

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官

研究要旨

公衆浴場におけるレジオネラ属菌等の病原性微生物による汚染に対応し、衛生管理を推進するため、①消毒洗浄、②迅速検査、③保健所衛生部局との連携、④培養検査の向上、⑤分子疫学の高度化の研究を行った。

①消毒洗浄による対策に関して、大きく分けて以下1から4の成果を得た。1:有機物を含む温泉利用施設の協力を得て、モノクロアミン消毒を行った。レジオネラ属菌を抑制することができた一方で、従属栄養細菌数や、16S rRNA 遺伝子コピー数の増加が確認された。菌叢解析の結果、*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immunidisolibacter* 属菌の増加が確認された。バイオフィルム対策として、洗浄が必要と考えられた。2:高アルカリ温泉水(pH9.6)を用いて、遊離塩素とモノクロアミンの消毒下における消毒効果を比較した。*Mycobacterium phlei* と *Bacillus subtilis* の消毒耐性は、ほぼ同程度であった。これらの1-Log 不活化に必要なモノクロアミンのCT値(濃度×時間)がおよそ250 mg/L・min に対し、遊離塩素は2,000 mg/L・min となり、モノクロアミンの方が遊離塩素よりも消毒効果が高かった。3:遊離塩素によるレジオネラ不活化試験の結果、高pHで消毒効果が低いことを改めて確認した。汚染が検出された医療機関は水道水のpHが高く、塩素消毒の効果不足が示唆された。4:電解オゾン水(0.8mg/L)を循環式ろ過器の有効容量(200L)となるように供給し消毒した結果、逆洗水中のレジオネラは、途中1回検出された以外は、約10ヶ月間継続して不検出となった。逆洗前の循環式ろ過器へ電解オゾン水を毎日供給する方法は、設備が単純で操作が簡易であった。

②培養よりも迅速な検査について、以下の成果を得た。1:フローサイトメトリー法等の非培養検査の結果を、衛生管理に反映する方法を整備した。消毒が不完全と判定された循環系に省力化配管洗浄技術を適用し、洗浄後はレジオネラを不検出にできた。別の施設では丁寧な対話により汚染源を特定し、故障への対応、盲管の撤去など、営業施設自身による適切な判断と処置につなげることができた。2:迅速・簡便なモバイル型 qPCR 装置を使用した遺伝子検査法は、プロトコルを改善することで、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法と同等の感度・特異度を示した。

③保健所、衛生部局による監視指導の実態把握や連携と対応のさらなる向上を意図して、以下の検討を進めた。1:自治体(2県、1市)の衛生部局あるいは保健所職員を対象に、オンラインヒアリングを行った。立ち入り施設の検水がレジオネラ陽性になることがあり、その多くは低濃度であった。消毒や洗浄の不足といった問題に対して、徹底させる指導の方法が課題とされた。保健所職員や営業施設向けの研修、講習が実施されて、マニュアルも整備されていた。患者と施設の菌株の不一致、培養できないことも多くあった。保健所と衛生研究所との連携が取られていた。2:入浴施設の衛生管理の手引きの改

定を目的に、ワーキンググループ(WG)と検討会を立ち上げて検討を行った。WG では浴槽水の塩素濃度の測定における問題点等を検討し、関連する Q&A の質問の作成を試みた。検討会では入浴施設において保健所が行う監視指導時に利用する調査票(確認調査票及び記録調査票)の検討を行い、確認調査票案を作成した。

④レジオネラ培養検査の向上に以下を検討した。1:容易ではない培養検査の精度向上を目的に、外部精度管理の情報を整理した。英国 FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) に試験的に参加した結果、選択肢の 1 つになり得ると考えられた。2:レジオネラ属菌の新規検査法であるレジオラート法の前処理法として、酸処理 5 分間が適切との結果を得た。

⑤分子疫学の高度化について以下の成果を得た。1:全ゲノム解析を行い、各遺伝子型で組換え領域の割合や SNPs 数(一塩基多型、single nucleotide polymorphism)に差異を認めた。疫学的に関連のある事例を解析した結果、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株間の SNPs は 0~41 であった。2:浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌を施設間で比較し、施設へのレジオネラ属菌の定着を確認した。洗浄消毒により除染できておらず、より効果的な対応が必要と考えられた。検出頻度の高い遺伝子型(ST、Sequence-Based Typing)は、状況によっては、より解像度の高い SNPs 解析が推奨された。3:従来の免疫凝集法で判別不能だった菌株が、新しく開発した multiplex-PCR 法により、血清型別できるようになった。SG13(Serogroup)と SG14 の型別能力を向上させる改良を加えた。バンドサイズの判定を容易にするポジティブコントロールを用意した。配布用プロトコルを作成した。4:プライマーのミスマッチにより増幅されない MLVA 領域(反復配列多型解析、Multilocus variable-number tandem-repeat analysis)に修正対応した。レジオネラ感染事例の全ゲノム解析を行い、施設環境由来株と患者株間の SNPs は 4 個以下であった。

研究分担者氏名・所属研究機関名、及び職名

枝川 亜希子・大阪健康安全基盤研究所

主任研究員

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

小坂 浩司・国立保健医療科学院

上席主任研究官

田栗 利紹・長崎県環境保健研究センター 次長

中西 典子・神戸市健康科学研究所 副部長

前川 純子・国立感染症研究所 主任研究官

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

公衆浴場は、適温の湯でレジオネラ等病原性微生物が増殖し、レジオネラ集団感染が繰り返された。衛生向上を目的とする公衆浴場において、衛生低下の問題が生じた(2002 年 宮崎県他)。浴場施設の塩素消毒が緊急避難的に導入されたが、高 pH(8~)での消毒効果の不足や、塩素臭の敬遠から消毒が不徹底等に陥る(2022 年 福岡県)。未だに感染事故がある(2021 年 広島県、2022 年 兵庫県)。

先の研究班の成果として、一般的な遊離塩素ではなく、結合塩素(モノクロアミン)の消毒によって、消毒の不足や塩素臭の回避が可能となった。

成果は厚労省通知「公衆浴場における衛生等管理要領等について(令和元年 9 月 19 日生食発 0919 第 8 号)」となり、自治体条例への反映が始まった。本研究は浴場施設の衛生向上と推進、さらに他の管理や対策方法の選択肢を増やすことを目的とする(図 0)。

以降、1 から 13 まである課題内容別に、目的、方法、成果等を記載した。この数字は分担研究報告書の順番に対応しており、図表の番号もこれに対応させた。

A1. モノクロミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

公衆浴場はもっぱら遊離塩素消毒が行われるが、遊離塩素とアンモニアの反応により生成される結合塩素のモノクロミンはレジオネラ属菌に対する有効性が確認されている。ただしモノクロミンの連用により、*Mycobacterium phlei* 等の雑菌の増加が報告される。アンモニア態窒素濃度が比較的低い温泉を利用した公衆浴場において、モノクロミン消毒の実証試験を行い、消毒効果、濃度の安定性、並びに菌叢の変化を検討した。

A2. *Mycobacterium phlei* 他の不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対するモノクロミン消毒効果の有効性

モノクロミン消毒の連用により生じる *M. phlei* の消毒抵抗性をより詳細に、客観的に評価するには、他の細菌の消毒と比較する方法が考えられる。当該研究では塩素消毒に弱いとされるグラム陰性菌の大腸菌と、強いとされるグラム陽性菌の枯草菌を比較対象とした。pH9.6 の高アルカリの温泉水を用いて試験管内での消毒試験を行った。

A3. 高 pH の遊離塩素によるレジオネラ消毒効果

の低下

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ属菌の汚染は、院内感染の原因となることから¹⁾、衛生管理が重要となる。複数の蛇口からレジオネラ属菌を検出したことから、自動塩素添加装置を設置し、水道水の遊離塩素濃度を高く(約 1.0 mg/L)維持する対策を講じた。対策により、不検出または減少の結果が得られたが、完全な清浄化には至っていない。要因として考えられたのが、水道水の pH が高値(7.9~8.6)であることだった。消毒効果の低下を確認する目的で、その水道水を使用して、そこから分離された菌の消毒実験を試験管内で行うこととした。

A4. 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

ろ過器を有する循環式浴槽はレジオネラ属菌に汚染されやすく、「1 週間に 1 回以上、ろ過器を十分に逆洗浄して汚れを排出するとともに、ろ過器及び循環配管について、適切な方法で生物膜を除去、消毒」するとされている²⁾。これを受けて、過酸化水素や高濃度塩素を用いる方法等が紹介されている^{3,4)}。しかし、大容量のろ過器には、多量の薬液と外付けタンク等を必要としたり、中和排水等の後処理が必要だったりして、多くの労力やコスト負担が避けられない。過酸化水素や塩素以外の方法として、オゾンに着目した。日本産業衛生学会では、作業環境基準(1 日 8 時間労働)としてのオゾン許容濃度(健康上の影響がないと判断される濃度)を 0.1 ppm(0.2 mg/m³)と定めている⁵⁾ものの、水溶液のオゾン水については特段の基準値等は定められていない。水の電気分解により生成するオゾンは、相対的に生成量が少なく、安全上の問題が少ないと考えられた。本試験では、電解生成オゾンを用いたろ過器の消毒・洗浄方法について検討した。

A5. フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

レジオネラ属菌は培養検査が標準検査法として用いられるが、7~10 日間を必要とする専門性の高い検査であるために、現場の日常的な指標として衛生管理に反映させるにはかなりの努力を要する。迅速な検査法として、フローサイトメトリー法 (FCM) ⁶⁾、遺伝子検査法 ⁷⁾ および ATP 法 ⁸⁾ 等の非培養検査法を検討してきた。検査の結果を施設衛生管理者と共有し、対話により消毒や細菌汚染による衛生状態等への施設の理解を促すことで、公衆浴場の衛生管理の向上に繋がれることを期待している。

A6. 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

新たなレジオネラ検査法を確立・普及することを目的に、1. モバイル型装置を用いた迅速な検査法の開発、2. 患者および地域流行株の解析によるその特徴の解明、3. 患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株のゲノム SNPs (一塩基多型、single nucleotide polymorphism) 解析を行った。近年に普及し始めたモバイル型のリアルタイム PCR 装置であれば、採水現場で直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出できる。平板培養法や他の遺伝子検査である LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法と相関が取れるよう、プロトコルの改良を検討した。レジオネラ症患者から検出される遺伝子型 (ST、Sequence-Based Typing) の偏りや、患者に感染・定着しやすい菌株の解明も企図した。

A7. 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態

保健所、衛生部局は、公衆浴場の事業者に対して、衛生管理に係る監視指導を行う立場を担っている。公衆浴場の衛生管理の向上には、消毒や検出法だけでなく、事業者への適切な監視指導等も重要と言える。地方自治体における公衆浴場の監視指導業務の担当職員を対象に、ヒアリングを行い、レジオネラ症発生防止や発生時の対応に係る監視指導の実態や課題を整理した。

A8. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

厚生労働省から技術的助言として発出されている管理要領やマニュアルには管理方法等の具体的な記述が少ないため、具体的な内容提示が保健所等から求められ、手引が整備された。これらの改定を継続し、内容不足の解消や新規の追加を行う。

A9. レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS[®]への試験的参加

浴槽水を対象としたレジオネラ検査は、行政指導の根拠となることに加え、日常的な衛生管理を行う上での重要なデータであることから、高い精度が求められる。一方、培養検査法に複数の方法、選択肢があり (濃縮方法として過濃縮法または遠心濃縮法、前処理として酸処理または熱処理、選択培地は GVPC α 寒天培地、WYO α 寒天培地など)、検査精度にばらつきが出やすい要因となっている。各検査機関は検査精度の確認を行っているが、従来参加していた外部精度管理は、検査方法が指定され、各施設の日常的な検査方法を使っていなかった。各施設の方法で試験に参加できるよう、FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) 他外部精度管理の選択肢を整理紹介することとした。

A10. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

レジオネラ属菌の検査に平板培養法が用いられるが、前述の通り検体の濃縮方法、分離培地の種類、コロニーの鑑別法等が複雑にあり、精度が課題となる。近年の水質管理に開発されたレジオラート/Quanti-Tray 法は、専用の粉末培地と検体を専用トレイに入れて培養するので、複雑な手順が不要である。しかし稀ではあるものの、一部検体において交雑菌による偽陽性が生じるので、検体の培養前に酸処理を加えた改良プロトコルの有効性を検討する。

A11. 浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

公衆浴場法等でレジオネラ属菌が検出された場合、通常、施設では清掃消毒等が行われ、陰性が確認される。しかし、継続的に同じ血清群が検出される施設が散見され、菌の定着が疑われる。分子疫学により、施設への定着状況について検討することとした。

