

原 著

温泉施設に分布する *Legionella pneumophila* の 侵入経路の解明に関する研究

加藤尚之¹⁾, 大野 章²⁾, 齋藤宏治¹⁾, 山口恵三²⁾

(平成 23 年 1 月 23 日受付, 平成 23 年 2 月 21 日受理)

Study on Elucidation of Invasion Pathway of *Legionella pneumophila* in Hot Spring Facilities

Naoyuki KATO¹⁾, Akira OHNO²⁾, Koji SAITO¹⁾ and Keizo YAMAGUCHI²⁾

Abstract

It is not clear about the route that *Legionella pneumophila* comes in the recycling-type supply system of hot spring water. Although there is no clear evidence, we speculate that the dust with amoeba cysts phagocyted *Legionella* cells derived from soil may be a major contributor, and the dust directly, or by attaching to human body, may enter in the bathtub. It is very important on the prevention of the disease outbreak for us to elucidate how *Legionella* come in the recycling-type supply system of hot spring water.

We studied in this article the genetic identity between *L. pneumophila* strains isolated from soil around hot spring facility and the strains from bathtub water of the facility in Shizuoka, Niigata, Kagoshima and Kanagawa prefectures. *L. pneumophila* was detected from bathtub water samples in 10 of 11 hot spring facilities. Thirteen soil samples from 11 facilities were also examined, and only 5 strains of *L. pneumophila* were isolated from 3 soil samples around 2 facilities. Serogroup of 2 strains of these isolates were coincident with the isolates from the matching hot spring water. The similarity of strains from both sources was examined by using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis protocol. As the result, the identity was not recognized at least in two facilities.

Key words : Hot spring water, *Legionella pneumophila*, Soil, Polymerase chain reaction, Serogroup, Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

要 旨

温泉循環システムへのレジオネラ ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) の侵入経路

¹⁾ 東邦大学医学部化学研究室, ²⁾ 東邦大学医学部微生物・感染症学講座, 〒143-8540 東京都大田区大森西 5-21-16. ¹⁾ Departments of Chemistry and ²⁾ Microbiology & Infectious Disease, Faculty of Medicine, Toho University, 5-21-16 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan.

は明確になっていないが、一般的には土壌からレジオネラ属菌を内包するアメーバシストを含む埃が、直接あるいは人の体に付着して浴槽に入ると考えられている。レジオネラ属菌がどのようにして温泉循環システムに侵入するか、その経路を明らかにすることは、レジオネラ症の集団発生の予防にとって重要である。

本論文において、著者らは静岡県、新潟県、鹿児島県、神奈川県各温泉施設周辺の土壌から分離された *L. pneumophila* と温泉施設浴槽水から分離された同一血清群の株について遺伝的同一性を検討した。*L. pneumophila* は 11 温泉施設の浴槽水の中で 10 施設から検出された。また 11 温泉施設周辺の土壌 13 試料の中で *L. pneumophila* が検出されたのは、2 施設周辺の土壌 3 試料から 5 株であった。その 2 施設の周辺土壌から分離された 2 株の *L. pneumophila* について血清群が温泉の浴槽水と一致した。これらについて random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD 法) を用いて株の同一性を調べた。結果は今回の 2 施設については少なくとも周辺土壌由来と温泉水由来の同一血清群株での遺伝的同一性を確認できなかった。

キーワード：温泉水、レジオネラ ニューモフィラ、土壌、PCR 法、血清群、RAPD 法

1. はじめに

1976 年米国のフィラデルフィアで行われた在郷軍人大会で、その参加者その他の宿泊客および通行人を含む 221 名に原因不明の集団肺炎が発症し 34 名が死亡するという事件が発生した。その後の調査で、患者がクーリングタワーの飛沫中の病原菌を吸引し発症したことが明らかとなった (Brenner *et al.*, 1979)。それ以降レジオネラ肺炎の感染症例は世界中から報告されるようになり、特に診断技術の進歩に伴い感染症例数は増加している。また外国での感染例のほとんどが、クーリングタワー、給湯施設、加湿器、渦流浴などの人工環境水が感染源となっていることから、本菌が水環境に広く分布していることが浮き彫りにされている。

