

資 料

浴槽水中のレジオネラ属菌検出状況

榊 美代子 小山 基* 平井 三昭* 小田佐知子** 松田 政明**

Isolation of Legionellae in Public Bath Waters

Miyoko Sakaki, Motoi Koyama*, Mitsuaki Hirai*, Sachiko Oda** and Masaaki Matsuda**

(Received Oct. 29, 1997)

緒 言

レジオネラ属菌は自然環境の土壌や淡水中に本来生息しているが、たまたまミストや土埃等を介してヒトの生活環境に持ち込まれる。特にビルの冷却塔や給湯システム等の水中で増殖し、ヒトにレジオネラ症を発生させている[1]。近年、温泉水が原因とされる発症例や、24時間風呂のレジオネラ汚染が明らかになり、身近なところでのレジオネラ症の発生が懸念されている[2-5]。そこで我々は県内東部ブロック5カ所の保健所環境課事及び試験検査担当者と協力し、公衆浴場等の浴槽水についてレジオネラ属菌の生息状況を調査したのでその結果を報告する。

材料および方法

1. 調査材料

調査地点を図1に示した。

1996年11月19日から20日に、公衆浴場、旅館および公共福祉施設を対象に5カ所の保健所・支所（竹原、三原、尾道、府中、福山）管内の各10施設計50カ所について現地での聴き取り（表1）および浴槽水（一部原水を含む）の採取をした。容器は、レジオネラ属菌検出用に1ℓ滅菌容器（滅菌前にチオ硫酸ナトリウムを50mg加）を、水質検査用として細菌検査用100ml、化学検査用500mlを使用した。

表1 調査票

浴槽水中のレジオネラの生息調査票

調査年月日	年 月 日	調査者	立会者
施設名	所在地		
設置者氏名	住所		
種類	旅館（ホテル、旅館、簡宿）公衆浴場（普、特）その他（ ）		
浴槽表面積	主浴槽	ml	換気 湯気抜窓、換気扇、その他（ ）
の水源の種類	温泉（類） 井戸水、水道水、その他（ ）		
概要	受水槽の有無	有（ m ² 材質～ FRP ）	無
	の清掃	平成 年 月 日	
濾過器の有無	有（ ） 無	給湯温度（最高）	℃
消毒	有（ ） 無	水質検査状況（原水、浴槽水）	平成 年 月
利用人数	/日	清掃回数	/月
換水期間（給湯機メンテナンス）	日		
採 水 状 況			
採水時間	採水場所	浴槽 蛇口	水温 ℃
残留塩素			
備考	最近の換水日・入浴剤の使用・入浴営業時間		

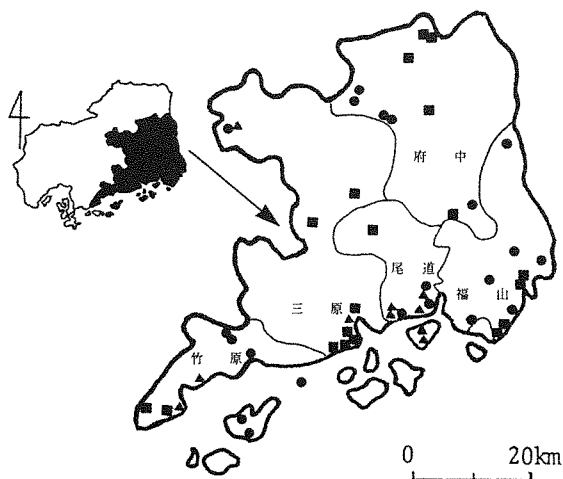


図1 調査地点

- ：温泉水（水道水との混用を含む）
- ：井戸水、海水
- ▲：水道水（井戸水との混用を含む）

* 広島県三原保健所尾道支所：Hiroshima Prefectural Mihara Community Health Center, Onomichi Branch Office

** 広島県福山保健所府中支所：Hiroshima Prefectural Fukuyama Community Health Center, Fuchuu Branch Office

2. レジオネラ属菌の検出

検査手順は上水試験法に準じて図2に従った[6]. 培地はWYO α , BCYE α 寒天培地(栄研化学)を, 免疫血清はデンカ生研製を使用した.

