

ス、アクリジンオレンジなどの特殊染色で検出される。また、血液寒天培地などの通常の培地には生育しないため、本菌の分離を念頭において、専用培地による培養を行わなければならない。本菌の鉄要求性やシステイン要求性に応じた専用の BCYE α 培地、あるいはそれにさらに他の細菌や真菌の生育を抑える薬剤を加えた選択培地を用いる。

治療には細胞内透過性のよい抗菌薬を用いる必要がある。そのため β ラクタム剤は MIC 上で感受性であっても無効である。マクロライド系、フルオロキノロン系が選択される。現在のところ薬剤耐性菌の報告はない。

Ⅲ. わが国での現状

レジオネラ症は感染症法に基づく感染症発生動向調査において医師に全数届出が義務づけられている 4 類感染症で、2004 年までは 100 症例前後だったが、尿中抗原検査の普及に伴い届出数が急増し¹³⁾、2007 年以降は 600~900 症例を推移している。

海外の集団感染事例の感染源は空調の冷却塔水によるものが大半だが、日本の集団感染事例の殆どが循環設備をもった入浴施設で起こっていて、入浴好きの国民性を反映している。したがって、旅行歴や温泉の入浴歴などからレジオネラ感染を疑うことができるが、届出症例からみるとむしろ感染源不明の事例が多い。また、毎年 7 月が患者発生のピークとなっていて、この季節性は湿度と関連していると考えられ¹⁴⁾、認識されていない季節性を示す感染源があるのかもしれない。

レジオネラ症の確定診断のためには、臨床的特徴があり、なおかつ菌の分離、あるいはレジオネラ特異的な抗原、遺伝子、抗体などを検出することが必要である。尿中抗原陽性での診断例が 2008 年には 95% を超え¹³⁾、培養、血清抗体価の測定、PCR による確定診断は極めて少ない。起原菌が *L. pneumophila* 血清群 1 以外の場合、殆ど尿中抗原陰性となり、尿中抗原検査だけでは診断がつかないため注意を要する。レジオネラ属菌を広く検出できる遺伝子増幅法を用いた体外診断薬が 2010 年に承認されたので、有効な方法として期待される。また、レジオネラ症患者発生時に感染源を解明するためには、臨床検体から菌を分離し、患者周辺の環境から分離された菌株との異同を確認する必要がある。したがって、抗原や遺伝子による診断に留まらず、臨床検体から菌を分離することは非常に重要である。

Ⅳ. 分子疫学

感染源を明らかにするための分子疫学的手法としては、

パルスフィールドゲル電気泳動が現在のところ最も優れている。これは菌株のゲノム DNA を数個から数十個に制限酵素を用いて切断し、DNA 断片を電気泳動により分離・視覚化し、得られるバンドパターンを比較する方法である。分別能に優れ、感染源と推定される環境からの分離株と患者分離株、あるいは患者同士の分離株を比較するのに適している¹⁵⁾。しかし、再現性に乏しく(手技者の技量に依存するところが大きい)、異なる実験間で得られたデータの比較が難しいなどの問題がある。

近年、各種病原細菌で行われるようになった MLST (multilocus sequence typing) は、7~8 個の遺伝子の一部領域の塩基配列を決定し、番号をふって型別を行う方法である (<http://www.mlst.net>)。塩基配列決定が以前と比べて簡単に安価に行えるようになり普及してきたが、菌株ごとのデジタルデータが得られ、異なる地域や時期の菌株の比較が容易である。MLST には、変異の度合いに経過した時間が比例すると考えられる生育に必須なハウスキーピング遺伝子が用いられるが、*L. pneumophila* の場合、ハウスキーピング遺伝子を用いると多様性に欠けるため、鞭毛遺伝子やタンパク質分解酵素遺伝子など生育に必須でないもの、*mip* 遺伝子のように病原性に関係すると考えられている遺伝子も使われている。そのため通常の MLST と区別するために SBT (sequence-based typing) という名称が用いられている¹⁶⁾¹⁷⁾。方法は一元化され、データベースも運用されている (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)。2010 年 10 月現在、日本を含め、約 40 カ国、4,600 株、910 sequence type のデータが登録されている。

筆者らは、日本各地の温泉や冷却塔水から分離された *L. pneumophila* について SBT を行ったところ、温泉分離株は多型であるのに対し、冷却塔水分離株は遺伝的に比較的均一であることを見出した¹⁸⁾。さらに、わが国における 86 株の *L. pneumophila* 臨床分離株の SBT を行ったところ 53 の遺伝子型に分かれ、SBT の型別法としての有用性が確認できた(図 2)。臨床分離株の遺伝的多様性が欧米諸国に比べ高く、欧米とは異なる感染源である浴槽水からの分離株の多様性を反映している可能性がある¹⁹⁾。

おわりに

レジオネラ肺炎が認識されるようになって 30 年余り、稀な疾患だと考えられていたが、現在では、全数届出が義務づけられている 4 類感染症のなかでレジオネラ症は最多の疾患である。環境細菌であるレジオネラ属菌が、循環式

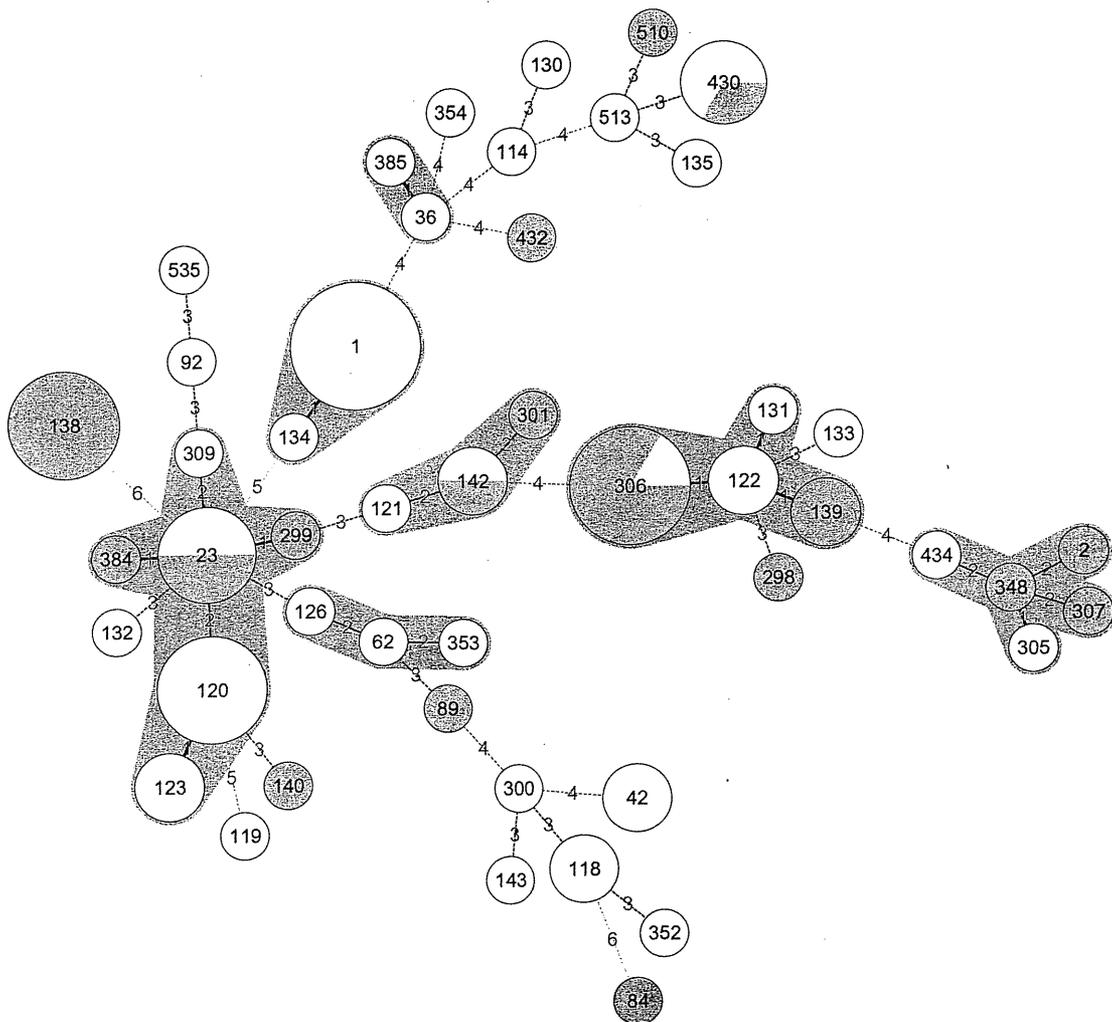


図2 7つの遺伝子座により決められた日本の *L. pneumophila* 臨床分離株の遺伝子型の分布図

調べた臨床分離株は1980～2008年にかけて、すべて独立の事例で得られた。それぞれの円中の数字は7つの遺伝子座の塩基配列により一義的に定められた遺伝子型(ST)番号である。円の大きさはそれぞれのST番号を有する株数を表している。ST1は7株、ST306は6株、ST120とST138は5株ずつである。円と円を結ぶ線上の数字はST間で配列の異なる遺伝子数を示しており、1つないし2つの遺伝子座のみが異なる遺伝的に似通っているSTの集団(クローナルコンプレックス)は大小7つ存在しており、周囲を灰色に塗って示されている。円の一部分あるいは全部が灰色に塗られているのは感染源が浴槽水と確定あるいは推定されている患者に由来する株であり、白色は感染源不明株であることを示す。したがって、ST138やST306の株が分離された患者の感染源は殆どが浴槽水であるのに対し、ST1やST120の株が分離された患者の感染源はすべて不明であることが分る。

(Amemura-Maekawa J, et al¹⁹). *J Med Microbiol* 59:2010より引用)

浴槽や冷却塔のような身近な人工水系に混入するのを防ぐことは不可能である。人工水系の管理が不十分で水中の細菌が増えると、それを捕食するアメーバが繁殖し、最終的にはレジオネラ属菌が増殖する。それを防ぐために消毒剤の使用が推奨されているが、バイオフィームが形成されると消毒剤が届かなくなり、レジオネラ属菌などの温床とな

