

図1 本研究で用いた冷却塔水と浴槽水から分離された*L. pneumophila*の血清群内訳

表1 浴槽水および冷却塔水分離株の血清群別にみた *flaA* 遺伝子型別結果

<i>flaA</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	16	17	18	計
冷却塔 SG1	64				2	2	1			15		1		1	86
浴槽水 SG1	4	6	3	2		19	13		2		2				51
冷却塔 SG3							1			1			1		3
浴槽水 SG3		3	2	1		2			4						12
冷却塔 SG4															0
浴槽水 SG4						2			1						3
冷却塔 SG5								2							2
浴槽水 SG5		7	4			7	8								26
冷却塔 SG6			2												2
浴槽水 SG6		1	17			7	4				1				30
冷却塔 SG7	28											1			29
浴槽水 SG7															0
冷却塔 SG8	1														1
浴槽水 SG8		2													2
冷却塔 SG9															0
浴槽水 SG9									3						3
冷却塔 SG10						1									1
浴槽水 SG10						2									2
冷却塔 SG11															0
浴槽水 SG11											1				1
冷却塔 SG12															0
浴槽水 SG12						1									1
冷却塔 SG13												1			1
浴槽水 SG13															0
冷却塔 SG14															0
浴槽水 SG14						1									1
冷却塔 SG15															0
浴槽水 SG15									1						1
冷却塔 SGUT									4					4	4
浴槽水 SGUT		2	7			16	5		1	4			2		33
冷却塔計	93	0	2	0	2	3	2	2	0	20	0	3	1	1	129
浴槽水計	4	21	33	3	0	57	30	0	12	0	4	0	2	0	166

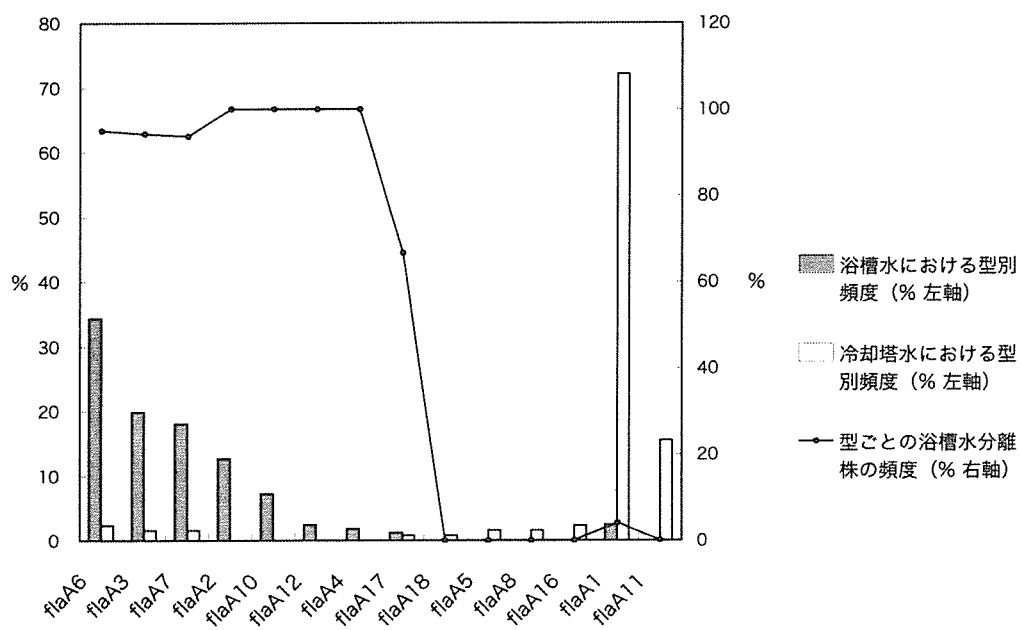


図3 浴槽水および冷却塔水分離株の *flaA* 遺伝子型の割合

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 推定されるレジオネラ感染源

1999年4月～2004年12月

記載あり	395 例
温泉・入浴施設等	327
土木工事、土、塵埃	14
空調、冷却塔等	9
河川、洪水	8
スポーツ施設、プール等	7
海外旅行後	6
国内旅行後	5
畑仕事、草刈り	3
乳児施設	3
井戸水	2
新生児室	2
ネブライザー	1
水冷扇風機	1
清掃業務	1
井戸水浄水器、太陽光温水器、畑のため水	1
わき水	1
下水道	1
浄水場	1
老人福祉施設	1
自宅、お湯関連	1
記載なし	376 例
計	771 例

感染症発生動向調査 2005年1月28日報告数

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

主任研究者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部

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

分担研究者

岩淵香織 岩手県環境保健研究センター
遠藤卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部
緒方喜久代 大分県衛生環境研究センター
黒木俊郎 神奈川県衛生研究所
杉山寛治 静岡県環境衛生科学研究所
藤田雅弘 群馬県衛生環境研究所
前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部
森本 洋 北海道立衛生研究所
山崎利雄 国立感染症研究所 ハンセン病
研究センター

研究協力者

池田徹也 北海道立衛生研究所
井田正己 鳥取県衛生環境研究所
熊田裕子 福島県衛生研究所
最首信和 鳥取県衛生環境研究所
清水俊一 北海道立衛生研究所
新川晶子 石川県保健環境センター
原 信行 岐阜県保健環境研究所
星野利得 群馬県衛生環境研究所
宮坂次郎 熊本県保健環境科学研究所

研究要旨

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 *Legionella 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。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 ($p=0.0006$)。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。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。

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、古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。

