

公衆浴場等におけるレジオネラ発生防止及び衛生管理推進のための研究

研究代表者 泉山信司 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所寄生動物部主任研究員

研究要旨

公衆浴場や冷却塔などにおけるレジオネラ属菌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公衆浴場への対応、②冷却塔への対応、③レジオネラ属菌の培養検査の精度管理、並びに④レジオネラ属菌の分子疫学の研究を行った。

①公衆浴場への対応として、以下の成果を得た。*Mycobacterium phlei* 等の抗酸菌が遊離塩素とモノクロロミンの消毒方法と関係なく浴槽水において増殖し、夾雑菌としてレジオネラ属菌の検査培地から検出されることを明らかにした。試験管内試験で *M. phlei* の増加要因を検討し、増加する温泉水としない温泉水があることを経験するとともに、pH の影響を検討した。さらに温泉水中の *M. phlei* に対するモノクロロミン消毒の効果が、高い場合と低い場合があることも試験管内試験で明らかになった。モノクロロミン消毒はレジオネラ属菌の不活化に有効であるが、感受性に幅があることを試験管内試験で確認した。レジオネラ属菌が継続的に検出される施設にモノクロロミン消毒を適用して効果を期待したが、レジオネラ属菌の遺伝子が継続的に検出されて、洗浄しても除ききれず、ろ過器等の衛生管理の改善が必要であった。ろ過器への対策とした電解オゾン水による消毒では、利用者数が多く汚染の負荷が高い間はレジオネラ属菌が散発的に検出され、利用者数の減少とろ過砂の交換により消毒効果が間に合っ
て検出が抑えられるようになったことを経験した。短期の繰り返しの洗浄によるバイオフィルムの除去、レジオネラ属菌の抑制効果を洗濯機の除染で経験した。

②冷却塔への対応として、以下の成果を得た。国内の冷却塔を発生源としたレジオネラ症集団感染の数値流体力学解析(CFD シミュレーション)を行い、レジオネラ属菌の広域拡散を定量的に評価した。レジオネラ属菌の拡散範囲は、天候・時間帯・風向など複数の環境要因の組み合わせによって大きく変動することが定量的に確認された。集団感染事例が発生した冷却塔環境の風速と風向、代替の冷却塔排出風を実測し、大気拡散モデルによる粒子拡散のシミュレーションを行い、上方や周辺への飛散が前述の CFD 解析結果と整合することを確認した。ニューヨーク州および市における冷却塔の登録制度に関する法規制等の情報を収集した。登録制度には罰則等の法的措置が設けられており、冷却塔の衛生管理において一定の役割を果たしているとともに、感染症発生時における感染源特定等の調査においても有益と考えられた。

③レジオネラ属菌の培養検査の精度管理に以下を検討した。英国健康安全保障庁(UKHS)が実施する EQA *Legionella* isolation scheme G140 への地方衛生研究所(地衛研)の参加を支援し、得られた検査結果の解析および課題の整理を行った。2025 年度は 55 機関の地衛研が参加し、G140A では 53 機関(96.4%)、G140B では 51 機関(92.7%)で Z スコア良好範囲内の結果を示した。

④分子疫学について以下の成果を得た。SBT (sequence-based typing) 型別に用いる *flaA* 遺伝子の PCR プライマーを修正した。2003 年から 2025 年にかけて冷却塔水から分離されたレジオネラ属菌の 460 株は、*L. pneumophila* が最も多く、血清群では SG1, SG13, SG7 が主要であり、SG1 は ST1 の C1 グループと ST154 の C2 グループが全体の 95 % を占めることを明らかにした。過去の 12 の患者株と環境株の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 解析を行い、組み換え領域を除去するか、しないかの解析方法の違いによって結果が異なる可能性、感染源を判断する難しさを明らかにした。一人の患者が同じ潜伏期間内に 2 施設で 2 つの公衆浴場由来の株に感染したと説明できる事例を経験した。レジオネラ症の散发事例及び集積事例について、分離株間の遺伝的距離を cgMLST (core genome multilocus Sequence typing) 解析及び SNP 解析により比較し、各事例における遺伝的距離に関する基礎データを蓄積した。散发事例のうち 4 事例では cgMLST 解析で 1~4 allele 差、SNP 解析で 1~14 SNPs、1 事例は cgMLST 解析で 9 allele 差、SNP 解析で 24 SNPs であった。集積事例では cgMLST 解析で 3~23 allele 差、SNP 解析で 4~28 SNPs を示した。国内で臨床からの分離頻度の高い遺伝子型(ST)である ST23 ならびに ST89 の菌株の SNP 解析を行なったところ、SBT 法では区別できない ST23、ST89 を高解像に識別できた。この場合は組み換え領域を除去しない方法の識別能が高かった。信頼性の高い調査や判断には、より多くの菌株や事例を検討して、将来に備えること、丁寧な疫学調査、細菌学的調査が重要と言えた。

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

主幹研究員

門屋 俊祐・国土技術政策総合研究所 研究官

金谷 潤一・富山県衛生研究所 部長補佐

小坂 浩司・国立環境研究所 上級主幹研究員

佐伯 歩・国立健康危機管理研究機構

主任研究員

中嶋 直樹・神奈川県衛生研究所 主任研究員

中西 典子・神戸市健康科学研究所 副部長

前川 純子・国立健康危機管理研究機構 研究員

淀谷 雄亮・川崎市健康安全研究所 技術職員

本間 義規・国立保健医療科学院 部長

大沢 飛智・北海道大学大学院工学研究院 助教

集団感染が繰り返される。衛生向上を目的とするはずの公衆浴場において、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)事態が生じた。公衆浴場における感染事故に加えて、冷却塔の環境汚染源を疑う事故も生じて、生活環境中の汚染源対策が広く求められている(2021 年 広島県、2022 年 兵庫県、2023 年 宮城県・大阪府)。

先の研究班「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究(22LA1008)」までの成果として、公衆浴場は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の改正について(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進んでいる。

A. 研究目的

公衆浴場や冷却塔の水にはレジオネラ属菌等の病原性微生物が増殖し、レジオネラ属菌による

冷却塔への対応は先の研究班で行っていなかったところ、立て続けに集団感染が生じ、喫緊の課題となった。冷却塔は、冷房や冷蔵・冷凍設備で使われる冷却水を、気化熱によって冷却する装置で、使用される水にレジオネラ属菌が増殖しやすく、菌を含む水が飛散して感染事故の原因となる。空冷式に比べて、冷却塔を用いる水冷式は冷却効率が高く、特定建築物や工場で広く採用される。外気温が40℃に達するような夏場では空冷式の効率が大きく低下する一方、水冷式は水の蒸発潜熱を利用することで比較的安定した冷却性能を発揮できる。エネルギー消費の観点からも水冷式は有利であり、その性能を安全に発揮するためには、冷却塔の適切な維持管理が欠かせない。

公衆浴場と冷却塔では対策の方法が異なるかもしれないが、どちらもレジオネラ属菌の検査方法や水の管理が共通して重要であることに変わりなく、双方の参考になる。本研究は公衆浴場と冷却塔のレジオネラの発生防止と、衛生管理の向上と推進を目的とする(図0)。

以降、1から13まである課題内容別に、A.目的、B.方法、C.結果および考察、D.結論を記載した。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. 公衆浴場の浴槽水における抗酸菌について

レジオネラ属菌の増殖を抑えるため、公衆浴場では主に次亜塩素酸ナトリウム(遊離塩素)により浴槽水が消毒されている。ただし、アンモニア態窒素、鉄、マンガン、有機物を含んでいたり、高pHの場合、消毒効果が低下することが知られている。結合塩素の一種であるモノクロアミンであれば、そのような場合でもレジオネラ属菌に対する消毒効果が期待できる¹⁾。ただしモノクロアミン消毒を継続して実施すると *Mycobacterium* 属菌(以下、抗酸菌)の一種である *Mycobacterium phlei* が

増加することがある²⁾。*M. phlei* (Rapid Growing *Mycobacteria*)による健康者の感染報告の例はほぼないが、バイオフィーム形成防止の観点からも、細菌の増殖には注意が必要である。

M. phlei はモノクロアミンだけでなく遊離塩素にも抵抗性があり³⁾、遊離塩素消毒下の浴槽水においても増殖することが最近になって経験的に知られるようになり、モノクロアミン消毒特有の問題ではなかったかもしれない。本研究では遊離塩素消毒時に *M. phlei* の増加があるのか、遊離塩素消毒とモノクロアミン消毒を別系統で実施している施設の協力を得て、それぞれの浴槽水における *M. phlei* の存在割合を調査した。加えて、モノクロアミン消毒下での *M. phlei* の増殖に関する要因についても検討した。

A2. アルカリ性塩化物泉中の *Mycobacterium phlei* に対する遊離塩素とモノクロアミンの消毒効果

公衆浴場では、従来から遊離塩素消毒が広く使用されている。しかし、高pHやアンモニア態窒素を多含するような温泉では、必ずしも遊離塩素消毒が最適ではなく、モノクロアミン消毒が、遊離塩素に代替する消毒方法の選択肢のひとつとなった⁴⁾。モノクロアミン消毒を連続的に実施していると、非結核性抗酸菌(Non-tuberculous *Mycobacteria* NTM)の一種である *M. phlei* が検出されるようになり、バイオフィームの生成等、衛生管理上の課題が懸念されてきた^{2,5,6)}。モノクロアミン消毒の実地検証^{7,9)}や、試験管内試験⁷⁾など、モノクロアミンの効果や実用性の検証を続けてきたが、消毒効果の高い場合と低い場合があり、*M. phlei* の増減する理由が不明であった。アルカリ性温泉水に対する試験管内試験では^{3,10)}、Ct1,500のモノクロアミン消毒で *M. phlei* の不活化が5ないし6-Logも進行していた。温泉成分により、消毒の

挙動が変化した可能性を想像するが、これまでの試験管内試験は、消毒の効果が高く、実地の営業施設で *M. phlei* が増殖することと対応していなかった。本研究では、単純温泉の次に多い塩化物泉に着目し、アルカリ性塩化物泉条件下における遊離塩素とモノクロアミンの *M. phlei* 消毒効果について、試験管内試験を行うこととした。

A3. 不活化曲線に基づくレジオネラ属菌のモノクロアミン感受性評価

公衆浴場におけるレジオネラ属菌の制御にモノクロアミン消毒が有効とされる¹¹⁾。しかしながら、レジオネラ属菌には多様な種や株があり、モノクロアミンへの感受性が異なる可能性がある。先行研究では、99.9%不活化(3-Log)に必要なCT値(CT99.9%:消毒剤濃度の減衰曲線の積分値であり、直線の場合は初期濃度と接触時間の積)が、レジオネラ属菌の種間及び種内において7倍程も異なることが報告されている¹²⁾。わが国の「公衆浴場における衛生等管理要領」においては3 mg/L程度を保つことが推奨されているが、先行研究¹²⁾のCT99.9%を直接適用することは困難である。そのCT値の算出にモノクロアミン濃度の減衰を考慮しているかも不明瞭であった。本研究では、モノクロアミン消毒の適切な濃度の確認を目的として、患者から分離された *L. pneumophila*、冷却塔水から分離された *L. anisa*、そして浴槽水から分離された *L. dumoffii* を用いて、モノクロアミンに対する感受性評価を行った。

A4. 公衆浴場におけるモノクロアミン消毒と配管洗浄

日本国内のレジオネラ症集団発生は、入浴施設を原因とした事例が多く報告されている¹³⁾。入浴施設におけるレジオネラ症防止対策は、レジオネラ属菌が増殖する場所となるバイオフィルムの

除去と浴槽水の消毒の2点が重要である。しかしながら、これらの対策を規則に則って実施していてもレジオネラ属菌が検出されることもあるため、施設の状況に応じた効果的な管理手法を提案する必要があると考えられる。本研究ではレジオネラ属菌が継続して検出されている施設において、遊離塩素よりバイオフィルム除去効果が高いモノクロアミンによる消毒試験を実施し¹⁴⁾、加えてバイオフィルム対策として配管洗浄を行い、その効果を調べた。

A5. 電解生成オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

公衆浴場等の温浴施設で衛生上の問題となっているレジオネラ属菌は、設備に付着する生物膜中で保護され、洗浄や消毒の困難なことが知られている¹⁵⁾。特に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、「公衆浴場における衛生等管理要領」において、「1週間に1回以上、ろ過器を十分に逆流洗浄(以下、逆洗)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」とされている¹⁶⁾。「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」では、循環配管に2~3%の過酸化水素や5~10 mg/Lの高濃度塩素を用いる方法が紹介されている¹⁷⁾。「レジオネラ症防止指針」では、ろ過器に対して、1週間に1回以上の頻度で5~10 mg/Lの高濃度塩素を使用した逆洗が推奨されており、気泡装置や噴流(以下、ジェット)装置を設けた浴槽のろ過器に対しては、毎日1回以上の頻度とされている¹⁸⁾。

ろ過器の生物膜の除去、消毒の方法の一つとしてオゾンに着目し、営業中のスーパー銭湯の協力を得て、ろ過器に電解オゾン水を供給する方法を試している。本試験は継続して行っており、小容量の浴槽水とろ過器、大容量の水風呂とろ過器

の場合は消毒効果が得られたが、本報告が課題とする大容量の浴槽ろ過器(男女2つのジェット浴槽を1つのろ過器でろ過する大型のろ過器で有効容量≒ろ材充填量 1.8m³)への効果は限定的であった。令和6年度の「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」では、オゾン濃度を平均1.5mg/Lまで増やしたが、必ずしもレジオネラ属菌の汚染を抑えきれていなかった¹⁹⁾。このろ過器は、男女2浴槽を受け持ち利用者数が多く負荷が高いだろうこと、またジェット循環により浴槽水へ溶存酸素が絶えず供給されることから、ろ過器内に生物膜が多量に蓄積していることが想定された。

A6. 家庭用洗濯機における塩素系消毒剤によるレジオネラ属菌に対する洗浄効果

洗濯機はレジオネラ属菌による汚染・増殖が検出される環境であり、生活衛生の維持向上の意味と、入浴施設の管理の参考になることを期待している^{20,21)}。先の研究班において、10台の家庭用洗濯機すべてから Liquid culture ethidium monoazide-quantitative PCR (LC EMA-qPCR)法によりレジオネラ属菌が検出された²²⁾。そのうちの1台の洗濯機を対象に、塩素系消毒剤の洗浄によるレジオネラ属菌の汚染軽減が試みられたものの、洗浄後1か月で洗浄前と同程度の汚染レベルに再増加し、除染が十分でなかったことが確認された。このことから、本研究では洗濯機の洗浄、除染の方法について、さらなる検討を行った。本研究では洗濯機の洗浄を1回ではなく2回実施して、効果を改めて検討した。レジオネラ属菌の測定は、平板培地による培養、quantitative PCR (qPCR)法及び LC EMA-qPCR 法による遺伝子の検出とした。16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスも実施して、洗浄による菌叢の変化も観察した。

A7. 冷却塔の稼働時モニタリングとその特性把握

冷却塔は圧縮式冷凍機或いは吸収式冷凍機における放熱側排熱のために用いられる設備で、冷房負荷の大きな建物、例えば大規模施設の空調設備あるいは24時間連続運転が必要なクリーンルームや医療施設等で活用されることが多い。水を空気と接触させることで蒸発させ、その蒸発潜熱で水温を下げる物理現象を利用する。設計上、蒸発水量は循環水量の1%、飛散損失水量(キャリーオーバー)は循環水の0.1%、ブローダウン量(蒸発によって残りの冷却水が濃縮されるのを防ぐ)は0.1~0.5%が必要となる。

冷却塔の循環水はレジオネラ属菌により汚染されて問題になる。冷却塔から発生するエアロゾルにレジオネラ属菌が含まれ、大気中に拡散し、海外(ヨーロッパ(スペイン、ポルトガル、フランス等)、アメリカ、オーストラリア等)では広域伝播による集団感染事例が繰り返し報告されている⁸³⁾。日本ではこれまで冷却塔を汚染源とする集団感染事例が少なかったが、2023年に医療施設の冷却塔が原因とされる集団感染(院内感染と市中感染)が発生した²⁷⁾。感染者のうち13名は、受診歴のない近隣住民であり、かつ医療施設から0.3~13.6km圏内で感染した広域拡散と考えられている。東京都や大阪府等でも、同様の広域拡散による集団感染が疑われている。近年の夏期の高温多湿化に伴い、危険性が増している。

空中拡散したレジオネラ属菌による感染パターンは、次の2種類がある。1つは、空調系統或いは開放窓等からレジオネラ属菌を含んだエアロゾル粒子が室内に侵入し院内感染するパターン⁸⁴⁾、もう一つは冷却塔ファンで上空放出されたエアロゾル粒子が広域拡散し市中感染するパターンである⁸⁵⁾。院内感染を避けるために、冷却塔と換気装置の離隔距離を、10m 確保するなどの建築的

工夫も行われてきた。しかし、短期間に複数の事故(疑い含む)が発生しており²⁷⁾、改めて冷却塔の工学的検証及び対策立案が求められている。そこで本研究では、集団感染事例が発生した冷却塔環境のモニタリングと、冷却塔実機のファン風速のモニタリング等を行い(すでに実機が撤去されていたことから代替機)、その特性の把握から始めた。

A8. レジオネラ属菌を含むエアロゾルの広域拡散シミュレーションとリスクエリア分析

2023 年 6 月から 9 月にかけて、宮城県大崎市の病院に設置された冷却塔を発生源とするレジオネラ症の集団感染事例が発生した²³⁾。本事例では感染者のうち 13 名が発生源から半径 3km 圏内に住居や職場を有していたことから、レジオネラ属菌が想定以上に広範囲へ拡散した可能性が示唆されている。発生当時、冷却塔水におけるレジオネラ属菌濃度は約 68,000,000 CFU/100mL に達しており、冷却塔の循環水に求められる基準(100 CFU/100mL 未満)より桁違いに多かった。高濃度のレジオネラ属菌を含むエアロゾルが拡散したと考えられるが、実際の拡散の状況や大気中での残存、濃度分布を推測し、患者の発生と照らし合わせることは、事故を理解するうえで有用と考えられる。本研究では、GIS(地理情報システム)により再現した大崎市の 3D モデルに対して、CFD(数値流体力学)解析を行い、レジオネラ属菌の拡散を推測する。その際、紫外線 B や相対湿度によるレジオネラ属菌の不活化と生残を考慮する。発生源から 5km 圏内における拡散範囲と濃度分布を定量的に評価した。

A9. 英国レジオネラ属菌外部精度管理(UKHSA の EQA)への参加と冷却塔の維持管理に関する国内外の法規制および登録制度

レジオネラ属菌培養法の検査結果は、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。検査機関は各施設で標準作業手順書(SOP)を作成し、その方法に沿って外部精度管理に参加して検査精度を確認している。令和元年に発出された「公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について」(生食発 0919 第 8 号厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知)により、「公衆浴場における衛生等管理要領等について」に、「検査の依頼に当たっては、精度管理を行っている検査機関に依頼することが望ましい」の一文も記載された。しかしながら、令和元年時点に参加可能であった外部精度管理は課題が存在していたため、その解消を図ってきた²⁴⁾。今年度は英国健康安全保障庁(UKHSA:UK Health Security Agency)の EQA (external quality assessment) Legionella isolation scheme (以下、UKHSA)への地衛研の参加を支援し、外部精度管理が安定して継続して行われることを企図した。得られたデータの収集・解析に加えてアンケート調査を実施することとした。

これまで日本国内では浴槽水を感染源とするレジオネラ感染事例が多数報告されてきたが、近年では感染源として水冷式の冷却塔が疑われる集団感染が報告されている^{25,26)}。保健所は、特定建築物の冷却塔であれば届け出により所在等を把握している一方、対象外は把握しておらず、保健所が地域内に多数ある冷却塔を網羅的に把握したり調査や対処したりするのは容易ではなかった。冷却塔への対応として、国内外で制定されている冷却塔の維持管理に関する法規制や登録制度について検討することとした。

A10. レジオネラの分子疫学と冷却塔の汚染実態調査

レジオネラ症の感染源の推定には、患者分離株と環境分離株の遺伝子型の一致を確認する。用いられる分子疫学解析手法の sequence-based typing (SBT)法は、7遺伝子の部分塩基配列の比較により解像度が得られるものの、検出頻度の高い遺伝子型においては信頼性が不足する場合がある。信頼性の維持と向上には、多くの菌株の情報を蓄積しておくことが有用である。従来は浴槽水を中心とした結果が蓄積されてきたが、冷却塔水を感染源とするレジオネラ集団感染事例が国内で相次いで報告された²⁶⁻²⁸⁾。そこで、過去の集団事例や散発事例に加えて、特に冷却塔由来株の遺伝的特徴を明らかにすることを目的とした。今年度は *flaA* 遺伝子の増幅が認められず、遺伝子型が決定できない事例に対応するため、primer の改良を行った。2003年から2025年にかけて冷却塔から分離されたレジオネラ属菌について、菌種別、血清型別、遺伝子型別を進めた。

A11. レジオネラ症の感染源調査における次世代シーケンサーの活用

レジオネラ症の主要な起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子型 (Sequence-Based Typing (SBT) による Sequence Type (ST)) は多様であるが、レジオネラ症患者から検出される遺伝子型には偏りがあり、感染源特定の判断に迷う場合がある²⁹⁾。実際、富山県でレジオネラ症患者から高頻度で検出される遺伝子型は、複数の公衆浴場からも検出され、遺伝子型だけでは感染源を判断できない場合がある。患者が複数の公衆浴場を利用していることも、感染源の特定を難しくしている要因の一つであると考えられる。

遺伝子型による分子疫学に限界があったことから、全ゲノム解析による、より詳細な分子疫学に期待が寄せられている。これまでの全ゲノム解析による検討はより解像度が高く、患者および患者が

利用した公衆浴場から分離された菌株が概ね近縁な系統であり、期待通りの結果が得られている³⁰⁾。しかしそれでもなお判断しかねる株もあり、患者株、環境株のいずれも背景となる情報の蓄積があるほうが、より正確な判断につながると考えられる。

そこで本研究では、患者株の大半を占める *L. pneumophila* 血清群 1 (SG1) のうち、富山県内で疫学的に関連があると推定された事例の株について、全ゲノム SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 解析を実施した。同一感染源と判断する基準となる SNP 数や、感染源調査に適した全ゲノム解析の手法の確立を目的とした。得られた結果は、将来の感染源調査の参考になる。汚染源が的確に把握されることで、問題となった公衆浴場の衛生管理の向上が期待される。

A12. 散発事例及び集積事例における遺伝的距離の検討

レジオネラ属菌の分子疫学解析法として Sequence Based Typing (SBT)法が広く利用されている。しかし、Sequence Type (ST)によっては頻繁に検出される ST が確認されるなど型別結果に偏りがあることが明らかとなっている。このため、レジオネラ症の集団発生時など、より詳細な分子疫学解析が求められる場面では、SBT 法のみでは感染源の特定が困難となる場合がある。従来、地方衛生研究所においては、より高分解能な解析手法としてパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) が実施されていたが、機器の製造中止により継続的に実施することが困難となっている。近年では全ゲノム解析による解析報告が増加しているものの、国内における事例の集積は不十分であり、結果判定や行政的な判断が困難になるケースが想定される。本検討では疫学的背景から感染源が判明している事例

