

【調査研究】

感染症起因菌の疫学調査（平成28年度～平成30年度）
岡山県内のレジオネラの疫学調査について

Epidemiological investigation of pathogenic bacteria (2016～2018)

Epidemiological study of *Legionella* in Okayama prefecture

狩屋英明, 河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋 (細菌科)

KARIYA Hideaki, KAWAI Hisahiro, MORIMOTO Koji, NAKA Atsushi, NAKAJIMA Hiroshi
(Bacteriology section)

要 旨

平成29年度～平成30年度に県内で発生したレジオネラ症患者から分離されたレジオネラ属菌7株及び平成28年度～平成30年度に県内公衆浴場の浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌115株について、PCR法により菌種を同定した。また、*Legionella pneumophila*と同定された株については、血清群別試験を実施した。その結果、患者由来株は血清群1が6株及び血清群3が1株であった。浴槽水由来株は、3年間を通じて血清群6, 3, 1の順に多く、平成27年度の当センターの調査と比較して血清群6が多かった。血清群1の24株及び血清群3の8株について、sequence-based typing法による遺伝子型別を実施したところ、同一施設で同一の遺伝子型（sequence type, 以下「ST」という。）を示す分離株が年を隔てて確認された事例、分離年は異なるものの患者由来株と浴槽水由来株が同一のSTを示す事例が見られた。また、平成30年7月に発生した西日本における豪雨の直後に県南部地域で発症した患者2名から同一のSTを示す株が分離された事例があったが、感染源は特定できなかった。さらに、今回の調査では、患者及び浴槽水から複数の新規STを示す株が分離された。

[キーワード：レジオネラ, 血清群, 遺伝子型, 疫学調査]

[Keywords: *Legionella*, Serogroup, Sequence type, epidemiological investigation]

1 はじめに

レジオネラ症は *Legionella pneumophila* (以下「*L.p*」という。)を代表とするレジオネラ属菌による細菌感染症であるが、時に生命にかかわる重篤な肺炎を引き起こすことがあり、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における四類感染症に位置づけられる。日本全国において、レジオネラ症は毎年多くの患者が報告されており（平成28年1602件、平成29年1733件、平成30年2130件）、時に集団感染も発生している。岡山県内においても、全国と同様に毎年レジオネラ症が発生しており、近年の患者届出数は平成28年が26件、平成29年が30件であったが、平成30年は83件に急増した。レジオネラ属菌は土壌や水環境の常在菌であるが、エアロゾルを発生させる人工環境が感染機会を増やすとされている¹⁾。レジオネラ症の事例が発生した場合、感染拡大防止対策には分離株の分子解析等による感染源の究明が重要である。しかしながら、一般にレジオネラ症は、尿中抗原又は遺伝子検出によって診断するため、医療機関等から分離株を得ることは困難である。今回我々は、レジオネラ属菌

を分離している県内1医療機関から患者由来株を入手し、保健所で分離された浴槽水等の由来株と併せて分子解析等を実施した。その結果、若干の知見を得たので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

県内の1医療機関から分与されたレジオネラ症患者に由来するレジオネラ属菌7株（平成29年度3株及び平成30年度4株）、また保健所から分与された公衆浴場の原水、浴槽水及びジャグジー並びに建築物における衛生的環境の確保に関する法律に規定する特定建築物の冷却塔水にそれぞれ由来するレジオネラ属菌115株（平成28年度62株、平成29年度30株及び平成30年度23株）の合計122株を解析の対象とした。

なお、分離については、医療機関、保健所ともに定法²⁾に従ってBCYE α 培地 (buffered charcoal-yeast extract agar with 0.1 % α -ketoglutarate) 等を用いて実施し、分離株がレジオネラ属菌であることは、血液寒天培地に発育しないこと、また斜光法における特徴的な外観構造

を有することで確認した。

2.2 PCR法による菌種の同定

全ての分離株について、5S rRNA遺伝子を標的としたレジオネラ属菌を特異的に検出するPCR法を実施した。また、陽性を示した株については、*mip*遺伝子を標的とした*L.p*を特異的に検出するPCR法を実施した。

