

千葉県における冷却塔冷却水からの*Legionella*の分離

小岩井健司¹⁾, 高木 謙二¹⁾, 岸田 一則¹⁾
三瓶 憲一²⁾, 矢崎 廣久¹⁾

Isolation of *Legionella* Species from Cooling Tower Water in Chiba Prefecture

Kenji KOIWAI, Kenji TAKAGI, Kazunori KISHIDA
Kenichi SANBE and Hirohisa YAZAKI

I はじめに

ここ数年、水冷式冷房装置（以下冷却塔と略）の冷却水中に生育する*Legionella*³⁾が、*Legionella*症の原因菌として注目されている。

日本での本感染症は、1981年に齊藤ら¹⁾が初めて報告し、それ以降、数多くの散発例が確認されている。しかし、千葉県内では現在まで患者発生の報告はない。

今回、本感染症の発生の動向をうかがう目的で、県内の冷却塔冷却水の*Legionella*の汚染状況について調査を行った。

II 調査方法

1. 調査期間および対象

冷却水の調査は、1987年12月から1988年8月まで毎月1回、千葉市および船橋市の冷却塔A、B、C3基について行った（延べ27検体）。また、千葉市内の他の1基については、1988年6月と8月に計7検体を検査した。河川水は千葉市と市川市の河川を対象とし、1988年8月に6検体を調査した。なお、すべての検体について、*Legionella*の検査の他、水温、pH、一般生菌数の測定も併せて行った。

2. 検査方法

1) 分離方法

検水400mlを遠心分離（4℃、7000rpm.、30分間）後、上澄水を静かに捨て、残量を4～10mlとし、この上澄水に沈澱物を再懸濁させ検査試料とした。検査試料を2本の試験管に1.0mlづつとり、1本は0.2M KCl-HCl

buffer (pH2.2) 1.0mlと混合し、室温で10分間酸処理を行った。他の1本は50℃で20分間加熱処理した。処理後の試料0.1mlをそれぞれWYO培地（栄研化学）に塗抹、35℃で3～10日間培養した。

2) 同定検査

WYO培地に発育した白色、正円形の集落をB-CYE培地および血液寒天培地に塗抹し、B-CYE培地のみ発育したグラム陰性の桿菌について、オキシダーゼ、カタラーゼ、B-CYE培地上での蛍光、硝酸塩還元能、ウレアーゼ、ゼラチン液化試験、ラクタマーゼおよび馬尿酸加水分解試験の性状検査を行った。その結果、*Legionella*を同定した。

*Legionella*と同定された菌株については、レジオネラ免疫血清（デンカ生研）を用いて型別を行った。

3) 薬剤感受性試験

分離した*Legionella*のうち、季節および各冷却塔を代表する16株について、微生物検査必携²⁾に準拠して、寒天平板希釈法によりMICを測定した。測定用培地はB-CYE培地を、また、薬剤はChloramphenicol (CP)、Kanamycin (KM)、Ampicillin (AP)、Erythromycin (EM)、Rifampicin (RFP) およびCephaloridine (CER) を用いた。

III 成績

1. *Legionella*の検出状況

冷却水および河川水からの*Legionella*の検出状況を表1に示す。冷却水では34検体中31検体（84株、91.2%）からと、非常に高率に*Legionella*が検出された。一方、河川水からの分離はみられなかった。

図1-1、1-2および1-3は、冷却塔A、B、Cの*Legionella*の菌数、水温およびpHを示したものである。いずれの冷却水でも、冬季、夏季を問わず調査期間

1) 千葉県衛生研究所

2) 柏保健所

(1988年9月30日受理)

表1. 冷却水および河川水からのLegionella検出状況

採水年月	冷却水		河川水	
	検体数	Legionella	検体数	Legionella
		陽性数		陽性数
'87. 12	3	3		
'88. 1	3	3		
2	3	3		
3	3	3		
4	3	3		
5	3	3		
6	6	5		
7	3	3		
8	7	5	6	0
合計	34	31(91.2%)	6	0

中すべて本菌が陽性であり、その菌数は100ml当り $10^1 \sim 10^4$ であった。一般生菌数は、冷却塔Aは $10^0 \sim 10^3 / ml$, Bは $10^1 \sim 10^3 / ml$, Cは $10^2 \sim 10^5 / ml$ であった。

菌分離の処理方法によるLegionellaの菌数を比較すると、酸処理の方が若干菌数が高い傾向であった。加熱処理の場合、発育したカビによってLegionellaの菌数測定が困難なことがあった。

2. 分離菌株の生物学的性状

分離された84株の生物学的性状を表2に示した。すべてLegionella pneumophila (L. pneumophila)

