

培養土等からのレジオネラ属菌分離を目的とした アメーバ培養法の確立と分離株の分子疫学解析

浅野由紀子 福口優佳 平井真太郎 大塚有加 青木紀子 滝山広志 四宮博人

Keywords: *Legionella spp.*, potting soil, Sequence-based typing, Minimum spanning tree

環境常在菌であるレジオネラ属菌による感染症発生時の感染経路解明のため、環境由来検体からのレジオネラ属菌分離を目的としたアメーバ培養法を検討した。その結果、市販培養土 37 検体中 18 検体 (48.6 %) からレジオネラ属菌遺伝子を検出し、11 検体 (29.7 %) からレジオネラ属菌を分離した。菌種は *Legionella bozemanii* が 7 検体 (18.9 %) と最も多く、*L. longbeachae* と *L. anisa* がそれぞれ 5 検体 (13.5 %), *L. cinclinatiensis* と *L. micdadei* がそれぞれ 2 検体 (5.4 %), *L. pneumophila*, *L. nagasakiensis*, *L. santicrucis* はそれぞれ 1 検体 (2.7 %) から分離された。

さらに県内で分離された環境由来株 95 株について、Sequence-based typing 解析を実施し、Minimum spanning tree を作成した結果、冷却塔及び入浴施設由来グループ、入浴施設由来グループ並びに土壤等由来グループの 3 グループに大別され、臨床由来株は全てのグループに分布した。

はじめに

レジオネラ症は、*Legionella pneumophila* (以下、*L. pneumophila*) に代表されるレジオネラ属菌による細菌感染症で、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(以下、感染症法)における四類感染症、全数把握対象疾患に定められている。レジオネラ症の患者報告数は年々増加しており、全国では 2018 年以降 2000 件以上の報告が続いている¹⁾。愛媛県においても増加傾向を示し、2022 年以降は年間 20 例以上患者が発生している。県内のレジオネラ症患者の推定感染源及び感染経路を確認したところ、レジオネラ症患者 204 例のうち 130 例(63.7 %) が感染経路不明と報告されている。

レジオネラ症の代表的な感染源・感染経路は入浴施設、加湿器、冷却塔であるが、近年では土壤、塵埃、洗車機など様々な要因による感染事例が報告²⁻⁶⁾されている。レジオネラ属菌は細胞内寄生性を有し、環境中ではアメーバなどの原虫や藻類内で増殖して自然界に広く分布している。

レジオネラ症の発生を抑制するためには、感染源、感染経路を解明し、予防対策を講じることが重要である。レジオネラ症の感染リスクとして一般的に知られる浴槽水等については、既にレジオネラ属菌の検査法が確立され⁷⁾、いずれの検査室でも一定レベルの検査精度が確保されている。一方、土壤、冷却塔水、園芸用培養土等の環境検体からの検出は一部の報告に留まっている。そのため、浴槽水以外からの感染経路を解明するためには夾雑物の多い土壤等の環境検体から効率よくレジオネラ属菌を分離し、患者由来株との比較・解析を実施する必要がある。そこで、今回、レジオネラ属菌の分離が困難な環境検体からのレジオネラ属菌検出プロトコルを確立するため、レジオネラ属菌の細胞内寄生性を利用したアメーバ培養法を検討した。

さらに、県内で分離した *L. pneumophila* について、分子疫学解析を実施し、感染源調査への有用性についても検討したので併せて報告する。

材料

1 レジオネラ属菌分離困難検体からの分離法の検討

通常の平板培養法でレジオネラ属菌の分離が困難な検体として、県内の複数のホームセンター等で購入した培養土 37 検体(9 社が製造した全て別製品)、河川水 5 検体(県内東予地域 1 検体, 中予地域 3 検体, 南予地域 1 検体)、冷却塔水 1 検体(中予地域)の計 43 検体について、平板培養法とアメーバ培養法を実施した。

2 分子疫学解析

(1) 臨床由来株

2008 年に行政検査で搬入された *L. pneumophila* 1 株, 2022 年に愛媛県感染症発生動向調査事業で搬入された *L. pneumophila* 1 株及び 2023 年に愛媛県感染症発生動向調査事業で搬入された患者喀痰検体から分離した *L. pneumophila* 1 株の計 3 株(いずれも血清群(以下, SG) 1) を使用した。

(2) 環境由来株

2008 年～2023 年の間に県内で分離された入浴施設由来 *L. pneumophila* 92 株(SG 1 41 株, SG2 1 株, SG3 5 株, SG5 21 株, SG6 21 株, SG7 2 株, SG9 1 株)、冷却塔由来 *L. pneumophila* 1 株(SG1)及び市販培養土から分離された *L. pneumophila* 2 株(SG1, SG6) の合計 95 株を使用した。

方法

1 試料の前処理

河川水及び冷却塔水は、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, 以下「病原体検出マニュアル」)⁸⁾に準拠して実施した。すなわち、試料 500 mL を孔径 0.20 μm のポリカーボネートフィルター(メルク株)でろ過し、フィルターを滅菌蒸留水(以下, DW) 5 mL で振り出した懸濁液を濃縮試料とした。

市販培養土は、検体 50 g と滅菌蒸留水 100 mL を 1 分間激しく混和後、30 分間静置して分取した上清 5 mL を試料とした。

2 直接培養法

(1) 平板分離培養

前処理後の試料について、①未処理、②熱処理(50 $^{\circ}\text{C}$ 20 分)、③酸処理(レジオネラ検査用酸処理液(関東化学株))を等量混合し、室温で 10 分間反応)、④熱酸処理(50 $^{\circ}\text{C}$ 20 分間の熱処理後、酸処理液を等量添加して 10 分間反応)の 4 種類の処理を行った。その後、処理

