

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理総合研究事業)
分担研究報告書

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究

温泉施設浴槽の真菌汚染

協力研究者 高鳥浩介 帯広畜産大学

レジオネラの公衆浴場での汚染は、他の有害微生物の温床にもなる恐れがある。バイオフィーム形成微生物による公衆浴場での微生物被害はレジオネラ同様に大きな問題であり、研究の範囲を拡大してレジオネラ生息環境に分布する真菌の消毒方法まで拡大して研究を進めることを目的として以下の調査を行ってきた。

バイオフィーム形成真菌と黒色真菌の温泉での実態がほとんどされていないことから公衆浴場を温泉として調査研究した。調査地域は北海道から九州まで35温泉85か所について精力的に調査した。調査は、浴槽の排水溝、浴槽床面、浴槽壁面などで変色している部分から綿棒85件、また循環温泉水23件は採水瓶等を用いてサンプリングした。今回は、綿棒の結果のみについて報告すると、85件中真菌陽性54件であった。検出真菌は、*Exophiala*, *Phoma*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Scolecobasidium*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Trichosporon*, など比較的暗色系真菌が多く検出され、今後レジオネラ生息環境での真菌の実態とあわせて健康被害との関連性を追求していきたい。

緒 言

レジオネラの公衆浴場での汚染による健康被害が知られている。一方では、他の有害微生物の温床にもなる恐れがあることをこの研究で解明することを目的として本研究を実施してきた。すなわちバイオフィーム形成微生物による公衆浴場での微生物被害はレジオネラ同様に大きな問題であり、研究の範囲を拡大してレジオネラ生息環境に分布する真菌の消毒方法まで拡大して研究を進める必要がある。

しかしながら、バイオフィーム形成真菌と黒色真菌の温泉での実態がほとんどされていない。そこで、本研究は最初に

公衆浴場として温泉に焦点を合わせて調査研究することとした。調査地域は各地の大学や自治体職員に協力依頼して北海道から九州まで35温泉85か所について調査した。

方 法

調査地域

平成20年度に実施した調査地域は以下のとおりであった。

北海道 洞爺 十勝 室蘭 小樽

東 北 仙台 鳴子

北陸 越後湯沢 能生 村上
富山

関東 那須塩原 箱根 多摩 伊豆

館山 草津 鴨川 伊東 熱海
厚木
東海 浜松
関西 大阪 橿原
中国 出雲 松江 岡山
九州 宮崎 熊本 長崎

調 査

浴槽の排水溝、浴槽床面、浴槽壁面など変色している部分から綿棒、また循環温泉水は採水瓶（ふきふきチェック：栄研器材株）等を用いてサンプリングした。一温泉あたりおよそ2～4カ所とし、主に浴槽内や浴槽上面などとした。

方 法

綿棒：ポテト・デキストロース寒天培地に直接とまつした。

温泉水：100mlを濾過してポテト・デキストロース寒天培地に直接フィルター貼付培養した。

評 価

綿棒から分離した真菌は定性培養による結果からであり、綿棒とまつによる発育程度を以下のように評価した。

- 極めて多い：培地一面に発育する
 多い：培地に十前後のコロニーが発育する
 やや多い：培地に少数コロニー発育する

結果及び考察

温泉浴槽環境からの真菌検出：

本年度に実施した温泉浴槽環境からの綿棒採取による検出真菌は定性試験の結果、85件中何らかの形で真菌陽性を示した件数は54件(63.5%)であった(表1)。

この中で、真菌陽性程度をみると、極めて多い検出件数は、14件であった。すな

わち、一見汚れていなく見える個所での陽性が全体の16.5%であり、陽性群の中の比率は25.9%であった。この数値が多いかどうかは今後の調査を進めることによって解明されるが、いずれにしてもレジオネラ生息環境での真菌の実態がこのように見られたことは、温泉浴槽環境での真菌がどのように生体に影響を及ぼすか今後この研究組織をすすめていくうえで重要な一課題であるといえる。

表1 温泉環境の真菌(綿棒採取試料)

調査対象温泉	85件
真菌陽性	54件 (63.5%)
陰性	31件 (36.5%)
真菌陽性頻度	
極めて多い	14件(16.5%)
多い	28件(33.0%)
やや多い	12件(14.0%)

2. 浴槽環境からの真菌

浴槽環境からの検出真菌は、以下のとおりであった。

Exophiala, *Wangiella*, *Phoma*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Scolecobasidium*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Trichosporon*, など比較的暗色系真菌が多く検出された。この中で湿性環境に多い真菌と知られる *Exophiala*, *Wangiella*, *Aureobasidium*, *Phoma*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* は、その分離程度や分離個所など詳細な調査を進めていく必要がある。

今回の調査を通して検出真菌の中で、とりわけ健康被害とのかかわりで注目される黒色系真菌が多くの浴槽から検出されており、今後の課題として、①真菌検

究を進めることを目的として以下の調査を行った。

バイオフィーム形成真菌と黒色真菌の温泉での実態がほとんどされていないことから公衆浴場を温泉として調査研究した。調査地域は北海道から九州まで35温泉85か所について調査した。調査は、浴槽の排水溝、浴槽床面、浴槽壁面などで変色している部分から綿棒85件、また循環温泉水23件は採水瓶等を用いてサンプリングし、今回は、綿棒の結果のみについて報告する。85件中真菌陽性54件であった。検出真菌は、*Exophiala*, *Phoma*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Scolecobasidium*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Trichosporon*, など比較的暗色系真菌が多

く検出され、今後レジオネラ生息環境での真菌の実態とあわせて健康被害との関連性を追求していく必要がある。

研究協力

この調査研究は、以下の協力により実施した。

相模女子大学 太田利子、新潟女子短期大学 村松芳多子、(財)食品薬品安全センター 高橋淳子、大阪府立公衆衛生研究所 久米田裕子、NPO 法人カビ相談センター 小菅旬子

研究発表

なし

III. 別刷

掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子

¹⁾ 愛媛県立衛生環境研究所, ²⁾ 神奈川県衛生研究所, ³⁾ 山形県衛生研究所, ⁴⁾ 山形県村山保健所 (元),
⁵⁾ 宮城県保健環境研究所, ⁶⁾ 秋田県衛生科学研究所, ⁷⁾ 群馬県衛生環境研究所, ⁸⁾ 静岡県環境衛生科学研究所,
⁹⁾ 岡山県環境保健センター, ¹⁰⁾ 福岡県保健環境研究所, ¹¹⁾ 長崎県環境保健研究センター,
¹²⁾ 鹿児島県環境保健センター (現 鹿児島県伊集院保健所), ¹³⁾ 国立感染症研究所細菌第一部,
¹⁴⁾ 同 寄生動物部, ¹⁵⁾ 同 バイオセーフティ管理室, ¹⁶⁾ アクアス(株)つくば総合研究所

烏谷 竜哉¹⁾ 黒木 俊郎²⁾ 大谷 勝実³⁾ 山口 誠一⁴⁾
 佐々木美江⁵⁾ 齊藤志保子⁶⁾ 藤田 雅弘⁷⁾ 杉山 寛治⁸⁾
 中嶋 洋⁹⁾ 村上 光一¹⁰⁾ 田栗 利紹¹¹⁾ 藏元 強¹²⁾
 倉 文明¹³⁾ 八木田健司¹⁴⁾ 泉山 信司¹⁴⁾ 前川 純子¹³⁾
 山崎 利雄¹⁵⁾ 縣 邦雄¹⁶⁾ 井上 博雄¹⁾

(平成 20 年 9 月 11 日受付)

(平成 20 年 11 月 5 日受理)

Key words: *Legionella*, epidemiology

要 旨

2005 年 6 月～2006 年 12 月の期間, 全国の循環系を持たない掛け流し式温泉 182 施設を対象に, レジオネラ属菌等の病原微生物汚染調査を行い, 29.5% (119/403) の試料からレジオネラ属菌を検出した. 採取地点別の検出率は浴槽が 39.4% と最も高く, 貯湯槽 23.8%, 湯口 22.3%, 源泉 8.3% と続いた. 陽性試料の平均菌数 (幾何平均値) は 66CFU/100mL で, 採取地点による有意差は認められなかったが, 菌数の最高値は源泉, 貯湯槽, 湯口でそれぞれ 180, 670, 4,000CFU/100mL と増加し, 浴槽では 6,800CFU/100mL に達した. 陽性試料の 84.7% から *Legionella pneumophila* が分離され, 血清群 (SG) 別では SG 1, 5, 6 がそれぞれ 22, 21, 22% と同程度の検出率であった. レジオネラ属菌の汚染に関与する構造設備及び保守管理の特徴を明らかにするため, 浴槽と湯口上流側とに分けて, 多重ロジスティック回帰分析を行った. 浴槽での汚染リスクは, 湯口水がレジオネラに汚染されている場合 (OR=6.98, 95%CI=2.14～22.8) 及び浴槽容量が 5m³ 以上の場合 (OR=2.74, 95%CI=1.28～5.89) に高く, pH 6.0 未満 (OR=0.12, 95%CI=0.02～0.63) では低下した. 同様に, 湯口上流では pH 6.0 未満 (OR=0.06, 95%CI=0.01～0.48) 及び 55℃ 以上 (OR=0.10, 95%CI=0.01～0.77) でレジオネラ汚染を抑制した. レジオネラ属菌以外の病原微生物として抗酸菌, 大腸菌, 緑膿菌及び黄色ブドウ球菌を検査し, 汚染の実態を明らかにした.