一方、我が国におけるレジオネラ肺炎の感染症例は、斎藤ら (1981) の報告が最初であった。最近では温泉におけるレジオネラ属菌のヒトへの感染が散発し、社会問題となっている (高橋ら, 1995; 中館ら, 1999)。その原因の一つに、最近の温泉ブームで一日当たりの入浴客が急増し、そのニーズに応えるため、入浴施設の大規模化が進んでいることが挙げられる。大型施設では、大量にお湯が必要となり、それに伴い必然的に源泉の湯量が不足することから、循環による方式を採らざるを得ないのが現状である。循環式ろ過装置では、ろ過器のろ材がアメーバなどの原生動物の繁殖の場となり、そのようなところにレジオネラ属菌が入り込むと、レジオネラ属菌の宿主であるアメーバ内でレジオネラ属菌が増殖し、循環湯と共に浴槽内に侵入する。では何故レジオネラ属菌が温泉浴槽および露天風呂に侵入するのか。これまでレジオネラ属菌は、土壌、河川水、湖沼水などの自然環境中に生息し、それが土埃などにより浴槽内に侵入すると考えられている。また入浴客自身が浴槽に持ち込むとも考えられている。しかし、いずれに関しても詳細は明らかになっていない。これら侵入経路を解明することは、レジオネラ属菌からの温泉の保護およびレジオネラ感染症の予防対策を立てる上でも重要であると考えられる。そこで今回、温泉での感染が報告されている *L. pneumophila* に着目し、温泉水およびその周辺土壌から検出された *L. pneumophila* が、遺伝学的に同一株由来であるか否かを明らかにするために、温泉水およびその周辺土壌を採取して検討を行った。

2. 実験材料および方法

2.1 試料

試料は 2002 年 7~12 月に静岡県 (A~H)、新潟県 (I)、鹿児島県 (J)、神奈川県 (K) の各温

Table 1 Chemical character of the hot spring waters tested.

| Sampling points | pH | Tw (°C) | Type of hot spring |
|-----------------|------|---------|---|
| A | 8.31 | 40.3 | Na-SO ₄ · Cl |
| B | 8.78 | 40.1 | Na-SO ₄ |
| C | 8.46 | 39.1 | Ca · Na-SO ₄ |
| D | 7.71 | 45.7 | Na · Mg-Cl |
| E | 8.10 | 40.0 | Na · Mg-Cl |
| F | 8.39 | 42.4 | Ca · Na-SO ₄ |
| G | 9.31 | 40.7 | Na-HCO ₃ · CO ₃ · SO ₄ |
| H | 8.77 | 39.3 | Ca · Na-SO ₄ |
| I | 7.43 | 40.8 | Na · Ca-SO ₄ |
| J | 7.84 | 41.1 | Na-Cl |
| K | 7.32 | 41.8 | Na-Cl · SO ₄ |

泉源泉 (Table 1), 浴槽水, 露天風呂を採取した。またそれらの温泉施設周辺 (温泉採水地を中心として半径約 300 m 以内) で表面より深さ 15 cm 以内の土壌を採取した。

2.2 レジオネラ属菌の検出および同定

2.2.1 土壌からの検出

土壌試料 50 g に対し, 滅菌蒸留水 250 mL を加え激しく攪拌を行った。攪拌後, 滅菌済みキャップ付き試験管に上清 1 mL を取り, 等量の 0.2 M KCl-HCl 緩衝液 (pH 2.2) を加え攪拌し, 15 分間静置後, buffered charcoal yeast extract α (BCYE α) 培地にサプリメントとして modified wadowsky yee (MWY) supplement (OXIOD 社製) と Pimaricin (SIGMA 社製) を 0.1 mL 添加した培地全面にコンラージ棒で塗抹し, 35°C で 5~6 日間培養を行った。これを direct (0time) 法とした。

一方, enrichment 法では土壌試料を 35°C で 9 週間インキュベーションを行った。その間, 1 週間毎に上清 1 mL を滅菌済みキャップ付き試験管に取り, 等量の 0.2 M KCl-HCl 緩衝液 (pH 2.2) を加え攪拌し, 15 分間静置後, 以下同様に培地に塗抹し 35°C で 5~6 日間培養した。どちらの方法とも, 培養後レジオネラ属菌を疑う集落を白金耳で釣菌し, レジオネラ属菌であることを確認するために, BCYE α 培地および Muller-Hinton 培地にそれぞれ塗抹し, 前者のみ発育した菌をレジオネラ属菌とした (Koide *et al.*, 2001)。その後, Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により菌種の同定を行い, *L. pneumophila* については, さらに免疫血清凝集反応 (デンカ生研) で血清群 (serogroup, SG) の同定を行った。

2.2.2 温泉水からの検出

温泉水 200 mL を滅菌チューブに取り, 4°C, 9,000 回転で 15 分間, 遠心分離 (Avanti HP 20 Beckman Coulter) を行った。遠心後, 上清を捨て 1 mL に濃縮した。等量の 0.2 M KCl-HCl 緩衝液 (pH 2.2) を加え攪拌し, 20 分間静置後, WYO α 培地 (栄研化学) に 0.1 mL 滴下し, コンラージ棒で培地全面に塗抹した。35°C で 5~6 日間培養後, レジオネラ属菌を疑う集落を白金耳で釣菌し, レジオネラ属菌であることを確認するために, BCYE α 培地と Muller-Hinton 培地にそれぞれ塗抹し, 前者のみ発育した菌をレジオネラ属菌とした。その後, PCR 法により菌種の同定を行い, *L. pneumophila* については, さらに免疫血清凝集反応で血清群の同定を行った。