3. PCR法による検出

プライマーと増幅塩基数は, *L. pneumophila*には市販品LPN-101, LPN-102 (Genemed Biotechnologies) 700bp, レジオネラ属にはPT87 (5'-GGCGACTATAGCGATTTGGAA-3'), PT163 (5'-GCGATGACCTACTTTCGCATGA-3') 108bpを受託合成し使用した[7,8]. 反応液は10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.5 μ M Primerからなり, これに1.5U *Taq* DNAポリメラーゼ (Takara) と加熱処理菌液の遠心上清を加えて混合し, ミネラルオイルを重層した. 増幅反応はアステックPC-700を用いて, 温度サイクル条件を94 $^{\circ}$ Cで30秒, 55 $^{\circ}$ Cで45秒, 72 $^{\circ}$ Cで1分とし25回繰り返し行った. 増幅断片は, 2%アガーローズゲル電気泳動により, あらかじめ0.5xTBE bufferに0.3mg/mlになるようにエチジウムブロマイドを加えて染色を並行して行った. 検出はトランスイルミネーター (312nm) によった.

4. 浴槽水の水質検査

濁度 (標準系列透視比濁法), 過マンガン酸カリウム消費量 (滴定法), 大腸菌群 (デソ法), pH (ガラ

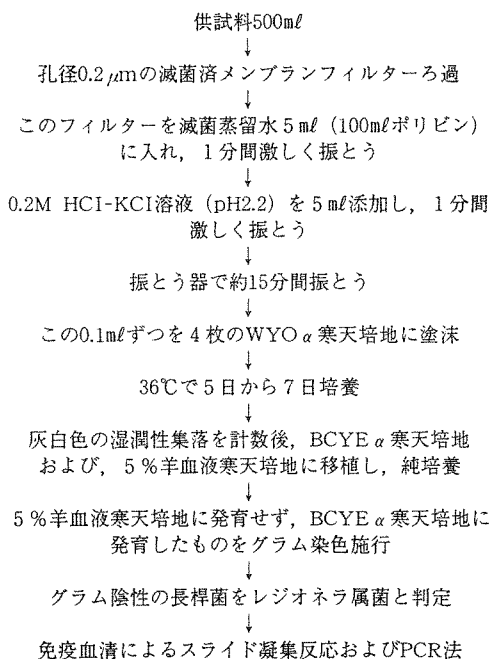


図2 レジオネラ属菌の検査手順

ス電極pH計) および残留塩素 (OT法) の項目について衛生試験法に準じて行った[9]. 残留塩素は現地測定した.

結果及び考察

1. レジオネラ属菌検出状況 (表2)

調査施設50件のうち温泉水を利用しているのは22件 (うち水道水との混用1件) で泉種は殆どが放射能泉 (旧名) であった. 他の水源としては, 井戸水, 水道水, 両者の混用と海水であった. 菌を検出した施設は温泉水では14件 (63.6%) その他の水源では18件 (64.3%) で全体では32件 (64%) であった. しかし, 蛇口から採取されていた原水7件を除くと, 浴槽水からの検出率は74.4% (32/43) となった. これらの生菌数についてレジオネラ症防止指針[10]で示された望ましい範囲を超えた試料は20件 (40%) であった. うち菌数が最も高く要緊急処置範囲になったのは200,000CFU/100mlの10⁵台1件で, 次に要注意範囲の10⁴台1件と10³台が13件で多く, 要観察範囲の10²台5件であった. 検出限界は50倍濃縮試料0.1mlずつを塗抹したプレート4枚を計数したので, 5CFU/100ml未満になった (図3).

要緊急処置範囲になった施設の改善指導を所轄の保健所で実施し, 1997年1月に再度レジオネラ属菌の検査を行った. その結果, 菌は再び検出されたものの10²台に減少した. さらに1カ月後の検査では, 陰性になった. 主な指導内容は, 浴槽の清掃と換水期間の短縮, ろ過器のフィルター交換清掃, 循環水の塩素消毒及びボイラー設定温度の上昇などであった.

表2 浴槽水のレジオネラ属菌検出状況

水源の種類	試料数	検出数	検出率 (%)
温泉水*	18 (3)	11 (0)	61.1
温泉水*+水道水	1	1	100
温泉水**	2	2	100
温泉水***	1	0	0
小計	22 (3)	14 (0)	63.6
井戸水	17 (2)	8 (0)	47.1
水道水+井戸水	2	2	100
水道水	8 (2)	7 (0)	87.5
海水	1	1	100
小計	28 (4)	18 (0)	64.3
合計	50 (7)	32 (0)	64

