

東京都内の冷却塔水におけるレジオネラ属菌の生息実態調査

(平成17年～23年度)

武藤 千恵子^a, 石上 武^a, 楠 くみ子^a, 猪又 明子^b, 保坂 三継^a, 中江 大^c

国内でのレジオネラ属菌（以下、レジオネラ）感染事例は浴槽水に起因するものが最も多いが、海外の事例を考慮すると、国内感染事例にも冷却塔水を原因とする感染事例が潜んでいる可能性が考えられる。しかしながら、国内においては、冷却塔水中のレジオネラの菌数についての規制がなく、各施設管理者に委ねられている状態である。このような実態をふまえて平成17～23年度に冷却塔水のレジオネラの生息実態調査を行った。

冷却塔水688件中290件（42.2%）からレジオネラが検出された。レジオネラ症防止指針の指針値100 CFU/100mLを超えたものが181件（26.3%）あり、最大検出菌数は240,000 CFU/100mLであった。

分離された*Legionella* spp.365株のうち、*L.pneumophila*は346株あり、*L.pneumophila* 1群209株、7群55株、5群45株、13群13株の順で多く、浴槽水での検出頻度の高い血清群とは分布が異なっていた。また、*L.pneumophila*以外の19株中、*L.bozemanii*が7株、*L.micdadei*が2株、*L.rubrilucens*が2株同定され、免疫血清反応やPCR法陽性で*Legionella* sp.と同定されたものは8株であった。

キーワード：レジオネラ属菌，冷却塔水，血清群

はじめに

レジオネラ属菌（以下、レジオネラ）発見の歴史は、1976年のアメリカフィラデルフィアのホテルで開催された、米国在郷軍人会（the Legion）で原因不明の集団肺炎が発生したことが発端である。これ以前も原因不明の肺炎は散発していた。当時、アメリカは国を挙げて原因究明を行い、米国疾病管理センター（Center for Disease Control and Prevention: CDC）の研究者により原因菌を分離することができ、その原因菌をthe Legionにちなんで、*Legionella pneumophila*（以下*L.pneumophila*）と命名したが、最終的な原因をホテルの冷却塔水（建築物の空調用冷凍機等で発生した熱を下げるための施設である冷却塔内を循環している水）と最終確定するには至らなかった¹⁾。しかし、それ以降も、海外では冷却塔水を原因とするレジオネラ症集団発生事例の報告があり、2002年以降だけでも推定患者数10名を超える集団感染は毎年発生し、推定患者数100人以上の大規模感染が4例、死亡者数が10人を超える事例も4例報告されている²⁾。

現在、日本国内でのレジオネラ感染原因は浴槽水が最も多いが、これは日本人の入浴の嗜好により普及した循環式浴槽によるものが多いと考えられる。しかし、海外の感染事例を考慮すると、1994年に発生した渋谷区内の研修センターの冷却塔水を原因とするポンティアック熱の集団感染事例^{3,4)}以外にも、冷却塔水を原因とする感染事例が日本国内においても潜んでいるのではないかと思われる。

平成6年に厚生省（当時）監修による「レジオネラ症防止指針」が出版されて（現在、第3版⁵⁾として出版）レジオネラ属菌の菌数と対策について記され、平成15年7月の厚生労働省告示第264号「レジオネラ症の発生を防止するために必要な措置に関する技術上の指針」⁶⁾では、レジオネラの感染源として冷却塔が考慮されている。しかしながら、わが国では、浴槽水等とは異なり、冷却塔水についてはレジオネラの菌数を規制する法令が整備されていない。そのため、現状としては、冷却塔水におけるレジオネラ管理は各施設管理者に委ねられている状態である。

このような実態をふまえて、冷却塔水のレジオネラ属菌の生息実態を調査した結果について報告する。

材料と方法

1. 試料水

東京都健康安全研究センター（以下、当センター）に搬入された冷却塔水計688検体の検査を実施した。その内訳は平成17年度125検体、18年度176検体、19年度81検体、20年度47検体、21年度69検体、22年度92検体および23年度98検体である。