[感染症誌 83 : 36～44, 2009]

序 文

わが国では, 温泉は古くから休養・保養・療養の場として利用され, 独自の温泉文化が育まれてきた. 近年, 温泉の掘削技術の進歩に伴い温泉を利用した入浴施設が急増したが, その多くは浴槽水をろ過して再利用する「循環式浴槽」を採用し, 衛生管理が不十分な施設でレジオネラ症の集団感染事故を招く結果となっ

た^{1)～3)}.

レジオネラ属菌は, 水中の有機物を利用して接水面に形成されるバイオフィーム (生物膜) 内で, アメーバ等の原生動物に寄生して増殖する⁴⁾. 循環式浴槽において, 入浴者由来の有機物を豊富に含んだ温水が常時流れるろ過器や循環配管内壁は, レジオネラ属菌の増殖に好適な条件が整っており⁵⁾, 汚染防止のためには次亜塩素酸ナトリウム等の消毒剤を適正濃度で維持することが必須となる⁶⁾. 一方, 循環系を持たない「掛け流し式温泉」では, 入浴者が持ち込む有機物が浴槽に限られるため, 源泉から湯口までの配管系にかかる

別刷請求先: (〒790-0003) 愛媛県松山市三番町 8 丁目 234 番地
 愛媛県立衛生環境研究所衛生研究課微生物試験室細菌科 烏谷 竜哉

汚染負荷は、循環式浴槽に比べて小さいものと考えられる。しかし、掛け流し式温泉を対象とした過去の調査で10~27%程度のレジオネラ属菌検出率が報告されているが^{27,6)}、調査規模が限られているうえ、いずれも浴槽での汚染状況を一面的に把握したに過ぎず、上流側にあたる源泉、貯湯槽、湯口等を含めた施設全体の汚染状況を調査した報告は見当たらない。また、入浴施設のレジオネラ対策を検討する上では、汚染の実態を明らかにするだけでなく、施設構造及び管理方法を併せて調査し、レジオネラ汚染を引き起こす要因を明らかにすることが重要である。

そこで、掛け流し式温泉の運用形態に即した衛生管理手法を確立するため、全国13府県の掛け流し式温泉を対象に泉質、構造設備、衛生管理方法等を含む実態調査を行い、レジオネラ汚染に影響を及ぼすリスク要因を解析した。

対象と方法

1. 検査対象

浴槽内に循環配管あるいは連通管等の配管を一切持たず、かつ、温泉法に基づく「温泉」を利用する施設を「掛け流し式温泉」とみなし、調査対象とした。

2005年6月~2006年12月にかけて、全国13府県の掛け流し式温泉182施設について構造設備及び衛生管理状況を調査するとともに、403件の温泉水を採取し微生物汚染状況を調査した。検査項目は、温度、pH、遊離残留塩素、レジオネラ属菌、抗酸菌、アメーバ、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌を実施した。

2. 検査方法

試料温度、pH、遊離残留塩素濃度は採水時に測定した。試料採取後、アメーバ分離用検体は室温で、他の微生物的検査用の検体は速やかに保冷して各研究機関に搬入し、48時間以内に検査を開始した。

レジオネラ属菌の同定及び菌数測定は新版レジオネラ症防止指針⁹⁾に準拠した。即ち、冷却遠心濃縮法の場合は試料200mLを6,000g、10分間で、ろ過濃縮法の場合は試料500mLを孔径0.45 μ mのポリカーボネートフィルター（ミリポア）でそれぞれ100倍に濃縮後、50 $^{\circ}$ C、20分の熱処理を行い、その0.1mLをGVPC寒天培地（日本ビオメリュー）上に塗布し、36 \pm 1 $^{\circ}$ Cで10日間培養した。レジオネラ属菌様の集落を血液寒天培地とBCYE α 寒天培地で確認培養後、スライド凝集反応（デンカ生研）、ラテックス凝集反応（OXOID）、DNA-DNAハイブリダイゼーション（極東製薬）、*mip* 遺伝子の増幅及び16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定により、菌種及び血清群の同定を行った（検出限界10CFU/100mL）。抗酸菌検査は、100倍濃縮試料に等量の4%NaOHを加えて室温20分間処理後、0.1mLを2%小川培地（極東製薬）に塗布し36 \pm

1 $^{\circ}$ Cで8週間培養した。分離菌を純化後、国立感染症研究所にて生化学的性状、DDH、塩基配列決定などにより菌種の同定を行った。大腸菌はコリラートMPN（アスカ純薬）を使用し、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌は食品衛生検査指針に基づきMPN値を求めた。アメーバ検査は遠藤ら¹⁰⁾の「アメーバ分離・検出マニュアル」に準じた。

3. 統計解析

統計パッケージはR version 2.6.2 (R Development Core Team)¹¹⁾を使用した。多群間の比率の差はTukeyの多重比較を用い、多群間の平均値の比較はパラメトリック法としてTukeyの多重比較を、また、等分散の仮定が棄却された場合にはTurkeyの多重比較に替えてノンパラメトリック法のSteel-Dwassの多重比較を用い、いずれも有意水準は危険率5%未満とした。レジオネラ属菌汚染に関与するリスク因子を評価するため、レジオネラ属菌検出の有無を目的変数とし、各説明変数のオッズ比（OR）及び95%信頼区間（CI）を算出した。多重ロジスティック回帰モデルの構築には、step関数を用いた変数減少法及び変数増減法を実施し、AIC（Akaike's Information Criterion）を指標に変数選択を行った。

成績

1. 施設及び管理状況

調査施設の設備及び管理状況をTable 1にまとめた。pH 3.0未満の酸性泉が20.3%と多く、温泉を消毒している施設は22.5%であった。貯湯槽を持つ施設は58.4%で、そのうち温度を60 $^{\circ}$ C以上に維持している施設は37.0%、年1回以上清掃している施設は57.6%であった。また、配管系の定期清掃を行っている施設は34.5%にとどまった。浴槽については、約半数の施設が容量5m³以上の大浴槽を持ち、毎日完全換水及び清掃を実施している施設は74.4%であった。

2. 採取地点別検出率

403件中119件（29.5%）からレジオネラ属菌が検出された（Table 2）。採取地点別の検出率は浴槽が39.4%と最も高く、湯口22.3%、貯湯槽23.8%、源泉8.3%で、源泉から浴槽に至る経路に沿って検出率は増加した。レジオネラ属菌陽性119件の平均菌数（幾何平均値）は66CFU/100mLで、地点別の菌数に有意差は認められなかったが、菌数の最高値は源泉、貯湯槽、湯口でそれぞれ180、670、4,000CFU/100mLと増加し、浴槽では6,800CFU/100mLに達した。アメーバもレジオネラ属菌と同様の分布を示し、浴槽30.3%、貯湯槽19.0%の検出率であった。抗酸菌は380件中7件（1.8%）から検出され、すべて浴槽であった。同定された菌種は*Mycobacterium avium*、*M. scrofulaceum*が各2件、*M. szulga*、*M. triplex*が各1件で

