

入浴施設から分離された *Legionella pneumophila* の性状解析

中嶋 智子 浅井 紀夫 柳瀬 杉夫

Serological and Polymorphic Analysis of *Legionella pneumophila* Isolated from Bathwater

Satoko NAKAJIMA Norio ASAI Sugio YANASE

Abstract

Serological and polymorphic analysis of *Legionella pneumophila* were carried out using bath water in four different lodging facilities in which three patients of Legionnaires' disease have stayed in Kyoto prefecture. *L. pneumophila* serogroups (SGs) 1, 3, 5, 6, 7 and 12 were detected in 54 isolates from 4 bath water samples. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) subtypings were applied to 27 isolates (SG1,3,5,7), and 10 PFGE patterns were identified. At least 2 different strains of *L. pneumophila* were survived in the same bath tub. Although SG1 strains from the same bath water were divided into 4 subtypes by PFGE, there were slight differences in the results of clustering analysis. On the other hand, SG12 strains from the same bath water were divided into 2 subtypes by PFGE, and they showed quite different patterns. In the case of SG3 strains from the same facility, the same results were obtained as the SG12. The difference of each PFGE patterns may show considerable variation within each. From these analyses, the variance detection and the conditions on survive of *L. pneumophila* were discussed.

キーワード：*Legionella pneumophila*、パルスフィールドゲル電気泳動、血清型別、浴槽水
key words：*Legionella pneumophila*, Pulsed-field gel electrophoresis, Serotyping, Bath water

はじめに

レジオネラ属菌は土、河川、湖沼などの環境中に広く生息し、アメーバなどの原生生物に寄生して増殖する通性細胞内寄生性菌である¹⁾。ヒトでは、本菌に汚染されたエアロゾルを吸入することで感染し、レジオネラ症を引き起こす^{2,3)}。48種のレジオネラ属菌中、ヒトに病原性があるのは *Legionella pneumophila* など、20種のレジオネラ属菌とされている^{2,3)}。

レジオネラ症の発生は1999年から2004年までは毎年、全国で150例前後であったが、2005年から急増し、2009年は712例であった(国立感染症情報センター <http://idsc.nih.go.jp/idwr/index.html> からデータを改変引用)。京都府でも2006年から2009年にかけて64例の患者発生があり、中高年の男性がハイリスクグループとなっている⁴⁾。患者発生の感染源解明には臨床検体からの菌分離が必須だが、国内では血清群(SG)1をターゲットとしたレジオネラ尿中抗原測定でレジオネラ症が確定することもあり、国内の患者株が詳細に検討された報告はあまり多くない。

一方、温泉水など生活環境水からの報告例は多く、検出率はいずれも30%前後とレジオネラ属菌が環境常在菌であることが示され、その多くを占める *L. pneumophila* の血清群(SGs)などの性状解析も行われている^{5,7)}。

今回、2009年、2010年の患者発症事例3例で実施した、患者が発症前に入浴利用した京都府内4施設への立ち入(平成22年9月1日受理)

り調査で、浴槽水などからのレジオネラ属菌の検出を行った。また、分離された *L. pneumophila* については、血清群型別解析とパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を用いた遺伝学的解析を併用して、その生息状況や生態について検討を加えることとした。その結果、1つの浴槽水からでも複数タイプの *L. pneumophila* が分離されることが判明し、比較的にまれに検出されるSG12の検出例もあり、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 材料

表1に今回調査したレジオネラ肺炎患者発生と患者利用施設の概要、試料の一覧を示した。それぞれの事例の患者が発症直前に利用していたA市の社会福祉施設の浴槽水、B市の旅館a、bの内湯と露天風呂の浴槽水、B市の民宿cの浴槽水と源泉の地下水を試料とした。

2. レジオネラ属菌の分離同定と血清型別解析

レジオネラ症防止指針第3版のレジオネラ検査法⁸⁾に従って行った。滅菌ガラスビンにチオ硫酸ナトリウムで中和処理を行った試料を約1L採水し、前処理開始まで冷蔵保存し、採水後1日以内に検査を開始した。

