

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

杉山 芳宏・矢部かおり・田中 美帆
奥田 佳子・前田 彩・丸本 沙織

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第50号抜刷）

論 文

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

An epidemiological study of *Legionella* species in the water from ponds, rain and goldfish bowls in Tsuyama city

杉山芳宏^{*1} 矢部かおり^{*2} 田中美帆^{*2} 奥田佳子^{*2} 前田彩^{*2} 丸本沙織^{*2}

1. まえがき (Introduction)

レジオネラ感染症の発見は、1976年米国フィラデルフィアのホテルで開催された在郷軍人会の参加者やホテル周辺の通行人などに原因不明の重症肺炎が集団発生したことに始まった。この肺炎は新たな細菌による感染症であることが明らかになり、在郷軍人病と称され、後に原因菌はレジオネラ肺炎菌 *Legionella pneumophila* と命名され、現在、レジオネラ属菌として43菌種以上が知られている¹⁾。レジオネラの特徴は通常の細菌検査用培地には発育しないことで、発育にL-システインやL-セリン、スレオニンなどのアミノ酸類をエネルギー源及び炭素源として要求する。特に、L-システインは不可欠の栄養素であり、かつ微量の有機鉄化合物が増殖促進因子として培養に必要であり、pH6.8 ± 0.1の限られた範囲でなければ増殖しないため、培地中のpHを一定に保つための緩衝剤も必要である^{1) 2) 3) 4)}。このようにレジオネラの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、レジオネラは自然環境においては温度、pH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、アメーバなどの原生動物の細胞内でも増殖することが知られている^{5) 6) 7)}。

レジオネラ症はその臨床症状から肺炎型と風邪様のポンティアック熱型に大別されている。肺炎型のレジ

オネラ症は、初発症状は全身倦怠、易疲労感、頭痛、食欲不振、筋肉痛など不定の症状で始まり、あまり咽頭痛や鼻炎などの上気道炎症状はみられず、膿性痰喀が認めれ、精神・神経学的異常の出現は、適切な治療がなされないと死亡する場合がある。ポンティアック熱型では、主症状は発熱で、悪寒、筋肉痛、倦怠感、頭痛で発症し、肺炎像は認められず、多くの患者は無治療で回復し、死亡例はない。レジオネラは発見当初、病原性の強いものと考えられていたが、最近では、健康な成人が発症することはまれで、幼児や高齢者、免疫力が低下している場合に罹患しやすい日和見感染菌の一つとして認識されている。

またレジオネラ症の発生は世界各地で報告があり、我が国でもレジオネラ症の集団発生は全国に認められる¹⁾。我が国のレジオネラ症の多くは散发例であったが、1994年8月東京都で罹患者45名を出すポンティアック熱の集団感染が発生し、原因はこの施設の空調用冷却塔水であった。また、肺炎型のレジオネラ症の集団感染は、1996年東京都の病院において新生児がレジオネラの院内感染で肺炎を起こし、死亡した。その後、2000年静岡県温泉施設の温泉施設、2000年茨城県の福祉施設、2002年宮崎県や鹿児島県の入浴施設、岡山県の病院での集団感染が報告されている。

以上のようにレジオネラは人に感染し、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は土壌、水中などに生息し、人への感染源となることから、今回の

*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

津山市における疫学調査を実施した。レジオネラの自然界での水への汚染機構は不明であり、今回地域的な湖沼のレジオネラ生息状況調査ならびに汚染経路、汚染機序を明かとするため、雨水、湖沼水を調査すること、さらにこれまで疫学調査報告のない観賞魚の水槽水も対象として、レジオネラ感染症の疫学解明と共に地域への警鐘を行うことを目的とした。

2. 材料と方法 (Materials and Methods)

- 1) 使用培地：本調査に使用した培地は BCYE *a* 寒天培地（培養用、栄研）、GVPC 寒天培地（分離選択培養用、メリビオビュー社）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）の 3 種類を使用した。
- 2) 湖沼水、雨水、観賞魚の水槽水の採取：2003 年から 2004 年まで、津山市内北部の湖沼（図 1）の水、総計 71 サンプルを採取した。また、美作大学校舎 4 階屋上に採取桶を設置（図 2）し、雨水総計 21 サンプルを検査した。また、その間の降雨をポリバケツに溜め、春から晩秋に定期的に 13 回、貯留雨水も検査した。2003 年の湖沼の水サンプルは、採取時に pH および水温の測定も行った。2004 年には、観賞魚の水槽水を 10 例を検査した。
- 3) 水サンプルの前処理：2003 年には採取した水 1,000ml を 0.45 μ m のフィルターを使用して、濾過をおこない、濃縮した。濾過後、0.45 μ m のフィルターを遠心管に移し、生理食塩水を 2ml 加えてよく振盪し、フィルターに付着した菌を生理食塩水に浮遊させた。次に、レジオネラ菌分離用緩衝液（0.8M 塩酸・塩化カリウム溶液 pH2.2）を 2ml 加え、5 分間攪拌し、これを菌分離のためのサンプル前処理とした。2004 年では、採取した水 280ml を 50 $^{\circ}$ C、30 分間の熱処理を加え、10,000rpm 10 分間の遠心後、沈澱をレジオネラ菌分離用緩衝液 1ml で処理する前処理法を用いた。
- 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、5～7 日間 37 $^{\circ}$ C で培養した。典型的なレジオネラと観察される、やや白