2.2.3 菌種の同定

1) 免疫血清凝集反応

温泉水および土壌から培地上にコロニーを形成したレジオネラ属菌を釣菌し、滅菌生理食塩水に懸濁させたのち、スライドガラスの上に 3 μL を分取した。そこに血清群を同定する試薬 (デンカ生研) 2 滴加え混合し、1 分以内に凝集が観察された試料を陽性とした。

2) DNA の抽出

温泉水および土壌から培地上にコロニーを形成したレジオネラ属菌を釣菌し、滅菌生理食塩水に懸濁させ、滅菌マイクロチューブに移し、12,000 回転で 5 分間遠心を行った。この操作を 3 回繰り返した後、滅菌生理食塩水で $10^7 \sim 10^9$ 個 L^{-1} に調製し、Sepa Gene (三光純薬) を用い本菌の DNA を抽出した。

i) PCR 法

PCR 法の反応系は、DNA テンプレート 5 μL , dNTP (Takara Co. Ltd.) 5 μL , 10 \times PCR buffer (Takara Co. Ltd.) 5 μL , DNA taq (Takara Co. Ltd.) 0.5 μL , レジオネラ属に特有なプライマー: LEG 448A (5'-GAGGGTTGATAGGTTAAGAGC) および LEG 854B (5'-CGGTCAACTTATCGGTTTGCT) 各 0.5 μL , 滅菌済み Milli Q 33.5 μL を加え計 50 μL とし、GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) にかけた。反応条件は、95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分間の変性反応をし、95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 61 $^{\circ}\text{C}$ 59 秒, 74 $^{\circ}\text{C}$ 59 秒を 40 サイクル後、74 $^{\circ}\text{C}$ 7 分の延長反応を行った。1.2% アガロース・ゲル (岩井化学薬品) を用いて電気泳動し、ethidium bromide に 20 分間浸し、紫外線照射でバンドの位置を確認した (山本, 1998)。さらに、*L. pneumophila* に特有なプライマー: Lmip L920 (5'-GCTACAGACAAGGAT-AAGTTG) および Lmip R1548 (5'-GTTTTGTATGACTTTAATTCA) を用いて同様に行った。反応条件は 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分間の変性反応をし、95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒を 25 サイクル後、72 $^{\circ}\text{C}$ 7 分の延長反応を行った (Mahbubani *et al.*, 1990)。

ii) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法

検出された *L. pneumophila* の中で、血清群まで一致したものに対し、RAPD 法を行った。反応系は、あらかじめ 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ にあわせた DNA テンプレート 33.5 μL , dNTP 5 μL , 10 \times PCR buffer 5 μL , DNA taq 0.25 μL , プライマーとして 15mer (5'-GTGGTGGTGGTGGTG) 1 μL , 滅菌済み Milli Q 5.25 μL を加え計 50 μL とし、GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) にかけた。反応条件は、95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分間の変性反応をし、95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 35 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒を 30 サイクル後、72 $^{\circ}\text{C}$ で 7 分の延長反応を行った。また再度確認するために、あらかじめ 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ にあわせた DNA テンプレート 14.5 μL , dNTP 5 μL , 10 \times PCR buffer 5 μL , DNA taq 0.5 μL , プライマーとして AP8 (5'-TTGCTGGCCTAGTTAAACGTA), AP9 (5'-ATGCGTAACCGTAACGTGCTGACT) 各 1 μL , 滅菌済み Milli Q 23 μL を加え合計 50 μL とし、GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) にかけた (Molmeret *et al.*, 2001; Zeybek *et al.*, 2008)。反応条件は、94 $^{\circ}\text{C}$ 5 分間の変性反応をし、94 $^{\circ}\text{C}$ 1 分, 30 $^{\circ}\text{C}$ 2 分, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 分を 40 サイクル後、72 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分の延長反応を行った。どちらとも 2% のアガロース・ゲル (NuSieve 3 : 1, BMA) を用い電気泳動し、ethidium bromide に 20 分間浸し、紫外線照射でバンドの位置を確認した。

3. 結 果

3.1 温泉周辺土壌

A~K の 11 温泉施設周辺の土壌 13 試料 (B および D 温泉施設周辺の土壌は各 2 試料ずつ採取, E 温泉施設周辺の土壌は採取していない), 中 9 試料 (69.2%) から 13 株のレジオネラ属菌 (*Legionella*

spp.) を検出し, そのうち *L. pneumophila* は D-1, 2 および J 温泉施設周辺土壌からのみ 5 株検出された. 従って, 今回の調査から, *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が多く分布していることが明らかになった. またレジオネラ属菌はインキュベーション時間の経過に伴い多くの菌株が検出された (Table 2).

