

温泉水を原料としたミネラルウォーターへの *L. pneumophila* 混入事例

上野伸広 吉國謙一郎 新川奈緒美
有馬忠行 榎元磨加* 永田告治

要 旨

平成12年1月、鹿児島県内の業者が製造したミネラルウォーターから *Legionella pneumophila* が検出された。ミネラルウォーターから同菌が検出された前例はないため、関係機関と連携を取りながら原因究明を行った。調査は当該製品をはじめとし、製造工程や汚染経路に関する拭き取り、フィルター、土壤等のレジオネラ属菌について、フィルター濾過、酸処理を行う方法で実施した。その結果、温泉原水からはレジオネラ属菌は検出されなかったが、製造工程で侵入した同菌とアメーバが加熱殺菌後の製造過程で増殖し、製品へ混入したものと推定された。

キーワード：レジオネラ属菌、ミネラルウォーター、温泉水、混入事例

1 はじめに

レジオネラ属菌は環境中に広く分布し、ビルの冷却塔、公衆浴場および温泉の浴槽水や家庭の24時間風呂等からの検出事例について、多くの報告がなされている。しかし、清涼飲料水を含むミネラルウォーターからの検出事例は報告がない。

今回、消費者からの苦情品として東京都立衛生研究所に持ち込まれた鹿児島県内で製造されたミネラルウォーターより *Legionella pneumophila* 3群が検出されたことから、製造工程等について原因究明調査行われた。

そこで、本誌では主に検査方法とその結果について報告する。詳細については、管轄保健所作成の報告書¹⁾によって報告されている。

2 材料と方法

2.1 材料

当初、当該製品を検体として検査を実施したが、製造工程や汚染経路の調査にあたり、拭き取り・フィルター・土壤等これまで経験のない検査材料について試験検査

を行った。

材料の採取方法と試験に供した検体を以下に示す。

- ① 製品：未開封品を混和後1Lを供した。
- ② 拭き取り：滅菌綿球で拭き取ったものを10mlの滅菌蒸留水中に浸し、混和後、全量を供した。
- ③ フィルター：大型ビニール袋を3重にし、フィルターを滅菌蒸留水2Lで浸し、フィルター細部のバイオフィームを取るため、良く混和後1Lを供した。
- ④ 土壤：乾燥していたため、深さ数十センチの部分について約1kgをビニール袋に採取した。土壤100gを滅菌蒸留水900mlに混和後、桐山ロート(No. 5A)で濾過し、その500mlを試験に供した。
- ⑤ 源泉水・井戸水：地下よりポンプアップした水を適当量採取し、その1Lを試験に供した。
- ⑥ 各種タンク水：タンク下部のドレインより適当量採取し、その1Lを試験に供した。
- ⑦ リーク水：製造ラインから漏れた溜まり水を全量採取し、その500mlを試験に供した。

2. 2 方法

当所で通常行っているフィルター濾過、酸処理の方法で実施したので、その概要を以下に示す。

なお、使用した培地 WY0- α , BCYE- α , 血液寒天 (馬) はすべて市販の生培地を使用した。

- ① フィルター濾過 (ポアサイズ0.2 μ m, TYPE GTTP)
- ② 5mlの滅菌蒸留水で激しく振盪
- ③ 1mlに分取し、等量の0.2MHC1-KC1溶液(pH2.2)添加
- ④ 混和、15分静置
- ⑤ WY0- α 6枚に10倍希釈0.1, 0.2, 0.2ml, 原液0.1, 0.2, 0.2mlコンラージで広げ、湿潤箱、37 $^{\circ}$ C培養
- ⑥ 3日目：発育集落のチェック (レジオネラ否定)
- ⑦ 4日目以降：レジオネラ様集落数の計測
- ⑧ レジオネラ様集落 (1検体10集落) をBCYE- α , 血液寒天へ、湿潤箱、37 $^{\circ}$ C24~48時間培養
- ⑨ BCYE- α (+), 血液寒天(-)のものについて、血清反応、グラム染色、PCR (レジオネラ属用) で確認
- ⑩ 菌数算出

