

酸化塩素の使用も選択肢にあげられる。
参考として、レジオネラ属菌に対して pH8.7 の条件で、次亜塩素酸ナトリウム (0.5mg/L asCl) 、 B C D M H

(0.5mg/L asCl) 、二酸化塩素 (0.5mg/L) を作用させた場合の殺菌効果のデータを示す。

菌数単位 CFU/mL	開始時	5 分後	30 分後
次亜塩素酸 Na	4.1×10^5	3.5×10^4	<10
B C D M H	4.1×10^5	2.5×10^2	<10
二酸化塩素	4.1×10^5	<10	<10

この結果、接触 5 分後の殺菌効果に薬剤による違いがあらわれている。この試験条件の場合、二酸化塩素が最も殺菌効果が強く、次いで BCDMH、次亜塩素酸 Na の順になっている。

高 pH 温泉水における二酸化塩素の有効性については、今後、実際の温泉水における効果データを蓄積することが望まれる。この他、紫外線殺菌装置により循環水の殺菌を行い、定期的な洗浄消毒との併用も有効と考えられる。

2) アンモニウムイオンを含む泉質の場合

アンモニウムイオンは、塩素剤と結合して結合型塩素(クロラミン)を生成し、殺菌効果を弱くする。クロラミンにも殺菌効果はあるが、遅効性でその程度は遊離塩素の数 10 分の一程度とされている。従って、結合型塩素の状態では浴槽水を管理する場合は、次第に浴槽系にバイオフィームが付着してくる可能性が高いので、洗浄消毒を頻繁に実施する必要がある。消毒洗浄の間隔は施設にもよるが長くても 7 日以内に実施する。一方、最近ではバイオフィーム内への浸透性は遊離の次亜塩素酸に比

べて結合型の方が良いとの評価もある。

アンモニウムイオンが存在する時、塩素剤の殺菌効果を発揮させるためには、ブレイクポイント処理を行いアンモニウムイオンを窒素にまで分解する。このためにはアンモニウムイオンの 10 倍以上の塩素の添加が必要となる。ブレイクポイント以上の塩素剤の添加は、全て遊離残留塩素となり殺菌効果を発揮する。ブレイクポイント処理を浴槽水中で行なうことは、塩素剤の注入量制御、反応時間の確保、過剰の遊離塩素の処理などの課題があり実際にはかなり困難である。

二酸化塩素は、アンモニウムイオンと結合しないので、アンモニウムイオンが存在しても有効に作用するとされている。アンモニウムイオンを含有する温泉水における二酸化塩素の有効性については、今後、実際の温泉水における効果データを蓄積することが望まれる。

この他、紫外線殺菌装置により循環水の殺菌を行い、定期的に洗浄消毒を併用する対応も有効と考えられる。

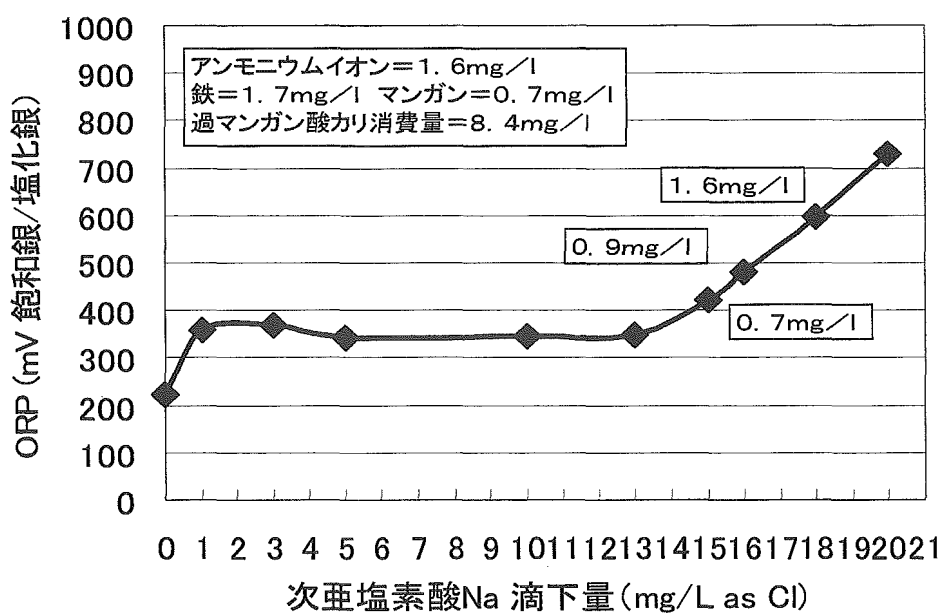
3) 過マンガン酸カリウム消費量を含

有する場合

塩素剤や臭素剤、二酸化塩素などの酸化性殺菌剤が過マンガン酸カリウム消費量成分と反応して浴槽水中で残留しない場合がある。対策として、薬剤の添加量を増やして酸化剤成分(塩素や臭素)を残留させる考えがあるが、酸化剤の消費量が多い場合は過剰注入にならないように連続的な残留塩素濃度監視と制御を行なう必要がある。したがって、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を安定して適正な範囲に維持するのはか

なり困難を伴う。特に、硫化物イオンを含む温泉水の場合は塩素剤の消費量が多く、反応も早い場合があるので対応が困難である。同じ過マンガン酸カリウム消費量成分であっても、フミン質などの有機物を含有する場合は、アンモニウムイオンを含む場合も多く、反応は複雑である。例として、茨城県の温泉水に塩素剤を添加した場合の酸化還元電位の挙動を示す。泉質は、以下の通りである。(単位：pH、電気伝導率以外は mg/L)

項目	値
pH	7.8
電気伝導率(mS/m)	1700
カルシウム硬度	750
塩化物イオン	6200
鉄	1.7
マンガン	0.7
アンモニウムイオン	1.6
過マンガン酸カリウム消費量	8.4



遊離残留塩素が検出され始めるのは、ブレイクポイントを過ぎた 16mg/L 添加後付近からである。この濃度から、酸化還元電位 (ORP) も徐々に上昇しており、浴槽水自体の殺菌力が高くなっていることを示している。また、次亜塩素酸 Na を 5mg/L 程度添加した時点で、DPD 法では残留塩素が 2mg/L 以上検出された。この時の ORP 値は低く、十分な殺菌効果は得られない状態と考えられる。こうした温泉水では塩素剤処理を行なう場合は、ORP 値も参考として添加量管理を行なうことが望ましい。塩素剤による殺菌力が強くな

4) 鉄、マンガンを含む場合

鉄、マンガンを含む温泉水に塩素剤などの酸化性殺菌剤を添加すると、反応して酸化鉄のフロックや二酸化マンガンの黒色の着色が生成する。これらは、ろ過や清掃により除去する。塩素剤などは鉄、マンガンの酸化を促進するが、非酸化性の殺菌剤は酸化を促進しない。このため鉄、マンガンのフロック汚れ対策として有機系の殺菌剤である、第 4 級アンモニウム塩化合物などの使用が考えられるが、人体に対する影響などに十分に配慮する必要がある。

