

環境中に生息するレジオネラ属菌の感染リスク調査

Legionella Infection Risk from the Environment

山口 友美 有田 富和 吉川 弓林*1 畠山 敬 渡邊 節

Yumi YAMAGUCHI, Tomikazu ARITA, Yuri KIKKAWA,
Takashi HATAKEYAMA, Setsu WATANABE

平成 26～28 年度にアスファルト道路の水たまり 72 カ所から水を採取し、培養法によるレジオネラ属菌の検出および LAMP 法によるレジオネラ属菌遺伝子の検出を行ったところ、培養法では 38 検体 (52.8%)、LAMP 法では 46 検体 (63.9%) でレジオネラ属菌陽性であった。さらに培養法で検出されたレジオネラ属菌 126 株について、浴槽水由来株および患者由来株と比較したところ、「レジオネラ属菌培養陽性率」、「*Legionella pneumophila* 血清群 1 (*Lp* SG1) 陽性率」、「*Lp* SG1 における *lag-1* 保有率」、「PFGE 解析における患者株との遺伝子相同性 95% 以上の株数」などリスク因子と考えられる項目すべてにおいて、水たまり由来株が浴槽水由来株を上回っていることが明らかとなった。これらのことから、水たまりがレジオネラ症の感染源となりうること、水たまりは浴槽水と同様に感染リスクが高い可能性があることが示唆された。

キーワード：レジオネラ症；水たまり；感染源；*Legionella pneumophila* 血清群 1；*lag-1* 遺伝子

Key words：Legionellosis；rainwater on roads；source of infection；

Legionella pneumophila serogroup 1；*lag-1* gene

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り、重症例では死亡することがある。レジオネラ属菌は、河川、池、沼、温泉、土壌など自然界に広く生息しているが、レジオネラ症の感染源として主に調査が実施されるのは循環式浴槽や温泉に限られている。

宮城県において平成 26～28 年にレジオネラ症として届出のあった患者は 88 名であった。このうち、感染源が判明していたのは水系が 27.3%、塵埃が 5.7%であり、残りの 67.0%は感染源が不明であった。水系の感染源としては循環式浴槽、温泉などがあり、旅館や公衆浴場では条例に基づきレジオネラ防止対策が行われている。しかし、実際には水系との関連が認められない事例が半数以上を占めており、感染源の特定に至っていないのが現状である。

そこで、本研究では浴槽水以外の感染源を模索するため、自然環境中でエアロゾルの発生源となりうる水たまりに着目してレジオネラ属菌の検索を行った。さらに、水たまりから分離された菌株について、浴槽水由来株および患者由来株との比較を行ったので報告する。

2 対象および検査方法

2.1 対象

調査期間は平成 26 年 7 月から 28 年 12 月までとし、雨天の当日または翌日に宮城県内のアスファルト道路の水たまりを 72 カ所を調査した。

さらに、レジオネラ症患者から分離された *L.pneumophila* 血清群 1 (*Lp* SG1；8 株)、浴槽水から分離された *Lp* SG1 (49 株) を水たまり由来株との比較対象菌株とした。

2.2 方法

2.2.1 レジオネラ属菌の検出および菌種の同定

水たまりから採取した水をフィルター濃縮し、10 倍濃縮試料を作製した。実験には、濃縮および非濃縮試料の 2 種類を用いた。

各試料は酸処理 (0.2M KCl-HCl, pH2.2 にて 20 分) または熱処理 (50°C 20 分) を行った後、MWY および GVPC 寒天培地 (OXOID) に塗抹してレジオネラ属菌の分離培養を行った。また、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) を用いて LAMP 法による遺伝子の検出を行った。分離されたレジオネラ属菌は LEG プライマーおよび *Lmip* プライマーを用いた PCR 法により¹⁾ *Lp* の同定を行い、レジオネラ免疫血清 (デンカ生研) を用いて血清型別を実施した。

