

レジオネラの細菌学的検査における検体の濃縮法と選択培地の比較検討

産業医科大学医学部微生物 宮本比呂志
新日化環境エンジニアリング 有馬恵子

【目的】

我が国では現在のところ環境試料からのレジオネラ属菌の検出は主に、厚生省（現厚生労働省）生活衛生局企画課監修の「新版 レジオネラ症防止指針」（以下指針という）の方法が使用されている。それは、試料を遠心または濾過濃縮後、酸または熱処理し、選択分離培地に塗抹後、培養を行うものである。各施設（検査室）で実際にやりやすい方法で濃縮や前処理が行われており、選択分離培地も検査室により異なったものが使用されているのが現状である。現行の指針の検査法は多くの施設（検査室）で行うことが出来る方法を提唱するという主旨で方法に幅を持たせたものであるが、統一した試験法で検査が出来れば、それぞれの結果は簡単に比較でき、評価が容易になるため望ましいと考えられる。そこで、レジオネラ属菌の検出方法の標準化をはかることを目的に第1段階として試料濃縮方法と分離選択培地の選択が検査結果に与える影響について調べた。

【方法】

1. 検体採取、搬入及び保存

検体採取、搬入及び保存は指針に準じ行ったが、チオ硫酸ナトリウムの検水への添加は行わなかった。また採水は家庭用24時間風呂浴槽水を検査依頼者が約450ml行った（17検体）。

2. 検査方法

上記17検体を指針に準じ遠心濃縮・酸処理後、3種類の市販選択培地 WYO（栄研科学）、GVPC（日本ビオメリュー）、MWY（OXOID）寒天培地にそれぞれ塗布し培養した。増殖してきたレジオネラ属菌と疑われるコロニーを計数した。得られたコロニー数から試料水100mlあたりのコロニー数（CFU/100ml）を算出した。各培養平板から代表的なコロニーを釣菌し、指針に準じシステム要求性を調べ、この結果に従って必要があればコロニー数の集計に反映させた。菌種および血清群の同定には抗血清（デンカ生研）を使用した。

上記17件体の内11検体については濾過濃縮・酸処理も行い、WYO 寒天培地に塗布後、培養した。この11検体中7検体については WYO 寒天培地に加え、GVPC 寒天培地も分離選択培地として使用した。

3. 統計解析

試料濃縮方法と分離選択培地の選択が検査結果に与える影響を比較するため試料ごとに検出感度の判定を3段階（1：低感度、2：中感度、3：高感度）で評価してウィルコクソン符号付順位和検定を行った。

【結果】

1. 使用した選択培地による検出菌数の相違（遠心濃縮・酸処理試料の場合）

遠心濃縮・酸処理後の試料を3種類の選択培地に塗布し、培養した際の検出菌数を表1に示す。17検体中8検体（試料番号5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 17）で桁数の違う生菌数が同一検体から得られた。しかし、検出菌種と血清群はいずれの培地を使用しても一致していた。また、試料番号5, 9, 15, 17は1種類、または2種類の培地では実際にはレジオネラ汚染があるにもかかわらずレジオネラ属菌を検出できなかった。培地の違いによる検出感度の相違をウィルコクソン符号付順位和検定したところ、GVPC 寒天培地はWYO 寒天培地に比べ有意($P<0.05$)に検出感度が高かった。また、GVPC 寒天培地と MWY 寒天培地の検出感度の相違はT値の下側値であった ($P<0.1$)。一方WYO 寒天培地と MWY 寒天培地の間には有意差はなかった。この結果は浴槽水を遠心濃縮し、酸処理した場合は選択培地として GVPC 寒天培地を選択することが適していることを示している。

2. 使用した選択培地による検出菌数の相違（濾過濃縮・酸処理試料の場合）

濾過濃縮・酸処理後の7試料を2種類の選択培地に塗布し、培養した際の検出菌数を表2に示す。7検体中1検体（試料番号7）で桁数の違う生菌数が得られた。検出菌種と血清群はいずれの培地を使用しても一致していた。GVPC 寒天培地と WYO 寒天培地の検出感度に統計学的な有意差は無かった。このことは浴槽水を濾過濃縮し、酸処理した場合は選択培地として WYO 寒天培地、GVPC 寒天培地のいずれを選択しても良いことを示唆している。

3. 検体濃縮方法による検出菌数の相違（WYO 寒天培地を使用した場合）

11検体を遠心濃縮・酸処理した群と濾過濃縮・酸処理した群に分け、それぞれを WYO 寒天培地に塗布し、培養した際の検出菌数を表3に示した。濾過濃

縮・酸処理検体の方が遠心濃縮・酸処理検体に比べて多数の菌（11検体中8検体）を検出できたが、統計学的には有意差はなかった。この結果は選択分離培地として WYO 寒天培地を使用する場合には浴槽水を遠心濃縮しても濾過濃縮してもよく、検体濃縮方法が検出菌数に影響することが無いことを示している。

【考察】

今回の研究により（1）浴槽水を遠心濃縮し、酸処理した場合は選択培地として GVPC 寒天培地を選択すること、（2）浴槽水を濾過濃縮し、酸処理した場合は選択培地として WYO 寒天培地、GVPC 寒天培地のいずれを選択しても良いこと、（3）選択分離培地として WYO 寒天培地を使用する事しかできない場合には浴槽水を遠心濃縮しても濾過濃縮しても検出感度は変わらないこと、が明らかになった。これらの結果は検体が浴槽水であり、前処理として酸処理を行った場合で、また汚染菌種が *L. pneumophila* に限ったものである。そのため異なった種類の検体（冷却塔水など）のレジオネラ属菌検出や汚染菌種が *L. pneumophila* 以外の菌種の場合にも適用出来るか否かはわからない。しかしながら、*L. pneumophila* が環境分離株の80%以上を占めていること、日本におけるレジオネラ症の感染源の85%が入浴施設であることなどから考えて、浴槽水からの *L. pneumophila* の検出を指標にして統一した検出方法を探る今回の研究方法と結果は妥当と考えられる。

