

温泉水におけるレジオネラ属菌の生態及び繁殖防止方法に関する調査研究

吉 國 謙一郎 中 山 浩一郎 本 田 俊 郎¹
 石 谷 完 二 新 川 奈緒美 藏 元 強
 川 元 孝 久

1 はじめに

レジオネラ症は、感染症法の届け出義務のある四類感染症に位置づけられており、その病型には肺炎型と感冒様のポンティアック熱型とがある。レジオネラ肺炎の致死率は約15%（レジオネラ研究班の調査）と高く、高齢者や新生児および免疫力の低下をきたす疾患を有する者が本症のリスクグループとされている。

レジオネラ症の原因菌であるレジオネラ属菌は、水中や湿った土壌中等の環境中に広く存在している細菌で、現在48種の菌が同定されており、なかでも*Legionella pneumophila* (L.p) による人への感染報告が多い。

人工環境水（循環式浴槽水、冷却塔水等）では、原虫類（アメーバ等）に寄生して繁殖することも知られている。レジオネラ属菌は、15～43℃で繁殖し、培養環境下では36℃前後で最もよく繁殖する。

1999年の感染症法施行後、本県におけるレジオネラ症の報告数は2000年に2名、2002年に11名、2003年に3名の感染症者が報告されている（感染症発生動向調査事業による）。

近年、温泉施設における患者発生が問題視され、本県においても、2002年8月に循環式浴槽水が原因と推定された集団感染事例、2003年8月には患者及び循環式浴槽水から分離されたL.p SG1が遺伝子解析（PFGE）において一致して、感染源が特定された事例等の温泉水によるレジオネラ感染症者が報告されている。

このことから、本調査研究は、県内の温泉水におけるレジオネラ属菌の生態状況を把握することにより、繁殖防止方法を検討し、衛生管理の向上に役立てることを目的として実施した。なお、レジオネラ属菌繁殖防止方法に関しては、本県特有のシラスからゼオライトを製造して、これに銀を担持させた銀ゼオライト（以下、「銀ゼオ」という）の製造および研究を実施しているサンケイ

化学（株）と共同研究を行い、また、生態等のアドバイザーとして鹿児島大学医学部細菌学教室の協力を得て、2003年度より2カ年計画で実施するものである。

初年度は、地域別（泉質別）の実態調査、レジオネラ属菌の生態調査および銀ゼオにおける消毒効果試験等を行い、若干の知見を得たので報告する。

2 調査および検査方法

2.1 地域別（泉質別）の実態調査

県内の代表的な温泉保有地域である霧島、隼人、指宿、市比野地区で、調査研究の協力を得られた16施設を対象に、吐出口及び浴槽水のレジオネラ属菌数、塩素濃度、温度、pH、バイオフィルムの有無の調査に加え、ろ材の種類および検出された菌（L.p）の血清群別についても調査した。この調査は委託検査業務として鹿児島県薬剤師試験センターの協力をもらった（第1回目の検査はクロスチェックのため当センターにおいても検査を実施）。また、検査は「新版レジオネラ防止指針」に準じて、ろ過濃縮及び酸処理法にて実施した。

2.2 レジオネラ属菌の生態調査

60L水槽（市販の小魚飼育用水槽）に温泉水（炭酸水素塩泉）を、および動物舎に設置されている250L水槽（現在未使用）に脱塩素した水道水（バケツ等の容器に水道水を溜めて約1週間放置後、DPD法にて塩素が無いことを確認）を、スーパージェットフィルター（簡易濾過装置）を用いて循環させた。60L水槽を設置した部屋（別棟の動物舎）は業務時間内（午前8時30分～午後5時15分）に限り、窓を全開して土埃等が混入しやすい環境にした。一方、250L水槽は、金網だけで仕切られていることから、常時、外界から土埃等が混入しやすい環境になっている。

