

感染予防対策に向けたヒト及び環境等における感染症起因菌の調査（平成26年度）
②県内の環境検体におけるレジオネラの検出状況

檀上博子，大畠律子，河合央博，中嶋 洋，仲 克巳

【調査研究】

感染予防対策に向けたヒト及び環境等における感染症起因菌の調査 (平成 26 年度)

②県内の環境検体におけるレジオネラの検出状況

Investigation of pathogenic bacteria in the human and the environmental samples for prevention of transmission (FY2014)

② Isolation of *Legionella* from environmental samples in Okayama prefecture

檀上博子, 大島律子, 河合央博, 中嶋 洋, 仲 克巳* (細菌科)

* 暮らしき作陽大学食文化学部現代食文化学科

Hiroko Danjou, Ritsuko Ohata, Hisahiro Kawai, Hiroshi Nakajima,

Katsumi Naka* (Bacteriology section)

* The Department of Contemporary Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

要 旨

レジオネラの汚染実態を把握するため、浴槽水等 108 検体について調査を行った。浴槽水からの検出率は 31.9%、ジャグジー水は 37.5%、シャワー水は 9.1%、堆肥は 50% であった。浴槽水、ジャグジー水、シャワー水からは *L. pneumophila* が検出され、堆肥からは *L. londiniensis*、レジオネラ属菌が検出された。また、県内でヒトから検出され、その遺伝子型に地域特異性が見られる *L. pneumophila* 血清群 3 の感染源究明のため、当センター及び保健所等で検出された *L. pneumophila* 血清群 3 の遺伝子解析を行ったが、ヒト由来株の遺伝子型と一致する株はなかった。

[キーワード：レジオネラ, レジオネラ・ニューモフィラ, 血清群 3, ST93]

[key words ; *Legionella*, *L. pneumophila*, serogroup 3, sequence type 93]

1 はじめに

レジオネラ症は、レジオネラを含むエアロゾルや粉塵を吸入することで起こる感染症で、感染症法において四類感染症に指定されている。近年、レジオネラ症の届出件数は増加傾向にあり、平成 26 年度は全国で 1,236 例(暫定値)が報告されており、四類感染症の中で最も届出数の多い疾患である。県内では平成 23 年以降、毎年 20 名以上のレジオネラ患者が報告されているが、感染源は不明であることが多い。

レジオネラは土壌や淡水等の自然環境や冷却塔、加湿器、浴槽水などの人工的な水環境中に広く分布し、アメーバを宿主として生息している。

当センターでは、レジオネラ対策の一環として、県内の浴槽水等の汚染実態調査を実施しており、本報告では平成 26 年度の結果について報告する。また、平成 19 年より岡山県内のレジオネラ症患者分離株を収集し、血清

群別及び遺伝子解析を行っている。患者分離株のうち、*L. pneumophila* 血清群(以下「SG」という。)3 は、現時点において本県に地域特異的であり、全ての株の遺伝子解析結果が一致している。このため、感染源・感染経路の究明を目的として、分離収集したレジオネラ菌株の遺伝子解析を行ったので、その結果についても報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株及び検体

平成 26 年度に採取した浴槽水等 96 検体と堆肥 12 検体の計 108 検体について、レジオネラ検査を実施した。一方で、県内の保健所等で、浴槽水等から検出されたレジオネラ菌株 152 株を収集し、同定及び血清群別を実施した。また、*L. pneumophila* SG3 と同定された菌株は、遺伝子解析を行った。

2.2 検査法

2.2.1 浴槽水の濃縮と培養

検体 500mL を孔径 0.22 μm のポリカーボネート製メンブランフィルターでろ過濃縮し、吸引後のフィルターを滅菌蒸留水 5mL でよく混和して洗い出し、濃縮試料とした。試料 1mL に 0.2N HCl・KCl 緩衝液 (pH2.2) を等量混合して 4 分間酸処理を行い、200 μL を GVPC 寒天培地 (日研生物医学研究所) 及び WYO 寒天培地 (栄研化学) あるいは MWY 寒天培地 (関東化学) に、コンラージ棒で塗抹した。36℃ で 7 日間培養し、その間、斜光法でコロニーを観察して、レジオネラと推定された集落を血液寒天培地 (BBL) と BCYE *α* 寒天培地 (栄研化学) に接種した。BCYE *α* 寒天培地のみで発育した集落について、血清群別試験、PCR 法 (*mip* 遺伝子及び 5S rRNA 遺伝子) または LAMP 法 (栄研化学) を実施して、同定をし、菌数を測定した。また、浴槽水については遊離残留塩素濃度と検出状況の関連を調べた。