A12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良

レジオネラ症の診断の 95%は、尿中抗原の検出によって行われている。従来は SG1 (Serogroup, 血清群)の検出が主であったところを、2019 年より他の血清群による感染も診断可能な尿中抗原キットが販売され、2 から 15 の群別の必要性が高まりつつある。一方、培養の時間をかけず少量の菌体から血清群を型別できる方が、感染源の特定に有利である。当該研究では、血清群別を微量な試料から行うことの出来る multiplex-PCR (M-PCR) 法を開発した⁹⁾。免疫血清では群別不能だった菌株の型別に応用し、SG13 と 14 の検出の改良も行い、レジオネラ・レファレンスセンターを通じるなどして、普及を目指している。

A13. 分子疫学解析法の活用と環境水における NGS を用いた網羅的解析

感染源の特定には、患者分離株と、推定感染源とされる環境分離株の一致を確認する。この分子疫学の方法として、パルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE 法、製造中止が決定)、塩基配列の多型解析 (Sequence based typing, SBT 法)、反復配列多型解析法 (Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA 法)があり、新しく提案した MLVA 法の普及が進んでいる¹⁰⁾。方法間で結果に相違が生じることもあり、塩基配列の確認やプライマーの修正といった丁寧な対応で、信頼性の維持向上に務めることとなる。本研究では、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列の解析 (Next-generation sequencing, NGS 法)を取り入れて、従来の型別法の妥当性を評価し、最適化することを企図している。従来法の解像度の不足には、全ゲノム解析による分子疫学を行い、解析法の確立と基礎データの蓄積を目指している。

MLVA 法は、増幅されない MLVA 領域があったことから、ゲノム解析で判明したプライマーのミスマッチ部分を修正し、新たなプライマーを用いた Multiplex PCR の系の構築を目指した。あるレジオネラ感染事例は患者分離株が 1 名分しかなく、SBT 法の解像度が不足したことから、全ゲノム解析による汚染源の推定を行うこととした。

B. 研究方法

研究班を①消毒洗浄、②迅速検査法、③保健所衛生部局との連携、④培養検査の向上、⑤分子疫学の大きく分けて 5 分野に編成し、これらの成果により直接あるいは間接的に衛生管理の向上と推進が得られることを目指した。研究分担者 10 名、研究協力者多数の参画を得て、研究を遂

行した(図0、表0)。地衛研・保健所や民間企業を通じて、現場施設の支援、協力や参加を得た。感染研と地衛研で形成するレファレンスセンターの協力を得て、患者株や環境株の収集解析を行った。

B1. モノクロアミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

アンモニア態窒素 0.2 mg/L を含む、pH7.5 の源泉水を利用する入浴施設の協力を得た。入浴者数は 1 日に 400~800 名程度で、浴槽水の循環ろ過システムを有しており、毎日換水・清掃していた。試験対象浴槽は約 45 m³ の内湯とした。モノクロアミン生成装置を設置し、概ね 3~6 mg/L の範囲で循環システムに添加した。各種測定は定法に従い、モノクロアミン導入前の 4 週間と導入後の 4 週間、週に 1 回、営業終了後に実施した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 42°C の 14 日間で求めた。浴槽水中の 16S rRNA 遺伝子コピー数の定量、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)。

B2. *Mycobacterium phlei* 他の不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対するモノクロアミン消毒効果の有効性

先の *M. phlei* の不活化試験^{11, 12)}の方法に準拠して行った。検液として、pH9.6、電気伝導度 EC = 39 mS/m のアルカリ泉を使用した。菌株は大腸菌 (*Escherichia coli* ATCC25922) と枯草菌 (*Bacillus subtilis* NBRC3134) を用いた。濃度調整した菌に、モノクロアミンと遊離塩素を、それぞれ低濃度 (約 5ppm)、中濃度 (約 10ppm)、高濃度 (約 20ppm) の 3 段階の濃度となるように添加した。消毒剤の濃度 (C) と、接触時間 (T)

の積として CT 値 (Concentration × Time value)¹³⁾ を算出した。消毒前後の菌数から消毒された菌の割合 (不活化割合、生残率) を求めた。

B3. 高 pH の遊離塩素によるレジオネラ消毒効果の低下

当該医療機関の水道水から分離した *L. pneumophila* SG1 を使用した。医療機関の受水槽から採水して濾過滅菌した水道水 (pH7.9、pH 未調整) と、ここから HCl 水溶液を用いて pH 7.0 に調整した水道水を使用した。その遊離塩素濃度は 0.69~0.76 mg/L であったのを、0.25 mg/L になるように、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液および 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を用いて調整した。遊離塩素濃度が 0.25 mg/L になるように 5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加した PBS (pH 8.3 および pH 7.0) を比較に使用した。消毒試験中の試験液は 20°C の水浴中に静置した。分取した試験液 1 mL 中の塩素は 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液 2 μL を添加することで中和し、BCYE α 寒天培地で菌数を測定した。レジオネラ属菌の生存割合と、遊離塩素濃度 (C) と経過時間 (T) を乗じた CT 値から不活化曲線を求めた。

B4. 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

某スーパー銭湯における小規模なアトラクション浴槽 (井水、約 1 m³) の循環システムを試験対象とし、営業終了後、逆洗前のろ過器に対して、電解オゾン水を毎日供給した。この検討は令和 3 年度より開始して当初の成果を一部報告したところで、さらに年余にわたって継続することで本結果を得ている。電解オゾン水は、施設で使用している井水を市販のオゾン生成電極 (オゾンバスター PRO、オゾンマート製) で電気分解することにより生成した。試験対象ろ過器の清浄化を確認するために、週 1

回の頻度で、営業終了後のオゾン供給前に、逆洗水の水質を分析した。逆洗水の採水は、ろ過器をブローによりエアレーション(約 200 L/min、約 5 分間)¹⁴⁾した後に行った。これにより、ろ材に残存する汚れを分析評価できるようにした。

B5. フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

循環ろ過式と掛け流し式の2つの入浴施設の協力を得た。民間事業者等と連携して、現場施設を調査、予防・改善の実施例を蓄積する。省力化配管洗浄による生物膜対策を、施設衛生管理者が実体験する機会も用意した。掛け流し式では、源泉ポンプ付近の汚染状況を調査した。

B6. 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

公衆浴場などから得たレジオネラ属菌を用いた。モバイル qPCR 法 (PicoGene[®] *Legionella* spp. Kit および PicoGene[®] PCR1100 (日本板硝子)) は、核酸抽出に新規の活性炭を含む吸収剤を追加した。レジオネラ症患者から高頻度に検出された 4 つの遺伝子型 (ST23、ST120、ST502、ST505) の菌株について、SNPs 解析を実施した。イルミナ社のプロトコルに従い、Nextera XT DNA Library Preparation Kit、Nextera XT Index Kit および MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles)を用いてライブラリーを作製後、RUN を実施した。遺伝子型ごとに BactSNP で pseudogenome を作成後、Gubbins を用いて組換え領域を除去し、SNPs を比較した¹⁵⁾。

B7. 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態

3 自治体(A~C 自治体)の保健所・衛生部局を対象に、オンラインでヒアリングを行った。A、B 自

治体は県保健所、C 自治体は市保健所であった。質問票は、事前に送付した。質問内容は以下のとおりであった。・レジオネラ症関係に対応する組織、対象とする施設 ・レジオネラ症発生状況 ・レジオネラ症対応で実施していること ・現状の課題の有無とその程度 他。

B8. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

ワーキンググループ(以下 WG)と入浴施設の衛生管理の手引き検討会(以下検討会)を立ち上げた。WG のメンバーは研究班に所属する研究分担者と研究協力者の一部とした。検討会のメンバーは、自治体の本庁あるいは保健所の環境衛生部署に所属し、入浴施設の監視指導に当たっている自治体職員とし、入浴施設の現場における監視指導の経験を活かした内容を手引きに盛り込むことを目指した。

B9. レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS[®]への試験的参加

国内外における外部精度管理の情報を収集し、選択肢の一つとして英国 FAPAS に参加した。

令和 4 年 10 月実施された FAPAS レジオネラ外部精度管理 (LG0119) に、国立感染症研究所、大阪健康安全基盤研究所、アクアス株式会社、日本建築衛生管理教育センター、大阪府茨木保健所、大阪府藤井寺保健所、大阪府泉佐野保健所の計 7 機関が参加した。非選択培地 (BCYE α 寒天培地) が基本とされたが、選択培地で参加も可能との回答を得た。ただし、その場合は選択培地を用いた参加機関のみで解析を行うとのことであったため、最大限の情報が得られるよう、非選択培地と選択培地の両方の検査を実施した。

B10. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

公衆浴場の温泉水、浴槽水等の計 90 検体を検査対象とした。レジオラート (IDEXX) の未処理は飲料水用 10 mL プロトコルで実施した。これに追加する酸処理として、検体 10 mL に×20 前処理剤 (IDEXX Pre-treatment reagent) を 0.5 mL 加えて 5 分又は 10 分後、15 % KOH を 0.3 mL 加えた。レジオラート粉末を滅菌水 90 mL で溶解し、検体全量を加えよく攪拌した後、専用トレイに封入し 37°C で 7 日間培養した。レジオラート法 MPN 値 (Most probable number) と平板培養法 CFU 値 (Colony forming unit) を比較した。なお、平板培養法はいずれかの方法で検出された結果を採用しており、前処理条件が同一ではないので、単純比較ではない。遺伝子検出 (LAMP 法) も行った。

B11. 浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

同一施設から異なる時期に採取された同一血清群のレジオネラ属菌を検討対象とした。すなわち、18 施設から分離された *Legionella pneumophila* の保存株 99 株を対象とし、SBT 法、MLVA 法を実施した。一部 19 株は iseq100 を用いて全ゲノム配列を解読し、Philadelphia1 (NC_002942) を参照株として、BioNumerics を用いて SNPs 解析を行い、相同性を検討した。

B12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良

レジオネラ免疫血清「生研」(デンカ株式会社) を用いて判定不能 (SGUT, serogroup untyped) とされた *L. pneumophila* 41 株を使用した。基準株として、日本国内で環境から分離された SG1 から 15 の 15 株を使用した。M-PCR 法による SGg (SG-genotypes) の決定は、Nakaue らの方法⁹⁾にしたがった。混合 DNA の作製には、DNA Blood & Tissue

Kit (QIAGEN) で抽出した精製 DNA を用いた。

B13. 分子疫学解析法の活用と環境水における NGS を用いた網羅的解析

MLVA 法の評価は *L. pneumophila* SG1 の 439 株を対象とした¹⁰⁾。レジオネラ感染事例における全ゲノム解析では、同一患者の喀痰に由来する 14 株と、施設環境から分離の 18 株 (浴槽水由来 5 株、ヘアーキャッチャー由来 5 株、ろ過器由来 8 株)、および 2013 年に同一施設の浴槽水から分離の 1 株を用いた。

MLVA 法の改良は、Sobral ら¹⁶⁾によって報告された 12 領域のうち、Lmps01、Lmps13、Lmps31 の 3 領域を、Pourcel らのプライマー^{17,18)}に変更し、増幅産物を得られるようにした。増幅産物のフラグメントサイズは、AB3500 Genetic Analyzer を測定に使用した。株間の類縁関係を明らかにするために、Minimum spanning tree (MST) を作成した (BioNumerics)。

全ゲノム解析は、MiSeq (Illumina) を用いてリードデータを取得した。SNPs 解析には BactSNP を用いて pseudogenome を作成し¹⁹⁾、組換え領域の除去に Gubbins を用いた¹⁵⁾。リファレンスに、*L. pneumophila* str. Paris 株 (Accession no.; CR628336.1) のゲノム配列を用いた。

(倫理面への配慮)

病原体の取り扱い、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがった。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. 結果および考察

C1. モノクロラミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

浴槽水のレジオネラ属菌は、モノクロラミン導入前の1検体から検出され、他は全て検出下限値未満で、モノクロラミンは有機物を含む泉質においてもレジオネラ属菌を安定的に抑制できていた。一般細菌数はいずれも40 CFU/mL未満であり、モノクロラミン消毒導入前後で定量値に大きな変化は確認されなかった(図1-1)。一方、導入後の従属栄養細菌数は1,000~4,000 CFU/mLと導入前よりも100倍程度に有意に増加した。浴槽水中の16S rRNA遺伝子のコピー数は導入後、100倍から1,000倍程度に有意に増加した。増加した従属栄養細菌の16S rRNA遺伝子は、解析した7株全てが*M. phlei*と100%(446 bp/446 bp)一致していた。現在までのところ、pHによる消毒効果の強弱と、入浴者による汚染の負荷量に、従属栄養細菌数の増加との関連性が示唆された。

菌叢解析(図1-2)の群間比較解析により細菌の系統ごとの増減を解析した結果、モノクロラミン導入により*Staphylococcus*属菌、*Aquidulcibacter*属菌などの111系統が有意に減少した。*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus*属菌、*Immundisolibacter*属菌など152系統が有意に増加したが、いずれも環境中に存在する細菌であり²²⁻²⁴⁾、病原性の報告はなかった。レジオネラ属菌や、R2A培地で増加を確認した*M. phlei*は、いずれも有意な増減はなかった。