今回分離された*Legionella pneumophila* 3群は比較的発育が早く、4日目には集落が確認でき、5日目以降その数に変化はなかった。

3 結果

3. 1 苦情製品の検査結果

東京都の苦情主の自宅に残っていた未開封の製品20L (平成11年12月3日製造) について、東京都立衛生研究所で調査した結果、*Legionella pneumophila* 3群(16CFU/100ml)を検出したとの報告を受けた。そこで、製造業者に残っていた5製品について検査を行った。

その結果を表1に示した。

このことから、管轄保健所は製造業者に対し、同菌を検出した製品の回収命令と以前製造した製品についての自主回収を指示するとともに、製造自粛を要請した。

表2に自主回収製品について検査した結果を示した。表2のとおり、少なくとも平成11年7月28日の時点で、当該製品はすでにレジオネラ属菌に汚染していたことが

表1 苦情製品の検査結果(平成12年1月17日判明)

検体名	レジオネラ属菌*
H11.12.2 製造製品 500ml	63 CFU/100ml
H11.12.24 製造製品 20L	41 CFU/100ml
H11.12.28 製造製品 20L	47 CFU/100ml
H12.1.6 製造開始時製品 20L	67 CFU/100ml
〃 製造終了時製品 20L	38 CFU/100ml

*検出されたレジオネラ属菌はすべて*L. pneumophila* 3群

表2 回収された製品の検査結果

検体名	レジオネラ属菌*
H11.7.28 製造製品 20L	6.2 \times 10 ⁴ CFU/100ml
H11.8.2 製造製品 20L	1.1 \times 10 ⁴ CFU/100ml
H11.8.26 製造製品 20L	1.5 \times 10 ³ CFU/100ml
H11.9.17 製造製品 20L	3.6 \times 10 ⁴ CFU/100ml
H11.10.14 製造製品 20L	1.1 \times 10 ⁴ CFU/100ml
H11.10.28 製造製品 20L	3.3 \times 10 ⁴ CFU/100ml
H11.11.12 製造製品 20L	3.4 \times 10 ⁴ CFU/100ml
H11.11.25 製造製品 20L	3.8 \times 10 ² CFU/100ml

*検出されたレジオネラ属菌はすべて*L. pneumophila* 3群

判明した。

さらに、製造日が古いものほど、その汚染菌数が多い傾向が伺えた。

3. 2 製造工程関連の調査

表3に製造工程関連の調査結果を、図1にそのフローチャートを示した。

レジオネラ属菌による汚染は、加熱処理後の処理水タンク以降で起きていることを確認した。最も汚染の著しい箇所は、処理水タンク後の0.5 μ mフィルターと20L充填用の0.2 μ mフィルターであった。

これらの結果により汚染箇所は判明したが、レジオネラ属菌の侵入箇所を特定するため、環境材料や外部との開口部を中心に追加調査を実施した。

その結果を表4に示した。充填室内排水溝付近では、同じ血清型のレジオネラ属菌が検出された。しかし、製造水からの流出と考えられることから、汚染経路については明確にすることができなかった。

なお、今回の方法での土壌の検査は、困難を極めた。前処理の酸処理、加熱処理ともに土壌細菌(真菌)を死滅させることができず、やむなく10²~10³に希釈した平板での判定となった。後日、感染研より土壌のレジオネラ属菌の検査方法²⁾についてご指導頂き、陰性を確認した。