Table 1 Facilities and sanitary management at 182 hot springs

Facilities	Number (%)
Source of hot spring	
Temperature	
- $\geq 60^{\circ}\text{C}$	55 (30.2)
- $50-59^{\circ}\text{C}$	67 (36.8)
- $< 50^{\circ}\text{C}$	60 (33.0)
pH	
- ≥ 8.5	31 (17.0)
- $7.5-8.4$	74 (40.7)
- $6.0-7.4$	35 (19.2)
- $3.0-5.9$	5 (2.7)
- < 3.0	37 (20.3)
Quality	
- Chloride and/or bicarbonated spring	60 (33.0)
- Simple hot spring	49 (26.9)
- Sulfate spring	34 (18.7)
- Sulfur spring	39 (21.4)
Disinfection	
- Present	41 (22.5)
- Absent	141 (77.5)
Storage tank	
- Present	104 (58.4)
- Absent	74 (41.6)
Temperature	
- $\geq 60^{\circ}\text{C}$	34 (37.0)
- $50-59^{\circ}\text{C}$	25 (27.2)
- $< 50^{\circ}\text{C}$	33 (35.9)
Material	
- FRP	56 (57.1)
- Concrete	27 (27.6)
- Wood	7 (7.1)
- Other	8 (8.2)
Cleaning frequency	
- Every month or more	20 (20.2)
- Every 2 to 6 months	23 (23.2)
- Every year	14 (14.1)
- As necessary	15 (15.2)
- None	27 (27.3)
Distribution pipe	
Regular cleaning	
- Present	59 (34.5)
- Absent	112 (65.5)
Bathtub	
Volume of bath	
- $< 5.0\text{m}^3$	82 (51.9)
- $5.0-9.9\text{m}^3$	34 (21.5)
- $\geq 10.0\text{m}^3$	42 (26.6)
Main material	
- Tile	77 (41.0)
- Stone	83 (44.1)
- Wood	15 (8.0)
- Concrete	13 (6.9)
Drain and cleaning frequency	
- Daily	134 (74.4)
- Every 2 days	22 (12.2)
- Every 3 to 6 days	12 (6.7)
- Every week or less	12 (6.7)
Cleaning procedure	
- Brush	64 (38.6)
- Brush + detergent	52 (31.3)
- Brush + disinfection (+ detergent)	31 (18.7)
- Non brush (HPW and/or disinfection)	19 (11.4)

*HPW: High-Pressure Water Jet

あった。大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌はいずれも浴槽から高頻度に検出され、浴槽での検出率はそれぞれ40.4%、30.8%、30.8%であった。

3. レジオネラ属菌汚染の特徴

Table 3に温度及びpH別の検出率を、浴槽と上流側（湯口、貯湯槽及び源泉）とに分けて示した。レジオネラ属菌は 50°C 以上で検出率が低下し、 55°C 以上では26件中1件（ 56.3°C の湯口）のみの検出であったが、アメーバは 50°C 以上の試料ではすべて陰性であった。また、レジオネラ属菌はpH 6.0未満で検出率が低下し、pH 3.0未満では検出されなかったが、アメーバはpH 6.0未満の試料ではすべて陰性であった。

4. 分離されたレジオネラ属菌の種及び血清群

分離されたレジオネラ属菌は6種で、119件中102件（85.7%）の試料から*Legionella pneumophila*が分離された（Table 4）。*L. pneumophila*の血清群（SG）別内訳は、SG 1, 5, 6がそれぞれ21.8%、21.0%、21.8%と同程度の分離率を示し、SG 3, 4がそれぞれ17.6%、14.3%と続いた。レジオネラ属菌が分離された試料を、*L. pneumophila* SG 1, SG1以外の*L. pneumophila*, *L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌の3群に分けて陽性試料のpH及び温度の平均値を比較した。その結果、*L. pneumophila* SG 1（ $\text{pH } 7.6 \pm 0.9$ ）は、SG1以外の*L. pneumophila*（ $\text{pH } 8.0 \pm 0.7$ ）と比較してpHが有意に低く（Steel-Dwass多重比較, $p < 0.05$ ）、温度では*L. pneumophila* SG 1（ $44.3 \pm 4.4^{\circ}\text{C}$ ）は、SG1以外の*L. pneumophila*（ $42.3 \pm 3.2^{\circ}\text{C}$ ）と比較して有意に高い（Tukey多重比較, $p < 0.05$ ）結果が得られた。

5. レジオネラ属菌汚染のリスク因子

レジオネラ属菌の汚染に関与する構造設備及び保守管理の特徴を明らかにするため、浴槽とそれより上流側とに分けて、多重ロジスティック回帰分析を行った。浴槽においては、湯口からの流入水がレジオネラ属菌に汚染されている場合（ $\text{OR} = 6.98$, $95\% \text{CI} = 2.14 \sim 22.8$ ）及び浴槽容量が 5m^3 以上（ $\text{OR} = 2.74$, $95\% \text{CI} = 1.28 \sim 5.89$ ）でリスクが高く、pH 6.0未満（ $\text{OR} = 0.12$, $95\% \text{CI} = 0.02 \sim 0.63$ ）でリスクが低下した（Table 5）。なお、泉質並びに浴槽の洗浄方法、材質及び換水洗浄頻度についても評価を行い、単変量解析では塩化物/炭酸水素塩泉、ブラシを使わない浴槽洗浄、石の浴槽で検出率が高くなる傾向がみられたが、多重ロジスティック回帰分析で有意な関係は認められなかった。

一方、上流側においてはpH 6.0未満（ $\text{OR} = 0.06$, $95\% \text{CI} = 0.01 \sim 0.48$ ）及び温度 55°C 以上（ $\text{OR} = 0.10$, $95\% \text{CI} = 0.01 \sim 0.77$ ）で有意にリスクが低下し、貯湯槽の存在でリスクが増加する傾向がみられた（Table 6）。なお、泉質、遊離残留塩素濃度及び貯湯槽・配管の洗浄頻度についても評価を行い、単変量解析では硫

Table 2 Microbial contamination of hot spring samples (n = 403)

Organism	Parameter	Bathtub	Inlet faucet Pouring gate	Storage tank	Source	Total
<i>Legionella</i> spp.	No. of positive samples/total (%)	78/198 (39.4)	33/148 (22.3)	5/21 (23.8)	3/36 (8.3)	119/403 (29.5)
	with $\geq 10^2$ CFU/100mL	29/198 (14.6)	9/148 (6.1)	2/21 (9.5)	1/36 (2.8)	41/403 (10.2)
	Geometric mean (CFU/100mL)	8.1×10	4.1×10	8.0×10	4.8×10	6.6×10
	Maximum count (CFU/100mL)	6.8×10^3	4.0×10^3	6.7×10^2	1.8×10^2	6.8×10^3
Amoebae	No. of positive samples/total (%)	57/188 (30.3)	6/137 (4.4)	4/21 (19.0)	1/33 (3.0)	68/379 (17.9)
	Geometric mean (PFU/100mL)	3.5×10	2.0×10	1.2×10	5	3.2×10
	Maximum count (PFU/100mL)	2.5×10^3	1.0×10^2	5.0×10	5	2.5×10^3
<i>Mycobacterium</i> spp.	No. of positive samples/total (%)	7/189 (3.7)	0/136 (0.0)	0/21 (0.0)	0/34 (0.0)	7/380 (1.8)
	Geometric mean (CFU/100mL)	2.1×10				2.1×10
	Maximum count (CFU/100mL)	1.0×10^2				1.0×10^2
<i>Escherichia coli</i>	No. of positive samples/total (%)	80/198 (40.4)	6/124 (4.8)	1/17 (5.9)	0/30 (0.0)	87/369 (23.6)
	Geometric mean (MPN/100mL)	4.2×10	1.2×10	9		3.8×10
	Maximum count (MPN/100mL)	2.4×10^3	1.5×10^2	9		2.4×10^3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No. of positive samples/total (%)	60/195 (30.8)	5/121 (4.1)	1/17 (5.9)	1/29 (3.4)	67/362 (18.5)
	with ≥ 10 MPN/100mL	32/195 (16.4)	1/121 (0.8)	1/17 (5.9)	1/29 (3.4)	35/362 (9.7)
	Geometric mean (MPN/100mL)	2.8×10	7.4	1.4×10^3	2.4×10^2	2.8×10
	Maximum count (MPN/100mL)	2.4×10^3	1.5×10^2	1.4×10^3	2.4×10^2	2.4×10^3
<i>Staphylococcus aureus</i>	No. of positive samples/total (%)	60/195 (30.8)	3/121 (2.5)	0/17 (0.0)	0/29 (0.0)	63/362 (17.4)
	with $\geq 10^2$ MPN/100mL	13/195 (6.7)	0/121 (0.0)	0/17 (0.0)	0/29 (0.0)	13/362 (4.1)
	Geometric mean (MPN/100mL)	2.3×10	3.3			2.1×10
	Maximum count (MPN/100mL)	2.4×10^3	4			2.4×10^3