色がかった小さなコロニーを白金線を使用して釣菌し、BCYE *a* 寒天培地と血液寒天培地に塗抹し、5～7 日間 37 $^{\circ}$ C で培養した。BCYE *a* 寒天培地で



図 1 図は調査した津山市内湖沼の 1 つの景観である。周囲に人家も認められ、主に農業用水と考えられる。



図 2 図は大学屋上に設置された雨水採取用桶であり、左は降雨採取用、右は雨水貯水用である。降雨直後は無色透明であるが、貯蔵雨水は時間とともに藻類が発育し、緑色に変化する。

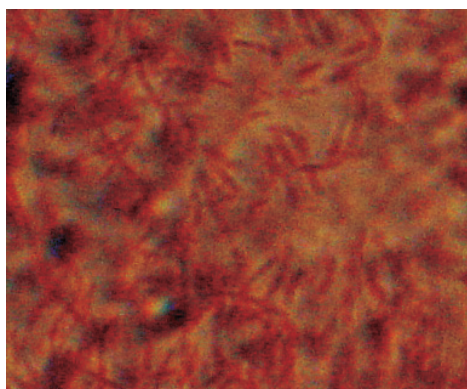


図 3 分離レジオネラの顕微鏡像である。グラム陰性長桿菌の典型的レジオネラの形態を示した。

発育し、血液寒天培地で発育しなかったものをレジオネラと同定した。さらに分離菌をレジオネラ免疫血清（精研）を用いて凝集反応を行い、血清型別を実施した。また、菌の形態およびグラム染色性を検査するため、グラム染色により菌を染色し、顕微鏡観察を行った⁹⁾。一方で分離菌は SDS-PAGE 電気泳動法により陽性対照のレジオネラとタンパク質菌体構成成分を比較検討を行った¹⁰⁾。

結果と考察 (Results and Discussion)

1) 湖沼におけるレジオネラ検出

2003年に採取した水、合計53サンプル中1サンプル(1.9%)からレジオネラは分離された。(表1)分離菌は、血液寒天培地では発育しないこと、顕微鏡形態観察では長桿菌ならびにグラム陰性菌(図3)であることからレジオネラ属菌と判断されたが、「生研」抗血清を用いた凝集検査では、ニューモフィラ1~6群・ボゼマニイ・デュモフィ・ゴルマニイ・ミクダディの菌種ではないと判断された。2004年の成績からは合計18サンプル中2サンプル(11.1%)からレジオネラは分離された。血清型別では、分離菌の1株は、*Legionella pneumophila* 6群と判定されたが、他は型別未定である。また、型別未定株は、SDS-PAGEにより、菌体構成蛋白の比較を *Legionella pneumophila* 1群株と比較した。主要な蛋白成分の分子量の一致は認められたものの、異なる分子量の蛋白構成も認められたことから、レジオネラ属ではあろうが、典型的なレジオネラ菌種と違うことが推測された。

米国での環境水から分離成績では、20Lの水のサ

表1 津山市北部の湖沼におけるレジオネラ分離成績

サンプル採取年	水サンプル数	レジオネラ陽性数	血清型別
2003年	53	1	未定*
2004年	18	2	<i>L. pneumophila</i> 6群1例、未定1例*

*未定は *Leginella pneumophila* 1-6群、*L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. bozermanii*, *L. gormanii* 以外の血清型と考えられる。