るため、物理的清掃によるバイオフィームの除去も重要である。レジオネラ症に対するワクチンも開発されていない現在、一番有効なレジオネラ症の予防法は、人工水系の適切な衛生管理である。また、レジオネラ肺炎に罹患した場合は、迅速な診断に基づき適切な抗菌薬の投与が必要であることはいうまでもない。

文 献

- 1) Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDate JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium : *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med* 90 : 656—658, 1979
- 2) Kuroki H, Miyamoto H, Fukuda K, Iihara H, Kawamura Y, Ogawa M, Wang Y, Ezaki T, Taniguchi H. *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. *Syst Appl Microbiol* 30 : 273—279, 2007
- 3) Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Chereshtsky A. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis : an international collaborative survey. *J Infect Dis* 186 : 127—128, 2002
- 4) 宮本比呂志. レジオネラ属菌の細菌学. 防菌防微 38 : 99—111, 2010
- 5) Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M. The *Legionella pneumophila* replication vacuole : making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews* 7 : 13—24, 2009
- 6) Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev* 23 : 274—298, 2010
- 7) Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA. Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 9607—9611, 1992
- 8) Berger KH, Isberg RR. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 7 : 7—19, 1993
- 9) Burstein D, Zusman T, Degtyar E, Viner R, Segal G, Pupko T. Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog* 5 : e1000508, 2009
- 10) Schroeder GN, Petty NK, Mousnier A, Harding CR, Vogrin AJ, Wee B, Fry NK, Harrison TG, Newton HJ, Thomson NR, Beatson SA, Dougan G, Hartland EL, Frankel G. *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *J Bacteriol* 192 : 6001—6016, 2010
- 11) Brüggemann H, Cazalet C, Buchrieser C. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment : role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol* 9 : 86—94, 2006
- 12) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会. 「呼吸器感染症に関するガイドライン」成人市中肺炎診療ガイドライン : 2007
- 13) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課 <特集> レジオネラ症 2003.1—2008.9. 病原微生物検出情報 29 : 327—328, 2008
- 14) Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, Kura F, Kato N, Matsubayashi K, Okumiya K, Yamaguchi K. *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. *Emerg Infect Dis* 15 : 1295—1297, 2009
- 15) Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of pulsed-field gel electrophoresis agarose plugs for the analysis of *Legionella isolates*. *Jpn J Infect Dis* 62 : 54—56, 2009
- 16) Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 43 : 2047—2052, 2005
- 17) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 45 : 1965—1968, 2007
- 18) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol Immunol* 49 : 1027—1033, 2005
- 19) Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, Watanabe H ; Working Group for Legionella in Japan. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *J Med Microbiol* 59 : 653—659, 2010

3. レジオネラの環境中での生態とその迅速検出

倉 文明^{*1)} 常 彬^{*2)} 前川 純子^{*3)}

レジオネラはありふれた環境細菌であり, 水中や湿った土壤中に存在する。レジオネラ属菌のうち, ヒトの主たる起因菌は *Legionella pneumophila* 血清群 1 である。海外では冷却塔水, 給湯水がおもな感染源であるが, わが国では入浴施設となっている。しかし, 感染源不明の症例も多い。わが国では7月にレジオネラ症の患者が多い。興味深いことに, 生息する環境により *L. pneumophila* の遺伝子型が異なり, しかもこのうち, ヒトに感染する菌株は環境中のごく一部の菌であることがわかってきた。レジオネラの分離培養には専用の培地を必要とし, 通常4日以上を要する。このため, 核酸を増幅して菌を迅速に検出する方法が工夫され, さらに生菌と死菌の区別もできるようになってきた。

Key Words : PCR / sequence-based typing / ATP / 浴槽水 / 泉質

I はじめに

レジオネラはありふれた環境細菌であり, 水中や湿った土壤中に存在する。環境中では主としてアメーバに寄生して増殖するグラム陰性の細菌である¹⁾。レジオネラを含んだエアロゾルや粉塵を吸い込むことにより感染して, 肺炎やインフルエンザ様の発熱 (ポンティアック熱) を引き起こす。ヒトの体内では主としてマクロファージ内で増殖する。培養陽性例のヒトの起因菌の約9割は *Legionella pneumophila* である²⁾。海外では冷却塔, 給水系 / 給湯系が³⁾集団感染, クラスタ事例の主たる感染源であるが³⁾, わが国の感染源は集団感染, 散発事例ともに入浴施設となっている。しかし, 感染源不明の症例も多い⁴⁾。入浴施設のレジオネラの管理基準は平成 11 年 (1999 年) の旧厚生省生活衛生局通知以来, レジオネラ症防止指針の検

査方法によって検出されないこと (検出限界 10cfu/100mL) となっている。この水準はヨーロッパや米国のレベルと同様である。53 種のレジオネラ属菌のうち, 現在までに 25 菌種で臨床との関連が確認されている (表 1)。

II 環境における生息状況

1. 環境による違い

レジオネラの増殖には 20 ~ 45 °C の水環境が必要である。冷却塔水では *L. pneumophila* 血清群 1 と 7 および *L. anisa* が多く, 浴槽水では *L. pneumophila* 血清群 1 のほか血清群 3 ~ 6 も多かった (2006 年 4 月 ~ 2007 年 1 月分離)⁵⁾。土壌では *L. pneumophila* 血清群 1, 3 の順に多く分離されている⁶⁾。

興味深いことに, ヒトの主たる起因菌 *L. pneumophila* 血清群 1 のうち, ヒトに感染し市中肺炎

Distribution and rapid detection of *Legionella* in environments

* 国立感染症研究所細菌第一部 ¹⁾ 主任研究官 Fumiaki Kura ²⁾ 主任研究官 Bin Chang

³⁾ 主任研究官 Junko Amemura-Maekawa

表1 Legionella 属菌 53 菌種のヒトへの病原性

臨床検体からも分離された菌種あるいは血清抗体価の上昇した菌種	環境からのみ分離された菌種	
<i>L. pneumophila</i> *	<i>L. adelaidensis</i>	○ <i>L. jeonii</i>
<i>L. micdadei</i> *	<i>L. beliardensis</i>	<i>L. londiniensis</i>
<i>L. longbeachae</i>	<i>L. brunensis</i>	<i>L. moravica</i>
○ <i>L. dumoffii</i>	<i>L. busanensis</i>	<i>L. nautarum</i>
○ <i>L. bozemanii</i> *	<i>L. drancourtii</i>	<i>L. quateirensis</i>
<i>L. feeleii</i> *	<i>L. drozanskii</i>	○ <i>L. rowbothamii</i>
○ <i>L. gormanii</i>	● <i>L. erythra</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. hackeliae</i>	<i>L. fairfieldensis</i>	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. jordanis</i>	<i>L. fallonii</i>	<i>L. spiritensis</i>
<i>L. sainthelensi</i>	<i>L. geestiana</i>	○ <i>L. steigerwaltii</i>
<i>L. maceachernii</i>	<i>L. genomospecies 1</i>	● <i>L. taurinensis</i>
<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. gratiana</i>	<i>L. yabuuchiae</i>
<i>L. wadsworthii</i>	<i>L. gresilensis</i>	
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. impletisoli</i>	
<i>L. cincinnatiensis</i> *	<i>L. israelensis</i>	
○ <i>L. anisa</i> *	<i>L. jamestowniensis</i>	
○ <i>L. tucsonensis</i>		
<i>L. lansingensis</i>		
○ <i>L. cherrii</i> **		
○ <i>L. parisiensis</i>		
○ <i>L. lytica</i>		
<i>L. waltersii</i>		
<i>L. quinlivanii</i> **		
● <i>L. rubrilucens</i>		
<i>L. worsleiensis</i> **		

*ポンティアック熱の集団発生を引き起こした菌種, **肺炎患者で抗体力価上昇するが菌は分離されていない。白丸：長波長紫外線照射により青白色の蛍光を発する。黒丸：長波長紫外線照射により暗赤色の蛍光を発する。

(筆者ら作成)

の起因菌となる菌株(モノクローナル抗体 MAb3/1 陽性)は環境中に生息する株のごく一部であることがわかってきた(図1)。ヨーロッパでも同様に, MAb3/1 陽性の株は環境中に少ない (*lag-1* 遺伝子があると陽性になる)。

生息環境による菌の分布の違いには, リポ多糖を抗原とする血清群だけでなく, 菌の遺伝子型に

よる違いもあることが明らかになってきた。7つの遺伝子の一部領域を PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) で増幅し, 遺伝子配列を決定し型別する MLST (multilocus sequence typing) 法と同一の手法だが, *L. pneumophila* の場合は病原性に関する遺伝子も用いているため, SBT (sequence-based typing) 法と称している。The European

PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)

MLST (multilocus sequence typing)

SBT (sequence-based typing)

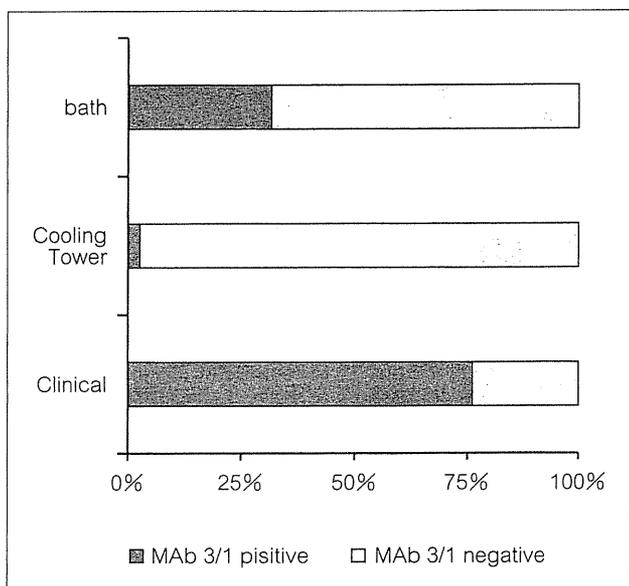


図1 臨床分離株にはモノクローナル抗体 MAb3/1 陽性の菌株が多い

わが国で分離された *L. pneumophila* 血清群 1 (臨床分離株 41 株, 浴槽水分離株 40 株, 冷却塔水分離株 48 株, 独立して分離された合計 129 株)。MAb3/1 の認識する抗原は O-鎖の 8-O アセチル基で, 疎水性が増し物理化学的に感染性が高まると考えられている。

