

水景施設におけるレジオネラ属菌の分子疫学的解析

The Molecular Epidemiological Analysis *Legionella* Species
from Water Facilities in Kagawa

内田順子 藤川名伊子* 久保由美子 砂原千寿子** 三木一男
Junko UCHIDA Meiko FUJIKAWA Yumiko KUBO Chizuko SUNAHARA Kazuo MIKI

要 旨

香川県域の大型水景施設を対象とし、レジオネラ属菌に対する感染危険因子排除を主な目的とした汚染実態調査を実施した。調査は、11公園内の18水景施設で、2006～2008年に延べ129回実施し、レジオネラ属菌は、5～2,500CFU/100mlが7公園10水景施設より延べ33回検出された。レジオネラ属菌は、*L. pneumophila* SG1, SG5, SG8, SG13及び、*L. anisa*, *L. feeleii*, *L. sainthelensi*が検出され、各公園周辺の生息域を反映し、各公園及び、各水景施設間で菌種・血清型は異なり、生息域の特異性が顕著に確認された。更に、検出菌株の遺伝子多型解析結果では、各公園及び、各水景施設間で特徴的なPFGEパターンの相違が確認された。この生息環境により異なる変異型の出現状況は、水景施設以外の人工的水利用設備を含め、患者発生時の原因究明において有効な手段となることが示唆された。

キーワード：水景施設 レジオネラ属菌 パルスフィールド電気泳動法 分子疫学的解析

I はじめに

水景施設は、「新版レジオネラ症防止指針」において特定建築物に分類され、レジオネラ属菌の制御は施設管理者の判断に委ねられている。我国ではレジオネラ症は、主に温泉、循環式浴槽を感染源とする報告例が多く、これらに関連する施設及び、設備等の関係者間にもレジオネラ症に対する認識は浸透し、感染危険因子は減少してきた。一方、諸外国では生活習慣の違いより温泉等を感染源とする事例は少なく、水景施設を感染源とした感染例が多く確認されている。このような状況を背景に、現在、施設関係者間においてレジオネラ症に対する認知度が低いと推定される香川県域の大型水景施設を対象とした調査を実施した。本調査により、施設管理者のレジオネラ症に対する意識の向上を図ると共に、汚染実態を把握し、今後の感染防止対策に資するため、検出状況並びに、遺伝子情報を基に疫学解析し、若干の知見を得たので報告する。

II 材料及び方法

1 調査対象施設

香川県域の屋外に設置され、演出形態は流水、落水、噴水を有する大型水景施設、11公園18施設を選定した。

選定公園の水景用水は、修景用水10公園17施設、親水用水1公園1施設であった。

2 調査期間

調査期間は、2006年に11公園18水景施設を2～3回採水し、延べ50検体を試料とした。2007年は、適正管理と判断した修景用水1公園1水景施設は除外し、10公園17水景施設を2～3回採水し、延べ40検体を試料とした。同年、10月に1公園の2水景施設中1施設に菌数の急増が確認され、原因究明と菌数低減化を目的とし、5ヶ所を計2回、延べ10検体を試料とした。同調査は、2008年も継続し、同一公園内の噴水施設を加え、計3回、延べ18検体を追跡調査した。また、2006～2007年、検出6公園内の11水景施設を1回、追跡調査し、延べ129検体を試料とした。

3 調査項目

(1) 施設の概要調査

水景施設の演出形態、水景用水、原水の種類、濾過器の有無及び、濾過剤の種類、殺菌装置の有無及び、殺菌方法、清掃状況等を調査した。

(2) 微生物及び理化学検査

レジオネラ属菌数、レジオネラ属同定・血清型別、一般細菌数、大腸菌群数、従属細菌数、アムーバー、水温、

*香川県立中央病院

**香川県中讃保健福祉事務所

pH, 残留塩素等を実施した。レジオネラ属菌の検出は、「新版レジオネラ症防止指針」¹⁾に基づき実施した。

(3) 遺伝子検査

LAMP 法を用い、水景用水中のレジオネラ属菌遺伝子の存在を探った。

(4) 遺伝子多型解析

PFGE 法は、国立感染症研究所より提示された方法²⁾に準拠し、PFGE 後に Fingerprinting II (BIO-RAD) で系統樹解析を実施した。

III 結 果

1 レジオネラ属菌実態調査の対象水景施設

水景用水の用途別では、修景用水 10 公園 17 施設、親水用水 1 公園 1 施設を調査対象とした。各公園の演出形態別状況を表 1 に示した。調査成績は検査終了後、直ちに、検査結果を連絡し、レジオネラ属菌の検出施設は菌数低減化、未検出施設は継続維持に関する助言を施設管理者の要望により行なった。