2.2.2 堆肥の前処理と培養

堆肥 200g に滅菌蒸留水 400mL を加え、よく攪拌後、二重にした滅菌ガーゼで濾過し、濾液 120mL を 10,000rpm、5 分間遠心後、沈殿物に滅菌蒸留水 40ml を加え濃縮試料とした。試料 5mL を加熱処理 (50℃ 20 分間) 後、等量の 0.2N HCl・KCl 緩衝液 (pH2.2) を加えて 4 分間酸処理を行い、浴槽水と同様に分離培地に塗抹して、同定を行った。

2.2.3 血清群別試験

レジオネラ免疫血清 (デンカ生研) 及び衛生微生物技術協議会レジオネラレファレンスセンターで配布されたレジオネラ免疫血清 (ロングビーチ 2 群, ロングビーチ 2253, フィーレイ 1 群, フィーレイ 2 群, ハッケリ 1 群

+2 群, アニサ, ロンディニエンシス 1 群, ロンディニエンシス 2 群) を用いて行った。

2.2.4 パルスフィールドゲル電気泳動法による DNA パターンの解析

常らの改良法¹⁾により、パルスフィールドゲル電気泳動法 (以下「PFGE 法」という。) を実施した。

2.2.5 sequence-based typing 法

sequence-based typing 法による sequence type (以下「ST」という。) は、国立感染症研究所に依頼して実施した。

3 結果

3.1 検体別レジオネラ検出状況

浴槽水等 108 検体のレジオネラ検出状況を、表 1 に示した。

浴槽水 69 検体中 22 検体 (31.9%), ジャグジー水 8 検体中 3 検体 (37.5%), シャワー水 11 検体中 1 検体 (9.1%) 及び堆肥 12 検体中 6 検体 (50%) から、レジオネラが検出され、浴槽水やジャグジー水及び堆肥の検出率が高かった。原水、注湯口水及び冷却塔水からは、レジオネラは検出されなかった。

浴槽水からは、*L.pneumophila* SG 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, UT 等、多様な血清群の菌が検出された。ジャグジー水からは *L.pneumophila* SG3 と 6 が、シャワー水からは *L.pneumophila* SG3 が検出された。

堆肥からは *L.londiniensis* SG1 とレジオネラ属菌が検出されたが、*L.pneumophila* は検出されず、浴槽水、ジャグジー水、シャワー水由来株とは汚染菌種が異なっていた。

L.pneumophila SG3 は浴槽水等 108 検体中 5 検体から

表 1 検体別レジオネラ検出状況

検体名	検体数	検出数	検出率 (%)	検出菌種及び血清群 (検体数) *
浴槽水	69	22	31.9	<i>L. pneumophila</i> SG1 (6), 2 (1), 3 (2), 5 (4), 6 (9), 7 (2), 8 (1), 9 (2), 10 (4), UT (3)
ジャグジー水	8	3	37.5	<i>L. pneumophila</i> SG3 (2), 6 (1)
原水	4	0	0.0	
注湯口水	2	0	0.0	
シャワー水	11	1	9.1	<i>L. pneumophila</i> SG3 (1)
冷却塔水	2	0	0.0	
堆肥	12	6	50.0	<i>L. londiniensis</i> SG1 (5), <i>Legionella</i> spp. (4)
計	108	32	29.6	

* 重複を含む。 UT : 0 血清群別不能

検出された。

3.2 浴槽水等から検出されたレジオネラ菌数の分布

浴槽水、ジャグジー水、シャワー水から検出されたレジオネラ菌数を、表2に示した。

レジオネラが検出された検体の菌数は、ほとんどが $10 \sim 10^3$ CFU/100mLであったが、浴槽水とシャワー水からは、 10^3 CFU/100mL以上検出された検体があった。

3.3 遊離残留塩素濃度とレジオネラ検出状況

浴槽水の遊離残留塩素濃度とレジオネラ検出状況を、表3に示した。(浴槽水69検体中5検体は未測定)。

レジオネラの検出率は、遊離残留塩素度が0.2 mg/L

表2 浴槽水等から検出されたレジオネラ菌数の分布

菌数* (CFU/100mL)	浴槽水	ジャグジー	シャワー水
10未満(不検出)	47	5	10
$10 \sim 10^2$ 未満	18	3	0
$10^2 \sim 10^3$ 未満	3	0	0
$10^3 \sim 10^4$ 未満	0	0	1
$10^4 \sim 10^5$ 未満	1	0	0
計	69	8	11