以下にその方法を示す。

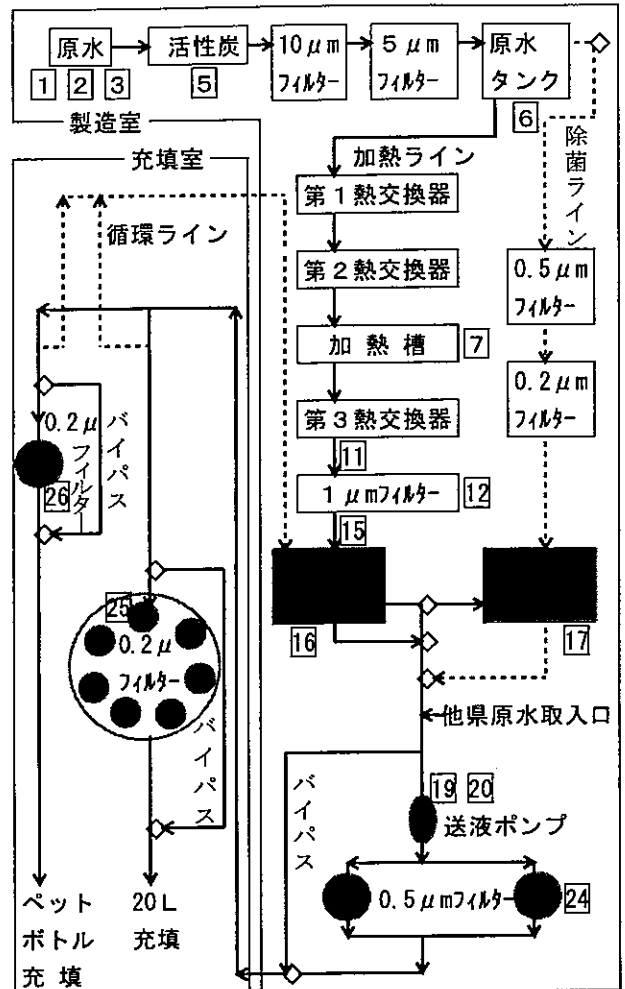
- ① 試料50gを三角フラスコにとり、滅菌水150mlを加え、30分間激しく振盪。
 - ② 約10分間静置、大きい粒子を沈殿させる。
 - ③ 浮遊液1mlに等量のpH2.2溶液を加え、15分処理。
 - ④ その0.1mlを抗真菌剤pimaricin(natamycin)250mg/mlを含むMWY培地に塗布、37 $^{\circ}$ C培養。
- または、アメーバ増菌法。
- ②の後、上清を別の三角フラスコに移し、37 $^{\circ}$ C 2-3ヶ月培養後、検査に供する。

表3 製造工程関連レジオネラ属菌検査結果

番号	検体名	採取形態	レジオネラ属菌*
1	原水(H12. 1. 6採取) ^{2) 5)}	水	検出限界未満
2	原水(H12. 1. 20採取) ⁵⁾	水	検出限界未満
3	原水(H12. 2. 4採取) ^{3) 5)}	水	検出限界未満
4	井戸水 ⁵⁾	水	検出限界未満
5	活性炭処理後の水 ⁵⁾	水	検出限界未満
6	原水タンクの水 ⁵⁾	水	検出限界未満
7	加熱殺菌直後の水 ⁵⁾	水	検出限界未満
8	加熱タンク上部のヘパフィルター	拭き取り	0 ¹⁾
9	加熱熱交換器ボイラー水(飲水処理後) ⁵⁾	水	検出限界未満
10	第2熱交換器ボイラー管バルブのリーク水 ⁶⁾	水	検出限界未満
11	加熱直後1μmフィルター入口配管	拭き取り	0 ¹⁾
12	加熱直後1μmフィルター	フィルター ⁴⁾	検出限界未満
13	1μmフィルター(新品)	フィルター ⁴⁾	検出限界未満
14	加熱直後1μmフィルターハウジング内の水 ⁶⁾	水	検出限界未満
15	加熱直後1μmフィルター出口配管	拭き取り	0 ¹⁾
16	処理水タンク1内の水	水	10
17	処理水タンク2内の水	水	20
18	処理水タンク1上部のヘパフィルター	拭き取り	0 ¹⁾
19	処理水タンク1後の送液ポンプ内の水	水	8.5×10 ²
20	処理水タンク1後の送液ポンプ内	拭き取り	2 ¹⁾
21	処理水循環ライン配管内	拭き取り	0 ¹⁾
22	処理水タンク2の上部換気扇配管内	拭き取り	0 ¹⁾
23	処理水タンク1と2のバイパス配管内	拭き取り	15 ¹⁾
24	処理水タンク後0.5μmフィルター	フィルター ⁴⁾	1.3×10 ⁴ ¹⁾
25	20L充填用0.2μmフィルター	フィルター ⁴⁾	2.2×10 ⁴ ¹⁾
26	ペットボトル充填用0.2μmフィルター	フィルター ⁴⁾	2.8×10 ² ¹⁾
27	ペットボトルリンス用2μmフィルター	フィルター ⁴⁾	3.1×10 ³ ¹⁾
28	ペットボトル充填口内部	拭き取り	0 ¹⁾
29	20L充填口内部	拭き取り	0 ¹⁾
30	ペットボトルリンス用ノズル先端	拭き取り	0 ¹⁾
31	除菌ライン0.5μmフィルターハウジング内部	拭き取り	0 ¹⁾
32	他県(H11. 11. 8製造)の原水 ⁵⁾	水	検出限界未満