表1 水景施設の概要

設置場所	水景用水	演出形態	公共公園											演出形態別調査施設	
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K		
屋外	修景	噴射系	噴水		○	○	○	○		○	○			○	7
			水路	○	○	○					○				4
	修景	流れ系	湧水						○				○	2	
			滝		○		○							○	3
	修景	落水	壁泉	○											1
															1
親水	噴射系	噴水									○			1	
公共公園別調査施設			2	3	1	2	2	1	1	2	1	1	2	18	

2 演出形態別レジオネラ属菌検出状況

(1) 調査成績 (2006 年)

2006 年は、修景用水 10 公園 17 施設、親水用水 1 公園 1 施設を調査し、修景用水 7 公園 (70.0%)・9 施設 (52.9%) にレジオネラ属菌が検出された。検出菌数は、水景施設における適正菌数 (100CFU/100ml 未満) の範囲内である 10~90CFU/100ml であった。また、親水用水の 1 公園・噴水はレジオネラ属菌未検出であったが、大腸菌群数 (MPN/100ml) が 1,700 個/100ml と日本水景協会、用途別目標水質の 1,000 個以下を越えていたため、施設関係者に菌数低減化の助言を行った。

演出形態では噴水に検出施設が多い傾向が窺えた。

(2) 調査成績 (2007 年)

2007 年は、2006 年 3 回の調査時、レジオネラ属菌不検出、一般細菌数 < 30 個/ml、従属細菌数 < 30 個/ml、大腸菌群陰性、残留塩素 > 2.0mg/L と適正管理と判断した修景用水 1 公園・湧水は除外した。調査当初の 2006 年に比

べ、レジオネラ属菌は修景用水 3 公園 (33.3%)・5 施設 (31.3%) と検出公園及び、検出施設は大幅に減少した。そのうち 2 公園 3 施設の菌数は 10~20CFU/100ml と適正範囲内であったが、1 公園・噴水で新たに 6 月 13 日、5CFU/100ml 検出され、10 月 11 日、同公園・落水で 2,500CFU/100ml と菌数の急増が確認された。親水用水の 1 公園・噴水はレジオネラ属菌は未検出であったが、2006 年と同様に大腸菌群数 (MPN/100ml) $\geq 24,000$ 個/100ml が確認され、菌数低減化に関する助言を再度行った。

(3) 原因究明及び追跡調査 (2007~2008 年)

1 公園・落水でレジオネラ属菌 2,500CFU/100ml と菌数の急増が確認され、直ちに、菌数低減化に関する助言を行った。11 月 14 日にレジオネラ属菌検出限界以下の確認及び、原因究明調査を使用原水を含む 5 箇所を選定し、5 箇所は未検出と対応策に合致した。原因究明ため、再度、12 月 5 日に調査し、3 箇所より 10~30CFU/100ml が検出された。

2008 年も 3 回追跡調査し、レジオネラ属菌は 7 月 23 日 2 箇所 10CFU/100ml、9 月 10 日 3 箇所 10~20CFU/100ml、10 月 31 日 4 箇所 30~40CFU/100ml と継続して検出された。

(4) 検出施設の追跡調査 (2008 年)

(3) で述べた公園・落水以外で 2006~2007 年にレジオネラ属菌の検出 6 公園 8 水景施設に加え、未検出隣接 3 水景施設を 1 回、追跡調査した。全施設未検出となった。

3 レジオネラ属菌の検出菌種及び血清型 (表 2)

7 公園 10 施設より、*L. pneumophila* SG1, SG5, SG8, SG13 の 4 血清型、*L. anisa*, *L. feeleii*, *L. sainthelensi* の 3 菌種が検出された。レジオネラ属菌の検出状況は、各公園・施設間で特定及び複数の菌種・血清型が検出され、各施設間で異なる菌種並びに血清型の顕著な相違は疫学指標としての有用性を窺わせた。しかし、1 公園・落水では、採水時期により検出菌種・血清型は相違し、通常の清掃では除去出来ない水景施設内の強固な生物膜内での複数株の生息を疑わせた。

4 水温別のレジオネラ属菌検出状況 (表 3)

レジオネラ属菌は、延べ 129 検体中 33 検体 (25.8%) が 7~31.5℃ の幅広い水温域より検出された。調査期間中、2,500CFU/100ml と最も数多く検出された試料は 19℃ で、10℃ 以下の低水温より 10~30CFU/100ml が 3 検体検出された。