前処理は検水1000 mLから直径47mm、孔径0.45μmのフィルタでろ過濃縮-酸処理法で実施した。選択分離培地はGVPC a (日本ビオメリュー)を用い、事例3ではWYO a (栄研化学)を併用した。36℃で最長7日間

表 1. レジオネラ肺炎患者発生の概要と患者が利用した入浴施設からのレジオネラ属菌数と血清型別 *Legionella pneumophila* の分離状況

	事例 1 A 市	事例 2 B 市		事例 3 B 市	
事例概要					
性別	男性	男性	男性	男性	男性
年齢	78 歳	59 歳	59 歳	71 歳	71 歳
病型	肺炎型	肺炎型	肺炎型	肺炎型	肺炎型
診断法	尿中抗原	尿中抗原	尿中抗原	尿中抗原	尿中抗原
施設利用日	定期的に利用	2009/12/11	2009/12/12	2010/1/28-29	2010/2/4
発症日	2009/2/9	2009/12/15	2009/12/15	2010/2/4	2010/2/4
診断日	2009/2/10	2009/12/22	2009/12/22	2010/2/9	2010/2/9
利用施設	社会福祉施設	旅館 a		旅館 b	
試料番号	1	2	3	4	5
採水日	2009/2/11	2009/12/25		2009/12/25	
採取場所	循環式給湯風呂	温泉浴場	露天風呂	温泉浴場	露天風呂
試料	浴槽水	内風呂	浴槽水	内風呂	浴槽水
<i>Legionella</i> 属菌の検出	検出	検出	検出	検出せず	検出せず
菌数 (cfu/100 mL)	2,400	79	<10	<10	<10
検出した <i>L. pneumophila</i> の血清型別検出数					
血清型 1					15
血清型 3		1	8		
血清型 5			1		11
血清型 6					1
血清型 7		9			
血清型 12	8				

尿中抗原の測定はいずれもイムノクロマト法
cfu/100 mL; number of colony-forming units present in 100 mL of water.

湿潤培養し、出現したレジオネラ属菌コロニー数を計数して、試料 100mL あたりのレジオネラ属菌数 (cfu/100mL) とした。

レジオネラ属菌を検出した試料ではレジオネラ属菌の特徴を持つコロニーの出現数が多かったため、培養日数やコロニー個々の特徴を変えて、それぞれ代表的と考えられるコロニーで釣菌を実施した。その後、BCYE *a* と BCY *a* (日本ビオメリュー) を用いて L- システイン要求性確認と純培養を行った。得られた菌株で、グラム染色、ラテックス凝集反応 (*Legionella* Latex Test Kit, OXOID)、*L. pneumophila* 免疫抗血清 (デンカ生研) による凝集、一部、LAMP 法 (*Legionella* Detection Kit-E, 栄研化学) も実施し、レジオネラ属菌、あるいは、*L. pneumophila* と同定し、SGs を決定した。

3. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子型別解析

分離した *L. pneumophila* 27 株を用いて、PFGE による遺伝子型別解析を行った。PFGE 法は、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル (<http://www.nih.go.jp/niid/reference/pathogen-manual-60.pdf>) を元にした久高らの変法⁹⁾ に従い、B. Chang らの方法¹⁰⁾ を参考に proteinase K (和光純薬) の処理時間を 2 時間で実施した。DNA の制限酵素処理は *Sfi* I (Roche) で 1 ゲルブロックあたり 20units、50℃ 一晩で実施した。電気泳動は、スイッチタイム 5-50 秒、6.0V/cm、泳動時間 18 時間、泳動バッファー 44.5mM トリス-ホウ酸-1mM EDTA バッファー (x0.5TBE、

和光純薬)、温度 13.5℃ の条件で、CHEFF-DR1I (Bio-Rad) で行った。PFGE の分子量マーカーには *Xba* I (Roche) 処理の *Salmonella* Braenderup H9812 を用いた。泳動像からバンドの有無を目視で判定して、画像解析ソフト Lane & Spot Analyzer ver.6.0 と Lane Analyzer ver.3.0 (アトー) を使用し、各バンドの分子量を求めた。