3.2 土壌から検出された菌株の PCR

土壌から検出された菌株がレジオネラ属菌で, 尚かつ *L. pneumophila* であることを確認するために PCR の測定を行なった (Fig 1, 加藤, 2004). lane 1 は F 温泉施設周辺土壌で培養を初めてから 3 週間目に検出された菌株, lane 2 は D 温泉施設周辺土壌 D-1 で培養を初めてから 3 週間目に検出された菌株, lane 3, 4 は D 温泉施設周辺土壌 D-2 で培養を初めてから 3 週間目に検出された菌株, lane 5, 6 は D 温泉施設周辺土壌 D-2 で培養を始めてから 4 週間目に検出された菌株をそれぞれ白金耳で釣菌した. レジオネラ属菌の特異的なバンドは 430 bp のところに産生する. 左側の lane 1~6 ではいずれもコントロールの lane 7 と同じ 430 bp の位置にバンドが観察されることから, これらはレジオネラ属菌であることが分かった. また *L. pneumophila* に特異的なバンドは 650 bp のところに産生する. 右側の lane 2, 5, 6, はコントロールの lane 7 と同じ 650 bp の位置にバンドが観察されることから, これらの菌株は *L. pneumophila* であることが分かった. また右側の lane 1, 3, 4 の菌株は 650 bp のところにバンドが産生されていないことから, *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌であることが分かった. 観察された *L. pneumophila* について免疫血清凝集反応を行ったところ, lane 2 では SG2 に凝集し, lane 5, 6 は SG7 に凝集した.

3.3 温泉水中および周辺の土壌中から検出された *L. pneumophila*

A~K の 11 温泉の中で A を除く 10 温泉 (90.9%) からレジオネラ属菌が検出された (Table 3). 検出された菌種は全て *L. pneumophila* であった. 血清群を見ると 7 箇所の室内浴槽から *L. pneumophila* SG1, SG2, SG3, SG5 および SG6 が検出された. なお, Table 3 に示した D 温泉浴槽水中の *L. pneumophila* SG5 は 2001 年の調査で検出された菌株を採用した. 露天風呂からは, I 温泉を除く 5 箇所から *L. pneumophila* が検出された. それらの血清群は SG1, SG4, SG5 および SG10 であった I 温泉では露天風呂の温泉水からレジオネラ属菌は検出されなかったが, 露天風呂の岩肌に着した“ぬめり”を採取し, レジオネラ属菌の検出を試みた. その結果, アメーバと共に *L. pneumophila* SG1 および SG6 が検出された (Table 3). また I 温泉では浴槽から検出されたレジオネラ属菌の血清群と“ぬめり”から検出された血清群が異なっていた. J および K 温泉でも浴槽と露天風呂で検出された *L. pneumophila* の血清群が異なっていたことは興味深いことであった.

3.4 温泉の浴槽水およびその施設周辺土壌から検出された菌株の PCR

D 温泉の浴槽水から検出された菌株とその施設周辺土壌 D-1 で培養を始めてから 7 週間目に検出された菌株をそれぞれ 2 菌株ずつ白金耳で釣菌し PCR を行った. その結果, いずれの菌株も 430 bp の位置にバンドが産生していることからレジオネラ属菌であることが分かった. さらに *L. pneumophila* に特異的である 650 bp の位置にバンドが産出していることから, D 温泉の浴槽水およびその施設周辺土壌 D-1 から検出したレジオネラ属菌はいずれも *L. pneumophila* であった. 今回 PCR を行なった菌株は免疫血清凝集反応の結果いずれも SG5 に凝集したことから, D 温泉の浴槽水およびその施設周辺土壌 D-1 から検出された *L. pneumophila* の血清群が SG5 で一致していることが分かった. Table 2 より, D 温泉施設周辺から採取した土壌 D-1 では, 培養を初めてから 9 週間目までに検出された *L. pneumophila* の血清群は SG2, SG5, SG7 であった. また J 温泉の露

Table 2 Species and number of *Legionella* isolated from the soil around the hot springs after incubation.