循環系を持たない温泉においてレジオネラ属菌等の繁殖を抑えるには、貯湯槽、配

管及び浴槽に生物膜を形成させないように管理することが最も重要と考えるが、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、参加都道府県に限られており、日本の多様な温泉に十分対応できているとは言い難い。

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、解析を目的とする。

B. 研究方法

1) 泉質の調査

調査対象施設は、原則として循環系の配管を持たず、毎日換水及び清掃を行っている掛け流し式温泉とした。

浴槽水は、朝湯については、温泉成分、TOC (Total organic carbon、全有機炭素)、アンモニア、溶存酸素、遊離二酸化炭素、pHを、しまい湯については微生物(詳細は後述)、TOC、アンモニア、残留塩素)、湯口からの湯についてはしまい湯の頃の微生物を測定した。泉質の測定のためには、なるべく人の入浴の影響を受けにくい早朝の浴槽水(あるいは湯口からのお湯)を500 mLポリ瓶に満水の状態で採取した。これまでレジオネラとの関連が示唆されている項目を含め、以下の16項目を測定した; pH、電気伝導率(mS/m)、全硬度(CaCO₃換算)、カルシウム硬度(CaCO₃換算)、マグネシウム硬度(CaCO₃換算)、鉄、マンガン、塩化物イオン、硫酸イオン、亜硝酸イオン、硝酸イオン、シリカ(無水ケイ酸)、アンモニウムイオン、銅、亜鉛、TOC。アンモニアやTOCは人から由来する一方で、アンモニアは関東地方の地下深くから湧出する黒色の温泉水から、高濃度で検出される。また、TOCも有機質(植物のフミンなど)により高い値を示すことがある。現地で、湯温、溶存酸素量、遊離二酸化炭素量を測定し、泉質、泉温、配湯量・湧出量、注湯口からの給水量、採取日の入浴者数、採取場所の

状況なども記録した。温泉分析書も参考のため入手した。

2) レジオネラ及びその他の微生物の生息状況

細菌検査に用いる検体は採水後、冷蔵保存し、アメーバ検査用の検体は採水後、室温保存した。採取場所は浴槽及び湯口とし、浴槽水は浴槽中央部で無菌的に採取した。

レジオネラ属菌検査には、滅菌した蓋付きの遠心管に検水200 mLを入れ、6,000G、10分間(室温、たとえば20°Cで)遠心した。上清を捨てて滅菌蒸留水を2mL加え、管内壁をよく洗い、沈渣を懸濁した。(この遠心法は、ISO11731 (Water quality -- Detection and enumeration of *Legionella*)で規定され、WHOのレジオネラ分離法にも採用されている。ちなみに300-500 mLの容器を使用して遠心するとされている)。濃縮液は未処理、熱処理、アルカリ処理用(抗酸菌用、詳細は分担報告書「浴槽水からの抗酸菌検出株の同定」を参照)に3等分した。レジオネラ検査には未処理液と50°Cで20分間の熱処理液を使用した。雑菌汚染がひどいと考えられる検体では熱処理後さらに酸処理した。未処理液および処理液100 µLと適宜10倍希釈で2~3段階希釈した試料100 µLをGVPC寒天平板(ピオメリュー)に接種し、36±1°Cで10日まで培養し、2、3日ごとに観察した。また、菌数が多い場合を考慮し、非濃縮検体についても未処理のもの100 µL、加熱処理したものを100 µL選択培地に塗布した。

レジオネラ様のコロニーを血液寒天プレートとBCYE αプレートで確認培養した。長波紫外線による自家蛍光を観察し、自家蛍光が無ければデンカ生研のレジオネラ免疫血清7種(*L. pneumophila*血清群1-6、*L. micdadei*)でスライド凝集反応を観察した。自家蛍光があればデンカ生研のレジオネラ免疫血清3種(*L. bozemanii*、*L. gormanii*、*L. dumoffii*)でスライド凝集反応を観察することとした。スライド凝集反応陰性の場合、PCRにより *mip*、5S rRNAを増幅して *L. pneumophila*かその他のレジオネラ属菌かを確認した。OXOIDのラテックス凝集反応(*L. pneumophila*血清群2-14、他のレジオネラ属菌種7種)も用いた。*mip*陰性菌については、極東DDHで種を同定した。*mip*遺伝子陽性菌については、デンカ生研のレジオネラ免疫血清9種(*L. pneumophila*7-15)でスライド凝集反応を観察した。上記の確認で陰性菌の場合には、16S rRNA遺伝子の配列決定に

よる同定を行った。菌の濃縮に、フィルターろ過法を使用した場合はその旨明記し、濃縮の手技は原則として病原体検出マニュアル（感染研と地研全国協議会編）の中のレジオネラ症検査マニュアルによった。すなわち、検水500mLを直径47mm、孔径0.45 μ mのポリカーボネートメンブランフィルターで吸引ろ過し、フィルターを剥がし5mLの滅菌蒸留水にひたし、フィルターがちぎれる程度に強く手で振盪洗浄した液（100倍濃縮）を遠心法と同じように熱処理を行った。

他に、大腸菌、大腸菌群、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、抗酸菌、一般細菌、従属栄養細菌、アメーバについても検査した（方法は、温泉実態調査 細菌検査マニュアルを参照）。

一部、源泉の微生物検査も行った。

3) 温泉施設の衛生管理等についての調査
温泉水の利用形態として、加温や加水の有無、消毒の有無やその方法について調査した。施設設備については、貯湯槽の有無およびその材質、浴槽の材質について調査した。衛生管理状態については、浴槽の換水および清掃頻度、清掃方法、貯湯槽の清掃頻度、配湯管の清掃の有無について調査した。

