

研究奨励賞受賞論文

レジオネラ症感染防止対策に関する研究

古畑 勝則

Studies on Infectious Preventive Measures of Legionellosis

Katsunori FURUHATA

College of Environmental Health, Azabu University  
1-17-71, Fuchinobe, Sagamihara, Kanagawa 229-8501, Japan

1. はじめに

近年、各地の温泉においてレジオネラ症が多発し、社会的に問題視されている。レジオネラ症は呼吸器系の感染症であるから原因菌であるレジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸い込むことによって発症するものと考えられている。したがって、身近な水環境が感染源と考えられ、感染源対策が最優先課題とされている。

本稿では、これまでおよそ20年間、レジオネラ属菌の分布を中心に行ってきた生態学的検討や *L. pneumophila* に対して有効な天然抗菌剤の検索結果の一部をまとめた。レジオネラ属菌の細菌学的特性を十分に理解し、適切な殺菌処理を行うための一助としていただければ幸いである。

2. 我国の土壌におけるレジオネラ属菌の分布状況<sup>1)</sup>

レジオネラ属菌は土壌細菌であるといわれているが、その根拠となるデータは乏しい。特に我国における分布状況はほとんど知られていないのが実情である。そこで、我国の土壌におけるレジオネラ属菌の分布状況を把握するために、全国各地の土壌からレジオネラ属菌の分離を試みた。

2.1. レジオネラ属菌の地域別分離状況

全国各地からのレジオネラ属菌の分離状況を図1に示した。全体では1,362試料中86試料(6.3%)から分離され、分離率は低いものの北は北海道から南は九州、沖縄まで日本全国に分布していることが明らかになった。47都道府県の内、レジオネラ属菌が分離されたのは31都道府県に及び、66.0%と半数以上の都道府県から分離された。また、図2にはレジオネラ属菌が分離された各都道府県での分離率を示した。都道府県別に分離率を比較すると、15%を超えた県は山形と長崎の2県で、それぞれ15.8%、16.7%であった。分離率が10%~15%であった都県は、宮城、東京、神奈川、群馬、埼玉、富山、兵庫、島根、佐賀、沖縄の10都県で、5%~10%であった府県は、長野、石川、福井、滋賀、大阪、山口、徳島、福岡、大分の9府県であった。このように、レジオネラ属菌は大都市圏、地方を問わず各地から分離されており、地理的な分布傾向は認められなかった。

2.2. レジオネラ属菌の季節別分離状況

図3には月別の分離率を示した。レジオネラ属菌は6月を除く各月から分離され、年間を通して

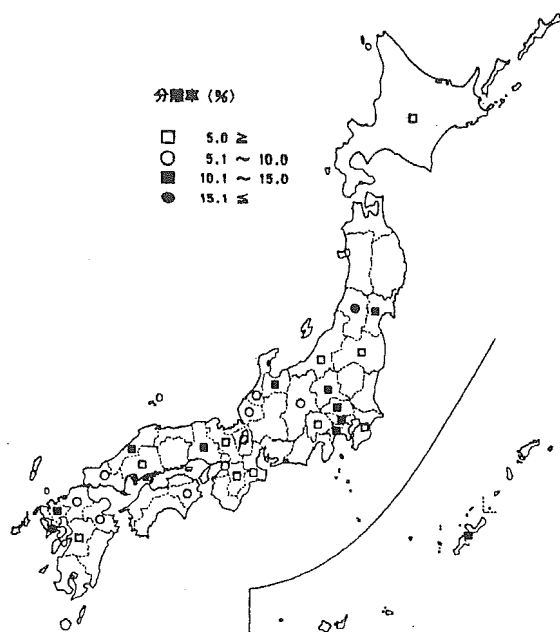


図1. 我国の土壤におけるレジオネラ属菌の分布状況

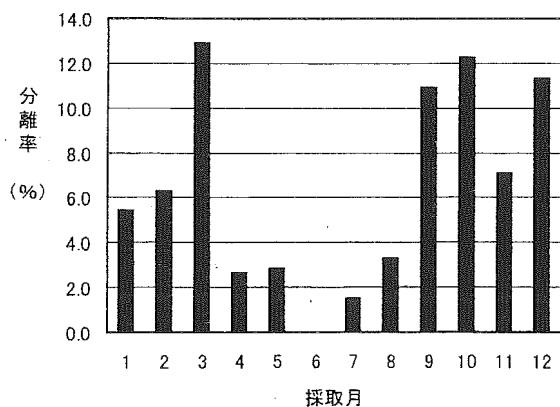


図3. 土壤からのレジオネラ属菌の月別分離状況

土壤中に生息していた。特に3月、9月、10月、12月の分離率は10%を超え、比較的高率に分離された。四季のなかで最も分離率が高かったのは秋期で、415試料中40試料(9.6%)から分離された。次に冬期では277試料中21試料(7.6%)、春期では334試料中18試料(5.4%)からそれぞれ分離された。しかし、夏期は予想に反して分離率が最も低く、336試料中7試料(2.1%)から分離されたに過ぎなかった。

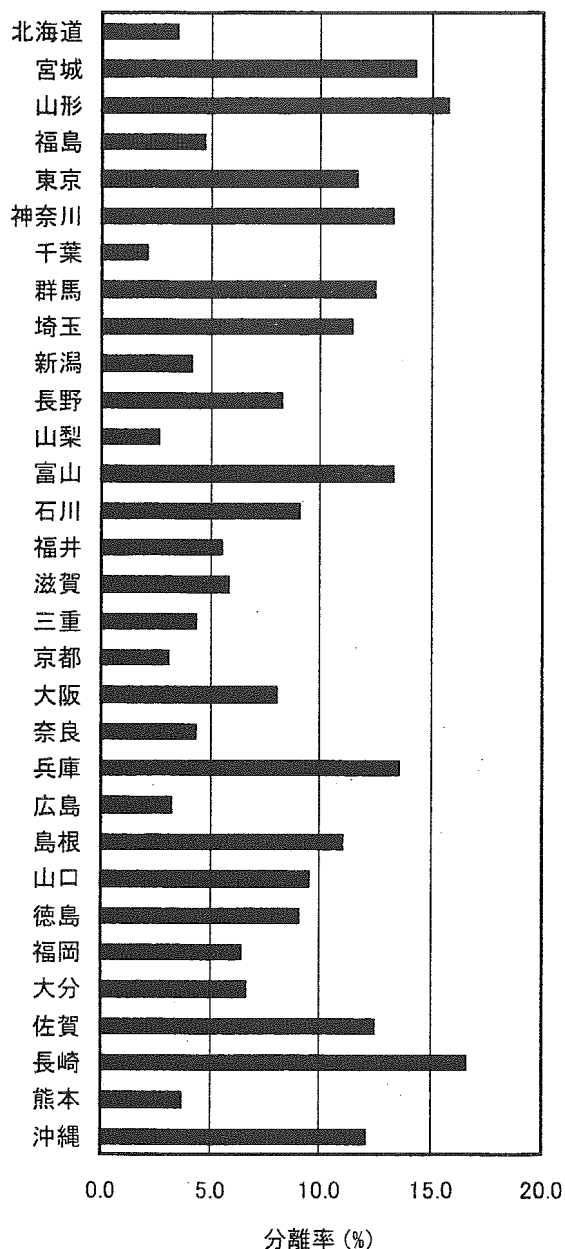


図2. 土壤からのレジオネラ属菌の都道府県別分離状況

### 2.3. レジオネラ属菌の菌種別分離状況

全国各地の土壤86試料から分離された116株のレジオネラ属菌を表1にまとめた。最も高頻度に分離された菌種は *L. pneumophila* で、全体の80.2%を占めた。なかでも群別できたものでは血清群1群が30株(32.3%)と最も多く、次に3群が16株(17.2%)であった。5群と6群はそれぞれ7株(7.5%)ずつ分離されたが、4群は1株も分離されなかった。また、7群から14群で個

表1. 我国の土壌から分離されたレジオネラ属菌

菌種	株数 (%)
<i>L. pneumophila</i>	
血清群 1	30 (25.9)
2	1 (0.9)
3	16 (13.8)
5	7 (6.0)
6	7 (6.0)
7-14	32 (27.6)
<i>L. anisa</i>	1 (0.9)
<i>L. bozemanii</i>	2 (1.7)
<i>L. feeleii</i>	3 (2.6)
<i>L. longbeachae</i>	1 (0.9)
<i>L. oakridgensis</i>	2 (1.7)
<i>L. rubrilucens</i>	1 (0.9)
<i>L. sainthelensis</i>	6 (5.2)
その他	7 (6.0)
合計	116 (100.0)

別には群別できなかったものが32株 (34.4%) あった。*L. pneumophila* 以外の菌種では *L. sainthelensis* が最も多く認められたが、全体では6株 (5.2%) と低率であった。そのほか、*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. feeleii*, *L. longbeachae*, *L. oakridgensis*, *L. rubrilucens* がわずかながら分離された。

各地域におけるレジオネラ属菌の菌種別分布状況は表2に示すとおり、最も分離頻度が高かった *L. pneumophila* 血清群1群は北海道を除く各地域から分離された。一方、3群は関東、中部、中国および九州から分離されたが、北海道や東北からは分離されなかった。これに対し、5群と6群

表2. 土壌からの地域別分離菌種

菌種	北海道	東北	関東	中部	近畿	中国	四国	九州	沖縄	合計
<i>L. pneumophila</i>										
血清群 1	0*	3	9	2	6	3	2	4	1	30
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
3	0	0	10	2	0	2	0	2	0	16
5	1	0	4	1	1	0	0	0	0	7
6	0	1	4	1	1	0	0	0	0	7
7-14	1	4	11	1	4	3	1	4	3	32
<i>L. anisa</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>L. bozemanii</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>L. feeleii</i>	0	1	1	1	0	0	0	0	0	3
<i>L. longbeachae</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>L. oakridgensis</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>L. rubrilucens</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>L. sainthelensis</i>	0	2	3	1	0	0	0	0	0	6
その他	1	0	3	0	0	1	1	0	1	7
合計	3	11	47	10	14	9	5	12	5	116