について、cgMLST (core genome multilocus sequence typing) 解析及び SNP 解析による実例データの蓄積を行うとともに、遺伝的距離を評価した。

A13. *Legionella pneumophila* ST23 ならびに ST89 の分子疫学解析

レジオネラ症患者の感染源を特定するには、患者から菌株を分離し、感染源が疑われる入浴施設などからの環境分離株をスクリーニングし、血清群が一致した菌株について、遺伝子解析を行い、その同一性を確認する。Sequence-based typing (SBT)法による遺伝子型別がよく用いられるが、高頻度に分離される遺伝子型(ST)では、感染源特定の判断が困難となるため、他の分子疫学解析手法と合わせて調査する必要がある。特に、全ゲノム解析は高い解像度を持つ識別性の高い手法であることが示されており、レジオネラ属菌の分子疫学においても整備が課題となっている^{31, 32)}。*L. pneumophila* のゲノムは組み換えが頻繁に起こりやすいことが知られており^{33, 34)}、全ゲノム解析においては、組み換え領域を解析に含めるかどうか等、解析手法の検討を行う必要がある³⁵⁻³⁷⁾。

ST23 ならびに ST89 は、国内で臨床から高頻度に分離される ST である^{38, 39)}。ST23 は、散発事例や集団感染事例を引き起こし、国内では 2000 年、2002 年、2015 年に発生した公衆浴場集団感染事例の起因菌でもあった。さらに、冷却塔水を感染源とした事例も存在するが、散発事例での感染源は不明なことが多い^{38, 40)}。ST89 は、2 事例の入浴施設を感染源とした PFGE 確定例(うち 1 例は複数 ST の株の感染事例)の他、入浴施設や運送業・建設解体業、畑仕事等を推定感染源とする散発事例を引き起こしているが、感染源は不明なことが多い^{38, 41)}。

SBT 法のみでは菌株の異同の識別が困難な ST23 ならびに ST89 について、SNP 解析で補うこ

とを企図した。組み換えが解析に影響しないように Gubbins で組み換え領域を除外したうえで、SNP 解析を行うことが当初の解析パイプラインであった。ただし、この処理によって SNP 検出を行うゲノムカバー率が大きく減少することがあり、それは解像度の低下につながる。Gubbins 処理の解像度への影響を考慮しつつ、各 ST 分離株の 2 株間 SNP 数を検証した。

B. 研究方法

研究班を①公衆浴場への対応、②冷却塔への対応、③レジオネラ属菌の培養検査の精度管理、並びに④レジオネラ属菌の分子疫学の大きく分けて 4 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(図 0)。研究分担者 11 名、研究協力者多数の参画を得て、研究を遂行した(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. 公衆浴場の浴槽水における抗酸菌について

遊離塩素消毒下での *M. phlei* の存在割合を検討した。同一施設内で浴槽水の原水が、塩化物泉の温泉水の 2 検体(遊離塩素消毒、内湯と露天風呂)と、井水の 1 検体(モノクロロミン消毒、ジェット風呂)を採水した。いずれも循環ろ過式で、遊離塩素は 1~2 mg/L、モノクロロミンは 3~5 mg/L で管理されていた。各検体から同時に 2 回ずつ採水し、従属栄養細菌数の測定および菌叢解析を実施した。従属栄養細菌数の測定は、R2A 寒天培地を用いた混濁培養で 42°C、14 日間培養した。一部のコロニーより 16S rDNA V3-V4 領域の塩基配列を決定して菌種を調べた。菌叢解析は、16S rDNA の V3-V4 領域のアンプリコンシーケンスに

より行った(生物技研)。

2025 年 10 月から 12 月にかけて採水した浴槽水 143 検体の抗酸菌とレジオネラ属菌の GVPC 寒天培地での発育状況を検討した。定法に従い、濃縮液を酸処理し、GVPC 寒天培地を用いて 37°C で 7 日間培養した。レジオネラ属菌はシステム要求性試験、抗酸菌は Rocchetti らのプライマー⁴²⁾を用いた PCR で判定した。

M. phlei の増殖に関する要因を検討した。先の研究で従属栄養細菌数が増加した施設⁶⁾の温泉水(以下、増加温泉水;pH9)と、増加しなかった施設⁸¹⁾の温泉水(以下、非増加温泉水;pH10)を使用した。水酸化ナトリウム又は塩酸を用いて、これら 2 つの温泉水の pH を 8, 9, 10 に調整した。これに加えて、2 つの温泉水のアンモニウムイオン濃度を塩化アンモニウムを用いて、0, 0.5, 1 mg/L になるよう調整した。なお、元となる温泉水のアンモニウムイオン濃度は 0 mg/L であった。以上の 18 通り(=2 つの温泉×3 通りの pH×3 通りのアンモニウムイオン濃度)に調製した温泉水に、温泉施設で分離された *M. phlei*⁶⁾を 10² CFU/mL 程度になるよう添加した。40°C で 7 日間まで静置し、1 日ごとに R2A 寒天培地を用いた混釈培養で、各条件 2 サンプルの菌数の平均値を算出した。

B2. アルカリ性塩化物泉中の *Mycobacterium phlei* に対する遊離塩素とモノクロラミンの消毒効果

先行研究の不活化試験の方法^{2,3)}に準拠して実施した。

アルカリ性塩化物泉の検液として、三重県内で湧出する pH9 よりもアルカリ性が高く、塩化物イオン濃度が 10,000 mg/L 以上含有されている温泉水を使用した(表 2-1)。

M. phlei 株は、神奈川県内温浴施設の浴槽水由来を使用した(松田ら, 2019)⁴³⁾。この株を R2A

寒天培地の 37°C で培養し、コロニーを実験直前に懸濁して菌原液を調製した。検液 200 mL に 10⁶CFU/mL 程度の終濃度となるよう菌を添加した。

検液の消毒は、遊離塩素の初期濃度が約 5 mg/L、約 10 mg/L 又は約 20 mg/L、モノクロラミンの初期濃度が約 5 mg/L、約 10 mg/L 又は約 20 mg/L とした。菌を含む検液に消毒液を混合した後、経時的に一部をサンプリングし、菌数及び各消毒薬の濃度を測定した。

菌数は、適量のチオ硫酸ナトリウム溶液(関東化学)で消毒剤を中和した後、りん酸緩衝生理食塩水(PBS; . Phosphate-buffered saline)で適宜希釈し、R2A 寒天培地の 7 日間 37°C の培養で測定した。

遊離塩素は DPD 法(ポケット残留塩素計 HACH Pocket ColorimeterII)、モノクロラミン濃度はインドフェノール法(ポケットモノクロラミン・遊離アンモニア計、HACH DR300 Pocket ColorimeterII)で測定した。消毒濃度の実測値(C)と、接触時間(T)の積から CT 値(Concentration × Time value)⁴⁴⁾を算出した。CT 値と菌の生残数から不活化曲線をプロットした。

B3. 不活化曲線に基づくレジオネラ属菌のモノクロラミン感受性評価

消毒試験は、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila* Philadelphia-1 (ATCC33152)、臨床分離株である *L. pneumophila*、冷却塔水から分離された *L. anisa*、浴槽水から分離された *L. dumoffii*を対象とした。レジオネラ属菌の培養に BCYE α 寒天培地(Oxoid 1203B; SR0251A)を使用した。モノクロラミンの調製は、0.1 M リン酸緩衝液 pH 8.0(以下、PBS(8.0); 和光純薬)で希釈した 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液(和光純薬)に対して、塩素濃度とアンモニア態窒素濃度の質量比が 4.5 以上となるように 1M 塩化アンモニウム溶液を添加した⁴⁵⁾。全塩素濃度

(モノクロラミン濃度)は、ポケット残留塩素計 (HACH DR300)により測定した。

初期菌体濃度の多寡が不活化曲線に与える影響を確認するため、初期濃度 10^4 及び 10^5 CFU/mL の *L. pneumophila* (ATCC 株)試料を用いてモノクロラミン濃度の減衰を試験した。0.1M ダルベッコ PBS(-)(以下、PBS(7.0); 島津ダイアグノスティクス)により 10^1 及び 10^2 倍希釈した菌懸濁液を 1 mg/L モノクロラミン溶液に添加した(室温条件下)。0, 30, 60, 120 秒後の全塩素濃度を測定・記録した。First-order rate equation を改良したモデルを用いて (Eq. 1)、最小二乗法により係数を推定した:

$$C_t = C_0 e^{-kt^m} \quad (\text{Eq. 1})$$

C_t は接触時間 t における濃度 [mg/L]、 C_0 は消毒前の濃度 [mg/L]、 k は減衰定数 [sec^{-1}]、 m は形状因子[-]である^{46,47)}。

L. pneumophila (臨床株)、*L. anisa*、*L. dumoffii* の塩素感受性を比較するため、3 mg/L のモノクロラミン溶液中で 0, 1, 3, 5, 10, 15 分接触させた際の不活化曲線を得た。菌試料をモノクロラミン溶液へ添加して、室温条件、静置の下実施した。所定の接触時間において試料の一部を取り出し、0.1 M チオ硫酸ナトリウム溶液(和光純薬)により残留塩素を消去した。培養により消毒前 N_0 [CFU/mL] と消毒後 N_t [CFU/mL] の菌濃度を測定した。レジオネラ属菌の不活化動態ならびに株間のモノクロラミン感受性を定量的に把握するため、モノクロラミン濃度一定条件下における不活化速度定数 k [sec^{-1}]を推定した (Eq. 2):

$$\text{Log}_{10}(N_t/N_0) = -kt^m \quad (\text{Eq. 2})$$

k は不活化速度定数 [sec^{-1}]、 m は Hom 因子[-]である^{46, 47)}。パラメータは、R version 4.4.0 (<https://www.r-project.org/>) 及び Stan version 2.32.2 (<https://mc-stan.org/>) 上においてマルコフ連鎖モンテカルロ法により推定した。

B4. 公衆浴場におけるモノクロラミン消毒と配管洗浄

レジオネラ属菌に悩む公衆浴場の協力を得て、モノクロラミン消毒を試験した。期間中の利用者は 1 日あたり 200~300 人だった。実験浴槽は循環式浴槽 A (総容量 8.9 トン)、浴槽 B (11.8 トン)で、共に砂式ろ過器があり、水道水を使用して、週 1 回換水していた。令和 2 年以降にレジオネラ属菌が浴槽 A から 5 回、浴槽 B から 2 回検出されていた。イソシアヌル酸ナトリウム製剤による塩素消毒装置で、営業時の残留遊離塩素濃度は 0.5~1.0 mg/L に維持されていた。ろ過器の定期点検が年 2 回行われたが、ろ材の交換時期は不明だった。

モノクロラミンは濃度 5.0 mg/L 程度にタイマー式自動添加した(モノクロラミン生成装置クロクター、ケイ・アイ化成)。週 1 回、モノクロラミン濃度を 15 mg/L に上昇させて一晩循環した後に排水した。モノクロラミン消毒試験の開始日を試験 0 日目として結果を示した。全塩素濃度は DPD 法 (MD100, Lovibond、あるいは HI97734, HANNA) で測定した。モノクロラミン濃度をインドフェノール法 (Pocket Colorimeter II, Hach) にて測定した。

配管洗浄は、過炭酸ナトリウム製剤を製品取扱説明書に従って、浴槽 A は試験開始 4 日前の遊離塩素消毒時、浴槽 B が試験 29 日目に行われた。さらに、試験 90 日目に本研究班で開発した過炭酸ナトリウムと助剤からなる製剤⁴⁸⁾を使用して浴槽 A、B を配管洗浄した。

浴槽水の採取に加えて、ヘアキャッチャー付近の配管拭取りをワイプチェック(佐藤化成工業所)を用いて適宜実施した。レジオネラ属菌の培養検査は常法に従い、メンブレンフィルターろ過による 100 倍濃縮後、無処理、酸処理及び熱処理の検体各々を GVPC 培地 (島津ダイアグノスティクス)に

塗抹して36℃で7日間培養した。配管拭取り検体はPBS10mLに振り出し、遠心分離(5,000rpm、30分)後に3mLに濃縮した無処理及び酸処理検体を検査に供した。一般細菌数、自由生活性アメーバ数及び従属栄養細菌数を定量した。浴槽水中のレジオネラ属菌の生菌遺伝子の検出をEMA-qPCR法、死菌を含む遺伝子の検出をqPCR法により行った。qPCRは、Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2(タカラバイオ)及びCycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を用いた。EMA処理に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0(タカラバイオ)及びLED Crosslinker 12(タカラバイオ)を用いた。

B5. 電解生成オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

試験対象としたろ過器は、男女のジェット浴槽(原泉水、11 m³×2、42℃、pH7.5)を併せてろ過している。営業終了後、逆洗前のろ過器(有効容量≒ろ材充填量1.8 m³、直径約1.4 m×高さ約1.2 m)に対して、電解オゾン水のろ過器容量分を毎日供給した。試験装置は、単相100Vの電源で稼働し、始動スイッチを一度押すだけで、電解オゾン水を自動供給するシステムとなっている。電解オゾン水は、塩素消毒を活性炭で除去した後の井水中での、電気分解を行うことで生成した。オゾン生成電極は、市販されている電極(オゾンバスターインダストリー、オゾンマート製)を用いた。電解オゾン水は、ろ過器下部のドレン口より供給し、タイマー制御により一定時間経過後停止する。井水の供給量に制限があるため電解オゾン水の流量は26 L/minとした。オゾン濃度は、1.5 mg/Lを目標値とし、電解槽を2個設置した。オゾン供給時間は、ろ過器容量分(1.8 m³)を供給するため、70分間(=1800 L÷26 L/min)を要した。

電解オゾン水の効果を調べるため、週1回の頻

度で、浴槽水及び逆洗水を採水し、レジオネラ属菌を分析した⁴⁹⁾。試験対象としたジェット浴槽は週に2回、浴槽水を換水していた。浴槽水は、換水前に汚れ(生物膜)の蓄積が最も多く、換水の前後で採水した。代表して男子浴槽から採水した。ろ過器内のレジオネラ属菌による汚染を把握する目的で、逆洗水も分析対象に含めた。ただし、電解オゾン水の供給時に行われる逆洗水であることから、オゾン有の逆洗水となる。

B6. 家庭用洗濯機における塩素系消毒剤によるレジオネラ属菌に対する洗浄効果

調査対象は、単身者の住宅で使用している洗濯機1台とした。調査期間中の洗濯の頻度は週5回程度で、他の清掃はせず、乾燥モードは使用しなかった。洗濯槽の洗浄方法は、市販の塩素系洗浄剤を使用し、約10時間のつけ置きとした。採水は、洗濯槽を最小水量(約10 L)の水道水で満たし、十分量の25%チオ硫酸ナトリウム溶液を添加後、10分間洗浄モードで装置を動かしてから500 mLを採取した。水試料を直径47 mm、孔径0.2 µmのポリカーボネートメンブレンフィルターでろ過し、1/50希釈したPBSの5 mLに再浮遊した(以下、濃縮液)。

16S rRNA 遺伝子(V3-V4領域)のアンプリコンシーケンスに、洗濯機水から採取した水試料を面積49 cm²、孔径0.2 µmのPESフィルターでろ過し、冷凍条件で保管、外注先(生物技研、神奈川県)に送付した。MPure Bacterial DNA Extraction Kit(MP Bio)でDNAを抽出後、Illumina NextSeq 1000でシーケンスした。取得したリードデータはQIIME2(ver. 2024.10)を用いて解析した。Amplicon Sequence Variant (ASV)推定にはDADA2プラグインを使用し、Greengenesデータベース(ver. 13_8)を用いて分類した。

レジオネラ属菌の分離培養は、GVPC 寒天培

地(関東化学)及び MWY 寒天培地(関東化学)で少なくとも7日間培養した。培養の前処理に、以前の報告²²⁾を参考に熱・酸処理を行った。すなわち、50°Cの恒温水槽中で20分間静置した後、等量のpH 2.2 緩衝液を加えて5分間静置した。別に、Inoue ら⁵⁰⁾の報告を参考に、エタンプトールを10 mg/L に調製したpH 2.2 緩衝液と、濃縮液を等量混合して5分間静置する処理も行った。

従属栄養細菌数は、濃縮前の洗濯機水をPBSで10倍段階希釈し、それらの1 mLを混釈法によりR2A 寒天培地(BD)に接種した。20°Cで7日間培養し、集落数を計数した。

qPCR 法とLC EMA-qPCR 法によるレジオネラ属菌数の測定は以前の報告²²⁾に従い実施した。

LC EMA-qPCR 法は、濃縮液を遠心分離でさらに10倍濃縮してから等量のpH 2.2 緩衝液で酸処理をした。そこに *Legionella* LC medium (タカラバイオ) 0.9 mL を添加し、37°Cで18時間培養した。培養後の100 µL を分取し、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (タカラバイオ)を用いてEMA処理をした。

qPCR 法とLC EMA-qPCR 法のDNA抽出は、濃縮液の1 mLからLysis Buffer for *Legionella* Ver.2 (タカラバイオ) を用いて行った。

CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を用いてqPCRを実施した。キットのマニュアルに従い、qPCR 法では死菌を含む、LC EMA-qPCR 法では生菌に相当する、レジオネラ属菌数(CFU 換算値)を算出した。

B7. 冷却塔の稼働時モニタリングとその特性把握

対象とする医療施設は2023年に集団感染が発生した施設である。当時の冷却塔は既に撤去されていることから、シミュレーションによる検証を行うこととした。評価手法として、環境アセスメントで用いられる大気拡散モデル(プリューム・パフモデル)

を利用した⁸⁶⁾。算出基礎式を(1)～(3)式に示す。

排風上昇高さ算定(CONCAWE モデル)

$$\Delta H = 0.157 \cdot Q_H^{0.5} \cdot u^{-\frac{3}{4}} \quad (1)$$

有風時(プリュームモデル)の地上濃度C

$$C = \frac{Q}{\pi \sigma_y \sigma_z U} \cdot e^{-\frac{y^2}{2\sigma_y^2}} \cdot e^{-\frac{H_e^2}{2\sigma_z^2}} \quad (2)$$

無風時(パフモデル)の地上濃度C

$$C = \frac{Q}{(2\pi)^{3/2} \gamma} \cdot \left(\frac{2}{R^2 + \frac{\alpha^2}{\gamma^2} H_e^2} \right) \quad (3)$$

ただし、 ΔH :冷却塔排風上昇距離(m)、 Q_H :排風熱量(W)、 θ :温度(°C)、C:濃度(-)、 σ_y 、 σ_z :排風のy方向およびz方向の拡散幅(m)、Q:単位時間当たりのレジオネラ属菌放出強度(CFU/s)、U:外部風速(m/s)、u:ファン風速(冷却塔排風速度)(m/s)、 H_e :排風の中心軸の地上からの高さ(有効煙突高)(m)、 α 、 γ :大気安定度に対して設定された無風時拡散パラメータ。

広域拡散のシミュレーションは、別の研究分担者が数値流体解析(CFD)を実施するが、本手法の大気拡散モデルと照らし合わせて妥当性の検証に用いることを考えている。風向・風速データが必要であるため、超音波風速計(PGWS-100-3)を冷却塔があった建物最上階に設置した。測定期間は2025年8月28日～10月15日である。

大気拡散モデル(広域拡散)や無風時の周辺汚染質濃度の算出に必要なファン風速データは、稼働している実機で代替した。東京都及び埼玉

県の建物に設置された冷却塔のファン風速等を、サトテック・ベーン式風速計 AM-4207SD を用いて測定した。

B8. レジオネラ属菌を含むエアロゾルの広域拡散シミュレーションとリスクエリア分析

3D で再現した対象都市を対象として、レジオネラ属菌を高濃度を含む冷却塔からのエアロゾル噴霧を模擬した拡散シミュレーション (CFD 解析) を実施した。

対象都市の再現手法について、その概要は以下の通りである⁵¹⁾。建物形状を再現するために、Open Street Map (OSM)⁵²⁾で建物の平面形状を把握した。基盤地図情報より入手可能な地表面の標高座標である DTM⁵³⁾と、国際興業株式会社より有償で提供されている樹木や建物を含めた標高座標である DSM⁵⁴⁾の差から建物高さを推定した。求めた建物の形状 (平面形状、高さ) を基に、Energy Plus で利用可能な idf ファイルとして、対象都市を 3D 化した^{55, 56)}。Google SketchUp⁵⁷⁾を用いて、CFD 解析用ソフト STREAM⁵⁸⁾の STL 形式に変換した。

レジオネラ症集団発生があった 2023 年 6 月から 8 月を対象に、当時の気象条件を再現した。気象庁 (JMA) が提供する 6 月から 8 月にかけての大崎市の気象データを用いて、風配図を作成した (図 8-1)。住民が活動中と想定される時間帯 (10:00~22:00 と仮定) を、日中 (10:00~16:00) と夕方以降 (16:00~22:00) に分割した。

紫外線によるレジオネラ属菌の不活化を考慮した⁵⁹⁾。波長別の強度に関し、300nm 未満の波長は地表に到達する強度が急激に低下し、地上付近では紫外線 B (290~320 nm) が多くなる (紫外線 C の影響は考慮しなかった)⁶⁰⁾。紫外線 B によるレジオネラ属菌の濃度減衰は、Chick-Watson 不活化モデル式に基づいて評価した。紫外線強度が与

えられれば、経過後の濃度を予測することが可能である^{61, 62)}。大崎市の紫外線 B は拡張アメダス気象データの年標準 (2011~2020 年) データを使用した。ただし、地面に近い高さであるほど、周辺の建物に遮られ、紫外線が届かない。そこで、周辺の建物の配置状況を正射影画像で再現し、場所ごとに届く紫外線強度を想定した。正射影画像は対象地点を指定したうえで、対象地点を中心とした 200m 以内の建物を OSM データより抽出し、対象地点の座標と抽出した建物の座標の関係をもとに作成した。

拡張アメダス気象データより入手できる紫外線 B には直達成分と拡散成分がある。作成した正射影画像を用いて、それぞれの成分の減衰量を算出し、それらを合算した。直達成分については、拡張アメダス気象データに含まれる太陽高度および太陽方位角を用いて正射影画像上に太陽位置を設定し、建物によって遮蔽されない場合に、その地点へ到達するものとした。拡散成分は正射影画像の全体に対する天空部分となる黒色部分の割合を紫外線 B の拡散成分に乗ずることで求めた。

屋外湿度の変化もエアロゾル化されたレジオネラ属菌の気中での不活化に大きく影響する¹⁴⁾。相対湿度に対するレジオネラ属菌の生存率を考慮した。

粒子 1 点ごとの軌跡を CFD 解析より算出し、それぞれの粒子で紫外線 B 及び相対湿度の時間ごとの影響を算出した。当初、シミュレーション条件を仮に 30 秒ごとに 2 粒子ずつ冷却塔より放出することとし、風速は 2.5 m/s、風向は南東、粒子の沈降速度をストークスの式を参考に計算した。粒子が分散された結果は確認できたが、発生源である冷却塔から離れるほど、粒子の通過が予想される場所であるにもかかわらず、レジオネラ属菌を含むエアロゾルが一切存在しない箇所が発生した。