C2. *Mycobacterium phlei* 他の不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒効果の有効性

検液中のモノクロラミン、遊離塩素とも、菌の添加から実験終了まで、少なくとも8割前後の濃度を維持しており、消毒に問題はなかった。*M. phlei*と*B. subtilis*の不活化は同程度で、これ

らの1-Log不活化にはモノクロラミンがCT値およそ250 mg/L・minに対し、遊離塩素はCT値およそ2,000 mg/L・minであった(図2-1、2-2)。モノクロラミンによるこれらの3-Log不活化はCT値750~800 mg/L・minと測定できたが、遊離塩素では3-Logに達しなかった。すなわち、高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の有用性を改めて確認した。*M. phlei*の消毒耐性の強さはこれまでも示唆されていたものの、*B. subtilis*に匹敵する耐性を有することが明らかになった。本実験においては消毒効果が認められたものの、実地試験ではモノクロラミン消毒を連用中に*M. phlei*が多く検出されており、増殖の場や消毒を回避する仕掛けになお一層の興味を持たれる結果であった。

C3. 高pHの遊離塩素によるレジオネラ消毒効果の低下

試験中の遊離塩素濃度はおよそ維持できており、開始前に0.20~0.27 mg/L、30~90分後にその50%以下であった。pHはほとんど変動がなかった。水道水における99%不活化CT値は、pH 7.9未調整で0.89、pH 7.0で0.31となり、pH 7.9未調整水道水の方が約2.9倍大きかった(図3)。比較に行ったPBSにおける99%不活化CT値は、pH 8.3で1.40、pH 7.0で0.36となり、pH 8.3の方が約3.9倍大きく、水道水の結果と同様にpHの影響があった。水道水のpHが高いことで、レジオネラ属菌に対する塩素の消毒効果が低いことを、実験的に確認した。蛇口からレジオネラの検出が続いている以上は、消毒が不十分である可能性が示唆された。

C4. 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

当該スーパー銭湯は入館者数が多く、ろ過器

に汚れが蓄積していることが疑われた。逆洗水のレジオネラ属菌は、オゾン供給前は 30～330 CFU/100 mL の間で検出されていたが、ろ過器の有効容量(200L)となるようにオゾン供給を開始した試験 77 日目から継続して不検出となった(図 4)。浴槽水のレジオネラ属菌は、91 日目に 10 CFU/100 mL で検出された以外は継続して不検出であった。オゾン供給を一時停止した 186 日目から 245 日目までの間、レジオネラ属菌は不検出だったものの、遊離塩素は減少傾向、一般細菌数と ATP が増加傾向であった。オゾン供給を再開した 245 日目からは、電解槽からの極少量の漏水が突発的に発生しており、オゾン供給の不足が懸念された。322 日目からは、2 個あったオゾン電極の 1 個が停止し、オゾン濃度が 0.8 mg/L から 0.4 mg/L へと減少した。レジオネラ属菌は 364 日目まで浴槽水と逆洗水ともに不検出であったが、370 日目から両者ともに 10 CFU/100 mL の値で検出され、オゾンの供給が不足した様子であった。電解槽の抜本的な更新が必要になったことを受けて、385 日目(2022 年 9 月 3 日)に本試験を終了した。ろ過器のオゾン処理により、逆洗水のレジオネラ属菌を、約 10 ヶ月間継続して不検出とできた。

C5. フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

具体的な施設調査の手順を作成した(図 5)。
1 番目に、保健所や民間の環境衛生管理者等と連携して入浴施設に研究協力を申し入れる。
2 番目に、施設の衛生管理者との対話の中で、調査対象とする試料と検査方法を定める。この時、非培養検査法を中心に提案するが、管理者の意向によっては培養検査も加える。計画に基づいて検査を実施する。3 番目に検査結果を施設の衛生管理者と共有する。4 番目に、4-a : 衛生状態が良好な場合は、維持を伝える。4-b : 衛

生状態に問題があった場合は、消毒の強化等の改善手段を提案し、必要に応じて配管洗浄等を含めて、これら対策を事業者にも体験してもらおう。5 番目に、培養法で浴槽水のレジオネラ陰性を確認する。6 番目の最終的に、以上から導き出される重要管理点を、施設の衛生管理マニュアルに反映、日常管理に役立ててもらおう。

H 入浴施設は、ジェット浴に課題があり、自主的な配管洗浄を実施したばかりであったが、FCM 法では消毒効果が不完全と判定され、レジオネラ遺伝子も検出されていた。省力化配管洗浄剤²⁰⁾を用いて洗浄した結果、洗浄中の試料に多数の細菌の放出が確認され、洗浄効果は明らかであった(表 5)。レジオネラも不検出になった。

掛け流し式の J 施設では、対話の中で、原水汲上ポンプ後にあった 2 つのろ過器の 1 つが閉塞していたことと、盲管が判明した。改修により原水からレジオネラ属菌が検出されなくなり、丁寧な対話が汚染源対策の 1 例になった。

C6. 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 の反応阻害を避けるため、プロトコルを改良し、活性炭を含む吸収剤を添加した。結果として、今年度の検討では遺伝子陰性培養陽性検体は認められなかった。また、感度・特異度は LAMP 法と同等であった(表 6-1)。

疫学的に関連のある事例の全ゲノム解析では、患者と入浴施設から分離された菌株間の SNPs は 0～41 個であった。

レジオネラ症患者から高頻度で検出される遺伝子型(ST23、ST120、ST502、ST505)の全ゲノム解析では、外来 DNA によって生じる組換え領域内の SNPs が多いと判明した(表 6-2、図

6)。とりわけ ST120 は、検出された SNPs の 99% 以上が組換え領域内であった。通常の SNP 解析として組換え領域内の SNPs を除外すると、ST120 は疫学的な関連性がない 2 株間で SNPs の 5 以内の組み合わせが 62 通りも存在した(表 6-2)。高頻度に検出される遺伝子型の SNPs 解析は、組み換え領域を除外しない解析や、実地疫学と分子疫学から総合判断する丁寧な感染源調査が重要と考えられた。

C7. 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態

ヒアリングの主要な回答を表 7 に抜粋した。いずれの自治体も立ち入り施設からレジオネラが検出されることがあり、多くは 10~< 100 CFU/100 mL であった。陽性施設の特徴として、消毒の方法に問題があり、清掃頻度が十分でない場合が多い傾向にあった。危機意識が高くない施設の清掃・消毒方法に欠陥があったり、自主検査を規定の頻度で実施していない施設も多く、衛生管理を徹底させる方法が課題との指摘があった。

職員へのレジオネラ症に関連した研修や事業者向けの講習が、実施されていた。課題として、実地研修の現場施設の確保を挙げられた。

患者発生時の対応は、いずれの自治体でもマニュアルが作成されていた。患者株と施設株は一致しない方が多く、培養できないこともあった。試料の採取は保健所、検査は衛生研究所で実施されて、いずれの自治体も保健所と衛生研究所との連携が取られていた。

C8. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

WG では浴槽水の塩素濃度の測定における問題点を議論し、Q&A で想定される質問を作成した。『営業時に浴槽水に次亜塩素酸ナトリウムを添

加して消毒を行っているが、DPD 法(N,N-Diethyl-p-phenylenediamine)で遊離残留塩素濃度を測定すると次のような現象が発生した。こうした現象が起きた場合はどのように解釈して対処すればよいか。』

Q1、現象 1:DPD 試薬を加えても全く発色しない。

Q2、現象 2:DPD 試薬を加えると一瞬発色するがすぐに透明になる。

Q3、現象 3:DPD 試薬を加えて次第に色が濃くなった。

検討会では手引きにおいて例示するチェックシートを中心に検討し、確認調査票案(構造設備基準、維持管理基準、水質基準)を作成した(表 8)。

C9. レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS[®]への試験的参加

従来から参加のサーベイは、R4 年度も各施設が日常的に行っている検査方法に対応しない回答であった。英国 UKHSA (UK Health Security Agency) の外部精度管理に参加している国内検査機関もあったが²¹⁾、決済や英語対応といった障壁が存在した。FAPAS は国内代理店を通じての決済とサポートを受けることが可能であった(表 9)。

試験的に FAPAS に参加した。試料(菌量の違う 2 種の試料 A、B)は常温で英国から空輸され、受取り後は検査開始まで冷蔵で保存した。指示書に記載された検査方法は、「ルーチンメソッドで検査すること」のみであり、各施設の検査手順での参加が可能であった。検出/不検出、菌数、菌種等を報告し、締切後の約 3 週間で分析レポートが返却された。返却された Z スコアから、全参加者中の位置を確認できた。他に参加施設の検査方法(フィルターや使用培地の種類)の情報もあり、参加者の知りたい情報が記載されていた。申込みから各種問い合わせまで、

すべて日本語で国内代理店を通じて行い、対応は丁寧かつ迅速であった。

C10. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

レジオラート法は、平板培養法と93%の高い一致率を示した(表10-1~10-4)。例数は少ないが、未処理で検出された1検体は酸処理5分及び10分では陰性で、未処理の陽性は偽陽性と推察され、酸処理が有効であった。酸処理により感度が低下することから、5分が適切と考えられた。50 MPN/100mL以上の検体は、酸処理10分でも全て陽性判定であったことから、交雑菌が多い場合に10分も有効と考えられた。結果の不一致はレジオネラ菌数の少ない検体に留まった。

C11. 浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

18施設のすべてで同一のSTが複数回検出された(表11)。複数のSTが複数回検出された施設もあった。検討できた5年の範囲で、4年2ヶ月の定着例があった。16施設は11か月以上の定着であった。同一ST株のMLVA型はおおむね同一か、1領域違いであった。反対に血清群5及び6で、異なるSTから同一MLVA型もあった。

血清群1のうちSTが一致するなどした19株の全ゲノム解析を実施した。同一STであっても施設ごとに分別できて解像度が高かった。同一施設から分離された株間のSNPs数は0のものから最大55であった。施設によっては、複数の遺伝子型(ST、MLVA、SNPs)が混在していた。

C12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良

レジオネラ免疫血清において判定不能のSGUTとされた41株を、6種類のSGg(SG-genotypes)に

分けることができた(図12-1)。本法を用いると判定不能とならず、いずれかのSGgに型別できるので、疫学調査において有用な型別法と考えられる。従来の免疫凝集法は必要な菌体量の確保に培養日数がかかるが、PCRを用いた本法は、ごく少量の菌数で施行できるので、感染源特定の時間短縮が期待できる。

SGg1のレジオネラ免疫血清による型別を再度検討したところ、前処理の加熱の有無により結果が変化すると判明した。M-PCR法ではそのような特別な検討を必要としない。

SG14に特異的な遺伝子を検出するプライマーを設定し、SGg14の群別を可能とした。SGg13の従来のプライマーには、日本で多く見られる株とミスマッチがあり、混合塩基から成るプライマーに改良した。改良したプロトコルを、レジオネラ・レファレンスセンターを通じて地方衛生研究所に配布した。普及に向けて、陽性コントロール・サイズマーカーも用意した(図12-2)。

C13. 分子疫学解析法の活用と環境水におけるNGSを用いた網羅的解析

MLVA領域(Lmps01, Lmps13, Lmps31)は、プライマーのミスマッチにより増幅されないことがあると判明し、プライマーの変更により改善した。他の複数の連携機関に活用してもらいながら、評価と修正を続ける計画である。

レジオネラ感染事例において、患者および疑似施設環境から、*L. pneumophila* SG1が分離された。SBT法でST138と型別されたが、これはよく検出される遺伝子型で、感染源の推定には根拠が弱い状況であった。患者分離株が1名分に限られ、他での感染が否定しきれなかったことから、より高解像度な全ゲノム解析に進んだ。患者株と施設環境株の間のSNPs数がわずか4個以下となる組合せが確認され、当該施設が感染源との判断

は妥当と考えられた(図 13)。Clade II と III に患者由来株と環境由来株の両方の株が含まれ、SNPs は 4 個以下であった。なお、患者由来の 14 株に多様性があり、その間の SNPs が 0~41 個であった。患者は多様なレジオネラ株に重複感染したと示唆された。患者株および施設環境株の間の SNPs 数も 0~42 個の範囲内と少なく、これらはとても近い関係にあると判明した。

以上の通り、公衆浴場の衛生管理の推進に有用な結果を得た。高 pH で塩素消毒の効果が低下することを、*L. pneumophila*、*M. phlei* の消毒試験により改めて確認した。高 pH には、遊離塩素よりモノクロラミンの消毒効果が高い結果であった。しかしモノクロラミン消毒を続けると従属栄養細菌数が増加し、バイオフィルムの発生が懸念された。モノクロラミンによる消毒だけで解決しようとせず、洗浄が大事なことに代わりはなかった。菌叢を解析した範囲において、モノクロラミン使用中の病原細菌の増加は認められず、レジオネラ属菌も抑えられていた。強く汚染を受けると考えられるのが循環ろ過器だが、これに対しては、オゾン消毒を併用した逆流洗浄により、レジオネラ属菌を 10 ヶ月の長期に抑える実施例が得られた。