5) pH が低い場合

pH が 3 以下の場合、レジオネラ属菌が存在しない可能性が高いので、定期的なレジオネラ属菌検査で不検出を確認する。

pH が 3 以上、5 以下の場合、塩素剤を添加すると添加量にもよるが、塩

素 ORP 値の目安としては 600mV (飽和銀/塩化銀) 程度以上と考えられる。

過マンガン酸カリウム消費量を含む温泉水では、塩素などの酸化性殺菌剤を消費するため、非酸化性の殺菌剤が有効であると考えられる。

この場合、第 4 級アンモニウム塩化合物などの使用が考えられるが、人体に対する影響などに十分に配慮する必要がある。

この他、紫外線殺菌装置により循環水の殺菌を行い、定期的に洗浄消毒を併用する対応も有効と考えられる。

素ガスを発生する可能性があるので、塩素剤による処理を行なわないことが望ましい。

第 4 級アンモニウム塩化合物などの有機系殺菌剤の使用が考えられるが、人体に対する影響などに十分に配慮する必要がある。また、紫外線殺菌装置により循環水の殺菌を行い、定期的に洗浄消毒を併用する対応も有効と考えられる。

4. まとめ

- 浴槽の水源に水道水又は水道水並みの水質の水を使用している場合は、塩素剤による消毒が有効であり、通常 0.2~0.4mg/L の遊離残留塩素濃度を維持する。
- 温泉水では泉質により塩素剤による消毒が有効でない場合がある。その場合は各泉質に応じた対応をとるが、定期的な洗浄消毒を組み合わせることで浴槽水の殺菌効果の低さを補完

することが重要である。

- 二酸化塩素による処理、有機系殺菌剤による処理、紫外線殺菌装置による処理は今後、実機での評価データを蓄積することが望まれる。

D. 文献

古畑勝則，原元宣，吉田真一，福山正文；温泉浴槽水におけるレジオネラ属菌の生息状況．感染症誌 2004；78：710－716

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

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

循環式浴槽における浴槽水及び浴室空気中の消毒副生成物に関する研究

分担研究者 神野 透人 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部第一室
研究協力者 高橋 淳子 食品薬品安全センター秦野研究所
香川 聡子 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部第一室
大河原 晋 武蔵野大学薬学部

研究要旨 都内5カ所の公衆浴場において、施設内の空気及び浴槽水・シャワー水中のトリハロメタン類 (THMs) 濃度に関する調査を実施した。浴室空気中の CHCl_3 濃度は $45 \sim 200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、であり、何れの施設においてもTHMs濃度は $\text{CHCl}_3 \gg \text{CHBrCl}_2 > \text{CHBr}_2\text{Cl} > \text{CHBr}_3$ の順であった。浴槽水中のTHMs濃度も概ね $\text{CHCl}_3 \gg \text{CHBrCl}_2 > \text{CHBr}_2\text{Cl} > \text{CHBr}_3$ であり、入浴客が公衆浴場で塩素消毒で生じたと考えられる比較的高濃度の CHCl_3 に経気道的及び経皮的に暴露されている実態が明らかになった。

A. 研究目的

循環式浴槽を使用する公衆浴場等の施設ではレジオネラ症防止対策として塩素消毒が行われている。水道水の浄水処理等において塩素系消毒剤が水中の有機物と反応してトリハロメタン類 (THMs)に代表される消毒副生成物を生じることが周知の事実である。したがって、適切な衛生管理が行われなければ公衆浴場においても経気道的あるいは経皮的な経路で入浴客が高濃度の消毒副生成物に暴露される可能性が懸念される。そこで、本研究では都内5カ所の公衆浴場の協力を得て、施設内の空気及び浴槽水・シャワー水中のTHMsに関する実態調査を行った。

B. 研究方法

Sampling

平成17年12月に、東京都内・城東地区の公衆浴場5施設において脱衣場及び浴室（洗い場並びに浴槽近辺）の空気採取した。携帯型ポンプ（柴田化学製MP-Σ30）を床上約1.2 mの位置に設置し、脱衣場及び浴室内の空気を75 ml/minの流速で10分間吸引し、直列に接続した2本のTenax TA管 (Supelco, 1/4" × 3.5")でTHMsを捕集した。

空気のサンプリングと並行して、水中THMs測定用及び微生物学的な水質検査用に浴槽水

及びシャワー水を採水した。

Thermal Desorption - gas chromatography/mass spectrometry (TD - GC/MS)

Tenax TA管で捕集したTHMsのTD-GC/MS分析には島津製作所製加熱脱着装置TDTs-2010及びGC/MS QP-2010を使用し、表1に示した条件で測定を行った。

表1 TD-GC/MSの分析条件

Thermal Desorption

脱着： 280°C, 60 ml He/min, 10 min
トラップ冷却： -15°C
トラップ加熱： 280°C, 10 min
スプリット比： 25

GC

カラム： Rtx-1 (0.32 mm×60 m, 1 μm)
キャリアガス： He, 2.35 ml/min (39.1 cm/sec)
カラム温度： 40°C-5°C/min-140°C-20°C/min-250°C
インターフェース： 250°C

MS

イオン源温度： 200°C
測定イオン： CHCl_3 , m/z 83, 85
 CHBrCl_2 , m/z 83, 85
 CHBr_2Cl , m/z 127, 129, 131
 CHBr_3 , m/z 171, 173, 175

Headspace - GC/MS

Headspace - GC/MSによる浴槽水及びシャワー水中のTHMs分析にはPerkinElmer製HS-40及びQO-2010を使用し、表2に示した条件で測定を行った。

表2 Headspace-GC/MSの分析条件

Headspace	
加圧時間:	3 min
注入時間:	0.12 min
ニードル温度:	150°C
トランスファー	200°C
ライン温度:	
GC	
カラム:	DB-624 (0.27 mm×30 m, 1.4 mm)
カラム温度:	50°C(3.5 min)-25°C/min-115°C- 40°C/min - 220°C
インターフェース:	250°C
MS	
イオン源温度:	200°C

C. 研究結果

調査を実施した5カ所の公衆浴場の空气中及び浴槽水・シャワー水中のTHMs濃度を図1に示した。施設A - 施設DのBathtub 1は通常の浴槽

であり、施設A及び施設DのBathtub 2は「薬湯」、施設CのBathtub 2は「ステビア草湯」、施設EのBathtub 1は「備長炭湯」である。

5施設の浴室空气中のTHMs濃度は、CHCl₃ 45~200 µg/m³、CHBrCl₂ 3.8~17 µg/m³、CHBr₂Cl 2.5~11 µg/m³、CHBr₃ 1.0~4.4 µg/m³であり、CHCl₃がTotal THMsの大部分を占めることが明らかになった。浴槽水についても同様の傾向がみられ、THMs濃度は概ねCHCl₃ >> CHBrCl₂ > CHBr₂Cl > CHBr₃の順であった。これに対し、水道水中のTHMs濃度を反映するシャワー水では何れの施設でもCHBr₂Cl濃度が最も高く、浴槽水で検出されたCHCl₃が公衆浴場での塩素消毒によって生成したものであることを示唆する結果が得られた。

化学的及び微生物学的水質検査結果をそれぞれ表3、表4に示した。浴槽水中からCHCl₃が極めて低い濃度 (0.3 µg/l)でしか検出されなかった施設Aの「薬湯」(Bathtub 2)では残留塩素が検出されず (表3)、大腸菌・大腸菌群に加えてレジオネラ属菌によって浴槽水が汚染されていることが明らかになった。