1 鹿児島県出水保健所 〒899-0202 鹿児島県出水市昭和町18-18

簡易濾過装置中のろ材には、綿状の化学繊維を入れて、60L水槽は温度を42℃に、250L水槽は35℃に設定し、前者は約2ヶ月、後者を約1ヶ月間循環させた。

なお、60L水槽は2台を準備し、片方に銀ゼオ20%粒剤を6g（濾過器中の化学繊維の上にガーゼで包んで置いた）投入して循環させ、一般生菌数（48h後判定）およびレジオネラ属菌数の検査（4日目及び7日目に判定）を実施した。一方、250L水槽は、脱塩素させた水道水を循環させているけれども、前日に使用した入浴後の残湯約2Lを、1週間に2～3回の割合で、1ヶ月間水槽に足した。次に、この実験終了後、化学繊維からセラミック製ろ材に換えて、同様に循環及び調査を行った。

2. 3 銀ゼオ粒剤における消毒効果試験

予備実験として、L.p SG3を 10^5 CFU/100ml含む温泉水を検水として使用し、この検水500mlに対し、銀ゼオ20%粒剤及び2%粒剤を、それぞれ0.5%、0.1%、0.05%、0.01%の割合で投入し、42℃で24時間反応させてレジオネラ属菌数を測定した。さらに、銀ゼオ投入から24時間までの経時的な変動についても調査を行った。

一方、60L水槽の炭酸水素塩泉中で、自然に繁殖したレジオネラ属菌に対しても、上述した方法で調査を実施した。

3 調査結果

表1 泉質別調査成績書(2003年度)

地区	施設名	採水年月日	吐出口のレジオネラ属菌数	浴槽水のレジオネラ属菌数	吐出口塩素濃度	浴槽水塩素濃度	吐出口温度	浴槽水温度	吐出口PH	浴槽水PH	バイオフィルムの有無	ろ材の種類	血清型別	泉質
霧島地区	A	'03.8.19	検出限界未満	検出限界未満	0.2mg/l	0.2mg/l	41.0℃	40.9℃	6.4	6.3	無し	セラミック製	—	単純泉
	B	'03.10.20	検出限界未満	検出限界未満	2.0mg/l	2.0mg/l	43.0℃	40.0℃	6.8	6.9	無し	塩化ビニール製	—	単純泉
	C	'03.12.9	検出限界未満	検出限界未満	無し	0.8mg/l	54.5℃	41.1℃	7.7	7.4	無し	—	—	単純泉
	D	'04.2.17	検出限界未満	検出限界未満	0.1mg/l	0.1mg/l	41.6℃	41.1℃	7.6	7.4	無し	砂	—	単純泉
隼人地区	A	'03.8.19	30CFU/100ml	30CFU/100ml	無し	無し	45.6℃	44.7℃	7.7	8.0	有り	—	L.pSG4	炭酸水素塩泉
	B	'03.10.21	20CFU/100ml	80CFU/100ml	無し	無し	47.1℃	41.7℃	7.7	8.0	有り	—	L.pSG3	純重曹泉
	C	'03.12.9	検出限界未満	検出限界未満	無し	無し	47.1℃	41.7℃	8.1	7.8	有り(吐出口)	—	—	炭酸水素塩泉
	D	'04.2.17	検出限界未満	検出限界未満	無し	0.1mg/l	51.0℃	44.1℃	8.1	8.0	無し	—	—	炭酸水素塩泉
指宿地区	A	'03.8.20	検出限界未満	5.9×10^2 CFU/100ml	無し	0.1mg/l	46.9℃	40.4℃	6.2	6.8	無し	塩化ビニール製	L.p NA	塩化物泉
	B	'03.10.22	検出限界未満	検出限界未満	0.05mg/l	0.05mg/l	41.5℃	41.3℃	8.4	8.3	無し	セラミック製	—	アルカリ性単純泉
	C	'03.12.10	検出限界未満	検出限界未満	0.7mg/l	1.3mg/l	46.1℃	42.6℃	7.6	7.7	無し	塩化ビニール製	—	Na塩化物硫酸塩泉
	D	'04.2.19	検出限界未満	5.0×10^3 CFU/100ml	無し	無し	40.0℃	34.0℃	6.6	7.0	無し	—	L.pSG1, NA	Na塩化物硫酸塩泉
市比野地区	A	'03.8.21	検出限界未満	検出限界未満	無し	無し	46.5℃	43.1℃	9.5	9.4	無し	—	—	単純泉
	B	'03.10.23	検出限界未満	10CFU/100ml	無し	無し	46.0℃	44.3℃	9.6	9.6	有り(浴槽水)	—	L.pSG1	弱アルカリ性単純泉
	C	'03.12.11	検出限界未満	検出限界未満	無し	無し	43.8℃	43.1℃	6.6	6.5	無し	—	—	炭酸水素塩泉
	D	'04.2.19	検出限界未満	検出限界未満	無し	無し	43.9℃	42.1℃	8.2	8.3	無し	—	—	炭酸水素塩泉

