

環境中におけるレジオネラ属菌分布状況調査

Distribution of *Legionella* spp. in the Environment

山口 友美 畠山 敬 渡邊 節

Yumi YAMAGUCHI, Takashi HATAKEYAMA, Setsu WATANABE

レジオネラ属菌が主に環境中に生息することから、宮城県内の水たまりに注目してレジオネラ属菌の分布状況を調査した結果、レジオネラ属菌が 26 株分離された。うち 5 株はレジオネラ症患者から検出されることが多い *Legionella pneumophila* 血清群 (SG) 1 であったことから、水たまりがレジオネラ症の感染源となりうる可能性が示唆された。

キーワード：レジオネラ症；*Legionella pneumophila* 血清群 1；水たまり

Key words：Legionellosis；*Legionella pneumophila* serogroup 1；rainwater on roads

1 はじめに

レジオネラ症は、レジオネラ属菌が原因で起こる感染症である。レジオネラ属菌は、河川、池、沼、土壌など自然界に広く生息しており、レジオネラ属菌を含むエアロゾルや塵埃などを吸入することにより感染し、発症する。レジオネラ症患者から分離されるのは、*Legionella pneumophila* 血清群 1 (SG1) が大半を占めている。

2011年～2013年に宮城県においてレジオネラ症として届出のあった患者は109名であり、2011年が16名、2012年が27名、2013年が66名と年々増加している。この109名のうち、届出時に感染源が判明していたのは44%（水系が38%、塵埃が6%）で、残りの56%は感染源が不明であった。

国立感染症研究所および地方衛生研究所を主体とするレジオネラ・レファレンスセンターで実施した *L.pneumophila* SG1 臨床分離株の sequence-based typing (SBT) 法による遺伝子型別の結果では、感染源不明の臨床分離株の多くが S グループ（土壌分離株が多い）に属していたと報告があり¹⁾、自然環境中にも感染源が存在する可能性は高いと考えられる。そこで本研究では、自然環境中でエアロゾルの発生源となり得る水たまりに着目し、レジオネラ属菌の分布状況を調査したので報告する。

2 対象および検査方法

2.1 調査地点

調査期間は2014年7月～10月。調査対象は名取市、岩沼市、富谷町、利府町など7市8町の県内29カ所のアスファルト道路の水たまりとし、雨天の当日または翌日に検体を採取した。採水地点を図1に示した。

2.2 検体の前処理

検体はフィルターろ過による濃縮や滅菌精製水による希釈の操作を行い濃縮試料、非濃縮試料および希釈試料を作製した。

さらに、分離培養の前処理として濃縮、非濃縮、希釈

試料それぞれについて酸処理（0.2M KCl-HCl, pH2.2にて20分）または熱処理（50℃20分）を行った。

2.3 LAMP 法による遺伝子検出

濃縮、非濃縮および希釈試料の一部を分取してアルカリ熱抽出法によりDNAを抽出し、LAMP法の測定キットであるLoopampレジオネラ検出試薬キットE（栄研化学）を用いてレジオネラ属菌遺伝子の検出を行った。

2.4 レジオネラ属菌の分離培養

酸処理または熱処理を行った試料をMWY寒天培地およびGVPC寒天培地へ塗抹し、35℃で10日間培養した。

分離されたレジオネラ属菌はLEGプライマーおよびLmpプライマーを用いてPCR法を実施し²⁾、レジオネラ属菌および*L.pneumophila*の同定を行った。また、レジオネラ免疫血清（デンカ生研）およびレジオネララテックステスト（OXOID）を用いて血清型別を実施した。



図1 採水地点

2.5 分離菌株の遺伝子解析

L.pneumophila SG1 と同定された株については、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を実施した。*Sfi* I (20U/sample) を用いて 50°C で 4 時間の制限酵素処理を行い、パルスタイム 5 秒から 50 秒、電圧 6V/cm で 19 時間泳動した。PFGE パターンの解析には Fingerprinting II (BIO-RAD) を用いた。

3 結果

3.1 分離培養法および LAMP 法の結果

分離培養法と LAMP 法の結果を表 1 に示した。レジオネラ属菌が分離されたのは 29 検体中 12 検体、LAMP 法によりレジオネラ属菌遺伝子が検出されたのは 13 検体、菌分離または遺伝子のいずれかが陽性だったのは 16 検体であった。

分離培養法が陽性で LAMP 法が陰性だったのは 3 検体で、すべて菌数が 1,000~10,000 未満の検体であった。反対に、分離培養法陰性で LAMP 法が陽性だったのは 4

