

# 市内温泉施設における緊急事態宣言後の レジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移

小松頌子、中西典子、岩本朋忠  
神戸市健康科学研究所 感染症部

## 1 はじめに

土壌や淡水に生息するレジオネラ属菌は、土埃などに運ばれて人工環境水中で増殖する。増殖したレジオネラ属菌はエアロゾルとともに飛散することで人に感染し、レジオネラ症を引き起こす<sup>1)</sup>。これまでに、温泉入浴施設を感染源としたレジオネラ症は多数報告されており、特に新規営業開始時や休止後の再開時は、レジオネラ属菌が増殖している危険性が高いため<sup>2)</sup>、レジオネラ症の感染リスクが高まる可能性がある。

R2 年度は、新型コロナウイルス感染症の流行により、4月に初めての緊急事態宣言が発出され、温泉入浴施設に対して使用の制限等の要請がなされた。これを受けて厚生労働省からは、十分に消毒した後に営業を再開するよう注意喚起がなされており<sup>3)</sup>、レジオネラ症への感染防止対策がより一層求められることとなった。

そこで、緊急事態宣言後の影響を調べるために、宣言解除後に実施した R2 年度の市内温泉施設におけるレジオネラ属菌の検出状況を精査し、検出菌数の多かった 5 施設に着目して、直近 9 年間に分離されたレジオネラ属菌の遺伝子型の推移を調査した。

## 2 材料および方法

### 1) 調査対象

市内温泉地区の施設全体のレジオネラ属菌検出状況については、H28 年度から R1 年度を緊急事態宣言前の期間とし、緊急事態宣言解除後の R2 年度の行政検査結果を比較対象とした。

さらに、5 施設(A~E)において、H24 年度から R2 年度に分離されたレジオネラ属菌を解析対象とした。

### 2) レジオネラ属菌の分離および同定

検水 500 mL を直径 47 mm、孔径 0.2 μm のポリカーボネート製メンブレンフィルター(ミリポア、GTTP04700)で吸引ろ過後、フィルターを滅菌ミリ Q 水 5 mL に浸し、5 分間のボルテックスで再浮遊した。濃縮検水を 50°C20 分間の

熱処理後、100 μL を GVPC 寒天培地(関東化学)に塗布した。36°C で 7 日間培養し、システイン要求性かつ斜光法におけるモザイク・カットグラス様コロニーをレジオネラ属菌と推定した。

*Legionella pneumophila* の同定は、LEG(genus *Legionella* 16S rRNA gene)と Lmip(*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene)の両プライマーを用いた PCR 法により行った<sup>4)</sup>。両遺伝子が増幅したものを *L. pneumophila*、LEG のみが増幅したものを *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌と同定した。*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定して BLAST 検索を行うことにより、菌種同定した。

### 3) 血清型別

*L. pneumophila* の血清群(serogroup, 以下、SG)は、レジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いて型別した。

### 4) 遺伝子型別解析

*L. pneumophila* の遺伝子型別解析は、Sequence Based Typing (SBT) 法と Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) 法を用いた<sup>4)</sup>。SBT 法では、7 つの遺伝子をシーケンスし、データベースで照合することで遺伝子型(sequence type, 以下、ST)を決定した。MLVA 法では、12 領域のリピート数を解析した。

また、SG1 の 9 株については、病原性との関連が明らかになっている *lag-1* 遺伝子を標的とした PCR 法を実施した<sup>4)</sup>。

## 3 結果

### (1) レジオネラ属菌検出状況

市内温泉地区における、直近 5 年間のレジオネラ属菌検出率を表 1 に示す。R2 年度の行政検査では、R1 年度と比較して検出率は低下した。一方、レジオネラ属菌が検出された施設について、検出菌数(10~100 CFU/100 mL 未満、100~1,000 CFU/100 mL 未満、1,000~10,000 CFU/

100 mL 未満、10,000 CFU/100 mL 以上)に対する検出施設数やその割合を精査したところ、R2 年度に 10,000 CFU/100 mL 以上の菌数が検出された施設が 5 施設あり、検出施設のうち 29.4%を占めた。H30年度の 0 施設(0%)、R1 年度の 3 施設(15.8%)と比較して、R2 年度は検出菌数の多い施設の割合が高かった。なお、5 施設はいずれも採水時に遊離残留塩素濃度(0.4 mg/L 程度<sup>2)</sup>)またはモノクロアミン濃度(3 mg/L 程度<sup>2)</sup>)を維持できていなかった。