2.2.2 分離菌株の遺伝子解析

Lp SG1 と同定された株については、Kozak ら²⁾ が報告したプライマーを用いた PCR 法による *lag-1* 遺伝子の検出およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を実施した。PFGE 法は *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。

*1 現 大崎広域水道事務所

表1 培養法およびLAMP法の陽性件数(n=72)

		LAMP法		計
		陽性	陰性	
培養法	陽性	28	10	38
	陰性	18	16	34
計		46	26	72

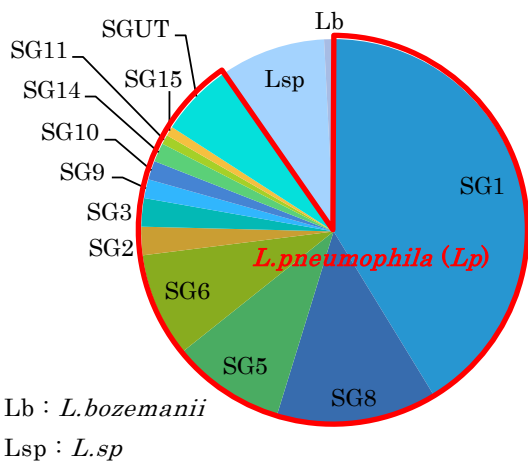


図1 分離株の菌種および血清型 (n=126)

3 結果

3.1 水たまりからの検出状況

培養法およびLAMP法ともに、10倍濃縮試料もしくは非濃縮試料のいずれかにおいてレジオネラ属菌が検出された場合を陽性とした。

培養法によりレジオネラ属菌陽性となったのは水たまり72検体中38検体(52.8%)であった。LAMP法によりレジオネラ属菌遺伝子が陽性であったのは46検体(63.9%)であり、分離培養・LAMP法のいずれかが陽性となった検体は56検体(77.8%)、いずれにおいても陰性であった検体は16検体(22.2%)であった(表1)。

3.2 分離株の菌種・血清型別

水たまり38検体から分離されたレジオネラ属菌126株について菌種同定を行ったところ、114株(90.5%)がLpであった。血清型別ではSG1が52株(41.3%)と最も多く、次いでSG8が17株(13.5%)、SG5が12株(9.5%)、SG6が11株(8.7%)であった(図1)。

