

秋田県内におけるレジオネラ属菌の汚染実態 および分離菌のAP-PCR法による型別について

木内 雄 八柳 潤 齊藤志保子 佐藤 宏康

秋田県内におけるレジオネラ属菌の汚染状況を把握するため、特定建築物の冷却塔水、給湯水および温泉保養施設の源泉水、浴槽水の実態調査を実施した。冷却塔水からは42.0%、給湯水からは18.9%、源泉水からは32.0%、浴槽水からは41.9%のレジオネラ属菌が分離され、県内でのレジオネラ属菌の汚染が明らかとなった。冷却塔水と給湯水に高頻度に検出された菌は *Legionella pneumophila* の血清群1（以下 L. P SG1 と略す）で、この菌種が県内に広く分布していることが明らかとなった。冷却塔水中のレジオネラ属菌数には季節変動が認められた。一方、給湯水からはレジオネラ属菌が多種類検出されたが、*Legionella bozemanii*（以下 L. bozemanii と略す）等の様に、一種類のレジオネラ属菌が特定の施設から断続的に分離される傾向が認められた。源泉水及び浴槽水中のレジオネラ属菌数では季節変動は認められなかったが、分離菌種は給湯水と同様に特定の施設から同一菌種が断続的に分離される傾向が認められた。

また、県内に広く分布していると推測される L. P SG1 の生態を解明するため、冷却塔水等から分離された菌を対象として Arbitrarily primed PCR（以下 AP-PCR と略す）を検討したところ、幾種類かのパターンに分類が可能であり、この手法を利用した疫学的な解析法は有用であると考えられた。

キーワード：*Legionella pneumophila* 血清群1, 季節変動, 冷却塔水, AP-PCR 法

I はじめに

レジオネラ症は1970年代後半、米国でレジオネラ肺炎（在郷軍人病）と非肺炎型のポンティアック熱の2つの病型が発表されて以来、世界各国から多数の散発例や集団発生例が報告されている¹⁾。

日本においてはレジオネラ症の組織的な調査は実施されていないが、厚生省レジオネラ症研究班によれば、1979年から1992年までの14年間にレジオネラ肺炎と診断された患者は80例で海外の報告例と比較して少ない。しかし、致死率は市中感染者で26%、院内感染者では53%と外国のそれより高率であった²⁾。レジオネラ属菌は自然界の土壌や水に広く生息し、本菌に汚染された冷却塔水、温泉、渦流浴等がレジオネラ症の感染源になり得ると言われている。その中でも、冷却塔はエアロゾルを大量に飛散するため、レジオネラ症の感染源として非常に重要視されている³⁾。また、給湯水についてもレジオネラ属菌による高度汚染が近年明らかとなってきた⁴⁾。

レジオネラ症の感染源として重要な人工環境水中におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握することは、環境衛生上重要である。しかし、秋田県内での汚染調査は行われておらず、その実態も明らかとはなっていない。我々は平成7年度から特定建築物の冷却塔水および給湯水また温泉保養施設の源泉水および浴槽水を対象とし、汚染の実態把握を目的としたレジオネラ属菌の調査を実施した。また冷却塔水について分離された L. P SG1 に

ついて AP-PCR を行い、疫学解析法としての有用性について検討したので併せて報告する。

II 材料と方法

1. 実態調査

1) 調査対象施設及び検体採取

表1に示した秋田県内の特定建築物10施設、温泉保養施設10施設を検査定点とし、冷却塔水および給湯水については1995年6月から1996年5月まで毎月採取した。ただし、冷却塔水については、稼働期間中のみ採取した。源泉水及び浴槽水については1995年6月から1996年4月までの偶数月に採取した。特定建築物については冷却塔水69検体、給湯水106検体の計175検体、また温泉保養施設については源泉水50検体、浴槽水62検体の計112検体を供試した。

2) 方法

「厚生省監修：レジオネラ症防止指針」に従い、以下の方法⁵⁾で検査を実施した。

- ①検水200mlを6000回転30分冷却遠心し、得られた沈渣に滅菌蒸留水1mlを加えた。
- ②0.2M HCl・KCl バッファー (pH 2.2) を1ml加え、検水の100倍濃縮液とし25℃4分放置した後、100μlをMWY寒天培地に塗抹し、37℃、5～7日間培養した。

③灰白色湿潤集落のコロニー数をカウントし、L-システイン要求性を確認した。

④L-システイン要求性の菌株をレジオネラ属菌と推定し、更に血清学的試験により同定を試みた。

⑤血清学的に同定できなかった菌株については、Legionella 属（以下 LEG と略す）および L. pneumophila（以下 LP と略す）を同定するためのPCR法を行った。