そこで、許容可能な計算負荷に抑えつつ、粒子の分散を正確にとらえるために、冷却塔から放出される粒子は毎秒8個に増やした。粒子の発生源である冷却塔から北西方向に粒子が分布することになるので、冷却塔を計算範囲の南東に配置した。計算対象エリアを4,000m×5,000m×60mとした。

B9. 英国レジオネラ属菌外部精度管理(UKHSAのEQA)への参加と冷却塔の維持管理に関する国内外の法規制および登録制度

地衛研の外部精度管理への参加を支援した。2025年度はUKHSAのG140(2025年10月実施)に地衛研55機関が参加した。参加地衛研の募集は、国立感染症研究所と地衛研で構成される「衛生微生物技術協議会レジオネラ・レファレンスセンター(以下、レファレンスセンター)」を通じて行った⁶³⁾。検査は、各機関のSOPによる環境水の標準的な方法の「前処理あり、選択培地」と、菌数の減少を見る目的で「前処理なし、非選択培地」が行われた。地衛研から収集したデータと、UKHSAから提供を受けたデータを合わせて解析や課題の抽出を行った。

国内外で制定されている冷却塔の維持管理に関する法規制等の情報を収集した。本年度はニューヨーク州およびニューヨーク市の冷却塔登録制度について、ニューヨーク州⁶⁴⁾およびニューヨーク市⁶⁵⁾のウェブサイトの情報を基にまとめた。

B10. レジオネラの分子疫学と冷却塔の汚染実態調査

散发例の患者から分離された*L. pneumophila* SG1 ST818 (KL2644)を用いた。2003年から2025年に冷却塔水254検体から分離されたレジオネラ属菌460株を用いた。菌種と血清群は定法に基づき決定した。一部の菌種の同定にMALDI-TOF

MS(Bruker)、あるいは*mip* (macrophage infectivity potentiator)遺伝子によるシーケンスも用いた⁶⁶⁾。SBT型別はEuropean Working Group for Legionella Infections (EWGLI)の方法に基づき、*L. pneumophila*の7つの遺伝子*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*の一部領域の塩基配列を解読し、遺伝子型(sequence type: ST)を決定した⁶⁶⁾。ゲノム解析はQIAseq FX(QIAGEN)を用いてDNAライブラリを調製し、MiSeq reagent Kit v.3を用いてリードデータを取得した。Skeseでアセンブリし、PROKKAでアノテーションを行った。

B11. レジオネラ症の感染源調査における次世代シーケンサーの活用

全ゲノム解析に用いた菌株は、2005年以降に富山県で発生したレジオネラ症12事例(疑い含む)から分離された患者由来株と浴槽分離株を対象とした。そのうち事例2は、患者が潜伏期間内に2か所の公衆浴場を利用し、患者株と2施設から分離された株が同じSTであった。感染源について精査するため、全ゲノム解析に加え、血清型別、SBTを実施した。血清型別は、BCYE α 寒天培地(島津ダイアグノスティクス)に発育した菌を用いて加熱抗原を作製後、レジオネラ免疫血清(デンカ)および*Legionella Latex Test Kit* (オキソイド)を用いて実施した⁶⁶⁾。SBTは、菌株から抽出したDNAを用いて7遺伝子の部分塩基配列を解読し、STを決定した⁶⁶⁾。全ゲノム解析のDNAは、QIAamp DNA Mini Kit(キアゲン)を用いて抽出した。DNAライブラリは、Nextera XT DNA Library Preparation Kit(イルミナ)またはQIAseq FX DNA Library UDI Kit(キアゲン)を用いて作製した。その後、MiSeq Reagent Kit v3 (2×300 bp PE) またはNovaSeq X Plus system (2×150 bp PE)を用いて配列を解読した。取得したペアエンドのリードデータより、SNPcaster (<https://github.com/leech-rr/>)

SNPcaster) を用いて、SNP を検出した。その SNP 検出の際、リピート領域は除外した。組み換え領域の除外には、Gubbins を用いた。NCBI データベースから取得した Paris 株 (accession no. NC_006368) の全長配列をレファレンス配列とした。

B12. 散発事例及び集積事例における遺伝的距離の検討

2014 年から 2025 年までに分離され、疫学調査により感染源が特定されているレジオネラ症散発事例 5 例と、2012 年から 2018 年までに同一の ST1346 が分離されている感染源が不明の集積事例 (患者由来株 6 株) を対象とした。iSeq 100 (Illumina) を用いてゲノムデータを取得した。cgMLST 解析は Ridom 社の cgMLST データベース (<https://www.cgmlst.org/ncs/schema/Lpneumophila/>) から取得したスキーマを用い、1521 遺伝子座について chewBBACA (v3.3.10) を用いて解析を実施した。各株間の遺伝的距離は BioNumerics (Applied Maths 社) を用いて最小全域木 (minimum spanning tree: MST) を作成した。SNP 解析は SNPcaster (v.0.9.3) を用いて実施した。リファレンスは、GenBank より取得した *L. pneumophila* Paris 株 (アクセッション番号: CR628336)、又は各事例内の 1 株について取得した完全長ゲノム若しくはドラフトゲノムを使用した。MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies) を用いてロングリードシーケンスデータを取得し、ショートリードと組み合わせた Hybracter (v.0.10.0) によるハイブリッドアセンブリにより完全長ゲノム配列を構築した。

B13. *Legionella pneumophila* ST23 ならびに ST89 の分子疫学解析

ST23 の菌株は、2000 年から 2023 年までに日本国内で分離された *L. pneumophila* ST23 の 78 株

(臨床分離株 61 株ならびに環境分離株 17 株) を用いた。ST89 の菌株は、2006 年から 2024 年までに日本国内で分離された *L. pneumophila* ST89 の 83 株 (臨床分離株 46 株ならびに環境分離株 37 株) を用いた。菌株の DNA は、MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit (Thermo Fisher Scientific) ならびに KingFisher Duo Prime (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出した。QIAseq FX DNA Library kit (QIAGEN) を用いて DNA ライブラリを調製後、MiSeq (Illumina) あるいは NovaSeq (Illumina) を用いてリードデータを取得した。SNP 解析は、BactSNP を主体としたパイプラインである SNPcaster (<https://github.com/leech-rr/SNPcaster>)⁶⁷⁾ を用い、各 ST ごとに解析を行なった。すなわち、BactSNP で各株の SNP をコール後、snippy を用いてコアゲノム SNP (リピート領域は除去) を抽出した。組み換え領域の除去には、Gubbins⁶⁸⁾ を用いた。リファレンス配列は、ST23 の解析に *L. pneumophila* strain ST23 (GenBank accession. No. LT632615) のゲノム配列、ST89 の解析に ST89 の国内臨床分離株の一つである NIIB3707 配列を用いた。この目的のために、MinION (ONT) でシーケンシングを行い、Illumina のショートリードと ONT のロングリードのハイブリッドアセンブリ (Hybracter) により、NIIB3707 のコンプリートゲノム配列を決定した。

(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. 公衆浴場の浴槽水における抗酸菌について

遊離塩素消毒下での *M. phlei* の存在割合を菌叢解析により求めた。*M. phlei* の存在割合は、露天風呂とジェット風呂では 1 番目、内湯では 2 番目に多い細菌であった(図 1-1)。各検体を R2A 培地で培養して得られたコロニーの 16S rDNA の一部塩基配列も、*M. phlei* とほぼ一致した(表 1-1)。遊離塩素消毒下の浴槽水においても、*M. phlei* は優占種の一つであった。すなわち *M. phlei* は、モノクロアミン消毒であるから増加するのではなく、消毒の方法にかかわらず、元から割合が高かったと判明した。

レジオネラ属菌を培養する GVPC 寒天培地での、抗酸菌の発育状況を検討した。143 検体の浴槽水から、抗酸菌およびレジオネラ属菌が検出された検体数は、それぞれ 55 検体(38.5%)、12 検体(8.4%)となり、抗酸菌の検出が多かった。ただし、本データはレジオネラ検査時に夾雑菌として発育してきた抗酸菌を調査したものであるため、実際の割合は今回のデータより高いと予想される。両方検出されたのは 8 検体(5.6%)、抗酸菌のみ検出が 47 検体(32.9%)、レジオネラ属菌のみ検出が 4 検体(2.8%)であった。遊離残留塩素濃度の平均値は、抗酸菌が検出された浴槽水(54 検体)は 1.0 mg/L で、検出されなかった浴槽水(76 検体)は 0.9 mg/L と大きな違いはなく、低濃度の遊離塩素では抗酸菌を消毒しきれないと考えられた。総残留塩素濃度の数値がある検体は 12 検体と少ないものの、3.4~5.0 mg/L の 11 検体は抗酸菌が検出されておらず、4.9 mg/L の 1 検体のみが 10 CFU/100 mL の抗酸菌の濃度であった。この総残留塩素濃度がモノクロアミン消毒と同じではないとしても、モノクロアミン消毒に限って抗酸菌が増えるというものではないと考えられた。

過去、モノクロアミン消毒で抗酸菌の検出が目

立ったのは、積極的に検査をして見つけていたこと、菌数が多くなることが理由と考えられた。前述の温泉水を遊離塩素消毒した浴槽水 2 検体の従属栄養細菌数は、内湯が 26 CFU/mL、露天風呂が 5 CFU/mL と低い濃度であった一方で、井水をモノクロアミン消毒したジェット風呂は 1.6×10^5 CFU/mL と高い濃度であった。モノクロアミン消毒(結合塩素消毒)は、遊離塩素消毒に比べると消毒の効果が低いことから、消毒への抵抗性が高い抗酸菌を消毒しきれず非常に目立っていた。

M. phlei の増殖に関する要因を検討した。*M. phlei* 増加温泉水の pH を意図して変化させたところ、pH8 および 9 では *M. phlei* が増殖し、pH10 では菌濃度が減少した(図 1-2)。一方、非増加温泉水では、pH8~10 のいずれにおいても増殖しなかった(図 1-3)。すなわち、pH が高かったり低かったりすれば *M. phlei* が増加しやすいということではなかった。過去のモノクロアミン消毒実証試験において、pH10 以上の浴槽水中では従属栄養細菌数は増加しない⁸¹⁾が、pH9 以下では増加すること、高い菌濃度を維持する^{6,9)}ことを経験している。森ら⁷⁾の報告では pH9 程度の浴槽水でも従属栄養細菌数は増加しており、このあたりが上限のようであった。*M. phlei* の増殖に影響する何らかの因子があつて、増殖しやすい温泉があることに注意する必要があると考えられた。

C2. アルカリ性塩化物泉中の *Mycobacterium phlei* に対する遊離塩素とモノクロアミンの消毒効果

アルカリ性塩化物泉中の *M. phlei* を遊離塩素又はモノクロアミンにより消毒した(図 2-1、図 2-2 及び図 2-3)。遊離塩素消毒による *M. phlei* の不活化を確認できたが、CT2,000 ものモノクロアミン消毒であっても不活化が 1-Log も進まなかった。

先行研究では、アルカリ性温泉水中の *M. phlei*

がモノクロラミンで消毒されて、遊離塩素よりも消毒効果が高かったことを経験したが、本研究のアルカリ性塩化物泉では逆の結果が得られていた^{3, 10)}。本研究の結果は、モノクロラミン消毒下の営業施設の浴槽水から *M. phlei* が検出されることと一致しており^{5, 6)}、むしろ納得のいくものであった。消毒効果が異なる要因として、本研究で用いた温泉水が、アルカリ性だけでなく、塩化物イオン濃度が 13,810 mg/L とかなり高かったこと、高塩泉であったことが影響したことが考えられた。

C3. 不活化曲線に基づくレジオネラ属菌のモノクロラミン感受性評価

モノクロラミンによる消毒効果が確実に得られる試料の最小希釈倍率を求めるため、菌試料を 10^1 及び 10^2 倍希釈した際のモノクロラミン濃度減衰曲線を得た(図 3-1)。菌濃度が高いとモノクロラミン濃度が減少してしまうところを、十分に希釈することでモノクロラミン濃度が減少しない、消毒試験の条件を設定した。なお、入浴施設においては、施設利用者由来の垢等の有機物が本研究の培地成分に相当し、溢水や完全換水による垢等の塩素消費物質を除去することが浴槽水における消毒効果の確保に重要と言える。

L. pneumophila (臨床株)、*L. anisa* (冷却塔水由来株)、*L. dumoffii* (浴槽水由来株)の塩素感受性を比較するために、モノクロラミン濃度 3 mg/L の条件下で不活化試験を実施した。その結果、いずれも tailing 様の不活化曲線を示した(図 3-2A)。冷却塔水から分離された *L. anisa* のモノクロラミン感受性が最も高く(10分で3-Log程度の不活化)、Hom 因子 m が 1 に近い値を示した(図 3-2C)。*L. pneumophila* (臨床株)と *L. dumoffii* を比較すると(図 3-2A、B)、大差ではないが、*L. pneumophila* (臨床株)のモノクロラミン感受性(10分で2-Log程度の不活化)はやや低かった。

不活化曲線から 99.9%不活化に必要な CT99.9%を算出し、株間で比較した。*L. pneumophila* (臨床株)、*L. anisa*、*L. dumoffii* の CT99.9%は、108.8、25.4、56.2 [min・mg/L] となった。Jakubek らの報告においては、河川や冷却塔から分離された *L. pneumophila* の CT99.9%は 15~65 程度の範囲であり¹²⁾、外挿領域の推定であることに留意する必要があるが、本研究で対象とした *L. pneumophila* (臨床株)のモノクロラミン感受性は比較的低いといえた。感受性の振れ幅が種や株でどこまで異なるのか、さらなる検討が望ましいと考えられた。実際の 3mg/L のモノクロラミン消毒がなされた浴槽では、10分ないし15分で99.9% (3-Log)の不活化が達成していることになるので、速やかに消毒がなされるものと考えられた。

C4. 公衆浴場におけるモノクロラミン消毒と配管洗浄

試験開始前は遊離塩素により消毒されていたところ、試験開始後は全塩素濃度 3.0~8.0 mg/L の範囲で消毒が維持された。

浴槽水のレジオネラ属菌は、試験 24 日目の浴槽 B から *L. pneumophila* 血清群不明が 10 CFU/100 mL 検出された(表 4-1)。配管拭取り検体から、遊離塩素による消毒時に *L. pneumophila* SG1、モノクロラミン消毒時に浴槽 B の配管拭取り検体から *L. pneumophila* 血清群不明が検出された(表 4-2)。

浴槽水の PCR 検査では、遊離塩素消毒時はほぼ検出されなかったが、モノクロラミン消毒時は $10^1 \sim 10^3$ CFU 相当/100 mL の値が検出された(図 4-1)。浴槽水中の DNA は、遊離塩素によって短時間で失活するのに対して、モノクロラミンは長時間残存することが、モノクロラミン消毒時に高い遺伝子コピー数の検出理由と考えられた⁶⁹⁾。一方、死菌の検出を抑制する EMA-qPCR は、qPCR の

値より顕著に低く、生菌は少ないと考えられた。すなわち遺伝子のほとんどがモノクロロミン消毒により殺菌された死菌と考えられたが、それでも EMA-qPCR で最大 4.3 CFU 相当/100 mL が検出された。

従属栄養細菌数は、遊離塩素消毒時は 14~94 CFU/mL であったが、モノクロロミン消毒開始 10 日目に浴槽 A が 1.4×10^4 CFU/mL、浴槽 B が 1.4×10^5 CFU/mL まで増加し、その後は $10^2 \sim 10^6$ の値であった(図 4-2)。従属栄養細菌数がモノクロロミン消毒開始後に増加するという報告があり²⁾、本研究の結果も同じ傾向であった。なお、一般細菌数、アメーバ数は全ての検体で検出されなかった。

レジオネラ属菌の遺伝子が検出されること、従属栄養細菌数が高く、系統内にバイオフィルムの存在が疑われたことから、配管洗浄によるバイオフィルム除去を試みた。浴槽 B の配管洗浄(試験 31 日目)が実施されたが、洗浄後の検体における生菌死菌遺伝子量に明瞭な減少が認められなかった。ろ過系統内にまだバイオフィルムが残存していると考えられたことから A 及び B の配管洗浄を試験 90 日目に実施したが、効果は一時的なものにとどまった。

ろ過器のろ材を管理した記録がないとのことで、バイオフィルムの数年分が残存していると考えられた。ろ材交換時期の推奨が 3~4 年と書かれたことがあるようだが¹⁸⁾、それで足りないのであれば、より高頻度な交換が必要かもしれない。

C5. 電解生成オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

問題の大容量の浴槽とろ過器に、令和 5 年 8 月からオゾン濃度(平均値)0.5 mg/L で電解オゾン水を供給したが、ろ過器他からレジオネラ属菌の検出が続き、消毒の不足が強く示唆されていた。要因として、ろ過器以外から汚染が来してしまうこと(ジ

ェット循環配管等の管理しきれないものが浴槽にある)、汚濁量が多いこと(男女 2 つの大型の浴槽水をろ過して汚染の負荷が高い)、オゾンが減衰すること(大きなろ過器へ電解オゾン水を供給するのに 70 分間も要したが、オゾンは反応性が高く短時間で消失するので、全体に行き渡らない)等が考えられていた¹⁹⁾。

令和 7 年度の本報告では、端的に言うと、利用者数の減少と、ろ過器のろ材交換により、電解オゾン水による消毒の有無にかかわらず、レジオネラ属菌の汚染は抑えられるようになった。

協力を得たスーパー銭湯は、試験期間中、年末年始や連休等の繁忙期を含めると、1 日に約 300 から 2,000 人の入館者数があった(図 5-1、5-2)。当該銭湯の系列企業会員を無料で受け入れて入館者数が非常に多かったところ、993 日目にこれを終了し、平均入館者数が 1,268 人/日(約 1,300 人/日)から、868 人/日に急減した。一時的な増減はあったが、繁忙期以外は概ね 800 人/日程度で推移した。人数の減少後は、汚染負荷量の減少により、換水後のろ過器逆洗水のレジオネラ属菌が低下した(図 5-2)。電解オゾン水で対応できる汚染の負荷量を超えていたとも考えられた。

「レジオネラ症防止指針」では、ジェット浴槽のろ過器に対して、毎日 1 回以上の頻度で 5~10 mg/L の高濃度塩素を使用した逆洗を推奨している¹⁸⁾が、当該スーパー銭湯では未実施であり、逆洗を毎日、浴槽水(塩素濃度 1.0 mg/L 程度)により行っているだけであった。ろ過器のろ材交換が少なくとも数年間は行っていなかったことが判明し、1,089 日目に施設全てで交換が行われた。1,089 日目以降は、電解オゾン水によるろ過器の消毒がなくても、レジオネラ属菌は概ね継続して不検出となった(図 5-1、5-2)。ろ過器内の汚れ(生物膜)が全て除去されたことが理由と考えられた。なお、電解オゾン水は、オゾン電極の劣化が進んだた

め、ろ材交換と同時に停止していた。電解オゾン水の供給にかかわらず、通常の遊離塩素消毒は行われていた。

C6. 家庭用洗濯機における塩素系消毒剤によるレジオネラ属菌に対する洗浄効果

洗濯機の洗浄前後における qPCR 法及び LC EMA-qPCR 法に基づき算出したレジオネラ属菌数並びに従属栄養細菌数を、図示した(図 6-1)。洗浄前のレジオネラ属菌数は、洗浄を 1 回実施したことで、大きく減少し、さらに洗浄(2 回目)を実施したことで qPCR 法でも検出限界未満となった。例数は少ないものの、2 回の洗浄は 1 回よりもレジオネラ属菌を洗浄、除染する効果が高く、その状態は 4 か月程度維持できていた。入浴施設は、洗濯機と同様、高濃度塩素消毒を頻回に実施する衛生管理が有用と推測される。それから、レジオネラ属菌の完全除去は困難であり、定期的な洗浄が必要と考えられた。

なお、レジオネラ属菌の分離培養の結果は全ての検体で不検出だった。16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスで取得した菌叢解析では、*Legionella* 科あるいは属に分類された ASV があった。BLAST 検索の結果は Uncultured *Legionella* sp. で占められ、VBNC 状態や人工培地では増殖しにくい菌種と考えられた。

各検体の上位 15 属を抽出、統合した計 38 属の菌叢推移によると、塩素洗浄により菌叢は一時的に単純化した。その後の時間経過と共に再び洗浄前に近い構成へと戻る傾向であった(図 6-2)。バイオフィーム形成に関与するとされる *Mycobacterium* 属⁷⁰⁾は、1 回の洗浄では相対存在率に大きな変化はなかったが、2 回目の洗浄後には相対的に低下した。複数回の洗浄は、バイオフィーム除去を、より促進できる可能性が示唆された。

C7. 冷却塔の稼働時モニタリングとその特性把握

日射の影響を受ける日中に風速が大きくなり、夜間に風速が小さくなる傾向にあった(図 7-1)。気象庁統計データによると大崎市の平均風速は 1.5m/s であるが、今回の測定場所では平均風速 1.0m/s となっており、遮蔽物により外部風の影響が低減した様であった。風向頻度分布は SW、SSE、NNE が相対的に高かったが、気象庁統計データとの差異から考えて、冷却塔周りはやや複雑な気流場になっている様子であった。

冷却塔の実測は 2 箇所で行い、うち 1 箇所を例示した(図 7-2)。定常稼働時のファン風速は 16m/s、吹き出し風量は 115,812m³/h と見積もることができた。もう一台の定常稼働時のファン風速は 13m/s、吹き出し風量は定常時 94,097m³/h と見積もることができた。

大気拡散モデル(プリューム・パフモデル)を用いて、冷却塔排風上昇高さ ΔH 及び水平到達距離 L を推定した(図 7-3)。環境アセスメントに用いられる大気拡散モデル(プリューム・パフモデル)をレジオネラ属菌濃度推定に活用することができれば、計算負荷の大きな CFD 解析を経由しなくとも済む。排風吹き出し速度は、先の実測結果を用いた。外部風の状況にもよるが、排風速度 13m/s、ファン直径 1.6m の場合、冷却塔直上 40~60m の高さまで到達し、水平距離は水滴の大きさ(500 μ m)であれば周囲 30m の範囲、50 μ m であれば 500~1,000m の範囲に拡散する結果となった。この結果は CFD 解析とも概ね整合した。発生源におけるレジオネラ属菌放出強度(CFU/s)は循環水中のレジオネラ属菌濃度(CFU/m³)とファンに伴う飛散量(m³/s)の積で表すことができることから、(3)式を用いた院内感染の評価への応用を期待している。

