

厚生労働科学研究費補助金
地域健康危機管理研究事業

温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の 開発に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 文 明

平成19（2007）年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究----- 1
倉 文明

II. 分担研究報告

1. 温泉水の微生物に対する作用----- 19
藤田雅弘
2. *Legionella pneumophila* の型別----- 27
(1) *Legionella pneumophila* 血清群 1 の遺伝子型およびモノクローナル型の解析
前川純子
3. *Legionella pneumophila* の型別----- 37
(2) 浴槽水と冷却塔水に棲息する *Legionella pneumophila* の鞭毛遺伝子型に見られる違いについて
前川純子、遠藤卓郎
4. 掛け流し式温泉の温泉成分検査、微生物実態調査、および施設の衛生管理状況についての調査 ----- 45
岩泷香織、遠藤卓郎、緒方喜久代、黒木俊郎、杉山寛治、藤田雅弘、前川純子、森本 洋、山崎利雄
(資料 1) 温泉実態調査 細菌検査マニュアル
(資料 2) 各自治体の調査概要報告書
(資料 3) レジオネラ属菌の培養法について
5. 浴槽水からの抗酸菌検出株の同定----- 97
山崎利雄
6. 入浴施設に関連したレジオネラ症の発生に関わる汚染菌濃度に関する研究----- 101
黒木俊郎
7. レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ類の検査に関する講習および実習----- 113
遠藤卓郎

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 121

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）
総括研究報告書

「温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究」

主任研究者	倉 文明	国立感染症研究所細菌第一部主任研究官
分担研究者	岩渕香織	岩手県環境保健研究センター 主任専門研究員
	遠藤卓郎	国立感染症研究所 部長
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター 主幹研究員
	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所 主任研究員
	杉山寛治	静岡県環境衛生科学研究所 主幹
	藤田雅弘	群馬県衛生環境研究所独立研究員
	前川純子	国立感染症研究所 主任研究官
	森本 洋	北海道立衛生研究所 研究職員
	山崎利雄	国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨：入浴施設を介したレジオネラ症集団感染事例の後、循環式入浴施設では塩素消毒による衛生管理がなされているが、温泉の場合には一律にこの手法が適用できない。そこで平成 18 年度の単年度研究として、実際に浴槽水中の温泉成分濃度を測定し、掛け流し式温泉の微生物の実態と衛生管理状況を調査した。この際、レジオネラ症の主たる起因菌と *Legionella pneumophila* 血清群 1 の入浴施設における分離株を型別し特色を探った。以下の 6 項目について研究を実施し、実態調査に必要なアメーバに関する研修を行った。その結果、酸性泉の *L. pneumophila* 殺菌作用が判明し、掛け流し温泉入浴施設の浴槽水においては一般細菌数がレジオネラ汚染とよく対応すること、入浴施設における感染事例の集積等、温泉施設の衛生管理に有用な知見を得た。

1) 温泉水の微生物に対する作用

酸性泉では、浴槽水の消毒に次亜塩素酸ナトリウム等の薬品を用いると塩素ガスが発生し、このような消毒方法は適当でない。そこで、2 つの酸性泉を利用源泉とする浴槽水の *L. pneumophila* に対する作用を調べた。これらの浴槽水に *L. pneumophila* を接触させた場合、30 分後に減少傾向が見られ 3 時間後には 1 万分の 1 以下になった。陰イオン交換処理により殺菌作用は消失した。*L. pneumophila* が宿主とするアメーバのシストへの酸性泉の影響をみると、1 時間接触させてもアメーバシストの数は減少しなかった。これらの酸性泉を利用する掛け流し式温泉施設では浴槽水の消毒は必要ないと考えられるが、このような環境においても従属栄養細菌がかなり生存しているので、浴場及びその付帯設備の衛生管理に注意し、潜在的な危害を排除する努力は必要であると考えられた。

2) *Legionella pneumophila* 血清群 1 の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析

日本各地から分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 27 株（入浴施設分離株 13 株、冷却塔分離株 14 株）および臨床分離株 38 株、計 65 株について遺伝子型別およびモノクローナル抗体型別を行ったところ、環境分離株は 14 種類に、臨床分離株は 29 種類に型別され、その疫学的有用性が確認できた。環境分離株において、冷却塔分離株が遺伝子型(1,4,3,1,1,1)、モノクローナル抗体型は OLDA および Oxford と均一であったのに対し、入浴施設分離株は多様性に富んでいた。集団感染事例の 3 株を除くと、環境分離株と臨床分離株で共通の型は 2 種類のみであり、両者で遺伝子型やモノクローナル抗体型の分布や頻度が異なることが示唆された。病原性に関連していると考えられているモノクローナル抗体 MAb 3/1 に着目すると、臨床分離株は 74%が陽性であったのに対し、環境分離株の陽性率は 22%で、すべて入浴施設由来株であった。

3) 浴槽水と冷却塔水に棲息する *Legionella pneumophila* の鞭毛遺伝子型に見られる違いについて 日本各地の浴槽水および冷却塔水から分離された *L. pneumophila* 295 株（浴槽水分離株 166 株、冷却塔水分離株 129 株）について鞭毛をコードしている *flaA* 遺伝子の塩基配列の差異に基づく型別を行った。調べた環境分離株は *flaA* の塩基配列の違いにより 14 種類に分けられた。冷却塔水分離株は 10 種類、浴槽水分離株は 9 種類に分けられ、遺伝子型の分布に違いが見られた。冷却塔水由来分離株は特定の 2 種類の遺伝子型のものが、88%を占めたのに対し、浴槽水分離株はそれとは異なる 5 種類の遺伝子型のものについて合わせると 92%となり、両者で明白な違いが認められた。このことを利用すれば、散発感染事例で臨床分離株から感染源を推測できることが示唆された。

