

資 料

温泉浴槽壁木板からの*Legionella*属菌の分離及び増殖経過

金子紀子, 青木敏也, 大谷勝実

Isolation of *Legionella* spp. from a hot spring bathtub wall

by Akiko KANEKO, Toshiya AOKI and Katsumi OOTANI

山形県内のA温泉施設において、浴槽の洗浄、消毒の徹底など種々の対応を実施したが、浴槽水中の*Legionella pneumophila*の消失ができず、浴槽の壁にタイル状に貼り付けられていた木板の張替えを実施したところ、浴槽水中の*L. pneumophila*が消失した事例があった。この剥離した木板を蒸留水に浸漬し、浸漬後、3時間で水から*L. pneumophila*、アメーバを分離した。木板の裏にバイオフィルムが発生し、バイオフィルム内のアメーバシストに*L. pneumophila*が寄生していたと考えられた。また、剥離した木板を半年間室温に放置し、同様な実験を試みたところ、7日目で*L. pneumophila*が分離された。木板が乾燥してもアメーバシストの中で、*L. pneumophila*が半年間も生存していた可能性が示された。

Key Words : *Legionella pneumophila*, 温泉浴槽水, バイオフィルム, アメーバシスト

I はじめに

レジオネラ症は、レジオネラ属菌 (*Legionella* spp.) による感染症である。本邦における主要な感染源は温泉などの入浴施設であると推定されている¹⁾。2002年、宮崎県の温泉施設において本邦では最大規模のレジオネラ症集団感染が発生し、温泉施設でのレジオネラ症に対する関心が高まった。

山形県内のA温泉施設において、浴槽の洗浄、消毒の徹底を促すなど種々の対応を実施したが、浴槽水中の*Legionella pneumophila* (以下、*L. pneumophila*) の消失ができず、浴槽壁にタイル状に貼り付けられていた木板の張替えをしたところ浴槽水中の*L. pneumophila*が消失した事例があった。その剥離した木板から*L. pneumophila*の増殖経過を調べたので報告する。

II 施設の概要 (背景)

調査対象とした施設は、日帰りの公衆浴場であり、築後11年経過している。泉質はナトリウム・塩化物・炭酸水素塩泉、貯水槽の湯温は65°Cで、掛け流し式の形態の温泉である。浴槽は15cm角の木板をタイルのように貼り合わせた構造で、ところどころ目地の破損や木板の浮きが生じている。特に浴槽への踏み込み段に破損が多い。この施設の*Legionella*汚染実体を調べるため、平成17年8月から*Legionella*属菌等の検査を実施してきた。湯口水から*L. pneumophila*は検出されないが、終い湯の浴

槽水から*L. pneumophila*が常時検出され、多い場合は10⁴CFU/100ml検出された。浴槽の洗浄、消毒の徹底を促したが、*L. pneumophila*を消失させることはできなかった。さらに高濃度塩素洗浄 (50ppm又は100ppm) を5回試みたが、*L. pneumophila*を消失させることはできなかった。そこで、浴槽壁面の木板の張替えを実施したところ浴槽水中の*L. pneumophila*を消失することができた。

III 材料および方法

1 木板からの*Legionella*属菌とアメーバの分離

浴槽壁面の木板張替えのため剥離した木板を、剥離してから12日後、19日後及び半年後に検査を実施した。剥離した浴槽壁の木板 (15×15×0.7cm) 2枚 (A, B) を蒸留水500mlに浸漬し、37°C 恒温室で穏やかに振盪し、経時的 (3時間, 1, 2, 3, 4, 7日目) に蒸留水を採取した。採取した蒸留水の*Legionella*属菌の検出は「新版レジオネラ症防止指針²⁾」に基づいて行った。等量の0.2M塩化カリウム緩衝液 (pH2.2) を加え酸処理した後、直ちにWYO α寒天培地に一定量塗抹し、37°C で培養した。培養5～7日目にレジオネラ属菌と思われる集落を数え、蒸留水中100mlあたりのレジオネラ属菌数 (CFU/100ml) を算出した。*Legionella*属菌と思われる代表的な集落をBCYE α寒天培地と5%ヒツジ血液寒天培地に画線培養し、L-システイン発育要求を確認後、必要に応じて菌数算定値を修正した。*L. pneumophila*の同定

は、*Legionella*属特異プライマーおよび*L. pneumophila*種特異プライマーを用いたPCRにより行った³⁾。*L. pneumophila*と同定されたものについて*Legionella*免疫血清（デンカ生研）で群別した。

