

# レジオネラ症患者及び関連する温泉施設から分離した レジオネラ属菌のPFGE解析

藤原 恵子 江崎 久雄 森垣 忠啓

## Genetic analysis of *Legionella pneumophila* isolated from Legionnaires' disease patient and the related spa-bath by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Keiko FUJIWARA, Hisao ESAKI and Tadaaki MORIGAKI

キーワード：温泉、循環浴槽、レジオネラ症、レジオネラ尿中抗原、麦飯石  
パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

key words : spa, whirlpool bathes, Legionnaires' disease, Legionella urinary antigen, porous natural stones  
Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

### はじめに

レジオネラ症の原因となるレジオネラ属菌は、本来、水の中や湿った土壌など自然界の湿潤な環境に生息する細菌である。しかし近年、空調施設の冷却塔、循環式浴槽、給湯施設、噴水など生活環境の変化などにより人工的な水の循環設備が多く作られ、これらが人の生活と密接に関係するようになった。このような人工的な湿潤環境中に一度レジオネラ属菌が侵入すると、そこで生息するアメーバや繊毛虫など原生動物の体内で大量に繁殖し、レジオネラ属菌を含んだエアロゾルを人が吸い込むことによって感染し、発症するに至る。

レジオネラ症には、重篤な経過をたどる「肺炎型」<sup>1)</sup>と、自然治癒型でインフルエンザ様疾患である「ポンティアック熱型」<sup>2)</sup>がある。

1976年に米国フィラデルフィアで「肺炎型」のレジオネラ症の集団感染事例が発生して以来<sup>3)</sup>、世界中で多くの感染事例が報告されるようになり、大規模な集団感染事例が続発している<sup>4-7)</sup>。日本でも1980年に初めてレジオネラ症が報告<sup>8)</sup>されて以来、感染事例の報告が後を絶たない。2000年には静岡県<sup>9)</sup>と茨城県<sup>10)</sup>で、2002年には宮崎県<sup>11, 12)</sup>で、いずれも *Legionella pneumophila* serogroup (以下「SG」と記す。) 1を主たる原因菌とし、循環式浴槽を原因施設とする大規模な集団感染事例が報告された。

京都府でも平成17年10月から平成18年3月にかけて、レジオネラ症4事例が相次いで発生した。うち1事例は、患者の尿からレジオネラ尿中抗原が検出され、喀痰から *L.pneumophila* SG1が分離された。そこで、当該患者が利用した温泉の環境調査を行い、浴槽水を含む環境中からレジオネラ属菌の分離を試みた。その結果、*L.pneu-*

*mophila* SG1が3株分離され、患者由来株と環境由来株についてパルスフィールドゲル電気泳動 (以下「PFGE」と記す。) による解析を行ったので報告する。

### 材料及び方法

#### 1. 材料

##### 1.1 患者由来株

患者由来株は、名古屋市衛生研究所から分与を受けた。患者についての概要を表1に示す。

表1 レジオネラ症を発症した患者の概要

患者	男性 (64歳) 名古屋市在住
経過	平成18年1月22日~23日 当該施設を利用
	2月1日 発症
	2月3日 初診
	2月6日 受診した病院でレジオネラ尿中抗原陽性
	2月8日 名古屋市衛生研究所でレジオネラ属菌を分離
当該施設の概要	<ul style="list-style-type: none"> <li>・打たせ湯と露天風呂に塩素剤を投入して消毒</li> <li>・ろ過槽に麦飯石を使用</li> </ul>

##### 1.2 環境由来株

患者が利用した入浴施設で使用する源泉水、内湯浴槽水、露天風呂浴槽水、貯湯タンク水の計4検体、更にヘアキャッチャー、内湯循環水吸込口、内湯循環水吐出口、内湯レベル管又は連絡管、露天風呂吸込口、露天風呂吐出口、内湯板天井の拭取りの計7検体、合わせて11検体を採取し、環境から *L.pneumophila* の分離を試みた。

#### 2. 検査

採水現場における残留塩素濃度の測定及びレジオネラ属菌の検出を試みた。

(平成18年7月31日受理)

### 3. 方法

#### 3. 1 検体の採取

試料水を滅菌1Lポリ瓶に採水した後、25%チオ硫酸ナトリウム溶液2mLを添加した。拭取り材料は各々の施設内部を滅菌綿棒で拭き取り、滅菌スピッツ管に入れて保管した。

