

沖縄県における修景用水の*Legionella*属菌汚染状況調査(2004)

久高 潤・中村正治・糸数清正・平良勝也・安里龍二

Legionella Contamination in Artificial waterfall and fountains in Okinawa, 2004

Jun KUDAKA, Masaji NAKAMURA, Kiyomasa ITOKAZU, Katsuya TAIRA, Ryuji ASATO

要旨：2004年10月沖縄本島及び八重山保健所管内28施設の公園，ホテル，観光施設，商業及び公共施設の噴水と人工滝を対象にレジオネラとその宿主となるアメーバの調査を実施した。調査した28施設のうち8施設（29）%から*Legionella*属菌が検出された。特に那覇市及び浦添市から検体を採取した中央保健所管内の検出率が高く同保健所管内10施設のうち6施設（60%）の陽性率であった。施設別には一般県民の利用が多い公園での検出率が高く14施設のうち7施設（50%）から*Legionella*が検出された。遊離塩素濃度との関係は，遊離塩素が検出されない施設の*Legionella* 検出率が最も高く43%，0.51mg/l以上の遊離塩素が検出された6施設から*Legionella*は検出されなかった。清掃回数との関連は年6回（2ヶ月に1回の清掃）以上を実施している8施設から*Legionella*は検出されなかった。検出された*Legionella*は2属で，*L. pneumophila*の検出率が最も高く（88%）血清型1群が有意に検出された。アメーバは6施設(21%)から2属（*Vannella*属及び*Vexillifera*属）検出された。残留塩素等の管理基準については，修景用水における明確な基準は定められていないが，適切な清掃・消毒設備を設置し，水道法施行規則に定める基準以上の残留塩素濃度を確保する必要があると思われる。

I はじめに

*Legionella*属菌は湿った土壌や淡水の湖、沼、河川や温泉水のほかに、人工的水利用施設である空調システムの冷却塔、加湿器、循環式浴槽及び噴水などの修景用水にも生息する細菌で、15～43℃で繁殖する¹⁾⁴⁾。また、循環式浴槽水、空調施設の冷却塔水、給湯器の水などに生息する原虫類（アメーバ）の細胞内で大量に増殖する。本属によって起こる*Legionella*症は劇症型の肺炎と軽い熱性疾患（ポンティアック熱）の病型をとり、環境水に生息する*L. pneumophila*を代表とする*Legionella*属菌を含むエアロゾルの吸入や汚染水の吸引による経気道感染によって感染し、高齢者、新生児及び免疫力の低下をきたす疾患を有する者が本症のハイリスクグループである。日本国内における本症の主な感染源は、温泉や循環式浴槽水であるが、諸外国においては噴水などの修景用水が感染源として報告⁵⁾⁷⁾されている。

著者らはこれまでに沖縄県における特定建築物の冷却塔水の調査^{8)・9)}、循環式浴槽水の調査^{10)~12)}を実施しその分布状況を報告した。亜熱帯気候に位置し観光立県である沖縄県は観光地やホテル等の公共施設には噴水・滝などの修景用水設備が設置されているが、その管理状況

や*Legionella*汚染状況については不明な点も多い。今回は公共施設やホテルなどに設置されている修景用水を対象に実施した*Legionella*汚染状況について報告する。

II 材料及び方法

1. 調査施設及び採水

2004年10月、沖縄本島及び八重山保健所管内28施設の公園、ホテル、観光施設、商業施設及び公共施設の噴水と人工滝を対象に調査を行った（表1）。採水は各保健所の環境監視員が行い、採水容器には25%チオ硫酸ナトリウム1mlを加えた500mlの滅菌プラスチック容器を用いて500ml採取した。採水の際には水温及び残留塩素濃度の測定を行うとともに管理（清掃）状況について聞き取りを行った。採取された検体は冷蔵にて輸送、保存し、検査は採水後72時間以内に実施した。

2. *Legionella*属菌の検出

「新版 レジオネラ症防止指針」³⁾に基づいて行い、未処理の検体と冷却遠心分離法にて200倍濃縮した後、酸処理及び熱処理したものをそれぞれWYO α 寒天培地（栄研化学）に塗布して、37℃で4～7日間培養した。この間に増殖してきた*Legionella*菌と疑われるコロニー数を