液を生理食塩水で適宜希釈し、MWY 培地(関東化学株)、WYO 培地(栄研化学株)、BCYE α 培地(島津ダイアグノスティックス株)にそれぞれ 100 μL 滴下してコンラージを用いて培地表面に広げた後、37 $^{\circ}\text{C}$ で 7 ~ 10 日間培養し、出現集落の分離・同定を行った。

(2) Sweep PCR

平板培養後、培地上の濃厚発育部位を 5mm 程度白金耳でかきとり、DW 200 μL に懸濁してアルカリ熱抽出法で鋳型 DNA を調整し、山本ら⁹⁾の方法に準拠して LEG 領域の遺伝子増幅を確認した。LEG 領域の増幅が認められた検体は、かき取った部分を BCYE α 培地等に再塗布してレジオネラ属菌分離を試みた。

3 アメーバ培養法

(1) アメーバ懸濁液の調製

アメーバは国立感染症研究所から分与された *Acanthamoeba* 属環境分離株を用いた。

50 mL カルチャーフラスコ(コーニングインターナショナル株)に、保存アメーバ懸濁液 100 μL と PYGC 培地を 2 ~ 3 mL 入れ、30 $^{\circ}\text{C}$ で 3 ~ 4 日間培養した。培養中は 1 回/日、倒立顕微鏡で観察を行った。アメーバがコンフルエントになったことを確認し、カルチャーボトル内の培養液を、PYGC 培地と 1/50 リン酸緩衝液の混合液(PYGC 培地:1/50 リン酸緩衝液 = 9:1, 7:3, 5:5, 3:7, 1:9)に順次置き換え、最終的に 1/50 リン酸緩衝液 3 mL に入れ替えた。その後、カルチャーフラスコを氷上に 5 分間静置後、軽く衝撃を与えて 1/50 リン酸緩衝液にアメーバを浮遊させて分取し、アメーバ懸濁液とした。

(2) アメーバ培養

前処理後の試料 5 mL を 50 mL カルチャーフラスコ(コーニングインターナショナル株)に入れ、(1)で調製したアメーバ懸濁液 0.5 mL を添加して、30 $^{\circ}\text{C}$ で 7 ~ 21 日間培養した。培養期間中は 1 回/日、倒立顕微鏡を用いて観察し、アメーバが確認できなくなった場合には、アメーバ懸濁液 0.5 mL を追加した。アメーバ懸濁液の接種量は最大 1.5 mL とした(図 1)。

(3) アメーバ培養液からのレジオネラ属菌分離

得られたアメーバ培養液は、2 (1) 平板分離培養に従い分離培養を行った。

確認のため、アメーバ培養液 100 μL を分取し、アルカリ熱抽出で鋳型 DNA を調製後、LEG 領域の遺伝子増幅を実施し、増幅が認められた場合は再度平板分離培養を行った(図 1)。

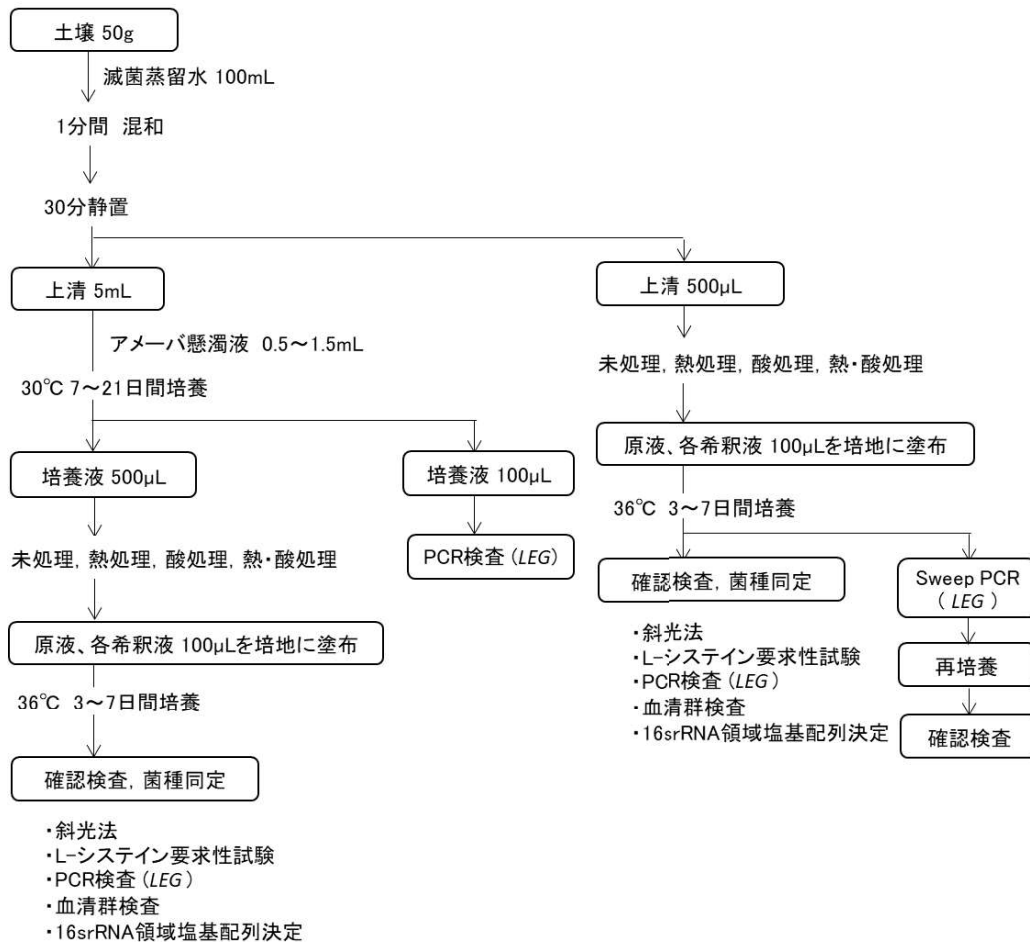


図1 市販培養土からのレジオネラ属菌検出プロトコル

4 レジオネラ属菌の同定

(1) レジオネラ属菌同定検査

平板分離培養期間中は1回/日、斜光法を行い、モザイク様を呈したレジオネラ属菌疑い株は、純培養を行うとともに、L-システイン要求性試験及びLEG領域を対象とした遺伝子増幅検査を行った。