*検出されたレジオネラ属菌はすべて *L. pneumophila* 3群

- 拭き取り及びフィルターの検査結果は、検出された集落数を計上した。
- 採取後4日間冷蔵保存後検査開始した。
- 採取後3日間室温保存後検査開始した。
- 2Lの滅菌蒸留水でよく洗い、その洗い水1Lを試験供与した。
- 被検水量は1Lで、検出限界は5CFU/100mlである。
- 被検水量は500mlで、検出限界は10CFU/100mlである。



◇: 手動バルブ, 図中● 部分とは同菌検出

図中の囲み番号は表3に対応

図1 製造工程フローチャート

表4 レジオネラ属菌追加調査結果(環境関係)

番号	検体名	採取形態	レジオネラ属菌
33	泉源東側の土壌	土壌	検出限界未満
34	泉源北側の土壌	土壌	検出限界未満
35	製造所前の排水溝	拭き取り	0 ¹⁾
36	製造所裏の排水溝	拭き取り	0 ¹⁾
37	製造室内換気扇の羽根	拭き取り	0 ¹⁾
38	充填室内換気扇の羽根	拭き取り	0 ¹⁾
39	充填室空調設備フィルター	拭き取り	0 ¹⁾
40	充填室空調設備フィルター	フィルター ²⁾	検出限界未満
41	充填室空調設備外機のドレインパイプ	拭き取り	0 ¹⁾
42	製造室内排水溝出口瓶	拭き取り	0 ¹⁾
43	充填室内排水溝出口瓶	拭き取り	1 ¹⁾
44	製造室コンプレッサのドレイン水	水	検出限界未満

- 拭き取り及びフィルターの検査結果は、検出された集落数を計上した。

表5 アメーバの検査結果 (国立感染症研究所で実施)

検体名	結果
処理水タンク1の水	検出せず
〃 内壁拭き取り	検出せず
処理水タンク2の水	検出せず
〃 内壁拭き取り	検出せず
0.5μmフィルター振り落とし液	多数のため測定不能
0.2μmフィルター振り落とし液	多数のため測定不能
回収製品 (H11.11.25製造, 20L)	38個/ml
〃 (H11.11.12製造, 20L)	98個/ml
〃 (H11.12.2製造, 500ml)	検出せず
〃 (H12.1.6製造, 20L)	1個/400ml

Hartmannella sp., *Vannella sp.*, *Vexillifera sp.*を検出

3.3 アメーバの検査結果

レジオネラ属菌の増殖には、宿主アメーバの存在が不可欠であることから、回収された製品や製造工程の試料10検体のアメーバ検査を国立感染症研究所に依頼した。

表5の結果とおり、製品中にもアメーバを認めたことから、3.1で述べた製造日が古いものほど、レジオネラ属菌の汚染菌数が多い結果の裏付けとなった。

3.4 フィルターの性能試験

フィルターの濾過性能について、製造工程のレジオネラ属菌調査で検査済みのものを滅菌して実施した。

図2に示す試験系を作り、はじめに系がレジオネラ属菌に汚染されていないか、滅菌水を通し陰性対照とした。その後、濾過前液と濾過後液をそれぞれ10L採取し、その500mlを試験に供した。

