

原 著

「24時間風呂」からの *Mycobacterium avium* complex の検出¹斎藤 肇 ¹村上 和保 ²石井 則久 ³権 赫間¹広島県環境保健協会, ²横浜市立大学皮膚科, ³ソウル保健大学臨床病理ISOLATION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX
FROM THE "24-HOUR BATH"¹Hajime SAITO, ¹Kazuyasu MURAKAMI, ²Norihisa ISHII,
and ³Hyuk Han KWON¹*Hiroshima Environment and Health Association,
²Yokohama City University, ³Seoul Health College

The "24-HOUR BATH" is an apparatus which circulates the bath water, keeps it clean and warm, and makes it possible to take a bath at any time during the day or night. It consists of apparatus for cleaning (sponge or mesh filter and filter material), heating (ceramic heater), and sterilizing (UV lamp). Recently, three cases of skin disease due to *M. avium* infection in private homes, in which "24-HOUR BATH" water was suspected to be the source of infection, have been reported. We attempted to isolate *M. avium* complex from the water (32 specimens), sponge filter (29 specimens), and filter material (32 specimens) of the "24-HOUR BATH". One hundred-ml samples of bath water, and 50-ml samples of rinse from a sponge filter or filter material were centrifuged at 3000 rpm for 20 min. Sediment was suspended in distilled water and a smear was prepared, and then digested and decontaminated with 2% sodium hydroxide. The processed specimens were cultured on 2% Ogawa medium containing ofloxacin (1 µg/ml) and ethambutol (2.5 µg/ml) for 8 weeks at 37°C. Positive smears were 3 (9.4%), 25 (86.2%) and 25 (78.1%) specimens from the water, sponge and filter material, respectively. A few bacterial clumps were observed, especially in the sponge specimens. The number of positive culture was 5 (15.6%), 24 (82.8%) and 25 (78.1%) from the water, sponge and filter material, respectively. Among them the number of Runyon's Group III-positive cultures was 5 (100%), 22 (91.7%) and 20 (80%) in the water, sponge, and filter material specimens, respectively. In most cases, cultures were positive for both the sponge and filter material specimens. All of the Group III mycobacteria were smooth, grew at 28, 37, 42, and 45 °C, negative for niacin, nitrate reductase, semiquantitative catalase, urease and Tween80 hydrolysis, and positive for 68°C catalase. All of the strains reacted with *M. avium* complex AccuProbe and *M. avium* AccuProbe, but none of the strains reacted with *M.*

*〒730-8631 広島県広島市中区広瀬北町9-1

* 9-1, Hirosekita-machi, Naka-ku, Hiroshima-shi Hiroshima 730-8631 Japan.

(Received 29 Jul. 1999/Accepted 4 Oct. 1999)

intracellulare AccuProbe. Therefore, all the Group III isolates were identified as *M. avium* by the culture, biochemical and genetical characteristics.

Key words: *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium avium*, "24-HOUR BATH"

キーワード: トリ型菌群, トリ型菌, 「24時間風呂」

はじめに

「24時間風呂」は浴水を浄化しながら循環し、保温する装置で、これにより、きれいな風呂に24時間いつでも入れ、かつ経済的で、わが国では140万世帯で用いられている¹⁾。本装置はメーカーによって多少とも異なるが、浴水の浄化(スポンジやメッシュのフィルターと濾材(浄化石)), 加熱(セラミックヒーター)および殺菌(紫外線, 塩素, オゾン, 高温)などの部分よりなっている(Fig. 1)。

最近、「24時間風呂」の浴水が感染源と考えられた、同一家族内における *M. avium* による皮膚感染症の3例^{2)~4)}が報告されている。そこで、今回われわれは「24時間風呂」の浴水に加え、フィルターおよび濾材の *M. avium* complex による汚染状況を明らかにするためその検出を試みた。