4) 泉質によるレジオネラの生息状況

日本全国の多様な泉質をもつ掛け流し温泉入浴施設の浴槽水、直接湯口から採水した湯など、合計 131 検体のうち、113 検体について微生物検査を行ったところ、33 検体（29%）からレジオネラが検出された（施設別では、48 施設中 46%の 22 施設から検出）。分離されたレジオネラは、9 割が *L. pneumophila* で、血清群 1、6、untypable が多かった。泉質別では酸性泉と硫黄泉のレジオネラ検出率がそれぞれ 10%、17%と低かった。検査した温泉成分との関係では、レジオネラの陽性率が有意に低かったのは、単変量解析の結果から、pH6 未満、酸消費量（炭酸水素イオン濃度）400 mg/L 未満、電気伝導率 225mS/m 未満、全硬度 650 mg/L 未満の温泉水であったが、多重ロジスティック回帰解析では、pH6 未満のみが有意となった。また、レジオネラ陽性率と他の微生物量との関係については、多重ロジスティック回帰解析により、従属栄養細菌 200CFU/mL 以上、一般細菌 30CFU/mL 以上、アメーバ 20PFU/100mL 以上で有意に高く、特に連続量として見ると、一般細菌数が重要なリスク因子であることが分かった。一般細菌が 10 倍になると、レジオネラ汚染のリスク（オッズ比）は 2.2 倍になった。各種泉質は、一般細菌数に影響してレジオネラ汚染のリスクに関与すると示唆された。その他、温泉水の消毒の有無、浴槽の材質、貯湯槽の有無と温度等とレジオネラの検出の関連について調査した。

5) 水からの抗酸菌の検出株の同定

種々の泉質の循環式でない温泉を利用する公衆浴場における浴用水の衛生管理を検討する上で、浴槽水中にいかなる抗酸菌が存在するか調査を行った。113

検体中、3 検体から抗酸菌 3 株が分離された。分離菌の内訳は、*Mycobacterium gordonae* 1 株、*M. phlei* 1 株が同定された。残り 1 株は、検査中である。結核菌(*M. tuberculosis*)は、検出されなかった。

6) レジオネラ症発生事例における浴槽水のレジオネラ汚染濃度

レジオネラ症発生時に関連した浴槽のレジオネラ属菌の菌濃度データを蓄積することは、レジオネラ症の発生を防ぐための衛生管理手法の確立や患者発生子予防対策の策定のために非常に重要である。しかし、これまで患者発生時の浴槽の菌数に関する報告は非常に少ない。そこで、全国の地方衛生研究所にアンケート調査への協力を求めた。アンケートの内容は、それぞれの自治体で実施された疫学調査の中から浴槽の菌数に関するデータとそれに付随した情報に関するものとした。60 機関から回答が得られ、このうち 30 機関が患者発生時に関連する入浴施設の調査を実施し、患者由来株と入浴施設由来株の遺伝子型が一致する結果を得たのは 10 機関、13 症例で、すべて *L. pneumophila* が起因菌であった。浴槽水中の菌濃度は、90~4700CFU/100mL であった。

7) レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ類の検査に関する講習および実習

本研究班における微生物学的汚染調査の一環として、レジオネラ属菌の宿主である小型自由生活性アメーバ類の検査を行うにあたり、研究班参加の各地方衛生研究所の担当者を対象としてアメーバ類の検査法に関する講習ならび実習を行った。その講義実習資料を記録した。

A. 研究目的

入浴施設を介したレジオネラ症集団感染事例が続発したことを受け、平成 15 年 2 月に公衆浴場における衛生管理要領等が改正され、レジオネラ属菌にかかる規制や浴槽水の消毒方法が明記された。これにより循環式浴用施設においては塩素消毒の徹底が図られたが、その一方で、旧くから地域に点在する温泉では、泉質によっては塩素が適用できないこともあり、温泉の安全性の確保に不確定な要素が残っている。実際に、比較的レジオネラ汚染の少ないと期待されている掛け流し式温泉でもレジオネラが検出される例が報告されている。塩素消毒は残存性があるため、常に微生物に汚染される恐れがある循環式入浴施設では最も有効な消毒方法の一つと言えるが、循環系を持

たない温泉では、塩素等の化学消毒剤を添加しない状態で利用することが温泉本来の効用のために好ましい。現行の循環式浴用施設を対象とした衛生管理手法は、最終的には微生物等に汚染された水を消毒することによって健康被害を防止するという考えに基づいており、必ずしも温泉の運用形態に適合した手法とは言えない。このため、掛け流し式温泉の調査と衛生管理について研究が始まっているが、温泉の多様性の観点から、実際に泉質を測定しながら、より多くの調査が必要である。

そこで、本研究では第一義的に、これまでの調査対象からもれている都道府県の参加をつのり、循環系を持たない多様な泉質の温泉を対象として、微生物学的検査ならびに温泉成分検査を行い、泉質によるレジオネラなどの微生物叢の特徴を明らか

にすることにより、泉質に応じた衛生管理のためのデータの取得、解析を行う。その際、主たる起因菌である *Legionella pneumophila* に着目し、温泉水の微生物に対する直接作用、感染事例の調査も検討する。これらを通じて泉質に応じた温泉の衛生管理とレジオネラの管理基準についての提言の科学的根拠を提示することを目的とする。

分担研究者の他に、福島、石川、岐阜、鳥取、熊本の各県から研究協力者が参加した。

(倫理面への配慮) 本研究ではヒト試料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。

B. 研究結果及び考察

1) 温泉水の微生物に対する作用

酸性泉では、浴槽水の消毒に次亜塩素酸ナトリウム等の薬品を用いると塩素ガスが発生し、このような消毒方法は適当でない。一方で「循環式浴槽おけるレジオネラ症防止対策マニュアル」によれば、酸性泉にはレジオネラは棲息しないとの記述や、「レジオネラの知識と浴室管理」では、酸性域 (pH5.0 以下) ではレジオネラが棲息しにくいと記述されている。そこで、酸性泉を利用する掛け流し式温泉での、浴槽水の水質検査義務の適用除外を検討する一助として *L. pneumophila* に対する酸性泉の作用について調べた。

2つの酸性泉を利用源泉とする浴槽水の *L. pneumophila* に対する作用を調べた。これらの浴槽水に *L. pneumophila* を接触させた場合、30分後に減少傾向が見られ3時間後には1万分の1以下になった(図1)。対照と

して用いた大腸菌でも同様に殺菌された。しかし、この殺菌作用は、陰イオン交換処理により消失した。ヨウ素イオンの効果が想定された。*L. pneumophila* が宿主とするアメーバのシストへの酸性泉の影響をみると、1時間接触させてもアメーバシストの数は減少しなかった。これらの酸性泉を利用する掛け流し式温泉施設では浴槽水の消毒は必要ないと考えられる。ただし、このような環境においても従属栄養細菌がかなり生存しているため、浴場及びその付帯設備の衛生管理に注意し、潜在的な危害を排除する努力は必要であると考えられた。

2) *Legionella pneumophila* 血清群1の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析