また、アメーバの検出は、八木田ら⁴⁾の方法に準じて行った。木板を浸漬した蒸留水1mlを大腸菌塗布寒天平板に均一に塗り広げ、35℃で培養した。培養2～7日間行い、その間に出現したアメーバの集落（プラーク）を数え、蒸留水中1mlあたりのアメーバ集落数（PFU/ml）を算出した。アメーバ単離は、プラークの最外郭部を含む部分を3～5mm角の大ききで寒天ごと切り出し、増殖面を下にして新たな大腸菌塗布寒天平板に移植後、更に35℃、2～7日間培養を行い、アメーバの形態的特長から属の同定を行った。

2 分離された*L. pneumophila*の遺伝子解析

当該浴槽水から分離された*L. pneumophila*血清群UT（H17.8.16, H17.8.28, H17.11.13, H18.1.27, H18.2.13, H18.2.17, H18.2.19, H18.9.25, H19.1.22, H19.1.24採水）26株と木板から分離された4株について、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による遺伝子解析を実施した。制限酵素は*Sfi* I を使用し、泳動パラメーターは、Block1：電圧6V/cm、パルスタイム5.3sec-34.9sec、泳動時間19.7時間とした。画像は、画像解析ソフト「フィンガープリンティングII」（BIO-RAD）により型別分類を行った。

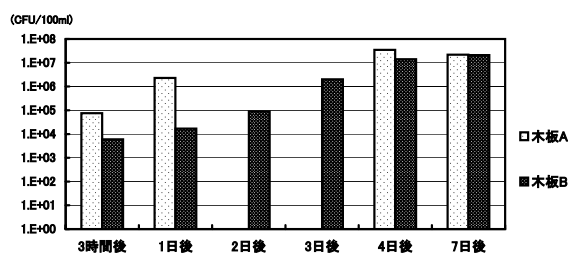


図1 木板からの*L. pneumophila*分離状況

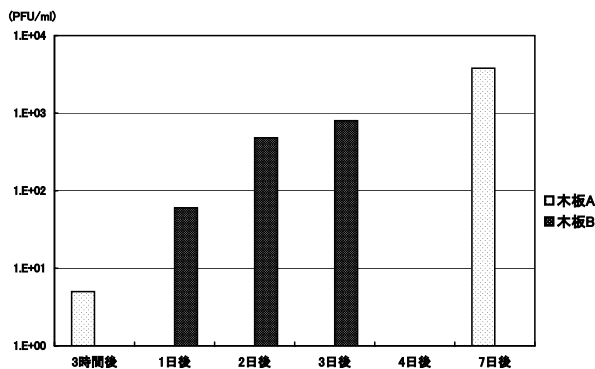


図2 木板からのアメーバ分離状況

IV 結 果

1 木板からの*Legionella*属菌とアメーバの分離

木板A, Bとも3時間後には*L. pneumophila*が検出され、菌数は、 7.5×10^4 CFU/100mlおよび 6.0×10^3 CFU/100mlで、その後急速に増殖するのが認められた（図1）。木板Aの方が増殖は早かったが、4日後にはA, Bどちらの板も 10^7 CFU/100mlまで達し、7日後でもほぼ同じ菌数であった。木板から分離された*L. pneumophila*の血清群は、市販の抗血清に凝集反応がないUTだった。アメーバの検出状況も*L. pneumophila*と同様な増殖経過を示した（図2）。形態的特徴より*Hartmannella* spと同定した。

剥離した木板を半年間室温に放置し、同様の実験を試みたところA板については、7日目で*L. pneumophila* UTが分離された。

2 分離された*L. pneumophila*の遺伝子解析

浴槽水および剥離した木板から分離された*L. pneumophila* 30株は、画像解析ソフトより10のクラスターに分類された（図3）。供試した木板の4株は、1種類のPFGE型で、クラスター8に分類された。このクラスター8にはH18年2月17日に分離された3株も入っていた（表1）。また、クラスター6に分類された株は、H17年11月からH19年1月までの15ヶ月間にわたり、分離されていた。調査の期間中に浴槽水から分離された血清群はUTの他に1, 4, 5, 6及び7と多くの血清群が分離された。

V 考 察

対象施設では、浴槽壁面の目地破損などにより木板に浮きが生じたことから木板の裏にバイオフィームが発生し、バイオフィームに生息する*Legionella*属菌が浴槽水中に浮遊する形となっていたと考えられる。木板裏面のバイオフィームはブラッシングなどの通常の清掃では除去できない。また、高濃度塩素洗浄でも木板裏面バイオフィーム深部まで塩素の効果が波及しなかったものと考えられる。