Table 3 Isolation of *Legionella* and Amoebae at different temperature and pH

Characteristic	No. of positive samples/total (%)*			
	Bathtub		Inlet faucet/pouring gate, Storage tank, Source	
	<i>Legionella</i> spp.	Amoebae	<i>Legionella</i> spp.	Amoebae
Temperature				
55°C \leq			1/26 (3.8)	0/24 (0.0)
50-54°C	0/4 (0.0)	0/4 (0.0)	4/31 (12.9)	0/28 (0.0)
45-49°C	4/11 (36.4)	5/11 (45.5)	10/39 (25.6)	0/39 (0.0)
< 45°C	74/183 (40.4)	52/173 (30.1)	26/109 (23.9)	11/100 (11.0)
pH				
8.5 \leq	15/30 (50.0) ^a	11/30 (36.7) ^a	10/35 (28.6) ^a	7/30 (23.3)
7.5-8.4	40/81 (49.4) ^a	31/74 (41.9) ^c	20/80 (25.0) ^a	2/74 (2.7)
6.0-7.4	21/44 (47.7) ^a	15/42 (35.7) ^c	10/37 (27.0) ^a	2/35 (5.7)
3.0-5.9	2/11 (18.2) ^a	0/11 (0.0) ^{d,f}	1/8 (12.5) ^a	0/8 (0.0)
< 3.0	0/32 (0.0) ^b	0/31 (0.0) ^{b,d}	0/45 (0.0) ^b	0/44 (0.0)

*Isolation differed significantly between a and b; c and d; e and f.
(Tukey multiple comparison test. p < 0.05).

黄泉、塩素濃度0.2mg/L以上で検出率が低下する傾向がみられたが、多重ロジスティック回帰分析で有意な関係は認められなかった。

考 察

一般に、掛け流し式温泉は循環式浴槽に比較してレジオネラ属菌汚染のリスクは小さいというイメージがあるが、これは過去の集団感染事例がレジオネラ属菌に高濃度に汚染された循環式浴槽によって引き起こされたことによる¹²⁾。温泉のレジオネラ汚染に関する全国調査では、笹原ら⁷⁾が循環式浴槽を中心とした調査で49.5%、古畑ら⁸⁾が循環式38.0%、掛け流し式27.3%の検出率を報告している。今回、掛け流し式温泉を対

象とした全国調査の結果、浴槽水の39.4% (78/198件) からレジオネラ属菌が検出され、掛け流し式浴槽においても循環式浴槽と同程度の頻度で検出されることを明らかにした。検出菌数は100CFU/100mL未満の試料が62.8% (49/78件) を占め (Table 2)、循環式浴槽 (35~48%)⁷⁾⁸⁾と比較すると低濃度側に分布していると考えられる。しかし、100 CFU/100mL未満であっても、糖尿病等の基礎疾患を持つ易感染者ではエアロゾルの多い環境で感染が成立するため¹³⁾、今後一層の衛生管理の充実が望まれる。今回の調査で、掛け流し式温泉での汚染場所が明らかとなったことは重要である。湯口からの源湯が汚染されていれば浴槽の

Table 4 *Legionella* species and serogroups isolated in hot spring water (n = 403)

Organism	No. of positive samples (%)				
	Total	pH		Temperature (°C)	
		< 7.5	7.5 ≤	< 45	45 ≤
<i>L. pneumophila</i>	102 (85.7)	27 (79.4)	75 (88.2)	84 (84.0)	18 (94.7)
serogroup 1	26 (21.8)	13 (38.2)	13 (15.3)	18 (18.0)	8 (42.1)
2	1 (0.8)		1 (1.2)	1 (1.0)	
3	21 (17.6)	5 (14.7)	16 (18.8)	17 (17.0)	4 (21.1)
4	17 (14.3)	3 (8.8)	14 (16.5)	12 (12.0)	5 (26.3)
5	25 (21.0)	4 (11.8)	21 (24.7)	22 (22.0)	3 (15.8)
6	26 (21.8)	5 (14.7)	21 (24.7)	22 (22.0)	4 (21.1)
7	4 (3.4)		4 (4.7)	3 (3.0)	1 (5.3)
8	6 (5.0)	3 (8.8)	3 (3.5)	5 (5.0)	1 (5.3)
9	5 (4.2)	3 (8.8)	2 (2.4)	5 (5.0)	
10	8 (6.7)	2 (5.9)	6 (7.1)	7 (7.0)	1 (5.3)
11	2 (1.7)	1 (2.9)	1 (1.2)	2 (2.0)	
13	1 (0.8)		1 (1.2)	1 (1.0)	
15	1 (0.8)		1 (1.2)	1 (1.0)	
UT	28 (23.5)	4 (11.8)	24 (28.2)	22 (22.0)	6 (31.6)
<i>L. dumoffii</i>	2 (1.7)	1 (2.9)	1 (1.2)	1 (1.0)	1 (5.3)
<i>L. londiniensis</i>	8 (6.7)	1 (2.9)	7 (8.2)	4 (4.0)	4 (21.1)
<i>L. micdadei</i>	1 (0.8)		1 (1.2)	1 (1.0)	
<i>L. oakridgensis</i>	5 (4.2)		5 (5.9)	5 (5.0)	
<i>L. rubrilucens</i>	2 (1.7)		2 (2.4)	2 (2.0)	
Other <i>Legionella</i> spp.	23 (19.3)	10 (29.4)	13 (15.3)	21 (21.0)	2 (10.5)
Total	119 (100)	34 (100)	85 (100)	100 (80)	19 (100)

汚染リスクは7倍に上昇することから (Table 5), 浴槽のみならず湯口あるいは上流側での定期検査を実施し, 汚染場所を特定した上で適切な対策を講じる必要があると考えられる。

レジオネラ属菌は pH 3.0以下の酸性泉や 65°C 以上の高温では棲息できないことが知られている⁴⁾。有機物汚染の激しい浴槽と汚濁負荷の小さい上流側とを区別してリスク評価を行った結果, 両者に共通のリスク要因は pH であった。今回の調査では pH 3.0~5.9の弱酸性泉が少なかったため pH 6.0を境界として評価したが, pH 6.0未満ではレジオネラ汚染リスクは 0.06~0.12 倍に低下した。Ohno ら¹⁴⁾は温泉中のレジオネラ属菌が pH 5.0の酸性条件で長時間増殖能を維持できることを実験的に示しているが, 今回 pH 6.0未満の温泉で検出率が低下した要因として, レジオネラの増殖装置の役割を果たすアメーバが pH 6.0未満で全く検出されなかったこと (Table 3) が考えられた。

湯口から上流側においては, pH に次いでレジオネラ汚染の重要なリスク因子は温度である。レジオネラ属菌の至適増殖温度は 32~42°C で, 48.4~50.0°C が上限とされる⁴⁾。今回の調査でレジオネラ属菌検出の上限は 56.3°C の湯口水で, 55°C 以上のオッズ比は 50°C 未満の 1/10 に低下した (Table 6)。調査した施設の 6 割は貯湯槽を保有しているが, 衛生管理要領等に定める 60°C 以上で管理している施設は 4 割に満た

ない (Table 1)。「温度」は構造が単純な掛け流し式温泉において施設側で制御し得る数少ない指標であり, 貯湯槽を加温するなど可能な限り高温で維持することが有効と考えられた。温度管理が困難な場合の改善策として塩素消毒が挙げられる。消毒を実施している施設数が少ないため有意な結果は得られなかったが, 0.2mg/L 以上で汚染リスクに低下傾向がみられた (Table 6)。貯湯槽や配湯管の清掃頻度とレジオネラ汚染との相関が得られなかったことから, pH 6.0以上の温泉では湯口より上流の温度を少なくとも 55°C 以上に維持するか, 遊離塩素濃度を 0.2mg/L 以上に保つことが必要であろう。

一方, 浴槽水のレジオネラ汚染に関しては, 湯口水の汚染が明らかでない場合でも, 39.5% (45/114) の浴槽水からレジオネラ属菌が検出されることは注目される (Table 5)。このうち, 湯口陰性が確認された浴槽 82 件中 37 件 (45.1%) からレジオネラ属菌が高率に検出されており, 湯口上流での検出率 (20.4%) と比較すると (Table 6), 掛け流し式温泉においては浴槽での汚染が極めて大きな割合を占めると考えられる。多重ロジスティック回帰分析で浴槽のリスク因子を評価した結果, 浴槽の容量が 5m³ 以上でレジオネラ汚染が有意に増加することが明らかとなった。単変量解析では浴槽の洗浄に高压洗浄などブラシを使わない場合にオッズ比が有意に高かったが, 多重ロジスティック回帰分析では除外された。その原因として,

Table 5 Risk factor analysis for *Legionella* contamination in bathtub water (uni- and multivariate logistic regression analysis)