わが国においてレジオネラ症の主要な感染源は温泉などの入浴施設であると推測されている。レジオネラ症の起因菌として最も頻度の高い *L. pneumophila* 血清群 (SG) 1 の分離株について、遺伝子型別およびモノクローナル抗体 (MAb) 型別を行い、その疫学的有用性を確認するとともに、本菌の生息する環境の違いにより遺伝子型や MAb 型に差が見られるか、また臨床分離株との間に違いがあるか検討した。

日本各地から分離された *L. pneumophila* 血清群1の環境分離株27株(入浴施設分離株13株、冷却塔分離株14株)および臨床分離株38株、計65株について遺伝子型別およびモノクローナル抗体型別を行ったところ、環境分離株は14種類に、臨床分離株は29種類に型別され、その疫学的有用性が確認できた。環境分離株において、冷却塔分離株が遺伝子型(1,4,3,1,1,1)、モノクローナル抗体型

は OLDA あるいは Oxford と均一であったのに対し、入浴施設分離株は、遺伝子型、Mab 型ともに多様性に富んでいた(図 2、冷却型は左下の CT ; 表 1)。集団感染事例の 3 株を除くと、環境分離株と臨床分離株で共通の型は 2 種類のみであり、両者で遺伝子型やモノクローナル抗体型の分布や頻度が異なることが示唆された。病原性に関連していると考えられている MAb 3/1 に着目すると、臨床分離株は 74% が陽性であったのに対し、環境分離株の陽性率は 22% で、すべて入浴施設由来株であった(図 3)。

今回の方法で検索すると、わが国で初めての臨床分離株(1980 年、図 2、上から 5 番目の□、NIIB No. 79)は冷却塔型ではないことが判明した。臨床分離株のうち 6 株(16%)のみが冷却塔分離株と同じ遺伝・Mab 型であったということはわが国のレジオネラ症の感染源の多くが入浴施設であると考えられていることとも矛盾しない。臨床分離株も本来環境に生息していたはずであることを考えると、環境に生息している *L. pneumophila* SG 1 の特定の株がレジオネラ症の発生に関与している可能性がある。入浴施設から分離された菌株を型別することで、より具体的なリスクアセスメントを行うことができるようになるかもしれない。

3) 浴槽水と冷却塔水に棲息する *L. pneumophila* の鞭毛遺伝子型に見られる違いについて

遺伝子型およびモノクローナル抗体型は、前段で記載したように疫学マーカーとして有用であるが、これらすべて調べるのは労力的にも費用的にも大変である。また、冷却塔分離株 14 株はすべて 1 種類の遺伝子型だった。EWGLI(European Working

Group for *Legionella* Infections)は遺伝子型別の際に、6 つすべての遺伝子型別ができない場合には、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA* の順に遺伝子型別を行うことを推奨している。そこで遺伝子型検査に用いられる遺伝子の 1 つである鞭毛をコードしている *flaA* 遺伝子の塩基配列を多数の浴槽水、および冷却塔水分離株について調べ、分離株の由来環境により遺伝子の傾向に違いがあるか調べた。

まず *L. pneumophila* の血清群の分布を検索したところ、浴槽水分離株と冷却塔水分離株とで異なっており、冷却塔水分離株では、血清群 1 がいちばん多く、次いで血清群 7 で、それぞれ 67%、22% を占めるのに対し、浴槽水分離株においては血清群 1 がやはり最も多いもののその比率は 31% で、次いで型別不能(UT)株が 20%、さらに血清群 6、5 がそれぞれ 18%、16% と続いた。

日本各地の浴槽水および冷却塔水から分離された *L. pneumophila* 295 株(浴槽水分離株 166 株、冷却塔水分離株 129 株)について鞭毛をコードしている *flaA* 遺伝子の塩基配列の差異に基づく型別を行った。調べた環境分離株は *flaA* の塩基配列の違いにより 14 種類に分けられた。冷却塔水分離株は 10 種類、浴槽水分離株は 9 種類に分けられ、遺伝子型の分布の違いが見られた。冷却塔水由来分離株は特定の 2 種類の遺伝子型のものが、88% を占めたのに対し、浴槽水分離株はそれとは異なる 5 種類の遺伝子型のものについて合わせると 92% となり、両者で明白な違いが認められた(図 4、表 2)。このことを利用すれば、散发感染事例で臨床分離株から感染源を推測できることが示唆された。

4) 泉質によるレジオネラの生息状況
日本全国の多様な泉質を持つ掛け流し温泉入浴施設の浴槽水、直接湯口から採水した湯など、合計 131 検体のうち、113 検体について微生物検査を行ったところ、33 検体 (29%) からレジオネラが検出された (施設別では、48 施設中 46% の 22 施設から検出) (表 3)。分離されたレジオネラは、9 割が *L. pneumophila* で、血清群 1、6、untypable が多かった。泉質別では酸性泉と硫黄泉のレジオネラ検出率がそれぞれ 10% ($p=0.016$ 、フィッシャーの正確確率検定、単純温泉と比較)、17% ($p=0.083$ 、同) と低かった (図 5)。

温泉成分との関係では、レジオネラの陽性率が有意に低かったのは、単変量解析の結果から、pH6 未満、酸消費量 (炭酸水素イオン濃度) 400 mg/L 未満、電気伝導率 225mS/m 未満、全硬度 650 mg/L 未満、炭酸イオン 1 mg/L 未満、ナトリウムイオン 250 mg/L 未満、カリウムイオン 30 mg/L 未満の温泉水であったが、多重ロジスティック回帰解析では、pH6 未満のみが有意となった (表 4,5,6)。また、レジオネラ陽性率と他の微生物量との関係については、多重ロジスティック回帰解析により、従属栄養細菌 200CFU/mL 以上、一般細菌 30CFU/mL 以上、アメーバ 20PFU/100mL 以上で有意に高く (表 7)、特に連続量として見ると、一般細菌数が重要なリスク因子であることが分かった ($p=0.0006$)。一般細菌が 10 倍になると、レジオネラ汚染のリスク (オッズ比) は 2.2 倍になった (図 6)。レジオネラ陽性率 p はロジスティック回帰の結果から以下の式で求められる。

$$X \text{ は一般細菌数(log)として、} \\ p=1/\{1+\exp(3.455-0.790 \times 1.560-0.175 \\ \times 0.294-0.228X)\}$$