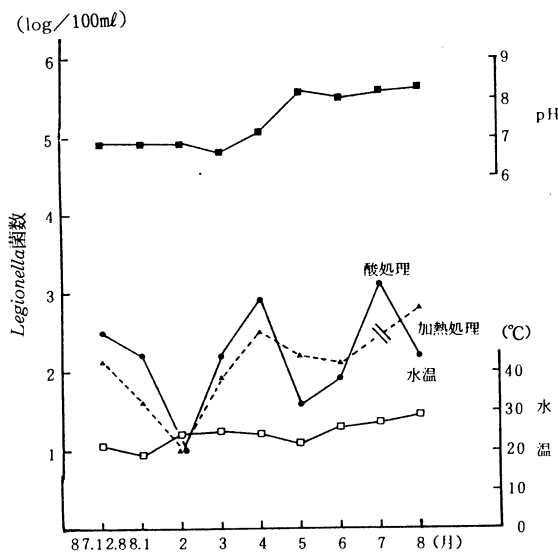


図1-1 冷却水中のLegionellaの消長 (冷却塔A)

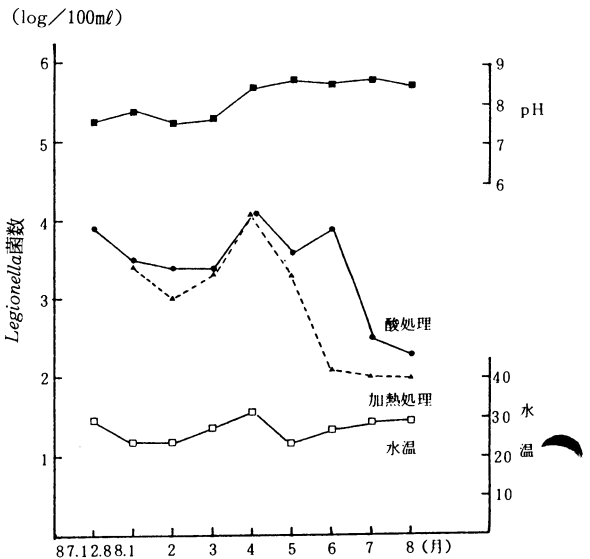


図1-2 冷却水中のLegionellaの消長 (冷却塔B)

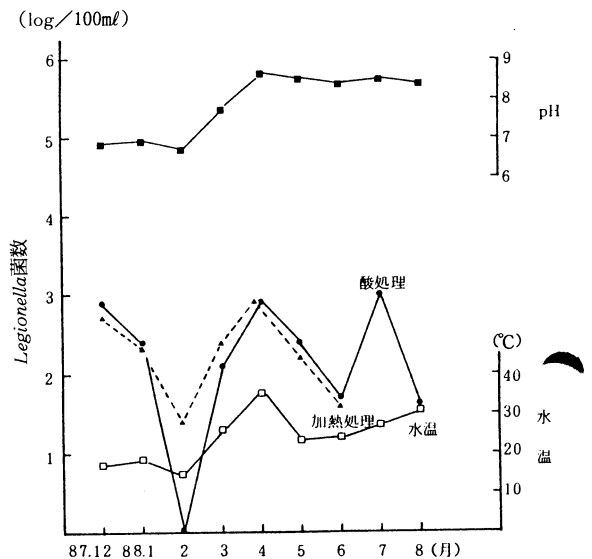


図1-3 冷却水中のLegionellaの消長 (冷却塔C)

の性状と一致した。ただし、オキシダーゼ反応は市販のろ紙を用いた検査では、ほとんどの株が陰性と判定された。また、Kovacの試験管法でも約20%が陽性となったのみであった。

L. pneumophilaと同定された菌株について血清型別を行ったところ、C冷却塔で分離された32株がserogroup 4であったが、他はすべてserogroup 1であった。

3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は*L. pneumophila*16株について行った。いずれの薬剤にも感受性であったが、特に、Rifampicinが強い抗菌力を示した(図2)。

表2. 分離菌株の生物学的性状

性状	<i>L.pneumophila</i> (84株)	+%
グラム染色	陰性	100
形態	桿菌	100
BCYE寒天発育性	+	100
血液寒天発育性	-	0
オキシダーゼ		
ろ紙法	d	6.0
Kovac法	d	20.2
カタラーゼ	+	100
BCYE寒天上での蛍光(365nm)	+	100
硝酸塩還元能	-	0
ウレアーゼ	-	0
ゼラチン液化試験	+	100
β-ラクタマーゼ	+	100
馬尿酸加水分解試験	+	100