統計解析はJMP（SAS社）を用いた。

（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。

C. 研究結果及び考察

1 微生物検査結果

全国の温泉施設 48 施設（泉源数は 50）について微生物学的検査および泉質の検査を行った。泉質の内訳は環境省の新旧泉質対照表 (<http://www.env.go.jp/nature/onsen/reference/02.pdf>) に基づく揭示用泉質名により分類すると、単純温泉 13、酸性泉 10、塩化物泉 9、炭酸水素塩泉 6、硫黄泉 6、放射能線 3、硫酸塩泉 3 である。

微生物学的検査を行った浴槽数は 56（内湯 51、露天 5）で、一部の浴槽において時間帯を変えて複数回検体を採取したため浴槽水の検体数は 63 である。また、50 のすべての源泉について 48 の湯口水あるいは 2 つの源泉水が採取され、浴槽水 63、湯口水 48、源泉水 2 の計 113 検体について微生物学的

検査が行われた。

1-1 レジオネラ属菌検査結果

113 検体のうち、33 検体（29%）からレジオネラが検出された（表 1）。内訳は浴槽水が 24、湯口水が 9 である。最高は 500 CFU/100mL、100 CFU/mL 以上は 8 検体（7%）で、平均 29 CFU/100mL であった。施設別にみると 46%にあたる 22 施設（泉源数も 22）からレジオネラが検出された。そのうち、浴槽水からも湯口水からも検出されたのは 8 施設、浴槽水からのみ検出された施設が 13 施設、湯口水からのみ検出された施設が 1 施設であった。湯口からレジオネラが検出された施設はすべて貯湯槽を有していた。浴槽水におけるレジオネラ属菌数は平均 33 CFU/100mL で、貯湯槽を有する浴槽水は平均 54 CFU/100mL で貯湯槽のない浴槽水では 9 CFU/100mL だった。浴槽水におけるレジオネラの検出率（38%）に比べ、湯口水からのレジオネラの検出率（19%）は低かった（ $p < 0.05$ 、カイ二乗検定）が、レジオネラ陽性検体における菌数が多かったため、湯口水における平均レジオネラ属菌数は 26 CFU/100mL で、浴槽水とあまり変わらなかった（表 1）。

泉質別にみると、酸性泉および硫黄泉から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 1）。分離されたレジオネラは、9 割が *Legionella pneumophila* で、血清群 1、6、untypable が多かったが、他に *L. pneumophila* 血清群 3、4、5、9 および *L. micdadei*、*L. birminghamsensis*、*L. maceachernii*、*L. saintelensis* が検出された（表 2）。陽性検体の 24%からは複数の菌種あるいは血清群が検出された。

1-2 その他の微生物検査結果

アメーバは、113 検体中 24 検体（21%）から検出され（浴槽水 21、湯口水 3）、最高は 1800 PFU/100 mL だった。大腸菌は 33 検体（25%）から検出され（浴槽水 32、湯口水 1）、最高は 1100 MPN (Most Probable Number) /100 mL だった。大腸菌群は 38 検体（34%）から検出され（浴槽水 35、湯口 3）、最高は 2400MPN/100mL だった。緑膿菌は 26 検体（23%）から検出され（浴槽水 23、湯口水 3）、最高は ≥ 2400 MPN/100 mL だった。黄色ブドウ球菌は 28 検体（25%）から検出され（浴槽水 27、湯口水 1）、最高は > 1100 MPN /100 mL だった。以上の微生物は

すべて浴槽水からの検出頻度が、湯口水からの検出頻度より有意に高かった（すべて $p < 0.001$ 、カイ二乗検定）。抗酸菌は、3 検体（3%）から検出され（すべて浴槽水）、いずれも 1 CFU/100mL だった。菌種は *Mycobacterium gordonae*、および *M. phlei* だった。残りの 1 検体は現在解析中であるが、すべて結核菌ではなかった。一般細菌は 77 検体（68%）から検出され（浴槽水 50、湯口水 26、源泉 1）、最高は 340,000 CFU/mL だった。従属栄養細菌は 98 検体（87%）から検出され（浴槽水 58、湯口水 38、源泉 2）、最高は 2,600,000 CFU/mL だった（図 2、表 3）。入浴後の浴槽水の検査では 2/3 の施設でレジオネラ、大腸菌群不検出という公衆浴場法の水質基準を満たすことができなかった。

1-3 レジオネラ検出の有無と微生物量との関連

検体によりレジオネラの検出限界が 1~10CFU/100mL と異なっていたので、10CFU/100mL 未満の検体をレジオネラ陰性、10CFU/100mL 以上の検体をレジオネラ陽性検体とした。雑菌が多く正確なレジオネラ数が測定不能だった 1 検体を除くと、検体数は 112 となり、陽性検体数は 29（浴槽水 22、湯口水 7）であった。

カイ二乗、あるいはフィッシャーの正確確率検定により、一般細菌 30 CFU/mL 以上、従属栄養細菌 200 CFU/mL 以上、アメーバ 20PFU/100mL 以上、黄色ブドウ球菌 30MPN/100mL 以上、大腸菌および大腸菌群 3MPN/100mL 以上の場合、レジオネラの検出率が有意に高かったので、ロジスティック回帰による単変量解析を行った（表 4）。同様の項目について、多重ロジスティック回帰による解析を行い、調整オッズ比を求めた。その結果から、従属栄養細菌 200 CFU/mL 以上、一般細菌 30 CFU/mL 以上、アメーバ 20PFU/100 mL 以上のそれぞれの場合において、レジオネラの検出率が有意に増加することが分かった（表 5）。そこで、レジオネラの検出の有無に対して、従属栄養細菌、一般細菌、アメーバ数の対数について多重ロジスティック解析を行ったところ、一般細菌数が 10 倍になるとオッズ比が 2.2 倍に増加することが分かった（表 6）ので、一般細菌の検出数から推定されるレジオネラ陽性率を示した（図 3）。