材料と方法

検体: 「24時間風呂」11メーカーの厚意により、関東・甲信越(18), 中部(2), 近畿(3), 中国・四国(6)および九州(3)における32家庭の「24時間風呂」の各々より採取された浴水32検体, スポンジフィルター(以下フィルター)29検体および濾材32検体を供試した。

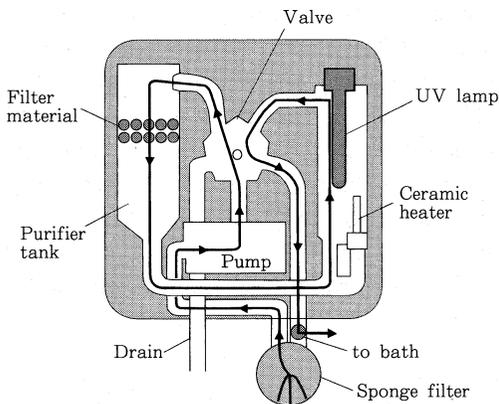


Fig. 1 Apparatus of the "24-HOUR BATH"

浴水は滅菌した200 ml ネジ蓋付メジウム瓶に、フィルターは滅菌した500 ml 蓋付プラスチック容器に、また、濾材は滅菌した100 ml ネジ蓋付メジウム瓶に採取後、「クール宅配便」で送付され、受領後直ちに、あるいは4℃, 1夜保存後に供試した。

検体処理: 浴水100 ml, フィルターは滅菌蒸留水50 mlを加えて数回絞り出しを繰り返して得られた洗浄液, また、濾材は滅菌蒸留水50 mlを加えて強く振盪して得られた洗浄液を1~2本の50 ml 遠心管(Falcon)へ移し, 3000 rpm, 20分遠心した。そして得られた沈殿物を滅菌蒸留水1 mlに浮遊させ, その1白金耳で塗抹標本を作った後, 等量の4% NaOHを加えてVortex mixerで攪拌し, 室温で20分間—その間, 時々振盪・攪拌—処理した。

培養: 上記処理検体の各0.1 mlを ofloxacin (1 μg/ml)・ethambutol (2.5 μg/ml) 含有2% 小川培地に接種後, 37℃, 8週間培養した。

分離菌の純化: 蒸留水による分離菌の微濁浮遊液をMiddlebrook 7H11平板に画線し, 5% CO₂ ふらん器内で37℃, 2週間培養後, 顕微鏡(40倍)下で観察し, S型, 扁平, 透明の孤立集落1個を釣菌し, Middlebrook 7H9培地(2 ml)で増菌後, 4℃に保存した。

分離菌の同定: 上記純化菌を接種した2%小川培地あるいはMiddlebrook 7H9培地上発育菌を供試して, 培養・生化学的性状⁵⁾並びに *M. avium* complex, *M. avium* および *M. intracellulare* 各 AccuProbe を用いたDNAプローブテスト⁶⁾を行った。

結果

塗抹検査: Table 1に示すように, 抗酸菌塗抹陽性検体は, 浴水32例中3例(9.4%), フィルター29例中25例(86.2%), 濾材32例中25例(78.1%)であった。塗抹陽性例の検出菌数について見ると, 浴水では全例において極めて少なく(rare), 菌塊検出例はなかったが, フィルターでは少数(few)ないし多数(numerous)菌の検体が25例中17例(68%), また, 濾材では25例中12例(48%)も見られた上, 多数菌検出例では, 少なくともフィルターにおいてはほとんどの検体(15例中13例)に菌塊が見られた(Fig. 2)。

Table 1 Detection of acid-fast bacilli in the stained smears prepared from the "24-HOUR BATH" specimens

Specimens	Number of specimens	Smear		Number of acid-fast bacilli ^a		
		Positive	Negative	Rare	Few	Numerous
Bath water	32	3 (9.4%)	29 (90.6%)	3 (0) ^b	0 (0)	0
Sponge filter	29	25 (86.2)	4 (13.8)	8 (0)	2 (0)	15 (13)
Filter material	32	25 (78.1)	7 (21.9)	13 (0)	4 (0)	8 (3)

^a rare, 3 to 9 bacilli per slide; few, 10 or more bacilli per slide; numerous, 1 or more bacilli in most oil immersion fields.

