

is now common at hotels and bathhouses after some outbreaks of Legionnaires' disease were attributed to spa water [17, 18], but not yet on ships. The cruise company had never performed surveillance for *Legionella* in the ship; the surveillance on 23 December was performed for the first time after inquiries by a regional public health centre about the probability of *Legionella* contamination. In the Japanese guidelines established by the Ministry of Health, Labour and Welfare, legionellae should not be detectable in bath water, with a sensitivity threshold of 10 c.f.u./100 ml. Exact requirements vary from prefecture to prefecture, but generally any detection of legionellae must be reported to a public health centre, which will require disinfection and retesting or closure.

Given the fact that the spas were implicated as the source of infection on this cruise ship, the implementation of preventive measures is imperative. Cruise-ship companies must be aware of the risk of legionellosis associated with the presence of legionellae in the ships' spas, and must ensure that their drains and pipework are as short as possible for easier cleaning. Moreover, they must maintain all spa apparatus fastidiously. In this cluster, *Legionella* contamination of spa water occurred in spite of the water being changed twice a day during the cruises. One reason might be the porous natural stones in filters where biofilms harbouring legionellae and other microbes are formed. Porous natural stones or ceramic balls in filters maintained poorly are so dangerous that they should be discarded. Extracts from natural stone *Maifanshi* and ceramic balls in domestic spa filters [19] and a slurry of water and sand taken from a whirlpool spa sand filter [6] harboured far more legionellae than bath water. The current most common ways of disinfecting them include superheat and hyperchlorination. Another reason is the presence of about 200 l of residual water in pipework between a heater on one floor and a bathtub several floors higher without appropriate drains. Such structural defects in spa design teach us lessons. Although the chlorine concentration of the indoor spas was set to 4 mg/l with automatic dosing devices, the actual concentration of free available chlorine residuals in the spa water had not been measured and was presumed to have been much lower than that in the guidelines of the Ministry of Health, Labour and Welfare (0.2–0.4 mg/l, <1.0 mg/l).

The concentration of *Legionella* spp. in water specimens obtained from the ship's indoor spa water

ranged from 80 to 15000 c.f.u./100 ml, a concentration comparable to those of previous large outbreaks in spas [18, 20] ( $8.4 \times 10^3$  c.f.u./100 ml and  $8.0 \times 10^3$  c.f.u./100 ml). Legionnaires' disease is an opportunistic infection and frequently affects people who are elderly, smoke cigarettes, or have other underlying disease [21]. Our three cases were all 70 years or older, and the index case was a heavy smoker with mild emphysema. In this cluster, however, there were few confirmed cases of Legionnaires' disease although many elderly people participated in these cruises. One probable explanation is that the indoor spas have no air compressors and therefore fewer aerosols. Another explanation may be that physicians did not order laboratory testing for the diagnosis of suspected cases.

In conclusion, this report is the first documented cluster of *L. pneumophila* sg 5 infection associated with a cruise ship and is the first cluster of Legionnaires' disease associated with a cruise ship in Japan. Since legionellosis cases associated with cruise ships have probably been overlooked, and advanced age is a risk factor for the disease [21], it is necessary to pay close attention to the hygiene of water supply systems, air-conditioning apparatus, and especially spas in any cruise ship where elderly people are likely to be passengers. We strongly recommend that porous, incompletely washable stones should not be used in a spa system.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Eiko Yabuuchi, Department of Microbial Bioinformatics, Gifu University School of Medicine, Wantana Paveenkittiporn, NIH, Nonthaburi, Thailand, and Kyoko Masuko, Ibaraki Prefectural Institute of Public Health for *L. pneumophila* sg 5 strains; Hiroshi Hagiwara, Health, Welfare and Environmental Services Department, Hyogo Prefecture, for providing information on the problems and the improvement of the spa facility on the ship.

#### DECLARATION OF INTEREST

None.

#### REFERENCES

1. Benin AL, Benson RF, Besser RE. Trends in legionnaires disease, 1980–1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin Infect Dis* 2002; **35**: 1039–1046.

2. **National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare.** Legionellosis, April 1999–December 2002, Japan. IASR Infectious Agents Surveillance Report 2003; 24: 27–28 (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/24/276/tpc276.html>). Accessed 3 Aug. 2005.
3. **Rowbotham TJ.** Legionellosis associated with ships: 1977 to 1997. *Commun Dis Public Health* 1998; 1: 146–151.
4. **Jalaludin BB, Nguyen OTK, Goldthorpe IC, Chiew RF.** Legionnaires' disease: co-infection with *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 5. *Med J Aust* 1997; 166: 277–278.
5. **Castellani Pastoris M, Lo Monaco R, Goldoni P, et al.** Legionnaires' disease on a cruise ship linked to the water supply system: clinical and public health implications. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 33–38.
6. **Jernigan DB, Hofmann J, Cetron MS, et al.** Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet* 1996; 347: 494–499.
7. **Kobayashi A, Yamamoto Y, Chou S, Hashimoto S.** Severe *Legionella pneumophila* pneumonia associated with the public bath on a cruise ship in Japan. *J Anesth* 2004; 18: 129–131.
8. **Sugishita Y.** Legionnaires' disease on a cruise ship to and from Taiwan. Case 2 – Tokyo [in Japanese]. IASR Infectious Agents Surveillance Report 2004; 25: 40–41.
9. **Takemoto M, Gonda H, Oishi T, Yamamoto K, Ikenouchi N.** A case of legionellosis on a domestic cruise ship [in Japanese]. IASR Infectious Agents Surveillance Report 2004; 25: 41–42.
10. **Li GS, Wang JX, Jing L.** The anti-fluoride effects of Zhonghua Maifanshi. An experimental study. *Fluoride* 1990; 23: 37–42.
11. **Okuda K, Ikedo M, Yabuuchi E.** Wadowsky-Yee-Okuda (WYO) medium: a new selective medium for the isolation of legionellae strains from environmental water specimens [in Japanese]. *Kansenshogaku Zasshi* 1984; 58: 1073–1082.
12. **Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H, Gondaira F, Sugiyama J.** Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis and monoclonal antibodies. In: Marre R, Abu Kwaik Y, Bartlett C, et al., eds. *Legionella*. Washington, DC: ASM Press, 2002: 302–304.
13. **Kuroki T, Sata S, Yamai S, Yagita K, Katsube Y, Endo T.** Occurrence of free-living amoebae and *Legionella* in whirlpool baths [in Japanese]. *Kansenshogaku Zasshi* 1998; 72: 1056–1063.
14. **Chang FY, Jacobs SL, Colodny SM, Stout JE, Yu VL.** Nosocomial Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 5: laboratory and epidemiologic implications. *J Infect Dis* 1996; 174: 1116–1119.
15. **Murdoch DR.** Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 64–69.
16. **Ruf B, Schurmann D, Horbach I, Fehrenbach FJ, Pohle HD.** Prevalence and diagnosis of *Legionella pneumonia*: a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection. *J Infect Dis* 1990; 162: 1341–1348.
17. **Sugiyama K, Nishio T, Goda Y, et al.** An outbreak of legionellosis linked to bath water circulating through a filter at a spa resort, March–April 2000 – Shizuoka. IASR Infectious Agents Surveillance Report 2000; 21: 188 (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/21/247/de2471.html>). Accessed 3 Aug. 2005.
18. **Nakamura H, Yagyu H, Kishi K, et al.** A large outbreak of legionnaires' disease due to an inadequate circulating and filtration system for bath water–epidemiologic manifestations. *Intern Med* 2003; 42: 806–811.
19. **Takahashi T, Yabuuchi E, Endo T, Furuhashi K.** Sanitary problems of 24 h-bath and administrative counter-measures for them [in Japanese]. *Jap J Environ Infect* 1998; 13: 129–136.
20. **Fallon RJ, Rowbotham TJ.** Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. *J Clin Pathol* 1990; 43: 479–483.
21. **Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF.** Surveillance for legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med* 1994; 154: 2417–2422.
22. **Fujita I, Tsuboi H, Ohotsuka M, et al.** *Legionella dumoffii* and *Legionella pneumophila* serogroup 5 isolated from 2 cases of fulminant pneumonia [in Japanese]. *Kansenshogaku Zasshi* 1989; 63: 801–810.

# 宿主アメーバからみた レジオネラの水系汚染対策

ENDO TAKURO/YAGITA KENJI/IZUMIYAMA SHINJI

遠藤卓郎/八木田健司/泉山信司

◎国立感染症研究所寄生動物部

## はじめに

レジオネラ汚染防止対策の要点は、環境中でのレジオネラの増殖様式と伝播様式の2点を正しく理解することである。レジオネラがいかんして環境を汚染し、どのような経路を経てヒトに感染していくかを知れば自ら対策がみえてくるはずである。対策を論ずることの必要性は重々承知しているが、一步引いてレジオネラ問題を考えてみると、ところかまわず知に走る人の姿がみえてくる。しかし、所詮は人も自然の中に生かされているにすぎない。自然の恩恵を享受することはできても、その営みを制御することはできないと知るべきである。この観点に立つと、直面するレジオネラ問題に対して臆することなく白旗をあげることが歴とした「人知」にみえてくる。

## ■環境水中でのレジオネラの増殖様式

レジオネラ属菌の詳細については他書に譲るが、レジオネラ属菌の特徴は細胞寄生性であることで、ヒトに感染した場合にはマクロファージなどに寄生して、その中で増殖する。同様に、環境中にあるアメーバなど原生動物を宿主として増殖している(図1)<sup>1)</sup>。すなわち、環境中のレジオネラは宿主となる原生動物が存在することではじめて増殖が可能となる。これまでにレジオネラの宿主として温水(≤42℃)に棲息する *Acanthamoeba* や