計測した後、代表的なコロニー数個を純培養及びL-システイン要求性確認のため5%羊血液寒天培地及びBCYE α 寒天培地に接種して37°Cで2日間培養した。培養の結果BCYE α 寒天培地に発育し5%羊血液寒天培地に発育しない、特有の酸臭を発するグラム陰性桿菌を*Legionella*菌と推定し、確認試験を実施した。確認試験は市販のレジオネラ免疫血清（デンカ生研）及び*L. pneumophila*血清7-9群の免疫血清を用いて型別試験を実施し血清群を確認した。さらに、山本¹³⁾が報告した*Legionella*属遺伝子（genus *Legionella* 16S rRNA gene）を特異的に検出するLEGプライマーとMahbubaniら¹⁴⁾の報告による*L. pneumophila*の遺伝子（*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator）を特異的に検出する*Lmip*プライマーを用いたPCR法により、*Legionella* sp. 及び*L. pneumophila*の同定を行った。この結果に従って必要があればコロニー数の集計に反映させた。また、LEGプライマーによる遺伝子検査陽性の株については、ダイレクトシーケンス法（ABI PRISM Genetic

Analyzer 310: Applied Biosystems）により塩基配列を決定し、DDBJのClustal Wソフトを用いて解析後、Njplotで遺伝子系統樹を作成した。

3. アメーバの検出

八木田ら¹⁵⁾の方法を参考に、試料水1検体につき1mlを大腸菌塗布寒天平板に均一に塗り広げ、これらをマザープレートとしてアメーバの分離を行った。培養は30°Cで2~7日間行い、その間出現したアメーバの集落（プラーク）の数を計測するとともに、アメーバ形態観察のため単離を行った。アメーバの単離は、プラークの最外郭部を含む部分を3-5mm角の大きさで寒天ごと切り出し、増殖面を下にして新たなアメーバ分離培地に移植した後、更に30°C、3~5日間培養した。クローニングされたアメーバのプラークを実体顕微鏡及び位相差顕微鏡を用いて観察し、アメーバの形態的特長から属の同定を行った。

4. 有意差検定

異なる2群の差の検定にはマン・ホイットニ検定を用い、危険率10%未満を有意とした。

表1 保健所別調査対象施設数

施設別	一般公園	観光施設	ホテル・レジャー施設	商業・公共施設	合計	
管轄保健所	北部	1	2	3	0	5
	中部	4	0	0	3	7
	南部	1	1	0	1	3
	中央	8	1	0	1	10
	八重山	0	0	3	0	3
施設別合計	14	4	5	5	28	

表2 地域(保健所管轄区)別修景用水の*Legionella*検出状況

保健所名	北部	中部	南部	中央	八重山	合計
施設数	5	7	3	10	3	28
陽性数	1	1	0	6	0	8
陽性率%	20	14	0	60	0	29

表3 施設別修景用水からの*Legionella*検出状況

施設別	一般公園	観光施設	ホテル・レジャー施設	商業・公共施設	合計
施設数	14	4	5	5	28
陽性数	7	1	0	0	8
陽性率%	50	25	0	0	29

III 結果

地域（保健所管轄区）別修景用水の*Legionella*汚染状況を表2に示した。調査した28施設のうち8施設（29%）から*Legionella*が検出された。*Legionella*が検出された8施設のうち、6施設が中央保健所管内であり、同保健所管轄区内10施設のうち6施設（60%）と*Legionella*の検出率が高かった。

施設別修景水の*Legionella*検出状況を表3に示した。*Legionella*が検出された8施設のうち7施設が主に一般県民の利用が多い公園（一般公園）での検出であり、調査した14施設の一般公園のうち半数から*Legionella*が検出された。その他の施設については、4観光施設のうち1施設から検出されたが、ホテル・レジャー施設5ヶ所、商業・公共施設5ヶ所からは検出されなかった。

修景水の*Legionella*汚染菌量の分布を表4に示した。今回の試験の検出感度は検水100mlあたり10 cfu（cfuはcolony forming unitの略で分離平板中にコロニーを形成した数）であり、検出感度以下であったのは20施設（71%）、 10^1 台（100mlあたり10~90）cfuが7施設（25%）、 10^2 台（100mlあたり100~990）cfuが1施設（4%）であった。

表4 修景用水の*Legionella*汚染菌量の分布

菌数cfu/100ml	施設数	(%)
<10	20	(71)
10 ¹ 台	7	(25)
10 ² 台	1	(4)
10 ³ 台	0	(0)
10 ⁴ 台	0	(0)

表5 遊離塩素濃度別*Legionella*検出状況

遊離塩素濃度 mg/l	施設数	<i>Legionella</i> 陽性数	(%)
0	14	6	(43)
0.01 ~ 0.1	5	1	(20)
0.11 ~ 0.5	3	1	(33)
0.51 ~ 1.0	1	0	(0)
>1.0	5	0	(0)

