

# レジオネラ属菌の衛生管理に関する研究

## Study on the Status of Pollution by *Legionella* Species in Hot Springs.

佐々木美江 高橋 恵美 三品 道子\*<sup>1</sup>  
畠山 敬 上村 弘 谷津 壽郎  
齋藤 紀行

Mie SASAKI, Emi TAKAHASHI, Michiko MISHINA  
Takashi HATAKEYAMA, Hiroshi UEMURA, Juro YATSU  
Noriyuki SAITO

循環系統を持たない掛け流し式温泉 11 施設についてレジオネラ属菌の検索を行い、注湯口 (18%)、浴槽 (32%) から検出され、循環式浴槽施設と同様に汚染されていることが判明した。菌が検出された要因としては源泉温度が 50℃ 前後と低いことが挙げられ、汚染防止対策にはボイラー等による加熱 (60℃ 以上) が必要であると考えられた。また、レジオネラ属菌の迅速測定法であるリアルタイム PCR 法や LAMP 法は、培養法と強い相関を示し、衛生指導における有用な検査法であると思われた。

キーワード：レジオネラ；リアルタイム PCR 法；LAMP 法；温泉

**Key words** : *Legionella* ; real-time PCR ; LAMP ; hot spring

### 1 はじめに

浴用施設は、給湯方法により循環式および掛け流し式の 2 つに大分される。循環式浴槽施設は、ろ過器、熱交換器等の循環系統が微生物増殖の場となりやすいため、現在までレジオネラ症集団感染事例が多く報告されている。これを受けて厚生労働省は平成 13 年以降レジオネラ症発生防止対策を通知し、浴用施設における衛生指導の強化を図っている<sup>1) 2)</sup>。その結果、循環式浴槽施設については、浴槽水の消毒や清掃への意識が高まり、多くの施設でレジオネラ属菌を中心とした病原微生物対策が実施されている。

しかし、循環系統を持たない掛け流し式温泉は、一般に安全であると考えられているために、調査がほとんど実施されておらず、循環式浴槽施設と同様の調査が必要であるとされていた。

また、レジオネラ症感染防止には浴槽水に増殖するレジオネラ属菌の管理が重要であり、浴槽水中のレジオネラ属菌の有無と菌数を把握して排除する必要がある。しかし、現在の検査法である培養法は、結果が得られるまで 7~10 日を要するため、リアルタイムに浴槽水中の菌数を把握することは困難であることから、レジオネラ属菌汚染の有無を短時間で推定する方法の開発が求められている。

そこで、今回、掛け流し式温泉の病原微生物汚染の実態を調査し、さらに汚染の要因を明らかにして、衛生管理方法の検討を行った。

また、遺伝子増幅を利用したレジオネラ属菌の迅速測定法についても検討した。

### 2 対象および検査方法

#### 2.1 調査期間

平成 18 年 7 月から 11 月に採水した検体で調査を実施した。

#### 2.2 実態調査

循環系統を持たない掛け流し式温泉 11 施設の注湯口および浴槽のそれぞれ 11 件についてレジオネラ属菌、その他の病原微生物 (抗酸菌、アメーバ) および従属栄養細菌の調査を実施した。

レジオネラ属菌の検査方法は検水 200ml を遠心 (6,000G, 10 分間) し 2 ml に濃縮した後に、加温処理した試料 100 $\mu$ l を GVPC 培地 (極東) に塗抹培養し、分離された菌を同定した。抗酸菌は 100 倍濃縮後にアルカリ処理した試料 100 $\mu$ l を 2% 小川培地に塗布し、8 週間観察した。アメーバはレジオネラ症防止対策マニュアル<sup>3)</sup> に準じて検査を行い、採水時に水温、残留塩素濃度を測定した。また、施設設備によるレジオネラ属菌検出状況を検討するために、浴槽の材質を調査した。

#### 2.3 掛け流し式温泉における汚染源の推定と衛生管理方法の模索

実態調査で注湯口と浴槽からレジオネラ属菌が検出された 1 施設を対象とし、源泉から浴槽に至るまでの数ヶ所で採水して、レジオネラ属菌の検出を行い汚染箇所の特定を行った。検査方法は実態調査と同様に実施した。

#### 2.4 遺伝子迅速測定法

レジオネラ属菌の遺伝子測定法は、温泉を含む公衆浴場の浴槽水 59 件を対象とし、リアルタイム PCR 法および LAMP 法、培養法を実施して検出菌数を比較した。

リアルタイム PCR 試薬は市販の TAKARA Cycleave PCR Legionella Detection Kit を用い、試薬の専用機器である

\* 1 現 宮城県拓桃医療療育センター

Smart Cycler (タカラバイオ) で、5SrRNA 遺伝子配列を標的としレジオネラ属菌の特定遺伝子を増幅した。DNA 濃縮・抽出方法は、リアルタイム PCR 試薬の添付書に従い、検水 200 ml を濃縮・抽出して、TE バッファー 10 $\mu$ l で溶解した試液を鋳型とした。