\* : 菌株数

表3. 土壌からの月別分離菌種

菌種	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合計
<i>L. pneumophila</i>													
血清群 1	2*	1	3	0	1	0	0	4	5	7	6	1	30
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	2	1	2	0	1	0	0	2	2	2	3	1	16
5	0	0	1	0	0	0	1	1	2	0	1	1	7
6	1	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	7
7-14	3	0	5	0	0	0	1	2	6	9	4	2	32
<i>L. anisa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. bozemanii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>L. feeleii</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3
<i>L. longbeachae</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. oakridgensis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
<i>L. rubrilucens</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. sainthelensis</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3	6
その他	0	0	0	0	2	0	0	1	2	0	2	0	7
合計	9	6	14	2	5	0	2	11	18	20	18	11	116

\* : 菌株数

は近畿より東の地域で分離されたが、中国、四国、九州および沖縄では分離されなかった。表3には分離菌種の月別分布状況を示した。レジオネラ属菌がまったく分離されなかった6月と分離株数が少なかった4月、7月を除いて分離状況をみると、分離菌種と分離月には顕著な傾向はみられなかった。

#### 2.4. レジオネラ属菌が分離された土壌の特性と使用用途

レジオネラ属菌が分離された土壌の採取場所とその土壌のpHおよび水分含量を表4に示した。レジオネラ属菌が最も多く分離された場所は道端で、全体の26.7%であった。次に、庭が16.3%、植え込みが14.0%、畑が11.6%であった。このほか、駐車場、空き地、公園など身近な土壌から分離された。これら試料のpH値をみると、5.5~8.5と広範囲にわたり、弱酸性から弱アルカリ性の土壌にレジオネラ属菌は広く生息していた。また、水分含量は10.4%~48.5%であり、土壌の乾燥度合いにおいて分離試料特有の傾向は認められなかった。

表4. レジオネラ属菌が分離された土壌の採取場所とそのpHおよび水分含量

採取場所	分離試料数 (%)	pH	水分含量 (%)
道端	23 (26.7)	7.0 - 8.5	17.3 - 48.5
庭	14 (16.3)	6.5 - 8.1	10.4 - 13.9
植え込み	12 (14.0)	6.3 - 8.0	12.0 - 45.8
畑	10 (11.6)	5.6 - 8.5	14.4 - 37.0
駐車場	8 (9.3)	6.5 - 8.0	13.1 - 32.4
空き地	7 (8.1)	6.5 - 7.3	10.9 - 48.1
公園	2 (2.3)	5.5, 6.4	31.6, 46.2
野原	2 (2.3)	7.0, 8.2	16.2, 21.9
資材置き場	2 (2.3)	6.2, 8.4	19.6, 28.9
林	2 (2.3)	6.5, 7.1	15.9, 26.7
土手	1 (1.2)	8.3	19.2
山	1 (1.2)	5.8	21.9
田	1 (1.2)	6.2	45.0
神社	1 (1.2)	7.4	15.9
合計	86 (100.0)		

#### 2.5. 深層部土壌からのレジオネラ属菌の分離状況と分離菌種

深層部土壌からのレジオネラ属菌の分離状況を表5に示した。9月から11月の間に15都府県で採取した60試料についてレジオネラ属菌の分離を試みたところ、神奈川県で3試料、山口県で2試料、福岡県で1試料の計6試料(10.0%)から分離され、レジオネラ属菌は表層から20~30cmの深さの土壌中にも生息していることがわかった。月別では9月の分離率が15.4%(26試料中4試料)、10月は11.1%(9試料中1試料)とほぼ同程度であったが、11月は4.0%(25試料中1試料)と他の月に比べ、低い分離率であった。また、分離菌種はいずれも*L. pneumophila*であり、血清群1群が共通して分離された。

### 3. 我国の温泉水におけるレジオネラ属菌の分布状況<sup>2)</sup>

「日本秘湯に入る会」という愛好会の協力を得て、日本全国の温泉におけるレジオネラ属菌の生息状況を調査した。

#### 3.1. 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況

全国各地の温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況は表6に示すとおり、全体では710試料中204試料(28.7%)から分離された。その内訳は全国47都道府県すべての温泉水から3.8%~100%に分離された。これを地域別にみると、中国、東北および関東地方の分離率が30.7%~31.0%とやや高く、次に中部と四国地方が28.6%~29.2%であり、北海道、近畿および九州地方が25.0%~26.2%とやや低かった。これらのことから地域別における分離率に顕著な差は認められなかった。

採水した試料を内湯と露天に区別し、それぞれ

表5. 我国の深層土壌からのレジオネラ属菌の分離状況

採取月	供試試料数	分離試料数 (%)	分離県名 (試料数)	分離菌種	血清群
9	26	4 (15.4)	神奈川県 (2) 山口県 (2)	<i>L. pneumophila</i> <i>L. pneumophila</i>	1, 5 1, 7-14
10	9	1 (11.1)	神奈川県 (1)	<i>L. pneumophila</i>	1, 7-14
11	25	1 (4.0)	福岡県 (1)	<i>L. pneumophila</i>	1, 7-14
合計	60	6 (10.0)			

の分離率を比較したものを表7に示した。内湯では447試料中137試料(30.6%)から、露天では222試料中61試料(27.5%)からそれぞれ分離され、露天における分離率の方がわずかに低率であった。また、温泉水の供給形態を「循環式」といわれる「かけ流し」に区別して両者の分離率と検出菌数の比較を表8に示した。循環式では100試料中38試料(38.0%)から分離された。これに対し、かけ流しでも249試料中68試料(27.3%)から分離され、循環式での分離率と顕著な差はみられなかった。また、温泉水100ml中の検出菌数は、循環式が平均1,701.8CFU、かけ流しが939.1CFUであり、循環式の方がわずかに多かったが有意な差は認められなかった。

表9には温泉水のpH別に分離率を示した。レジオネラ属菌は最低pH2.8から最高pH9.3の範囲で分離されたが、温泉水のpHによって分離率に差が認められた。すなわち、pH3.1~pH7.5の範囲が34.8%と高く、次にpH7.6以上が24.8%とそれぞれ高率であったが、pH3以下では4.9%と非常に低い分離率であった。このことから、本菌は弱酸性または中性の環境下において高率に存在

していることが明らかになった。

レジオネラ属菌が分離された204試料における温泉水100ml当たりのレジオネラ属菌数を図4に示した。菌数については $10^2$ CFU未満が98試料(48.0%)と最も多く、次に $10^2$ CFU台が71試料(34.8%)、 $10^3$ CFU台が29試料(14.2%)および $10^4$ CFU以上が6試料(2.9%)あった。

検出菌数のワースト10は表10に示すとおり、最高菌数は $3.4 \times 10^4$ CFU/100mlであり、10位は $5.0 \times 10^3$ CFU/100mlであった。これら10ヶ所の内訳は、内湯が8ヶ所と多く、露天は2ヶ所にすぎず、ワースト5まではすべて内湯であった。また、温泉水の供給形態別では、6ヶ所が循環式、4ヶ所がかけ流しであった。なお、上位2位まではいずれも循環式であった。これら温泉水のpH

表6. 我国の温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況

採取地域	供試試料数	分離試料数 (%)
北海道	56	14 (25.0)
東北	101	31 (30.7)
関東	153	47 (30.7)
中部	154	45 (29.2)
近畿	78	20 (25.6)
中国	42	13 (31.0)
四国	42	12 (28.6)
九州・沖縄	84	22 (26.2)
合計	710	204 (28.7)

表7. 内湯と露天におけるレジオネラ属菌分離率の比較

採取場所	供試試料数	分離試料数 (%)
内湯	447	137 (30.6)
露天	222	61 (27.5)
合計	669	198 (29.6)

表8. 温泉水供給システムの相違によるレジオネラ属菌分離率の比較

供給システム	供試試料数	分離試料数 (%)	菌数 (CFU/100ml)		
			最高	最低	平均 ± 標準偏差
循環式	100	38 (38.0)	$3.4 \times 10^4$	$1.0 \times 10^1$	1,701.8 ± 3,560.2
かけ流し	249	68 (27.3)	$1.3 \times 10^4$	$1.0 \times 10^1$	939.1 ± 2,603.9
合計	349	106 (30.4)			

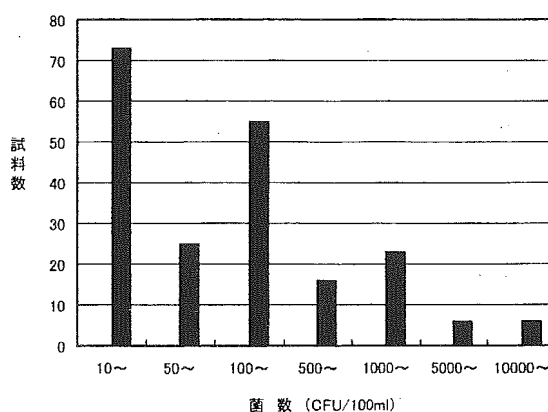


図4. 温泉水中のレジオネラ属菌数

表9. 温泉水におけるレジオネラ属菌のpH別分離状況

pH	供試試料数	分離試料数 (%)
≤3.0	41	2 (4.9)
3.1 ~ 5.9	38	13 (34.2)
6.0 ~ 7.5	321	112 (34.9)
7.6 ~ 8.5	242	66 (27.3)
8.6 ≤	68	11 (16.2)
合計	710	204 (28.7)

表10. *L. pneumophila* 菌数が多かった10試料

No.	採取場所	供給システム	pH	菌数 (CFU/100ml)	血清群	泉質名
1	内湯	循環式	7.5	$3.4 \times 10^4$	5	炭酸水素塩泉
2	内湯	循環式	7.0	$1.4 \times 10^4$	6	塩化物泉
3	内湯	かけ流し	7.3	$1.3 \times 10^4$	8	塩化物泉
4	内湯	かけ流し	8.5	$1.1 \times 10^4$	6	硫黄泉
5	内湯	循環式	6.2	$1.0 \times 10^4$	4,10	硫黄泉
6	露天	かけ流し	7.1	$9.6 \times 10^3$	9	塩化物泉
7	内湯	かけ流し	6.9	$8.0 \times 10^3$	9	塩化物泉
8	露天	循環式	6.4	$7.2 \times 10^3$	11	塩化物泉
9	内湯	循環式	7.0	$6.7 \times 10^3$	9	硫酸塩泉
10	内湯	循環式	7.7	$5.0 \times 10^3$	3,4	放射能泉