*検査及び調査については、委託業務として鹿児島県薬剤師試験センターにおいて実施した

3. 1 実態調査結果

表1に示したとおり、吐出口からレジオネラ属菌が検出されたのが2施設、浴槽水からは5施設で検出され、両方から検出されたのが2施設存在した。最も多かったのは指宿地区のD施設（Na塩化物硫酸塩泉）で、吐出口からのレジオネラ属菌は検出されなかったが、浴槽水から 5.0×10^3 CFU/100mlの菌を検出した。また、検出された施設の吐出口および浴槽水の残留塩素濃度は認められないか、県の条例で定めている基準値（0.2～0.4mg/l）以下の濃度であった。一方、逆に基準値を大きく上回っている施設もあった。

なお、ろ材が無いところは掛け流し式の施設であった。バイオフィルムの有無は触感（吐出口及び浴槽壁のぬめり）の判断であったけれども、4施設において確認して、うち3施設の浴槽水からレジオネラ属菌を確認した。

ろ材の種類は、現地で聞き取り調査を行い、塩化ビニール製が3施設、セラミック製が2施設、砂が1施設であった。塩化ビニール製のろ材を使用している1施設の浴槽水からレジオネラ属菌を確認したが、他の施設からは検出しかつた。なお、L.pの血清群別については、市販の血清（デンカ生研）で凝集反応試験を行い、凝集が無かった場合はPCR（L-mip遺伝子）にて確認した。結果は、L.p SG1が2施設、L.p SG3が1施設、L.p SG4が1施設、PCRにてL.p (NA)を確認した温泉水が2施設あった。

3. 2 生態調査結果

60L水槽2台において、温泉水（炭酸水素塩泉）を簡易濾過器を介して42℃で循環させ、1台に銀ゼオ0.01%量を加えて、一般生菌数及びレジオネラ属菌の動向を観察した。

調査期間内において、レジオネラ属菌の繁殖を2台の水槽共に確認しなかったが、一般生菌数は、銀ゼオを投入していない水槽で急激な増加を認め、投入した水槽では、一般生菌の繁殖を認めなかった（図1）。

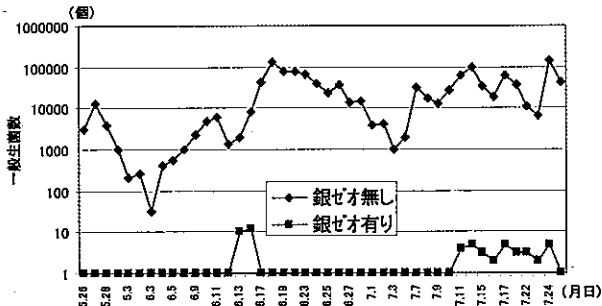


図1 温泉水における一般生菌数の動向

一方、250L水槽において、脱塩素した水道水を35℃で60L同様に約1ヶ月間循環させた結果、一般生菌の増加は認められたものの、レジオネラ属菌は検出しなかった。

このことから、9月1日より循環濾過装置中の化学繊維をセラミック製ろ材に交換し、同条件で循環させた。ろ材を換えて1週間目の9月8日の検水500mlから、はじめて20CFU/100mlのレジオネラ属菌を分離した。その後は、図2に示すとおり、継続的にレジオネラ属菌を認めた。また、検出されたレジオネラ属菌すべて（検査範囲内）が、*Legionella pneumophila*血清群7 (L.p SG7)であった。以後、2004年3月24日現在においても、L.p SG7の生存を確認している。

