

園芸用培養土やハトの糞便を含む水におけるレジオネラ属菌の調査

杉山 芳宏・花岡みどり

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第55号抜刷）

報告・資料

園芸用培養土やハトの糞便を含む水におけるレジオネラ属菌の調査

An epidemiological study on *Legionella* species in the rain water contaminated with cultivation soil or pigeon feces.

杉山 芳宏*¹・花岡みどり*²

キーワード：レジオネラ、疫学調査、園芸用培養土、ハト糞便
Legionella spp, Epidemiological study, the water with soil or pigeon feces

まえがき (Introduction)

レジオネラ感染症は、1976年に発見された比較的新しい感染症である。本感染症は、肺炎を主徴とする感染症であり、2000年前後には日本でも、公衆浴場や宿泊研修施設で、本菌感染症が発生して死者もでたことで、注目された^{1,2)}。その後、公衆浴場などの規則の改定や衛生管理の向上もあり、本感染症の発生は減少しているが、未だに感染症学会などの呼吸器病分野での症例報告があつたと絶たない^{3,4)}。

レジオネラ属菌は人に感染し、時に重大な疾患をもたらす。本菌感染症は感染症法4類感染症に分類されるように、その発生状況を行政的にも監視すべき疾患である。自然界ではレジオネラ属菌は土壌、水中などに生息し、人への感染源となることから、我々は、これまでに継続的にヒトをとり巻く環境で疫学調査を実施してきた^{5,6)}。公衆浴場に関しては、レジオネラ属菌は湯水中に10CFU/100mL未満と規制されているが、野外の雑用水などでは基準がなく、どれくらい存在すると感染の危険性が高く、殺菌消毒を必要とするかは不明である。そこで今回は、家庭などでよく用い

られる植物培養用の培養土に注目し、培養土の入った鉢の受け皿に貯留する水からのレジオネラ属菌の調査を行った。

また、野外や屋上に設置される冷却塔の水などからもレジオネラ属菌は検出率が高い。そこでその環境に棲息する鳥類であるハトに注目し、ハトの糞便を集め、雨水に混ぜて、レジオネラ属菌の検出を試みた。

材料と方法 (Materials and Methods)

1) 使用培地: 本調査に使用した培地はGVPC寒天培地(分離選択培養用、メリビオピュー社)および5%馬脱繊維血液加ブレインハートインフュージョン寒天培地(確認用、栄研)を使用した。

2) 培養土および鳩糞便を含む雨水サンプル: 2008年から2009年まで、降雨時に雨水を採取し、その雨水をポリバケツに溜めた。各種培養土(河川の土、市販培養土)を、植木鉢に入れ、鉢受として常に水が溜まり易いようにプラスチックボウル(約2L容量)を用意した。雨水は鉢に入れた培養土を経由して、鉢受のボウルに常に溜まるように補給した。6月から10月まで定期的に鉢受ボウルの貯留水を検査した。また、同様にプラスチックボウル6個(約5L容量)を用い、採取したハト糞便50gまたは5gを各3個のボウルに加

*¹ 美作大学 生活科学部 食物学科

*² 美作大学 生活科学部 食物学科学生

え、雨水を貯留させた。このハト糞便を含む水も定期的に検査した。

3) 水サンプルの前処理：検査水100mlを50℃、30分間の加熱処理後、3,500rpm (2,260G)、10分間の遠心を行った。沈査にレジオネラ菌分離用緩衝液 (0.8 M塩酸・塩化カリウム溶液pH2.2) を0.5ml加えて攪拌し、これを菌分離のためのサンプル水とした。今回のサンプル前処理には春日ら⁷⁾ が提唱する加熱前処理法を採用した。

4) 菌の分離培養と同定：前処理を行ったサンプル液をGVPC寒天培地に塗抹し、7日間37℃で培養した。典型的なレジオネラ属菌と観察される、やや白色がかかった小さなコロニーを釣菌し、GVPC寒天培地と血液寒天培地に塗抹して、7日間37℃で培養した。GVPC寒天培地で培養2日後には菌増殖が確認されず、培養7日後に菌増殖が確認され、かつ血液寒天培地で菌増殖が認められなかったもので、顕微鏡形態観察では長桿菌ならびにグラム陰性菌である場合に、レジオネラ属菌とした。

結果と考察 (Results and Discussion)

1) 培養土を含む雨水サンプルからのレジオネラ属菌の検出

2008年に採取した培養土を含む水から、合計50例中1例 (2%) からレジオネラ属菌が分離された。これまでに、我々が環境水からの本菌の検出を行った結果⁵⁾ では、1.9%から11.1%の分離率であったことから、今回の分離成績も特別に高率に検出されるというわけではなかった。一方、水温は35℃以上と以下では、高温の方が有意に高率に本菌が検出される報告^{8,9,10)} があるが、今回の調査では、本菌が培養土を含む雨水から分離した時期としては10月の秋に限定している。10月の水温は35℃を超えることはないと考えられ、報告とは矛盾している。しかし、レジオネラ属菌は環境において単純に温度だけが、増殖のための重要な要因ではない。われわれの過去の環境水の調査でも、秋にレジオネラ属菌が検出されることから、比較的低温に