表 1 分離培養法と LAMP 法の結果

培養法 (cfu/100mL)	LAMP法	
	陰性	陽性
検出せず	13	4
100~1,000未満	0	2
1,000~10,000未満	3	5
10,000以上	0	2

表 2 分離培養法 (濃縮倍率別) の結果

検体No	濃縮倍率		
	10×濃縮	非濃縮	×10希釈
C8	—	3,000	20,000
C9	—	6,000	—
C10	—	2,000	—*2
C11	—	2,000	5,000 ^{*2}
C16	—	1,000	—
C19	—	2,000	—
C20	—	1,000	—*2
C22	—	1,000	—*2
C25	—*1	2,000	—
C26	100	—	—
C27	—*1	3,000	30,000
C32	200	—	—

*1 : 5×濃縮

*2 : ×5希釈

単位 : cfu/100mL

検体であった。

分離培養法で陽性となった 12 検体について、濃縮倍率別の結果を表 2 に示した。非濃縮試料で陽性だったのは 10 検体で、そのうち 7 検体は濃縮試料も培養を実施したがすべて陰性であった。非濃縮試料で陰性だった 2 検体は濃縮試料では陽性であった。

LAMP法で陽性となった13検体について、濃縮倍率別の結果を表3に示した。濃縮試料で陰性であっても、非濃縮試料では陽性であった検体が7検体、非濃縮試料が陰性で、希釈試料で陽性であった検体 (濃縮は実施せず) が1検体確認された。

表 3 LAMP 法 (濃縮倍率別) の結果

検体No	濃縮倍率		
	10×濃縮	非濃縮	×10希釈
C3	—*1	+	—
C8	—	+	—
C10	—*2	+	—
C11	—*2	+	—
C12	—*2	+	—
C15	+	—	—
C17	+	—	—
C20	—	+	—
C22	—	+	—
C25	—	+	—
C26	+	—	—
C27	—	—	+
C32	+	—	—

*1 : 100×濃縮

*2 : 20×濃縮

表 4 分離された菌種および血清型

菌種	検出数
<i>L.pneumophila</i> SG1	5
SG5	1
SG6	3
SG8	7
SG9	1
SG10	1
SG14	2
SGUT	1
その他のレジオネラ属菌	5
計	26

3.2 分離されたレジオネラ属菌の菌種および血清型

12検体から分離されたレジオネラ属菌の菌種および血清型を表4に示した。分離されたレジオネラ属菌は全部で26株であり、そのうち21株が*L.pneumophila*、5株が*L.pneumophila*以外のレジオネラ属菌であった。

また、*L.pneumophila*の血清型別では、SG1、5、6、8、9、10、14など様々な型が検出されたが、SG8が最も多く7株、次いでSG1が5株、SG6が3株であった。

3.3 採水地点別の結果

採水地点別の結果を図2に示した。分離培養・LAMP法ともに陰性の地点は6市4町の13地点、LAMP法による遺伝子のみを検出した地点が2市1町の4地点、分離培養法でレジオネラ属菌を検出した地点が2市4町の7地点、分離培養で*L.pneumophila* SG1を検出した地点が1市4町の5地点であった。

レジオネラ属菌を検出しなかった地点、レジオネラ属菌を検出した地点、*L.pneumophila* SG1を検出した地点はそれぞれ、様々な市町に分布しており、明らかな偏りは見られなかった。

3.4 PFGE 法による遺伝子解析

L.pneumophila SG1 と同定された5株についてはPFGE法を実施した。この菌株と合わせて、平成26年度に実施した旅館および公衆浴場浴槽水検査で検出された*L.pneumophila* SG1 (17株) についてもPFGE法を実施した。解析結果を図3に示した。

実線で囲んだ株が今回の調査で分離された水たまり由来株、それ以外の株が浴槽水由来株である。浴槽水由来株の中には点線で囲んだ株のように類似度が96%と高い株が見られた。しかし、水たまり由来の5株の類似度はそれぞれ32~72%と低く、浴槽水由来株と類似度の高

い水たまり由来株も見られなかった。

4 考察

レジオネラ症は浴槽水が重要な感染源であるといわれており、宮城県では旅館や公衆浴場におけるレジオネラ防止対策が条例に基づき行われている。しかし、レジオネラ症として届出のあった事例の感染源を調査したところ、半数以上の事例で感染源の特定ができていないというのが現状であった。

今回の調査では、水たまり 29 検体中 16 検体 (55.2%)