表1に示したように4検体（試料番号5, 9, 15, 17）はレジオネラ汚染があるにも拘わらず一種類の培地しか使用しない場合、レジオネラ汚染を見逃すことを示唆している。「公衆浴場における水質基準等に関する指針」で「レジオネラ属菌は10CFU/100ml 未満であること」という基準値があることよりレジオネラ汚染の見逃しは厚生労働行政上、非常に重要な問題である。レジオネラ検出の際に複数の種類の培地を同時に使用することが望ましいことは既に指針で述べられているが、これに従っている施設（検査室）は少ない。検体中に混在することの多い酵母型真菌、糸状菌、*Pseudomonas* spp.、*Acinetobacter* spp.、*Staphylococcus* spp.などの雑菌の増殖を抑制し、全てのレジオネラ属菌種を効率よく検出できる1種類の選択分離培地が開発されていない現状ではGVPC培地を含めた複数の種類の培地使用を義務化することを検査法標準化の第一歩として提唱する。

表1 3種類の選択培地を使用した時のレジオネラ生菌数 (CFU/100ml)

*試料番号	選択培地			検出菌種 (血清群)
	WYOα	GVPC	MWY	
1	2040	2780	2430	<i>L. pneumophila</i> (5)
2	5420	3620	4180	<i>L. pneumophila</i> (5)
3	2480	3750	3400	<i>L. pneumophila</i> (5)
4	150	290	270	<i>L. pneumophila</i> (5)
5	380	60	<10	<i>L. pneumophila</i> (5)
6	330	890	10	<i>L. pneumophila</i> (5)
7	20	60	150	<i>L. pneumophila</i> (5)
8	30	80	90	<i>L. pneumophila</i> (5)
9	50	<10	<10	<i>L. pneumophila</i> (5)
10	10	40	30	<i>L. pneumophila</i> (5)
11	20	100	70	<i>L. pneumophila</i> (5)
12	110	120	150	<i>L. pneumophila</i> (5)
13	920	980	910	<i>L. pneumophila</i> (5)
14	40	830	530	<i>L. pneumophila</i> (5)
15	230	630	<10	<i>L. pneumophila</i> (5)
16	1800	1570	1280	<i>L. pneumophila</i> (3, 5, 6)
17	<10	40	60	<i>L. pneumophila</i> (5)

*試料は全て遠心濃縮・酸処理された。

表2. 2種類の選択培地に濾過濃縮試料を接種した時のレジオネラ生菌数 (CFU/100ml)

*試料番号	選択培地		検出菌種 (血清群)
	WYO	GVPC	
1	2000	3250	<i>L. pneumophila</i> (5)
2	3210	4000	<i>L. pneumophila</i> (5)
3	380	500	<i>L. pneumophila</i> (5)
4	230	130	<i>L. pneumophila</i> (5)
5	2870	1460	<i>L. pneumophila</i> (5)
6	220	200	<i>L. pneumophila</i> (5)
7	30	<10	<i>L. pneumophila</i> (5)

*試料は全て酸処理された。

表3. 2種類の試料濃縮法によるレジオネラ生菌数 (CFU/100ml)

*試料番号	濃縮		検出菌種 (血清群)
	遠心	濾過	
1	5420	2000	<i>L. pneumophila</i> (5)
2	2480	3210	<i>L. pneumophila</i> (5)
3	330	380	<i>L. pneumophila</i> (5)
4	120	230	<i>L. pneumophila</i> (5)
5	800	2870	<i>L. pneumophila</i> (5)
6	240	220	<i>L. pneumophila</i> (5)
7	40	30	<i>L. pneumophila</i> (5)
8	220	1560	<i>L. pneumophila</i> (5)
9	1800	3620	<i>L. pneumophila</i> (3, 5, 6)
10	100	600	<i>L. pneumophila</i> (5)
11	1110	1220	<i>L. pneumophila</i> (1)

*濃縮された試料は全て酸処理後、WYO 培地に塗布された。

7. レジオネラ症集団発生への対応

平成 14 年度厚生労働科学特別研究
「生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究」(H14-特別-047)

II. 日向サンパーク温泉「お舟出の湯」を感染源とする
レジオネラ症集団発生への対応

分担研究者 藪内 英子(岐阜大学医学部微生物バイオインフォマティクス)
研究協力者 縣 邦雄(アクアス株式会社つくば総合研究所)

1986 年 7 月、勤務先が主催した 1 泊 2 日の慰安旅行で片山津温泉に赴いた大阪の 59 歳男性が *Legionella dumoffii* による肺炎に罹患したと聞いて、我々は患者勤務先の冷却塔の冷却水を採取して調べたが *L. dumoffii* は検出されなかった。当時はレジオネラ肺炎と温泉との因果関係に考えが及ばず、何らの追跡調査も実施しなかった。その後、愛知県の温泉浴槽内で転倒し浴槽水を誤嚥した後に発症した症例が 1993 年に報告された。温泉関連レジオネラ肺炎の第一報告例であった。それ以来温泉浴槽水や公衆浴場浴槽水中のレジオネラ属菌の分布調査が行われ、浴場および温泉水関連のレジオネラ肺炎散発例や小規模集団感染が起こった。特に 2000 年と 2002 年には、かねて我々が危惧していた大規模集団感染が、計 4 ケ所の新設温泉施設で発生した。その中で死者 7 人を出した日向サンパーク温泉「お舟出の湯」でのレジオネラ集団感染に関わる「日向サンパーク温泉施設レジオネラ菌原因等究明委員会」に、分担研究者が会長、研究協力者が委員として平成 14 年 10 月 21 日から平成 15 年 1 月 24 日まで参画した。

対象と方法

宮崎県日向市大字幸脇(サイワキ)で平成 14 年 3 月 29 日に工事が完了した日向サンパーク温泉「お舟出の湯」は各種の試験を経て 6 月 20 日に日向保健所から公衆浴場としての営業を許可され、同日竣工式を挙行し、同日および翌 21 日に近隣住民 200 人づつを体験入浴に招待した。その後社員による浴槽清掃、湯張り、湯抜きを繰り返し、7 月 1 日に正式開業した。正式開業以来、毎週月曜の休館日をはさんで、7 月 17 日までの入浴者は合計 15,085 名、1 日平均 1,006 名であった。

1. 集団感染事例とその対応の概要

7 月 18 日、日向保健所は日向市内の医療機関から「レジオネラ肺炎を疑わせる患者 3 名が入院しており、その何れもが「お舟出の湯」の入浴者である」との通報を受けた。保健所は翌日の水質検査と浴槽水などの現状保持を日向市に通告した。

7 月 19 日(金)、日向保健所員 5 名が来所し、浴槽 6 ケ所及び温泉スタンドの計 7 ケ所から採水し、徹底洗浄・消毒の実施と一時営業休止を要請した。日向市側は、24 日の休業と清掃・消毒実施を決めていたことを保健所に通報し、営業を続行した。しかし、この日(19 日)の業者の点検で塩素剤注入装置のパイプにガス溜まりが出来て塩素剤が注入されない状態であったこと、及び入浴者数が多かったことから、全浴槽で残留塩素濃度がゼロであることが判明した。