()内は原水の数
温泉水泉種(旧名) *:放射能泉, **:塩化物泉, ***硫黄泉

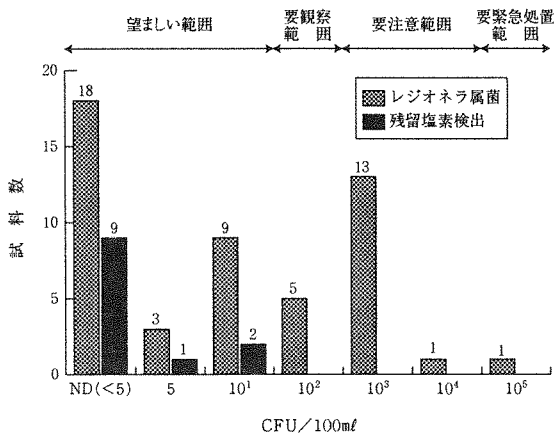


図3 レジオネラ属菌の菌数分布と残留塩素検出試料数

2. レジオネラ属菌の菌種

免疫血清の凝集及びPCR法によって決定された菌種は、166株で施設内の重複を差し引くと53株になった。うち50株(94.3%)が*L. pneumophila*で、その他の3株は*Legionella* spp.までで菌種名は判明しなかった。*L. pneumophila*の血清群(SG)はSG1が最も多く12株次いでSG6, SG5, SG3,4, SG2の順であった。PCR法で*L. pneumophila*と決定したSG1-6以外の血清群は9株であった。菌を検出した32浴槽水のうち単一菌型・血清群は18件で、2菌型、3菌型が分離されたのは7件ずつであった(表3)。この点は冷却塔水から検出されるレジオネラ属菌の殆どが*L. pneumophila* SG1であったのと対照的である[11,12]。今回実施したPCR法(図4)では菌株を用いたため十分なDNA量が得られ、反応条件も各ステップの時間およびサイクル数を短縮して行った。しかし環境水から直接行うときは濃縮操作および反応条件をより感度の良い設定に変更する必要がある[13-15]。

3. 浴槽水の水質

浴槽水43件のうち公衆浴場水質基準[16]に適合したのは38件、不適は5件でその水源は温泉水および海水であった。その内訳は濁度1件(レジオネラ菌数10²CFU/100ml)、KMnO₄消費量2件(同10³CFU/100ml)と大腸菌群2件(同5および10¹CFU/100ml)であった。浴槽水については、適不適にかかわらず菌は検出され、特に要観察範囲の10²CFU/100ml以上検出された20件については大腸菌群は基準以下で関連は認められなかった。また、原水は7件のうち濁度のみが1件基準を超えたが、レジオネラ属菌は検出されなかった。菌陽性試料のpHは6.7から8.6と幅広く、人工培地の至適pHが6.9前後なのに比べ環境中では藻類や原虫との共生関係によって生息できるものと思われ

表3 浴槽水から検出されたレジオネラ属菌の菌種

検出菌種 血清群	株数(%)	単一菌型 血清群	2菌型	3菌型
<i>L. pneumophila</i>				
1	12 (22.6)	5	3	4
2	3 (5.7)		2	1
3	4 (7.5)	1		3
4	4 (7.5)	2		2
5	8 (15.1)	2	3	3
6	10 (18.9)	5	3	2
1-6以外*	9 (17.0)	(3)***	(2)***	(4)***
<i>Legionella</i> spp.**	3 (5.7)		(1)***	(2)***
計	53 (100.0)	18	14(7施設)	21(7施設)

* : 抗血清に非凝集でPCR法*L. pneumophila* (+)

** : / *L. pneumophila* (-), *Legionella* spp. (+)

*** : 単一とは限らないがカウントした

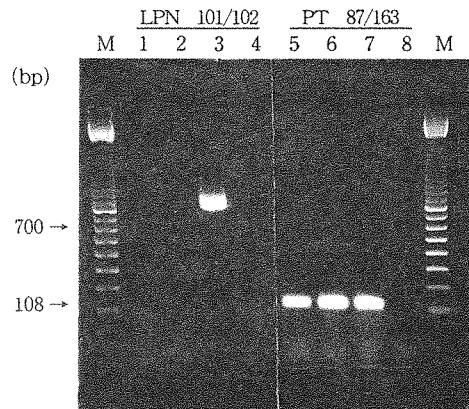


図4 PCR法によるレジオネラ属菌の検出

レーン M : DNA分子量マーカー
 1, 5 : 参考株 *L. bozemanii*
 2, 6 : 分離株 *Legionella*
 3, 7 : 分離株 *L. pneumophila*
 4, 8 : 陰性対照

る[17,18]。残留塩素については、浴槽水で23.3%(10/43)検出された。そのうち菌を分離したのは3件で、菌数は10²CFU/100ml未満であった。菌を分離した32件中残る29件の菌数は望ましい範囲を超える10²CFU/100ml以上でいずれも残留塩素不検出であった。

4. 聞き取り調査

レジオネラ属菌を10²CFU/100ml以上検出した施設について聞き取り調査のなかから関連のあった事項は、1)ろ過器を設置、2)換水期間が11日を超過、3)浴槽の規模は10m³以上、4)利用人数は100人以