*人がエアロゾルを直接吸引する恐れがあるもの(浴槽水、シャワー水等)は検出される菌数を10CFU/100mL未満としている。(レジオネラ症防止指針)

未満では16検体中11検体(68.8%)、0.2mg/L以上1.0mg/L未満は25検体中7検体(28.0%)、1.0mg/L以上は23検体中2検体(8.7%)で、遊離残留塩素濃度が高いほど、検出率が低くなる傾向にあった。表には示していないが、検出菌数が 10^2 CFU/100mL以上の検体は、全て遊離残留塩素濃度0.2mg/L未満であり、0.2mg/L以上の検体では検出菌数は $10 \sim 10^2$ CFU/100 mLで、遊離残留塩素濃度が高いほど、検出菌数が少なくなる傾向にあった。

シャワー水では、井戸水を使用した遊離残留塩素濃度0.1mg/L未満の検体から、 10^3 以上 10^4 未満CFU/100 mLのレジオネラが検出された。水道水を使用した10検体は、遊離残留塩素度が0～0.2mg/Lであったが、レジオネラは検出されなかった。

3.4 保健所等の浴槽水等由来株の血清群別結果

保健所等の検査で浴槽水等から検出された152株の血清群別結果を、表4に示した。

浴槽水由来株は、*L.pneumophila* SG 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, UT, *L.micdadei* 及びレジオネラ属菌で、当センターの調査結果と同様に、多様な血清群及び菌種が検出された。原水由来株は*L.pneumophila* SG 1, 3, 5, 8 及びレジオネラ属菌、シャワー水由来株は*L.*

表3 浴槽水中の遊離残留塩素濃度とレジオネラ属菌の検出率

遊離残留塩素濃度* (mg/L)	検体数	陽性検体数	検出率(%)
0.2未満	16	11	68.8
0.2以上1.0未満	25	7	28.0
1.0以上	23	2	8.7
計	64	20	31.3

*遊離残留塩素濃度は「0.2～1.0mg/L程度に維持する」となっている。(レジオネラ症防止指針)

表4 保健所等分離レジオネラ株

検体名	検出菌種及び血清群
浴槽水	<i>L. pneumophila</i> SG1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, UT <i>L. micdadei</i> , <i>Legionella</i> spp.
原水	<i>L. pneumophila</i> SG1, 3, 5, 8, <i>Legionella</i> spp.
シャワー水	<i>L. pneumophila</i> SG1, 5
ジャグジー	<i>L. pneumophila</i> SG1, 3, 5, 6, 9
トイレ給湯口水	<i>L. pneumophila</i> SG1

UT：0血清群別不能

pneumophila SG 1, 5, ジャグジー水由来株は *L.pneumophila* SG1, 3, 5, 6, 9, トイレ給湯口由来株は *L.pneumophila* SG1 であった。

保健所等の検査で浴槽等から検出された *L.pneumophila* SG3 は 19 株であった。

3.5 遺伝子型別

当センターで検出された *L.pneumophila* SG3 の 5 株

表 5 県内で分離された *L.pneumophila* SG3 株の PFGE パターン

検体	菌株数	バンドパターン数*	
環境由来	浴槽水	109	60
	原湯	4	4
	ジャグジー水	7	5
	プール水	8	4
	プールろ過水	1	1
	フローミル水	9	1
	ろ過水	4	1
	冷却水	3	3
	シャワー水	1	1
	小計	146	72
患者	9	1	
計	155	73	

* 検体間の重複を含む

及び保健所等で検出された *L.pneumophila* SG3 の 19 株の合わせて 24 株について、PFGE 法による解析を行った結果、患者由来の *L.pneumophila* SG3 と遺伝子パターンが一致する菌株はなかった。さらに、過去に検出された環境由来株及び患者由来株を含めた 155 株について、PFGE 法による解析を行った結果を、表 5 及び図 1 に示した。

環境由来株 146 株は 72 パターンに分類され、そのうち、浴槽水由来株 109 株は 60 パターンに分類された。患者由来 9 株は全て同じパターンであった。浴槽水等から検出された株は、いずれも患者由来株の PFGE パターンとは、異なっていた。また、菌株を国立感染症研究所に送付して、ST 型別を実施したが、いずれも患者由来株の ST93 とは異なっていた。

4 考察

レジオネラ感染症の原因菌としては、衛生微生物技術協議会レジオネラレファレンスセンターで収集された臨床分離株の 9 割以上を *L.pneumophila* が占め、そのうちの 8 割が SG1 であった。一方、*L.londiniensis* は、臨床分離株 1 株が収集されているのみである²⁾。

