

【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27年度)

岡山県内のレジオネラの疫学調査と小児科受診患者等のエルシニア抗体保有調査について

Investigation of pathogenic bacteria in the human and the environmental samples for prevention of transmission (FY2015)

Epidemiological study of *Legionella* in Okayama prefecture and survey of *Yersinia* antibody in pediatric patients and others

中嶋 洋, 檀上博子, 河合央博, 大畠律子 (細菌科)

Hiroshi Nakajima, Hiroko Danjyo, Hisahiro Kawai, Ritsuko Ohata (Bacteriology section)

要 旨

平成 27 年度に県内で発生したレジオネラ症患者由来株 5 株の sequence-based typing (SBT) 法による型別を実施した。このうちの 1 株は、過去にも本県で地域特異的に分離されている *L.pneumophila* (Lp) 血清群 (SG) 1 sequence type (ST) 609 であった。環境検体では、37 検体中 7 検体 (18.9%) からレジオネラを検出し、保健所分離株を含めた Lp SG1 と SG3 について分子疫学解析を行って、患者由来株や過去に分離された株と比較したが、地域特異的な患者由来株と同じ ST や PFGE パターンの菌株は、検出されなかった。感染源の究明には、より多様な検体の調査や患者発生時の自宅周辺の調査も、必要であると思われた。一方、エルシニア症の発生実態を把握するため、全国の病院の小児科等を受診した患者で、エルシニア症疑いあるいは川崎病との鑑別が必要な患者の血清について エルシニア抗体保有調査を実施した。患者 100 名中 37 名 (37.0%) が抗体価 1 : 160 以上の陽性であり、エルシニア感染が強く疑われた。

[キーワード : レジオネラ, エルシニア, 抗体価, 疫学]

[Keywords : *Legionella*, *Yersinia*, antibody titer, epidemiology]

1 はじめに

岡山県下では、毎年レジオネラ症が発生しており、事例発生時に感染源を究明することは、感染予防対策として重要である。特に、患者由来株の *L.pneumophila* (以下、「Lp」という。) 血清群 (以下、「SG」という。) 1 sequence type (以下、「ST」という。) 609 や ST1077, Lp SG3 ST93 は本県で地域特異的に検出されているが、これらはすべて散発例であり、感染源究明は困難な状況にある。一方、エルシニア症は過去に本県で集団事例が 5 例 [*Y.pseudotuberculosis* (以下「Y.ptb」という。) による事例が 4 回, *Y.enterocolitica* (以下「Y.ent」という。) による事例が 1 回] 発生した^{1),2)}。しかしながら、患者への抗菌剤等の早期投与により、菌の検出はより難しい状況にあり、散発例の発生状況は不明である。このため、両菌の感染予防対策に資することを目的として、平成 13 年度より患者及び環境検体におけるレジオネラの調査を、平成 11 年度より患者血清抗体によるエルシニア症の発生状況の調査を行っている。本報告では、

平成 27 年度の結果について報告する。

2 材料及び方法

2.1 検体

2.1.1 レジオネラ

県内のレジオネラ症患者株 5 株と、保健所が浴槽水等から分離したレジオネラ 122 株を収集し、同定および血清群別を実施した。環境検体は用水 22 検体、河川水 8 検体、湧水 3 検体、湖水 1 検体、池水 1 検体、土壌 2 検体の計 37 検体を採取し、レジオネラの分離培養を実施した。このうち、Lp SG3 と同定された菌株については、過去の調査で収集・分離された菌株と合わせて、計 161 株の遺伝子解析を行った。

2.1.2 エルシニア

全国の病院の小児科等を受診あるいは入院している患者で、エルシニア症疑いあるいは川崎病との鑑別を必要とする患者の血清について 抗体価を測定した。平成 27 年度は、

病院 53 施設の同意書が提出された患者 100 名分 220 検体について、抗体価測定依頼を受けて実施した。なお、本調査は、当センターの倫理審査委員会の承認を得て実施した。