C8. レジオネラ属菌を含むエアロゾルの広域拡

散シミュレーションとリスクエリア分析

計算対象エリア内を $100\text{m} \times 100\text{m} \times 1\text{m}$ でメッシュ分割し、各メッシュ内の代表粒子に含まれるレジオネラ属菌の濃度と、各メッシュ空間内のレジオネラ属菌濃度をCFD計算した(図 8-2)。時間ごとの紫外線、相対湿度の影響も考慮した。図の(a)は紫外線を考慮せず湿度効果のみを考慮した場合、(b)は雨天時、(c)は曇天時である(図 8-2a~c)。(d)は夜間(日射のない時間帯、20:00~21:00)で(図 8-2d)、他は日中の 10:00~11:00 におけるリスク領域を例示した(図 8-2a~c)。地上 1m 高さにおけるレジオネラ属菌濃度として、スケールの上限を 100 CFU/m^3 とし、濃く着色されているのはそれ以上の濃度の、より危険なリスクエリアを意味している。

強い海風に乗ってレジオネラ属菌が広範囲に拡散するところ、紫外線による不活化がない前提では、風下で広域な高リスクエリアを形成した(図 8-2a)。なお、不活化が全く無いことはないので、現実の高リスクエリアは計算結果より狭くなり、図にあるほどの距離には届かないと考えられる。それから計算対象の都市は図の左上の北西の外側に山があり、計算上の考慮をしていないので、図の左側では対象エリア内で拡散したり、もしくは、北西側からの風が強くなり、発生源の左下の南東側に高リスクエリアが形成されたりする可能性がある。

曇天を仮定した場合、雲を透過する紫外線が十分に届いており、高リスクエリアが消失した(図 8-2c)。曇天であっても紫外線の効果が強くあり、計算上、レジオネラ属菌は速やかに不活化された。雨雲(厚い乱層雲など)は紫外線の透過率を著しく低下させるため、空中での不活化速度が鈍化した結果として、リスクエリアが生じていた(図 8-2b)。

夜間は紫外線による不活化がゼロになるため、生存率は湿度のみに依存する(図 8-2d)。日中の

拡散(図 8-2b、または a に近いもの)とは異なり、夜間はリスクエリアが発生源(冷却塔)の近傍で濃い帯状となっている。夜間は風速が低下して長距離への輸送が制限されるとはいえ、不活化されなければ広範囲に広がってしまう。

C9. 英国レジオネラ属菌外部精度管理(UKHSA の EQA)への参加と冷却塔の維持管理に関する国内外の法規制および登録制度

UKHSA では、報告期限後に参加者宛に Intended results が送付される(図 9-1)。Intended results は、いわゆる正解値で、配付された 2 試料(G140 の A と B)に含まれるレジオネラ菌数および菌種、レジオネラ以外の菌種が記載されている。レジオネラ以外の細菌は、G140A には *Nocardia farcinica*、*Pseudomonas putida*、G140B には *Micrococcus luteus* が含まれていた。これらのうち、*P. putida* と *M. luteus* はレジオネラ検査の選択培地である GVPC 寒天培地にコロニーを形成しないが、*N. farcinica* はコロニーになるので培養前の処理が必要であった。

参加結果は Z スコアによって評価され、個別に参加機関へレポートとして返却された。G140 の世界全体の参加数は 241 機関、日本国内の地衛研は 55 機関、全地衛研が UKHSA および研究班へ検査結果を報告した。G140A は 224/229 名(97.8%)、G140B は 222/229 名(96.9%)がレジオネラ属菌の検出を回答している(回答なし・試験未実施は除く)。今回、参加した地衛研のうち絶対値 2 以内の良好範囲内であったのは、G140A では 53 機関(96.4%)、G140B では 51 機関(92.7%)であった(図 9-2)。2 試料共に良好範囲外であった機関は 2 機関(3.6%)あった。

今回の G140 試料をレジオネラ属菌検査の標準的な方法である 100 倍濃縮法で行った場合、Intended results の 100%値の菌数は、培地 1 枚当

たり G140A は 130 CFU、G140B は 120 CFU となる。細菌検査では、培地 1 枚当たり 30～300 CFU 程度が比較的正確に計測可能な範囲とされている。G140 は、試料 A、B 共に比較的計測しやすい菌数設定であった。

地衛研のレジオネラ属菌外部精度管理に関する現状を把握するため、参加機関にアンケート調査を行った。おおむね半数程度の地衛研では、外部精度管理に参加したい意向は有しているものの、予算化が難しい状況にあることが明らかとなった。「今後も同様の外部精度管理を実施してほしい」との意見も複数の機関から寄せられており、本研究班による支援を当面、継続することが好ましいと考えられた。

国内で冷却塔を感染源とするレジオネラ属菌の集団感染が発生したが、特定建築物の冷却塔は届出により保健所が所在等を把握している一方、特定建築物以外は情報を把握できないため、保健所が調査するのは容易ではなかった。そのため、海外の冷却塔登録制度を調査した。ニューヨークでは 2015 年の夏にサウスブロンクスで発生した冷却塔に起因するレジオネラ属菌の集団感染を受けて法整備が進み、冷却塔の登録制度が始まった(図 9-3)。ニューヨーク市の場合は州と市の両方に届け出る必要がある。届出は州、市ともにウェブサイト上からの電子登録となり、既存および新規の冷却塔の登録、及び定期的な報告が求められる(表 9-1、9-2)。冷却水の薬品処理を常時行うことなども求められる。所有者が規定の期間内に必要なことを行わない場合、州または地域の保健局は法律で認められた措置(該当するあらゆる民事および刑事罰の適用を含む)を取ることができ、違反内容によって細かく罰金額も決まっているため、実効性が高いと考えられた。培養検査で細菌が検出された場合、それらの菌数レベルに応じて取るべき対応も定められている⁷¹⁾。

日本国内では、特定建築物に設置された冷却塔は法令に基づく届出対象とされている一方で、それ以外の冷却塔については、関係法令上、その所在を把握する仕組みは整備されていない。そのため、レジオネラ属菌感染症が発生した場合には、冷却塔の所在確認に航空写真解析や現地踏査といった煩雑な作業を要し、感染源調査に多大な労力を要することが報告されている²⁶⁾。冷却塔の所在地や維持管理状況をオンラインで確認できる登録制度は、感染源を特定する際等の調査において有益と考えられた。

C10. レジオネラの分子疫学と冷却塔の汚染実態調査

患者由来株である *L. pneumophila* SG1 ST818 (KL2674) は、SBT 型別に用いる 7 つの遺伝子の一つである *flaA* 遺伝子が増幅されなかった。全ゲノム解析から配列を比較したところ、従来の forward primer に 2 塩基、reverse primer に 4 塩基のミスマッチがあった。ミスマッチ部位を縮重化した degenerate primer を新たに作製し、問題なく増幅することを確認した(*flaA*-FMT2(M13F) TGTA AAA CGA CGG CCA GTR CGT ATT GCY CAA AAT ACT G、*flaA*-RMT2(M13R) CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCR TTA ATS GTT AAG TTR TAR G)。従来の primer では増幅が認められなかった冷却塔由来の 4 株も増幅できた。冷却塔水由来の C2 グループ³⁸⁾や SG1 以外においても、*flaA*:11 を示す株では、同様のミスマッチにより *flaA* が増幅しない場合があることが判明した。病原体検出マニュアルの改訂を提案する。

冷却塔水に由来のレジオネラ属菌の菌種、血清群、遺伝子型を検討した(表 10-1、10-2、10-3)。菌種は *L. pneumophila* が最も多く、血清群は SG1、SG13、SG7 が主要であり、過去の報告⁷²⁾と同様の傾向を示した。東京都の冷却塔水の調査結果とも

一致しており⁷³⁾、冷却塔由来株に大きな地域差はないと考えられた。なお、1994年に東京都渋谷区で発生した冷却塔水に起因する集団感染事例では *L. pneumophila* SG7 が原因菌と推定されており、SG1 だけを試験すれば良いとはならないと考えられた。他方、浴槽水では SG1、SG6、SG5 が主要な血清群であり⁷⁴⁾、冷却塔水とは異なり、感染源の調査はこの違いを考慮することが有用と考えられた。

遺伝子型は ST1 が最も多く、次いで ST154 の順であった。ST1 以外に C1 グループ (cooling tower group) に属する ST は ST1008、ST1019、ST1657 であり、SG1 全体の 80.1% を占めた。また、ST154 を含む C2 グループは、全体の 14.9% であった。ST1 の C1 グループおよび ST154 の C2 グループが主要であることは、これまでの報告⁷²⁾と一致していた。なお、検査した地域では 2020 年から 2025 年の間に、C2 グループに属する遺伝系統が分離されていない。

2023 年に発生した集団感染に着目すると、大阪府の集団事例²⁶⁾では、*L. pneumophila* SG1 の新規遺伝子型 (*flaA*:2 or *flaA*:1, *pilE*:10, *asd*:18, *mip*:15, *mompS*:25, *proA*:5, *neuA*:6) が報告されている。東京都の集団事例²⁵⁾では、*L. pneumophila* SG1 ST1646 が検出されており、いずれも従来の主要グループに属さない遺伝子型であった。近年の冷却塔水に由来のレジオネラ属菌はこのような特徴があるようで、主要なグループから外れたとしても、原因である可能性を否定しないことが必要と考えられた。

C11. レジオネラ症の感染源調査における次世代シーケンサーの活用

過去に富山県で発生した 12 事例について、全ゲノム解析により、患者株と環境株の間に検出される SNP 数を調査した (表 11-1)。今回解析した

12 事例は、患者が 2~10 日間の潜伏期間に公衆浴場を利用しており、患者由来株と利用した公衆浴場由来株から分離した菌株の ST が一致したことを確認している。

組み換え領域を除去した全ゲノム解析 (Gubbins の処理あり) では、患者株と公衆浴場株間に検出された SNP 数は、最小 0、最大 31 SNPs であった (表 11-1)。組み換え領域を除去しない解析でも概ね同様の結果であったが、患者由来株と一部の公衆浴場由来株との間に最小 0 から最大 1,088 SNPs が検出され、解像度が向上した。しかし、SNPs が増えすぎて感染源の判断が否定されかねないことも判明した。組み換え領域の除去 (Gubbins の処理) は、解像度が足りない場合にはなし、解像度が十分な場合にはありとするのが適すると考えられた。

SNP 数が多くなるのは、レジオネラ属菌が浴槽水中で相同組み換えを起こして、多様性が大きいことが理由と考えられた^{29, 75)}。過去の検討によると、公衆浴場株の同一検体内から異なる SNP を持つ複数の株 (SNV, single nucleotide variants) が検出されており、7 株以上を解析対象にしないと変異の種類を網羅できないことが経験的に明らかになっている³⁰⁾。多様性が生じる理由を想像してみると、冷却塔は浴槽水では使えないような強い消毒剤を使えたり冷却塔の台数が少なかったりと、環境が均一に近いだろうことに対して、公衆浴場では水質、温度、男女別種類別にある多数の浴槽、浴槽それぞれに接続された多系統のろ過器と異なるろ材の種類、入浴剤や気泡発生装置の有無など、環境の条件が多様なことが背景にあるのだろう。そして公衆浴場のろ過器では、宿主アメーバが豊富に存在してレジオネラ属菌が盛んに増殖するなど⁸²⁾、レジオネラ属菌の遺伝的多様性が進行しやすそうである。加えて、通常の疫学調査では、感染源と疑われる複数の公衆浴場試料を

並行して検査する都合上、1 株ずつしか解析しない場合が多そうである。すなわち、どの株を釣菌して解析するかは偶然であり、患者株と環境株間で検出される SNP 数が大きくなっても不思議ではない。できれば、疑い公衆浴場が絞り込まれた後に、改めてそこから複数の株を解析することで、患者株に近縁な公衆浴場株を検出できることが望ましい。

他方、海外における冷却塔を原因とする感染事例では、患者株と環境株間は 5 SNPs 以内との報告であった³²⁾。レジオネラ属菌以外の細菌でも全ゲノム解析による疫学調査が一般的になりつつあるが、疫学的関連性があるとされる SNP の閾値は、調べられた範囲で *Pseudomonas aeruginosa* で最も多く、37 であった⁷⁶⁾。この様に感染源の判断に行われる SNP 検出は、解析対象によって異なると認識しておく必要がある。

話は変わるが、1 人のレジオネラ症患者が、同一潜伏期間内に、2 つの施設でレジオネラ属菌に感染したと推察される事例があった。今回の全ゲノム解析からも、この所見を支持する結果が得られた。事例 2 の患者株から ST505 および ST644 が検出された一方、公衆浴場株では施設 A から ST644 および ST1094、施設 B から ST505 他が検出された(表 11-2)。ST505 および ST644 における全ゲノム解析の結果では、患者株と公衆浴場株との間に検出された SNP 数は、組み換え領域を除去した解析で、最大 13 であった(表 11-1)。我々の知る限り、事例 2 のような同一潜伏期間内に 2 つの施設でレジオネラ属菌に感染したと推察された事例はこれまでに報告がなかった。同一患者から複数の血清型、遺伝子型、SNV が検出された報告はあるが⁷⁷⁻⁷⁹⁾、いずれの報告においても 1 か所の感染源から複数の感染した事例であり、複数の感染源から重複して感染した報告はなかった。繰り返すと、同一患者が複数の感染源から複数の

株に感染する可能性があることを認識する必要がある。国内では温泉はしご(ハシゴ湯)などと言われる通り、公衆浴場を利用する文化が盛んなため、複数の感染源で重複して感染する機会が十分にある。レジオネラ症患者の感染源の解明には、丁寧な疫学調査、細菌学的調査が必要であることを改めて認識した。

C12. 散発事例及び集積事例における遺伝的距離の検討

浴槽水と冷却塔に関連した *L. pneumophila* の cgMLST 解析及び SNP 解析を行った。散発事例 5 事例中 4 事例(散発 A、B、D、E)における患者由来株と環境由来株の遺伝的距離は、cgMLST 解析で 1~4 allele 差、SNP 解析で 1~12 SNPs であり、遺伝的に近縁であることが示された(表 12-1)。これは既報⁸⁰⁾で疫学的関連性のある株の目安として示されている ≤ 4 allele 及び ≤ 16 SNPs を満たしていた。

一方で、散発事例の残り 1 事例(散発 C)では、患者由来株と環境由来株の間で cgMLST 解析では 9 allele 差、SNP 解析では 24 SNPs であり、既報の基準を上回る遺伝的距離が確認された(表 12-1)。施設 C は 2 株の環境由来株しか取得しておらず、近縁の株を分離できなかったと考えられた。

また、同一の患者に由来する株(散発 E)において、最大 11 SNPs の差が認められたこともあった。複数の多様な菌に暴露されれば、重複して感染することもあり得た(図 12-1)。

まずは、感染源調査において、複数の分離株を解析することが感染源の正確な特定に重要であると考えられる。もし株数が制限される場合、感染源の推定に一定の閾値を厳密に設定すると、疫学的に関連のある事例を見逃す恐れがあることが考えられた。目安としては基本的に既報の数値

が参考となるものの、*Legionella* 属菌は遺伝子組み換えを起こしやすいことが知られており、数値のみではなく、疫学情報と併せたうえで一定の幅をもって解釈する必要があると考えられた。

以上とは別に、感染源不明の集積事例があり、患者由来の 6 株が、cgMLST で 3~27allele 差、SNP 解析で 4~32SNPs の狭い範囲にあった。詳細は説明しないが、同一地域内で検出が何年も続いており、さらなる調査が待たれる。

C13. *Legionella pneumophila* ST23 ならびに ST89 の分子疫学解析

ST23 の解析では、Gubbins なしの場合は、ゲノムカバー率は 85%であり、疫学的に関連のある株の 2 株間 SNP 数は 0~2 の範囲となり、疫学的に関連のない菌株間の範囲よりも小さく(疫学的に関連がないと考えられる株間での SNP 数が 2 以下のものも 10 組存在)、従来の SBT 法では区別できなかった菌株を区別し、全ゲノム解析は ST23 の菌株の識別に有用であった(表 13-1)。一方で、Gubbins ありの場合では、ゲノムカバー率はわずか 30%と小さく、解析対象となるべき配列の大部分が除外されてしまった。疫学的に関連がない株間の SNP 数は、1 以下が 273 組も存在し、菌株の識別が困難であった(表 13-2)。

ST89 の解析では、Gubbins なしの場合は、ゲノムカバー率は 85%、疫学的に関連のある株の 2 株間 SNP 数は 0~3 の範囲であった(表 13-3)。疫学的に関連がない株間の SNP 数が 3 以下のものも 139 組も存在し解像度は不足する傾向であったが、それでも SBT 法で区別できなかった菌株を区別できるようになり、全ゲノム解析は ST89 の菌株の識別に有用であった。一方、Gubbins ありの場合は、ゲノムカバー率が 70%と若干の減少で済んだにも関わらず、疫学的に関連がないと考えられる株間の SNP 数が 3 以下のものが 392 組も存

在し、Gubbins なしの場合より識別能が低下した(表 13-4)。

以上より、ST23 と ST89 の菌株の SNP 解析においては、Gubbins なしの方が、SNP 検出を行うゲノムカバー率が大きく、識別能が高かった。ただし ST89 の解析では、Gubbins 処理の有無にかかわらず、疫学的に関連がないと考えられる株間で SNP が数個となる場合が多くあった。すなわち、ST89 は ST23 と比較して、多様性に乏しく、感染源調査においてはより注意する必要があると考えられた。

以上、公衆浴場等におけるレジオネラ発生防止及び衛生管理推進に有用な結果を得た。

①モノクロミン消毒下の浴槽水で *M. phlei* の増殖が生じることが懸念されていたが、モノクロミン消毒下だけでなく、遊離塩素消毒下の浴槽水においても優占種であることが判明した。菌叢解析とレジオネラ属菌の検査培地から、抗酸菌は検出されていた。バイオフィルムの定着と消毒効果の低減が心配されるので、*M. phlei* の増殖は避けたいことである。ところが *M. phlei* の増殖の要因や消毒の可否、つまりどのような環境になると増殖するのか、消毒が通じないことがあるのかは未だに不明である。今回の試験管内試験で *M. phlei* が増殖する温泉としない温泉があること、*M. phlei* の消毒効果が高い場合と低い場合があることが再現されたので、それらの条件が増殖の要因を検討するための足がかりになることを期待したい。

浴槽水のモノクロミン消毒は 3mg/L を濃度の目安としているが、これは水道の結合塩素消毒の 1.5mg/L の倍であり、例えば 2mg/L に下げるといったことも考えられる。ところが、レジオネラ属菌に対するモノクロミン消毒の効果に幅があること、*M. phlei* の増殖が抑えられていないことから、当面は消毒の濃度を維持した方が良さそうである。洗

浄や他の消毒も試みているが、それだけで対応するのは無理があり、ろ過器の管理は容易ではなかった。*M. phlei*やレジオネラ属菌が検出されるなら、汚染負荷の低減、強い消毒や洗浄の繰り返し、ろ過器の管理の徹底といったことを地道に行うことが必要であろう。

②CFD解析から、冷却塔からのレジオネラ属菌の拡散には、紫外線や風の影響が大であった。日中の紫外線の効果が強く夜間が問題であれば、夜間や強風時の飛散を抑える冷却塔の制御、例えばファン回転数を下げる、薬剤添加を増強するといった制御が考えられる。大気汚染分野で利用される大気拡散モデル(パフモデル)に基づく簡易シミュレーションを行い、概ね、CFD解析結果と整合することを確認した。現場の風速風向、代替冷却塔のファン風速のモニタリング等を行った。国内で冷却塔に由来するレジオネラ症の集団感染が生じた際、汚染源の冷却塔を特定するのは容易ではなかったと指摘されている。これに対して、海外の冷却塔に関する法整備や登録制度を倣うことで、負担を緩和軽減し、危害の拡大を防ぐのが有用と考えられた。冷却塔には入浴では使えない強い消毒剤や洗浄剤を使えるので、まずは現行の水処理剤の使用を徹底すべきである。万一事故が発生してしまった場合には、冷却塔水のレジオネラ属菌の菌種、血清群、遺伝子型の検出状況が非常に参考になるだろう。

③レジオネラ属菌検査の培養検査は容易ではなく、濃縮と前処理が加わることで、ばらつきが大きくなりやすい。不安定な結果に基づいて公衆浴場や冷却塔の指導をするのは避けたいところであり、外部精度管理への参加を支援することで、難しい培養検査の精度や信頼性の確保に努めている。Zスコア的良好範囲外に出てしまう参加者が出たことは、原理上避けられないことでもあるが、数年毎の異動で不慣れな検査を担当することの

悪影響もあるかもしれない。外部精度管理に繰り返し参加するなど、検査能力の維持に努めてもらう必要がある。

④レジオネラ属菌の分子疫学には SBT 法がよく使われているが、primer の不一致などが理由で、増幅できないことがあった。今回、ゲノム解析により得られた配列を元に、primer の修正がなされた。この修正は、マニュアルに反映されることで解析不能や低い精度が直ちに改善できるものであり、地方衛生研究所と国立感染症研究所で使われる病原体検査マニュアルに反映される。

レジオネラ属菌の SNP 解析による分子疫学は、株の異同の判断に一定の基準値を厳密に設定した場合、疫学的に関連のある事例を見逃すことが懸念された。複数の解析の結果として、同一の患者や同一の環境から、多様な SNV が検出された。多数の株を分離して解析すれば、同じ SNP の株を得られる確率は向上するが、複数の疑い施設、複数の浴槽や冷却塔の試料、複数の分離株と手を広げるには限度がある。例えば最初は少数のコロニーから菌種、血清型、*lag-I* 遺伝子陽性で施設を絞り込み、SBT 法でさらに試料を絞り込み、最終的に絞り込んだ試料から数コロニー分の全ゲノム解析へと進むことになる。労力と費用のこともあり、このように絞り込みができてから、SNP 解析の対象にする分離株を増やすのが効率的である。レジオネラ属菌は環境中で多種多様であり、どの菌種も血清型も遺伝子型も、濃度一定ではなく、多い SNV と少ない SNV のばらつきもありえる。感染性病原性の高いものに限って、環境中の割合が低かったことも経験されている。であれば、SNP 解析に基準値を設定するのではなく、今なお、古典的疫学調査を含めた総合判断が大事になる。解析例が多くなれば、ある程度の閾値が見えてくるだろうが、それは厳密な数値にはならないと想定される。それから組み換え領域の除去は一律

ではなく、解像度が足りているなら除去、足りないなら除去しないことで、ST 型では区別できない株を必要に応じて、より高解像に識別できるようになる。他方、多様性に乏しいST89は、SNP解析でも区別できないことが示された。分子疫学だけに頼ること無く、通常の疫学調査が重要であることに変わりなかった。複数施設で複数のレジオネラ属菌に重複感染することも想定に含める必要があった。

D. 結論

D1. 公衆浴場の浴槽水における抗酸菌について

M. phlei はモノクロラミン消毒下の浴槽水だけでなく、遊離塩素消毒下の浴槽水においても優占種であった。レジオネラ属菌の培養検査において、抗酸菌は遊離塩素消毒であっても少なくない頻度で検出されていた。*M. phlei* が増殖する温泉としない温泉があることが試験管内試験で確認された。増殖の要因に興味を持たれた。

