

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）

研究報告書

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

富山県の不明感染源解明のための環境調査

研究分担者 磯部 順子 富山県衛生研究所

研究協力者 金谷 潤一 富山県衛生研究所

研究要旨 富山県におけるレジオネラ症患者のおよそ 4 割は感染源が不明である。そこでこれまで調査してきた浴用水以外の感染源を特定するために、環境中に分布するレジオネラ属菌を調査した。今年度は対象として、河川水 25 検体、その周辺の土壌 20 検体に加えて昨年に引き続き、浴用施設のシャワー水 32 検体、車のウィンドウウォッシャー液(41 検体) について 調査を実施した。その結果、河川水から 7/25(28.0%)、土壌から 8/20(40.0%)、シャワー水からは 8/32(25.0%)、ウォッシャー液からは 1/41(2.4%) のレジオネラ属菌が分離された。分離されたレジオネラ属菌は、河川水、土壌では *L. pneumophila* SG1 がもっとも多く、シャワー水では SG1 および SG5 が多かった。ウィンドウウォッシャー液から分離された 1 株は *L. rubrilucens* であった。富山県特有の ST505 の *L. pneumophila* SG1 は河川水、土壌およびシャワー水から分離されなかった。しかしながら、これら環境から *L. pneumophila* SG1 が多く分離され、また、ウォッシャー液からはヒトからの分離が報告されている *L. rubrilucens* が分離されるなど、さまざまな環境がレジオネラ症の感染源となりうることを示す結果となった。今後も水溜りやウォッシャー液のように、感染源となりうる環境を把握するため、更なる調査が必要である。

A. 研究目的

富山県におけるレジオネラ症の発生状況は、平成 18～24 年の 7 年間の対人口 10 万人の報告数は全国でもっとも多く、加えて平成 25 年の報告数は 39 件で、これまででもっとも多かった。感染源については患者の行動様式や職業などから、およそ 4 割は浴用水との関連が推定されたが、およそ 4 割は感染源が不明であることが明らかとなった(図 1)。レジオネラ症は尿中抗原検査の保険適用などの影響により全国的に報告数が増加傾向にある<sup>1)</sup>が、感染様式や起原菌であるレジオネラ属菌の病原性など未だ

解明されていないことが多い。また、富山県も同様に、感染源が特定できない事例も多い<sup>2)</sup>。

そこで、レジオネラ症患者の発生を予防するため、感染源と感染経路を明らかにすることを目的として、富山県の環境中のレジオネラ属菌の分布状況を調査した。

B. 研究方法

1. 調査対象

感染源調査は、河川水、土壌、車のウィンドウウォッシャー液、および公衆浴場のシャワー水を対象とした。河川水について

は、富山県の患者からのみ分離されている *Legionella pneumophila* serogroup 1 (SG1) の Sequence-Based Typing (SBT) による Sequence Type (ST) が ST505 であった株が分離された浴用施設の近くを流れる河川を選んだ。そして、河川付近の土壌についても対象とした。また近年、車のウィンドウウォッシャー液はレジオネラ症との関連性が指摘され<sup>3)</sup>、また、浴場のシャワー水がレジオネラ症の感染源として報告<sup>4)</sup>されたことを受けて、昨年度より対象としている。

## 2. 調査期間と試料

試料は、平成 25 年 4 月～平成 25 年 10 月の 7 か月間、西部地域を流れる庄川に設定した 4 地点 (図 2) で採取した河川水 25 検体、土壌 20 検体である。また、車のウィンドウウォッシャー液については、協力機関 A, B で平成 25 年 10～11 月に採取した 41 検体である。シャワー水については、約 30 秒間流出させた後、容器に採取した。

## 3. レジオネラ属菌の分離

レジオネラ属菌の分離は、基本的には浴用水の方法に準じて行なった。

濃縮方法：試料は、河川水 (1,000 ml) とシャワー水 (500 ml) は、メンブランフィルター (直径 47 mm, 0.22 μm, ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE) で吸引ろ過し、フィルターを 100 倍濃縮量となる滅菌蒸留水で 5 分間ボルテックスしたものを試料とした。ウィンドウウォッシャー液 (100 ml) はメンブランフィルター (直径 47 mm, 0.45 μm, ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE) を用い、50 倍濃縮量となる滅菌蒸留水を加えてボルテックスした。