表2 レジオネラ属菌の検出菌種、血清型

公園 記号	演出形態		採水年月日	レジオネラ属		
				CFU/100ml	菌種、血清型	
A	流水	水路	2006.10.11	10	<i>L.feeleii</i>	
B	噴水	噴水	2006.10.3	70	<i>L.pneumophila</i> 5群, <i>L.sainthelensi</i>	
			2007.10.11	10	<i>L.pneumophila</i> 5群, <i>L.spp.</i>	
C	噴水	噴水	2006.8.8	10	<i>L.anisa</i>	
			2006.9.5	10	<i>L.pneumophila</i> 1群	
D	噴水	噴水	2006.10.11	40	<i>L.pneumophila</i> 1群	
E	噴水	噴水	2006.8.8	20	<i>L.pneumophila</i> 8群, <i>L.anisa</i>	
			2007.8.8	20	<i>L.pneumophila</i> 1群	
E	落水	滝	2007.10.11	10	<i>L.pneumophila</i> 1群, <i>L.anisa</i>	
			2006.6.7	25	<i>L.anisa</i>	
			2006.8.8	20	<i>L.anisa</i>	
			2006.10.3	40	<i>L.pneumophila</i> 1群, <i>L.pneumophila</i> 8群, <i>L.anisa</i>	
			2007.10.11	20	<i>L.pneumophila</i> 1群	
G	噴水	噴水	2006.8.8	10	<i>L.pneumophila</i> 1群	
K	落水	滝	2007.6.13	5	<i>L.anisa</i>	
			2006.8.8	20	<i>L.pneumophila</i> 13群, <i>L.anisa</i>	
			2006.10.3	90	<i>L.feeleii</i>	
			2007.6.13	70	<i>L.anisa</i> , <i>L.feeleii</i>	
			2007.8.8	60	<i>L.pneumophila</i> 13群, <i>L.feeleii</i>	
			2007.10.11	2,500	<i>L.pneumophila</i> 13群, <i>L.feeleii</i>	
			滝-1,2,3	2007.12.5	10~30	<i>L.feeleii</i> (3)
			滝-2,3	2008.7.23	10	<i>L.anisa</i> (2)
滝,滝-1,3	2008.9.10	10~20	<i>L.pneumophila</i> 13群, <i>L.feeleii</i> (2)			
滝,滝-1,2,3	2008.10.31	30~40	<i>L.pneumophila</i> 13群, <i>L.pneumophila</i> , <i>L.anisa</i> (2), <i>L.feeleii</i> (4)			

表3 水温別レジオネラ属菌検出状況

水温	レジオネラ属菌 (CFU/100ml)										不検出
	5	10	20	25	30	40	60	70	90	2500	
7.0		1									1
7.5					1						
8.0		1									
13.0~13.5											5
14.0					2	2					1
16.0~18.0											4
19.0										1	2
19.5											2
20.0		1	1								2
20.5											1
21.0			2					2			2
21.5						1					1
22.0									1		11
22.5~25.0											26
25.5	1					1	1				
26.0			1	1							5
27.0		4									4
27.5											2
28.0		1	1								2
28.5											1
29.0		1									5
29.5											3
30.0		1	2								6
30.5											1
31.0			1								4
31.5			1								
32.0~35.5											5
合計	1	12	7	1	3	4	1	2	1	1	96

表4 残留塩素とレジオネラ属菌検出状況

残留塩素 (mg/L)	レジオネラ属菌 (CFU/100ml)										不検出
	5	10	20	25	30	40	60	70	90	2500	
0.0		7	3	1	3	4		2	1	1	45
<0.1		2	1								15
0.1											3
0.2											1
0.3	1										7
0.4			1								
0.5		2									2
0.6							1				
0.7											5
1.0											1
1.2				1							1
1.5											3
1.7				1							2
1.8											4
2.0											1
>2.0		1									6
合計	1	12	7	1	3	4	1	2	1	1	96

表5 アメーバとレジオネラ属菌

アメーバ	レジオネラ属菌 (CFU/100ml)										合計	不検出	
	5	10	20	25	30	40	60	70	90	2500			
50ml													
検出	5	5	1		1		1		1		1	14	38
不検出	1	7	2		3	3	1	1	1			19	58
合計	1	12	7	1	3	4	1	2	1	1	1	33	96

5 残留塩素とレジオネラ属菌検出状況(表4)