D2. アルカリ性塩化物泉中の *Mycobacterium phlei* に対する遊離塩素とモノクロラミンの消毒効果

pH が9以上、塩化物イオン濃度が 13,810 mg/L のアルカリ性塩化物泉中では、*M. phlei* は CT2,000 ものモノクロラミン消毒であっても不活化が 1-Log も進まなかった。この結果は、営業施設の浴槽水中で *M. phlei* が検出したことと対応するものであった。一方、先行研究のアルカリ性温泉水における試験管内の消毒試験とは対応しなかった。消毒効果が変化した要因に興味をもたれた。

D3. 不活化曲線に基づくレジオネラ属菌のモノクロラミン感受性評価

L. pneumophila、*L. anisa*、*L. dumoffii* の3種のレジオネラ属菌についてモノクロラミン感受性を評価した。*L. pneumophila* 及び *L. dumoffii* は同程度

の感受性(10 分で 2-Log 程度の不活化)、*L. anisa* は 10 分で 3-Log の不活化と感受性に幅があった。モノクロラミン濃度 3 mg/L を常時維持することが可能な公衆浴場等は安全性が保たれていると言えるが、バイオフィームから遊離した直後の菌の塊といったものが発生しないように注意すべきと考えられた。

D4. 公衆浴場におけるモノクロラミン消毒と配管洗浄

レジオネラ属菌が継続して検出される入浴施設において、モノクロラミンによる浴槽水の消毒と、配管洗浄を実施した。モノクロラミン消毒が維持されても、浴槽水から *L. pneumophila* が分離され、遺伝子量が高い値を示した。ろ過器が管理されておらず、バイオフィームが残存していると考えられたため、配管洗浄を実施した。洗浄直後に生菌死菌遺伝子量は減少したが 4 日後には洗浄前の値に戻り、除去が難しいバイオフィームの残存が疑われた。

D5. 電解生成オゾン水を用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験

レジオネラ属菌の汚染に苦慮する、汚濁量の多い大型ろ過器(1.8m³)を対象として、電解オゾン水による消毒・洗浄を試みた。ろ過器に対して、有効容量分の電解オゾン水を毎日逆洗前に供給した。入館者数が多い間は、換水前・換水後共に、浴槽水からレジオネラ属菌が散発的に検出され、オゾンの不足が強く示唆された。入館者数が減少するに従い、換水後浴槽水のレジオネラ属菌は、オゾン濃度急減時の単発的な検出以外は、継続して不検出となった。入浴者数が、電解オゾン水の有効な利用範囲を超えていたと考えられた。ろ材を交換した後は、オゾン供給を停止したにも拘らず、浴槽水及び逆洗水からはレジオネラ属菌は

概ね不検出となり、汚染が主にろ材にあったと考えられた。

D6. 家庭用洗濯機における塩素系消毒剤によるレジオネラ属菌に対する洗浄効果

洗濯機には、レジオネラ属菌が定着・増殖できる環境が存在することを改めて確認した。洗浄を複数回実施することで、より効果的にレジオネラ属菌及びバイオフィルムの除去が促進される可能性が示唆された。

D7. 冷却塔の稼働時モニタリングとその特性把握

冷却塔に起因すると考えられる医療施設のレジオネラ集団感染事例を対象として、大気汚染分野で利用される大気拡散モデル(パフモデル)に基づく簡易シミュレーションを行い、概ね、CFD 解析結果と整合することを確認した。現場の風速風向、代替冷却塔のファン風速のモニタリング等を行った。

D8. レジオネラ属菌を含むエアロゾルの広域拡散シミュレーションとリスクエリア分析

冷却塔を発生源とするレジオネラ症集団感染事例を対象に、GIS で再現した 3D 都市を基に CFD 解析を行い、紫外線 B による不活化効果と相対湿度の影響、粒子の沈降を計算モデルに反映させることで、広域におけるレジオネラ属菌の拡散プロセスと濃度分布を定量的に評価した。気象条件(夜間は風速が低下し、エアロゾルの長距離拡散が制限)および時間帯(夜間は紫外線による不活化効果が消失)がレジオネラ属菌のリスクエリアの形成に重要であった。

D9. 英国レジオネラ属菌外部精度管理(UKHS A の EQA)への参加と冷却塔の維持管理に関する国内外の法規制および登録制度

レジオネラ属菌検査における外部精度管理の整備と検討を進めてきた。2025 年度は全国 55 機関の地衛研が参加し、G140A では 53 機関(96.4%)、G140B では 51 機関(92.7%)で Z スコア良好範囲内の結果を示した。地衛研を対象としたアンケート調査から、外部精度管理の必要性については理解が進んでいるものの、予算確保が大きな課題であることが明らかとなった。ニューヨーク州および市の冷却塔に関する法整備状況と登録制度についてまとめた。制度には、罰則等の法律的な措置も定められており、冷却塔の衛生管理や感染源調査に有効と考えられた。

D10. レジオネラの分子疫学と冷却塔の汚染実態調査

SBT 型別に用いる *flaA* 遺伝子の primer に存在するミスマッチにより増幅されない株への対応として、ミスマッチ部位を縮重化した新規 primer を用いた PCR 系を構築した。冷却塔水に由来のレジオネラ属菌の菌種、血清群、遺伝子型を明らかにした。菌種は *L. pneumophila*、血清群は SG1, SG13, SG7 が主要であった。SG1 の遺伝子型は、ST1 と ST154 のグループが全体の 95 %を占めた。

D11. レジオネラ症の感染源調査における次世代シーケンサーの活用

患者株と公衆浴場株間に検出された SNP 数は、組み換え領域を除去した場合においても最大 31 SNPs であり、海外で報告されている冷却塔の 5 SNPs より大きかったが、*Pseudomonas aeruginosa* の 37 SNPs よりは小さかった。同一由来と判断するための根拠を求めて、経験的に基準値を設定するため、より多くの菌株を検討しておくことが課題と考えられる。全ゲノム解析から、1 人のレジオネラ症患者が、同一潜伏期間内に、2 つの施設でレジオネラ属菌に感染したとの推察を支持する結

果が得られた。

D12. 散発事例及び集積事例における遺伝的距離の検討

浴槽水と冷却塔に関連した *L. pneumophila* の cgMLST 解析及び SNP 解析を行った。患者由来株と環境由来株の遺伝的距離は、cgMLST 解析で 1~9 allele 差、SNP 解析で 1~24 SNPs であり、既報の基準を上回る遺伝的距離が確認された。同一の患者由来株の間に 11 SNPs の差が認められたりもした。複数の分離株を解析することが感染源の正確な特定に重要と考えられるが、遺伝的距離に一定の閾値を厳密に設定すると、疫学的に関連のある事例を見逃す恐れがあると考えられた。数値のみではなく、疫学情報と併せたうえで一定の幅をもって解釈する必要があると考えられた。

D13. *Legionella pneumophila* ST23 ならびに ST89 の分子疫学解析

全ゲノム解析により、SBT 法による型別では区別できない ST23、ST89 を従来よりも高解像に識別できた。いずれの ST でも Gubbins あり(組み換え領域を解析から除く)よりも、Gubbins なし(組み換え領域を解析に含める)の識別能が高かった。しかし、ST89 は ST23 よりも多様性に乏しく、より注意が必要と考えられた。

以上、公衆浴場等におけるレジオネラ発生防止及び衛生管理推進に有用な結果を得た。モノクロロミン消毒下の浴槽水で *M. phlei* の増殖が生じることが懸念されたが、モノクロロミン消毒だけでなく、遊離塩素消毒下の浴槽水においても優占種であった。*M. phlei* が増殖する温泉としない温泉があること、*M. phlei* の消毒効果が高い場合と低い場合があることが試験管内で再現されたので、

増殖の要因を検討するための足がかりにすることを期待する。レジオネラ属菌に対するモノクロロミン消毒の効果に幅があることが示されたこと、*M. phlei* への対応もあり、消毒の濃度は 3mg/L を維持する。*M. phlei* やレジオネラ属菌が検出される場合には、汚染負荷の低減、強い消毒や洗浄の繰り返し、ろ過器の衛生管理の徹底が望ましい。冷却塔からレジオネラ属菌が広域に拡散するのは、紫外線や風速風量の影響が大であったことから、夜間や強風時の飛散を抑える冷却塔の制御が考えられる。海外の冷却塔に関する法整備や登録制度は、国内の冷却塔管理にも有用と考えられた。冷却塔水に由来のレジオネラ属菌の菌種、血清群、遺伝子型の検出状況は、将来の感染源調査に有用である。レジオネラ属菌検査の外部精度管理への参加を支援することで、難しい培養検査の精度や信頼性の確保に努めた。レジオネラ属菌の分子疫学に使用する SBT 法の primer の修正を、病原体検出マニュアルに反映する。SNP 解析に一定の基準値を厳密に設定すると疫学的に関連のある事例を見逃す恐れがあり、基準値を設定するのではなく、古典的疫学調査を含めた総合判断が大事になると考えられた。組み換え領域の除去は一律ではなく、解像度が足りているなら除去、足りないなら除去しないことで、ST 型では区別できないのを、より高解像に識別する。多様性に乏しい ST89 型があり、分子疫学だけに頼ること無く、通常疫学調査が重要であることに変わりなかった。複数施設で複数のレジオネラ属菌に重複感染することも想定に含める必要があった。

E. 引用文献

- 1) 杉山寛治:環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御¹⁰⁾ 浴槽のレジオネラ対策③ モノクロロミンによる消毒方法について, 防菌防黴, 47, (2019), 159-166

- 2) 長岡宏美, 泉山信司, 八木田健司, 杉山寛治, 小坂浩司, 壁谷美加, 土屋祐司, 市村祐二, 青木信和:社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について, 厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究 平成 28 年度分担研究報告書
- 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消毒効果, 温泉科学, 72, (2022), 26-37
- 4) 泉山信司, 長岡宏美 他:高 pH 浴槽水、薬湯、並びに水泳プールへの、モノクロラミン消毒の応用、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」(研究代表者 前川純子)より, 平成 28~30 年度総合研究報告書
- 5) 渡邊貴明, 松田宗大, 小倉 徹, 植園健一, 松田尚子, 枝川亜希子, 泉山信司, 藤井 明 (2018):循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について, 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会要旨集, p 262
- 6) 柳本恵太, 植松香星 他: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, 厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場の衛生管理の推進のための研究 令和 4 年度分担研究報告書
- 7) 柳本恵太, 泉山信司, 森 康則, 長岡宏美 他:高 pH 温泉、有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒, 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, 令和元~3 年度 総合研究報告書
- 8) 森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 西 智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司:次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証ー三重県津市の榊原温泉における検討ー, 2019, 温泉科学, 69, 90-102.
- 9) 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, 2021, 49, 261-267
- 10) Mori, Y., Nagai, Y., Sato, D., Toyoda, M., Kameyama, Y., Tanimoto, K., Kobayashi, A., Yoshimura, H., Izumiyama, S., Effects of monochloramine and free disinfection on alkaline hot spring water as shown by inactivation experiments with *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*, 2023, J. Hot Spring Sci., 73, 46-55.
- 11) Cunliffe, D.A. 1990. Inactivation of *Legionella pneumophila* by monochloramine. *J. Appl. Bacteriol* 68(5), 453-459.
- 12) Jakubek, D., Guillaume, C., Binet, M., Leblon, G., Dubow, M., Brun, M.J. 2013. Susceptibility of *Legionella* strains to the chlorinated biocide, monochloramine. *Microbes. Environ* 28(3), 336-345.
- 13) 国立感染症研究所感染所情報センター:レ

- ジオネラ症 2013～2023, 病原微生物検出情報 (IASR), 45 (7): 107-109, 2024
- 14) 縣 邦雄ら:種々の温泉水におけるモノクロラミン消毒効果と高濃度洗浄の検証, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究 平成 25 年度分担研究報告書
 - 15) 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(平成 13 年 9 月 11 日、令和元年 12 月 17 日改正)、pp.25、(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/001401965.pdf>、令和 8 年 4 月 13 日時点).
 - 16) 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(厚生省生活衛生局長、平成 12 年 12 月 15 日生衛発第 1,811 号、令和 8 年 1 月 20 日一部改正)、pp.13、(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000124204.html>、令和 8 年 3 月 13 日時点).
 - 17) 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(平成 13 年 9 月 11 日、令和元年 12 月 17 日改正)、pp.22-23、(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/001401965.pdf>、令和 8 年 4 月 13 日時点).
 - 18) (公財)日本建築衛生管理教育センター:第5版レジオネラ症防止指針, 124-126, 2024
 - 19) 泉山信司、石井清隆、木村哲也、小森正人: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、令和 6 年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場の衛生管理の推進のための研究、分担研究報告書、2025 年 3 月.
 - 20) Gleason JA, Conner LE, Ross KM. Associations of Household Factors, Hot Water Temperature, and Chlorine Residual with *Legionella* Occurrence in Single-Family Homes in New Jersey. *Sci Total Environ.* 2023;870:161984.
 - 21) Hayes-Phillips D, Bentham R, Ross K, Whitley H. Factors influencing *Legionella* contamination of domestic household showers. *Pathogens.* 2019, 8:27.
 - 22) 黒木俊郎, 陳内理生, 中嶋直樹, 佐原啓二. 家庭用洗濯機におけるレジオネラ属菌の汚染実態. 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)「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」, 令和 5 年度分担研究報告書.
 - 23) レジオネラ症の集団発生について(第三報) - 宮城県公式ウェブサイト, <https://www.pref.miyagi.jp/release/covid-19/legionella20230911.html>, (accessed 31 March 2025).
 - 24) 枝川亜希子ら、国内から参加可能な英国のレジオネラ外部精度管理(UKHS A および FAPAS)への参加と検査精度に関連する国際的な現状、厚生労働科学研究費補助金(公衆浴場の衛生管理の推進のための研究)令和 6 年度分担研究報告、研究代表者: 泉山信司、271-282、2024
 - 25) 令和5年度生活衛生関係技術担当者研修会、資料5:病院の冷却塔に起因したレジオネラ症集団発生事例について、<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001208088.pdf>
 - 26) 西田伸子ら、大阪府内で発生したレジオネラ症アウトブレイクの原因と対策に関する考察、日本防菌防黴学会誌、53、233-242、2025

- 27) 病院の冷却塔に起因したレジオネラ症集団感染事例について (IASR Vol.45,p.112-114、2024 年 7 月号)
- 28) IASR Vol. 46 p66-67: 2025 年 3 月号東京
- 29) Amemura-Maekawa J, et al. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. Appl Environ Microbiol. 2012 Jun;78(12):4263-70.
- 30) 金谷潤一 他. 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. 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)「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和 4~6 年度総合研究報告書, 175-190, 2025.
- 31) David S, Mentasti M, Tewolde R, Aslett M, Harris SR, Afshar B, Underwood A, Fry NK, Parkhill J, Harrison TG. Evaluation of an Optimal Epidemiological Typing Scheme for *Legionella pneumophila* with Whole-Genome Sequence Data Using Validation Guidelines. J Clin Microbiol 54: 2135-2148, 2016.
- 32) Raphael BH, Baker DJ, Nazarian E, Lapierre P, Bopp D, Kozak-Muiznieks NA, Morrison SS, Lucas CE, Mercante JW, Musser KA, Winchell JM. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from New York State. Appl Environ Microbiol 82: 3582-3590, 2016.
- 33) Haas W, Lapierre P, Musser KA. A Bioinformatic Pipeline for Improved Genome Analysis and Clustering of Isolates during Outbreaks of Legionnaires' Disease. J Clin Microbiol 59(2): e00967-20, 2021.
- 34) Qin T, Zhang W, Liu W, Zhou H, Ren H, Shao Z, Lan R, Xu J. Population structure and minimum core genome typing of *Legionella pneumophila*. Sci Rep 6: 21356, 2016.
- 35) 金谷潤一、磯部順子、稲窪 大治. 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. 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「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和 4 年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 泉山信司:90-97, 2023.
- 36) 佐伯歩、前川純子. *Legionella pneumophila* ST23 臨床分離株の分子疫学解析. 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「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和 6 年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 泉山信司:294-300, 2025.
- 37) 中西典子、野本竜平、小松頌子、藤永千波、平塚貴大. 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. 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「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和 6 年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 泉山信司:301-310, 2025.
- 38) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani J, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M. *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* species Isolated From Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. Appl Environ Microbiol 84: e00721-18, 2018.
- 39) 佐伯歩、前川純子、明田幸宏. *L. pneumophila* の分子疫学解析. IASR 45:124-125, 2024.
- 40) 病院内冷却塔からのレジオネラ感染疑い事例—福岡市. 松田正法、重村久美子、徳

- 島智子、吉田英弘、佐藤正雄、廣瀬みよ子、門司慶子、石津尚美、竹中章、前川純子. IASR 36:13- 14, 2015.
- 41) 同一利用施設(フィットネスクラブ)で感染したレジオネラ症の2例—新潟市. 新潟市保健所、新潟市衛生環境研究所(旧新潟市衛生試験所). IASR 28: 144-145, 2007.
- 42) Rocchetti et al. Validation of a Multiplex Real-Time PCR assay for Detection of *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis* Complex, and *Mycobacterium avium* Complex Directly from Clinical Samples by Use of the BD Max Open System. *J. Clin. Microbiol.*, **54**, (2016) 1644-1647
- 43) 松田宗大、枝川亜希子、泉山信司、小倉徹、植園健一、松田尚子、藤井 明(2019): 循環式浴槽から分離された *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラムの殺菌効果, 日本防菌防黴学会第46回年次大会要旨集, p 232.
- 44) 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.
- 45) Buse, H.Y., Morris, B.J., Struewing, I.T., Szabo, J.G. 2019. Chlorine and monochloramine disinfection of legionella pneumophila colonizing copper and polyvinyl chloride drinking water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol* 85(7), e02956-18.
- 46) Gyürék, L.L., Finch, G.R. 1998. Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *J. Environ. Engineer* 124(9), 783-793.
- 47) Kadoya, S., Nishimura, O., Kato, H., Sano, D. 2019. Predictive water virology: Hierarchical Bayesian modeling for estimating virus inactivation curve. *Water* 11, 2187.
- 48) 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年度分担研究報告書
- 49) (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5版)、pp.37-47、2024年9月.
- 50) Inoue H, Taguchi M, Kitazume M, Saito Y, Iwasawa T. Ethambutol inhibited the growth of acid-fast bacteria and enhanced the detection of *Legionella* in environmental water samples. *J Microb Control*. 2024;29:1-7.
- 51) レジオネラ属菌を含むエアロゾルの拡散濃度分布に関する研究 | 公益財団法人 日本建築衛生管理教育センター, <https://www.jahmec.or.jp/news/tyosa/2025/post-195.html>, (accessed 14 April 2026).
- 52) OpenStreetMap contributors, OpenStreetMap, <https://www.openstreetmap.org/copyright/en>, (accessed 30 October 2023).
- 53) 基盤地図情報ダウンロードサービス, <https://fgd.gsi.go.jp/download/menu.php>, (accessed 31 March 2025).
- 54) 国際航業株式会社, PAREA-LiDAR 航空レーザーデータ, <https://www.kkc.co.jp/service/item/5672/>, (accessed 31 March 2025).
- 55) R: The R Project for Statistical Computing, <https://www.r-project.org/?adlt=strict&toWww=1&redig=003305AA01C54F5999C5E2D44F67553C>, (accessed 21 December 2022).
- 56) the U.S. Department of Energy, EnergyPlus, <https://energyplus.net/?adlt=strict&toWww=1&redig=D44D2187730E4FB0B65986DC894>

- AE58A, (accessed 18 July 2022).
- 57) Trimble Inc., SketchUp, <https://www.sketchup.com/en/benefits-of-sketchup>, (accessed 31 March 2025).
 - 58) STREAM | Cradle CFD | Hexagon, <https://www.cradle.co.jp/product/stream.html>, (accessed 31 March 2025).
 - 59) B. J. Dutka, Sensitivity of *Legionella pneumophila* to Sunlight in Fresh and Marine Waters (1984) Vol. 48.
 - 60) オゾン層等の監視結果に関する年次報告書 平成22年8月環境省 (環境省, 2010).
 - 61) S. Rattanakul and K. Oguma, Water Res 130, 31 (2018).
 - 62) Y. Oh, J. Sangsanont, H. Woo, L. A. Boczek, K. G. Linden and H. Ryu, Science of the Total Environment [DOI:10.1016/j.scitotenv.2023.167781].
 - 63) 佐伯歩, 前川純子ら, レジオネラ・レファレンスセンターの活動, IASR, 45, 125-126, 2024
 - 64) Protection Against *Legionella*, Department of Health, New York State. <https://www.health.ny.gov/environmental/water/drinking/legionella/> (2026 年 3 月 30 日閲覧)
 - 65) Cooling Tower Registration and Maintenance, NYC Health. <https://www.nyc.gov/site/doh/business/permits-and-licenses/cooling-towers.page> (2026 年 3 月 30 日閲覧)
 - 66) 国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所, 病原体検出マニュアル レジオネラ症, 2025 年 3 月改訂 <https://id-info.jihs.go.jp/manuals/pathogen-detection/Legionella20250326.pdf>.
 - 67) Lee K, Iguchi A, Uda K, Matsumura S, Miyairi I, Ishikura K, Ohnishi M, Seto J, Ishikawa K, Konishi N, Obata H, Furukawa I, Nagaoka H, Morinushi H, Hama N, Nomoto R, Nakajima H, Kariya H, Hamasaki M, Iyoda S. Whole-genome sequencing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* OX18 from a fatal hemolytic uremic syndrome case. Emerg Infect Dis 27:1509-1512. 2021.
 - 68) 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 43(3):e15. 2015.
 - 69) 泉山信司ら:モノクロロミン消毒の薬湯への応用、並びに雑菌への対応, 厚生労働科学研究 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究 平成 30 年度分担研究報告書
 - 70) Steed KA, Falkinham JO 3rd. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. Appl Environ Microbiol. 2006, 72:4007-4011.
 - 71) Chapter 8 of the Rules of the City of New York. <https://www.nyc.gov/assets/doh/downloads/pdf/about/healthcode/health-code-chapter8.pdf> (2026 年 3 月 30 日閲覧)
 - 72) Nakanishi N, Nomoto R, Tanaka S, Arikawa K, Iwamoto T. Analysis of Genetic Characterization and Clonality of *Legionella pneumophila* Isolated from Cooling Towers in Japan. Int J Environ Res Public Health. 2019, 16:1664. doi: 10.3390/ijerph16091664.
 - 73) 武藤千恵子ら. 東京都内の冷却塔水におけるレジオネラ属菌の生息実態調査 (平成 17