2.3 血清群別試験

*L.p*と同定された分離株について、レジオネラ免疫血清（デンカ生研）を用い、血清群別試験を実施した。

2.4 分子解析

血清群1の24株及び血清群3の8株については、

sequence-based typing（以下「SBT」という。）法による遺伝子型別を国立感染症研究所に依頼し、遺伝子型（sequence type, 以下「ST」という。）を決定した。

また、血清群1の分離株については、Kozakらの方法³⁾により、病原性との関連が指摘されている*lag-1*遺伝子を標的としたPCR法を実施した。

3 結果

3.1 分離株の菌種及び血清群

平成28～30年度の分離株について、検体の種類、検体数、菌株数、菌種及び血清群を表1（平成28年度）、表2（平

表1 平成28年度に分離されたレジオネラ属菌

| 検体の種類 | 施設数 | 検体数 | 分離株数 | 菌種及び血清群 |
|-------|-----|-----|------|---|
| 浴槽水 | 32 | 46 | 53 | <i>L.p</i> SG1(9), SG2(1), SG3(13), SG5(5), SG6(16), SG9(3), SG10(3), UT(2) 他のレジオネラ属菌(1) |
| ジャグジー | 4 | 6 | 6 | <i>L.p</i> SG1(1), SG6(3) 他のレジオネラ属菌(2) |
| 冷却塔水 | 1 | 2 | 3 | <i>L.p</i> SG1(2), SG3(1) |
| 計 | 37 | 54 | 62 | |

SG：血清群， UT：血清群別不能，（）：株数， *L.p*： *L. pneumophila*

表2 平成29年度に分離されたレジオネラ属菌

| 検体の種類 | 施設数 | 検体数 | 分離株数 | 菌種及び血清群 |
|-------|-----|-----|------|---|
| 浴槽水 | 16 | 20 | 26 | <i>L.p</i> SG1(3), SG3(6), SG4(1), SG5(5), SG6(1), SG7(1), SG8(2), SG9(1), SG10(1), UT(5) |
| 原水 | 2 | 2 | 2 | <i>L.p</i> SG 5(1), UT(1) |
| ジャグジー | 1 | 1 | 1 | <i>L.p</i> SG1(1) |
| 冷却塔水 | 1 | 1 | 1 | <i>L.p</i> SG6(1) |
| 患者 | | 3 | 3 | <i>L.p</i> SG1(2), SG3(1) |
| 計 | 20 | 27 | 33 | |

SG：血清群， UT：血清群別不能，（）：株数， *L.p*： *L. pneumophila*

表3 平成30年度に分離されたレジオネラ属菌

| 検体の種類 | 施設数 | 検体数 | 分離株数 | 菌種及び血清群 |
|-------|-----|-----|------|---|
| 浴槽水 | 12 | 16 | 18 | <i>L.p</i> SG1(2), SG3(1), SG4(1), SG5(1), SG6(8), SG10(1), UT(3) 他のレジオネラ属菌(1) |
| ジャグジー | 3 | 5 | 5 | <i>L.p</i> SG1(2), SG6(1), SG10(1), UT(1) |
| 患者 | | 4 | 4 | <i>L.p</i> SG1(4) |
| 計 | 15 | 25 | 27 | |

SG：血清群， UT：血清群別不能，（）：株数， *L.p*： *L. pneumophila*

成29年度), 表3(平成30年度)及び表4(平成28~平成30年度)に示す。なお, 同一検体から同一血清群の株が複数分離された場合は, 株数を1として集計した。

*L.p.*の血清群別試験の結果, 患者由来の7株(平成29年度3株,平成30年度4株)については, 平成29年度の1株は血清群3であったが, それ以外は全て血清群1であった。浴槽水由来株を年度別にみると, 平成28年度は血清群6(16株), 3(13株), 1(9株), 平成29年度は血清群3(6株), 5(5株), 1(3株), 平成30年度は血清群6(8株), 1(2株), 3(1株; 血清群4, 5及び10も1株)の順に多かった。3年間を通じて見ると, 浴槽水由来株については, 血清群6(25株), 3(20株), 1(14株)の順に多かった。ジャグジー由来株については, 血清群1(4株)及び6(4株)が多かった。また,