20 日には業者によるろ過器の点検、22 日には浴槽等の清掃・消毒を行っていたが、25 日に日向市内在住の 50 歳代男性の喀痰培養と、「お舟出の湯」の浴槽水培養で *Legionella pneumophila* 血清群(serogroup, SG)1 が検出され、30 日には制限酵素 Sfi I を用いたこの菌株と浴槽由来株の DNA の遺伝子多型解析(パルスフィールドゲル電気泳動、宮崎県衛生環境研究所実施)で両者が一致したことから、「お舟出の湯」が集団感染の感染源であることが確定し、施設名が公表された。7 月 19 日採取の浴槽水中の *L. pneumophila* の菌数は、最大で 1.5×10^6 CFU/100 ml であった。*L. pneumophila* SG 1 の他に SG 8、*L. dumoffii*、*Legionella* sp. が検出された。このことは宮崎県医師会を通じて県内医療機関に通報され診療に当たっての注意が喚起された。県民に対しても注意を促すとともに、報道機関に公表した。

7 月 25 日、日向サンパーク温泉は日向保健所の文書による営業自粛要請を受入れ、同月 30 日には日向保健所から 60 日間の営業停止命令(期間 7 月 30 日~9 月 27 日)が出され、

その後営業停止期間は順次延長され、現在は平成 15 年 10 月 31 日迄営業停止が続くことになっている。温泉施設は宮崎県警察本部(宮崎県警)と日向警察署によって 7 月 30 日に封鎖され、この立入規制は 11 月 28 日に解除されるまで続いた。翌 31 日には国立感染症研究所、宮崎県衛生管理課、日向保健所、宮崎県警が立入調査を行った。

発症者数は喀痰培養陽性尿中レジオネラ特異抗原検出 *L. pneumophila* SG1 に対する血清抗体価上昇の 1 つまたは 2 つでレジオネラ症と確定診断された 34 名(男 24 名、女 10 名)を含めて 295 名(男 159 名、女 136 名)であった。2 日間の体験入浴者の中の夫々 5 名と 3 名の発症例があったが、確定診断症例はなかった。

2. 「日向サンパーク温泉施設レジオネラ菌原因究明等委員会」の活動

日向市は 10 月 21 日、浴槽水の汚染原因の究明と再発防止対策策定のため「日向サンパーク温泉施設レジオネラ菌原因究明等委員会」を設置し、我々がその委員に加わった。当委員会は現場検証を含めて計 4 回の会合と 1 回の学習研修会を開催して論議を深めた。その要点は以下のものである。

1) 温泉湧出量と熱源の関係

温泉湧出量と湯温に比して浴槽の数が多く、供給湯量の調整や加温が必要であった。施設が国定公園内であるため煤煙を発生するボイラーは使用できないとの理由から加温の熱源に電気を充て、夜間に温泉水の温度を上げるシステムであった。そのため、日中の溢水用温泉水の供給が不足し、浴槽が常時満水でなかったことから汚濁の排出が妨げられた。当委員会の要請で調査した結果、ボイラーの使用を制約する規定はどこにもないことが判明した。

2) レジオネラ症防止指針とパンフレット

現実に日向市および温泉施設の担当者これらの刊行物が認識されていなかったことは明白であり、長年にわたりこの両方の作成に関わり、色々な機会にその解説に当たってきた者としては、失意と虚無感を禁じ得なかった。

3) ろ過器とろ材

第 2 回委員会の席上、設計会社が「セラミックの砕粉と砂を混同」していたことが明らかとなり、ろ材についての関係者の認識不足を感じた。平成 14 年 10 月 29 日付けで厚生労働省健康局長から健発第 1029004 号として出された「条例等にレジオネラ症発生防止対策を追加する際の指針について」の中で、多孔質のろ材(多孔質のろ材砕石を「砂」と称して使用することも含む。)でろ過器に微生物を繁殖させて湯水を浄化する方式(いわゆる生物浄化方式)の循環式浴槽は、好ましくないことが明記された。

平成 14 年 10 月 23 日にろ過機 R-5 から採取したとして送付されて来たろ材は 0.6mm 前後の淡黄褐色の砕粉であった。同一社の同一製品の新品ろ材が淡灰白色でサラサラし盛り上げて置くことが出来ないのに対し、使用済みろ材の表面は粘性でシャーレの中に容易に盛り上げて置くことが出来た。このろ材 5g を滅菌精製水 5ml に懸濁し振盪すると液は泥水状になり、汚濁物は直ぐに沈降して僅かに混濁した上液とにわかれた。その上液を酸処理して培養すると 34 CFU/100ml の *L. pneumophila* SG 1 が生育した。これを単純に換算すると 3.4×10^4 /100ml となり、営業停止直前に強力な塩素消毒を行った筈のろ過器のろ材中に、営業停止から 3 ヶ月後にもこれだけの数のレジオネラ属菌が生存していたことになる。

4) 施設公開日と感染初日が同一であった理由

静岡県掛川市孺恋温泉「森林の湯」、茨城県石岡市のふれあいの里石岡「ひまわりの館」、東京都目黒区の特別養護老人ホームで、施設開設後ほぼ 1 ヶ月経過後に感染事例が発生している。これに対して「お舟出の湯」では、6 月 20 日と 21 日の体験入浴者からそれぞれ 5 名、3 名の疑診患者が出ており、温泉施設公開日が感染初日であるという前代未聞の事態と言わねばならない。このことは、施設公開日(体験入浴日)には既に浴槽を含む循環系

にかなりのレジオネラ汚染があったことを想定させる。「お舟出の湯」の配管系には最も低い部分に排水孔が設置されておらず、その上、体験入浴前のレジオネラ検査も循環系全体の消毒・殺菌も実施されていなかった。

水が滞留した器機を未消毒・未清掃のまま使用してレジオネラ肺炎集団発生を起こした例として、Tennessee 州 Memphis の病院および英国 Staffordshire の総合病院で休止冷却塔再稼動直後の集団感染事例がある。

休止していた水利用設備を再稼動させる直前にその水系全体を十分に消毒・清掃しなければならないことは、水利用施設の関係者の間でも認知度が低いように思われる。また「清掃・消毒」という表現が多用されているが、本来は作業者の安全のためにはまず消毒してから清掃するべきである。汚染浴槽などに最初から高圧水を噴射して洗浄することの危険性を認識しておかねばならない。

