

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25年度～平成26年度)

武藤 千恵子^a, 石上 武^a, 市川 めぐみ^a, 辻 麻美^a,
田部井 由紀子^a, 鈴木 俊也^a, 保坂 三継^b, 栗田 雅行^b

海外において冷却塔水に起因するレジオネラ症感染事例が多く報告されているが、日本国内での事例報告は稀である。しかしながら、東京都が継続している冷却塔水からのレジオネラ属菌調査においては、多くの施設からレジオネラ症防止指針値を上回る菌数が検出されており、国内で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。このような実態をふまえて、平成25～26年度も冷却塔水におけるレジオネラ属菌の生息実態調査を行った。冷却塔水255件中96件 (37.6 %) からレジオネラ属菌が検出された。レジオネラ症防止指針の指針値100 CFU/100mLを超えたものが67件 (26.3 %) あり、最大検出菌数は780,000 CFU/100mL であった。分離された*Legionella* spp.156株のうち*L. pneumophila*は143株あり、血清群 (Sero group, SG) 別では1 が76株, SG7が33 株, SG13が8株, SG10が7株の順で多く、浴槽水における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13株中、*L. rubrilucens*が5株、*L. birminghamensis*が2株、*L. anisa*、*L. busanensis* および*L. erythra*がそれぞれ1株同定され、免疫血清反応およびラテックス凝集反応で陰性であった3株はすべて遺伝子検査 (LAMP法) で陽性となりレジオネラ属菌と判定された。本調査の結果、およそ半数の冷却塔からレジオネラ属菌が検出されていること、市販の抗血清で同定が難しい菌種が検出されていることから、今後も継続して調査が必要である。

キーワード: レジオネラ属菌, 冷却塔水, 血清群

はじめに

レジオネラ症は、細胞内寄生性のグラム陰性桿菌であるレジオネラ属菌に起因する感染症であり、レジオネラ肺炎もしくは一過性のインフルエンザ様症状を呈するポンティアック熱といった二つの病型を示す¹⁾。また、レジオネラ症は感染症法上の4類感染症であるため、診断した医師は、直ちに保健所へ届ける義務がある。その診断に必要な検査法として、2004年に尿中抗原検査キットが保険適用になり、翌2005年には尿中抗原検査キットが日本呼吸器学会のガイドラインに記載されたこともあり、レジオネラ症届出数は年々増加している²⁾。ただし、日本国内におけるレジオネラ症届出数のほとんどが散发事例であり、感染源不明が半数以上を占めているのが現状である³⁾。

レジオネラ症集団感染事例においては日本国内では浴槽水に起因するものが多く報告されているが、近年、散发事例において、冷却塔水に起因する事例が少数ではあるが報告されている^{4,5)}。また、海外では冷却塔水に起因する集団感染事例が多く、本調査期間中に5事例の報告があった⁶⁾。そのうち4事例では、多数の感染者および死者が出た。

現在、日本国内でのレジオネラ症感染源の多くが原因不明であること、海外の感染事例に冷却塔水に起因するものが多い点を考慮すると、日本国内においても冷却塔水を原

因とする感染事例が潜んでいるのではないかと思われる。しかしながら、冷却塔水についてはレジオネラ属菌数を規制する法令が整備されていないため、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、前報に引き続き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 (以下当センターと略す) に搬入された冷却塔水計255検体の検査を実施した。その内訳は平成25年度139検体および26年度116検体である。

2. 試験方法

レジオネラ属菌検査方法は前報⁷⁾に従った。すなわち、試料水 200 mL を孔径 0.22 μ m の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-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

^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

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)	25	26	合計	
総検体数	139	116	255	
検出限界*未満	85 (61.2%)	74 (63.8%)	159 (62.4%)	
検出限界*以上	54 (38.8%)	42 (36.2%)	96 (37.6%)	
菌数 (CFU/100mL)	5 ≤ ~ < 10	5 (3.6%)	2 (1.7%)	7 (2.7%)
	10 ≤ ~ < 10 ²	12 (8.6%)	10 (8.6%)	22 (8.6%)
	10 ² ≤ ~ < 10 ³	12 (8.6%)	12 (10.3%)	24 (9.4%)
	10 ³ ≤ ~ < 10 ⁴	17 (12.2%)	13 (11.2%)	30 (11.8%)
	10 ⁴ ≤ ~ < 10 ⁵	6 (4.3%)	5 (4.3%)	11 (4.3%)
	10 ⁵ ≤ ~ < 10 ⁶	2 (1.4%)	0 (0.0%)	2 (0.8%)
	最大検出菌数 (CFU/100mL)	780,000	30,000	指針値** 以上 67 (26.3%)