上/日などであった。

これらの結果からレジオネラ属菌がおもに生息しているのは、ろ過器を経由する循環過程で、長期の換水期間、大きな浴槽、多人数の利用などの要因がろ過器に負担をかけているものと考えられる。菌数を望ましい範囲の 10^2 CFU/100ml未満にコントロールするためには、換水期間を短く(今回の調査では10日以内)および塩素消毒により残留塩素濃度の管理を行うなどの対策が必要である。

結 語

1. 浴槽水のレジオネラ属菌検出状況は74.4% (32/43)と高率であった。
2. 検出菌量は 10^3 CFU/100mlが40.6% (13/32)で多く、 10^4 および 10^5 CFU/100mlについても3.1% (1/32)ずつ認められた。
3. 検出菌種は、*L. pneumophila*が94.3% (50/53)を占めた。その血清群はSG1が最も多く22.6%次いでSG6が18.9%、SG5が15.1%、SG3、4共に7.5%、SG2の5.7%の順であった。単一菌型・血清群を検出したのは56.3% (18/32)で、他は1施設で2から3菌型混在していた。
4. 菌数の高かった試料は浴槽水基準に適合しており、これらの水質検査項目はレジオネラ属菌生息状況を把握する目安になり難かった。
5. 菌数が 10^2 CFU/100ml以上の試料が40% (20/50)あったが、全て残留塩素が不検出であったことから原水及びろ過器の適切な維持管理が望まれる。

おわりに、現地での聴き取り、試料の採取、水質検査など調査にご協力戴いた東部ブロック保健所環境薬事ならびに試験検査担当各位に深謝いたします。

文 献

- [1]厚生省レジオネラ研究班 (1992): 培養陽性本邦レジオネラ肺炎症例について、1980年から1990年まで。感染症誌, 66, 1513-1523.
- [2]真柴晃一, 浜本龍生, 鳥飼勝隆 (1993): 温泉水の誤燕により発生したと考えられるレジオネラ肺炎の1例。感染症誌, 67, 163-166.
- [3]宮本比呂志, 吉田真一, 藪内英子 (1996): 温泉浴槽内溺水後の肺炎患者から分離された*Legionella pneumophila* SG3とその患者が溺れた浴槽水より分離された菌株との分子疫学的解析。日細菌誌, 51, 157.

- [4]藪内英子 (1996): 温泉浴槽水とレジオネラ属菌。Medical Technology, 24, 1259-1261.
- [5]李 那, 青山透, 堀 弘, 江崎孝行 (1997): 24時間循環風呂のレジオネラ汚染とその感染防止対策。感染症誌, 71, 763-769.
- [6]日本水道協会編 (1993): 上水試験方法, 東京, 日本水道協会.
- [7]Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Miller, R., Haff, L., DiCesare, J. and Atlas, R.M. (1990): Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Mol. Cell. Probes, 4, 175-187.
- [8]Maiwald.M., Ditton, H.-J., Sonntag, H.-G. and von Knebel Doeberitz, M. (1994): Characterization of contaminating DNA in Tag polymerase which occurs during amplification with a primer set for *Legionella* 5S ribosomal RNA. Mol. Cell. Probes, 8, 11-14.
- [9]日本薬学会編 (1990): 衛生試験法・注解, 東京, 金平出版.
- [10]厚生省生活衛生局企画課監修 (1994): レジオネラ症防止指針, 東京, ビル管理教育センター.
- [11]藪内英子 (1987): XI. *Legionella*, 医学細菌学 2巻, P.365-442, 東京, 葉根出版.
- [12]榊 美代子 (1988): 冷却塔水からの*Legionella*属菌検出状況. 広島県衛研研究報告, 35, 7-11.
- [13]山本啓之 (1992): PCR法による*Legionella*属細菌の検出・同定, 日本臨床50巻特別号, P.394-399, 日本臨床社.
- [14]Miller, L.A., Beebe, J.L., Butler, J.C., Martin, W., Benson, R., Hoffman, R.E. and Filds, B.S. (1993): Use of Polymerase Chain Reaction in an Epidemiologic Investigation of Pontiac Fever. J.Infect. Dis., 168, 769-772.
- [15]Miyanoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T. and Yoshida, S. (1997): Development of a new seminestid PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. Appl. Environ. Microbiol., 63, 2489-2494.
- [16]厚生省生活衛生局長通知 (1986): 公衆浴場における水質等に関する基準について.
- [17]藪内英子 (1996): レジオネラ症の現況と対策. モダンメディア, 42, 20-26.
- [18]遠藤卓朗, 八木田健司, 藪内英子 (1997): 家庭用24時間風呂より検出されたレジオネラ属菌の宿主アメーバ類について. 感染症誌, 71, 臨時増刊号, 86.