3.3 水たまり由来株と浴槽水由来株の比較

3.3.1 レジオネラ属菌数

平成26~28年度に行政検査として実施した浴槽水を対象としたレジオネラ属菌検査での検出菌数と今回の水たまりにおける調査での検出菌数を比較した(図2)。

前述したように、水たまりにおけるレジオネラ属菌培養陽性率は52.8%であったが、浴槽水におけるレジオネ

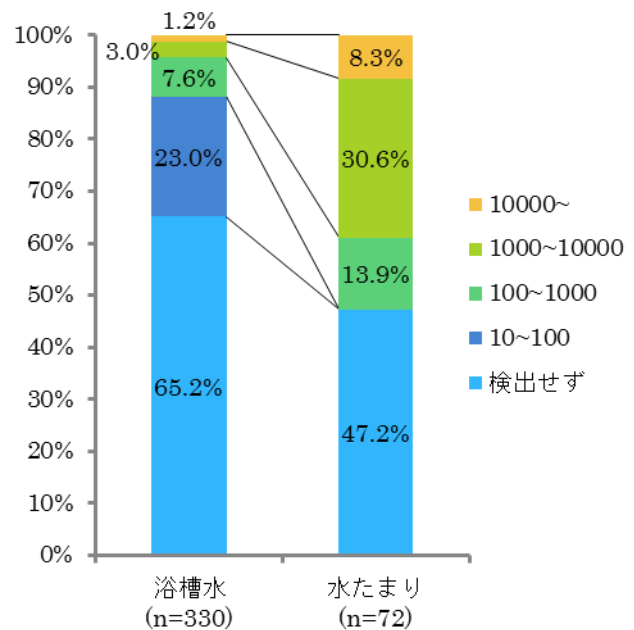


図2 浴槽水および水たまりから検出されたレジオネラ属菌数

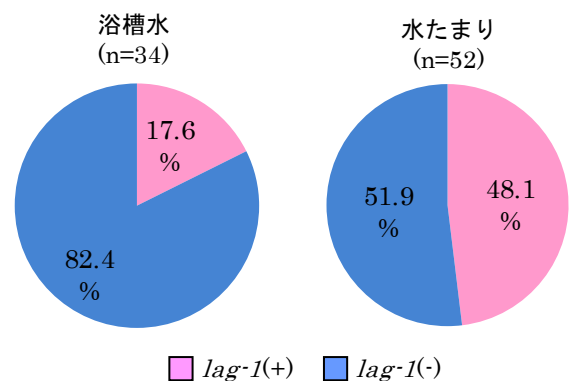


図3 lag-1遺伝子保有状況

ラ属菌培養陽性率は34.8%であった。検出菌数では、1,000~10,000 CFU/100mLの検体が浴槽水で3.0%であったのに対し、水たまりでは30.6%、10,000 CFU以上の検体が浴槽水では1.2%であったのに対し、水たまりでは8.3%と、水たまりは浴槽水に比べて検出率、菌数ともに多い傾向がみられた。

3.3.2 Lp SG1におけるlag-1遺伝子保有状況

患者由来SG1の9割が保有するといわれているlag-1遺伝子の有無を浴槽水由来Lp SG1(34株)および水たまり由来Lp SG1(52株)について比較した。浴槽水由来株では6株(17.6%)が陽性(lag-1+)であったが、水たまり由来株では25株(48.1%)と約半数が陽性であった(図3)。