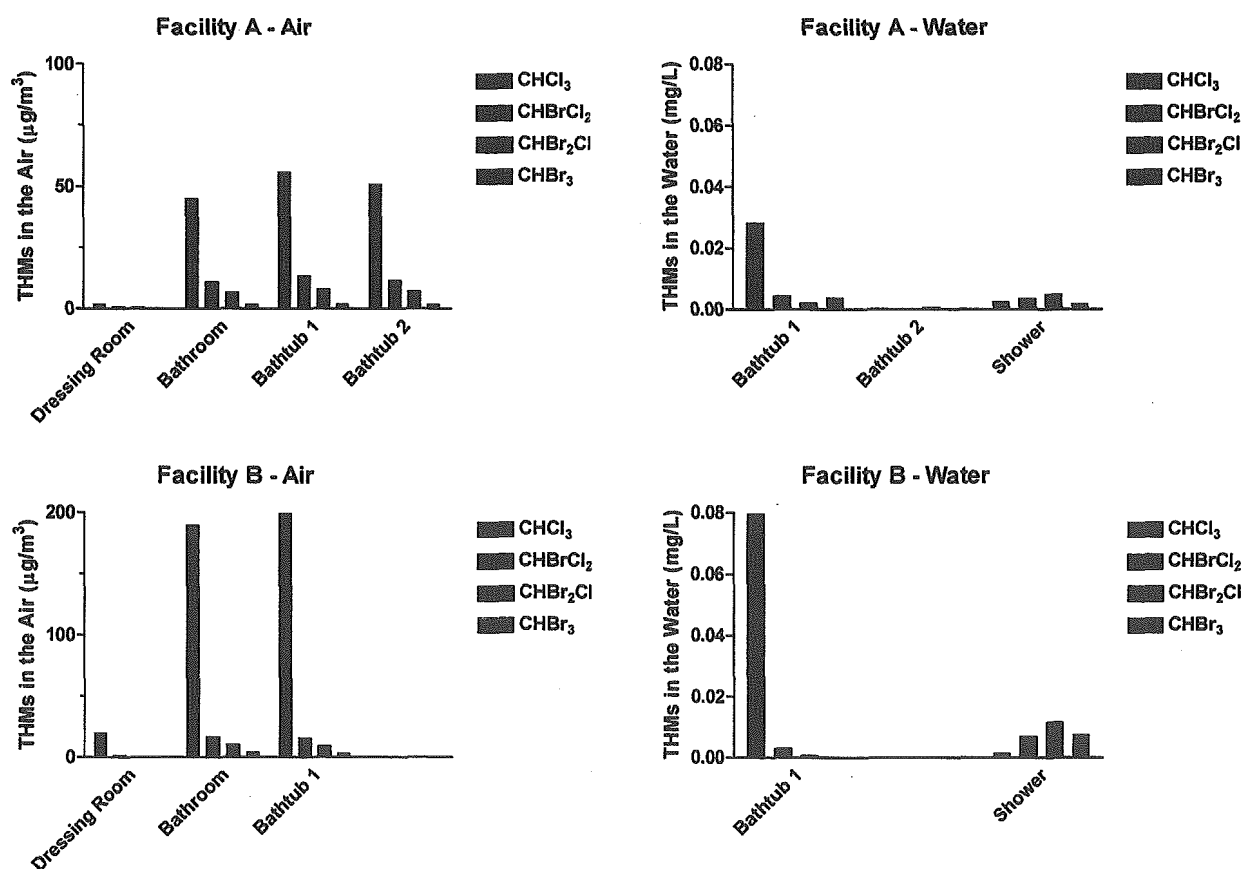


図1 公衆浴場の空气中及び浴槽水・シャワー水中のTHMs濃度

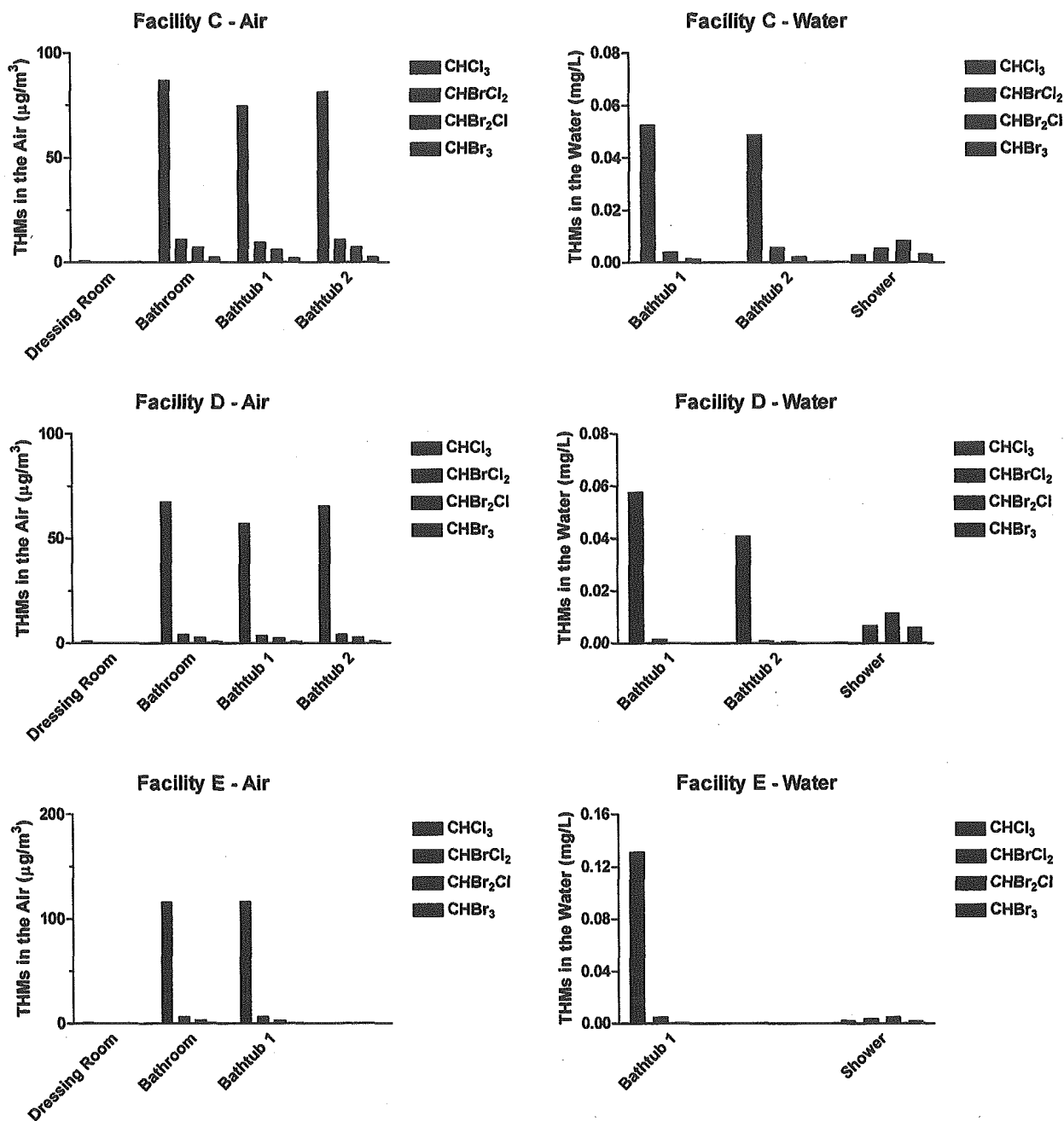


図1 公衆浴場の空気中及び浴槽水・シャワー水中のTHMs濃度（続き）

D. 考察

著者らが一般の12家庭を対象に行った調査の結果では、入浴時の浴室内THMs濃度(中央値)はCHCl₃, 17.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、CHBrCl₂, 12.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、CHBr₂Cl, 9.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、CHBr₃, 1.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、今回調査を実施した公衆浴場ではCHCl₃濃度(45~200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)のみが突出して高い傾向が認められた。最高のCHCl₃濃度(200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)は狭小なユニットバスでシャワー入浴をした場合に匹