^b Parentheses indicate the number of smears with bacterial clumps.

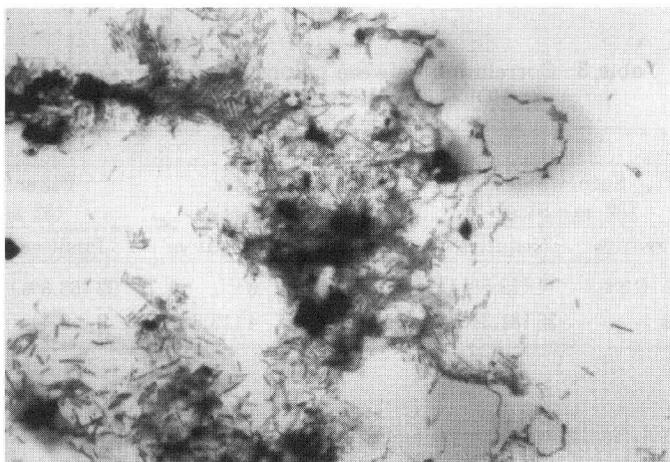


Fig. 2 Acid-fast bacilli in a sponge filter specimen (Ziehl-Neelsen stain, ×1000)

Table 2 Positive cultures of mycobacteria from the "24-HOUR BATH" specimens

Specimens	Number of specimens	Number of strains	Growth ^a			
			1+	2+	3+	4+
Bath water	32	5 (15.6%)	5	0	0	0
Sponge filter	29	24 (82.8)	7	4	5	8
Filter material	32	25 (78.1)	8	9	3	5

^a 1+, 1-200 colonies; 2+, over 200 distinct colonies; 3+, heavy but not confluent growth; 4+, medium covered with confluent growth.

培養検査: Table 2に示すように, 培養陽性検体は浴水32例中5例(15.6%), フィルター29例中24例(82.8%)および濾材32例中25例(78.1%)であった。培養陽性例における菌発育の程度について見ると, 浴水では全例が1+であったのに対して, フィルターおよび

濾材では2+~4+の発育の見られたものがそれぞれ24例中17例(70.8%)および25例中17例(68%), 3+~4+のものが前者で24例中13例(54.2%), 後者で25例中8例(32%)見られた。塗抹および培養両検査成績の関係について見ると, Table 3に示すように, 塗抹陽

性・培養陽性例は浴水では32例中2例(6.3%)にすぎなかったが、フィルターおよび濾材ではそれぞれ29例中24例(82.8%)および32例中22例(68.8%)も見られた。さらにこれを、検体組合せ別抗酸菌分離について見ると、Table 4に示すように、「浴水菌分離陰性・フィルター、濾材菌分離陽性」例(32検体中16検体、16菌株)が最も多く、次いで「浴水・フィルター・濾材菌分離陽性」例(32検体中5検体、5菌株)であった。

分離菌のRunyon分類: Table 5に示すように、浴水では分離全菌株(5株)、フィルターではIV群菌2株を除いた22菌株(91.7%)、また、濾材ではII群菌1株およびIV群菌4株を除いた20菌株(80%)がIII群菌で

あった。これを、浴水については前回の浴水交換から今回の浴水検体採取までの日数別に、また、フィルターおよび濾材では前回の洗浄から今回の各検体採取までの日数別に、III群抗酸菌の分離頻度との相関について見ると、それぞれTable 6-1、Table 6-2およびTable 6-3のようになり、いずれにおいても相関は見られなかった。興味あることにはフィルターおよび濾材では洗浄したにもかかわらず、早期から高率にIII群菌が分離されたことである。