2.2 検査法

2.2.1 レジオネラ

ろ過法により検体を 100 倍濃縮後、等量の 0.2M HCl・KCl 緩衝液 (pH2.2) で酸処理を行い、GVPC 寒天培地に塗抹した。36℃ で 7 日間培養し、その間に発育したコロニーを斜光法³⁾により観察して、血液寒天培地と BCYE 寒天培地に接種してスクリーニングした後、血清群別 (レジオネラ免疫血清: デンカ生研) 及び PCR 法⁴⁾(*mip* 遺伝子及び 5S rRNA 遺伝子) を実施し、同定した。菌株の遺伝子解析による比較は、パルスフィールドゲル電気泳動 (以下、「PFGE」という。) 法を用いて、改良プロトコールによる 2 日間の方法⁵⁾で実施した。また sequence-based typing (以下、「SBT」という。) 法による ST の型別と、ST を用いた minimum spanning tree (以下、「MST」という。) による解析は、国立感染症研究所に依頼して実施した。Lp SG1 株の病原性との関連が指摘されている *lag-1* の保有は、Kozak らの方法⁶⁾により、*lag-F* 及び *lag-R* のプライマーを用いて検査した。

2.2.2 エルシニア

患者血清を 56℃、30 分間非働化し、生理食塩水で 10 倍希釈した。これを 2 倍段階希釈して 1:10 ~ 1:160 の希釈系列を、使用する抗原の種類と同数作成した。抗原液は、当センターが保有する Y.ptb (血清群 la, lb, 2a, 2b, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6) 株と Y.ent (血清群 03, 05, 08, 09) 株を使用した。25℃、2 日間培養した菌を生理食塩水で 2 回洗浄し、生理食塩水でマクファーランド No 0.6 の濃度になるように調製して、抗原液として使用した。抗体価の測定は、抗原ごとに希釈系列の患者血清 0.2ml と抗原液 0.2ml を試験管内で混合し、50℃、1 晩反応後に凝集像を観察した。凝集の見られた最高希釈倍率の値をその検体の抗体価とし、抗体価が 1:160 以上を陽性と判定した。

3 結果及び考察

3.1 レジオネラ

3.1.1 環境検体の検査結果

用水等環境検体 37 検体のレジオネラ検査結果を、表 1 に示した。

用水 22 検体中 7 検体 (31.8%) からレジオネラが検出され、河川水、湧水、湖水、池水及び土壌からは検出されなかった。分離菌は、*L. feeleii* SG1 2、*L. hackeliae* SG1&2 及びレジオ

表 1 環境検体のレジオネラ検査結果

| 検体名 | 検体数 | 検出数 | 検出率 (%) | 検出菌種 * |
|-----|-----|-----|---------|----------------------------------------------------------------------------|
| 用水 | 22 | 7 | 31.8 | <i>L. feeleii</i> SG1,2, <i>L. hackeliae</i> SG1&2, <i>Legionella</i> spp. |
| 河川水 | 8 | 0 | 0.0 | |
| 湧水 | 3 | 0 | 0.0 | |
| 湖水 | 1 | 0 | 0.0 | |
| 池水 | 1 | 0 | 0.0 | |
| 土壌 | 2 | 0 | 0.0 | |
| 計 | 37 | 7 | 18.9 | |

*重複を含む

表 2 保健所等分離レジオネラ株

| 検体名 | 菌株数 | 検出菌種及び血清群 |
|-----------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 浴槽水 | 89 | Lp SG1(17),3(15),5(16),6(2),8(2),9(6),10(8),UT(22), <i>Legionella</i> spp.(1) |
| 原水 | 1 | Lp SG8 |
| シャワー水 | 7 | Lp SG1(1),3(1),5(2),6(1),UT(1), <i>Legionella</i> spp.(1) |
| ジャグジー | 4 | Lp SG1(1),3(2), <i>Legionella</i> spp.(1) |
| 冷却塔水 | 20 | Lp SG1(6),5(1),10(2),13(1),UT(5), <i>L. anisa</i> (2), <i>L. feeleii</i> SG1(1), <i>Legionella</i> spp.(2) |
| 風呂吐水口ふきとり | 1 | Lp SG1 |
| 計 | 122 | |

