

【調査研究】

岡山県内における水たまりのレジオネラ属菌調査

A study of *Legionella* Isolated from Puddles in Okayama Prefecture

河合央博, 森本晃司*, 岡田達郎, 仲 敦史**, 中嶋 洋, 狩屋英明

*現 岡山市保健所, **現 岡山県備前保健所

KAWAI Hisahiro, MORIMOTO Koji*, OKADA Tatsurou, NAKA Atsushi**,

NAKAJIMA Hiroshi, KARIYA Hideaki

要 旨

2019年から2020年にかけて、岡山県内のアスファルト道路上に形成された水たまり101検体についてレジオネラ属菌の分離を試みたところ、57検体(56.4%)が陽性となった。分離株の多くが*Legionella pneumophila*(以下「Lp」という。)であり、血清群(Serogroup;以下「SG」という。)別では、SG1(30.7%)、SG5(20.6%)、SG3及び型別不能(各12.2%)の順に多かった。水たまりから分離されたLpについてパルスフィールドゲル電気泳動(以下「PFGE」という。)法により遺伝子型別を実施した結果、物理的に距離のある県南部と県北部で一致又は類似したPFGEパターンを示す株が認められたことから、水たまりに存在するレジオネラ属菌には特有の近縁株があり、県内に広域に存在すると推察された。Lpの臨床分離株と水たまり分離株のPFGEパターンを比較したところ、臨床分離株Lp SG1の2株が水たまり分離株と類似又は酷似したPFGEパターンを示したことから、水たまりがレジオネラ症の感染源となり得る可能性が考えられた。また、国内では本県のみで検出されている臨床分離株Lp SG3 Sequence Type 93(Sequence-Based Typing法による遺伝子型)については、水たまりからは分離されなかった。

[キーワード:レジオネラ症, 水たまり, レジオネラ属菌, *Legionella pneumophila*, パルスフィールドゲル電気泳動]

[Key words: Legionellosis, Puddle, *Legionella*, *Legionella pneumophila*, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)]

1 はじめに

レジオネラ症は、*Legionella pneumophila*(以下「Lp」という。)を代表とするレジオネラ属菌による感染症で、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(平成10年法律第114号)において四類感染症に位置づけられている。主な病型としてレジオネラ肺炎とポンティアック熱があるが、特にレジオネラ肺炎は重篤となることがある。全国のレジオネラ症の患者数は近年増加傾向であり、2018年には年間2,000人を越えた¹⁾。同様に、岡山県内の患者数も、2017年までは年間20~30人で推移していたが、2018年には83人、2019年には57人、2020年には80人、2021年には57人と、増加傾向である。

レジオネラ属菌は自然界に広く存在するが、ヒトへの主な感染経路はエアロゾルの吸入とされており、代表的な感染源は、衛生管理が不十分な入浴施設、冷却塔、加湿器等と考えられている。また、土壌の粉塵の吸入も想定されている。しかしながら、2019年から2021年の本県におけるレジオネラ症患者194人について、感染症サーベイランスシステム(National Epidemiological

Surveillance of Infectious Disease; NESID)で確認したところ、感染源が特定された事例は皆無であった。これは、レジオネラ症のほとんどが散発事例であることが感染源の特定を困難にしているためと推察される。

当センターでは、以前からレジオネラ症患者の感染源を特定するための調査を実施しているが、その中でも2008年から2017年の10年間で10件確認された(2008年3件、2010年2件、2011年2件、2012年1件、2013年1件、2017年1件)Lp血清群(Serogroup;以下「SG」という。)3による散発事例に着目している²⁾⁻⁵⁾。これらの感染源は不明とされているが、国立感染症研究所のSequence-Based Typing(以下「SBT」という。)法による臨床分離株の遺伝子型別では、10株全てがSequence Type(以下「ST」という。)93であり、国内では本県のみで検出された希少株であることが明らかとなった。そこで、2001年から2015年までに県内の入浴施設の浴槽水、プール水、ジャグジー水、シャワー水等、人工の水系環境等を対象とした調査を行い、分離又は収集したLp SG3 152株についてパルスフィールドゲル電気泳動

(Pulsed-Field Gel Electrophoresis；以下「PFGE」という。)法による遺伝子型別を行ったが、ST93株との遺伝的関連性は認められなかった²⁾⁻⁵⁾。このことから、ST93株による散发事例10件については、人工の水系環境とは異なる感染源に起因する可能性が考えられた。

近年、アスファルト道路の水たまりからLpをはじめとするレジオネラ属菌の分離が報告され^{6),7)}、患者由来株と遺伝的に近縁であったことから、水たまりが土壌からのエアロゾルの発生源となることでレジオネラ属菌を感染させる可能性が示された。そこで今回我々は、県内のレジオネラ属菌の生息実態の把握及びST93株の感染源の究明を目的に、県内の水たまりを対象にレジオネラ属菌の分布状況を調査し、同時期に発生したレジオネラ症の臨床分離株との比較解析を実施したので報告する。

2 材料及び方法

2.1 対象及び臨床分離株

2019年6月～2020年1月及び5月～7月、雨天の当日又は翌日に、県内74か所(地点番号1～71, A, B及びC: 県南部58か所, 県北部16か所)のアスファルト道路上に形成された水たまりから採水した(図1)。このうち県南部の地点A, B及びCの3か所では、月1回程度の頻度で継続的に採水し(地点A: 11回(検体No.A-1～A-11), 地点B: 9回(検体No.B-1～B-9), 地点C: 10回(検体No.C-1～C-10)), 計101検体を対象とした。また、水たまりの調査と同時期に県内で分離されたLpの臨床分離株11株(Lp SG1: 10株, Lp SG3: 1株)を収集し、