レジオネラ属菌が検出された 33 検体の残留塩素は、0.0mg/L が 22 検体(66.7%)と最も多く、次いで 0.1mg/L 未満が 3 検体(0.9%), 0.5mg/L が 2 検体(6.1%), 0.3mg/L・0.4mg/L・0.6mg/L・1.2mg/L・2.0mg/L 以上が各々1 検体(3.0%)であった。10 CFU/100ml が>2.0mg/L と高濃度の残留塩素中より 1 検体検出された。

6 水景施設の生態系調査 I (アメーバ)

検水 50ml 中のアメーバの生息を調査した。アメーバは、

9 公園 16 水景施設から検出され、レジオネラ属菌が検出された全 7 公園 10 水景施設に生息が確認された(表5)。検出変動は大きく、レジオネラ属菌検出 33 検体中 14 検体(42.4%)に確認されたが、半数以上の 19 検体(57.6%)は未検出となった。また、レジオネラ属菌未検出 95 検体中 38 検体(40%)にアメーバが確認された。検出アメーバは、レジオネラ属菌検出、未検出に関わらず水景施設は共に、*Hartmannella* spp. *Vahlkampfia* spp. *Vannella* spp. が優先種であった。

7 水景施設の生態系調査Ⅱ (一般細菌数・従属細菌数・大腸菌群数)

レジオネラ属菌検出施設のレジオネラ属菌と一般細菌数、従属細菌数、大腸菌群数との関連を表6に示した。レジオネラ属菌検出施設は一般細菌数<30 個/ml～480,000 個/ml、従属細菌数<30 個/ml～470,000 個/ml、大腸菌群数 陰性～1,700 個/100ml と大幅な差異が認められ、レジオネラ属菌不検出施設においても一般細菌数<30 個/ml～480,000 個/ml、従属細菌数<30 個/ml～210,000 個/ml、大腸菌群数 陰性～≥24,000 個/100ml とレジオネラ属菌検出施設と同様な傾向を示した。しかし、残留塩素濃度が高濃度では一般細菌数・従属細菌数・大腸菌群数は減少する傾向が窺えた。

表6 一般細菌数・従属細菌数・大腸菌群数とレジオネラ属菌検出状況

レジオネラ属菌 (CFU/100ml)	一般細菌数 (個/ml)	従属細菌数 (個/ml)	大腸菌群数 (個/100ml)	合計
5	<30	32	陰性	1
10	<30～76,000	180～76,000	陰性～1,700	12
20	<30～480,000	120～470,000	陰性～110	7
25	48,000	49,000	陰性	1
30	56～33,000	1,000～110,000	4.5～79	3
40	270～25,000	56,000～400,000	陰性～23	4
60	<30	<30	陰性	1
70	<30～700	170～200,000	陰性～350	2
90	55	1,200	4.5	1
2500	130	220	110	1
不検出	<30～480,000	<30～210,000	陰性～≥24,000	96

8 遺伝子検査

2007～2008年にLAMP法を用い、検水中のレジオネラ属菌遺伝子の存在を10公園17水景施設について探った。培養法で検出された3公園5施設以外に7公園11施設から検出され、死菌、viable but nonculturable (VBNC)の存在を窺わせた。培養法陽性検体とLAMP法の比較は、10CFU/100ml 7検体中6検体(85.7%)、20CFU/100ml 2検体中1検体(50%)、30CFU/100ml 3検体中3検体(100%)、40CFU/100ml 2検体中2検体(100%)、60CFU/100ml 1検体中1検体(100%)、70CFU/100ml 1検体中1検体(100%)、2,500CFU/100ml 1検体中1検体(100%)であった(表7)。2008年9月10日採取、1公園・滝2箇所の追跡調査で、10CFU/100ml、20CFU/100ml 各々1検体においてLAMP法で陰性が確認された。

表7 LAMP法によるレジオネラ属菌の検出

LAMP	レジオネラ属菌 (CFU/100ml)								合計	不検出
	10	20	30	40	60	70	2500			
陽性	7	2	3	2	1	1	1	17	37	
陰性	1	1						2	17	
合計	8	3	3	2	1	1	1	19	54	

9 遺伝子多型解析

検出された株の *L. pneumophila* SG1, SG5, SG8, SG13 と *L. anisa*, *L. feeleii*をPFGE後にFingerprintingⅡによりクラスター解析した。