*Naegleria*, *Hartmannella* などといったアメーバ類や *Tetrahymena*(繊毛虫)などが報告されている<sup>2)</sup>。一般の従属栄養細菌類とは異なり、レジオネラ属菌は細菌捕食性の原生動物に取り込まれても消化されることなく寄生・増殖し、やがて宿主を破壊する。例えば、*Acanthamoeba*を宿主とした場合、感染後2日程度で増殖したレジオネラが宿主の細胞質をほぼ埋め尽くす(図1d, 図2)。やがて細胞の中で活発に運動を始め、水に浮遊させた条件で観察すると運動が始まってから10分程度で細胞膜を破り水中に遊出する(図1f, 図3)。レジオネラの増殖は盛んでアメーバ1匹当たり優に1,000個を超える数となる。

これまでの感染事例で浴槽水など原因となった水の菌数は $10^{3-6}$ cfu/100mLの範囲であった。単純計算すると、そのような環境水中には $10^{0-3}$ 個/100mLの感染したアメーバが存在したことになる。これを20m<sup>3</sup>程度の営業用の浴槽にあてはめると、浴槽水中には $10^{5-8}$ 個オーダーの感染したアメーバが必要となる。生態学的な妥当性からすれば、存在するすべてのアメーバが一斉に感染することは考えられず、寄生されているものはせいぜい1%にも満たないと想定される。この単純な仮定が大筋で正しいとすると、事故につながるような浴槽の微生物量は生半なものではないことがうかがえるであろう。

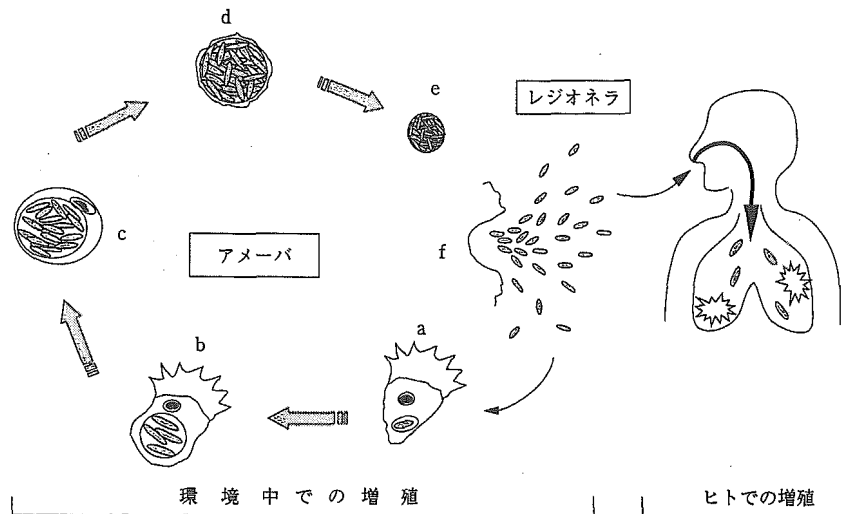


図1 レジオネラの増殖様式

### ■レジオネラの伝播経路と汚染原因

すでによく知られるところであるが、レジオネラの感染様式は汚染された水から発生したエアロゾルを吸引することによる。一般に、菌を内包したままで肺胞内に到達し得るエアロゾルの粒径は2～5 μm程度とされている<sup>3)</sup>。

われわれの生活環境にあって、エアロゾルの発生につながる装置としては空調設備の冷却塔、浴槽の各種付属設備、加湿器や噴霧器、あるいは水を用いる歯科・医療器具などさまざまなものがあげられる。これらの装置では汚染理由がそれぞれ異なるが、根本的な理由は共通する。すなわち、温水などに発生するバイオフィーム対策の欠除がレジオネラ問題を招来させると考えてよい。

以下、わかりやすい例として循環式浴槽を取り上げて説明する。循環式浴槽の基本構造を図4に示した。本装置は浴槽水をろ過循環させて長期にわたり継続使用しようとするものである。このような装置には入浴者が持ち込む汚れ(有機物汚染)を取り除くための装置、ろ過槽が設置され、槽内に積極的に微生物を繁殖させている。いわゆる生物浄化といわれるもので、浴槽水中に持ち込まれた有機物を微生物に捕食・吸収させて除去しよう

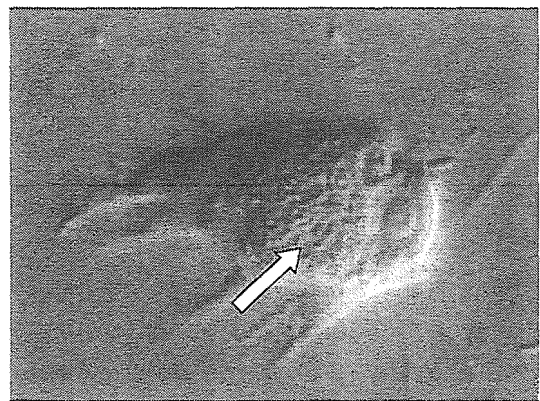


図2 アカンソアメーバに寄生したレジオネラ  
細胞質の大半を埋めるレジオネラ(矢印)

とするものである。下水処理などにおける活性汚泥に対応するもので、浴槽水中の有機物除去には効果的であることはよく知られる。図5に示すごとく、浴槽水中の有機物量(過マンガン酸カリ消費量として表現)は細菌数の増加に伴い顕著に減少する。たしかに、浴槽水の過マンガン酸カリ消費量に着目した場合は生物浄化によって見かけの清浄度は回復・保障される。しかしながら、循環式浴槽全体を閉じた系として考えると、全く別のストーリーがみえてくる。すなわち、本システム

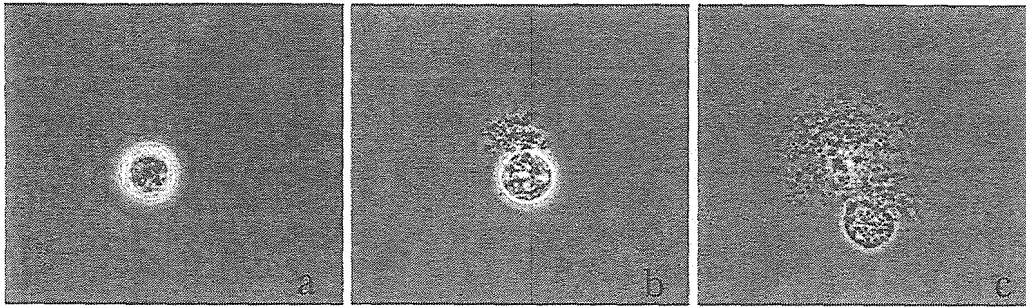


図3 レジオネラによる宿主アメーバの破壊の様子

a:破壊寸前のアメーバ、管壁当への付着ができなくなり、浮遊状態となる。b:破壊直後。  
c:レジオネラが周囲に分散していく

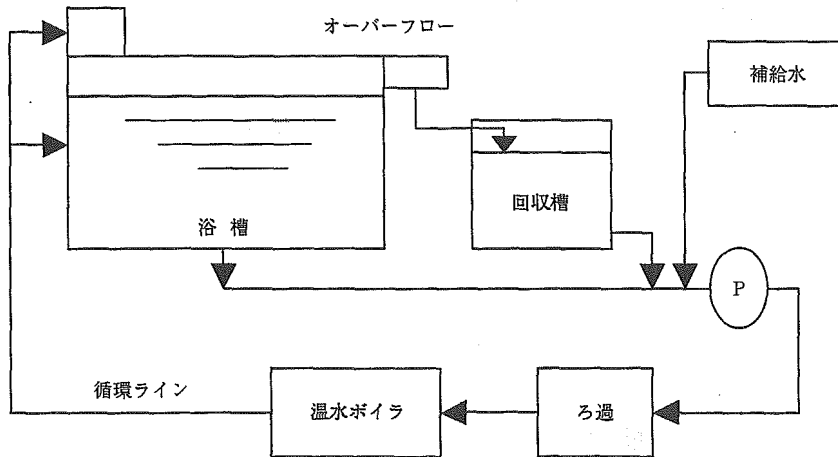


図4 循環式浴槽水のフロー

では入浴者によって持ち込まれる有機物を微生物に変えてはいるが、系外に運び出しているわけではない。そのため、生き物を含めた総有機物量は系内に蓄積され続ける仕組みといえる。さらに、微生物へ形が変わることで厄介なことに系内にレジオネラの増殖の場が形成されてしまう。

厚生労働省は、先の「公衆浴場法第3条第2項並びに旅館業法第4条第2項及び同法施行令第1条に基づく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(健発第1029004号,平成14年10月)」で遊離残留塩素(1日2時間以上0.2~0.4mg/Lを保つこと)による浴槽水の管理を指示している。循環式浴槽の設計思想は生物浄

化に依拠した有機物除去であり、この装置に遊離残留塩素管理を持ち込むことはシステムの心臓部ともいえる生物浄化機能を破壊することにはかならず、この時点で循環式浴槽という発想は実質的に破綻する。食品の分野ではHACCP(Hazard Analysis and Critical Control Point: 危害分析重要管理点)という概念が浸透しつつある。この概念の骨子は危害因子の排除と予防であるが、これにならえば、ろ過槽の撤去と残留塩素による管理こそが循環式浴槽の対策といえるのではないかと考える。