冷却塔水由来株については, 血清群1(2株), 3(1株)及び6(1株)であった。

3.2 分子解析の結果

*L.p.*血清群1の分離株のSBT法の結果及び*lag-1*遺伝子の検出結果を表5に, 血清群3のSBT法の結果を表6にそれぞれ示す。

SBT法では, 同一施設のジャグジーで年を隔てて同一のST(ST286)を示す事例(表5 分離株No.2016-26及びNo.2018-8), 分離年は異なるが, 浴槽水由来株(表5 分離株No.2016-22)と患者由来株(表5 分離株No.2017-1)が同一のST(ST1077)を示す事例が見られた。また, 施設は異なるが浴槽水から同一のSTを示す株が分離された事例も複数見られた(表5 分離株No.2016-41及び2018-

表4 平成28年度~平成30年度に分離されたレジオネラ属菌

| 検体の種類 | 施設数 | 検体数 | 分離株数 | 菌種及び血清群 |
|-------|-----|-----|------|---|
| 浴槽水 | 60 | 82 | 97 | <i>L.p.</i> SG1(14), SG2(1), SG3(20), SG4(2), SG5(11), SG6(25), SG7(1), SG8(2), SG9(4), SG10(5), UT(10) 他のレジオネラ属菌(2) |
| 原水 | 2 | 2 | 2 | <i>L.p.</i> SG 5(1), UT(1) |
| ジャグジー | 8 | 12 | 12 | <i>L.p.</i> SG1(4), SG6(4), SG10(1), UT(1) 他のレジオネラ属菌(2) |
| 冷却塔水 | 2 | 3 | 4 | <i>L.p.</i> SG1(2), SG3(1), SG6(1) |
| 患者 | | 7 | 7 | <i>L.p.</i> SG1(6), SG3(1) |
| 計 | 72 | 106 | 122 | |

SG: 血清群, UT: 血清群別不能, (): 株数, *L.p.*: *L. pneumophila*

表5 *L.p.*血清群1のST及び*lag-1*遺伝子の有無

| 分離株No. | 採水又は届出月 | 検体種別 | ST | ST比較 | <i>lag-1</i> | 備考 |
|---------|---------|-----------|------|------------|--------------|-----------------|
| 2016-16 | 2016.6 | 浴槽水 公衆浴場 | 2340 | | + | |
| 2016-22 | 2016.6 | 浴槽水 公衆浴場 | 1077 | 2017-1と同じ | + | |
| 2016-24 | 2016.7 | 浴槽水 公衆浴場 | 2341 | | - | |
| 2016-26 | 2016.7 | ジャグジー プール | 286 | 2018-8と同じ | - | 施設は同じジャグジー |
| 2016-30 | 2016.7 | 浴槽水 公衆浴場 | 129 | | - | |
| 2016-34 | 2016.7 | 冷却塔水 冷却塔 | 154 | | - | |
| 2016-35 | 2016.8 | 浴槽水 公衆浴場 | 687 | | + | |
| 2016-41 | 2016.9 | 浴槽水 公衆浴場 | 305 | 2018-36と同じ | - | 施設は異なる |
| 2016-42 | 2016.8 | 浴槽水 公衆浴場 | 2342 | | - | |
| 2016-61 | 2016.12 | 浴槽水 公衆浴場 | 150 | | - | |
| 2016-68 | 2017.1 | 浴槽水 公衆浴場 | 115 | | + | |
| 2017-1 | 2017.5 | 患者 喀痰 | 1077 | 2016-22と同じ | + | |
| 2017-3 | 2017.5 | ジャグジー プール | 976 | | - | |
| 2017-7 | 2017.6 | 浴槽水 公衆浴場 | 2477 | 新規遺伝子型 | - | |
| 2017-13 | 2017.8 | 患者 喀痰 | 22 | 新規遺伝子型 | - | 国内臨床株として新規 |
| 2017-14 | 2017.8 | 浴槽水 旅館業浴場 | 260 | | - | |
| 2017-25 | 2017.10 | 浴槽水 公衆浴場 | 1857 | | - | |
| 2018-2 | 2018.6 | 患者 喀痰 | 300 | 国内3例目 | + | |
| 2018-8 | 2018.7 | ジャグジー プール | 286 | 2016-26と同じ | - | |
| 2018-9 | 2018.7 | 患者 喀痰 | 2655 | 新規遺伝子型 | + | 県南 |
| 2018-10 | 2018.7 | 患者 喀痰 | 2655 | 新規遺伝子型 | + | 県南 |
| 2018-26 | 2018.9 | 患者 気管内分泌物 | 739 | 国内臨床由来株 | - | 6例目 |
| 2018-29 | 2018.10 | 浴槽水 公衆浴場 | 1 | | - | |
| 2018-36 | 2018.11 | 浴槽水 旅館業浴場 | 305 | 2016-41と同じ | - | 施設は異なる 国内固有遺伝子型 |