#### 3. 2 レジオネラ属菌の分離・同定検査

レジオネラ属菌の分離は、「新版レジオネラ症防止指針」<sup>19)</sup>に基づき、以下の方法で行った。

##### (1) 検体の前処理

###### (A) 温泉水

試料水500mLをポリカーボネート製メンブランフィルター(直径47mm 孔径0.45  $\mu$ m)で吸引ろ過した後、フィルターを剥がして滅菌蒸留水5mLに浸し、ボルテックスミキサーで攪拌して懸濁液とした。0.2M HCl・KCl緩衝液(pH2.2)を等量加え、25℃に4分間放置して前処理試料とした(50倍に濃縮)。

###### (B) 拭取り材料

新しい滅菌スピッツ管に滅菌蒸留水を2mL入れ、そこに施設の拭取り綿棒を入れ、ボルテックスミキサーで攪拌した。綿棒に吸水している水分をよく絞り出して懸濁液とする。懸濁液を1mL採取し、(A)と同様に酸処理した。

##### (2) 分離培養

前処理試料の100  $\mu$ L及び200  $\mu$ LをGVPC培地(日本ビオメリユー社製)に接種し、コンラージ棒で全面塗布し、37℃で5~7日間湿箱の中で培養した。発育した灰白色湿潤コロニーについてグラム染色を行い、グラム陰性桿菌であるものをシスチン添加BCYE  $\alpha$ 寒天培地(日本ビオメリユー社製)とシスチン無添加BCYE  $\alpha$ 寒天培地(日本ビオメリユー社製)に塗布し、37℃で培養してLシスチン要求性を確認した。

##### (3) 同定検査

シスチン添加BCYE  $\alpha$ 寒天培地で発育し、シスチン無添加BCYE  $\alpha$ 寒天培地で発育しなかった菌株について、馬尿酸塩加水分解試験を行い、陽性を示したものをレジオネラ属菌と同定した。

陽性菌株はレジオネラ属菌診断用抗血清(デンカ生研製)を用いて血清群型別を行った。

#### 3. 3 レジオネラ属菌のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

PFGE解析は、国立感染症研究所の方法に準じた「PFGE New Protocol-Kinki」を参考に、以下の方法で行った。図1に「PFGEのフローチャート」を示す。

##### (1) 菌液の調製

患者由来株と環境由来株は、シスチン添加BCYE  $\alpha$ 寒天培地にコンラージ棒で塗布し、37℃で3日間湿箱の中で培養した。マイクロチューブに滅菌生理食塩水1mL入れ、10  $\mu$ Lループの白金耳でコロニーを掻き取って浮遊した。その後14000rpm・10分間遠心し、上清を除去した。

再び滅菌生理食塩水1mLで再浮遊し、試料原液とした。これを滅菌生理食塩水で階段希釈し、実験に供した。

##### (2) 菌のアガロースブロックの作製

PFGE用のアガロースブロックの作製は、サンプルプラグキャスター(0.7mm)を用い、SeaKem Gold Agarose(最終濃度:0.5%)で作製した。

##### (3) DNAの抽出

アガロースブロックを1mg/mL Protinase K、1% N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0)中で、50℃・2時間以上浸透し溶菌した。

##### (4) 制限酵素の前処理

DNA抽出処理したアガロースブロックを4mM Pefabloc SC in TE溶液中で、50℃・20分以上反応させ、Protinase Kを失活させた。

##### (5) 制限酵素処理

制限酵素はSfi I (30unit/sample)を使用し、50℃・一晚反応させた。サイズマーカーとして使用したSalmonella Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain(標準株)はXba Iを使用し、37℃・一晚反応させた。

##### (6) 電気泳動

制限酵素処理したアガロースブロックの電気泳動は、SeaKem Gold Agarose (1%)を用い、サイズマーカーとしてラムダラダー及びSalmonella Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain(標準株)を使用した。電気泳動条件<sup>12,14)</sup>は、6V/cm (200V)、5~50秒、18時間、Buffer温度14℃とした。

#### 3. 4 PFGE画像の解析

PFGEのゲルの写真は画像解析装置で取り込み、画像データ(TIFF形式、グレースケール、8ビット)に変換し、Fingerprinting IIソフトウェア(BIO-RAD)を用いて解析した。解析条件は解析係数Dice、Band-Tolerance値は1.20%、最適化値は0.00%とした。

