

【調査研究】

岡山県で分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 の病原性に関する研究
Pathogenicity of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated in Okayama Prefecture

梶原知博, 池田和美, 河合央博

KAJIHARA Tomohiro, IKEDA Kazumi, KAWAI Hisahiro

要 旨

県内で分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 の患者由来株 57 株及び環境由来株 180 株を対象に、病原性遺伝子 (*lvh*, *rtxA*, *dot*, *hsp* 及び *lag-1*) の保有率を調査した。また、フルオロキノロン系抗菌薬(シプロフロキサシン(CPFX), レボフロキサシン(LVFX))及びマクロライド系抗菌薬(アジスロマイシン(AZM), クラリスロマイシン(CAM), エリスロマイシン(EM))に対する薬剤感受性試験を行った。病原性遺伝子の調査では、患者由来株は環境由来株と比較して *lag-1* 及び *rtxA* の両方を保有する比率が極めて高く、これが病原性株の特徴の一つであることが示唆された。また、この特徴を有する株の比率を環境由来株の由来別に求めたところ、レジオネラ症の主な感染源とされる浴槽水や冷却塔よりも水たまりの方が高く、病原性株が自然環境中に広く分布することを示唆する結果であった。薬剤感受性試験では、患者由来株に耐性傾向を示す株は認められなかったが、環境由来株の一部に AZM 及び EM に対して耐性傾向を示す株が認められた。その理由は不明であり、今後さらなる調査によって解明すべき課題と考える。

[キーワード：レジオネラ症, *Legionella pneumophila*, 病原性遺伝子, 薬剤耐性][Key words : Legionellosis, *Legionella pneumophila*, Pathogenic Genes, Antimicrobial Resistance]

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呼吸器感染症であり、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では四類感染症に分類されている。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呼吸困難や意識障害等の重篤な症状となり、命にかかわることもある¹⁾。

レジオネラ属菌のヒトへの感染経路は、汚染されたエアロゾルの吸入による空気感染である。肺に到達したレジオネラ属菌は、宿主細胞である肺胞マクロファージに寄生して増殖し、最終的に肺炎を引き起こすとされている^{2), 3)}。これまでに、宿主細胞への侵入、寄生、増殖などに関与する多くの病原性遺伝子が報告されているが^{4)~7)}、重症化への関与については十分に解明されていない。そこで本研究では、レジオネラ症の起原菌で最も多い Lp 血清群 1 (以下「SG1」という。)を対象に、当県で分離収集した菌株(患者由来株及び環境由来株)について、病原性遺伝子の保有状況を調査し、疫学情報と合わせて解析した。

また、レジオネラ症の治療には、フルオロキノロン系及びマクロライド系抗菌薬が有効とされ、国内外で広く使用されている^{8), 9)}。しかし、近年多くの感染症におい

て薬剤耐性菌の出現が世界的な課題となっており、レジオネラ属菌についても耐性菌の出現が治療効果に影響を及ぼすことが懸念される。一方で、これらの抗菌薬に対するレジオネラ属菌の耐性機序は十分に解明されておらず、その有効性を推定するための臨床ブレイクポイントも未だ設定されていない。そこで本研究では、県内で分離された Lp SG1 株を対象に薬剤感受性試験を実施し、耐性を獲得した菌株の監視に利用される疫学的カットオフ値^{10), 11)} (以下「ECOFF 値」という。)を参考値として用い、その感受性を評価した。

2. 材料及び方法

2.1 調査対象菌株

2003 年から 2024 年の間に県内のレジオネラ症患者から分離された Lp SG1 57 株及び 2005 年から 2024 年の間に県内の環境(水たまり, 浴槽水及び冷却塔)から分離された Lp SG1 180 株の合計 237 株を調査対象とした。その内訳を表 1 に示す。