また、レジオネラ属菌数は、循環水にL-システイン塩

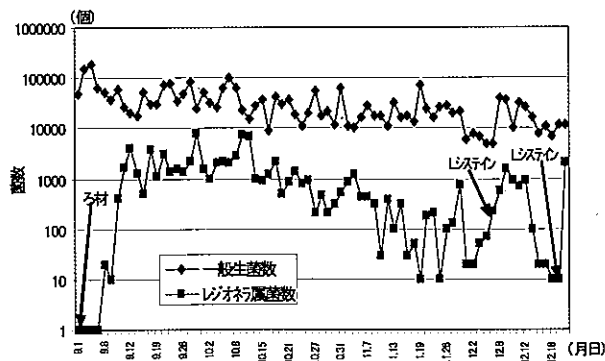


図2 セラミック製ろ材使用後の一般生菌及びL.pの動向

酸塩を加えることにより、増加傾向を認めた（図2の12.9, 12.19）。

3. 3 銀ゼオ粒剤における消毒効果試験

消毒効果試験に使用する検水（L.p SG3を 10^5 CFU/100ml含む温泉水）500mlに対し、銀ゼオ20%粒剤及び2%粒剤を一定量加え、42℃±1℃で24時間反応させた後の試験結果を表2及び表3に示した。

表2 銀ゼオ20%粒剤における試験結果

銀ゼオ量	検査結果	血清型
0.5%	検出限界未満	—
0.1%	検出限界未満	—
0.05%	検出限界未満	—
0.01%	検出限界未満	—
無し	1.2×10^5 CFU/100ml	L.p SG3

表3 銀ゼオ2%粒剤における試験結果

銀ゼオ量	検査結果	血清型
0.5%	検出限界未満	—
0.1%	検出限界未満	—
0.05%	検出限界未満	—
0.01%	70CFU/100ml	L.p SG3
無し	2.6×10^5 CFU/100ml	L.p SG3

銀ゼオ2%粒剤を0.01%量加えた検体から、レジオネラ属菌（70CFU/100ml）を検出したが、銀ゼオのレジオネラ属菌に対する消毒効果を認めた。

また、この結果から同検水を使用して、銀ゼオ2%粒剤を0.05%量（レジオネラ属菌が検出されなかった最小量）入れて、経時的な変動についての調査を実施した結果、4時間後には明らかな減少を認め、15時間及び24時間後に10CFU/100ml（2枚のWY0α寒天培地上に1個のコロニー）検出したものの、消毒効果速度については満足できる結果が得られた（表4）。

表4 レジオネラ属菌の経時変化（42℃で静置）

検査時間	検査結果	血清型
1時間	9.8×10^4 CFU/100ml	L.p SG3
2時間	7.3×10^4 CFU/100ml	〃
4時間	2.1×10^4 CFU/100ml	〃
6時間	8.9×10^3 CFU/100ml	〃
15時間	10CFU/100ml	〃
24時間	10CFU/100ml	〃
銀ゼオ無し24時間	1.2×10^5 CFU/100ml	〃
P型ゼオ*24時間	1.7×10^5 CFU/100ml	〃

※P型ゼオ：P型ゼライト（銀を担持させてないゼライト）

一方、温泉水で自然に繁殖したL.p SG7についても、消毒効果試験（前述と同様な方法）を実施して、銀ゼオオによる消毒効果を認めた（表5）。しかし、一般生菌数においては、24時間で 1.1×10^3 CFU/1mlに増加した。この原因については、今後検討していきたい。

表5 温泉水の循環で繁殖したレジオネラ属菌 (L.p SG7)等の経時的变化

検査時間	一般生菌数	レジオネラ属菌数
採水直後	1.5×10^6 CFU/1ml	2.0×10^4 CFU/100ml
2時間	2.0×10^6 CFU/1ml	1.0×10^4 CFU/100ml
4時間	検出されず	検出限界未満
6時間	検出されず	10CFU/100ml
10時間	検出されず	検出限界未満
24時間	1.1×10^3 CFU/1ml	検出限界未満
銀ゼオオ無24時間	1.1×10^3 CFU/1ml	多数のためカット不能