レジオネラ培養検査は 1~2 週間の時間を要することから、より迅速な検査法があれば有用である。フローサイトメトリーやモバイル qPCR 法を整備し、特に前者の応用が進んだ。現場施設の不衛生な状態を感知し、丁寧な対話により施設が改善した 2 例が得られた。従来の培養検査法については、精度向上に新しい外部精度管理の選択肢を用意し、また複雑な前処理を避けられるレジオラート法を検討した。

公衆浴場の実際の現場に立ち入るのは保健所の衛生部局であることから、指導の内容や根拠が大事になる。実態を把握し、不足部分を補うようヒ

アリングや検討会を実施し、将来の通知や手引の改定を準備した。残念ながら患者が発生した際には、指導に根拠が求められることから、分子疫学の高度化を検討した。従来の免疫凝集法では群別できなかった菌株であっても、M-PCR 法により型別できた。MLVA 法も改良された。多少なりと感染源調査に要する時間の短縮が期待される。全ゲノム解析を行い、患者株と環境株が SNPs のわずか 2~4 個違いで対応し、疑い施設が感染源と判断された。レジオネラ感染事故の指導根拠として、知る限りにおいて、初めて全ゲノム解析が使われた事例となった。レジオネラが長期に施設に定着しており、洗浄消毒の困難さが改めて認識された。

D. 結論

D1. モノクロラミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

有機物を含む温泉の営業 1 施設の協力を得て、モノクロラミン消毒を行った。レジオネラ属菌を抑制することができた一方で、従属栄養細菌数や、16S rRNA 遺伝子コピー数の増加が確認された。菌叢解析の結果、*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌の増加が確認された。バイオフィルム対策として、洗浄が必要と考えられた。

D2. *Mycobacterium phlei* 他の不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒効果の有効性

pH9.6 の高アルカリ温泉水を用いて、遊離塩素とモノクロラミンの消毒下における消毒効果を比較した。*M. phlei* と *B. subtilis* の消毒耐性はほぼ同程度で、これらの 1-Log 不活化には、モノクロラミンの CT 値がおおよそ 250 mg/L・min に対し、遊離塩素は 2,000 mg/L・min であった。

pH9.6 の高アルカリ温泉水では、モノクロロミンの方が遊離塩素よりも消毒効果が高かった。

D3. 高 pH の遊離塩素によるレジオネラ消毒効果の低下

遊離塩素によるレジオネラ不活化試験の結果、pH が高い条件で消毒効果が低かった。当該医療機関の水道水の pH は高く、塩素消毒の効果が不十分である可能性が示唆された。

D4. 電解生成オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

オゾン濃度が 0.8mg/L の条件で、電解オゾン水をろ過器の有効容量(200L)となるように供給したところ、逆洗水のレジオネラ属菌は、途中 1 回検出された以外は、約 10 ヶ月間継続して不検出となった。逆洗前の循環式ろ過器へ電解オゾン水を毎日供給する方法は、設備が単純で操作が簡易であった。

D5. フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

FCM 法等の非培養検査の結果を管理に反映する方法を整備した。H 施設で消毒が不完全と判定された循環系に省力化配管洗浄技術を適用し、洗浄後はレジオネラを不検出にできた。J 施設では、丁寧な対話により汚染源を特定し、故障への対応、盲管の撤去など、施設側の適切な判断と処置につなげることができた。

D6. 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 装置を使用した遺伝子検査法は、プロトコルを改良し LAMP 法と同等の感度・特異度を示した。全ゲノム解析を行い、各遺伝子型で組換え領域や SNP 数に差異を認め

た。疫学的に関連のある事例を解析した結果、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株間の SNPs は 0~41 であった。

D7. 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態

3 自治体(2 県、1 市)の衛生部局、あるいは保健所職員を対象に、レジオネラ症対応についてオンラインヒアリングを行った。対象施設の検水でレジオネラ陽性になることがあり、その多くは低濃度であった。消毒や洗浄の不足といった問題に対して、徹底方法が課題とされた。職員や施設向けの研修、講習が実施されて、マニュアルも整備されていた。患者と施設の菌株の不一致、培養できないことも多くあった。保健所と衛生研究所との連携が取られていた。

D8. 入浴施設の衛生管理の手引きの改定

WG と検討会を立ち上げて検討を行った。WG では浴槽水の塩素濃度の測定における問題点等を検討し、関連する Q&A の質問の作成を試みた。検討会では入浴施設において保健所が行う監視指導時に利用する調査票(確認調査票及び記録調査票)の検討を行い、確認調査票案を作成した。

D9. レジオネラ検査精度管理の向上を目的とした検討と英国 FAPAS[®]への試験的参加

外部精度管理の選択肢として、情報を整理した。英国 FAPAS に試験的に参加した結果、選択肢の 1 つになり得ると考えられた。

D10. レジオネラ属菌の新規検査法の検討

レジオラート/QT 法における前処理法として、本検討においては酸処理 5 分が適切であると考えられた。

D11. 浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

施設にレジオネラ属菌の定着を確認した。洗浄消毒により除染できておらず、より効果的な対応が必要と考えられた。検出頻度の高い ST は、状況によっては、より解像度の高い SNPs 解析が推奨された。

D12. *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良

従来の免疫凝集法で判別不能だった菌株が、新しく開発した M-PCR 法により、型別できるようになった。SG13 と SG14 の型別能力を向上させる改良を加えた。バンドサイズの判定を容易にするポジティブコントロールを用意した。配布用プロトコルを作成した。

D13. 分子疫学解析法の活用と環境水における NGS を用いた網羅的解析

プライマーのミスマッチにより増幅されない MLVA 領域に修正対応した。レジオネラ感染事例の全ゲノム解析を行い、施設環境由来株と患者株間の SNPs は 4 個以下であった。

以上、公衆浴場の衛生管理の推進に有用な結果を得た。高 pH で塩素消毒の低下を改めて確認した。高 pH にはモノクロロミン消毒の効果が高かったが、洗浄の大切さが改めて指摘された。モノクロロミン消毒中の病原細菌の増加は認められず、レジオネラ属菌も抑えられていた。オゾン消毒を併用した逆流洗浄により、循環ろ過器のレジオネラ属菌を 10 ヶ月間抑えられた。培養検査より迅速なフローサイトメトリーやモバイル qPCR 法を整備し、応用により不衛生な状態 2 例が改善した。レジオネラ培養検査法の向上に新しい外部精度管理の選択肢を用意し、また複雑な前処理を避けられ

るレジオラート法を検討した。公衆浴場に立ち入る衛生部局とのヒアリングや検討会を行い、通知や手引の改定を準備した。M-PCR 法による血清型別、MLVA 法の改良、SNPs 解析を行い、指導根拠となる分子疫学がより高度化された。患者株と環境株が 2~4SNPs の違いで対応し、感染事故の指導根拠として使われた。レジオネラが長期に施設に定着しており、洗浄消毒の困難さが改めて認識された。

E. 引用文献

- 1) 磯目賢一, 中島佳代, 池町真実, 山崎貴之, 中浴伸二, 宮川一也, 永澤浩志. 院内感染で判明したレジオネラ菌による給湯系汚染とその後の対応. 環境感染誌. 2020, 35 巻, 第 2 号.
- 2) 厚生労働省:公衆浴場における衛生等管理要領等について, pp.13, 2020 年 12 月, (<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/00556111.pdf>).
- 3) 厚生労働省:循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル, pp.22-23, 2019 年 12 月, (<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000577571.pdf>).
- 4) (公財)日本建築衛生管理教育センター:レジオネラ症防止指針(第 4 版), pp.110, 2017 年 7 月.
- 5) (公社)日本産業衛生学会:許容濃度等の勧告(2022 年度), 産業衛生学雑誌, pp.255, Vol.64, No.5, 2022 年.
- 6) 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, 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 年度総合研究報

- 告書, 研究代表者:前川純子, 31-36, 2019.
- 7) 磯部順子ら, レジオネラ属菌迅速検査法の評価, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 30 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者:前川純子, 13-22, 2018.
 - 8) 黒木俊郎ら, ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究, 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)「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 20 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者:倉 文明, 91-100, 2021.
 - 9) 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.
 - 10) 中西典子ら, MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析. 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」令和元年~3 年度総合研究報告書, 研究代表者:前川 純子, 220-234, 2022
 - 11) 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川 亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果, 2022, 温泉科学, 72, 26-37.
 - 12) 森 康則, 泉山信司, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 枝川亜希子, 藤井 明: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, 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」(研究代表者 前川純子)より, 令和 3 年度分担研究報告書.
 - 13) Hermanowicz, S.W., 微生物起因の水質:規制, 科学, 工学, 1999, 水道協会雑誌, 68(7), 53-63.
 - 14) (社)日本水道協会:水道施設設計指針, pp.219-220, 2000 年.
 - 15) Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, Parkhill J, Harris SR. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015 Feb 18;43(3):e15.
 - 16) 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.
 - 17) MLVA net support site (<http://mlva.i2bc.paris-saclay.fr/MLVAnet/spip.php?rubrique44>) (2023.4.28 時点)
 - 18) Pourcel C, Visca P, Afshar B, D'Arezzo S, Vergnaud G, Fry NK. 2007. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and

- development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. J Clin Microbiol. 45:1190-1199.
- 19) Yoshimura, D., Kajitani, R., Gotoh, Y., Katahira, K., Okuno, M., Ogura, Y., Hayashi, T., Itoh, T. Evaluation of SNP Calling Methods for Closely Related Bacterial Isolates and a Novel High-Accuracy Pipeline: BactSNP. Microb. Genom. 2019, 5, e000261.
- 20) 泉山信司ら, 省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験-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」令和2年度総括・分担研究報告書, 研究代表者:前川 純子, 13-26, 2020.
- 21) 井上浩章, 抗レジオネラ用空調水処理剤協会の取り組みと冷却水系のレジオネラ属菌対策、ビルと環境、No.161、pp.43-50、2018
- 22) Indrelid S, Kleiveland C, Holst R, Jacobsen M, Lea T: The Soil Bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath Interacts with Human Dendritic Cells to Modulate Immune Function. Front Microbiol. 2017;8:320.
- 23) Beheshti Ale Agha A, Kahrizi D, Ahmadvand A, Bashiri H, Fakhri R: Identification of *Thiobacillus* bacteria in agricultural soil in Iran using the 16S rRNA gene. Mol Biol Rep. 2018;45(6):1723-1731.
- 24) Corteselli EM, Aitken MD, Singleton DR: Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class Gamma-proteobacteria, and proposal of Immundisolibacterales ord. nov. and Immundisolibacteraceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2017;67(4):925-931.
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表
1. 紙上発表
1) 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果, 2022, 温泉科学, 72, 26-37.
2) 森 康則, はじめて学ぶ ぼくたちの温泉科学, 2023, 三重大学出版会.
3) Komatsu S, Tanaka S, Nakanishi N. Evaluation of *Legionella pneumophila* SGUT Serotypes Isolated from Bath Water Using a Multiplex-PCR Serotyping Assay. Jpn. J. Infect. Dis., 76, 77-79, 2023.
4) Nakanishi N, Komatsu S, Tanaka S, Mukai K, Nomoto R. Investigation of a *Legionella pneumophila* Outbreak at a Bath Facility in Japan Using Whole-Genome Sequencing of Isolates from Clinical and Environmental Samples. Microorganisms. 2022 Dec 22;11(1):28.
5) 泉山信司, 水の塩素消毒ー病原微生物の塩素消毒にまつわる誤解への回答例, 環境技術, 2022, 51(2), 43-48.
6) 淀谷雄亮, 原 俊吉, 湯澤栄子, 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

者からのレジオネラ属菌の分離状況と ST1346 の集積について. 感染症学雑誌 2022, 96 (5), 193-197.