の範囲は6.2~8.5の中性から弱アルカリ性であった。また、泉質は塩化物泉が5ヶ所で最も多く、硫黄泉が2ヶ所であった。

以上のように、菌数は少ないものの、日本各地の温泉水には広くレジオネラ属菌が生息していることが判明した。

### 3.2. 温泉水から分離されたレジオネラ属菌の菌種構成

全国各地の温泉水204試料から分離された251株のレジオネラ属菌は表11に示すとおり5菌種に同定された。なかでも最も高頻度に同定された菌種は *L. pneumophila* であり、245株 (97.6%) を占めた。その血清群別においては、1群が54株 (21.5%) と最も多く、次に5群が39株 (15.5%)、6群が31株 (12.4%)、4群が29株 (11.6%)、3群が26株 (10.4%)、10群が25株 (10.0%) であった。このほかにも7群、8群、9群、11群、12群、13群、15群に低率ながら群別されたが、2群と14群は1株も群別されなかった。

*L. pneumophila* 以外に同定された菌種では *L.*

表11. 温泉水から分離されたレジオネラ属菌

菌種	株数 (%)
<i>L. pneumophila</i>	
血清群 1	54 (21.5)
2	0 (0)
3	26 (10.4)
4	29 (11.6)
5	39 (15.5)
6	31 (12.4)
7	1 (0.4)
8	12 (4.8)
9	12 (4.8)
10	25 (10.0)
11	6 (2.4)
12	6 (2.4)
13	3 (1.2)
14	0 (0)
15	1 (0.4)
<i>L. birminghamensis</i>	
1	1 (0.4)
<i>L. bozemanii</i>	
2	2 (0.8)
<i>L. dumoffii</i>	
1	1 (0.4)
<i>L. micdadei</i>	
2	2 (0.8)
合計	251 (100.0)

*bozemanii* と *L. micdadei* が各2株 (0.8%)、*L. birminghamensis* と *L. dumoffii* が各1株 (0.4%) であった。

また、各地域ごとに *L. pneumophila* の血清

表12. 温泉水から分離された *L. pneumophila* の地域別血清群

採取場所	<i>L. pneumophila</i> 血清群													合計
	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	
北海道	3	0	1	6	1	0	1	0	2	0	0	0	0	14
東北	7	3	2	5	1	0	1	2	7	0	1	0	1	30
関東	12	8	13	11	8	0	5	4	7	2	2	0	0	72
中部	15	6	9	11	4	1	1	1	5	1	0	2	0	56
近畿	4	3	2	2	2	0	0	1	2	3	1	0	0	20
中国	5	1	1	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0	13
四国	2	2	1	0	5	0	4	0	0	0	0	1	0	15
九州・沖縄	6	3	0	2	7	0	0	3	2	0	2	0	0	25
合計	54	26	29	39	31	1	12	12	25	6	6	3	1	245

\* : 菌株数

群別分布状況を表12に示した。すなわち、北海道では5群、東北では1群と10群、関東では1群、4群および5群、中部では1群と5群、近畿と中国では1群、四国では6群と8群、九州・沖縄地方では1群と6群がそれぞれ多く分離される傾向であった。

さらに、検出菌数が多かった10試料について *L. pneumophila* の血清群別でみると、9群が3試料、4群と6群が各2試料、3群、5群、8群、10群および11群が各1試料であり、血清群別による特徴的な傾向はみられなかった(表10)。

#### 4. *L. pneumophila* に対する天然抗菌剤の抗菌作用

感染源対策を目的に身近な天然抗菌剤を用いて *L. pneumophila* に対する抗菌作用を検討してきた。以下にその概要を示す。

##### 4.1. コーヒー<sup>3-5)</sup>

24種類のコーヒー豆からの抽出液を用いてディスク法により *L. pneumophila* 28株に対する抗菌作用を検討した。その結果、すべてのコーヒー

は供試菌株に対して抗菌作用があり、その程度はコーヒーの種類によって若干異なった(表13)。また、コーヒーの抽出条件の違いにより阻止円の大きさを比較したところ、いわゆる出廻らしでは阻止円は小さく、抗菌活性が減少していることがわかった。また、コーヒーの抽出温度を変えてみたが、沸騰直後と室温では抗菌活性に大差はなかった。さらに、この抗菌作用が静菌的作用あるいは殺菌的作用のいずれかを確認するために定量的に殺菌試験を行ったところ、すべてのコーヒーに殺菌作用が認められ、濃度依存であることが明らかになった。

また、コーヒーに含まれるプロトカテキン酸、カフェイン酸、クロロゲン酸の *L. pneumophila* に対する抗菌効果を検討するために、MIC値(最小発育阻止濃度)およびMBC値(最小殺菌濃度)の測定と各物質による殺菌実験を行った。これら3物質のMIC値を測定すると、なかでもプロトカテキン酸のMIC<sub>90</sub>値(MICの90%値)が156.3mg/lと最も小さく、抗菌活性が比較的高いことが判明した(図5)。ところが、MBC値をみると、プロトカテキン酸の値よりもカフェイン酸の値の方が小さく、カフェイン酸のMBC<sub>90</sub>値(MBCの90%値)は625mg/lで殺菌活性が一番強かった(図6)。クロロゲン酸のMBC値はMIC値と同様に他の2物質より大きく活性は低かった。また、殺菌実験の結果ではカ

表13. *L. pneumophila* に対するコーヒーの抗菌効果

No.	種類	平均±標準偏差	範囲
1	モカ	24.4±3.3*	19~32
2	コロンビア A	23.4±4.0	16~34
3	モカ・マタリ	23.1±3.9	16~30
4	ブルーマウンテン	23.1±5.7	12~40
5	マンデリン	23.0±4.2	14~30
6	コロンビア B	22.7±3.8	14~32
7	グアテマラ	22.5±4.7	15~32
8	メキシコ A	22.4±2.7	17~26
9	カウイ	22.2±3.3	17~33
10	ブラジル A	22.2±3.3	12~29
11	モカ・ハラール	22.2±5.8	12~38
12	トラジャ	21.8±3.5	14~29
13	マウントハーゲン	21.8±4.4	14~32
14	バリ	21.6±4.5	14~32
15	キリマンジャロ A	21.4±2.9	16~27
16	キリマンジャロ B	20.8±5.3	14~34
17	マハラジャ	20.6±2.6	17~26
18	ガヤ・マウンテン	20.4±2.9	14~25
19	サンアグスチン	20.3±3.7	13~25
20	メキシコ B	20.1±2.9	17~28
21	ブラジル B	20.1±5.1	12~36
22	サルパドル	19.5±4.2	14~30
23	クリスタル・マウント	18.6±4.0	11~32
24	コスタリカ	16.9±2.3	12~23

\* ; 阻止円の大きさ(mm)  
n=28株

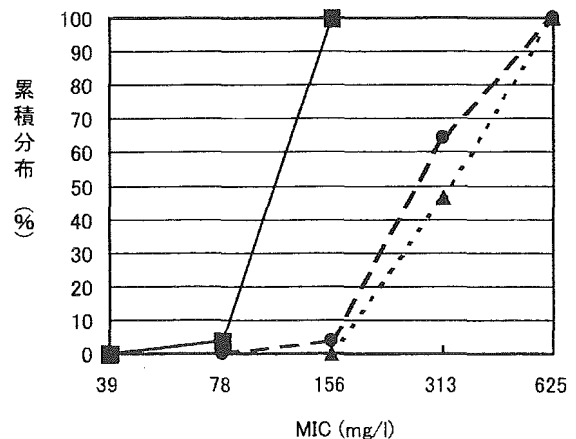


図5. フェノール化合物に対する *L. pneumophila* のMIC分布  
■: プロトカテキン酸, ●: カフェイン酸,  
▲: クロロゲン酸 n=28株

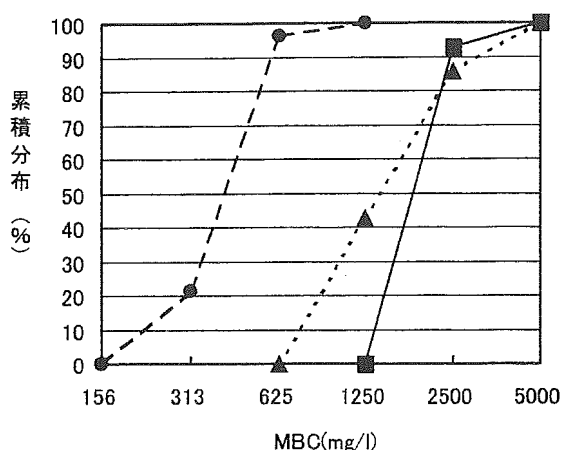


図6. フェノール化合物に対する *L. pneumophila* の MBC 分布  
 ■: プロトカテキュ酸, ●: カフェイン酸,  
 ▲: クロロゲン酸  
 (接触時間: 8 時間)  
 n=28株

フェイン酸における菌数減少が最も大きく、2,500mg/l では $10^6$ CFU/ml の接種菌数が1時間後には検出されなくなり、MBC 値の測定結果を裏付ける傾向が認められた。このように、速効性はないものの、プロトカテキュ酸、カフェイン酸、クロロゲン酸には *L. pneumophila* に対して明らかな殺菌作用が認められた。

#### 4.2. ハーブ<sup>6)</sup>

日本でも身近な生活に取り入れられる機会が多くなったドライハーブ抽出液28種類を用いて、*L. pneumophila* に対する抗菌活性を検討した。ま

ず、ディスク法により *L. pneumophila* に対する抗菌活性を調べたところ、ラズベリーリーフ、コモンセージ、レモンバーム、ペパーミントなど22種類 (78.6%) のハーブで阻止円が認められ、*L. pneumophila* に対するハーブの抗菌活性が明らかになった。特に、シソ科のハーブが強い活性を示した。また、ハーブ抽出液の濃度を変えて殺菌実験を行ったところ、ハーブは *L. pneumophila* に対して殺菌的に作用し、その活性は濃度依存性であった。殺菌率が100%であったハーブの最大希釈倍数をみると、最も高いものはセボリーとハイビスカスの $\geq 16$ 倍で、次にコモンタイムの8倍であった (表14)。さらに、抗菌活性が強かったシソ科のペパーミント、コモンセージおよびコモンタイムの抽出液中での *L. pneumophila* の経時的菌数変化を測定したところ、いずれのハーブでも $10^6$ CFU/ml の接種菌数が3時間後から12時間後には検出されなくなった。このように、ハーブは速効性ではないものの *L. pneumophila* に対して殺菌活性を示した。