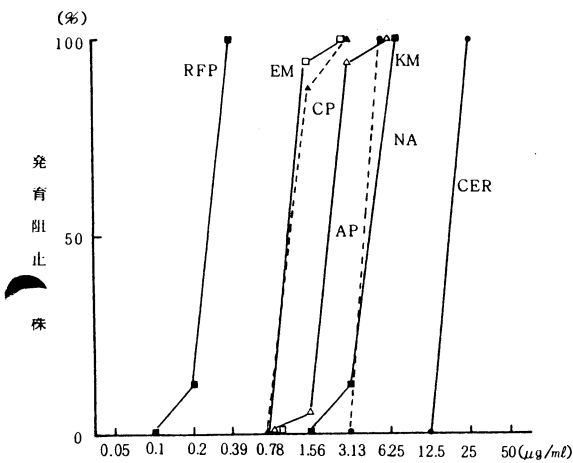


図2. *L.pneumophila* (16株)の各種抗生剤に対する感受性

IV 考察

*Legionella*が世界的に注目されたのは、本菌が1976年にPhiladelphiaで発生した在郷軍人病の原因菌として知られてからである。それ以後、わが国においても精力的に検査が行われ、1981年に初めて*Legionella*症の報告⁹⁾がなされた。

一方、*Legionella*症の原因菌である*Legionella*の生態についても調査^{3,4)}がなされ、冷却水中の本菌は*Legionella*症の最も重要な感染源の一つといわれている。

今回の調査で、千葉県内の冷却水にも100ml当り10¹~10⁴個の本菌が存在していることが確認された。冷却水中に*Legionelle*がどの程度以上存在すると危険性を伴うかはまだ明らかではないが、少なくとも数10個以下/100mlに保持することがよいといわれている⁵⁾。そのような観点からみれば、A、B、Cの3基の冷却塔は速やかに除菌を図る必要がある。

今回検出された菌株は、すべて*L. pneumophila*と同定された。serogroup別では62% (52/84)がserogroup 1, 38% (32/84)がserogroup 4であった。これはFliermansら⁶⁾あるいは伊藤⁹⁾の報告とよく一致していた。また、各冷却塔とも冷却水中の*Legionella*の除菌をしなければ、毎月同じserogroupの菌が分離される傾向であった。

河川水からの本菌の検出も試みたが、まったく分離されなかった。このことは、被検検体数が少ないことも一因であるが、酸処理あるいは加熱処理を行っても雑菌の抑制が十分でないため、培養の初期にWYO培地に雑菌が多数発育し、生育の遅い本菌の分離培養ができないことが大きな要因と思われる。冷却水を検体とした場合も、カビ等の発育により*Legionella*の分離が困難なことがあったが、河川水あるいは土壌からの本菌の分離には、検体の前処理あるいは選択分離培地の改良が必須と考えられる。

*Legionella*は現在24菌種が知られているが、そのすべての菌種が病原菌であるかは不明である。さらに、発症菌量等も明確でないため、冷却水から*Legionella*が分離された場合の対応が非常に難しいのが現状である。しかしながら、環境分離株の中には、強い病原性のある株の存在が確認^{4,7)}されており、*Legionella*症の発症を予防するという立場から、とりあえずは冷却水中の*Legionella*の菌数を、前述したように100ml当り数10個以下にするように清掃、除菌を行っていくことが必要と思われる。

V まとめ

1987年12月から1988年8月まで、千葉県内の冷却塔冷却水および河川水からの*Legionella*の分離を試みた。その結果、冷却水の91.2% (31/34)から*Legionella*を検出した。しかし、河川水からの分離はみられなかった。分離された*Legionella*84株はすべて*L. pneumop-*

hilaで、その菌数は冷却水100ml当り $10^1 \sim 10^4$ であった。

*L. pneumophila*のserogroupは、1が62% (52/84), 4が38% (32/84)であった。

16株について薬剤感受性試験を行ったところ、いずれの薬剤にも感受性であった。

稿を終えるに当たり、*Legionella*の同定を快くお受けくださった岐阜大学医学部藪内英子先生、山本啓之先生に深謝します。また、採水にご協力いただいた方々、化学検査にご協力いただいた当所先活環境研究室の皆様感謝します。

文献

- 1) 齊藤 厚, 下田照文, 長沢正夫, 田中 光, 伊藤直美, 重野芳輝, 山口恵三, 広田正毅, 中富昌夫, 原 耕平 (1981): 本邦で初めてのLegionnaires' disease (レジオネラ症)の症例と検出菌の細菌学的性状, 感染症誌, 55: 124~128.
- 2) 微生物検査必携 細菌・真菌検査第3版, N18~N19, 日本公衆衛生協会(東京), 1987.
- 3) 中浜 力 (1983): 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, 感染症誌, 57: 643~655.
- 4) 伊藤直美 (1983): わが国全土における*Legionella*の分布調査及び検出菌の病原性に関する研究, 感染症誌, 57: 682~694.
- 5) アクアス株式会社: 在郷軍人病(レジオネラ症)に関する資料.
- 6) Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L., and Pope, D. H.: Ecological distribution of *Legionella pneumophila*, Appl. Environ. Microbiol., 41: 9~16.
- 7) 渡辺正俊 (1985): *Legionella pneumophila*の病原性に関する研究-特に実験動物における感染成立について-, 感染症誌, 59: 342~354.