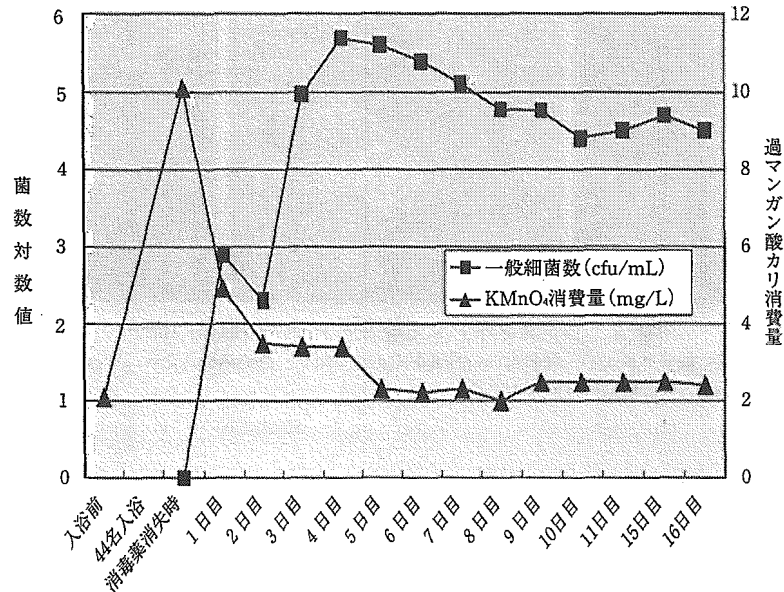


図5 浴槽水中の一般細菌と過マンガン酸カリ消費量の挙動

## ■汚染防止対策

### 1. 冷却塔水

レジオネラ症の歴史的背景から冷却塔水のレジオネラ汚染は有名で、かつての集団感染ではほとんどのこの装置が汚染源とされていた。事実、冷却塔水が外気に直接接触する構造となっており、微生物の侵入繁殖は防げない。少々古いデータであるが、日本全国の冷却塔水 180 試料について行ったアメーバとレジオネラの調査によれば、*Acanthamoeba* や *Hartmannella* をはじめとして多種類のアメーバが検出され、検出率はおよそ 90% に達していた<sup>4)</sup>。その一方で、空調設備の維持のために冷却塔水の水質管理を徹底する必要があること、大気中へのエアロゾルの飛散を抑える構造が考案されていること、さらに、室内への外気取入口や窓、および人が活動する場所から冷却塔を 10m 以上離すことなどが義務づけられていることが功を奏してか、わが国では冷却塔を介したレジオネラ症の報告は聞かれなくなっている。

### 2. 入浴施設

循環式の浴用施設が普及するに伴って、入浴施設を介したレジオネラ症の報告が増えている。入浴施設にはジャグジー、ジェットバス、打たせ湯（滝を模した装置）、そのほか、エアロゾルの発生しやすい装置が多数存在する。循環式浴槽にこれらの装置を併設しないことが厚生労働省から通達されている。また、すでに述べたように、厚生労働省から浴槽水の遊離残留塩素管理が通達されている。図6は浴槽水の遊離残留塩素濃度と浴槽水 pH、および宿主アメーバの出現状況をプロットしたものであるが、0.2mg/L 以上の遊離残留塩素濃度が維持されているほとんどの浴槽でアメーバが不検出になっており、安全が確保されていることが示されている<sup>5)</sup>。

なお、循環浴槽系ではシステム内の殺菌・洗浄が伴わない換水は汚染防止にほとんど効果を示さないことが指摘されている。ある調査によると、 $10^5$  cfu/100mL 程度のレジオネラを含む浴槽水を完全に換水しても、数時間後には  $10^4$  cfu/100mL のレベルに達することが示されている。当該循環

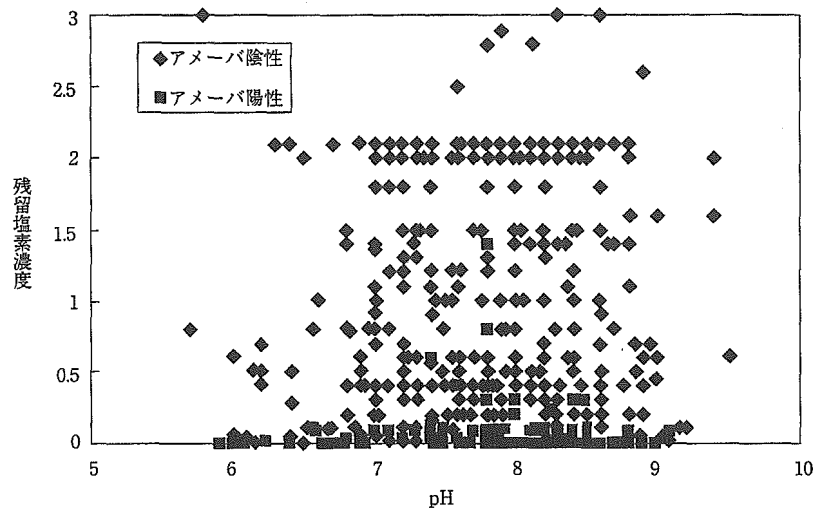


図6 残留塩素濃度と浴槽水pHとアメーバ検出の関係

厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)総合研究報告書「平成13-15年度温泉・公衆浴場, その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜炎の病原体*Naegleria fowleri*の疫学と病原性発現に関する研究」より転写

装置のろ過槽内の汚泥には  $5 \times 10^6$  cfu/g のレジオネラが存在しており, ろ過槽を含めた系全体の洗浄・消毒の重要性があらためて指摘された。

### 3. 貯湯槽

温泉水, 井水, 水道水など, いかなる水であっても有機物を全く含まない水はない。そのため, 貯湯槽を長期にわたり使い続けると徐々にではあるがバイオフィーム形成が起こり, やがてレジオネラ汚染につながる。そこで, 湯水の補給口や貯湯槽底部の温度に至るまで貯湯槽の温度を  $60^\circ\text{C}$  以上に保つこと, 最大使用時においても  $55^\circ\text{C}$  以上に保つよう指導されている。この温度に達しない場合には湯水の消毒が必要となる。また, 原水の水質を考慮して, 定期的に貯湯槽内のバイオフィーム除去を行うことが望ましい。

### 4. そのほかの器具など

レジオネラ症は冷却塔や修景用噴水, 超音波式ネブライザー, 加湿器や温泉浴槽, 場合によってはシャワーや呼吸補助装置などを介した発生が知

られている<sup>6)</sup>。例外的にはあるが, プランターの土や腐葉土で増殖していたレジオネラ (*L. longbeachae*) が原因と考えられる集団感染事例の報告がある<sup>7, 8)</sup>。

加湿器や噴霧器, あるいは水を用いる歯科・医療器具などにおいては定期的な高濃度の塩素消毒, 水の滞留を防ぐ工夫と, 洗浄しやすい単純な構造であることが求められる。あわせて, ホースなどの交換を頻繁に行うことが汚染防止につながる。

### ■利便性の追求とリスク

レジオネラ問題に関しては利用者(消費者)側の問題も指摘される。例えば昨今の温泉ブームである。ここでは, 無批判に大規模な浴槽やジェット噴流式の浴槽などが好まれる傾向がある。浴槽の容量が大きくなれば水量の関係から必然的に循環装置の設置につながる。有機物汚染が進んだ温水に微生物が繁殖しないはずもなく, その中にレジオネラなど病原性を示す微生物が存在しても何の不思議もない。直面しているレジオネラ問題は, 便利さや快適さを求める過程で人が作り出した温

水環境を介して起きている。換言すれば、便利さや快適さを求める過程で発生した人災といえる。理論的には、この問題の解決はきわめて容易である。そもそも、循環式浴槽がなければこの問題は起きなかったわけで、設備を使用しなければ本件は解決する。しかしながら、使用されていることを前提とした現実対応はきわめて難しく、その衛生管理に要する労力は計り知れない。ここでは触れなかったが、やむを得ず用いている塩素消毒に問題がないわけではない。塩素を使用する限り副生成物による健康影響は避けられない問題である。本件に関しては原点に立ち返って必要性については是非論を交わすべき時期にきていると考える。

ちなみに、公衆浴場法では浴槽水の有機物汚染に係る水質基準として過マンガン酸カリ消費量が25mg/L以下であることと規定されている。また、浴槽原水の基準値は過マンガン酸カリ消費量10mg/L以下とされている。この基準値が何を根拠として定められたのか不勉強にして知らないが、原水の水質を考慮して15~25mg/Lの範囲の持ち込みが上限となる。われわれの試算では、入浴者一人が持ち込む有機物量は過マンガン酸カリ消費量に換算して、およそ0.5gであった。仮に入浴者の持ち込む汚れ(有機物)を通して入浴者数を規制するものであるとすれば、20m<sup>3</sup>の浴槽水に延べ600~1,000人が入浴すると公衆浴場法に定める基準値を超える(違反)計算である。200L程度の家庭用の浴槽にあてはめると延べ6~10人の入浴者に相当する。この基準の是非についても合わせて議論していくべきものと考えている。

いずれにせよ、利便性の追求が生活環境の悪化を交換条件としているとするならば、あまりにも知恵のないことである。

- 1) Rowbotham TJ : Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 33 : 1179-1183, 1980.
- 2) Fields BS : *Legionella* and protozoa : interaction of a pathogen and its natural host. *Legionella : current status and emerging perspectives*, 129-136, Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP eds., American Society for Microbiology, Washington DC, 1993.
- 3) Mangione EJ, Remis RS, Tait KA *et al.* : An outbreak of Pontiac fever related to whirlpool use, Michigan 1982. *J Am Med Assoc* 253 : 535-539, 1985.
- 4) 遠藤卓郎(1995). レジオネラとアメーバ類の共生(寄生)関係に関する調査研究, 862-868, 平成6年度ヒューマンサイエンス基礎研究事業報告第4分野, 1995.
- 5) 厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)総合研究報告書. 平成13-15年度温泉・公衆浴場, その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体 *Naegleria fowleri* の疫学と病原性発現に関する研究(主任研究者 遠藤卓郎).
- 6) Butler JC, Breiman RF : Legionellosis. Bacterial infections of humans, 355-375, Evans AS, Brachman PS eds., Kluwer Academic/Plenum, New York, 1998.
- 7) Steele TW : Interaction between soil amoeba and soil legionellae. *Legionella : current status and emerging perspectives*, 140-142, Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP eds., American Society for Microbiology, Washington DC, 1993.
- 8) Steel TW, McLennan AM : Infection of *Tetrahymena pyriformis* by *Legionella longbeachae* and other *Legionella* species found in potting mixes. *Appl Environ Microbiol* 62 : 1081-1083, 1996.