- 年～23 年度) 東京健安研セ年報 Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, 63, 275-280, 2012.
- 74) 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. 2023. 76:77-79. doi: 10.7883/yoken.JJID.2022.397.
- 75) McAdam PR, et al. Gene flow in environmental *Legionella pneumophila* leads to genetic and pathogenic heterogeneity within a Legionnaires' disease outbreak. Genome Biol. 2014;15(11):504.
- 76) Schürch AC, et al. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. Clin Microbiol Infect. 2018 Apr;24(4):350-354.
- 77) Lück PC, et al. Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. J Clin Microbiol. 1998 Apr;36(4):1160-3.
- 78) Wewalka G, et al. Dual infections with different *Legionella* strains. Clin Microbiol Infect. 2014 Jan;20(1):O13-9.
- 79) Hiratsuka T, et al. A large outbreak investigation of Legionnaires' disease associated with a public bath facility in Hiroshima, Japan, using PFGE, SBT, MLVA, and whole-genome sequencing. Int J Med Microbiol. 2025 Dec;321:151680.
- 80) Mentasti M, Underwood A, Lück C, Kozak-Muiznieks NA, Harrison TG, Fry NK. Evaluation of an optimized epidemiological typing scheme for *Legionella pneumophila* with whole-genome sequence data using validation guidelines. J Clin Microbiol. 2016;54(8):2135–2148.
- 81) 柳本恵太, 高村知成, 山上隆也, 土屋邦男, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久: アルカリ性温泉 (pH10) におけるモノクロアミンの消毒効果と菌叢に与える影響, 厚生労働科学研究 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 公衆浴場の衛生管理の推進のための研究 令和 6 年度分担研究報告書
- 82) Kuroki T, et al. [Occurrence of free-living amoebae and *Legionella* in whirlpool bathes]. Kansenshogaku Zasshi. 1998 Oct;72(10):1056-63. Japanese.
- 83) Sandra Walser, Doris Gerstner, Bernhard Brenner, Christiane Höller, Bernhard Liebl, Caroline E W Herr. Assessing the environmental health relevance of cooling towers A systematic review of legionellosis outbreaks, International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2014.
- 84) M.C. O'Mahony, R.E. Stanwell-smith, H.E. Tillett, D. Harper, J.P.G. Hutchison, I.D. Farrell, D.N. Hutchinson, J.V. Lee, P. J. Dennis, H.V. Duggal, J. A. Scully and C. Denne. The Stafford outbreak of Legionnaires' disease, Epidemiol. Infect. (1990), 104, 361-380
- 85) Peter Ulleryd, Anna Hugosson, Görel Allestam, Sverker Bernander, Berndt EB Claesson, Ingrid Eilertz, Anne-Christine Hagaeus, Martin Hjorth, Agneta Johansson, Birgitta de Jong, Anna Lindqvist, Peter Nolskog and Nils Svensson. Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidköping, Sweden epidemiological, environmental and

microbiological investigation supported by meteorological modelling, BMC Infectious Diseases 2012, 12:313, <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/12/313>

- 86) 近藤明. 大気汚染物質の拡散シミュレーション技術、安全工学 Vol.57, No.6、424-432 (1018)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

紙上発表

1. Hiratsuka T, Nakanishi N, Akita H, Masuda K, Komatsu S, Nomoto R, Amemura-Maekawa J. A large outbreak investigation of Legionnaires' disease associated with a public bath facility in Hiroshima, Japan, using PFGE, SBT, MLVA, and whole-genome sequencing. *Int J Med Microbiol.* 2025 Dec;321:151680.
2. Shimbashi R, Arima Y, Yahara K, Masutani M, Kasamatsu A, Fukusumi M, Kajihara T, Arashiro T, Takahashi T, Otsuka M, Kobayashi Y, Komase K, Tsuchihashi Y, Chang B, Amemura-Maekawa J, Sunagawa T, Suzuki M, Akeda Y. A pluralistic approach to interpreting surveillance data: The likely decline in the occurrence of invasive pneumococcal disease in Japan during the COVID-19 pandemic. *Ann Epidemiol.* 2025, 108:63-70.
3. 淀谷雄亮, 西里恵美莉, 小嶋由香, 佐々木麻里, 蔡 国喜, 井原 基, 田栗利紹, 柳本恵太, 緒方喜久代, 武藤千恵子, 梅津萌子, 高久靖弘, 山口友美, 前川純子. 浴槽水等のレジオネラ属菌検査におけるレジオラート

/QT 法と平板培養法の比較検討. 日本防菌防黴学会誌. 53(1), 3-8, 2025.

4. 前川純子. レジオネラ症の概要、発生動向、発生防止の対策等について. 公衆衛生情報, 55(3), 4-5, 2025.

学会発表

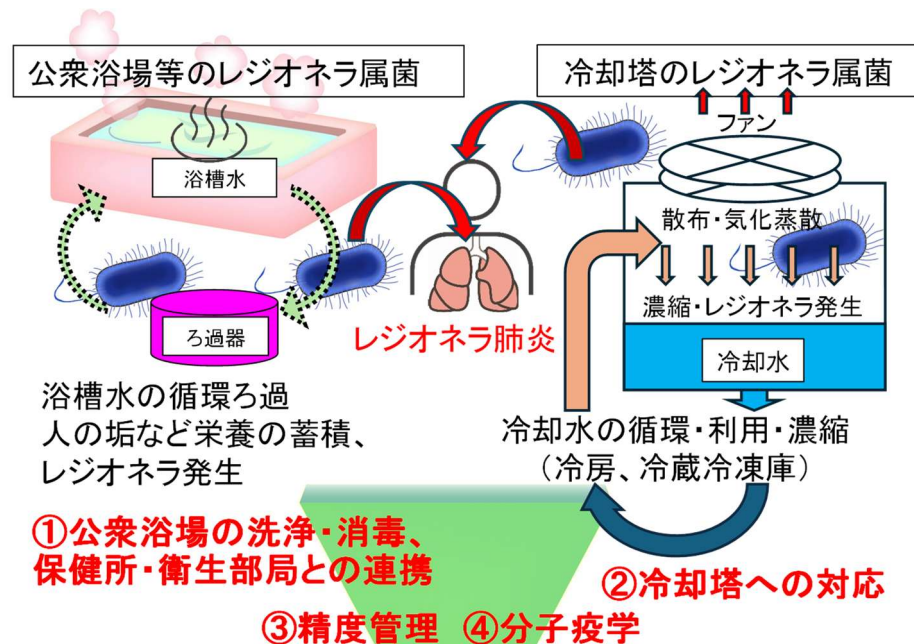
1. 柳本恵太, 高村知成, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 堀内雅人, 土屋邦男, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司: 遊離塩素消毒が困難な県内温泉施設におけるモノクロアミン消毒の効果と細菌叢への影響、令和 7 年度総合理工学研究機構研究員研修会, 2027 年 2 月, 山梨県
2. 柳本恵太, 高村知成, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 堀内雅人, 土屋邦男, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司: 遊離塩素消毒が困難な県内温泉施設におけるモノクロアミン消毒の効果と細菌叢への影響、令和 7 年度山梨県衛生環境研究所研究成果発表会, 2027 年 3 月, 山梨県
3. 小森正人, 金井博哉, 石井清隆, 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 34 回年次研究講演会, 2025 年.
4. 呉 禾, 森 太郎 & 大沢 飛智; Legionella Transmission Investigation Part2 Extended-Range CFD Simulation of Cooling Tower; in 日本建築学会北海道支部研究報告集(98) 141 - 144 (日本建築学会北海道支部, 2025).
5. 呉 禾, 森 太郎 & 大沢 飛智; Legionella Transmission Investigation Part1 A CFD Simulation of Cooling Tower Dispersal, Mechanistic Analysis; in 日本建築学会大会学術講演梗概集・建築デザイン発表梗概集 1193 - 1194 (一般社団法人日本建築学会,

2025).

6. WU HE, 森 太郎 & 大沢 飛智; Legionella Transmission Investigation Linked to Sunlight Disinfection; in 日本太陽エネルギー学会講演論文集 317-320 (一般社団法人 日本太陽エネルギー学会, 2025).
7. 金谷潤一 他. レジオネラ症患者の感染源調査のための全ゲノム SNP 解析. 第 99 回日本細菌学会総会. 2026 年 3 月. 広島市.
8. 細川賢人、田中孝典、山田耕造、藤井志子、山本哲司、泉山信司、前川純子. 循環ろ過式浴槽の新規・省力化配管洗浄法の検討. 日本温泉科学会第 78 回大会. 2025 年 9 月. 東京.
9. 中臣昌広、井上浩章、前川純子、金谷潤一、大島萌愛. 令和 6 年能登半島地震の津波被災地の泥及び奥能登豪雨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 52 回年次大会. 2025 年 9 月. 三重.

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



現場施設・民間企業・保健所衛生部局・地方衛研・科学院・感染研・学術機関の協力による

レジオネラ発生防止、衛生管理の推進

図0 本研究班の編成

※図中の丸数字は、①公衆浴場と②冷却塔への対応、レジオネラ属菌の③培養検査の精度管理と④分子疫学の、大きく分けて4分野の課題対応を意味している。

表0 研究協力者一覧(あいうえお順、敬称略、オブザーバー参加を除く報告書の共同発表者)

青沼 終	三重県保健環境研究所	田中 慶郎	株式会社マルマ
縣 邦雄	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
浅井 威一郎	川崎市健康安全研究所	柘植 亮	三重県保健環境研究所
安齋 博文	公益財団法人日本建築衛生管理教育センター	中村 亮太	三重県保健環境研究所
石井 清隆	株式会社ヤマト	鍋田 信吾	静岡県環境衛生科学研究所
井上 浩章	アクアスつくば総合研究所	野村 健太	花王株式会社
岩本 智花	神戸市健康科学研究所	野本 竜平	神戸市健康科学研究所
大市 真梨乃	三重県保健環境研究所	原 有紀	三重県保健環境研究所
木村 哲也	株式会社ヤマト	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	前田 千恵	三重県保健環境研究所
小嶋 由香	川崎市健康安全研究所	美澤 克俊	静岡県西部健康福祉センター
小松 頌子	神戸市健康科学研究所	森 康則	名古屋大学
小森 正人	株式会社ヤマト	八木 美弥	静岡県環境衛生科学研究所
近藤 笑加	三重県保健環境研究所	柳本 恵太	山梨県衛生環境研究所
茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所
杉山 寛治	株式会社マルマ	山田 耕造	花王株式会社
杉山 順一	公益財団法人日本建築衛生管理教育センター	吉田 真平	三重県保健環境研究所
田栗 利紹	元、長崎県環境保健研究センター	吉村 英基	三重県保健環境研究所

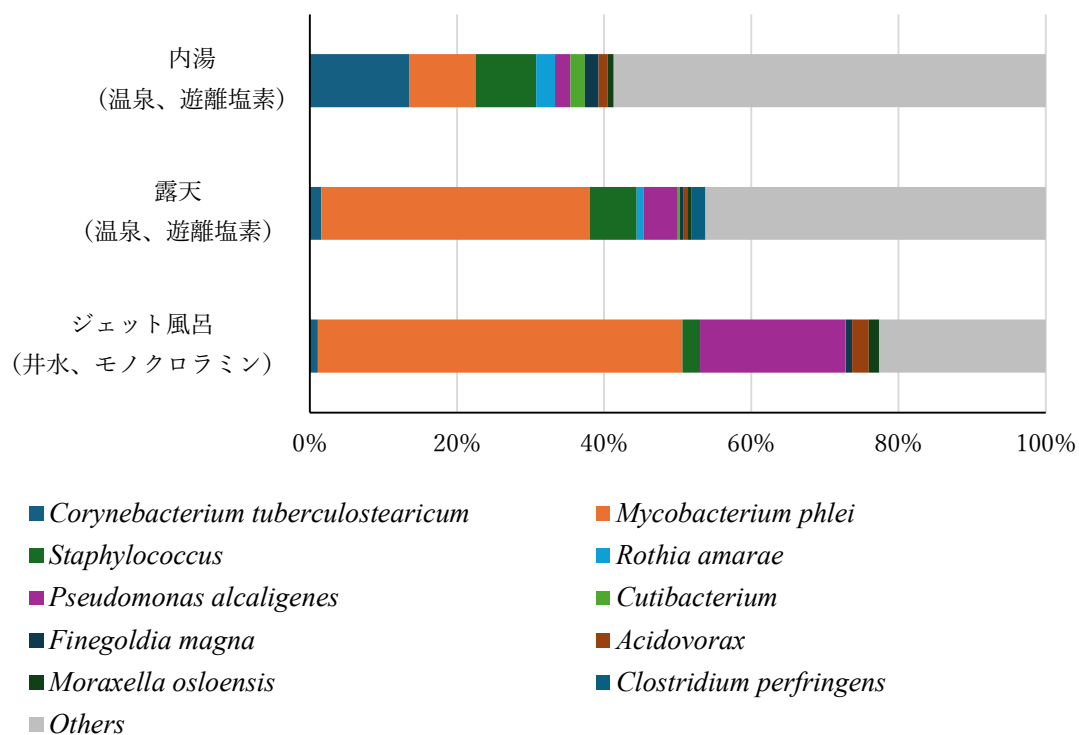


図 1-1 遊離塩素およびモノクロラミン消毒下の浴槽水の菌叢解析

表 1-1 従属栄養細菌の 16S rDNA 解析

浴槽水	菌種	コロニー数
内湯 (温泉、遊離塩素)	<i>Mycobacterium phlei</i> 100% (466bp/466bp)	1
	<i>Cutibacterium acnes</i> 100% (446bp/446bp)	2
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 100% (466bp/466bp)	1
露天 (温泉、遊離塩素)	<i>Mycobacterium phlei</i> 99.8% (445bp/446bp)	1
	<i>Agrococcus sp.</i> 99.6% (444bp/446bp)	1
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 99.6% (466bp/468bp)	1
	<i>Paenibacillus sp.</i> 100% (465bp/465bp)	2
ジェット風呂 (井水、モノクロラミン)	<i>Mycobacterium phlei</i> 100% (466bp/466bp)	3

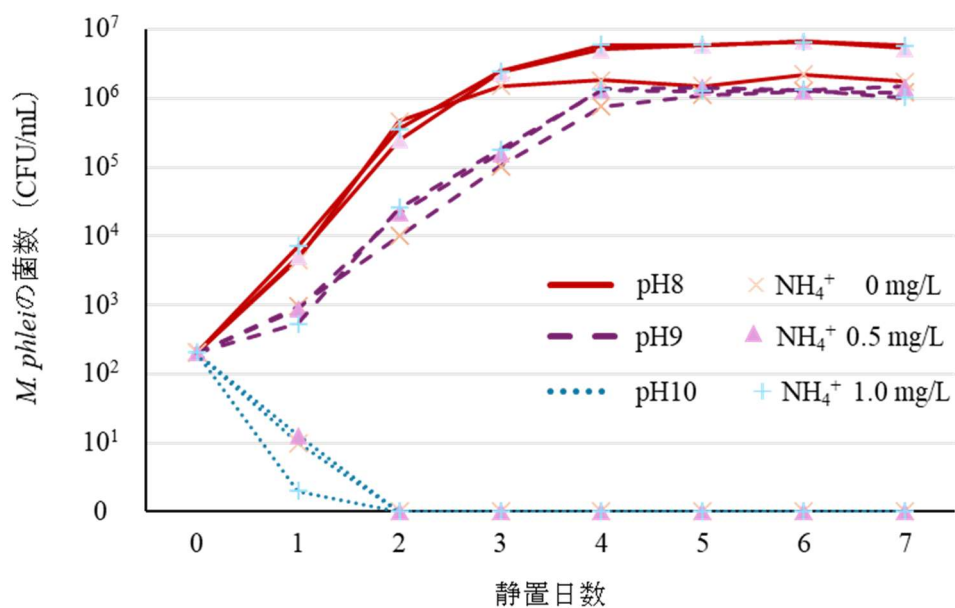


図 1-2 *M. phlei* 増加温泉水における pH、 NH_4^+ 濃度別（9 通り）の増殖曲線

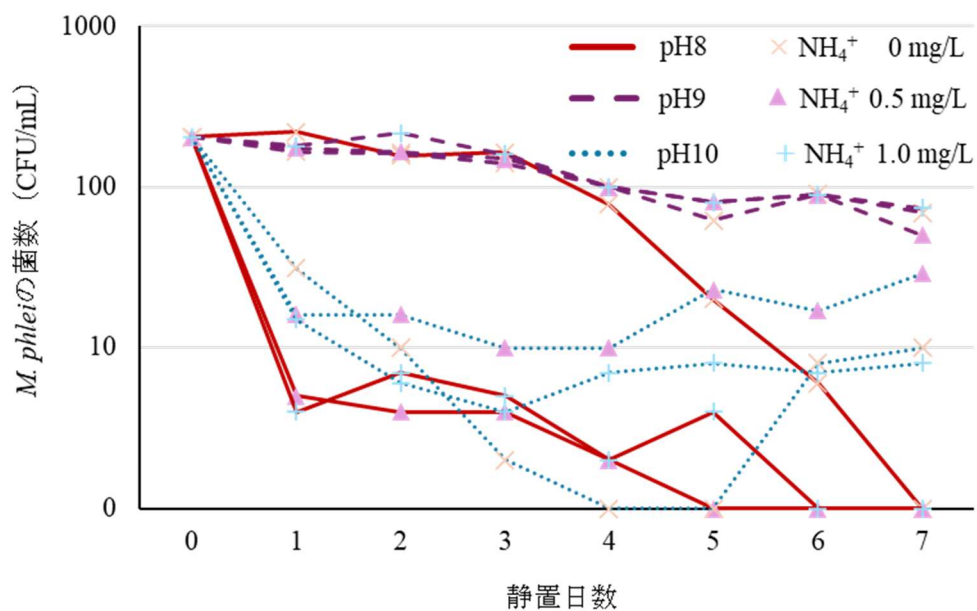


図 1-3 *M. phlei* 非増加温泉水における pH、 NH_4^+ 濃度別（9 通り）の増殖曲線

表 2-1 アルカリ性塩化物泉の化学分析結果

項目	分析結果*1	分析方法*2
pH	9.04	pH/EC 計 1)
EC (mS/m)	3,600	
TOC	1.4	TOC 計 2)
Na ⁺	8,144	AAS 法 3)
K ⁺	82.5	
Mg ²⁺	2.0	
Ca ²⁺	2.8	
NH ₄ ⁺	<0.1	IC 法 4)
(NH ₄ ⁺ -N)	(<0.1)	
F ⁻	29.6	IC 法 5)
Cl ⁻	13,810	
SO ₄ ²⁻	0.8	
H ₂ SiO ₃	13.9	ICP-AES 法 6)
HBO ₂	206.3	

*1 表記のない箇所の単位は mg/L

*2 使用分析機器は以下の通り：

- 1) TOA DKK MM-60
- 2) SHIMADZU TOC-L CPH
- 3) SHIMADZU AA-7000
- 4) Thermo DIONEX ICS-5000 EG
- 5) SHIMADZU HIC-ESP
- 6) SHIMADZU ICP-8100

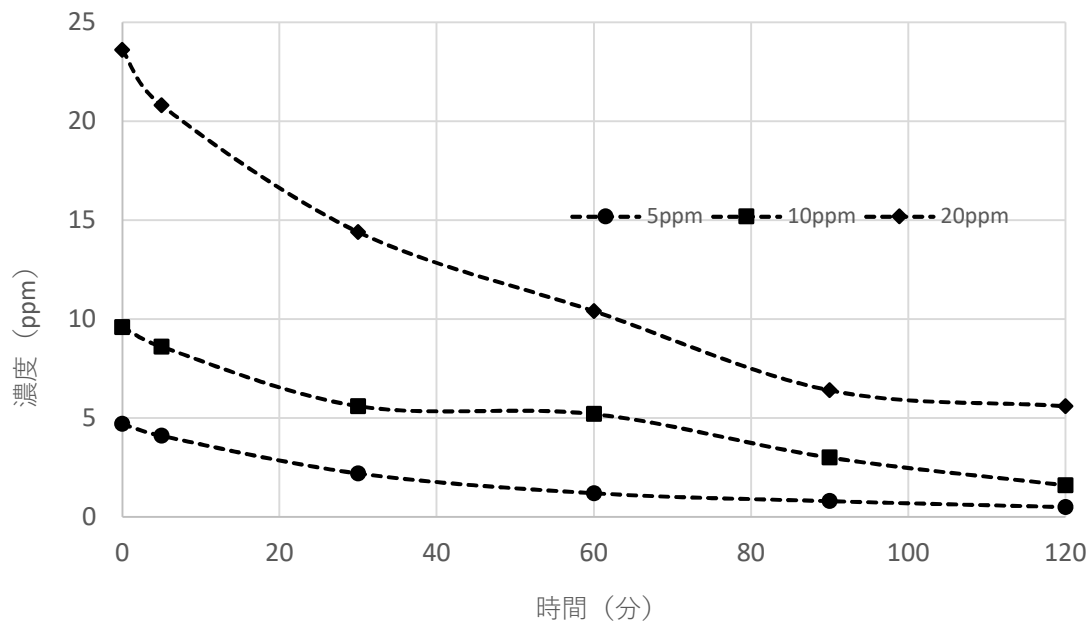


図 2-1 アルカリ性塩化物泉中の遊離塩素濃度

低濃度 (約 5 ppm)、中濃度 (約 10 ppm)、高濃度 (約 20 ppm) の 3 つの異なる濃度で添加した。

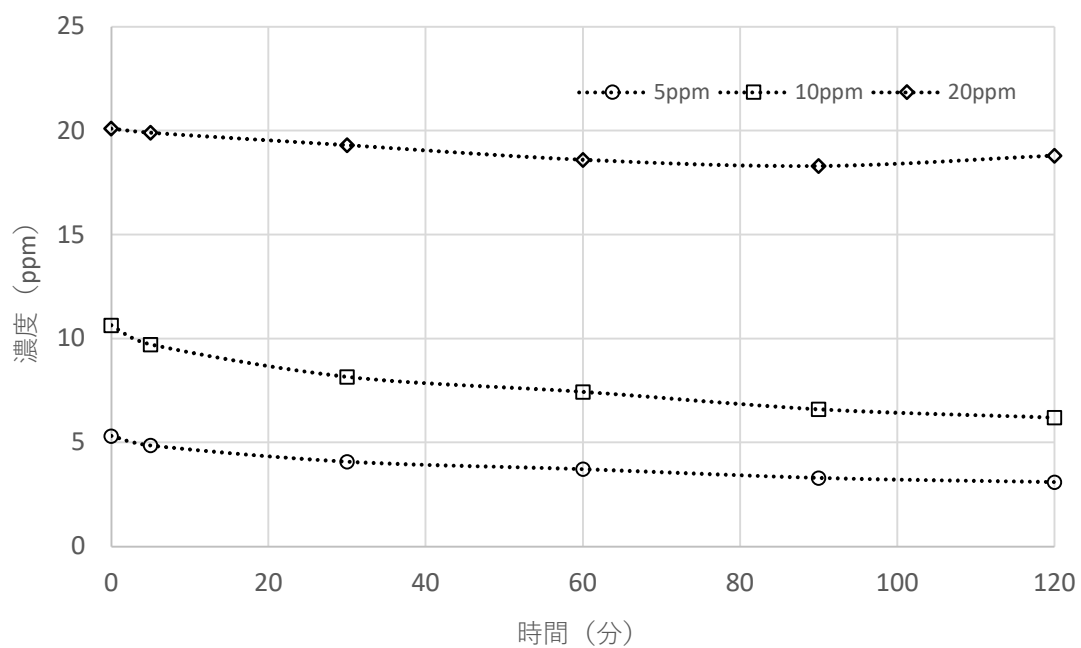


図 2-2 アルカリ性塩化物泉中のモノクロラミン濃度

低濃度 (約 5 ppm)、中濃度 (約 10 ppm)、高濃度 (約 20 ppm) の 3 つの異なる濃度で添加した。

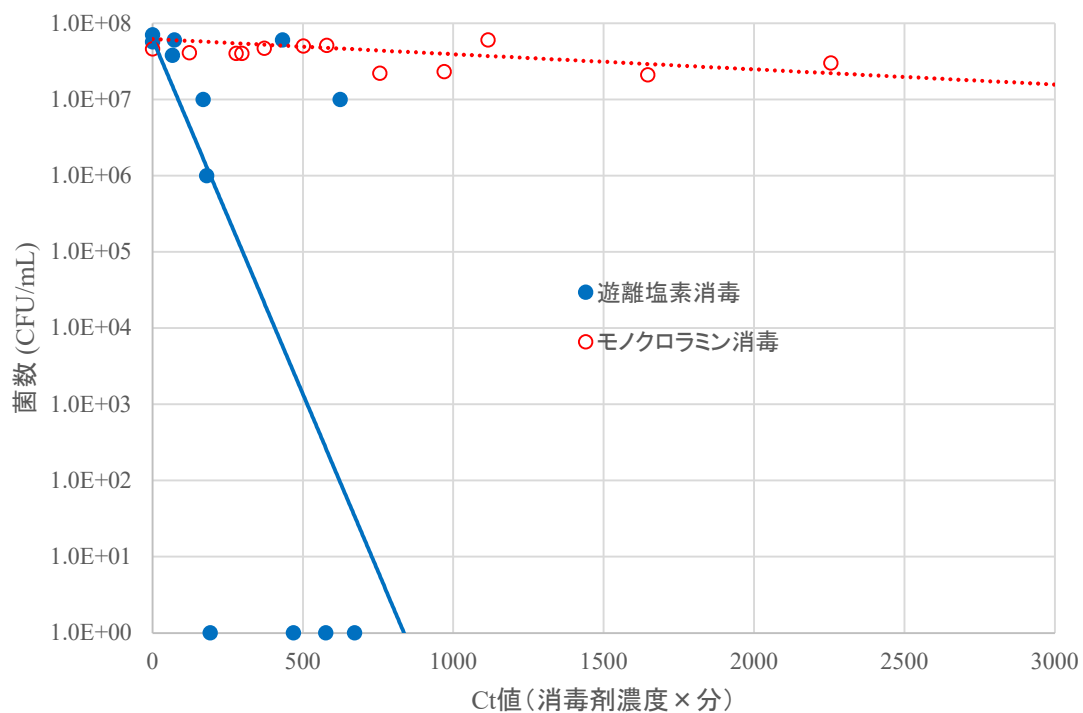


図 2-3 アルカリ性塩化物泉中の *M. phlei* に対する遊離塩素
およびモノクロラミン消毒の不活化の比較
実線が遊離塩素、破線がモノクロラミンの不活化をそれぞれ示す。