培養法：河川水 (5～11 月の検体) 土

壌検体およびウィンドウウォッシャー液 (50 倍濃縮) は、アメーバを用いて共培養した。河川水、ウィンドウウォッシャー液は濃縮検体 2 ml, 土壌は約 50 g に滅菌蒸留水 100 ml を加えた試料に、古畑らの報告<sup>5)</sup>にしたがって調整したアメーバ培養液 200 μl を添加後、35℃ で 1 か月間培養した。培養液を酸処理液 (0.2M KCl-HCl, pH2.2) と等量混合後、室温で 15 分静置した。混合液 200 μl を GVPC 培地 (日研生物および極東製薬)、および MWY 培地 (OXOID) それぞれ 1 枚ずつコンラージ棒で広げて、35℃ で 7 日間培養した。

アメーバ培養を行った上記検体以外は、濃縮検体を酸処理液 (0.2M KCl-HCl, pH2.2) と等量混合後、室温で 5 分静置し、上記と同様に GVPC 培地および MWY 培地それぞれ 1 枚ずつコンラージ棒で広げて、35℃ で 7 日間培養した。

分離されたレジオネラ属菌の同定：同定は、平板に発育したレジオネラ属菌様のコロニーについて、森本の報告<sup>6)</sup>した斜光法で特異的な形態を観察し、血液寒天培地と BCYE-α 培地 (ピオメリュール) に移植し、システインの要求性を確認した。次に BCYE-α 培地にのみ発育したコロニーについて、レジオネララテックステスト (OXIDO) とレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) により血清群を決定した。

*lag-1* 遺伝子：分離された *L. pneumophila* SG1 11 株について、*lag-1* 遺伝子の保有率を調べた。Kozak らの報告<sup>7)</sup>したプライマー lag-F : 5'-CTCACAACAAGTCA AGCAAC-3' および lag-R : 5'-AAACCATAC CAAA GCAACAT-3' を用い、GoTaqHS (プロメガ) 10 μl

に lag-F, lag-R (2 µM) をそれぞれ 2 µl, テンプレート 1 µl を加え, 20 µl になるよう H<sub>2</sub>O を加え反応液とした PCR は 95 2 分の熱変性後, 94 30 秒, 57 30 秒, 72 1 分を 30 サイクル, 72 5 分の条件で thermal cycler DICE (TaKaRa) でおこなった。

SBT: lag-1 遺伝子の調査と同様, *L. pneumophila* SG1 11 株について, ST を決定した。方法は前川の報告に準じて行なった<sup>8)</sup>。また, その系統樹解析は, 7 遺伝子の部分塩基配列をつなげた 2,501 塩基について, MEGA4 Software を用いて Neighbor-joining 法で系統樹を作成した。

PCR によるレジオネラ属菌の遺伝子検出: 環境検体から分離されたレジオネラ属菌およびウィンドウウォッシャー液から抽出した DNA 検体について, PCR を用いて 16S rRNA 遺伝子<sup>9)</sup> および mip 遺伝子<sup>10)</sup> を調べた。

## C. 研究結果

### 1. 河川水における *Legionella* 属菌検出状況

地点ごとの検出状況を表 1 に示した。レジオネラ属菌の検出率は, 全体で 7/25 (28.0%) であった。月別に見ると, *Legionella* 属菌が分離された 7 検体のうち 6 検体が 9 月, 10 月であった。地点別では, 地点 C を除く 3 地点からレジオネラ属菌が分離された。分離されたレジオネラ属菌の血清群は, *L. pneumophila* SG1 が 4 検体から分離され最も多く, 次いで SG3 と SG6 がそれぞれ 3 検体, UT が 1 検体から分離された。また, PCR の結果, UT 株は 16S rRNA 遺伝子のみ陽性であった。

### 2. 土壌におけるレジオネラ属菌検出状況

地点ごとの検出状況を表 2 に示した。レジオネラ属菌の検出率は, 全体で 8/20 (40.0%) であった。月別に見ると, 調査したすべての月でレジオネラ属菌が分離された。地点別では, 地点 C を除く 3 地点からレジオネラ属菌が分離された。分離されたレジオネラ属菌の血清群は, *L. pneumophila* SG1 が 5 検体から分離され最も多く, 次いで SG8 が 2 検体, SG3 と SG6 がそれぞれ 1 検体から分離された。また, UT が 5 検体から検出され, PCR の結果, すべての株が 16S rRNA 遺伝子のみ陽性であった。