UT:O血清群別不能, ():株数, Lp: *L.pneumophila*

ネラ属菌（以下、「*Legionella* spp.」という。）で、Lp は検出されなかった。

3.1.2 保健所分離株の同定結果

収集した保健所分離株の血清群別結果を 表 2 に示した。

収集した 122 株は、浴槽水、原水、シャワー水、ジャグジー水、冷却塔水及び風呂吐水口ふきとりから分離された。その菌種と血清群は、浴槽水は Lp SG1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 群別不能（以下、「UT」という。）、*Legionella* spp. であった。原水は Lp SG8, シャワー水は Lp SG1, 3, 5, 6, UT, *Legionella* spp., ジャグジー水は Lp SG1, 3, *Legionella* spp., 冷却塔水は Lp SG1, 5, 10, 13, UT, *L. anisa*, *L. feeleii* SG 1, *Legionella* spp., 風呂吐水口ふきとりは Lp SG1 であった。

3.1.3 収集した患者由来株の疫学解析結果

平成 19 年度から平成 27 年度の期間に収集したレジオネラ症患者から分離された 38 株を、表 3 に示した。

平成 27 年度は Lp SG1 が 4 株、*L. longbeachae* SG2 が 2 株で、現在までに収集した株数は 38 株になり、本年度初めて Lp 以外の *L. longbeachae* が分離された。本年度収集した Lp は 4 株すべてが SG1 で、38 株中 Lp SG1 が 24 株となった。このうち、19 株について *lag-1* の保有を検査した結果、16 株（84.2%）が保有していた。*lag-1* について

は病原性との関連が指摘されており、調査の結果でも高率に保有していたが、*lag-1* を保有していなかった菌株が分離された患者でも、呼吸困難や意識障害など、その症状が比較的重篤な場合も見られることから、より多くの事例についての検討が必要であると思われる。

患者由来株の SBT 法による解析結果は、Lp SG1 が多様な ST に型別されたのに対し、Lp SG3 は 9 株すべてが同じ ST93 で、PFGE 法による遺伝子パターンも一致した⁷⁾。LpSG1 (ST609, ST1077) 及び Lp SG3 (ST93) 株は、国内では本県に地域特異的に分離されており、本年度も Lp SG1 ST609 が 1 株分離された。Lp SG1 の 751 株について感染研で実施した MST 解析の結果⁸⁾では、患者由来の Lp SG 1 (ST609) は、感染源不明の臨床分離株が多い Group-U に属した。これまで報告された 6 株のうち、4 株が本県の患者由来株であり、これらの株が分離された症例のうち、温泉での感染が推定された県外の 1 例を除く 5 例は、感染源が不明である。

3.1.4 患者及び環境由来 Lp SG3 の遺伝子解析結果

平成 13 年度から平成 27 年度の期間に分離あるいは収集した Lp SG3 について、患者由来 9 株と環境由来 152 株の PFGE 法を用いた遺伝子解析結果を、表 4 及び図 1 に示した。

