

富山県における浴槽水中 *Legionella* 属菌の分離状況 (2020 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, 2020Junko ISOBE, Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, Kaoru UCHIDA,
Emi MAENISHI, Masanori WATAHIKI, and Kazunori OISHI

要 旨 2020 年 9 ～ 11 月に県内 12 施設から採取した浴槽水 41 検体, シャワー水 18 検体, カラン水 17 検体, 計 76 検体について, *Legionella* 属菌による汚染実態調査を実施した. 得られた結果を次に示す. 1. 遊離残留塩素濃度 (以下残塩濃度) による管理状況は, 浴槽水で適正とされる残塩濃度 $0.4 - \leq 1.0$ mg/L の検体は, 4/41 (9.7%) で, カラン水 1/15 検体 (6.7%), シャワー水 2/16 (12.5%) であった. 残塩濃度の低い検体 ($0.0 - < 0.4$ mg/L) における *Legionella* 属菌の検出割合は 7/34 検体 (20.6%) で, 残塩濃度 0.4 mg/mL 以上の検体の検出率 3/38 検体 (7.9%) より高かった. *Legionella* 属菌が検出された 12 検体についてみると 9/12 検体 (75%) が残塩濃度の低い検体であった. 2. 培養法における *Legionella* 属菌の検出率は, 浴槽水で 5/41 (12.2%), カラン水 4/17 (23.5%), シャワー水 3/18 (16.7%) で, カラン水でもっとも高かった. LAMP 法による検出率は, 14/41 (34.1%), カラン水 8/17 (47.0%), シャワー水 5/18 (27.8%) で, カラン水における検出率が高い傾向は培養法と同様であった. 3. 分離された *Legionella* 属菌数は, 処理法による偏りは認められなかった. 4. 今年度分離された *Legionella* 属菌は *L. pneumophila* と菌種が同定できなかった株 (UT) であった. その内訳は Lp6 が浴槽水, カラン水, シャワー水それぞれ 2 検体から分離された.

以上のことから, ミスト発生リスクの高いシャワー水, カラン水について, 残塩濃度を上げるなど, 衛生管理の強化が必要であることが明らかとなった. 今後も日常的に浴用施設の衛生管理の監視と汚染実態の把握は強化・継続すべきである.

Legionella 属菌は土壌や淡水などの自然環境に広く棲息するが, 現代では冷却塔, 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とが知られている. このような環境で発生するエアロゾルや粉塵と一緒に吸入された *Legionella* 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) を起こす. 日本では温泉や循環式浴用施設を感染源とするレジオネラ症集団感染事例が多く報告 [1-3] され, さらに 2009 年には公衆浴場のシャワー水を感染源とする事例 [4] も報告されるなど, レジオネラ症は浴用施設と強く関連することが明らかである.

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 件を超える報告数となった [5]. 富山県でも同様に増加傾向を示していたが, 2020 年の患者届け出数は, これまででもっとも多かった 2019 年の

患者届出数 (54 件) のおよそ 7 割 (36 件) と減少した [6,7]. 2020 年の罹患率 (人口 10 万人当たりの患者発生数) は 3.32 (全国の罹患率 1.6) で, 岡山県の次に高かった [7].

富山県でのレジオネラ症の発生予防に資することを目的として, おもな感染源となっている浴用施設における *Legionella* 属菌による汚染実態調査を継続している. ここでは 2020 年の結果を報告する.

材料と方法

1. 対象と材料

2020 年 9 ～ 11 月に県内 12 施設から採取した浴槽水 41 検体, シャワー水 18 検体, カラン水 17 検体, 計 76 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、当日中に当所へ搬入された。

2. 浴槽水の濃縮と培養

検査は厚生労働科学研究 [8] の方法に従った。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。*Legionella* 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 0.2M 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°C 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°C 7 日間培養した。培養 3 日目から実体顕微鏡を用いて *Legionella* 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

Legionella 属菌様のコロニーを血液寒天培地 (栄研化学) 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 *Legionella* 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 100mL 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。しかし、コロニー数が極めて多く、すべてを同定できない場合には、疑わしいコロニーを 10 ~ 20 個用いて同定試験を行い、その *Legionella* 属菌の割合をもって、全 *Legionella* 属菌数を計算した。あるいは、未濃縮検体の培養平板に発育したコロニー数からその定量値を算出した。*Legionella* 属菌を認めない場合 10 cfu/100mL 未満とした。

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°C 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、*Legionella* 属菌陽性とした。

7. ATP 測定法

ATP 量の測定は簡易測定キット 'ルシパックペン' (キッコーマン) により行った。キットの説明書に従って専用の測定器 (ルミテスター PD-20) にキット本体を差し込み、測定器に表示された発光計測値 (RLU) を ATP 量とした。

