

短報

温泉源泉周辺土壌からの レジオネラ属菌の分離について

石野珠紀¹, 安藤利恵¹, 山本陽子¹, 沖津忠行²

Isolation of *Legionella* spp. from soil surrounding hot spring wells

Tamaki ISHINO, Rie ANDO,

Yoko YAMAMOTO and Tadayuki OKITSU

はじめに

レジオネラ症はレジオネラ属菌が原因で起こる感染症で、その病型には肺炎型（レジオネラ肺炎）と感冒様のポンティアック熱とがあり、前者が重篤である。近年、レジオネラ属菌に汚染された浴槽水や冷却塔水を原因とするレジオネラ肺炎の発生が各地で報告されており、特に高齢者、乳幼児あるいは慢性基礎疾患保有者等の免疫機能低下者での発症率が高い。レジオネラ属菌は自然環境に広く分布する土壌性の細菌で、土埃が浴槽水等を汚染する一因になると言われているが、土壌等の自然環境における本菌の分布状況に関する報告例は少ない。

今回我々は、神奈川県西部地域の温泉源泉の周辺土壌について、レジオネラ属菌の有無を直接および増菌培養法で調査し、さらにレジオネラ属菌が疑われる分離株の一部について、遺伝子増幅法の一つであるLAMP（Loop mediated isothermal amplification）法による同定を試みたところ、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1 検査材料

平成19年10～11月の間に、神奈川県西部地域で採取された温泉源泉周辺の表層土壌33検体を供試した。

2 レジオネラ属菌の分離培養法

(1) 直接培養法

田中らによる方法¹⁾に従った。すなわち検体の各々25gを滅菌容器に採り、滅菌水225mlを加えてよく攪拌

した後、30分間静置した。ついで2重滅菌ガーゼにて上清をろ過し、ろ液を6,000rpm 30分間冷却遠心分離後、得られた沈渣に遠沈管内壁を洗いながら滅菌水5mlを加えたものを懸濁液とした。懸濁液1mlについて15分間酸処理（0.2M HCl-KCl buffer pH2.2を1ml添加して混和）を行い、その0.1mlをMWY寒天培地（OXOID）及びWYO α 寒天培地（栄研化学）の各々に塗抹して、37℃、10日間の培養を行った。

(2) 増菌培養法

腐葉土からのレジオネラ属菌の増菌培養法²⁾を用いた。すなわち検体の各々50gに滅菌精製水100mlを加え、33℃、3ヶ月間の培養を行った。その後、このサスペンション1mlを直接培養法と同様に酸処理して、その0.1mlをMWY寒天培地及びWYO α 寒天培地の各々に塗抹して、37℃、10日間の培養を行った。

3 レジオネラ属菌の同定

分離培地上でレジオネラ属菌が疑われる湿潤灰白色、大小不同で淡い酸臭を示す集落について、まず羊血液寒天培地（栄研化学）に塗抹後、ついでBCYE α 寒天培地（栄研化学）に塗抹して両培地とも37℃で24～48時間培養した。

BCYE α 寒天培地に発育し、血液寒天培地には発育しなかった菌株は、BCYE α 寒天培地上の菌株についてグラム染色を実施した。グラム陰性桿菌の形態を示した菌株は同様の菌株について馬尿酸水解試験並びにレジオネラ免疫血清（デンカ生研）による血清型別を行い、それらの結果からレジオネラ菌種を同定した。

さらに血清型別が不能で同定出来なかった菌株についてはLAMP法による遺伝子検査をつぎのとおり試みた。BCYE α 寒天培地で培養した集落を40 μ lの滅菌蒸留水に浮遊させ、レジオネラ検出キットE（栄研化学）を使用して、アルカリ熱抽出後に中和処理した溶液をサンプル溶液とし、6領域を認識する4種類のPrimerにより65℃、60分間の核酸増幅を行い、副産物であるピロリン酸マグネシウム（白色沈殿物質）の濁度の変化をLoopampリアルタイム濁度測定装置（LA-320C、栄研化学）にて測定した。

