が中止されたりしたが、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、全体的にみると、例年と遜色なく研究は遂行されたと思われる。以下に各研究項目についての考察を述べる。

過炭酸ナトリウムに助剤を併用する入浴施設の配管洗浄方法を開発した。本法は、バイオフィーム中の金属によるフェントン反応が生じることで、少ない薬剤量で効率よくバイオフィームが除去できる。既存薬剤と比較したところ、すすぎの回数が削減され、使用薬剤量も低減されることから、少ない労力で洗浄することが可能となった。本洗浄方法の活用により、洗浄頻度の向上、浴場施設の衛生の向上が期待される。

これまでアルカリ性や中性の泉質に適用され、酸性での適用事例がなかったモノクロラミン消毒を 3 施設の pH5 程度の弱酸性の人工炭酸泉に適用したところ、臭気を発生させることなく、レジオネラ属菌の増殖が抑制できた。従属栄養細菌数の増殖抑制も示唆された。

これまでに、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 (FCM) 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、この判定がレジオネラ培養検査の定性結果とも一致することをモデル実験や施設調査で実証してきた。モノクロラミン消毒では、FCM により測定される散布図が遊離塩素消毒の場合と全く異なったことから、モデル実験でモノクロラミン消毒時の FCM 特異領域を設定し、モノクロラミン消毒の迅速評価法の有効性を実検体で確認した。「清浄」と判定された 19 浴槽からは培養法において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 浴槽からもレジオネラ属菌は検出されなかったが、硝化細菌である *Mycobacterium phlei* が検出され、モノクロラミン消毒に影響を与えている可能性が示唆された。

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。平板培養法との結果一致率は高いことから、本法は、日常の衛生管理には非常に有用な検査法と考える。しかしながら、今年度は偽陽性を示す菌種が複数確認されたため、偽陽性の発生頻度の把握や確認できる手法、偽陽性を低減する方法を検討する必要がある。また、定量検査のために専用トレイとシーラーが必要だが、それら高価な機器を使用しない定性法の確立には、培養条件等に多くの課題が残る。

モバイル型 qPCR 装置を使用した検討では、いずれのプロトコルにおいても、平板培養法に対する感度が LAMP 法よりも低かった。今後は、採水現場での濃縮・測定を想定したうえで、フィルターや濃縮率についてプロトコルを再検討する必要がある。

PALSAR 法は、これまでシャワー・カラン水を対象とした場合、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は 100%であったため、これらの検体では増菌培養を実施することが望ましい。

16S アンプリコン解析では、半数以上の浴槽水・シャワー水からからレジオネラ属菌のリードが検出され、Lp のリードも一部の検体から検出された。非結核性抗酸菌症の原因菌であるマイコバクテリウム属菌に関しては、浴槽水・シャワー水の約 9 割からリードが検出され、広くレジオネラ属菌およびマイコバクテリウム属菌が存在していることが示された。これらの菌が生きた状態で存在しているのかは明らかではないため、今後、死菌 DNA の PCR 増幅を阻害する EMA 処理などを取り入れた解析を実施する必要がある。

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ため、IMB により Lp1 を選択的に濃縮分離する方法を検討している。IMB 処理前に Lp1 特異的な qPCR によるスクリーニングを実施することで、不必要な IMB 操作を省くことができた。平板培養法で Lp1 不検出の 3 検体から Lp1 を分離することができた。平板培養法のみで Lp1 が分離された検体も過去にはあったことから、平板培養法と濃縮液を用いた Lp1-IMB 法を併用す

ることが望ましいと考えられた。

「入浴施設の環境水におけるレジオネラ迅速検査ガイドライン」を作成した。各施設において迅速検査法を導入する際は、それぞれの方法の特性を理解した上で自施設の平板培養法の結果と比較し、どのように利用するかを検討することが望ましい。

