

富山県における浴槽水中レジオネラ属菌の分離状況(2021年)

磯部 順子 金谷 潤一 木全 恵子 内田 薫
前西 絵美 綿引 正則 大石 和徳

Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Toyama Prefecture, 2021

Junko ISOBE, Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, Kaoru UCHIDA,
Emi MAENISHI, Masanori WATAHIKI, 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棲息するが、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。循環式浴用施設での集団感染事例[1-4]が多く報告され、レジオネラ症と浴用施設は強く関連していることが明らかとなっている。

レジオネラ症の届け出数は全国的に増加傾向を示し、2018年には2,130件と、ついに2,000件を超え[5]、その後も2,000件を超えた状況が続いている[6]。富山県の患者届け出数も増加傾向は全国同様である。届け出数は富山県、全国いずれも2020年にわずかに減少したが、2021年には再び増加に転じている[6,7]。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3.87（全国第2位、2021年）で全国の罹患率1.67のおよそ2倍と、全国の中でも高い状況が続いている[7]。

富山県の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浴用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2021年の結果を報告する。

材料と方法：

1. 対象と材料

2021年10、11月に県内8施設から採取した浴槽水30検体、カラン水10検体、シャワー水16検体、計56検体を試料とした。採水は厚生センター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。

2. 浴槽水の濃縮と培養

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」[8]に従った。すなわち、検水800 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8.0 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1.0 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、1.0 mLは50℃20分間ヒートブロックで加熱し、加熱処理試料とした。酸処理試料は200 μ Lを、加熱処理試料と未処理試料は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℃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[9]により平板上の発育菌を観察した。

3. 同定および菌数測定

レジオネラ属菌様のコロニーを血液寒天培地（日本BD）およびBCYE α 寒天培地（日本ビオメリュー）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。

4. 血清凝集試験

1 検体あたり 1～10 個の BCYE α 寒天に発育した菌を用い、病原体検出マニュアル [10] に従い、加熱抗原を作製した。反応はレジオネラ免疫血清（デンカ（株））および *Legionella* Latex Test Kit（オキソイド）を用いて行った。

5. DNA 抽出法

新鮮分離株を 5% キレックス懸濁液（日本バイオラド）に懸濁し、100℃ 10 分の加熱処理を行い、遠心（10,000 rpm, 5 分）して得られた上清を DNA 溶液とした。

6. LAMP 法による遺伝子検査

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：

1. 浴槽水の管理状況

採水日の遊離残留塩素濃度（以下残塩濃度）別検体数を図 1 に示した。「公衆浴場における衛生

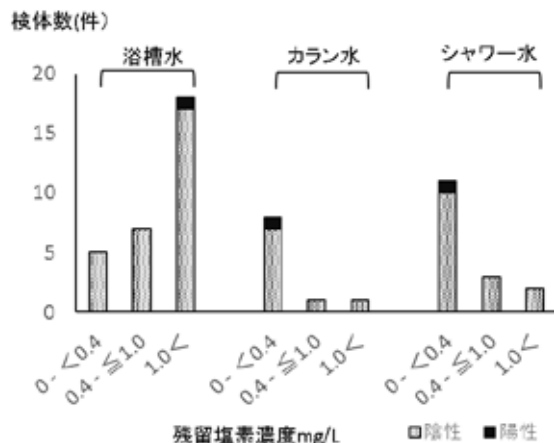


図 1. 給湯方式別残塩濃度の分布とレジオネラ属菌検出率

等管理要領等の改正について」(令和 2 年 12 月 10 日最終改正)の中の「別添 2 公衆浴場における衛生等管理要領」で推奨される「残塩濃度 0.4-1.0 mg/L」の検体は、7/30 検体 (23.3%) のみで、18/30 検体 (60.0%) の浴槽水が 1.0 mg/L を超えていた。これに対し、カラン水 8/10 検体 (80.0%)、シャワー水 11/16 検体 (68.8%) が残塩濃度 0.4 mg/L より低かった。検体の泉種を見ると、カラン水、シャワー水共におよそ半数で井戸水を利用していた (表 1)。レジオネラ属菌が検出された 3 検体のうち 1 検体は残塩濃度 1.0 mg/L であった。

2. レジオネラ属菌検出率

レジオネラ属菌の検出状況を表 1 に示した。本年の調査においては、培養法では浴槽水、カラン水、シャワー水いずれも 1 検体からレジオネラ属菌が検出されたのみであった。検出率は、浴槽水で 1/30 検体 (3.3%)、カラン水 1/10 検体 (10.0%)、シャワー水 1/16 検体 (6.3%) で、いずれも昨年の 0.3～0.4 倍と低かった。カラン水、シャワー水では井戸水検体からの検出であった。一方、LAMP 法による検出率は、10/30 検体 (33.3%)、カラン水 3/10 検体 (30.0%)、シャワー水 1/16 検体 (6.3%) と昨年に比べ低い傾向であったが、例年と同様、培養法より高かった。ただし、浴槽水 (33.3%) では昨年の検出率 (34.1%) と同等であった。

