

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^{7,8)}、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℃、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℃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℃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℃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 (%)
Sorce of hot spring	
Temperature	
- $\geq 60^{\circ}\text{C}$	55 (30.2)
- $50\sim 59^{\circ}\text{C}$	67 (36.8)
- $< 50^{\circ}\text{C}$	60 (33.0)
pH	
- ≥ 8.5	31 (17.0)
- $7.5\sim 8.4$	74 (40.7)
- $6.0\sim 7.4$	35 (19.2)
- $3.0\sim 5.9$	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)
- $50\sim 59^{\circ}\text{C}$	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)
- $5.0\sim 9.9\text{m}^3$	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 (pH 7.6 ± 0.9) は、SG1 以外の *L. pneumophila* (pH 8.0 ± 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 (OR=6.98, 95%CI=2.14~22.8) 及び浴槽容量が 5m^3 以上 (OR=2.74, 95%CI=1.28~5.89) でリスクが高く、pH 6.0未満 (OR=0.12, 95%CI=0.02~0.63) 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 (OR=0.06, 95%CI=0.01~0.48) 及び温度 55°C 以上 (OR=0.10, 95%CI=0.01~0.77) 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) ^e	10/37 (27.0) ^a	2/35 (5.7)
3.0–5.9	2/11 (18.2) ^a	0/11 (0.0) ^{df}	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次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圧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) ^c	6.98 (2.14–22.8)	0.001
- 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	0.12 (0.02–0.63)	0.012
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	2.74 (1.28–5.89)	0.023
- < 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		multivariate model	
		OR (95%CI)		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へ深謝いたします。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へ深謝いたします。

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⁾, Shioko SAITO⁶⁾, Masahiro FUJITA⁷⁾, Kanji SUGIYAMA⁸⁾, Hiroshi NAKAJIMA⁹⁾, Koichi MURAKAMI¹⁰⁾, Toshitsugu TAGURI¹¹⁾, Tsuyoshi KURAMOTO¹²⁾, Fumiaki KURA¹³⁾, Kenji YAGITA¹⁴⁾, Shinji IZUMIYAMA¹⁴⁾, Junko AMEMURA-MAEKAWA¹³⁾, 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.