5) 汚染源の推定

宮崎県福祉保健部レジオネラ症対策本部と宮崎県福祉保健部がまとめた調査結果(中間報告)では推定される汚染原因として次の 8 項目が列挙された。

- (1) 源泉タンクの適切な清掃、消毒などの衛生管理が不十分だったこと。
- (2) 定期的な清掃、消毒などの衛生面での担保がなされていない中温タンクの温泉水を高温水と混合して浴槽水に使用していたこと。
- (3) 高温タンクの温度維持能力が不十分で、設定された 58℃の温度を常時維持できなかったこと。
- (4) 浴槽水の残留塩素の濃度の測定が適切に行われなかったため、消毒に必要な塩素濃度が維持出来ていなかったこと。同時に、塩素注入装置の操作を十分理解しておらずメンテナンスが不十分であったこと。
- (5) 常時浴槽の水位を満水状態としなかったため、営業時間内での湯水の入れ替えが不十分であったこと。
- (6) ろ過装置の逆洗浄時間の設定が不十分で、ろ過槽内の汚れの排出が行われず、アメーバやレジオネラ属菌の増殖場所を提供してしまったこと。
- (7) ヘアキャッチャーの清掃、消毒が不十分であったこと。
- (8) 適切な衛生管理を行うためのマニュアル(手順書)が作成されていなかったこと。

我々の委員会はこれまでの調査結果を踏まえ、上記 8 項目に以下の 3 項目を加え、11 項目を推測される汚染原因とした。

- (1) 日向市や施設関係者にレジオネラ感染症についての知識・認識が不足していた。
- (2) 施設引き渡し後に行った試運転などの操作で使用した水が配管に滞留し、そこにレジオネラ属菌が増殖し、それが体験入浴時の感染源になった可能性がある。
- (3) 体験入浴前に湯の循環系統全体の消毒・清掃が不十分だったこと。

6) レジオネラ属菌とレジオネラ感染症についての研修会

汚染源の推定で我々の委員会が挙げた第 1 項目への対応として、平成 14 年 12 月 20 日、日向市勤労青少年ホームで実物供覧とスライド映写による研修会を行った。供覧には *Legionella pneumophila* serogroup 1 のパイロット株 EY3492=ATCC 33153 をマックファーランド濁度 1.0 になるよう懸濁し、その 10 倍希釈系列と、その各 100 μ l を BCYE α 寒天培地に塗布した培養物を用いた。これにより肉眼で識別できる濁りと実際の菌数とを比較し、水が透明に見えても細菌学的には清潔でないことを示すと共に菌数算定方法、発育集落の性状、発育菌の臭気などを説明した。そのあとで、汚染・感染経路、レジオネラ肺炎についてスライドを用いて解説した。この研修会には日向市長、助役、収入役、市職員、サンパーク温泉職員、保健所職員、市議会議員、市内公衆浴場職員など約 100 名が参加した。

7) 日向サンパーク温泉「お舟出の湯」に係る改善計画書

平成 15 年 1 月 31 日、1. 施設全般に係る衛生管理 2. 管理体制の整備 3. 施設の

改善および 4. その他必要と思われる事項 の 4 項目から成る表記改善計画書(発日商第 480 号)が山本孫春日向市長から宮崎県日向保健所長に提出された。

考察と結語

日向サンパーク温泉施設「お舟出の湯」での事例は、温泉施設の衛生管理と感染防止のいずれにも無経験の集団が、恐らく無経験であるとの確たる自覚も希薄なまま、郷土の繁栄の起爆剤になろうと温泉施設の設営と運営に集中した結果、起こるべくして起こった不幸な集団感染であったと言わねばならない。明文化された「ボイラー使用規制」を確認しなかった一例に見られるように、曖昧さを確認せずに済ます姿勢があったと思う。保健所の衛生管理指導が如何ほどであったかは、外部の我々には知る由もないが、手渡されたという「レジオネラ症防止指針」とパンフレット「よく知ろう レジオネラ症」の意義や重要性が日向市および施設関係者に認識されず、その内容が実施されなかったことも事実である。一旦、事故がおきた後には、対策委員会をはじめ様々な対応が急遽実施されるのに対して、事前の予防措置立案と実施が如何に困難であるかを認識させられた。

平成 14 年 9 月 3 日付けで厚労省健康局の結核感染症課長と生活衛生課長の連名で出された健感発および健衛発第 0903001 号の「レジオネラ症患者の発生時等の対応について」には、集団感染発生時の対処法が簡潔・適正に記されている。しかし英国放送本部の屋上冷却塔が原因で発生した大規模集団感染に際し、行政ならびに関係機関が、一本化された指揮命令系統のもとで、通報を受けてから 3 日以内に必要な対策を立案し迅速に行動したことを、我々は学ばねばならない。集団感染発生に対処する指揮命令系統は平時に考えておかねばならない。

論文発表. 藪内英子、縣 邦雄.2003. 新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生 - 日向市原因究明等委員会からの報告 - 感染症誌 投稿中

8. 知識の普及と啓蒙のための総説

〔解 説〕

福利厚生のための入浴施設におけるレジオネラ症防止対策 —安全で快適な心の湯浴みのために—

宮本比呂志

産業医科大学 医学部 微生物学教室

要 旨: 浴槽の大型化に伴い省資源(節水)を目的に循環式浴槽システムが普及している。最近、宮崎県と鹿児島県で入浴施設を感染源とするレジオネラ症集団発生が相次いで起こり、現時点で疑いを含め合計300名を超す感染者と8名の死亡者がでている。平成13年9月に厚生労働省が発行した「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」が遵守されていない現状が明らかになった。福利厚生のための入浴施設における労働者のレジオネラ症発生を防止するためには産業保健業務従事者がこのマニュアルをよく理解し遵守することが大切である。本稿ではマニュアルを理解するために必須な微生物学の知識を産業保健業務従事者を対象に解説する。日本における入浴施設を感染源とするレジオネラ症の発生状況とその社会背景、レジオネラの細菌学的性状、環境中での棲息状況と生態、レジオネラ症の臨床像、DNA解析による感染源の同定法について述べる。さらに実際の作業レベルでの効果的なレジオネラ除菌対策についても概説する。

キーワード: レジオネラ, 肺炎, 衛生管理, 循環式浴槽, 福利厚生。

(2002年11月25日 受付, 2003年1月22日 受理)