である。各種泉質は、一般細菌数に影響してレジオネラ汚染のリスクに関与すると示唆された。

その他、温泉水の消毒の有無、浴槽の材質、貯湯槽の有無と温度等とレジオネラの検出の関連について調査した。調査した 50 泉源の浴槽のうち貯湯槽を有していたのは 26 (52%) であった。貯湯槽を有している浴槽水および湯口水の方が、貯湯槽をもたない場合よりレジオネラ、一般細菌ともに陽性率が高い傾向にあった。湯口水からレジオネラが検出されたのは貯湯槽の設定温度が 41-43°C と低いグループのみだった。貯湯槽を有し、その管理温度の低い事がレジオネラ汚染のリスクを高めた。

5) 水からの抗酸菌の検出株の同定

種々の泉質の循環式でない温泉を利用する公衆浴場における浴用水の衛生管理を検討する上で、浴槽水中にいかなる抗酸菌が存在するか調査を行った。113 検体中、3 検体 (2.7%) から抗酸菌 3 株が分離された。分離菌の内訳は、*Mycobacterium gordonae* 1 株、*M. phlei* 1 株が同定された。残り 1 株は、検査中である。結核菌 (*M. tuberculosis*) は、検出されなかった。今回の調査による抗酸菌の検出率は、他の研究班による掛け流し式温泉の浴槽水調査の平成 17 年度成績、220 検体中 7 検体 (3.2%) より若干低い検出率であった。

M. phlei は、ヒトに対し病原性は無いと言われている菌種である。*M. gordonae* は、健常人に対しては、病原性は低い、免疫力の低下したヒトに *M. gordonae* 症を引き起こす抗酸菌である。また、他の調査では、浴

槽水から *M. avium*、*M. scrofulaceum*、*M. fortuitum* と言った病原性のある菌種が分離されている。非結核性抗酸菌は、自然界に広く分布しているが、健常人にとっては、ほとんどが日和見感染菌である。したがって、菌が分離されたからといって、即病気を起こす原因とは言い切れない。しかし、かつて、家庭用の 24 時間風呂の浴槽水から感染したと考えられる *M. avium* による皮膚感染症例が報告されているため、浴槽内や配管等の清掃や消毒により、抗酸菌症の原因となりうる菌を排除することは重要であろう。

6) レジオネラ症発生事例における浴槽水のレジオネラ汚染濃度

レジオネラ症発生時に関連した浴槽のレジオネラ属菌の菌濃度のデータを蓄積することは、レジオネラ症の発生を防ぐための衛生管理手法の確立や患者発生予防対策の策定のために非常に重要である。しかし、これまで患者発生時の浴槽の菌数に関する報告は非常に少ない。そこで、全国の地方衛生研究所にアンケート調査への協力を求めた。アンケートの内容は、それぞれの自治体で実施された疫学調査の中から浴槽の菌数に関するデータとそれに付随した情報に関するものとした。

60 機関から回答が得られ、このうち 30 機関が患者発生時に関連する入浴施設の調査を実施していた。感染事例に関連した浴槽水中の菌数分布は、100 mL 中の菌数が増えるに従って頻度は低下していた (図 7)。100 CFU 未満の菌数の感染事例については塩素濃度が高い事例もあり、感染時における菌濃度を反映しているかどうか個々の事例で検討が必要である。患者由来株と入浴施設由来株の

遺伝子型が一致する結果を得たのは 10 機関、13 症例ですべて *L. pneumophila* が起因菌であった。その内、感染当時を反映していると思われた浴槽水中の菌濃度は、90~4700 CFU/100mL であった (図 8、▲9 例)。

入浴施設に関連したレジオネラ症の発生に関わる浴槽水の汚染菌濃度について、予備的な文献調査をしたところ、多くの大規模な集団感染事例は 10,000 CFU/100mL 以上で起こり、1,000 CFU/100mL 以下の場合には溺水事故や免疫力の低下した患者で起きている。今回の調査でもそのことが確認され、100mL あたり 100-1000 の菌濃度帯で散発感染事例が認められた。

C. 結論

酸性泉が *L. pneumophila* の殺菌効果をもつことを初めて明らかにした。利用源泉が pH 3 以下の酸性泉を利用する施設については、十分な湯量をもって従来の掛け流し式をとっていれば、浴槽水の消毒をおこなわなくても、浴槽水のレジオネラの衛生管理目標値を達成すると考えられた。しかし、湯口水および浴槽水からは、従属栄養細菌が検出されることや、レジオネラの宿主アメーバのシストには殺菌効果がないこと、浴槽の材質が木製であったり、岩石を組んだ清掃しにくい構造である施設が多くみられること等、衛生管理について注意し、潜在的な危害の排除する努力は必要であると考えられた。

わが国のレジオネラ症の主要な感染源とされる温泉から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 を遺伝子型および MAb 型を用いて型別したところ、その疫学的有用性が確認できた。さらに、遺伝子型および MAb 型ともに、

環境分離株と臨床分離株との間で、その分布や頻度が異なっていたので感染源の推測に有用である。

温泉入浴施設由来の浴槽水、直接湯口から採水した湯、合計 131 検体の中で、微生物検査を行った 113 検体のうち 32 検体 (28%) からレジオネラが検出された (施設別では、48 施設中 46% の 22 施設から検出)。分離されたレジオネラは、9 割が *L. pneumophila* で、血清群 1 と untypable が多かった。温泉成分との関係では、レジオネラの陽性率が有意に低かったのは、単変量解析の結果から、pH6 未満、酸消費量 (炭酸水素イオン濃度) 400 mg/L 未満、電気伝導率 225mS/m 未満、全硬度 650 mg/L 未満の温泉水であったが、多重ロジスティック回帰解析では、pH6 未満のみが有意となった。また、レジオネラ陽性率と他の微生物量との関係については、多重ロジスティック回帰解析により、従属栄養細菌 200CFU/mL 以上、一般細菌 30CFU/mL 以上、アメーバ 20PFU/100mL 以上で有意に高く、特に連続量として見ると、一般細菌数が重要なリスク因子であることが分かった。

入浴施設関連のレジオネラ症の汚染菌濃度と発症リスクの事例調査について、全国の地方衛生研究所対象にアンケート調査への協力を求めた。60 機関から回答が得られ、このうち 30 機関が患者発生時に関連する入浴施設の調査を実施していた。患者由来株と入浴施設由来株の遺伝子型が一致する結果を得たのは 10 機関、13 症例ですべて *L. pneumophila* が起因菌であった。その内、感染当時を反映していると思われた浴槽水中の菌濃度は、90~4700 CFU/100mL であった。

入浴施設に関連したレジオネラ症

の発生に関わる浴槽水の汚染菌濃度について、予備的な文献調査をしたところ、多くの大規模な集団感染事例は 10,000 CFU/100mL 以上で起こり、1,000 CFU/100mL 以下の場合には溺水事故や免疫力の低下した患者で起きている。今回の調査でもそのことが確認され、100mL 当り 100-1000 の菌濃度帯で散発感染事例が認められた。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 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* 134:385-91, 2006.

2) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Bin Chang, and Haruo Watanabe: Pulsed-field gel electrophoresis analysis and sequence-based Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from Japan. pp159-162. In *Legionella*; state of the art 30 years after its recognition (Edited by Nicholas P. Cianciotto *et al.*) ASM Press, Washington, D. C., 2006.

3) Katsuhiko Ohata, Kanji Sugiyama, Mitsuaki Suzuki, Rieko Shimogawara, Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, and Takuro Endo: Growth of *Legionella* in Non-sterilized, Naturally Contaminated Bath Water in a Facility Which Mechanically Circulates and Purifies the Water. pp431-435. In *Legionella*; state of the art 30 years after its recognition (Edited by Nicholas P. Cianciotto *et al.*) ASM Press, Washington, D. C., 2006.

4) Kanji Sugiyama, Katsuhiko Ohata,

Mitsuaki Suzuki, Rieko Shimogawara, Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, and Takuro Endo: Inhibition of *Legionella* Growth in Circulating Bathing Water by Filter Refreshment Method Using High Concentration Chlorine. pp.497-500. In *Legionella*; state of the art 30years after its recognition (Edited by Nicholas P. Cianciotto *et al.*) ASM Press, Washington, D. C., 2006.

5) 藤井明、河合自立、松田和也、杉山寛治、大畑克彦、鈴木光彰、加藤宏一：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. 生活と環境. 51, 67-73, 2006.

6) 河野喜美子、岡田美香、倉 文明、前川純子、渡辺治雄：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 II. 診断検査法の比較. 感染症学雑誌. 81, 173-182, 2007.

7) 倉 文明、常 彬、前川純子(アイウエオ順)：レジオネラ、図説 呼吸器系細菌感染症：疫学、診断、治療 (荒川宜親、渡辺治雄監修, 佐々木次雄編集)、105-22, じほう、東京、2006.

8) 倉 文明、登坂直規、渡辺治雄：5章 日本と世界のレジオネラ感染症

情報、わが国の感染症法に基づいた届け出の現状、レジオネラ感染症ハンドブック (斉藤 厚編)、254-66 日本医事新報社、東京、2007.

2. 学会発表

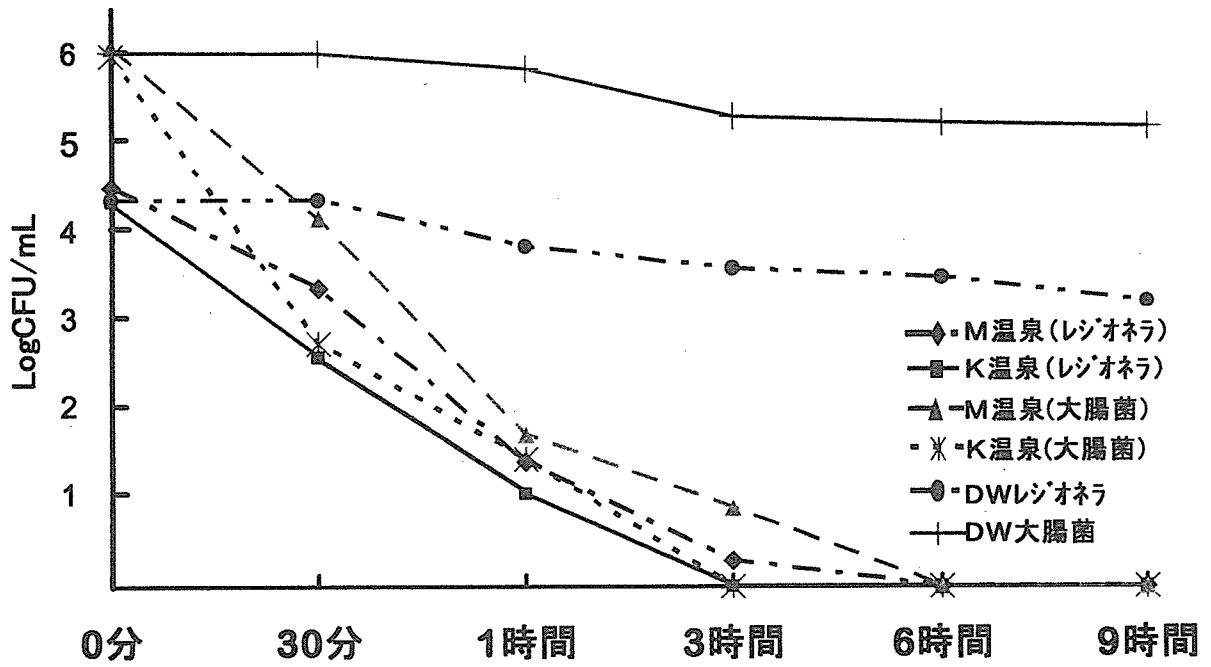
1) Kawano K, Okada M, Kura F, Amemura-Maekawa J, Watanabe H: The largest outbreak of legionellosis in Japan associated with spa baths: Diagnostic tests. 21st Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Lisbon, Portugal. May 2006.

2) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Watanabe H: Typing of *Legionella pneumophila* isolates in Japan by *flaA* gene. 21st Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Lisbon, Portugal. May 2006.

3) 前川純子、倉 文明、常 彬、渡辺治雄： *Legionella pneumophila* のモノクローナル抗体を用いたドレスデンパネルによる分類、第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪.