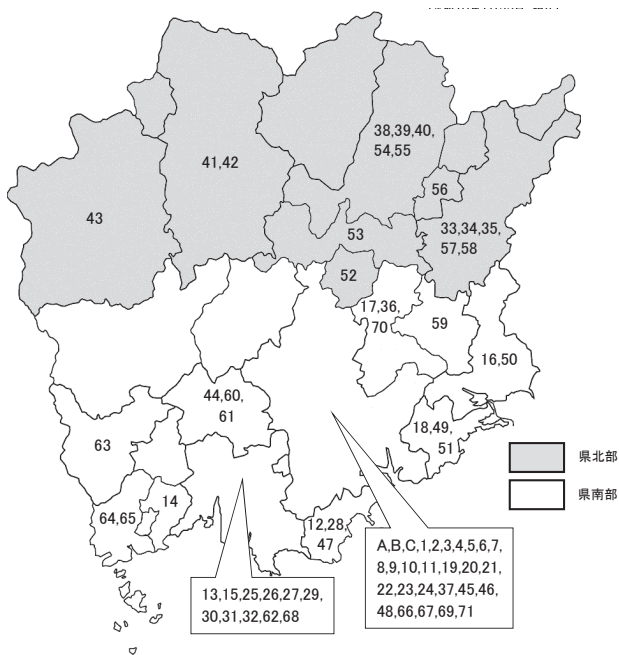


図1 水たまり採水地点

対象から分離された菌株との比較解析に供した。

2.2 方法

2.2.1 レジオネラ属菌の分離及び同定

レジオネラ属菌の分離は、検体の非濃縮液及びろ過法による濃縮液を用いた。検体500 μL(非濃縮液)に等量の0.2 M KCl-HCl緩衝液(pH 2.2)(武藤化学)を加えて4分間室温で酸処理した後、200 μLをGVPN α寒天培地(自家製造)にコンラージ棒を用いて塗布し、37℃7日間分離培養を行った。また、検体99.5 mLをフィルターろ過後、フィルターを滅菌生理食塩水5 mLに浸し、ポルテックスミキサーで1分間洗浄して濃縮液とし、このうち500 μLを非濃縮液と同様に酸処理し、100 μLをGVPN α寒天培地に塗布して37℃7日間分離培養を行った。濃縮液については、滅菌生理食塩水による10倍及び100倍希釈液を用いた分離培養も併せて行った。培養後、GVPN α寒天培地上に発育したレジオネラ属菌が疑われる灰白色コロニーについて、BCYE α寒天培地(自家製造)及び血液寒天培地(自家製造)を用いて確認培養を行い、BCYE α寒天培地にのみ発育した菌株について、レジオネラ属菌を検出するPCR法⁸⁾を行った。陽性株については、Lpを特異的に検出するPCR法⁹⁾によってLp株を特定し、同定された菌株については、レジオネラ免疫血清(デンカ)を用いてSGの確認を行った。また、培地上のレジオネラ属菌と同定されたコロニー数から、水たまり100 mL当たりのレジオネラ属菌の菌数を算出した。なお、複数の培地で菌数を算出した検体については、最多の菌数を採用した。

Lp以外のレジオネラ属菌(以下「non-Lp」という。)については、1地点につき1株を無作為に選択し、国立感染症研究所病原体検出マニュアル¹⁰⁾に準じてmip遺伝子の塩基配列を決定後、BLAST検索(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)により既存菌種の配列と比較して菌種を推定した。

2.2.2 SBT法

志賀毒素遺伝Lpの臨床分離株11株のSBT法による遺伝子型別は、国立感染症研究所に依頼した。

2.2.3 PFGE法

水たまり分離株及び臨床分離株のPFGE解析は、常らの方法¹¹⁾に準じて行った。PFGEパターンの解析はBioNumerics ver7.6(Applied Maths)を使用し、UPGMA法によりデンドログラムを作成した。同一検体から分離されたLpで同じPFGEパターンを示した菌株は一つにまとめた。また、デンドログラムの分類は、類似度85%以上をクラスターとした。

3 結果

3.1 レジオネラ属菌の分離及び分布状況

水たまり101検体のうち、57検体（56.4%）からレジオネラ属菌が分離された（表1）。レジオネラ属菌の菌数（CFU/100 mL）は、1,000以上10,000未満が41検体（71.9%）と最も多かったが、4検体は平板上に夾雑菌や真菌が広範囲に発育する等の理由で算出できなかった。市町別で比較すると、採水地点数に違いはあるものの、18市町のうち16市町（88.9%）からレジオネラ属菌が分離された（図2）。地域別で比較すると、県北部では

16検体中9検体（56.3%）、県南部では85検体中48検体（56.5%）が陽性となり、両者に差は認められなかった（表2）。水たまり形成場所別で比較すると、国道県道沿い又は付近（側道、高架下道路、歩道、待避所等）のアスファルト道路上では83検体中52検体（62.7%）が陽性となり、それ以外の道路（住宅地内の道路、歩道、公園内の道路等）の18検体中5検体（27.8%）よりも陽性率が高かった（表3）。月別で比較すると、9月を除く全ての採水月で分離され、12月が83.3%、次いで6月が71.4%、5月が60.0%の順に多かった（表4）。

表1 水たまりからのレジオネラ属菌分離状況と菌数

分離培養結果	検体数	割合 (%)	陽性検体の菌数		
			菌数 (CFU/100mL)	検体数	割合 (%)
陽性	57	56.4	1,000未満	7	12.3
			1,000以上 10,000 未満	41	71.9
			10,000以上	5	8.8
			不明	4	7.0
陰性	44	43.6	—		
計	101	—	—		

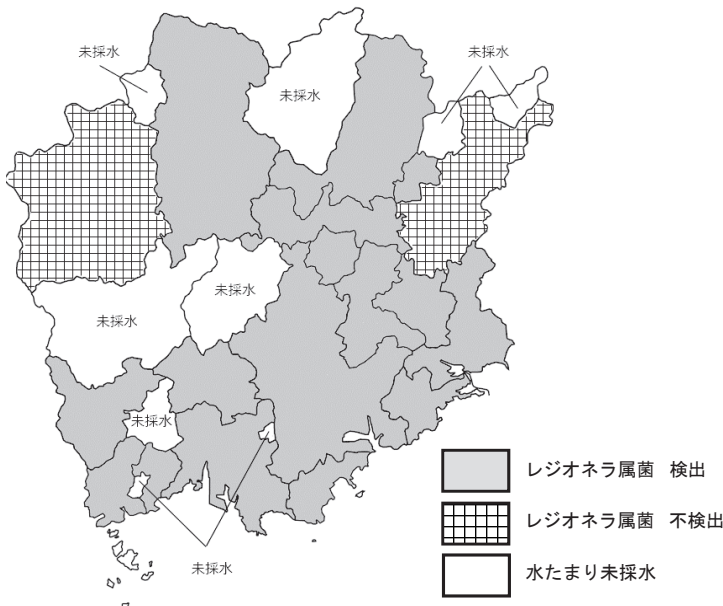


図2 水たまりからのレジオネラ属菌分離状況（市町村別）

表2 水たまりからのレジオネラ属菌分離状況（県北部、県南部）

地域	検体数	陽性数	陽性率(%)
県北部	16	9	56.3
県南部	85	48	56.5

表3 水たまりからのレジオネラ属菌分離状況（水たまり形成場所別）

水たまり形成場所の種類	検体数	陽性数	陽性率(%)
国道県道沿いあるいは付近のアスファルト道路上の水たまり 例 国道、県道 国道の側道・高架下道路・歩道・待避所	83	52	62.7
上記以外アスファルト道路上の水たまり 例 住宅地内の道路・歩道・公園内の道路	18	5	27.8

分離されたレジオネラ属菌の菌種、血清群及び株数を表5に示す。57検体から分離されたレジオネラ属菌349株のうち、Lpは296株(84.8%)、non-Lpは53株(15.2%)であった。LpのSGはSG1が91株(30.7%)と最も多く、次いでSG5が61株(20.6%)、SG3及びSG型別不能(以下「UT」という。)が各36株(12.2%)であった。また、non-Lpについても菌種の同定を行うこととし、分離された17か所から各1株ずつを選択し、検査した。結果、3株が*Legionella oakridgensis*、2株が*Legionella rubrilucens*、1株が*Legionella longbeachae*、1株が*Legionella quinlivanii*と推定されたが、残りの10株は不明であった。