菌株ごとに制限酵素切断によって得られたバンド数、各バンドを約 100kb ごとにグループ化した分子量、総分子量などを変数として正規化し、ユークリッド距離を計算してデンドログラムを作成した。但し、分子量データでバンドが出現していない場合はその菌株の分子量データは 0 とし、100kb 内に 2 バンドある場合は適宜グループを分割した。クラスター分析の計算には Black-Box (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/BlackBox.html>) を使用した。

結果

1. レジオネラ属菌の分離と血清型別解析について

表 1 にそれぞれの試料から得られたレジオネラ属菌の検出結果、レジオネラ属菌の菌数と分離株 *L. pneumophila* の血清型別結果を示した。事例 1、A 市の社会福祉施設の浴槽水 (試料 1)、事例 2、B 市の旅館 a の浴槽水 (試料 2、3)、事例 3、B 市の民宿 c の浴槽水 (試料 6) の 4 試料から *L. pneumophila* が検出され、旅館 a の露天風呂浴槽水 (試料 3) 以外は、いずれも 10cfu/100mL の公衆浴場のレジオ

オネラ属菌の基準値を超過していた。これら基準値を超過していた施設では入浴設備の洗浄と点検を実施し、自社実施による再検査でレジオネラ属菌が基準値以下であることを確認後、入浴施設使用が再開されている。

分離した54株の血清型は、事例1では8株すべてがSG 12、事例2の内湯ではSG 7が9株、SG 3が1株、露天風呂ではSG 3が8株、SG 5が1株、事例3の浴槽水からはSG 1が15株、SG 5が11株、SG 6が1株であった。

事例3の浴槽水（試料6）の一部で、コロニー性状とSGsの関係を検証した。培養2～3日目に出現し始めたコロニーは7株中6株がSG 1で、1株がSG 5、培養4～6日目に出現し始めたコロニーでは9株中3株がSG 1で、6株がSG 5であることを確認した。また、SG 1は灰白色湿潤コロニー、SG 5は青みがかった灰白色湿潤コロニーで、わずかに色調が異なった。

2. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子型別解析について

分離した *L. pneumophila* 54株中27株で、PFGEによるDNA遺伝子多型解析を実施し、目視で10種類のパターン(I～X)に便宜上の分別をした。27株に菌株番号を付し、SGsの結果とともに表2に示し、得られたPFGE像を図1に示した。

SGsが異なる株では、PFGEパターンも互いに異なっていた。同一のSGsでは、事例1のSG12の6株(1-1～8)では明らかに異なる2種類のパターン(I、II)が検出された。事例2のSG3の6株(2-5、3-7,8,11,17,18)では、内湯から分離された1株(2-5、IV)は、露天風呂から分

離された5株(3-7,8,11,17,18、V)と異なっており、内湯のSG7の5株(2-1,2,6,12,14)はすべて同じ(III)であった。

表2. 分離された *Legionella pneumophila* の血清型別と目視によるパルスフィールドゲル電気泳動像のパターン分け結果

事例番号	試料番号	菌株番号	血清型	PFGE * 型別
1		1 - 1	12	I
		1 - 2	12	I
		1 - 3	12	II
		1 - 4	12	II
		1 - 5	12	II
		1 - 6	12	II
		1 - 7	12	II
		1 - 8	12	II
2		2 - 1	7	III
		2 - 2	7	III
		2 - 5	3	IV
		2 - 6	7	III
		2 - 12	7	III
		2 - 14	7	III
		3 - 7	3	V
		3 - 8	3	V
		3 - 11	3	V
		3 - 17	3	V
		3 - 18	3	V
3		6 - 17	1	VII
		6 - 18	1	VIII
		6 - 19	1	IX
		6 - 20	1	X
		6 - 21	1	VIII
		6 - 22	5	VI
		6 - 23	5	VI

