

岡山県の土壌におけるレジオネラ菌の調査

杉山 芳宏・宮本 泰子・上岡 香
村上 智美・和田 昌子

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第51号抜刷）

岡山県の土壌におけるレジオネラ菌の調査

An epidemiological study of *Legionella* species from several kinds of soils in Okayama prefecture.

杉山芳宏、宮本泰子、上岡 香、村上智美、和田昌子

まえがき (Introduction)

レジオネラ菌は、1970年代に発見された比較的新しい病原体で、その代表的菌種は *Legionella pneumophila* であり、43種類以上の血清型とその他に数菌種が知られている。近年、屋上冷却水、プール、浴場、温泉などを汚染し、人への集団感染の報告があり、注目されている。また、入院患者など抵抗力が低下したヒトへの感染も発生し、社会的な問題となっている。本菌は、通常、健康人にはあまり感染しない日和見感染病原体ではあるが、多量に菌を吸入した場合は、発症が認められる。その症状は重症のレジオネラ肺炎と軽症のポンティアック熱に分けられる^{1,2)}。我々はこれまで、レジオネラ菌の疫学研究として、津山市の環境水等におけるレジオネラ菌の調査を実施してきた^{3,4)}。レジオネラ感染症は、このように水と関連が深いのが、その水を汚染する原因として土壌に存在するレジオネラ菌が問題となる。そこで、津山市を中心とする岡山県の土壌について、本菌の存在実態を解明するため、調査をおこなった。その結果として、地域の土壌のレジオネラ菌汚染状況など貴重な情報が得られたので報告する。

材料と方法 (Materials and Methods)

土壌の採取：岡山県の河川、湖沼、田、畑および公園などから、砂や土などの土壌を採取した。その内訳は表1に示す通りである。

レジオネラ菌の分離：レジオネラ菌の分離には通常用いられる方法を採用した⁵⁾。採取した砂や土を、滅菌リン酸緩衝液 (PBS) に入れ、良く混和し、静置した。その液相を 50℃、30 分間の熱処理を行った。ただちに 10,000rpm 10 分間遠心して、沈殿を PBS に再浮遊した後、GVPC 寒天培地 (メリビオビュー社) に塗抹して、37℃、7 日間の培養を行った。レジオネラ菌様の半透明の小コロニーを釣菌し、BCYE α 寒天培地で純培養した。また、血液寒天培地で発育の有無を調べて、発育しなかった菌株を以後の同定検査に用いた。レジオネラ菌の同定：血液寒天培地で発育しないレジオネラ様コロニーをグラム染色⁶⁾による染色性と顕微鏡観察による菌の形態を調べ、グラム陰性で長桿菌の形態を示すものを選択した。また、市販抗血清 (生研、Oxoid) による血清型別を実施した。さらに Miyamoto H. ら⁷⁾の報告するプライマーを使用して、PCR による菌種同定を試みた。PCR は、培養増殖した菌コロニーより 1 白金耳の菌を 0.5ml の蒸留水に浮遊させ、100℃、10 分間の熱処理後、ただちに 10,000rpm で遠心した上清を菌の遺伝子サンプルとして、遺伝子増幅用サーマルサークル (PC320 ASTEC) にて、Taq ポリメラーゼ KOD-Dash (TOYOBO) を用いて、95℃ 30 秒、62℃ 30 秒、74℃ 30 秒を 40 サイクルの増幅を実施した。その後、増幅した遺伝子を 2% アガロースの電気泳動により、図1に示されるように増幅された 430bp サイズの DNA を確認した。

表1 岡山県の土壌からのレジオネラの検出

土壌サンプル数	菌検出数	陽性率	
159	22	13.8%	
内訳			
河川の土壌	81	15	18.5%
湖沼の土壌	26	3	11.5%
田の土壌	33	3	9.1%
畑の土壌	8	0	0.0%
公園等の土壌	11	1	9.1%
吉井川沿い	108	13	12.0%
旭川沿い	51	9	17.6%

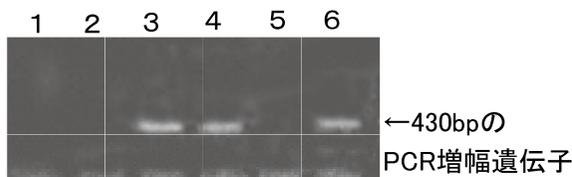


図1 レジオネラのPCR増幅遺伝子の2%アガロース電気泳動像。レーン3, 4, 6にレジオネラの430bpサイズの増幅遺伝子が認められる。

結果および考察 (Results and Discussion)