分離III群菌の同定: 培養・生化学的・分子遺伝学的性状は一括してTable 7に示した。すなわち、分離菌はいずれも非光発色性、遅発育で、S型、28、37、42およ

Table 3 Correlation between culture and smear from the "24-HOUR BATH" specimens

Culture	Smear					
	Bath water (32 samples)		Sponge filter (29 samples)		Filter material (32 samples)	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	2 (6.3%)	4 (12.5%)	24 (82.8%)	0	22 (68.8%)	3 (9.4%)
Negative	0	26 (81.3)	1 (3.4)	4 (13.8%)	3 (9.4)	4 (12.5)

Table 4 Isolation of mycobacteria in combinations of the specimens

Specimens			Number of specimens
Bath water	Sponge filter	Filter material	
+	+	+	5 (15.6%)
-	+	+	16 (50.0)
-	+	-	3 (9.4)
-	-	+	1 (3.1)
-	NS ^a	+	3 (9.4)
-	-	-	4 (12.5)
Total			32 (100%)

^aNot sampled.

Table 5 Runyon's classification of mycobacteria isolated from the "24-HOUR BATH" specimens

Specimens	Number of specimens	Number of strains	Groups (Runyon)			
			I	II	III	IV
Bath water	32	5	0	0	5 (100%)	0
Sponge filter	29	24	0	0	22 (91.7)	2 (8.3%)
Filter material	32	25	0	1 (4%)	20 (80)	4 (16)

Table 6-1 Days of sampling after the last change of the bath water and isolation of Group III mycobacteria

Days	Number of samples	Number of positive Group III
1	0	0
2	1	0
3	1	0
4	2	1 (50%)
5	4	0
6	2	0
7	1	1 (100)
8	0	0
9	1	0
10	2	2 (100)
11-20	6	1 (16.7)
21-30	2	0
31-40	0	0
41-50	0	0
51-60	4	0
61-100	3	0
101-200	1	0
> 200	2	0
Total	32 (100%)	5 (15.6%)

び45℃で発育可能、ナイアシン、硝酸還元、ウレアーゼおよび半定量カタラーゼ陰性、68℃カタラーゼ陽性であった。Tween80水解は5日法全株陰性、10日法少数株に陽性を示すものがあった。したがって、分離Ⅲ群菌の全菌株が培養・生化学的諸性状より *M. avium* complex と同定された。さらに、Table 8 に示すように供試Ⅲ群菌株はすべてが DNA プローブ法で *M. avium* complex AccuProbe および *M. avium* AccuProbe と反応し、*M. intracellulare* AccuProbe と反応したものはなく、分子遺伝学的にも *M. avium* と同定された。

考 察

M. avium complex 感染症は細胞性免疫低下患者、特に AIDS 患者における日和見感染症として注目されており、適切な治療薬がなく、一般に予後は不良とされている⁷⁾。本菌群の感染源は水、土壌などの自然界と考えられており⁸⁾、Saito と Tsukamura⁹⁾ は銭湯から本菌群が高率に分離されることについて、また斎藤ら¹⁰⁾ は関東以西の土壌から分離した本菌群と、患者由来菌との血清型別について報告している。

ところで、わが国では浴水を循環させ、清潔に温かく

Table 6-2 Days of sampling after the last washing of the sponge filter and isolation of Group III mycobacteria

Days	Number of samples	Number of positive Group III
1	16	13 (81.3%)
3	5	3 (60)
5	4	3 (75)
6	3	2 (66.7)
7	1	1 (100)
Total	29 (100%)	22 (75.9%)

Table 6-3 Days of sampling after the last washing of the filter material and isolation of Group III mycobacteria

Days	Number of samples	Number of positive Group III
1-10	11	8 (72.7%)
11-20	1	1 (100)
21-30	3	3 (100)
31-40	0	0
41-50	0	0
51-60	7	3 (42.9)
61-100	5	4 (80)
101-200	3	1 (33.3)
> 200	2	0
Total	32 (100%)	20 (62.5%)