2. 試験方法

試料水20 mLを孔径0.22 μmのセルロース混合エステル滅菌メンブランフィルターで吸引ろ過し、フィルター上の捕捉物を滅菌精製水5 mLで1分間洗い出した後、0.2 M HCl-

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科

^c 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

KCl溶液 (pH2.2) 5 mLを添加して3~5分間酸処理を行った。この酸処理済み液をWYO α 寒天培地 (栄研化学) 2枚とGVPC α 寒天培地 (日研生物医学研究所) 2枚に各0.25 mLずつ (計1 mL) 塗布し, 37 °Cで5~7日間培養した (図1)。

判定は図2に示すフローに従った。すなわち, 灰白色の湿潤集落数を計数し, これを羊血液寒天培地/BCYE α 寒天培地 (日研生物医学研究所) に画線培養した。BCYE α 寒天培地のみで発育したものを, ラテックス凝集反応 (OXID, Legionella Latex Test Kit), 免疫血清反応 (デンカ生研, レジオネラ免疫血清「生研」), PCR法 (核酸抽出: PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent, プライマー: LEG448およびLEG854⁷⁾), およびDNA-DNAハイブリダイゼーション法 (極東製薬工業 (株), DDHレジオネラ) を適宜組み合わせることで菌種と血清群を決定した。

なお, 本法による検出限界は5 CFU/100mLである。

結果と考察

1. レジオネラ検出状況

表1に冷却塔水からの検出されたレジオネラ属菌の年度別検出状況をまとめた。688検体中290検体 (42.2%) から, レジオネラが検出された。レジオネラ症防止指針第3版⁵⁾の指針値100 CFU/100mLを超えたものが, 181件 (26.3%) あり, 最大検出菌数は240,000 CFU/100mLであった。年度別の検出率は30~55%で推移しているが, 平均は42.2%であった。この傾向を平成14~16年度の検出率⁸⁻¹⁰⁾と比較してみると, 定点調査ではないので年度毎に対象となる施設は異なるが, この3ヶ年の平均は38.0%であり, 比較的安定した検出率であった。

「レジオネラ防止指針第3版」ではエアロゾルを直接吸引する可能性の低い人工環境水中に100 CFU/100mL以上のレジオネラが検出された場合, 清掃, 消毒等の対策を講じ, 対策後には10 CFU/100mL未満であることを確認するよう明記されている。本調査において, 25%以上の冷却塔において, 殺菌・洗浄等の対策を講じなければならない状況であったことが伺えた。

当センターに搬入される検水は「建築物における衛生的環境の確保に関する法律」¹¹⁾の特定建築物 (興行場, 百貨店, 遊技場および旅館等で延べ面積3,000 m²以上の建築物および学校教育法第1条に規定する学校の用途に用いられる建築物で延べ面積8,000 m²以上の建築物) のうち, 23区内の東京都が所管する延べ面積10,000 m²に該当するものが多く, 冷却塔が原因となるレジオネラ症が発生した場合, 与える影響および被害は大きいと考えられる。

また, 2005年4月~2012年3月に海外での冷却塔が原因と推定されるレジオネラ症感染事例は, 8ヶ国から16件報告されている²⁾。これらの原因施設はホテルや老人福祉施設がほとんどを占めていたが, 冷却塔が原因とされるもので菌数が明らかな事例の多くは, 10,000 CFU/100mLを超えていた。