| Sampling point | <i>Legionellae</i> isolated | Number of organisms (CFU/m ³) after incubation | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----|
| | | 0 time | 1 week | 2 weeks | 3 weeks | 4 weeks | 5 weeks | 6 weeks | 7 weeks | 8 weeks | 9 weeks | |
| A | <i>Legionella</i> spp. | ND | 1.0 × 10 ¹ | 1.0 × 10 ¹ | ND | ND | ND | ND | NT | ND | ND | ND |
| B-1 | <i>Legionella</i> spp. | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1.0 × 10 ¹ | NT | 1.0 × 10 ¹ | 1.6 × 10 ² | ND |
| B-2 | | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | NT | ND | ND | ND |
| C | | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | NT | ND | ND | ND |
| D-1 | <i>L. pneumophila</i> SG2 | ND | ND | 4.3 × 10 ² | 1.0 × 10 ¹ | ND | 8.0 × 10 ¹ | NT | 1.0 × 10 ¹ | 2.0 × 10 ¹ | ND | ND |
| | <i>L. pneumophila</i> SG5 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.0 × 10 ¹ | 5.0 × 10 ¹ | 1.0 × 10 ¹ | ND |
| | <i>L. pneumophila</i> SG7 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1.0 × 10 ¹ | ND | ND |
| D-2 | <i>Legionella</i> spp. | ND | 3.0 × 10 ¹ | 1.0 × 10 ³ | 2.0 × 10 ¹ | ND | ND | NT | ND | ND | ND | ND |
| | <i>L. pneumophila</i> SG7 | ND | ND | ND | ND | 5.0 × 10 ¹ | 7.0 × 10 ¹ | NT | 1.8 × 10 ² | ND | 6.0 × 10 ¹ | ND |
| E | | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| F | <i>Legionella</i> spp. | ND | ND | ND | 4.2 × 10 ² | 1.17 × 10 ³ | ND | ND | NT | ND | ND | ND |
| G | <i>Legionella</i> spp. | 2.0 × 10 ¹ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | NT | ND | ND | ND |
| H | <i>Legionella</i> spp. | ND | 2.0 × 10 ¹ | 3.2 × 10 ² | 9.1 × 10 ² | 1.45 × 10 ³ | 2.9 × 10 ² | 1.3 × 10 ² | NT | 7.0 × 10 ¹ | 1.0 × 10 ² | ND |
| I-1 | | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| I-2 | <i>Legionella</i> spp. | ND | ND | ND | ND | 3.0 × 10 ¹ | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| J | <i>Legionella</i> spp. | ND | ND | 3.0 × 10 ¹ | 7.0 × 10 ¹ | NT | 3.0 × 10 ¹ | 2.0 × 10 ¹ | 3.0 × 10 ¹ | 1.0 × 10 ¹ | ND | ND |
| | <i>L. pneumophila</i> SG5 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.0 × 10 ¹ | 9.0 × 10 ¹ | 6.0 × 10 ¹ | 5.0 × 10 ¹ | ND |
| K | | ND | ND | ND | ND | ND | NT | ND | ND | NT | ND | ND |

ND : Not Detected, NT : Not Tested, spp. : species, SG : Serogroup, CFU : Colony Forming Unit

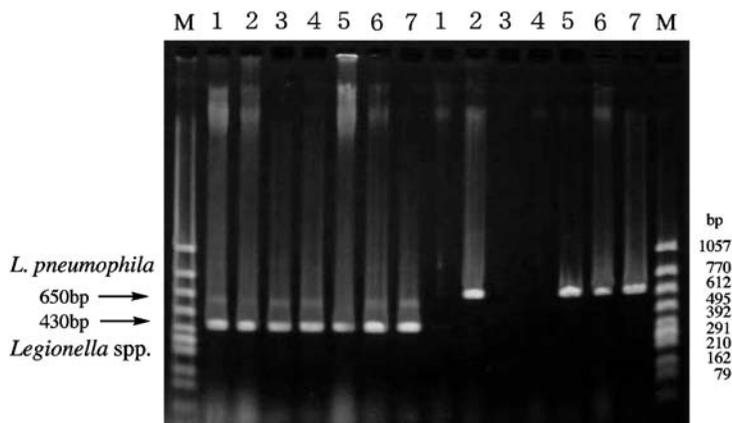


Fig. 1 PCR profiles of colonies suspected of the genus *Legionella* from soil samples (Kato, 2004)
 Lane 1 to 6 : The PCR profiles for *Legionella*-suspected colonies cultured from the soil samples around F and D hot spring facility. Lane-1 ; sample F (facility F), lane-2 ; sample D-1 (facility D), lane-3, 4, 5, 6 ; sample D-2 (facility D). The colonies in lane 1-4 and in lane 5, 6 grew in 3 weeks and 4 weeks after incubation, respectively. Lane 7 : control strain ; *L. pneumophila* Suzuki.
 Left side (1-6) : PCR profiles for the genus *Legionella* ; The 430bp amplicon specific to the genus *Legionella* was detected in all samples.
 Right side (1-6) : PCR profiles for *L. pneumophila* ; The 650bp amplicon specific to *L. pneumophila* was detected only in lane 2, 5 and 6.
 Molecular size markers (X 174 Hinc II digest) are given at the lanes M in base pairs.