3.3.3 Lp血清型別の検出率

分離培養陽性となった水たまり38検体と浴槽水115

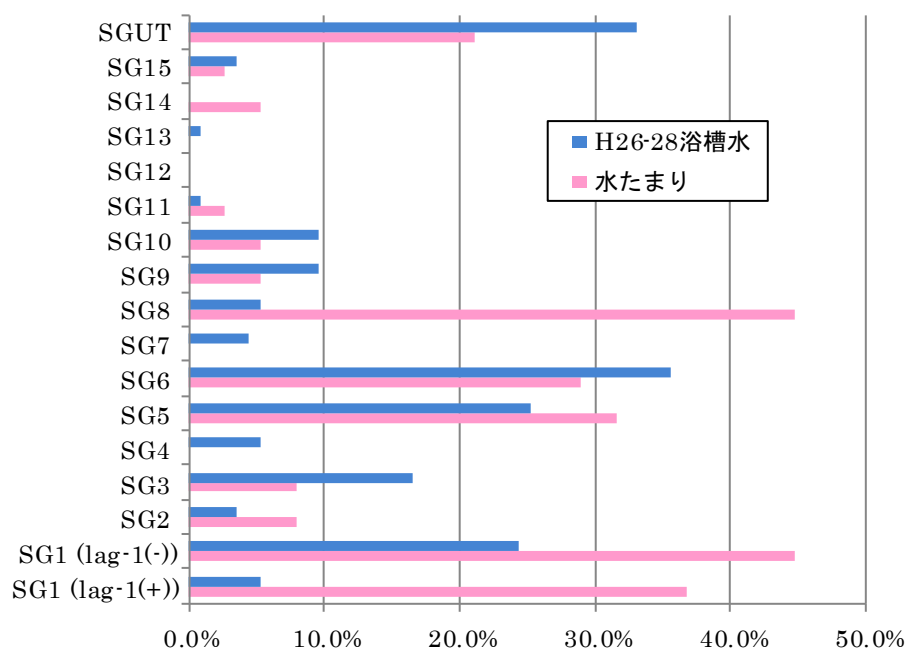


図4 *Lp*血清型別の検出率

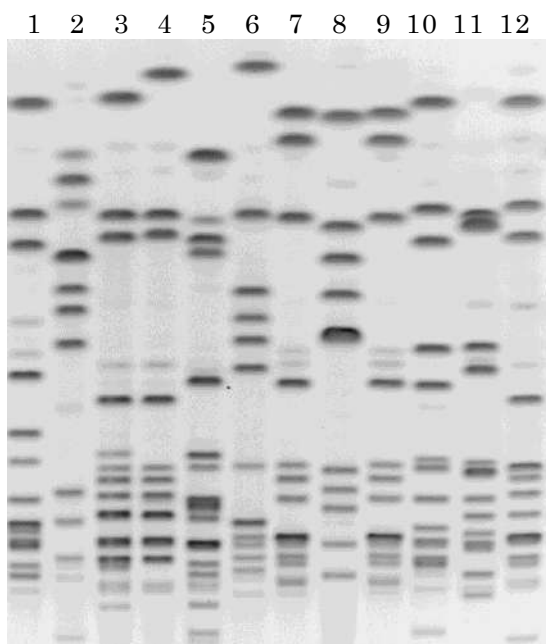


図5 水たまり由来 *Lp* SG1 の PFGE パターン

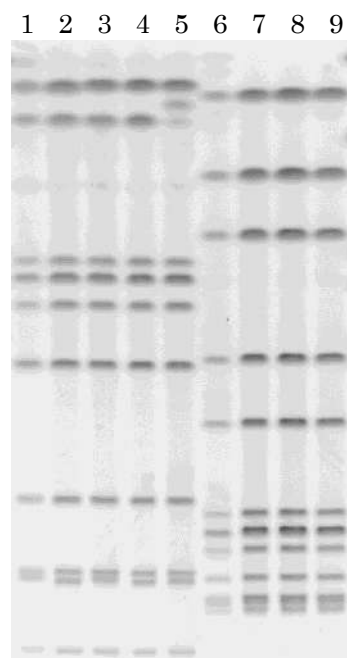


図6 浴槽水由来 *Lp* SG1 の PFGE パターン

検体について、*Lp*血清型毎の検出率を比較したところ、SG1 (*lag-1*+) と SG8 で明らかな違いが認められた。すなわち、水たまりでは SG1 (*lag-1*+) は 36.8% (14 検体) から検出されたが浴槽水では 5.2% (6 検体)、SG8 は水たまりで 44.7% (17 検体) から検出されたが浴槽水では 5.2% (6 検体) であった (図 4)。

3.3.4 同一検体由来 *Lp* SG1 の PFGE パターン

今回調査した水たまりのうち、12 検体から *Lp* SG1 が複数検出された。これらの株の *lag-1* 遺伝子の有無を

調べたところ、7 検体で *lag-1* 陽性と *lag-1* 陰性の両方の *Lp* SG1 が確認された。このことは、同一検体から同じ血清型の株が検出されても、同一由来株とは限らないことを示している。

そこで、同一検体由来の *Lp* SG1 について PFGE パターンを比較した。浴槽水由来株についても同様に実施した。水たまり由来 *Lp* SG1 では、同一検体由来であっても、PFGE パターンが異なる場合が多かった。結果の例を図 5 に示した。レーン 1~6 が検体 No. E8 由来の 6 株、

レーン7~12が検体No.E18由来の6株である(表2)。レーン1~6は全て異なるPFGEパターンを示しており、レーン7~12ではレーン7と9が同一パターンである他はパターンが異なっていた。一方、浴槽水由来株(図6)の場合は、レーン1~5、6~9がそれぞれ同一検体由来であるが、パターンはほぼ同一であり、浴槽水では水たまり由来株のような*Lp* SG1のバリエーションは見られなかった。