2. 学会発表

- 1) 柳本恵太, 植松香星, 望月映希, 鶴田芙美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司: 有機物が含まれる温泉におけるモノクロラミンの消毒効果, 令和 4 年度山梨県公衆衛生研究発表会, 2023 年 2 月, 山梨県
- 2) 柳本恵太, 植松香星, 望月映希, 鶴田芙美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司: 山梨県内の温泉施設におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水の菌叢解析について, 第 34 回地方衛生研究所関東甲信静支部細菌研究部会, 横浜市
- 3) 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による不活化, 日本温泉科学会第 75 回大会, 2022 年 9 月, 大分県.
- 4) Nakajima N, Jinnai M, Izumiyama S, Kuroki T. Influence of high pH on chlorine disinfection against *Legionella* spp. The 10th International Conference on *Legionella*. September 2022. Yokohama.
- 5) 中嶋直樹, 陳内理生, 黒木俊郎. レジオネラ属菌に対する遊離塩素の消毒効果における高 pH の影響. 第 4 回 Hospital Water Hygiene 研究会学術集会. 2022 年 11 月. 東京.
- 6) 小森正人, 住谷敬太, 齋藤利明, 泉山信司, 田栗利紹, 電解オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒試験, 日本オゾン協会 第 31 回年次研究講演会, 2022 年.
- 7) Taguri T, Cai G, Nakanishi N, Hiratsuka T, Inoue H, Shimoda T, Shinmichi K, Kura F, Amemura-Maekawa J. Bacterial counts by flow cytometry can determine presence/absence of *Legionella* in bath water. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
- 8) Kanatani J, Fujiyoshi S, Isobe J, Kimata K, Watahiki M, Maenishi E, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Maruyama F, Oishi K. Characterization of bacterial microbiome in water from public bath facilities, especially focused on *Legionella*. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
- 9) Nakaue R, Morita M, Murai M, Amemura-Maekawa J. PCR serotyping of *Legionella pneumophila* based on the diversity of LPS biosynthetic loci. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
- 10) Amemura-Maekawa J, Harada N, Murai M, Morita M, Akeda Y. Evaluating *Legionella pneumophila* NaCl-resistant mutant virulence using *Galleria mellonella* model. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
- 11) 前川純子: レジオネラ属菌検査法の現状と今後の展望. 第 34 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会. 2023 年 2 月. 横浜市.
- 12) 前川純子, 森中りえか, 明田幸宏: *Legionella pneumophila* 血清型別マルチプレックス PCR 法の改良. 第 96 回日本細菌学会総会. 2023 年 3 月. 姫路市.

- 13) Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto, Noriko Nakanishi. The genetic characterization of *L. pneumophila* SG1 isolates from bath water in Kobe City, Japan. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022, Yokohama, Japan.
- 14) Noriko Nakanishi, Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto. Whole-Genome analysis of *L. pneumophila* strains causing outbreak at bath facility in Kobe, Japan. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022, Yokohama, Japan.

3. 研修会

- 1) 前川純子:レジオネラ対策、専門課程 I 保健福祉行政管理分野分割前期・専門課程 III 地域保健福祉専攻科、2022 年 5 月、Web 対応.
- 2) 前川純子:レジオネラ属菌の検査と対策、令和 4 年度 短期研修 環境衛生監視指導研修、2022 年 11 月、Web 対応.
- 3) 前川純子:レジオネラ. 令和 4 年度 希少感染症診断技術研修会、2023 年 2 月、Web 対応.
- 4) 泉山信司:レジオネラ等の微生物汚染、検査、対策. 令和 4 年度レジオネラ属菌検査研修会(講義)、2022 年 11 月、静岡
- 5) 泉山信司:令和 4 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2023 年 2 月、Web 対応

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- なし

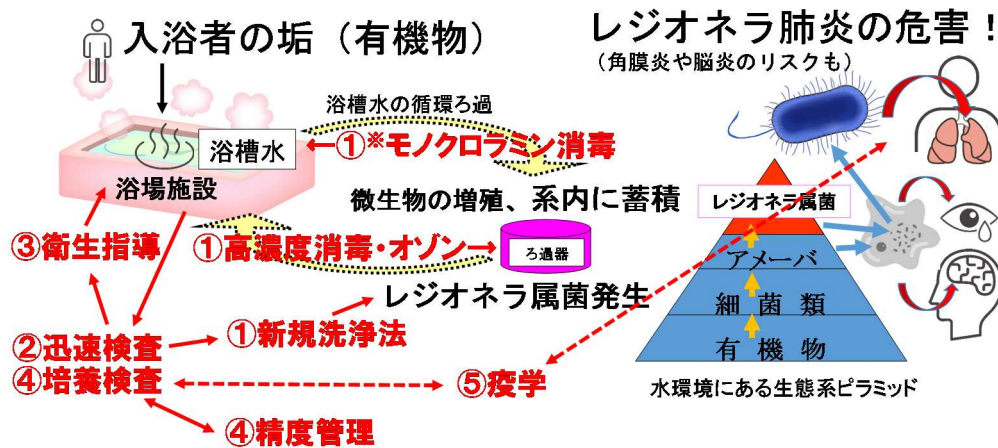


図0 本研究班の編成

※図中の丸数字は、①消毒洗浄、②迅速検査、③保健所衛生部局との連携、④培養検査の向上、⑤分子疫学の高度化の、大きく分けて5分野の課題対応を意味している。

表0 研究協力者一覧

| | | | |
|--------|----------------------|--------|----------------------|
| 縣 邦雄 | アクアスつくば総合研究所 | 陳内 埋生 | 神奈川県衛生研究所 |
| 浅野 由紀子 | 愛媛県立衛生環境研究所 | 新道 欣也 | 株式会社お風呂のシンドー |
| 安齋 博文 | 公益財団法人日本建築衛生管理教育センター | 杉本 貴之 | 宮崎県中央保健所 |
| 石森 啓益 | 柴田科学株式会社 | 杉山 寛治 | 株式会社マルマ |
| 磯部 順子 | 富山県衛生研究所 | 杉山 順一 | 公益財団法人日本建築衛生管理教育センター |
| 市村 祐二 | ケイ・アイ化成株式会社 | 高久 靖弘 | 東京都健康安全研究センター |
| 稲窪 大治 | 日本板硝子株式会社 | 田中 慶郎 | 株式会社マルマ |
| 井上 花音 | 岡山県保健福祉部 | 田中 忍 | 神戸市健康科学研究所 |
| 井上 浩章 | アクアスつくば総合研究所 | 谷本 健吾 | 三重県保健環境研究所 |
| 植松 香星 | 山梨県衛生環境研究所 | 鶴田 英美 | 山梨県衛生環境研究所 |
| 梅津 萌子 | 東京都健康安全研究センター | 豊田 真由美 | 三重県保健環境研究所 |
| 大橋 美至 | 神奈川県健康医療局 | 鳥井 良太 | 株式会社お風呂のシンドー |
| 大森 恵梨子 | 仙台市衛生研究所 | 永井 佑樹 | 三重県保健環境研究所 |
| 緒方 喜久代 | 公益社団法人大分県薬剤師会検査センター | 長岡 宏美 | 静岡県環境衛生科学研究所 |
| 尾崎 淳朗 | 愛媛県保健福祉部 | 中嶋 直樹 | 神奈川県衛生研究所 |
| 尾崎 吉純 | 高知県健康政策部 | 中臣 昌広 | オフィス環監未来塾 |
| 小田 康雅 | シスメックス株式会社 | 西里 恵美莉 | 川崎市健康安全研究所 |
| 貝森 繁基 | 内藤環境管理株式会社 | 野本 竜平 | 神戸市健康科学研究所 |
| 加藤 定男 | 長崎県環境保健研究センター | 久田 美子 | 山梨県衛生環境研究所 |
| 亀山 有貴 | 三重県保健環境研究所 | 平塚 貴大 | 広島県立総合技術研究所保健環境センター |
| 木村 哲也 | 株式会社ヤマト | 藤井 明 | 健美薬湯株式会社 |
| 倉 文明 | 国立感染症研究所 | 細川 賢人 | 花王株式会社 |
| 小池 真生子 | 大阪健康安全基盤研究所 | 水戸 智文 | 北海道保健福祉部 |
| 小松 頌子 | 神戸市健康科学研究所 | 武藤 千恵子 | 東京都健康安全研究センター |
| 小森 正人 | 株式会社ヤマト | 望月 映希 | 山梨県衛生環境研究所 |
| 蔡 国喜 | 長崎県環境保健研究センター | 森中 りえか | 株式会社ファスマック |
| 斎藤 利明 | 株式会社ヤマト | 山上 隆也 | 山梨県衛生環境研究所 |
| 佐伯 歩 | 国立感染症研究所 | 山口 友美 | 宮城県保健環境センター |
| 佐藤 大輝 | 三重県保健環境研究所 | 山本 哲司 | 花王株式会社 |
| 茶山 忠久 | ケイ・アイ化成株式会社 | 吉田 裕一 | 川崎市健康安全研究所 |
| 下田 貴宗 | 株式会社シモダアメニティサービス | | |