2.2 患者情報

患者症状等疫学情報は、感染症サーベイランスシステム(NESID)から収集、又は保健所から提供を受けた。

表1 由来別菌株数

由来	株数
患者由来株	57
水たまり	88
環境由来株	82
浴槽水	
冷却塔	10
計	237

2.3 方法

2.3.1 病原性遺伝子の検出

病原性遺伝子は、感染初期の侵入・定着に関与する *lvh*、細胞接着及び細胞毒性に関与する *rtxA*、細胞内での生存・増殖に必須な分泌装置(Dot / Icm系)を構成する *dot* 及び細胞接着に関与する *hsp* を対象に、Tachibana らの方法¹²⁾に準拠したPCR法により検出した。加えて、Lp SG1の病原性との関連が指摘されている *lag-1* を対象に、Kozak らの方法¹³⁾に準拠したPCR法により検出した。

2.3.2 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、日本化学療法学会標準法¹⁴⁾、猿渡らの方法¹⁵⁾、¹⁶⁾及び杉浦らの方法¹⁷⁾を参考にした微量液体希釈法により行い、最小発育阻止濃度(以下「MIC」という。)を測定した。また、Bruin らが示すLp SG1における各薬剤のECOFF値¹⁸⁾を参考に感受性を評価した。

2.3.2.1 対象薬剤及び薬剤原液の調製方法

対象薬剤は、フルオロキノロン系抗菌薬(シプロフロキサシン(CPFX)及びレボフロキサシン(LVFX))及びマクロライド系抗菌薬(アジスロマイシン(AZM)、クラリスロマイシン(CAM)及びエリスロマイシン(EM))の5薬剤とした。CPFX、LVFX及びAZMはLKT Laboratories社製、CAMは富士フィルム和光純薬社製、EMはSigma-Aldrich社製を用いた。いずれの薬剤も力価または純度が明らかなものを用い、純度または力価に基づき補正を行った。CPFX及びLVFXは滅菌精製水で1,280 µg / mL(薬剤濃度は活性本体の値を表記、以下同じ)、AZM、CAM及びEMはエタノールで3,200 µg / mLの薬剤原液を用時調製した。

2.3.2.2 測定方法

対象菌株は、猿渡らの方法¹⁶⁾により自家調製したBuffered starch yeast extract *a* (以下「BSYE *a*」という。)寒天平板培地上にて35°C、3日間培養後、滅菌生理食塩液に懸濁してマクファーランド濁度0.5に調整した。さらに滅菌生理食塩液で10倍に希釈し、接種用菌

液(約10⁷ CFU/mL)を調製した。感受性測定培地にはBSYE *a*液体培地(自家調製)を用いた。各薬剤の薬剤原液をBSYE *a*液体培地で希釈して2 µg / mLの溶液を調製後、これを2倍段階希釈することにより、2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.032, 0.016, 0.008, 0.004及び0.002 µg / mLの2倍系列溶液を作成した。接種用菌液5 µLを96穴マイクロプレートの各ウエルに分注した各薬剤含有BSYE *a*液体培地100 µLに接種し、35°Cで3日間培養した。培養後、対照に用いた薬剤不含有培地での菌の発育を確認し、肉眼的に菌の発育が認められなかったウエルの中で最小の薬剤濃度をMICとした。なお、2.0 µg / mLでも発育が認められた菌株については、新たに薬剤の最高濃度を8 µg / mLとする2倍系列溶液を作成し、同様にMICを測定した。また、測定の都度、Lp SG1 ATCC 33152株、*Escherichia coli* ATCC 25922株及び*Staphylococcus aureus* ATCC 29313株を用いて精度管理を行い、各試験間のMICが±1管以内であることを確認した。なお、*E. coli* ATCC 25922株及び*S. aureus* ATCC 29313株による精度管理は、感受性測定培地としてミューラーヒントン液体培地を用いた。