敵する値である。

「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」(厚生労働省告示第264号)では浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して記録し、通常0.2 - 0.4 mg/l 程度に保ち、かつ最大で1.0 mg/l を超えないように努める等適切に管理を行うとともに、消毒装置の維持管理を適切に行うこととされている。今回の調査では浴槽水の残留塩素濃度が1.0 mg/l を超えた公衆浴場が3施設あり、最高は4.0 mg/l であつ

表3 浴槽水及びシャワー水の化学的な水質検査結果

	pH	残留塩素 (mg/l)	色度 (度)	濁度 (度)	臭素酸 (mg/l)	シアン化物 塩化シアン (mg/l)	KMnO ₄ 消費量 (mg/l)	アンモニア性 窒素 (mg/l)
A Bath tub 1	7.4	1.3	0.1	0.03	0.0086	<0.0003	4.4	0.03
Bath tub 2	7.4		5.9	2.43	0.0006	<0.0003	6.2	0.52
Shower	7.3	0.05	-	-	0.0010	0.0005	-	<0.03
B Bath tub 1	7.5	1.0	0.2	0.06	0.0292	<0.0003	14.7	0.60
Shower	7.4	0.1	-	-	0.0010	<0.0003	-	<0.03
C Bath tub 1	7.4	1.5	0.2	0.01	0.0121	<0.0003	8.1	0.14
Bath tub 2	7.2	0.5	18.6	4.25	0.0097	0.0008	9.6	0.41
Shower	7.4	0.1	-	-	0.0018	<0.0003	-	<0.03
D Bath tub 1	7.8	0.8	0.7	0.71	0.0456	0.0006	18.5	1.09
Bath tub 2	7.2	0.6	34.3	2.86	0.0123	0.0024	33.5	1.20
Shower	7.3	0.05	-	-	<0.0003	<0.0003	-	<0.03
E Bath tub 1	7.0	4.0	0.4	0.00	0.1386	0.0078	5.6	0.10
Shower	7.4	0.05	3.0	0.51	0.0021	0.0009	1.8	0.05

表4 浴槽水及びシャワー水の微生物学的水質検査結果

	一般細菌 (/ml)	大腸菌群 (/50 ml)	大腸菌 (/50 ml)	レジオネラ属菌 (CFU/100 ml)
A Bath tub 1	0	不検出	不検出	< 10
Bath tub 2	88,880	検出	検出	1,200
Shower	-	-	-	-
B Bath tub 1	0	不検出	不検出	< 10
Shower	-	-	-	-
C Bath tub 1	0	不検出	不検出	< 10
Bath tub 2	0	不検出	不検出	< 10
Shower	-	-	-	-
D Bath tub 1	0	不検出	不検出	< 10
Bath tub 2	0	不検出	不検出	< 10
Shower	-	-	-	-
E Bath tub 1	0	不検出	不検出	< 10
Shower	0	不検出	不検出	< 10

た。このような過度の塩素消毒が浴槽水あるいは浴室空気のTHMs濃度を増加させる要因であり、例え一過性であるにしても高濃度のTHMs暴露を回避するためには塩素消毒ばかりではなく施設の換気等も含めた適切な維持管理が望まれる。

今回の調査で対象とした公衆浴場はいわゆる「毎日完全換水型」の施設であり、「連日使用型」の施設についても消毒副生成物に対する暴露実態の把握が必要であろう。

E. 結論

公衆浴場5施設について浴室空気中及び浴槽水・シャワー水中のTHMs濃度を測定し、何れの施設にでも塩素消毒で生成したCHCl₃が他のTHMsと比較して突出して高い濃度で存在することが明らかになった。公衆浴場は日常的・恒常的に利用する機会の多い施設であり、不要の化学物質暴露を避けるためには施設の換気等も含めた維持管理の見直しが必要であると考えられる。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

浴室内における消毒副生成物の曝露評価—
浴槽水および浴室空気中における消毒
副生成物の消長について—, 高橋淳子,
村山志帆, 宇津木祥子, 小島幸一, 栗原
綱義, 渡辺実, 青木信道, 大沢高温, 菅
原英治, 田幡憲一, 佐久間豊夫, 松本秀
章, 矢根五三美, 鈴木茂雄, 神野透人,
高鳥浩介, 第33回建築物環境衛生管理全
国大会, 2006年1月, 東京

H. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

なし

厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)
分担研究報告書

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

(浴槽水におけるレジオネラ属菌の平成17年度の検出状況、特に *Legionella pneumophila* 血清群1について)

主任研究者：遠藤卓郎 (国立感染症研究所寄生動物部)
分担研究者：倉 文明 (国立感染症研究所細菌第一部)
研究協力者：前川純子、常 彬 (国立感染症研究所細菌第一部)
鈴木敦子、市瀬正之 (東京都予防医学協会検査研究センター)

(研究要旨) 近年いくつかのレジオネラ症の集団感染事例を通じて、循環式浴槽の塩素消毒が進み、相対的にレジオネラ属菌の検出率は低下してきている。一方、その集団感染事例の起因菌となってきた *Legionella pneumophila* 血清群1の分離株に占める割合は、増加傾向にあった(昨年度報告)。平成17年度に分離された浴槽水由来株294株の98.3%は *Legionella pneumophila* で、33.0%が血清群1で、群別不能株(UT)(22.1%)と血清群5,6(それぞれ15.3%)が多かった。平成8~12年度、平成13年度に比べ、平成17年度は浴槽水分離株の内、*Legionella pneumophila* 血清群1の割合が増え、検体当りのレジオネラ属菌の陽性率は低下しているにも関わらず、*Legionella pneumophila* 血清群1の陽性率は低下していない。

A. 研究目的

近年いくつかのレジオネラ症の集団感染事例を通じて、循環式浴槽の塩素消毒が進み、相対的にレジオネラ属菌の検出率は低下してきている。浴槽水のレジオネラ陽性率は平成8年の85%から平成12年の47%まで漸減してきた(鈴木敦子ら、感染症学雑誌76巻、703頁、平成14年)。一方、平成12年静岡県、茨城県及び14年宮崎県(論文発表3参照)、鹿児島県の循環式浴槽における集団感染事例の起因菌となってきた *Legionella pneumophila* 血清群1の年度別の推移はこれまで明らかでなかった。そこで、平成13~14年度に引き続き平成17年4月~12

月の浴槽水のレジオネラ属菌株を詳細に同定し、*Legionella pneumophila* 血清群1の推移を考察した。

B. 研究方法

検体採取、搬入、保存、検査方法は、鈴木敦子ら(感染症学雑誌76巻703頁、平成14年)によった。平成17年4月~12月に東京都予防医学協会で検査された日本全国4,651検体(内浴槽水は3,481検体;表1)のうち626検体(内浴槽水は380検体;表1)からレジオネラ属菌が分離され、一時冷蔵保存された466株内について同定した。これらの466株の内訳は、浴槽水由来294株、