遊離塩素濃度別*Legionella*の検出状況は、塩素濃度0mg/lで6施設(43%)、0.01~0.1mg/lで1検体(20%)、0.11~0.5mg/lで1施設(33%)から*Legionella*が検出された。塩素濃度0.51mg/l以上の施設からは*Legionella*は検出されなかった(表5)。遊離塩素濃度0.5mg/l以下と

表6 清掃回数別*Legionella*検出状況

清掃回数 (回/年)	施設数	<i>Legionella</i> 陽性数	(%)
0	6	2	(33)
1~5	14	6	(43)
6~11	2	0	(0)
>12	6	0	(0)

表7 修景用水から検出された*Legionella*の種類と*L. pneumophila*血清群

種名(株名)	血清群	検出数	(%)
<i>L. pneumophila</i>		7	(88)
(H-2, TO-1, TO-2, TO-7, TO-9)	1群	5	
(T-3)	5群	1	
(TO-6)	7群	1	
<i>L. birminghamsiensis</i> ?(TO-4)		1	(13)
合計		8	(100)

0.51mg/l以上の施設における*Legionella*陽性数は、危険率10% (p<0.1) で有意差が認められた。

1年あたりの清掃回数別*Legionella*の検出状況は、0回で2施設(33%)、1~5回で6施設(43%)から*Legionella*が検出された。6回(2ヶ月に1回の清掃)以上の施設からは*Legionella*は検出されなかった(表6)。清掃回数5回以下と6回以上の施設における*Legionella*陽性数は、危険率10% (p<0.1) で有意差が認められた。

修景用水から検出された*Legionella*の種類と*L. pneumophila*血清群を表7に示した。検出された8株の*Legionella*属のうち*L. pneumophila*が7株で、血清群の内訳は、1群が5株(H-2, TO-1, TO-2, TO-7, TO-9)、5群及び7群がそれぞれ1株(T-3, TO-6)ずつであった。TO-4株は、市販の*Legionella*免疫血清および*L. pneumophila*血清7~9群に凝集を示さず、核酸検査ではLEGプライマー陽性、Lmipプライマー陰性であり、LEGプライマー遺伝子増幅産物の部分塩基配列(423bp)は、*L. birminghamsiensis* (Z49717) と99%のホモロジーであった。*Legionella* sp.の16S rRNA geneの部分塩基配列(423bp)に基づく分子系統樹において、分離されたH-2, T-3, TO-6株は、*L. pneumophila* (M36023) と同じクラスターを形成した。図には示さなかったがTO-1, TO-2, TO-7, TO-9株(*L. pneumophila* SG1)も同様であった。TO-4株は*L. birminghamsiensis* (Z49717) の近縁に分類された(図1)。

図1 *Legionella* 16S rRNAの部分塩基配列(423bp)に基づく分子系統樹

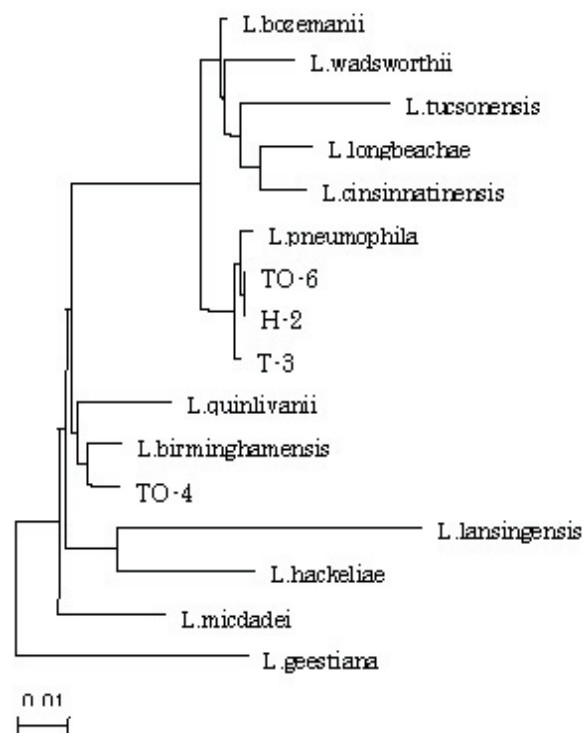


表8 修景用水から検出されたアメーバと汚染量

アメーバ属	検出数	(%)	汚染量cfu/ml
<i>Vexillifera</i>	4	(14.3)	1~4
<i>Vannella</i>	2	(7.1)	1
合計	6	(21.4)	1~4