事例番号と試料番号は表1. に示した。

*: 目視によるPFGE型別で同じパターンごとに便宜的に番号分けした。

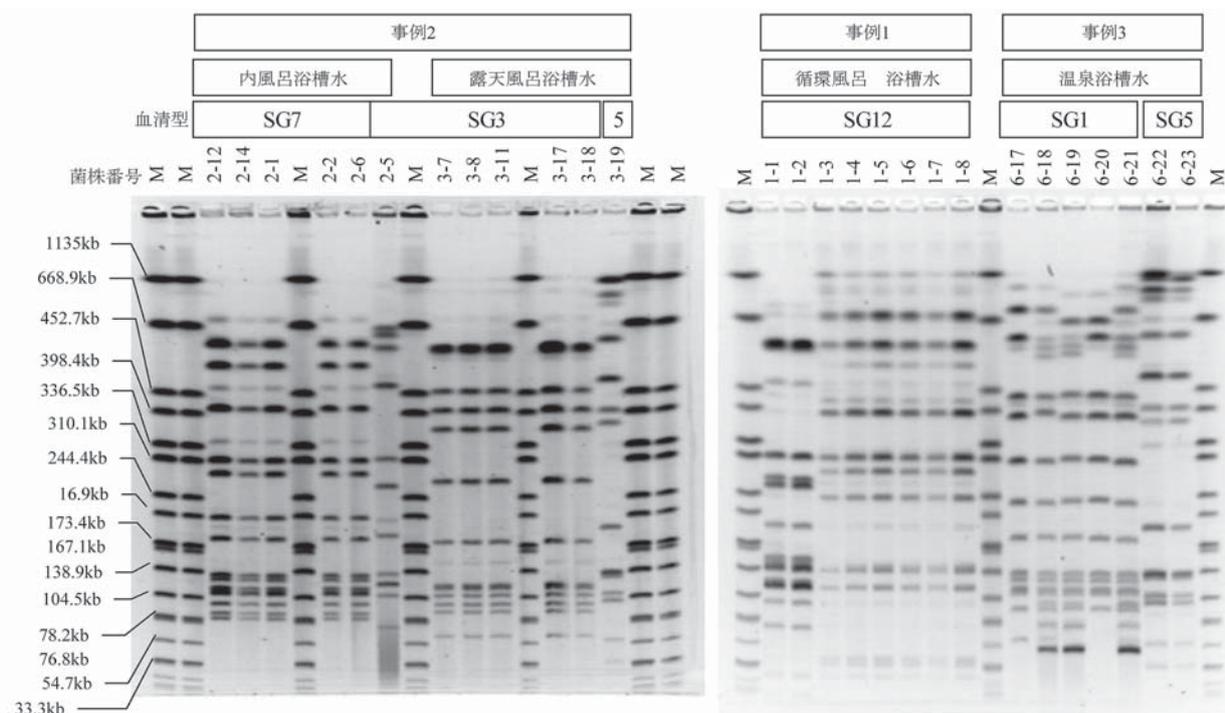


図1. 分離された *L. pneumophila* のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 像
 レーン下段の番号は表2. の菌株番号に対応する。菌株番号の上段に分離菌の由来と血清型 (SGs) を示す。
 レーン M は分子量マーカー、*Xba* I 処理した *Salmonella* Braenderup strain H9812

事例3のSG1では5株(6-17~21)は4種類(VI、VII、VIII、IX、X)に分類できたが、分子量濃度が濃い主要なバンドパターンは5株とも互いによく似ていた。また、SG5の2株(6-22,6-23)は同じで、事例2のSG5(3-19)とも同一(VI)であった。

PFGEから得られたバンドの分子量データを24グループに細分し、クラスター分析を実施した。データ変数をバンドの分子量データのみと、バンド出現数や総分子量、血清型などのデータ変数を加えた場合について検討したが、クラスター融合に大きな差異はみられなかった。そこで、得られた24バンドの分子量を変数としてワード法と最近隣法でデンドログラムを作成し、図2に示した。両方法ともPFGEパターンを目視で判断した分類(表2)で同一としたものは互いに非常に近いクラスターとなった。また、SG1の4種類にあまり大きな差異はなく、SG3の2種類は互いの差異が大きい結果であった。SG5の3株は他のSGsに比べ、一番遠いクラスターに分類された。

一方、ワード法と最近隣法では融合クラスターの判別順位に差異が生じた場合もあった。SG3の菌株2-5はワード法ではSG1の5株に近いが、最近隣法ではSG12のパターンIIにより近く、次にSG1に近い結果を示した。また、SG12の8株IとIIの差異はワード法で近く、最近隣法で遠い判断となった。