冷却塔水由来 166 株、その他 6 株（給湯水、及び温泉タンク水由来）だった（表 1）。

分離されたレジオネラ属菌コロニーの同定は、1) Oxoid 社のレジオネラ・ラテックステスト (*Legionella pneumophila* 血清群 1、*Legionella pneumophila* 血清群 2-14、レジオネラ属の 3 種のラテックス) 2) デンカ生研のレジオネラ免疫血清 (*Legionella pneumophila* 血清群 1 から 15 の 15 種類、*L. micdadei*、*L. bozemanii* 血清群 1、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、以上 19 種類) によるスライド凝集反応、という血清学的同定、3) 極東製薬工業の DDH レジオネラ極東 (DNA-DNA ハイブリダイゼーション用キット)、4) レジオネラ属特異的な 5SrRNA プライマーと、*Legionella pneumophila* 特異的な *mip* プライマーによる PCR (国立感染症研究所、地方衛生研究所全国協議会編、病原体検出マニュアル、レジオネラ症平成 15 年 8 月 29 日改訂版)、5) 16SrRNA の遺伝子の部分配列決定 (論文発表 3 参照) 等の遺伝学的な同定、3) 長波紫外線 365nm による自発蛍光の観察、によった。まず自発蛍光の有無を確認し、ラテックス凝集反応により菌株を大別した。さらに、デンカ生研の特異免疫血清で凝集しない株あるいは、複数に凝集した株は、PCR により *Legionella pneumophila* かどうかを鑑別し、DNA-DNA ハイブリダイゼーションで確認した。

(倫理面への配慮) 実験動物やヒトへの検査は含まれていない。また、環境株の分離施設は特定されないようにデータを整理してあるので、倫理面の配慮はなされている。

C. 研究結果

平成 17 年 4 月～12 月に東京都予防医学協会会で検査された浴槽水の 10.9%、冷却塔水

の 28.3%からレジオネラ属菌が検出された (表 1)。分離された浴槽水由来株 294 株の 98.3%は *Legionella pneumophila* で、血清群 1(33.0%)、群別不能株 (UT) (22.1%)、血清群 5 及び 6(それぞれ 15.3%)が多かった(表 2、表 3、図 1)。一方、冷却塔水由来株は、浴槽水の分布パターンとは異なり血清群 1、7 がそれぞれ 59.0%、22.3%と多く、その他は 7%未満と少なかった(表 2、表 4、図 1)。

浴槽水検体当たりの陽性率は、1996.04-2000.11、2001 年度、2005.04-12 の 3 つの期間で、浴槽水では 48.0%、28.6%、10.6%と次第に減少した(表 3)。一方、冷却塔水の陽性率は、46.0%、45.9%、28.3%と最近になってようやく減少したが、浴槽水よりも陽性率が高かった(表 4)。菌種・血清群の分布は、浴槽水及び冷却塔水ともに、分離株にしめる *Legionella pneumophila* 血清群 1 の割合が増加した(図 2、図 4)。

以上の結果、*Legionella pneumophila* 血清群 1 以外の菌種・血清群のレジオネラ属菌の検体当たりの検出率が低下してきているにも関わらず、*Legionella pneumophila* 血清群 1 のみは検出率が低下しない傾向がみられた(図 3、図 5)。

D. 考察

これまで、浴槽水由来のレジオネラ属菌は、*L. pneumophila* 血清群 3-6 が多く、一方、冷却塔水由来のレジオネラ属菌は、*L. pneumophila* 血清群 1 が多いと報告されてきた。しかし、分離株に占める *L. pneumophila* 血清群 1 の割合は、浴槽水、冷却塔水ともに増加し、特に浴槽水で急増した(図 2、4)。検体当たりの陽性率が低下傾向にあることは、浴槽施設の衛生管理が向上していることを示しているが、*L. pneumophila* 血清群 1 の陽性率は低下していない。レジオネラ症

の多くがこの *L. pneumophila* 血清群 1 によることから、*L. pneumophila* 血清群 1 の陽性率が低下するような方策が望まれる。

浴槽水ではないが、海外で給湯水のレジオネラ属菌の汚染状況の調査 (Borella P 等、Emerging infectious Diseases 10:p457, 2004; Applied and Environmental Microbiology 71:p5805, 2005) において、遊離塩素濃度の高い給湯水で *L. pneumophila* 血清群 1 が他の血清群の *L. pneumophila* より多く検出されていることから、近年の塩素消毒が多用されてきた浴槽水で *L. pneumophila* 血清群 1 の増加が懸念される。日本の循環式浴槽でおきた大規模な集団感染事例がいずれも *L. pneumophila* 血清群 1 を起因菌としたことから注意が必要である。今後は、検体あたりの *L. pneumophila* 血清群 1 陽性率だけでなく、検体あたりの *L. pneumophila* 血清群 1 の濃度の推移を含めて明らかにしたい。

E. 結論

平成 17 年度に分離された浴槽水由来株 294 株の 98.3% は *Legionella pneumophila* で、33.0% が血清群 1 で、群別不能株 (UT) (22.1%) と血清群 5,6 (それぞれ 15.3%) が多かった。平成 8-12 年度、平成 13 年度に比べ、平成 17 年度は浴槽水分離株の内、大規模集団感染事例の起因菌である *Legionella pneumophila* 血清群 1 の割合が増え、検体当りのレジオネラ属菌の陽性率は低下しているにも関わらず、*Legionella pneumophila* 血清群 1 の陽性率は低下していない。

F. 健康危惧情報

確定的な情報はなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N, Watanabe H: Identification of a novel adhesion molecule involved in virulence of *Legionella pneumophila*. Infect Immun 73: 4272-4280, 2005.
- 2) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, and Watanabe H: *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan from a distinct genetic cluster. Microbiol Immunol 49:1027-1033, 2005.
- 3) 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 前川純子, 渡辺治雄, 八木田健司, 遠藤卓郎, 鈴木 泉: 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. 発症状況と環境調査、感染症誌 79(6):365-74、2005。
- 4) Kura F, Amemura-Maekawa J, Yagita K, Endo T, Ikeno M, Tsuji H, Taguchi M, Kobayashi K, Ishii E, Watanabe H: Outbreak of legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. Epidemiol Infect, 2006, in press.

2. 学会発表

- 1) Kura F, Kobayashi S, Amemura-Maekawa J, Aratani Y, Suzuki K, Watanabe H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Legionella pneumophila*. 6th International Conference on Legionella. October 2005, Chicago, USA.
- 2) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H: Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis and sequence-based typing (SBT) of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from Japan. 6th International Conference on Legionella. October 2005, Chicago, USA.

3)前川純子、倉 文明、常 彬、渡辺治雄：
Legionella pneumophila 血清群 1 の
sequence-based typing (SBT), 第 78 回日本細菌学会総会, 2005 年 4 月, 東京。

4) 倉 文明: レジオネラ感染症の現状と展望、特別講演、第 18 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会、2006 年 2 月、長野。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし。

その他 なし。

3. 総説

なし

表1. 2005年4月～12月のレジオネラ属菌の検出状況

	検査数	陽性数	菌株数	検査株数	(内訳)	
					<i>L. pneumophila</i> SG1	その他
浴槽水	3,481	380	394	294	97	197
冷却水	819	232	242	166	98	68
給湯水	123	8	8	3	0	3
プール水	137	0	0	0	0	0
水道水	23	0	0	0	0	0
井戸水	5	0	0	0	0	0
その他	63	6	6	3	0	3
合計	4,651	626	650	466	195	271

表2. 2005年4月～12月に分離されたレジオネラ属菌の種及び血清群

	浴槽水	冷却塔水	給湯水	温泉タンク水	合計
<i>L. pneumophila</i> SG1	97	98	0	0	195
SG2	0	0	0	0	0
SG3	18	5	0	0	23
SG4	6	0	0	0	6
SG5	45	2	2	0	49
SG6	45	1	0	0	46
SG7	0	37	1	0	38
SG8	2	1	0	0	3
SG9	4	0	0	0	4
SG10	3	1	0	0	4
SG11	1	0	0	0	1
SG12	1	0	0	0	1
SG13	0	2	0	0	2
SG14	1	0	0	0	1
SG15	1	0	0	0	1
<i>L. pneumophila</i> UT	65	11	0	0	76
<i>L. pneumophila</i> 合計	289	158	3	0	
その他のレジオネラ属菌	5	8	0	3	13
合計	294	166	3	3	466