3.2 地点A、B及びCで分離されたレジオネラ属菌

継続的に採水した地点A、B及びCの検査結果を表6に示す。レジオネラ属菌の分離は、地点Aでは11回中8回(72.7%)、地点Bでは9回中5回(55.6%)、地点Cでは10回中8回(80.0%)で陽性となった。地点A、B及びCでもLpが多く分離されたが、SGは各地点とも採水日毎に様々であった。最も多くのSGが分離された検体は、地点Cの1回目(C-1)で、SG1、2、3、5、7、8、9及び14(UTを除く)の8種類であった。また、同じ

SGのLpが複数分離された検体もあった。さらに、地点AのSG5、6及び7、地点BのSG1、地点CのSG1、2、3、5、8及び9のように、異なる採水日に同じSG(UTを除く)のLpが繰り返し分離された地点もあった。

3.3 SBT解析

Lpの臨床分離株11株のSBT法による遺伝子型別の結果、Lp SG1の10株は、ST44、ST120、ST291、ST550、ST609、ST701、ST1186、ST1645、ST1845及びST1846に型別された。また、Lp SG3の1株は、本県でのみ検出されているST93に型別された。

3.4 PFGE解析

3.4.1 地点A、B及びCで分離されたLp

継続的に採水した地点A、B及びCから分離されたLpについて、同一地点で分離された菌株間の関連性を解析するため、地点毎及びSG毎にPFGEパターンを比較した。デンドログラムについては、最も多種類のSGが分離された地点CのLp SG1、2、3、5、8、9及び14を図3、地点AのLp SG3、5、6及び7を図4、地点BのLp SG1及び3を図5にそれぞれ示す。

同一SGのLpについて地点毎にPFGEパターンを比較したところ、地点CのSG1については、異なる採水日の

表4 水たまりからのレジオネラ属菌分離状況(月別)

	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	計
検体数	10	28	16	16	2	16	2	6	5	101
陽性数	6	20	7	7	0	9	1	5	2	57
陽性率(%)	60.0	71.4	43.8	43.8	0.0	56.3	50.0	83.3	40.0	—

表5 水たまり分離レジオネラ属菌の種別及び血清群

菌種	血清群	株数	割合(%)
Lp			
	SG 1	91	30.7
	SG 2	13	4.4
	SG 3	36	12.2
	SG 4	6	2.0
	SG 5	61	20.6
	SG 6	9	3.0
	SG 7	7	2.4
	SG 8	9	3.0
	SG 9	18	6.1
	SG 11	7	2.4
	SG 14	3	1.0
	SG UT	36	12.2
	小計	296	—
non-Lp		53	—
計		349	—

検体から分離された複数の菌株で構成される7組のクラスターc1-I～Ⅶが形成された(図3 ①Lp SG1)。クラスターc1-I, III及びⅤには,異なる採水日の検体から分離されたにもかかわらずPFGEパターンが一致した菌株が認められた。また,異なる採水日の検体から分離された菌株が一致又は類似したPFGEパターンを示したのは5回が最も多く(クラスターc1-Ⅵ),その期間は約1年であった。その他の地点でも同様に,異なる採水日の検体から分離された菌株で構成されるクラスターが形成され,一致又は類似したPFGEパターンを示す菌株が繰り返し分離された。

次に,同一検体から分離された同一SGの複数のLpについてSG毎にPFGEパターンを比較したところ,地点Cでは検体番号C-1から分離された8株のLp SG1は,7種類のPFGEパターンに分類された(図3 ①Lp SG1)。このうち,PFGEパターンが一致したのは菌株番号2019-84及び2019-86の2株のみで,2019-84,2019-86,2019-85及び2019-10のようにPFGEパターンが類似し,同一クラスターc1-Vに分類される株も認められたが,その他の菌株間では類似度85%未満で相違した。その他の同一検体でも同様に,同一SGの水たまり分離株に多様性が認められた。

3.4.2 水たまり分離株及び臨床分離株の比較

水たまりから多く分離されたLp SG1,3及び5について,PFGEパターンを比較した。また,臨床分離株についても,水たまり分離株とPFGEパターンを比較した。Lp SG1,3,5のデンドログラムをそれぞれ図6,図7,図8に示す。

3.4.2.1 Lp SG1

Lp SG1のPFGEパターンは,水たまり分離株91株が67種類,臨床分離株10株が10種類の計77種類に分類され,11組のクラスター(1-I～XI)が形成された(図6)。

水たまり分離株に着目すると,Lp SG1は19か所(地点A,B,C,3,5,6,22,26,28,29,30,48,49,53,54,55,56,60及び69)から分離された。このうち12か所(地点C,5,6,28,29,48,49,53,54,55,56及び69)では同一検体(地点Cは同じ採水日の検体)から複数のLp SG1が分離されたが,そのPFGEパターンは一部の同一検体由来株間で一致又は類似が認められたものの,基本的には多様であった。9組のクラスター1-I～Ⅶ,Ⅸ及びⅪは複数地点の水たまり分離株で構成され,地点48の分離株1株(2020-50)と地点49の分離株2株(2020-31及び2020-33)のように,異なる地点由来であるにもかかわらずPFGEパターンが一致する水た

表6 地点A,B及びCの水たまりの検査結果(数字は分離菌株数)