L. pneumophila SG1は、C公園・噴水、E公園・滝、E公園・噴水 (E公園は同一水系により以下E公園・滝・噴水)、G公園・噴水より検出された。E公園・滝・噴水より2007年10月11日に検出された2株の相似度は100%であったが、検出年及び月により相違した。C公園・噴水からの検出株も検出月により相違した。各水景施設からの検出株は、全て相違し、各公園及び施設間で特徴的なPFGEパターンが確認された(図1)。

L. pneumophila SG5は、B公園・噴水より検出され、採取年によりPFGEパターンは相違した(図2)。

L. pneumophila SG8は、D公園・噴水、E公園・滝・噴水より検出された。2006年8月8日、2006年10月3日にE公園・滝・噴水からの検出株の相似度は100%と一致し、*L. pneumophila* SG1の検出月により相違するPFGEパターンとは異なった。D公園・噴水とE公園・滝・噴水からの検出株は86.7%とPFGEパターンは相違した(図3)。

L. pneumophila SG13は、K公園・滝より全株検出され、検出年及び月により82.4～96.6%と相違したPFGEパターンを示した(図4)。

*L. anisa*は、E公園・滝・噴水、K公園・噴水・滝より検出された(図5)。2006年8月8日にE公園・滝と噴水からの検出株は、94.7%と相違した。同時期の2006年8月8日に噴水からの検出株と2006年10月3日滝からの検出株は相似度100%と一致し、複数の遺伝子型の存在を裏付けた。2007年6月13日にK公園・噴水からの検出1株、K公園・滝からの検出1株及び、2008年7月23日にK公園・滝3からの検出1株の相似度は100%と一致し、同一公園内で近距離ではあるが水景施設間及び、検出年による差異は確認されなかった。しかし、2008年10月31日にK公園・滝1,2からの検出株では21.1%と相違し、複数の遺伝子型の存在を裏付けた。それ以外の検出株は、検出年及び、月により相違した。E公園とK公園間では異なるPFGEパターンを示した。

*L. feeleii*は、A公園・水路、K公園・滝より検出された(図6)。K公園より2007年10月11日の滝、2007年12月5日の滝2からの検出株2株は相似度は100%と一致した。2007年6月13日・2007年8月8日・2007年10月11日の滝と、2007年12月5日の滝3からの検出株4株

は相似度は100%と一致した。2008年9月19日の滝1, 2008年10月31日の滝1, 2, 3からの検出株4株は相似度100%と一致した。2007年6月13日～2008年10月31日までの検出株は94.1%の差異であった。また、2006年10月3