黄色ブドウ球菌や大腸菌および大腸菌群による浴槽水の汚染は多くの場合ヒトからの持ち込みによると考えられるが、そのよ

うな細菌が検出される浴槽水は衛生管理が不十分であり、レジオネラ汚染も起こりやすくなっていることが考えられた（表 4）。また、浴槽水の細菌による汚染がすすむとアメーバが増殖し、アメーバを宿主とするレジオネラが検出されるという図式が実態として裏付けられた（表 5）。

2 泉質検査結果

各施設の入浴前の浴槽水あるいは湯口水の泉質について、各自治体独自にあるいはアクアス（株）に委託して検査を行った。48 施設（泉源数は 50）の 50 検体について、pH、電気伝導率、全硬度、カルシウム硬度、マグネシウム硬度、鉄、マンガン、塩化物イオン、硫酸イオン、亜硝酸イオン、硝酸イオン、シリカ、アンモニウムイオン、銅、亜鉛、TOC を、および 44 検体について酸消費量（炭酸水素イオン濃度）を測定した。銅は全検体で検出限界以下であった。アンモニウムイオンと TOC については入浴後の浴槽水についても測定した。平均アンモニウムイオン濃度は入浴前後で変わらなかったが、実際には、施設により増えたり、減ったり、変化しなかったり、一定しなかった（一対の標本による両側 t 検定で $p = 0.385$ ）。TOC 濃度は平均値としては入浴後に増加したが、アンモニウムイオン同様一定の傾向は見られなかった（同上 t 検定で $p = 0.205$ ）。また、現地調査で、48 検体の湯温、35 検体の溶存酸素量および 32 検体の遊離二酸化炭素量を測定した。入浴者数、泉温、配湯量・湧出量、浴槽容積、注湯口からの給水量についても調査した（表 7）。

2-1 レジオネラ検出の有無と泉質成分量の関係

同一施設あるいは浴槽水において複数の微生物検査を行っている検体について、1 泉源 1 浴槽水になるよう微生物汚染の激しい検体を選び、レジオネラ属菌陽性検体と陰性菌体それぞれについて泉質成分量等の平均値を求めた。t 検定により、pH、酸消費量、入浴者数について有意差があった。すなわち、pH が低い、あるいは酸消費量が少ない、あるいは入浴者数が多いほど、レジオネラの陽性率が低かった（表 7）。入浴者数が多いと浴槽水の汚染は進むはずなので、入浴者が多い施設は衛生管理が適正に行われているなど、他の要因が関与していることが考えられた。

2-2 浴槽水におけるレジオネラ検出の有無と泉質の関係

レジオネラ属菌の汚染が少ない環境水の水質としては、全硬度、溶存酸素、銅、硫酸イオン、シリカ濃度が高く、鉄、マンガ、亜鉛濃度が低いことが報告されている

(1) Borella P ら、Emerg Infect Dis, 10:457, 2004. 給湯水、2) Borella P ら、Appl Env Microbiol, 71:5805, 2005. 給湯水、3) 笹原武志ら、感染症学雑誌 78 巻、p545、2004. 温泉水)。今回検査した泉質において、レジオネラの検出率が有意に低かったのは、pH6 未満、酸消費量 400 mg/L 未満、全硬度 (CaCO₃ 換算) 650 mg/L 未満、電気伝導率 225 mg/L 未満の温泉水であった。マンガ 1 mg/L 以上、溶存酸素 2.6 mg/L 未満の温泉水も、レジオネラの検出率が低い傾向が見られたが、有意ではなかった (表 8)。カルシウム硬度、マグネシウム硬度、鉄、塩化物イオン、硫酸イオン、亜硝酸イオン、硝酸イオン、シリカ、アンモニウムイオン、亜鉛では有意差はなかった。さらに検体数を増やせば、新たな知見が得られるかもしれない。

2-3 温泉分析書による解析

今回実際に調査しなかった泉質項目についても温泉分析書を入手して解析を行った。欠損値が半数未満だったナトリウムイオン、カリウムイオン、アルミニウムイオン、フッ化物イオン、炭酸イオン、メタケイ酸、メタホウ酸、遊離硫化水素について単変量解析を行ったところ、レジオネラの検出率が有意に低かったのは、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、炭酸イオン 1 mg/L 未満の温泉水であった (表 9)。ナトリウムイオンが多いと、レジオネラ陽性率が高くなるというのは、生理食塩水程度の塩化ナトリウムを添加した培地で *L. pneumophila* が増殖できなくなる (Catrenich and Johnson, Infect Immun, 57:1862-4, 1989) という従来の知見と一見矛盾する結果であるが、ナトリウムイオンは一般細菌数の増加を促し、その結果、一般細菌を補食するアメーバが増加したり、レジオネラ棲息の場となる生物膜の形成に寄与したりしていると考えられる。レジオネラはアメーバに寄生しているので、温泉水と直に接することはむしろ少ないのかもしれない。

