

山梨県内の入浴施設由来 *Legionella pneumophila* の *lag-1* 陽性率

植松香星 柳本恵太

Detection of *lag-1*-positive *Legionella pneumophila* from Bath Water and Swab Samples in Public Baths in Yamanashi prefecture.

Kosei UEMATSU, Keita YANAGIMOTO,

キーワード: *Legionella pneumophila*, SG1, *lag-1*

Legionella 属菌はグラム陰性桿菌で土壌や河川水などの環境に広く分布している¹⁾。*L. pneumophila* SG1 がレジオネラ肺炎などのレジオネラ症を引き起こす主要な原因菌である。近年、レジオネラ症の患者報告数の増加傾向が指摘されており、尿中抗原検出キットや LAMP 法²⁾ の保険適用による普及が患者報告数の増加原因の一つとされている。

本菌は時として、入浴施設や宿泊施設の浴槽水を原因とした集団発生を起こすことがあり、多数の患者発生がみられることがある。我々は、これらの施設を対象に患者発生に伴う行政検査で分離した菌株を用い、県内の公衆浴場や宿泊施設の浴槽水やふきとりのレジオネラ属菌汚染状況を調査し、報告してきた³⁾。

近年の報告では、Kozak⁴⁾らは病原性関連遺伝子と考えられる *lag-1* の存在を報告している。その後、Kanatani ら⁵⁾は路上の水たまりから *lag-1* 陽性株検出を報告している。また、Amemura-Maekawa ら^{6,7)}は浴槽水、土壌、冷却塔水由来株の *lag-1* 関連抗原の保有状況を調査している。環境水由来株と比較して、ヒト由来株は当該遺伝子陽性率が高いことから病原性に関連していると考えられている。

今回は前回の調査³⁾で使用した菌株に新たな調査で分離した菌株を追加し、県内の *lag-1* 陽性株検索を行い陽性率の調査をした。加えて *lag-1* 陽性株の増加が患者発生の増加と関係するか検討した。また、*lag-1* 遺伝子陽性株とその温泉水の pH との関係について調査した。

対象と方法

1 供試菌株

2013 年 1 月から 2022 年 12 月の間にレジオネラ症患者発生に伴う調査で分離された *L. pneumophila* 239 株を使用した。内訳は浴槽水由来 206 株（貯湯槽水由来 3 株を含む）及びふきとり由来 33 株である。ふきとり由来株の内訳は浴槽 16 株、洗い場床、湯の出口 4 株、シャワーヘッド 3 株、打たせ湯の出口、カラン、ジャグジー吹き出し口、ヘアキャッチャー、洗い場吐水口、貯湯槽内壁がそれぞれ 1 株であった。

血清群の内訳を表 1 に示した。

2 *lag-1* PCR の方法

(1) 鋳型 DNA の調製

スキムミルクにより凍結保存した菌株を BCYE α 寒天培地（関東化学）で 35℃、5 日間培養し、集落を生じさせた。その集落を用いて煮沸法により遺伝子抽出を行った。

(2) PCR

PCR は Kozak⁴⁾らの方法で行った。反応条件は最初の前熱変性を 95℃2 分とし、熱変性 94℃、30 秒、アニーリング 57℃、30 秒、伸長反応 72℃、60 秒を 30 サイクル繰り返した。生じた PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動後、GelRed (Biotium 社) により染色し、585bp の DNA 断片を検出した。

3 *lag-1* 陽性株分離とその温泉水 pH との関連性

入浴施設および宿泊施設の浴槽水 pH は保健所から提供された値を用いた。SG1 における *lag-1* 陽性株と *lag-1* 陰性株が分離された施設数をそれぞれ集計した。

結果と考察

表1 使用した*L. pneumophila*株

由来	血清群	菌株数
浴槽水	SG1	83
	SG6	29
	SG3	28
	SG5	11
	SG4	9
	SG10	8
	SG2	5
	SG9	4
	SG13	3
	SG8	2
	SG15	2
	SG7	1
	SG4, 9	5
	型別不能	16
	合計	206
ふきとり	SG1	9
	SG6	5
	SG4	4
	SG5	4
	SG3	3
	SG15	3
	SG4, 9	2
	SG2	1
	型別不能	2
合計	33	

1 *lag-1*陽性率

供試した菌株 239 株のうち *lag-1* 陽性が 13 株であり、全て SG1 であった。内訳は浴槽水由来 11 株、ふきとり由来（浴槽及び風呂の吐口）2 株であった。SG1（83 株）の *lag-1* 陽性率は浴槽水由来 13.3%、ふきとり由来では 22.2% であった。関東地方の入浴施設を調査した Amemura-Maekawa⁷⁾ の報告では、浴槽水からの *lag-1* 陽