同一水たまり検体から複数検出された*Lp* SG1について表2にまとめた。PFGE解析の結果が同一パターンであった株は、同一株としてマーキングした。検体No.D25では、*lag-1+*である菌株D25-6とD25-15は同一株であったが、同じ*lag-1+*株であるD25-16とはPFGEパターンが異なっていた。*lag-1(-)*株であるD25-8とD25-17のパターンも異なっていたため、検体No.D25にはタイプの違う*Lp* SG1が少なくとも4種類(*lag-1+*株:2種類、*lag-1(-)*株:2種類)存在したと考えられた。検体No.E8では6種類(*lag-1+*株:5種類、*lag-1(-)*株:1種類)、検体No.E23では最も多い7種類(*lag-1+*株:4種類、*lag-1(-)*株:3種類)の*Lp* SG1が確認された。

3.3.5 PFGE解析

水たまり由来*Lp* SG1、浴槽水由来*Lp* SG1および患者由来*Lp* SG1を、*lag-1*遺伝子の有無で分け、PFGE

法で解析を行った。*lag-1(-)*の患者由来株は1株のみであったが、この株は浴槽水由来株との類似度が89%であり、水たまり由来株では類似度の高い株は認められなかった。(図7)。*lag-1+*の患者由来株7株のうちの4株については水たまり由来株との遺伝子型の類似度が95%以上であり、残りの3株についても水たまり由来株との類似度が85%以上であった。(図8)。

4 考察

宮城県内のほぼ全域から72ヶ所の水たまりを採取し、レジオネラ属菌の実態調査を行った。

水たまりで培養法によりレジオネラ属菌陽性となったのは52.8%、培養法とLAMP法を併用した場合、レジオネラ属菌の存在を確認できた検体は77.8%と非常に高率であった。また、*Lp*の血清型別ではレジオネラ症患者の8割以上から検出される³⁾SG1が最も多く、次いでSG8、SG5の順であった。金谷ら⁴⁾は、富山県内のアスファルト道路の水たまりを採取し、レジオネラ属菌の分離を行っている。この報告によると、レジオネラ属菌の検出率は47.8%、*Lp*血清型別ではSG1が最も多く、次いでSG5、SG8の順であり、レジオネラ属菌の培養法による検出率、*Lp*血清型別ともに我々の結果とほぼ同様であった。

表2 同一水たまり検体由来*Lp* SG1

検体No.	菌株No.	同一株	<i>lag-1</i>	検体No.	菌株No.	同一株	<i>lag-1</i>	検体No.	菌株No.	同一株	<i>lag-1</i>
D25	D25-6	●	+	E8	E8-1		+	E23	E23-1	●	(-)
	D25-8		(-)		E8-2		+		E23-2	●	(-)
	D25-15	●	+		E8-3		+		E23-4	●	(-)
	D25-16		+		E8-4		+		E23-5	■	(-)
	D25-17		(-)		E8-5		(-)		E23-7		+
D27	D27-1		(-)	E8-8		+	E23-8	●	(-)		
	D27-2		(-)	E12	E12-1		+	E23-9		(-)	
D29	D29-1	●	(-)	E12-2		(-)	E23-11	●	(-)		
	D29-5	●	(-)	E16	E16-2	●	+	E23-12	●	(-)	
	D29-9		(-)	E16-5		+	E23-13	▲	+		
	D29-10		+	E16-9	●	+	E23-14	▲	+		
D30	D30-2		(-)	E17	E17-4		(-)	E23-16	▲	+	
	D30-5	●	(-)	E17-7		+	E23-17		+		
	D30-10		(-)	E17-11		+	E23-18	■	(-)		
	D30-12	●	(-)	E18	E18-2	●	(-)	E23-19		+	
	D30-15	●	(-)		E18-3		(-)				
D30-17	●	(-)	E18-4			+					
			E18-5		●	(-)					
D32	D32-3		(-)	E18-7		+					
	D32-6		(-)	E18-8		(-)					
D38	D38-1		+								
	D38-3		+								