2-4 レジオネラ陽性率と一般細菌数と泉質についての関係

レジオネラ陽性率において有意な差がみられた pH、全硬度、電気伝導率、ナトリウ

ムイオン、カリウムイオンについて多重ロジスティック回帰による解析を行い、調整オッズ比を求めた。酸消費量、炭酸イオンは欠測値が多かったため、解析に用いなかった。その結果からは、pH6 以上の場合、レジオネラの検出率が有意に高いことが示された (表 10)。

レジオネラの宿主であるアメーバ汚染についても、pH6 以上で有意に高いことが示された (表 11) が、微生物検査の結果からは、レジオネラ陽性率に連続変数として関与するのは、一般細菌数の増加だけだった (表 6) ので、一般細菌数の対数と pH について多重ロジスティック回帰を行ったところ、レジオネラの陽性率に pH は独立した変数としては直接関与しないことが分かった (表 12)。pH が高くなると一般細菌数が増加し、それを補食する宿主アメーバの増加が、ひいてはレジオネラの陽性率の上昇につながると考えられる (表 13)。

レジオネラ分離培養の際に酸処理を行うこともあるように、レジオネラはむしろ酸に耐性なので、pH の影響が直接的なものではなかったというのは納得できる結果である。同様にレジオネラの陽性率に有意な影響を与えることが明らかになった温泉成分の濃度について、一般細菌 30CFU/mL 以上と未満の場合とで単変量解析を行ったところ、その多くのがレジオネラの検出率以上に、一般細菌の検出率に影響することが分かった (表 14)。

3 温泉設備および衛生管理についての調査結果

3-1 温泉水の消毒の有無とレジオネラ検出との関係

温泉水への消毒薬の添加の有無と残留塩素濃度について調査した。調査対象が掛け流し温泉のため、浴槽水に消毒薬を添加している施設は 15 施設 (31%) と少なかった。消毒薬の種類はすべて塩素だった。塩素処理を行っている施設での残留塩素濃度とレジオネラ検出状況については表 15 に、その注入方法については表 16 にまとめた。浴槽水において適正とされる塩素濃度 0.2-0.4 mg/L だった施設は 1 施設のみであった。8 施設からレジオネラが検出されたが (ただし 1 施設は 1CFU/100mL)、調べた範囲において残留塩素濃度はすべて 0.1mg/L 以下であった。温泉水に塩素を添加していない 33 施設のうちレジオネラが検出されたのは 14 施設で、塩素添加の有無でレジオネラの検

出率に差はなかった（カイ二乗検定）。適正な塩素使用がなされていた施設が少なかったため、塩素消毒の有効性を確認することはできなかった。なお、塩素を添加していないとする 33 施設のうち 22 施設について念のため残留塩素濃度が測定されたが、すべて不検出であった。

3-2 浴槽水の換水頻度

今回の調査では毎日換水および清掃を行っていた施設は 60%であった。換水頻度の低い施設の方がむしろ微生物汚染の度合いが低い傾向が見られたが、これは換水頻度の低い温泉に pH6 未満の温泉が多いためと考えられた（図 4）。

3-3 浴槽の材質

浴槽の材質はタイルが 32%、木が 22%、コンクリートが 16%、石あるいは岩が 14%の順で多かったが、それらを組み合わせたものが 14%あり、微生物汚染の状況と浴槽の材質との関係ははっきりしなかったが、タイルあるいはタイルを主体にした材質の浴槽は微生物汚染の度合いが高い傾向にあった。pH6 未満の温泉に、浴槽の材質が木、石・岩であるものが多く、それらを除くと木、石・岩でできた浴槽での微生物陽性率は高くなった。清掃が容易だと考えられる FRP 製の浴槽は今回の調査では 1 施設のみであった（図 5）。

3-4 浴槽の清掃状況

各施設の浴槽の清掃状況を図 6 に示した。90%以上の施設がブラシがけ主体の清掃を行っていた。清掃時に消毒を行っている施設の方が微生物汚染率が低い傾向が見られたが、有意ではなかった（両側 t 検定でレジオネラが $p=0.49$ 、一般細菌が $p=0.64$ 、図 7）。

3-5 配湯管の清掃状況

配湯管本管および施設内の配湯管の清掃状況を調べた。本管の清掃を行っている施設は 38%、施設内配湯管の清掃を行っている施設は 48%にとどまっていた。配湯管本管、施設内配湯管の清掃の有無で浴槽水のレジオネラの検出率はあまり変わらなかった。浴槽水の一般細菌の検出率についてはかえって配湯管の清掃を行っている方が高かった（図 8）が、その理由は不明である。掛け流し温泉ではあるが、何らかの設備のために循環配管を有している施設が 2 つあったが、そのうちの 1 施設では、施設内配管の清掃を行っておらず、浴槽水で 10CFU/mL のレジオネラが検出された。

3-6 貯湯槽の有無と湯口水および浴槽水の

微生物汚染との関係

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（図 9）。

貯湯槽の清掃については定期的に行っているところが 19 施設、不定期に行っているところが 6 施設だった（表 17）。

26 の貯湯槽の材質は FRP が 15、コンクリートとステンレスが各 4、鉄、合成樹脂、不明が各 1 であった。FRP、コンクリート製の貯湯槽の湯口水に微生物汚染が少ない傾向が見られたが、全体のサンプル数が少ないのではっきりしなかった（表 18）。また、外気と遮断されているものが 20、外気との遮断がないものが 5、不明が 1 であった（表 19）。

貯湯槽の設定温度については、源泉そのままが 13、加温しているものが 8、加水しているものが 5 であった（表 20）。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℃と低いグループのみだった。

D. 結論

日本全国から得られた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 *Legionella 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。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 400 mg/L 未満、電気伝導率 225mS/m 未満、全硬度 650 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、炭酸イオン 1 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

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。

レジオネラの陽性率が有意に低くなる温泉成分の濃度がいくつか明らかになったが、それらはレジオネラに直接働きかけるのではなく、一般細菌叢に影響を与え、その結果レジオネラの陽性率が低下すると考えられた。

したがって、温泉成分の特性に留意しながら、適切な衛生管理を行い、一般細菌数を抑えることが、レジオネラ汚染防止のために重要である。

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) 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. 感染症学雑誌、印刷中.