本調査で、浴槽水等及び堆肥からは、様々な種類のレジオネラが検出され、検体により分布が異なっていた。

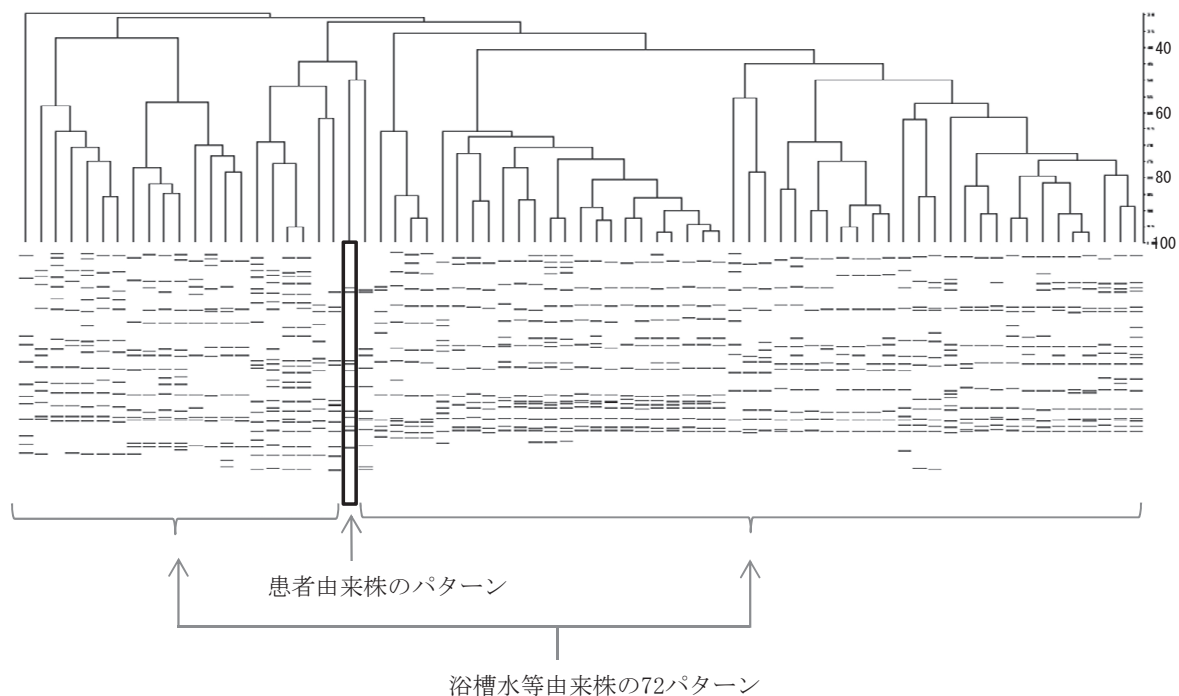


図 1 患者および浴槽水等由来 *L.pneumophila* SG3 株の PFGE パターンとデンドログラム解析結果

浴槽水の衛生管理では、遊離残留塩素濃度が適切であっても、レジオネラが検出されている検体があり、高いpH、有機物、バイオフィルムの存在等による影響が考えられ、適切な管理が必要である。ジャグジーやシャワーはエアロゾルを発生するため、検出菌数が多い場合は感染のリスクが高く、注意が必要である。

堆肥からは*L.pneumophila* は検出されなかったが、臨床検体から分離されている*L.londiniensis* が高率に検出されたので、堆肥を扱う際には、粉塵の吸入を防ぐよう注意する必要があると思われる。

県内で患者から検出された*L.pneumophila* SG3は、同一のPFGEパターン及びSTを示す地域特異的な株であるが、現在まで環境由来株は、全て患者由来株とPFGEパターン及びSTが異なっていた。今後は対象を広げ、より多様な環境検体についての調査が重要であると思われる。

なお、本調査は、平成26年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」の研究班による調査の一環として実施した。

謝 辞

レジオネラのST型別をお願いしました国立感染症研究所の前川 純子先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 常 彬, 前川 純子, 渡辺 治雄: レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法の改良, IASR, 29, 333-334, 2008
- 2) 前川 純子, 倉 文明, 大西 真, 渡辺 ユウ, 渡辺 祐子: レジオネラ臨床分離株の型別—レファレンスセンター活動報告として, IASR, 34, 161-162, 2013