LAMP 法は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E を用い、遺伝子検出を実施した。

### 3 結果および考察

#### 3.1 実態調査

レジオネラ属菌は 11 施設の注湯口 11 件中 2 件 (18%)、浴槽 11 件中 5 件 (32%) から検出され、アメーバはそれぞれ 1 件 (9%)、4 件 (36%) から分離されたが、抗酸菌は検出されなかった。また、レジオネラ属菌が検出されたすべての注湯口、浴槽からアメーバが分離された。

水温はほとんどの施設で 40 $^{\circ}$ C 前後であり、残留塩素は検出されなかった。浴槽の材質では、タイル、石、檜でレジオネラ属菌が検出された。

従属栄養細菌とレジオネラ属菌の検出菌数を比較した結果、従属栄養細菌が 10<sup>4</sup>cfu/ml 以上のときレジオネラ属菌が検出される傾向がみられた (図 1)。

今回の調査の結果、浴槽からのレジオネラ属菌とアメーバの検出率は、前年、当センターで行った掛け流し式温泉の調査結果 (レジオネラ属菌 27%、アメーバ 35%)<sup>4)</sup> と同様であり、掛け流し式温泉からレジオネラ属菌およびアメーバが約 30% 検出されることが再度確認された。また、アメーバが分離された施設では、すべての施設からレジオネラ属菌が検出された。浴槽内においてレジオネラ属菌やアメーバはバイオフィーム中に生息する<sup>5)</sup> ため、掛け流し式温泉においても同様にレジオネラ属菌とアメーバがバイオフィーム内に生息していたと考えられる。

更に、レジオネラ属菌が注湯口から検出された 2 施設では、浴槽からも菌が分離された。この両施設は源泉温度が 50 $^{\circ}$ C 以下であることから、改善のためには定期的な配管の清掃および源泉の加熱などの措置を講ずる必要があると思われる。

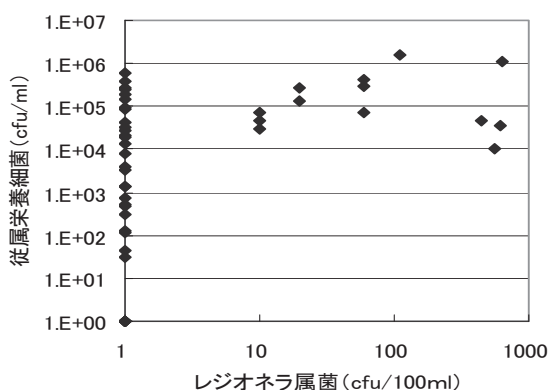


図 1 レジオネラ属菌と従属栄養細菌の相関

#### 3.2 掛け流し式温泉における汚染源の推定と衛生管理方法の模索

調査結果を表 1 に示した。

平成 18 年 7 月の調査では浴槽①よりレジオネラ属菌が、2,120cfu/100ml 検出されたため、その対策として 8 月に高圧洗浄による配管清掃を行った。翌日の検査では浴槽①では 400cfu/100ml まで菌数が減少しており、浴槽②と源泉から貯湯タンクに至るまでのエア抜きタンク 2ヶ所からは菌が検出されなかった。

そこで、配管清掃の約 2 ヶ月後に再度調査を実施すると、源泉からは菌が検出されなかったものの前回の調査で陰性であったエア抜きタンク①から 180cfu/100ml、エア抜きタンク②から 220cfu/100ml、貯湯タンクでは 60cfu/100ml と源泉より施設に至る配管のすべてからレジオネラ属菌が検出され、更に浴槽①、②からもそれぞれ 10cfu/100ml、90cfu/100ml と再度、菌が検出された。

このため、急遽、配管洗浄を行いレジオネラ属菌の再確認を行った結果、浴槽①、②から菌は検出されなかった。

対象施設は源泉温度が 43 $^{\circ}$ C と低く、源泉から浴槽までの配管の長さが約 330 m と長いことに加え、配管の途中には 2 箇所にエア抜きタンクが設置してあるため、源泉から貯湯タンクに引湯する課程での汚染が考えられた。配管洗浄の一時的な効果は認められたが、清掃 2 ヶ月後には、再び源泉を除くエア抜きタンク、貯湯タンク、注湯口、浴槽のすべてからレジオネラ属菌が検出されたことから、これより短い間隔での配管清掃が当該施設には必要であると考えられた。

表 1 レジオネラ属菌の経時変化

検査日	7月25日	8月29日	10月17日
浴槽① (cfu/100ml)	2,120	400	10
浴槽② (cfu/100ml)	ND	<10	90
エア抜きタンク① (cfu/100ml)	ND	<10	180
エア抜きタンク② (cfu/100ml)	ND	<10	220