### 3. シャワー水におけるレジオネラ属菌検出状況

調査したシャワー水 32 検体中, レジオネラ属菌が分離されたのは 8 検体 (25.0%) で, 10~99cfu/100 ml が 7 検体, 100~999cfu/100 ml が 1 検体であった。陽性 8 検体のうち, 6 検体が井戸水, 2 検体が水道水を使用していた。陽性であった 8 検体の採水時の遊離残留塩素濃度は, 0.05 mg/l が 3 検体, 0 mg/l が 3 検体, 未調査が 2 検体であった。分離されたレジオネラ属菌の血清群は, SG1 と SG5 が 2 検体, SG6 が 1 検体から検出された。また, UT が 6 検体から検出され, PCR の結果, すべての株が 16S rRNA 遺伝子のみ陽性であった。

### 4. 車のウィンドウウォッシャー液におけるレジオネラ属菌検出状況

結果を表 3 に示した。調査したウィンドウウォッシャー液 41 検体中, 1 検体 (2.4%) から *L. rubrilucens* が分離され, その菌数は 670 CFU/100 ml であった。濃縮液中の遺伝子の保有率は, 16S rRNA 遺伝子は

12/41 検体 (29.3%), *mip* 遺伝子は 41 検体がすべてから検出されなかった。また, アメーバを用いた培養法においても, 通常実施している培養法で分離された検体のみ, レジオネラ属菌が分離された。

#### 5 *L. pneumophila* SG1 の ST および *lag-1* 遺伝子保有状況

11 株の ST および *lag-1* 遺伝子保有状況を表 4 に示した。7 種類の ST のうち, ST127 は異なる試料 (河川および土壌) から検出された。また, ST48 と ST127 は過去に水溜りからも検出されている。*lag-1* 遺伝子を保有していたのは 2/11 株 (18.2%) であった。

今年度分離株および当所保存株の *L. pneumophila* SG1 計 179 株 (河川水由来 4 株, 土壌由来 6 株, 水溜り由来 82 株, 浴用施設由来 53 株, シャワー水由来 3 株, 冷却塔由来 5 株, レジオネラ症患者由来 26 株) について, SBT の系統樹を作成した (図 3)。河川水および土壌由来株は当所において今年度初めて分離したが, 河川水由来 1 株 [LG2269 (ST1185)] と土壌由来 3 株 [LG2144 (ST18), LG2160 および LG2236 (ST48)] は水溜り由来株と遺伝的に近縁であった。一方, 河川水由来 2 株 [LG2243 および LG2268 (ST1599)] と土壌由来 1 株 [LG2193 (ST1598)] は, 浴用施設由来株と遺伝的に近縁であった。残りの 3 株は, 水溜り由来株および浴用施設由来株との遺伝的な近縁度は同程度であった [LG2194, LG2202, LG2245 (ST127)]。

#### D. 考察

富山県におけるレジオネラ症の報告数は年間 20 ~ 30 名で, 人口対 10 万人の報告数

は全国でもっとも多い。さらに平成 25 年は 39 名の患者が報告され, これまででもっとも多い報告数であった。レジオネラ症発生時には患者の届け出とともに患者の行動等の疫学調査および感染源調査が行われるが, 患者のほとんどが尿中抗原検査で診断され, 喀痰培養試験によりレジオネラ属菌が分離されることは少なく, 菌の分子疫学的解析等ができないため, 感染源の特定が困難となっていることが問題となっている。