図2 採水地点別の結果

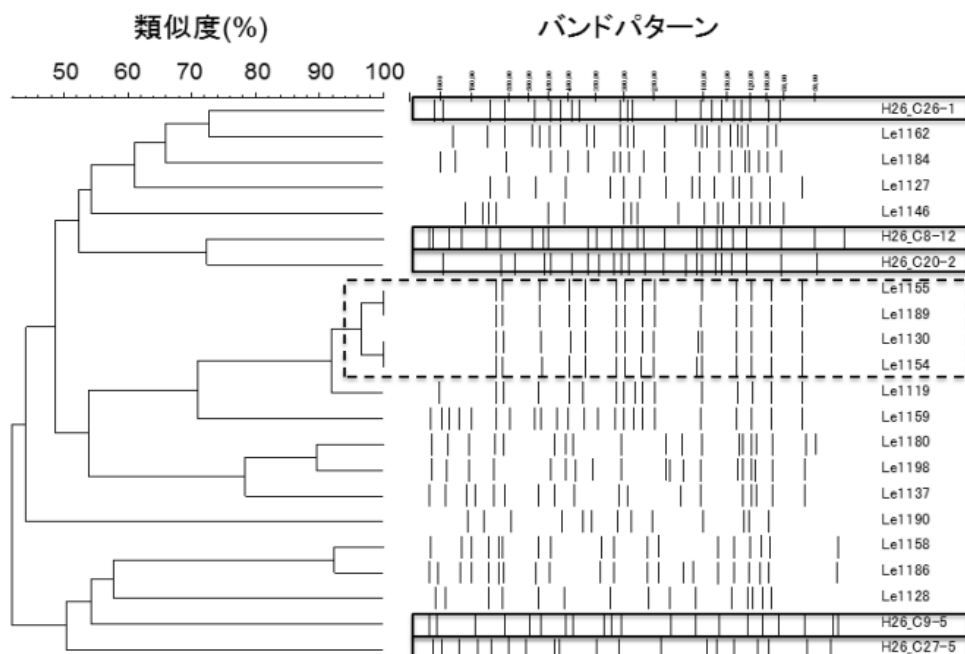


図3 PFGE 法による遺伝子解析

でレジオネラ属菌が分離または遺伝子が検出された。一部の検体では、分離培養法と LAMP 法の結果が異なっていたが、それぞれの検査の特性が影響しているものと考えられた。すなわち、分離培養法ではレジオネラ属菌の発育を妨げるような雑菌の影響、LAMP 法では検体中に含まれる PCR 阻害物質の影響による偽陰性や死菌の DNA による偽陽性反応などが考えられる。このような結果の乖離については、今後も検討が必要である。

また、同一の検体であっても検体の濃縮倍率により結果に差が生じ、濃縮試料より非濃縮試料のほうが検出率がよいという検体が多くみられ、分離培養法、LAMP 法ともに同様の傾向を示した。これについても、分離培養法と LAMP 法の結果が乖離したことと原因はほぼ同じであると考えられたが、今回の結果から同一検体から様々な濃縮倍率の試料を作製して検査を行うことにより、偽陰性となる検体を最小限にできることが示唆された。

分離されたレジオネラ属菌の血清型別では、レジオネラ症患者から検出されることが多い *L.pneumophila* SG1 が宮城県内の水たまりにも存在することが明らかとなった。さらに、*L.pneumophila* SG1 の遺伝子解析の結果からは、分離株同士の類似度は低く、県内の水たまりには様々なタイプが存在することが推測された。富山県における調査では、水たまりから *L.pneumophila* SG1 が最も多く分離されている³⁾。宮城県においても *L.pneumophila* SG1 が分離されたことは、レジオネラ症は主に梅雨の時期である 7 月に発症のピークがある⁴⁾ことから、水たまりがレジオネラ症の感染源となり得る可能性を示唆している。日常の身近な自然環境からも

レジオネラ属菌に曝露する機会があるとの認識が必要であると思われた。

PFGE や SBT などの遺伝子解析法は、菌株の多様性を把握することが可能であり、感染源特定のために有用な手段である。しかし、レジオネラ症は尿中抗原検査で簡便に診断することができるため、患者の喀痰培養検査を実施している医療機関は少なく、現状では患者の菌株確保は困難である。レジオネラ症の疫学解析のためにも各医療機関には臨床分離株または喀痰などの検査材料の確保をお願いしたい。

今後も、環境由来レジオネラ属菌のデータを蓄積するとともに、臨床分離株との比較解析も実施し、疫学情報の提供に役立てたいと考える。

謝辞

本研究は平成 26 年度宮城県公衆衛生研究振興基金の研究助成により行われたものである。

参考文献

- 1) レジオネラ・レファレンスセンター報告（衛生微生物技術協議会第 35 回研究会）
- 2) 国立感染症研究所，病原体検出マニュアル「レジオネラ症」
- 3) 病原微生物検出情報 34：163-164，2013
- 4) 病原微生物検出情報 29：327-328，2008