(2) 菌種同定試験

レジオネラ属菌と同定された株は、レジオネラ免疫血清(デンカ株)により血清群検査を実施するとともに、病原体検出マニュアルに従い、16s rRNA領域の遺伝子配列を決定して菌種同定を行った。

5 分子疫学解析

(1) Sequence-based typing (SBT)

病原体検出マニュアルに準拠して行った。すなわち、*L. pneumophila* の特定の7つの遺伝子 *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA* の一部領域の塩基配列を決定し、国立感染症研究所から提供されたデータベースと比較後、7領域それぞれにアルル番号を付与し、7領域のアルル番号の組合せから各菌株の Sequence type (以下、

ST)を決定した。

(2) Minimum spanning tree 解析

SBT解析の結果、7領域の解析が可能であった91株について、病原微生物遺伝子情報システム(BioNumerics v8.1)を用いて Minimum-spanning tree(以下、MST)を作成した。全国データと比較するため、2008年~2016年に国内のレジオネラ症患者から分離された *L. pneumophila* 419株¹⁰⁾並びに1996年~2006年に国内で分離された浴槽水由来50株、冷却塔由来50株及び土壌等由来35株の環境由来 *L. pneumophila* SG1 135株¹¹⁾のSTデータについて併せて解析を行った。

結果

1 分離困難検体からのレジオネラ属菌分離

製品名が異なる入手可能な市販培養土37検体について、レジオネラ属菌の分離を試みた。その結果、直接培養法により4検体(12.0%)からレジオネラ属菌遺伝子を検出し、再培養等を試行したもののレジオネラ属菌様コロニーは確認されず、レジオネラ属菌の分離には至らな

表 1 環境検体からのレジオネラ属菌検出結果

種別	No	メーカー・採取地区	直接培養法		アメーバ培養法		菌種(株数)
			Sweep PCR	Legionella spp. 分離	培養液 PCR	Legionella spp. 分離	
	1	A	-	-	-	-	
	2	A	-	-	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG1(2), <i>L. pneumophila</i> SG6(1)
	3	A	-	-	+	-	
	4	A	-	-	+	+	<i>L. anisa</i> (1)
	5	A	-	-	-	-	
	6	A	-	-	-	-	
	7	B	-	-	-	-	
	8	B	-	-	+	-	
	9	B	+	-	+	-	
	10	B	-	-	+	-	
	11	B	+	-	+	+	<i>L. bozemanii</i> (1), <i>L. nagasakiensis</i> (1)
	12	B	-	-	+	-	
	13	B	-	-	+	-	
	14	B	-	-	-	-	
	15	B	-	-	-	-	
	16	B	-	-	-	-	
	17	B	-	-	-	-	
市販培養土	18	C	-	-	-	-	
	19	C	-	-	-	-	
	20	C	-	-	+	+	<i>L. longbeachae</i> (4), <i>L. cincinnatiensis</i> (2)
	21	D	+	-	+	+	<i>L. bozemanii</i> (6), <i>L. longbeachae</i> (1)
	22	D	+	-	+	+	<i>L. longbeachae</i> (1), <i>L. cincinnatiensis</i> (4), <i>L. santicrucis</i> (1)
	23	D	-	-	-	-	
	24	D	-	-	-	-	
	25	E	-	-	+	-	
	26	E	-	-	+	+	<i>L. bozemanii</i> (6), <i>L. anisa</i> (1), <i>L. micdadei</i> (1)
	27	E	-	-	+	+	<i>L. bozemanii</i> (1), <i>L. anisa</i> (1)
	28	E	-	-	-	-	
	29	E	-	-	-	-	
	30	E	-	-	-	-	
	31	F	-	-	-	-	
	32	F	-	-	+	+	<i>L. bozemanii</i> (2), <i>L. longbeachae</i> (1)
	33	F	-	-	-	-	
	34	G	-	-	+	+	<i>L. bozemanii</i> (2), <i>L. longbeachae</i> (2), <i>L. anisa</i> (1), <i>L. micdadei</i> (1)
	35	G	-	-	+	+	<i>L. bozemanii</i> (7), <i>L. anisa</i> (2)
	36	H	-	-	-	-	
	37	I	-	-	-	-	
河川水	38	中予	-	-	-	-	
	39	中予	-	-	-	-	
	40	中予	-	-	-	-	
	41	東予	-	-	-	-	
	42	南予	-	-	-	-	
冷却塔水	43	中予	-	-	-	-	

った。

一方、アメーバ培養法では、培養液の遺伝子検査により、18 検体 (48.6 %) からレジオネラ属菌遺伝子を検出し、平板分離培養を行った結果、11 検体 (29.7 %) からレジオネラ属菌 53 株を分離した (表 1, 2)。製造会社別のレジオネラ遺伝子検出率に大きな違いは認められなかったが、B 社の 11 検体については 6 検体 (54.5 %) から遺伝子が検出されたものの、菌分離は 1 検体 (9.1 %) のみであった。レジオネラ属菌を分離した培地は、選択培地の MWY 培地と WYO 培地で、非選択培地の BCYE α 培地からは分離できなかった (データ未発表)。

アメーバ培養法で分離したレジオネラ属菌 53 株について菌種同定を行った結果、分離したレジオネラ属菌種は 8 菌種で、同一検体から分離された菌種数は 1 菌種が 2 検体、2 菌種が 6 検体、3 菌種が 2 検体、4 菌種が 1 検体であった。市販培養土から分離された菌種は、*L. bozemanii* が 7 検体 (18.9 %) と最も多く、*L. longbeachae* が 5 検体 (13.5 %), *L. anisa* が 5 検体 (13.5 %), *L. cincinnatiensis*