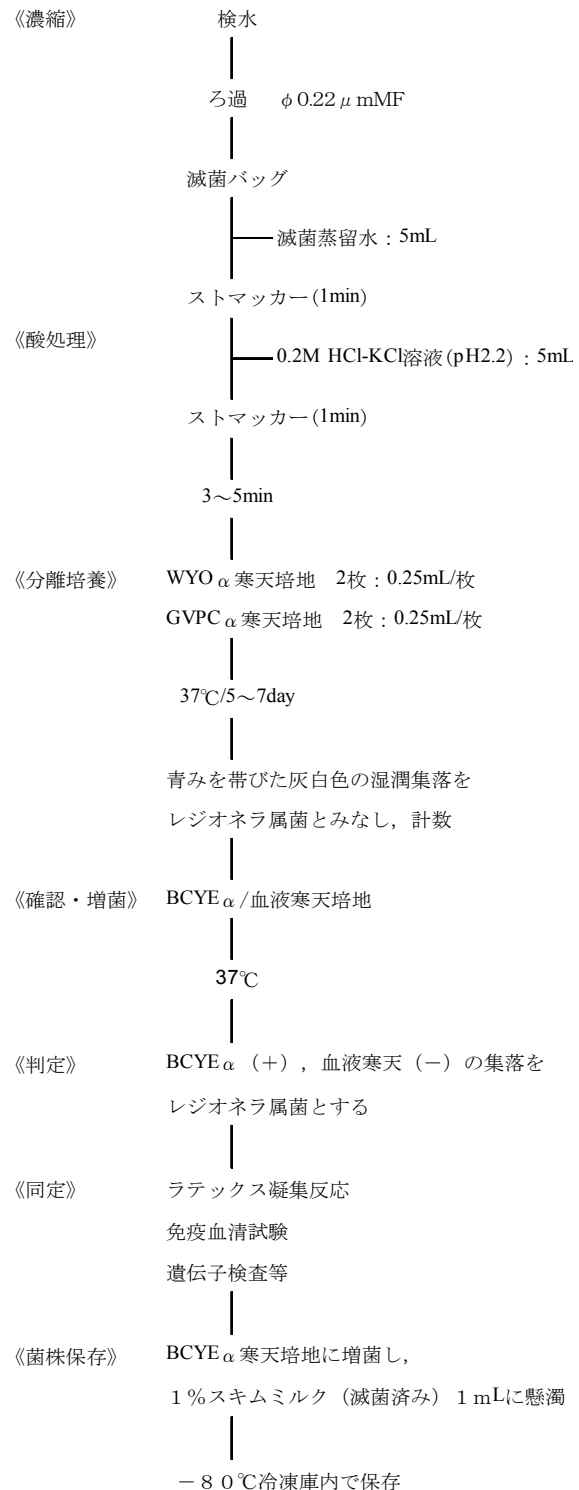


図1. 冷却塔水からのレジオネラ培養法

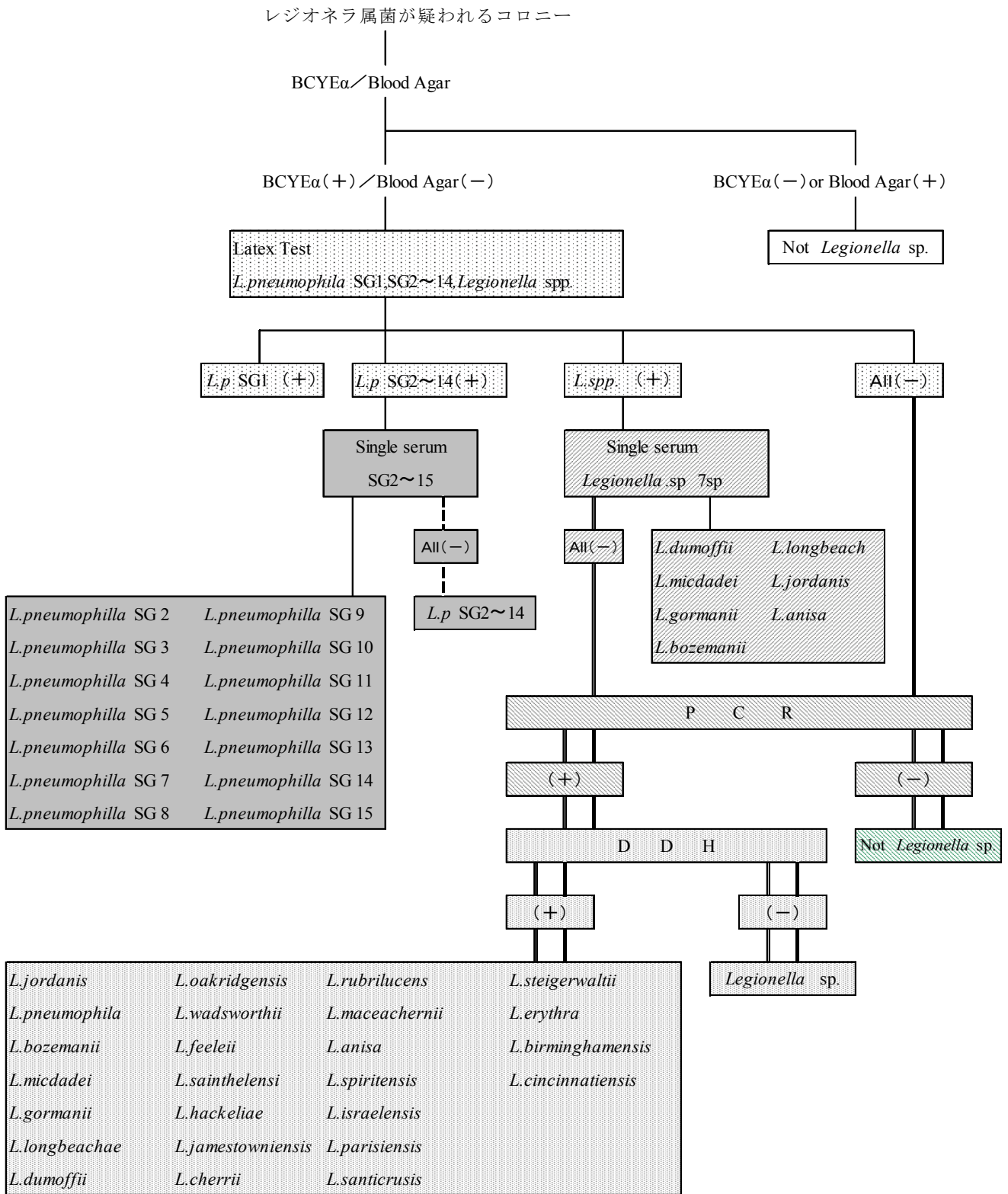


図2. 分離されたレジオネラ属菌の菌種および血清群 (SG) の判別法

表 1. 冷却塔水中から検出されたレジオネラ属菌の年度別検出状況

年度 (平成)	17	18	19	20	21	22	23	合計	
総検体数	125	176	81	47	69	92	98	688	
検 体 数 (%)									
検出限界 ^a 未満	88 (70.4)	117 (66.5)	41 (50.6)	20 (42.6)	35 (50.7)	42 (45.7)	55 (56.1)	398 (57.8)	
検出限界 ^a 以上	37 (29.6)	59 (33.5)	40 (49.4)	27 (57.4)	34 (49.3)	50 (54.3)	43 (43.9)	290 (42.2)	
菌数 (CFU/100mL)	5 ≤, <10	0 (0)	0 (0)	3 (3.7)	1 (2.1)	2 (2.9)	1 (1.1)	2 (2.0)	9 (1.3)
	10 ≤, <10 ²	8 (6.4)	25 (14.2)	13 (16.0)	11 (23.4)	14 (20.3)	14 (15.2)	15 (15.3)	100 (14.5)