岡山県の土壌においてレジオネラの検出状況は表1の通りである。岡山県の土壌におけるレジオネラの分離は159サンプル中22サンプル13.8%で検出が認められたが、特に高い検出率ではない。それぞれの土壌の内訳では、河川付近の土壌が81サンプル中15サンプル18.5%で検出された。河川の土壌は湖沼や田、畑などの土壌と比較すると高い傾向は認められたが、有意な差は認められなかった。また、サンプルの採取場所を岡山を流れる吉井川および旭川流域で地理的に分類すると、旭川流域での土壌から本菌の検出率が高い傾向にあるが、有意な差はなかった。同様にそれら河川の上流域と下流域とに分けても、特に検出率に差はなく、県内の土壌をそれほど高率ではないが、広く汚染し、レジオネラが存在していることが明らかとなっ

た。これらの土壌が一般的には、風や水などに運ばれてレジオネラの汚染源となっていることは明らかであるが、レジオネラは一般的に土壌で増殖するのではなく、水中でアメーバなどの原虫に取り込まれて増殖する⁸⁾。すなわち土壌におけるレジオネラは直接的に感染の可能性はないが、その付近の水などを汚染するとその水中のアメーバの棲息と関連して、人への感染の危険性が高まるほどに増殖するものと考えられる。

なおPCR法により、レジオネラ特異遺伝子は確認されたが、市販抗血清によるレジオネラの決定はなされていない。これは、レジオネラ菌の血清型が43種類以上あることから、市販の血清型とは合致しなかったものと考えられる。PCR法は特異度や感度の点で有利な方法であるが、熟練度が必要なことや機器や試薬が高価なことなどの欠点もある。また、夾雑物の多い材料をサンプルとする場合には、PCR反応の阻害物質などにより、特異度や感度も低下することがある。今回の菌種同定には、遺伝子サンプルとして培地上に発育した菌コロニーを用いたのでPCR法の阻害物質は少なく、検査は容易だった。しかし、環境材料から直接レジオネラ菌遺伝子を検出する場合は処理法が煩雑となるが、分離培養法よりも検出感度は高まること予想されることから、今後はPCR法を環境からのレジオネラ菌の検出検査にも導入したいと考えている。

我々はこれまでに、津山市の湖沼の水からのレジオネラ菌の検出を試みたが、湖沼の水からは、季節にも左右されるが、約2~11%程度レジオネラ菌が検出されることが分かっている^{3,4)}。また、サンプル数は数例と少ないが、中浜ら⁹⁾により、岡山南部地域の泥や土壌からレジオネラの検出報告がある。報告では分離頻度には季節が関連し、冬場の土壌からは検出されていない。今回の夏期に採取された土壌においては、検出率は環境水よりも高い傾向にあるものの、国内外でも、高頻度に検出される冷却塔水や風呂水など^{1,10)}と比較しても、特に高い検出率ではなかった。しかし、岡山県の土壌においても広域にレジオネラ菌の存在が明らかとなり、これら土壌の環境水への混入は注意を

要する。

今後も継続して、これら環境材料からのレジオネラの検出を行い、疫学的な解明を行いたいと考えている。

謝 辞

この研究は 美作大学研究助成金および八雲環境科学振興財団の環境研究助成（一般）により実施された。

参考文献 (References)

- 1) 小栗豊子ら著：レジオネラ属菌とレジオネラ症—最近の知見 臨床と微生物 近代出版 Vol.25 P1-75. 1998.
- 2) J.G.HOLT et al. edit.: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Williams & Wilkins. 1994. P86. 108
- 3) 杉山ら 津山市の湖沼、雨、観賞魚の水槽水におけるレジオネラ菌の調査 美作大学紀要 50号 P17-21. 2004.
- 4) 杉山ら、－報告－ 湖沼、雨におけるレジオネラ菌の調査と本菌の簡易培養法に関する検討 大学地域生活科学研究所所報 第1号 P25-30 2004.
- 5) 厚生省監修 / 細菌・真菌検査<第3版> (財)日本公衆衛生協会 レジオネラ F31-49. 1993.
- 6) 医科学研究所学友会編 細菌学実習提要 2版 丸善 顕微鏡による検査法 P7-27. 1998.
- 7) H. MIYAMOTO et al: Development of a new semi-nested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. Appl. Environ. Microbiol. 63. P2489-2494. 1997
- 8) C.M.ANAND et al. Interaction of *L. pneumophila* and free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). J. Hyg. Camb. 91. P 167-178. 1983.
- 9) 中浜 力 岡山地方における *Legionella* 属の環境材料より分離に関する研究 感染症雑誌 57. P643-655. 1983.
- 10) C.B.FLIERMANS et al. Ecological Distribution of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 41. P9-16. 1981.

(2005年12月1日 受理)