#### 4.3. 竹酢液<sup>7)</sup>

近年、様々な用途で市販されている竹酢液の *L. pneumophila* に対する抗菌効果を検討した。供試竹酢液16種類のうち11種類 (69%) に対して冷却塔水由来26株すべてが明瞭な阻止円を形成し、感受性であった。なお、菌株によって阻止円の大きさが異なる傾向が認められた。なかでも、

表14. *L. pneumophila* に対するハーブの殺菌効果

No.	供試ハーブ	供試菌株数*	希釈倍数				
			0	×2	×4	×8	×16
1	セボリー	26	26 (100)**	26 (100)	26 (100)	26 (100)	26 (100)
2	ハイビスカス	15	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)
3	コモンタイム	27	27 (100)	27 (100)	27 (100)	27 (100)	20 (74)
4	ペパーミント	28	28 (100)	28 (100)	28 (100)	27 (96)	7 (25)
5	コモンセージ	28	28 (100)	28 (100)	28 (100)	27 (96)	3 (11)
6	ユーカリ	20	20 (100)	20 (100)	20 (100)	7 (25)	1 (5)
7	ジャパニエズミント	15	15 (100)	15 (100)	15 (100)	3 (20)	1 (7)
8	タラゴン	17	17 (100)	17 (100)	14 (82)	0 (0)	0 (0)
9	ドッグローズ	23	23 (100)	23 (100)	13 (57)	1 (4)	0 (0)
10	ラベンダー	14	14 (100)	14 (100)	3 (21)	0 (0)	0 (0)
11	レモンバーム	28	28 (100)	26 (93)	2 (7)	0 (0)	0 (0)
12	ラズベリーリーフ	28	28 (100)	26 (93)	1 (4)	0 (0)	0 (0)
13	チャービル	20	20 (100)	6 (30)	1 (5)	0 (0)	0 (0)

\* ; 阻止円形成菌株数

\*\* ; 殺菌株数 (%)



表15. *L. pneumophila* に対する竹酢液(I)の経時的抗菌効果

放置条件	測定時期						
	開封直後	1ヶ月後	2ヶ月後	3ヶ月後	4ヶ月後	5ヶ月後	6ヶ月後
室温	34.0±2.5*	31.5±6.9	37.0±7.7	41.8±6.6	49.0±7.0	51.7±10.8	54.7±8.5
4℃	—	31.2±5.6	37.5±7.1	41.7±4.9	48.2±6.5	51.6±10.1	54.4±8.7

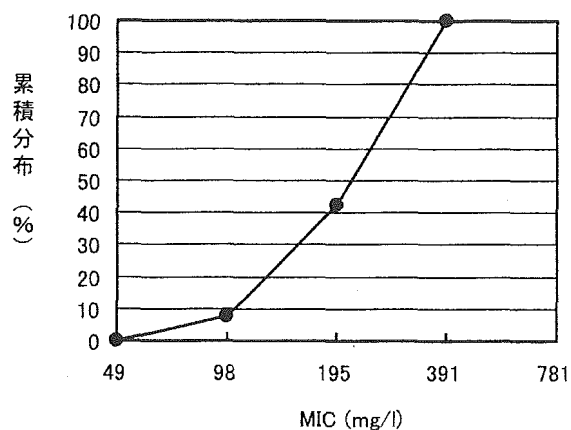
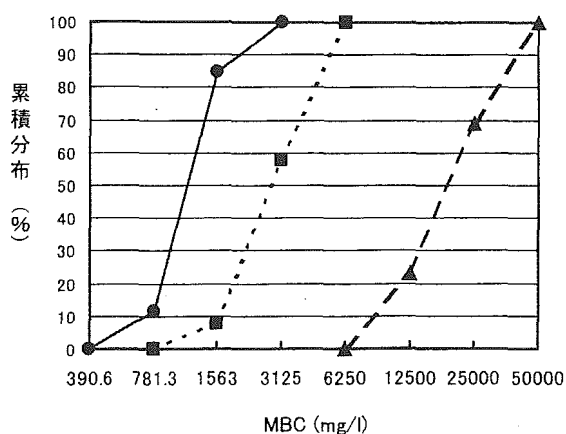
\* ; 阻止円の平均値±標準偏差(mm)

n=26株

竹酢液(I)の経時的抗菌効果は表15に示した通り、放置条件に関係なく、放置時間とともに阻止円の大きさは増大した。竹酢液(I)のMIC値の測定では、1.25% (80倍希釈)の竹酢液で供試菌株すべての発育が阻止された。また、MBC値の測定では、1分間の接触の場合、25% (4倍希釈)の竹酢液で供試菌株は100%殺菌された。さらに、殺菌実験では竹酢液の濃度によって生残菌数の減少傾向が顕著に異なり、竹酢液の殺菌効果は濃度依存であることが明らかになった。竹酢液(I)の原液(100%)では1分間の接触でまったく検出されなくなった。10倍希釈したもので、初期接種菌数が検出されなくなるまでに10分間を要した。100倍希釈したものでは、20分経過後まで菌数の変化はなく、60分経過してもおよそ99.9%殺菌されたにすぎなかった。このように、高濃度の竹酢液には *L. pneumophila* に対して速効的な殺菌作用があることがわかった。

#### 4.4. グレープフルーツ種子抽出物<sup>8)</sup>

食品添加物として注目されているグレープフルーツ種子抽出物(GSE)の *L. pneumophila* に対する抗菌効果を検討した。浴槽水由来25株すべてがGSEに対して明瞭な阻止円を形成し、いずれも感受性であった。なお、阻止円の大きさは平均20.2mmで菌株による差は認められなかった。GSEのMIC分布は、97.7mg/lから390.6mg/lであり、MIC<sub>90</sub>値は390.6mg/lであった(図7)。また、MBC分布は、接触時間の増大に伴って左方にシフトしており、低濃度のGSEでは長時間を要した(図8)。MBC<sub>90</sub>値は接触時間1分、10分、60分で、それぞれ50,000mg/l、6,250mg/l、3,125mg/lであった。さらに、殺菌実験ではすべての実験条件において接触時間1分以内で初期接種菌数が4 log すなわち99.99%以上減少した。

図7. グレープフルーツ種子抽出物に対する *L. pneumophila* の MIC 分布  
n=25株図8. グレープフルーツ種子抽出物に対する *L. pneumophila* の MBC 分布  
接触時間; ▲: 1分, ■: 10分, ●: 60分  
n=25株

このことは、標準株 IID5232株と浴槽水由来株で差異はなかった。以上のように、GSEには *L. pneumophila* に対して速効的な殺菌作用があった。

## 5. おわりに

レジオネラ属菌に関する最近の情報をまとめてみた。我国における分布をみると、土壌や温泉の広い範囲に生息していることが明らかになり、環境常在菌であることが再確認された。また、これらに対する天然抗菌剤の検索では、グレープフルーツ種子抽出物 (GSE) が比較的即効性であった。

近年のレジオネラ症発生状況から現場では感染源対策が急務とされているが、実際には殺菌、除菌対策に苦慮している。あらゆる環境中でレジオネラ属菌ゼロを目標にするのではなく、あくまでもレジオネラ症の発生防止を目的に持続的な衛生管理を心がける必要がある。

長年の調査研究に際し、試料採取等多くの方々に多大なる御協力をいただいた。紙面をお借りして心から感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) 古畑勝則, 岡部弥穂, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文 (2002) 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴誌, 30, 555-561.
- 2) 古畑勝則, 原 元宣, 吉田真一, 福山正文 (2004) 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況. 感染症誌, 78, 710-716.
- 3) 古畑勝則, 杉山順一, 堂ヶ崎知格, 福山正文 (2000) *Legionella pneumophila* に対するコーヒーの抗菌作用. 防菌防黴誌, 28, 87-91.
- 4) 堂ヶ崎知格, 新藤哲也, 古畑勝則, 福山正文 (2002) *Legionella pneumophila* に抗菌活性を示すコーヒー成分の化学構造について. YAKUGAKU ZASSHI, 122, 487-494.
- 5) 古畑勝則, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文 (2002) *Legionella pneumophila* に対するコーヒー飲料由来フェノール化合物の抗菌作用. 防菌防黴誌, 30, 291-297.
- 6) 古畑勝則, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文 (2001) *Legionella pneumophila* に対するドライハーブ抽出液の抗菌作用. 麻大誌, 1,2: 15-20.
- 7) 古畑勝則, 堂ヶ崎知格, 福山正文 (2001) *Legionella pneumophila* に対する市販竹酢液の抗菌効果. p 133, 日本防菌防黴学会第28回年次大会要旨集.
- 8) Furuhata, K., Dogasaki, C., Hara, M., Fukuyama, M. (2003) Inactivation of *Legionella pneumophila* from whirlpool bath water by grapefruit (*Citrus paradisi*) seed extract. *Biocontrol Sci.*, 8, 129-132.