富山県では, *L. pneumophila* SG1 の ST505 が西部の庄川付近の患者および浴用施設から複数分離されている。そこで今年度は, 庄川および庄川付近の土壌から ST505 が分離されるのかを明らかにするため, 河川水および土壌の調査をおこなったが, ST505 は検出されなかった。しかしながら, *L. pneumophila* SG1 をはじめとする *Legionella* 属菌が複数の河川水および土壌から分離された。さらに, 臨床分離株の大半が保有している *lag-1* 遺伝子を保有している株も土壌から検出された。今回はアメーバ培養法で分離したので検体中の菌数はわからなかったが, 河川水および土壌がレジオネラ症の感染源となる可能性が示唆された。分子系統樹の結果では, 多くの河川水および土壌由来株が浴用施設由来株より水溜り由来株と遺伝的に近縁であったが, 浴用施設由来株とより遺伝的に近い関係の株もあった。生息環境と遺伝子型がある程度相関することがわかっているので<sup>11)</sup>, 今後分離株数を増やすことで, 富山県内の河川水および土壌由来株の遺伝的な特徴が明らかになると考えられる。

シャワー水におけるレジオネラ属菌検出率は, 昨年度の結果 (38.9%) に比べて低

く、また *lag-1* 遺伝子を保有する *L. pneumophila* SG1 は分離されなかった。しかしながら、シャワー水はミストが多く発生し、感染リスクが高いと思われることから、重要な感染源のひとつとして認識すべきであろう。すでにこれを原因とするレジオネラ症が発生し、リスクがあることは報告されている<sup>4)</sup>。しかしながら、現在の関係法令ではシャワー水の水質基準や衛生管理について規定されていない。また今回の結果では、レジオネラ属菌が検出された検体の 3/8 検体は、遊離残留塩素が 0 mg/l であった。したがって、これらが規定されるとともに、清掃、管理についても、適切な指導方法が示されるよう強く望む。

ウィンドウウォッシャー液については、近年 Wallensten<sup>2)</sup>が患者発生とウィンドウウォッシャー液に界面活性剤を使用していないことを関連付けて、また、Palmer<sup>12)</sup>は界面活性剤を使用していないウォッシャー液で細菌数が多く、1 検体から *L. pneumophila* SG1 を分離したと報告している。また、8<sup>th</sup> International conference on Legionella においては、オーストラリアにおけるレジオネラ症患者の疫学解析結果<sup>13)</sup>から、運転手との関連性が示唆され、車のウォッシャー液など、車の関連する環境調査の必要性を示唆していた。本研究でも昨年度に *L. pneumophila* SG5 が分離され、今年度には *L. rubrilucens* が分離されたが、この *L. rubrilucens* については、レジオネラ症患者からの分離が報告されており<sup>14)</sup>、ウォッシャー液がレジオネラ属菌の生息環境のひとつとなることが示された。これらの結果から、ウォッシャー液のリスクとともに界面活性剤を使用するよう周知する必

要が示された。

われわれの生活環境には広くレジオネラ属菌が生息することが改めて示された。さらに対象を広げて調査することが重要であると思われる。

謝辞 本実態調査を実施するにあたり、富山県生活衛生課、各厚生センター、富山市保健所の担当者および採水にご協力いただいた浴用施設の皆様に深謝いたします。

#### E. 参考文献

- 1) National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare. 2008. レジオネラ症 2003.1～2008.9. Infect. Agents Surveill. Rep. 29: 327–328.
- 2) Kanatani *et al.* 2013. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama Prefecture, Japan. J. Infect. Chemother. 19: 644–652.
- 3) Wallensten *et al.*, 2010. Windscreen wiper fluid without added screenwash in motor vehicles: a newly identified risk factor for Legionnaires' disease. Eur. J. Epidemiol. 25: 661–665.
- 4) National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare. 2010. シャワー水を感染源としたレジオネラ症例について. Infect. Agents Surveill. Rep. 31:

331–332.

5) 古畑 勝則 他. 2002. 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴誌. 30: 555–561.

6) 森本 洋. 2010. 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. 日本環境感染誌 25: 8–14.

7) Kozak *et al.*, 2009. 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: 2525–2535.

8) Amemura-Maekawa *et al.*, 2010. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. J. Med. Microbiol. 59: 653–659.

9) Yamamoto H. 1992. Detection and identification of *Legionella* species by PCR. Nihon Rinsho. 50: 394–9. (In Japanese.)

10) Mahbubani *et al.*, 1990. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Mol. Cell Probes. 4: 175–87.

11) Amemura-Maekawa *et al.*, 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan.

Appl. Environ. Microbiol. 78: 4263–4270.