## 結果と考察

### 1. 環境からのL.pneumophilaの分離・同定結果等について

環境からのL.pneumophilaの分離結果及び遊離残留塩素濃度の測定結果を表2に示す。

#### 1. 1 環境からのL.pneumophilaの分離・同定結果

環境材料の11検体のうち4検体からL.pneumophilaが検出された。露天風呂の浴槽水及び吸入口と吐出口の拭取りからL.pneumophila SG1が検出され、ヘアーキャッチャーからL.pneumophilaが検出されたが、血清型は判別できなかった。また、露天風呂浴槽水のL.pneumophila SG1の菌数は、10CFU/100mLであった。

L.pneumophila SG1は過去の集団感染事例<sup>15~17)</sup>の患者から最も高頻度に検出されており、当該事例でも検出された。また別の報告<sup>18~24)</sup>では、浴槽水でSG3~6の検出割合が高いとされているが、当該事例では検出されなかった。

源泉水、貯湯タンク及び内湯関連の入浴施設からレジオネラ属菌が検出されなかったことから、主要な感染原因は、露天風呂関連の入浴施設を中心にレジオネラ属菌

による汚染と推定された。

また、ろ過装置のある循環システムでは、ろ過材及び配管に容易にシュードモナス属菌等による生物膜が形成

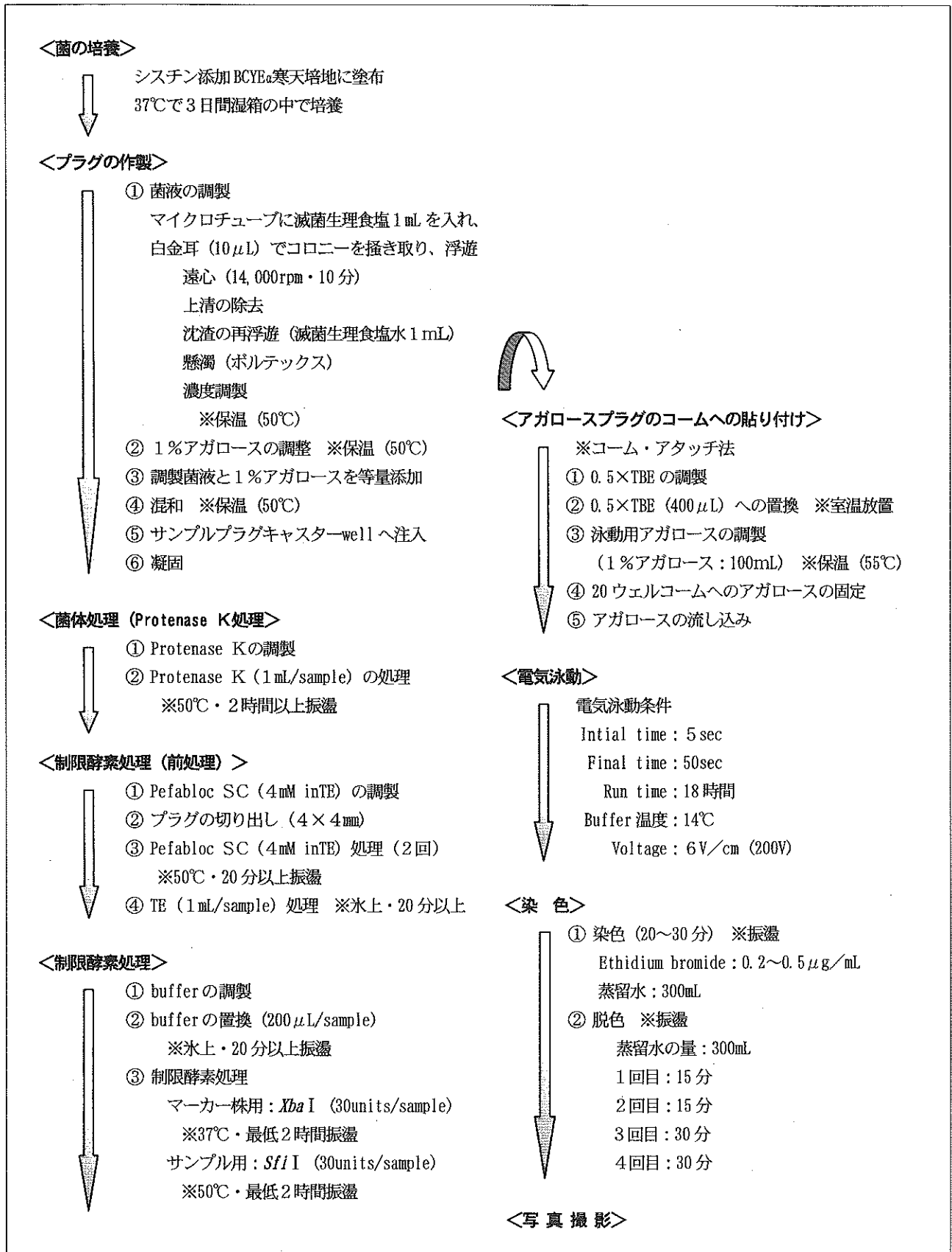


図1 レジオネラ属菌のパルスフィールドゲル電気泳動法

表2 施設のレジオネラ属菌の検出結果と残留塩素濃度

検体番号	検体名	レジオネラ属菌の検出			遊離残留塩素濃度 (mg/L)
		検出結果		血清型	
		定性検査	定量検査		
1	源泉水		<10 CFU/100mL		検出限界以下
2	貯湯タンク水		<10 CFU/100mL		検出限界以下
3	内湯 浴槽水		<10 CFU/100mL		1.3
4	露天風呂 浴槽水		10 CFU/100mL	<i>L.pneumophila</i> SG1	1.3
5	内湯 循環水吸込口	検出しなかった			実施せず
6	内湯 循環水吐出口	検出しなかった			実施せず
7	内湯 レベル管 または連絡管	検出しなかった			実施せず
8	内湯 板天井	検出しなかった			実施せず