3. 結果及び考察

各病原性遺伝子の保有率は、患者由来株57株では、*rtxA*、*dot*及び*hsp*はいずれも100%、*lag-1*は89.5%、*lvh*は40.4%であった(図1)。一方、環境由来株180株では、*dot*及び*hsp*は97.8%、*lvh*及び*lag-1*は40.0%、*rtxA*は33.9%であった。患者由来株と環境由来株を比較すると、*dot*、*hsp*及び*lvh*の保有率は両者で大きな差は認められなかったが、*lag-1*及び*rtxA*の保有率は患者由来株が明らかに高かった。そこで、*lag-1*及び*rtxA*について、両方を保有する株の比率を求めたところ、患者由来株では89.5%、環境由来株では12.8%であり、両者の保有率には大きな差が認められた(図2)。このことは、*lag-1*及び*rtxA*の両方を保有することが病原性株の特徴の一つであることを示唆している。次に、*lag-1*及び*rtxA*の両方を保有する株の比率が低かった環境由来株について、由来別にその比率を求めたところ、水たまりは18.2%(16/88株)、浴槽水は8.5%(7/82株)、冷却塔は0.0%(0/10株)であった。人工環境である浴槽水や冷却塔はレジオネラ症の主な感染源とされるが、これらの由来株は、病原性株の特徴の一つと考えられる*lag-1*及び*rtxA*の両方を保有する株の比率が低く、むしろ自然環境である水たまり由来株が高かった。このことは、病原性株が自然環境中に広く分布することを示

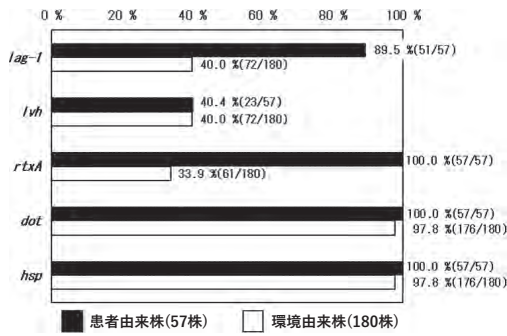


図1 病原性遺伝子の保有率の比較(患者由来株・環境由来株)

峻している。

次に、患者由来株及び環境由来株の5薬剤に対する薬剤感受性試験結果(MIC分布)を図3に示す。患者由来株におけるフルオロキノロン系抗菌薬のMIC分布はCPFXが0.008 - 0.063 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LVFXが0.004 - 0.032 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であり、マクロライド系抗菌薬のMIC分布はAZMが0.063 - 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CAMが0.008 - 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EMが0.063 - 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であった。一方、環境由来株におけるフルオロキノロン系抗菌薬の

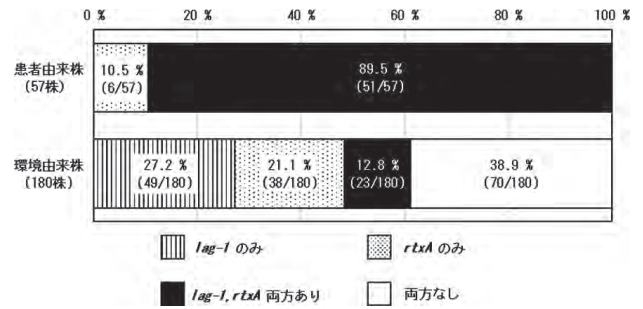


図2 lag-1, rtxAの保有パターン(患者由来株・環境由来株)

MIC分布はCPFXが0.004 - 0.032 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LVFXが0.002 - 0.032 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で患者由来株と同様であったが、マクロライド系抗菌薬のMIC分布はAZMが0.063 - 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CAMが0.008 - 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EMが0.032 - 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であり、患者由来株よりも高いMICを示す株が認められた。これらの結果をBruinらの報告¹⁸⁾したECOFF値(CPFX: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LVFX: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AZM: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CAM: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EM: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と照らし合わせたところ、患者由来株で