* 検出限界：5 CFU/100mL

** 指針値：100 CFU/100mL

mL) 塗布し, 37 °Cで 5~7 日間培養した. その後, 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」), および DNA-DNA ハイブリダイゼーション法 (極東製薬工業, DDH レジオネラ) を適宜組み合わせて菌種と血清群を決定した. 但し, 免疫血清反応および, DNA-DNA ハイブリダイゼーション法については, レファレンスセンターから配布されたレジオネラ免疫血清 (5 菌種 : *L. feeleii*, *L. londiniensis*, *L. anisa*, *L. hackeliae*, *L. longbeach*) および DNA-DNA ハイブリダイゼーション追加プレート (6 菌種 : *L. busanensis*, *L. gresilensis*, *L. londiniensis*, *L. nautarum*, *L. quinlivanii*, *L. geestiana*) も使用して菌種の決定を行った.

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

冷却塔水から検出されたレジオネラ属菌の年度別検出状況を表1にまとめた. 255検体中96検体 (37.6%) から, レジオネラ属菌が検出された. レジオネラ症防止指針第3版⁸⁾の指針値100 CFU/100mLを超えたものが, 67件 (26.3%) あり, 最大検出菌数は780,000 CFU/100mLであった. また, 各年度別の検出率は平成25年度は38.8%, 平成26年度は36.2%と若干ではあるが, 前報^{7,9)}と比較しても減少傾向にある.

現在は「レジオネラ症防止指針第3版」において, 100 CFU/100mL以上のレジオネラ属菌が検出された場合, 殺菌・洗浄等の対策を講じ, 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, 対策を講じるべき冷却塔が26%以上存在することが明らかとなった.

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」¹⁰⁾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.

実際に, 本調査期間中に海外での冷却塔が原因と推定されるレジオネラ症集団感染事例は, 2013 年はスコットランド レンフルー (感染者数 6 名)¹¹⁾, アメリカ ペンシルバニア州刑務所 (感染者数 4 名)¹²⁾, 2014 年ドイツ ユーリッヒの発電所 (感染者数 83 名, 死者 2 名)¹³⁾, ポルトガル化学肥料工場 (感染者数 417 名, 死者 12 名)¹⁴⁾, アメリカ ニューヨーク州の団地 (感染者数 12 名)¹⁵⁾の 5 事例が報告されている. いずれも感染者数が多い事例では死者も出ていることから, 冷却塔に起因する感染事例は死者を含む多数の感染者が出る可能性があることが明らかとなっている.

一方, 日本国内では, 冷却塔に起因するレジオネラ症集団感染事例は 1994 年渋谷区で発生した事例^{16,17)}以降確認されていないが, 散発事例は少数ではあるが報告されてい

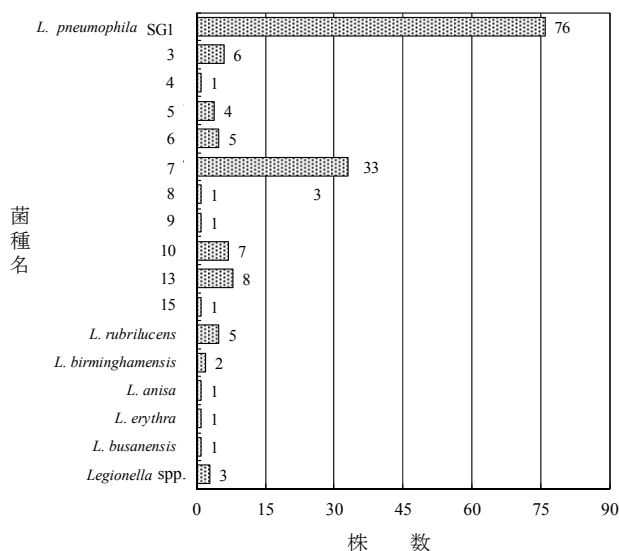


図1. 冷却塔水から分離されたレジオネラ属菌の菌種および血清群

る。近年では2010年3月に神戸市内⁴⁾で、2013年7月に福岡市内⁵⁾で報告があり、いずれも病院内の冷却塔水が感染原因であることが判明している。レジオネラ属菌の検出菌数は神戸市内の事例では2基の冷却塔から520 CFU/100mL および3,800 CFU/100mL、福岡市内の事例では2,500 CFU/100mL 検出されている。