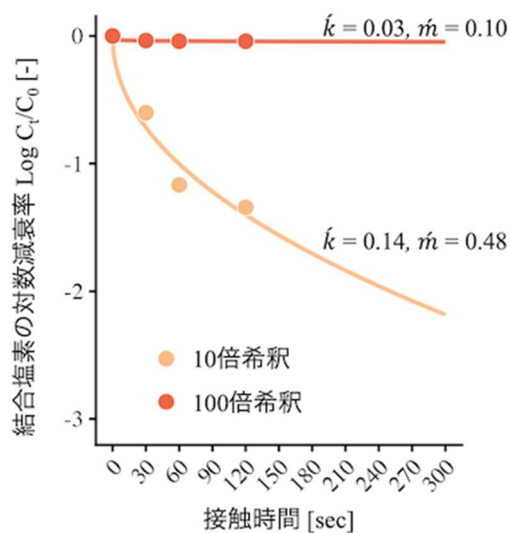


図 3-1 レジオネラ属菌試料の希釈倍率(黄色:10 倍希釈、橙色:100 倍希釈)を変化させた際の
モノクロラミン濃度の減衰曲線。減衰曲線は $C_t = C_0 e^{-\bar{k}t^{\bar{m}}}$ を用いて推定した。プロットは実測値、実
線は推定した減衰曲線を示す。

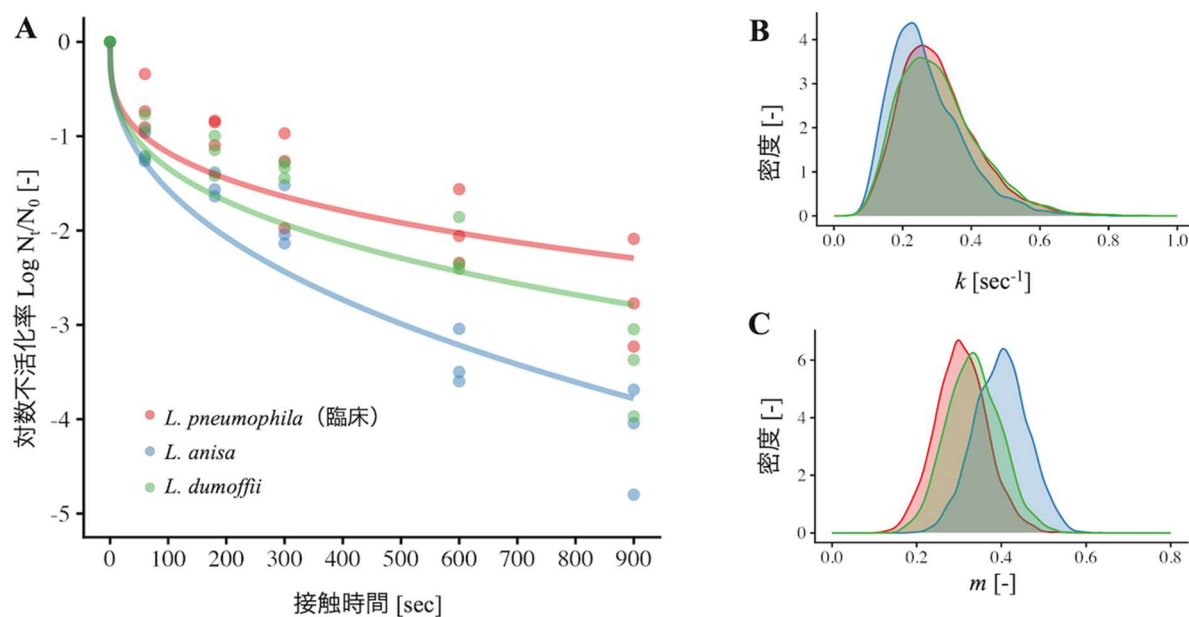


図 3-2 *L. pneumophila* (臨床株; 赤色)、*L. anisa* (冷却塔水由来; 青色)、*L. dumoffii* (浴槽水由来; 緑色) の不活化曲線 (A)、不活化速度定数 k (B) ならびに Hom 因子 m (C)。

(A): プロットは実測値、実線は推定した不活化曲線。(B)、(C): k および m の確率分布。

表 4-1 浴槽水検体の検査結果

項目	検体	検体採取日							
		35 日前	28 日前	21 日前	14 日前	3 日目	10 日目	17 日目	24 日目
レジオネラ 属菌数 (CFU/100 mL)	A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10

表 4-2 配管拭取り検体のレジオネラ属菌培養検査結果

検 体	検体採取日								
	35 日前	14 日前	3 日目	10 日目	17 日目	24 日目	31 日目	90 日目	
								配管 洗浄前	配管 洗浄後
A	<i>L. pneumophila</i> SG1	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
B	不検出	<i>L. pneumophila</i> SG1	<i>L. pneumophila</i> 群別不明	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出

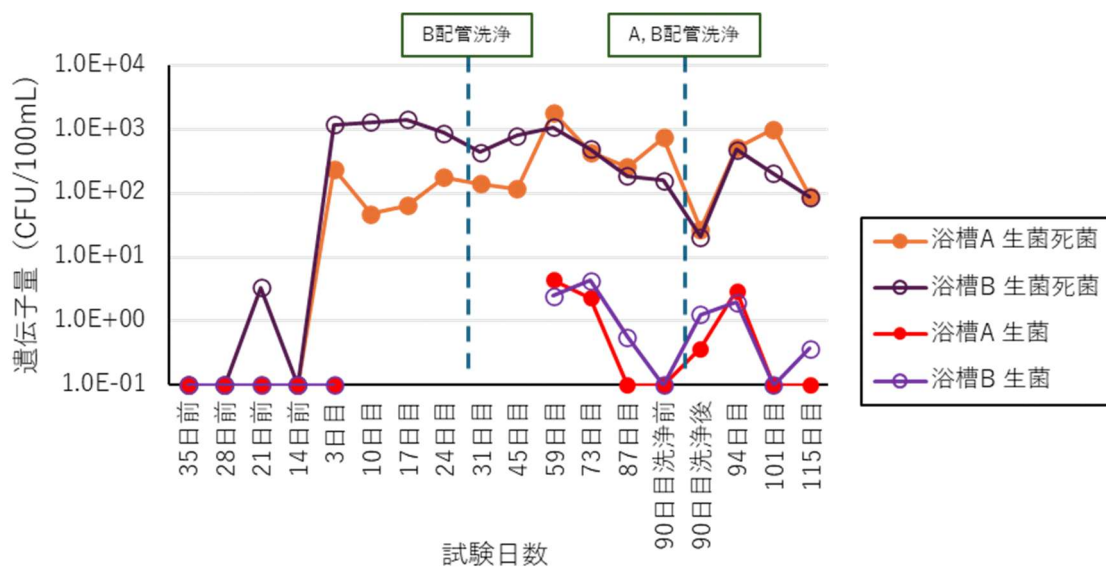


図 4-1 浴槽水から検出されたレジオネラ属菌生菌死菌遺伝子量及び生菌遺伝子量
不検出は 1.0E-01 と示し、検査未実施は空白。

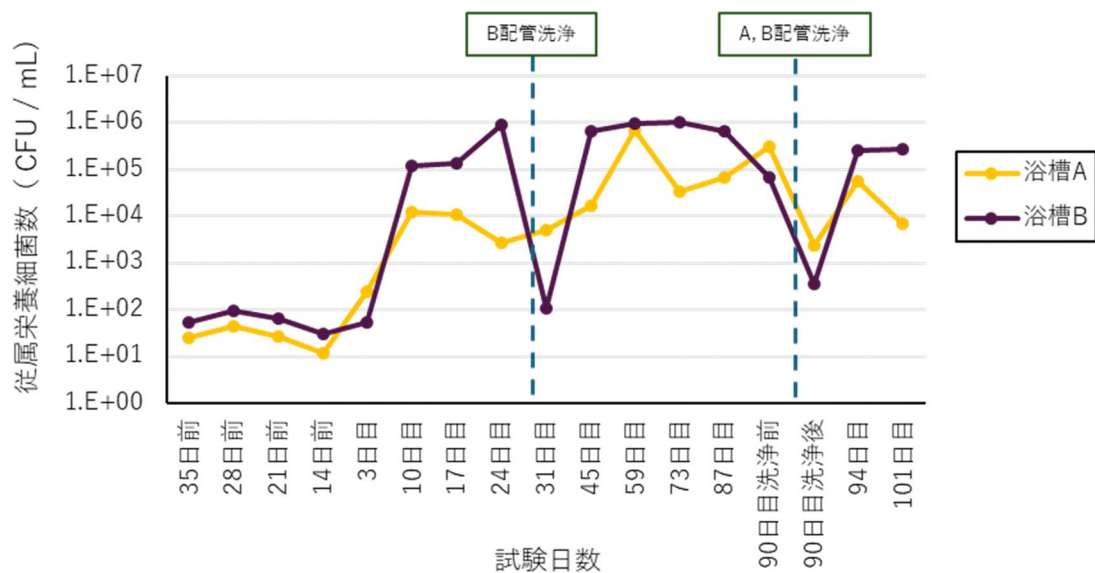


図 4-2 モノクロラミン消毒試験における従属栄養細菌数

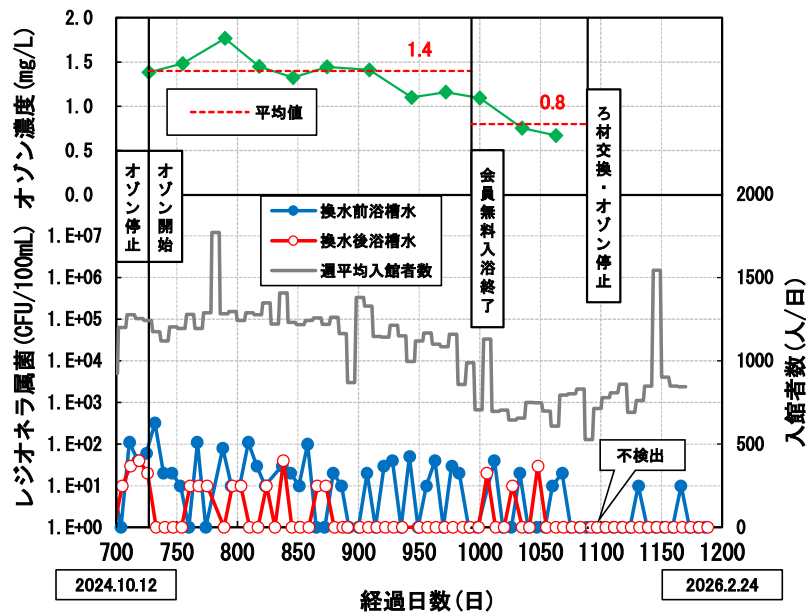


図 5-1 オゾン濃度、週平均入館者数および浴槽水レジオネラ属菌経日変化
レジオネラ属菌の 1CFU/100mL は不検出(検出限界 10CFU/100mL 未満)を示している。オゾン濃度は会員の無料入浴を終了した 993 日目で分けて平均値を算出した(以下、同様)。

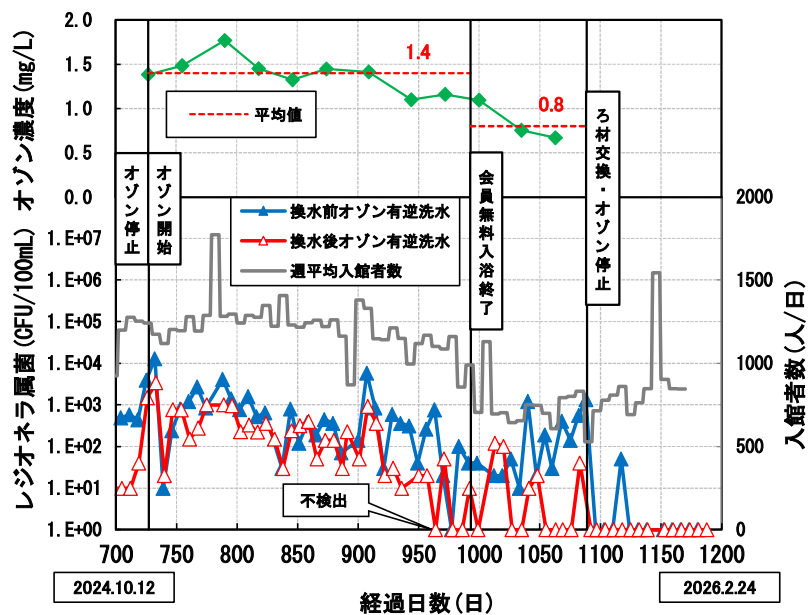


図 5-2 オゾン濃度、週平均入館者数および逆洗水レジオネラ属菌経日変化
オゾン停止中でも便宜的にオゾン有逆洗水のプロットと同列に逆洗水の測定結果を表示した。

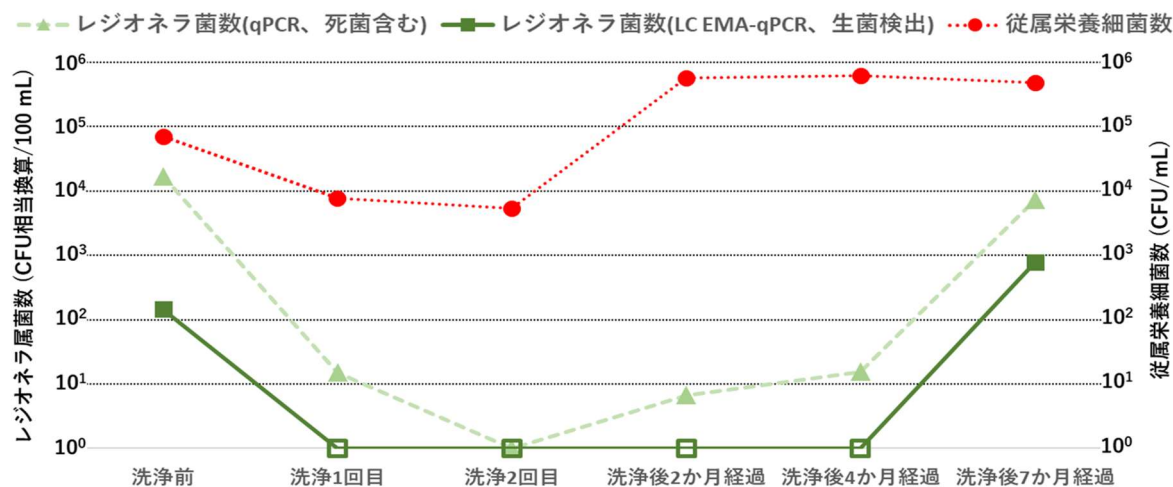


図 6-1 家庭用洗濯機 (N=1) における洗浄前後の菌数の推移
白抜きマーカーは検出限界未満(1 CFU/100 mL 未満)を示す。

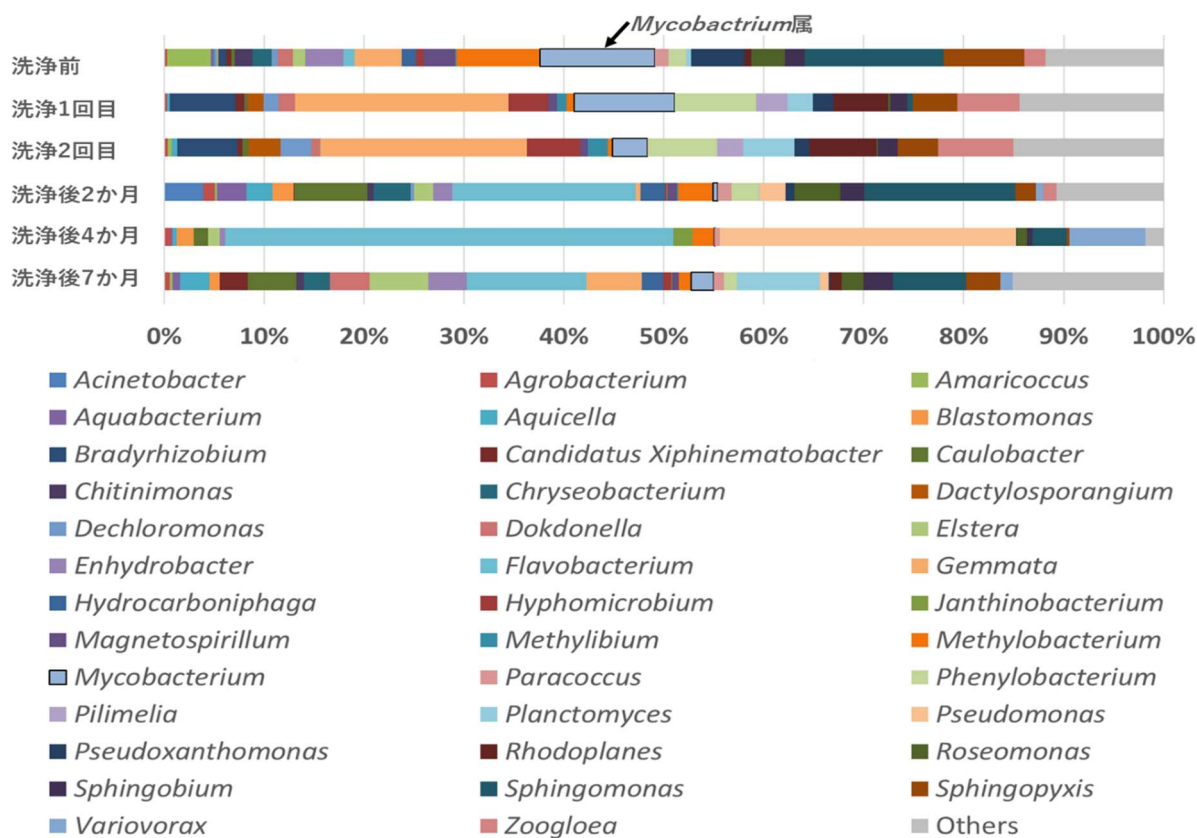
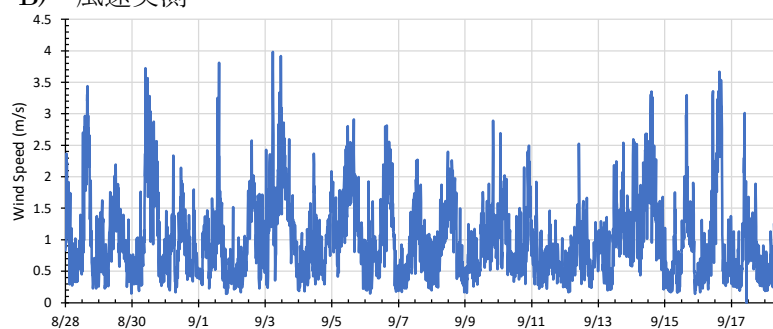


図 6-2 家庭用洗濯機 (N = 1) における洗浄前後の菌叢
各検体における上位 15 属を抽出し、それらを統合した 38 属を図中に示した。各検体で 17 ~32 属を表示し、その他の属は Others に集約した。

A) 風向風速計の設置



B) 風速実測



C) 風向実測

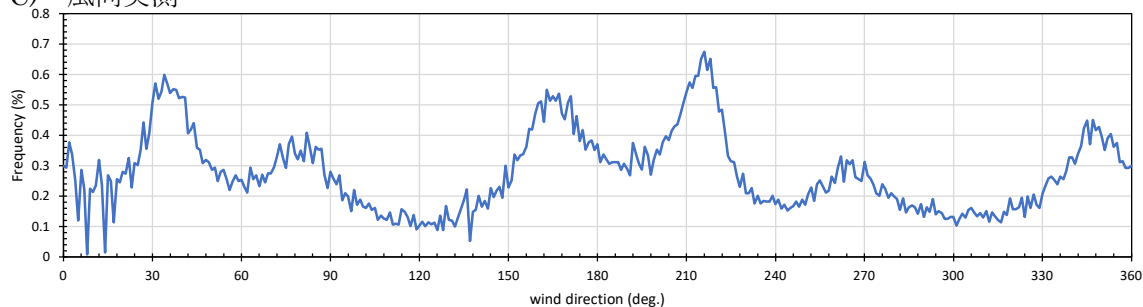
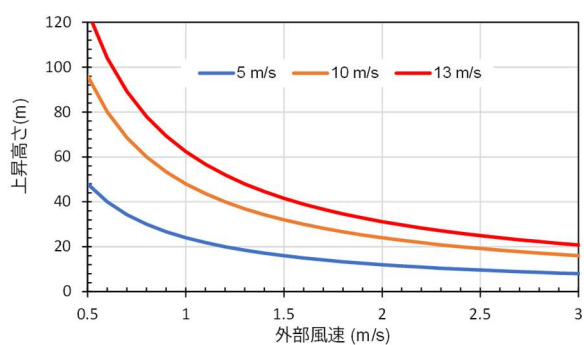


図 7-1 超音波風向風速計の設置、実測

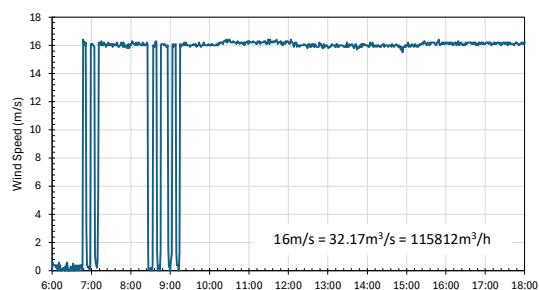
A) 冷却塔への風速計設置例



A) 粒子上昇の高さ、冷却塔風速 3 通り



B) 冷却塔排出風の風速、実測例



B) 粒子の水平到達距離、粒径 3 通り

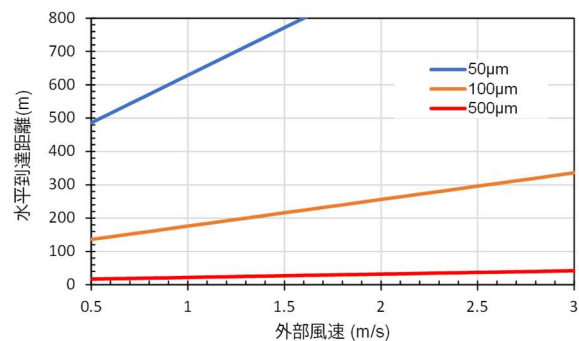


図 7-2 冷却塔排出風実測の例
A)設置例、B)実測例、0 ないし 16m/s

図 7-3 冷却塔排出風による粒子到達距離
A)上昇高さ、B)水平距離

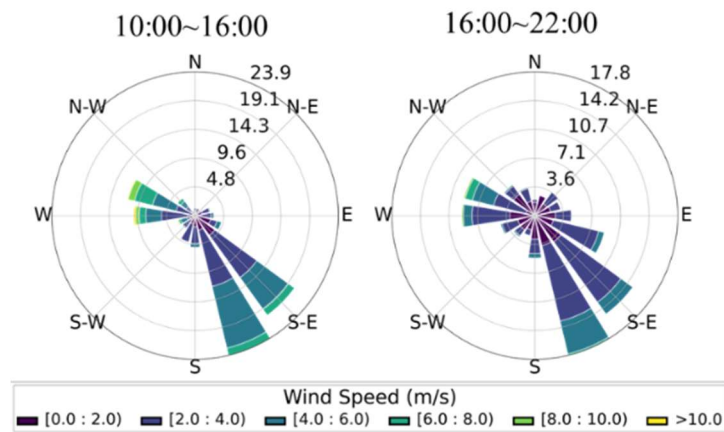


図 8-1 6～8 月の日中と夕方以降の風配図（風向の頻度の数値(%)や成分が若干異なる）

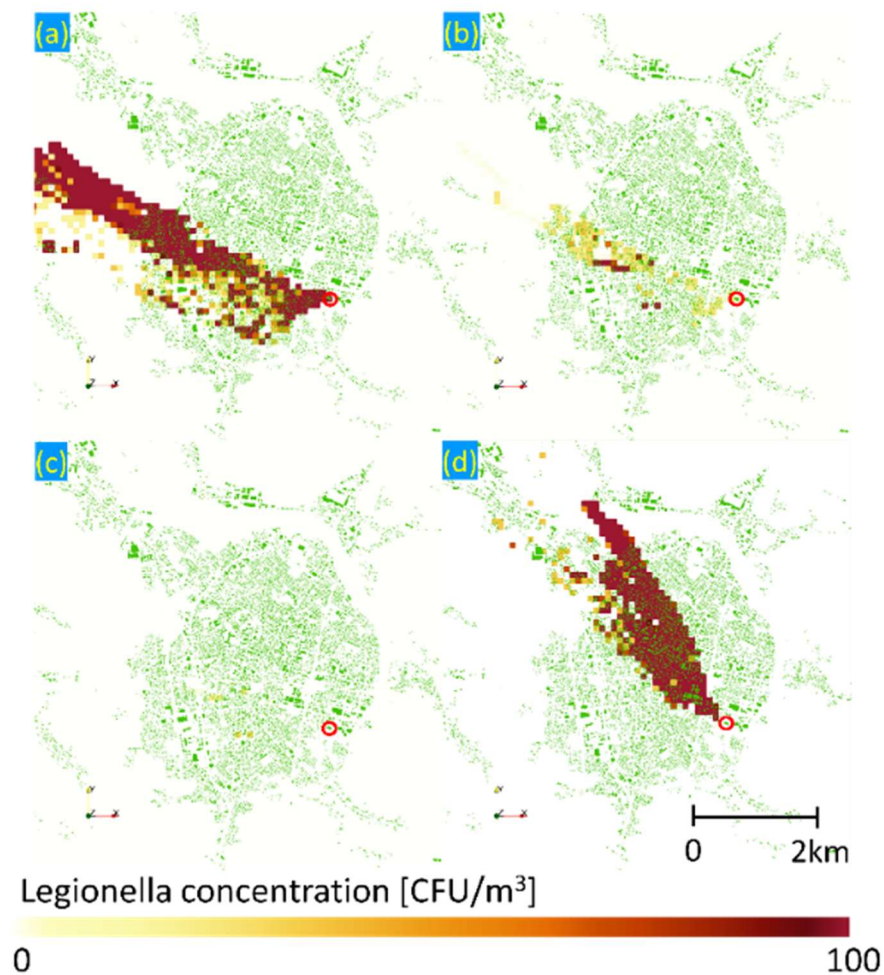


図 8-2 CFD 解析によるレジオネラ属菌の濃度分布

(a)は紫外線を考慮せず湿度効果のみを考慮した場合、(b)は雨天時、(c)は曇天時である。(d)は夜間（日射のない時間帯、20:00～21:00）で、他は日中の 10:00～11:00 におけるリスク領域。各地図の右下にある赤丸がレジオネラ属菌の発生源を意味する。

Legionella Isolation Scheme Preliminary Intended Results Notification

These results are provided for guidance and are determined from the examinations undertaken during quality control testing of the samples in the FEPTU laboratory. The enumeration results may show minor variations from the final results, which are calculated from the participants' consensus results, and included in the distribution report.

Distribution: **G140** Samples: **G140A and G140B**

Intended results:

	G140A	G140B
*cfu L ⁻¹	1.3x10 ⁴	1.2x10 ⁴
Species	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Serogroup	1	10

* colony forming units per litre

Sample contents:

G140A	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1, <i>Nocardia farcinica</i> and <i>Pseudomonas putida</i>
G140B	<i>L. pneumophila</i> serogroup 10 and <i>Micrococcus luteus</i>

図 9-1 UKHSA G140 の Intended results

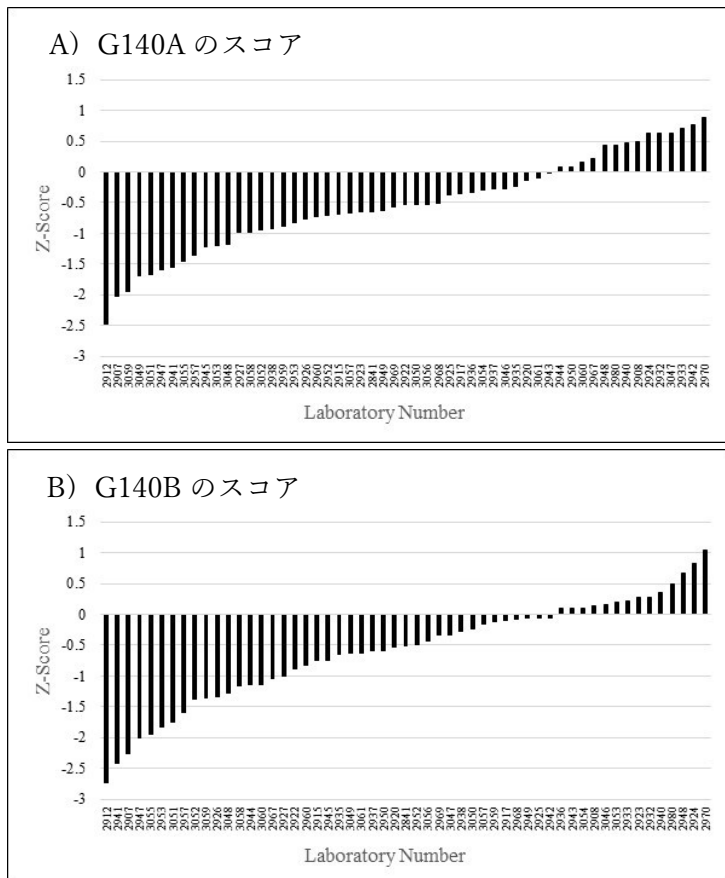


図 9-2 参加した地衛研
の Z スコア分布

A)は試料 G140A、B)は試料 G140B のスコア分布を表す。Z スコアの良好範囲は、一般に-2.0 から +2.0 の間とされ、この範囲内に約 95%が含まれる（適切な検査をしていても、範囲外に出る参加者が 5%生じる）。培養の前処理で菌が減少するので、マイナス側に分布することが多い傾向にあるかもしれない。

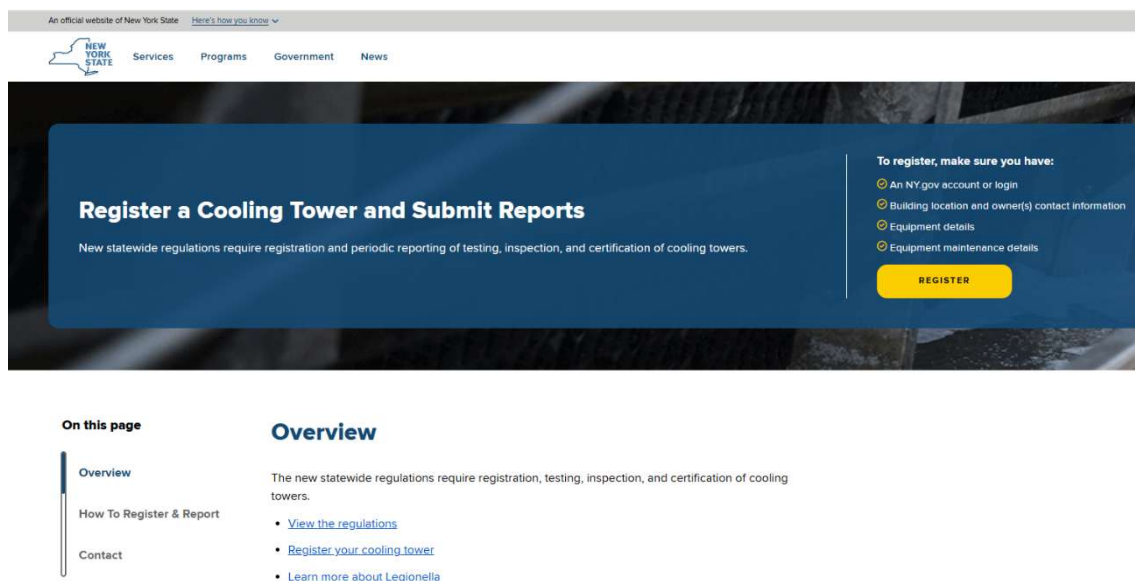


図 9-3 ニューヨーク州のウェブサイト（冷却塔の登録と報告の提出）

表 9-1 登録する内容

	登録項目
1	冷却塔が設置される建物の住所
2	冷却塔所有者の氏名，住所，電話番号，メールアドレス
3	冷却塔のメーカー
4	冷却塔の型式
5	シリアル番号
6	冷却能力
7	冷却塔の保有水量
8	冷却塔の使用目的
9	冷却塔の運転期間（通年，季節）
10	消毒剤の使用方法（手投入，タイマー間欠，連続注入）
11	メンテナンス要員（社内，請負業者，その他）
12	冷却塔の稼働開始年

表 9-2 報告する内容

	報告項目
1	最後に細菌培養検査用の試料を採取した日，その時の検査結果，および必要な是正処置実施日
2	直近のレジオネラ属菌培養検査用の試料を採取した日，その時の検査結果，および必要な是正処置実施日
3	直近の点検日
4	最終認証日
5	冷却塔の撤去または恒久的な使用中止日（該当する場合）
6	その他の情報

表 10-1 冷却塔水から分離された
レジオネラ属菌の菌種

菌種	株数 (%)
<i>L. pneumophila</i>	339 (73.7)
<i>L. erythra</i>	29 (6.3)
<i>L. rubrilucens</i>	24 (5.3)
<i>L. anisa</i>	17 (3.7)
<i>L. quinlivanii</i>	9 (2.0)
<i>L. busanensis</i>	7 (1.5)
<i>L. feeleii</i>	6 (1.3)
<i>L. londiniensis</i>	5 (1.1)
<i>L. gresilensis</i>	4 (0.9)
<i>L. taurinensis</i>	3 (0.7)
<i>L. gormanii</i>	2 (0.4)
<i>L. cincinnatiensis</i>	1 (0.2)
<i>L. geestiana</i>	1 (0.2)
<i>L. hackeliae</i>	1 (0.2)
<i>L. israelensis</i>	1 (0.2)
<i>L. jamestowni</i>	1 (0.2)
<i>L. lansingensis</i>	1 (0.2)
<i>Legionella</i> spp.	9 (2.0)
計	460 (100)

表 10-2 冷却塔水から分離された
L. pneumophila の血清群

血清群	株数 (%)
SG1	216 (63.7)
SG13	46 (13.6)
SG7	31 (9.1)
SG5	14 (4.1)
SGg4/10	11 (3.2)
SG6	5 (1.5)
SG3	4 (1.2)
SG14	4 (1.2)
SG4	2 (0.6)
SG10	2 (0.6)
SG8	2 (0.6)
SG2	1 (0.3)
SG9	1 (0.3)
計	339 (100)

表10-3 冷却塔水から分離された*L. pneumophila* SG1の遺伝子型(ST)

A) C1 group*		B) C2 group*		C) others	
ST	株数	ST	株数	ST	株数
1	154	154	24	40	2
1008	4	598	2	2	1
1019	2	607	2	45	1
1657	1	986	1	48	1
計	161	1065	1	59	1
		新規ST#1	1	461	1
		計	31	新規ST#2	2
				計	9

* Amemura-Maekawa *et al.* の分類

#1; *flaA*:3, *pilE*:14, *asd*:16, *mip*:10, *mompS*:15, *proA*:13, *neuA*:11

#2; *flaA*:16, *pilE*:21, *asd*:33, *mip*:1, *mompS*:31, *proA*:1, *neuA*:1

表 11-1 富山県内で発生したレジオネラ症事例（疑い含む）における全ゲノム SNP 解析、組み換え領域の除去（Gubbins 処理）前後の SNP 数

Case no.	Year	Month	Environmental source	No. of PA	No. of isolates		Sequence type	SNPs between PA and EN isolates					
					PA	EN		Recombination filtered (Gubbins)			No recombination filtering		
								Core genome size (bp (%))	Range	Median	Core genome size (bp (%))	Range	Median
1	2005	Aug	Bath water	1	7	1	ST505	2,837,451 (81)	16 between all	16	2,866,185 (82)	16 between all	16
2**	2008	Sep	Bath water	2	6	6	ST505	2,875,735 (82)	2–13	8	2,907,054 (83)	2–13	8
					13	20	ST644	2,691,055 (77)	0–9	6	2,778,352 (79)	0–691	6
3	2014	Jun	Bath water	1	1	1	ST505	NA	NA	NA	2,950,675 (84)	13	13
4	2015	Sep	Bath water	1	1	5	ST502	2,815,139 (80)	0–15	12	2,880,215 (82)	0–1,088	12
5	2016	Aug	Bath water	1	2	2	ST502	2,852,384 (81)	9–11	10	2,878,382 (82)	9–11	10
6	2021	Mar	Bath water	1	4	1	ST502	2,874,845 (82)	31 between all	31	2,902,362 (83)	31 between all	31
7	2022	May	Shower water	1	1	1	ST120	NA	NA	NA	2,950,289 (84)	0	0
8***	2015	Feb	Shower water	5	9	6	ST353	2,832,909 (81)	0 between all	0	2,914,911 (83)	0 between all	0
9	2019	Apr	Bath water	1	1	1	ST493	NA	NA	NA	2,882,898 (82)	24	24
10	2020	Mar	Bath water	1	10	1	ST2930	2,886,734 (82)	7 between all	7	2,886,875 (82)	7 between all	7
11	2024	Mar	Bath water	1	5	12	ST502	2,831,960 (81)	28–29	28	2,892,954 (83)	1,078–1,080	1,078
12	2024	Oct	Bath water	1	1	1	ST122	NA	NA	NA	2,880,136 (82)	10	10

*PA; patient, EN; environment, NA; not applicable.

**Six isolates were obtained from a single patient in which two sequence types were detected.

***Nine isolates were obtained from four patients.

表 11-2 事例 2 の患者株と浴槽分離株（施設 A と B）のうち、*L. pneumophila* SG1 の ST 型と、分離株数

Species and serogroups	SBT		No. of isolates from:			
	ST	Allele no.	Patient	Facility A	Facility B	Total
Lp1	ST505	(7, 6, 17, 3, 11, 11, 9)	6		6	12
	ST530	(6, 10, 20, 6, 9, 4, 9)			2	2
	ST644	(6, 10, 20, 10, 9, 14, 11)	14	26		40
	ST1094	(6, 10, 20, 10, 9, 4, 9)		7		7
	ST-new	(6, 10, 21, 13, 9, 4, 9)			1	1

表12-1 各散発事例の解析株数、患者由来株と環境由来株のcgMLSTのallele差、SNP数

事例	菌種	血清群	ST	患者由来株数	環境由来株数	由来環境	患者と環境由来株間のcgMLST allele差	SNP解析のreference 2種類*1	SNP解析のCore genome size	患者と環境由来株間のSNP数
散発A	Lp	SG1	ST1	1	2	冷却塔	1~4	CR628336 2014-16	3,303,952 3,424,211	1~2 1~2
散発B	Lp	SG1	ST42	1	1	浴槽水	2	CR628336 2019-14	2,855,748 3,221,079	2 3
散発C	Lp	SG6	ST68	1	2	浴槽水/ 貯水槽	9~26	CR628336 2024-24**	2,985,864 3,411,237	24~36 27~46
散発D*2	Lp	SG9	ST2670	2	2	浴槽排水溝	4~5	CR628336 2025-08**	2,893,133 3,370,721	12 12
散発E*2	Lp	UT	ST537	5	8	浴槽水	3~21	CR628336 2022-46	2,872,985 3,172,001	6~14 2~11

*1 *L. pneumophila* Paris株(AccessionNo.CR628336)での解析結果を上段、各事例内の1株から取得したゲノムでの解析結果を下段に示した。

*2 同一患者から分離した各株を解析した。

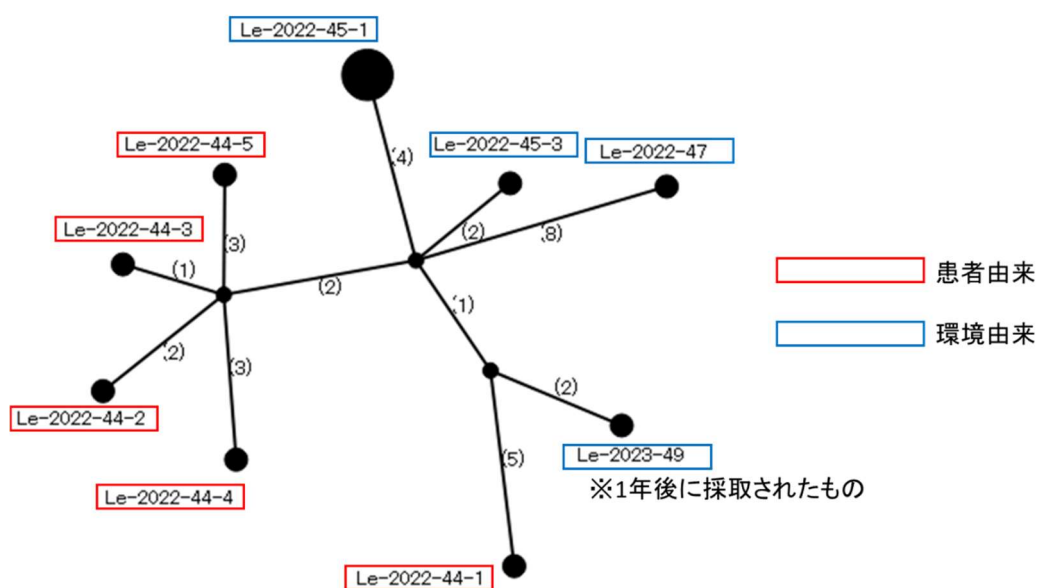


図 12-1 散発事例 E における SNP 解析のハプロタイプネットワーク図

赤枠を患者由来株、青枠を環境由来株とする。() 内の数値は株間の SNP 数を示す。

表 13-1 ST23 型 78 株の、2 株間 SNP の組み合わせ（Gubbins なし）

2株間SNPs 組合せ（組）	（うち疫学的に関連あり）	（うち疫学的に関連なし）
0	112	66
1	20	17
2	9	1
3	20	0
4	18	0
5	24	0
6-10	24	0
11-13,114	2776	0

表 13-2 ST23 型 78 株の、2 株間 SNP の組み合わせ（Gubbins あり）

2株間SNPs 組合せ（組）	（うち疫学的に関連あり）	（うち疫学的に関連なし）
0	207	83
1	197	1
2	199	0
3	447	0
4	488	0
5	284	0
6-10	794	0
11-1,050	387	0

表 13-3 ST89 型 83 株の、2 株間 SNP の組み合わせ（Gubbins なし）

2株間SNPs 組合せ（組）	（うち疫学的に関連あり）	（うち疫学的に関連なし）
0	476	475
1	115	97
2	49	7
3	86	8
4	160	0
5	376	0
6-10	894	0
11-4,248	1247	0

表 13-4 ST89 型 83 株の、2 株間 SNP の組み合わせ（Gubbins あり）

2株間SNPs 組合せ（組）	（うち疫学的に関連あり）	（うち疫学的に関連なし）
0	512	506
1	100	68
2	79	5
3	288	8
4	433	0
5	591	0
6-10	997	0
11-27	403	0