結 果

1 直接培養法による分離および分離株の血清型別

土壌33検体のうち3検体（9.1%）からレジオネラ属菌が分離され、菌数は各々 8.4×10^1 、 1.6×10^2 、 2.4×10^2 CFU/gであった。3検体由来株はいずれも分離培地上でレジオネラ属菌であることが濃厚に疑われる集落を形成し、BCYE α 寒天培地に発育し、血液寒天培地には発育しないグラム陰性桿菌で、レジオネラ属菌と同定でき

1. 神奈川県衛生研究所地域調査部小田原分室
〒250-0042 神奈川県小田原市荻窪350-1
2. 同上（現、藤沢市保健所）

表1 レジオネラ属菌の分離結果一覧

検体NO.	直接培養法		増菌培養法	
	結果(CFU/g) ^{*1}	分離株血清型	結果(定性) ^{*3}	分離株血清型
1	< 4		—	
2	2.4 × 10 ²	型別不能 ^{*2}	+	<i>L.pneumophila</i> SG1
3	< 4		—	
4	< 4		—	
5	< 4		—	
6	< 4		—	
7	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG1 <i>L.pneumophila</i> SG5 型別不能
8	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG13
9	< 4		—	
10	< 4		—	
11	< 4		—	
12	< 4		—	
13	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG6
14	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG5
15	< 4		—	
16	< 4		—	
17	< 4		—	
18	< 4		—	
19	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG6
20	< 4		—	
21	< 4		+	型別不能
22	< 4		—	
23	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG6 型別不能
24	< 4		—	
25	1.6 × 10 ²	型別不能	+	型別不能
26	< 4		—	
27	8.4 × 10	型別不能	+	<i>L.pneumophila</i> SG5
28	< 4		—	
29	< 4		—	
30	< 4		+	<i>L.pneumophila</i> SG2 <i>L.pneumophila</i> SG6 型別不能
31	< 4		+	型別不能
32	< 4		+	型別不能
33	< 4		—	

*1: CFUはコロニー形成単位, <4は検出限界.

*2: 型別不能は市販レジオネラ抗血清(デンカ生研)に凝集せず.

*3: —は不検出, +は検出.

た。しかしながら、市販レジオネラ抗血清のいずれにも非凝集で血清型別は不能であった（表1）。

2 増菌培養法による分離および分離株の血清型別

土壌33検体のうち13検体（39.4%）からレジオネラ属菌が分離された。13検体中 *Legionella pneumophila* が9検体（69.2%）分離され、それら分離株の血清型の内訳は *L. pneumophila* SG1が2検体、*L. pneumophila* SG2が1検体、*L. pneumophila* SG5が3検体、*L. pneumophila* SG6が4検体、*L. pneumophila* SG13が1検体であった（うちSG1およびSG5、SG2およびSG6は同一検体から各1例同時に分離された）。その他、分離培地上でレジオネラ属菌であることが濃厚に疑われる集落を形成し、BCYE α 寒天培地に発育し、血液寒天培地には発育しないグラム陰性桿菌で、市販レジオネラ抗血清のいずれにも非凝集の型別不能株7菌株（7検体由来）をレジオネラ属菌とした（表1）。

3 LAMP法によるレジオネラ属菌の同定

直接または増菌培養法で分離同定したが、市販抗血清のいずれにも非凝集で、型別不能であった分離株が10菌株認められた。これらについて、レジオネラ属菌に特異的な16SrRNAをコードするDNA領域の一部を増幅するLAMP法、並びに馬尿酸水解試験を行ったところ、10菌株すべてがLAMP法でレジオネラ属菌陽性、馬尿酸水解試験では陰性を示した。（表2）