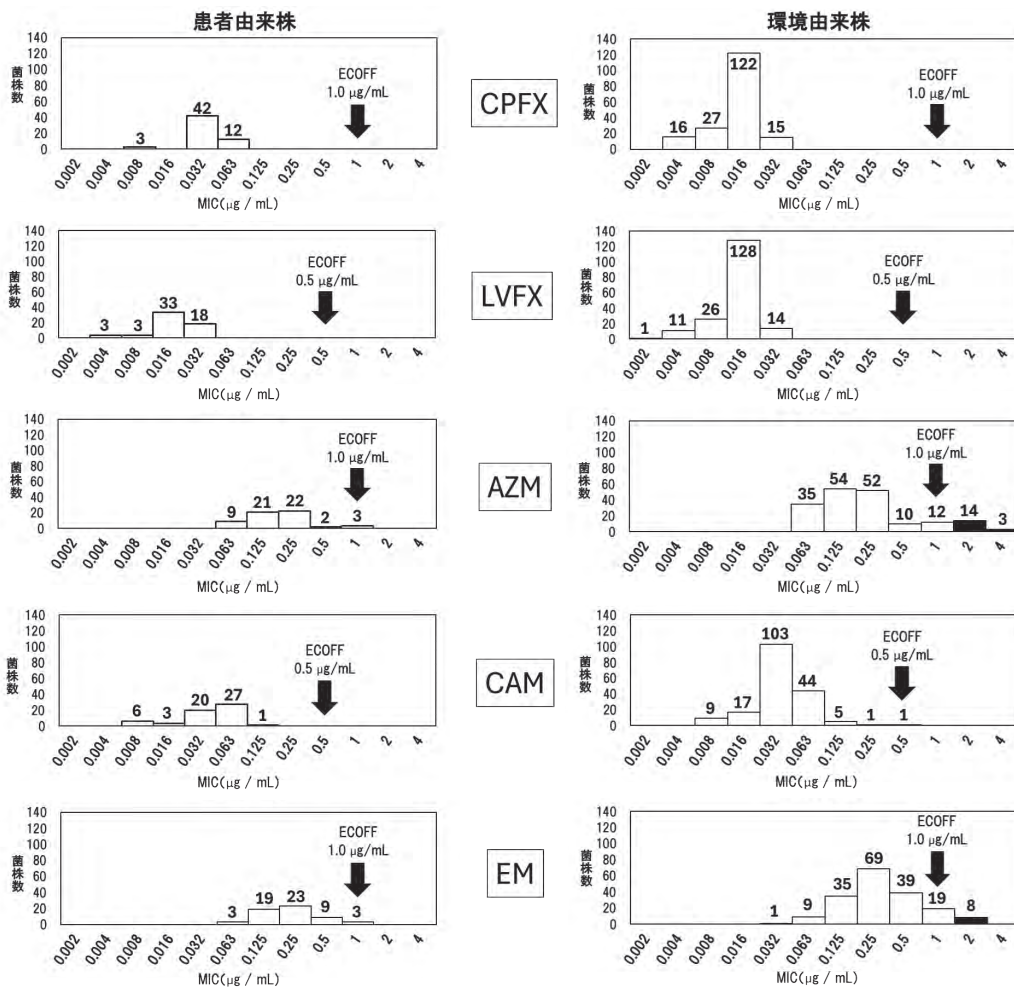


図3 薬剤感受性試験結果(左:患者由来株・右:環境由来株)

※黒は ECOFF 値を超える低感受性株を示す

は全ての薬剤においてMICがECOFF値を下回っており、耐性傾向は認められなかった。一方、環境由来株ではAZM及びEMでECOFF値を上回る株が認められた。特にAZMでは、0.125 - 0.25 µg / mLと2 µg / mLをピークとする二峰性を示し、ECOFF値(1.0 µg / mL)はその間に位置していた。このピーク分布は、2 µg / mL以上のMICを示した菌株が耐性を獲得していることを強く示唆するものであると同時に、参考値としたECOFF値が、耐性を獲得したレジオネラ菌株の監視に有効であることを裏付けるものであった。また、EMのMIC分布は明確な二峰性を示さなかったが、ECOFF値(1.0 µg / mL)を超えた8株は耐性を獲得している可能性があると考えられる。今回の調査では、より薬剤にさらされる可能性の高い患者由来株には耐性傾向を示す株が認められなかったが、その理由は不明であり、更なる調査によって解明すべき課題と考える。