	10 ² ≤, <10 ³	13 (10.4)	23 (13.1)	9 (11.1)	10 (21.3)	11 (15.9)	14 (15.2)	13 (13.3)	93 (13.5)
	10 ³ ≤, <10 ⁴	13 (10.4)	8 (4.5)	14 (17.3)	2 (4.3)	4 (5.8)	19 (20.7)	9 (9.2)	69 (10.0)
	10 ⁴ ≤, <10 ⁵	3 (2.4)	2 (1.1)	1 (1.2)	3 (6.4)	3 (4.3)	2 (2.2)	4 (4.1)	18 (2.6)
	10 ⁵ ≤, <10 ⁶	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)
最大検出菌数(CFU/100mL)	17,000	240,000	13,000	79,000	70,000	14,000	36,000		

* 検出限界：5 CFU/100mL

一方、国内では、1994年8月に渋谷区内の某企業研修センタービルの冷却塔水中のレジオネラを原因としたポンティアック熱の集団感染（感染者数45名）^{3,4)}が発生して以来、冷却塔水を原因とするレジオネラ症集団感染事例は報告されていない。しかしながら、今回の調査で10,000 CFU/100mLを超えた検体は19検体あり、国内でもレジオネラ症集団感染を起こすに十分な菌数の冷却塔が存在している事が明らかになった。