表 3 患者由来レジオネラ株（2007 年～2015 年）

| 菌株No | 分離年 | 菌種 | 血清群 | ST | PFGE パターン | 年齢 | 性別 | 検体 | 症状 | | | | | lag-1 保有 | | |
|----------|------|--------|-----|------|--------------|----|----|--------|----|----|------|------|----|-------------|---------------|-------|
| | | | | | | | | | 発熱 | 咳嗽 | 呼吸困難 | 意識障害 | 肺炎 | | その他 | |
| K9 | 2007 | Lp | 1 | 595 | NT | 64 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | - | |
| K11 | 2007 | Lp | 1 | 593 | NT | 69 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | - | |
| K105 | 2008 | Lp | 1 | 609 | NT | 59 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K117 | 2008 | Lp | 1 | 609 | NT | 79 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K118 | 2008 | Lp | 1 | 594 | NT | 55 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K090729 | 2009 | Lp | 1 | 550 | NT | 37 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| O100216 | 2009 | Lp | 1 | 23 | NT | 54 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K100118 | 2010 | Lp | 1 | 609 | NT | 58 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K100503 | 2010 | Lp | 1 | 42 | NT | 69 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K110728 | 2011 | Lp | 1 | 1077 | NT | 55 | 女 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K111019 | 2011 | Lp | 1 | 120 | NT | 78 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| KD111109 | 2011 | Lp | 1 | 120 | NT | 78 | 男 | 不明 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | NT | |
| K111117 | 2011 | Lp | 1 | 1077 | NT | 91 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | NT | |
| K111213 | 2011 | Lp | 1 | 1077 | NT | 69 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | NT | |
| K120214 | 2012 | Lp | 1 | 42 | NT | 55 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | NT | |
| K121108 | 2012 | Lp | 1 | 530 | NT | 71 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | - | |
| K140624 | 2014 | Lp | 1 | 1847 | NT | 50 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K140618 | 2014 | Lp | 1 | 1845 | NT | 53 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K140714 | 2014 | Lp | 1 | 23 | NT | 68 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K140904 | 2014 | Lp | 1 | 1846 | NT | 49 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K150622 | 2015 | Lp | 1 | 1 | NT | 57 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K150925 | 2015 | Lp | 1 | 609 | NT | 94 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K150823 | 2015 | Lp | 1 | 2126 | NT | 70 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K151014 | 2015 | Lp | 1 | 642 | NT | 61 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | NT | |
| KD110625 | 2011 | Lp | 2 | 354 | NT | 63 | 男 | 不明 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | + | |
| K79 | 2008 | Lp | 3 | 93 | 同一 | 66 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | |
| K86 | 2008 | Lp | 3 | 93 | | 58 | 女 | 喀痰 | | | | | | | 胸部異常影、症状無し | |
| K95 | 2008 | Lp | 3 | 93 | | 79 | 男 | 喀痰 | | | | | | | 胸部異常影、症状無し | |
| K100423 | 2010 | Lp | 3 | 93 | | 60 | 女 | 肺胞洗浄液 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | |
| K100712 | 2010 | Lp | 3 | 93 | | 74 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | |
| K110707 | 2011 | Lp | 3 | 93 | | 77 | 男 | 喀痰 | | | | | | | 胸部異常影、症状無し | |
| K110908 | 2011 | Lp | 3 | 93 | | 59 | 女 | 喀痰 | | | | | | | 胸部異常影、症状無し | |
| K120831 | 2012 | Lp | 3 | 93 | | 58 | 女 | 喀痰 | | | | | | | 胸部異常影、非定型肺炎疑い | |
| K130920 | 2013 | Lp | 3 | 93 | | 73 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | |
| K130108 | 2013 | Lp | 9 | 1283 | | NT | 65 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | 全身倦怠感 |
| K141112 | 2014 | Lp | 9 | 2094 | NT | 59 | 男 | 気管内吸引痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | |
| KD120905 | 2012 | Lp | 10 | 1427 | NT | 74 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ICUに入院 | |
| K151013 | 2015 | L.long | 2 | - | NT | 68 | 男 | 喀痰 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | | |

Lp: *L. pneumophila*, L.long: *L. longbeachae*, NT: not tested

表4 県内で分離された*L.pneumophila* SG3株のPFGEパターン

| 由来 | 菌株数 | バンドパターン数 |
|--------|-----|----------|
| 浴槽水 | 113 | 63 |
| 原湯 | 4 | 4 |
| ジャグジー水 | 9 | 7 |
| プール水 | 8 | 4 |
| プールろ過水 | 1 | 1 |
| フロアミル水 | 9 | 1 |
| ろ過水 | 4 | 1 |
| 冷却水 | 3 | 3 |
| シャワー水 | 1 | 1 |
| 患者 | 9 | 1 |
| 計 | 161 | 76 |

浴槽水等由来株 152 株の PFGE パターンは 75 パターンに分類されたが、患者由来株 (ST93) の遺伝子パターンと一致する株は無かった。昨年度、SBT 法に必要な 7 つの遺伝子のうち、*faA* だけの塩基配列について実施した MST による解析結果⁸⁾でも、ST93 株は *faA3* のグループに属していたが、clonal complex は形成しなかった。ST93 株については、患者の住所や感染時期は異なっており、疫

学的な共通性も見られなかったことから、本菌が広範囲かつ継続的に多様な検体を汚染している可能性が危惧された。しかし、図 1 に示したように、県下の広範囲な地域の施設で採水した多数の検体から分離された *Lp* SG3 株計 152 株について、遺伝子解析を実施したが、患者と同一の株は見つからなかったことから、浴槽水における本菌の汚染は、かなり低いものと思われた。これらの菌株の感染源究明のためには、今まであまり検査をしていない噴水や人工滝などの修景水等についても、積極的な調査が必要と考える。