F. 知的所有権の取得状況
なし。

図1 浴槽水の細菌への影響 (n=3)



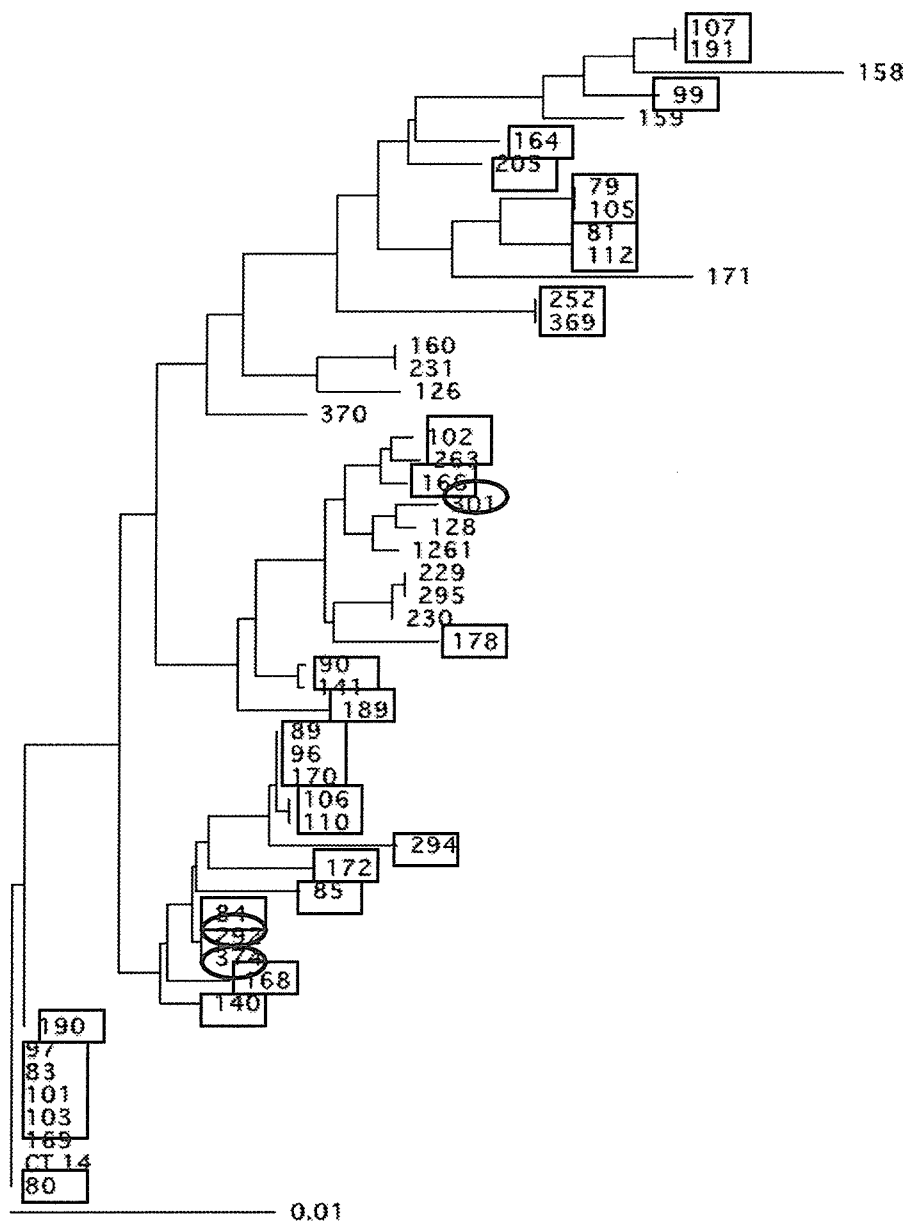


図2 日本各地から分離された臨床および環境分離株 65 株の遺伝子型別による系統樹。6 つの遺伝子座の塩基配列をつなげて、1 つの配列として、CLUSTALW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)を用いて、系統樹を作成した (NJ 法による)。数字は株名を示している。臨床分離株は株名を四角で囲んだ。冷却塔水分離株はすべて同一の型を示したので、まとめてCT14 と示した。

表1 モノクローナル抗体による *Legionella pneumophila* 血清群1の型別

サブグループ名	MAb 3/1	臨床分離株数	入浴施設分離株数	冷却塔分離株数
Benidorm - MAb 10/6-neg.	pos.	10 b)	0	0
Benidorm - MAb 10/6-pos. a)	pos.	4	0	0
Philadelphia	pos.	6	4 d)	0
Allentown/France	pos.	5 c)	1 d)	0
Knoxville - MAb 8/4-neg.	pos.	0	1 d)	0
Knoxville - MAb 8/4-pos.	pos.	3	0	0
OLDA	neg.	6 e)	0	8
Oxford	neg.	3 f)	2	6
Bellingham	neg.	1	5	0
計		38	13	14

- a) 欧州では未報告の型
- b) 入浴施設疑い1例含む
- c) 入浴施設疑い3例含む
- d) 集団感染起因株(各1)を含む
- e) 院内感染疑い1例含む
- f) 新生児感染1例含む