はじめに

2002年7月に宮崎県日向市で、8月には鹿児島県東郷町で入浴施設を感染源とするレジオネラ症の集団発生が起こり、報道によれば現時点で疑いを含め300名を超す感染者と8名の死亡者が出たと言われる。これらの感染事故を受け、厚生労働省の指導のもと各地でレジオネラ症防止対策講習会が開催されている。福岡県でも県内4カ所で県主催の講習会が開催された。公衆浴場、旅館及び高齢者などの施設の営業者または管理者を対象とした講習会であったが、参加者は4ヶ所で合計1000名

を超した。講師として参加した私はレジオネラ症が入浴施設の経営者や管理者にとっていかに切実な問題であるかを実感した。しかし、産業保健関係者は対象者でなかったため講習会に参加できなかったと思われる。そのため、産業保健業務に従事している方々から交代勤務者のために設置している循環式浴槽(いわゆる24時間風呂)や企業の寮・保養所に設置されている循環式浴槽の設備・維持管理などについての質問や相談が個人的に私のもとへ寄せられている。厚生労働省より平成13年9月に発行された「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/2001/0109/tp0911-1.html>)を十分に理解して頂く上で必須と思われる微生物学的知識について、福利厚生のための入浴施設における労働者のレジオネラ症集団発生を防止することを目的に解説する。本解説は産業保健業務に従事している全ての人々を対象としたものであり、産業保健活動を行っている医療従事者でない人々にレジオネラの細菌学的知識を提供することも目的にしている。そのため専門用語と英語の使用は極力避けたのでご了承頂きたい。

入浴施設を感染源とするレジオネラ症の発生事例と行政の対応

Table 1 に日本における最近のレジオネラ症のうち入浴施設を感染源とするものを示した [1]。平成11年6月に自宅の24時間風呂で水中分娩し、生まれた新生児がレジオネラに感染し、生後8日で亡くなるという痛ましい感染事故があった。その当時、既に24時間風呂浴槽水の約70%にはレジオネラ汚染があることはわかっており [2]、各報道機関を通じて公表されていた。その後、平成12年3月と6月に別々の入浴施設で合計65名の感染者と5名の死者を出す集団発生が起こった。原因は両施設とも循環式浴槽水の換水や塩素消

毒が不十分でレジオネラが増殖していたことであった。7月には大学病院の展望24時間風呂に入浴した入院患者がレジオネラ肺炎を発症して死亡するという病院内感染も起きた。これら一連の入浴施設におけるレジオネラ症の発生を重く見た行政当局は公衆浴場及び旅館業における入浴施設の衛生管理の徹底と一斉点検を行い、管理簿などへ清掃、消毒などを記録するよう指導を行った。12月には「公衆浴場における衛生等管理要領」などの改正が行われ、水質基準などに関する指針が策定された。これにより浴槽水では「レジオネラ属菌は10 CFU/100 ml 未満であること」とされた。平成13年9月には厚生労働省より具体的な管理方法などをまとめた「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」が発行された。このマニュアルが遵守されれば入浴施設を感染源とするレジオネラ症の散発例(患者数が1名のこと)はあっても集団発生は起こらないであろうと思われた。平成13年12月には東京の銭湯で循環した湯を使用した薬湯に入浴中の男性が溺れ、浴槽水中のレジオネラを吸い込み肺炎を発症して亡くなったとする報道にも接した。この感染事故は入浴者が浴槽内で溺れるという特殊な散発例であった。しかし、平成14年7月と8月に前述し

Table 1. 入浴施設を感染源とするレジオネラ症

年	月	場 所	発病者(人)	死者(人)
平成11年	6月	愛知県	1	1
平成12年	3月	静岡県	23	2
平成12年	6月	茨城県	42	3
平成12年	7月	愛知県	1	1
*平成13年	12月	東京都	1	1
*平成14年	7月	宮崎県	295	7
*平成14年	8月	鹿児島県	7	1

*は新聞報道、それ以外は文献1より引用

たように宮崎と鹿児島で相次いで集団発生が起こった。いずれの施設も塩素処理が不十分で循環式浴槽水からレジオネラが多数検出された。具体的な衛生管理マニュアルがあるにも拘わらず、その理解が不十分で遵守されていない現状が明らかとなった。

レジオネラと水利用施設

1976年7月、米国フィラデルフィアのホテルで開催された在郷軍人大会の参加者やホテル周辺の通行人などに原因不明の肺炎が集団発生し、患者221名の内の29名が死亡したことが報告された [3]。在郷軍人大会にちなんでこのときの肺炎は在郷軍人病と名づけられた。精力的な原因調査によって、この肺炎はこれまで報告のなかった新たな細菌による感染症であることが明らかになり、この原因菌は *Legionella pneumophila* (レジオネラ・ニューモフィラ) と命名された [4]。在郷軍人 (legion) と肺を好む (pneumophila) ということにちなんで名づけられたのである。感染源は在郷軍人大会が開催されたホテル屋上に設置

された空気調和機(空調機)の冷却塔水であった。冷却塔水を汚染したレジオネラが目に見えない水滴(エアロゾル)として冷却塔の周囲に飛散し、これらのエアロゾルが建物の外気取入口から屋内に入ってきたことが原因であった (Fig. 1)。また、レジオネラは約1ミクロン(千分の一ミリ)の大きさで、菌体の端に一本の鞭毛を持つ桿状の細菌であることがわかった。グラム染色でピンク色に染まるグラム陰性桿菌である。レジオネラを増殖させるための培地 (BCYE 培地) 上では淡い酸臭をおびた灰白色で湿潤な菌塊 (コロニー) を形成する (Fig. 2)。現在までに45種類のレジオネラが発見・同定されている (<http://www.bacteriocict.fr/1/legionella.html>) が、どの菌種が病気を起こす力 (病原性) が強いかははっきりしていない。レジオネラ・ニューモフィラは臨床的に最も多く分離されるがその理由はこの菌種が最も多く環境中に棲息しており、ヒトへの感染の機会が多いためであろうと推測されている [5]。