2. AP-PCR解析

実態調査を実施した冷却塔から分離された L. P SG1 24株と、源泉水および浴槽水から分離された L. P SG1 6株を供試した。

AP-PCRは Alex van Belkum らの方法に準じて図1に示す方法^{6), 7)}で実施した。

図-1 AP-PCR 条件

Primers		
AS-11	5'- TGC AGG ACA AAT GCA AGC AGT -3'	21mer
AS-21	5'- TCC ACC CGA AAA TGG TAT TCC -3'	21mer
AP-PCR Reaction Mixture		
KCl	50 mM	
Tris-HCl	10 mM (pH9.0)	
TritonX-100	0.01 %	
dNTP	100 μM	
Primer	1 μM	
MgCl ₂	2 mM	
Taq DNA polymerase(Tic Tac)	0.5 U/20 μl	
Total volume	20 μl	
Heat cycle		
	40 cycles	
denaturation	1min at 94°C	
annealing	1min at 25°C	
extension	2min at 74°C	
Electrophoresis		
	2% agarose gel	

III 結果及び考察

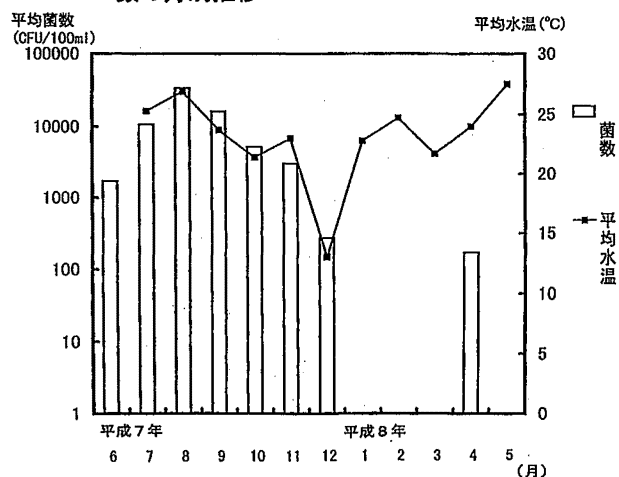
1. 実態調査

表1に示すように冷却塔水において、レジオネラ属菌は69検体中29検体（陽性率42.0%）から分離された。調査した6月から翌年の5月までのうち7, 8, 9月の陽性率は60%を越えており、特に9月は80%と最も高い陽性率であった。一方、冷却塔水中のレジオネラ属菌数は図2に示したように7, 8, 9月に増加しこれに伴いレジオネラ症防止指針に定める要注意範囲（ $10^3 \sim 10^5$ 未満/100ml）⁸⁾に達する施設が7月に3施設、8月に5施設、9月に3施設認められた。このことは夏期の気温の上昇に伴い、冷却塔水の水温が上昇したと関連があると考えられた。

表-1 特定建築物、温泉保養施設からのレジオネラ属菌月別検出状況（平成7年）

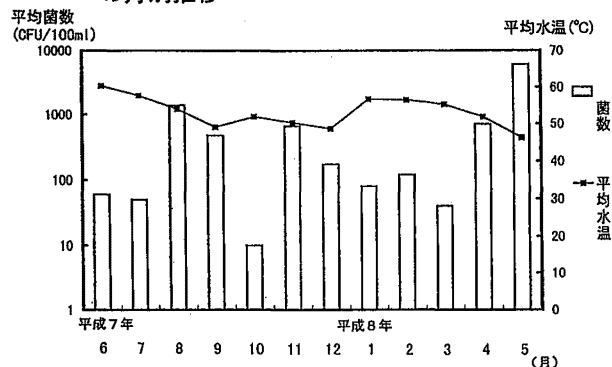
	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	合計
冷却塔水													
検査施設数	10	10	10	10	8	3	3	3	3	3	3	3	69
分離陽性数	1	6	6	8	5	1	1	0	0	0	1	0	29
陽性率(%)	10.0	60.0	60.0	80.0	62.5	33.3	33.3	—	—	—	33.3	—	42.0
給湯水													
検査施設数	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	9	9	106
分離陽性数	1	2	3	2	1	2	2	1	1	1	2	2	20
陽性率(%)	11.1	22.2	33.3	22.2	11.1	22.2	22.2	11.1	12.5	12.5	22.2	22.2	18.9
源泉水													
検査施設数	9	9	9	9	8	7	8	8	8	8	8	8	50
分離陽性数	1	2	2	3	2	2	4	4	4	4	4	4	16
陽性率(%)	11.1	22.2	22.2	33.3	25.0	28.6	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	32.0
浴槽水													
検査施設数	10	11	11	11	10	8	9	9	9	9	9	9	62
分離陽性数	3	2	2	6	5	3	7	7	7	7	7	7	26
陽性率(%)	30.0	18.2	18.2	54.5	50.0	37.5	77.8	77.8	77.8	77.8	77.8	77.8	41.9

