

足湯からのレジオネラ属菌の分離状況

フルハタ カツノリ エダガワ ア キ コ フクヤマ マサフミ
古畑 勝則* 枝川亜希子^{2*,3*} 福山 正文*

目的 近年、全国各地に急増している温泉水を利用した足湯を対象にレジオネラ属菌の生息状況を把握することを目的とした。

方法 2009年3月から2011年11月にかけて全国37都道府県の温泉水を利用した足湯を採取した。レジオネラ属菌の分離同定は「第3版レジオネラ症防止指針」に準拠した。すなわち、試料を濃縮後、酸処理を行ってからGVPC α 寒天培地に塗抹し、36°Cで7日間培養した。グラム陰性の長桿菌で、システイン要求性の菌株をレジオネラ属菌とした。イムノクロマトグラフィーを用いて一次同定後、免疫血清凝集反応あるいは遺伝子学的試験により菌種を同定した。

結果 足湯からのレジオネラ属菌の分離状況は、全体では196試料中56試料(28.6%)から分離され、北海道から九州まで全国各地の足湯に広く生息していることが明らかになった。足湯の設置場所別ではホームを含む駅周辺で40.9%と最も高率に分離された。足湯100 ml当たりのレジオネラ属菌数は、 1.0×10^1 CFU から最高 1.0×10^4 CFUであったが、 10^2 CFU未滿が34試料(60.7%)と最も多かった。分離菌種では *Legionella pneumophila* が優占種であり、なかでも1群が16株(23.9%)と高頻度に分離された。このほか、*Legionella londiniensis* が7株(10.4%)、*Legionella rubrilucens* が4株(6.0%)あった。

結論 全国各地に設置された温泉利用の足湯において約30%にレジオネラ属菌が生息していることが明らかとなった。菌数は少ないものの、レジオネラ症の重要な原因菌である *Legionella pneumophila* が優占していることからレジオネラ症が発生する可能性は否定できない。各施設においては、レジオネラ属菌の現状把握とともに、衛生的維持管理の継続が必要である。

Key words : レジオネラ属菌, 足湯, 分離

I 緒 言

足湯は服を脱がずに男女関係なく手軽に温泉を楽しむため、旅館や温泉街の他、駅や公園、美術館などの公共施設に設置されていることが多い。近年では、「湯めぐり」ならぬ「足湯めぐり」が行える温泉地もあり、観光スポットとして脚光を浴びている。また足湯は、全身で入浴する通常の温泉と違って膝下だけしか湯につからないので、のぼせにくい。さらに、足には太い血管が通っているので全身を温めることができる。こうした効果を期待して、近年では足湯がリハビリなどに利用されるケースもある。しかしながら、これらの施設は温泉の利用許可だけで設置できることから、全国的には正確な設

置数さえ把握されていない。また、法的には公衆浴場法の対象外であり、個別の衛生基準は設けられていないため、衛生管理はすべて設置者に委ねられているのが実情である。

こうした中、2008年、鹿児島県において高圧洗浄機を用いて足湯浴槽を清掃していた男性(58)がレジオネラ属菌に感染し、足湯によるレジオネラ症例が、わが国で初めて報告された¹⁾。レジオネラ症は、温泉水などに生息するレジオネラ属菌が原因で起こる呼吸器系疾患である。近年、レジオネラ症の発症例が多数報告されているが、これらには肺炎による死亡例も含まれている²⁾。2002年には、宮崎県日向市の温泉入浴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³⁾、浴場施設でのレジオネラ症対策が一段と進んだ。しかし、足湯におけるレジオネラ属菌の生息状況はまったく明らかにされておらず、行政的な衛生指導もほとんど行われていない。

そこで今回は、温泉水を利用した足湯を対象にレジオネラ属菌の生息状況を把握することを目的とし

* 麻布大学生命・環境科学部

²* 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部

³* 佐賀大学大学院医学研究科

連絡先：〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

麻布大学生命・環境科学部 福山正文

た。また、同時に大腸菌群数の測定も行い、その指標性について検討した。

II 研究方法

1. 材料

2009年3月から2011年11月にかけて全国37都道府県の温泉水を利用した足湯500 mlを採取し、試験に供した。地方での採取の場合は冷蔵便にて輸送後、速やかに処理した。