9	露天風呂 吸込口	検出した		<i>L.pneumophila</i> SG1	実施せず
10	露天風呂 吐出口	検出した		<i>L.pneumophila</i> SG1	実施せず
11	ヘアーキャッチャー	検出した		<i>L.pneumophila</i> 型別不能	実施せず

され<sup>26)</sup>、その膜内でレジオネラ属菌が増殖することが知られていること、残留塩素が検出される浴槽水からでもレジオネラ属菌が検出された事例<sup>26)</sup>があること、更に麦飯石を使用した入浴施設からレジオネラ属菌が検出された事例<sup>27)</sup>もあり、このことから、ろ過器に使用した麦飯石の表面積が広大であるため、大量の生物膜が形成されやすく、生物膜からレジオネラ属菌が大量に供給<sup>28)</sup>され、増殖と汚染を促進させたものと推察された。

1.2 源泉水と浴槽水等の残留塩素濃度の測定結果

内湯及び露天風呂の浴槽水の遊離残留塩素濃度はそれぞれ1.3mg/Lであり、源泉水と貯湯タンク水からは、遊離残留塩素は検出されなかった。

レジオネラ属菌に対する殺菌効果を発揮する塩素濃度と必要接触時間は、0.4mg/Lで15分<sup>29)</sup>、0.5mg/Lで10分

以内<sup>29)</sup>であることが報告されている。露天風呂の浴槽水からは、京都府レジオネラ症発生子防のための入浴施設の衛生管理に関する条例施行規則第4条（塩素消毒の基準）に定められている最大遊離塩素濃度1.0mg/Lを上回る塩素が検出されているにもかかわらず、*L.pneumophila* SG1が検出された。通常は高濃度の塩素が存在している場合は、レジオネラ属菌は検出されない。このことから配管やろ過器材に広範に大量の生物膜が形成されていたことが推測される。

2. *L.pneumophila* 1群のPFGE画像解析結果について

PFGE画像と解析した系統樹を図2に示す。

PFGE画像解析の結果から、患者由来株と露天浴槽水及び露天吐出口の拭取りからの分離株との近似度は

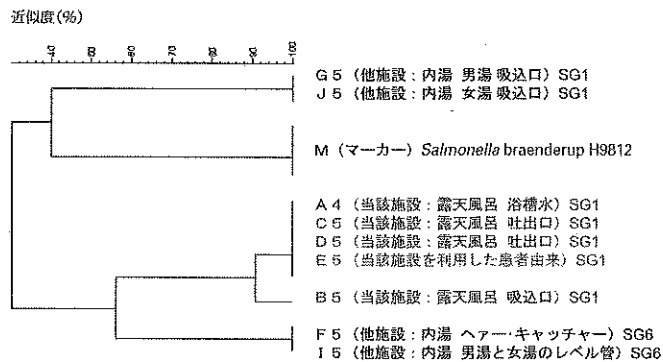
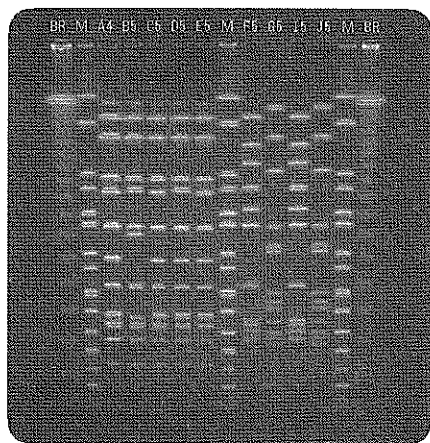