考察

レジオネラ属菌の分離と*L. pneumophila*の血清型別解析およびPFGEによる遺伝子型別解析の結果から以下の考察を行なった。

1. 入浴施設からのレジオネラ属菌の検出について

それぞれ患者発生事例との関連調査ではあるが、今回4施設中3施設、特に浴槽水では6試料中4試料と*L. pneumophila*が高頻度で検出され、事例1では2,400cfu/100mLと菌数も非常に多い結果となった。鈴木ら⁵⁾は、レジオネラ属菌の汚染率は公衆浴場や旅館などの30%程度に比べ、個人住宅、社員寮・社会福祉施設では50~70%と高いとしている。また、古畑ら⁶⁾は温泉水中のレジオネラ属菌数は100cfu/100mL未満が48%で、内湯や循環式給湯ではその菌数が高くなる傾向があるとされている。烏谷ら⁷⁾は、かけ流し温泉では100cfu/100mL未満が63%で、循環式浴槽の調査^{6,11)}と比較すると低濃度側に分布していたとしている。事例1はこれら報告での汚染リスクを高める要因をもつ事例に該当することから、事例2、3の検出例に比べても非常に多い菌数であったのではないかと考えた。また、緒方ら¹²⁾は塩素濃度を0.2mg/L以上で管理された循環式浴槽水試料からのレジオネラ属菌数の検出率は低く、その菌数も少なかったと報告している。塩素消毒によるレジオネラ属菌の管理手法には問題点も指摘されているが¹³⁾、事例1で採水時の塩素濃度が0.05mg/L未満であったことも高い菌数が検出された要因ではないかと考えた。今回の試料では試料3露天風呂のレジオネラ属菌数が最も少なかったことも以前の報告^{6,7)}と類似する結果と考えられた。

2. 入浴施設での*Legionella pneumophila*の生息状況

旅館aのSG3を示した6株は、露天風呂で検出された1株(2-5)と内湯で検出された5株(3-7,8,11,17,18)ではPFGEパターンが大きく異なり、クラスター分析による相同性も互いに低かったことから由来そのものが異なる