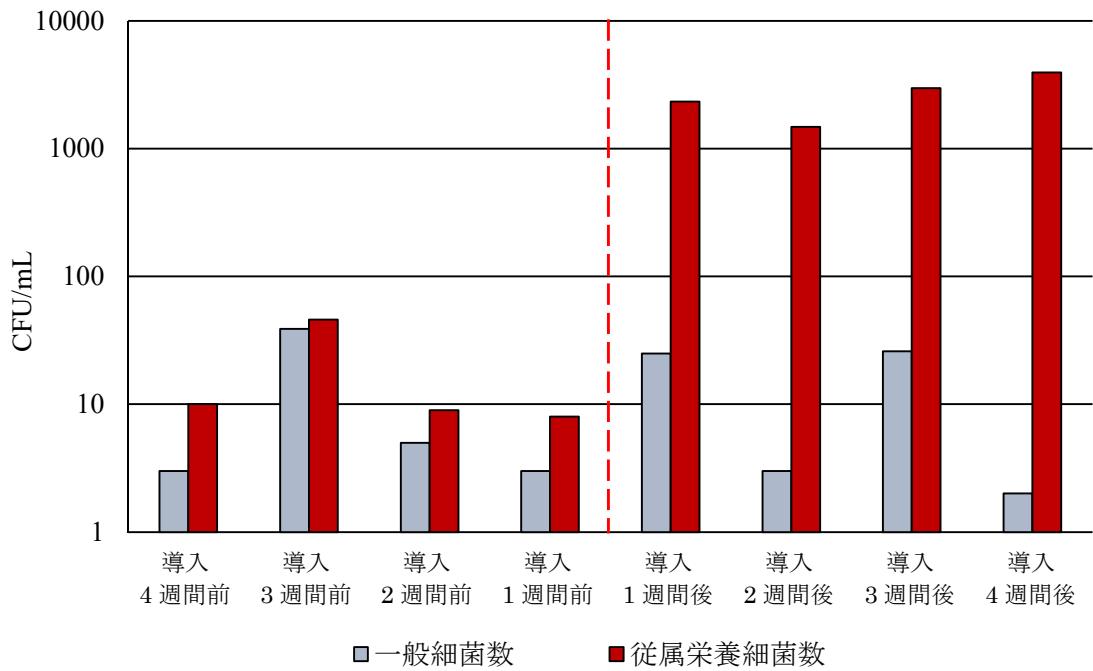


図 1-1 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数

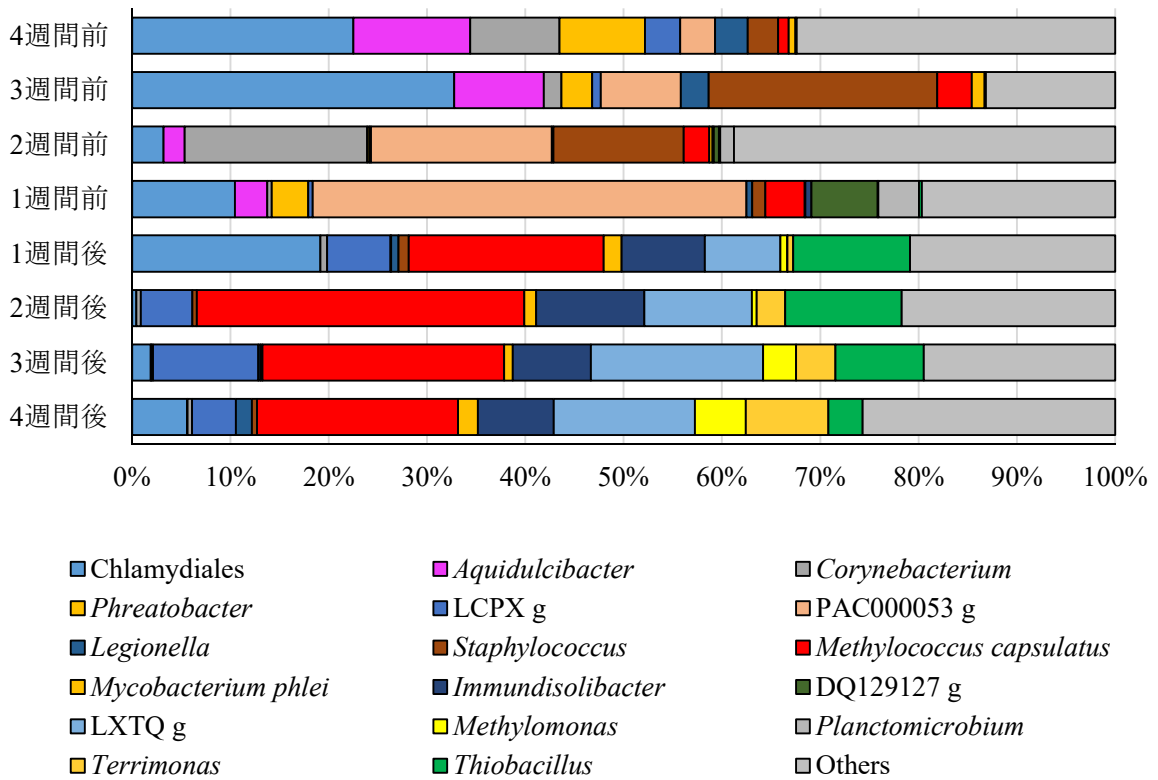


図 1-2 浴槽水の菌叢解析結果

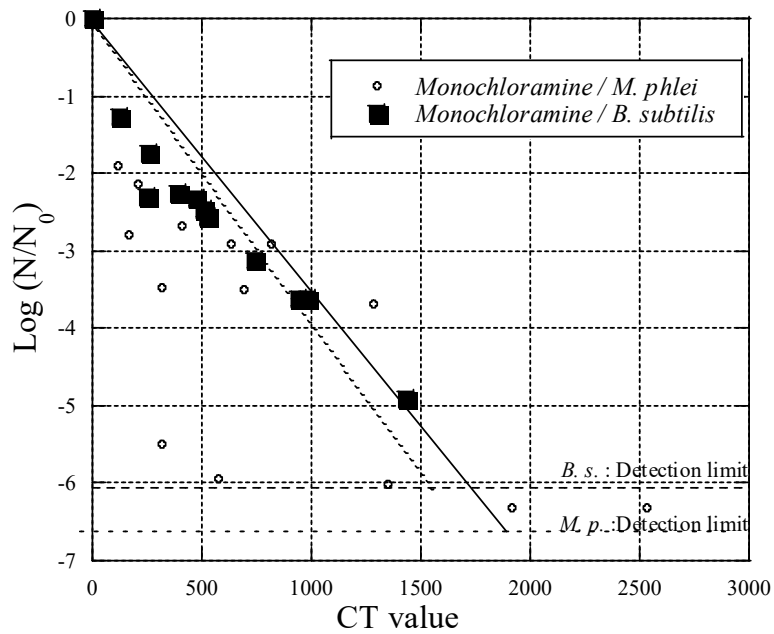


図 2-1 モノクロラミン消毒下の *M. phlei* と *B. subtilis* の不活化の比較
 実線が *M. phlei*、破線が *B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

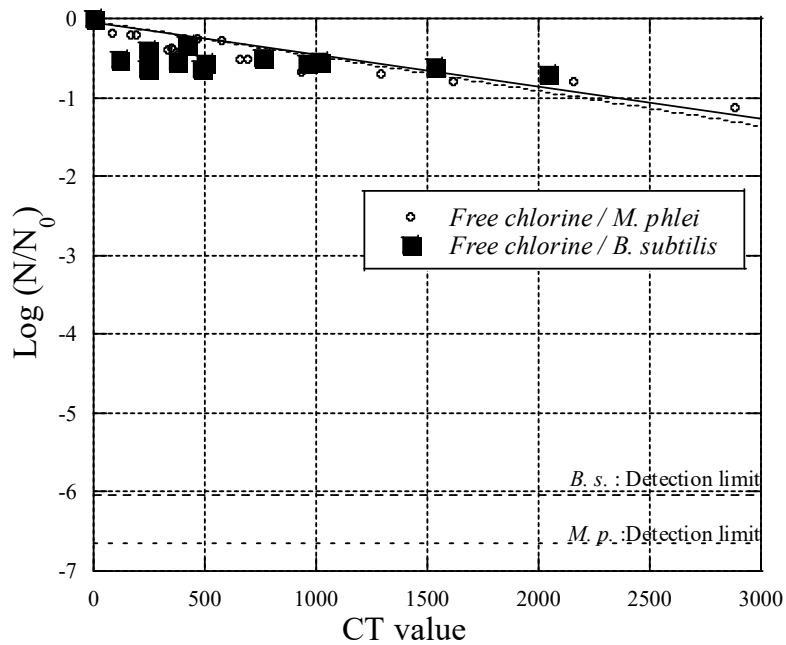


図 2-2 遊離塩素消毒下の *M. phlei* と *B. subtilis* の不活化の比較
 実線が *M. phlei*、破線が *B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

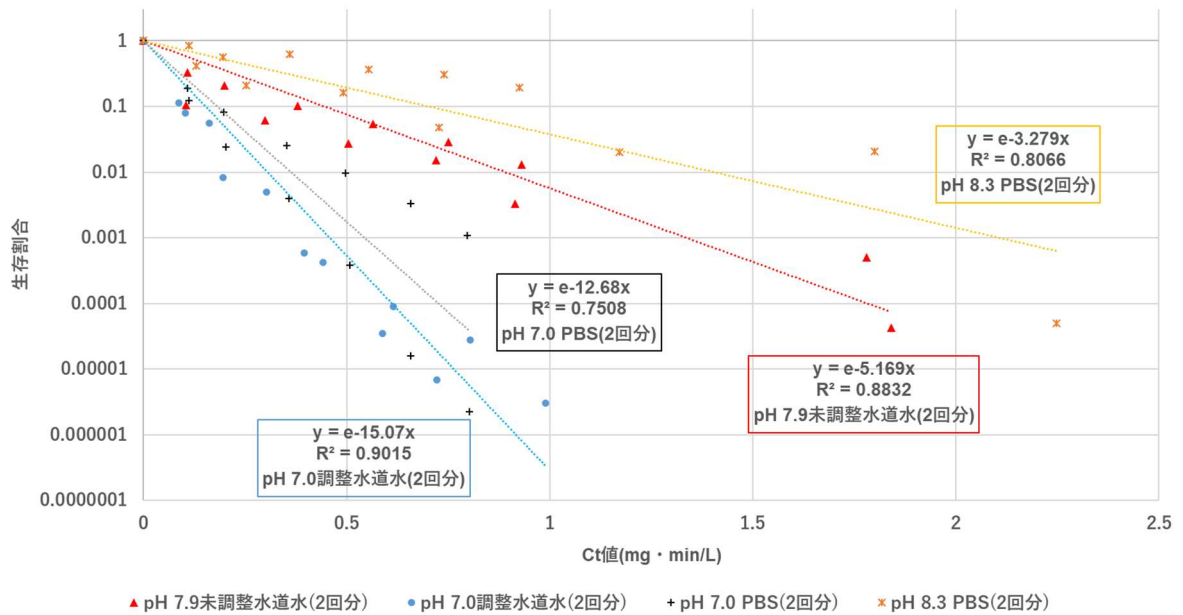


図3 医療機関由来の *L. pneumophila* に対する遊離塩素消毒による不活化曲線

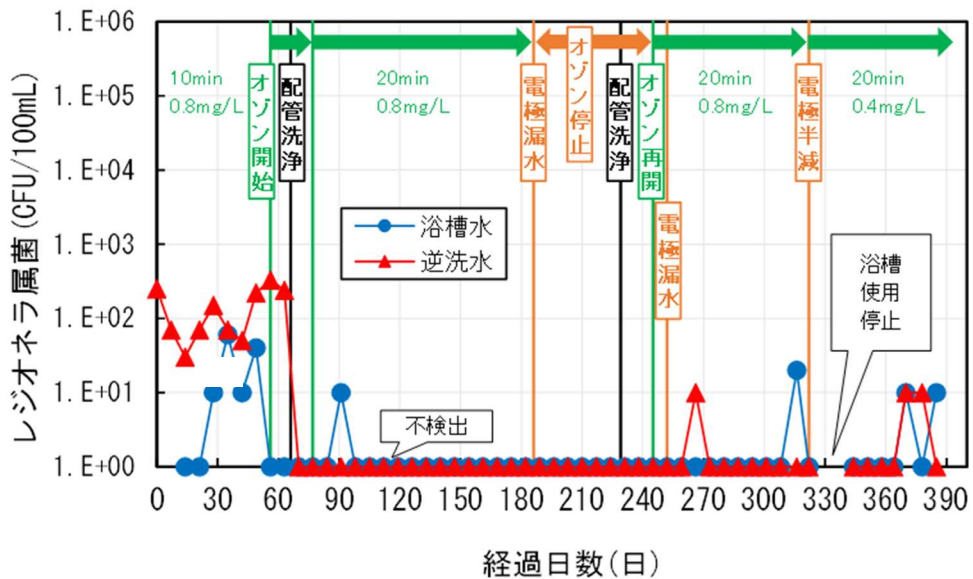


図4 レジオネラ属菌経日変化

レジオネラ属菌の1CFU/100mLは不検出(検出限界10CFU/100mL)を示している。オゾンが56日目より開始して、77日目より電解オゾン水の供給時間を20分間に倍増している。66日目と229日目に過酸化水素によるろ過器と配管の化学的洗浄を行った。186日目に漏水してオゾン进行停止、オゾン電解槽を交換して245日目に再開、322日目に断線により電極面積が半減した。370日目よりレジオネラ属菌が浴槽水と逆洗水から検出され始めた。385日目に本試験を終了した。

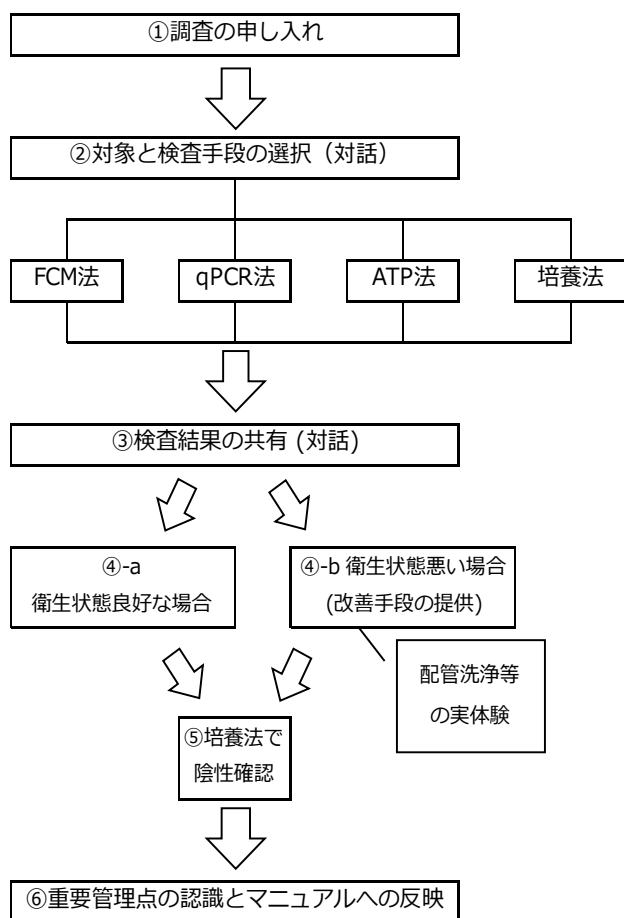


図5 施設との対話、調査フロー

表5 省力化配管洗浄剤の工程ごとの各種検査結果の推移

| | 処理前 | | A剤処理1時間後 | | 中和剤注入後 | | すぎ | | 通常営業時 | |
|---------|------|------|-----------------------------|------------------|--------|-----|-----|-------|-------|------|
| | 浴槽水 | 逆流水 | 浴槽水 | 逆流水 | 浴槽水 | 逆流水 | 浴槽水 | 逆流水 | 浴槽水 | 逆流水 |
| 培養法 | | | | | | | | | | |
| レジオラート | <10 | 32 | MPN ^{**} /100mL | NT ^{**} | NT | NT | <10 | <10 | <10 | <10 |
| 平板培養法 | <10 | 10 | (CFU ^{**} /100mL) | NT | NT | NT | 10 | <10 | <10 | <10 |
| Lg生菌遺伝子 | 0 | 0 | (GU ^{**} /100mL) | NT | NT | NT | 7 | NT | NT | NT |
| Lg全遺伝子 | 19 | 7 | (GU/100mL) | NT | NT | NT | 27 | NT | NT | NT |
| FCM法 | 287 | 587 | (cells/mL) | 103,233 | 53,987 | 493 | 353 | 9,073 | 90 | 40 |
| ATP法 | 47 | 53 | (RLU ^{**} /0.1 mL) | 3 | 137 | 1 | 5 | 4,007 | 34 | 24 |
| 残留塩素濃度 | 0.23 | 0.53 | (mg/L) | NT | NT | NT | NT | NT | 0.50 | 0.60 |

^{**}MPN: most probable number, CFU: colony forming unit, GU: gene unit (CFU-equivalent value), RLU: relative light unit, ^{**}NT: not tested

表 6-1 遺伝子検査法と平板培養法との相関

A)

| | | 平板培養 (CFU/100 mL) | | |
|------|---|-------------------|-----|----|
| | | ≥10 | <10 | 計 |
| LAMP | + | 5 | 8 | 13 |
| | - | 1 | 16 | 17 |
| | | 6 | 24 | 30 |