今回の調査においても、1,000 CFU/100mLを超えた検体は43検体あり、国内でのレジオネラ症散発事例を考慮すると、国内でもレジオネラ症感染を起こすに十分な菌数の冷却塔が多数存在している事が明らかになった。

また、病院入院患者や社会福祉施設入所者は、免疫機能が低下していることが多いため、各施設における冷却塔施設管理については、十分留意する必要があると考える。

2. 分離されたレジオネラの菌種の同定および血清群別

Legionella spp.156 株について、菌種を同定し、血清群を調査した結果を図1にまとめた。分離された *L. pneumophila* は143株あり、*L. pneumophila* SG (sero group) 1 (76株) が最も多く、次いでSG7 (33株)、SG13 (8株)、SG10 (7株) の順であった。浴槽水ではSG1, SG6, SG5, SG6の順であり¹²⁾、過去の報告と同様に冷却塔水中から分離された *L. pneumophila* のSG分布は、浴槽水中から分離されたSG分布とは異なっていた。なお、1994年に渋谷区内で発生した集団感染事例では *L. pneumophila* SG7であり、前報^{7,9)} および本報においても2番目に多く分離されている血清群であることから、今後も *L. pneumophila* SG7によるレジオネラ感染事例が起こりうると思われる。一方、2010年に発生した神戸市内の病院および2013年に福岡市内の病院で発生した事例においてはいずれも *L. pneumophila* SG1が感染原因であった。当センターの調査においても、*L. pneumophila* SG1は例年最も多く分離されており、浴槽水における感染事例と同様に冷却塔水中における *L. pneumophila* SG1は感染原因菌として注意すべ

き存在であることがうかがえる。

L. pneumophila 以外の13株中、DDHレジオネラで菌種が確定できたものは、*L. rubrilucens* 5株、*L. birminghamensis* 2株、*L. erythra* 1株であった。さらに、*L. busanensis* 1株がレファレンスセンターより分与されたDDH用追加スリットで、*L. anisa* 1株がレファレンスセンターから分与された免疫血清でそれぞれ菌種が確定できた。また、免疫血清反応およびラテックス凝集反応では陰性であったが、LAMP法でレジオネラ属菌と確定できた株が3株分離された。

国内では、臨床検体から分離された菌株の8割以上が *L. pneumophila* SG1である¹⁸⁾。これは、レジオネラ症の臨床診断方法の96%が、*L. pneumophila* SG1の検出に限定される尿中抗原検査を行っているためであると推察できる。一方、本調査において、検出したレジオネラ属菌の51.3%は *L. pneumophila* SG1以外のレジオネラ属菌が占めていた。このことは、本調査で冷却塔水から検出されたレジオネラ属菌が、レジオネラ症の原因となる可能性が高いことを示している。しかしながら、それらによる感染事例があった場合でも、臨床検査では *L. pneumophila* SG1に対するレジオネラ尿中抗原検出キットが主として用いられているため、感染原因が判明しない。平成23年からは迅速検査としてLAMP法が保険適用となっており、今後、*L. pneumophila* SG1以外のレジオネラ属菌による発生報告や臨床検体からの *L. pneumophila* SG1以外の菌株の分離が増加すれば、冷却塔水を含む環境水との関連性が明らかになるのではないかと期待できる。

また、冷却塔水中のレジオネラ属菌の分布、および、国内での患者発生のピークと冷却塔稼働時期が同時期にあたる³⁾ことから、レジオネラ症の感染発生について今後もより詳細な調査が必要と考えられる。

ま と め

平成25~26年度に当センターに搬入された冷却塔水255検体を検査し、以下の結果を得た。

- 255 検体中 96 検体からレジオネラ属菌が検出された。その最大検出菌数は780,000 CFU/100mLであった。
- レジオネラ属菌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67件(26.3%)あった。各年度別の検出率は若干ではあるが、前報と比較しても減少傾向にあるものの、殺菌・洗浄等の対策を講じなければならない状況の施設が多く存在することが伺えた。
- 冷却塔水中から *Legionella* spp.156株が分離された。このうち *L. pneumophila* は122株であり、*L. pneumophila* SG1が76株、SG7が33株、SG13が8株、SG10が7株の順に多く、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13株中、*L. rubrilucens* が5株、*L. birminghamensis* が2株、*L. anisa*、*L. erythra* および *L. busanensis* が1株ずつ分離された。*L. erythra* および *L. busanensis* は市販抗血清や検査キットでは同定できない菌