# 温泉水におけるレジオネラ汚染とその対応\*

古畑 勝 則

## 1. はじめに

日本は有数の温泉大国であり、2001年度の環境省のまとめでは、全国に26,000本を超える源泉があり、約15,000カ所の宿泊施設がある。癒しの場としての浴場施設はわが国独特の文化であり、世界に類を見ない。近年、こうした浴場施設においてレジオネラ症という新興感染症が多発している。

2002年、宮崎県日向市の温泉入浴施設において本邦では最大規模のレジオネラ症集団感染が発生し、浴場施設でのレジオネラ症に対する関心が一段と高まった。レジオネラ属菌は身近な土壌に生息しており、これらが浴槽水などの人工的水環境に侵入し、増殖したレジオネラ属菌がエアロゾルとともに飛散することによりヒトに感染し、肺炎などの呼吸器系疾患を起こすものと推察される。誤飲を除いて、レジオネラ属菌の飲用による発症例は報告されていない。温泉においてレジオネラ汚染問題が顕在化してきた背景には、源泉の枯渇と施設の大規模化があげられる。本事例は温泉ブームを背景に大きな社会問題に発展し、感染源対策が急務とされている。

ここでは温泉における衛生問題の一つとしてレジオネラ汚染をとりあげ、温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況と衛生的対応について述べる。

## 2. 循環式浴槽水におけるレジオネラ症発生状況<sup>1)</sup>

わが国におけるレジオネラ症の主な発生状況を表1にまとめた。諸外国の事例と異なり、日本におけるレジオネラ症の集団発生は、浴槽水を原因とするものが圧倒的に多い特徴があり、冷却塔や給水・給湯における事例は非常に少ない。特に、2000年以降は浴場施設における感染事例が相次いでいる。なかでも2002年、宮崎県日向市で発生したレジオネラ症はこれまでにない大規模な集団感染であった。以下にその概要と推定原因について述べる。

当施設は、循環式浴槽を12有する日帰り温泉入浴施設であり、循環ろ過システムは6系統に集約されていた。2002年6月20日に竣工し、2日間の市民による体験入浴を実



Katsunori Furuhata  
 昭和57年 麻布大学環境保健学部卒業  
 同年 東京都立衛生研究所  
 平成2年 筑波大学大学院修士課程環境科学  
 研究科修了  
 10年 麻布大学環境保健学部講師  
 12年 同助教授  
 獣医学博士  
 資格 臨床検査技師

\* Contamination of Hot Spring Baths by *Legionella* spp. in Japan and Some Countermeasures

施後、7月1日に営業を開始したが、レジオネラ症集団発生のため7月24日に営業停止となった。6月20日から7月23日までの入浴者はおよそ20,000人にのぼった。このうち295名が発症し、うち34名が臨床的にレジオネラ症と確定診断され、7名が死亡した。患者および浴槽水から同一血清型のレジオネラ属菌が分離され、遺伝子パターン的一致が確認されたことから同施設の浴槽が感染源と断定された。

調査委員会により集団感染の推定原因として以下の11項目が上げられた。

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冷却用で使用していたこと。③高温タンクの温度管理が不十分で、設定された58度以上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できていなかったこと。同時に、塩素注入装置の操作を十分理解していなかったこと。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替えが不十分となっていたこと。⑥ろ過装置の逆洗浄時間の設定が不十分で、ろ過槽内の洗浄が行われず、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)が作製されていなかったこと。⑨施設関係者のレジオネラ症に対する知識と認識が不足していたこと。⑩施設完成時、試運転後の配管内における浴槽水の滞留とレジオネラ属菌増殖の可能性があったこと。⑪体験入浴前の循環システム全体の清掃、消毒が不十分であったこと。

本施設は、既存施設の問題点に対して改善を行い、450日間の営業停止の後に2003年11月に営業を再開した。なお、本感染事例における補償費用は3億5千万円にのぼった。

## 3. 温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況<sup>3)</sup>

### 3.1 全国各地の温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況

都道府県別の分離状況は表2に示すとおり、全体で710試料中204試料(28.7%)から分離された。その内訳は全国47都道府県すべての地域の温泉水から分離され、3.8%~100%の分離率であった。このように、都道府県によって分離率にかなりの差が認められたが、試験した試料が各都道府県を代表するものではなく、また、試料数の少ない都道府県もあることから一概に分離率を比較して優劣をつけるデータではないことを強調する。分離率を地域別にみると、中国、東北および関東地方の分離率が30.7%~31.0%とやや高く、次に中部と四国地方が28.6%~29.2%であり、北海道、近畿および九州地方が

表1 わが国における主なレジオネラ症の発生例

年	場 所	患者数	死 者	原 因
2003	岡山県岡山市「岡山大学付属病院」	1	1	給湯
	石川県山中町「ゆけむり健康村 ゆうゆう館」	1	1	気泡風呂
2002	鹿児島県東郷町「東郷温泉 ゆったり館」	9	1	循環式浴槽
	宮崎県「日向サンパーク温泉 お舟出の湯」	295	7	循環式浴槽
2001	東京都板橋区「銭湯 湯〜HOUSE」	1	1	葉湯の誤飲?
2000	愛知県名古屋市「名古屋大学医学部付属病院」	1	1	展望風呂
	茨城県石岡市「ふれあいの里・ひまわり館」	43	3	循環式浴槽
	静岡県「掛川つま恋温泉 森林の湯」	23	2	循環式浴槽
1998	東京都目黒区 高齢者福祉施設	12	1	24時間風呂
1996	東京都新宿区「慶應大学病院」	3	1	給湯
1994	東京都渋谷区 企業研修センター	45	0	冷却塔

表2 全国各地の温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況

都道府県	試料数	分離数	分離率(%)
北海道	56	14	25.0
青森	6	2	33.3
秋田	16	3	18.8
岩手	10	1	10.0
宮城	15	5	33.3
山形	22	9	40.9
福島	32	11	34.4
東京	21	2	9.5
神奈川	20	7	35.0
栃木	29	14	48.3
茨城	6	1	16.7
千叶	13	3	23.1
群馬	57	16	28.1
埼玉	7	4	57.1
新潟	32	9	28.1
長野	37	11	29.7
山梨	19	5	26.3
静岡	16	9	56.3
富山	5	1	20.0
石川	15	2	13.3
岐阜	13	4	30.8
愛知	7	1	14.3
福井	10	3	30.0
滋賀	5	3	60.0
三重	26	1	3.8
京都	8	2	25.0
大阪	7	5	71.4
奈良	5	2	40.0
和歌山	8	1	12.5
兵庫	19	6	31.6
岡山	4	2	50.0
広島	3	3	100.0
島根	20	3	15.0
山口	11	4	36.4
徳島	4	1	25.0
香川	15	3	20.0
高知	5	1	20.0
愛媛	9	1	11.1
福岡	13	7	53.8
熊本	3	1	33.3
大分	29	6	20.7
宮崎	8	1	12.5
佐賀	3	1	33.3
長崎	3	1	33.3
熊本	22	5	22.7
鹿児島	14	5	35.7
沖縄	2	2	100.0
合 計	710	204	28.7

表3 内湯と露天におけるレジオネラ属菌分離率の比較

採取場所	供試試料数	分離試料数(%)
内 湯	447	137 (30.6)
露 天	222	61 (27.5)
合 計	669	198 (29.6)

25.0%~26.2%とやや低かった。このように、北は北海道から南は九州・沖縄まですべての都道府県の温泉水にレジオネラ属菌が生息していた。

### 3.2 「内湯」と「露天」、「循環式」と「かけ流し」における分離率の比較

採水した試料を内湯と露天に区別し、それぞれの分離率を比較したものを表3に示した。内湯では447試料中137試料(30.6%)から、露天では222試料中61試料(27.5%)からそれぞれ分離され、露天における分離率の方がわずかに低率であった。また、温泉水の供給形態を「循環式」といわゆる「かけ流し」に区別して両者の分離率と検出菌数の比較を表4に示した。循環式では100試料中38試料(38.0%)から分離された。これに対し、かけ流しでも249試料中68試料(27.3%)から分離され、循環式での分離率と顕著な差はみられなかった。また、温泉水100ml中の検出菌数は、循環式が平均1,701.8cfu、かけ流しが939.1cfuであり、循環式の方がわずかに多かったが有意な差は認められなかった。温泉水の供給形態に関して、ろ過により浴槽水を再利用している循環式では高濃度のレジオネラ汚染が危惧されている。一方、大量の温泉水を一時的に利用する、いわゆる「かけ流し」では、レジオネラ汚染問題はないと思われていたが、今回の調査では循環式と大差ない分離率と検出菌数であることから、かけ流しであってもレジオネラ汚染がまったくないとは言えない結果であった。

### 3.3 温泉水の泉質とレジオネラ属菌の分離状況

表5には温泉水のpH別に分離率を示した。レジオネラ属菌は最低pH2.8から最高pH9.3の範囲で分離されたが、温泉水のpHによって分離率に差が認められた。すなわち、pH3.1~pH7.5の範囲が34.8%と高く、次にpH7.6以上が24.8%とそれぞれ高率であったが、pH3以

表4 温泉水供給システムの相違によるレジオネラ属菌分離状況の比較

供給システム	供試試料数	分離試料数(%)	菌数 (cfu·dl <sup>-1</sup> )		
			最高	最低	平均 ± 標準偏差
循環式	100	38 (38.0)	3.4×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>	1,701.8 ± 3,560.2
かけ流し	249	68 (27.3)	1.3×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>	939.1 ± 2,603.9
合計	349	106 (30.4)			

表5 温泉水におけるレジオネラ属菌のpH別分離状況

pH	供試試料数	分離試料数 (%)
≤3.0	41	2 (4.9)
3.1 ~ 5.9	38	13 (34.2)
6.0 ~ 7.5	321	112 (34.9)
7.6 ~ 8.5	242	66 (27.3)
8.6 ≤	68	11 (16.2)
合計	710	204 (28.7)

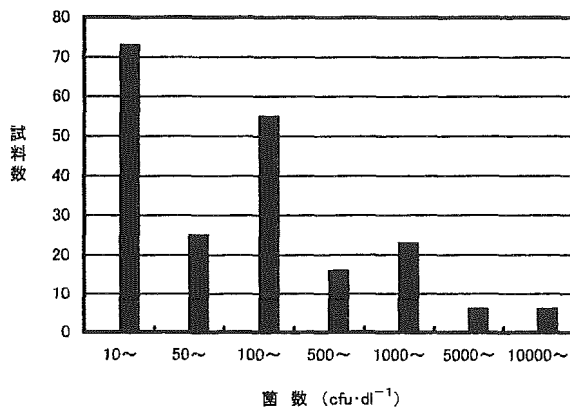


図1 温泉水中のレジオネラ属菌数

下では4.9%と非常に低い分離率であった。このことから、本菌は酸性下では検出されにくく、弱酸性または中性の環境下において高率に存在することが明らかになった。今回の調査において検出菌数が多かった温泉水の泉質をみると、ナトリウム・塩化物泉、硫黄泉、ナトリウム・塩化物・炭酸水素塩泉、ナトリウム・マグネシウム（・カルシウム）・塩化物泉、放射能線など多種多様であった。したがって、一概にレジオネラ属菌が生息しやすい泉質を特定することは困難であった。