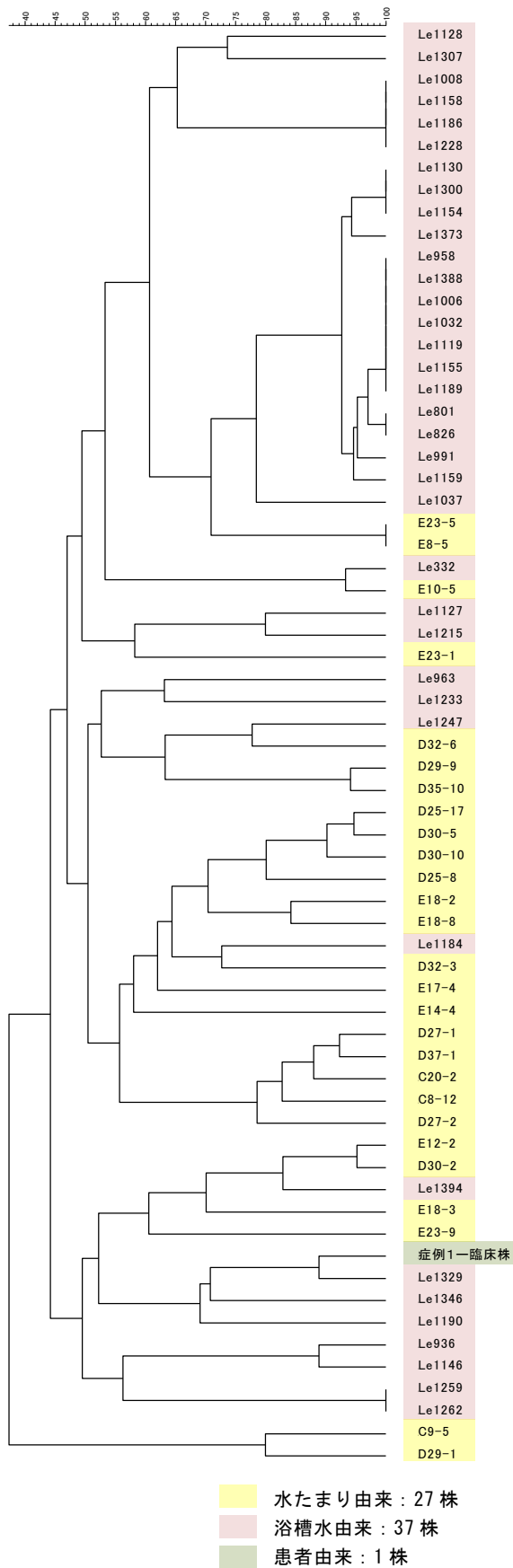


図 7 *lag-1(-)* *Lp* SG1 における PFGE 解析 (n=65)