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。2019 年 9 月 19 日付け「生衛発 0919 第 8 号 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について」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「浴槽水中の遊離残留塩素濃度を通常 0.4mg/L 程度を保ち、かつ、遊離残留塩素濃度は最大 1 mg/L を超えないよう努めること」と示されている。今年度の浴槽水の残塩濃度による管理状況は、適正とされる残塩濃度 0.4 - $\leq$ 1.0mg/L の検体は、4/41 検体 (9.7%) のみで、およそ 8 割 (31/41 検体 75.6%) の浴槽水が 1 mg/L を超えていた。これに対し、カラン水 1/15 検体 (6.7%)、シャワー水 2/16 (12.5%) と、残塩濃度が低い検体が多かった。これらの検体では、およそ半数で井戸水を利用しているためと思われる (表 1)。全体として、残塩濃度の低い検体 (0.0 - <0.4mg/L) における *Legionella* 属菌の検出割合は 7/34 検体 (20.6%) で、残塩濃度 0.4mg/mL 以上の検体の検出率 3/38 検体 (7.9%) より高かった。*Legionella* 属菌が検出された 12 検体についてみると 9/12 検体 (75%) が残塩濃度の低い検体であった。一方、換水頻度については、もっとも多かったのは週に 1 回の換水とした検体が 25 検体 (9 施設) であっ

た。毎日換水が5検体(4施設)、月に1回換水が3検体(2施設)と、施設毎ではなく、浴槽水によって頻度が異なっている状況が認められた。昨年同様、*Legionella* 属菌の検出率と換水頻度に関連性は認められなかった(データ未掲載)。

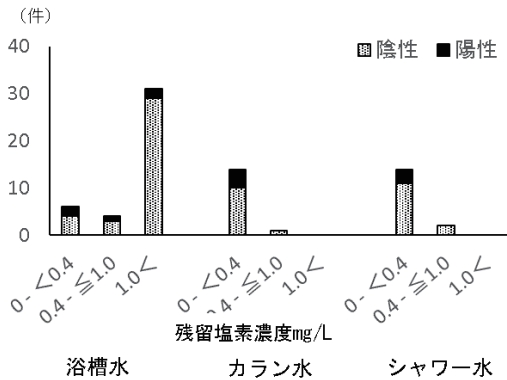


図 1. 給湯方式別残塩濃度の分布と *Legionella* 属菌検出率

2. *Legionella* 属菌検出率

Legionella 属菌検出率を表 1 に示した。培養法における *Legionella* 属菌の検出率は、浴槽水で 5/41(12.2%)、カラン水 4/17 (23.5%)、シャワー水 3/18 (16.7%) で、カラン水でもっとも高かった。とりわけ井戸水での検出率が高く、カラン水の場合、3/7 検体 (42.9%) の検出率であった。LAMP 法による検出率は、14/41(34.1%)、カラン水 8/17 (47.0%)、シャワー水 5/18 (27.8%) で、カラン水における検出率が高い傾向は培養法と同様であった。全体的に LAMP 法による検出率は培養法より高かったが、井戸水の検体では検出率に大きな違いは認められなかった。

3. 夾雑菌抑制(処理)法別 *Legionella* 属菌分離菌数

培養時に夾雑菌を抑制するために実施した処理法別の *Legionella* 属菌の検出状況(菌数)を表 2 に示した。分離された *Legionella* 属菌数は、合計では熱処理法で少なかった。しかし、熱処理法でもっとも分離菌数が多い検体(No.8,12)も認められ、処理法による分離菌数に偏りは認められなかった。一方、ATP との関連性については、

ATP が高く、夾雑菌が多いと予想される検体(No.1)であっても、未処理と熱や酸によって夾雑菌処理された検体との間に差はなかった。このことは ATP の値を指標として処理法を選択することは難しいことを示している。

表 2. 夾雑菌抑制法別の *Legionella* 属分離菌数

No.	検体種	<i>Legionella</i> 属菌数 (CFU/100ml)	ATP (RLU/10ml)	濃縮検体中 <i>Legionella</i> 属菌数/100μl		
				未処理	熱処理	酸処理
1		50	1059	3	2	5
2		350	271	20	29	35
3	浴槽水	10	5	1	0	1
4		10	283	0	1	0
5		10	5	0	1	0
6		30	110	2	2	2
7	カラン水	2690	13	251	179	269
8		110	14	7	11	3
9		30	10	3	1	3
10		40	109	1	4	3
11	シャワー水	90	8	0	9	9
12		150	20	14	15	11

