

埼玉県内の冷却塔水におけるレジオネラ属菌検出状況（2018–2023）

中川佳子 坂本大地 伊藤由加里 佐藤孝志 近真理奈* 尾関由姫恵

Detection of *Legionella* in cooling tower in Saitama Prefecture (2018–2023)

Keiko Nakagawa, Daichi Sakamoto, Yukari Ito, Takashi Sato, Marina Kon, Yukie Ozeki

はじめに

レジオネラ症は、*Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) を代表とするレジオネラ属菌による細菌感染症である。レジオネラ属菌は、自然界（河川、湖水、温泉、土壤など）に生息しており、循環式浴槽や冷却塔、加湿器などの人工水系で増殖し、レジオネラ属菌に汚染されたエアロゾルを吸入することで感染する。国内では入浴施設を原因とする集団発生事例が多い傾向にあるが、海外では冷却塔水を原因とする集団感染事例が数多く報告されているため、冷却塔もレジオネラ症の感染源として重視する必要がある¹⁾。埼玉県では、水温の上昇によりレジオネラ属菌増殖リスクが高まる夏場に県内冷却塔水のレジオネラ属菌検査を実施している。そこで、2018年から2023年までに搬入された冷却塔水のレジオネラ属菌検出状況を報告する。

対象および方法

1 対象

2018年1月から2023年12月までに埼玉県衛生研究所に搬入された62施設81検体の冷却塔水を対象とした。

2 検査方法

(1) 分離培養法

レジオネラ属菌培養検査は公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について²⁾に準じて実施した。非濃縮検体については未処理と酸処理、100倍濃縮検体では酸処理のみを行い培地に接種した。培地はレジオネラ属菌の選択分離培地であるMWY培地とWYO α 培地を使用した。各培地へは未処理検体は各100 μ L、酸処理検体は各200 μ Lをコンラージ棒で塗布した。酸処理時間は20分とした。濃縮は、2022年までは冷却遠心濃縮法で行い、2022年以降はより検出効率が良いとされるろ過濃縮法を行った。

培養は36°C 7–10日間行い、培養開始3日目以降にいずれかの培地に出現した灰白色湿潤コロニーのうち、斜光法による観察で特徴的なカットグラス様を呈するコロニーについてL-システイン要求性試験を実施し、L-シス

テイン要求性を示したものをレジオネラ属菌と推定した。次にレジオネラ属菌の特異抗血清を用いて菌種及び血清群（serogroup = SG）を同定した。特異抗血清を用いた試験で判定ができなかった株については、レジオネラ属菌の共通遺伝子であるLEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene) プライマー及びレジオネラ属菌共通遺伝子である*mip* 遺伝子のうち、*L. pneumophila*に特異的な領域を增幅する*Lmip* (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) プライマーを用いたPCR法を実施し、LEG陽性、*Lmip*陰性であれば*L. sp*、両遺伝子陽性であれば*L. pneumophila*と判定した。さらに*L. sp*については16SrRNA遺伝子の配列決定による菌種同定を試みた。

(2) 遺伝子検査 (LAMP法)

100倍濃縮検体を用いてLAMP法を実施した。LAMP法は、Loopamp レジオネラ検出試薬キットE(栄研化学)を用い、添付文書に従って実施し、濁度測定装置LA320Cで判定を行った。さらに、検体由来の成分によってLAMP反応が阻害される可能性があるため、検体のDNA抽出試料にキット添付の陽性コントロールを添加したものを同時に測定した³⁾。陽性コントロールを添加したチューブで濁度の上昇が認められない場合は「判定不可」とした。

(3) *L. pneumophila* SG1の遺伝子検査

培養法で*L. pneumophila* SG1が検出された場合は、PCR法により病原性関連疫学マーカーである*lag-1*遺伝子の有無を確認するとともに、SBT法によりSTを決定した³⁾。

(4) *L. micdadei*, *L. bozemanae* 及び *L. anisa*の確認試験
冷却塔水から分離される菌種として*L. pneumophila*に次いで分離例が多い*L. anisa*は、免疫血清による凝集反応で*L. micdadei*や*L. bozemanae*に交差反応を示すことがあるという報告⁴⁾があるため、調査期間中に分離された*L. micdadei*, *L. bozemanae*及び*L. anisa*について特異血清を用いた凝集試験、16SrRNA遺伝子の配列決定による菌種同定及び紫外線(360nm)照射による自発蛍光の有無の確認を実施した。