MLVA 法は利便性の高い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 MLVA 領域が増幅されないケースが明らかとなり、primer の改良が必要であると考えられた。Intermediate-size として扱う必要がある MLVA 領域については菌株数を増やし検討する必要がある。集団事例におけるコアゲノム SNPs 解析から詳細な菌株間の関連性が明らかとなったことから、個々の菌株の同一性を詳細に確定させたい場合は、可能であればゲノム解析を実施することが望ましいが、コスト等の面で難しい場合は PFGE、MLVA、SBT を併用して分子疫学解析を実施することが必要である。

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複数人で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。

本研究で作成している衛生管理ガイドライン案及び調査ガイドライン案が、保健所による入浴施設の指導での参考として活用され、またレジオネラ症発生時の原因究明に資することができるように、さらに改良を進めていきたい。

公衆浴場の浴槽で維持すべきとされている遊離残留塩素濃度（0.4～1.0 mg/L）であれば、SARS-CoV-2 は短時間に不活化されることが明らかとなった。モノクロロミンは一般的にウイルスに対する効果は遊離塩素よりも低く、SARS-CoV-2 に対しても同様であるとの結果が得られた。

緊急事態宣言に伴い休業した入浴施設のレジオネラ汚染状況を調査したところ、営業休業中はむしろレジオネラ汚染が少なかった。これは、休

業期間中に定期的に配管内の原湯を入れ替え、循環させ、遊離残留塩素濃度を高濃度に保ったことによるものと考えられた。しかし、完全なレジオネラ属菌排除には至らず、営業再開後は増加傾向が認められた。このため、今後も調査を継続するとともに新たなレジオネラ属菌対策を実施する必要があると考えられた。

医療機関の給水・給湯系について、レジオネラ属菌と合わせて一般細菌数と従属栄養細菌数を調査し、レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌と一般細菌の指標性を検討した。一般細菌は検出されなかった。従属栄養細菌数もレジオネラ汚染との相関はなかった。したがって、医療機関の給水・給湯系においてそれらの細菌数はレジオネラ汚染の指標とならず、レジオネラそのものを測定する必要があると考えられた。

近年、次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されている。入浴施設の管理への応用を検討するため、2015 年から調査を継続してきた神奈川県内の入浴施設で検出された Lp を用いて、次世代シーケンサーによる SNPs 解析を実施した。同一のクローンを起源とする菌株が、一年以上にわたり検出されていたり、異なる浴室から検出されたりしていた。このため、この入浴施設内にレジオネラ属菌の供給源があるものと推察された。

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。

入浴施設における省力化配管洗浄法を開発し、実地試験でその効果が検証できた。弱酸性の人工炭酸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。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 装置の試用、

PALSAR 法の改良を行った。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。携帯型フローサイトメーターを使用したモノクロラミン消毒の効果判定系を作成した。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、あるいは1つの入浴施設の複数箇所から長期にわたって検出される菌株のSNPs解析を行い、他の分子疫学解析法とも比較した。次世代シーケンサーはMLVA法の検証にも活用した。医療機関の給水・給湯系のレジオネラ汚染を調査した。

レジオネラ迅速検査ガイドライン、衛生管理ガイドライン案、調査ガイドライン案を作成した。

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/>) 中の研究会からののお知らせ・最新情報 (URL: <https://fs.lck-cloud.jp/u13673/研究会からののお知らせ・最新情報/>) 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](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歯科、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) 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.
- 2) 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)
- 3) 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.

- 4) Nakamura I, Amemura-Mackawa 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.
- 5) 金谷潤一 他. 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.
- 6) Seto J, Amemura- Mackawa 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) Inoue H, Baba M, Tayama S. Evaluation of Legiolert for Quantification of *Legionella pneumophila* from Bath Water Samples. 2020. 25:179-182.

2. 総説

- 1) 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.
- 2) 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

3. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.

4. 研修会

- 1) 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) .
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許出願中、配管の洗浄方法