(筆者らデータより)

Working Group for Legionella Infections により検査法が設定されている (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)。たとえば, *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA* がそれぞれ, 2, 3, 9, 10, 2, 1, 6 の場合, ST23 と名称がつけられている。

この手法を用いると, これまでパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) の泳動パターンで菌株が比較されてきたところを数字で分類できるようになり, 世界中の施設で型別された菌株が容易に比較できるようになった。

我々は, 多数の浴槽水, 冷却塔水分離株の鞭毛遺伝子 *flaA* および他の 6 つの遺伝子の塩基配列を決定して, 冷却塔水分離株が比較的均一であり, 浴槽水分離株とは異なる塩基配列を示すことを見

出した (図 2)⁷⁾⁸⁾。対応する環境分離株の得られていない散発事例の 38 株中 6 株 (16%) が冷却塔水型であったが, このことは発生動向調査で, わが国のレジオネラ症の推定感染源が, 冷却塔ではなく入浴施設が多いことと対応していた。

2. 水の物理化学的性状や他の微生物との関連

わが国で感染源として多く報告されている浴槽水に着目し, 水質との関係を探った。全国の掛け流し式の温泉入浴施設の浴槽水等 113 検体について微生物検査を行ったところ, 29% からレジオネラが検出され, 浴槽水のレジオネラの汚染の比率は温泉の泉質により異なった (図 3)⁹⁾。すなわち, 泉質としては酸性泉で汚染が少なく, 逆に, 塩化物泉, 単純温泉, 炭酸水素塩泉などが汚染されやすい (図 3)。烏谷らも同様の結果を得ている¹⁰⁾。

レジオネラ陽性率と他の微生物量との関係について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 以上でレジオネラ陽性率が有意に高く, 特に連続量として見ると, レジオネラの宿主となるアメーバの餌となる一般細菌数が重要なリスク因子であることが判明した。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 (図 4)⁹⁾。一般細菌数はヒト由来の有機物量が多い浴槽水環境ではレジオネラ汚染の有用指標と思われる。

汚染が少ないとされてきた酸性泉について, 酸性・(含硫黄) -硫酸塩泉を例に菌に対する作用を検討したところ, この温泉水は *L. pneumophila* や大腸菌に対して殺菌作用をもつことが明らかになった¹¹⁾。この結果から, 群馬県では特定の泉質の温泉ではレジオネラの検査が免除されている。

III 環境からの検出を可能とする方法論

ヒトの入浴後に塩素消毒を中止して運転した循環式浴槽モデルでは, 一般細菌数・従属栄養細菌の増殖に続き, アメーバの増殖が認められ, 最後にアメーバを宿主とするレジオネラが増殖して, レジオネラの菌数は 100mL 当たり 10^5 に達する

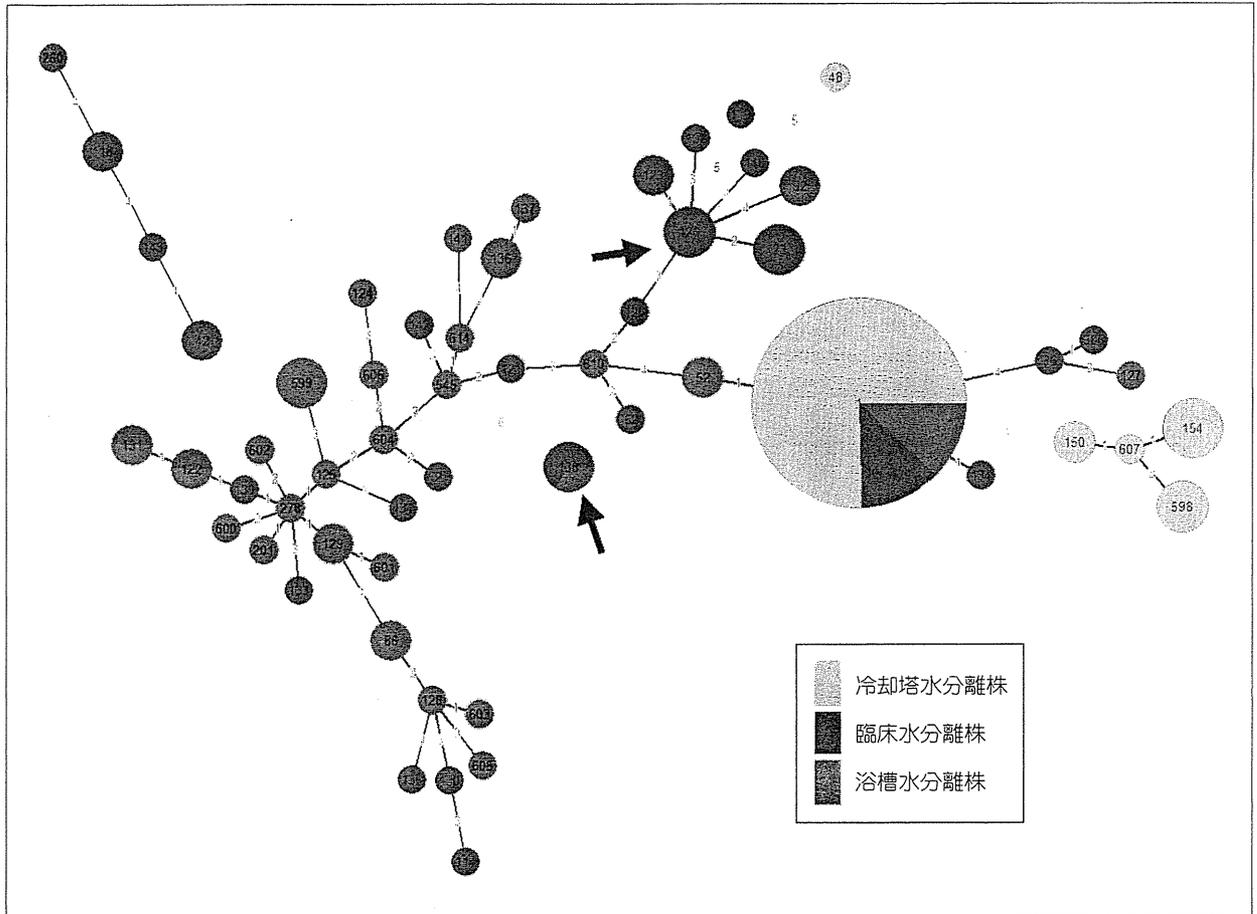


図2 Sequence-based typingの結果を minimum spanning tree 法で示す

円の中の数字は ST (sequence type) ナンバーを示し、その大きさはそれぞれの ST を有する株数に比例している。“枝”の長さは互いの ST で異なる遺伝子座の数に比例している。隣り合う遺伝子座の違いが2つ以下の ST およびそれらをつなぐ枝の周囲は薄い灰色に塗られ、complex を形成していることを示している。分離株の由来を色別で示した。ST120 はわが国独自の型で、1980 年代から日本各地で検出されているが、感染源はすべて不明である。一方、ST138 もわが国独自の型だが、感染源は浴槽水と判明している。図に矢印で示した。右の大きな円は ST1 で冷却塔水からよく分離される。

(文献8, 筆者らデータより)

(図5)¹²⁾。このことから、浴槽水のレジオネラの管理にはレジオネラを直接検出するだけでなく、レジオネラ汚染のポテンシャル (一般細菌数, 従属栄養細菌数, ATP [アデノシン三リン酸]) を検出する方法も考えられる (表2)。

1. レジオネラ汚染のポテンシャルを検出する方法

浴槽水の ATP 量は従属栄養細菌数および一般細菌数にほぼ並行し、浴槽水中のレジオネラの菌

濃度あるいは汚れの度合いの指標として ATP 量を利用することができる。実際に、356 の浴槽水試料を検索したところ、ATP 量を反映する相対発光値 (RLU) が 0.1 mL 当たり 40 以上でレジオネラの汚染率が高くなっていた (図6)¹³⁾。ハンディタイプの測定装置が市販されているので、現場ですぐに結果が判明し日常の衛生管理に役立てることが可能である。同様に、浴槽壁の 10cm 四方を綿棒で拭った試料の ATP 量を測定することによ

ATP (アデノシン三リン酸)

RLU (相対発光値)

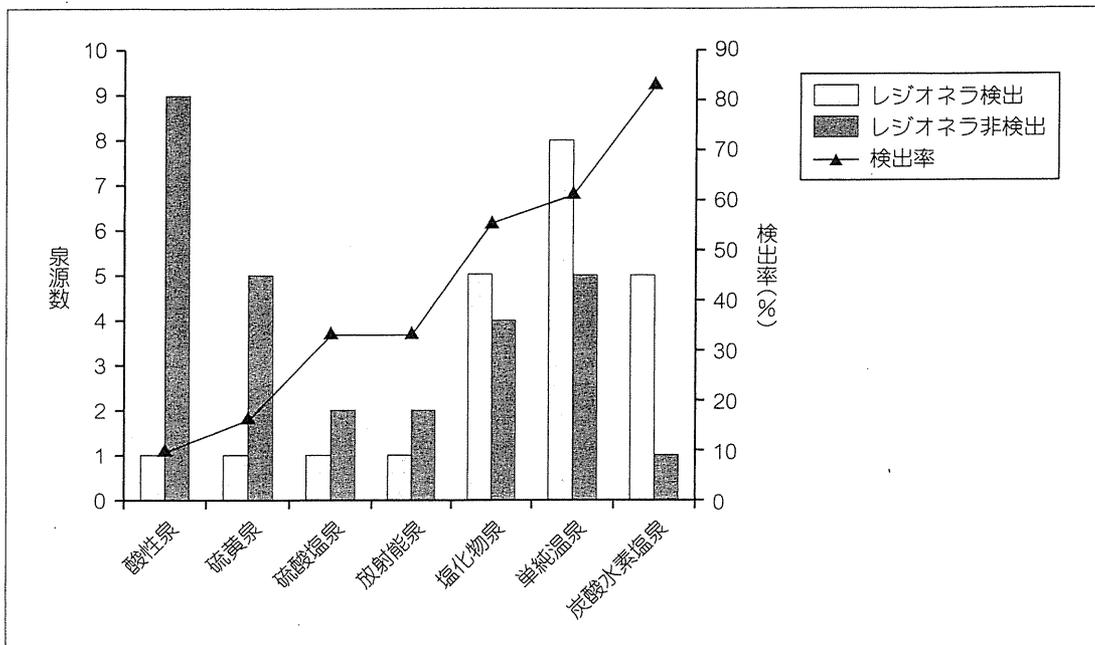


図3 泉質別レジオネラ汚染状況

わが国でレジオネラの感染源として多く報告されている浴槽水に着目し、水質との関係を探ったところ、浴槽水のレジオネラの汚染の比率は温泉の泉質により異なった。

(筆者らデータより)