保ち、24時間中いつでも入浴できるという「24時間風呂」が開発され、一般家庭でも用いられている。近年になって、「24時間風呂」の浴水の *Legionella* による汚染¹¹⁾ 並びにそれが感染源と考えられたヒトの肺炎の1例¹²⁾ が、また、*M. avium* による「24時間風呂」浴水の汚染¹³⁾¹⁴⁾ 並びに「24時間風呂」浴水が感染源と考えられた母子²⁾、兄弟³⁾、姉妹⁴⁾ における皮膚感染症の3例が報告され学界で注目されている。今回、われわれが行った「24時間風呂」の浴水とその浄化装置であるスポンジフィルター並びに濾材（浄化石）の *M. avium* complex による汚染状況についての検討によれば、フィルター並びに濾材は本菌群のメンバーである *M. avium* によって高率かつ著しく汚染されていたが、浴水はそれらに比べて汚染率、汚染度ともにはるかに低かった。この「24時間風呂」浴水から分離の *M. avium* は、もともと浴水あるいは体表面由来菌と考えられるが、入浴により生じた垢や塵などとともにフィルター並びに濾材に

トラップされてそこで増殖し、浴水中に遊離、循環するものと思われる。Saito と Tsukamura の銭湯分離菌⁹⁾ (1976年, 培養・生化学的性状から *M. intracellulare* と同定, 報告したが, その後, DNA プローブとの反応性より *M. avium* と同定), 藪内¹³⁾ および今回のわれわれの「24時間風呂」からの分離 *M. avium* complex はいずれも *M. avium* であり, *M. intracellulare* は分離されていないが, 李ら¹⁴⁾ は本菌群 23 株中 22 株は *M. avium* で 1 株が *M. intracellulare* であったという。最近われわれが関東から九州に至る 6 カ所で採取した土壌から分離した *M. avium* complex 12 株のすべてが *M. intracellulare* であった (未発表) ことから, 本菌が水からも分離されることが推定される。事実 Goslee

と Wolinsky (米国)¹⁵⁾ は 11 株の血清型別可能 *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* complex 中 *M. intracellulare* 血清型¹⁶⁾ 7 株 (14型 5 株; 18型 2 株) を分離している。そこで, 「24時間風呂」よりの分離菌が *M. avium* のみで *M. intracellulare* が検出されない一要因として浴温 (42℃前後) における両菌種の発育温度差があげられるのではなかろうか。ちなみに, われわれの「24時間風呂」由来 *M. avium* (47 株) および新鮮分離土壌由来 *M. intracellulare* (11 株) の Middlebrook 7H9 培地を用いた 42℃並びに 45℃の発育能についての検討によれば, 42℃では, *M. avium* の全菌株が発育陽性であったのに対して, *M. intracellulare* では 7 株 (63.6%) までもが発育陰性, また, 45℃では,

Table 7 Culture and biochemical characteristics of Group III mycobacteria isolated from the "24-HOUR BATH" specimens

Characteristics	Mycobacteria isolated from		
	Bath water (5 strains)	Sponge filter (22 strains)	Filter material (20 strains)
Pigment			
In dark	—	—	—
Photoactive	—	—	—
Colony morphology	smooth	smooth	smooth
Growth at			
28, 37, 42, 45°C	+(1) ^a	+(1) ^a	+(2) ^a
Niacin	—	—	—
Nitrate reductase	—	—	—
Urease	—	—	—
Catalase	—	—	—
68°C catalase	+	+	+
Tween hydrolysis			
5 days	—	—	—
10 days	—	-(3) ^b	-(2) ^b

^a Number of negative strains at 45°C.

^b Number of positive strains.