Risk factors	<i>Legionella</i> spp. positive/total (%)	univariate model OR (95%CI)	multivariate model OR (95%CI)	p
Total	64/137 (46.7)			
<i>Legionella</i> contamination of inlet faucet/pouring gate water				
- <i>Legionella</i> -positive	19/23 (82.6)	7.28 (2.32–22.8) ^a	<u>6.98 (2.14–22.8)</u>	<u>0.001</u>
- Negative or not examined	45/114 (39.5)	1.00	1.00	
pH				
- ≥ 6.0	62/120 (51.7)	1.00	1.00	
- < 6.0	2/17 (11.8)	0.12 (0.03–0.57) ^b	<u>0.12 (0.02–0.63)</u>	<u>0.012</u>
Quality of hot spring				
- Chloride and/or bicarbonated spring	26/42 (61.9)	1.86 (0.79–4.37)		
- Simple hot spring	21/45 (46.7)	1.00		
- Sulfate spring	9/24 (37.5)	0.69 (0.25–1.89)		
- Sulfur spring	8/26 (30.8)	0.51 (0.18–1.41)		
Chlorine concentration				
- ≥ 0.2 mg/liter	2/8 (25.0)	0.36 (0.07–1.85)	0.28 (0.04–1.83)	0.185
- < 0.2 mg/liter	62/129 (48.1)	1.00	1.00	
Volume of bathtub				
- ≥ 5.0 m ³	38/65 (58.5)	2.49 (1.25–4.96) ^b	<u>2.74 (1.28–5.89)</u>	<u>0.023</u>
- < 5.0 m ³	26/72 (36.1)	1.00	1.00	
Cleaning procedure				
- Brush	10/38 (26.3)	1.00		
- Brush + detergent	27/51 (52.9)	3.15 (1.27–7.81) ^a		
- Brush + disinfection (+ detergent)	15/30 (50.0)	2.80 (1.01–7.74) ^a		
- Non brush (HPW and/or disinfection)	12/18 (66.7)	5.60 (1.66–18.9) ^b		
Main material				
- Stone	32/57 (56.1)	1.42 (0.68–2.94)		
- Tile	28/59 (47.5)	1.00		
- Concrete	2/10 (20.0)	0.28 (0.05–1.41)		
- Wood	2/11 (18.2)	0.25 (0.05–1.24)		
Drain and cleaning frequency				
- Daily	57/109 (52.3)	1.00		
- Every 2 days	3/12 (25.0)	0.30 (0.08–1.18)		
- Every 3 days or less	4/16 (25.0)	0.30 (0.09–1.00)		

^a p = 0.01 to 0.05.^b p = 0.006 to 0.009.^c p < 0.001.

浴槽容量が5m³未満ではブラシを使わない洗浄が9.7% (7/72)であるのに対し、5m³以上では16.9% (11/65)に増加し、両因子に交絡が生じた結果と考えられた。我々は、浴槽の洗浄効果判定にATPふき取り検査を適用し、材質が石の場合や、ブラシを使用しない高圧洗浄や消毒のみの場合にバイオフィルムの除去効果が低いことを明らかにしている¹⁵⁾。今回の結果は、浴槽容積すなわち表面積の増加が、ブラシ洗浄よりも作業の容易な高圧洗浄を選択する一つの要因となり、結果的に浴槽壁にバイオフィルムが残存する可能性を示唆している。物理的洗浄後の高濃度塩素消毒といった管理方法の徹底のみならず、浴槽容量の適正化や材質の選定など洗浄効率を考慮した施設設計を行う意識改革も必要と考える。なお、浴槽の材質や泉質の影響についてはサンプル数が少なく、今回の解析で有意な相関は認められなかった。

環境水から検出されるレジオネラ属菌は、冷却塔水

では *L. pneumophila* SG 1 が、温泉や循環式浴槽では SG 3, 5, 6 など SG 1 以外の *L. pneumophila* が優勢であることが知られていた¹⁶⁾。しかし、入浴施設の塩素消毒が徹底され始めた2001年以降 SG 1 の比率が増加しているとの報告があり¹⁷⁾、血清群によって塩素等に対する抵抗性が異なる可能性が指摘されている¹⁸⁾。今回の調査では塩素消毒を行う施設の割合が低かったため、SG 1 の検出率が低下した可能性が考えられ、今後、塩素消毒の徹底によって血清群の分布に変化が生じるかどうか、慎重に見極める必要がある。

入浴者に健康被害を及ぼす可能性のある病原体として WHO のガイドライン¹⁹⁾に示された、抗酸菌、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌の汚染実態を併せて調査した。レジオネラ属菌と同様の環境を好む抗酸菌は3.7%の浴槽から検出され、浴槽でのバイオフィルム対策が重要であることが示唆された。大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌はほとんどがヒト由来であり、緑膿菌

Table 6 Risk factor analysis for *Legionella* contamination in inlet faucet/pouring gate, storage tank, and source waters (uni- and multivariate logistic regression analysis)

Risk factors	<i>Legionella</i> spp. positive/total (%)	univariate model OR (95%CI)	multivariate model OR (95%CI) p	
Total	41/201 (20.4)			
pH				
- ≥ 6.0	40/149 (26.8)	1.00	1.00	
- < 6.0	1/52 (1.9)	0.05 (0.01-0.40) ^b	<u>0.06 (0.01-0.48)</u>	<u>0.008</u>
Temperature				
- $\geq 55^\circ\text{C}$	1/26 (3.8)	0.12 (0.02-0.93) ^a	<u>0.10 (0.01-0.77)</u>	<u>0.027</u>
- 50-54 $^\circ\text{C}$	4/25 (16.0)	0.47 (0.15-1.42)	0.37 (0.12-1.18)	0.092
- $< 50^\circ\text{C}$	36/150 (24.0)	1.00	1.00	
Quality of hot spring				
- Chloride and/or bicarbonated spring	16/73 (21.9)	0.70 (0.31-1.57)		
- Simple hot spring	16/56 (28.6)	1.00		
- Sulfate spring	5/34 (14.7)	0.43 (0.14-1.31)		
- Sulfur spring	4/38 (10.5)	0.29 (0.09-0.96) ^a		
Chlorine concentration				
- ≥ 0.2 mg/liter	2/17 (11.8)	0.50 (0.11-2.26)		
- < 0.2 mg/liter	39/184 (21.2)	1.00		
Storage tank				
- Present	29/103 (28.2)	2.81 (1.34-5.89) ^b	1.62 (0.72-3.65)	0.240
- Absent	12/98 (12.2)	1.00	1.00	
Cleaning frequency (storage tank or pipe)				
- Every month or more	8/24 (33.3)	1.59 (0.54-4.71)		
- Every 2 to 6 months	7/34 (20.6)	0.82 (0.28-2.41)		
- Every year or less	11/46 (23.9)	1.00		
- None	15/97 (15.5)	0.58 (0.24-1.39)		

^a p = 0.04.^b p = 0.004 to 0.006.

については WHO ガイドラインに示された管理基準値 10/100mL 未満を超える菌数が 16.4% の浴槽から、また、黄色ブドウ球菌については WHO の基準値 100/100mL 未満を超える菌数が 6.7% の浴槽から検出された。いずれも基準値を超えることで直ちに重篤な健康被害に結びつく濃度ではないと考えられるが、大腸菌は入浴者による糞便汚染を示し、また、緑膿菌や黄色ブドウ球菌は毛嚢炎等の化膿性皮膚疾患を引き起こす原因となるため、消毒剤を添加しない温泉では注意を払うべき病原体と考えられる。浴槽内での汚染の動向をみると、いずれの病原体も入浴者数が多いほど、また、採取時刻が遅いほど検出率が明らかに高くなった¹⁵⁾。浴槽水の消毒を行わない施設においては、入浴者数が増えるほど汚染のリスクが増加することを充分理解し、浴槽に入る前に入念にかけ湯を行う等、入浴者への衛生教育を含めた対策を講じる必要性が再確認された。

温泉は源泉の組成や施設構造によって微生物汚染リスクが異なる。施設管理者が自らの温泉の特徴と構造を把握したうえで、経路ごとの汚染の蓄積具合を評価し、独自の管理基準を設定することが望まれる。

本論文の一部は第 66 回日本公衆衛生学会総会(2007 年 10 月、松山市)で発表した。本研究は平成 17、18

年度厚生労働科学研究費補助金(研究課題名:掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究, H17-健康一般-020)の支援を受けて行われた。