3. レジオネラ属菌数と分離菌種

培養法、LAMP 法いずれか一方、もしくは両法で陽性となった 15 検体について、培養法による定量値、レジオネラ属菌の血清群等をまとめた (表 2)。培養法、LAMP 法いずれも陽性となった検体は 2 検体、培養法のみ陽性が 1 検体、残る 12 検体は LAMP 法のみ陽性であった。LAMP 法のみ陽性となった検体の中には、Tt 値 (任意に設定した濁度に到達するまでの所要時間) が 27:54

表 1. 給湯方式・泉種別レジオネラ属菌検出率 (培養法 / LAMP 法)

		全検体		白湯		温泉		薬湯		井戸水	
		陽性数	検出率	陽性数	検出率	陽性数	検出率	陽性数	検出率	陽性数	検出率
浴槽水 (30)	培養法	1/30	3.3%	1/15	11.8%	0/11		0/3		0/1	
	LAMP法	10/30	33.3%	6/15	35.2%	2/11	18.2%	2/3	66.7%	0/1	
カラン水 (10)	培養法	1/10	10.0%	0/4		0/1				1/5	20.0%
	LAMP法	3/10	30.0%	0/4		0/1				3/5	60.0%
シャワー水 (16)	培養法	1/16	6.3%	0/4		0/2				1/10	10.0%
	LAMP法	1/16	6.3%	0/4		0/2				1/10	10.0%

表 2. レジオネラ属菌が検出された検体における調査結果

検体No.	検体名	給湯方式	施設名	泉種、水源	LAMP法	Tt値	培養結果 (CFU/100ml)	Legionella属菌
1	B01	浴槽水	A	白湯	+	30:30	<10	
2	B05	浴槽水	B	白湯	+	47:36	<10	
3	B06	浴槽水	B	白湯	+	27:54	<10	
4	B12	浴槽水	C	薬湯	+	30:00	<10	
5	B15	浴槽水	D	温泉・露天	+	29:42	<10	
6	B17	浴槽水	E	白湯	+	37:42	<10	
7	B18	浴槽水	E	白湯	+	31:12	<10	
8	B19	浴槽水	E	白湯・露天	+	26:48	10	Lp9
9	B20	浴槽水	E	薬湯	+	31:42	<10	
10	B25	浴槽水	F	温泉	+	29:00	<10	
11	C01	カルン水	A	井戸水	+	34:18	<10	
12	C06	カルン水	E	井戸水	+	35:48	<10	
13	C10	カルン水	G	井戸水	+	30:12	40	Lp6
14	S05	シャワー水	C	井戸水	+	48:00	<10	
15	S16	シャワー水	G	井戸水	-		70	Lp5,Lp6,UT

(No.3), 29:42 (No.5), 29:00 (No.10) と比較的小さく、遺伝子量が多いと推測される検体も認められた。データは示していないが、これらの3検体は採水時の残塩濃度がいずれも1.5以上と高かった。

今回分離されたレジオネラ属菌は*L. pneumophila*とUT(型別不能)であった。その内訳はLp6がカルン水、シャワー水から、Lp5がシャワー水から、Lp9が浴槽水から分離され、No.15のシャワー水からはUTも分離された。

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)[11]や入浴施設(2019年)[12]のように感染源・原因施設はこれまでの報告と同様である。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[13]、そのような地域からの報告数が増加する状況にある。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およそ4割が浴用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、浴用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。

今回の調査ではレジオネラ属菌の検出率はこれ

までになく低く、遺伝子検査でのみレジオネラ属菌が検出されている状況は、塩素消毒によりレジオネラ属菌がコントロールされているものと思われる。一方、ミストを発生するリスクが高いシャワー水やカルン水では、残塩濃度が低い点が非常に危惧される。カルン水やシャワー水については、現在、日常的な衛生管理状況をどのように把握するか、解決されていない課題である。

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、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ていかねばならない。浴用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浴用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, 前川純子, 渡辺治雄, 八木田健司, 遠藤卓郎, 鈴木 泉 (2005). 感染症誌, 79, 365-374
2. Nakamura H., Yagyu H., Kishi K., et al. (2003). Intern Med, 42, 806-811
3. 厚労省生活衛生技術研修「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> (2022年5月15日アクセス可能)
4. 国立感染症研究所. (2010). 病原微生物検出情報, 31, 331-333 <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html> (2022年5月15日アクセス可能)
5. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2018 第 52 週 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/8508-idwr-sokuho-data-j-1852.html> (2022年5月24日アクセス可能)
6. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2021 第 52 週 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/10886-idwr-sokuho-data-j-2152.html> (2022年5月15日アクセス可能)
7. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2020 第 52 週 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/10103-idwr-sokuho-data-j-2053.html> (2022年5月24日アクセス可能)
8. 「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4年5月15日付け薬生衛発 0919 第1号
9. 森本 洋. (2010). 環境感染誌, 25, 8-14
10. 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所, 全国地方衛生研究所, 2020年9月版
11. 厚労省生活衛生技術研修「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> (2022年5月15日アクセス可能)
12. 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> (2022年5月15日アクセス可能)
13. 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> (2022年5月15日アクセス可能)