Table 8 DNA probe tests for Group III mycobacteria isolated from the "24-HOUR BATH" specimens

Specimens	Number of strains	Number of DNA probe-reactive strains		
		<i>M. avium</i> complex	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
Bath water	5	5	5	0
Sponge filter	22	22	22	0
Filter material	20	20	20	0

M. avium 43株 (91.5%) が発育陽性であったのに対して、*M. intracellulare* では全菌株が発育陰性であった。

今後、*M. avium* による「24時間風呂」浴水の汚染対策として、使用者としてはメーカーの指示した浴水の交換、フィルター、濾材、並びに浴槽の洗浄時期の厳守、またメーカーとしては、循環浴水の殺菌法の検討、改良が急がれよう。今回のわれわれの検討によれば、洗浄したフィルターおよび濾材からもすでに早期から高率にⅢ群菌 (*M. avium*) が分離されているが、これは恐らく、洗浄が単なる「見た目がきれいになった洗浄」とどまり、除菌が不十分なためと考えられる。したがって、今後、一定の消毒剤中での洗浄、浸漬後、水洗、乾燥したものの再利用が望まれる。

文 献

- 1) 24時間風呂協議会説明書：「24時間風呂がよくわかる本」, 24時間風呂協議会, 東京, 1997, 1-14.
- 2) 伊藤 薫, 伊藤雅章, 尾崎京子, 他：24時間風呂の関与が疑われる *Mycobacterium avium* 皮膚感染症の母子例. 皮膚病診療. 1998; 20: 703-706.
- 3) 田畑伸子, 加藤泰三, 田上八朗：家族内発生のみられた *Mycobacterium avium* 皮膚感染症. 日皮会誌. 1998; 108: 621.
- 4) 楠原正幸, 松尾圭三, 森 理, 他：24時間風呂が感染源と考えられた皮膚 *Mycobacterium avium* 感染症の姉妹例. 日皮会誌. 1999; 109: 444.
- 5) 斎藤 肇：同定法. 「抗酸菌検査法, 遺伝子技術による迅速診断」, 第1版, 斎藤 肇, 阿部千代治監修, 医歯薬出版, 東京, 1997, 25-40.
- 6) 富岡治明, 斎藤 肇：AccuProbe. 「抗酸菌検査法, 遺伝子技術による迅速診断」, 第1版, 斎藤 肇, 阿部千代治監修, 医歯薬出版, 東京, 1997, 41-52.
- 7) Horsburg CR Jr, Havlik JA, Ellis DA, et al.: Survival of patients with AIDS and disseminated *Mycobacterium avium* complex infection with and without mycobacterial therapy. Am Rev Res Dis. 1991; 144: 557-559.
- 8) Wayne LG, Kubica GP: The mycobacteria. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, The Williams Co., Baltimore, U.S.A., 1986, 1435-1457.
- 9) Saito H, Tsukamura M: *Mycobacterium intracellulare* from public bath water. Jap J Microbiol. 1976; 20: 561-563.
- 10) 斎藤 肇, Dawson D, 甲斐雅規, 他： *Mycobacterium avium* complex の自然環境における地理的分布並びに AIDS・非 AIDS 患者株の血清型. 結核. 1998; 73: 379-383.
- 11) 高橋武秀, 藪内英子, 遠藤卓郎, 他：「24時間風呂」の衛生問題と行政の対応. 環境感染. 1998; 13: 129-136.
- 12) 峯下昌道, 庄田慎一, 清田 康, 他：循環式浴槽が感染源と考えられたレジオネラ肺炎の一例. 感染症誌. 1999; 73: 156.
- 13) 藪内英子, 坂井小枝住, 不破和美, 他： *Mycobacterium avium* : 家庭用 24 時間風呂濾材, フィルター, および浴槽水からの検出. 環境感染. 1998; 13: 87.
- 14) 李 娜, 宮田町子, 江崎孝行：24時間循環風呂から分離された抗酸菌. 日臨微誌. 1999; 9: 176-177.
- 15) Goslee S, Wolinsky E: Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1976; 113: 287-292.
- 16) Saito H, Tomioka H, Sato, K, et al.: Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes. J Clin Microbiol. 1989; 27: 994-997.