が 2 検体 (5.4%), *L. micdadei* が 2 検体 (5.4%) と続き、*L. pneumophila*, *L. nagasakiensis* 及び *L. santicrucis* がそれぞれ 1 検体 (2.7 %) から分離された。*L. pneumophila* は 1 検体 (A 社 No.2) のみから 3 株分離され、血清群は SG1 が 2 株, SG6 が 1 株であった。

河川水 5 件, 冷却塔水 1 件からはレジオネラ属菌は検出されなかった。

2 *L. pneumophila* 株の分子疫学解析

県内で分離された入浴施設由来株 *L. pneumophila* 92 株について SBT 解析を行った結果、ST 型が確定したのは 72 株であった (表 3)。その内訳は、ST1 が 18 株、

表 2 市販培養土からのレジオネラ属菌検出結果

	PCR 検出数 (%)	Legionella spp. 分離数 (%)
直接培養法	4 (12.0 %)	0 (0 %)
アメーバ培養法	18 (48.6 %)	11 (29.7%)

表 3 愛媛県内で分離された *Legionella pneumophila* の解析結果

No.	施設	菌株番号	分離年	由来 ¹⁾	SG ²⁾	ST ³⁾	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA
1	A	H21E368	2009	Bw	1	ND	ND	14	16	16	15	13	2
2	A	H22E041	2010	Bw	1	ND	ND	14	16	16	15	13	2
3	A	H22E359	2010	Bw	1	ND	ND	14	16	16	15	13	2
4	A	H22E360	2010	Bs	1	ND	ND	14	16	16	15	13	2
5	B	H21E379	2009	Bw	6	1633	2	10	19	28	19	4	6
6	B	H22E026	2010	Bw	5	UT	23	6	17	28	14	8	207
7	B	H22E071	2010	Bs	5	1392	3	13	1	28	14	9	207
8	B	H22E361	2010	Bw	5	UT	6	10	17	6	48	14	207
9	B	R05E066	2017	Bs	6	1633	2	10	19	28	19	4	6
10	B	R05E061	2019	Bs	5	1392	3	13	1	28	14	9	207
11	B	R05E062	2019	Bw	5	1392	3	13	1	28	14	9	207
12	C	R01E106	2019	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
13	C	R02E123	2020	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
14	D	H20E220	2008	Bb	5	1032	3	13	1	6	14	9	38
15	D	H23E023	2011	Bb	5	UT	8	6	17	6	48	15	40
16	E	H21E350	2009	Bw	1	788	2	6	17	14	12	8	11
17	E	H21E351	2009	Bb	1	788	2	6	17	14	12	8	11
18	E	R04E075	2011	Bb	6	1633	2	10	19	28	19	4	6
19	F	H20E231	2008	Bb	5	392	3	13	1	6	14	9	11
20	F	H21E347	2009	Bb	5	392	3	13	1	6	14	9	11
21	F	H21E354	2009	Bb	1	48	5	2	22	27	6	10	12
22	F	H23E001	2011	Bb	1	48	5	2	22	27	6	10	12
23	F	H23E003	2011	Bb	5	392	3	13	1	6	14	9	11
24	F	H20E245	2008	Bw	1	1151	7	43	31	3	48	15	40
25	G	H21E336	2009	Bb	6	1885	6	10	14	28	2	14	3
26	G	R04E111	2012	Bb	1	980	6	10	17	28	9	14	3
27	G	R05E073	2020	Bw	1	UT	6	10	3	10	19	14	6
28	H	H22E005	2010	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
29	H	H22E020	2010	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
30	H	H22E363	2010	Bw	1	979	10	22	7	3	16	18	6
31	H	H22E366	2010	Bb	5	UT	3	6	1	28	14	9	207
32	H	R04E125	2013	Bw	1	979	10	22	7	3	16	18	6
33	H	R04E130	2013	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
34	H	R04E133	2013	Bs	1	1	1	4	3	1	1	1	1
35	I	H18E132	2006	Bs	6	153	2	10	3	28	9	14	3
36	I	H18E200	2006	Bt	6	153	2	10	3	28	9	14	3
37	I	H19E011	2007	Bw	5	1413	8	6	34	9	53	8	207
38	I	H19E105	2007	Bt	6	153	3	10	3	28	9	14	3
39	J	H20E275	2008	Bb	6	1994	3	6	1	6	8	11	9
40	J	H21E341	2009	Bb	6	1994	3	6	1	6	8	11	9
41	J	H21E342	2009	Bb	1	1	1	4	3	1	1	1	1
42	J	H22E371	2010	Bb	6	1994	3	6	1	6	8	11	9
43	J	H22E372	2010	Bb	1	1	1	4	3	1	1	1	1
44	J	H23E014	2011	Bb	1	1	1	4	3	1	1	1	1
45	J	R04E072	2011	Bw	6	1994	3	6	1	6	8	11	9
46	J	R04E073	2011	Bb	1	1	1	4	3	1	1	1	1
47	J	R04E076	2012	Bb	1	1	1	4	3	1	1	1	1
48	K	H20E228	2008	Bb	1	ND	ND	14	16	16	15	13	2
49	K	H20E287	2008	Bs	1	1	1	4	3	1	1	1	1