謝辞:本研究の実施にあたり、計画の段階からご助言を頂いた国立感染症研究所遠藤卓郎先生、調査にご協力いただいた会員外研究協力者京都府保健環境研究所田口寛先生、栃木県保健環境センター船渡川圭次先生及び各地方衛生研究所の皆様にご深謝いたします。また、試料採取及び施設調査にご協力いただいた温泉施設及び保健所の皆様にご深謝いたします。

文 献

- 1) 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.
- 2) 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 前川純子, 渡辺治雄, 八木田健司, 他: 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発症状況と環境調査. 感染症誌 2005; 79: 365-74.
- 3) 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: 循環濾過式浴槽

- 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.
- 4) Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S: *Legionella* and the prevention of legionellosis. World Health Organization 2007; 29—38.
 - 5) 大畑克彦, 鈴木光彰, 杉山寛治, 江塚安伸, 曾布川尚民: 実験用循環式浴槽水浄化装置を用いた自然汚染, 無殺菌状況下におけるレジオネラ属菌の消長. 防菌防黴誌 2004; 32: 593—600.
 - 6) 厚生労働省健康局長通知: 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について. 平成15年2月14日. 健発第0214004号.
 - 7) 笹原武志, 菊野理津子, 奥田舜治, 関口朋子, 佐藤義則, 高山陽子, 他: 温泉水における *Legionella* 属菌汚染と泉質に関する調査・研究. 感染症誌 2004; 78: 545—53.
 - 8) 古畑勝則, 原元宣, 吉田真一, 福山正文: 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況. 感染症誌 2004; 78: 710—6.
 - 9) 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.
 - 10) 遠藤卓郎: 温泉・公衆浴場, その他の温水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. 厚生労働科学研究費補助金健康科学総合研究事業, 平成15年度報告書. p. 159—78.
 - 11) R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008; ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
 - 12) 感染症情報センター: レジオネラ症. 病原微生物検出情報 2003; 24: 27—8.
 - 13) 倉文明: 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. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業, 平成18年度報告書. p. 101—12.
 - 14) Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K: Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 2540—7.
 - 15) 井上博雄: 掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業, 平成18年度報告書. p. 165—200.
 - 16) 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.
 - 17) 遠藤卓郎: 循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業, 平成18年度報告書. p. 49—59.
 - 18) Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, et al.: *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 5805—13.
 - 19) WHO: Guidelines for safe recreational water environments Vol.2: swimming pools and similar environments. 2006, p. 80—99.

Legionella Contamination Risk Factors in Non-circulating Hot Spring Water

Tatsuya KARASUDANI¹⁾, Toshiro KUROKI²⁾, Katsumi OTANI³⁾, Seiichi YAMAGUCHI⁴⁾, Mie SASAKI⁵⁾, Shioiko SAITO⁶⁾, Masahiro FUJITA⁷⁾, Kanji SUGIYAMA⁸⁾, Hiroshi NAKAJIMA⁹⁾, Koichi MURAKAMI¹⁰⁾, Toshitsugu TAGURI¹¹⁾, Tsuyoshi KURAMOTO¹²⁾, Fumiaki KURA¹³⁾, Kenji YAGITA¹⁴⁾, Shinji IZUMIYAMA¹⁴⁾, Junko AMEMURA-MAEKAWA¹⁵⁾, Toshio YAMAZAKI¹⁵⁾, Kunio AGATA¹⁶⁾ & Hiroo INOUE¹⁾

¹⁾Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental science, ²⁾Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, ³⁾Yamagata Prefectural Institute of Public Health, ⁴⁾Yamagata Prefectural Murayama Public Health center, ⁵⁾Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment, ⁶⁾Akita Prefectural Institute of Public Health, ⁷⁾Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, ⁸⁾Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ⁹⁾Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health, ¹⁰⁾Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, ¹¹⁾Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health, ¹²⁾Kagoshima Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health (currently working at Kagoshima Prefectural Ijyuin Public Health center), ¹³⁾Department of Bacteriology, ¹⁴⁾Department of Parasitology and ¹⁵⁾Division of Biosafety Control and Research, National Institute of Infectious Diseases, ¹⁶⁾Tsukuba Research Laboratory, Aquas Co., Ltd.

We examined water from 182 non-circulating hot spring bathing facilities in Japan for possible *Legionella* occurrence from June 2005 to December 2006, finding *Legionella*-positive cultures in 119 (29.5%) of 403 samples. Legionellae occurrence was most prevalent in bathtub water (39.4%), followed by storage tank water (23.8%), water from faucets at the bathtub edge (22.3%), and source-spring water (8.3%), indicating no statistically significant difference, in the number of legionellae, having an overall mean of 66 CFU/100mL. The maximum number of legionellae in water increased as water was sampled downstream: 180 CFU/100mL from source spring, 670 from storage tanks, 4,000 from inlet faucets, and 6,800 from bathtubs. The majority - 85.7% - of isolated species were identified as *L. pneumophila*: *L. pneumophila* serogroup (SG) 1 in 22%, SG 5 in 21%, and SG 6 in 22% of positive samples. Multivariate logistic regression models used to determine the characteristics of facilities and sanitary management associated with *Legionella* contamination indicated that legionellae was prevalent in bathtub water under conditions where it was isolated from inlet faucet/pouring gate water (odds ratio [OR]=6.98, 95% confidence interval [CI]=2.14 to 22.8). Risk of occurrence was also high when the bathtub volume exceeded 5m³ (OR=2.74, 95% CI=1.28 to 5.89). Legionellae occurrence was significantly reduced when the bathing water pH was lower than 6.0 (OR=0.12, 95% CI=0.02 to 0.63). Similarly, occurrence was rare in inlet faucet water or the upper part of the plumbing system for which pH was lower than 6.0 (OR=0.06, 95% CI=0.01 to 0.48), and when the water temperature was maintained at 55°C or more (OR=0.10, 95% CI=0.01 to 0.77). We also examined the occurrence of amoeba, *Mycobacterium* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* in water samples.

【技術論文】

浴場施設でのレジオネラ属菌と宿主アメーバの関連、
およびレジオネラ属菌を塩素消毒により
制御する場合の問題点

村上 光一^{1*}, 長野 英俊¹, 野田多美枝¹, 濱崎 光宏¹,
堀川 和美¹, 石黒 靖尚¹, 乙藤 武志², 迎田 惠之³,
泉山 信司⁴, 八木田健司⁴, 遠藤 卓郎⁴

The Relation between *Legionella* and Free-living Amoeba,
and the Treatment of Equipment at Bathhouses where *Legionella* is
Controlled by Chlorination

Koichi MURAKAMI^{1*}, Hidetoshi NAGANO¹, Tamie NODA¹, Mitsuhiro HAMASAKI¹,
Kazumi HORIKAWA¹, Yasuhisa ISHIGURO¹, Takeshi OTOFUJI², Yoshiyuki MUKAEDA³,
Shinji IZUMIYAMA⁴, Kenji YAGITA⁴ and Takuro ENDO⁴

¹Division of Pathology and Bacteriology, Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

²Kasuya Office for Health, Human Services, and Environmental Issues,
235-7 Tobara, Kasuya, Fukuoka 811-2312, Japan

³Division of Public Health, Department of Health and Human Services, Fukuoka Prefectural Government,
7-7 Higashi-koen, Hakata-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8577, Japan

⁴Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases,
Toyama 1-23-1, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

An epidemiological investigation was conducted among public bathhouses that can be used after payment of an admission fee (including hot springs) in Fukuoka Prefecture, Japan, between 2002 and 2004, to estimate the prevalence and distribution of *Legionella* and free-living amoebae in these facilities. As a result, *Legionella* were isolated from 29 of 100 samples, and free-living amoebae were isolated from 27 of 100 samples from 37 bathhouses. There was a significant relation between the existence of free-living amoebae and *Legionella* ($p < 0.01$). After chlorination, 0.7 mg/l and more and 0.5 mg/l and higher concentrations of free residual chlorine were significantly effective in controlling the proliferation of free-living amoebae and *Legionella*, respectively. However, some equipment, including pressurized filtration systems with biological filtration and the collection tanks for recycled bath-water were highly contaminated with *Legionella* and free-living amoebae, despite of presence of free residual chlorine. In addition, because there was no disinfection process, *Legionella* and free-living amoebae were detected in some baths with medicinal herbs. (Accepted 16 July 2008)

Key words : Free-living amoebae (自由生活性アメーバ)/Bathhouse (浴場)/*Legionella* (レジオネラ属菌)/Public health (公衆衛生).