* 現 川口市保健所

結果と考察

1 レジオネラ属菌の検出状況

冷却塔水 81 検体中 19 検体がレジオネラ属菌培養陽性となった。検出限界未満 (<10 CFU/100 mL) は 62 検体、培養陽性のうち、100 mL 中 10–99 CFU が 2 検体、レジオネラ症防止指針¹⁾ における冷却塔水の指針値である 100 CFU/100 mL を超えたものは 17 検体であった。LAMP 法陰性の検体は全て培養法で検出限界未満となり、培養検査と遺伝子検査で矛盾した結果となった検体はなかった。LAMP 法判定不可となった検体は 12 検体あり、うち 3 検体は培養法陽性となった。(表 1)

表 1 培養法及び遺伝子検査法(LAMP 法)結果

レジオネラ属菌数(CFU/100mL)【培養法】					
	<10 (検出限界 値未満)	10-99	100-999	1000≤	計
L A M P 法	陰性	21	0	0	0
	陽性	32	2	4	10
	判定不可	9	0	0	3
計		62	2	4	81

検体採取年別の検出菌種を図 1 に示した。2019 年を除いた全期間で *L. pneumophila* SG1 が分離された。2021 年以前は *L. pneumophila* のみの検出だったが、2022 年以降は *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌も複数種類検出されている。これは、濃縮処理法を冷却遠心濃縮法からろ過濃縮法へ変更したことによる影響であると考えられる。

培養法で検出されたレジオネラ属菌の内訳は、*L. pneumophila* SG1 が最も多く 14 検体 (17.3%) から検出された。(表 2) また、同一検体から 2 菌種以上のレジオネラ属菌が検出されたものが 11 検体あった。

菌種が決定できたレジオネラ属菌に関しては、すべて臨床検体からの分離報告例がある菌種であり、冷却塔水がレジオネラ症対策上重要であることが示された。

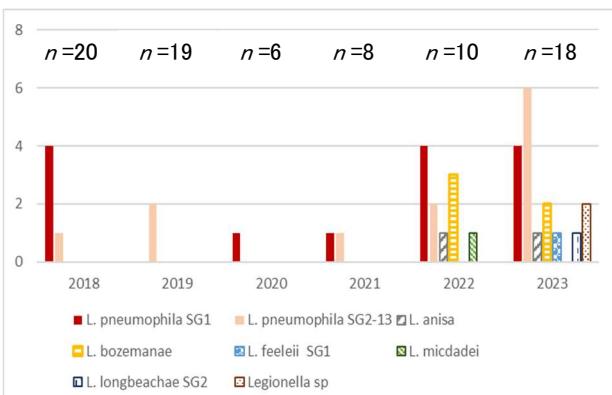


図 1 検体採取年別レジオネラ属菌検出検体数

表 2 2018 年–2023 年に冷却塔水から検出されたレジオネラ属菌内訳(重複あり)

検出菌種	検出検体数(%)	臨床検体からの分離報告例
<i>L. pneumophila</i> SG1	14 (17.3)	あり
<i>L. pneumophila</i> SG2	1 (1.2)	あり
<i>L. pneumophila</i> SG6	3 (3.7)	あり
<i>L. pneumophila</i> SG7	5 (6.2)	あり
<i>L. pneumophila</i> SG10	1 (1.2)	あり
<i>L. pneumophila</i> SG12	1 (1.2)	あり
<i>L. pneumophila</i> SG13	1 (1.2)	あり
<i>L. anisa</i>	2 (2.5)	あり
<i>L. bozemanae</i>	5 (6.2)	あり
<i>L. feeleii</i> SG1	1 (1.2)	あり
<i>L. micdadei</i>	1 (1.2)	あり
<i>L. longbeachae</i> SG2	1 (1.2)	あり
<i>Legionella</i> spp.	2 (2.5)	—

2 *L. pneumophila* SG1 の遺伝子検査

検出された 14 株の *L. pneumophila* SG1 について、*lag-1* PCR と SBT 法の結果を表 3 に示した。14 株すべて *lag-1* 遺伝子陰性であった。冷却塔水のレジオネラ検査時に検出されたすべてのレジオネラ属菌株を保存しているわけではないため、保存しなかった菌株の中に *lag-1* 遺伝子保有株が含まれていた場合に見逃している可能性が考えられた。保存菌株選定時に *lag-1* 遺伝子のスクリーニングを行う等、*lag-1* 保有株を見逃さない検査体制とする必要がある。