1) Pt:患者, B:入浴施設 (Bw:浴槽水, Bs:原水, Bt:貯湯槽, Bb:逆流水, Bsh:シャワー水), Ct:冷却塔, Soil:土壌

No.	施設	菌株番号	分離年	由来 ¹⁾	SG ²⁾	ST ³⁾	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA
50	L	H22E113	2010	Bw	1	1720	2	10	17	14	21	14	221
51	L	H22E115	2010	Bw	5	UT	2	10	3	6	9	4	207
52	M	H22E227	2010	Bw	5	UT	2	10	3	28	9	4	220
53	M	H22E230	2010	Bw	1	129	6	6	15	28	4	14	11
54	N	H23E028	2011	Bs	1	1	1	4	3	1	1	1	1
55	N	R04E091	2012	Bs	1	UT	3	53	1	28	14	9	207
56	O	R05E058	2019	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
57	O	R05E059	2019	Bw	5	UT	2	6	17	28	14	8	207
58	P	R05E074	2020	Bw	6	1341	3	13	1	3	14	9	207
59	P	R05E075	2020	Bsh	6	1341	3	13	1	3	14	9	207
60	Q	R05E083	2021	Bw	5	UT	2	10	3	28	9	4	220
61	Q	R05E084	2021	Bw	3	87	2	10	3	28	9	4	13
62	R	R05E086	2021	Bw	6	68	3	13	1	28	14	9	3
63	R	R05E087	2021	Bw	9	1907	10	22	7	50	16	18	6
64	S	R05E090	2022	Bw	7	1720	2	10	17	14	21	14	221
65	S	R05E092	2022	Bw	5	UT	3	6	1	28	14	9	207
66	S	R05E070	2019	Bw	3	508	10	10	7	28	16	18	11
67	S	R05E054	2019	Bw	6	68	3	13	1	28	14	9	3
68	S	R05E050	2022	Bw	5	1424	23	12	31	6	48	31	220
69	S	R05E093	2022	Bw	5	2889	40	60	80	94	103	33	232
70	S	H20E084	2008	Bw	1	512	3	8	19	28	19	4	9
71	S	H20E234	2008	Bw	1	1151	7	43	31	3	48	15	40
72	S	H20E241	2008	Bs	6	1994	3	6	1	6	8	11	9
73	S	H21E040	2009	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
74	S	R04E098	2012	Bw	1	UT	7	12	31	3	48	15	40
75	S	R04E105	2012	Bw	1	UT	2	10	19	28	UT	4	9
76	S	R04E117	2013	Bw	6	1885	6	10	14	28	2	14	3
77	S	R04E124	2013	Bw	1	979	10	22	7	3	16	18	6
78	S	R04E136	2013	Bs	6	68	3	13	1	28	14	9	3
79	S	R04E144	2013	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
80	S	R05E065	2018	Bw	6	1994	3	6	1	6	8	11	9
81	S	R05E053	2019	Bw	3	UT	23	10	3	6	8	4	UT
82	S	R05E072	2020	Bw	6	UT	3	13	1	28	11	9	3
83	S	R05E079	2020	Bw	3	430	2	6	17	6	12	8	11
84	S	R05E080	2020	Bw	5	1631	2	12	3	6	9	14	220
85	S	R05E082	2020	Bw	3	249	1	4	3	5	1	1	1
86	S	R05E095	2020	Bw	7	1720	2	10	17	14	21	14	221
87	S	R05E052	2021	Bw	6	483	3	13	1	1	14	9	3
88	S	R05E076	2021	Bw	1	1166	2	3	9	10	2	1	9
89	S	R05E049	2022	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
90	S	R05E077	2022	Bw	1	1	1	4	3	1	1	1	1
91	S	R05E199	2023	Bw	2	1354	2	10	24	28	4	4	207
92	S	R05E203	2023	Bw	5	1975	3	12	1	6	35	9	220
93	S	H20E004	2008	Ct	1	36	3	4	1	1	14	9	1
94	S	R05E114	2023	Soil	6	2661	6	10	14	3	2	14	9
95	S	R05E115	2023	Soil	1	115	12	29	2	5	3	17	15
96	S	H20E074	2008	Pt	1	512	3	8	19	28	19	4	9
97	S	R04E231	2022	Pt	1	260	12	8	11	23	29	26	2
98	S	R05E221	2023	Pt	1	624	12	8	11	10	5	12	6

2) Sero Group 3) Sequence Type

ST1994 が 6 株, ST68, ST153, ST392, ST979, ST1392, ST1633, ST1720 が各 3 株, ST48, ST788, ST1151, ST1341, ST1885, が各 2 株, ST87, ST129, ST249, ST430, ST483, ST508, ST512, ST980, ST1032, ST1166, ST1354, ST1413, ST1424, ST1631, ST1907, ST1975, ST2889 がそれぞれ 1 株であった。その他, 7 領域のアリル番号が決定あるいは遺伝子配列が決定したものの ST が決定しなかった型別不明 (以下, UT) が 15 株, 7 領域いずれかのアリル番号が決定しなかった株が 5 株であった。

その他, 冷却塔由来 *L. pneumophila* 1 株は ST36, 市販培養土から分離した *L. pneumophila* 3 株のうち, SG1 2 株は ST115, SG6 株は ST2661 で, 臨床由来 *L. pneumophila* 3 株は ST260 が 1 株, ST512 が 1 株, ST624 が 1 株であった。

SBT 解析で 7 領域のアリル番号が決定した 91 株について, 参照株 554 株を加えて病原微生物遺伝子情報系統解析システム (BioNumerics ver8.1) を用いて MST 解析を行った (図 2)。その結果, 冷却塔及び入浴施設由来グループ, 入浴施設由来グループ並びに土壌由来グループの 3 グループに大別され, 臨床由来株は全てのグループに分布した。県内の入浴施設由来 67 株 (78.8 %)

が入浴施設由来グループ, 14 株 (16.5 %) が冷却塔及び入浴施設由来グループ, 4 株 (4.7 %) が土壌由来グループに分類された。また, 冷却塔由来 1 株は冷却塔及び入浴施設由来グループ, 市販培養土から分離した土壌由来株 2 株は入浴施設由来グループと土壌由来グループに, 1 株ずつ分類された。さらに, 県内の臨床由来株 3 株は, 2 株が土壌由来グループ, 1 株が入浴施設由来グループに分類された。