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. 総説

1) 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.

2) 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.

F. 知的所有権の取得状況

なし。

表1 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)	

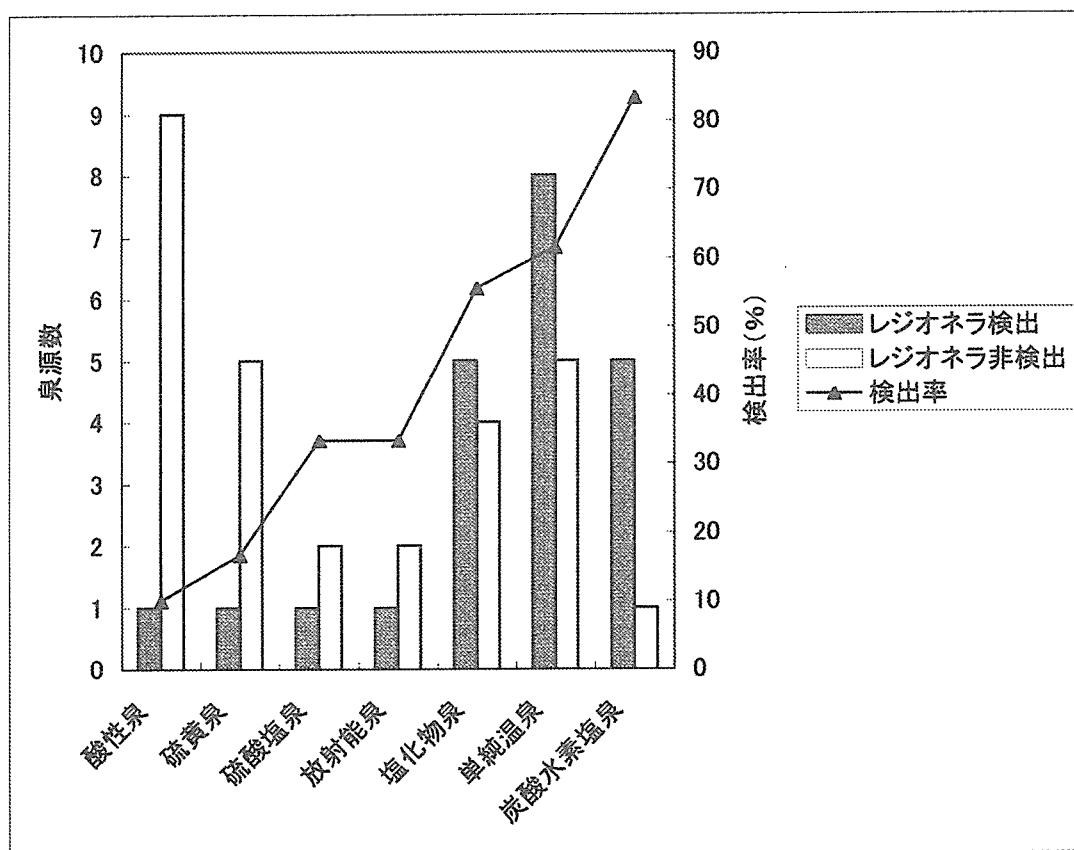


図1 泉質別レジオネラ検出状況

表 2 検出されたレジオネラ属菌の種類、血清群

	検出数								
	<i>L. pneumophila</i>	1	3	4	5	6	9	UT	<i>L. spp.</i>
酸性泉									1 (<i>L. sainthensi</i>)
硫黄泉					1				
硫酸塩泉								1	
放射能泉				1					
塩化物泉		1	1	1	2		1	3	(<i>L. maceachernii</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. birminghamensis</i>)
単純温泉	4	1	2	2	3			3	
炭酸水素塩泉	2	2					1	2	
計	7	3	3	4	6	1	7	4	合計 35 (重複含む)

