

富山県内の入浴施設における水検体中の レジオネラ属菌分離状況(2023年度)

金谷 潤一 木全 恵子 磯部 順子 齋藤 和輝
池田 佳歩 前西 絵美 大石 和徳

Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2023

Jun-ichi KANATANI, Keiko KIMATA, Junko ISOBE, Kazuki SAITO,
Kaho IKEDA, 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生息するが、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。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で発症する。国内では、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[1-4]。レジオネラ症の届出数は全国的に増加傾向を示し、2023年には暫定値で2,271件報告されている[5]。富山県のレジオネラ症罹患率（人口10万人当たりの患者数）は3.58で、全国の罹患率1.80のおよそ2倍と高い状況である。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、主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2023年の結果を報告する。

材料と方法：2023年7月から2023年11月にかけて、県内7施設から採取した浴槽水31検体、シャワー水8検体、カラン水7検体、計46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。

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[6]。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pH 2.2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、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、濃縮試料と同様に100 μ LをGVPC寒天培地に塗布して培養した。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[7]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（バイオメリュー）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[8]。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、シャワー水およびカラン水の各3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9.7%であったのに対し、シャワー水は37.5%、カラン水は42.9%であった。LAMP 法による検出率は、浴槽水が51.6%（16/31 検体）、シャワー水が50.0%（4/8 検体）カラン水が71.4%（5/7 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、浴槽水およびシャワー水は全てが10～99 CFU/100 mL であったのに対し、カラン水の1 検体では100 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 検体から *L. pneumophila* 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56.5%（26/46 検体）の検体では、両方の結果が一致した（表4）。2 検体は平板培養法陽性・LAMP 法陰性であり、18 検体は平板培養法陰性・LAMP 法陽性であった。

考察：富山県におけるレジオネラ症患者の感染源は、患者への聞き取り調査などからおおよそ4 割が入浴施設であると推定されるが、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9.7%であり、昨年度（9.1%）と同等であった。一方、シャワー水の37.5%、カラン水の42.9%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（LAMP 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 *L. pneumophila* 血清群 1 が浴槽水から検出された。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、患者数は減っておらず、レジオネラ症対策の難しさを示している。本調査により、入浴施設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。県内の入浴施設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。

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、厚生センターおよび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> (2024 年 5 月 9 日アクセス可能)
4. 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>
(2024 年 5 月 9 日アクセス可能)
5. 国立感染症研究所 IDWR 速報データ 2023 年第 52 週
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/12442-idwr-sokuho-data-j-2352.html>
(2024 年 5 月 9 日アクセス可能)
6. 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
7. 森本 洋. (2010). 日本環境感染学会誌, 25, 8-14
8. 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

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	3／31	(9.7)	16／31	(51.6)
シャワー水	3／8	(37.5)	4／8	(50.0)
カラン水	3／7	(42.9)	5／7	(71.4)

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	28	5	4
10～99	3	3	2
100以上	0	0	1
計	31	8	7

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		
	SG 2		1	1
	SG 4	1		
	SG 6		1	1
	SG 8		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	+	7	18	25
	—	2	19	21
		9	37	46