日検出株との差異は81.3%～93.8%と大幅な相違は確認されなかった。A公園とK公園間では大幅に異なるPFGEパターンを示した。

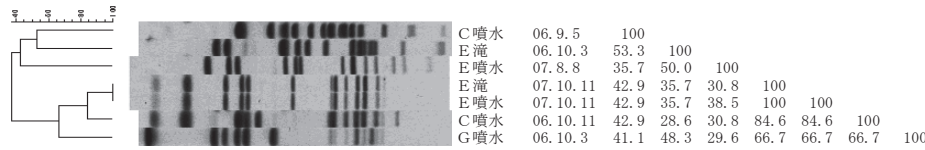


図1 *L. pneumophila* SG1

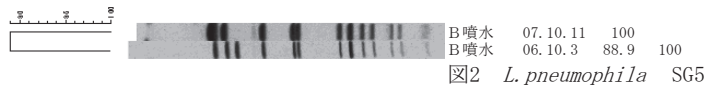


図2 *L. pneumophila* SG5

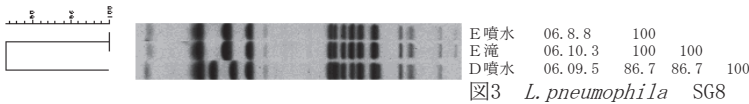


図3 *L. pneumophila* SG8

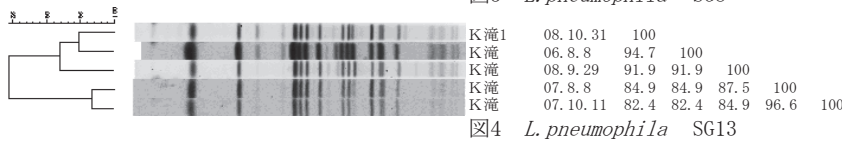


図4 *L. pneumophila* SG13

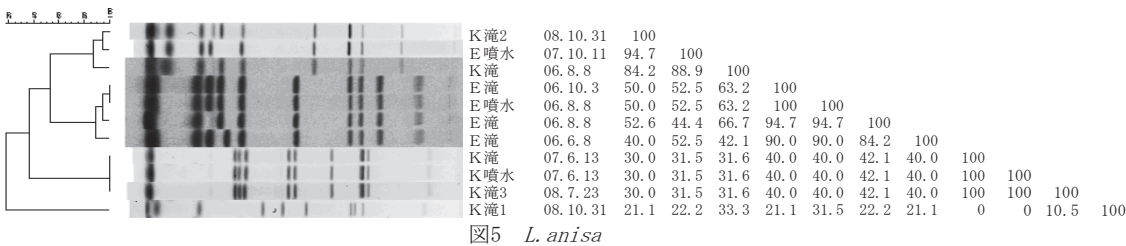


図5 *L. anisa*

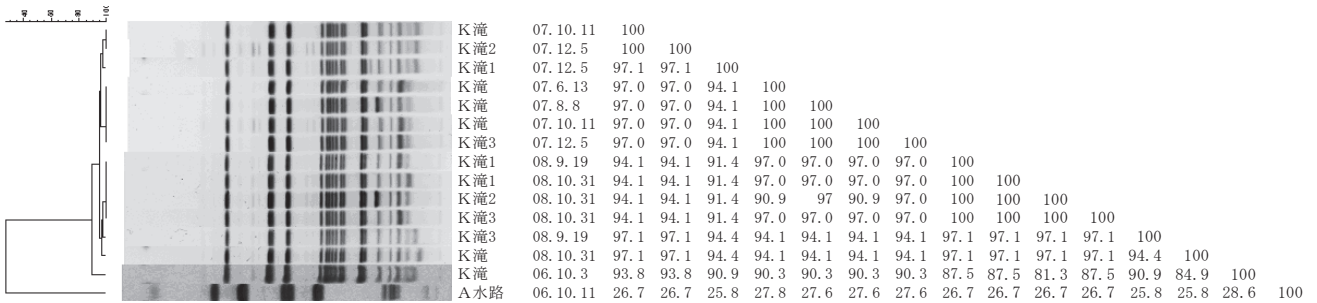


図6 *L. feeleii*

IV 考 察

レジオネラ属菌は、2006年までに53菌種が報告³⁾され、約20菌種が人への感染を引き起こす⁴⁾ことが確認されている。感染防止対策には、法的規制を含めた様々な対策が提示され、発生事例が多発する施設及び、設備関係者の意識は向上し、感染危険因子は減少傾向にある。しかし、感染源不明症例も多く存在し、香川県域からの感染危険因子排除を目的とした大型水景施設のレジオネラ属菌汚染実態を調査した。

本調査は、香川県域の11公園18水景施設を対象とし、2006年～2008年に延べ129回実施した。「新版レジオネラ症防止指針」で対応策が必要であった100CFU/100ml以上の検出は、1水景施設(0.8%)であった。レジオネラ

属菌が検出された施設には、公園管理者に塩素殺菌及び、清掃方法を基本とした菌数低減化を助言した。その結果、2006年調査当初の7公園9水景施設から、2007年は3公園5水景施設、2008年は1公園1水景施設と、年々減少傾向を示した。他の報告例同様、噴水に7施設中5施設と多く確認され、構造上、レジオネラ属菌の排除は困難とされていたが、演出形態に関係無く、施設管理者の意識の向上により感染危険因子の排除は可能であることが推察された。

検出株は、*L. pneumophila* SG1, SG5, SG8, SG13, 4血清型、*L. anisa*, *L. feeleii*, 3菌種が7公園10水景施設で確認された。これらは、全株レジオネラ患者からの検出⁴⁾がみられ、その病原性が証明された菌種・血清型であった。

各公園及び、水景施設毎の検出状況は、特定の菌種、血清型及び、複数の菌種・血清型が単発ないし継続して検出されており、公園の設置場所毎に菌種・血清型は相違した。自然界に広く生息する土壌菌としての特性が反映され、レジオネラ属菌生息の地域性が深く関与していることが推定された。また、検出公園及び、水景施設は土壌が表面に露出した場所と近距離にある水景施設が検出事例が多い傾向が窺えた。