4. *Legionella* 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 27 検体について、培養法による定量値と分離された *Legionella* 属菌の血清群をまとめた(表 3)。培養法、LAMP 法いずれも陽性となった検体は 12 検体で、残る 15 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 18:06 (No.5) や 19:48 (No.2) と短く、遺伝子量が多いと推測される検体も認められた。

今年度分離された *Legionella* 属菌は *L. pneumophila* と UT (型別不能)であった。その内訳は Lp6 が浴槽水、カラン水、シャワー水それぞれ 2 検体からと多く、Lp1 が浴槽水の 2 検体、カラン水、シャワー水の 1 検体から分離され、Lp5 はカラン水、シャワー水の各 2 検体から分離された。

表 1. 給湯方式・泉種別 *Legionella* 属菌検出率(培養法)

		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(41)	培養法	5/41	12.2	2/17	11.8	3/22	13.7	0/2	0		
	LAMP法	14/41	34.1	7/17	41.1	7/22	31.8	0/2	0		
カラン水(17)	培養法	4/17	23.5	1/10	10.0					3/7	42.9
	LAMP法	8/17	47.0	4/10	40.0					4/7	57.1
シャワー水(18)	培養法	3/18	16.7	1/10	10.0					2/8	25.0
	LAMP法	5/18	27.8	3/10	30.0					2/8	25.0

表 3. *Legionella* 属菌が検出された検体における調査結果

No.	給湯方式	施設名	泉種 水源	換水頻度	採水日の遊離残留 塩素濃度 (mg/L)	塩素剤の種類	ATP (RLU/10 mL) ルシパックpen	LAMP	Tt値	培養結果 (CFU/100mL)	分離菌の 血清群
1		A	温泉	2回/月	1	次亜塩素酸ナトリウム	5	+	26:00	<10	
2		B	温泉	1回/週	0.2	次亜塩素酸ナトリウム	17730	+	19:48	<10	
3		B	白湯	2回/週	0.1	次亜塩素酸ナトリウム	18	+	25:36	<10	
4		B	白湯	毎日	0.2	次亜塩素酸ナトリウム	8	+	26:00	<10	
5		B	温泉	2回/週	>2.0	次亜塩素酸ナトリウム	601	+	18:06	<10	
6		D	白湯	1回/週	0.5	次亜塩素酸ナトリウム	1059	+	19:24	50	Lp1, Lp6
7		D	白湯	1回/週	0.8	次亜塩素酸ナトリウム	519	+	22:42	<10	
8	浴槽水	E	白湯	2回/月	>2.0	次亜塩素酸ナトリウム	5	+	25:54	<10	
9		F	白湯	毎日	1.59	次亜塩素酸ナトリウム 次亜塩素酸カルシウム	271	+	21:48	350	Lp6
10		G	白湯	1回/週	>2.0	次亜塩素酸ナトリウム	2	+	30:36	<10	
11		H	温泉	3-4回/月	1	電解次亜塩素素	5	+	22:12	10	Lp1
12		H	温泉	3-4回/月	0.2	電解次亜塩素素	283	+	21:36	10	UT
13		H	温泉	3-4回/月	0.6	電解次亜塩素素	105	+	21:18	<10	
14		I	温泉	1回/週	0.3	次亜塩素酸ナトリウム	5	+	24:42	10	Lp2-14
15		B	井戸水		0		20	+	34:12	<10	
16		C	水道水		0.09		15	+	23:48	<10	
17		E	水道水		<0.1		110	+	24:24	30	Lp1
18	カラン水	F	井戸水		0.04		13	+	18:06	2690	Lp6
19		G	井戸水		0		14	+	23:18	110	Lp5, Lp6, UT
20		G	井戸水		0		10	+	25:24	30	Lp5
21		H	水道水		0.1		6	+	34:18	<10	
22		J	水道水		0.2		7	+	31:36	<10	
23		C	水道水		0.09		19	+	32:36	<10	
24		E	水道水		<0.1		109	+	25:12	40	Lp1
25	シャワー水	G	井戸水		0		8	+	19:42	90	Lp5, Lp6
26		G	井戸水		0		20	+	19:42	150	Lp5, Lp6
27		H	水道水		<0.1		5	+	33:18	<10	

考 察

レジオネラ症の感染源は多様であるが、最近の集団発生事例を見ると、2017年に発生した老人福祉施設でのポータブル加湿器を原因とする事例[11]や、2019年の入浴施設における事例[12]の感染源・原因施設はこれまでも多く報告されてきたところと変わっていない。しかしながら、近年毎年のように発生している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ている[13]ことから、このような状況においてもレジオネラ症の発生に注意が必要である。幸い富山県ではこのような大きな水害は発生していないが、それでも人口あたりのレジオネラ症患者報告数が多い。また、集団事例も発生していない状況で、その原因は未だ解明できていない。聞き取り調査などから推定される感染源はおおよそ4割が浴用施設であるから、このような施設の衛生管理を徹底することで4割の患者を減らすことができるものと考え。