2. 分離されたレジオネラの菌種の同定および血清群別

冷却塔水中から分離された*Legionella* spp.365株について、菌種を同定し、血清群を調査した結果を図3にまとめた。*L.pneumophila* は346株あり、血清群別に見ると、*L.pneumophila* 1群（209株）が最も多く、次いで7群（55株）、5群（45株）、13群（13株）の順であった。浴槽水で検出頻度の高い*L.pneumophila*の血清群は1群、6群、5群、3群の順であり¹²⁾、今回冷却塔水中から検出された血清群とは異なっていた。また、*L.pneumophila*以外の19株のうち、免疫血清反応で菌種が確定できたものは9株で、*L.bozemanii*が7株、*L.micdadei*が2株であった。ラテックス凝集反応では*Legionella* spp.であるが、免疫血清反応では陰性だった8株を*Legionella* sp.とし、うち5株はPCR法を行い、遺伝子学的にレジオネラ陽性を確認した。DNA-DNAハイブリダイゼーション法を行った2株はいずれも、*L.rubrilucens*と同定された。うち1株はラテックス凝集反応で*Legionella* spp.、PCR陽性であり、もう1株はラテックス凝集反応で陰性だった。

他の報告^{13,14)}によると、冷却塔水中のレジオネラ血清群の検出割合との比較では1群の検出割合が50%以上と高いこと、*L.bozemanii*と*L.micdadei*がわずかに検出されたことは共通であった。ただし、これらの報告では1~10群まで

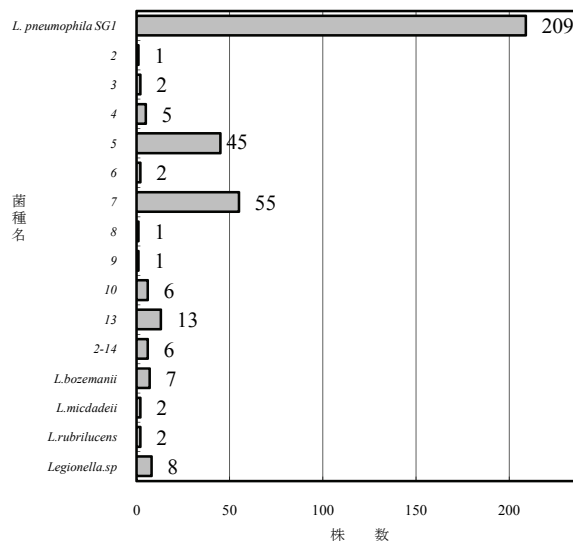


図3. 冷却塔水から分離されたレジオネラ属菌の菌種および血清群 (SG)

の血清群しか述べられていないため、今回筆者らが検出した11~15群の全国的な検出状況は不明であるが、本調査の結果から11~15群が検出株数の1割程度を占めていることが明らかになった。

1994年に発生した渋谷区内の冷却塔水に起因するレジオネラ症はポンティアック熱の集団感染であり、冷却塔下部水槽から検出された菌種は*L.pneumophila* 7群であった。ポンティアック熱は健康人でも感染率が高いが、感冒様症状を示した後、自然軽快してしまうため、原因菌の確認には至らないケースが多い¹⁾。さらに、現在、臨床検査で用いられるレジオネラ尿中抗原検出キットでは、*L.pneumophila* 1群以外のレジオネラに関しては検出感度が低い¹⁵⁾、

今回の調査で冷却塔から検出したレジオネラの42.7%が占めていた*L.pneumophila* 1群以外のレジオネラによる感染事例があったとしても、尿中抗原検査では判明しない。これらのことから、冷却塔水中のレジオネラ分布とこれによる感染発生についてのより詳細な調査が必要と考えられる。