3.2 エルシニア

3.2.1 エルシニア抗体保有状況

抗体価測定依頼を受けた患者 100 名 (220 検体) のうち、97 名 (213 検体) は *Y.ptb* に対する抗体価を 28 名 (58 検体) は *Y.ent* に対する抗体価を測定した。うち 25 名については、*Y.ptb* と *Y.ent* 両方に対する抗体価を測定した。その結果は、表 5 に示した。

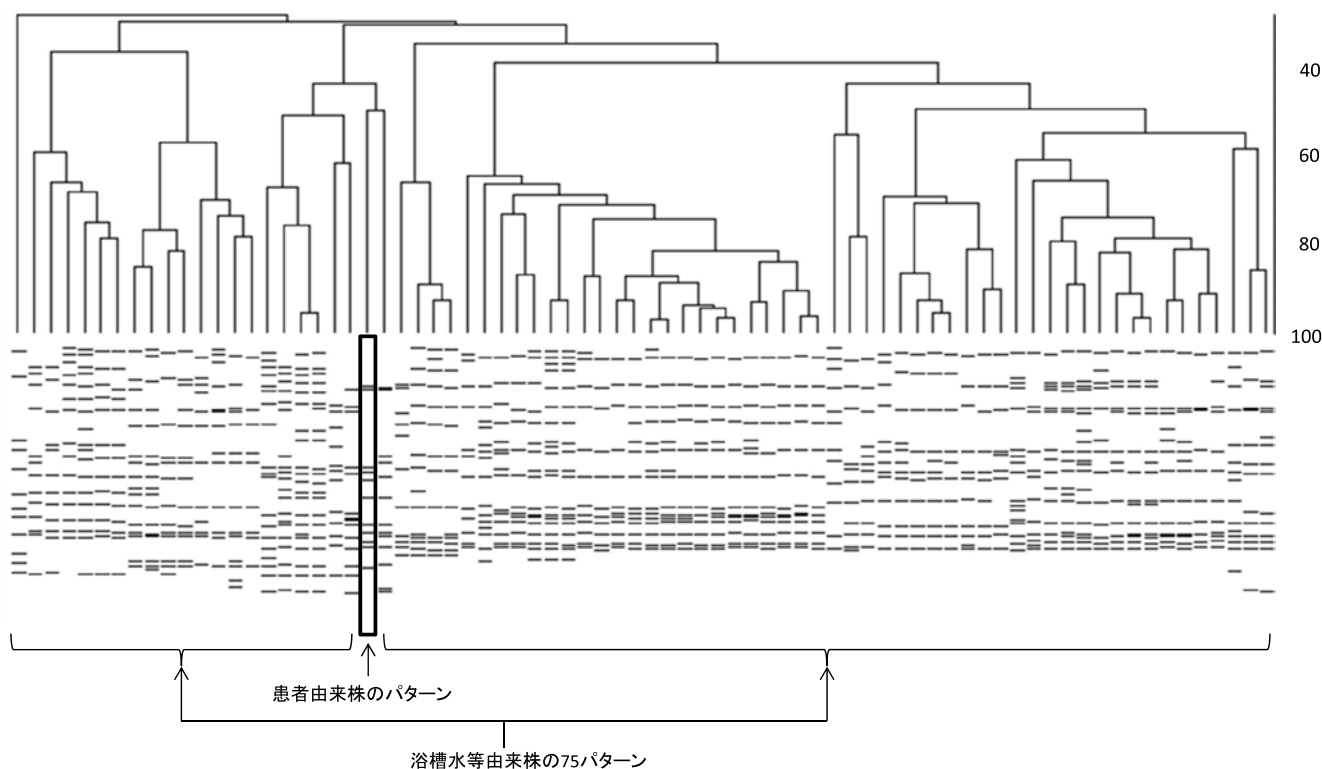


図1 患者及び浴槽水等由来*L.pneumophila* SG3のPFGE解析結果

表5 エルシニア抗体保有状況

| 抗体価 | <i>Y.ptb</i> | | <i>Y.ent</i> | |
|-----|------------------|----|------------------|----|
| | 陽性 | 陰性 | 陽性 | 陰性 |
| 人数 | 34 ^{a)} | 63 | 12 ^{b)} | 16 |
| 計 | 97 ^{c)} | | 28 ^{c)} | |