表 3. 浴槽水のレジオネラ属菌の種類の変移

浴槽水	期間	<i>L. pneumophila</i>						<i>L. micdadei</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. bozemanii</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>Legionella</i> その他	合計
		SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6						
株数	1996.04 - 2000.11	30	8	116	46	178	86	0	1	0	0	62	527
	2001年度	108	8	70	64	138	75	8	2	1	1	101	576
	2005.04-12	97	0	18	6	45	45	1	1	0	0	81	294
全株に 対す る%	1996.04 - 2000.11	5.7	1.5	22.0	8.7	33.8	16.3	0.0	0.2	0.0	0.0	11.8	100.0
	2001年度	18.8	1.4	12.2	11.1	24.0	13.0	1.4	0.3	0.2	0.2	17.5	100.0
	2005.04-12	33.0	0.0	6.1	2.0	15.3	15.3	0.0	0.0	0.0	0.0	27.5	100.0
検体当 りの陽 性率 (%)	1996.04 - 2000.11	2.7	0.7	10.6	4.2	16.2	7.8	0.0	0.1	0.0	0.0	5.6	48.0
	2001年度	5.4	0.4	3.5	3.2	6.9	3.7	0.4	0.1	0.0	0.0	5.0	28.6
	2005.04-12	3.6	0.0	0.7	0.2	1.7	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	10.9

表 4. 冷却塔水のレジオネラ属菌の種類の変移

冷却塔 水	期間	<i>L. pneumophila</i>						<i>L. micdadei</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. bozemanii</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>Legionella</i> その他	合計
		SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6						
株数	1996.04 - 2000.11	138	1	11	50	7	6	4	1	3	0	205	426
	2001年度	110	0	1	49	4	5	0	0	1	0	56	226
	2005.04-12	98	0	5	0	2	1	0	0	0	0	60	166
全株に 対す る%	1996.04 - 2000.11	32.4	0.2	2.6	11.7	1.6	1.4	0.9	0.2	0.7	0.0	48.1	100.0
	2001年度	48.7	0.0	0.4	21.7	1.8	2.2	0.0	0.0	0.4	0.0	24.8	100.0
	2005.04-12	59.0	0.0	3.0	0.0	1.2	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	36.1	100.0
検体当 りの陽 性率 (%)	1996.04 - 2000.11	14.9	0.1	1.2	5.4	0.8	0.6	0.4	0.1	0.3	0.0	22.1	46.0
	2001年度	22.3	0.0	0.2	10.0	0.8	1.0	0.0	0.0	0.2	0.0	11.4	45.9
	2005.04-12	16.7	0.0	0.8	0.0	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	28.3