図2 *Legionella pneumophila* のパルスフィールドゲル電気泳動画像 (PFGE) とデンドログラム (系統樹)

100%であった。また、患者由来株と露天吸込口の拭取りからの分離株との近似度は90%であった。このことから、レジオネラ症の発症原因は、当該施設の露天風呂を使用したことにあると断定した。

### まとめ

1. 環境材料の11検体のうち4検体から*L.pneumophila* が検出された。露天風呂の浴槽水及び吸入口と吐出口の拭き取りから*L.pneumophila* SG1が検出され、ヘアークャッチャーから*L.pneumophila*が検出されたが、血清型は判別できなかった。また、露天風呂浴槽水由来の*L.pneumophila* SG1の菌数は、10CFU/100mLであった。
2. 内湯及び露天風呂の浴槽水の残留塩素濃度はそれぞれ1.3mg/Lであり、源泉水と貯湯タンク水からは、残留塩素が検出されなかった。
3. PFGE画像解析の結果は、患者由来株と露天風呂浴槽水及び露天風呂吐出口の拭き取りからの分離株との近似度は100%、患者由来株と露天吸込口の拭き取りからの分離株との近似度は90%であった。
4. 患者由来株と環境由来3株の*L.pneumophila* SG1についてのPFGE画像解析の結果から、患者のレジオネラ症の発症は、当該施設の露天風呂の使用に原因があったと断定した。
5. ろ過器のろ過材に使用されていた麦飯石がレジオネラ属菌の増殖を促進させる要因となったと推測された。

### 謝 辞

患者由来株を分与していただいた名古屋市衛生研究所の安形則雄先生、PFGE画像の解析にご協力をいただいた滋賀県衛生科学センターの石川和彦先生、及び本調査にご協力いただいた保健所職員に深謝いたします。

### 引用文献

- 1) 掛屋弘ほか：臨床と微生物、25、41 (1998)
- 2) 森正道：臨床と微生物、25、49 (1998)
- 3) Fraser D.W et. al : N. Engl. J. Med、297、1189 (1977)
- 4) Garcia-Fulgueiras A et. al : Emerg Infect、9、915 (2003)
- 5) Fernandez JA et. al : Eur J Clin Microbiol Infect、21、729 (2002)
- 6) Den Boer JW et. al : Emerg Infect、8、37 (2002)
- 7) Greig JE et. al : Med J、180、566 (2004)
- 8) 斎藤厚ほか：感染症学雑誌、55、124 (1981)
- 9) 杉山寛治ほか：静岡県環境衛生科学研究所報告、43、1 (2000)
- 10) Nakamura H et. al : Intern Med、42、806 (2003)
- 11) 福田祐典：J. Natl. Inst. Public Health、52、2 (2003)
- 12) 岡田美香ほか：感染症学雑誌、79、365 (2005)
- 13) 厚生省生活衛生局企画課監修 新版レジオネラ症防止指針：(2000)、(財)ビル管理教育センター
- 14) 渡辺治雄ほか：食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究(課題番号：H15-新興-1)平成15年度総括・分担研究報告書、103、173 (2004)
- 15) Yousef Abu Hwaik et. al : Clin. Microbiol、64、3127 (1998)
- 16) 病原微生物検出情報、21、166 (2000)
- 17) 病原微生物検出情報、24、27 (2003)
- 18) 黒木俊郎ほか：感染症学雑誌、72、156 (1998)
- 19) 藪内英子ほか：感染症学雑誌、68、549 (1994)
- 20) 楠くみ子ほか：東京衛研年報、53、14 (2002)
- 21) 山内昌弘ほか：堺市衛生研究所報：19、59 (2001)
- 22) 鈴木敦子ほか：感染症学雑誌、76、703 (2002)
- 23) 小出道夫ほか：臨床と微生物、25、65 (1998)
- 24) 藪内英子ほか：臨床と微生物、25、11 (1998)
- 25) 土戸哲明：食衛誌、43、J-283 (2002)
- 26) 田口寛ほか：本誌、48、58 (2003)
- 27) F. KURA et. al : Epidemiol. Infect、134、385 (2006)
- 28) 藪内英子ほか：感染症学雑誌、69、151 (1995)
- 29) John M. Kuchata et. al : Appl. Environ. Microbiol、46、1134 (1983)