レジオネラ属菌は、自然界では主に原生動物の細胞内増殖性細菌であり、アミノ酸のみに依存する偏向したエネルギー代謝を有するのに対し、従属細菌は様々な有機物をエネルギー代謝として利用⁵⁾する。自然の水環境は、種々の微生物により一定の群集構造が維持され、レジオネラ属菌の生息数は通常の従属細菌の 1/1000 以下である。水景施設の水環境では少量の有機物及び、塩素殺菌等の影響により限られた細菌が生息し、細菌の定着と共に、生物膜が形成され、低栄養環境にも適応したアメーバ等の原生動物が生息する。この原生動物が捕食連鎖の上位を占め、それを宿主としてレジオネラ属菌が自然の水環境では得られない生息数を維持する。この従属細菌は、宿主となる原生動物の生息数の維持には不可欠で、従属細菌の増加はレジオネラ属菌の増殖を助長⁵⁾する。しかし、今回の調査は、レジオネラ属菌の菌数低減化を目的とし、主に塩素殺菌、清掃等の助言により、レジオネラ属菌検出施設、未検出施設で採水時期により従属細菌数の変動が大きく、水景施設では関連は証明出来なかった。従属細菌数を指標とした監視体制で、レジオネラ属菌の菌数を推定するのは極めて困難であることが推定された。また同時にレジオネラ属菌と一般細菌数、大腸菌群数との関連も確認されなかった。アメーバの検出は、18 水景施設中 16 水景施設 (88.9%) に確認され、レジオネラ属菌が検出された全 10 水景施設 (100%) に確認された。検出アメーバは、*Hartmannella* spp. *Vahlkampfia* spp. *Vannella* spp. が優先種として検出され、冷却塔水とほぼ同様な生息状況⁶⁾が確認された。従属細菌と同様に 2006 年、2007 年の調査期間中にレジオネラ属菌が検出された 33 水景施設で 14 回 (42.4%) と同一水景施設でもアメーバの検出率の変動は大きく、2008 年は全水景施設未検出と連続的な塩素消毒の有効性と施設管理の重要性を裏付ける結果となった。しかし、1 公園・滝は、調査当初から 2008 年まで継続してレジオネラ属菌が検出されており、水景施設の設備内に通常の清掃、塩素殺菌では除去困難

な強固な生物膜の形成を推測させた。

レジオネラ属菌殺菌には、水景施設では残留塩素濃度は 0.2mg/L 保持⁷⁾が望ましいとされ、塩素消毒は pH9.2 の高 pH では効力が少ない⁸⁾とされている。しかし、レジオネラ属菌が検出された水景施設は、*L. feeleii* 10CFU/100ml 検出・水温 30°C・残留塩素 >2mg/L・pH8.1 (1 水景施設)、*L. pneumophila* 8 群 20CFU/100ml・水温 26°C・残留塩素 1.7mg/L・pH6.1 (1 水景施設)、*L. pneumophila* 8 群 + *L. feeleii* 60CFU/100ml・水温 25.5°C・残留塩素 0.6mg/L・pH8.6 (1 水景施設)、*L. feeleii* 10CFU/100ml・水温 28°C・残留塩素 0.5mg/L・pH8.1 (1 水景施設)、*L. pneumophila* 1 群 10CFU/100ml・水温 27°C・残留塩素 0.5mg/L・pH8.0 (1 水景施設)、*L. pneumophila* 13 群 20CFU/100ml・水温 22°C・残留 0.4mg/L・pH8.3 (1 水景施設)、*L. anisa* 5CFU/100ml・水温 25.5°C・残留塩素 0.3mg/L・pH7.4 (1 水景施設) と pH6.1~8.6 の範囲内で、残留塩素 0.2mg/L 以上より 7 施設検出された。塩素の投薬時期は不明であるが、残留塩素濃度で、レジオネラ属菌の存在を推定するのは困難であることが示唆された。また、1 公園・1 水景施設より *L. feeleii* 10CFU/100ml・水温 7°C、*L. feeleii* 30CFU/100ml・水温 7.5°C、*L. feeleii* 10CFU/100ml・水温 8°C から検出され、濾過器等の設備内の温度低下は少ないと推定され、10°C 以下の低水温期でも施設管理の必要性が示唆された。

試料中のレジオネラ属菌を人工培地上で再現し、感染への危険度を推定するのは、VBNC の存在により極めて難しい。2007 年以降、LAMP 法を用い、レジオネラ属菌遺伝子の存在を探り、培養法陽性検体では 10~20CFU/100ml に不検出が 2 検体確認され、死菌の存在も否定できないが、30CFU/100ml 以下で不検出が確認される報告例より検出感度は高いと推定された。LAMP 法は、死菌、VBNC も含め、検出可能で、培養法でレジオネラ属菌不検出施設 4 公共公園 6 水景施設からも検出され、レジオネラ属菌遺伝子の存在を裏付けた。レジオネラ属菌不検出施設も含め、施設管理の継続的な感染防止対策の必要性を示唆させた。また、感染者発生時に迅速対応の手段となる LAMP 法の検出感度は、「新版」レジオネラ対策防止指針におけるレジオネラ属菌検出時 (100CFU/100ml 以上) の対応基準以上の検出感度を概ね有していることが明らかとなった。