B)

| | | 平板培養 (CFU/100 mL) | | |
|----------|---|-------------------|-----|----|
| | | ≥10 | <10 | 計 |
| モバイルqPCR | + | 6 | 10 | 16 |
| | - | 0 | 13 | 13 |
| | | 6 | 23 | 29 |

表 6-2 4 遺伝子型 (ST) における組換え領域と SNPs

| ST | 株数 | 分離年 | 平均ゲノムサイズ (bp) | 平均組換え領域 (bp) | % | 総SNPs | 組換え領域内のSNPs | % |
|-------|----|-----------|---------------|--------------|-----|--------|-------------|------|
| ST23 | 14 | 2010-2021 | 3,430,085 | 79,450 | 2.3 | 11,270 | 10,983 | 97.5 |
| ST120 | 21 | 2006-2021 | 3,379,816 | 61,726 | 1.8 | 18,122 | 17,983 | 99.2 |
| ST502 | 32 | 2005-2021 | 3,375,724 | 24,586 | 0.7 | 4,926 | 4,264 | 86.6 |
| ST505 | 30 | 2005-2021 | 3,380,811 | 59,507 | 1.8 | 7,948 | 7,168 | 90.2 |

| ST | 組換え領域外のSNPs | % | 2株間の最大SNPs | 2株間のSNPsが5以内の組み合わせ |
|-------|-------------|------|------------|--------------------|
| ST23 | 287 | 2.5 | 99 | 8 |
| ST120 | 139 | 0.8 | 40 | 62 |
| ST502 | 662 | 13.4 | 191 | 6 |
| ST505 | 780 | 9.8 | 194 | 3 |

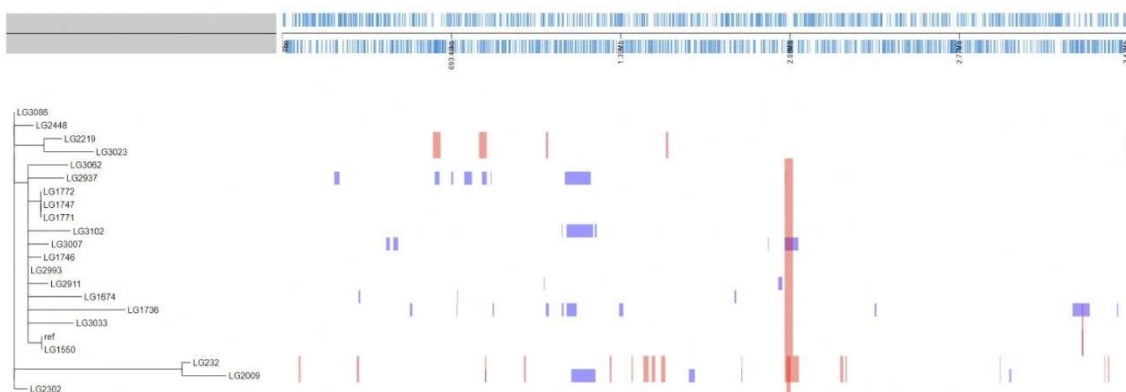


図 6 ST120 型における組み換え領域の例示

上部はレファレンス配列の ORF 領域を約 4,000 程の縦線で示した。左下は ST120 型の 20 株強の系統樹を示した。右下は組換え領域を示しており、赤色は複数の株で検出された領域、青色は 1 株のみに検出された領域。

表 7 保健所、衛生部局による公衆浴場でのレジオネラ症対応、監視指導の実態(抜粋)

| 項目 | A 県 | B 県 | C 市 |
|---|--|---|---|
| 過去 5 年間の、患者数、施設からの検出状況等 | <ul style="list-style-type: none"> ・当該保健所：入浴施設での検出事例(令和元年に 1 件、ただし患者は出ていない；280 CFU/100 mL) ・検出濃度は、通常は 10～< 100 CFU/100 mL がほとんど | <ul style="list-style-type: none"> ・当該保健所：H30 年：1 件、令和元年：3 件、令和 2 年：9 件、令和 3 年：1 件、令和 4 年：3 件 ・検出濃度は、10～< 100 CFU/100 mL が多い。 ・水に関連したと断定した症例は 0 | <ul style="list-style-type: none"> ・患者数：H29 以降、年 35 件、42 件、55 件、40 件、38 件 ・検出施設数／検査数：H29 以降、年 4/36、3/38、4/47、4/28、11/32 ・検出濃度：集計していないが、10～100 CFU/100 mL 程度、多いと 10000 CFU/100 mL |
| 発生施設の特徴、発生施設への指導、施設による対策等 | <ul style="list-style-type: none"> ・<u>陽性施設の特徴：消毒の方法に問題があり、頻度が十分でない場合が多い(全く消毒をしていない施設はない)</u> | <ul style="list-style-type: none"> ・これまで、レジオネラ症(患者)の原因となった施設の断定・推定はなし | <ul style="list-style-type: none"> ・<u>患者からの株と施設からの株は、一致しない方が多い</u> ・<u>患者菌株が増えなかったり、逆のケースもある</u> |
| 職員への研修の実施 | <ul style="list-style-type: none"> ・5～6 月に異動した職員への研修を実施 ・これまでは、現場での実施研修を行っていたが、新型コロナで休館中 ・現場の研修は重要、聞くより体験 | <ul style="list-style-type: none"> ・初任者研修があり、その中で、関連法規、監視指導のやり方について研修 ・業務マニュアルを作成している。職員は熟読している | <ul style="list-style-type: none"> ・OJT が基本、初任期研修の中でレジオネラ症に関する内容あり ・感染症の観点から保健師と共同研修あり |
| 事業者向けの講習会、その他の啓発方法(リーフレット、インターネット Web ページ等の作成や紹介) | <ul style="list-style-type: none"> ・年に 1 回県主体の入浴施設の責任者を対象とした講習会を実施(新型コロナ後再開予定) | <ul style="list-style-type: none"> ・公衆浴場、旅館等、保健所が考えて実施(令和 2、3 年は実施していない) | <ul style="list-style-type: none"> ・web 上で手引書の例 ・リーフレット配布、動画も作成 ・年 1 回、社会福祉施設事業者向けの講習会 |
| 他部局との連携 | <ul style="list-style-type: none"> ・本庁の衛生管理課や感染症対策課、<u>保健所、衛研と連携</u> ・高齢者部署に情報提供 | <ul style="list-style-type: none"> ・<u>衛生研究所との連携あり(保健所は検体採取、指導機関。衛生研究所は検査機関)</u> ・県庁衛生部局、感染症対策課とも連携 | <ul style="list-style-type: none"> ・<u>地衛研と連携あり</u> ・<u>検査は衛研のみが実施</u> |
| 今後の目標や課題 | <ul style="list-style-type: none"> ・<u>実地研修の施設の確保</u> ・県としては現在、大きな問題は無いと考えている。事故発生した際の影響の大きさを知らない入浴施設の経営関係者が多くなってきているのが課題かもしれない | <ul style="list-style-type: none"> ・<u>施設の清掃・消毒方法に欠陥があったり、自主検査を規定の頻度で実施していない施設も多く、どのようにレジオネラ症防止対策のための衛生管理を徹底させるかが課題</u> | <ul style="list-style-type: none"> ・適切な維持管理の方法について、今後も指導していきたい ・レジオネラや水質汚染事故は健康被害に直結するため、対応の優先度は高い ・自主検査で発生が明らかとなった場合は、出来るだけ立入に行く |

表 8 確認調査票案(構造設備基準)(検討中)

| 項目 | | 基準 | 管理要領 / 条例等 | | | |
|--------|---------|---|--|--|--|--|
| 構造設備基準 | 貯湯槽 | 60℃以上に保つ能力を要する加熱装置が設けられている これにより難しい場合は消毒する設備が設けられている 完全に排水できる | | | | |
| | 配管 | ろ過器および循環配管に接続しない構造、原湯を浴槽水面の上方から浴槽に落とし込む構造である | | | | |
| | | 内湯と露天風呂の接続 | 露天風呂の湯が内湯に混じることのない構造である | | | |
| | | 配管状況 | 配管の状況を正確に把握し、不要な配管を除去する | | | |
| | | 排水 | 配管内の浴槽水が完全に排水できる構造とする | | | |
| | ろ過器 | 設置 | 浴槽ごとの設置が望ましい | | | |
| | | ろ過能力 | 1時間当たり浴槽の容量以上のろ過能力を有する | | | |
| | | 逆洗浄 | 逆洗浄を行える | | | |
| | | 排水 | 完全に排水できる | | | |
| | | 集毛器 | ろ過器に毛髪等が混入しないように、ろ過器に入る前に設ける | | | |
| | 気泡発生装置等 | 構造 | 連日使用した浴槽水を使用する構造でない | | | |
| | | 点検、清掃、排水 | 点検、清掃及び排水が容易に行うことができる | | | |
| | | 空気取入口 | 土ぼこりが入らない構造である | | | |
| | | 循環水の吐出口 | 浴槽の底部に近い部分に設置する | | | |
| | | 消毒剤の注入又は投入口 | 浴槽水がろ過器内に入る直前に設置されている | | | |
| | | 打たせ湯・シャワーの構造 | 循環ろ過水及び浴槽水を用いる構造でない | | | |
| | | オーバーフロー回収槽の構造 | 浴用に供する構造になっていない 浴用に供する場合、オーバーフロー還水管は循環配管に接続せず回収槽につなぐ 浴用に供する場合、地下埋設でなく清掃が容易にできる 浴用に供する場合、消毒設備を設置する | | | |
| | | 水位計 | 構造 | 配管内を洗浄・消毒できる構造とする、あるいは配管を要しないセンサー方式にする | | |
| | | 調節箱 | 構造 | 清掃しやすい構造とする | | |
| | | | 消毒 | 薬剤注入口を設けて塩素消毒できるようにする | | |

表 9 日本国内から参加可能なレジオネラ検査外部精度管理

| 名称 | レジオネラ属菌 検査精度管理サーベ イ | External Quality Assessment of Water Microbiology <i>Legionella</i> Isolation from Water Samples | FAPAS [®] (Food Analysis Performance Assessment Scheme) |
|-----------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| 実施者 | 日水製薬株式会社 | UKHSA (UK Health Security Agency) 英国健康安全保障庁 | Fera (The Food and Environment Research Agency) 独立行政法人英国食料環境研究 庁(英国環境食料農村地域省傘 下) |
| 国 | 日本 | 英国 | 英国 |
| 日本からの参加実績 | あり | あり | なし |
| 参加費 (1回あたり) | 38,500 円(消費税込) | 172 ポンド(2022 年度) (約 30,000 円) | 52,800 円(消費税込) |
| 年間実施回数 | 1 | 4 | 4 |
| 参加者数 | 約 180 | 114~173(1回あたり) | 20 程度(1回あたり) |
| 国内代理店の有無 | — | なし | あり(セントラル科学貿易) |
| 日本語サポート | — | なし | あり |
| 配付試料の輸送 | 冷凍 | 常温 | 常温 |
| 検査実施までの保管 | 冷凍 | 冷凍 | 冷蔵 |
| 1回あたりの 配付試料数 | 1 | 2 | 2 |
| 配布試料中のレジオネ ラ以外の細菌の混合 | なし | あり | なし |
| いずれかの配布試料中 にレジオネラが含まれな い可能性 | なし | あり | あり |
| 配布試料中に含まれる レジオネラの菌種 | <i>Legionella pneumophila</i> のみ | 複数種 | 複数種 |
| 配布試料中に含まれる レジオネラの菌種数 | 1 種 | 1~2 種 | 1~2 種 |
| 配布試料の形状 | BioBall フリーズドライ | Lenticule Disc ゼラチン状のディスク | Lyophilized sample フリーズドライ様 |
| 検査方法 | 指定法 | 自施設の方法 | 自施設の方法 非選択培地を用いる (選択培地で参加も可) |
| 検査結果の報告 | 菌数 | 菌数 菌種(血清群) | 菌数 菌種(血清群) |
| 解析方法 | Z スコア | Z スコア | Z スコア |
| 分析レポートの ページ数 | 23 | 10 | 28 |

この他に、米国 CDC の ELITE (The Environmental Legionella Isolation Techniques Evaluation) があるが、日本から参加可能かは不明である。