ンプルを500倍に濃縮した結果、夏期の湖、川からは約40%からレジオネラが検出されている¹²⁾。さらに蛍光抗体法でフローサイトメトリーによる菌検出を行うとすべての水サンプルに菌の存在が確認できるということから、レジオネラは淡水細菌と考えられている。米国の湖、川の水のpHに関しては、pH6.75前後では菌の存在に有意な差はないが、水温は35℃以上と以下では、有意に高温の方が検出されることを報告している。日本では、気温は夏のみ暑く、しかし、一般的に水は夏でも気温レベルには達しない。今回2003年に調査した湖沼の水温の平均は春、夏、秋、冬それぞれ21.2 ± 0.8℃、28.5 ± 0.6℃、20.4 ± 0.9℃、13.6 ± 0.9℃であった。春のpHの成績はないが、夏、秋、冬の平均pHはそれぞれ6.6 ± 0.3、8.1 ± 1.0、7.6 ± 0.4であった。レジオネラの培地上での増殖至適条件はpH6.8 ± 0.1、25℃以上と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pH、温度などで培地上とは、成育条件が異なる場所に生息しているが、今回の調査でレジオネラの検出率が低かった原因として、pHや水温などレジオネラ菌が発育するための環境が適していなかったことも否定できない。調査した湖沼に関しては、近隣に田畑も多く、農薬に含まれるリン酸や窒素化合物(亜硝酸)などが、これらが湖沼に流入している可能性がある。また、これらにより共生生物の生息にも影響を受け、レジオネラ菌数が検出限界以下となることも推測される。また、冬においては水温の低下からレジオネラが増殖に適する環境でなかったと考えられる。2004年の18例は春と夏に実施し、菌が分離されたのはすべて夏に採取した水のサンプルからである。その結果からも、本来は夏に本菌の増殖至適温度に達すると推測されるが、2003年は冷夏で、秋に暑い状態であったことから、例年と異なる条件であった可能性がある。特に秋の調査でレジオネラが13サンプル中1サンプルから分離されたことは、それを反映しているように思われる。中浜¹³⁾が約20年前に岡山県南部の病院周辺環境においてレジオネラの検査を実施している。当時、レジオネラは外国で注目され始めた頃であり、日本におけるレジオネラの先駆的調査

であるが、当時は高価ではあるが、感度の高いモルモット接種法により、池の水2例より、側溝の水1例より本菌を分離している。その報告の中では、中浜は秋には菌が分離されたが、冬には分離出来なかったことおよび水サンプルの酸処理培養法ではモルモット接種法よりも菌の分離率が悪いことを指摘している。また東京都がおこなったレジオネラの調査結果では、雑用水において調査数73箇所の中の5箇所からレジオネラが検出されており、雑用水からの検出率は6.8%と低い。本調査において、レジオネラの検出された時の検出成績だけを注目すれば、2003年秋の13例中1例(7.7%)であり、2004年では10例中2例(20.0%)雑用水からの検出率は東京都の成績と変わらない。また、今回2003年に採用した分離培養法は、中浜が行った酸処理法とフィルター濃縮法を採用したため、検出感度が悪かった可能性がある。2004年は春日ら¹⁴⁾が提唱する加熱前処理法を採用した。その効果もあり、表1に示されるように、検出率の増加が認められたとも考えられる。型別未定菌について、レジオネラの病原因子はまだ解明されていないことから、レジオネラ属の全ての菌種が病原性を持つと考えられている¹⁵⁾。今回分離された菌株も菌種や血清型別が確定していない株があるが、病原性の強弱はあろうが、ヒトへの感染の可能性はあると考えられる。今後の継続調査において同様の菌種が多数検出されるならば、菌種の同定は疫学上も重要と考えている。

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。今回の調査では、分離処理過程でレジオネラがどれくらい消失、減少しているかは不明であるが、分離培地上の発育コロニー数から水1L当り10CFUのオーダーと考えられるので浴場などよりもずっと低い生息菌数と考えられる。津山市では雨水や湧き水を農業用、防火用に貯水した湖沼が認められる。これらの雑用水は時に、車両等の洗浄、修景用水や親水用水にまで用途が広がるが、人の生活圏での雑用水の使用はエアロゾ

ルの発生を伴い、レジオネラの菌数が少なくても、感染に発展する危険性があることを十分理解した上での雑用水の利用が望まれる。

2) 雨水におけるレジオネラの調査

2003年の5月より12月までの21回の雨水の検査ではレジオネラは検出されなかった。これは、雨水にはレジオネラが我々の採用した検出方法の検出限界以下または存在しなかったと考える。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検出される原因は、雨ではなく、風によって舞上げられた土ぼこりに由来する可能性が高いと考えられる。また、2003年より2004年まで13回の定期的貯蔵雨水の検査においても、レジオネラは検出されていない。貯蔵雨水の環境として美作大学の屋上約16mに貯蔵桶を設置したため、地上と違い土埃は入りにくい点が貯蔵雨水を菌が汚染しなかった原因と思われる。さらに日本に降る雨は、近年酸性化している。1993～1995年の環境庁の調査によると、倉敷でpH4.6～4.7の酸性雨が確認されている。今回調査した雨水(平均5.35 ± 0.63)、貯蔵雨水(平均6.71 ± 1.86)は、レジオネラの至適発育pH領域からさらに酸性側や極端にアルカリ性側であるので、より一層レジオネラの発育環境として適していないものと推測される。またレジオネラは自然界において他の微生物(藻類、細菌類、原虫類など)と共生する。藻類は代謝産物をレジオネラに提供し、レジオネラは呼吸により生じた炭酸ガスを藻類に提供する共利共生である。ある種の細菌との共生関係については、特定の菌種はまだ同定されていないが、レジオネラが発育できない培地において他の細菌のコロニー周辺部にレジオネラの微小コロニーが形成されること、また従属栄養細菌との共存下でのみレジオネラ生菌数の増加が認められることなどから片利共生であることが推測されている。また自然宿主である原虫、特に根足虫類(アメーバ)は、細菌を餌として食胞に取り込み、酸と消化酵素により菌体を分解するが、レジオネラは酸に対して抵抗性を持ち、さらに食胞に消化酵素が分泌されるのを阻止する能力をもっている。これにより、レジオネラは食胞内で生残り、宿主細胞