各水景施設からの検出株を PFGE パターンによりクラスタ解析し、原因究明調査時の有用性を推定した。

L. pneumophila は、SG1, SG5, SG8, SG13 の解析結果は SG8 で約 2 ヶ月経過後も変異型の出現が確認されなかったが、他の血清型は同一公園の水景施設の検出株は検出年及び、月により PFGE パターンは相違し、各公園及び、水景施設間でも PFGE パターンは異なることが示唆された。*L. anisa* は、同一公園内の 2 水景施設で PFGE パターンの同一遺伝子型が確認されたが、両水景施設の設置場所は近距離で類似した環境条件、設備管理、又は水景施設・滝からのエアロゾルによる汚染、或いはこれらが複合したことが原因と推察された。*L. anisa* は、各公園及び、各水景施設で PFGE パターンは異なるが、長期間に亘る同一遺伝子型の残存及び、複数株の存在により、複数集落を解析する必要性が示唆された。*L. feeleii* は、約 6 ヶ月間、同一遺伝子型が検出されており、約 1 年 6 ヶ月の長期間でも PFGE パターンの大幅な相似度の変化は確認されなかったが、各公園及び、各施設間では異なることが示唆された。レジオネラ属菌は、土壌菌の一種であり、検出株はその周辺の生息域を反映し、各公園及び、水景施設間で地域特異的な検出状況となる。その検出菌種・血清型は、各水景施設に於いて生息環境に合わせ、PFGE パターンの特徴的な変異型が出現する。この出現状況は、冷却塔水等からも確認^{2),9)}されており、患者発生時の原因施設特定には有効な手段となることが推察された。

最後に、レジオネラ感染症は、人工的な様々な水環境と人との接点の中で発生する。感染危険因子は、その施設、設備等の関係者間の意識の向上により、排除可能であると推察される。今回の調査成績を基に、感染危険因子を有する施設関係者に対してレジオネラ症の認知度を高める必要性が示唆された。また、迅速診断法の尿中抗原検査の普及は、患者発生時の早期治療には非常に有効な手段であると共に、感染源となる原因施設も特定され減少してきた。しかし、報告例の中には感染源が特定出来ない症例も多く存在することも現実である。今回の遺伝子解析の応用は、水景施設以外の施設、設備等にも対応可能と推定され、医療機関に対して、レジオネラ症診断の際には、菌分離の併用等の重要性を認識させると共に、各関係機関が連携を密に図り、感染症法に基づく積極的疫学調査により、レジオネラ症の発生防止に努める必要性が示唆された。

文献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課監修: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, 85-98(2002)
- 2) 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業), 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究, レジオネラ属菌の PFGE の精度管理, 及び九州各機関で検出されたレジオネラ属菌の PFGE による比較解析, 196-209, (2006)
- 3) 厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業), 建築物の衛生的環境の維持管理に関する研究, レジオネラ属菌の細菌学 154-157, (2006)
- 4) 小出道夫, 斉藤厚:レジオネラの疫学, 臨床と微生物, 67, (1998)
- 5) 小出道夫, 斉藤厚:レジオネラの疫学, 臨床と微生物, 66, (1998)
- 6) 八木田健司, 泉山信司, 遠藤卓郎:レジオネラ属菌の水系汚染一宿主アメーバの果たす役割, 水環境学会誌, Vol26, No1, 14-19, (2003)
- 7) 厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業), 空気中の微生物防止対策に関する研究報告書, 水景施設における微生物に関する研究(分担研究), 69-114, (2002)
- 8) 厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業), 生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究, アルカリ領域における塩素の *Legionella pneumophila* に対する消毒効果と塩素損傷レジオネラの病原性に関する研究(分担研究, 宮本比呂志, 吉村博子), 13-16, (2006)
- 9) 久高潤, 糸数清正, 平良勝也, 仁平稔, 大野淳:パルスフィールド電気泳動法による環境由来 *Legionella pneumophila* 血清群 1 の遺伝子多型解析, 沖縄県衛生研究所報, 40, 77-81, (2003)