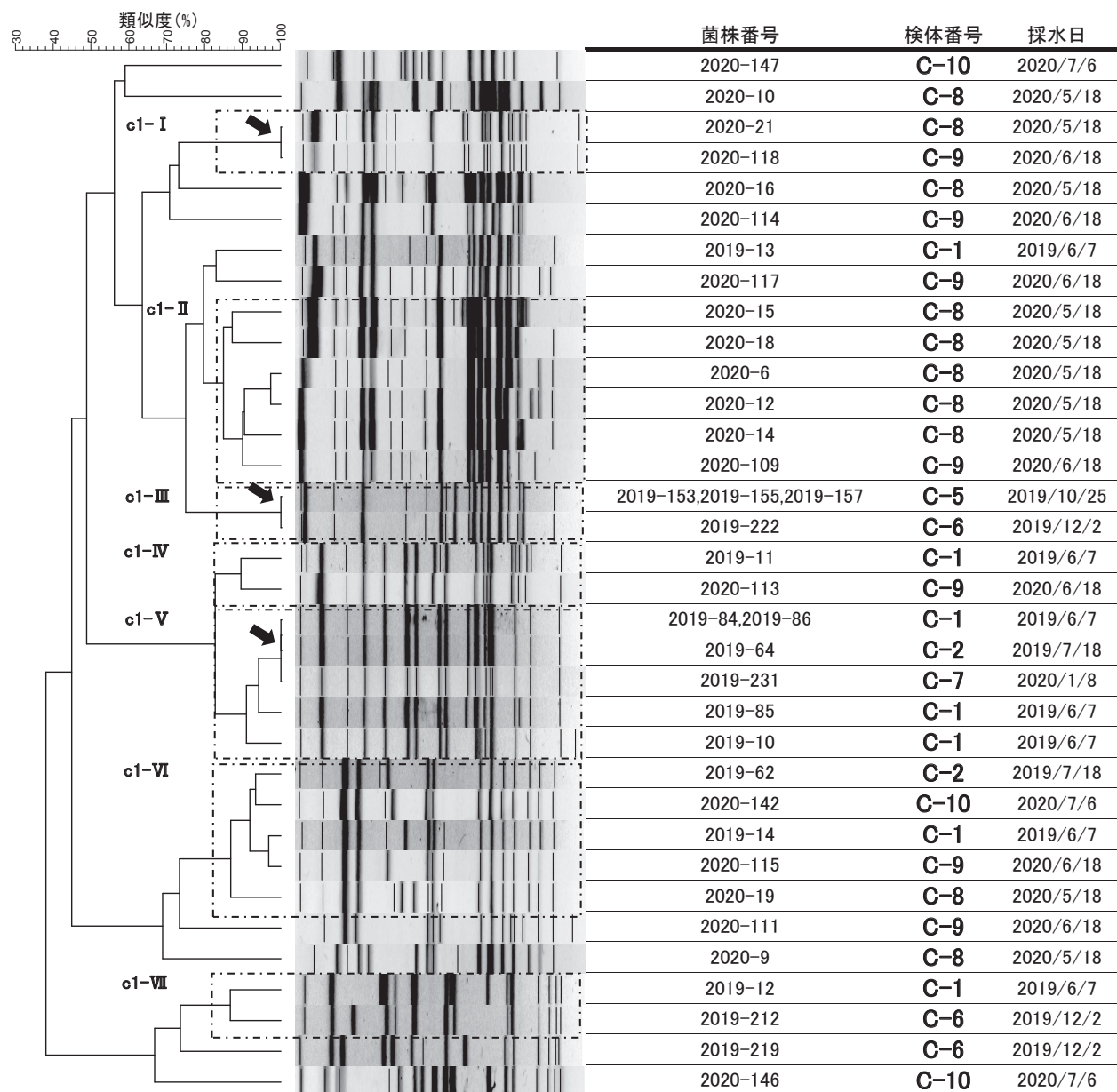
1)地点A														
検体番号	採水日	分離培養結果	Lp SG 1	Lp SG 2	Lp SG 3	Lp SG 4	Lp SG 5	Lp SG 6	Lp SG 7	Lp SG 8	Lp SG 9	Lp SG 14	Lp SG UT	non-Lp
A-1	2019/6/7	陽性											1	
A-2	2019/7/2	陰性												
A-3	2019/7/18	陽性					2				1		1	
A-4	2019/8/6	陰性												
A-5	2019/8/30	陽性											1	
A-6	2019/10/3	陽性	1	1	2		1	1					9	11
A-7	2019/11/28	陽性					3	2		1			3	1
A-8	2020/1/8	陽性					2		1				1	1
A-9	2020/5/18	陽性											1	
A-10	2020/6/18	陽性						1					1	1
A-11	2020/7/6	陰性												

2)地点B														
検体番号	採水日	分離培養結果	Lp SG 1	Lp SG 2	Lp SG 3	Lp SG 4	Lp SG 5	Lp SG 6	Lp SG 7	Lp SG 8	Lp SG 9	Lp SG 14	Lp SG UT	non-Lp
B-1	2019/7/2	陽性	1				1							
B-2	2019/8/6	陰性												
B-3	2019/8/30	陽性											1	
B-4	2019/10/3	陽性											1	1
B-5	2019/11/28	陰性												
B-6	2020/1/8	陰性												
B-7	2020/5/18	陽性	1		2					1			1	2
B-8	2020/6/18	陽性	1											
B-9	2020/7/6	陰性												

3)地点C														
検体番号	採水日	分離培養結果	Lp SG 1	Lp SG 2	Lp SG 3	Lp SG 4	Lp SG 5	Lp SG 6	Lp SG 7	Lp SG 8	Lp SG 9	Lp SG 14	Lp SG UT	non-Lp
C-1	2019/6/7	陽性	8	1	2		1		1	1	1	3	1	2
C-2	2019/7/18	陽性	2	4	1		1			1				
C-3	2019/8/6	陰性												
C-4	2019/8/30	陰性												
C-5	2019/10/25	陽性	3	1	1						1			1
C-6	2019/12/2	陽性	3		2		1				3		1	
C-7	2020/1/8	陽性	1		1	1	1							
C-8	2020/5/18	陽性	10	2	5		1				2			4
C-9	2020/6/18	陽性	7	1	2			1			3			
C-10	2020/7/6	陽性	3								2			1

地点C

①Lp SG1



②Lp SG2

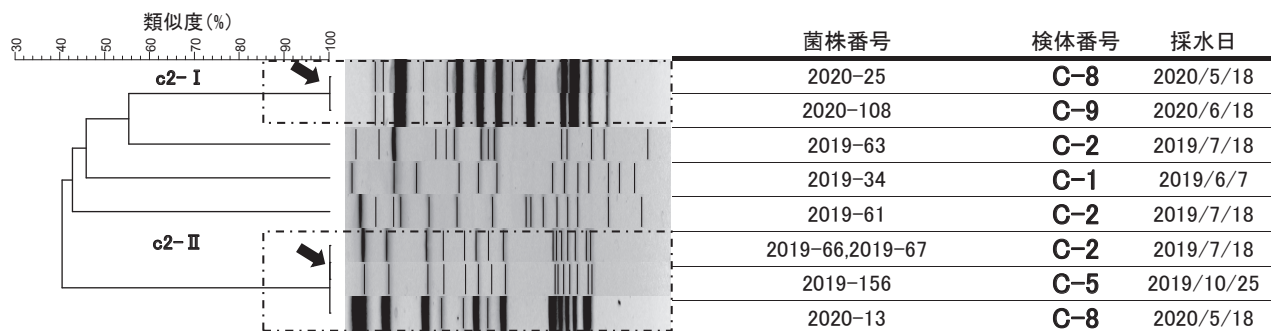


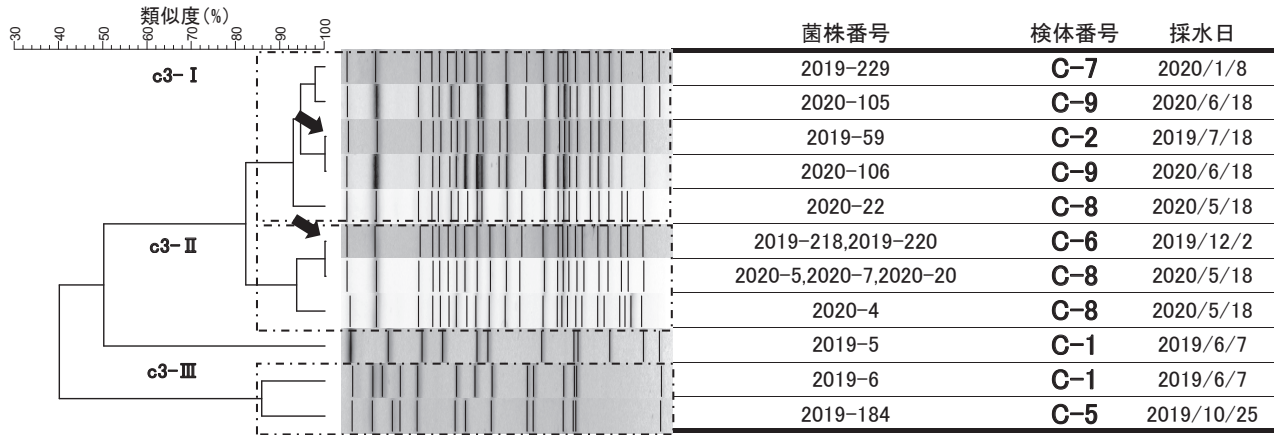
図3 地点Cの水たまり分離株 (Lp SG1, 2, 3, 5, 8, 9 及び14) のPFGE解析