\* \* \*



## 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

<sup>1)</sup>宮崎県衛生環境研究所, <sup>2)</sup>国立感染症研究所細菌第一部, <sup>3)</sup>同 寄生動物部  
岡田 美香<sup>1)</sup> 河野喜美子<sup>1)</sup> 倉 文明<sup>2)</sup> 前川 純子<sup>2)</sup>  
渡辺 治雄<sup>2)</sup> 八木田健司<sup>3)</sup> 遠藤 卓郎<sup>3)</sup> 鈴木 泉<sup>1)</sup>

(平成 17 年 3 月 17 日受付)

(平成 17 年 3 月 25 日受理)

Key words : outbreak, legionellosis, spa facilities, pulsed-field gel electrophoresis

#### 要 旨

2002 年 7 月, 宮崎県の循環式入浴施設において, レジオネラ症集団感染事例が発生した。発熱, 肺炎, 咳, 頭痛などを呈した 295 名の発症者 (患者および疑いを含む) が報告され, 37% が入院し, そのうち 7 名が死亡した。患者が共通して利用していた入浴施設の検査を行ったところ, 浴槽水, タンク水, ろ材などの 55 検体から *Legionella pneumophila serogroups* (SG) 1, SG8, *L. dumoffii*, *L. londiniensis* 等のレジオネラ属菌および多種類のアメーバが検出された。浴槽水から検出された主要なレジオネラ属菌 *L. londiniensis*, *L. dumoffii* および *L. pneumophila* SG1 の最高濃度はそれぞれ  $1.5 \times 10^6$ ,  $5.2 \times 10^5$  および  $1.6 \times 10^4$  cfu/100mL であった。施設材料および患者から分離された *L. pneumophila* SG1 株について, パルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子多型解析を実施した結果, 同一の遺伝子多型を示したことから, 今回の事例は循環式温泉入浴施設を発生源としたレジオネラ症集団感染であると考えられた。衛生管理が適切に行われないと, 循環式入浴施設が健康に対する重大な危険要因となりうる事が示された。

[感染症誌 79: 365~374, 2005]

#### 序 文

レジオネラ症は, レジオネラ属菌を原因として起きる感染症で, 病型として肺炎型や感冒様のポンティアック熱型がある<sup>1)</sup>。本菌は水中や湿った土壌中など自然界に存在する細菌で, これらが循環式浴槽水, 空調施設の冷却塔水, 給湯水等の人工水環境中に侵入すると, そこで生息するアメーバや繊毛虫などの原生動物内で大量に繁殖する。そして, このようなレジオネラ属菌に汚染されたエアロゾルをヒトが吸い込むことにより, レジオ

ネラ症を発症する。

レジオネラ症は, 1976 年に米国フィラデルフィアで集団感染が発生して以来, 海外では多数の事例が報告され, 最近も大規模な集団発生が続いている<sup>2)~6)</sup>。また, 日本でも, 2000 年に静岡県<sup>7)</sup>, 茨城県<sup>8)</sup>で循環式浴槽を発生源とした集団事例が発生し, その後, 各地で発生の報告がなされている。このように, レジオネラ症への関心が高まってきている中, 2002 年 7 月, 宮崎県において, 循環式入浴施設を原因施設としたレジオネラ症集団感染が発生した。我々は, 感染源や感染原因を究明するため, 患者および原因施設の調査を行ったのでその結果を報告する。

別刷請求先: (〒889-2155) 宮崎県宮崎市学園木花台  
西 2 丁目 3-2  
宮崎県衛生環境研究所 岡田 美香

## 材料と方法

### 1. 原因施設の材料

源泉水 2 検体, 浴槽水 6 検体, タンク水 9 検体, シャワー水 1 検体, 循環ろ過装置のろ材 6 検体, および浴場や配管などのふき取り 31 検体など合計 55 検体を材料とし, レジオネラ属菌の分離を実施した。また, これらの検体はレジオネラ属菌の宿主となるアメーバの調査, および一部は一般細菌数測定にも用いた。

### 2. 患者の発生状況調査<sup>9)</sup>

2002 年 6 月 20 日のプレオープン日及び 7 月 1 日から 7 月 23 日までの営業日に本施設を利用後, 何らかの症状を呈し, 医療機関で「レジオネラ症が疑われる患者」と診断され, 保健所に報告された 295 名(発症者)を調査対象とした。

### 3. レジオネラ属菌の分離

施設材料からのレジオネラ属菌の分離は, レジオネラ症検査・診断マニュアル<sup>10)</sup>およびレジオネラ症防止指針<sup>11)</sup>に準じて行った。その際, ろ材, ふき取りについては定性的に, 浴槽水等の水材料については定量的に試験した。

源泉水, 浴槽水, タンク水, およびシャワー水は, それぞれ 500mL を 0.22 $\mu$ m メンブランフィルターでろ過後, フィルターを 5mL の蒸留水に懸濁し試料とした。各試料の 1mL に等量の HCl-KCl 液 (pH2.2) を加えて酸処理し, それらの原液, 10 倍希釈液, 100 倍希釈液の各 100 $\mu$ L を, 各希釈に対して 2 枚の WYO- $\alpha$  寒天培地 (栄研化学) に接種した。37°C で 7~10 日間培養後, 2 枚の培地上に発育したレジオネラ属菌数を合計し, 検体原液 100 mL 中のレジオネラ属菌数を算出した (検出限界 10 cfu/100mL)。ろ材はその表面の洗浄液を, ふき取り材料はふき取りに用いたスポンジのしぼり液を, それぞれ遠心してその沈渣を試料とし, 各試料について酸処理を行い, WYO- $\alpha$  寒天培地に接種後, 37°C 7~10 日間培養した。培地に発育し, レジオネラが疑われた菌については, システイン要求性試験, グラム染色, 血清型別試験 (デンカ生研), PCR, ハイブリダイゼーション, および遺伝子配列決定法を実施しレジオネラであることの確認を行った。同一の材料から複数のレジオネラ属

菌が検出された場合には, 青白色自発蛍光の有無, コロニー増殖の速さ及び形態で区別し, 血清型別試験, PCR 等で各種および血清型を確認した。

### 4. PCR

分離菌について, レジオネラ属菌を同定するための PCR (LEG 遺伝子を検出)<sup>12)</sup>, *L. pneumophila* を同定するための PCR (Lmip 遺伝子を検出)<sup>13)</sup>を行った。これらの PCR の方法はレジオネラ症検査・診断マニュアルに準じて行った。

### 5. DNA-DNA ハイブリダイゼーション

発症者および施設から分離されたレジオネラ属菌の一部は, 菌種を決定するため, DNA-DNA ハイブリダイゼーションを実施した (DDH レジオネラ, 極東)。方法は添付マニュアルによった。

### 6. 遺伝子配列決定法

施設材料から分離され, 血清型別試験および DNA-DNA ハイブリダイゼーションによっても, 菌種が不明であった 2 種類のレジオネラ属菌については, MicroSeq (ABI) で使用されているプライマーを用いて PCR を行い, 16S rDNA 領域上流部の約 500 bp の増幅物を得た。PCR 産物について, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) により, サイクルシーケンシング反応を行い, キャピラリーシーケンサー (ABI PRISM 310, ABI) を用いて, 塩基配列を決定し, 既存の菌種の配列と比較し (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), 菌種を同定した。

### 7. 遺伝子多型解析

発症者および施設から分離されたレジオネラ属菌 77 株について, パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による遺伝子多型解析をレジオネラ症検査・診断マニュアルに準じて行った。制限酵素 *Sfi* I (TAKARA) でサンプル DNA を切断後, 泳動条件をパルスタイム 5 秒から 50 秒, 6.0V/cm, 泳動時間 21 時間, 泳動バッファーを温度 14°C に設定し, CHEF DR III (Bio-Rad) により電気泳動を行った。

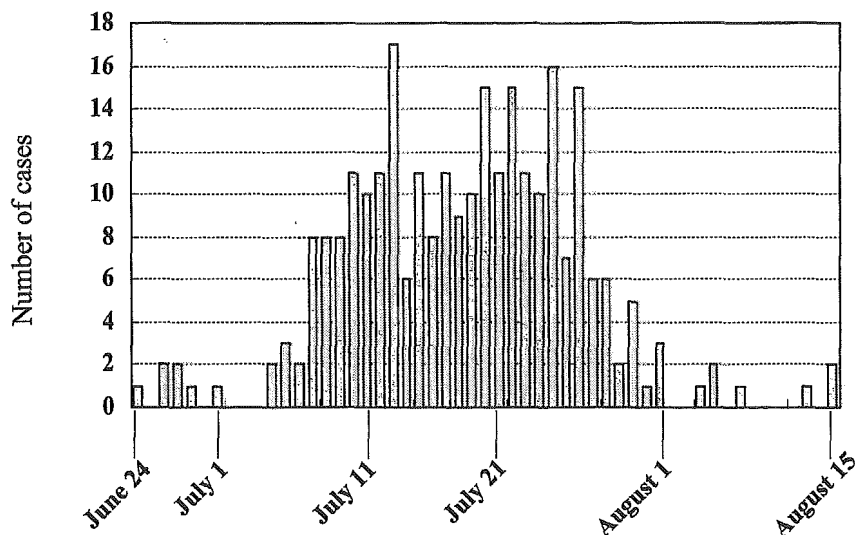
### 8. 一般細菌数測定

浴槽水, タンク水について, その 1mL 中の生菌数を, 標準寒天平板菌数測定法により測定した。

### 9. アメーバの検出

本邦最大のレジオネラ症集団感染事例

Fig. 1 Dates of onset of illness in cases of legionellosis, June 24-August 15, 2002.



