

22. レジオネラ属菌の生息環境と遺伝的特徴との関連性

○小松 頌子 (神戸市健康科学研究所 感染症部)

【研究目的】

Legionella pneumophila を対象とする尿中レジオネラ抗原検査キットの汎用により、レジオネラ症の起
因菌としては *L. pneumophila* が最も主要となっているが、他の菌種による症例も報告されている。我々
はこれまでに浴槽水・冷却塔水・河川・土壌等から *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌種を分離して
きた。レジオネラ症の感染源・感染経路を把握するには、環境中のレジオネラの挙動を理解する必要が
あるが、これらレジオネラ属菌種についての研究はあまり進んでいない。本研究では、種々の環境から
分離されたレジオネラ属菌を用いて、生存環境・経時的観点から、それらの特性について明らかにする
ことを目的とした。

【材料と方法】

1. 調査対象

対象菌種は、臨床検体から分離報告がある *L. longbeachae*、*L. londiniensis*、*L. micdadei* とした。*L.*
longbeachae は、神戸市で 2004 年¹⁾ (患者由来 1 株、土壌由来 1 株) と 2022 年²⁾ (患者由来 1 株、環境
由来 2 株) に発生した散発事例の関連株を用いた。*L. londiniensis* は 126 株 (浴場施設由来 117 株、冷却
塔由来 4 株、土壌由来 3 株、下水由来 2 株)、*L. micdadei* は 72 株 (浴場施設由来 68 株、河川由来 4 株)
を解析した。

2. *L. longbeachae* の解析

(1) 尿中レジオネラ抗原検査キットに対する反応性: 10^9 CFU/mL に調整した菌液を用いて、リボテスト
®レジオネラ (極東製薬工業)、イムノキャッチ®-レジオネラ (栄研化学)、Binax-NOW™ レジオネラ
(Abbott) の添付文書に従い実施した。リボテスト®レジオネラの最小検出感度は、 10^9 CFU/mL の菌液
とその 10 倍・100 倍希釈液を用いて評価した。試験あたりの抗原濃度は 10^8 CFU/test、 10^7 CFU/test、 10^6
CFU/test に相当する。

(2) 選択分離培地における発育性: Miles and Misra 法により、選択分離培地である GVPC 培地 (関東化学)、
MWY 培地 (関東化学)、WYO α 培地 (栄研化学)、非選択分離培地である BCYE α 培地 (関東化学) に
対して、 10^8 CFU/mL から 10^0 CFU/mL までの菌液を 20 μ L ずつ滴下接種し、3 日間培養して評価した。

(3) ゲノム解析: DNA は NucleoSpin Tissue kit (Takara) を用いて抽出した。Miseq (Illumina) により全ゲノム
配列を取得し、*L. longbeachae* NSW150 株 (Accession no.; NC_013861.1) をリファレンスとして、Lee³⁾ らの
方法を基に single-nucleotide variants (SNVs) 解析を実施した。

3. *L. londiniensis*・*L. micdadei* の解析

L. londiniensis は、レジオネラ免疫血清 (デンカ) を用いて血清群 (serogroup, SG) 別した。また、既
報⁴⁾を参考に、random amplified polymorphic DNA typing (RAPD-PCR) による遺伝子型別を行った。

【結果】

1. *L. longbeachae* の解析結果

(1) 尿中レジオネラ抗原検査キットに対する反応性

2022年事例はリボテスト®レジオネラにより診断されたことから、分離菌株を用いて3種の尿中レジオネラ抗原検査キットに対する反応性を評価した結果、リボテスト®レジオネラでは陽性、イムノキャッチ®-レジオネラ、Binax-NOW™レジオネラでは陰性であった（図1）。また、抗原濃度 10^7 CFU/test 以上でリボテスト®レジオネラ陽性となった（図2）。