* 同一検体(同一採水日)から分離された菌株で、PFGEパターンが一致したものは1つにまとめた。

* [Dashed box]: 類似度が85%以上であるクラスター

* [Arrow]: PFGEパターンが一致(類似度100%)した組み合わせ

③Lp SG3



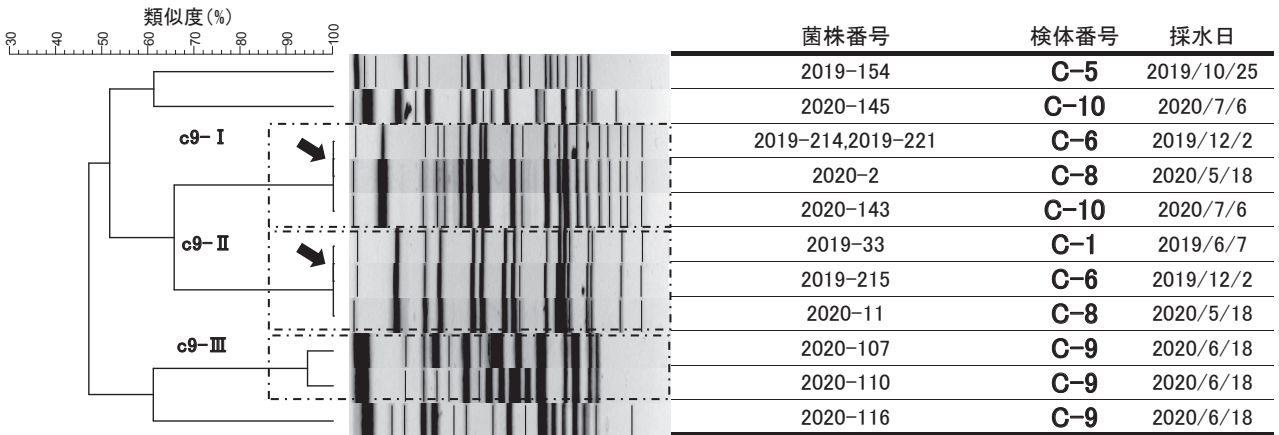
④Lp SG5



⑤Lp SG8



⑥Lp SG9



⑦Lp SG14

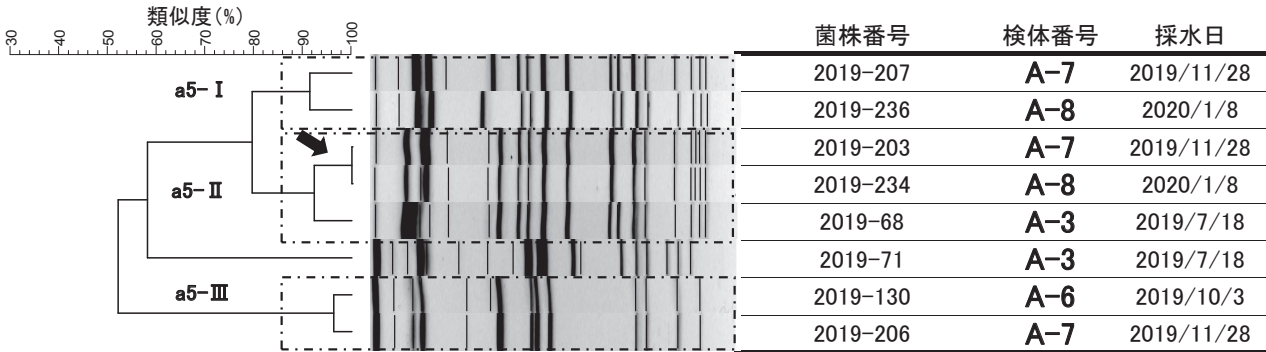


地点A

①Lp SG3



②Lp SG5



③Lp SG6



④Lp SG7



図4 地点Aの水たまり分離株 (Lp SG3, 5, 6 及び 7) のPFGE解析

- * 同一検体(同一採水日)から分離された菌株で、PFGEパターンが一致したものは1つにまとめた。
- * : 類似度が85%以上であるクラスター
- * : PFGEパターンが一致(類似度100%)した組み合わせ

地点B

①Lp SG1



②Lp SG3



図5 地点Bの水たまり分離株 (Lp SG1 及び 3) のPFGE解析

- * 同一検体(同一採水日)から分離された菌株で、PFGEパターンが一致したものは1つにまとめた。
- * : 類似度が85%以上であるクラスター
- * : PFGEパターンが一致(類似度100%)した組み合わせ