次に、R2 年度の検出菌数が 10,000 CFU/100 mL 以上であった 5 施設において、H24 年度以降に分離されたレジオネラ属菌を表 2 に示す。A 施設では、*L. londiniensis*、*L. israelensis* が継続的に分離された。また R2 年度は検出されなかったものの、*L. pneumophila* SG UT(untypable) が約 8 年にわたって分離された。B 施設では、約 7 年にわたって *L. pneumophila* SG1 が分離された。C 施設では、H26 年度と R2 年度に *L. pneumophila* SG1 が分離された。D 施設では H24 年度以降、様々な血清型の *L. pneumophila* が分離された。E 施設では、*L. pneumophila* は検出されず、*L. israelensis* が約 9 年にわたって分離された。

#### (2) 各施設で分離されたレジオネラ属菌の遺伝子型の解析

A, B, C, D 施設より分離された *L. pneumophila* の遺伝子型別解析の結果を表 3 に示す。A 施設において、H24 年度より分離された SG UT(4 株)は同一の ST であり、SBT 法未実施の菌株を含めた 5 株の MLVA 型は一致した。B 施設において、H26 年度より分離された SG1(4 株)は同一の ST であり、SBT 法未実施の菌株を含めた 6 株の MLVA 型は、H26 年度分離株での 1 領域を除いて一致した。また、6 株は全て *lag-1* 遺伝子を有していた。C 施設において、R2 年度と H26 年度に分離された SG1 は ST、MLVA 型ともに一致した。D 施設において、R2 年度に分離された SG UT と R1、H30 年度に分離された SG6 は、SBT 法は未実施であるが、MLVA 型は一致した。

## 4 考察

R2 年度は新型コロナウイルス感染症の流行のため、4 月に初めて発出された緊急事態宣言により、市内の温泉地区においても多くの施設で、休業や施設の使用制限があったと思われる。その影響を受けて、宣言解除後に実

施した R2 年度の行政検査では、レジオネラ属菌検出率が高まることが危惧されたが、実際には検出率は上昇していなかった。これは営業再開に際し、各施設が感染防止対策を実施したことが一因と考えられた。

しかしながら、R2 年度は検出菌数の多い施設の割合が高いことが明らかとなった。また、着目した 5 施設の R2 年度の菌数は直近 5 年間で最も多かった(データ不掲載)。この要因としては、緊急事態宣言下の休業期間中の衛生管理が不十分であったことが考えられた。

着目した 5 施設において、R2 年度に分離された菌株のほぼ全てが、過去に分離されたものと同一の遺伝子型もしくは菌種であったことから、休業の影響を受け、施設内に定着していた菌株が増殖したことが、検出菌数増加の要因の一つと考えられた。また、D 施設においては他施設とは異なり、R2 年度に新たな遺伝子型の *L. pneumophila* が分離されていることから、外部からの菌株が混入したことも検出菌数増加の一因と考えられた。本施設は、2 泉源の混合泉を利用しており、露天風呂も設置されている。H24 年度以降、様々な遺伝子型の *L. pneumophila* が分離されていることから、露天風呂周りの環境や泉源、泉源を混合する貯湯槽など、外部から様々な遺伝子型の *L. pneumophila* が持ち込まれ、それらが増殖している可能性が示唆された。

さらに、A, B 施設のように長期間にわたって同一遺伝子型の菌株が施設内に定着することも明らかとなった。レジオネラ属菌はバイオフィームによって、外界の不利な条件(消毒剤など)から保護され、増殖の場となることから<sup>1)</sup>、バイオフィーム対策の重要性が確かめられた。特に B 施設は、病原性関連遺伝子 *lag-1* を保有する *L. pneumophila* が定着していることから、レジオネラ症への感染リスクの高い環境であると考えられるため、より一層の衛生管理が求められる。

以上の結果より、レジオネラ属菌を施設内に定着させないよう、常時からの衛生管理が重要であることに加え、施設休業後の再開時にはさらなる衛生管理が必要であることが示された。

## 5 参考文献

- 1) 中原俊隆: 第 4 版 レジオネラ症防止指針、公益財団法人日本建築衛生管理教育センター、2017

- 2) 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知 生食発 0919 第 8 号 “公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について” 令和元年 9 月 19 日
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課 事務連絡

- “施設の使用再開に伴うレジオネラ症への感染防止対策について” 令和 2 年 5 月 13 日
- 4) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル レジオネラ症、令和 2 年 9 月 1 日改訂

表 1 レジオネラ属菌検出率

	R2 年度	R1 年度	H30 年度	H29 年度	H28 年度
検査検体数 / 施設数	40 / 39	42 / 37	38 / 34	40 / 37	52 / 38
検出検体数 / 施設数 (菌数 10,000 CFU/100 mL 以上)	17 / 17 (5 / 5)	21 / 19 (3 / 3)	11 / 11 (0 / 0)	21 / 20 (4 / 4)	29 / 24 (5 / 3)
検出率 [%] (菌数 10,000 CFU/100 mL 以上)	42.5 / 43.6 (29.4 / 29.4)	50.0 / 51.4 (14.3 / 15.8)	28.9 / 32.4 (0 / 0)	52.5 / 54.1 (19.0 / 20.0)	57.7 / 63.2 (17.2 / 12.5)