種であった。また、免疫血清反応およびラテックス凝集反応では陰性であったが、LAMP法でレジオネラ属菌と判定できた株が3株分離された。

本調査の結果、およそ半数の冷却塔からレジオネラ属菌が検出されていること、市販の抗血清で同定が難しい菌種が検出されていることから、今後も継続して調査が必要である。

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) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「レジオネラ症」, http://www.nih.go.jp/niid/images/labmanual/legionella_2012.pdf (2015年8月31日現在, 本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) 倉文明：ビルと環境, **149**, 36-44, 2015.
- 3) 国立感染研究所感染症疫学センター：感染症週報, **16** (25), 7-9, 2014
- 4) K. Osawa, K. Shigemura and Y. Abe : Journal of Infection and Chemotherapy, **20**, 68-70, 2014.
- 5) 国立感染研究所感染情報センター：病原微生物検出情報, **36**(1), 13-14, 2015.
- 6) Legionella Prevention and Education, Legionnaires' Disease Outbreaks : <http://hcinfor.com/about/outbreaks/> (2015年8月31日現在, 本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 7) 武藤千恵子, 石上武, 楠くみ子, 他：東京健安研セ年報, **64**, 195-199, 2013.
- 8) 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.
- 9) 武藤千恵子, 石上武, 楠くみ子, 他：東京健安研セ年報, **63**, 275-280, 2012.
- 10) 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.
- 11) <http://news.stv.tv/west-central/231700-cooling-towers-around-renfrew-treated-for-legionnaires-bacteria/> (2015年8月31日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 12) State prison in Somerset battling outbreak of Legionnaires' disease : http://www.pennlive.com/midstate/index.ssf/2013/07/state_prison_in_somerset_battl.html (2015年8月31日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 13) Das Juelicht : In Weisweiler nächste Quelle für Legionellen ausgemacht, <http://www.das-juelicht.de/nachrichten/artikel/14027.php> (2015年8月31日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 14) T.Shivaji, C.Sousa Pinto, A.San-Bento : Euro surveillance, **19** (50), 2014.
- 15) THE NEW YORK CITY DEPARTMENT OF HEALTH AND MENTAL HYGIENE : Health Department Preliminary Test Results Indicate Legionella Bacteria in Co-Op City Cooling Towers , <http://www.nyc.gov/html/doh/html/pr2015/pr004-15.shtml> (2015年8月31日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 16) 藪内英子, 森正道, 斉藤厚, 他：感染症誌, **69**, (6), 654-665, 1995 .
- 17) 森正道, 星野啓一, 園田久子, 他：感染症誌, **69**, (6), 646-653, 1995 .
- 18) 国立感染研究所感染情報センター：病原微生物検出情報, **34** (6) , 155-170, 2013.

Survey of *Legionella* Species in Cooling Towers in Tokyo (April 2013- March 2015)

Chieko MUTO^a, Takeshi ISHIKAMI^a, Megumi ICHIKAWA^a, Asami TSUJI^a, Yukiko TABEL^a,
Toshinari SUZUKI^a, Mitsugu HOSAKA^a, and Masayuki KURITA^a

Outside Japan, outbreaks of Legionnaires' disease are primarily due to cooling tower water. However, Legionnaires' disease due to cooling tower water is rare in Japan. According to continuous investigations based on surveys of *Legionella* species in cooling towers in Tokyo, *Legionella* species were detected at levels greater than the prevention guidance level at many facilities. The present study reports the occurrence of *Legionella* bacteria in cooling tower water in Tokyo from April 2013 to March 2015. A total of 225 water samples was tested for *Legionella* bacteria, and 96 water samples (37.6%) were positive for *Legionella*. Sixty-seven samples (26.3%) were >100 CFU/100 mL, which is the reference value in the guidelines for Legionnaires' disease. The maximum number of *Legionella* bacteria was 780,000 CFU/100 mL. *L. pneumophila* comprised 143 of the 156 strains of *Legionella* spp. isolated. Typing for *L. pneumophila* serogroup (SG) revealed that SG1 (76 strains) was dominant in cooling tower water, followed by SG7 (33 strains) and SG13 (8 strains). These results were different from those obtained after the typing of the *Legionella* spp. SGs in bath water, which we reported previously. *Legionella* spp. other than *L. pneumophila* were identified as *L. rubrilucens* (5 strains), *L. birminghamensis* (2 strains), *L. anisa* (1 strain), *L. erythra* (1 strain), *L. busanensis* (1 strain), and *Legionella* spp. (3 strains).

Keywords: *Legionella*, cooling tower water, serogroup

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