2. レジオネラ属の分離および同定

レジオネラ属菌の分離同定は「第3版レジオネラ症防止指針⁴⁾」に準拠した。すなわち、試料200 mlを6,000 rpm, 30分間の遠心分離により1 mlに濃縮後、等量の0.2 M HCl-KCl溶液 (pH2.2) を用いて15分間酸処理を行ってからGVPC α 寒天培地(日研生物医学研究所)に0.1 ml滴下して培地全面にコンラージ棒で塗抹し、36°Cで7日間培養した。培養後、レジオネラ属菌を疑う集落を釣菌して、血液寒天培地とBCYE α 寒天培地の2分割平板培地(日研生物医学研究所)に塗抹し、純培養と同時にシステム要求性試験を行った。グラム陰性の長桿菌で、血液寒天培地には発育せず、BCYE α 寒天培地に発育した菌株をレジオネラ属菌とした。分離株の同定は、デュオパス・レジオネラ(メルク)を用いて一次同定した後、*L. pneumophila*に該当した菌株については、免疫血清凝集反応(デンカ生研)により血清群別を行った。また、*Legionella* spp.に該当した菌株については、DNA-DNAハイブリダイゼーション(極東製薬)あるいはEdagawaらの方法⁵⁾により遺伝子学的試験を行って菌種を同定した。

3. 大腸菌群数の測定

大腸菌群数の測定は2011年に採取した試料について行った。方法は上水試験方法⁶⁾に準拠し、デソキシコール酸塩寒天培地法で行った。なお、デソキシコール酸塩寒天培地は日水製薬製を用いた。

III 研究結果

1. レジオネラ属菌の分離状況

全国各地に設置された足湯182施設からのレジオネラ属菌の分離状況は表1に示すとおり、全体では196試料中56試料(28.6%)から分離された。その地域別では、北海道が70.0%と最も高く、次いで近畿が37.9%とやや高く、四国, 中部, 中国, 九州, 東北が23.1%から29.4%で、最も低かったのは関東の20.7%であった。このように、各地域における分離率には顕著な差が認められたが、北海道から九州まで全国各地の足湯にレジオネラ属菌が広く生息していることが明らかになった。

足湯の設置場所別における分離状況を表2に示した。最も高率に分離された場所は、ホームを含む駅周辺が40.9%、次いで、美術館, 高齢者施設, 共同浴場などの公共施設が32.5%と高かった。そのほか、温泉街, 飲食店を含む旅館, 公園では23.1%から27.3%であった。これらの設置場所の屋外と屋内の内訳において、前者では181試料中54試料(29.8%)から分離されたが、後者では15試料中2試料(13.3%)から分離されたに過ぎなかった。

レジオネラ属菌が分離された56試料における足湯100 ml当たりのレジオネラ属菌数を図1に示した。検出菌数は 1.0×10^1 CFU から最高 1.0×10^4 CFU で

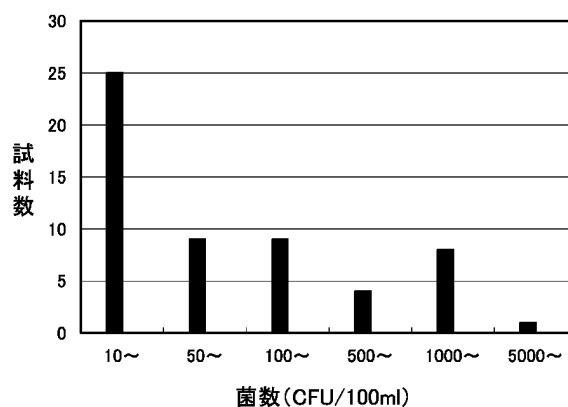
表1 足湯の地域別レジオネラ属菌の分離状況

採取地域	都道府県数	施設数	供試試料数	陽性試料数	(%)
北海道	1	10	10	7	70.0
東北	4	16	17	5	29.4
関東	6	23	29	6	20.7
中部	9	59	62	15	24.2
近畿	7	25	29	11	37.9
中国	4	16	16	4	25.0
四国	3	13	13	3	23.1
九州	3	20	20	5	25.0
合計	37	182	196	56	28.6

表2 足湯の設置場所別レジオネラ属菌の分離状況

採取場所	供試試料数	陽性試料数	(%)
駅(含む駅前)	22	9	40.9
公共施設	40	13	32.5
旅館(含む飲食店)	60	16	26.7
公園	22	6	27.3
温泉街	52	12	23.1
合計	196	56	28.6

図1 足湯浴槽水中のレジオネラ属菌数



あり、 10^2 CFU 未満が34試料 (60.7%) と最も多く、次に 10^2 CFU 台が13試料 (23.2%)、 10^3 CFU 台が8試料 (14.3%)、 10^4 CFU 台が1試料 (1.8%) であった。