なって他の環境菌の増殖などが抑制されたときに、検出され易いなど、本菌の増殖因子とは異なる要因が、関係しているのかもしれない。

また、実験に用いた植物栽培用の培養土に関しては、植物の生育用に消石灰や苦土石灰などのアルカリ成分が含まれる。実験開始時には、それらの成分が十分に培養土に含まれており、アルカリ性の環境は本菌の増殖に好ましくない。しかし実験開始後5ヶ月を経過した秋頃には、それらアルカリ成分は十分に流れ出て、受け皿の水のpHが中性から弱酸性へと変化して、レジオネラ属菌の発育条件に適した状態となったことも考えられる。さらに、これら培養土の成分により共生生物 (アメーバなど) の生息にも影響を受け、菌数が検出限界以下となり、検出率が低かったことも推測される。

今回は分離菌の型別は実施していないが、レジオネラ属の全ての菌種が病原性を持つとされている¹¹⁾。したがって、今回の分離菌株もヒトへの感染の可能性はあると考えられ、植物栽培に用いる鉢の受け皿に溜まる水も衛生的に十分な注意が必要であると思われる。

2) ハトの糞便を含む雨水からのレジオネラ属菌の検出

2009年の6月より10月までに、ハトの糞便を含む雨水を定期的に8回 (6月1回、7月2回、8月2回、9月2回、10月1回) 各検査毎に6サンプルを採取して、計48サンプルを検査した。その成績は、レジオネラ属菌が検出されたサンプルは2例 (4.2%) であり、いずれも9月の異なる検査日に1例ずつ検出された。また、ハトの糞便を多く (50g) 含む雨水と比較的少量 (5g) を含む雨水では、両サンプルより1例ずつ分離されていることから、特に差は見られなかった。この成績は、雨水からの検出率と同程度であり、ハトの糞便にはレジオネラ属菌が多量に存在したり、ハトの糞便が本菌の増殖を増長しなかったものとする。したがって、ビルの屋上に設置された冷却塔などで本菌が高頻度で検出される原因としては、ハト

の糞便による可能性は低いと考えられる。しかし、本菌は培地上での増殖条件は非常に限定されているにもかかわらず、自然環境においては温度、pH、必須栄養素などの条件が、かなり異なる場所においても生息し、藍藻や緑藻の細胞外代謝産物を炭素源あるいはエネルギー源として利用したり、アメーバなどの共生生物の細胞内でも増殖することが知られている^{12,13,14)}。また、レジオネラ属菌は培養増殖上25℃以上の比較的高い温度を好み、ヒトや動物の体温以上の40℃以上の温水からも頻繁に検出されることから、一般に体温がほ乳類よりも高い鳥類は、宿主の候補に該当すると考えた。さらに、屋上や公園などハトの棲息・生活地域がレジオネラ属菌の検出される水の場所とも重なることから、今回の調査のみの成績でレジオネラ属菌とハトとの関連を否定できるものではない。今後、ハトに関連する原生動物などの増殖要因との関連も含め、本菌の環境での増殖に関して詳細に検討を続ける予定である。特に、直接ハトを捕獲して、その糞便や口内などを直接的な検査を実施したいと考えている。

最後にレジオネラ感染症は健康者に対しては、日和見感染であり、深刻な感染症と見なされていないが、易感染者では容易に感染し、発症した場合は重篤な肺炎を引き起こすことから、軽視するべきではない。今回の調査では、植物栽培に用いる鉢の受け皿の水が本菌に汚染されたからと云って、その周囲でのヒトの感染、発症に直結するものではないが、本菌の存在を検査した上での水利用は、レジオネラ感染症の予防につながるものである。われわれは、本菌に対して十分な知識と対策をもって、生活に密接した環境の水と接しなければならぬ。

参考文献 (References)

- 1) 小栗豊子ら著. レジオネラ属菌とレジオネラ症—最近の知見. 臨床と微生物. 近代出版. Vol.25. p 1-75. 1998.
- 2) J.G.HOLT et al. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Williams & Wilkins. p86-108. 1994.
- 3) 河野喜美子ら. 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 検査診断法の比較. 感染症学雑誌. 81. P173-181. 2007.
- 4) 鳥谷竜哉ら. 掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子. 感染症学雑誌. 83. p36-44. 2009.
- 5) 杉山芳宏ら. 津山市の湖沼、雨、観賞魚の水槽水におけるレジオネラ菌の調査. 美作大学紀要. 50. p17-22. 2005.
- 6) 杉山芳宏ら. 岡山県の土壌におけるレジオネラ菌の調査. 美作大学紀要. 51. p33-35. 2006.
- 7) 春日修ら. 環境水由来レジオネラ属菌の検出における有機酸緩衝液前処理の検討. 感染症雑誌. 76. p1010-1015. 2002.
- 8) R.M.WADOWSKY and R.B.YEE. Effect of Non-*Legionellaceae* Bacteria on the Multiplication of *Legionella pneumophila* in Potable Water. Appl. Environ. Microbiol. 49. p1206-1210. 1985.
- 9) C.B.FLIERMANS et al. Ecological Distribution of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 41. p 9-16. 1981.
- 10) 中浜力. 岡山地方における *Legionella* 属の環境材料よりの分離に関する研究. 感染症雑誌. 57. p643-655. 1983.
- 11) R.J.FALLON and T.J.ROWBOTHAM. Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of whirlpool. J.Clin. Pathol. 43. p479-483. 1990.
- 12) C.M.ANAND et al. Interaction of *L. pneumophila* and free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). J.Hyg.Camb. 91. p167-178. 1983.
- 13) D.L. TISON et al. Growth of *Legionella pneumophila* in Association with Blue-Green Algae (*Cyanobacteria*). Appl. Environ. Microbiol. 39. p456-459. 1980.
- 14) B.W.JAMES et al. Influence of Iron-Limited Continuous Culture on Physiology and Virulence of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 63. p4224-4230. 1995.