図 1

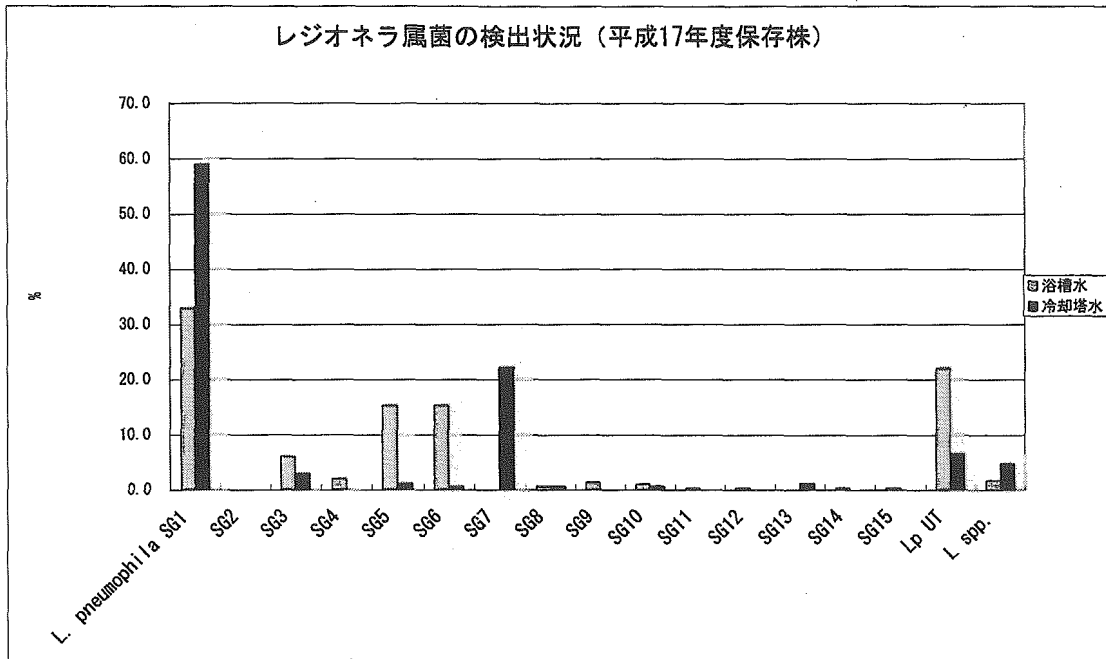


図 2

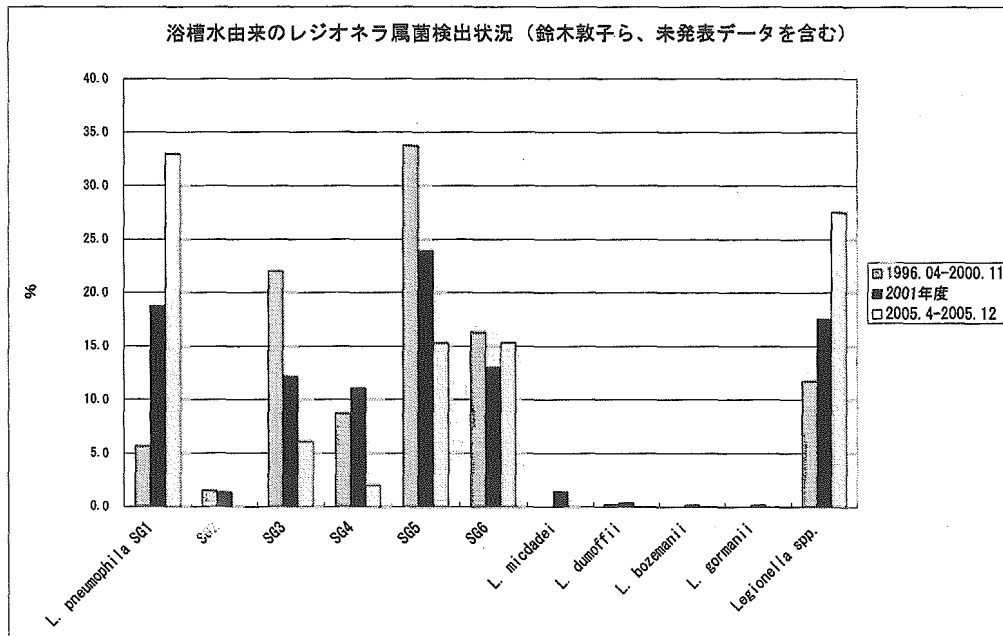


図 3

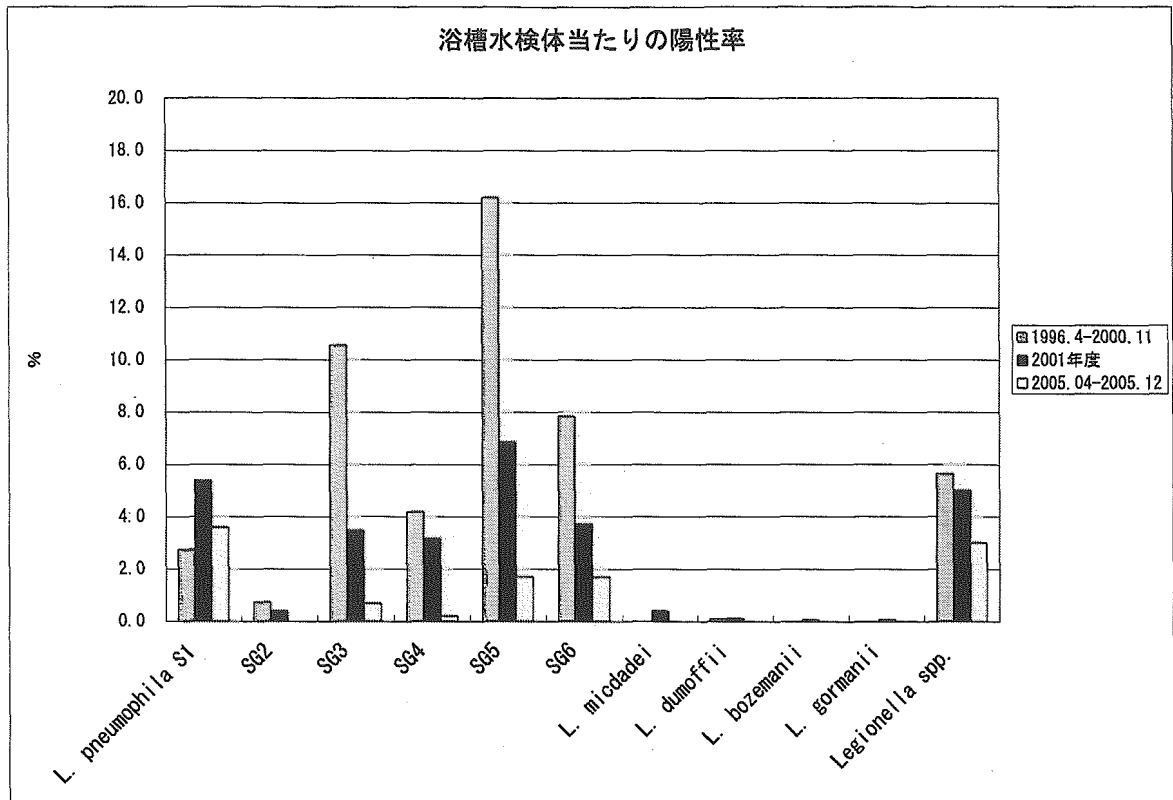


図 4

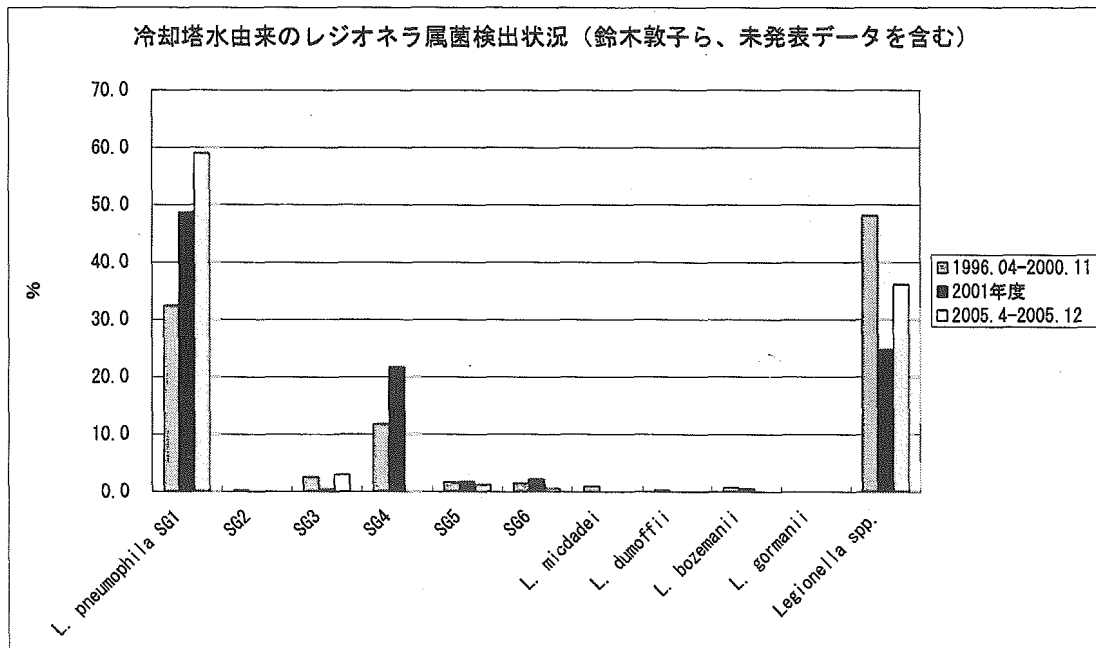
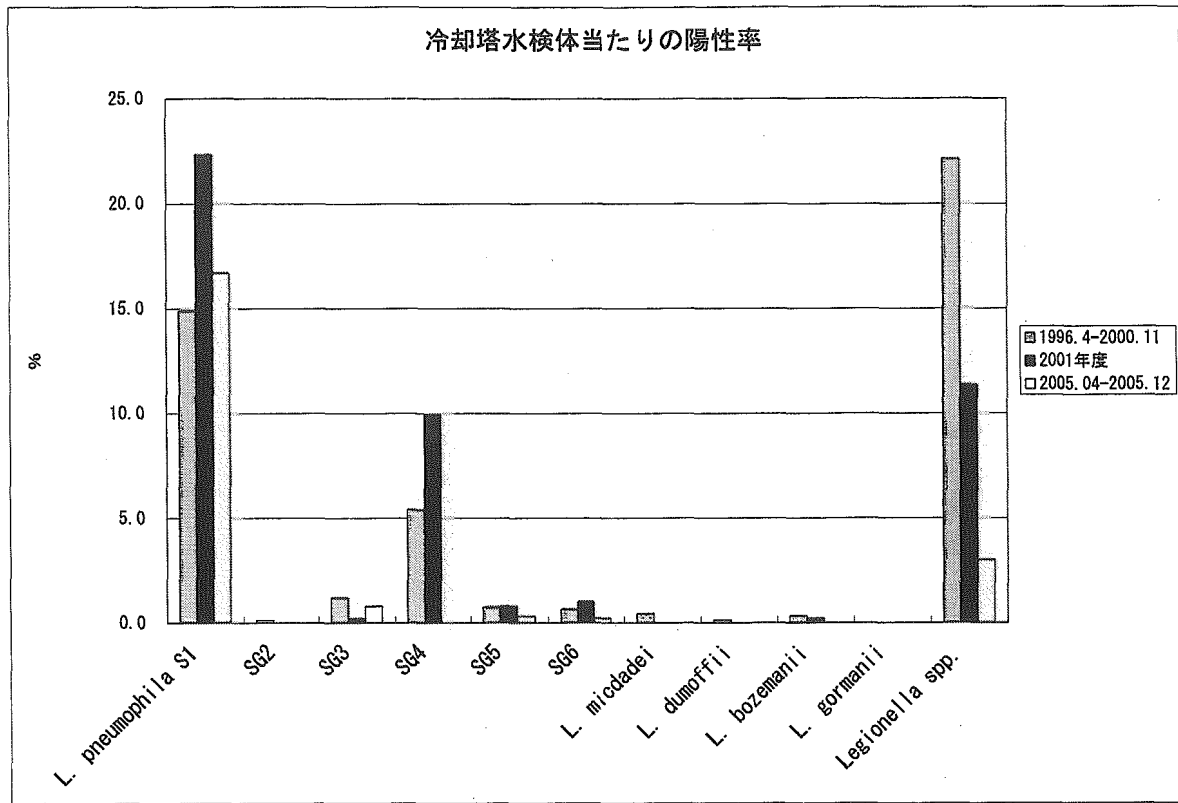