#### 3.4 温泉水中のレジオネラ属菌数

レジオネラ属菌が分離された204試料について、温泉水100ml当たりのレジオネラ属菌数を図1に示した。10<sup>2</sup> cfu未滴が98試料(48.0%)と最も多く、次に10<sup>2</sup> cfu台が71試料(34.8%)、10<sup>3</sup> cfu台が29試料(14.2%)および10<sup>4</sup> cfu以上が6試料(2.9%)あった。

#### 3.5 温泉水から分離されたレジオネラ属菌

全国各地の温泉水204試料から分離された251株のレジオネラ属菌は5菌種に同定された。なかでも最も高頻度に同定された菌種は *L. pneumophila* であり、245株(97.6%)を占めた。その血清群別においては、1群が54株(21.5%)と最も多く、次に5群が39株(15.5%)、6群が31株(12.4%)、4群が29株(11.6%)、3群が26株

(10.4%)、10群が25株(10.0%)であった。このほかにも7群、8群、9群、11群、12群、13群、15群に低率ながら群別されたが、2群と14群は1株も該当しなかった。*L. pneumophila* 以外に同定された菌種では *L. bozemanii* と *L. micdadei* が各2株(0.8%)、*L. birminghamsensis* と *L. dumoffii* が各1株(0.4%)であった。

#### 4. レジオネラのすみか<sup>4)</sup>

##### 4.1 レジオネラ属菌の通性細胞内増殖性

一般に原生動物と細菌は食物連鎖の関係にあり、細菌は原生動物の餌となる。ところが、レジオネラ属菌は捕捉されたアメーバなどの原生動物の細胞内でも増殖する特性があり、これを通性細胞内増殖性という。通常の細菌は原生動物の食胞内で消化されるが、レジオネラ属菌はこれに抵抗し、細胞内で増殖し続け、最終的には宿主である原生動物の細胞を破壊して水中に拡散する。このように捕食したはずのアメーバは悲惨な運命をたどるのである。このときのレジオネラ属菌の増殖速度は、培地で培養した場合より数倍速いといわれている。アメーバはあたかもレジオネラ属菌の増菌培地であるかのごとく、自然環境下ではレジオネラ属菌の増殖に大きな役割を果たしているのである。この性質はレジオネラ属菌が環境中で生存し続けていくために獲得した特性の一つであろう。こうしたレジオネラ属菌と原生動物との関係は、自由生活アメーバではアカントアメーバ、ナエグレリア、ハルトマンネラ、ワールカンピアなど、また、繊毛虫ではテトラヒメナなどがよく知られている。このようなレジオネラ属菌の特性は、環境におけるレジオネラ汚染対策においても十分に考慮すべきである。

##### 4.2 レジオネラ属菌とアメーバの生息状況

レジオネラ属菌は身近な人工的水環境に広く生息しており、空調用冷却塔水をはじめ、給湯水、修景用水、循環式浴槽水、温泉水等から多数検出されることは周知の事実である。こうした水環境にレジオネラ属菌だけが生息しているとは考えにくく、微生物生態学的にみても当然他の微生物も共存していると考えられる。こうしたなかで、レジオネラ属菌とアメーバの関係が注目される。

循環式浴槽水43試料についての調査結果では、アメーバの検出率は84%と高頻度であった(表6)。種類のにはハルトマンネラ、ワールカンピア、アカントアメーバなど冷却水と同一種が検出された。このうち、レジオネラ属菌は81%から検出されており、レジオネラ属菌とアメーバの共生の事実が明らかにされた。他方、アメーバ陰性試料では1試料のみからレジオネラ属菌が検出されたにすぎなかった。また、黒木らの報告<sup>5)</sup>でも、循環式浴槽を備えた一般家庭、公衆浴場、旅館の32施設のうち75%

表6 循環式浴槽水からのレジオネラ属菌とアメーバの検出状況

	アメーバ検出	アメーバ不検出	合計
レジオネラ検出	29 (67.4)*	1 (2.3)	30 (69.8)
レジオネラ不検出	7 (16.3)	6 (14.0)	13 (30.2)
合計	36 (83.7)	7 (16.3)	43 (100)

\*試料数 (%)

にあたる24施設から自由生活性アメーバが検出されている。また、レジオネラ属菌の菌数が多い浴槽では、ハルトマンネラとバンネラの検出頻度が高く、両者の関連性が示唆された。以上のように、レジオネラ属菌が多数生息している循環式浴槽では、レジオネラ属菌の宿主となるアメーバが高頻度に生息していることが明らかになった。

#### 4.3 バイオフィルム

水環境中の微生物は固体表面に付着し、粘性の多糖類を産生して微生物膜(スライムあるいはバイオフィルム)を形成する。これは水分がある固体表面ではどこにでもみられる現象で、いわゆる「水あか」または「ヌメリ」と言われている。こうした微生物膜内では外界からの有害作用を受けにくく、すなわち消毒剤などから保護された形になる。この微生物膜がまさにレジオネラ属菌のすみかなのである。このような微生物膜内でアメーバにより爆発的に短時間で増殖したレジオネラ属菌によって種々水環境が汚染され続けることになる。

#### 5. 温泉水の衛生管理<sup>6-8)</sup>

現在、温泉水のみに適応されるレジオネラ属菌の規制基準値はなく、現状ではお風呂の浴槽水を念頭に置いて設定された基準値を準用している。この基準値は10cfu・dl<sup>-1</sup>未満であり、実際の検査では不検出を意味する。既述したように温泉水はその泉質が多様であり、温泉水の供給システムも施設によって異なることから、画一的な対応策は提案しにくい。上述のように、レジオネラ属菌は微生物膜中で増え続けることから、浴槽水の処理だけを行ってもレジオネラ属菌の供給源を絶たない限り抜本的な対策にはならない。このことがレジオネラ汚染対策はアメーバ対策であるといわれる所以である。

微生物膜の発生防止に関しては種々検討されつつあるが、いまだに得策がないため、あらゆる水環境で微生物膜が発生し、各分野で弊害が生じている。形成された微生物膜を除去するには物理的剝離が最も有効であり、すなわち清掃が一番ということである。低濃度の塩素剤による浴槽水の消毒だけでは塩素耐性であるアメーバには効果がないため、温泉水を安易に塩素処理することは是非については議論のあるところである。温泉水に塩素を投入することにより泉質が変化し、もはや温泉水ではなくると嘆く人もいる。また、発ガン性物質の発生など塩素消毒の弊害を危惧する人もいる。しかしながら、レジオネラ属菌に関する現状の維持管理において塩素処理が有効な一方法であることは否定できない。自己管理が推奨される温泉水の衛生的維持管理においては、レジオネラ属菌の生息状況等、現状を十分に把握することが重要であり、施設ごとに供給システムの特徴を熟慮した適

切な対応を行うことが強く望まれる。以下には、塩素消毒について述べ、その他の消毒については割愛する。

#### 5.1 塩素の消毒効果

数内らの実験<sup>9)</sup>によると、各菌株を10<sup>5</sup>cfu・m<sup>-1</sup>になるように遊離残留塩素0.4mg・l<sup>-1</sup>に相当する次亜塩素酸ナトリウム溶液に懸濁すると、供試菌株102株はすべて15分以内に殺菌された。ところが、Kuchta らの報告では遊離残留塩素0.1mg・l<sup>-1</sup>、pH7.6、21°Cのときの99%(2桁)殺菌時間は大腸菌の1分に対し、レジオネラ属菌は40分を要している<sup>10)</sup>。このように、レジオネラ属菌は塩素に対して一般的なグラム陰性菌よりは抵抗性を示すようである。また、これらのデータは、あくまでも実験室レベルの検討結果にすぎず、実際のフィールドとは以下のような点で異なることを念頭に置く必要がある。

#### 5.2 塩素処理効果に影響を及ぼす要因<sup>11)</sup>

1) pH 値 pH 値によって消毒剤自身の存在形態が変化し、消毒効果が変わってくる。塩素がその典型例である。塩素はpH 値によって酸化還元電位やHOCl(次亜塩素酸)とOCl<sup>-</sup>(次亜塩素酸イオン)の比が変化するため、これによって塩素消毒の効果は大きく異なる。また、微生物表面の荷電状態は、消毒剤の細胞内への透過性に影響する。したがって、pH 値は微生物自身の状態のほか、消毒剤が標的部位に到達する速度にも影響を与えると考えられる。

2) 懸濁物質 懸濁物質が消毒効果を低下させることはよく知られている。その程度は、懸濁物質の種類、大きさ、濃度、微生物の種類、懸濁物質と微生物との結合形態などによって異なる。したがって、懸濁物質の量と消毒力の低下は一概にはいえない。懸濁粒子への吸着・付着、埋棲によって微生物が分散状態から集塊化し、消毒剤の作用から保護される場合がある。粒子の奥に入り込むほど消毒剤が届くのが遅くなる一方で、粒子に含まれる有機物により消毒剤が消耗して届くべき消毒剤の量が減り、いっそう消毒効果が低下する。

3) 攪拌 消毒剤はただ注入さえすればよいというのではなく、薬剤と微生物が十分に接触し、確実な反応時間が与えられなければならない。消毒剤は同じ量を注入すれば常に同じ効果が得られると期待してはいけない。このことは消毒剤と微生物がいかに均一に混ざるかということに関係している。よく混ざらないと、消毒剤が局在しているところで部分的に反応が起きてしまい、混ざらなかつたところに供給される消毒剤の量が減ってしまうので消毒効果は減少する。こうした現象に対応するには浴槽水の滞留を十分に考慮する必要がある。