レジオネラ属菌宿主アメーバ類はアメーバ分離用培地である大腸菌塗布寒天プレートを用いて分離した<sup>14)</sup>。1.5%に無栄養寒天 (Bacto agar, Difco 等) を蒸留水で調整し、滅菌後その 20mL を 90 mm 径のプラスチックシャーレに入れプレートを作製した。蒸留水に懸濁して加熱処理 (60℃, 1 時間) した大腸菌をその表面に均一に塗布し表面を乾燥させたものをアメーバ分離用培地として用いた。材料の接種は、水試料の場合は 1mL をそのまま、あるいは 50mL 遠心管を用いて試料 50mL を遠心 (500×G, 5 分間) により 1mL に濃縮したものを培地表面全体に塗り広げた。自然乾燥により培地表面の水分がなくなり表面にわずかに皺が生じたところでプレートをビニール袋に収納し、密封状態で 30℃ にて 2 週間培養した。ろ材の場合は、材質が砂状の粒子であったことからその 10 mL 容量を 50mL 遠心管にとり、これに滅菌蒸留水を加えて 50mL にメスアップ後、密栓して 30 秒間激しく上下に振りろ材を懸濁した。30 秒間遠心管を静置し、ほとんどのろ材が沈殿してから上清を 0.5mL とりアメーバ分離用培地全面に塗布した。その後は水試料の場合と同様にして培養を行った。培養期間中は毎日観察を行い、プレート表面に生じるプラーク (増殖したアメーバの集落)

の数を測定し、検査した単位水量あるいはろ材容量あたりのプラーク数を算出した。また、プラークの一部を採取し、顕微鏡下で形態学的に、主に属レベルでのアメーバの同定を行った。

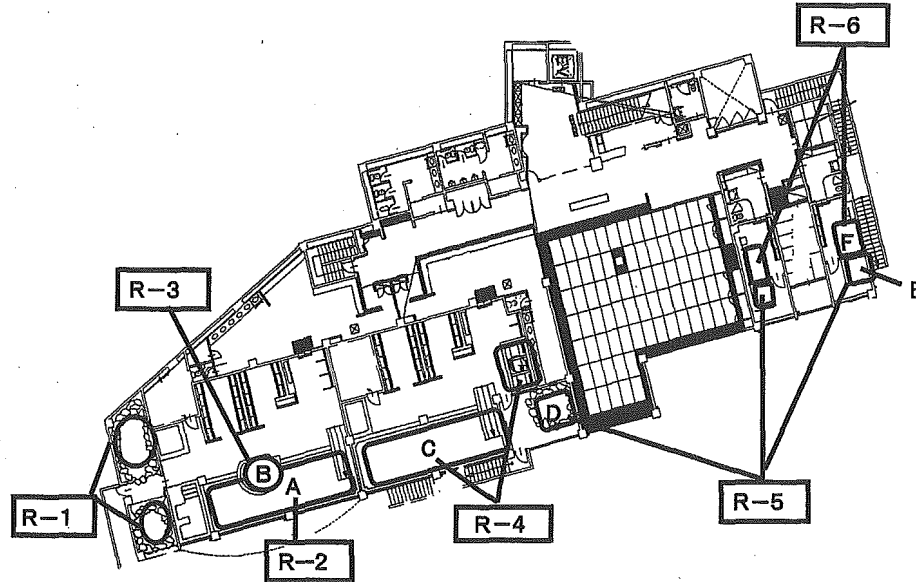
結 果

1. 事例の経過とレジオネラ症患者発生状況<sup>9)</sup>

2002 年 7 月 18 日、宮崎県内の医療機関から管轄保健所に対し、入院中の患者 3 名がレジオネラ症様の症状を呈し、かつ同一の入浴施設を利用していたとの連絡があった。これが一連の集団感染の端緒であり、翌 19 日から、施設の立入調査や、発症者および施設の細菌学的検査が開始された。7 月 25 日に発症者の喀痰および浴槽水から同一血清型のレジオネラ属菌が検出され、さらに 7 月 30 日、発症者の喀痰および浴槽水由来の菌の遺伝子型が一致したことから、これらの菌が同一起源のものと考えられたため、保健所は本施設をレジオネラ症集団感染の原因施設と判断し、本施設に対し営業停止を命令した。

医療機関から報告のあったレジオネラ症患者及び疑い患者 (発症者) は、総数 295 名で、6 月 24 日から 8 月 15 日まで発症が認められた (Fig. 1, 23 名は発症日不明) が、そのうち、7 月 7 日から 31 日までの間に 90% が発症していた。

Fig. 2 Plan of the spa area of the bath house in Miyazaki, June 2002. R-1 to R-6 ; independent filtration systems. A, a big spa ; B, a whirlpool spa ; C, a big spa with a bathtub made of hinoki ; D-E, open-air spas ; F, a small spa ; G, a small spa with the injection of air in which bathers lie down.



## 2. 施設の利用状況と発症との関係

本施設は2002年6月20日にプレオープン、7月1日から正式オープンし、7月23日まで、22日間営業、その間、延べ19,773人(平日平均761人、土、日曜平均1,453人)が利用した。発症者295名(男性159名、女性136名)の利用は全営業日に渡っていた。利用者の最も多かった7月7日(利用者1,986名)、7月14日(利用者1,750名)は日曜日で、発症者も最も多く、それぞれ20名、34名であった。潜伏期間は2日から15日に9割以上が集中しており、ピークは5日であった。295名の年齢は0歳から95歳にわたり平均年齢は57.0歳(男性56.6歳、女性57.5歳)であった。

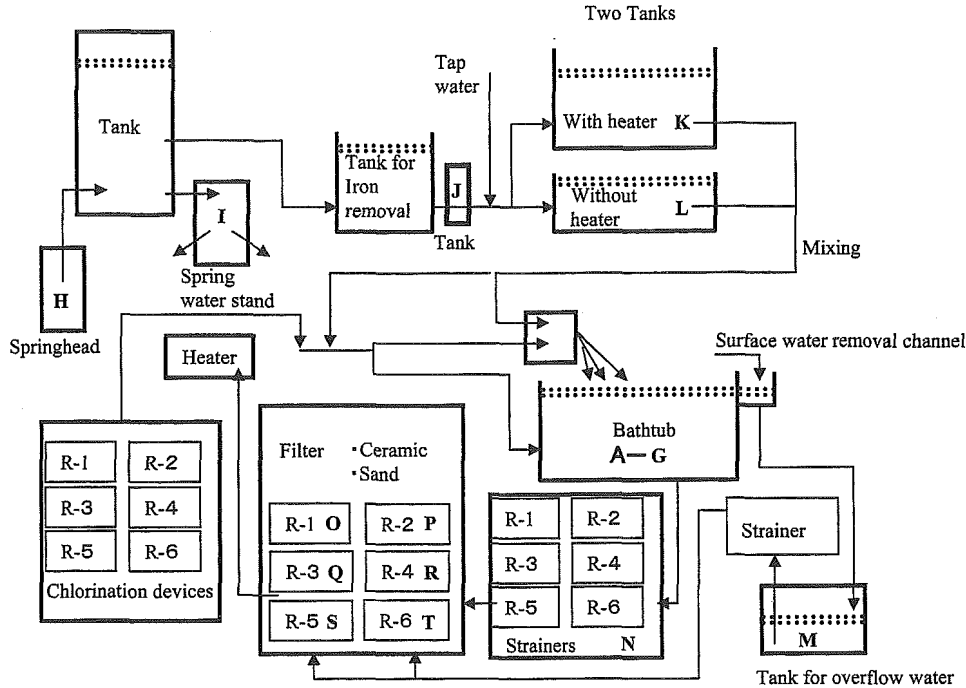
## 3. 原因施設の材料からのレジオネラ属菌、一般細菌数、アメーバ検査結果

Fig. 2 に施設の平面図、Fig. 3 に施設の配管、Table 1 にその主要部分からのレジオネラ属菌、一般細菌数およびアメーバの検出結果を示した。検査を実施した浴槽A~Fの浴槽水すべてからレジオネラ属菌が検出され、その汚染の程度はB

が980 cfu/100mLであった以外は、 $10^4 \sim 10^6$  cfu/100mL 台という高濃度の汚染が認められた。分離された菌の菌種および血清型は、*L. pneumophila* SG1, SG8, *L. dumoffii*, *L. londiniensis* などであった。患者の検査により本事例の原因菌と推定される *L. pneumophila* SG1 と *L. dumoffii* が最も多く検出されたのは、Cの浴槽で、それぞれ、160,000, 520,000 cfu/100mL と推定され、これはR-4の循環ろ過システムの浴槽であった。さらに、レジオネラ属菌が最も多く検出されたDとEの浴槽(各々1,500,000 cfu/100mL, *L. londiniensis* が主要菌)は、Fig. 2 に示したようにいずれもR-5の循環システムの浴槽であった。また、A~Fの浴槽水からは $10^4 \sim 10^5$  cfu/mL 台の一般細菌数も検出され、アメーバもBの浴槽を除くすべての浴槽水から検出された。検査を実施した6つの浴槽水の採水時の残留塩素濃度はすべて0mg/Lで、pHは7.5~7.65であった。

主要配管(Fig. 3)についての検査では、源泉からは、レジオネラ菌は検出されなかったが、各々

Fig. 3 A diagrammatic representation of the pipework of the spas.