ま と め

平成17～23年度に当センターに搬入された冷却塔水688検体を検査し、以下の結果を得た。

1. 688検体中290検体からレジオネラが検出された。その最大検出菌数は240,000 CFU/100mLであった。
2. レジオネラが検出された検体の中で、レジオネラ症防止指針第3版の指針値100 CFU/100mLを超えていたものが181検体あり、25%以上の冷却塔において、殺菌・洗浄等の対策を講じなければならない状況であったことが伺えた。
3. 冷却塔水中から*Legionella* spp.365株が分離された。このうち*L.pneumophila*は346株であり、*L.pneumophila* 1群209株、7群55株、5群45株、13群13株の順で。浴槽水とは検出頻度の高い血清群が異なっていた。また、*L.pneumophila*以外の19株中、*L.bozemanii*が7株、*L.micdadei*が2株、*L.rubrilucens*が2株同定された。他にも免疫血清反応やPCR法陽性で*L.sp*と同定されたものが8株あった。

謝 辞 本調査に供した検体の採水は、東京都の環境衛生監視員によって行われたものである。記して関係各位に深謝します。

文 献

- 1) 齊藤厚：レジオネラ感染症ハンドブック，2007，日本医事新報社，東京
- 2) <http://www.hcinfo.com/legionnaires-disease/outbreaks> (2012年8月日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) 藪内英子，森正道，齊藤厚，他：感染症誌，**69**，6，654-665，1995.
- 4) 森正道，星野啓一，園田久子，他：感染症誌，**69**，6，646-653，1995.
- 5) 目黒克己：レジオネラ症防止指針第3版，2009，(財)ビル管理教育センター，東京.
- 6) 平成15年7月25日付 厚生労働省告示第264号
- 7) Yamamoto, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T.: Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction, *Microbiol.Immunol.*, **37**, 617-622, 1993.
- 8) 勝田千恵子，保坂三継，榎田隆一，他：東京衛研年報，**54**，296-300，2003.
- 9) 高田千恵子，保坂三継，榎田隆一：東京健安研七 年 報，**55**，283-287，2004.
- 10) 高田千恵子，榎田隆一，保坂三継：東京健安研七 年 報，**56**，313-317，2005.
- 11) 建築物における衛生的環境の確保に関する法律，昭和45年4月14日法律第20号，平成23年6月24日改正.
- 12) 生嶋清美，楠くみ子，石上武，他：東京健安研七 年 報，**63**，267-274，2012.
- 13) 厚生労働省健康局生活衛生課：病原微生物検出情報，**24(2)**，27-28，2003.
- 14) 鈴木敦子，市瀬正之，松江隆之，他：感染症誌，**76**，703-710，2002.
- 15) 村上日奈子：モダンメディア，**50(4)**，14-19，2004.

Survey of *Legionella* Species in Cooling Towers in Tokyo (April 2005-March 2012)

Chieko MUTO^a, Takeshi ISHIKAMI^a, Kumiko KUSUNOKI^a, Akiko INOMATA^a,
Mitsugu HOSAKA^a, and Dai NAKAE^a

Domestic outbreaks of Legionnaires'disease in Japan are almost always due to bath water. By considering overseas outbreaks, a domestic outbreak due to cooling tower water is possible. However, there is no legal limit on the number of *Legionella* bacteria in cooling tower water, so hygiene control of a cooling tower is left to its administrator. The present paper deals with the occurrence of *Legionella* bacteria in cooling tower water in Tokyo from April 2005 to March 2012. We examined 688 water samples for the occurrence of *Legionella* bacteria, and 290 samples (42.2 %) were *Legionella*-positive. One hundred and eighty-one samples (26.3 %) contained *Legionella* bacteria >100 CFU/100 mL, the reference value of the guideline to Legionnaires'disease. The maximum number of *Legionella* bacteria detected was 240,000 CFU/100 mL. *Legionella pneumophila* was detected in 346 of 365 strains of *Legionella* spp. isolated. *Legionella pneumophila* serogroup (SG) typing revealed that SG1 (209 strains) was dominant in cooling tower water, followed by SG7 (55 strains), and SG13 (13 strains). These results differed from SG typing of *Legionella* spp. in bath water. *Legionella* spp. other than *L. pneumophila* were identified as *L. bozemanii* (7 strains), *L. micdadei* (2 strains), and *L. rubrilucens* (2 strains).

Keywords: *Legionella* spp., cooling tower water, serogroup

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan