

富山県における浴槽水中のレジオネラ属菌の分離状況(2022年度)

金谷 潤一 磯部 順子 綿引 正則 木全 恵子
小坂 真紀 前西 絵美 大石 和徳

Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2022

Jun-ichi KANATANI, Junko ISOBE, Masanori WATAHIKI, Keiko KIMATA,
Maki KOSAKA, Emi MAENISHI and Kazunori OISHI

目的：レジオネラ属菌は土壌や淡水などの自然環境に広く生息するが、近年は冷却塔、加湿器、循環式浴場など、人工的な水環境にも広く生息する。このレジオネラ属菌が肺胞マクロファージの中で増殖し、ヒトに経気道感染（レジオネラ症）を引き起こす。循環式入浴施設での集団感染事例が多く報告され、レジオネラ症と入浴施設は強く関連していることが明らかとなっている[1-3]。レジオネラ症の届出数は全国的に増加傾向を示し、2022年には暫定値で2,129件報告されている[4]。富山県のレジオネラ症罹患率（人口10万人当たりの患者発生数）は4.25（全国第1位）で、全国の罹患率1.69のおよそ2.5倍と高い状況が続いている。富山県では、レジオネラ症の発生予防に資することを目的として、おもな感染源となる入浴施設におけるレジオネラ属菌による汚染実態調査を継続している。ここでは2022年の結果を報告する。

材料と方法：材料と方法：2022年6月から2023年の1月にかけて、県内8施設から採取した浴槽水33検体、シャワー水8検体、カラン水8検体、計49検体を試料とした。採水は厚生センターおよび富山市保健所の担当者に依頼した。検体は採取後直ちにハイポ入り滅菌採水瓶に入れ、当日中または翌日（冷蔵保存）に当所へ搬入された。

検査は、令和元年9月19日付け薬生衛発0919第1号「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」の「別添 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」を参考に実施した[5]。すなわち、検水500 mLをポリカーボネート製メンブランフィルター（直径47 mm, 0.22 μ m, 日本ミリポア）で吸引ろ過した。このフィルターを50 mL滅菌コニカルチューブに入れ5 mLの滅菌蒸留水を加え、ボルテックス

ミキサーで1分間攪拌し、100倍濃縮試料（未処理試料）とした。レジオネラ属菌以外の細菌（夾雑菌）の発育を抑制するために、濃縮試料のうち0.5 mLはpH2.2の0.2 M KCl-HCl（レジオネラ検体用前処理液、極東製薬工業）を等量加え5分間静置し、酸処理試料とした。また、0.5 mLは50℃で20分間処理し、加熱処理試料とした。酸処理試料は200 μ Lを、未処理試料および加熱処理試料は100 μ LをGVPC寒天培地（日水製薬）にコンラージ棒で全面に広げ、試料が吸収されるまで室温で静置した。菌数が多く、濃縮試料では菌数が測定できない場合も想定されるため、検体の原液（非濃縮検体）を用いて、濃縮試料と同様の培養（未処理のみ）も行なった。培地は乾燥しないよう湿潤箱に入れ、35℃で7日間培養した。培養3日目から実体顕微鏡を用いてレジオネラ属菌に特異的に見られるモザイク模様、カットガラス様の形態を斜光法[6]により平板上の発育菌で観察した。

レジオネラ属菌様のコロニーを血液寒天培地（BD）およびBCYE α 寒天培地（ジオメリュー）に再分離し、2日後にBCYE α 寒天培地のみに発育したコロニーをレジオネラ属菌とした。菌数は処理法に関わらず、最も多く発育した培地のコロニー数を浴槽水100 mLあたりに換算し、検出限界値となる10 CFU以上を陽性とした。

血清凝集試験のため、1検体あたり1～10個のBCYE α 寒天培地に発育した菌を用い、病原体検出マニュアルに従い、加熱抗原を作製した[7]。反応は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。

LAMP法による遺伝子検査のため、分離株を5%キレックス懸濁液（バイオラッド）に懸濁し、

100℃で10分間加熱処理を行い、遠心(15,000 rpm, 5分)して得られた上清をDNA溶液とした。Loopamp レジオネラ検出試薬キットE(栄研化学)を用い、濁度装置 Loopamp EXIA で判定した。本法は定量性がないため、定性試験として遺伝子の増幅が認められた場合、レジオネラ属菌陽性とした。

結果：レジオネラ属菌の検出状況を表1に示した。平板培養法では浴槽水の3検体、シャワー水の1検体、カラン水の5検体からレジオネラ属菌が検出された。検出率は、浴槽水が9.1%であったのに対し、シャワー水は25.0%、カラン水は62.5%であった。LAMP法による検出率は、浴槽水が45.5% (15/33検体)、シャワー水が62.5% (5/8検体) カラン水が75.0% (6/8検体) であり、例年と同様、平板培養法より高かった。

検出されたレジオネラ属菌の菌数を見ると、浴槽水は3検体全てが10～99 CFU/100 mLであったのに対し、カラン水の2検体では100～999 CFU/100 mL、シャワー水の1検体では1,000 CFU/100 mL以上であった(表2)。分離されたレジオネラ属菌の血清群別を実施した結果、浴槽水の2検体、カラン水の1検体からレジオネラ・ニューモフィラ血清群1が検出された(表3)。平板培養法とLAMP法の相関を見ると、全体の63.3% (31/49検体) の検体では、両方の結果が一致した(表4)。また、1検体は平板培養法陽性・LAMP法陰性であり、17検体は平板培養法陰性・LAMP法陽性であった。