Y.ptb: *Y.pseudotuberculosis*, *Y.ent*: *Y.enterocolitica*

抗体価は1:160以上を陽性, 1:80以下を陰性

a): 5名は2種類の血清群が陽性

b): 4名は2種類以上の血清群が陽性

c): 25名は*Y.ptb*及び*Y.ent*の抗体価を測定

Y.ptb は 97 名中 34 名 (35.1%) が抗体価 1 : 160 以上の陽性であり, 5 名 (5.2%) は 2 種類の血清群に対して陽性であった。Y.ent は 28 名中 12 名 (42.9%) が陽性で, 4 名 (14.3%) は 2 種類以上の血清群に対して陽性であった。また, Y.ptb 及び Y.ent の両菌に対する抗体価を測定した 25 名中 2 名は, Y.ptb 及び Y.ent の各 1 種類の血清群に対して陽性であった。

3.2.2 疾病グループ別 Y.pseudotuberculosis 抗体保有状況
疾病グループ別の Y.ptb 抗体価測定結果は, 表 6 に示した。

表 6 疾病グループ別 Y.pseudotuberculosis 抗体保有状況

| 疾病グループ | 抗体価 | | 計 |
|----------|-----------|-----------|----|
| | 陽性 | 陰性 | |
| エルシニア症疑い | 29 (40.3) | 43 (59.7) | 72 |
| 川崎病症状 | 5 (20.0) | 20 (80.0) | 25 |

数字は人数, (): %

抗体価は 1:160 以上を陽性, 1:80 以下を陰性

Y.ptb の抗体価を測定した 97 名中, エルシニア症疑いの患者は 72 名, 川崎病症状を呈した患者は 25 名であった。それぞれのグループの 29 名 (40.3%) 及び 5 名 (20.0%) が抗体価 1 : 160 以上の陽性であり, エルシニア感染が疑われるグループの陽性率は, 川崎病症状を呈したグループに比べて高かった。一方, 川崎病症状を呈した患者の 20% が陽性であったことから, 類似した症状を呈する Y.ptb による感染との鑑別に, 抗体価測定が有用であると思われる。

謝 辞

本調査にご協力いただきました岡山市保健所, 倉敷市保健所および岡山県健康づくり財団の関係者各位, 患者株の分与を戴きました倉敷中央病院検査課の藤井 寛之先生, 川崎医科大学附属病院検査課の河口 豊先生, 多数の患者血清検体をご提供いただきました関係機関の先生方に, 深謝いたします。

文 献

- 1) 井上正直, 中嶋 洋, 石田立夫, 坪倉 操: わが国におけるエルシニア症の発生状況, 獣医畜産新報, 796, 12-16, 1987
- 2) 井上正直, 中嶋 洋, 森 忠繁, 田中睦男, 本郷俊治ら: 4. 岡山県におけるエルシニアの生態, メディアサークル, 36, 366-370, 1991
- 3) 森本 洋: 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性, 日本環境感染学会誌, 25(1), 8-14, 2010
- 4) 倉 文明, 前川純子, 森本 洋, 杉山寛治, 磯部順子ら: レジオネラ症, 病原体検出マニュアル, Package

insert, EnviroAmp Legionella Kits. Perkin Elmer Corporation, 1993

- 5) 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 2008; 29: 333-334.
- 6) Kozak N.A., Benson R.F., Brown E., et al.: Distribution of *lag-1* Alleles and Sequence-Based Types among *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Clinical and Environmental Isolates in the United States. J. Clin. Microbiol. 2009; 47: 2525-2535.
- 7) 西山 明宏, 石田 直, 興相 陽平, 他: *Legionella pneumophila* serogroup 3 による呼吸器感染症の 4 症例. 感染症誌 2011; 85: 373-379.
- 8) 中嶋 洋, 地域特異的な感染源不明クラスターに関する調査 (平成 25 年度 ~ 27 年度): 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 平成 25 年度 ~ 27 年度総合研究報告書, 105-113, 2016