図-2 特定建築物の冷却塔水におけるレジオネラ属菌数の月別推移



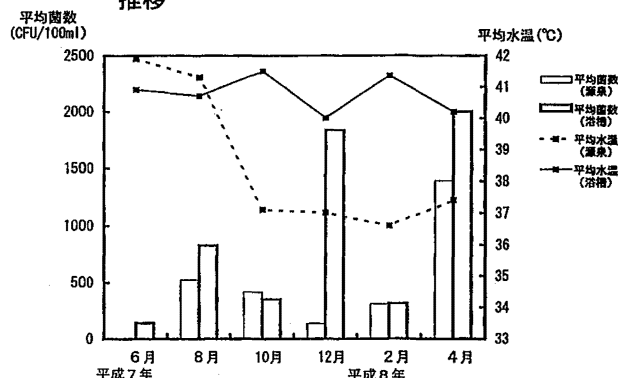
給湯水については表1よりレジオネラ属菌が106検体中20検体（陽性率18.9%）から分離され、月毎の陽性率は10%~30%台を示し、大きな月別変動は認められなかった。また、菌数の月別推移を図3に示したが、顕著な月別変動は見られなかった。このことは給湯器が季節に関係無く、一定の温度調節がなされているためと推察された。

図-3 特定建築物の給湯水におけるレジオネラ属菌数の月別推移



温泉保養施設では源泉水については表1より50検体中16検体（陽性率32.0％）から、浴槽水については62検体中26検体（陽性率41.9％）からレジオネラ属菌が分離された。また図4に示すように明らかな菌数の季節変動は確認されなかった。

図－4 温泉保養施設におけるレジオネラ属菌数の月別推移



一方、表2に示したように分離された菌種は L. P SG1 が10施設中9施設から分離され、この菌種が広範囲に存在していることが明らかとなった。給湯水から分離された菌種に関しては、L. P SG1 の分離数が多かったが、L. bozemanii, L. micdadei, L. P SG6 等、多種類のレジオネラ属菌が断続的に分離され、ある施設では L. bozemanii などの特定のレジオネラ属菌が常在している可能性が示唆された。源泉水及び浴槽水から分離されたレジオネラ属菌の菌種に関しては、冷却塔水とは異なり、L. P SG1 以外の LP も頻繁に分離され、L. P SG1, SG3, SG4, SG5, SG6 が特定の施設に常在している傾向がみられた。

表－2 分離されたレジオネラ属菌及び検出施設数

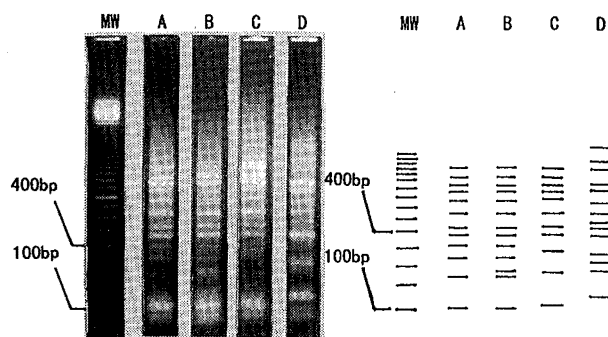
菌 名	(血清群)	分離株数(%)	検出施設数(※)			
			冷却塔水	給湯水	源 水	浴槽水
L. pneumophila	1	37 (32)	9	3	1	3
L. pneumophila	3	4 (3)	—	—	1	2
L. pneumophila	4	6 (5)	—	—	2	2
L. pneumophila	5	12 (10)	—	1	1	2
L. pneumophila	6	15 (12)	—	1	3	4
L. pneumophila	UT	3 (3)	—	—	1	1
L. bozemanii		9 (7)	3	2	—	—
L. micdadei		2 (2)	—	1	—	—
Legionella spp.		30 (26)	3	3	4	7
合計 118 (100)						
※) 調査対象施設数			冷却塔水 10箇所	給湯水 9箇所	源 水 9箇所	浴槽水 10箇所

2. AP-PCR解析

冷却塔水から分離された L. P SG1 24株についての AP-PCR を行ったところ、図5に示すとおり4種のパターン（A型、B型、C型、D型）に型別することが可能であった。1種（D型）を除いた3種のパターンは、約400bp以上のDNA増幅断片の領域では違いは認められなかったが100bpから400bpの領域の増幅断片に違いが認められた。また図6に示したように温泉保養施設から検出された L. P SG1 6株は泳動パターンが多彩で5つの型（E型、F型、G型、H型、I型）に分類された。しかも冷却塔のパターンと比較すると明らかに異なっていた。また表3に示したように、冷却塔水の採取施設別に検出された菌のAP-PCRパターンを検討したところ、b施設、f施設、及びi施設では同じパターンの L. P SG1 が継続的に検出された。特に秋田市から約40キロ離れたi施設では、他の施設から検出されなかったパターンを持つ L. P SG1（C型）のみが検出された。このことより、ある施設の冷却塔には特定のパターンを示す L. P SG1 が常在していると推測された。