なお、加圧ポンプはクリプトスポリジウム検査用のものを使用したため、濾過速度は40秒あたり1Lであった。

表6に示した結果のとおり、20L製品充填用フィルターは、全くその役目を果たしていなかったことに加え、レジオネラ属菌とアメーバの供給ラインとなっていた。

一方、ペットボトル充填用フィルターは、ほぼ濾過精度(90%除菌)どおりであったためか、表5で示したアメーバは、ペットボトルからは検出されなかった。

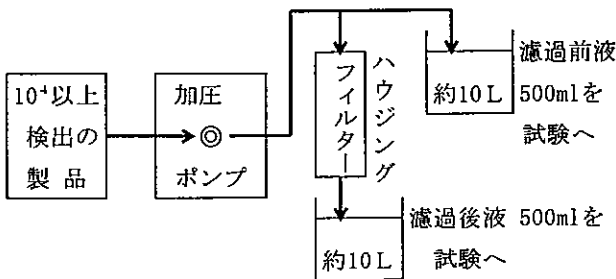


図2 フィルター性能試験系

表6 フィルターの性能試験

検体名 (番号は表3参照)	レジオネラ属菌	
	濾過前	濾過後
25 20L用0.2μmフィルター ¹⁾	2.0×10 ⁴	2.1×10 ⁴
25 〃 ²⁾	1.4×10 ⁴	1.6×10 ⁴
26 ペットボトル用0.2μmフィルター ²⁾	1.5×10 ⁴	2.4×10 ³

1) オートクレープ+ガス滅菌で処理 2) ガス滅菌処理のみ

4 考察及びまとめ

今回の調査では、レジオネラ属菌による製造工程の汚染状況を明確にできたが、汚染経路の調査では原水や環境材料から同菌を検出することはできなかった。今回調べた中で最も製造日の古い製品(平成11年7月28日製造)からも同菌を検出していることから、それより相当以前に、レジオネラ属菌とアメーバの暴露を受けていたと考えられる。こうした長い経過を経てから、汚染経路の解明を行うことの難しさを痛感した事例であった。

一方、レジオネラ属菌は偏性好気性菌で知られているが、今回調査した未開封製品には肉眼的観察では、空気は入っていない。その中で、宿主アメーバとのライフサイクルが成立していた可能性が高いことから、溶存酸素程度でも増殖や生存が可能と考えられた。ちなみに、平成11年12月24日製造の20L製品(調査時:41CFU/100ml)をその後の検査時の陽性対照として使用しているが、平成12年10月の結果は2.5×10³ CFU/100mlであった。この製品は、残量10L位に対し約100ml弱の空気が確認できる程度である。したがって、レジオネラ属菌は一般的に知られている程、偏性好気的ではないと思われた。

なお、今回の事例に伴って、県内で製造中のミネラルウォーター製造業者42社43施設の製品について検査を実施したが、レジオネラ属菌は検出されなかった。

謝 辞

本事例に関して、アメーバ検査を快く引き受けてくださいました国立感染症研究所 寄生動物部室長 遠藤卓郎先生、土壌中のレジオネラ属菌検査方法をご指導くださいました同所 細菌部 倉文明先生に深謝いたします。

参 考

- 1)鹿児島県鹿屋保健所作成：レジオネラ属菌が混入したミネラルウォーター製造施設原因究明検討委員会報告書 平成12年3月15日
- 2)Koide M *et al.* isolation of *Legionella longbeachae* Serogroup 1 from Potting Soils in Japan. Clin Infect Dis 29:943-944, 1999.