図 5



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

浴槽水より分離された抗酸菌の同定

主任研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部
分担研究者 山崎 利雄 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター病原微生物部
杉山 寛治 静岡県環境衛生科学研究所
大畑 克彦 静岡県環境衛生科学研究所
鈴木 光彰 静岡県環境衛生科学研究所

概要：健常人にとっては、ほとんどが日和見感染菌である抗酸菌は、自然界に広く分布している。循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化を検討する上に、浴槽水中にいかなる抗酸菌が存在するかの調査を行った。浴槽水 68 検体について分離培養を行ったところ、9 検体から抗酸菌 19 株が検出された。生化学的検査法、DDH 法、シークエンス法を行い、*Mycobacterium gordonae* 2 株、*M. avium* 11 株、*M. fortuitum* 1 株、*M. phlei* 4 株、未同定 1 株が同定された。結核菌(*M. tuberculosis*) は、検出されなかった。

A. 研究目的

結核菌以外の抗酸菌は、自然界に広く分布している。抗酸菌の中には、何らかの原因で細胞性免疫力が低下している人に感染して発病させる抗酸菌が存在するが、健常人にとっては、ほとんどが日和見感染菌である。従って抗酸菌が分離されたからといって即臨床的に問題とはならないが、以前、家庭用の 24 時間風呂から分離された抗酸菌が原因とされた例も存在するので、循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化を検討する上において、浴槽水中にいかなる抗酸菌が存在するかを明らかにすることは重要である。そこで、循環式浴槽水より抗酸菌の分離を行い、分離された抗酸菌の同定を行うことを目的とした。

B. 研究材料と研究方法

1、抗酸菌の分離と増菌培養

関東地方のホテル、旅館、又は公衆浴場等

より採取された浴槽水 200ml の遠心分離後の沈渣を、2ml の滅菌精製水に再懸濁した。この懸濁液 1ml に等量の 4%NaOH を加えて、室温で 20 分間処理後、このアルカリ処理液 0.1ml ずつを 2-3 本の 2%小川培地に接種し 36±1℃ で培養し、コロニーの出現状況を毎週観察した。コロニー陰性の場合には 8 週間まで培養した。検出された菌を、チール・ネルゼン染色法で抗酸菌である事を確認後、滅菌精製水で微濁浮遊液を 10 倍希釈系列で希釈し、それぞれの 0.1ml ずつを Middlebrook 7H10 寒天培地に接種し、5%CO₂ フランキ内で、36±1℃ で 2-3 週間培養後、単コロニーを釣菌し、1%小川培地に増菌した。

2、同定試験

生化学的検査法による同定試験は、極東抗酸菌鑑別セット（極東製薬工業）を用いた。試験操作法、観察判定日、観察判定法は、使用説明

書にしたがった。抗酸菌鑑別セット使用による同定試験は、発育速度、集落性状、着色、光発色性試験、p-ニトロ安息香酸(PNB) 500 µg/ml 含有培地上の発育、エタンブトール(EB) 5 µg/ml 含有培地上の発育、ピクリン酸(PA)0.2% 含有培地上の発育、p-アミノサリチル酸(PAS) 2mg/ml 含有培地の黒変、塩酸ヒドロキシルアミン(HA) 500 µg/ml 含有培地上の発育、硝酸塩還元試験、Tween80 水解試験である。さらに、アリルスルファターゼ試験を追加した。これらの生化学的検査法の他、主な抗酸菌 18 菌種の同定が可能な DNA-DNA ハイブリダイゼーション(DDH) 試験(極東製薬工業)を用いた。DDH 試験法の操作は、使用説明書に従った。

3、分離菌の 16S-rDNA のシーケンス

生化学的検査法や DDH 試験法において同定不能と判定された菌株および同定結果を再確認するために、分離菌から DNA を抽出し、16S-rRNA を標的としたプライマー 16Ss(5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3')と 16Sas(5' TGCACACAGGCCACAAGGGA 3')を用いて PCR を行い、PCR プロダクトを High pure PCR product Purification kit (ベーリンガーマンハイム社)を用いて精製後、Dye terminator cycle sequencing 法にて DNA を標識し、スピンカラム法により未反応の蛍光色素を取り除いた後、ABI310 シーケンサーにてシーケンスをおこなった。得られた結果を Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms(RIDM)あるいは、NCBI の nucleotide-nucleotide BLAST のデータベースと比較して、菌種の決定を行った。

C. 研究結果

昨年度の調査では、抗酸菌 20 株が分離同定されたが、今年度は、浴槽水 68 検体について分離培養を行ったところ、9 検体から抗酸菌 19 株が検出され、それぞれ増菌培養後同定試験を行った。抗酸菌 19 株全てが光発色性を持たず、

PNB 培地に増殖はせず、PAS 培地の黒変も見られなかった。この抗酸菌 19 株の生化学的検査法と DDH 法による同定結果を表 1 に示した。生化学的検査法では、*Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex(MAC)と判定された 11 菌株は、DDH 法では全て *M. avium* と判定された。迅速発育菌で、生化学的検査法では、ラニオン分類で IV 群菌と判定された 6 株のうち 1 株は、*M. fortuitum* であった。

DDH 法で同定不能と判定された株は 6 株あり、いずれもコロニーの色は、オレンジ色であり、16S-rRNA を標的とした PCR 産物の DNA シークエンスから、表 2 に示すごとく 5 株については菌種の同定が可能であった。これらの株は、*M. phlei* 4 株、*M. gordonae* 1 株であった。しかし 1 株は生化学的検査結果とシーケンス結果とが食い違ったため、現段階では同定不能とした。

抗酸菌 19 株の同定菌種の内訳を表 3 に示した。*M. gordonae* 2 株、*M. avium* 11 株、*M. fortuitum* 1 株、*M. phlei* 4 株、未同定 1 株であった。昨年同様に、結核菌(*M. tuberculosis*)は、検出されなかった。

D. 考察

抗酸菌は、グラム陽性・好気性・非運動性・多形態性の桿菌である。脂質に富む細胞壁を持つため染色されにくいのが、一度染色されると酸・アルコールに抵抗性で脱色されにくい(抗酸性)の性質を有するため抗酸菌と呼ばれる。チール・ネルゼン染色法では、赤い棍棒状に染色される。抗酸菌は、ヒトに対して病原性のあるものから、非病原性のものでおよそ 60 種が知られている。抗酸菌のなかで結核菌群(*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*)以外の培養可能な抗酸菌を一括して非結核性抗酸菌(nontuberculous mycobacteria: NTM)と呼び、自然界に広く分布している。また、それによる感染症は、非結核性抗酸菌症と呼ばれている。