4 考察およびまとめ

実態調査結果では、県内の4地域の16施設を対象に調査を実施したが、レジオネラ属菌を確認した施設も5施設あり、問題を残す結果であった。また、県内で集団感染事例も発生し、マスコミ等で大きく取り上げられたにもかかわらず、塩素消毒がなされていない施設もあったため、各関係機関を通じて、浴槽水の消毒等について再度注意を促していきたい。

一方、塩素消毒の効果は、泉質（アルカリの温泉水では殺菌効果が低下する）及び大勢の入浴者により浴槽水の残塩濃度が下がることも報告されているため、施設によって消毒効果が異なる短所も見られた。また、逆に塩素を入れすぎても塩素臭やガス（トリハロメタン）の発生があるため、塩素による消毒は、施設管理者にとって難しく十分な注意が必要と考えられた。

また、今回の調査で、掛け流し式の浴槽水でも、レジオネラ属菌が確認されていることから、循環式浴槽水だけがレジオネラ属菌の繁殖場所になっているとは考えにくい。したがって、すべての浴場施設において、徹底した浴槽等の清掃が望まれる。

生態調査では、2台の60L水槽において、一方に銀ゼオオを投入して、外界との接触を多く保ち温泉水を循環させた。2台の水槽中に土埃等の混入が認められたにもかかわらず、レジオネラ属菌は検出しなかった。しかしながら、少量の銀ゼオオを投入した水槽では、一般生菌の繁殖は約2ヶ月間認められず、銀イオンが細菌の繁殖を妨げることを確認した。

また、循環濾過装置中のろ材を、綿状の化学繊維からセラミック製ろ材へ換えて循環させた後、レジオネラ属

菌が繁殖したことは、非常に興味深い調査結果と考えた。このことは、綿状の化学繊維の中では原生動物（アメーバ等）が定着できなかったことから、レジオネラ属菌もアメーバ等に寄生することができず、繁殖が抑えられた可能性が強く考えられた。逆にセラミック製ろ材等には、微少なくぼみや穴を無数に認め、これがアメーバ等にとって定着及び繁殖しやすい環境であり、同時にレジオネラ属菌においても好条件の繁殖場所になっていることも窺えた。

銀ゼオオにおける消毒効果試験では、水道水及び炭酸水素塩泉において、少量でレジオネラ属菌及び一般生菌に対して消毒効果が認められた。しかし、L-システインを加えた後の消毒効果試験においては、レジオネラ属菌及び一般生菌には消毒効果がないことも確認された。これはL-システインの-SH残基と銀ゼオオの Ag^+ が結合したことにより、銀の消毒効果が低下したものと考えられた。

県内にはさまざまな泉質の温泉があり、また、温泉水に含まれる成分にも差異があることから、銀ゼオオがすべての温泉水に有効に働くのか、また、今回の消毒効果試験は*in vitro*での試験結果であり、実際に人の入浴後に消毒効果が認められるのか、今後の大きな課題である。

一方、銀ゼオオは本県特有のシラスを原料で作られていることから、施設管理者にとって設備改善をすることなく、しかも安価で、レジオネラ属菌を含む細菌の繁殖防止に役立つことが、初年度の調査で強く示唆された。

今回の調査結果を生かして、今後、幅広く活用できるよう、さらに調査域を拡大して研究を重ねていきたい。

参考文献

- 1) 財団法人ビル管理教育センター；新版レジオネラ症防止指針，（平成11年11月）
- 2) 宮本比呂志，吉田真一；レジオネラ属菌の菌株による病原性の差異，臨床と微生物，25(1)，17～23(1998)
- 3) 国立感染症研究所，他；病原微生物検出情報 月報 24(2)，1～10(2003)
- 4) 鈴木敦子，市瀬正之，他；各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況，感染症学雑誌，76(9)，703～710(2002)
- 5) 宮原正浩，山口三千男，他；温泉水のレジオネラ属菌について，九州薬学会会報，53，75～79(1999)
- 6) 杉山寛治，西尾智裕，他；生活環境水のレジオネラ汚染およびレジオネラ症患者調査，静岡県環境衛生科学研究所報告，(43)，1～4(2000)