今回我々は、レジオネラ病原性株における特徴的な保有遺伝子の組み合わせや、環境中に潜在する菌株の病原性及び薬剤感受性の実態の一端を明らかにした。今後もこれらの知見を蓄積し、感染症対策の基礎資料として役立てていきたい。

謝 辞

本研究のため貴重な菌株を分与して下さいました県内医療機関及び民間検査施設の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省：レジオネラ症 Q&A, https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_00393.html (2025.6.26 アクセス)
- 2) 永井宏樹：レジオネラと宿主真核細胞の相互作用, 日本細菌学雑誌, 69(3), 503-511, 2014
- 3) 神田暁郎, 吉田元樹, 浅田成紀, 中山謙二, 秋保直樹：レジオネラ肺炎 16 例の臨床的検討, 仙台市立病院医誌, 33, 3-6, 2013
- 4) Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo JD : *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence, Infect. Immun., 69(1), 508-517, 2001
- 5) Segal G, Russo JJ, Shuman HA : Relationships between a new type IV secretion system and the *icm/dot* virulence system of *Legionella pneumophila*, Mol. Microbiol., 34(4), 799-809, 1999
- 6) Berger KH, Isberg RR : Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*, Mol. Microbiol., 7(1), 7-19, 1993
- 7) Cianciotto NP : Pathogenicity of *Legionella pneumophila*, Int. J. Med. Microbiol., 291(5), 331-343, 2001
- 8) 日本呼吸器学会成人肺炎診療ガイドライン 2017 作成委員会, 成人肺炎診療ガイドライン 2017, 2017
- 9) Lim WS, Woodhead M, British Thoracic Society : British Thoracic Society adult community acquired pneumonia audit 2009/10, Thorax., 66(6), 548-9, 2011
- 10) Kahlmeter G, Turnidge J : Wild-type distributions of minimum inhibitory concentrations and epidemiological cut-off values—laboratory and clinical utility, Clin. Microbiol. Rev., 36(4), 2023
- 11) EUCAST : MIC and Zone diameter distributions for pathogens and agents relevant to the veterinary field, <https://www.eucast.org/ast-of-veterinary-pathogens/ecoffs-and-distributions> (2025.6.26 アクセス)
- 12) Tachibana M, Nakamoto M, Kimura Y, Shimizu T, Watarai M : Characterization of *Legionella pneumophila* isolated from environmental water and ashiyu foot spa, Biomed. Res. Int., 2013 : 514395, 2013
- 13) Kozak NA, Benson R.F, Brown E, Alexander NT, Taylor TH 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., 47(8), 2525-2535, 2009
- 14) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会 : 微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法) - 日本化学療法学会標準法 -, 日本化学療法学会雑誌, 38, 103-105, 1990
- 15) 猿渡克比孔 : レジオネラの薬剤感受性測定法, 臨床と微生物, 25, 25-28, 1998
- 16) 猿渡克比孔, 伊藤直美, 長沢正夫, 中里博子, 古賀宏延ら : *Legionella* に対する新しい薬剤感受性用培地 (B-SYE 寒天培地) について, 日本化学療法学会雑誌, 32, 718-723, 1984

- 17) 杉浦洋子, 山田博司, 高畑正裕, 南新三郎, 舘田一博ら: Tosufloxacin の *in vitro* 抗 *legionella pneumophila* 活性およびモルモット実験的肺炎に対する治療効果, 日本化学療法学会雑誌, 50(4), 203-208, 2002
- 18) Bruin JP, Ijzerman EP, den Boer JW, Mouton JW, Diederens BM: Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 72(1), 103-8, 2012