考察

今回, レジオネラ属菌の細胞内寄生性を利用したアメーバ培養法を検討した。その結果, 市販培養土 37 検体中 18 検体 (48.6 %) からレジオネラ属菌遺伝子を検出し, うち 11 検体 (29.7 %) からレジオネラ属菌を分離した。古畑ら¹²⁾は, 国内で流通している園芸用土 112 試料のうち 11 試料 (9.8 %) からレジオネラ属菌が分離されたと報告している。細谷ら¹³⁾は, 腐葉土 4 試料, 培養土 1 試料, 土壌 10 試料のうち, 腐葉土 3 検体と培養土 1 検体 (26.6 %) からレジオネラ属菌を検出している。

古畑ら¹²⁾の培養法は, 200 mL コルベンを培養容器

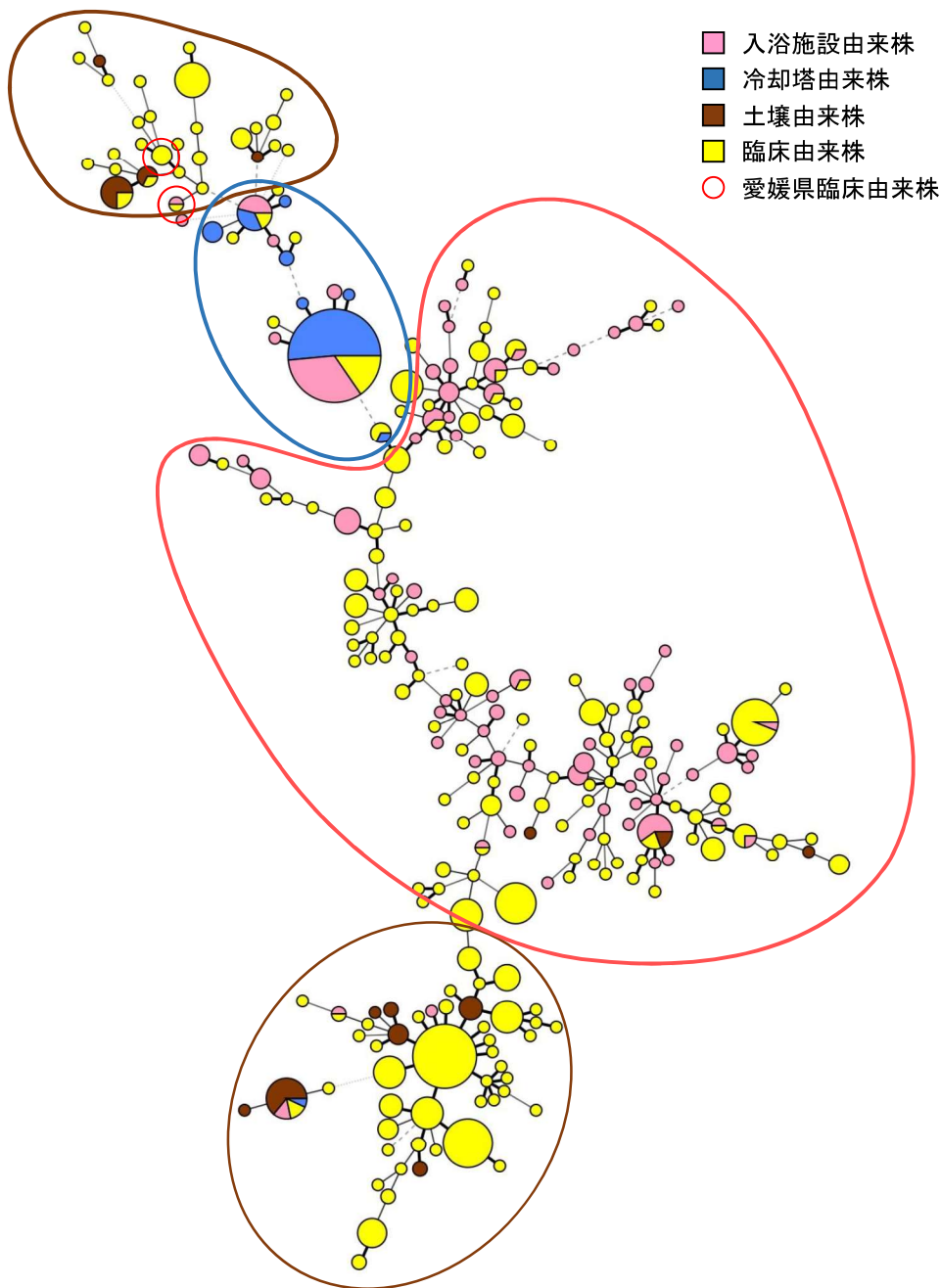


図2 Minimum spanning tree 解析

とし、試料 50g に DW 100 mL を加えて混和後、30 °C で 7 日間培養したアメーバ懸濁液 0.5 mL を添加して 36 °C で 4 週間放置している。また、細谷ら¹³⁾は古畑ら¹²⁾の方法を改良し、試料混和液の上清 5 mL を分取し、アメーバ懸濁液を添加している。我々の方法と異なるのは、①アメーバ懸濁液の調製方法、②アメーバ懸濁液の添加方法、③アメーバ培養温度、④アメーバ懸濁液の追加接種の有無である。

アメーバ懸濁液の調製方法では、既報^{12,13)}では PYGC 培地を用いて 30 °C で 7 日間培養したアメーバを使用しているが、我々は 30 °C で 3 ~ 4 日間培養と

最もアメーバの増殖効率が高い状態でアメーバ懸濁液を調製した。アメーバ培養期間が 5 日以上長くなるとアメーバ自体が浮遊して増殖が抑えられることが確認されているため、増殖効率の高い状態で懸濁液を調製したことにより、アメーバ捕食能力が最大限に発揮された可能性がある。