これらのことから、AP-PCR法は L. P SG1 の疫学解析に有用であることが示唆された。

図－5 冷却塔水から分離された L. P SG1 のAP-PCRパターン



図－6 冷却塔水と温泉水から分離された L. pneumophila SG1 のAP-PCRパターンの比較

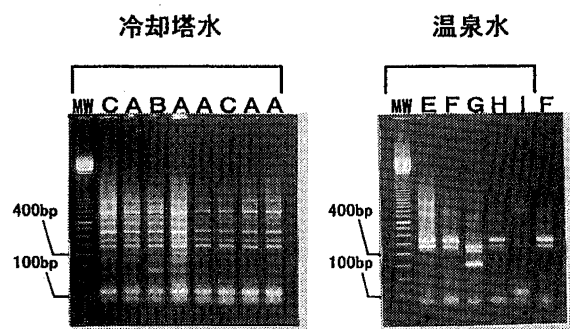


表-3 特定建築物の冷却塔水から検出された
L. P SG1 のAP-PCRパターン

Cooling Towers	AP-PCR pattern (Number of Isolates)
1. a	A(2), B(1)
2. b	A(6)
3. c	A(2)
4. d	A(1), D(1)
5. e	A(1)
6. f	B(4)
7. g	B(1)
8. h	B(1)
9. i	C(4)
10. j	—

IV まとめ

1. 秋田県内のレジオネラ属菌の分離率は、冷却塔水42.0%, 給湯水18.9%, 源泉水32.0%, 浴槽水41.9%であった。
2. 冷却塔水、給湯水ともに高頻度に検出された菌種はL. P SG1であり、この菌種が秋田県内でも広く存在していることが明らかとなった。
3. 冷却塔水中のレジオネラ属菌数には季節変動が認められたが、これは冷却塔内の水温の季節変動に関連していると考えられた。また、夏期の菌数が要注意範囲に達する施設が確認されたことは、これからの施設管理指導を行う上で検討すべき課題と考えられた。
4. 給湯水中のレジオネラ属菌数には明らかな季節変動は認められなかった。また分離菌種については、冷却塔水と比較して、L. bozemanii, L. micdadei, L. P SG6等と多彩であり、特にL. bozemaniiなど一種類のレジオネラ属菌が、特定の施設から断続的に分離される傾向が認められた。
5. 源泉水及び浴槽水のレジオネラ属菌数では季節変動は認められなかったが、 $10^3 \sim 10^5$ 未満/100mlに達する施設が半数を占めた。また分離菌種ではL. P

SG1と同程度にL. P SG3, SG4, SG5, SG6が確認され給湯水と同様に特定の施設から断続的に分離される傾向が認められた。

6. 冷却塔水から分離されたL. P SG1はAP-PCRパターンが4種に型別可能であること、また、冷却塔水由来L. P SG1と温泉水由来L. P SG1のAP-PCRパターンは異なることが確認されたため、AP-PCR法はL. P SG1の疫学解析の手法として有用であると考えられた。

V 文献

- 1) ビル管理教育センター. 序文. 厚生省監修. レジオネラ症防止指針. 東京: ビル管理教育センター, 1994; 1-5
- 2) ビル管理教育センター. レジオネラ症の臨床. 厚生省監修. レジオネラ症防止指針. 東京: ビル管理教育センター, 1994; 2-5
- 3) ビル管理教育センター. レジオネラ属菌の細菌学. 厚生省監修. レジオネラ症防止指針. 東京: ビル管理教育センター, 1994; 6-10
- 4) 古畑 勝則, 他. 給湯水におけるレジオネラ汚染とその対策. 日本公衛誌, 1994; 41; 1073-1082
- 5) ビル管理教育センター. レジオネラ属菌検査の実際. 厚生省監修. レジオネラ症防止指針. 東京: ビル管理教育センター, 1994; 32-39
- 6) ALEX VAN BELKUM, MARK STRUELENS, WIN QUINT. Typing of *Legionella pneumophila* Strains by Polymerase Chain Reaction-Mediated DNA Fingerprinting. J. Clin. Microbiol, 31; 1993; 2198-2200
- 7) E. Ledesma, et al. Subtyping of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Can. J. Microbiol, 1995; 41; 846-848
- 8) ビル管理教育センター. レジオネラ属菌の検出菌数とその意義付け. 厚生省監修. レジオネラ症防止指針. 東京: ビル管理教育センター, 1994; 19