Table 3 Serogroups of *L. Pneumophila* isolated from hot spring waters and soil around the hot springs.

| Sampling points | Hot spring waters | | Soils |
|-----------------|-------------------|---------------|---------------|
| | Inside bath | Open air bath | |
| A | ND | — | ND |
| B | ND | SG5 | ND |
| C | SG3 | — | ND |
| D | SG5* | — | SG2, SG5, SG7 |
| E | SG6 | — | — |
| F | — | SG4 | ND |
| G | SG2 | ND | ND |
| H | — | SG1 | ND |
| I | SG3, SG5 | SG1**, SG6** | ND |
| J | SG3 | SG5, SG10 | SG5 |
| K | SG1 | SG4, SG5 | ND |

SG : Serogroups, *previous data, **slime, ND : Not Detected

天風呂およびその施設周辺土壌から検出された *L. pneumophila* の血清群は、露天風呂では SG5, SG10 であり、その施設周辺土壌では SG5 であったことから、J 温泉の露天風呂およびその施設周辺土壌から検出された *L. pneumophila* は SG5 が一致していた (データは示していない)。なお、今回および前回の調査の中で、温泉水とその施設周辺土壌から検出された *L. pneumophila* の血清

群が一致したサンプルは、D および J 温泉だけであった。

3.5 血清群が一致した *L. pneumophila* の RAPD

D 温泉の浴槽水およびその施設周辺土壌 D-1 より分離し、血清群が一致した *L. pneumophila* SG5 株の RAPD の結果を Fig. 2 に示した。その結果、D 温泉の浴槽水から検出された *L. pneumophila* SG5 の lane 1~10 のバンドパターンは全て一致していた。またその施設周辺土壌 D-1 から検出された *L. pneumophila* SG5 の lane 11, 12 のバンドパターンも一致していた。しかし、lane 1~10 と lane 11, 12 のバンドパターンは異なっていることから遺伝学的な一致はみられなかった。従って、D 温泉の浴槽水およびその周辺土壌 D-1 から検出された *L. pneumophila* SG5 株の起源は異なっていることが示唆された。またこの結果は J 温泉の露天風呂およびその周辺土壌から検出された *L. pneumophila* SG5 株でも同様であった (データは示していない)。

4. 考 察

本邦の温泉でのレジオネラ属菌に関する報告は、例えば藪内ら (1994) は、40 温泉中 17 温泉 (42.5%) からレジオネラ属菌を検出し、その内 16 温泉が *L. pneumophila* であったと報告している。本研究でも、11 温泉の中でレジオネラ属菌が検出された 10 温泉 (90.9%) の全てが *L. pneumophila* であったことから、自然環境中と同様に、温泉でも *L. pneumophila* が広く蔓延していることが示唆された。これまでの報告から温泉における *L. pneumophila* の血清群は、SG3, 4, 5 が多く検出されている。しかし、本研究では試料数が少ないこともあるが、SG1~6, 10 まで検出されており、このような傾向は見られなかった。今回の調査で、I 温泉の残留塩素濃度が 2.0 ppm 以上であるにもかかわらず、露天風呂の温泉表面水と接触している岩肌に着している“ぬめり”から *L. pneumophila* が検出された。レジオネラ属菌は微細藻類の代謝産物を栄養源として利用すること、原生動物 (アメーバ) の食胞内に取り込まれ、その中で増殖することが知られている (八木

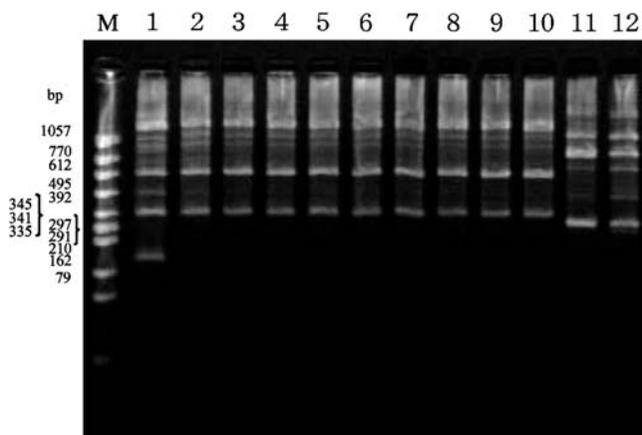


Fig. 2 Comparison of genotype by RAPD analysis between *L. pneumophila* SG5 isolates from D hot spring water and surrounding soil. Lanes 1-10, *L. pneumophila* SG5 isolates from D hot spring water; lanes 11, 12, *L. pneumophila* SG5 isolates from surrounding soil. Molecular size markers (X 174 Hinc II digest) are given at the lanes M in base pairs.