今回の調査では残塩濃度と *Legionella* 属菌の検出率には相関が認められたことから、基本的な管理法でもある塩素による消毒を徹底することが重

要であろう。遺伝子検査で *Legionella* 属菌が検出され、培養検査では菌が分離されなかった検体では、衛生管理により *Legionella* 属菌がコントロールされていることを示している。ただし、遺伝子検査法では、培養できない *Legionella* 属菌を検出している可能性も否定はできない点には注意が必要である。一方、ミストを発生するリスクが高いシャワー水やカラン水に利用されている井戸水で、残塩濃度が推奨より低いか、全く認められなかった点が非常に危惧される。No.18のカラン水では2,690/100mLと分離菌数が多く、そのリスクはきわめて高い。前述の入浴施設における事例[12]では、浴槽水から検出されたLp1は50 cfu/100mLであった。この事例を参考にすると、本調査結果から、富山県においてもいつ集団感染が発生してもおかしくないことを示している。したがって、浴用施設における自主的な衛生管理がもっとも重要となるが、その方法としてATPが活用されており、富山県においても監視指導の目安としている。しかしながら、カラン水やシャワー水については、ATPの値と *Legionella* 属菌による汚染度合が相関しないことが報告されている[14]。現在、シャワー水やカラン水の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。

今回の調査において、未処理、酸処理、加熱処理で *Legionella* 属菌の検出度合に差は認められなかったが、森本が報告 [9] しているように、同時に検出される夾雑菌の種類や菌数によって、*Legionella* 属菌の検出率が大きく変わることを、あるいは *Legionella* 属菌自体が、酸や熱に感受性を示す場合があることから、検査は常に3法を併用することが望ましい。

近年は、感染症の検査にも遺伝子検査法が多く取り入れられている。レジオネラ検査においても例外ではなく、「レジオネラ症防止指針第4版」、また、上述した「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」の中でも遺伝子検査法が記載され、検査の迅速性が高まることが期待されている。富山県では、以前から浴槽水検査にLAMP法を併用し、浴槽水中の *Legionella* 属菌の存在履歴を証明してきた。今回の調査に限らず、培養法とLAMP法ですべての結果が一致することはほとんどない。とりわけ、*Legionella* 属菌数が少ない検体では、濃縮液の一部を検査に供する方法であるため、確率の問題から結果にばらつきが出る場合がある。あるいは、検体中のPCR反応阻害物質の存在、死菌DNAの存在により、結果が不一致となることが考えられる [15]。一方、近年、培養法では検出できない *Legionella* 属菌の存在が報告 [16] され、遺伝子検査法のみ陽性という結果は、死菌DNAを検出しているだけではないことに注意しなければならない。このことから、*Legionella* 属菌の検査には遺伝子検査法の併用が望まれる。

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。しかしながら、感染源が特定される患者は少なく、行動調査の中から利用した浴用施設の衛生管理状況や *Legionella* 属菌検査を実施するにとどまっている。浴用施設以外の感染源はなかなか解明されないが、浴用施設の衛生管理を監視する体制の強化と汚染実態の把握は継続すべきである。はじめに書いたように2020年の全国におけるレジオネラ症患者の報告数は2,031件で、昨年2,314件のおよそ9割であった。富山県での報告数も同様で、昨年の7割程度であった。この報告数の減少は、新型コロナウイルス感染症対策の一環として旅行を控えるなど、温泉施設を利用する機会が減少したことが原因の一つである可能性は高い。また、同様に医療機関において喀痰等の検査を控える、受診を控えるなどの影

響もあるのかもしれない。今後も、レジオネラ症の動向に注視していかなければならない。

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> (令和3年7月5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> (令和3年7月5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/reference.html> (令和3年7月5日アクセス可能)
6. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2019 第 52 週 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/9289-idwr-sokuho-data-j-1952.html> (令和3年7月5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> (令和3年7月5日アクセス可能)
8. 倉 文明, 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・公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究. (平成24年度総括・分担報告書), 93-127
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>
(令和3年7月5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>
(令和2年6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>
(令和3年7月5日アクセス可能)
14. 病原微生物検出情報 (2013). 34, 167-168. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2252-related-articles/related-articles-400/3605-dj4008.html>
(令和3年7月5日アクセス可能)
15. 井上浩章 (2018) 日本防菌防黴誌, 46, 561-567
16. Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, et al. (2015) . Int J Sys Evol Microbiol, 12, 13118-13130