Distribution of *L. pneumophila* (SG1) MAb 3/1-positive strains

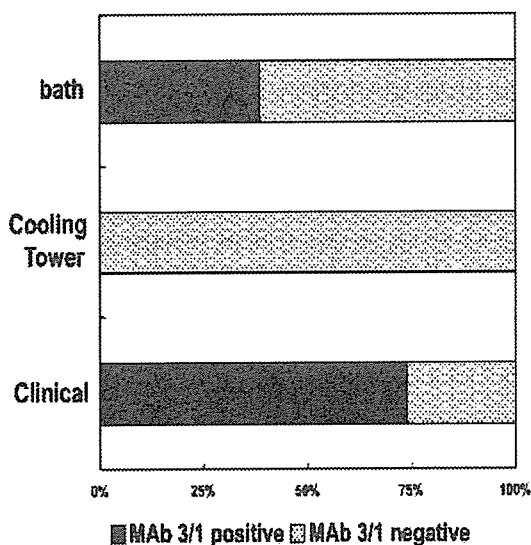


図3 *L. pneumophila* 血清群1の臨床分離株、環境分離株における MAb 3/1 陽性率

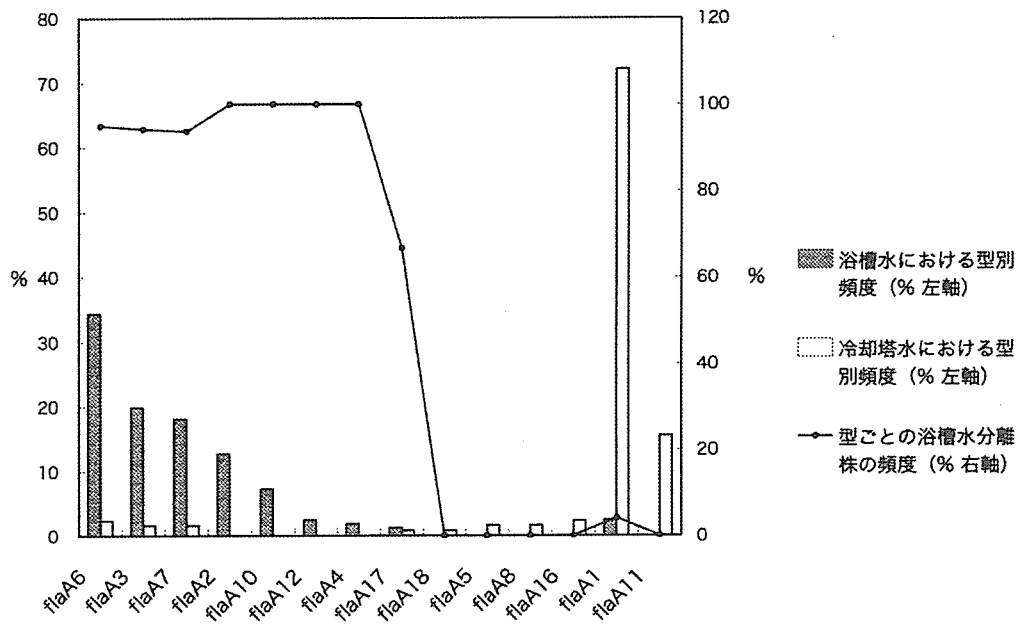


図4 浴槽水および冷却塔水分離株の *flaA* 遺伝子型の割合

表2 *flaA* 遺伝子型は冷却塔水型と浴槽水型に分けることができる

	<i>flaA</i> type	冷却塔 129 株	浴槽水 166 株	合計 295 株
冷却塔遺伝子型 <i>flaA</i>	1, 5, 8, 11, 16, 18	119	4	123
浴槽水遺伝子型 <i>flaA</i>	2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 17	10	162	172

表3 レジオネラ属菌検出状況

	検査数	検出数 (検出率 %)	平均菌数 (標準偏差) CFU/100mL	両側 t 検定
浴槽水	63	24 (38)	33 (101)	
貯湯槽あり	34	14 (41)	54 (134)	} p=0.08
貯湯槽なし	29	10 (34)	9 (20)	
湯口水	48	9 (19)	26 (96)	
貯湯槽あり	24	9 (38)	52 (133)	} p=0.05
貯湯槽なし	24	0 (0)	0 (0)	
源泉	2	0 (0)	0 (0)	
計	113	33 (29)	29 (98)	

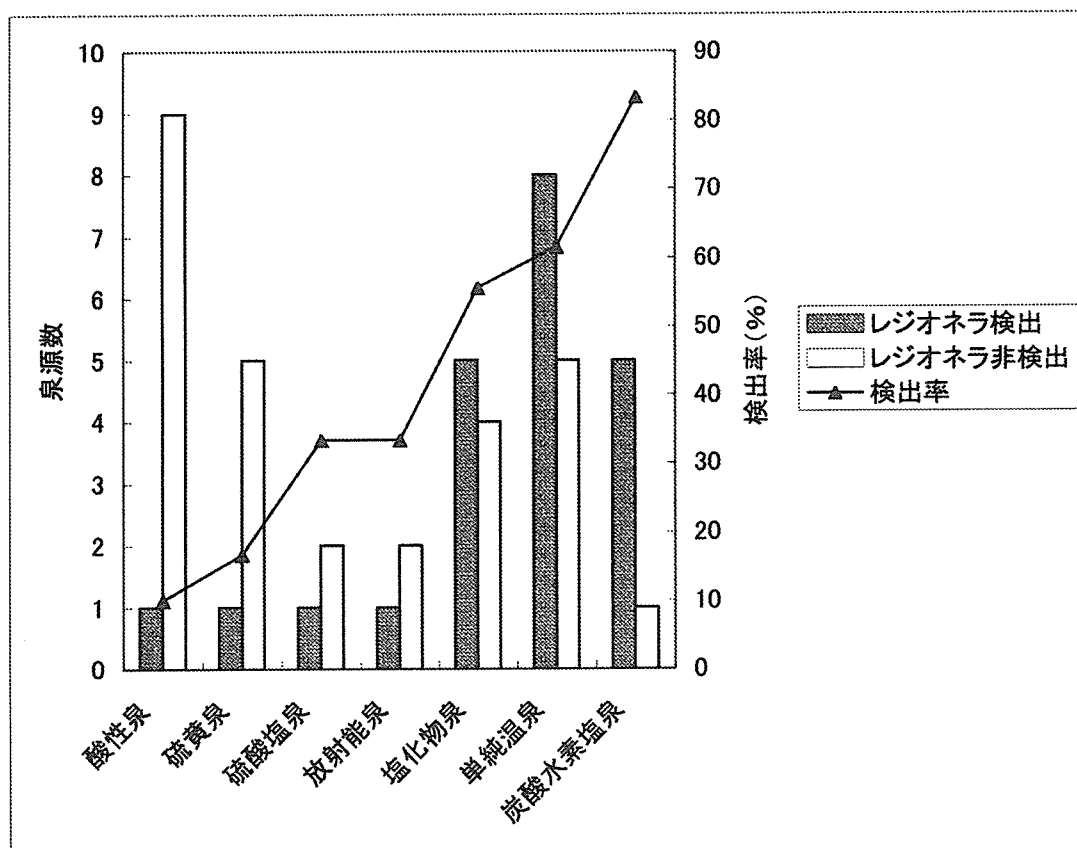


図5 泉質別レジオネラ検出状況

表4 レジオネラ汚染と泉質との関係（単変量解析、49 試料）

浴槽水	p 値	オッズ比	95%信頼区間
pH6 以上	0.0216*	12.28	1.45-104.28
酸消費量 400mg/L 以上 a)	0.0054**	8.33	1.87-37.15
全硬度 650mg/L 以上	0.0184*	5.40	1.32-21.95
電気伝導率 225mg/L 以上 b)	0.0188*	4.20	1.22-14.45
溶存酸素 2.6mg/L 以上	0.0659	8.00	0.87-73.40
マンガン 1mg/L 以上	0.0773	4.40	0.80-22.77

*:p<0.05 **:p<0.01 (カイ二乗検定)

a)43 試料 b)35 試料

表5 レジオネラ汚染と泉質との関係（温泉分析書より、単変量解析）

項目うしろのカッコの中の数字は試料数。

源泉	p 値	オッズ比	95%信頼区間
炭酸イオン 1mg/L 以上 (34)	0.0124*	9.71	1.63 -57.72
ナトリウムイオン 250mg/L 以上 (47)	0.0333*	3.93	1.11 -13.85
カリウムイオン 30mg/L 以上 (47)	0.0333*	3.93	1.11 -13.85

*:p<0.05 (カイ二乗検定)