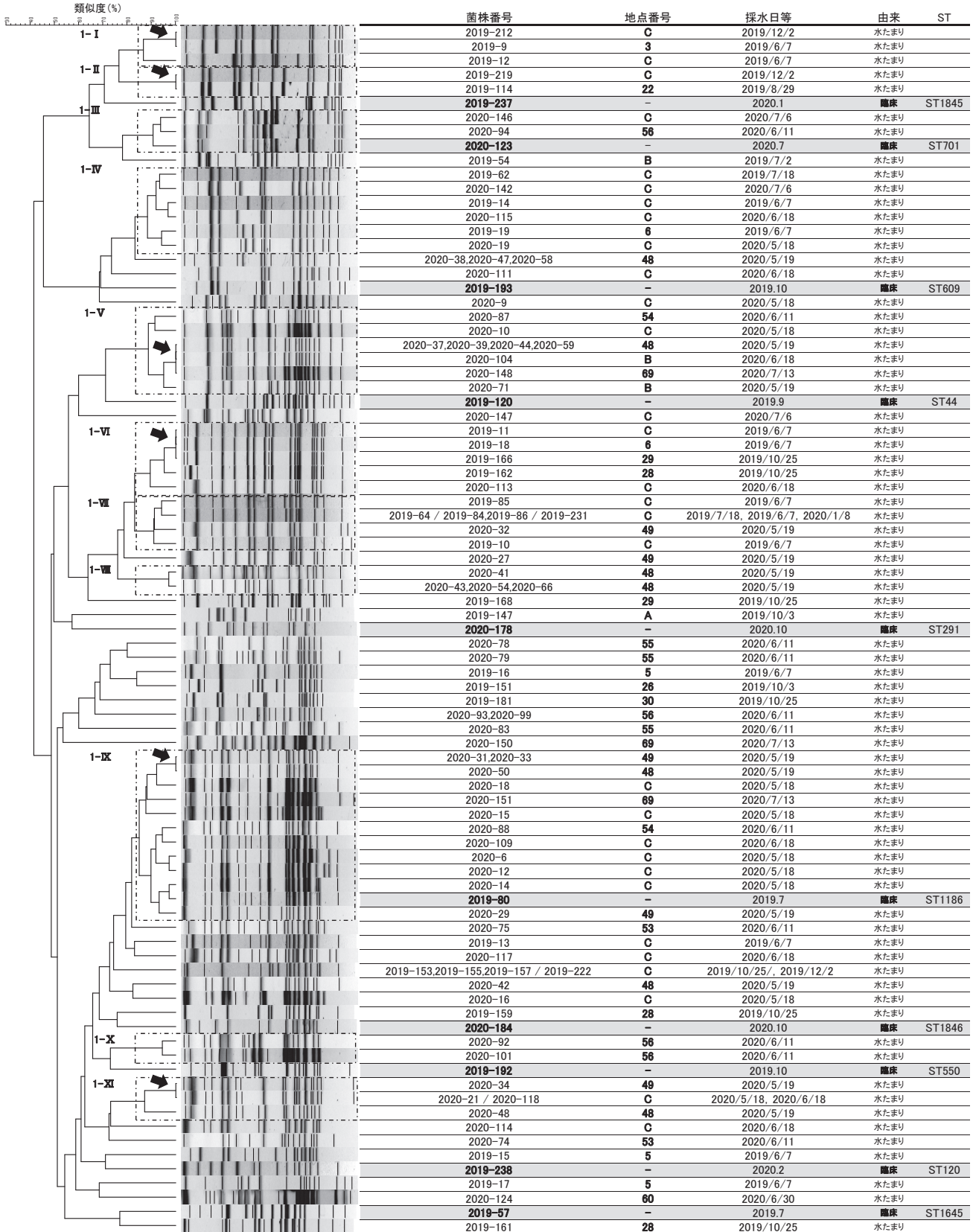


図6 水たまり及び臨床分離株 (Lp SG1) の PFGE 解析

- * 同一検体から分離された菌株で、PFGEパターンが一致したものは1つにまとめた。
- * 地点Cの水たまり分離株は、異なる採水日の検体から分離された株でPFGEパターンが一致したものは1つにまとめた。
- * [Dashed box]: 類似度が85%以上であるクラスター
- * [Arrow]: PFGEパターンが一致(類似度100%)した組み合わせ
- * 採水日等: 水たまり分離株は水たまり採水年月日、臨床分離株は分離年月あるいは診断年月を示す。

Lp SG3

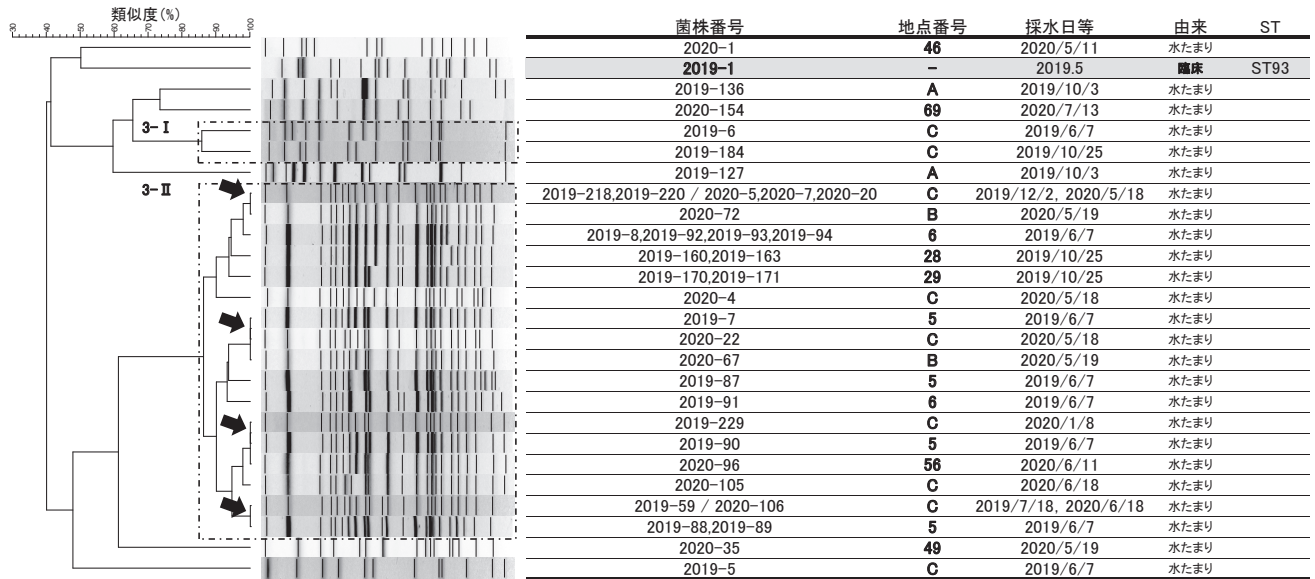


図7 水たまり及び臨床分離株 (Lp SG3) のPFGE解析

- * 同一検体から分離された菌株で、PFGEパターンが一致したものは1つにまとめた。
- * 地点Cの水たまり分離株は、異なる採水日の検体から分離された株でPFGEパターンが一致したものは1つにまとめた。
- * [] : 類似度が85%以上であるクラスター
- * [] : PFGEパターンが一致(類似度100%)した組み合わせ
- * 採水日等: 水たまり分離株は水たまり採水年月日、臨床分離株は分離年月あるいは診断年月を示す。

まり分離株が認められた。また、クラスター1-I、1-II及び1-IVは県南部同一市内の地点の水たまり分離株で構成されたが、その他のクラスターには異なる市町の水たまり分離株が含まれた。特にクラスター1-III、1-V及び1-IXには、物理的な距離のある県南部(地点B、C、48、49及び69)及び県北部(地点54及び56)の水たまり分離株が共に含まれた。

次に、臨床分離株と水たまり分離株のPFGEパターンを比較すると、両者に一致した菌株は認められなかった。しかしながら、臨床分離株2019-80及び2020-123の2株については、それぞれ複数の水たまり分離株を含むクラスターに分類された。特に、水たまり分離株12株と共にクラスター1-IXに分類された臨床分離株2019-80については、水たまり分離株2020-14と類似度95%以上で酷似していた。

3.4.2.2 Lp SG3

Lp SG3のPFGEパターンは、水たまり分離株36株が19種類、臨床分離株1株が1種類の計20種類に分類され、2組のクラスター(3-I及び3-II)が形成された(図7)。

水たまり分離株に着目すると、Lp SG3は11か所(地点A、B、C、5、6、28、29、46、49、56及び69)から分離された。このうち7か所(地点A、B、C、5、6、28及び29)では同一検体(地点A、B、及びCは同じ採

水日の検体)からそれぞれ複数のLp SG3が分離されたが、そのPFGEパターンは、Lp SG1とは異なり、地点A及びCの同一検体由来株の一部で相違する株が認められたものの、多くの同一検体の水たまり分離株間で一致又は類似していた。また、クラスター3-IIには、Lp SG1と同様に物理的な距離のある県南部(地点B、C、5、6、28及び29)及び県北部(地点56)の水たまり分離株が共に含まれた。