12) Palmer *et al.*, 2012. *Legionella pneumophila* found in windscreen washer fluid without added screenwash. Eur. J. Epidemiol. 27: 667.

13) Lucinda Franklin. 2013. Commercial driving as a risk factor for Legionellosis in Victoria. The 8<sup>th</sup> International Conference on Legionella. Melbourne, October–November. Poster session 1, No. 23.

14) Matsui *et al.* 2010. Isolation of *Legionella rubrilucens* from a pneumonia patient co-infected with *Legionella pneumophila*. J. Med. Microbiol. 59: 1242–1246.

#### F. 研究発表

古畑勝則、奥野ルミ、河野喜美子、磯部順子、福山正文. 2013. 温泉水から分離された *Legionella londiniensis* のパルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子型別と薬剤感受性. J. Enviro. Dis. 22: 13–19.

Kanatani *et al.* 2013. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup. 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based typing. Appl. Environ. Microbiol. 79: 3959–66.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

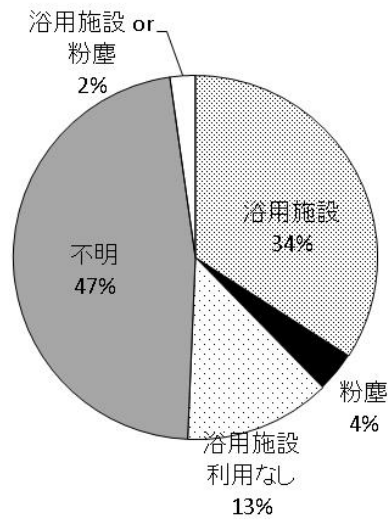


図1 レジオネラ症患者の感染源調査 (推定) 223人  
(1999年～2013年、富山県内)

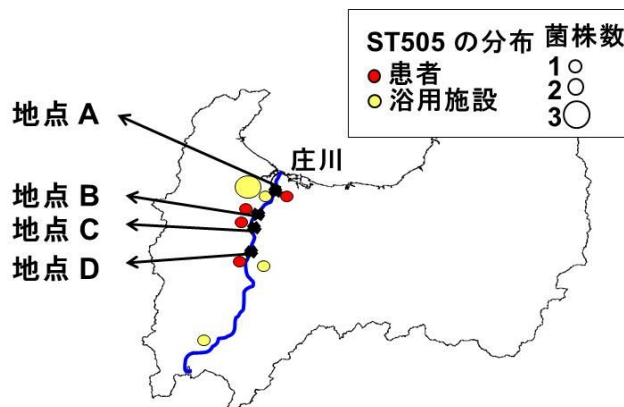


図2 河川水および土壌調査地点と ST505 分離状況

表1 河川水のレジオネラ属菌検出結果\*

月	地点			
	A	B	C	D
4	ND	ND**	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	ND	SG1, SG3, SG6	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
9	SG1	SG6	ND	<i>L. spp.</i>
10	SG1, SG3, SG6	SG3	ND	SG1

\*ND ; 不検出 . 血清群を示した菌株は *mip* 遺伝子陽性で *L. pneumophila* と確認した .

\*\*2 検体採取

表 2 土壌のレジオネラ属菌検出結果\*

月	地点			
	A	B	C	D
5	ND	SG1, SG6, <i>L. spp.</i>	ND	ND
6	SG1, <i>L. spp.</i>	ND	ND	ND
7	<i>L. spp.</i>	SG1	ND	SG1, SG8
9	SG1, SG8	ND	ND	ND
10	SG3	<i>L. spp.</i>	ND	ND

\*ND ; 不検出 . 血清群を示した菌株は *mip* 遺伝子陽性で *L. pneumophila* と確認した .