¹福岡県保健環境研究所 〒818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野39 ☎092-921-9944

²福岡県粕屋保健福祉環境事務所 〒811-2312 福岡県糟屋郡粕屋町戸原235-7 ☎092-939-1744

³福岡県保健福祉部生活衛生課 〒812-8577 福岡市博多区東公園7-7 ☎092-643-3279

⁴国立感染症研究所・寄生動物部 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 ☎03-5285-1111

緒 言

レジオネラ属菌は、浴場を含めた水環境の中で、単独で生息するわけではなく、*Pseudomonas* 等を主とするバイオフィーム中^{1,2)}で、あるいは自由生活性アメーバの中³⁾で温度等の環境変化から守られ存在することが明らかとなっている。また、レジオネラ属菌の増殖には自由生活性アメーバを主とする原生動物が必要であることも明らかとなっている⁴⁾。一方、自由生活性アメーバはレジオネラ属菌の宿主、あるいは増殖の場としてのみ、この細菌に関与するのではなく、レジオネラ属菌を包含する自由生活性アメーバを、そのまま人が吸入すると、自由生活性アメーバ内のレジオネラ属菌がヒトに感染するという、レジオネラ症の媒体としての役割を担っている可能性も報告されている^{5,6)}。このようにレジオネラ属菌と自由生活性アメーバの関係は、レジオネラ症の予防を考える上で重要であり、危害を分析する面からレジオネラ属菌の生息状況を調査する場合、自由生活性アメーバの生息状況も同時に調査しなければ正確な評価はできない。わが国では、浴場を含めた人工的な水環境におけるレジオネラ属菌分布調査が、さまざまに行われてきた。しかし、そのなかで、自由生活性アメーバをも同時に調査したものは黒木ら^{7,8)}あるいは古畑の報告⁹⁾等に限られ、いまだ十分な調査数および報告数とはいえない。

そこで、自由生活性アメーバの存在とレジオネラ属菌の存在が、実際の施設において、統計的に相関するか否か明らかにする目的で、福岡県内の浴場施設を対象として調査した。

さらに、浴場施設での遊離残留塩素の濃度と、レジオネラ属菌の出現状況の関連を明らかにし、塩素消毒の有用性を確認することも、目的として調査した。

調 査 方 法

平成14年7月から16年11月にかけて、福岡県内の温泉および浴場（所謂スーパー銭湯等を含む）37施設を対象として調査した。調査対象施設の選定は福岡県内の公衆浴場が約330施設（調査時

存在することから、その一割を超えて調査し、且つ一定の地域（保健福祉環境事務所の管轄地域）に偏らないように、分散させて選定した。浴槽水等は、滅菌したポリプロピレン製容器（500ml および1000ml 容量）に採取し、当日中に検査に供した。

レジオネラ属菌の検出は、レジオネラ症防止指針¹⁰⁾に従ったが、試料はフィルター処理後、酸処理し、分離培地は WYO- α 寒天培地（栄研化学）を用いた。レジオネラ属菌の確認は、システイン要求性試験、グラム染色、および polymerase chain reaction 法（山内昌弘、田中智之、杉山明、内山昭則、倉文明、前川純子、2002年、レジオネラ検査マニュアル、国立感染症研究所）にて確認し、必要に応じて DNA-DNA ハイブリダイゼーション（DDH レジオネラ、極東製薬）を行った。自由生活性アメーバの検出は、黒木らの方法^{7,8)}に準拠した。ただし、検体量は100ml とした。なお、試料のうちろ過器内の内容物（ろ過材や被ろ過物等）については、無菌的に滅菌ポリプロピレン容器に採取し、等量の滅菌蒸留水を加え、混和し、これを試料原液とみなして 10^1 から 10^5 まで10倍段階希釈で5段階希釈し、各1 ml を大腸菌塗布寒天培地に塗布した。

遊離残留塩素濃度の測定は、調査現場において Diethyl-*p*-Phenylenediamine 法（残留塩素測定器、DPD 法、柴田科学）を用いて行った。

調 査 結 果

1. 調査施設の概要

施設の内訳は、井戸水のみ使用している施設が11施設、井戸水および温泉水を使用している施設が3施設、井戸水、水道水および温泉水を使用している施設が2施設、水道水のみ使用している施設が14施設、使用水の内訳が不明であった施設が7施設であった。施設を循環方式の内容の違いで分類すると、生物ろ過方式による循環が11施設、物理ろ過方式による循環が22施設、生物ろ過と物理ろ過を浴槽によって使い分けている施設が1施設、主として物理ろ過方式を実施してい

るが薬湯に関してのみ循環を行っていない施設が1施設、不明が2施設であった。これらの施設について、試料の遊離残留塩素濃度、試料中の自由生活性アメーバの有無、およびレジオネラ属菌の有無について調査を行った。なお、これらの施設は、消毒を施している場合は、いずれも、塩素消毒を行っており、オゾン等の他の消毒方法を行っている施設はなかった。

試料の採取時期は Table 1 に示すとおりである。内訳は、Table 2 に示すとおり、通常の浴槽水が42、ジェットバスおよび超音波発生装置付浴槽の水が19、露天風呂浴槽水が7、薬湯が10、温泉タンク水および井戸水タンクが3、施設排水が1、ヘアキャッチャー内容物が7、ろ過器内容物が5、回収槽が5、および、逆洗水が1の合計100試料であった。

2. レジオネラ属菌および自由生活性アメーバの検出状況

調査した37施設100試料中の13施設 (35.1%)、27試料 (27.0%) から自由生活性アメーバを検出

Table 1. Change in the detection rate of amoebae- or *Legionella*-positive samples

Sampling period	No. of samples tested	Amoebae positive samples (%)	<i>Legionella</i> -positive samples (%)
2002	56	18 (32.1)	20 (35.7)
2003	27	6 (22.2)	6 (22.2)
2004	17	3 (17.6)	3 (17.6)
Total	100	27 (27.0)	29 (29.0)

し、21施設 (56.8%)、29試料 (29.0%) からレジオネラ属菌を検出した。調査年による試料のレジオネラ属菌および自由生活性アメーバの検出率は Table 1 に示すとおり、経年的に両微生物の検出率は減少する傾向が認められた。自由生活性アメーバが検出された試料と、自由生活性アメーバが検出されなかった試料においてレジオネラ属菌の検出率に差があるか否か統計的に検討した結果、自由生活性アメーバが検出された試料は、検出されなかった試料よりもレジオネラ属菌の検出率が有意に高いことが明らかとなった (1%危険率, χ^2 検定, イエーツの補正) (Fig. 1)。

試料の種類によるレジオネラ属菌と自由生活性アメーバの検出結果を Table 2 に示す。通常の浴槽の23.8%からレジオネラ属菌が、19.0%から自由生活性アメーバが検出された。また、薬湯 (50%) および回収槽 (60%) でレジオネラ属菌あるいは自由生活性アメーバが比較的高率に検出されたが、露天風呂 (0%) では、比較的低い検出率であった。

試料中の遊離残留塩素濃度を測定し、かつ自由生活性アメーバの検出を試みた80検体について、遊離残留塩素濃度と自由生活性アメーバ検出率の関連を検討した結果を Table 3 に示す。遊離残留塩素濃度0.6mg/l 以下の試料と0.7mg/l 以上の試料で自由生活性アメーバ検出率に統計的な差が認められた (χ^2 検定, 危険率5%)。また、レジオネラ属菌の検出と遊離残留塩素濃度の関係について Fig. 2 に示す。遊離残留塩素が0.5mg/

Table 2. Incidences of amoebae and *Legionella* in samples

Source	No. of samples tested	No. of samples amoebae - positive (%)	No. of samples <i>Legionella</i> - positive (%)
General bathtub	42	8 (19.0)	10 (23.8)
Bathtub with jet bath or bath with ultrasonic wave generation	19	5 (26.3)	7 (36.8)
Outdoor bath	7	2 (28.6)	0 (0.0)
Bath with medicinal herbs	10	5 (50.0)	5 (50.0)
Tanks of hot-spring-water or well water	3	1 (33.3)	0 (0.0)
Drain of facility	1	0 (0.0)	0 (0.0)
Hair catcher	7	1 (14.3)	2 (28.6)
Filtration machine content	5	2 (40.0)	2 (40.0)
Collection tanks for recycled bath-water	5	3 (60.0)	3 (60.0)
Water that washed the filter of the filtration machine	1	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	100	27 (27.0)	29 (29.0)