ND : Not Detect

#### 3.3 遺伝子迅速測定

レジオネラ属菌は、培養法では 68 浴槽中 23 浴槽 (34%)、リアルタイム PCR 法では 26 浴槽 (38%)、LAMP 法では 23 浴槽 (34%) で陽性となり、リアルタイム PCR 法および LAMP 法は培養法と同等かまたは高い陽性率を示した。PCR 法は標的とする遺伝子の種類によっては死菌でも生菌と同じ挙動を示すことが知られており、死菌を同時に検出している可能性があるため、レジオネラ属菌の検査として用いる場合にはこの点を考慮する必要があると考えられた。

一方、菌が検出された浴槽について培養法とリアルタイム PCR 法で換算した菌数を比較し、その結果を図 2

に示した。両者間には強い相関 ( $P < 0.01$ ) が認められたが、培養法の方が高い傾向を示した。

一般的に遺伝子を検出するリアルタイム PCR 法の方が培養法より高くなると考えられるが、今回の調査では、予測していた結果と異なった。これは、温泉水の成分中に PCR の反応を阻害する物質が存在した可能性もあるため、今後、更に泉質等も含めた検討が必要であると思われる。

しかし、一時的な消毒効果を期待して消毒剤を浴槽に投入した直後であっても遺伝子検出は可能なこと、また衛生指導後の陰性確認が短時間で可能なことから、衛生指導においては有用な検査法であると思われる。

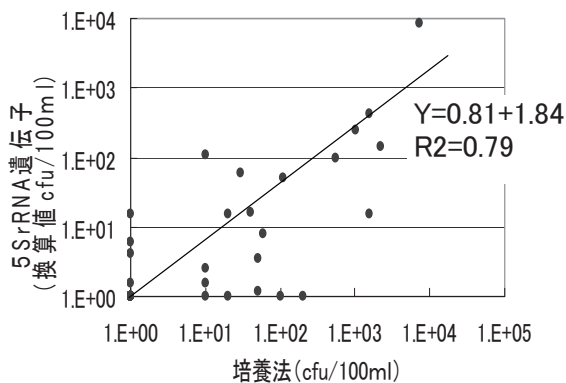


図2 培養法とリアルタイム PCR 法の相関

#### 4 まとめ

循環式浴槽施設を原因としたレジオネラ症集団発生で、循環システムのろ材やタンク水から患者の菌株と同一の遺伝子パターンを示すレジオネラ属菌が検出されたと報告<sup>6)</sup>されている。このように浴槽における循環システムはレジオネラ属菌などの病原微生物の生息場所となるため、衛生的に管理するためには適正な消毒とバイオフィームの定期的な除去が重要<sup>7)</sup>となる。一方、安全だと思われていた循環システムをもたない掛け流し式温泉からもレジオネラ属菌や抗酸菌、アメーバが分離され<sup>4)</sup>、全国249箇所の掛け流し式浴槽の27.3%からレジオネラ属菌が検出されていることから循環式浴槽施設と同様に対策が必要である。掛け流し式温泉は、泉質や湯量が様々なことから塩素消毒を行わないところが多く<sup>8)</sup>、今回の

対象施設も塩素による消毒が行われていなかった。

現在までの厚生労働省からの通知では、塩素消毒を用いた管理方法が中心となっているが、塩素管理下では *Legionella pneumophila* 血清群1が浴槽水中で優勢化しているとの報告<sup>9)</sup>もあることから、塩素消毒に頼らない管理方法を早期に確立することが必要である。

更に、施設ごとに設備構造が異なり各施設にあった衛生管理を行うことが重要であることから、レジオネラ属菌の迅速測定法により営業者に有用な情報を提供して適切な施設管理が行えるように努めたい。

#### 謝辞

調査に協力いただいた大崎保健所、仙南保健所の関係者の皆様に感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省健康局生活衛生課長通知“循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルについて”平成13年9月11日健衛発第95号(2003)
- 2) 厚生労働省告示第264号(2003)“レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針”平成15年7月25日
- 3) “新版レジオネラ症防止指針”，厚生省生活衛生課監修，p95(2000)，(財団法人 ビル管理教育センター)
- 4) 佐々木美江：掛け流し式温泉における微生物生息状況，宮城県保健環境センター年報(2006)
- 5) 八木田 健司，泉山 信司，遠藤 卓郎：水環境学会誌，26，(2003)
- 6) 岡田美香：循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I 発生状況と環境調査，感染症学雑誌，79，365(2005)
- 7) 小川正晃：“レジオネラ感染症ハンドブック”，齋藤厚編，p231(2007)，(日本医事新報社)
- 8) 井上博雄：厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究 平成17年度～平成18年度 総合研究報告書，2007，7。
- 9) 倉文明：厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究 平成17年度 総括・分担研究報告書，2006，49。