ンク水およびろ過装置のろ材など多くの場所からレジオネラ属菌およびアメーバが検出された。とくに浴槽水から多量のレジオネラ属菌が検出された R-4, R-5 の循環システムのろ材からそれぞれ 7,000 plaque/50mL, 20,000 plaque/50mL という大量のアメーバが検出された。

4. 患者および各設備から検出されたレジオネラ属菌の遺伝子多型解析結果

患者および各設備から検出された *L. pneumophila* SG1 について、制限酵素 *Sfi* I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法により遺伝子多型解析を行った。その結果、浴槽水および施設の設備から検出された SG1 がすべて、患者から分離された SG1 と遺伝子多型が一致した。従って本施設から検出されたすべての SG1 は遺伝学的に同一の菌であったと考えられた (Fig. 4)。

考 察

1976 年に米国フィラデルフィアで大規模なレジオネラ症集団感染が発生して以来、欧米では、数多くの集団感染事例が発生し<sup>2)-6)</sup>、また、米国、

英国、タイでは入院を要した市中肺炎患者の 3~8% がレジオネラによる肺炎であったと報告<sup>15)</sup>されている。日本では 1990 年代まで、レジオネラ症の発生頻度は欧米に比べて明らかに低く<sup>16)</sup>、大規模な集団発生も 1994 年のポンティアック熱の集団事例<sup>17)</sup>が報告されていただけであった。しかし、1986 年に Ikedo ら<sup>18)</sup>、1994 年に縣ら<sup>19)</sup>は、それぞれ、クーリングタワーの 62.9%、60.8% からレジオネラ属菌を検出したことを報告したが、これは欧米の病院環境の汚染率とほぼ同様であった。このことは、日本においても欧米と同程度のレジオネラ汚染があることを示し、すなわち、欧米と同様のレジオネラ症患者が存在する可能性を示唆するものであった。一方、レジオネラ症の検査には特殊な培地や試薬が必要なため、通常の細菌検査では検出できず、医師が本症を疑って特別に検査をしなければ診断ができない。さらに、これまで、レジオネラ症の診断に有効な尿中抗原は試薬の入手が難しく、保険適用もされていなかったため、一般に行える検査ではなかった。これらの理由に

Table 1 Detecion of *Legionella* and Amoeba from main parts of equipment

Sample		Date	Filtration system	Detection of <i>Legionella</i>			Detection of Amoeba		Detection of standard plate Count		
Sampling site	Type			Detection*	Total No. (cfu/100mL)	Species & serogroup	No. (cfu/100mL)	No. (plaque/50mL)	Species	Detection	Total No. (cfu/mL)
A	Bath water	July 19	R-2	+	2.6×10 <sup>4</sup>	<i>L.dumoffii</i>	1.5×10 <sup>4</sup>	+		+	1.8×10 <sup>4</sup>
						<i>L.londiniensis</i>	8.5×10 <sup>3</sup>				
						<i>L.pneumophila</i> SG8	2.5×10 <sup>3</sup>				
B	Bath water	July 19	R-3	+	9.8×10 <sup>2</sup>	<i>L.pneumophila</i> SG1	9.0×10 <sup>2</sup>	-		+	1.3×10 <sup>4</sup>
						<i>L.londiniensis</i>	4.0×10				
						<i>L.dumoffii</i>	2.0×10				
						<i>Legionella</i> species	4.0×10				
C	Bath water	July 19	R-4	+	6.8×10 <sup>5</sup>	<i>L.dumoffii</i>	5.2×10 <sup>5</sup>	+		+	1.6×10 <sup>5</sup>
						<i>L.pneumophila</i> SG1	1.6×10 <sup>5</sup>				
D	Bath water	July 19	R-5	+	1.5×10 <sup>6</sup>	<i>L.londiniensis</i>	1.5×10 <sup>6</sup>	+		+	1.8×10 <sup>4</sup>
						<i>L.pneumophila</i> SG1	4.5×10 <sup>4</sup>				
						<i>L.pneumophila</i> SG8	6.5×10 <sup>3</sup>				
						<i>L.dumoffii</i>	4.0×10 <sup>2</sup>				
E	Bath water	July 19	R-5	+	1.5×10 <sup>6</sup>	<i>L.londiniensis</i>	1.4×10 <sup>6</sup>	+		+	2.1×10 <sup>5</sup>
						<i>L.pneumophila</i> SG1	5.0×10 <sup>4</sup>				
						<i>L.dumoffii</i>	7.0×10 <sup>2</sup>				
F	Bath water	July 19	R-6	+	4.7×10 <sup>4</sup>	<i>L.pneumophila</i> SG1	4.3×10 <sup>4</sup>	+		+	3.1×10 <sup>4</sup>
						<i>L.londiniensis</i>	4.3×10 <sup>3</sup>				
						<i>L.dumoffii</i>	6.0×10 <sup>2</sup>				
G	Swab	July 31	R-4	+		<i>L.pneumophila</i> SG1		+			Acanthamoeba
						<i>L.pneumophila</i> SG8					Hartmannella
						<i>L.dumoffii</i>					Vexillifera
H	Spring-head water	July 31		-				+	76		Naegleria
											Vannella
											Vexillifera
I	Tank water	July 19		+	1.2×10 <sup>4</sup>	<i>Legionella</i> species	1.2×10 <sup>4</sup>	+		+	5.8×10 <sup>3</sup>
J	Tank water	August 5		+	3.2×10 <sup>4</sup>	<i>L.pneumophila</i> SG1		+	28		Platyamoeba
						<i>L.dumoffii</i>					Vannella
K	Tank water	August 5		+	6.0×10	<i>L.pneumophila</i> SG1		-		+	5.5×10 <sup>2</sup>

本邦最大のレジオネラ症集団感染事例

L	Tank water	August 5		+	1.3×10 <sup>5</sup>	<i>L.pneumophila</i> SG1 <i>L.pneumophila</i> SG8 <i>L.dumoffii</i>	+	17	<i>Acanthamoeba</i> <i>Platyamoeba</i>	+	3.0×10 <sup>5</sup>
M	Swab	July 31	R-1	+		<i>L.pneumophila</i> SG1 <i>L.pneumophila</i> SG8 <i>L.dumoffii</i>	+		<i>Acanthamoeba</i> <i>Naegleria</i> <i>Vannella</i>		
N	Swab	July 31	R-4	+		<i>L.pneumophila</i> SG8 <i>L.dumoffii</i>	+		<i>Naegleria</i> <i>Hartmannella</i> <i>Vannella</i>		
O	Filter Ceramic	August 5	R-1	+		<i>L.pneumophila</i> SG1 <i>L.pneumophila</i> SG8	+	100	<i>Naegleria</i> <i>Vannella</i>		
P	Filter	August 5	R-2	-			-				
Q	Filter	August 5	R-3	+		<i>L.pneumophila</i> SG1 <i>L.pneumophila</i> SG8 <i>L.dumoffii</i>	+	1,500	<i>Vannella</i>		
R	Filter	August 5	R-4	+		<i>L.pneumophila</i> SG1 <i>L.pneumophila</i> SG6 <i>L.pneumophila</i> SG8 <i>L.dumoffii</i>	+	7,000	<i>Vannella</i>		
S	Filter	August 5	R-5	+		<i>L.pneumophila</i> SG1 <i>L.dumoffii</i>	+	20,000	<i>Naegleria</i> <i>Hartmannella</i> <i>Vannella</i>		
T	Filter	August 5	R-6	+		<i>L.pneumophila</i> SG1 <i>L.pneumophila</i> SG8 <i>L.dumoffii</i>	+	2			

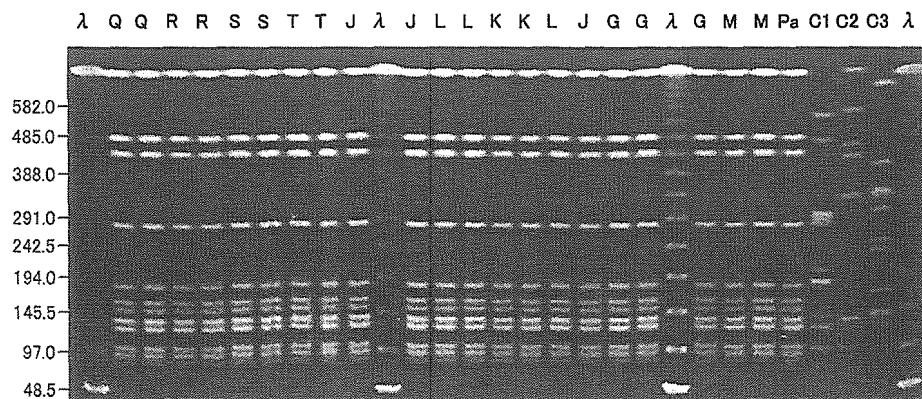
\* : +, detected with a sensitivity threshold of 10 cfu per 100 mL ; - , not detected

より、レジオネラ症は我が国で相当数見逃されてきたことが想像される。しかし2000年に入り、静岡県<sup>7)</sup>、茨城県<sup>8)</sup>、2002年に鹿児島<sup>20)</sup>の循環式浴槽を原因とした集団感染事例が発生し、その後も各地で相次いで発生報告がなされ、さらに今回、当県で295名の患者（疑いを含む）が発生するという大規模集団感染事例を経験したことは、特に、医療機関、および公衆浴場関係者のレジオネラ症に関する認識を高めたものと思われる。加えて、

2003年4月、尿中抗原の保険点数が決まり、試薬の発売も許可されたことにより、今後は、症例数も増え、日本におけるレジオネラ症の実態が明らかになるものと考えられる。

患者が複数回入浴している場合や、軽症のため医療機関を受診しなかった場合を考慮すると本事例における正確な侵襲率は不明であるが、約1.5%と計算された。今回の例ではエアロゾルの発生がB、G、及び他に1箇所の小型の浴槽と限られてい

Fig. 4 Comparison of PFGE patterns of *Sfi* I-digested DNA among *Legionella pneumophila* SG1 strains isolated from patients with pneumonia and materials from the main parts of equipment of the spa. G-T : Equipment shown on Figs. 2 and 3, Pa : Patient, C1-C3 : Unrelated strains,  $\lambda$  :  $\lambda$  ladder.