田・遠藤, 1998). 今回採取した“ぬめり”からレジオネラ属菌の宿主であるアメーバが同時に検出されたことから, *L. pneumophila* を取り込んだアメーバがシスト化(環境の悪化によってそれに耐えられる体に変化した状態, ただし増殖できない)し(藪内, 1997), 何らかによって露天風呂に入り込み, “ぬめり”の中でアメーバが再活性化して脱囊することで *L. pneumophila* も増殖して, アメーバを食い破って出てきているものと考えられた. この事から, この様な状況で一度に多くの浴客が露天風呂に入りそれにより残留塩素濃度が著しく低下した場合には, レジオネラ感染を引き起こす原因になりうる事が示唆された.

これまで土壤からのレジオネラ属菌の検出に関するデータは少ない. 例えば, 伊藤(1983)はモルモット腹腔内注入法を用い, 長崎県と大分県で採取した土壤 28 試料中, 5 試料(17.9%)から検出した. 中浜(1983)はこの方法を応用し, 岡山県で採取した土壤 7 試料中, 1 試料(14.3%)から検出している. また, 古畑ら(2002)は日本各地の土壤に *Acanthamoeba* を添加し, 37°C で 4 週間培養後, 1,362 試料中, 86 試料(6.3%)から検出した. 検出された菌種の 80.2% が *L. pneumophila* であったと報告している. 一方, 宮本ら(2000)の報告では土壤からレジオネラ属菌は全く検出されなかった. Koide *et al.* (2001)は市販の腐葉土 24 試料中, 22 試料からレジオネラ属菌を検出した. 石野ら(2008)は温泉源泉周辺土壤 33 試料を採取し, レジオネラ属菌の有無を直接培養法および増菌培養法を用いて調査した. その結果, レジオネラ属菌は直接培養法では 3 試料(9.1%)から検出した. 増菌培養法ではレジオネラ属菌が 13 試料(39.4%)から検出され, このうち 9 試料(69.2%)が *L. pneumophila* であったと報告している. これらの調査は温泉源泉周辺土壤のみであり, 温泉浴槽からのレジオネラ属菌との関係については調べていない.

今回調査を行った温泉施設周辺土壤では 13 試料中 9 試料(69.2%)から 13 株のレジオネラ属菌が検出された. しかし, *L. pneumophila* は検出された菌種の 38.5% であったことから, 温泉施設周辺土壤からは *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌が多く検出されていた. これら検出源でのレジオネラ属菌の菌種の違いに関する原因は不明である. direct (0time) 法では, G からのみレジオネラ属菌が検出された. また enrichment 法で検出された *L. pneumophila* の中で, D-1 からは SG2, SG5, SG7, D-2 からは SG7, そして J からは SG5 が検出された. このことから, 土壤中のレジオネラ属菌はアメーバに取り込まれた状態で, アメーバがシスト化するのに伴い, レジオネラ属菌もその中で VNC (Viable but Nonculturable: 生きてはいるが培養能力を持たない)の状態 (Michael *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 2003; 加藤, 2004) であるか, レジオネラ属菌が単独で VNC の状態で土壤中に生息しているものと考えられた. いずれの状態にせよ, enrichment 法でレジオネラ属菌が検出されたことから, 土壤を滅菌水に入れ適温でインキュベーションすることによりレジオネラ属菌が復活し培養能を持ったことが示唆された. また direct 法で検出されにくい事として, 低 pH 処理法を用いてもレジオネラ属菌の培養を阻害する細菌類は完全に死滅せず, 選択培地上に多数生育することから, 培養能力を持っているレジオネラ属菌も生育を阻害されている可能性があることが示唆された.

本研究の主たる目的である侵入経路を明らかにする実験では, 温泉水およびその施設周辺土壤から検出されたレジオネラ属菌の中で *L. pneumophila* であることを PCR 法により確認した. さらに血清群が一致した試料は, D 温泉の浴槽水およびその施設周辺土壤 D-1 と J 温泉の露天風呂およびその施設周辺土壤の 2 箇所だけであり, いずれも *L. pneumophila* SG5 であった. 次に遺伝学的同定法の一つである RAPD 法を用いて, それぞれの温泉水およびその施設周辺土壤から検出された同じ SG5 の *L. pneumophila* が遺伝学的に一致するか否か確認実験を行ったが遺伝学的な一致は見られなかった. 従って, D 温泉水およびその施設周辺土壤と J 温泉水およびその施設周辺土壤から検出された *L. pneumophila* の起源はそれぞれ異なることが示唆された.