リボテスト®レジオネラ Binax-NOW™レジオネラ イムノキャッチ®-レジオネラ

図1 3種の尿中レジオネラ抗原検査キットに対する反応性の比較（参考文献2の改変）

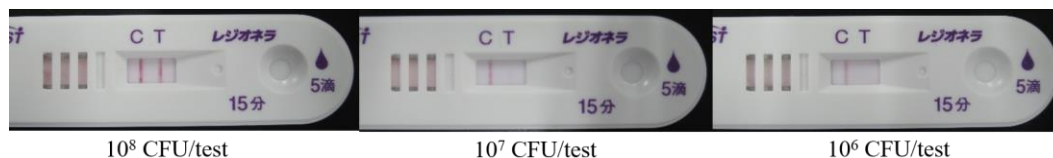


図2 リボテスト®レジオネラに対する反応性の評価（参考文献2の改変）

(2) 各選択分離培地における発育性

2022年事例では患者喀痰培養検査で用いた3種の実験分離培地のうちMWY培地でしか菌分離できなかったことから、分離菌株の各選択分離培地における発育性を評価した結果、非選択分離培地であるBCYE α 培地と同等の発育性を示した培地はMWY培地であり、GVPC培地やWYO α 培地とは10~100倍の差があった（図3）。

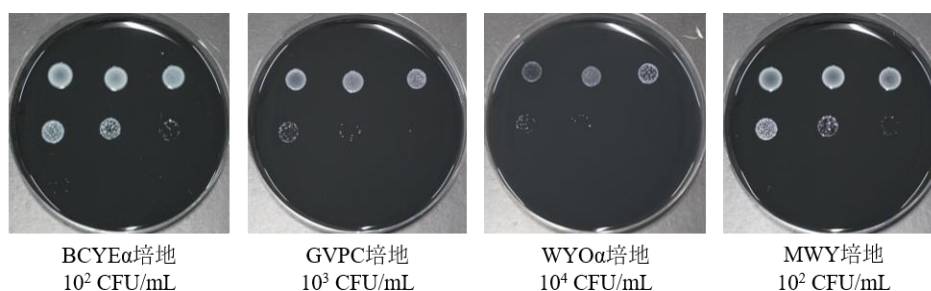


図3 各選択分離培地における発育性の評価（参考文献2の改変）

滴下接種した菌液の濃度は、上段左: 10^8 CFU/mL、上段中央: 10^7 CFU/mL、上段右: 10^6 CFU/mL、中段左: 10^5 CFU/mL、中段中央: 10^4 CFU/mL、中段右: 10^3 CFU/mL、下段左: 10^2 CFU/mL、下段中央: 10^1 CFU/mL、下段右: 10^0 CFU/mL。発育が認められた最小の菌液濃度を各培地の写真の下部に示した。

(3) SNVs 解析

2004年と2022年の散発事例における患者由来株と土壌由来株間のSNVsは、それぞれ250個、350個程度となった（図4）。

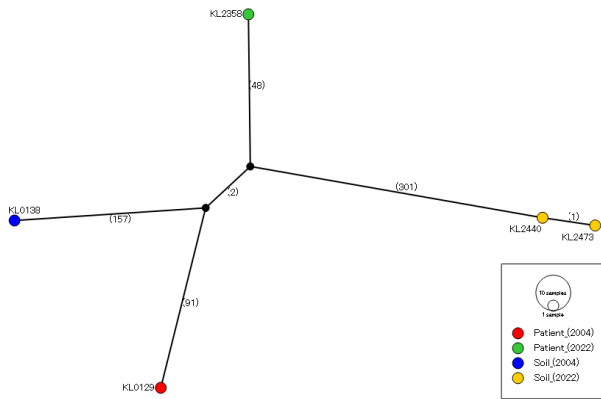


図4 レジオネラ症事例関連株（5株）のSNVsに基づくハプロタイプネットワーク図

2. *L. micdadei* の解析結果

RAPD-PCR のバンドパターンから *L. micdadei* 72 株は4つの clade に分けられた (図5)。河川由来株は浴場施設由来株とともに、Clade 4 に含まれた。また、*L. micdadei* が経年的に分離されている浴場施設 A, B, C に着目したところ、浴場施設 A に由来する8株は全て Clade 2 に含まれたが、浴場施設 B, C に由来する株は複数の clade に含まれた。