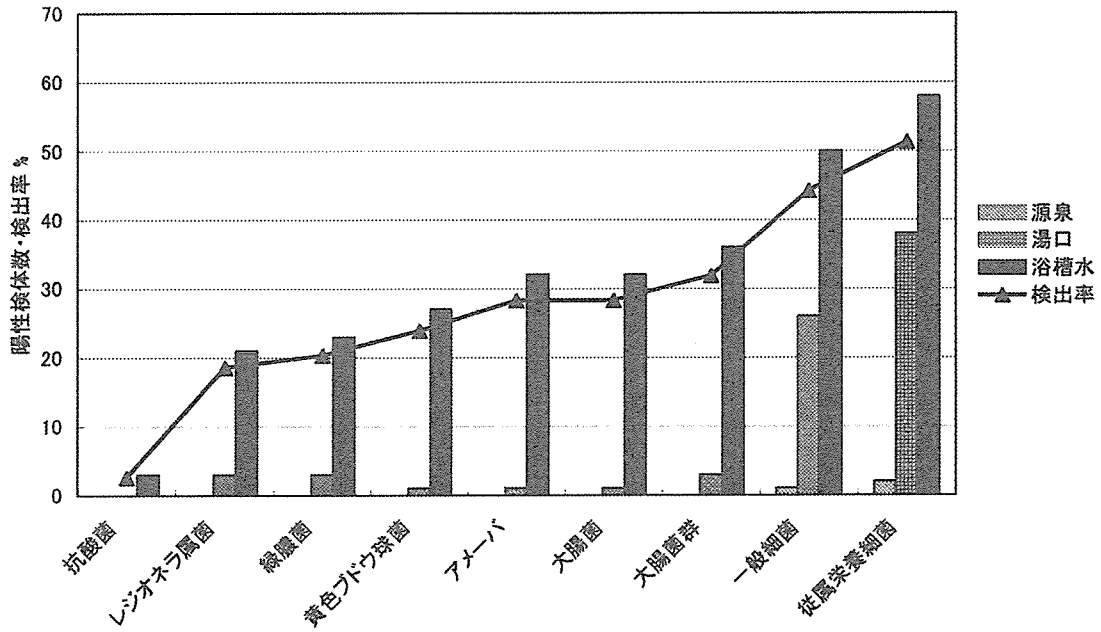


図 2 検体からの微生物検出状況

表3 微生物の検出数

それぞれの対象検体における検出平均数を示した（かっこ内は標準偏差）。

[検査数]	レジオネラ属菌*	アメーバ	一般細菌	従属栄養細菌
	CFU/100mL	PFU/100mL	log CFU/mL	log CFU/mL
浴槽水[63]	33 (101)	75 (292)	4.1 (4.7)	5.3 (5.7)
貯湯槽あり[34]	54 (134)	119 (387)	4.3 (4.8)	5.4 (5.7)
貯湯槽なし[29]	9 (20)	23 (82)	3.4 (3.8)	5.2 (5.8)
湯口水[48]	26 (96)	7 (43)	2.1 (2.7)	4.7 (5.3)
貯湯槽あり[24]	52 (133)	1 (7)	2.4 (2.9)	4.7 (5.4)
貯湯槽なし[24]	0 (0)	13 (61)	1.4 (2.0)	4.7 (5.3)
源泉[2]	0 (0)	0 (0)	0.0 (0.2)	0.7 (0.0)
計[113]	29 (98)	45 (221)	3.8 (4.5)	5.1 (5.6)

(表3 続き)

	黄色ブドウ球菌	大腸菌	大腸菌群	抗酸菌	緑膿菌
	MPN/100mL	MPN/100mL	MPN/100mL	CFU /100mL	MPN/100mL
浴槽水	76 (217)	89 (236)	157 (391)	0.0 (0.2)	132 (399)
貯湯槽あり	92 (219)	121 (273)	237 (491)	0.1 (0.3)	199 (503)
貯湯槽なし	58 (218)	52 (180)	63 (192)	0.0 (0.0)	52 (208)
湯口水	0 (0)	0 (1)	4 (19)	0.0 (0.0)	2 (9)
貯湯槽あり	0 (0)	0 (2)	8 (26)	0.0 (0.0)	4 (12)
貯湯槽なし	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0.0 (0.0)	0 (0)
源泉	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.0 (0.0)	0 (0)
計	42 (166)	50 (181)	89 (301)	0.0 (0.0)	74 (304)

*浴槽水（貯湯槽あり）1検体のみ算出できず。

表4 レジオネラ汚染と他の微生物量との関係（単変量解析、112 試料）

	p 値	オッズ比	95%信頼区間
一般細菌 30CFU/mL 以上	<0.001**	17.98	5.00 - 64.67
従属栄養細菌 200CFU/mL 以上	0.0002**	16.78	3.74 - 75.23
アメーバ 20PFU/100mL 以上	0.0013**	10.16	2.48 - 41.66
黄色ブドウ球菌 3MPN/100mL 以上	0.0253**	5.56	1.24 - 24.96
大腸菌群 3MPN/100mL 以上	0.0042**	3.63	1.50 - 8.79
大腸菌 3MPN/100mL 以上	0.0189*	2.93	1.19 - 7.21
緑膿菌 3MPN/100mL 以上	0.0722	2.39	0.92 - 6.16

*:p<0.05 **:p<0.01（カイ二乗検定）

表5 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)

表6 レジオネラ汚染と他の微生物数 (対数) との関係
(多重ロジスティック回帰、112 試料)

	平均値 (X)	推定値 (β)	標準 誤差	カイ 2 乗	p 値	調整した単位 オッズ比	95%信頼区間
切片		-3.455	0.694	24.8	<.0001**		
一般細菌 log CFU/mL	1.560	0.790	0.229	11.91	0.0006**	2.20	1.41 -3.45
従属栄養細菌 log CFU/mL	0.294	0.175	0.369	0.22	0.2548	1.26	0.85 -1.86
アメーバ log PFU/100mL	2.729	0.228	0.200	1.3	0.6365	1.19	0.58 -2.46