アメーバ懸濁液の添加方法では、古畑ら¹²⁾は試料混和液 100 mL にアメーバ懸濁液 0.5 mL を添加するのみであったが、細谷ら¹³⁾は試料混和液の上清 5 mL にアメーバ懸濁液 0.5 mL を添加し、相対的なアメーバ濃度を高めることで検出率の向上を図っており、我々も

細谷ら¹³⁾の添加方法を採用した。

アメーバ培養法の培養温度については、既報^{12,13)}では *L. pneumophila* の至適温度である 36 °C あるいは 37 °C で培養を実施しているが、我々はアメーバの至適温度である 30 °C を選択した。今回、アメーバ培養法のプレ実験として、様々な条件下における生活環境検体からのアメーバ培養法を検討した。その結果、レジオネラ属菌のアメーバ内増殖が成立する最も重要な要因は、アメーバがレジオネラを捕食し、アメーバを細胞内に取り込むことであると考えられた。特に、土壌のような夾雑物の多い環境検体では、運動性の高いアメーバにレジオネラ属菌を積極的に捕食させることを目的として、レジオネラ属菌の至適温度である 36 °C ではなく、アメーバの至適温度である 30 °C を選択した。それにより、既報よりレジオネラ属菌を高率に検出した可能性がある。

アメーバ追加接種について既報^{12,13)}では言及していないが、我々はアメーバ培養液を 2 ~ 3 回追加接種を行った。培養土中には様々な夾雑菌や生物が常在しており、レジオネラ属菌と同様に細胞内寄生性を有する菌種 (*Mycobacterium spp.* や *Listeria spp.* 等) が多数存在する。そのため、試料に接種したアメーバがそれらの菌種に消費されることを想定し、毎日観察を行ってアメーバが確認できなくなった時点でアメーバを追加接種することとした。実際に、アメーバ培養 7 日間でレジオネラ属菌遺伝子を確認したものの分離には至らなかった検体 (No.26, 35) から、アメーバ追加接種 2 回を行った結果、レジオネラ属菌がほぼ選択的に分離することが可能であった。これらのことから、夾雑菌を多数含む土壌等の検体の場合には、培養期間中にアメーバ懸濁液を接種することが望ましいと考えられた。

今回、生活環境検体から分離したレジオネラ属菌株は *L. bozemanii* 7 検体 (18.9 %) 25 株, *L. longbeachae* が 5 検体 (13.5 %) 9 株, *L. anisa* が 5 検体 (13.5 %) 6 株, *L. cincinnatiensis* が 2 検体 (5.4 %) 6 株, *L. micdadei* が 2 検体 (5.4 %) 2 株, *L. pneumophila* が 1 検体 (2.7 %) 3 株, *L. nagasakiensis* 1 検体 (2.7 %) 1 株, *L. santircrucis* 1 検体 (2.7 %) 1 株が検出された。最も高頻度に検出された菌種は *L. bozemanii* で 18.9 % を占め、次いで *L. longbeachae* と *L. anisa* が 13.5 %, *L. cincinnatiensis* 及び *L. micdadei* が 5.4 %, *L. nagasakiensis*, *L. pneumophila* 及び *L. santircrucis* が 2.7 % であった。古畑

ら¹²⁾は 112 試料中最も多く分離されたのは *L. pneumophila* で、全体の 72.4 % を占めたと報告している。細谷ら¹³⁾の調査でも、腐葉土 4 試料中 3 試料 (75.0 %) から *L. pneumophila* が分離されている。一方で、Koide ら¹⁴⁾の調査では、17 種類の培養土のうち *L. bozemanii* が 9 検体 (52.3 %), *L. longbeachae* が 8 検体 (47.1 %), *L. micdadei* が 5 検体 (29.4 %) から検出され、*L. pneumophila* は 2 検体 (11.8 %) であった。さらに、Steele ら¹⁵⁾は豪州の園芸用土について調査した結果、45 検体のうち 73 % から *L. longbeachae* を検出していた。我々の結果は、*L. pneumophila* を高率に検出した古畑ら¹²⁾や細谷ら¹³⁾のデータとは大きく食い違っているものの、培養土から様々なレジオネラ属菌が検出されている他文献と比較しても妥当性のあるデータだと思われる。

また、*L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. anisa*, *L. cincinnatiensis*, *L. micdadei* 及び *L. nagasakiensis* は、*L. pneumophila* ほどではないものの、ヒトへの感染事例が報告されている¹⁶⁻²⁰⁾。*L. pneumophila* はヒトへの病原性が高いことは知られており、レジオネラ症患者から分離される菌種の 87.8% を占めている²¹⁾。今回調査した市販培養土 37 検体中 18 検体 (48.6 %) からレジオネラ属菌遺伝子を検出し、うち 11 検体 (29.7 %) からヒトへの感染事例報告があるレジオネラ属菌を検出していることから、市販培養土がレジオネラ症の感染源となり得る可能性が示唆された。

今回、県内分離株について SBT 解析を実施した結果、全国の環境由来株や臨床由来株と容易に比較することができ、菌株間の近縁性解析及び可視化が可能であること、菌株の由来の推定が可能であることを確認した。2023 年 7 月に宮城県内の医療機関の冷却塔が原因となったレジオネラ集団感染事例²²⁾が記憶に新しいが、この事例では、医療機関利用者 8 名のほか、当該医療機関利用歴のない周辺地域の住人等 13 名の患者が発生し、その一部から冷却塔由来株と同じ遺伝子パターン²²⁾のレジオネラ属菌が検出され、大規模な感染事例であることが確認された。レジオネラ症の感染源調査には近年 NGS 解析が実施されることもあるが、高額な機器と費用が必要となることから、日常的に実施することは困難である。SBT 解析の index of discrimination は 0.963²³⁾ ~ 0.984²⁴⁾ と高いことから、SBT 解析は患者発生時の積極的疫学調査時の感染原・感染経路推定には十分活用可能であり、特に宮城県の事例²²⁾のように、レジオネラ症患者の発生が同一施設利用