最後に修景用水から検出されたアメーバと汚染菌量を表8に示した。調査した28施設のうち22施設は検出感度(1cfu/ml)以下であったが、6施設(21%)からアメーバが検出された。検出された種類は、4施設から*Vexillifera*属、2施設から*Vannella*属がそれぞれ検出された。

IV 考察

今回の調査で29%(8/28)の修景用水施設から*Legionella*が検出された。噴水、滝、池などの修景用水施設は多くの場合屋外に設置されており、これまでエアロゾルの発生も特に問題視されていなかった。しかし近年は屋内型の施設が増加しつつあり、国外では修景用水を感染源とする報告事例もあることから、修景用水も循環式浴槽水や冷却塔水等と同様に適正な水質管理が必要であると思われる。

施設種類別で最も多く*Legionella*が検出された施設は地域住民の利用頻度が高い都市部の一般公園であった。地域(保健所管轄区)別に中央保健所管内の*Legionella*検出率がたかい理由の一つとして、調査施設の8割が一般公園であったことが考えられる。後述する汚染菌量は比較的少量ではあったが、小児や高齢者も利用する施設であることから、結果を踏まえ、今後公園管理者に対する施設の管理方法等の指導が必要になると思われる。一方、多くの観光客や県民が訪れる観光施設1施設からの検出は、前者に比べ集団発生につながる危険性が高いことが考えられ早急な改善が望まれる。汚染菌量は、 10^1 台が7施設、 10^2 台が1施設であった。これは、これまでに報告されている集団発生事例等で検出される菌量¹⁶⁾に比べると少ない菌量ではあるが、 10^1 台であっても、*Legionella*の増殖に適した環境であれば、急速に増殖する可能性もあるので注意が必要である。残留塩素については、検出されなかった施設が14施設あり、そのうち6施設(43%)から*Legionella*が検出された。残留塩素については、修景用水における明確な基準は定められていないが、適切な消毒設備を設置し、水道法施行規則に定める基準値(0.1ng/l)以上の残留塩素濃度を確保する必要があると思われる。また、年清掃回数5回以下と6回以上で*Legionella*陽性数に、有意差が認められた($p < 0.1$)ことから、最低限2ヶ月に

1回以上の清掃が必要である。基準以上の残留塩素濃度を保っている場合でも清掃を怠ると、ぬめり・水垢・生物膜(バイオフィーム)などの形成により殺菌効果が失われるので注意を要する。

検出された菌種は*L. pneumophila*が7株、*L. birninghamiensis*と推定された株が1株であった。*Legionella*属には41菌種あり、*L. pneumophila*は最初に発見命名された菌種³⁾で、1~15の血清群(SG)に分類されている。我が国では患者、環境からSG1が最も多く検出されており¹⁶⁾、今回検出された*L. pneumophila*も7株のうち5株がSG1で同様な傾向であった。また、PCRおよび遺伝子解析により*L. birninghamiensis*に近縁であると推定された1株はDNA-DNAハイブリダイゼーションを実施できなかったため同定には至らなかった。

今回の調査で21%(6/28)の修景用水からアメーバが検出され、これまでの全国的な報告^{17) 18)}と同様な成績であった。検出されたアメーバのうち、特に今回*Vannella*属が検出された3施設のうち2施設では*Legionella*属も同時に検出された。*Vannella*属はレジオネラの主要な宿主となることが確認されている。水環境でアメーバは、バイオフィームの中に多く存在し、その中にいる細菌を捕食して増殖している。一方レジオネラはアメーバに捕食されるが食胞内に寄生・増殖し、やがてアメーバを破壊して外界へ放出されるサイクルで生存している。アメーバのシスト内に寄生しているレジオネラや、バイオフィーム中の細菌は、次亜塩素酸ナトリウムなどの殺菌剤に対して抵抗性を示すため、レジオネラを効率的にコントロールするためには、単に薬剤を投与するだけでなく、バイオフィームを物理的に除去することが重要であるといわれている。

これまで沖縄県で実施された冷却塔水や循環式浴槽水のレジオネラ汚染率は17%~67%で、今回の調査結果もこの範囲内であった。今回の調査では観光施設1施設を除いて緊急的な対応を要する施設はないと思われるが、現在全ての*Legionella*属菌は、肺炎の原因になる可能性がある³⁾ことから、十分な注意が必要であり、定期的な水質検査と施設管理は重要である。また、施設管理者に対する衛生管理の指導と伴に一般県民に対する啓発も重要であると思われる。