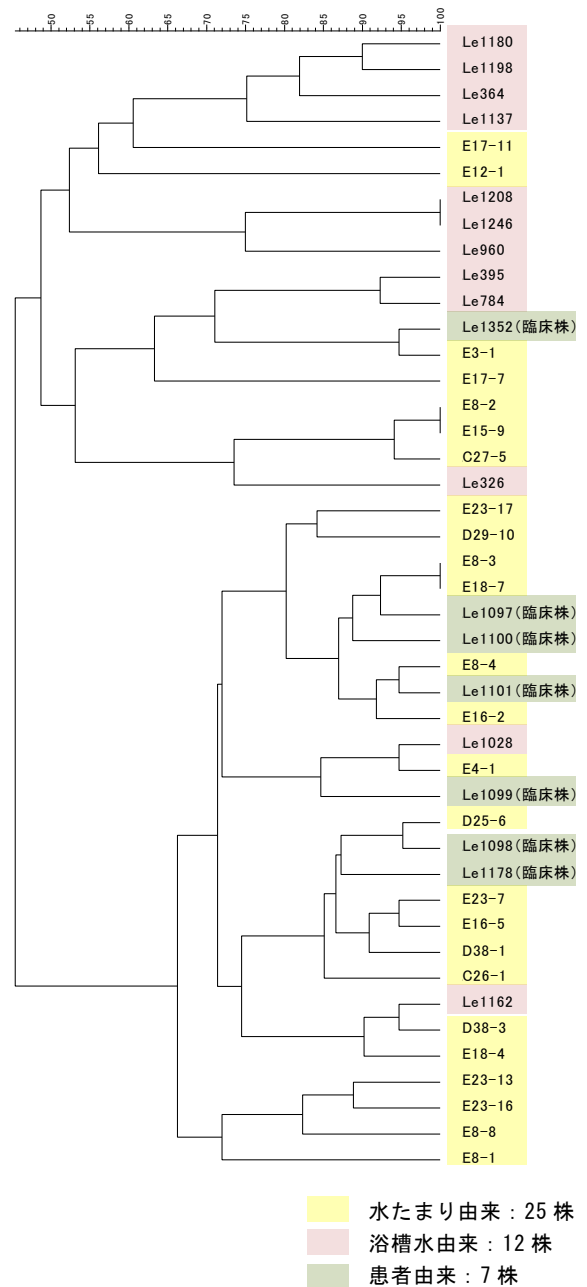


図 8 *lag-1(+)* *Lp* SG1 における PFGE 解析 (n=44)

水たまり由来株、浴槽水由来株ともに同一検体から複数の *Lp* SG1 が検出された。浴槽水ではほとんどの場合同一株である一方、水たまりでは最大 7 種類の *Lp* SG1 が検出されたことがわかった。このことから、水たまりなどの環境中には様々なタイプの *Lp* SG1 が存在しているが、浴槽や配管等ではそのうちのごく一部が選択的に定着し増殖しているためと推測された。このことから、感染源調査を目的に環境中のレジオネラ属菌検査を実施する場合には、可能な限り多くのコロニーを鈎菌して、血清型別や遺伝子型別を実施する必要があると考えられた。

さらに、水たまり由来株と浴槽水由来株を比較した場

合、「レジオネラ属菌培養陽性率」, 「レジオネラ属菌数」, 「*Lp* SG1における*lag-1*遺伝子保有率」, 「PFGE解析における患者株との遺伝子相同性95%以上の株数」などレジオネラ症の感染リスク因子と考えられる項目すべてにおいて、水たまり由来株が浴槽水由来株を上回っていることが明らかとなった。特に*lag-1*遺伝子は、環境由来株に比べ患者由来株で保有率が高いため、病原性との関連が指摘されており、患者由来株26株中26株すべて(100%)が*lag-1*遺伝子を保有していたとの報告⁵⁾もある。我々が行った*lag-1*遺伝子保有状況調査でも、患者由来株8株中7株(87.5%)が陽性であり、*lag-1*遺伝子の有無はレジオネラ症の感染リスクを評価する上で、最も重要な因子の一つと考えられる。今回の環境調査で、浴槽水由来株での*lag-1*陽性率が17.6%であったのに対し、水たまり由来株での陽性率が48.1%であったことは、水たまりがレジオネラ症の感染源となりうる可能性が高いことを示唆するものである。

今後は浴槽水に加え、水たまりなど浴槽水以外の感染源も視野に入れた疫学調査が必要であると考えられる。

参考文献

- 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」
- 2) Kozak NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor TH Jr, Shelton BG, Fields BS.: J. Clin. Microbiol., **47**, 2525 (2009)
- 3) レジオネラ・レファレンスセンター会議報告(衛生微生物技術協議会第37回研究会 平成28年7月22日(広島)), https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H28_Legionnaires.pdf
- 4) J.Kanatani, J.Isobe, K.Kimata, T.Shima, M.Shimizu, F.Kura, T.Sata, M.Watahiki: Appl. Environ. Microbiol., **79**, 3959 (2013)
- 5) 「環境におけるレジオネラ症の感染ルートを探る」(平成24年度生活衛生関係技術担当者研修会), http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/seikatsu-eisei/gijutuken-syuukai/dl/h24_07.pdf