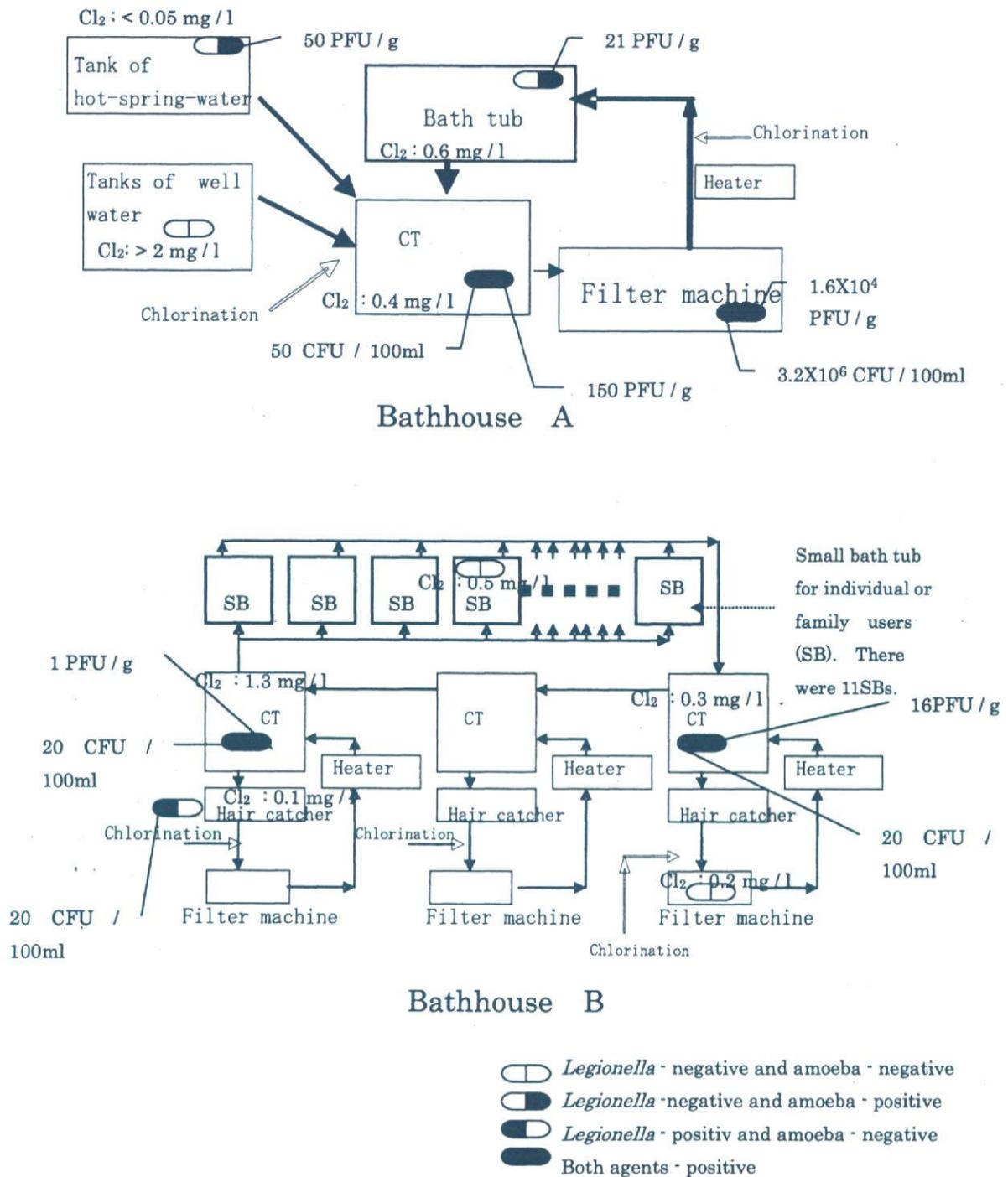


Fig.3. Rough sketches of two bathhouses with collection tanks for recycled bath tub water (CT), labeled Bathhouse A and B. Bathhouse A had 11 small bath tubs for individual or family use whereas bathhouse B had a large bath tub. In bath tubs in both facilities, free residual chlorine was detected.

ならず、レジオネラ属菌が検出されている。

施設 B (Fig. 3) は、多数の家族風呂 (浴槽) を有し、井戸水のみを使用し、物理 (砂) ろ過を用いていた。ろ過器のメンテナンスは未実施 (開業後間もないため)、逆洗は毎朝、営業時間は朝

10時から翌朝 3 時まで、循環は 24 時間、塩素注入は、自動で実施されていた。検査時、遊離残留塩素濃度は試料中 0.1~1.3mg/l であった。オーバーフロー水は再使用していた (ただし洗い場の湯は再使用されない)。個室となった家族風呂が

11あり、回収槽が複数存在し、大変複雑な循環系で、ろ過器を通らずに循環している温湯が多く含まれると考えられた。浴槽水は、いったん浴槽にためられた後、利用者が使用後、全て回収槽に回収され、その後、別の利用者が利用する際に、再び回収槽から浴槽に温湯が蓄えられる。そのため、回収槽におけるレジオネラ属菌汚染は、浴槽の汚染に直結する可能性が高い施設であった。この施設において、浴槽水からは自由生活性アメーバ、レジオネラ属菌は検出されなかったが、遊離残留塩素濃度が0.6あるいは1.3mg/l存在する回収槽の温湯からレジオネラ属菌あるいは自由生活性アメーバが検出された。

考 察

今回、レジオネラ属菌と自由生活性アメーバの関連について検討し、浴場施設における両者の存在が統計的に関連することを証明し、塩素消毒の自由生活性アメーバおよびレジオネラ属菌の除去における効果、あるいはその留意点について検討した。

Exnerら¹⁾は人工水環境におけるレジオネラ属菌増殖の要因として、25℃～42℃の水温、水の滞留、スケール、堆積物、そして、ある種の自由生活性アメーバの存在をあげている。このうち、自由生活性アメーバに関しては多くの報告がなされ、レジオネラ属菌にとって、少なくとも増殖において自由生活性アメーバを主とする原生動物の存在が不可欠であることは、多くの室内実験で証明されている⁵⁾。

しかし、実際の浴場施設において自由生活性アメーバの存在と、レジオネラ属菌の存在を、試料の分析結果を用いて、統計的に証明したものは少ない。古畑⁹⁾は、循環式浴槽水43試料を検査し、自由生活性アメーバとレジオネラ属菌の「共生の事実」を明らかにしたが、統計的検討については詳述していない。今回、我々が試料からの検出頻度をもとに、レジオネラ属菌の存在と自由生活性アメーバの存在が関連することを示したことは、この意味からも意義深いと考えられる。このことは、従来報告された、実験室内での自由生活性ア

メーバとレジオネラ属菌の関係（レジオネラ属菌が自由生活性アメーバの中で増殖する）を、実際の現場のデータを通して、補完するものであり、室内実験の成果を現場に応用する際の根拠となるものである。

一般に人工水環境の自由生活性アメーバあるいはレジオネラ属菌を対象とする消毒法としては、加熱、紫外線、オゾン、銅・銀イオン等が検討されている¹¹⁾。そのうち、60℃以上の加熱が最も効果が高いことは、既に明らかにされているが^{1,12)}、費用等の面から、現場で応用することには制限がある。そのため、現場で実際に使用される消毒法は、塩素消毒が多くを占めている。今回の検討では、0.5mg/l以上の濃度の遊離残留塩素の存在下で、レジオネラ属菌の汚染率が有意に低いことが明らかとなり、この結果は、従来の室内実験（塩素消毒が有効であること）を補完するものである。

一方、自由生活性アメーバについては、今回の検討の結果、0.7mg/l以上の濃度の遊離残留塩素の存在下にて、自由生活性アメーバの汚染率が低くなることが判明した。遊離残留塩素は、自由生活性アメーバへの殺菌効果は、あまり高くはないことが報告されているが^{4,13)}、遊離塩素濃度が維持されることにより、自由生活性アメーバの餌となる細菌が減少し、結果的に、自由生活性アメーバが抑制される効果が期待できる。また、一部の自由生活性アメーバでは、塩素消毒が直接自由生活性アメーバに効果があるとの室内実験の報告もある²⁾。遠藤ら¹⁴⁾は自由生活性アメーバに関しては0.2mg/lの濃度で効果があると報告しており、今回の検討では必要とする遊離残留塩素の濃度が、この報告よりも高かった。しかし、遊離残留塩素濃度を維持することが自由生活性アメーバ対策に有効であることが同様に浴場で確認された意義は大きい。

一方、遊離残留塩素濃度が十分あるにもかかわらず、レジオネラ属菌が検出される試料があった。塩素消毒が十分に行われにくい生物ろ過器、あるいは回収槽の存廃を含めた議論、あるいは塩素消毒以外の対策の必要性を示すものである。とくに回収槽に関しては、水資源の使用量を削減できる