たため侵襲率が比較的小さかったのであろう。オランダの花博では展示循環風呂の近くを通っただけの観光客の0.23%が発症している<sup>9)</sup>。患者の発生状況を見ると、6月20日、21日のプレオープンの入浴者にすでに感染者が出ていることから、入浴施設のレジオネラ属菌による汚染はかなり早期に危険なレベルに達していたと思われる。また、最初に医療機関から保健所に報告があった7月18日時点で、すでに132名もの入浴者が感染していた事実は重い(Fig. 1)。これには、発熱や肺炎の散发症例に接しても主治医がレジオネラ症をまれなケースとみなしていた可能性、早期にレジオネラ症の診断が可能な検査法が普及していなかった可能性が考えられる。

浴槽水中のレジオネラ属菌は、*L. pneumophila*の血清群3, 4, 5, 6が多いと報告されてきたが<sup>21)22)</sup>、循環式入浴施設におけるこれまでのレジオネラ症の集団発生は、*L. pneumophila* SG1ばかりである<sup>7)8)20)</sup>。この意味するところはまだ不明であるが、*L. pneumophila* SG1の病原性が高いのかもしれないし、あるいは、塩素消毒を伴った循環式浴槽という環境では、アメーバを含めた微生物叢が*L. pneumophila* SG1に偏ることがあるのかもしれない。単一の*L. pneumophila* SG1株が広汎に検出されたが、その起源は今のところ不明である。

周辺の土壌からは同一のDNA型の菌株は採取できなかった(未発表データ)。

今回の事例で主たる起因菌となった浴槽水中の*L. pneumophila* SG1の濃度は、900 cfu/100mLから最高160,000 cfu/100mLであり、検査した6つの浴槽水の内4つの浴槽水で10,000cfu/100mLを超えていた。同じような循環式浴槽を原因とする静岡、茨城、鹿児島におけるレジオネラ症の集団発生では、浴槽水中の*L. pneumophila*の濃度は、それぞれ最高88,000(*L. pneumophila* SG1)、8,400(*L. pneumophila* SG1、5および6)、130,000(*L. pneumophila* SG1および6) cfu/100mLであった<sup>7)8)21)</sup>。エアロゾルの発生条件にもよるが、他の集団発生の事例を考慮すると5,000 cfu/100mLをこえる濃度に達すると集団発生はいつ起きても不思議でないと思われる。それゆえ、浴槽水中にこの程度の菌量が検出された場合には、広報を行いレジオネラ症患者の有無を調査する必要があるだろう。

環境中から多種類のレジオネラ属菌が検出された。その内最も多量に検出された*L. londiniensis*は冷却塔や温泉等の環境水中からのみ海外で分離が報告されているが<sup>20)</sup>、患者からは分離されていない<sup>1)</sup>。また、国内では初めての環境からの分離例である。しかしながら、この菌に対する患者の抗体価を調べたところ上昇していなかったの



で、人への病原性は弱いと考えられる。この菌株は、1週間近く培養してようやく肉眼で見える程度の増殖の遅い菌で、コロニーが小さいので他の菌種と容易に区別できた。また、長波長の紫外線を培養プレートに当てることにより、青白色の自発蛍光を発する *L. dumoffii* をコロニーとして他の菌種とは区別して計数することができたことから、自発蛍光の観察はきわめて有用である。

今回の事例の発生源は循環式ろ過装置を利用した入浴施設であった。検査時点で浴槽水中に遊離塩素が検出されなかったように、その衛生管理が適切に行われていなかったため、オープンまもない新しい施設でありながら、浴槽水をはじめ、ろ過装置のろ材、配管のあらゆる場所から、レジオネラ属菌が高濃度に検出された。この汚染の背景として、宿主となるアメーバ類が、ろ過装置を中心として多量に増殖していたことがあげられる。換言すれば、本入浴施設では宿主アメーバの多量増殖を許すような細菌等による汚染の進行が指摘され、改めて水質管理の重要性を認識させられる事例である。このような施設においては、レジオネラ属菌がどこからでも入ってくる恐れのある菌であること、アメーバなどの原生動物中で増殖するという特殊な性質を持っていること、人を死に至らしめるような危険な菌であることを認識した上で、十分な衛生管理を行っていく必要があると痛感させられた。

レジオネラ症は、今回の事例のような入浴施設だけでなく、一般のビル、ホテル、学校、病院などでも、冷房設備、給湯設備、入浴設備、水景設備等を原因として発生しうる。そのため、レジオネラ症の発生については、今後も、広い範囲での対策を考えていかなければならないと思われた。

謝辞：今回の事例にあたり、疫学情報の提供にご協力いただいた宮崎県庁各関係課、検査材料の提供にご協力いただいた各医療機関ならびに各保健所の皆様に深謝いたします。また、検査試薬を提供していただいた、デンカ生研の権平文夫氏、レジオネラの検査について多大なるご助言をいただいた全国各地の皆様へ深謝いたします。

#### 文 献

1) Stout JE, Rihs JD, Yu VL : *Legionella*. In : Mur-

ray PR, ed. Manual of Clinical microbiology. 8<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, D.C., 2003 ; p.809—23.

2) Garcia-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, Garcia J, Gonzales-Diego P, Jimenez-Bunuales T, *et al.* : Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis* 2003 ; 9 : 915—21.

3) Fernandez JA, Lopez P, Orozco D, Merino J : Clinical study of an outbreak of Legionnaires' disease in Alcoy, Southeastern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002 ; 21 : 729—35.

4) Den Boer JW, Yzerman EP, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, Van Steenberghe JE, *et al.* : A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis* 2002 ; 8 : 37—43.

5) Greig JE, Carnie JA, Tallis GF, Ryan NJ, Tan AG, Gordon IR, *et al.* : An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000 : investigation and case-control studies. *Med J Aust* 2004 ; 180 : 566—72.

6) Gent N : Legionnaires' disease update : Barrow-in-Furness outbreak. Update Letter sent to Primary Care staff. <http://www.healthprotection.org.uk/Barrow/main.html>

7) 杉山寛治, 西尾智裕, 郷田淑明, 張 凡非, 増田教子, 秋山真人, 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 —循環濾過式浴槽水を感染源とするレジオネラ症集団感染事例と検査—. 静岡県環境衛生科学研究所報告 2000 ; 43 : 1—4.

8) Nakamura H, Yagyu H, Kishi K, Tsuchida F, Oh-Ishi S, Yamaguchi K, *et al.* : A large outbreak of legionnaires' disease due to an inadequate circulating and filtration system for bath water—epidemiologic manifestations. *Intern Med* 2003 ; 42 : 806—11.

9) 宮崎県福祉保健部 : 日向サンパーク温泉「お舟出の湯」におけるレジオネラ症集団感染事例報告書. 2003.

10) 地方衛生研究所全国協議会, 国立感染症研究所 : レジオネラ検査マニュアル. 2002.

11) 厚生省生活衛生局企画課 : 環境水のレジオネラ属菌検査方法, 新版レジオネラ症防止指針. ビル管理教育センター, 1999.

12) 山本啓之 : PCR 法による *Legionella* 属細菌の検出・同定. *日本臨床* 1992 ; 50 特別号 : 394—9.

13) Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, Atlas RM : Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol Cell Probes* 1990 ; 4 : 175—87.

14) 八木田健司, 遠藤卓郎, 太田宗広, 藪内英子 : 家庭用循環式浴槽の浴用水からの *Legionella* 属菌の

- 宿主アメーバ類の検出. 環境感染 1997; 12: 89—93.
- 15) File TM: Community-acquired pneumonia. Lancet 2003; 362: 1991—2001.
- 16) 荒川迪生, 稲松孝思, 江崎孝行, 大井田隆, 齋藤厚, 副島林造, 他: 本邦レジオネラ肺炎患者について -1979年から1992年まで-. 日環感 1993; 8: 1—10.
- 17) 森 正道, 星野啓一, 園田久子, 吉田広海, 藪内英子, 山城祐子, 他: *Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever の集団発生例 I 臨床所見. 感染症誌 1995; 69: 646—53.
- 18) Ikedo M, Yabuuchi E: Ecological studies of *Legionella* species. I. Viable counts of *Legionella pneumophila* in cooling tower water. Microbiol Immunol 1986; 30: 413—23.
- 19) 縣 邦雄, 広中隆行: 日本の冷却塔水中のレジオネラ属菌の分布. 感染症誌 1994; 68: 421—3.
- 20) 吉國謙一郎, 中山浩一郎, 本田俊郎, 新川奈緒美, 有馬忠行, 湯又義勝, 他: 循環式浴槽水が原因と推定されたレジオネラ症集団発生事例 -鹿児島県. 病原微生物検出情報 2003; 24: 31—2.
- 21) 官本 幹, 山口善夫, 笹津備規: 環境中のレジオネラ属菌および非結核性抗酸菌の分布調査. 環境感染 2000; 15: 127—32.
- 22) 鈴木敦子, 市瀬正之, 松江隆之, 天野祐次, 寺山武, 泉山信司, 他: 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況 -1996年4月から2000年11月まで. 感染症誌 2002; 76: 703—10.
- 23) Rocha G, Verissimo A, Bowker R, Bornstein N, Da Costa MS: Relationship between *Legionella* spp. and antibody titres at a therapeutic thermal spa in Portugal. Epidemiol Infect 1995; 115: 79—88.