次に、臨床分離株と水たまり分離株のPFGEパターンを比較すると、ST93である臨床分離株2019-1と一致又は類似した水たまり分離株は認められなかった。

3.4.2.3 Lp SG5

Lp SG5のPFGEパターンは、水たまり分離株Lp SG5 61株の42種類に分類され、11組のクラスター(5-I～XI)が形成された(図8)。

Lp SG5は19か所(地点A、B、C、3、4、14、22、28、30、37、40、41、48、53、55、56、60、63及び69)の水たまりから分離された。このうち12か所(地点A、3、14、22、30、37、48、55、56、60、63及び69)では同一検体からそれぞれ複数のLp SG5が分離されたが、そのPFGEパターンは、Lp SG1と同様に、一部の同一検体由来株間で一致又は類似が認められたものの、基本的には多様であった。また、クラスター5-IVを除く10組のクラスターは、異なる市町の水たまり分離株で構成され

Lp SG5

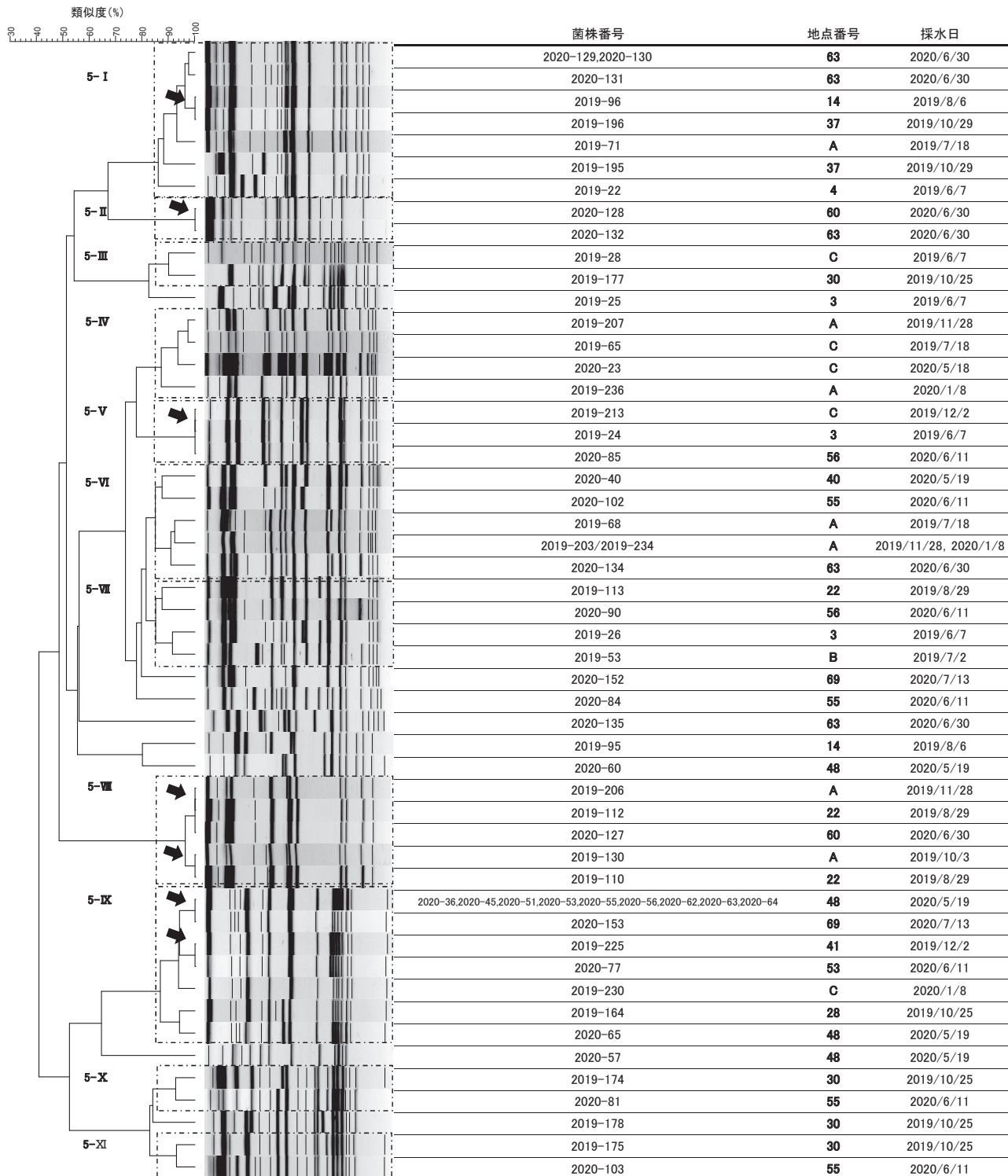


図8 水たまり分離株 (Lp SG5) のPFGE解析

- * 同一検体から分離された菌株で、PFGEパターンが一致したものは1つにまとめた。
- * 地点Aの水たまり分離株は、異なる採水日の検体から分離された株でPFGEパターンが一致したものは1つにまとめた。
- * [---] : 類似度が85%以上であるクラスター
- * [→] : PFGEパターンが一致(類似度100%)した組み合わせ

た。特にクラスター5-V, VI, VII, IX, X及びXIには、県南部（地点A, B, C, 3, 22, 28, 30, 48, 63及び69）と県北部（地点40, 41, 53, 55及び56）の水たまり分離株が共に含まれた。

4 考察

今回、県内の水たまりを対象にレジオネラ属菌の分布調査を行ったところ、レジオネラ属菌の陽性割合は56.4%であり（表1）、他県の報告の47.8%⁶⁾や52.8%⁷⁾と同程度であった。他の検体からの陽性率については、土壌17.9%¹²⁾、河川水32.9%¹³⁾、園芸用土9.8%¹⁴⁾、用水31.8%⁵⁾、浴槽水31.9%⁴⁾、ジャグジー水37.5%⁴⁾、シャワー水9.1%⁴⁾等が報告されているが、いずれも水たまりと比較して低かった。また、菌数（CFU/100 mL）については、今回の水たまりでは1,000以上10,000未満の検体が71.9%と最も多く（表1）、浴槽水やジャグジー水の報告で検体当たりの菌数の割合が最も多かった10以上100未満⁴⁾と比較して多かった。これらのことから、水たまりのレジオネラ属菌の汚染量は、検査法や調査対象地域に違いがあることを考慮する必要があるものの、他の検体と比べて高いと推測された。

水たまり調査の結果を地域別に比較すると、18市町のうち16市町の水たまりからレジオネラ属菌が分離され（図2）、県北部と県南部で陽性率に違いは認められなかった（表2）。このことから、県内の水たまりには地域差なく広域にレジオネラ属菌が存在していると考えられた。

水たまり形成場所別のレジオネラ属菌の陽性率は、交通量が比較的多い国道や県道の道路上及びその付近に形成する水たまりで高かった。この理由として、自動車のエアコンのエバポレーター¹⁵⁾やウインドウウォッシャー液¹⁶⁾（専用のウォッシャー液を除く）からレジオネラ属菌が分離された報告があることから、自動車等がレジオネラ属菌を拡散させている可能性が考えられた。

水たまりから分離されたレジオネラ属菌の菌種はLpが多く、LpのSG別ではSG1, SG5, SG3の順で多かった（表5）。同様の調査を実施した2県^{6), 7)}でも本県と同様にLpが最も多く分離されたが、SGについては本県と異なり、1県はSG1, SG8, SG5の順、他の1県はSG1, SG5, SG8の順であった。このことから、水たまり中のレジオネラ属菌の分布には若干の地域特異性があると推察された。