全国各地の足湯56試料から分離された67株のレジオネラ属菌は表3に示すとおり、*L. pneumophila* が73.1% (49株) を占め、優占種であった。その血清群別においては、1群が16株 (23.9%) と最も多く、次に6群、5群、10群がそれぞれ6株 (9.0%)、5株 (7.5%)、4株 (6.0%) と続き、3群と8群が各3株 (4.5%)、9群と12群が各1株 (1.5%) であった。また、2群、4群、7群、11群、13群、14群および15群には1株も該当せず、型別不能株が10株

(14.9%) があった。

L. pneumophila 以外の菌種に同定された18株 (26.9%) のうち、*L. londiniensis* が7株 (10.4%) と最も多く、次に*L. rubrilucens* が4株 (6.0%) であった。このほか、*L. birminghamensis*、*L. gormanii*、*L. israelensis*、*L. jordanis*、*L. longbeachae*、*L. oakridgensis* および*L. quinlivanii* が各1株 (1.5%) であったが、これらは、これまでわが国ではほとんど分離報告がない菌種であった。

2. 大腸菌群数

127試料の足湯について大腸菌群数を測定したところ、20試料 (15.7%) から検出された。その菌数は1 CFU/ml から120 CFU/ml の範囲で、10 CFU/ml 未満の試料が12試料 (60.0%) と半数以上を占めていた。

大腸菌群数が ≥ 1 CFU/ml の試料と0 CFU/ml の試料に大別し、それぞれの群におけるレジオネラ属菌の検出状況を表4に示した。すなわち、大腸菌群数が ≥ 1 CFU/ml でレジオネラ属菌が検出された試料が8試料 (6.3%)、また大腸菌群数が0 CFU/ml でレジオネラ属菌が検出されなかった試料が81試料 (63.8%) あり、両者の一致率は70.1%であった。一方、大腸菌群数が ≥ 1 CFU/ml でもレジオネラ属菌が検出されなかった試料が12試料 (9.4%)、また逆に、大腸菌群数が0 CFU/ml でレジオネラ属菌が検出された試料が26試料 (20.5%) あり、両者の不一致率は29.9%であった。これらのデータについて χ^2 検定したところ、p 値は0.145であり、両者には関連性は認められなかった。また、大腸菌群数が ≥ 1 CFU/ml の試料でレジオネラ属菌が検出された8試料を対象に両者の検出菌数について相関関係を検討したが、顕著な傾向は認められなかった。

IV 考 察

本研究は、全国各地に設置されている足湯におけるレジオネラ属菌の生息状況を初めて明らかにした調査結果であり、レジオネラ症対策のための基礎データとして極めて意義が高い。今回の調査では、

表3 足湯から分離されたレジオネラ属菌

菌 種	株数 (%)
<i>L. pneumophila</i> 血清群	1 16(23.9)
	3 3(4.5)
	5 5(7.5)
	6 6(9.0)
	8 3(4.5)
	9 1(1.5)
	10 4(6.0)
	12 1(1.5)
	UT* 10(14.9)
	小 計 49(73.1)
<i>L. londiniensis</i>	7(10.4)
<i>L. rubrilucens</i>	4(6.0)
<i>L. birminghamensis</i>	1(1.5)
<i>L. gormanii</i>	1(1.5)
<i>L. israelensis</i>	1(1.5)
<i>L. jordanis</i>	1(1.5)
<i>L. longbeachae</i>	1(1.5)
<i>L. oakridgensis</i>	1(1.5)
<i>L. quinlivanii</i>	1(1.5)
小 計	18(26.9)
合 計	67(100)

* : 型別不能

表4 大腸菌群数とレジオネラ属菌の分離状況

	大腸菌群数 (CFU/ml)		合 計
	≥ 1	0	
レジオネラ属菌	検 出 (≥ 10 CFU/100 ml)	8(6.3)*	34(26.8)
	不検出 (<10 CFU/100 ml)	12(9.4)	93(73.2)
合 計	20(15.7)	107(84.3)	127(100)

* : 試料数 (%)

各地域における分離率に顕著な差が認められたものの、全体では28.6%の分離率であり、北海道から九州まで全国各地の足湯にレジオネラ属菌が広く生息していることを明らかにした。この分離率は、全国の温泉浴槽水からの分離率である24.3%⁷⁾を上回っており、大変興味深い値であった。