赤痢菌、ペスト菌、コレラ菌などの病気を

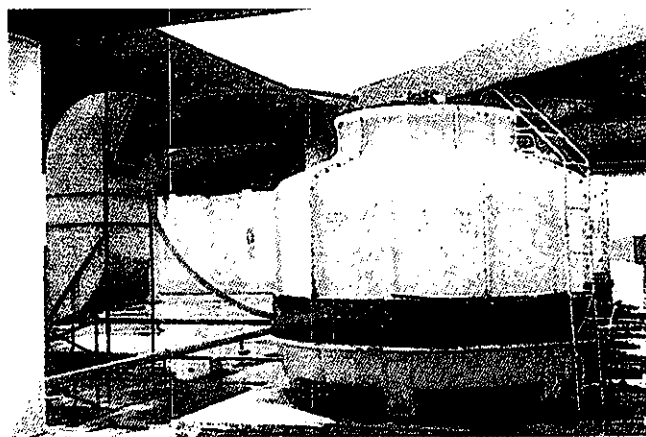


Fig. 1. 屋外の冷却塔より発生・飛散したエアロゾルの屋内への侵入経路。冷却塔水中で増殖したレジオネラを含んだエアロゾルは隣接した外気取り入れ口から屋内に入る (矢印)。

起こす細菌(病原細菌)の多くは既に19世紀末までに発見されており、レジオネラの実見は病原細菌の実見の歴史としては非常に新しいものと言える。その実見の端緒となった社会的背景を Table 2 に示した。1973~1974年のオイルショックをきっかけにして、主に欧米において省エネルギーを目的に窓を少なくするなど建築物の気密性を高め、換気を少なくして、空気を循環させて使う空気調和(空調)システムが普及した。水冷式冷却塔の設置が進み、自然界で棲息していたレジオネラが爆

発的に増殖できる水環境が提供されることとなった。その結果、ヒトに感染が起こり、それを契機にレジオネラは発見されたわけである。Fig. 3 に日本におけるレジオネラ症の感染源を示した [1]。多くの水利用施設(人工水環境)が感染源として報告されている。その中でも入浴施設は感染源の85%を占めている。浴槽の大型化により省エネルギー・省資源(節水)が必要になり、浴槽水を循環させて何度も使用する循環濾過システムが普及した。このシステムがレジオネラの新たな増殖の場

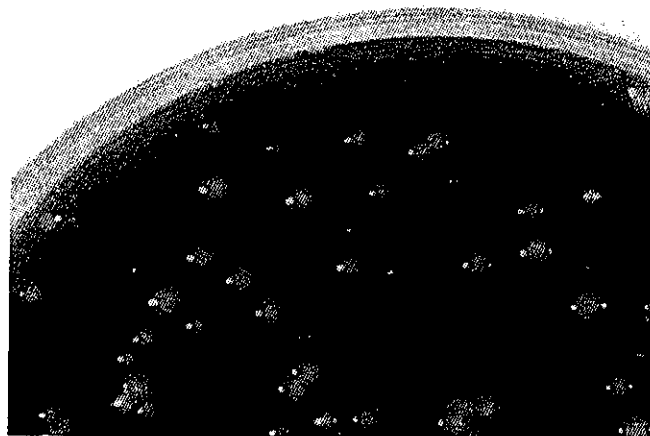
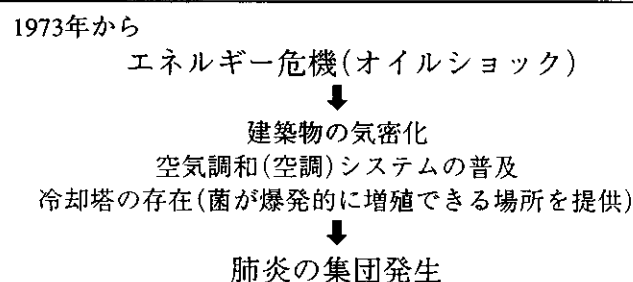


Fig. 2. レジオネラ用培地(BCYE 培地)上で増殖したレジオネラの菌塊(コロニー)。好氣的条件で37℃ 5日間培養したコロニーは灰白色で淡い酸臭がする(文献 [6] より引用)。

Table 2. レジオネラ実見の経緯



を提供することになっているのである (Table 3). レジオネラ発見の経緯も含め“レジオネラ症は文明病である”と吉田氏(九州大学)は提唱している. 今後, 新たな水利用施設を開発・使用の際にもレジオネラ対策は避けられないことを過去の歴史は我々に教えてくれている.

環境中での棲息状況と生態

Table 4 に示したようにレジオネラは自然環境では湿った土壌, 池や沼, 湖, 河川などの淡水に細々と棲息している [6, 7]. 人工的な環境ではビルやホテルの空調冷却塔水, 給

水・給湯設備, 循環式浴槽水, 加湿器の水, 噴水などから検出されている [6, 7]. これらの人工貯水環境(水利用施設)には土埃や補給水とともにレジオネラが混入すると考えられている. 入浴施設では入浴者の体に付いて直接持ち込まれたり, 土埃とともにレジオネラが露天湯や貯湯槽に混入することが考えられる.

貯水環境でレジオネラが定着, 増殖する要因を Table 5 に示した. レジオネラの培地上での発育条件が pH6.8-6.9, 温度37℃前後の好气的状態で発育因子として鉄やシステイン

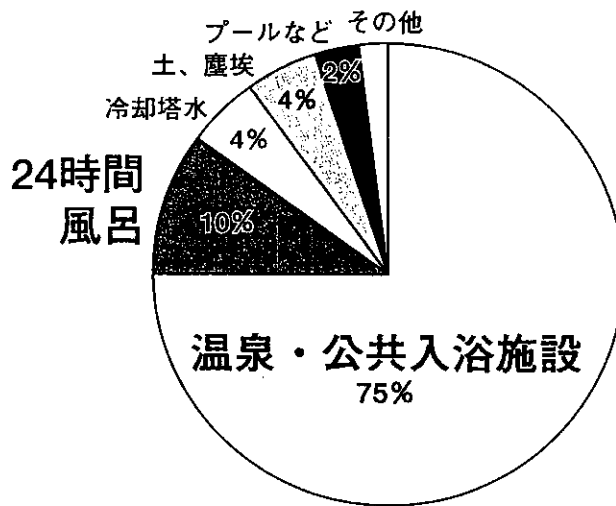
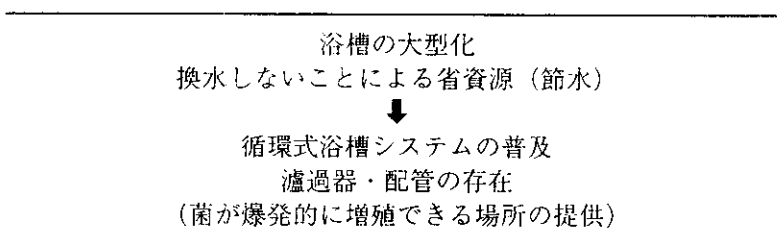


Fig. 3. 日本におけるレジオネラ症の感染源. 1999年4月より2000年7月に厚生省(現厚生労働省)に届出があった145例の内, 感染源の記載のあった69例について図示した.