剥離した木板を蒸留水に浸漬すると、短時間で*L. pneumophila*が蒸留水中に浮遊する現象が認められた。その後、*L. pneumophila*はアメーバの中で増殖し、急速に浮遊菌量を増したと考えられる。これらの成績から、木板の張替え以前の浴槽では、毎日換水し清掃しているものの、湯張り後短時間で木板裏面バイオフィームから*L. pneumophila*が浴槽水中に浮遊するため、終湯の浴槽水から常時*L. pneumophila*が検出されていたと考えられた。

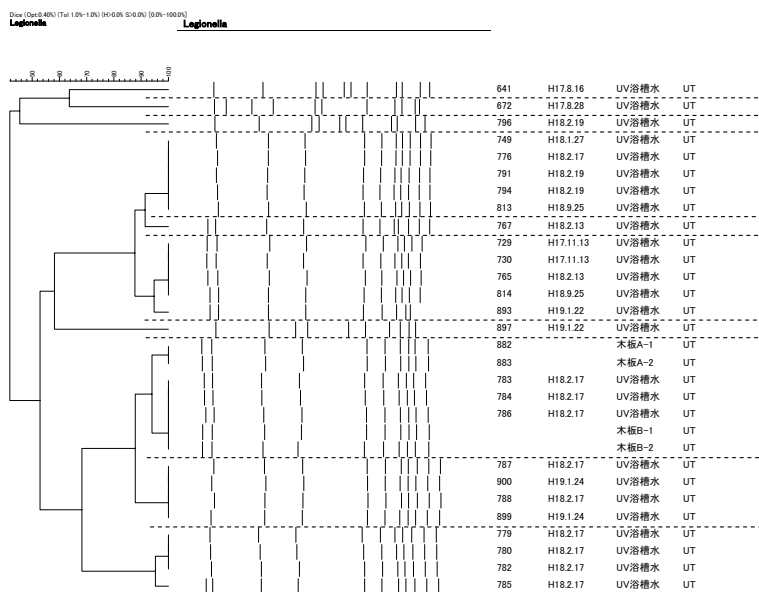


図3 浴槽水と木板から分離された*L.pneumophila* UTのPFGEパターン

浴槽の衛生管理において、「除去しにくい部分へのバイオフィーム発生防止は重要な管理点である」ということが本調査の結果からも裏付けるものとなった。

剥離した木板を半年間放置した実験でも7日目では*L. pneumophila* UTが分離されたことから、長い期間乾燥状態にあっても、アメーバのシスト内で*L. pneumophila* が生存している可能性を示したデータと考えられた。

温泉施設を原因とした集団感染症発生時に原因究明が求められるが、検体として最も適している浴槽水などがすでに無くなっている場合など、バイオフィームの拭き取りやバイオフィームが付着している物を検体に用いることで*L. pneumophila* が検出可能であると思われた。同じクラスターの株が長期間検出されるという結果から、このようにして分離した株でも、患者分離株と同じクラ

スターである可能性は高いと思われる。

PFGEの結果より木板と同じクラスターの*L. pneumophila*が浴槽水から分離されたことや同じクラスターの*L. pneumophila*が長期間分離されたことから木板の裏側に発生したバイオフィーム内に同じクラスターの*L. pneumophila*が残存していたことが示唆された。調査を実施した18ヶ月間を通して、10種類のクラスターの*L. pneumophila* UTが分離されたことや多くの血清群が分離されたことから、いろいろなタイプの*L. pneumophila* が木板裏に寄生していたと思われる。

温泉水の泉質や供給システム、浴槽の構造など多種多様であるため、レジオネラ汚染対策は非常に困難であるが、バイオフィームの除去やバイオフィームの発生を抑えることがレジオネラ汚染対策に非常に有効であった。

最後に浴槽水の検査を実施いただいた最上保健所検査室の皆様へ感謝いたします。

表1 浴槽水と木板から分離された*L.pneumophila* UTのPFGE結果

クラスター	H17			H18				H19		
	8/16	8/28	11/13	1/27	2/13	2/17	2/19	9/25	1/22	1/24
	1株	1株	2株	1株	2株	10株	3株	2株	2株	2株
1	◎									
2		◎								
3								◎		
4				◎		◎	◎	◎		
5					◎					
6			◎		◎			◎		◎
7									◎	
8						◎				◎
9						◎				◎
10						◎				
血清群	1,4,5	1,4,5	4,5,6,7	5	6	6	1	6	6	

文 献

- 1) 倉 文明 他：IDWR., 2002, 12, 7-9
- 2) 新版レジオネラ症防止指針：厚生労働省生活衛生局 企画課監修 88-94
- 3) Hiroyuki Yamamoto:Microbiol.Immunol., 1993, 37, 617-622
- 4) 八木田健司 他：ネグレリア属を中心とした恒温耐性アメーバの検査マニュアル 157-175