通常の足湯利用では、足湯が原因でレジオネラ症が発生することは考えにくい。しかしながら、不特定多数のヒトが様々な状況で足湯を利用することを考慮すると、その危険性を検討することは重要である。そこで、第3版レジオネラ症防止指針⁴⁾に記載されている感染危険度のスコア化を基に、対応を検討した。すなわち、「菌の増殖とエアロゾル化の要因」についてみると、約30%の足湯からレジオネラ属菌が分離された事実から、循環式浴槽水などと同等の3ポイントと考えられた。次に、「環境・吸入危険度」では、全体の約92%の施設が屋外に設置され、開放的環境であることから1ポイントと考えられた。さらに、「ヒト側の要因」を考えると、利用者は乳幼児から高齢者まで多彩であることから、2ポイントが与えられた。このように、一般的な足湯での感染危険因子スコアは合計6ポイントであった。したがって、「常に施設の適切な維持管理に心がけ、1年に最低1回の細菌検査を実施する⁴⁾」ことが望ましい。さらに、病院やリハビリ施設などで足湯を利用する場合の感染危険因子スコアは、7~9ポイントに上昇するため、より一層、水質の監視を十分に行う必要がある。

次に、レジオネラ属菌の汚染菌数との関連性について検討した。レジオネラ属菌が日和見病原体であるため、本菌の最小感染単位は明確にされていない。しかしながら、レジオネラ症の疫学調査のまとめによると⁴⁾、患者が発生した時の浴槽水中の菌数は90~4,700 CFU/100 mlであり、原因菌種はすべて *L. pneumophila* であった。このことから、現行の浴槽水の水質基準である「検出されないこと (10 CFU/100 ml 未満)」は妥当であると考えられている⁴⁾。今回の調査では、10² CFU 未満が34試料 (60.7%)と最も多く、10² CFU 台が13試料 (23.2%)、10³ CFU 台が8試料 (14.3%)で、最高1.0 × 10⁴ CFU/100 mlであった。このように、検出菌数は全体的にみて必ずしも多くはないが、汚染菌数から推定してレジオネラ症が発生する可能性は十分にあると考えられた。

今回の足湯から分離された菌種では、*L. pneumophila* が73.1%を占め、優占種であり、その血清群別では1群が23.9%と最も多かった。著者らが行った温泉浴槽水に関する全国調査においても、*L.*

pneumophila 1群を高率に分離しており、足湯の調査と類似した傾向であった⁷⁾。これまでにわが国で発生した主な集団感染の原因菌は、不明例を除き、すべて *L. pneumophila* であり、血清群1群が圧倒的に多いため、本菌種がレジオネラ症の重要な原因菌であると考えられている⁴⁾。この菌種が足湯からも高率に分離されたことは注目すべきである。また、*L. pneumophila* 以外の菌種で高頻度に同定されたのは *L. londiniensis* であり、10.4%であった。本菌種は、温泉浴槽水からも *L. pneumophila* に次いで高頻度に分離されている⁷⁾。わが国最大の集団感染事例でも *L. londiniensis* が浴槽水から1.5 × 10⁶ CFU/100 mlに達する菌数で検出されたが、呼吸器系検体からの菌の分離や血清抗体価の上昇などヒトに感染した証拠は得られなかった^{8,9)}。また、著者らの実験的検討結果¹⁰⁾でも、本菌は培養細胞内で顕著な増殖が認められなかったことから、その病原性は弱いものと考えられ、岡田らの報告⁸⁾を裏付ける結果であった。このほか、レジオネラ属菌のなかで赤色蛍光を発する菌種の一つである *L. rubrilucens* が6.0%に分離されたが、これは、わが国の温泉水では初めての分離報告である¹¹⁾。

先にも記述したとおり、足湯の利用に際しては、レジオネラ属菌の検査を行い、現状を把握することが重要である。そして、その頻度は感染危険度のスコアを参考に各施設で検討することができるが、その時期を定めることが困難である。そこで、手軽に行える大腸菌群数の検査結果を目安にレジオネラ属菌の汚染度合いを判断することができれば、タイムリーに検査を行うことができると考えた。しかしながら、今回の検討結果からも明らかなように、大腸菌群数とレジオネラ属菌の検出状況との関連性は認められず、大腸菌群数でレジオネラ属菌の汚染度合いを予想することは不可能であった。したがって、各施設での利用状況や衛生的な維持管理状況を勘案して、最も汚染の負荷が増大すると思われる時期にレジオネラ属菌の検査を行うことが得策であると考えられた。

V 結 語

今回の調査結果から全国各地に設置された温泉利用の足湯において約30%にレジオネラ属菌が生息していることが明らかとなった。菌数は少ないものの、レジオネラ症の重要な原因菌である *L. pneumophila* が優占していることからレジオネラ症が発生する可能性は否定できない。