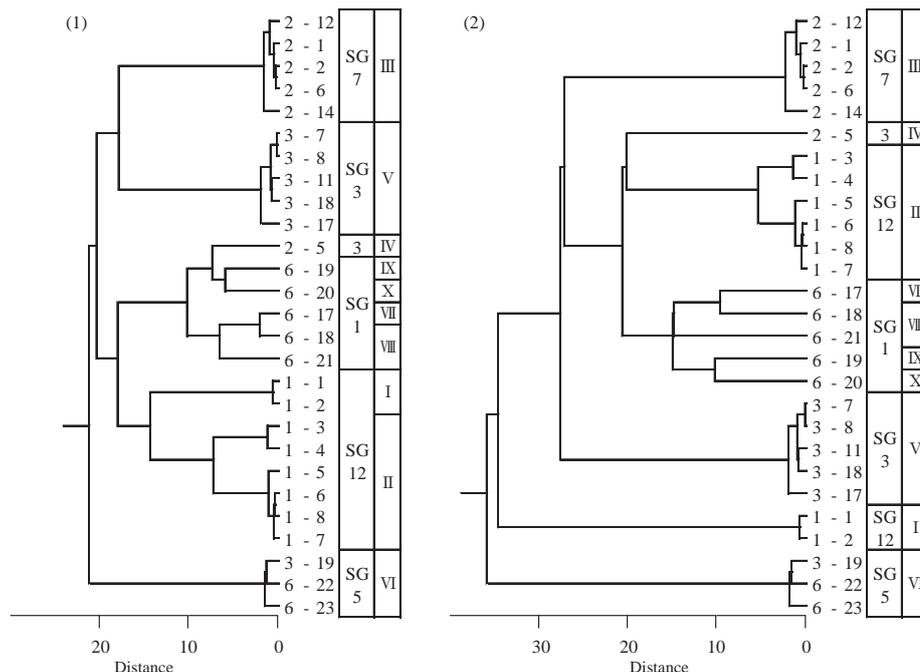


図2. 分離株のPFGE解析結果から作成したデンドログラム

(1) Ward法 (2) 最近隣法。

菌株番号は表2に示した。菌株番号の右側に分離菌のPFGEパターン分類番号と血清型(SGs)を示す。

ると考えられた。通性細胞内寄生性菌である本種¹⁾は宿主の原生生物の生息状況も含め、生息環境により様々なタイプのレジオネラ属菌が生息すると予測される。内湯で菌数多い傾向がある⁶⁾とされているが、菌数の多寡は、環境によって生存できるレジオネラ属菌が異なるためとも考えられた。加えて、本事例では同じ施設内であってもSGsのみの判断で由来が同一とは判断できないことを示し、今回は患者由来株の調査を実施していないが、菌株由来の疫学調査には複数の検査手法を併用し、判断を行う必要性が改めて確認できた。

水系や水質により *L. pneumophila* の血清型や遺伝子型などに違いがあることは従来から広くいわれている^{6-7,9,12-13)}。前述の旅館 a の SG 3 の例も含め、今回の調査結果では SG 5 の 3 株以外は、試料や採水場所が異なり互いに血清型も遺伝子型も大きく異なる株が分離され、それぞれの環境に適した *L. pneumophila* が生息していたと考えられた。

しかし、今回、環境が同じと考えられる同一の試料内で、少なくとも 2 タイプ以上の *L. pneumophila* が同時に生息していたことを確認し、*L. pneumophila* の多様な生息状況が明らかとなった。また、事例 3 の試料 6 では血清型や遺伝子型が異なると、コロニー生成時間やその形状・色調などの特徴に違いがあることが観察され、本属の検査にはより緻密な手技が要求されることも確認できた。

2007 年 8 月から 2008 年 6 月の 43 事例 44 株の臨床分離株では 42 株が *L. pneumophila* で、うち、35 株が SG 1 であったと報告され¹⁴⁾、SG 1 は冷却塔・循環式浴槽からの検出頻度が高い^{5,9,12,15)}とされている。久高ら¹⁰⁾は冷却塔と循環式浴槽では SG1 は遺伝学的に異なる傾向を示すと述べている。一方、Ragull et al.¹⁵⁾は、冷却塔の SG 1 では遺伝子型は多様だが、地理的に近い地域や試料採取期間が短期間であると比較的似たタイプの遺伝子型に分類されると述べている。今回、試料 6 で検出された SG 1 の 5 株は、PFGE パターンはそれぞれ小さな違いがあるものの互いに近似したパターンを示し、クラスター分析もその結果を裏付けるものであった。1 回のみ調査であるため、SG 1 の遺伝子変異の時間的経過を検討することはできないが、SG 1 はその生息環境により小さな遺伝子的変異を常に起こすことで環境に適応する性状を獲得していくタイプといえるかもしれない。血清型別での細菌の分類と制限酵素による細菌の DNA 分類では異なる観点から細菌を分別している可能性があり、SG 1 が網羅している strain 幅の問題である可能性も考えられる。しかし、SG 1 の検出頻度が高いとされている冷却塔や循環式浴槽、あるいはヒトの体内といった環境は、*L. pneumophila* にとって非常に劇変しやすい環境と考えられ、多様な環境にもより素早く適応できるタイプである SG 1 が生存しているともいえるのではないだろうか。同様に、試料 1 から分離された SG 12 が明らかに異なる遺伝的 2 型を示したことも SG 12 が SG 1 同様に環境適応能力に優れたタイプであることを示しているのかもしれない。

一方、B 市から異なった時期に分離された SG5 の 3 株は、血清型も遺伝子型も互いに同じで、他の分離株とは遺伝的にも遠い分類結果となった。Ragull et al.¹⁵⁾が SG 1 について述べているように、環境に常在するレジオネラ属菌の場合、同一地域では同じ起源をもつ菌が生息し、今回の調査であれば、それぞれ浴槽水という生存に適した環境で生息していたという可能性があるかもしれない。あるいは、SG 5 は SG1 などとは異なり、PFGE から判別できる遺伝的な変異がなくとも浴槽水という環境に適応できるタイプであるのかもしれない。