<謝辞>

本調査を実施するにあたり、検体採取及び各種機関との調整にご協力を頂いた沖縄県福祉保健部業務衛生課 田盛広三係長ならびに北部保健所、中部保健所、南部保健

所, 中央保健所及び八重山保健所環境衛生監視員の皆様, また, アメーバ検査法及び同定に関し, 貴重なご助言及び技術指導を頂いた国立感染症研究所 寄生動物部部长 遠藤卓郎先生及び専門研究官 八木田健司先生に深謝いたします。

VI 参考文献

- 1) 伊藤直美 (1983) : わが国全土における*Legionella*の分布調査及び検出菌の病原性に関する調査. 感染症誌, 57 : 682-93.
- 2) 古畑正典, 阿部弥穂, 堂ヶ崎知格, 原元宣, 福山正文 (2002) : 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴誌, 30 : 555-561.
- 3) 厚生省生活衛生局企画課監修 (1999) : 新版レジオネラ症防止指針. (財)ビル管理教育センター, 東京, pp.26-33.
- 4) 古畑正典 (1997) : 水環境におけるレジオネラ菌の生息状況. 防菌防黴誌, 25 : 369-377.
- 5) Jones TF, Benson RF, Brown EW, Rowland JR, Crosier SC, et al. (2003) : Epidemiologic investigation of a restaurant associated outbreak of Pontiac fever. Clin. Infect. Dis, 37 : 1292-97.
- 6) Hlady WG, Mullen RC, Mintz CS, Shelton BG, Hopkins RS, Daikos GL (1993) : Outbreak of Legionnaire's disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology. Am J Epidemiol, 15 : 555-62.
- 7) AM Correia, G Goncalves, J Reis, MJ Cruz, JA Castro. (2001) : An outbreak of legionnaires' disease in a municipality in northern Portugal. Euro surveillance, 6 : 121-124.
- 8) 大城直雅, 八木田健司, 久高 潤, 糸数清正, 大野 惇, 安里龍二, 他 (1997) . レジオネラ菌の疫学調査 (1) 平成8年度 海洋性危険生物対策事業報告書. 沖縄県衛生環境研究所, 51-3.
- 9) 大城直雅, 八木田健司, 久高 潤, 糸数清正, 大野 惇, 安里龍二, 他 (1998) : レジオネラ属菌の疫学調査 (2) . 平成9年度海洋性危険生物対策事業報告書, 沖縄県衛生環境研究所 : 1-4.
- 10) 糸数清正, 平良勝也, 中村正治, 久高 潤, 安里龍二 (2002) : 沖縄県における循環式浴槽水のレジオネラ属菌調査について. 沖縄県衛生環境研究所報, 36 : 85-7.
- 11) 糸数清正, 平良勝也, 中村正治, 久高 潤, 安里龍二 (2003) : 沖縄県における循環式浴槽水のレジオネラ属菌調査. 沖縄県衛生環境研究所報, 37 : 73-5.
- 12) 糸数清正, 平良勝也, 中村正治, 久高 潤, 安里龍二 (2003) : 沖縄県における循環式浴槽水のレジオネラ属菌調査. 沖縄県衛生環境研究所報, 38 : 83-5.
- 13) 山本啓之 (1992) : PCR法による*Legionella*属細菌の検出・同定. 日本臨床, 50 (特別号) : 394-9.
- 14) Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, and Altas RM (1990) : Detection of with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular Probes, 4 : 175-87.
- 15) 八木田健司, 泉山信司, 黒木敏郎 (2004) : ネグレリア属を中心とした恒温耐性アメーバの検査マニュアル. 遠藤卓郎 : 温泉・公衆浴場, その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜炎の病原体*Naegleria fowleri*の疫学と病原性発言に関する研究. 厚生労働科学研究補助金 がん予防等健康科学総合研究事業, 157-175.
- 16) 国立感染症研究所 (2003) : (特集)レジオネラ症 1999.4~2002.12. 厚生労働省健康局結核感染症課, 病原微生物検出情報 (月報), 24 : 2 : 27-28.
- 17) 柳田博史 (1998) : 建築物における噴水等修景用水中のレジオネラ属菌等生息実態調査について. 第25回建築物環境衛生管理全国大会・建築物環境衛生管理技術研究集会抄録, 36-7.
- 18) 佐藤康弘, 仲地 剛, 富田広造, 中島二三男, 宇田川隆男, 依田昌樹, 古畑勝則, 矢野一好 (1998) : 特定建築物におけるレジオネラ属菌等の生息状況について. 第25回建築物環境衛生管理全国大会・建築物環境衛生管理技術研究集会抄録, 38-9.