5. 結 論

今回、温泉におけるレジオネラ属菌の侵入経路を解明するために、温泉水およびその施設周辺土壌から *L. pneumophila* を検出し、さらにそれらの血清群が一致した試料を 2 箇所同定し、これらについて遺伝学的に同一の *L. pneumophila* であるか否か RAPD 法を用いて確認実験を行った。その結果、遺伝学的な一致は見られなかった。従って、本研究では侵入経路を特定するまでには至らなかった。しかし、今回の調査で十分な塩素殺菌を行っているにも関わらず、温泉中の“ぬめり”からアメーバおよびレジオネラ属菌が検出された事は、殺菌している温泉であってもレジオネラ属菌に感染する可能性がある事が示唆された。従って、浴槽および露天風呂での衛生管理を十分に行うことが重要である事が分かった。今後温泉へのレジオネラ属菌の侵入経路を明らかにするためには、土壌からだけでなく、湯客の体に付着して浴槽内に侵入することなども考慮する必要があると考えられた。

謝 辞

本研究に要した費用の一部は、文部科学省科学研究費（基盤研究（C）（2）課題番号：13680634 研究代表者 加藤尚之）を当てた。記して謝意を表します。

引用文献

- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G. and McDade, J.E. (1979) : Classification of the Legionnaires' disease bacterium : *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, family nova. *Ann. Intern. Med.*, **90**, 656-658.
- 古畑勝則, 岡部弥穂, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文 (2002) : 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. *防菌防黴*, **30**, 555-561.
- 石野珠紀, 安藤理恵, 山本陽子, 沖津忠行 (2008) : 温泉源泉周辺土壌からのレジオネラ属菌の分離について. *神奈川県衛生研究所研究報告*, **38**, 47-50.
- 伊藤直美 (1983) : わが国全土における *Legionella* の分布調査および検出菌の病原性に関する研究. *感染症誌*, **57**, 682-694.
- 加藤尚之 (2004) : 温泉のレジオネラ. *温泉科学の最前線* (西村 進編), pp. 167-189, ナカニシヤ出版, 京都.
- Koide, M. Arakaki, N. and Saito, A. (2001) : Distribution of *Legionella longbeachae* and other *Legionella* in Japanese potting soils. *J. Infect. Chemother.*, **7**, 224-227.
- Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Miller, R., Haff, L., DiCesare, J. and Atlas, R.M. (1990) : Detection of *Legionella* with Polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol. Cell Probes*, **4**, 175-187.
- Michael, S. Levente, E. Rudolf, A. and Jorg, H. (1997) : Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2047-2053.
- 宮本 幹, 山口義夫, 笹津備規 (2000) : 環境中のレジオネラ属菌および非結核性抗酸菌の分布調査. *環境感染*, **15**, 127-132.
- Molmeret, M., Jarraud, S., Pierre, M.J., Pernin, P., Forey, F., Reyrolle, M., Vandenesch, F., Etienne, J. and Farge, P. (2001) : Different growth rates in amoeba genotypically related environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains isolated from a thermal spa. *Epidemiol.*

- Infect., **126**, 231-239.
- 中館俊英, 山内広平, 井上洋西 (1999) : 温泉を感染源としたレジオネラ肺炎の集団発生例. 日呼吸会誌, **37**, 601-607.
- 中浜 力 (1983) : 岡山地方における *Legionella* 属の環境材料より検出に関する研究. 感染症誌, **57**, 643-655.
- Ohno, A., Kato, N., Yamada, K. and Yamaguchi, K. (2003) : Factors influencing of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. Appl. Environ. Microbiol., **69**, 2540-2547.
- 斎藤 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) : 本邦では, はじめての 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**, 124-127.
- 高橋良一, 中嶋良行, 山崎正貴, 河 哲吉, 門阪庄三, 儀間 充, 佐藤克明, 山田智裕, 牧 和夫, 村上貞次, 米田誠一, 梶田芳弘, 藤田洋一, 佐藤俊之 (1995) : 河川および温泉が感染源と推定されるレジオネラ肺炎の2例. 日胸, **54**, 469-475.
- 藪内英子 (1997) : 人工環境水中のレジオネラとそれによる感染症. 予防医学, **39**, 22-30.
- 藪内英子, 王 笠, 荒川迪生, 矢野郁也 (1994) : 日本の温泉水中の *Legionella* 属菌の分布. 感染症誌, **68**, 549-551.
- 八木田健司, 遠藤卓郎 (1998) : レジオネラの宿主アメーバ. 検査と技術, **26**, 245-247.
- 山本啓之 (1998) : 遺伝子による検出方法. 臨床と微生物, **25**, 35-39.
- Zeybek, Z., Türetgen, I., Kimiran, Erdem, A., Filoğlu, G. and Çotuk, A. (2009) : Profiling of environmental *Legionella pneumophila* strains by randomly amplified polymorphic DNA method isolated from geographically nearby buildings. Environ. Monit. Assess., **149**, 323-327.