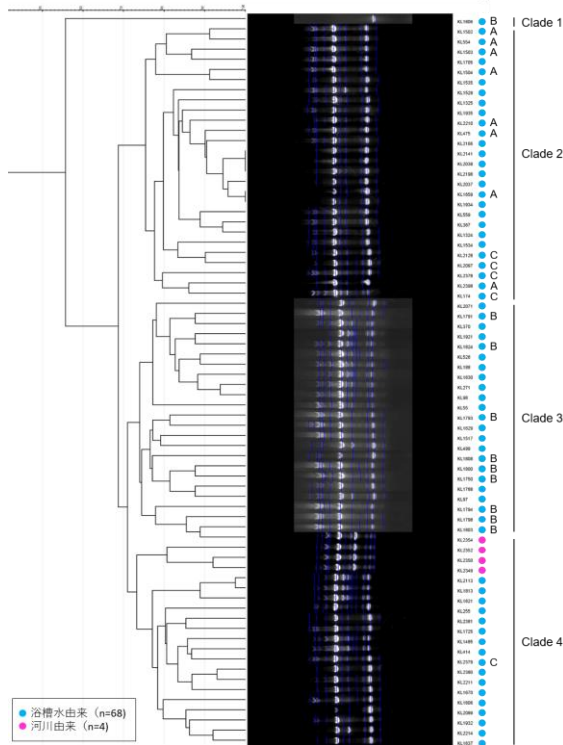


図5 *L. micdadei* の RAPD-PCR による遺伝子型別

3. *L. londiniensis* の解析結果

L. londiniensis 126 株の血清群の内訳は SG1 48 株、SG2 42 株、SGUT (untypable) 36 株であった。RAPD-PCR のバンドパターンから 126 株は5つの clade に分けられた (図6)。各 clade に SG1 と SG2 が混在し、Clade 3, 6 には由来の異なる株が含まれた。また、*L. londiniensis* が経年的に分離される浴場施設 X, Y, Z から分離された株は複数の clade に含まれた。