レジオネラ症の原因菌は、8割以上がLp SG1であるとされている^{17), 18)}。今回の調査で、水たまりから最も多

く分離されたのがLp SG1であったことから、水たまりはレジオネラ症との関連性を考慮すべき自然環境の一つと考えられた。また、水たまりから分離された*Legionella longbeachae*及び*Legionella rubrilucens*は、臨床分離例こそ少ないが、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の収集臨床分離株^{17), 18)}に挙げられる菌種である。このことから、水たまりはnon-Lpにも注意が必要な自然環境であると考えられた。

水たまりからは様々なSGのLpが分離され、そのPFGEパターンには多様性が認められた（図3～8）。このことから、水たまりには、降雨により形成される際に外部から様々なレジオネラ属菌が入り込んでいるのではないかと推察された。一方で、物理的に距離のある県南部と県北部の水たまりで一致又は類似したPFGEパターンを示す株が認められたことから、水たまりから分離されるレジオネラ属菌の中には特有の近縁株があり、県内に広域に存在すると推察された。

レジオネラ属菌の殺菌温度は60℃以上とされており¹⁹⁾、密粒舗装道路の路面温度は、約35℃の気温で約57.4℃まで上昇するため²⁰⁾、路面の乾燥も勘案すると、夏季にはレジオネラ属菌の生残は困難と考えられる。しかしながら、経時的に調査した地点A, B及びCでは、PFGEパターンが一致又は類似するLpが地点ごとに夏季を超えて繰り返し分離され（図3 ①Lp SG1他）、水たまり跡やその周辺にレジオネラ属菌が長期生残する可能性が示唆された。レジオネラ属菌は環境中ではアメーバ等に寄生するが²¹⁾、アメーバは乾燥や栄養状態の悪化などの要因により高い環境耐性を有するシストを形成する²²⁾。アメーバのシスト化が水たまり跡等でのレジオネラ属菌の生残に関与する可能性が考えられるが、これらを明らかにするためには、水たまり跡等におけるアメーバの生息状況等を含めて改めて調査する必要がある。

臨床分離株と水たまり分離株のPFGEパターンの比較の結果、両者に一致した株は認められなかった。しかしながら、Lp SG1の臨床分離株2株（2019-80及び2020-123）については、それぞれPFGEパターンが酷似又は類似した水たまり分離株が認められた。このことは、水たまりがレジオネラ症の感染源となる可能性を示唆するものである。一方、Lp SG3のST93については、臨床分離株2019-1が該当したものの、水たまり分離株との間で一致又は類似したPFGEパターンが認められなかったことから、今回の調査では水たまりとの関連性を示す結果は得られなかった。本県は他県と比べてLp SG3の分離比率が高く、自然環境中にもLp SG3が多く存在する可

能性があるため、今後対象を広げて調査を実施し、ST93の感染源究明につなげたいと考える。

今回の本県の調査で、水たまりには多様なレジオネラ属菌が含まれ、広域的に地域特異性を示す可能性があるとともに、水たまりが土壌からヒトへの感染源となり得ることが示唆された。水たまりが感染源となった場合、自動車が水たまり上を走行した際等において発生したエアロゾルにより直接感染する経路が想定されるが、現段階では推測の域を出ない。レジオネラ属菌の感染を未然に防ぐ予防方法の確立のため、日常生活で身近にある水たまりからどのような感染経路で感染が成立するのか調査を継続することとしている。

謝 辞

本調査の実施に際して、レジオネラ症臨床分離株の分与に御協力頂きました県内医療機関の先生方、そしてsequence-based typing法による解析を行っていただき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) 国立感染症研究所ホームページ：レジオネラ症の届出状況 2011年第1週～2021年第35週、
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/legionella-m/legionella-idwrs/10791-legionella-20211201.html> (2022.8.11アクセス)
- 2) 中嶋 洋, 大島律子, 河合央博, 榎原幸二, 仲 克巳：岡山県における食中毒及び感染症起因菌の疫学的解析①下痢症, 呼吸器感染症起因菌の疫学調査と検査法の検討 (平成24年度), 岡山県環境保健センター年報, 37, 93-97, 2013
- 3) 中嶋 洋, 大島律子, 河合央博, 榎原幸二, 井上 勝ら：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25年度), 岡山県環境保健センター年報, 38, 49-54, 2014
- 4) 檀上博子, 大島律子, 河合央博, 中嶋 洋, 仲 克巳：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, 岡山県環境保健センター年報, 39, 103-107, 2015
- 5) 中嶋 洋, 檀上博子, 河合央博, 大島律子：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) ②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, 岡山県環境保健センター年報, 40, 57-61, 2016

- 6) Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Keiko Kimata, Tomoko Shima, Miwako Shimizu, et al. : Close Genetic Relationship between *Legionella pneumophila* Serogroup1 Isolates from Sputum Specimens and Puddles on Roads, as Determined by Sequence-Based Typing, Applied and Environmental Microbiology, 79 (13), 3959-3966, 2013
- 7) 山口友美, 有田富和, 吉川弓林, 畠山 敬, 渡邊 節：環境中に生息するレジオネラ属菌の感染リスク調査, 宮城県保健環境センター年報, 35, 40-45, 2017
- 8) 山本啓之：PCR法による*Legionella*属細菌の検出・同定, 日本臨床, 50特別号, 394-399, 1992
- 9) Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, et al. : Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods, Molecular and Cellular Probes, 4, 175-187, 1990
- 10) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「レジオネラ症」(令和2年9月1日改訂), 30-31, 2020
- 11) 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
- 12) 伊藤直美：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, 感染症学雑誌, 57(8), 682-694, 1983
- 13) 倉 文明：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, 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 平成25年度～平成27年度 総合研究報告書, 2016
- 14) 古畑勝則, 宮本比呂志, 福山正文：市販園芸用土からのレジオネラ属菌の分離状況および分離株のアメーバ内増殖性と薬剤感受性, 環境感染, 19(2), 306-310, 2004
- 15) 坂本龍太, 大野 章：レジオネラ症の隠れた感染経路, 自動車の運転や雨天は危険因子か?, IASR, 29, 331-332, 2008
- 16) 倉 文明：公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究, 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 平成22年度～平成24年度 総合研究報告書, 2013
- 17) 前川純子, 倉 文明, 大西 真, 渡辺ユウ, 渡辺祐

- 子ら：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として, IASR, 34, 161-162, 2013
- 18) 衛生微生物技術協議会：第41回研究会レジオネラレファレンスセンター報告資料,
https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/R3_Legionnaires.pdf (2022.6.14アクセス)
- 19) 国立感染症研究所：レジオネラ症とは,
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ra/gonorrhoea/392-encyclopedia/530-legionella.html> (2022.6.14アクセス)
- 20) 国土交通省 道路局：舗装技術効果確認の各種データ 平成28年7月,
<https://www.mlit.go.jp/road/ir/ir-council/2020tokyo/pdf03/5.pdf> (2022.6.14アクセス)
- 21) レジオネラ研究者の会編著：レジオネラ属菌を知る 第3版, 2021
- 22) 八木田健司, 泉山信司：生活用水の病原アメーバ汚染とその健康影響－水系環境のアメーバ汚染, モダンメディア, 52(8), 2006