いずれにしても *L. pneumophila* は、その宿主生物となる原生生物の環境適応性や生息環境での多様性という要因が加わるので、その生息状況はより複雑で結果として非常に多様性に富むと予想され、今回の性状解析は多くの示唆を含む結果となったと考えられた。

謝辞

試料採取にあたりご尽力いただいた保健所職員の皆様に深謝します。

引用文献

- 1) Winn, Jr. W.C. 1994. Genus I. Legionella. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2PartB (Garrity G.M., eds.). pp. 212-236, Springer, East Lansing, USA.
- 2) Yu V.L., Plouffe J.F., Pastoris M.C., Stout J.E., Schousboe M., Widmer A., Summersgill J., File T., Heath C. M., Paterson D. L., Chereschsky A. 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired Legionellosis: An international collaborative survey. JID, 186,127-128.
- 3) Fields B. S., Benson R. F., and Besser R. E. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25years of investigation. Clinical Microbiology Reviews. 15, 506-526.
- 4) 中嶋智子, 奥村真友美, 棟久美佐子, 柳瀬杉夫. 2008. 京都府感染症情報センター感染症発生動向調査 (2008 年) — 全数把握感染症一. 京都府保健環境研究所年報, 54, 15-19.
- 5) 鈴木敦子, 市瀬正之, 松江隆之, 天野祐次, 寺山武, 泉山信司, 遠藤卓郎. 2002. 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況—1996 年 4 月から 2000 年 11 月まで—. 感染症誌, 76,703-710.
- 6) 古畑勝則, 原元宣, 吉田真一, 福山正文. 2004. 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況. 感染症誌, 78,710-716.
- 7) 烏谷竜哉, 黒木俊郎, 大谷勝実, 山口誠一, 佐々木美江, 齊藤志保子, 藤田雅弘, 杉山寛治, 中嶋洋, 村上光一, 田栗利紹, 藏元強, 倉文明, 八木田健司, 泉山信司, 前川純子, 山崎利雄, 縣邦雄, 井上博雄. 2009. 掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子. 感染症誌, 83,34-44.
- 8) 厚生省生活衛生局企画課監修. 2009. レジオネラ属菌の検査法. pp28-36, レジオネラ症防止指針第 3 版, 財団法人ビル管理教育センター, 東京.
- 9) 久高潤, 糸数清正, 平良勝也, 仁平 稔, 大野 惇. 2006. パルス

- フィールド電気泳動法による環境由来 *Legionella pneumophila* 血清群 1 の遺伝子多型解析. 沖縄県衛生環境研究所報, 40,77-81.
- 10) Chang B., Amemura-Maekawa J., Watanabe H. 2009, An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of pulsed-field gel electrophoresis agarose plugs for the analysis of *Legionella* isolates. Jpn. J. Infect. Dis., 62, 54-56
- 11) 笹原武志, 菊野理津子, 奥田舜治, 関口朋子, 佐藤義則, 高山陽子, 青木正人, 井上松久. 2004. 温泉水における *Legionella* 属菌汚染と泉質に関する調査・研究. 感染症誌, 8, 545-553.
- 12) 緒方菊代, 若松正人, 成松浩志, 長谷川昭生, 瀧祐一. 2007. 大分県における浴用水中の *Legionella* 属菌の分離状況. 大分県衛生環境センター年報, 35, 24-46.
- 13) 遠藤卓郎. 2006. 循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究. pp. 49-59, 厚生労働科学研究費補助金健康科学総合研究事業平成 18 年度報告書. 厚生労働省, 東京.
- 14) 前川純子, 倉文明, 金子紀子, 渡辺祐子, 磯部順子, 貫名正文, 中嶋洋, 河野喜美子, 多田有希. 2008. レジオネラ臨床分離株の収集と型別から得られた知見. IASR, 29, 332-333.
- 15) Ragull S., Garcia-Nuñez M., Pedro-Botet M. L., Sopena N., Esteve M., Montenegro L., Sabrià M. 2007. *Legionella pneumophila* in cooling towers: Fluctuations in counts, determination of genetic variability by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and persistence of PFGE patterns. Appl. Environ. Microbiol., 73, 5382-5384.