#### 5.3 レジオネラ属菌の飛散防止対策

レジオネラ症は呼吸器系疾患であり、飛散するレジオネラ属菌が直接の原因であることはすでに述べたとおりである。レジオネラ症に関しては、ヒトからヒトへの感染例は報告されていない。したがって、レジオネラ属菌の飛散防止は、レジオネラ症の感染経路対策となり、感染源対策とともに重要である。呼吸せずに温泉に入ることとは不可能であるから、極力エアロゾルの発生防止に配慮する必要がある。以前、試料採取のためにある温泉に行ったところ、室内に打たせ湯が設置されており、大変な飛散量のエアロゾルを目の当たりにして寒気を感じたことがあった。気泡発生装置やジェット噴射装置が設置

された施設での問題は利用者にはいかんともしがたいが、こうした施設を利用しないことも意思表示の一つである。今後は、これらの付帯設備による集客ではなく、いかに衛生管理をきちんと行っているかが問われる時を迎えるであろう。また、利用者自らも飛散防止に努めなければならない。具体的には、かけ湯の問題、浴槽への入り方、打たせ湯の利用などレジオネラ症を考慮した温泉の利用方法を身につけることが望ましい。

## 6. おわりに

温泉水の泉質は多種多様であり、供給システムも統一されていないことから、浴場施設におけるレジオネラ汚染対策は非常に困難である。温泉水において環境常在菌であるレジオネラ属菌に対してゼロを目標に対応することは不可能である。現在の公衆浴場における水質基準値である「10cfu・d<sup>-1</sup>未満」も決してレジオネラ属菌が生息していないことを意味するものではない。このようにレジオネラ属菌は常に存在していることを前提とし、いかに増殖させないようにするかが最も重要であると考えられる。それにはレジオネラ属菌の供給源となる微生物膜の除去が最優先課題である。しかしこのことは、衛生的な維持管理手法だけで対応できる事項ではなく、設計・施工の視点からろ過装置等を含むシステム全体を再考する必要がある。関連分野の活動を大いに期待したい。そし

て第二の「お舟出の湯」を発生させないことが我々の使命である。

## 文 献

- 1) 宮崎県福祉保健部 (2004) 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。
- 2) 藪内英子, 縣邦雄 (2004) 日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生, 感染症誌, 78, 90-98.
- 3) 古畑勝則, 原元宣, 吉田真一, 福山正文 (2004) 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況, 感染症誌, 78, 710-716.
- 4) 古畑勝則 (2002) レジオネラ汚染対策におけるアメーバの重要性, 防菌防微誌, 30, 217-223.
- 5) 黒木俊郎, 他 (1998) 循環式浴槽における自由生活性アメーバと *Legionella* 属菌の生息状況, 感染症誌, 72, 1056-1063.
- 6) 古畑勝則 (2003) レジオネラ属菌の細菌学的特性と制御ポイント, 空衛, 12, 12-24.
- 7) レジオネラ防止対策研究会 (2003) レジオネラ対策こうすれば安心, 泉書房, 東京.
- 8) 古畑勝則 (2005) レジオネラ症感染防止対策に関する研究, 防菌防微誌, 33, 397-406.
- 9) 藪内英子, 他 (1995) *Legionella* 属菌に対する塩素の殺菌効果, 感染症誌, 78, 710-716.
- 10) Kuchta, J.M., et al. (1983) Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1134-1139.
- 11) 金子光美編著 (1996) 水質衛生学, pp.253-394, 技報堂出版, 東京.



**Note**

## Inactivation of *Legionella pneumophila* from Whirlpool Bath Waters by Grapefruit (*Citrus paradisi*) Seed Extract

KATSUNORI FURUHATA<sup>1\*</sup>, CHIKAKU DOGASAKI<sup>1</sup>, MOTONOBU HARA<sup>2</sup>,  
AND MASAFUMI FUKUYAMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Environmental Health, <sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Azabu University,  
1-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

Received 10 February 2003/Accepted 8 June 2003

**We investigated the antibacterial effect of commercial grapefruit seed extract (GSE, Liquid), which has recently been attracting attention as a food additive, on *Legionella pneumophila*. The sensitivity test was performed using the disc method. All 25 strains tested were sensitive to GSE, and formed clear inhibition zones in its presence. The minimum inhibitory concentration (MIC) values were measured by the agar dilution method. The MIC of GSE in the strains was in the range of 98mg/l to 390mg/l, and the MIC<sub>90</sub> was 390mg/l. The minimum bactericidal concentration (MBC) values for the test strains were also determined. MBC<sub>90</sub> was 50,000, 6,300, and 3,100mg/l when the exposure time was 1, 10, and 60 minutes, respectively. These bactericidal test results demonstrate that GSE has a bactericidal effect on *L. pneumophila*.**

*Key words* : Grapefruit seed extract/*Legionella pneumophila*/Bactericidal activity.

Legionellosis caused by bacteria of the *Legionella* species has been attracting attention as a serious public health problem in recent years in Japan. In July 2002, an outbreak causing seven deaths and 295 cases of infection occurred in a special public bath in Hyuga City, Miyazaki (National Institute of Infectious Diseases, 2003). An epidemiological investigation revealed that the source of infection was the circulating bath water, indicating the importance of countermeasures against this source of infection. In public baths, where such infections have frequently been reported, sanitary conditions are maintained by using chlorine disinfection; but sufficient disinfection cannot be expected when the pH of the bath water is high or there is a high concentration of organic compounds. Moreover, additional equipment used in public baths such as for aeration may markedly decrease the effectiveness of the disinfection. Based on these considerations, we have investigated natural antibacterial agents as substitutes for chlorine disinfection, and re-

ported the effects of coffee (Furuhata et al., 2000a and 2002) and herbs (Furuhata et al., 2000b) on *L. pneumophila*.

In this study, we investigated the antibacterial effect of grapefruit (*Citrus paradisi*) seed extract (GSE), which has recently attracted attention in the food industry field as an agent that prolongs preservation.

Commercial GSE (CAP-10, Liquid, Kalfachemical Co., Kanagawa) was used. Twenty-six bacterial strains were used: *L. pneumophila* serogroup 1 IID5232 strain (No.26) and four strains of *L. pneumophila* serogroup 1 (No.1–4), five strains of serogroup 3 (No.5–9), two strains of serogroup 4 (No.10,11), nine strains of serogroup 5 (No.12–20), and five strains of serogroup 6 (No.21–25) isolated from whirlpool bath waters in metropolitan areas.

The GSE was sterilized by filtration using a disposable membrane filter unit with a pore size of 0.20 μm and a diameter of 25mm (Dismic-25cs, Advantec Toyo Co., Tokyo). Fifty microliters of the sterilized GSE were slowly adsorbed to a paper disc for the sensitivity test (diameter: 8 mm, thickness: 1.5mm, Advantec Toyo Co., Tokyo).

\*Corresponding author. Tel : +81-42-754-7111, Fax : +81-42-754-6215.



The bacterial strains were cultured on BCYE  $\alpha$  agar medium (Nikken Biomedical Laboratory Co., Kyoto) at 37°C for 3 days, and individual bacterial colonies were suspended in sterilized distilled water, and adjusted to a turbidity corresponding to McFarland No.1 ( $10^8$ cfu/ml). A 0.1-ml aliquot of this bacterial suspension was inoculated onto B-SYE agar medium (Sawatari et al., 1984) (Nikken Biomedical Laboratory Co., Kyoto). After the bacterial suspension had sufficiently been adsorbed, the antibacterial test discs were allowed to adhere to the surface of the medium and the plates were cultured at 37°C for 7 days. After the culture period, the inhibition zone around each disc was examined and its diameter was measured.

The MIC was measured according to the agar plate dilution method (NCCLS, 2000), which is the method used to measure the MIC of antibiotics. The test GSE was subjected to two-fold serial dilutions, and 2ml of each dilution were added to dishes and combined with 18ml of B-SYE agar medium (Sawatari et al., 1984) to prepare drug plates. Bacterial suspensions were prepared as described above, and 5  $\mu$ l of the suspension were inoculated onto each drug plate using a Microplanter MIT-P (Sakuma Seisakusho Co., Tokyo). These plates were incubated at 37°C for 7 days. The presence or absence of growth of the tested strains at each concentration, and the minimum inhibitory concentration (MIC) were determined.

To each well of a flat-bottom 96-well microplate (Greiner Japan Co., Tokyo) 100  $\mu$ l of sterilized water was added, and mixed with GSE (initially diluted 10-fold) to prepare serial two-fold dilutions. To these wells, 10  $\mu$ l of the bacterial suspension prepared as described above was added and kept at room temperature for 1, 10, or 60min. At each of these time points, a 10- $\mu$ l aliquot was collected from each well and spotted on an BCYE  $\alpha$  agar plate (Nikken Biomedical Laboratory Co., Kyoto). After the BCYE  $\alpha$  plates were incubated at 37°C for 7 days, the formation of colonies from these spots was observed and the minimum concentration of GSE resulting in no growth of the test bacteria was determined as the minimum bactericidal concentration (MBC).

The tested GSE was added to 200ml of phosphate buffer pH 7.0 kept at 40°C to prepare 1,000-fold (1,000mg/l) and 10,000-fold (100mg/l) dilutions. *L. pneumophila* IID 5232 strain (No.26) or bath-water-derived *L. pneumophila* serogroup 5 (No.12) was inoculated in the solutions at  $10^8$ cfu/ml, and kept at 40°C. The solutions were sampled at 1, 3, and 5 minutes, at which times 0.1ml of each solution was immediately smeared on BCYE  $\alpha$  agar (Nikken Biomedical Laboratory Co. Kyoto). The plates were

incubated at 37°C for 7 days and the viable cells were counted.

The same experiment was performed using a buffer solution adjusted to pH 9.0. In addition, to examine the ability of GSE to disinfect medicated bath water, phosphate buffer (pH 7.0) containing 1% of a crude drug taken as a model of medicated bath water (Yakujinto, containing Phellodendri Cortex, Angelicae Radix, Foeniculi Fructus, Zingiberis Rhizoma, Cnidii Rhizoma, Paeoniae Radix, Aurantii Nobilis Pericarpium, and Pepper; Morishita Jintan Co., Osaka) was prepared, and combined with the same volumes of the test samples of GSE as used in the bactericidal test. For controls, buffer solutions without the addition of GSE were used.