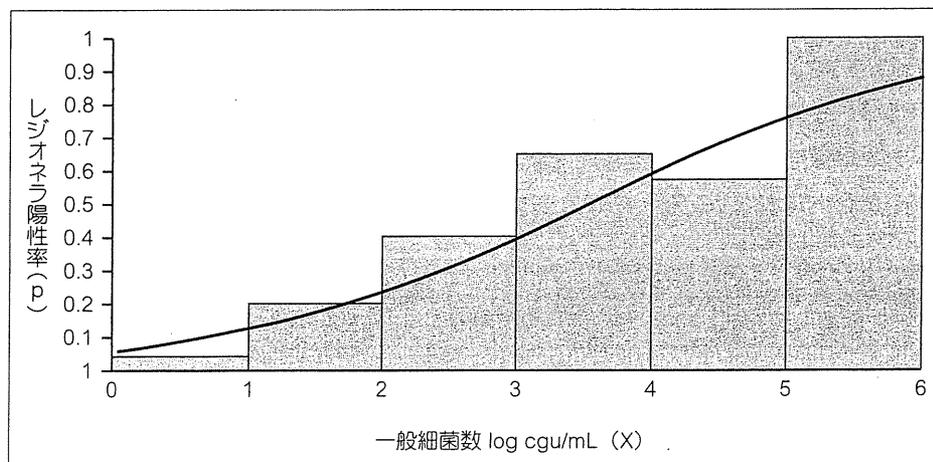


図4 一般細菌数から予測されるレジオネラ陽性率

レジオネラ陽性率 p はロジスティック回帰の結果から、 $p = 1 / \{1 + \exp(2.781 - 0.790X)\}$ で求められた。実際の陽性率はカラムを示した(たとえば、 $1 \leq X < 2$ ではレジオネラ陽性検体数 / 検体数 = $3/15 = 0.2$)。200mL 検体。

(筆者らデータより)

り、閾値 RLU 1,000 が設定され、洗浄の際の目安になる¹⁾。

一方、消毒された細菌は形態が変化するため、フローサイトメトリーで粒子ごとに前方散乱と

DNA 量を測定することにより生菌を検出できる。浴槽水の生菌に相当する粒子数をカウントすることにより、消毒効果を2分間の測定時間で判定できた¹⁴⁾。循環式浴槽水の調査では3,000 カウン

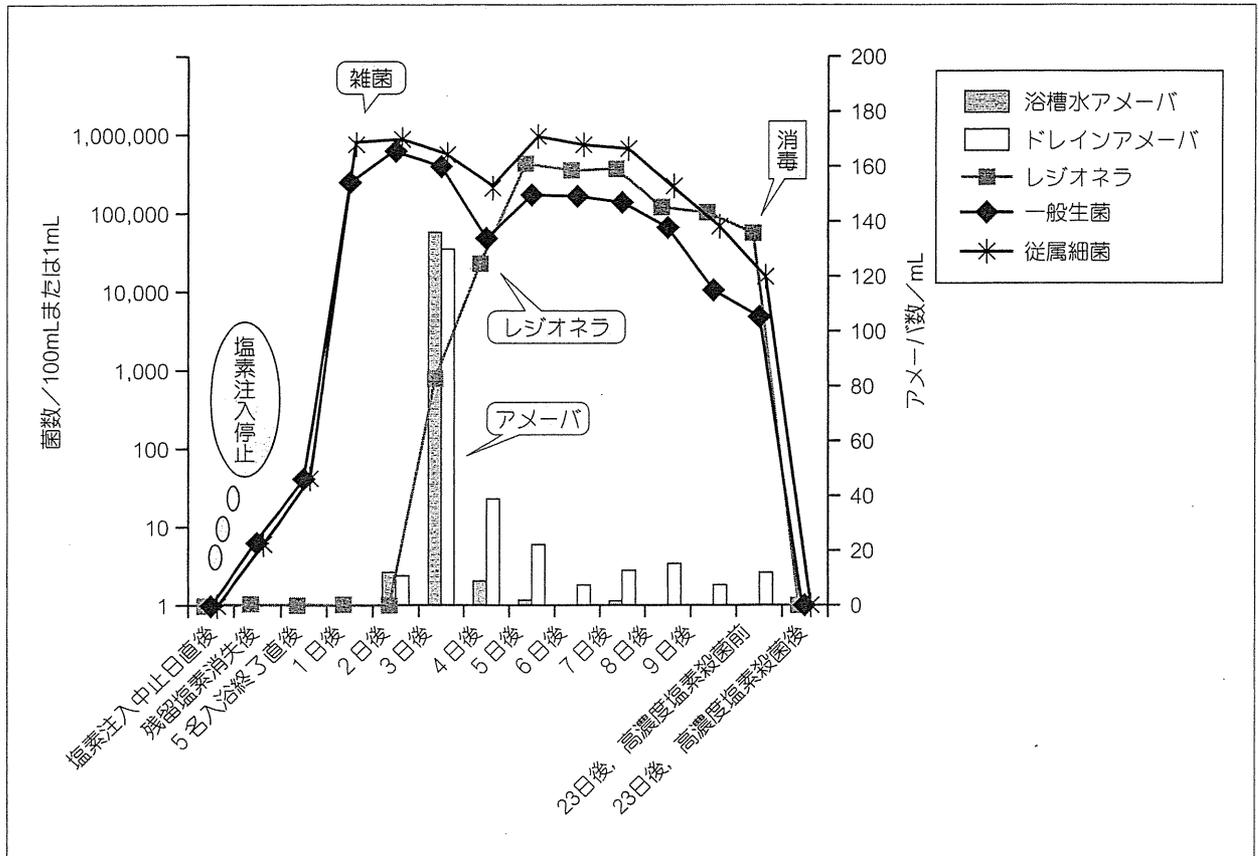


図5 自然汚染による循環浴槽水中でのレジオネラおよびアメーバ等の経時変化

レジオネラは 100mL 当たりの菌数, 他の菌数は mL 当たり。

(静岡県環境衛生科学研究所 杉山寛治先生ら作成)

ト mL^{-1} という閾値で, レジオネラの汚染は感度 95%, 特異性 84%, 一致率 89.5%であった。すなわち, 3,000 カウント mL^{-1} 未満で管理されていれば, レジオネラ汚染が少ないと考えられた。

2. レジオネラを直接検出する方法

レジオネラは増殖に特殊な培地 BCYE (buffered charcoal yeast extract) α を必要とし, 通常, コロニーを分離するには 4 日以上を要する。この培地で増殖してきたレジオネラのコロニーの形状や色彩には特色があり, 実体顕微鏡で観察することによりレジオネラ属以外のコロニーと経験的に区別できる¹⁵⁾。この方法を斜光法と呼んでいる。これにより, 早ければ培養 2 日でそれらしいコロニーを検出でき, 以下の核酸を増幅する迅速

検査, イムノクロマト法 (Duopath) と組み合わせると, その日にレジオネラ属と確認できる。

濃縮環境水を培養せず, 直接, PCR 法や LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法でレジオネラを検出すると, さらに迅速である。核酸の増幅によるレジオネラの検出には, rRNA 遺伝子 (レジオネラ属菌の検出) や mip (macrophage infectivity potentiator) 遺伝子 (*L. pneumophila* の検出) を増幅するプライマーを用いる。試料の濃縮により培養法と同程度の感度がある。浴槽水 366 試料からのレジオネラ検出率は, 培養法で 15.8%, 定量的リアルタイム PCR (qPCR) 法で 44.0%であった。全体としては, 培養法と qPCR 法の定量値に相関は認められな

BCYE (buffered charcoal yeast extract)
mip (macrophage infectivity potentiator)

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

表2 培養法と迅速検査法まとめ

対象	菌の状態	方法	利点
レジオネラ	生	EMA-PCR	迅速
		培養	菌種同定, 感染源の確定
	生死	PCR, LAMP	迅速
細菌	生	培養	
	生死	ATP 測定	迅速, 安価, 現場で対応
		フローサイトメトリー	迅速

EMA : ethidium monoazide, PCR : ポリメラーゼ連鎖反応

LAMP : Loop-Mediated Isothermal Amplification

ATP : アデノシン三リン酸

(筆者ら作成)

かったが、遊離残留塩素が0.4mg/L以下の試料に限定するとよく相関し、今後は培養法とともに迅速検査の利用が期待される¹⁶⁾。このように、核酸の増幅法では培養法に比べてレジオネラの検出率が高く、換算された検出菌数が多くなる傾向にある。培養法では検出しない培養不能菌や死菌も検出するためである。

そこで、死菌では細胞壁が損傷していることを利用して生菌と区別するPCR法が考えられた。浴槽水濃縮液をethidium monoazide (EMA) 処理することにより、EMAは損傷した菌体内に入り込みDNAに結合し、その後の光照射によりそのDNAはPCRで増殖できなくなる¹⁷⁾。これはDNAが切断されるからであるという報告もある。Propidium monoazide (PMA)はEMAより分子量が大きく、生菌に毒性が少ないとされていたが、レジオネラで検討するとEMAの方が総体的によかった。406 bpを増幅するプライマーでは死菌の影響を除去できたが、108 bpを増幅するプライマーでは死菌の影響が残ったことから、生菌と死菌の区別には増幅するDNAの長さも関係してくると思われる¹⁸⁾。

海外のEMA-qPCRの研究では、増幅されるDNA断片の長さが短いものが多く、死菌の影響を

十分に除去できていない報告が多い。EMAを実際の浴槽水試料に適用した時に問題となったのは、標準菌の培養で設定されたEMA処理濃度では、浴槽水から培養法で分離される生菌に対して毒性が強いことがあげられる。