表 10-1 レジオラート陽性一覧

| No. | レジオラート/QT法 | | | 平板培養法 | 検出菌種 | LAMP法 |
|-----|------------|-------|--------|-------|--|-------|
| | 未処理 | 酸処理5分 | 酸処理10分 | | | |
| 1 | 10 | 0 | 0 | 30 | Lp SG5, 6 | + |
| 2 | 10 | 11 | 11 | 10 | Lp SG6 | + |
| 3 | 11 | 0 | 11 | <10 | - | + |
| 4 | 11 | 0 | 23 | 10 | Lp SG6 | + |
| 5 | 11 | 0 | 0 | 10 | Lp SGUT | + |
| 6 | 22 | 22 | 11 | 20 | Lp SG6 | + |
| 7 | 22 | 32 | 0 | 10 | Lp SG5 | - |
| 8 | 22 | 0 | 11 | 50 | Lp SG1, 6 | + |
| 9 | 23 | 23 | 11 | 40 | Lp SGUT | + |
| 10 | 23 | 10 | 0 | 70 | Lp SG1 | + |
| 11 | 39 | 0 | 0 | 10 | Lp SG1 | + |
| 12 | 39 | 0 | 0 | 10 | Lp SG5 | + |
| 13 | 39 | 11 | 52 | 10 | Lp SG5, 10 | + |
| 14 | 43 | 11 | 0 | 10 | Lp SG5, 6 | NT |
| 15 | 52 | 58 | 47 | <10 | - | + |
| 16 | 65 | 84 | 39 | 210 | Lp SG1, 5, 6, 9 | NT |
| 17 | 124 | 22 | 22 | 50 | Lp SG3 | + |
| 18 | 146 | 74 | 79 | 180 | Lp SG1 | + |
| 19 | 223 | 146 | 124 | 100 | Lp SG2, Lsp | + |
| 20 | 246 | 155 | 123 | 160 | Lp SG5 | + |
| 21 | 264 | 84 | 39 | 180 | Lp SG6 | + |
| 22 | 361 | 74 | 52 | 330 | Lp SG3, 4 | + |
| 23 | 416 | 474 | 361 | 400 | Lp SG6, 7 | + |
| 24 | 474 | 223 | 146 | 580 | Lp SG1, 3, 5, 9 | NT |
| 25 | 642 | 854 | 659 | 2600 | Lp SG4 | + |
| 26 | 921 | 361 | 219 | 700 | Lp SG6, SGUT | + |
| 27 | 4096 | 0 | 0 | 190 | <i>L. thermalis</i> , <i>L. Nagasakiensis</i> | NT |

表 10-2 2×2 分割表(未処理)

| | | 平板培養法 | | 計 |
|---------------------|----|-------|-----|----|
| | | 検出 | 不検出 | |
| レジオラート/QT法 (未処理) | 陽性 | 25 | 2 | 27 |
| | 陰性 | 4 | 59 | 63 |
| | 計 | 29 | 61 | 90 |

表 10-3 2×2 分割表(酸処理 5分)

| | | 平板培養法 | | 計 |
|---------------------|----|-------|-----|----|
| | | 検出 | 不検出 | |
| レジオラート/QT法 (酸5分) | 陽性 | 20 | 1 | 21 |
| | 陰性 | 9 | 60 | 69 |
| | 計 | 29 | 61 | 90 |

表 10-4 2×2 分割表(酸処理 10分)

| | | 平板培養法 | | 計 |
|----------------------|----|-------|-----|----|
| | | 検出 | 不検出 | |
| レジオラート/QT法 (酸10分) | 陽性 | 18 | 3 | 21 |
| | 陰性 | 11 | 58 | 69 |
| | 計 | 29 | 61 | 90 |

表 11 同一施設で複数回の同一 ST が検出された一覧

ST new は ST 番号が付与されていない allele の組み合わせであったものを示す。

* 表記 ST が同年月に複数の検体から分離されたことを示す。

| 施設 | 血清群 | ST | 株数 | 検体採取年月 | | | |
|----|------|------|----|----------|----------|---------|---------|
| | | | | 2018/10 | 2020/2 | | |
| A | SG1 | 552 | 2 | 2018/10 | 2020/2 | | |
| B | SG1 | 1 | 3 | 2017/11* | 2018/10 | | |
| C | SG5 | new5 | 2 | 2018/3 | 2018/4 | | |
| | SG12 | 362 | 6 | 2018/3* | 2018/4 | 2020/2* | 2021/12 |
| D | SG4 | new9 | 2 | 2020/2 | 2021/7 | | |
| | SG10 | new9 | 2 | 2020/2 | 2021/7 | | |
| E | SG1 | 552 | 4 | 2017/8 | 2018/7 | 2020/7 | 2021/10 |
| F | UT | new3 | 3 | 2018/2* | 2019/2 | | |
| G | SG5 | 2790 | 2 | 2017/7 | 2020/7 | | |
| H | SG5 | new1 | 2 | 2017/8 | 2021/7 | | |
| I | SG1 | 278 | 2 | 2019/2 | 2021/11 | | |
| | SG1 | 2075 | 2 | 2018/3 | 2021/11 | | |
| | SG3 | 1996 | 2 | 2018/3 | 2019/2 | | |
| J | SG6 | 537 | 2 | 2018/3 | 2021/11 | | |
| | SG1 | 128 | 2 | 2017/8 | 2021/6 | | |
| K | SG8 | 1324 | 6 | 2017/8 | 2019/12* | 2021/6* | 2021/7 |
| | SG1 | 2076 | 3 | 2020/11* | | | |
| L | SG5 | 1631 | 2 | 2021/6* | | | |
| M | SG1 | 129 | 2 | 2020/11 | 2021/12 | | |
| | SG6 | 114 | 2 | 2019/11 | 2021/12 | | |
| N | SG6 | 191 | 4 | 2018/2 | 2018/3 | 2020/2* | |
| | SG6 | 292 | 2 | 2018/2 | 2019/2 | | |
| O | SG6 | 68 | 2 | 2019/1 | 2019/12 | | |
| P | SG5 | new6 | 2 | 2019/1 | 2019/12 | | |
| Q | SG3 | 506 | 8 | 2017/7 | 2019/12* | 2021/2 | 2021/7* |
| | SG8 | new2 | 2 | 2017/12 | 2019/12 | | |
| | SG6 | 68 | 8 | 2017/8 | 2018/8 | 2019/8* | 2020/2 |
| R | SG6 | 68 | 8 | 2017/8 | 2018/8 | 2019/8* | 2020/8 |

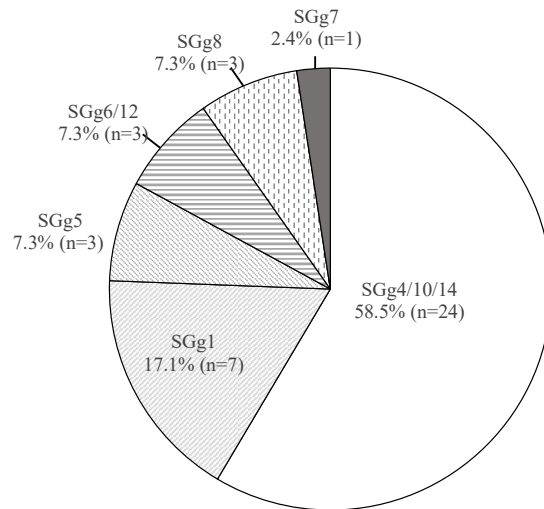


図 12-1 レジオネラ免疫血清で SGUT と判定された *L. pneumophila* 41 株の、M-PCR 法を用いた血清群別 (SGg) の結果割合

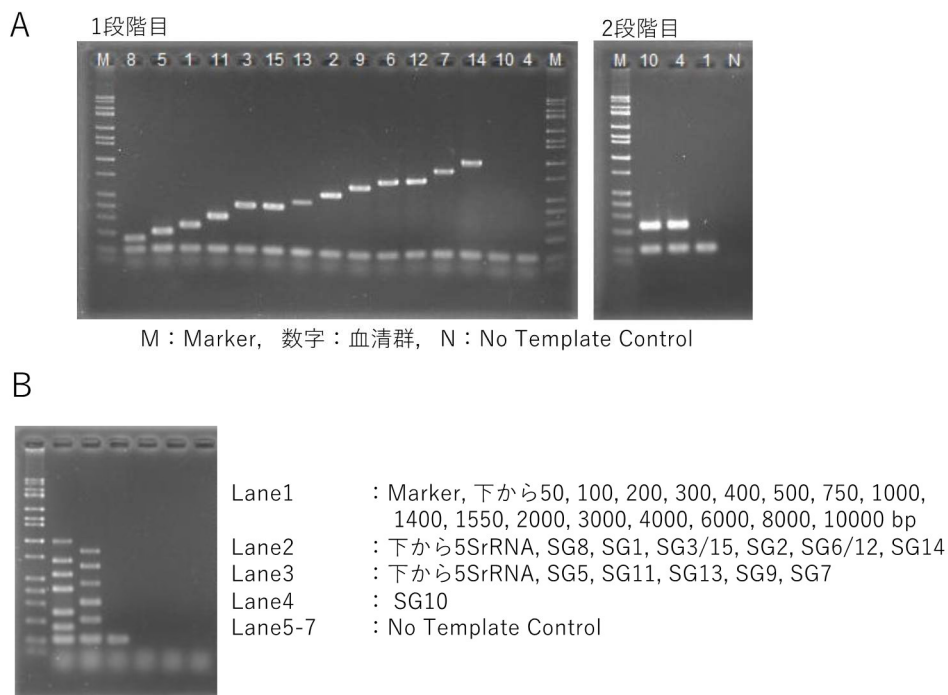


図 12-2 基準株を用いたポジティブコントロールの用意

(A) 各血清群の菌株から抽出した DNA を鋳型に用いた、各 M-PCR の結果。(B) 出現するバンドが 1 段おきになるよう、抽出 DNA を混合してポジティブコントロール (2 セット) を用意した。各セットを鋳型に M-PCR を行った結果 (Lane 2 がセット 1、Lane3 がセット 2 に対応)。

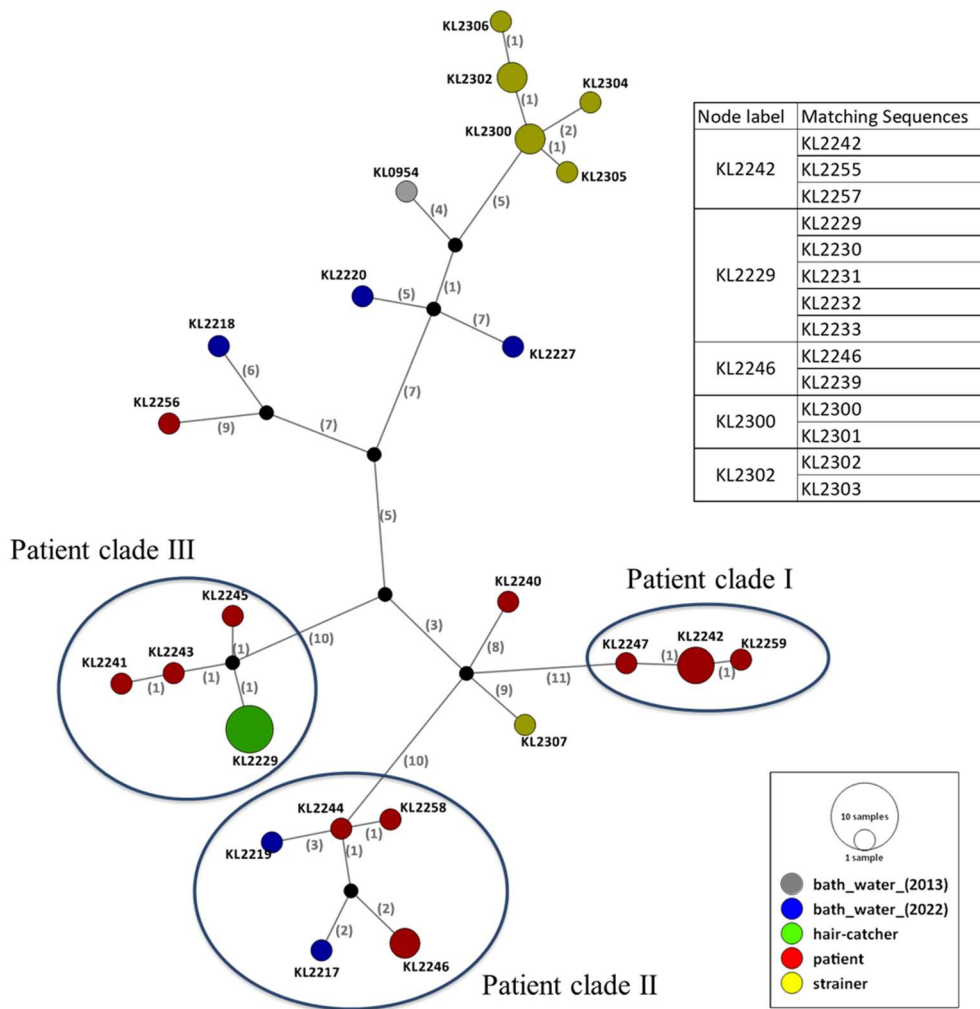


図 13 レジオネラ症発生事例の SNPs 解析に基づくハプロタイプネットワーク図
各ノード間の数字は SNPs の数を表す