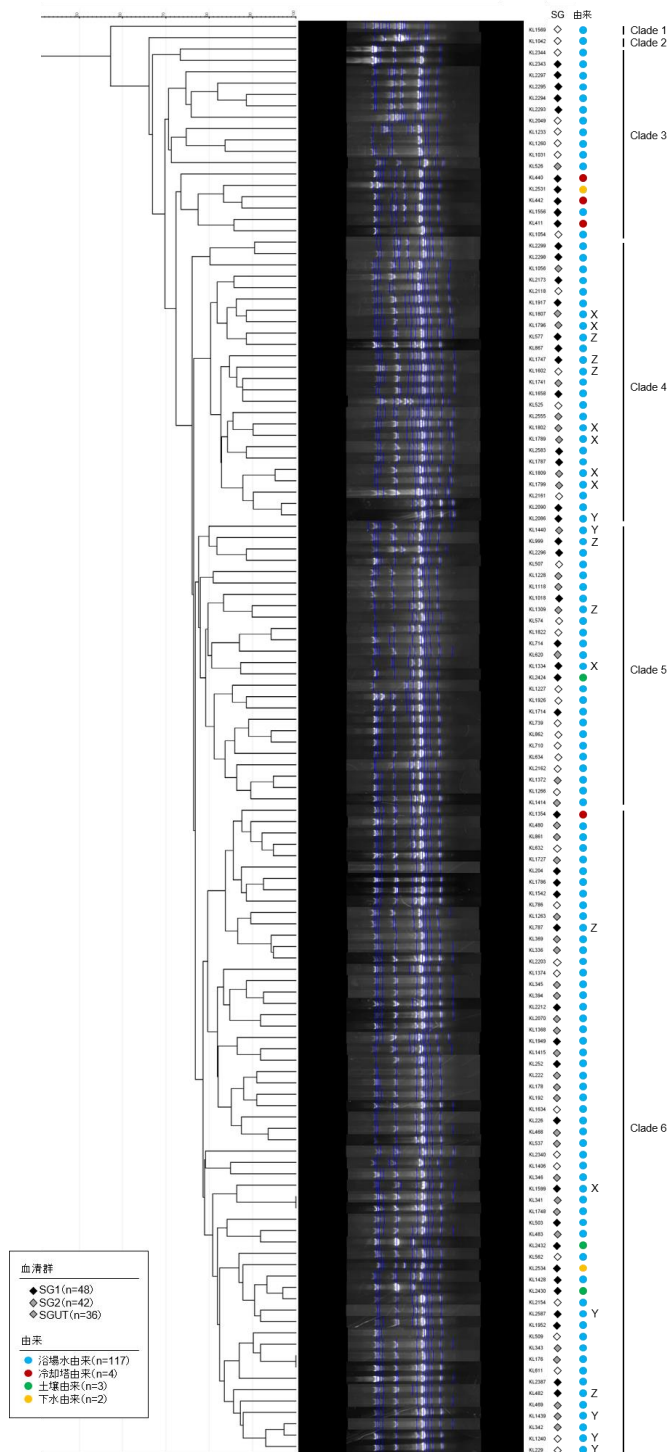


図6 *L. londiniensis* の RAPD-PCR による遺伝子型別

【考察と今後の課題】

本研究では、*L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌種で、臨床報告のある *L. longbeachae*、*L. londiniensis*、*L. micdadei* の細菌学的・遺伝的特徴を解析した。本邦で市販されている尿中レジオネラ抗原検査キットの対象は *L. pneumophila* であるが、*L. longbeachae* も抗原濃度 10^7 CFU/test 以上であればリボテスト®レジオネラ陽性となることが明らかとなった。抗原濃度 10^3 CFU/test で陽性となる *L. pneumophila* と比較すると、*L. longbeachae* の検出感度は著しく劣るものの、本キットでの診断も可能となることが示唆された。尿中レジオネラ抗原検査により診断された症例の中には、*L. pneumophila* 以外の菌種によるものも

含まれている可能性があるため、喀痰からの菌分離は感染源特定のために重要である。2022年事例では喀痰から *L. longbeachae* が分離されたことから、*L. longbeachae* の主な感染源である土壌を調査することとなった。本事例の分離株は MWY 培地での発育性が最も良好であったが、菌分離には熱や酸による前処理と複数の選択分離培地の使用が必要であると考えられた。2事例の患者由来・土壌由来株のゲノム解析の結果、それぞれの株間の SNVs 数は約 300 個となり、遺伝的関連性は認められなかった。2~3ヶ月後に環境調査を実施したため、患者が感染したときの土壌環境とは異なっていた可能性も考えられた。

L. londiniensis や *L. micdadei* の RAPD-PCR による遺伝子型別の結果、同一浴場施設で経年的に分離された株が複数の clade に含まれたことから、複数の遺伝系統が定着していると考えられた。また、*L. londiniensis* の各 clade には SG1 と SG2 が混在しており、血清群と RAPD-PCR による遺伝子型に相関は見られなかった。*L. londiniensis* では生存環境に特徴的な遺伝系統は見られなかったが、*L. micdadei* では河川由来株が一つの clade に含まれていたことから遺伝的に近縁である可能性が考えられる。今後は、浴場施設以外の環境株を増やし、ゲノム解析による詳細な系統分類を行い、菌種内の遺伝的多様性と生息環境との関連性について検討したいと考えている。

【参考文献】

1) 田中忍ら, IASR Vol.26 p 247: 2005年9月号, 2) 池成拓哉ら, 日本臨床微生物学会雑誌 34: 214-221, 2024, 3) Lee K, et al., Emerging Infectious Diseases 27: 1509-1512, 2021, 4) Costa J, et al., Applied and environmental microbiology 71(2): 663-671, 2005

【研究業績】

論文発表①: 池成拓哉、池町真実、中西典子、小松頌子、田中忍、(略8名)。2024. 尿中抗原検査により診断し得た *Legionella longbeachae* によるレジオネラ肺炎の1例. 日本臨床微生物学会雑誌 34 (3): 214-221.

論文発表②: 小松頌子、田中忍、野本竜平、向井健悟、中西典子. 2024. 尿中抗原検査により診断し得た *Legionella longbeachae* によるレジオネラ肺炎の一例. IASR Vol. 45 p117-118.

学会発表①: レジオネラ症発生事例における *Legionella longbeachae* の細菌学的・遺伝的特徴 日本防菌防黴学会第51回年次大会(令和6年9月)

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費 1 (リボテスト®レジオネラ)	35,530 円
物品費 1 (アルミブロックインキュベーター 等)	66,319 円
消耗品費 2 (カスタムプライマー)	5,280 円
物品費 2 (デンシトメーター)	158,400 円
消耗品費 3 (Binax-NOW™ レジオネラ、レジオネラ寒天培地 等)	32,172 円
振込手数料	2,310 円
合 計	300,011 円
大同生命厚生事業団助成金+決算利息+口座解約利息 - 税金	300,011 円