Table 3. 入浴施設を感染源とするレジオネラ症急増の社会背景



を要求する[8]などかなり厳しいのに比べ、環境に棲息する微生物群との共生関係にある貯水環境ではpH域や温度域が広い[9]。冷却塔水や露天湯に棲息する微細藻類(ラン藻類)は炭酸同化作用を通じて発生した酸素をレジオネラに提供していると考えられている[10,11]。レジオネラは浴槽水中から検出されるが、浴槽水のみでは増殖できないと考えられている[12]。浴槽水中に生息する他の細

菌(大腸菌群など)の代謝産物や入浴者に由来する老廃物(皮脂、垢など)を炭素源、エネルギー源として利用し[13,14,15]、また細菌捕食性原虫(アメーバなど)に寄生して増殖することが知られている[12,16,17]。この「アメーバに寄生して増殖する」というレジオネラ特有の性質が入浴施設でレジオネラ症が多い最大の原因である。細菌捕食性原虫の名前が示すようにアメーバは細菌を食べて栄養源

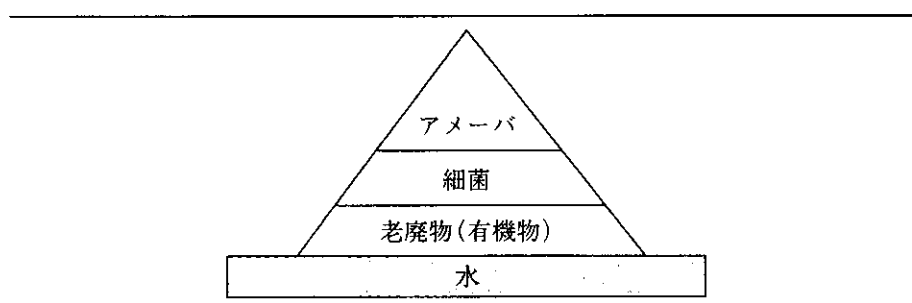
Table 4. レジオネラ的环境中での棲息場所

自然界における棲息場所；湿った土壌や淡水，湖沼，河川，水たまりなど
人工環境における棲息場所；空調冷却塔水，温泉，循環式浴槽，24時間風呂，貯水タンク，給湯水，蓄熱槽，加湿器，公園噴水

Table 5. 人工水環境でレジオネラが定着・増殖する要因

水温；20～60℃ pH；5.0～9.0 栄養素の供給 微生物との共生関係が成立；日射による藻類の増殖 アメーバ(細菌捕食性原虫)の存在
--

Table 6. 食物連鎖に基づく細菌とアメーバの微生物群集構造を示す模式図



にしている。しかしながら、運悪くレジオネラを食べたアメーバは逆にレジオネラがその体内で増殖するため殺されてしまうのである。老廃物－細菌－アメーバの間には一般的に Table 6 に示したように食物連鎖が成立している。すなわち、1. 老廃物を栄養源として細菌は増え、その結果栄養源である老廃物は減る。2. 細菌が増殖するとそれを餌とするアメーバが増え、その結果細菌は減る。3. アメーバは餌である細菌が減ると減るが、細菌が減った結果、老廃物が増えはじめ1.の状態に戻る [18]。このように老廃物－細菌－アメーバは一本の鎖でつながっているわけである。老廃物－細菌－アメーバの間の食物連鎖を利用した浴槽水の浄化方法が「生物浄化」である。濾材に微生物を定着させた濾過器に浴槽水を通過させることで入浴者に由来する老廃物を細菌に処理させ、細菌はアメーバに処理させるわけである。たとえば、大腸菌群は老廃物を栄養源として消費し、増殖した大腸菌群はアメーバに食べられ消化されてしまうので、結局老廃物も大腸菌群も減少するという結果になる。このように生物浄化は大腸菌群の処理には非常に有効である。しか

し、細菌がレジオネラの場合はアメーバの中で消化されず、逆に増殖するので生物浄化はレジオネラの培養器のようになってしまうのである。Fig. 4A に細菌捕食性原虫の一つであるアカントアメーバの中で増殖しているレジオネラを示した。このようなレジオネラが寄生・増殖する原虫との共存関係を断ち切ることがレジオネラ症防止に重要となる。したがって原虫(アメーバなど)を除去するため、濾過器の逆洗と消毒、配管の洗浄を行うことはレジオネラ症の大切な防止対策になる。また、「老廃物をためないこと」、すなわち完全換水することが最も基本的なレジオネラ症防止対策である。Table 6 に示しているように老廃物の量が少なければ細菌もアメーバも数が減少するからである。改正された「公衆浴場における衛生管理要領」には「連日使用型循環浴槽水は1週間に1回以上定期的に完全換水を行う」よう明記されている。

レジオネラはバイオフィーム(生物膜、いわゆるヌメリ)を形成すると報告[19]されており、この中にはしばしばアメーバや他の細菌が共生するためレジオネラは増え易いと考えられている[20]。一般にバイオフィームは

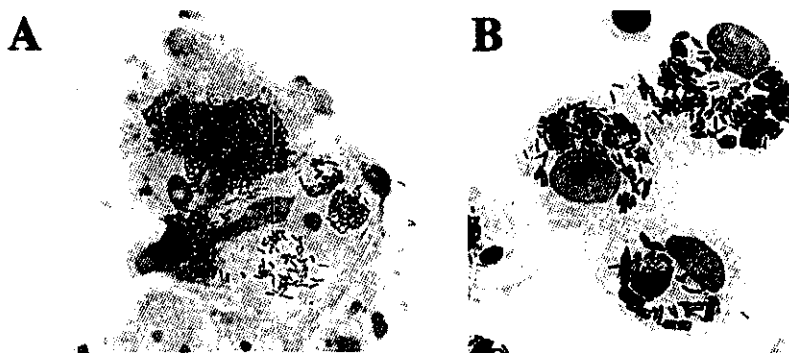


Fig. 4. アカントアメーバ(A)とモルモットの腹腔マクロファージ(B)内で増殖するレジオネラ。実験的にレジオネラを感染させ、2日後のヒメネツ染色像。レジオネラがピンク～紫に染色されている。