注) 分離株No. 2016-26及び2018-8は同じ施設由来。その他は異なる施設由来。

表6 *L. p*血清群3のST

| 分離株No. | 採水又は届出月 | 検体種別 | | ST | ST比較 | 備考 |
|---------|---------|------|--------|------|------------|----|
| 2016-51 | 2016.10 | 浴槽水 | 公衆浴場 | 2343 | 2017-27と同じ | |
| 2017-6 | 2017.6 | 浴槽水 | 公衆浴場 | 2476 | 新規遺伝子型 | |
| 2017-16 | 2017.8 | 浴槽水 | 旅館業浴場 | 2495 | 新規遺伝子型 | |
| 2017-24 | 2017.9 | 患者 | 喀痰 | 93 | 岡山県10例目 | |
| 2017-27 | 2017.10 | 浴槽水 | 旅館業浴場 | 2343 | 2016-51と同じ | |
| 2017-32 | 2017.10 | 浴槽水 | 旅館業浴場 | 1613 | 2018-11と同じ | |
| 2017-34 | 2017.10 | 浴槽水 | ゴルフ場浴場 | 1610 | | |
| 2018-11 | 2018.7 | 浴槽水 | 公衆浴場 | 1613 | 2017-32と同じ | |

注 分離株の由来施設は全て異なる

36 : ST305, 表6 分離株No.2016-51及び2017-27 : ST2343, No.2017-32及び2018-11 : ST1613)。平成30年7月に発生した西日本における豪雨（以下「平成30年7月豪雨」という。）の後、レジオネラ症の報告数に特別な変化はなかったが、直後（7月）に県南部地域の患者2名から同一のST(ST2655)を示す株が分離された事例があり、新規STであった。（表5 分離株No.2018-9及び2018-10）。また、表6の分離株No.2017-24の患者由来株は岡山県でのみ分離されるST93であり、今回は県内10例目の事例であった。

更に、表5の*L. p*血清群1の分離株No.2017-7（ST2477 : 浴槽水由来）及び2017-13（ST22 : 患者由来）並びに表6の*L. p*血清群3の菌株No.2017-6（ST2476 : 浴槽水由来）及び2017-16（ST2495 : 浴槽水由来）のように、世界又は国内で初めてのSTを示す株も分離された。

L. p 血清群1の*lag-1*遺伝子については、浴槽水等由来株18株のうち4株(22.2 %)及び患者由来株6株のうち4株(66.7 %)が保有していた（表5）。

4 考察

レジオネラ症患者由来の7株（平成29年度3株,平成30年度4株）のうち6株が*L. p*血清群1であり、日本国内のレジオネラ症患者の80 %以上から*L. p*血清群1が分離されるとの報告^{4)・5)}と一致する傾向であった。