現状では、足湯の衛生管理は設置者に委ねられていることから、衛生的管理の実施状況は不明な点が

多い。今回のデータをもとに清掃や消毒等の衛生管理が継続的に実施される必要があると考えられた。

なお、本研究は、麻布大学により支援を受けて行ったものである。

(受付 2011.11.29)
(採用 2012. 3.29)

文 献

- 1) 蓑田祥子, 上野伸広, 松山茂樹, 他. 足湯浴槽の清掃が原因と考えられたレジオネラ症の1例. 鹿児島県環境保健センター所報 2008; 9: 82-83.
- 2) 古畑勝則. 暮らしと微生物: 温泉. 防菌防黴 2011; 39: 543-548.
- 3) 藪内英子, 縣 邦雄. 日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生. 感染症学雑誌 2004; 78: 90-98.
- 4) 財団法人ビル管理教育センター. 第3版レジオネラ症防止指針. 東京: 財団法人ビル管理教育センター, 2009.
- 5) Edagawa A, Kimura A, Doi H, et al. Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. J Appl Microbiol 2008; 105: 2104-2114.
- 6) 社団法人日本水道協会. 上水試験方法・解説 (2001年版). 東京: 社団法人日本水道協会, 2001; 618-619.
- 7) Furuhashi K, Edagawa A, Ishizaki N, et al. Isolation of *Legionella* species from hot spring water samples in Japan, and the antibiotic susceptibility of the *L. pneumophila* isolates. Journal of Azabu University 2012; 23: 17-23.
- 8) 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 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: 365-374.
- 9) 河野喜美子, 岡田美香, 倉 文明, 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 II. 診断検査法の比較. 感染症学雑誌 2007; 81: 173-182.
- 10) Furuhashi K, Ogihara K, Ishizaki N, et al. Identification of *Legionella londiniensis* isolated from hot spring water samples in Shizuoka, Japan, and cytotoxicity of isolates. J Infect Chemother 2010; 16: 367-371.
- 11) Furuhashi K, Edagawa A, Miyamoto H, et al. Identification of *Legionella rubrilucens* isolated from a hot spring for foot-soaking in Niigata, Japan. Biocontrol Sci 2012; 17: 101-105.

Isolation of *Legionella* species from hot springs used for foot-soaking

Katsunori FURUHATA*, Akiko EDAGAWA^{2*,3*} and Masafumi FUKUYAMA*

Key words : *Legionella pneumophila*, hot spring for foot-soaking, isolation

Objectives We aimed to investigate the presence of *Legionella* species in hot-spring baths for feet, which have been rapidly increasing in number in Japan in recent years.

Methods The investigations were conducted between March 2009 and November 2011, and hot springs throughout the country were sampled. *Legionella* isolates were confirmed on the basis of the method described in the “Manual for the countermeasure to legionellosis, 3rd Edition.” In this method, the samples were concentrated and smeared on GVPC α agar medium after acid treatment and cultured for 7 days at 36°C. Gram-negative rods that required L-cysteine were determined to be *Legionella* species. After the first identification using Duopath Legionella[®] (Merck Ltd. Japan), isolates were identified on the basis of agglutination reaction of an immune serum or genetic examination.

Results *Legionella* was isolated from 56 of the 196 samples (28.6%) and was confirmed to widely inhabit hot-spring baths from Hokkaido to Kyushu. The isolation rates were the highest (40.9%) in facilities installed around railway stations, including those on platforms. The average microbial density of *Legionella* species per 100 ml of hot spring water was 1.0×10^1 CFU, with a maximum value of 1.0×10^4 CFU, although the microbial density in most of the samples (34 samples; 60.7%) was less than 10^2 CFU. *Legionella pneumophila* was the dominant strain, and 16 strains (23.9%) of serogroup 1 were isolated. In addition, 7 strains (10.4%) of *Legionella londiniensis* and 4 strains (6.0%) of *Legionella rubrilucens* were isolated.

Conclusion *Legionella* species inhabit approximately 30% of all hot springs for foot-soaking in the country. Although the number of viable organisms is small, the dominant presence of *Legionella pneumophila*, a major pathogen responsible for legionnaire’s disease, raises the possibility of legionnaire’s disease in users of these hot springs. Therefore, each institute should understand the present distribution of *Legionella* species in these hot springs and undertake appropriate sanitary measures.

* School of Life and Environmental Science, Azabu University

^{2*} Department of Environment Health, Osaka Prefectural Institute of Public Health

^{3*} Faculty of Medicine, Saga University