一方、EMA濃度を低くすると死菌が残ってしまう。浴槽水の塩素濃度が高くなると死菌の量が増えるので、浴槽水の塩素濃度により処理するEMA濃度を変えれば、培養法の結果とより近くなる¹⁷⁾。

IV 環境因子の変動との関係

1. 生活環境の変化と感染

レジオネラ症は文明病であるという指摘がなされてきた。冷却塔を稼働させて暑い夏でもビル内で涼しい生活ができるようになった。24時間風呂や循環式入浴施設浴施設では、いつでも入浴できて節水もできる。

この便利さとは裏腹に、これらの環境水はレジオネラの増殖に適切な温度で、入浴設備では栄養も豊富である。

循環式入浴施設における集団感染事例が引き起こされた。平成12年(2000年)の静岡、平成14年(2002年)の宮崎、鹿児島島の循環式入浴施設に

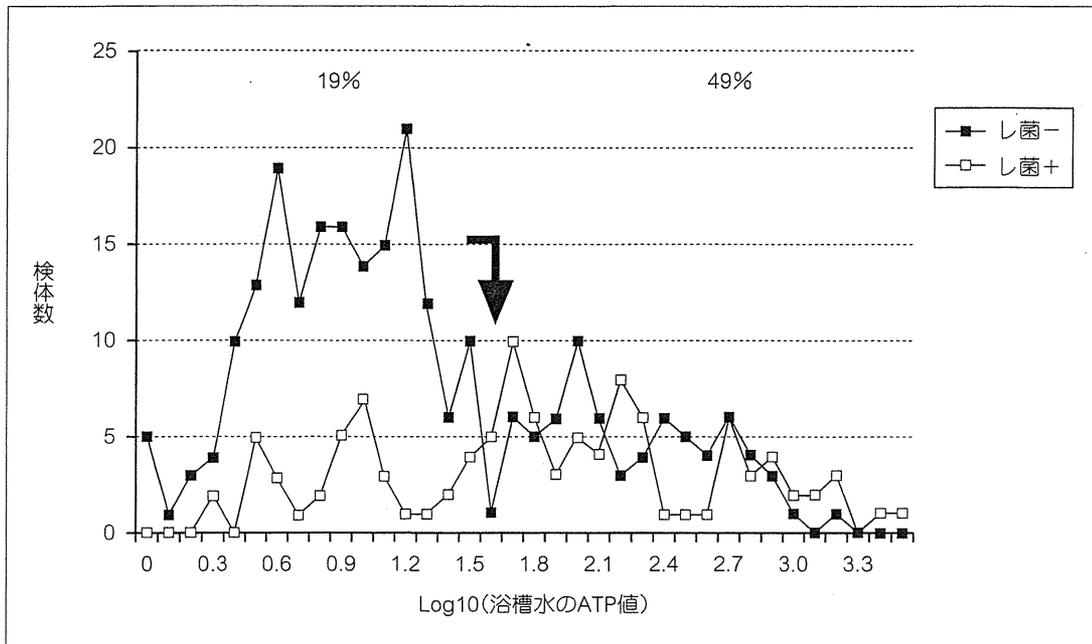


図6 浴槽水のATP測定によりレジオネラ汚染のリスクを予測

縦軸にレジオネラ属菌を検出した検体数および非検出の検体数を示した。矢印:RLUが40 (logで1.6)以下でレジオネラ陽性検体数/総検体数が19%から49%に上昇した。

ATP: アデノシン三リン酸

(文献 13 より)

における集団感染事例では、結果的に塩素消毒がなされず、モデル浴槽¹²⁾と同様のレジオネラの菌濃度に達していた。この極端な例でなくとも、これまでに浴槽水が感染源として特定された事例から菌濃度と感染リスクの関係が推察される¹⁹⁾。循環式浴槽の大規模な集団事例では100mL当たり1万を超えていた。一方、溺水事故では100未満/100mLの菌濃度でも感染が認められた。散発事例はおおむねこのあいだにきていて、現行の管理基準は妥当と判断される。

最近、これまで見過ごされてきた感染源が新たに浮上してきている。ひとつは運転によるリスクである。道路の水たまりからもレジオネラが検出されることが判明した²⁰⁾。レジオネラ症患者が自動車の運転手で、思い当たる感染源が不明なところからスタートした疫学調査で明らかとなったものである。水たまりを自動車が通過するとエアロゾルが発生し、窓を開放していたり車の空調系が破損していれば、車内にも菌が到達すると考えられる。廃車のエバポレーターの調査からレジオネ

ラのDNAが検出された²¹⁾。水で薄めたウォッシュ液を装備した車に乗車することもリスクであるという英国の報告もあった。さらに、道路舗装の前に路面を切削する機械に使用する水の汚染により、レジオネラ症の集団感染がスペインであった。電話線のマンホールで感染死亡したイタリアの事例では、作業をするマンホールに浸入した雨水が底にたまり、その水からレジオネラが検出されたと言う。これらはいずれも最近になって、生活空間の快適化や都市化と環境との接点から起こってきた新たに判明したレジオネラ問題である。

2. 気候の関与

わが国では7月にレジオネラ症の患者が多いが²⁾、梅雨期の温度と湿度が菌の増殖に都合がよいためと考えられている。月別の降水量、相対湿度、平均気温のうち、相対湿度が患者報告数と最も強い相関を示した²¹⁾。湿度との相関を示す報告は海外にもみられる。

V おわりに

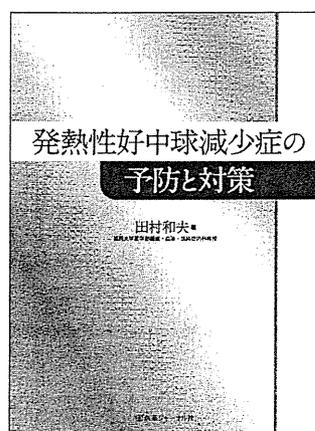
わが国のレジオネラ症の発生動向調査による届け出に記載された推定感染源はほとんどが入浴施設であるが³, 感染源不明の事例も多い。レジオネラ症の診断は, 尿中抗原の測定, とりわけイムノクロマト法による診断が保険適用になって*L. pneumophila* 血清群 1 によるレジオネラ症が⁴, 特異性, 感度よく迅速・簡便に診断できるようになった一方で, 菌の分離培養への関心が薄れる傾向があり, 分離培養の比率は年々低下してきた。しかし, レジオネラはヒトからヒトに感染せず, 必ず環境からヒトに感染するため, 臨床分離株の確保は, 危険な環境を放置せず感染源を特定する上で必須である。感染源の特定は臨床分離株と環境分離株の PFGE パターンを比較することによりなされ, わが国で最大の集団感染事例でもその有用性が確認された。

近年, 以前 4 日かかっていた PFGE 結果が 2 日で得られるようになった。菌が分離されると, 前述したように型別が可能となり, その情報はデジタル化され, 環境とヒトとの接点が地域や日本さらには世界レベルで比較検討することが容易となる。国立感染症研究所のレジオネラ・レファレンスセンターでは, 臨床分離株の収集と遺伝子型別を行い, ドレスデン工科大学に委託してモノクローナル抗体型を決定し, 検査結果を菌株の送付元に提供しているので利用されたい。

文献

- 1) 縣 邦雄ほか: “レジオネラ症防止指針第 3 版”. 財団法人ビル管理教育センター, 東京. 2009
- 2) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課: <特集>レジオネラ症 2003.1 ~ 2008.9. 病原微生物検出情報 **29**: 327-328, 2008
- 3) Ricketts KD, Joseph CA: European Working Group for Legionella Infections: Legionnaires disease in Europe: 2005-2006. *Eurosurveillance* **12**: 371-376, 2007
- 4) 厚生労働省, 国立感染症研究所: 速報レジオネラ症 1999 年 4 月 ~ 2006 年 (2007 年 2 月 28 日現在). 感染症週報 **9** (17, 18): 16-21, 2007
- 5) 倉 文明ほか: 浴槽水におけるレジオネラ属菌の平成 18 年度の検出状況, 特に *Legionella pneumophila* 血清群 1 について. “厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業. 循環式浴槽における浴槽水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究”. 主任研究者 遠藤卓郎. 平成 19 年度総括・分担報告書 p49-59, 2007
- 6) 古畑勝則ほか: 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴 **30**: 555-562, 2002
- 7) Amemura-Maekawa J, et al: Distinct difference of *flaA* genotypes of *Legionella pneumophila* between isolates from bath water and cooling tower water. *Microbiol Immunol* **52**: 460-464, 2008
- 8) Amemura-Maekawa J, et al: Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *J Med Microbiol* **59**: 653-659, 2010
- 9) 岩渕香織ほか: 掛け流し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. “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. 平成 18 年度総括・分担報告書 p45-66, 2007
- 10) 烏谷竜哉ほか: 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. 感染症誌 **83**: 36-43, 2009
- 11) 藤田雅弘ほか: 温泉水の微生物に対する作用. “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. 平成 18 年度総括・分担報告書 p19-26, 2007
- 12) 大畑克彦ほか: 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 **32**: 593-600, 2004
- 13) 黒木俊郎ほか: ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究. “厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業. 迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究”. 研究代表者 倉 文明. 平成 20 年度総括・分担報告書 p91-106, 2009

- 14) 田栗利紹ほか: フローサイトメトリーを用いたレジオネラ症予防のための浴槽水モニタリング技術. “厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業. 公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究”. 研究代表者 遠藤卓郎. 平成 21 年度総括・分担報告書 p83-91, 2010
- 15) 森本 洋: 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. 環境感染誌 25:8-13, 2010
- 16) 荒井桂子: レジオネラ症のリスクマネジメント 7 レジオネラ属菌の検査- 遺伝子検査-. 防菌防黴 38: 251-258, 2010
- 17) Chang B, et al: Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. Appl Environ Microbiol 75: 147-153, 2009
- 18) Chang B, et al: Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. Jpn J Infect Dis 63: 119-123, 2010
- 19) Kuroki T, et al: Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan with special reference to *Legionella* concentrations in water. Jpn J Infect Dis 62: 201- 205, 2009
- 20) Sakamoto R, et al: *Legionella pneumophila* in rain-water on roads. Emerg Infect Dis 15: 1295-1297, 2009
- 21) 坂本龍太, 大野 章: レジオネラ症の隠れた感染経路, 自動車の運転や雨天は危険因子か? 病原微生物検出情報 26: 331-332, 2008



発熱性好中球減少症の 予防と対策

福岡大学医学部腫瘍・血液・感染症内科教授 田村 和夫 編

B5判 192頁 定価 4,515円 (本体 4,300円+税 5%) 送料実費
ISBN978-4-7532-2419-7 C3047

◎抗がん化学療法時に発症する発熱性好中球減少症 (FN) は、迅速かつ適切な措置を行わなければ重篤な結果を招く。固形がん、血液疾患、造血幹細胞移植の患者を対象に、病原微生物を標的とした FN の予防法と発症時の検査・治療法をまとめた一冊、ここに刊行!