者や同一地域で続くなどの集積が確認された場合には、臨床検体や患者由来株を収集して SBT 解析を行い、感染経路を推定したうえで環境調査を行うなど、共通感染源が存在する可能性を視野に疫学調査を実施するなどの行政対応が可能であると思われる。

今回、感染源調査時に活用可能な環境検体からのレジオネラ属菌検出のためのアメーバ培養法を確立した。さらに、県内分離株 98 株について SBT 解析を実施し、データベース化を行ったことから、新たな患者発生時には感染源の推定ができ、有効な感染予防対策を講じることが可能となった。本研究成果を活用し、適切な感染予防対策について情報提供することで、感染対策に寄与することが期待される。

まとめ

- 1 環境検体からのレジオネラ属菌株分離のためのアメーバ培養法を確立した。
- 2 愛媛県内の市販培養土 37 検体についてアメーバ培養法を実施した結果、11 検体 (29.7%) からレジオネラ属菌を分離し、うち 1 検体からは病原性の高い *L. pneumophila* を分離したことから、市販培養土がレジオネラ症の感染源となり得る可能性を確認した。
- 3 愛媛県内で分離された環境由来 *L. pneumophila* 95 株及び臨床由来 *L. pneumophila* 3 株の計 98 株について、SBT 解析を実施した。
- 4 SBT 法で解析可能であった 91 株について、MST 解析を行い、全国の臨床由来株及び環境由来株のデータと比較した結果、冷却塔及び入浴施設由来、入浴施設由来並びに土壌由来の 3 グループに分類可能となった。
- 5 当該法によるデータベースを蓄積し、レジオネラ症患者発生時において臨床分離株の解析結果を既知のデータベースと照合することで、感染経路推定及び原因究明調査に極めて有用な知見が得られると考えられた。

文献

- 1) 国立感染症研究所発生動向調査年別一覧 (全数把握) レジオネラ症
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/11529-reportja2021-20.html>
- 2) 岡崎ら : 感染症学雑誌. (72) 10, 1076 – 1079 (1998)
- 3) 嶋田ら : IASR. 26 (8), 221 – 222 (2005)
- 4) Pinar A *et al.* : Infect Control Hosp Epidemiol. 23 (3), 145 - 147 (2002)

- 5) Natalia V *et al.* : Emerg Infect Dis. 23 (11), 1880 - 1882 (2017)
- 6) Ogawa H *et al.* : Intern Med. Nov 27. doi: 10.2169/internalmedicine.2590-23. Online ahead of print. (2023)
- 7) 令和元年 9 月 19 日付け 薬生衛発 0919 第 1 号 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知 「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」
- 8) 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,
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Legionella20200904.pdf>
- 9) 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.
- 10) Amemura-Maekawa J *et al.*: Appl Environ Microbiol. 84 (18), 1- 9 (2018)
- 11) Amemura-Maekawa J *et al.*: Appl Environ Microbiol. 78 (12), 4263 - 4270 (2012)
- 12) 古畑ら : 環境感染 (19) 2, 306-310 (2004)
- 13) 細谷ら : 新潟県保健環境科博研究所年報 26, 62 - 64 (2011)
- 14) Koide M. *et al.* : ASM press, washington, DC, 356-359 (2002)
- 15) Steel TW. *et al.* : Appl. Environ. Microbiol. 56 (10), 2984-2988 (1990)
- 16) Neiderud CJ. *et al.* : Infect Ecol Epidemiol. Sep 6, 3. doi: 10.3402/iee.v3i0.20739. PMID: 24023988; PMCID: PMC3767882. (2013)
- 17) Fenstersheib MD. *et al.* : Lancet. 336 (8706), 35-37 (1990)
- 18) Jernigan DB. *et al.* : Clin Infect Dis. Mar 18 (3), 385-389 (1994)
- 19) Li Q. *et al.* : Clin Lab. 68 (4), doi: 10.7754/Clin.Lab.2021.210725 (2022)
- 20) Yang G. *et al.* : Int J Syst Evol Microbiol. Feb 62, 284-288 (2012).
- 21) 国立感染症研究所衛生微生物技術協議会第 43 回研究会レジオネラ・レファレンスセンター会議資料 https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/R5_Legionnaires.pdf
- 22) 令和 5 年度生活衛生関係技術担当者研修会「病院の冷却塔に起因したレジオネラ症集団発生事例について」
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001208088.pdf>
- 23) Olsen JS. *et al.* : Environ. Sci. Technol. Nov 15; 44 (22), 8712-8717 (2010)

Establishment of amoeba culture method for isolation of *Legionella spp.* from potting soil,
and molecular epidemiological analysis of *Legionella spp.*

Yukiko ASANO, Yuka FUKUGUCHI, Shintaro HIRAI, Yuka Otsuka, Noriko AOKI,
Hiroshi TAKIYAMA, Hiroto SHINOMIYA

We investigated an amoeba culture method for the isolation of *Legionella spp.* from environment-derived specimens to elucidate the route of infection in outbreaks caused by *Legionella spp.* As a result, *Legionella spp.* genes were detected in 18 of 37 (48.6 %) commercially available culture soil samples, and *Legionella spp.* was isolated from 11 of them (29.7 %). *Legionella bozemanii* was the most common species isolated from seven samples (18.9%), *L. longbeachae* and *L. anisa* from five samples (13.5%) each, *L. cincinnatiensis* and *L. micdadei* from two samples (5.4%) each, and *L. pneumophila*, *L. nagasakiensis* and *L. santicrucis* from one sample (2.7%) each. Moreover, we performed sequence-based typing analysis on 95 environment-derived strains isolated in Ehime Prefecture and created a minimum spanning tree, which revealed that the strains were broadly classified into three groups: the cooling tower and bathing facility-derived group, the bathing facility-derived group, and the soil-derived group, and that the clinical strains were distributed in all three groups.