The Largest Outbreak of Legionellosis in Japan Associated with Spa Baths :  
Epidemic Curve and Environmental Investigation

Mika OKADA<sup>1)</sup>, Kimiko KAWANO<sup>1)</sup>, Fumiaki KURA<sup>2)</sup>, Junko AMEMURA-MAEKAWA<sup>2)</sup>,  
Haruo WATANABE<sup>2)</sup>, Kenji YAGITA<sup>3)</sup>, Takuro ENDO<sup>3)</sup> & Sen SUZUKI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment

<sup>2)</sup>Department of Bacteriology and <sup>3)</sup>Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

In July 2002, a large outbreak of legionellosis occurred in a bathhouse with spa facilities in Miyazaki Prefecture. Two hundred-ninety-five patients (including suspected cases) that had pneumonia and/or symptoms of fever, cough and so forth were reported; 37% of them were hospitalized and seven people died. In environmental investigations, *Legionella pneumophila* serogroups (SGs) 1 and 8, *L. dumoffii*, *L. londiniensis*, some other *Legionella* species and many kinds of amoeba were isolated from 55 samples of bathtub water, tank water, filters and so forth in the spa facilities. The dominant isolates from the bathtub waters belonged to *L. londiniensis*, *L. dumoffii* and *L. pneumophila* SG1, and their maximum concentrations were  $1.5 \times 10^6$ ,  $5.2 \times 10^5$  and  $1.6 \times 10^5$  cfu/100mL, respectively.

*L. pneumophila* SG1 strains isolated from bathtub water, tank water, filters and sputa of patients showed a indistinguishable DNA fingerprint pattern by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), confirming that the source of infection was the spa water. Our study indicate that spas may be a significant health hazard if hygienic management fails.

# 循環ろ過式モデル浴槽系内における バイオフィーム形成とその洗浄・殺菌について

藤井 明 (ふじい あきら)<sup>1)</sup>  
河合 自立 (かわい よりたつ)<sup>1)</sup>  
松田 和也 (まつだ かずや)<sup>1)</sup>

杉山 寛治 (すぎやま かんじ)<sup>2)</sup>  
大畑 克彦 (おおはた かつひこ)<sup>2)</sup>  
鈴木 光彰 (すずき みつあき)<sup>3)</sup>  
加藤 宏一 (かとう こういち)<sup>4)</sup>

## 1. はじめに

近年、入浴施設におけるレジオネラ症集団感染事例が多発している。本来、心身のリフレッシュや健康、癒しを求めて利用される施設で、逆に健康危害を被る可能性があるという問題を抱えているなか、安全で安心な施設作りは営業者側の責務である。

こうした背景のもと、静岡県環境衛生科学研究所では、循環ろ過式モデル浴槽を研究所内に構築し、2002年4月より循環浴槽におけるレジオネラ汚染防止対策確立を目指した各種実験を開始した。その中で、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌管理下で一定期間の入浴期間を経た後、無殺菌状況下で循環ろ過を行った浴槽水中では、入浴期間中に蓄積した有機物を栄養源として利用できる一般細菌や従属栄養細菌が無殺菌循環開始直後から増加し、その後、細菌捕食性のアメーバが急激に繁殖、そして、細胞内増殖性のレジオネラ属菌の著しい増殖が自然汚染によりごく普通に起こる<sup>1)</sup> (図1) ことを報告した。

一方、レジオネラ属菌の爆発的な増殖には、配管やろ過器内部に形成されるバイオフィームの存在が不可欠であることから、本研究では、同循環ろ過式モデル浴槽において、自然汚染、無殺菌状況下での浴槽循環系内におけ

るバイオフィーム形成状況を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。さらに、過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤ならびに過酸化水素によるバイオフィーム洗浄・殺菌効果を確認した。また、これらの研究を通じて得られた衛生管理上のリスクポイントに関する知見も併せて報告する。

## 2. 試験方法

(1) 試験に使用した循環ろ過式モデル浴槽の概要  
設備としては、約2m<sup>3</sup>の浴槽 (1m<sup>2</sup>×2槽)、粒度の異なるセラミックサンドのろ過材3層 (総量約100kg) から成るろ過器 (通水速度LV:25.5m/h)、材質の異なる配管 (SUS304:ステンレス, VP:塩化ビニル, PP:ポリプロピレン)、ヘアキャッチャー、熱交換器及び循環ポンプ等から構成され、約40℃に保温された湯水が1時間あたり約5m<sup>3</sup>循環している (図2)。

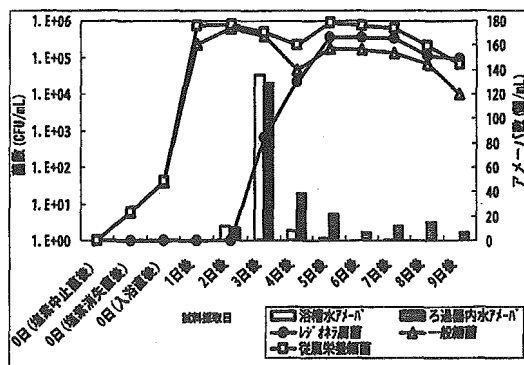


図1 自然汚染による循環浴槽水中のレジオネラ属菌及びアメーバ等の経日変化  
参考文献 1) から引用

- 1) 株式会社ヘルスケミカル
- 2) 静岡県環境衛生科学研究所
- 3) 静岡工業技術センター
- 4) 名古屋市立大学システム自然科学研究科

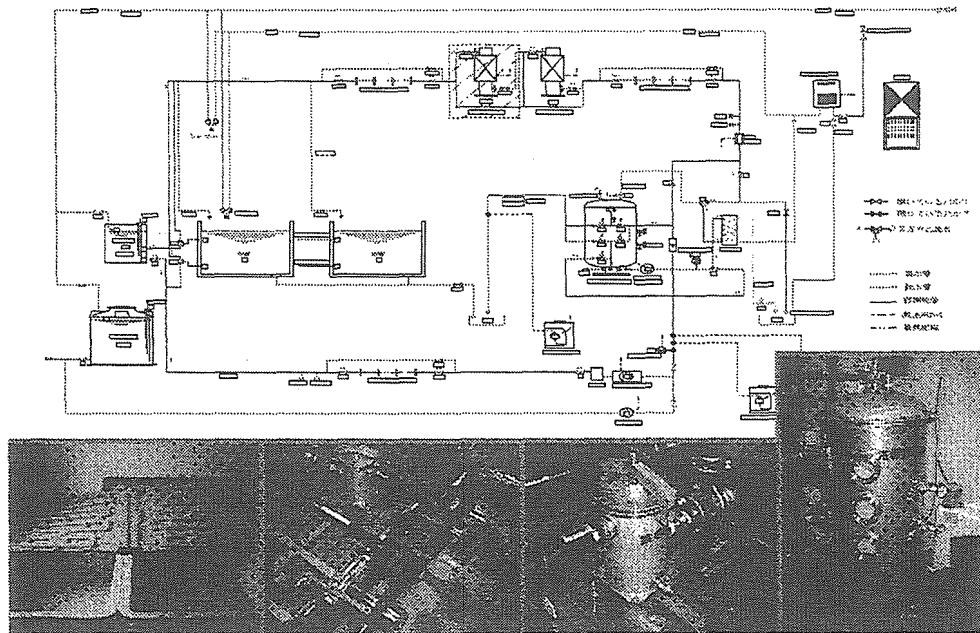


図2 循環ろ過式モデル浴槽の配管図

(2) ろ過材, VP配管テストピース及びEPDMパッキンに形成されたバイオフィームの走査型電子顕微鏡による観察ならびにレジオネラ属菌検査

次亜塩素酸ナトリウム溶液による殺菌（遊離残留塩素濃度0.2～1.5mg/L）管理下，6日間に延べ14名が入浴することにより皮脂や垢等の有機物を蓄積させた後，次亜塩素酸ナトリウム溶液の注入を停止させ，紫外線殺菌装置を用いて残留塩素を消失させた。その後，窓を開放して3名が入浴し，以後無殺菌状況で循環21日後にろ過材を採取した。また，VP配管テストピースは，同様のスケジュールで，殺菌管理下12日間に延べ27名入浴した後，残留塩素消失後1名入浴し，無殺菌循環0，3及び6日後に採取した。さらに，EPDMパッキンは，殺菌管理下6日間に延べ13名入浴した後，残留塩素消失後3名入浴し，無殺菌循環18日後に採取した。各採取部材の小片を，ホルムアルデヒド固定後，さらにオスミウム酸固定を行った。続いてエタノール系列による脱水を経て，液化炭酸を用いた臨界点乾燥法

により乾燥後，金蒸着を行い，走査型電子顕微鏡（JEOL JSM-T100）で観察した。また，各々隣接部位のレジオネラ属菌検査を行った。レジオネラ属菌検査は，冷却遠心濃縮法<sup>2)</sup>により行い，分離培地にはWYO $\alpha$ 寒天培地（栄研化学）またはGVPC寒天培地（日本ビオメリュー）を用いた。发育した疑わしい集落は，WYO $\alpha$ またはGVPC寒天培地及びトリプトソイ寒天培地（栄研化学）にそれぞれ塗抹して37℃2日間鑑別培養し，WYO $\alpha$ またはGVPC寒天培地にのみ发育した分離株について，市販血清（デンカ生研）を用いて血清群を調べた。なお，ろ過材については，5gを50mLの滅菌リン酸緩衝液にて洗い出した後，その上清を，また，拭き取り材料は，滅菌綿棒により当該部位を均一に拭き取り，滅菌リン酸緩衝液9mLに懸濁後，各々接種し，培養検査を行った。

(3) EPDMパッキン上バイオフィーム中のレジオネラニューモフィラの同定

EPDMパッキン上バイオフィームの一部をスライドガラス上に取り，蛍光標識DNAブ