考察：レジオネラ症の感染源は多様であるが、集団発生事例では、老人福祉施設でのポータブル加湿器(2017年)[8]や入浴施設(2019年)[9]が感染源・原因施設として報告されている。しかしながら、近年では大規模な台風や豪雨による水害が発生した被災地の泥などからもレジオネラ属菌が分離され[10]、そのような地域からの報告数が増加する傾向にある。幸い富山県ではこのような大規模な水害などは発生していないが、人口あたりの報告数は高い状況で推移している。富山県におけるレジオネラ症の感染源は、患者への聞き取り調査などからおよそ4割が入浴施設であろうと推定されるが、感染源の特定には至らない場合がほとんどである。このような背景のなか、これら4割の患者を減らすため、入浴施設のレジオネラ属菌の調査を継続し、施設の衛生管理を徹底するた

めの資料としている。

県内の浴槽水のレジオネラ属菌検出率は、培養法では9.1%であり、昨年度(3.3%)より高かった。浴槽水に加え、平成25年度からはシャワー水、昨年度からはカラン水のレジオネラ属菌検出率も調査している。今年度は、シャワー水の25.0%、カラン水の62.5%からもレジオネラ属菌が検出され、その値は浴槽水の検出よりも高かった。レジオネラ症は、レジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸い込むことが原因で発症することから、エアロゾルが多く発生するシャワーの管理は特に重要である。遺伝子検査法は、全体的に平板培養法よりも陽性率が高かった。この理由として、死菌のDNAを検出している可能性が考えられた。また、培養法の検出下限値である10 CFU/100 mL未満のレジオネラ属菌が存在した可能性や、生きているが培養できない(viable but non-culturable, VNC)状態のレジオネラ属菌を検出している可能性も考えられた。検出されたレジオネラ属菌の血清群の内訳では、レジオネラ肺炎の原因菌の90%以上を占めるレジオネラ・ニューモフィラ血清群1が浴槽水とカラン水から検出された。このことから、レジオネラ症発生防止のためには、施設への指導が重要であると考えられた。

富山県では2016年3月にはレジオネラ症患者発生時における対応要領を制定するなど、入浴施設に対する行政指導を強化しているが、患者数は依然増加傾向を示しており、レジオネラ症対策の難しさを示している。コロナ禍が続くなかでも増加しているレジオネラ症の動向に注視しなければならない。本調査により、公衆浴場の水系にはレジオネラ属菌がある一定の割合で生息していることが明らかとなっている。県内の公衆浴場の汚染実態を明らかにするため、継続して監視する必要がある。また、入浴施設の利用以外の感染源の探索を含め、レジオネラ症感染防止対策について、更なる研究が必要であろう。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、検体採取にご協力いただきました入浴施設および厚生センター、富山市保健所、生活衛生課の関係各位に心より感謝いたします。

なお、本研究は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」の一環として行った。

文 献

1. 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 他. (2005). 感染症学雑誌, 79, 365-374
2. Nakamura H., Yagyu H., Kishi K., et al. (2003). Intern Med, 42, 806-811
3. 平成 29 年度生活衛生関係技術担当者研修会. 2017 年に広島県内で発生したレジオネラ症集団感染事案について.
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000194768.pdf?msckid=7f316ecbd0d011ecacef11c37956a6b8>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)
4. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2022 年第 52 週
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/11740-idwr-sokuho-data-j-2252.html>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)
5. 厚生労働省. 「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」の「別添公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」. 令和元年 9 月 19 日付け薬生衛発 0919 第 1 号
6. 森本 洋. (2010). 日本環境感染学会誌, 25, 8-14
7. 国立感染症研究所, 全国地方衛生研究所. 病原体検出マニュアル レジオネラ症 2020 年 9 月版
8. 厚生労働省. 加湿器を原因とした老人福祉施設でのレジオネラ症集団発生事例
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000483754.pdf>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)
9. 厚生労働省. 静岡市内の入浴施設におけるレジオネラ症患者の集団発生について
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000590890.pdf>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)
10. 国立感染症研究所. (2020). 病原微生物検出情報, 41, 210.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/legionella-m/legionella-iasrd/9972-489d01.html>
(2023 年 5 月 10 日アクセス可能)

表 1. 平板培養法および LAMP 法におけるレジオネラ属菌の検出結果

	陽性数/検体数 (%)			
	平板培養法		LAMP 法	
浴槽水	3/33	(9.1)	15/33	(45.5)
シャワー水	2/8	(25.0)	5/8	(62.5)
カラン水	5/8	(62.5)	6/8	(75.0)

表 2. 平板培養法によるレジオネラ属菌数

菌数 (CFU/100 mL)	検体数		
	浴槽水	シャワー水	カラン水
10未満	30	6	3
10~99	3	1	3
100~999	0	0	2
1,000以上	0	1	0
計	33	8	8

表 3. 分離菌の血清群別の検体数

		浴槽水	シャワー水	カラン水
レジオネラ・ ニューモフィラ	SG 1	2		1
	SG 5		1	1
	SG 6	1	1	2
	SG 7			1
	SG 13			1
その他の レジオネラ属菌			1	1

表 4. 平板培養法と LAMP 法との相関

		平板培養 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
LAMP	+	9	17	26
	-	1	22	23
		10	39	49