当センターが行った平成27年度の調査⁶⁾では、保健所分離の浴槽水から*L. p*血清群1, 3及び5が多く分離されていたが、本研究では3年間を通じて、血清群6, 3, 1の順に多く分離された。血清群6が増加した理由については不明である。SBT法では、同一施設のジャグジーで分離された株が、年を隔てて同一のST（ST286）を示す事例が認められた。理由として、レジオネラはviable-but-not-culturable (VBNC) の状態で長期間生残することが報告されているため⁷⁾、施設配管等の中で同一菌株が長期生残した可能性が考えられる。外部からの継続的な汚染に起因する可能性もあるが、現段階で結論付けることは困難である。分離年は異なるが、浴槽水由来株（表5 菌株

No.2016-22）と患者由来株（表5 菌株No.2017-1）が同一のST（ST1077）であった事例も見られたが、その関連性は不明であった。平成30年7月豪雨の直後に県南部地域の患者2名から同一のST（ST2655）を示す株が分離された事例（表5 菌株No.2018-9及び2018-10）があった。この患者の発生場所は異なるが、どちらも豪雨被害を受けた場所であり、1名は大雨の後の河川の清掃作業も行ったことから、豪雨に関連したレジオネラ症であったことが推測される。

平成29年9月に届出された患者の喀痰から*L. p*血清群3のST93が分離された。この遺伝子型は本県特有の型^{6), 8), 9)}であり、今回は10例目であったが、感染源は不明であった。今後、同様の株が患者から分離された場合は、積極的に環境調査を行い、感染源を明らかにする必要があると考えられる。

*lag-1*遺伝子については、病原性との関連が指摘されており³⁾、今回の調査では、浴槽水等由来株はその保有率が22.2 %と、患者由来株（66.7 %）に比較して低かったが、この結果は他の報告³⁾と同様であった。平成27年度の当センターの調査結果⁶⁾と同様に、患者由来株は*lag-1*遺伝子を高率に保有していたが、*lag-1*遺伝子を保有しない株が分離された患者でも、呼吸困難や意識障害など、症状が比較的重篤な場合も見られたことから、更に多くの事例についての検討が必要であると思われる。

平成30年度は県内のレジオネラ症が急増し、対策が急務であることから、今後も患者由来株と環境由来株の分子解析等により、感染源の究明、感染予防対策及び感染拡大防止対策のための調査研究を継続する予定である。

謝 辞

本研究に御協力いただきました岡山県内保健所関係者各位、患者株を分与していただきました倉敷中央病院臨床検査技術部細菌ウイルス検査室の藤井寛之先生と大森章恵先生に、また、SBT法によるSTの型別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：レジオネラ症とは, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ra/legionella/392-encyclopedia/530-legionella.html> (2019.9.2アクセス)
- 2) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル レジオネラ症, 平成23年10月7日改訂
- 3) Kozak, N.A., Benson, R.F., Brown, E., Alexander, N. T., Taylor, T. H. et al. : Distribution of *lag-I* 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
- 4) Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Helbig, JH., Chang, B., Kaneko, A. et al. : Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types, *J. Med. Microbiol.*, 59 (6), 653-9, 2010
- 5) Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Chida, K., Ohya, H., Kanatani, J. et al. : *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(18), e00721-18, 2018
- 6) 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
- 7) Dietersdorfer, E., Kirschner, A., Schrammel, B., Ohradanova-Repic A., Stockinger, H. et al. : Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages, *Water Res.*, 141, 428-438, 2018
- 8) 西山 明宏, 石田 直, 興梠 陽平, 小西 聡史, 坪内 和哉ら: *Legionella pneumophila* serogroup 3による呼吸器感染症の4症例, *感染症誌*, 85, 373-379, 2011
- 9) 中嶋 洋, 大島 律子, 河合 央博, 前川 純子, 倉 文明ら: 患者由来*Legionella pneumophila*血清群3 sequencetype 93 の疫学調査—岡山県, *病原微生物検出情報月報*, 34(6), 164-165, 2013