**p<0.01 (カイ二乗検定)

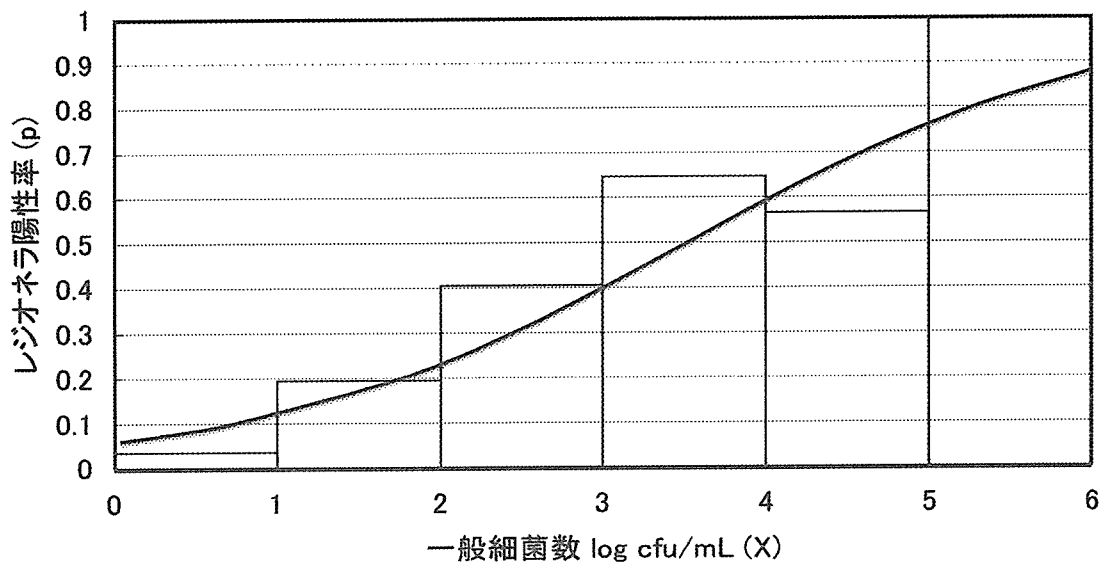


図3 一般細菌数から予測されるレジオネラ陽性率

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。

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

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。

表7 泉質検査結果

全体の平均値およびレジオネラ陽性、陰性各検体の平均を示した。陽性および陰性検体の平均値についてt検定を行った。

項目	pH (25°C)	酸消費量 (PH4.8) (44)	マンガン	入浴前 TOC	入浴後 TOC
平均	6.4	514	0.97	1.1	2.9
標準偏差	2.4	902	1.73	1.9	11.1
陽性平均	7.5	983 (14)	0.41	1.7	5.6
標準偏差	1.7	1085	0.48	2.5	18.4
陰性平均	5.7	303 (29)	1.32	0.8	1.4
標準偏差	2.6	734	2.10	1.4	1.6
p 値 (両側 t 検定)	0.011*	0.014*	0.076	0.104	0.218

項目	マグネシウム硬度	電気伝導率 (mS/m)	鉄	塩化物イオン	硫酸イオン
平均	182	464	4.40	1150	374
標準偏差	275	806	20.05	3017	537
陽性平均	256	653	8.6	1756	482
標準偏差	379	1119	32.8	4076	782
陰性平均	144	368	2.13	834	321
標準偏差	191	562	5.48	2256	333
p 値 (両側 t 検定)	0.177	0.241	0.288	0.312	0.320

項目	全硬度	硝酸イオン	亜鉛	入浴前アンモニウムイオン	入浴後アンモニウムイオン
平均	466	15.3	0.05	1.9	1.9
標準偏差	598	88.9	0.21	6.5	6.1
陽性平均	579	0.7	0.02	2.7	2.7
標準偏差	604	1.6	0.08	8.7	8.2
陰性平均	415	24.3	0.07	1.6	1.5
標準偏差	601	112.7	0.26	5.1	4.7
p 値 (両側 t 検定)	0.361	0.382	0.396	0.566	0.515

表7 続き

項目	シリカ	亜硝酸イオン	カルシウム硬度	泉温(°C)(49)	溶存酸素(35)
平均	96	0.04	285	51.9	3.1
標準偏差	58	0.09	450	11.7	2.2
陽性平均	102	0.03	324	48.4 (18)	3.8 (9)
標準偏差	61	0.06	403	8.5	2.0
陰性平均	91	0.04	271	54.2 (30)	2.8 (26)
標準偏差	57	0.11	485	13.1	2.3
p 値 (両側 t 検定)	0.542	0.637	0.696	0.101	0.243

項目	遊離二酸化炭素(32)	配湯量湧出量(リットル/分)(46)	湯温(°C)現地調査(48)	入浴者数(人)(49)	浴槽容積(m ³)(45)
平均	103.6	224	41.6	89	14.3
標準偏差	192.2	291	2.8	88	44.5
陽性平均	92.0 (7)	157 (18)	41.5 (18)	53.2 (18)	6.5 (15)
標準偏差	131.2	131	1.4	42.7	4.3
陰性平均	106.8 (25)	276 (27)	41.7 (30)	111 (30)	18.7 (29)
標準偏差	208.2	358	3.5	102	55.2
p 値 (両側 t 検定)	0.860	0.184	0.777	0.029*	0.200

項目	注湯口からの給水量(リットル/分)(34)	換水率(1時間当たりに浴槽水が入れ換わる回数)
平均	80.2	0.63
標準偏差	140.1	1.09
陽性平均	61.7 (12)	0.34 (10)
標準偏差	91.3	0.19
陰性平均	93.8 (21)	0.78 (21)
標準偏差	164.9	1.33
p 値 (両側 t 検定)	0.541	0.306

*: $p < 0.05$

項目欄のこの中の数字は調査泉源数。数字のないものは調査数 50。
 調査数 50 の項目については、レジオネラ陽性検体数は 18、陰性検体数は 31。
 それ以外のものについては実際の検体数を平均値の後ろにかっこで示した。
 単位については表示のないものはすべて mg/L。

表8 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9 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）
項目うしろのかっこ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10 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)