◎ FN のリスク分類、患者への環境整備、「薬物動態・薬物力学」理論から効果的な抗菌薬使用についての提言、耐性菌発現予防に対するサイクリング療法まで丁寧に解説。臨床現場のニーズに応える実用書!

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号)
〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 (00910-1-33353)
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索, ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

特集：平常時・災害時の衛生対策

＜原著＞

モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策

杉山寛治¹⁾，小坂浩司²⁾，泉山信司³⁾，縣邦雄⁴⁾，遠藤卓郎⁵⁾

1) 静岡県環境衛生科学研究所微生物部

2) 国立保健医療科学院水道工学部

3) 国立感染症研究所寄生動物部

4) アクアス株式会社つくば総合研究所

5) 国立感染症研究所細菌第一部

Sanitary Control of Bathing Water with Monochloramine Disinfection:
Prevention of Legionella ContaminationKanji SUGIYAMA¹⁾ , Koji KOSAKA²⁾ , Shinji IZUMIYAMA³⁾ , Kunio AGATA⁴⁾ , Takuro ENDO⁵⁾

1) Department of Microbiology, Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

2) Department of Water Supply Engineering, National Institute of Public Health

3) Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

4) Tsukuba Research Laboratories, Aquas Corporation

5) Department of Microbiology, National Institute of Infectious Diseases

抄録

目的 循環式浴槽では肺炎の起因菌であるレジオネラ属菌の汚染が問題となっている。死亡例を含む集団感染が繰り返されたことから、厚生労働省（当時は厚生省）の指導のもとで緊急避難的に遊離塩素消毒による管理が行われ、そのまま平常時の対応となった感がある。しかしながら、今日に至るまで浴槽からレジオネラが検出されており、遊離塩素消毒が全ての浴槽の安全を担保するとは言い難い状況にある。井水や温泉水など多様な水質（泉質）が存在し、また薬湯では添加された薬物成分と塩素が反応したり、高 pH の条件下では遊離塩素の効果が減じたりしているものと考えられる。また臭気などが敬遠されて塩素の使用が必ずしも徹底されない恐れもあり、多方面から代替消毒方法が求められている。本研究では米国の水道で実用化されているモノクロラミン消毒（結合塩素の 1 種）に着目し、モノクロラミン消毒の浴槽施設への応用について検討を行った。

方法 モデル循環式浴槽を用い、2 週間にわたってモノクロラミン消毒下で入浴を行い、この間のレジオネラ属菌や塩素濃度を測定した。モノクロラミン溶液は、アルカリ性（pH8.4）条件下の井水 1L に次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、次いで塩化アンモニウム水溶液を添加・混合することで生成した。生成したモノクロラミンをモデル循環式浴槽に加え、その後は不足した塩素を 1 日 1 回程度追加し、濃度維持（3mg/L）に努めた。塩素濃度は DPD 吸光度法（全塩素（結合塩素と遊離塩素の和）、あるいは遊離塩素）、インドフェノール法（モノクロラミン）、DPD/FAS 滴定法（遊離塩素、モノクロラミン、ジクロラミン、トリクロラミン）、サリチル酸法（モノクロラミン）、および HS-GC/MS 法（トリクロラミン）の各種方法により測定した。

結果 2 週間の消毒管理期間中、レジオネラ属菌とアメーバは検出されなかった。同時に測定した従属栄養細菌数も低く、微生物の増殖は抑えられていた。DPD 吸光度法（全塩素）は、他の複数のモノクロラミン測定方法と同等の測定値が得られたことから、DPD 吸光度法による全塩素濃度はモノクロラミン濃度に相当するものと判断され、現場向きの測定法として利用が可能であった。DPD/FAS 滴定法では、ジクロラミンがわずかに検出された程度にとどまり、塩素臭の主要な原因

〒 162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1 国立感染症研究所寄生動物部

1-23-1, Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo, 162-8640, Japan.

Tel:+81-3-5285-1111 Fax:+81-3-5285-1173

izmym@nih.go.jp

[平成 22 年 6 月 16 日受理]

となるトリクロラミンは検出されなかった。高感度な HS-GC/MS 法による測定においても、トリクロラミンは検出されなかった。なお、ボランティア入浴者から、いわゆる塩素臭がほとんどなかったとの感想を得ており、モノクロラミンによる消毒では臭気の低減が期待できた。

結論 浴槽における遊離塩素消毒の代替法として、モノクロラミン消毒が有効であることを見出した。

キーワード: レジオネラ, 浴槽, モノクロラミン, 消毒, 塩素

Abstract

Objectives Microbiological contamination of whirlpool baths with *Legionella*, a causative agent of pneumonia, is an important issue in Japan. The Chlorination of such bath water has been required during emergencies following several outbreaks of legionellosis, and chlorination has been established as the usual measure until now. However, chlorination has some difficulty in maintaining the cleanliness of bath water, and detections of *Legionella* are being reported even now. Chlorine in bath water sometimes reacts with substances that occur naturally in or are added to hot or cold springs or wells. Residual active chlorine (hypochlorous acid) also decreases under the condition of high pH. Strict maintenance of adequate chlorination levels is also unpopular with guests at facilities due to the strong odor of chlorination (the odor likely comes from trichloramine). An alternative measure is demanded to avoid those problems. In this study, we focused on monochloramine disinfection as an alternative measure, which is applied for municipal drinking water in the USA in order to prevent biofilms and disinfection by-products. We applied monochloramine disinfection to a whirlpool bath model running in our laboratory.

Methods Monochloramine concentration was maintained at around 3 mg/L while volunteers took baths in the whirlpool bath for 2 weeks. A monochloramine solution was added to the bath water immediately after it was made by mixing diluted sodium hypochlorite and ammonium chloride in a beaker of well water (pH 8.4). Amoebae, *Legionella* and heterotrophic bacteria were monitored during the test by using the usual culture methods. Chlorine concentrations were measured by the *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) ferrous titrimetric and colorimetric methods, the indophenol method, the salicylate method, and the HS-GC/MS method.

Results Microbiological contamination was suppressed successfully in the bath during the two-week period, by daily disinfection using monochloramine. *Legionella* and/or host amoebae were not detected, and heterotrophic plate counts were zero or very low. The DPD titrimetric method, the DPD colorimetric method, the indophenol method, and the salicylate method all produced almost the same measurements of the bath water, so the measurements of total residual chlorine (free chlorine plus combined chlorine) could be considered as the monochloramine concentrations. A small amount of dichloramine was detected with the DPD titrimetric method but no trichloramine was detected. This absence of trichloramine was confirmed by using the sensitive HS-GC/MS method, and volunteers noticed little odor during bathing, which provides additional evidence supporting the idea regarding the odor mentioned above. This monochloramine disinfection was successful in suppressing the typical chlorine odor.

Conclusions We found monochloramine disinfection to be very recommendable as a measure for the sanitary control and the prevention of *Legionella* contamination in alkaline bath water.

Keywords: *Legionella*, bath, monochloramine, disinfection, chlorine

I. 緒言

重篤なレジオネラ肺炎の起因菌であるレジオネラ属菌は、アメーバ等の原生動物に感染し増殖するが、浴槽水など身の回りの温水環境を介して人に感染することから問題となる。浴槽水の長期連用と管理の簡略化(自動化)に導入された循環式浴槽は、その構造上から入浴者の持ち込む汚れの蓄積は免れず、その結果、浴槽内で微生物の繁殖、ひいてはレジオネラ等の病原微生物汚染につながっている。事実、2002年には7名の死亡を含む295名の大規模集団感染が発生し、その他にも集団感染が繰り返されている^{1,2)}。この間、厚生労働省(当時は厚生省)の指導により浴槽水の遊離塩素消毒が行なわれてきたが、当初の消

毒方法がそのまま平常時の対応として今日に至っている(公衆浴場における衛生等管理要領等について、生衛発第1811号平成12年12月15日、健発第0214004号平成15年2月14日改正)。

遊離塩素の消毒効果は条件によって著しく減ずる可能性があり、そのため遊離塩素消毒下にもかかわらずしばしばレジオネラ属菌が検出されている³⁾。換言すれば、遊離塩素消毒は全ての浴用施設の安全を担保するものになってはいない。遊離塩素を消費する物質として金属イオン、有機物、あるいはアンモニアなど数多くが知られている。また、高pH環境下で消毒効果が著しく減じる点も問題である。塩素(Cl_2)は水に溶けると加水分解して塩酸と次亜塩素酸(HClO)に分かれ、水中では通常 HClO と

その共役塩基である次亜塩素酸イオン (ClO^-) として存在している⁴⁾。したがって、遊離塩素消毒とは、実際には、 HClO と ClO^- による消毒を意味しているが、高 pH 環境下では次亜塩素酸イオンが優位となり消毒効果が低下する ($\text{pKa}=7.5$)。本来、遊離残留塩素による水の消毒は不連続点塩素処理 (不連続点を超過して塩素を注入する処理方法) を基本とするが、浴用水では、上述の物質さらには入浴者の体表で遊離塩素が消費されることから、不連続点処理はおろか、遊離塩素濃度の維持も難しい。これらの問題を解消するためには遊離塩素消毒の代替消毒法が求められる。