性率は 26%（50 株中 13 株が陽性）であった。今回の浴槽水調査での結果はこれと比較して少ない割合であり、理由として分離株の地域差が考えられた。

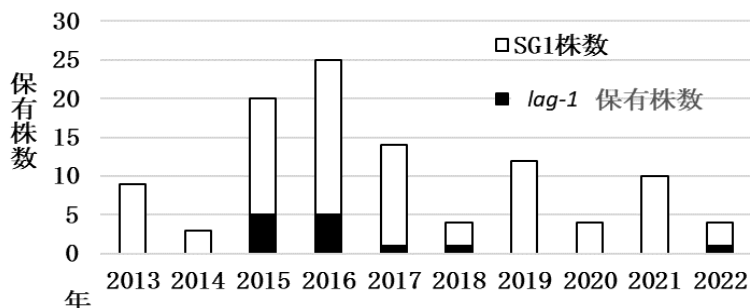


図1 分離されたSG1及び*lag-1* 保有株数

2 年別 *lag-1*陽性率

浴槽水由来株及びふきとり由来株を合わせた SG1 について年別の *lag-1* 陽性株数を図 1 に示した。*lag-1* 陽性率は 2013 年、2014 年が 0%、2015 年は 33.3%、2016 年が 25.0%、2017 年、2018 年が 7.7%、2019 年、2020 年、2021 年が 0%、2022 年が 33.3% であった。2015 年から 2018 年まで陽性率が減少傾向となり、2019 年から 2021 年まで 0% であった。陽性率は増加傾向ではなかったため、患者報告数の増加は浴槽水中の *lag-1* 陽性株の増加が原因とはいえなかった。今後も陽性率の上昇を捉えるため継続して監視する必要があると考えられた。

3 *lag-1*陽性株分離とその温泉水 pH との関連性

SG1 が分離されたのは 23 施設であり（重複なし）、そのうち浴槽水の pH 値を把握できたものが 11 施設であった。そのうち 2 施設で *lag-1* 陽性株が分離されており、pH はそれぞれ 8.4 および 9.9 であった。*lag-1* 陰性株が分離された残り 9 施設は、pH が 7.8 から 9.2 の範囲であった。内訳は pH 7.8、pH 8.0、pH 8.1、pH 8.3 及び pH 8.3 が 1 施設、pH 8.2 及び 9.2 が 2 施設であった。pH が把握できた検体数や SG1 が分離された検体数が少なかったことから、*lag-1* 陽性株と pH との関係は見いだすことはできなかった。ただし、pH 9.9 においても *lag-1* 陽性株が分離されたことから pH 10 付近の高アルカリ温泉でもレジオネラ症の感染源となることが確認された。このような高 pH の泉質において、我々は遊離塩素による *L. pneumophila* SG1 の殺菌力が低下することを確認している⁸⁾。高アルカリ泉質のレジオネラ症発生防止には、同泉質でも有効なモノクロロミン消毒の導入や十分な衛生管理を行う必要があると考えられた。

まとめ

1. 2013年1月から2022年12月の間にレジオネラ症患者発生に伴う調査で県内入浴施設から分離された *L. pneumophila* SG1 株の *lag-1* 陽性率は、浴槽水で 13.3%、ふきとり由来株では、22.2%であった。SG1 以外の血清群では、*lag-1* 陽性株はみられなかった。
2. *lag-1* 年別陽性率は、近年増加傾向ではなかった。
3. pH10 付近の高アルカリ性泉質でも *L. pneumophila* SG1 が分離された。清掃や消毒方法等衛生管理に特に留意する必要があると考えられた。
- 5) Kanatani, J. et al. :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**, 3959-3966 (2013)
- 6) Amemura-Maekawa, J., et al. :*Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016, *Appl Environ Microbiol*, **84**, (2018)

参考文献

- 1) 森本洋ら：病原体検出マニュアル, 4-64, (2020) 国立感染症研究所
- 2) 白坂渉ら：レジオネラ肺炎における尿中抗原検査と LAMP 法遺伝子検査のレジオネラ属菌検出率の比較, *日臨微誌*, **29**, 21-24 (2019)
- 3) 柳本恵太, 山上隆也, 植松香星：レジオネラ症関連調査における山梨県内の公衆浴場からのレジオネラ属菌検出状況について, *山梨衛環研年報*, **60**, 56-59 (2016)
- 4) Kozak, N. A., 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**, 2525-2535 (2009)
- 7) Amemura-Maekawa, J., et al. :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**, (2012)
- 8) 柳本恵太, 高村知成, 植松香星：山梨県内のレジオネラ属菌の消毒が困難な浴用水におけるモノクロロミンの消毒効果, *山梨衛環研年報*, **59**, 55-57 (2015)