考 察

レジオネラ属菌は、温泉源泉周辺の土壌から直接培養法で9.1%、増菌培養法では39.4%の割合で分離され、本菌が土壌性細菌として自然環境に広く分布することを

支持できる結果であった。源泉周辺土壌の汚染が直ちに温泉浴場水の汚染に関与するとは思われないが、土埃が浴場水の汚染の原因となり得ることは強く示唆されたと見えよう。

今回のレジオネラ属菌分離率は、直接培養法で9.1%であったが、増菌培養法では39.4%と高い割合を示し、増菌培養法が本菌の分離に有用な手段であることも分かった。この分離率の差は、培養に7~10日間必要とするレジオネラ属菌の直接培養法では、土壌中の真菌などが分離培地上に夾雑微生物として発育することによって、本来のレジオネラ属菌の発育を妨害してしまうことが推測されるが、増菌培養法では3ヶ月の間に真菌などは死滅し、レジオネラ属菌は土壌中に生息するアメーバ内で増殖し高率に分離培養できたと思われる。一部検体について増菌培養途中の培養液を鏡検したところ、アメーバが観察できることを確認した。

レジオネラ属菌の同定では、直接培養法で分離された3菌株とも菌種同定することができなかった。一方、増菌培養法では *L. pneumophila* が高率に分離されるようになった。これはもともと土壌中には *L. pneumophila* が広範に分布しており、本菌種および本菌種の宿主となるアメーバの増殖に適した増菌環境を与えられたことにより、他のレジオネラ菌種よりも優勢に増殖した結果とも考えられるが、この点はさらなる同様の調査を行い確認する必要がある。いずれにしても浴槽水のような有機物の豊富な環境は、レジオネラ属菌およびアメーバの増殖に好適であることは間違いなく、設備の適切な維持管理を怠ると *L. pneumophila* が優勢に分離されるような増菌環境になり得ると予想される。

表2 レジオネラ属菌市販抗血清に非凝集の菌株の性状

	検体 No.	グラム染色 形態	L-システイン 要求性	馬尿酸水解 試験	抗血清 凝集	LAMP法
直 接 法	2	GNR ^{*1}	+	-	UT ^{*2}	+
	25	GNR	+	-	UT	+
	27	GNR	+	-	UT	+
増 菌 法	7	GNR	+	-	UT	+
	21	GNR	+	-	UT	+
	23	GNR	+	-	UT	+
	25	GNR	+	-	UT	+
	30	GNR	+	-	UT	+
	31	GNR	+	-	UT	+
	32	GNR	+	-	UT	+

*1 GNR: グラム陰性桿菌

*2 UT: 型別不能

2005年の段階でレジオネラ属菌は50菌種、72血清型が認められている²⁾。本菌の同定では、BCYE α 寒天培地に発育しシステイン不含BCYE α 寒天培地（血液寒天培地で代用できる）に発育しないグラム陰性桿菌がレジオネラ属菌と推定されるが、入手可能な診断用抗血清の種類が限られているため、血清型が特定出来ないことも多い。本調査においても直接または増菌培養法で分離された分離株21株中10株については、市販抗血清で血清型の特定はできなかった。しかしながらこれら10株は全て、LAMP法によりレジオネラ属菌特異遺伝子を保持することが確認された。レジオネラ肺炎の原因菌として問題視される*L. pneumophila*をはじめ、疫学調査の際に実施される環境材料中のレジオネラ属菌の検査に、LAMP法等の遺伝子検査法の導入は有用で、特に環境材料中の遺伝子を直接検出するような活用が期待される。

今回の調査において、土壌中にはレジオネラ属菌が高率に存在することが、増菌培養法の結果から改めて証明された。増菌培養法は土壌に滅菌水を入れて放置した

けのものであったが、実際の浴槽水中にはレジオネラ属菌が増殖するための栄養分がたくさん含まれていると考えられるので、かけ流しの温泉水であっても定期的に浴槽の洗浄等の管理が不可欠である。また、テーマパークのような入浴施設では特に衛生管理が望まれる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、検体採取にご協力いただいた小田原保健福祉事務所温泉課、横山洋司課長はじめ課員の皆様に深謝いたします。

（平成20年7月28日受理）

文 献

- 1) 田中忍, 木股裕子, 南出正之, 貫名正文: 神戸市における*Legionella*検査の状況 (H15~H17), 神戸市環境保健研究所報, 34, 43-46 (2006)
- 2) 小出道夫: レジオネラ感染症ハンドブック, 斉藤厚編, 38-43, 日本医事新報社, 東京 (2007)