本研究では、浴槽における代替消毒方法としてモノクロラミン消毒に着目した。モノクロラミンは結合塩素の 1 種で、遊離塩素消毒に比べて遅効性ではあるが、化学的安定性があることから使いやすい可能性がある。実際に米国の水道では配管系のバイオフィーム対策および消毒副生成物対策として 2005 年の報告時点で 3 割の施設にモノクロラミン消毒が取り入れられている実績があり⁵⁾、また、給湯配管のレジオネラ対策には遊離塩素消毒に比べてモノクロラミン消毒がより有効であるとの報告がある⁶⁾。わが国の水道でも結合残留塩素による消毒は 0.4mg/L 以上、著しく汚染される恐れがある場合 1.5mg/L 以上と規定されている (水道法第 22 条に基づく水道法施行規則第 17 条第 1 項第 3 号)。ここで言う結合残留塩素は主にモノクロラミンと想定される。モノクロラミンを入浴中に使用した場合は皮膚への刺激性等が心配されるが、実験動物を用いた試験結果では問題ないことが確認された⁷⁾。

浴槽レジオネラ対策としてのモノクロラミン消毒の有効性を検討した報告は見当たらず、本研究において検討を試みた。最初に、浴槽水中のモノクロラミン濃度の維持管理が必要となるが、高い安定性を生かして 1 日 1 回程度の添加で足りるのであれば現場での使用には好都合である。また、現場向きのモノクロラミン測定方法が必要である。臭気の原因となるジクロラミンと、主要な原因となるトリクロラミンの生成をできる限り抑制したいが、反応条件としてアルカリ性であること、アンモニア過剰であることが必須と考えられる。入浴により浴槽水は有機物汚染を受けるが、これに伴い消毒効果が低下する有機クロラミンの副生と微生物の増殖が懸念される。これらの一連の検証を、試験管内試験ではない、実際の浴槽施設とほぼ同じと見なせるモデル循環式浴槽において実施したので報告する。

II. 材料と方法

1. モノクロラミン

モノクロラミンはアルカリ条件下、次亜塩素酸ナトリウムとアンモニアの反応によって得られ ($\text{NH}_3 + \text{HClO} \rightarrow \text{NH}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O}$)、溶液は用時調製が必要である。アンモニアの不足や pH が酸性側に傾くと、モノクロラミンからジクロラミン ($\text{NH}_2\text{Cl} + \text{HOCl} \rightarrow \text{NHCl}_2 + \text{H}_2\text{O}$)、トリクロラミン ($\text{NHCl}_2 + \text{HOCl} \rightarrow \text{NCl}_3 + \text{H}_2\text{O}$) が生成する恐れがあるので注意を要する。また有機物との反応による有

機クロラミンの生成にも注意を払う必要がある。本研究では、井水 1L (pH8.4) に、6% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (オーヤラックス) 90ml を添加・希釈し、次いで 10% 塩化アンモニウム溶液 (和光純薬) 112.5ml を加え、所定の時間反応させてモノクロラミンを生成した。この時の両剤のモル比は遊離塩素に対してアンモニアが過剰 (1:2.5) となっており、ジクロラミンおよびトリクロラミン生成の抑制に努めた。この全量を水量 2m^3 のモデル循環式浴槽に添加、浴槽水のモノクロラミン濃度を 3mg/L 付近に調整した。濃度は WHO のバックグラウンドドキュメント等を参考に設定した⁸⁾。

2. モデル循環式浴槽

モデル循環式浴槽 (静岡県環境衛生科学研究所) は、砂ろ過装置を含む循環配管と浴槽や加温装置からなり、水量は循環系を含め 2m^3 ある。これを最初に洗浄消毒し、pH8.4 の井水を満たしてからモノクロラミン消毒を開始した。循環流速を $4\text{m}^3/\text{h}$ とし、湯温 40°C に維持した浴槽水に研究所職員が入浴することで有機物汚染を負荷した。モノクロラミンの消費分は計測の上で間欠的に投入・補完し、2 週間の入浴実験を行なった。この間、定期的に試料を採取し、常法に従ってレジオネラ属菌 (GVPC 寒天培地)、従属栄養細菌 (R2A 寒天培地)、自由生活性アメーバ (大腸菌塗布無栄養寒天培地) を定量した。

本浴槽では消毒がなくなると速やかにレジオネラ属菌を含め各種微生物が増殖することを繰り返しており、安全性には十分に配慮して入浴試験を行った。浴槽上部の天井にはドラフトを設置し、換気によるエアロゾル対策に努めた。併せて入浴者による浴槽水の臭気について聞き取り調査を行った。上記の一連の入浴試験を 2 回実施した。

3. 塩素濃度測定

モデル浴槽現場での全残留塩素濃度 (遊離残留塩素濃度と結合残留塩素濃度の和) ならびに遊離残留塩素濃度は *N,N*-ジエチル-*p*-フェニレンジアミン (DPD) 吸光度法により測定した (ポケット塩素計、全塩素用ならびに遊離塩素用測定試薬; HACH 社)。予備実験の結果から、上述の方法で生成されたクロラミン溶液には遊離残留塩素は検出されず、全てが結合型塩素として存在しており、また、そのほとんど全てがモノクロラミンであることを確認した。すなわち、全塩素濃度の測定値をモノクロラミン濃度と考えてよく、現場におけるモノクロラミン濃度は、DPD 吸光度法による全塩素濃度の測定値を用いた。なお、2 回目のモデル浴槽試験では簡易測定試薬 (Monochlor F, HACH 社) を用いたインドフェノール法によるモノクロラミン濃度測定もあわせて行った⁹⁾。インドフェノール法は、有機クロラミン等の影響を受けにくい測定方法であることが知られている。

モノクロラミン・ジクロラミン・トリクロラミンの分別定量は、米国の Standard Methods (第 21 版, 2005) の DPD を用いた硫酸第一鉄アンモニウム (FAS) によ

る滴定法 (DPD/FAS 滴定法) に準じて行った¹⁰⁾。なお、DPD/FAS 滴定法と区別する目的で、本報告では先に説明した現場使用の簡易試験法を DPD 吸光度法と表現した。

DPD 吸光度法ならびに DPD/FAS 滴定法は、有機クロロミンが存在する場合にはその影響を受ける場合がある。これを避けるため、インドフェノール法と同様に有機クロロミン等の影響を受けにくいサリチル酸法での測定を併用した¹¹⁾。DPD 法とサリチル酸法あるいはインドフェノール法による測定値を比較することで、有機クロロミンの生成の有無を確認した。

トリクロロミンの濃度測定は、HS-GC/MS 法 (ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析法, Agilent 6890N/5975C, Agilent Technologies 社) を併用した^{12, 13)}。なお、HS-GC/MS 法の定量下限値は 15 $\mu\text{g/L}$ で、DPD/FAS 滴定法よりも高感度にトリクロロミンを測定できる。

現場で実施できない DPD/FAS 滴定法、HS-GC/MS 法、サリチル酸法による塩素濃度の測定については、消毒副生成物等の測定方法に準じて浴槽水を輸送し、実験室 (国立医療科学院) で実施した。すなわち、化学測定用の共栓ビンを用い、空気を入れないよう試料水で容器を満たし、パラフィルムで封じて冷蔵して輸送した。

Ⅲ. 結果および考察

1. モノクロロミンによるモデル循環式浴槽のレジオネラ消毒効果

方法に記したように、2m³ のモデル循環式浴槽水のモノクロロミン消毒による管理を試みた。モノクロロミン濃度 3mg/L を目標に管理して、入浴しながら 2 週間にわたって浴槽水を使用し続けた。レジオネラ属菌、自由生活性アメーバ、従属栄養細菌の測定を行った結果、レジオネラ属菌、自由生活性アメーバは検出されなかった (表 1)。従属栄養細菌は検出されてもわずかであった。モノクロロミン消毒は微生物汚染を抑制することが可能であった。

また、モノクロロミン消毒を停止した浴槽水において、レジオネラ属菌、従属栄養細菌、アメーバの増殖が確認さ

れた。これは当浴槽水に細菌増殖のポテンシャルがあったことを意味し、モノクロロミン消毒によってそれが抑えられていたことになる。モノクロロミンの消毒効果の高さが示唆される結果であった。

2. モデル循環式浴槽におけるモノクロロミン濃度の維持

モノクロロミンを含む塩素とアンモニアの反応は非常に複雑である⁴⁾。このため、モノクロロミンを高純度で生成させるには、アルカリ条件下で、遊離塩素に対してアンモニアを過剰に保ちつつ反応させることが重要となる。現場での簡易なモノクロロミン溶液の生成方法として、方法に記した手順を用意した。この方法を用いることで、浴槽水的全塩素濃度 (モノクロロミン濃度) を所定の濃度 (= 3mg/L) に調整することが可能であった (表 2)。入浴後の浴槽水中のモノクロロミン濃度は概ね 1 ~ 3 割 (最大 5 割) 低下することから、それに応じて 1 日 1 回、モノクロロミン溶液を追加することで比較的容易に濃度を維持することができた。モノクロロミン溶液の調製と浴槽中での濃度維持は遊離塩素管理に比べて容易と考えられたが、実施に向けては塩素試薬の安全操作、生成反応や塩素濃度測定とそれに応じた追加塩素量の計算への理解が必要になる。入浴施設など現場への導入およびその普及、あるいは事故防止の観点からは自動注入装置の開発が好ましいと考える。

3. モノクロロミン、ジクロロミン、トリクロロミン測定

DPD/FAS 滴定法によりモノ・ジ・トリクロロミン濃度をそれぞれ測定した結果、わずかな量 (0.1mg/L) のジクロロミン生成が認められた以外は全てモノクロロミンであった (表 3)。本方法ではトリクロロミンが測定されることは無く、さらに、高感度の HS-GC/MS 法によってもトリクロロミンは生成されていないことが確認された (定量下限値: 15 $\mu\text{g/L}$)。トリクロロミンは主要な塩素臭の原因物質であるが、トリクロロミンが不検出という測定結果と、入浴を担当したボランティアから得た「試験期間を通して塩素臭はほとんどなかった」との証言は符合した。

なお、DPD 吸光度法による全塩素濃度の値はインドフ

表 1 浴槽水の微生物汚染測定結果

A) 1回目				B) 2回目					
管理状態	日数	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	アメーバ数 (50mL中)	管理状態	日数	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	アメーバ数 (50mL中)
濃度管理入浴前		<10	<10	0	濃度管理入浴前		<10	<10	0
濃度管理入浴	1日目	<10	<10	0	濃度管理入浴	1日目	<10	<10	0
	2日目	<10	<10	0		3日目	<10	<10	0
	3日目	<10	<10	0		7日目	<10	<10	0
	5日目	<10	<10	0		11日目	<10	20	0
	8日目	<10	<10	0	14日目	<10	10	0	
	10日目	<10	<10	0	濃度管理なし	15日後	7.5×10 ²	3.1×10 ⁵	9.5
	12日目	<10	<10	0					
15日目	<10	<10	0						
濃度管理なし	44日後	2.2×10 ⁴	2.5×10 ⁵	検出					

モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策

表2 モデル循環式浴槽塩素濃度推移

A) 1回目					B) 2回目						
管理状態	日数	塩素濃度 (mg/L) *3		モノクロラミン投入量 (mg/L) *2	入浴者数	管理状態	日数	塩素濃度 (mg/L) *3		モノクロラミン投入量 (mg/L) *2	入浴者数
		全塩素*1	遊離塩素*1					モノクロラミン*4	全塩素*1		
モノクロラミン投入前		0.1	0.0		0	モノクロラミン投入前		0.1	0.3	0.0	0
濃度一定調整時		3.3	0.1	3.0	0	濃度一定調整時		3.0	3.0	0.1	3.6
濃度管理	1日後	2.8	0.1	0.4	0	濃度管理	1日後	2.6	2.6	0.1	0.9
	2日後	2.7	0.2	0.4	0		2日後	2.5	2.5	0.1	1.0
濃度管理入浴	1日目	2.6	0.1	0.7	1		3日後	2.5	2.5	0.2	0.6
	2日目	2.5	0.2	0.6	2	濃度管理入浴	1日目	2.3	2.6	0.1	1.6
	3日目	2.3	0.1	1.2	3		2日目	2.6	3.0	0.2	1.0
	4日目	2.6	0.1	1.0	1		3日目	2.6	2.6	0.1	1.2
	5日目	2.8	0.2	0.8	3		4日目	2.7	2.7	0.1	1.0
	6日目	2.6	0.2	0.8	1		5日目	2.5	2.7	0.1	1.0
	7日目	3.0	0.1	0.3	0		6日目	2.7	2.7	0.1	0.8
	8日目	2.2	0.1	0.8	3		7日目	2.6	2.7	0.1	1.2
	9日目	2.7	0.1	1.4	3		8日目	2.8	2.6	0.1	0.8
	10日目	2.7	0.1	1.0	2		9日目	2.6	2.7	0.1	0.8
	11日目	3.1	0.1	0.6	2		10日目	2.4	2.5	0.1	1.2
	12日目	2.6	0.2	1.0	3		11日目	2.7	2.6	0.1	1.0
	13日目	3.1	0.1	0.4	1		12日目	2.4	2.6	0.1	0.8
	14日目	2.4	0.2	0.8	0		13日目	2.3	2.5	0.1	0.8
	15日目	3.1	0.1	0	0		14日目	2.4	2.5	0.1	0
濃度管理なし	1日後	1.8	0.1	0	0	濃度管理なし	1日後	1.7	1.7	0.1	0
	2日後	1.4	0.1	0	0		2日後	1.0	1.9	0.1	0
	3日後	1.1	0.1	0	0		3日後	0.7	0.9	0.1	0
							4日後	0.4	0.5	0.0	0
							5日後	0.3	0.4	0.0	0
							8日後	0.1	0.4	0.0	0
							9日後	0.1	0.2	0.0	0
							10日後	0.0	0.0	0.0	0
							11日後	0.0	0.3	0.0	0
							15日後	0.1	0.0	0.0	0

*1 全塩素濃度、遊離塩素濃度はDPD吸光度法実測値

*2 モノクロラミン投入量は計算値

*3 塩素濃度は、モノクロラミン投入後の測定値

*4 モノクロラミン濃度はインドフェノール法実測値

表3 各種塩素の分別定量

試験 試料内容	DPD/FAS滴定法				サリチル酸法	HS-GC/MS法	DPD法*3	インドフェノール法*3
	モノ	ジ	トリ	遊離塩素	モノ	トリ	全塩素	モノ
第一回入浴試験								
最初、モノクロラミン管理入浴0日入浴前*1	2.4	0.1	不検出	不検出	2.5	不検出	2.6	ND
最初、モノクロラミン管理入浴0日入浴前	2.5	0.1	不検出	不検出	2.5	不検出	2.6	ND
途中、モノクロラミン管理入浴4日目	2.6	0.1	不検出	不検出	2.6	不検出	2.6	ND
最終、モノクロラミン管理入浴15日目	2.3	0.1	不検出	不検出	2.3	不検出	3.1	ND
第二回入浴試験								
最終、モノクロラミン管理入浴14日目*2	2.4	不検出	不検出	不検出	2.2	不検出	2.5	2.4

*1: 新幹線にて輸送し当日測定した。他は宅配便にて輸送し到着日に測定(冷蔵保存1日相当)

*2: 宅配便輸送に要した時間を含め、冷蔵保存2日後に測定

*3: 比較用に現場測定値を再掲、他は輸送してモデル浴槽とは別の施設において測定

ND: no data

フェノール法によって測定されたモノクロラミン濃度とほぼ一致しており, DPD 吸光度法により測定された全塩素濃度をモノクロラミン濃度としてよいものと判断された (表 2B)。なお, DPD 吸光度法では微量の遊離塩素が測定されたが, 常にアンモニア過剰の条件でモノクロラミン生成を行っており, 理論上遊離塩素の存在は考えにくい。DPD 吸光度法の取扱説明書は遊離塩素濃度を測定する際に迅速な操作を求めており, 結合塩素が存在する場合には時間の経過とともに発色が進むことから, そのような誤差として上記遊離塩素は検出されたと解釈した。

4. 有機クロラミンの生成の有無

モノクロラミンの測定において, 有機クロラミンの影響を受ける場合がある DPD/FAS 滴定法と, 影響を受けないサリチル酸法の比較を行ったところ, 両測定法による測定結果はほぼ一致し, 浴槽中に有機クロラミンが生成されていないことが確認された (表 3)。このことは, 有機クロラミンの影響を受けないインドフェノール法による測定結果との照合からも確認された (表 2B)。

5. 試料輸送について

原則, 塩素濃度は現場で測定すべきであるが, モノクロラミンは遊離塩素に比べて安定で, 冷蔵輸送でも測定は可能であった。モデル循環式浴槽の現場で測定した DPD 吸光度法による全塩素濃度 (モノクロラミン消毒ではモノクロラミン濃度と見なす) の値は, 輸送後に実験室で測定した DPD/FAS 滴定法, あるいはサリチル酸法によるモノクロラミン濃度とほぼ一致した (表 3)。冷蔵で 2 晩経過したサンプルにおいても, 採水時に現場で測定した全塩素濃度 (DPD 吸光度法) あるいはモノクロラミン濃度 (インドフェノール法) は, 実験室で行った DPD/FAS 滴定法あるいはサリチル酸法によるモノクロラミン濃度とほぼ一致した。

IV. 結論

モノクロラミンの消毒効果はレジオネラ対策に効果が望めるものと期待されたことから, モデル循環式浴槽で実際に管理を試みた結果, 2 週間レジオネラ属菌を抑制することができた。1 日 1 回の塩素添加でモノクロラミン濃度を維持することが可能であった。モノクロラミン濃度測定には, DPD 吸光度法 (全塩素) を使用することが可能であった。ジクロラミン, トリクロラミン, 有機クロラミンの生成はほとんど無視できた。モノクロラミン消毒は, アルカリ性の浴槽水において, 遊離塩素消毒を代替する方法となると期待された。モノクロラミン消毒の自動化等整備を進め, 浴槽施設への導入・普及を目指したい。

V. 謝辞

本研究は平成 19 ~ 21 年度厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法の研究」(研究代表者: 遠藤卓郎, H19- 健危 - 一般 -015) の支援を受けて行った。また, 本研究の塩素濃度測定に際して沖縄県企業局の福井克人氏の助力を得た。ここに謝意を表します。

引用文献

- 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. 感染症学雑誌 2005; 79: 365-74.
- Kuroki T, Ishihara T, Ito K, Kura F. Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan, with a special focus on Legionella concentrations in water. Jpn J Infect Dis. 2009; 62 (3) :201-5.
- 村上光一, 長野英俊, 野田多美枝, 濱崎光宏, 堀川和美, 石黒靖尚, 他. 浴場施設でのレジオネラ属菌と宿主アムーバの関連, 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. 防菌防黴 2008; 36 (11) :749-56.
- White GC. Handbook of chlorination and alternative disinfectants. 4th edition. New York: J. Wiley; 1998.
- Seidel CJ, McGuire MJ, Summers RS, Via S. Have utilities switched to chloramines? J Am Water Works Assoc 2005; 97:87-97.
- Flannery B, Gelling LB, Vugia DJ, Weintraub JM, Salerno JJ, Conroy MJ, et al Reducing Legionella colonization in water systems with monochloramine. Emerg Infect Dis 2006; 12 (4) :588-96.
- 神野透人, 泉山信司, 香川 (田中) 聡子, 高橋淳子, 畔上二郎. モノクロラミンの皮膚一次刺激性に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究」(研究代表者: 遠藤卓郎. 課題番号: H19- 健危 - 一般 -015) 平成 20 年度分担研究報告書. 2009.
- WHO. Monochloramine in drinking-water (Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality) . Geneva: WHO; 2004.
- Lee W, Westerhoff P. Formation of organic chloramines during water disinfection-chlorination versus chloramination. Water Res 2009;43:2233-9.
- APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water & wastewater. 21th edition. Washington, DC: American Public Health Association; 2005.
- Tao H, Chen ZL, Li X, Yang YL, Li GB. Salicylate-spectrometric determination of inorganic monochloramine. Anal Chim Acta 2008;615:184-90.

- 12) 小坂浩司. 水道におけるトリクロラミンの実態および前駆物質の低減化. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業「水道水異臭被害を及ぼす原因物質の同定・評価および低減化技術に関する研究」(主任研究者: 西村哲治) 平成 19 年度 総括・分担研究報告書. 2008.
- 13) Kosaka K, Seki K, Kimura N, Kobayashi Y, Asami M. Determination of trichloramine in drinking water using head space gas chromatography/mass spectrometry. *Water Sci Technol: Water Supply* 2010;10(1):23-9.