The sizes of the inhibition zones of GSE for the test strains were measured. Clear inhibition zones were observed for all test strains (25 strains), and the diameter varied from 17mm to 25mm, with a mean  $\pm$  standard deviation of  $20.2 \pm 2.4$ mm, without significant difference among the test strains. The mean size of the inhibition zone for each of serogroups 1, 3, 4, 5, 6 varied from 20mm to 22mm, without significant difference depending on the serogroup. Therefore, GSE exerted antibacterial effect on *L. pneumophila*.

The cumulative fractions of the tested bacterial strains inhibited at each MIC value are presented in the order from lower to higher concentrations in Figure 1 to show the distribution range of MIC. The MIC ranged from 98mg/l to 390mg/l depending on the strain, with the minimal growth inhibition distributed within three sequential tubes (eight-fold). The MIC values for 50% and 90% of the strains (MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>, respectively) were both 390mg/l.

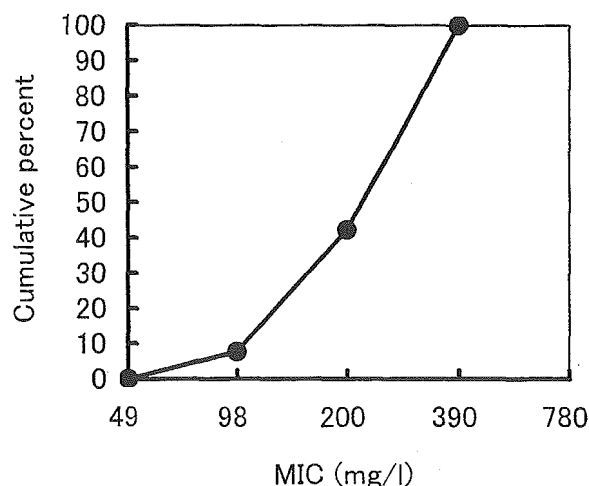


FIG. 1. Cumulative distribution of MIC of the grapefruit seed extract against *L. pneumophila* from whirlpool bath waters.

The cumulative distribution of MBC at each time point of exposure was examined in a manner similar to that for MIC. As the duration of exposure increased, the MBC distribution pattern shifted to the left, showing that the bacteria tended to be killed at lower concentrations. MBC ranged from 13,000 to 50,000mg/l with an exposure of 1 min, while it decreased to a range from 1,600 to 6,300mg/l with an exposure of 10min and to a range of 780 to 3,100mg/l with an exposure of 60min. At all exposure times, MBC was seen in samples distributed within three tubes (an eight-fold dilution range), showing a similar distribution range as MIC. The  $MBC_{50}$  was 25,000, 3,100, and 1,600 mg/l at 1, 10, and 60 min of exposure time, respectively, and  $MBC_{90}$  was 50,000, 6,300, and 3,100 mg/l, respectively (Table 1).

Changes in the *L. pneumophila* cell count caused by incubation in phosphate buffers at pH 7.0 and pH 9.0 containing 100mg/l GSE and 1,000mg/l GSE, and in phosphate buffer pH 7.0 containing the crude drug (Yakujinto) were measured. Under all conditions, the initial inoculum size,  $10^6$ cfu/ml, was decreased by 4 log cycles (or more than 99.99%) within 1 min. Particularly, the number of inoculated organisms decreased promptly even when the Yakujinto being used as the medicated bath water was added. The decreases found for the standard strain IID 5232 and the isolates from bath water showed no significant difference.

GSE has recently been attracting attention as a natural antibacterial agent, and it has been shown to have a wide antibacterial spectrum (Cho et al., 1995 ; Ionescu et al., 1990). The antibacterial activity of GSE is considered to make it an effective agent for extending the storage period of food in Japan, and its safety has been confirmed (Watanabe and Yamaguchi, 1995). It has been found that the antibacterial activity of GSE is mainly due to the component benzetonium chloride (Takeoka et al., 2001 ; von Woedtke et al., 1999). With regard to the mechanism of action, this substance has been found to cause the rupture of the bacterial membrane and release of the cytoplasm (Heggors et al., 2002).

**TABLE 1.**  $MBC_{50}$ ,  $MBC_{90}$  and MBC ranges of grapefruit seed extract against *L.pneumophila* from whirlpool bath waters.

Contact time (min)	MBC (mg/l)		
	Range	$MBC_{50}$	$MBC_{90}$
1	13,000-50,000	25,000	50,000
10	1,600-6,300	3,100	6,300
60	780-3,100	1,600	3,100

n=25

In this study, we investigated the antibacterial effect of GSE on the etiologic agent of legionellosis, *L. pneumophila*. In screening tests using the disc method, all test strains formed inhibition zones, showing an obvious antibacterial effect of GSE. The size of the inhibition zones did not significantly differ among the strains, and similar degrees of growth inhibition were observed. Although there have been many reports on the antimicrobial effects of GSE on various microorganisms (Heggors et al., 2002 ; Reagor et al., 2002), to our knowledge no data on *L. pneumophila* have hitherto been reported.

Nishina et al. (1991) reported that the MIC values of GSE for *E. coli* and *S. aureus* were 25 and 5mg/l, respectively, indicating that GSE has potent antibacterial activity. Watanabe et al. (1995) reported the antibacterial activity of another type of GSE, with MIC values for *E. coli* and *S. aureus* of 200 and 25 mg/l, respectively.

In this study, we found that the MIC value of GSE for *L. pneumophila* ( $MIC_{90}$ ) was 390mg/ml, which is lower than those of coffee-derived caffeic acid and chlorogenic acid, both at 630mg/l (Furuhata et al., 2002), showing the high antibacterial activity of GSE. In addition, the  $MBC_{90}$  of GSE at an exposure time of 60 min was 3,100mg/l, indicating that GSE has higher bactericidal activity than the coffee-derived substances. Investigation of the time-course of the changes in the viable bacterial count in the bactericidal test revealed that 100mg/l GSE killed 99.99% or more of the bacteria within 1 min. These findings suggest that GSE is an effective natural bactericide for *L. pneumophila*.

Takeoka et al. (2001) identified the bactericidal component of commercial GSE as benzetonium chloride. In the present study, though we did not identify the antibacterial material, it is possible that the same component as that identified by Takeoka et al. was responsible for the bactericidal effect.

Disinfection with chlorine products is generally recommended for hot springs and public baths shown to be contaminated with *Legionella* spp. in Japan, and simple chlorination at a high concentration is performed in some places. Water characteristics such as pH vary markedly among hot springs, and there are various kinds of public baths, including medicated baths. In such circumstances, the control of *Legionella* spp. by chlorination alone is very difficult. The results of this study suggest that the bactericidal effect of GSE does not decrease at pH 9.0 or in medicated baths (for example, medicated with Yakujinto), and that GSE would therefore be useful as a bactericide for practical use. This point will require verification in tests during actual use.

## ACKNOWLEDGMENTS

We sincerely thank Dr. Kazuyoshi Yano, Head of Microbial Research, Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Public Health Research Institute, and Ms. Mie Iwaya, Chief Investigator, for providing the bath water-derived *L. pneumophila* for this study. We also thank Dr. Toshio Ozaki, Jintan Co., for providing the crude drugs.

## REFERENCES

- Cho, S., Lee, S. Y., Kim, J. W., Ko, G. H., and Seo, I. W. (1995) Development and application of a natural antimicrobial agent isolated from grapefruit seed extract - antimicrobial activity of grapefruit seed extract. *J. Hyg. Safety*, **10**, 33-39.
- Furuhata, K., Sugiyama, J., Dogasaki, C., and Fukuyama, M. (2000a) Antibacterial activities of several coffee samples against *Legionella pneumophila* (in Japanese). *Bokin Bobai*, **28**, 87-91.
- Furuhata, K., Dogasaki, C., Hara, M., and Fukuyama, M. (2000b) Antibacterial activities of several herbs on *Legionella pneumophila* (in Japanese). *J. Azabu Univ.*, **1-2**, 15-20.
- Furuhata, K., Dogasaki, C., Hara, M., and Fukuyama, M. (2002) Inactivation of *Legionella pneumophila* by phenol compounds contained in coffee (in Japanese). *Bokin Bobai*, **30**, 291-297.
- Heggors, J. P., Cottingham, J., Gusman, J., Reagor, L., McCoy, L., Carino, E., Cox, R., and Zhao, J. G. (2002) The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent : II . Mechanism of action and in vitro toxicity. *J. Altern. Complement. Med.*, **8**, 333-340.
- Ionescu, G., Kiehl, R., Wichmann-Kunz, F., Williams, C. H., Bauml, L., and Levine, S. (1990) Oral citrus seed extract. *J. Orthomolec. Med.*, **5**, 230-238.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS Approved Standard M7-A5.
- National Institute of Infectious Diseases, Infectious Diseases Surveillance Center (2003) Legionellosis, April 1999- December 2002, Japan. *Infectious Agents Surveillance Report*, **24**, 27-28.
- Nishina, A., Kihara, H., Uchibori, T., and Oi T. (1991) Antimicrobial substances in "DF-100", extract of grape fruits seeds (in Japanese). *J. Antibact. Antifung. Agents*, **19**, 401-404.
- Reagor, L., Gusman, J., McCoy, L., Carino, E., and Heggors, J. P. (2002) The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent : I . An *in vitro* agar assay. *J. Altern. Complement. Med.*, **8**, 325-332.
- Sawatari, K., Itoh, N., Nagasawa, M., Nakasato, H., Koga, H., Watanabe, K., Tanaka, H., Fujita, K., Shigeno, Y., Yamaguchi, K., Izumikawa, K., Saito, A., and Hara, K. (1984) New susceptibility testing medium (B-SYE agar) for *Legionella* and Legionella-like organisms (in Japanese). *Chemotherapy*, **32**, 718-723.
- Takeoka, G., Dao, L., Wong, R. Y., Lundin, R., and Mahoney, N. (2001) Identification of benzethonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3316-3320.
- von Woedtke, T., Schluter, B., Plegel, P., Lindequist, U., and Julich, W. D. (1999) Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie*, **54**, 452-456.
- Watanabe, T. and Yamaguchi, M. (1995) Use of grapefruit seed extracts (in Japanese). *Bio Ind.*, **12**, 42-46.

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

##### 3. レジオネラの病原性に関する研究