表 2 5 施設において分離されたレジオネラ属菌種

施設	年度#1	菌種#2
A	R2	<i>L. londiniensis</i> , <i>L. israelensis</i>
	R1	<i>L. pneumophila</i> SG1/UT
	H30	<i>L. pneumophila</i> SG UT, <i>L. spp</i>
	H29	<i>L. pneumophila</i> SG UT, <i>L. londiniensis</i>
	H28	<i>L. londiniensis</i>
	H27	<i>L. pneumophila</i> SG6/UT, <i>L. israelensis</i> , <i>L. nagasakiensis</i>
	H26	<i>L. israelensis</i>
	H25	<i>L. israelensis</i>
	H24	<i>L. pneumophila</i> SG UT, <i>L. londiniensis</i> , <i>L. israelensis</i>
B	R2	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. londiniensis</i>
	H30	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. spp</i>
	H29	<i>L. pneumophila</i> SG1
	H28	<i>L. pneumophila</i> SG1
	H27	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. quinlivanii</i>
	H26	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. londiniensis</i>
	H25	<i>L. pneumophila</i> SG UT, <i>L. israelensis</i>
C	R2	<i>L. pneumophila</i> SG1, <i>L. londiniensis</i>
	H30	<i>L. spp</i>
	H29	<i>L. israelensis</i>
	H26	<i>L. pneumophila</i> SG1/UT
D	R2	<i>L. pneumophila</i> SG5/UT
	R1	<i>L. pneumophila</i> SG6
	H30	<i>L. pneumophila</i> SG6
	H29	<i>L. pneumophila</i> SG8
	H26	<i>L. pneumophila</i> SG8, <i>L. londiniensis</i> , <i>L. israelensis</i>
H24	<i>L. pneumophila</i> SG3/8, <i>L. israelensis</i>	
E	R2	<i>L. londiniensis</i> , <i>L. israelensis</i>
	H28	<i>L. israelensis</i>

H26	<i>L. londiniensis, L. israelensis</i>
H25	<i>L. israelensis</i>
H24	<i>L. israelensis</i>

#1: 不記載年度は不検出(10 CFU/100 mL 未満)。ただし、D 施設の H28 年度の検査は実施しなかった。

#2: *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌で、菌種同定未実施の菌株は *L. spp* と表記した。

表 3 分離された *L. pneumophila* の遺伝子型別解析結果

施設	年度	SG	ST <sup>#1</sup>	MLVA profile												lag-1 <sup>#2</sup>
				Lpms01	Lpms03	Lpms13	Lpms19	Lpms31	Lpms33	Lpms34	Lpms35	Lpms38	Lpms39	Lpms40	Lpms44	
A	R1	1	new1	8	8	0	4	17	4	2	19	0	10	4	9	-
	R1		1439													
	H30	UT	NT	6	8	9	0	12	2	2	19	0	10	4	9	NT
	H29		1439													
	H27															
	H27	6	new2	8	8	11	4	17	1	1	3	3	13	4	9	NT
H24	UT	1439	6	8	9	0	12	2	2	19	0	10	4	9	NT	
B	R2		new3													
	H30		NT													
	H29	1	new3	9	8	8	4	14	2	3	11	8	0	4	9	+
	H28		NT													
	H27															
	H26		new3									10				
H25	UT	2668	8	8	8	5	10	4	3	11	0	0	4	9	NT	
C	R2	1	2744	6	8	9	4	12	2	2	19	3	10	4	9	-
	H26															
	H26	UT	1117	9	8	9	4	12.5	4	2	24	3	11	5	0	NT
D	R2	5	NT	8	8	11	4	17	1	1	3	3	6	4	9	NT
	R2	UT														
	R1	6	NT	9	8	8	0	14	2	2	18	3	11	4	9	NT
	H30															
	H29	8	NT	7.5	7	11	4	4	4	1	16	0	12	5	9	NT
	H26	8	1547	9	8	11	0	14	5	4	27	0	11	4	9	NT
	H24		5													
	H24	3	1005	8	7	8	5	12	2.5	3	22	0	8	4	9	NT
H24	3	1996	0	7	8	5	12	2.5	3	22	0	8	4	0	NT	

#1: データベースに未登録の新規 ST を ST new1, 2, 3 とした。NT: not tested

#2: NT: not tested