から栄養分を摂取して増殖するとされている¹⁾。今回の調査では貯蔵雨水には時間の経過と共に藻類が生えて来たが、アメーバの存在は確認されておらず、ポリバケツ中の貯蔵雨水という環境は、降雨時に雨水が追加貯留する状態で、pHが変化しやすく、発育する藻類や原虫の種類が少なく、レジオネラの増殖に有効な藻類や原生生物が生育しなかったとも考えられる。本実験の貯蔵雨水はレジオネラにとって増殖し難い環境であったと推測される。今後の研究課題としては、発育する藻類、原虫の鑑定などもあわせて検討する必要があると考えている。日本においても、降雨が少ない地方や河川水、湧水などが十分確保されない地域では、雨水を貯蔵して、飲水や生活用水に利用していることがあるが、貯蔵雨水に関しても、法律上のレジオネラの基準はない。今回の調査では、本菌は貯蔵雨水から検出されてはいないが、レジオネラの汚染の可能性は否定できないことから貯蔵雨水も取り扱いには十分な注意を要するものと考えている。

3) 観賞魚水槽水におけるレジオネラの調査

これらの環境水の調査に加え、家庭に一般に普及しているペットである観賞魚の水槽水における、レジオネラの調査を実施した。その結果は、表2に示されるように、調査例数は少ないが、10例中1例でレジオネラの存在が確認された。しかし、代表的な *Legionella pneumophila* とは異なる型別未定菌であった。観賞魚の水槽水からの本菌の検出報告はないことから今後はさらに調査を継続して検討を行いたい。

最後にレジオネラは健康者に対しては、深刻な感染症と見なされていないが、易感染者が感染し、発症した場合は重篤な肺炎を引き起こす病原細菌であり、軽視するべきではない。レジオネラは日和見感染原因菌であるため、水が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、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。本菌に対して十分な知識と対策をもって、自然環境の水と接しなければならぬと考えている。

表2 観賞魚の水槽水からのレジオネラ分離成績

水サンプル数	レジオネラ陽性数	血清型別
10	1	未定*

* 未定は *Leginella pneumophila* 1-6 群, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. bozermanii*, *L. gormanii* 以外の血清型と考えられる。

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 p1-75. 1998.
- 2) J.G.Holt et al. edit.: Bergey's manual of determinative bacteriology 9th edition. Williams & Wilkins. p86-108. 1994.
- 3) 坂崎利一訳 医学細菌同定の手びき(第3版) 近代出版. p169-184. 1999.
- 4) 坂崎利一監修 新細菌培地学講座・下II(第二版) 近代出版. 1990. p209-214. 1990.
- 5) C.M.ANAND et al. Interaction of *L. pneumophila* and free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). J.Hyg.Camb. 91. p167-178. 1983.
- 6) 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.
- 7) D.L. TISON et al. Growth of *Legionella pneumophila* in Association with Blue-Green Algae (*Cyanobacteria*). Appl. Environ. Microbiol. 39. p456-459. 1980.
- 8) 厚生省監修/細菌・真菌検査(第3版)(財)日本公衆衛生協会 レジオネラ p F31 ~ F49.1993.
- 9) 医科学研究所学友会編 細菌学実習提要 2版 丸善 顕微鏡による検査法 p7-27. 1998.
- 10) 岡田雅人・宮崎香編集/タンパク質実験ノート(下) 一次構造の決定まで 羊土社 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 p 14-23.1997.
- 11) B.W.JAMES et al. Influence of Iron-Limited Continuous Culture on Physiology and Virulence of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 63. p4224-4230. 1995.
- 12) C.B.FLIERMANS et al. Ecological Distribution of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 41. 9-16.1981.
- 13) 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.

- 14) 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.
- 15) 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. 479-483. 1990.

(2004年12月1日 受理)