表6 レジオネラ汚染と泉質との関係（多重ロジスティック回帰）

	p 値	調整オッズ比	95%信頼区間
pH6 以上	0.0292*	21.73	1.36-345.88
電気伝導率 225mg/L 以上	0.2295	4.81	0.37-62.47
全硬度 650mg/L 以上	0.5912	1.76	0.22-13.88
カリウムイオン 250mg/L 以上	0.8293	1.30	0.12-14.00
ナトリウムイオン 250mg/L 以上	0.4033	0.33	0.02-4.44

*:p<0.05 (カイ二乗検定)

表7 レジオネラ汚染と他の微生物量との関係 (多重ロジスティック回帰、112 試料)

	p 値	調整したオッズ比	95%信頼区間
従属栄養細菌 200CFU/mL 以上	0.0083**	13.80	1.97 - 96.85
一般細菌 30CFU/mL 以上	0.0013**	13.68	2.78 - 67.23
アメーバ 20PFU/100mL 以上	0.0148*	12.03	1.63 - 88.95
黄色ブドウ球菌 3MPN/100mL 以上	0.2381	3.13	0.47 - 20.81
大腸菌群 3MPN/100mL 以上	0.5948	2.26	0.11 - 45.64
緑膿菌 3MPN/100mL 以上	0.0925	0.28	0.07 - 1.23
大腸菌 3MPN/100mL 以上	0.2909	0.19	0.01 - 4.20

*:p<0.05 **:p<0.01 (カイ二乗検定)

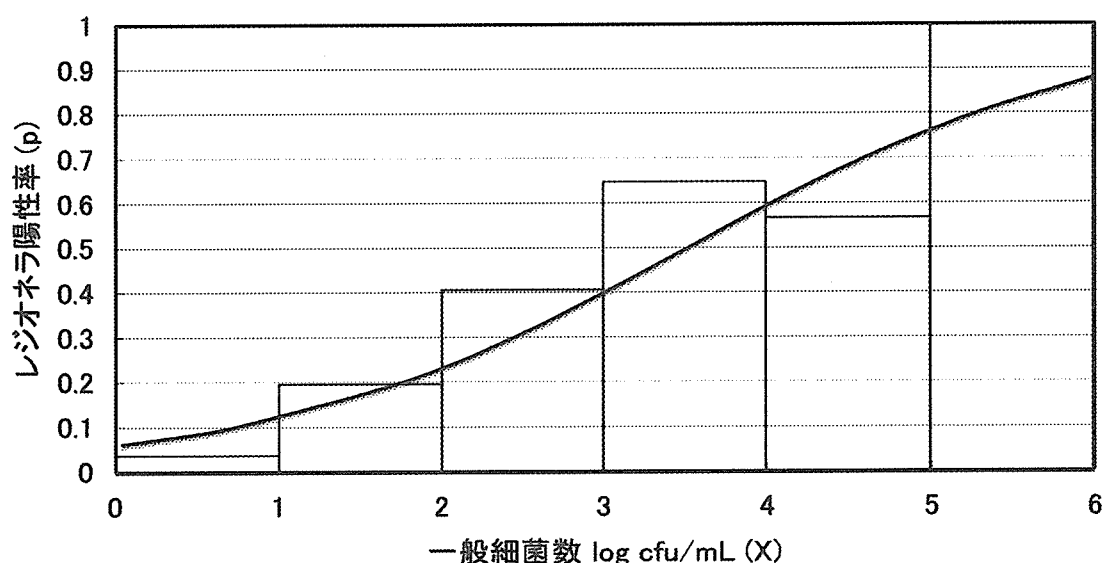


図6 一般細菌数から予測されるレジオネラ陽性率

レジオネラ陽性率 p はロジスティック回帰の結果から以下の式で求められる。

$$p = 1 / \{1 + \exp(3.455 - 0.790 \times 1.560 - 0.175 \times 0.294 - 0.228X)\}$$

: X は一般細菌数(log)

実際の陽性率をヒストグラムで示した。ヒストグラムの実数は、 $X < 1$, 2/54; $1 \leq X < 2$, 3/15; $2 \leq X < 3$, 7/17; $3 \leq X < 4$, 11/17; $4 \leq X < 5$, 4/7; $5 \leq X < 6$, 2/2 (レジオネラ陽性検体数/各範囲の総検体数)である。

図7 施設におけるレジオネラ属菌種の菌数の分布

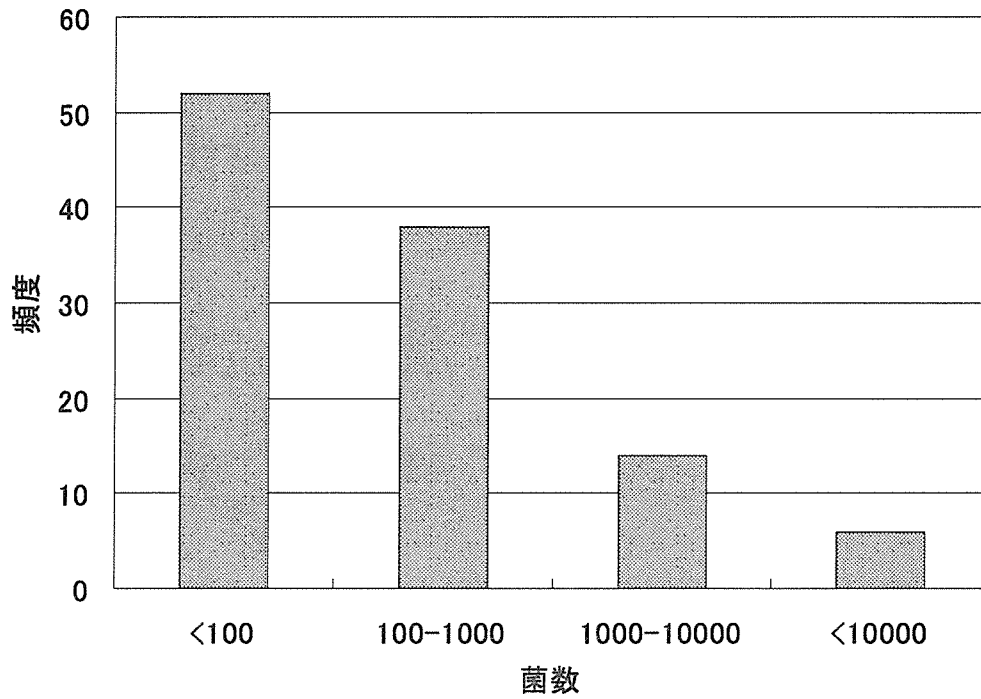


図8 レジオネラの汚染量と感染事例