SBT 法の結果は、ST が決定できなかった 2 株を除いた 12 株が ST1 となった。ST1 は冷却塔水から高頻度で分離され⁵⁾、患者からも検出報告のある ST である。今後も継続して分離菌株の SBT 法を実施し、データを蓄積していくことが重要である。(表 3)

3 *L. micdadei*, *L. bozemanae* 及び *L. anisa* の確認試験

検体搬入時のレジオネラ属菌培養検査において特異血清を用いた試験によって同定された *L. micdadei* 1 株、*L. bozemanae* 5 株、*L. anisa* 2 株について改めて確認試験を実施した結果、すべての株で 360nm の紫外線照射で青白い蛍光を発し、16SrRNA 遺伝子配列解析で *L. anisa* と同定された(表 4)。免疫血清による凝集反応試験では、2 株が複数の血清に凝集を示し、3 株が搬入当時の結果と異なる血清に凝集を示した(表 4 色付き部分)。免疫血清による凝集試験で交差反応の報告がある菌種に凝集が認められた際は、塩基配列決定による菌種同定を併用するなど多角的に判断する必要がある。本研究では 16SrRNA 遺伝子の塩基配列による菌種同定を実施したが、すべてのレジオネラ属菌が保有し、菌種間の相同意性が低い *mip* 遺伝子の塩基配列による菌種同定方法も今後取り入れていく必要がある。

表3 *L. pneumophila* SG1の遺伝子検査結果

No.	採取年	施設No	<i>lag-1</i>	ST	SBT profile							
					flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	
①	2018	5	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
②	2018	5	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
③	2018	6	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
④	2018	9	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
⑤	2020	31	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
⑥	2021	37	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
⑦	2022	38	—	UT*	x	14	16	1	15	x	1	
⑧	2022	40	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
⑨	2022	41	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
⑩	2022	42	—	UT*	1	4	3	1	1	x	1	
⑪	2023	51	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
⑫	2023	54	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
⑬	2023	59	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1
⑭	2023	61	—	ST1	1	4	3	1	1	1	1	1

※一部領域の遺伝子が增幅されずST未決定

表4 *L. micdadei*, *L. bozemanae*, *L. anisa* 確認試験結果

菌株	特異抗血清による凝集反応				自発蛍光	16SrRNA
	ミクダディ	ボゼマニイ	ボゼマニイ2群	アニサ		
micdadei-1	-	+++	-	+	青白	<i>Lanisa</i>
bozemanae-1	-	+++	-	-	青白	<i>Lanisa</i>
bozemanae-2	-	+++	-	-	青白	<i>Lanisa</i>
bozemanae-3	-	-	-	+++	青白	<i>Lanisa</i>
bozemanae-4	-	+++	-	-	青白	<i>Lanisa</i>
bozemanae-5	-	+++	-	-	青白	<i>Lanisa</i>
anisa-1	-	-	+++	+++	青白	<i>Lanisa</i>
anisa-2	-	+	-	-	青白	<i>Lanisa</i>

+++: 反応開始後1分以内にはっきりとした凝集が認められた ++: 反応開始後1分以降に凝集が認められた

+: 反応開始後1分以降に弱い凝集が認められた

■: 撲入当時の検査結果と異なる菌種に凝集を示した検体

総括

調査期間中に冷却塔水から分離されたレジオネラ属菌のうち菌種が同定されたものは、すべて臨床検体からの分離報告例がある菌種となっていた。近年では冷却塔が感染源と疑われるレジオネラ症の集団発生事例も報告されていることから、今後も冷却塔水のレジオネラ属菌検査結果を蓄積し、臨床分離株と遺伝子型の比較を行うなど、より詳細な解析を実施していきたい。

文献

- 宇都宮啓: レジオネラ症防止指針第5版, 公益財団法人日本建築衛生管理教育センター, 東京, 2024
- 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長, 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について(令和元年9月19日発葉生衛発0919第1号)
- 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月改訂版
- 神奈川県衛生研究所, 神奈川県微生物検査情報第165号, 2006年7月
- Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, et al. Legionella

pneumophila and other Legionella species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. Appl Environ Microbiol 2018; 84: e00721-18