3段階の過程を経て生成される。まず、水に溶けているタンパクやイオンなどの老廃物が浴槽水と接している浴槽壁や循環水の流れるパイプの壁などに吸着する。次に、レジオネラやアメーバなどの微生物がそれらの老廃物が付着している壁に付着する。最後に、付着した微生物は壁に付着している老廃物を栄養源として増殖を開始するが、増殖中にレジオネラは多糖体ポリマー(ムコ多糖)を分泌し、フィルム状物質を形成するのである。その結果、レジオネラはムコ多糖に覆われた状態で壁に定着してしまう。このような状態になると、塩素などの殺菌剤が菌に直接届きにくいことになり、いくら消毒してもレジオネラが浴槽水から検出されることになる。殺菌を免れたバイオフィーム中の菌が浴槽水に供給されるからである。そのような理由で、浴槽壁や配管壁に付着するバイオフィームを物理的・化学的に洗浄し、取り除くことがレジオネラ症を防止するためには大切となる。

レジオネラ症とその現況

レジオネラ症は肺炎型(在郷軍人病, レジオネラ肺炎)と非肺炎型(ポンティアック熱)の2種類の病型に分類される。Table 7にレジオネラ症の2つの臨床像(症状)を示した

[21]. レジオネラを含むエアロゾルを吸い込むことで感染が起きる。どちらも病初期には発熱, 頭痛, 筋肉痛を認めるが, レジオネラ肺炎の場合は肺炎により呼吸困難に陥る。レジオネラ肺炎患者の3分の1は下痢, 嘔吐などの消化器症状を伴い, また2分の1には意識混濁などの中枢神経障害が認められる。なぜ消化器症状や中枢神経症状が出るのかはよくわかっていない。潜伏期は2~10日と幅があり, 潜伏期は吸入菌量と関係していると考えられている。細菌性肺炎の際に一般的に最初に使われるベータ・ラクタム剤がレジオネラ肺炎に無効であり, 病気の進行が早いいため薬の変更が遅れると手遅れとなり死に至ることもある。致命率は5~15%と高いものであるが, レジオネラ肺炎に有効な抗生物質は既に複数のもので開発されており, 実際に使用されている。現在のところこれらの薬の効かないレジオネラ(薬剤耐性菌)はまだ見つかっていないので, 早期の診断と治療開始が重要である。

レジオネラがヒトに肺炎を引き起こすことができる原因も明らかにされている。我々の体には細菌などの外来異物に対抗するため, 殺菌機構を持った細胞が生来備わっている。細菌を食べ, 消化・殺菌してしまう細

Table 7. レジオネラ症の臨床像

レジオネラ肺炎 (在郷軍人病)	ポンティアック熱
高熱	発熱
頭痛	頭痛
筋肉痛	筋肉痛
呼吸困難	全身倦怠感
下痢, 嘔吐	咳
意識混濁	胸痛
腎・肺機能障害	

胞で、大食細胞(マクロファージ)と呼ばれる。大腸菌なら30分程度で殺してしまう能力を持っている。ところがレジオネラは肺に備わっているマクロファージの消化・殺菌機構に抵抗し、その細胞内で逆に増殖することができるのである。この性質を専門的には細胞内増殖能という。Fig. 4Bにマクロファージ内で増殖しているレジオネラを示したが、アメーバ内で増殖している像(Fig. 4A)とよく似ていることに気づくと思う。電子顕微鏡を使用してその増殖像を比較するとリボソームの集合した食胞の存在など共通点があることがわかっている[22]。また、レジオネラがマクロファージ内で増殖するために必要な遺伝子群はアメーバの中で増殖する際にも必須であることもわかっている[23]。レジオネラは同じ遺伝子を使い、自然界ではアメーバの中で増殖し、ヒトに感染するとマクロファージの中で増殖するわけである。細胞内増殖能を失ったレジオネラは肺炎を起こすことができない無害なレジオネラ(弱毒株)になるので、細胞内増殖能が病気を起こす要因(病原因子)と考えられている。

一方、ポンティアック熱はインフルエンザ様の症状だけで終始し、肺炎に至ることはなく治療を受けなくても自然に治る。ポンティアック熱という病名は最初に本症が発生した場所(米国ポンティアック)に由来している。1994年には東京の某企業研修センターにおいて日本で最初のポンティアック熱の集団発生が確認された。冷却塔水中で増殖したレジオネラが原因となって45名の会社研修生がポンティアック熱を発症した[24]。同じレジオネラが一方では肺炎を起こし、一方ではインフルエンザのような症状のみで終わり、肺炎を起こさないという点に関しては現在よくわかっていない。

また、レジオネラに感染しても何の症状も発病しない不顕性感染もある。家庭用24

時間風呂使用者110名と非使用者94名を対象としたレジオネラ感染の調査(抗体検査)では使用者は49.1%が抗体陽性であった。一方、非使用者の抗体陽性率は18.1%で、使用者は非使用者に比べ統計学的に有意に感染率が高かった。しかし、全員が不顕性感染であった[25]。調査対象者の平均年齢が41歳と比較的若く体の抵抗力が強かったことや吸入した菌数が少なかったことが推測された。

1999年4月に感染症に関する法律が改正・施行され、レジオネラ症と診断した医師は患者の発生を保健所に届出なければならなくなった(4類感染症)。その結果、以前に比べ正確にレジオネラ症の発生状況を把握できるようになった。1999年4月より2001年12月までの2年9カ月の間に日本でレジオネラ症と診断された患者は294名であり、男性が83%、女性が17%で、男性に多く、全体の死亡率は6.3%であった。50歳以上の患者が全体の約84%を占めている[26]。欧米では空調冷却塔水が感染源であることが多いので空調の運転時期である夏に患者の発生が多くなるが、日本では患者の発生に季節変動は無かった。若い頃に比べ体の抵抗力の落ちてくる中高年層が入浴施設を利用し、感染、発病することが多いのが日本のレジオネラ症の特徴といえるであろう。

DNA解析による感染源の同定

Table 1 にあげた感染事故はすべて入浴施設が感染源と同定(決定)されたものである。具体的に感染源の同定がどのように行われているのかについて触れてみる。たとえ肺炎を発症する直前の2週間(レジオネラ肺炎の潜伏期は2~10日)に入浴施設を利用していたとしても、レジオネラは自然界にありふれた細菌であるので、自然界での棲息場所から感染したかもしれないし、ビルの空調冷却塔水から感染した可能性もある。発病直前2週間