表 3 ウィンドウウォッシャー液のレジオネラ属菌分離状況

	レジオネラ属菌陽性率		遺伝子検索 (PCR 法)	
	培養法 (平板)	アメーバ培養法	16S rDNA	<i>mip</i> 遺伝子
施設 A	0/19	0/19	3/19	0/19
施設 B	1/22	1/22	9/22	0/22
Total	1/41	1/41	12/41	0/41

表 4 *L. pneumophila* SG 1 の SBT

由来	分離年/月	地点	ST	<i>lag-1</i> gene
シャワー	2013/11		579	-
河川水	2013/6	B	127	-
	2013/9	A	1599	-
	2013/10	A	1599	-
		D	1185	-
土壌	2013/5	B	18	+
	2013/6	A	48	-
	2013/7	B	127	-
		B	1598	+
		D	127	-
	2013/9	A	48	-



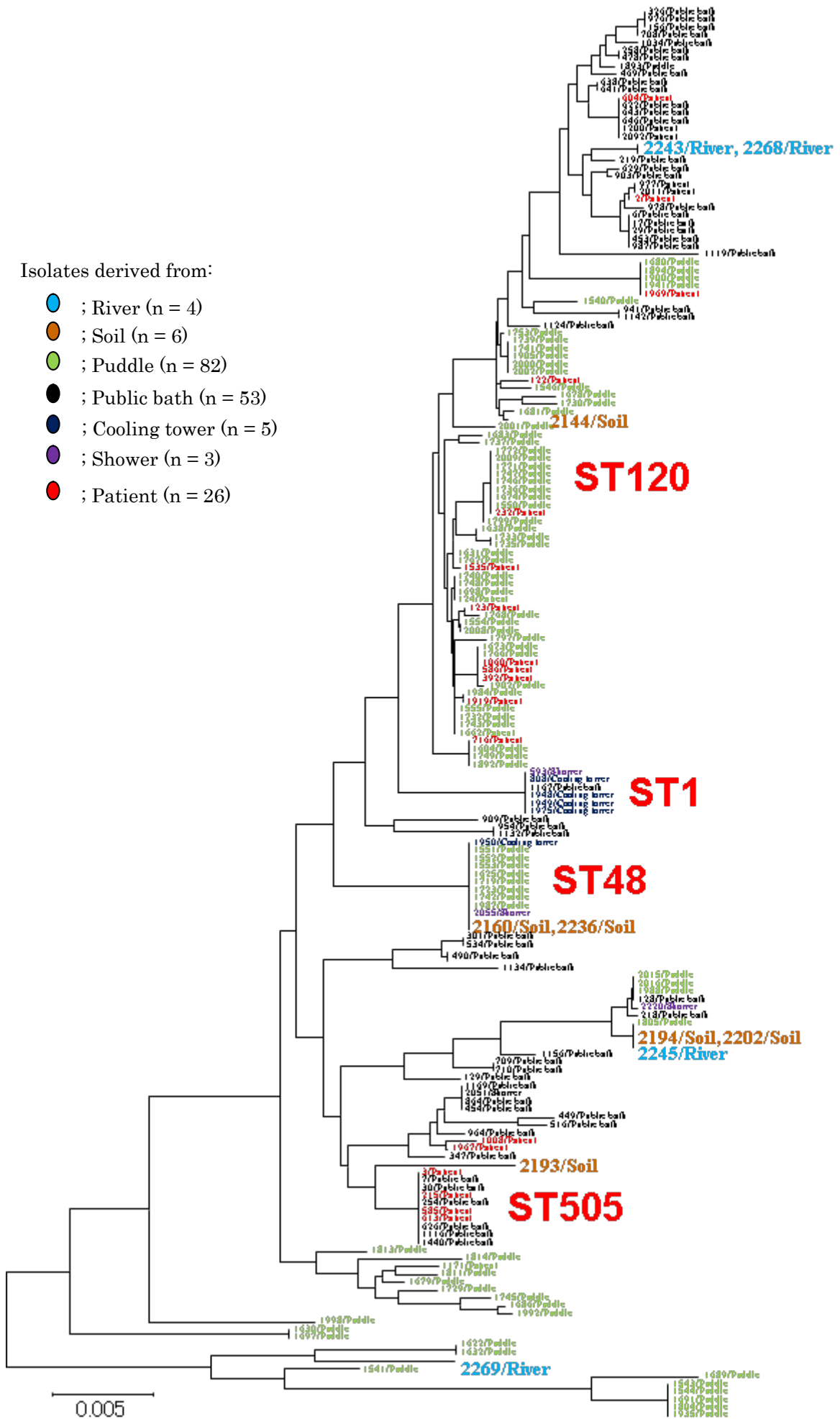


図3 *L. pneumophila* SG 1 の SBT塩基配列の分子系統樹