

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

久高 潤・糸数清正・平良勝也・仁平 稔・大野 惇

Analysis of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolated from Environment in Okinawa by Using Pulsed-field Gel Electrophoresis

Jun KUDAKA, Kiyomasa ITOKAZU, Katsuya TAIRA, Minoru NIDAIRA and Atsushi OONO

要旨：本研究は、*Legionella*属菌のパルスフィールド電気泳動（PFGE）法による遺伝子解析の試験体制確立とレジオネラ症対策の基礎資料とする事を目的とした。今回の調査では、冷却塔水及び循環式浴槽水から分離した*Legionella pneumophila*の血清型別を行い、血清群（SG）1について、制限酵素*Sfi*Iを用いたPFGE法による型別を実施した。冷却塔水及び循環式浴槽水からはいずれもSG1の検出頻度が高く、それぞれ53.6%、41.7%であった。PFGE法による型別の結果SG1 30株は、25クローンに細分化され、冷却塔水及び循環式浴槽水由来株は異なるクラスターを形成し、遺伝学的に異なる傾向が認められた。このことから、遺伝子系統解析をすることにより、ある程度菌の由来を推測出来ることが示唆された。

I はじめに

*Legionella*属菌は湿った土壌や、河川、沼などの淡水や温泉水など自然環境に広く分布するほか、人工的水利用施設である空調システムの冷却塔、加湿器、循環式浴槽などの環境水にも生息し、自然環境よりも人工的水環境に多く生息することが報告されている¹⁻⁶⁾。本属菌によって起こるレジオネラ症は、在郷軍人病やレジオネラ肺炎と呼ばれる劇症型肺炎のほかに、インフルエンザ様のポンティアック熱が主要な疾患であり、また、心内膜炎、腹膜炎などの原因にもなることが知られている。ヒトへの感染経路は、循環式浴槽水、冷却塔水、給湯水中などの人工水環境水に進入したレジオネラ属菌が、そこで生息するアメーバや繊毛虫などの原生動物内あるいは細菌や藻類等の代謝産物を栄養源として大量に繁殖し、ヒトがこれらの水から発生したエアロゾルを吸入することによって経気道感染する。我が国のレジオネラ症は、1981年、斉藤らによって初めて報告⁷⁾されて以来、1994年に冷却塔水を原因としたポンティアック熱⁸⁾の集団発生や、循環式入浴施設を原因施設とした多数のレジオネラ集団感染事例が続き^{9, 10)}、2002年7月には宮崎県の循環式入浴施設で295名が発症し7名が死亡する事例が発生¹¹⁾するなど大規模な集団感染事例が相次いで報告されている。

レジオネラ症の集団発生時における感染源を証明する方法として、パルスフィールド電気泳動法（PFGE）は最も有用な方法である^{12, 13)}。沖縄県における*Legionella pneumophila*について、どのような遺伝子的多型性が存在しているのかを調べることは、集団発生時の基礎的資料として重要である。今回我々は、レジオネラ集団発生時における危機管理体制の強化の一つとして、冷却塔水及び循環式浴槽水由来*L. pneumophila*の血清型別と、PFGE法による遺伝子多型解析のデータベース構築を目的として、患者及び環境から分離頻度が最も高い血清群1型（SG1）についてPFGE型別を実施したので報告する。

II 材料及び方法

1996から98年に実施したレジオネラ属菌の調査^{14, 15)}にて空調設備の冷却塔水25施設のから分離した28株及び2002～03年に沖縄県の公衆浴場、ホテルなどの大浴場の循環式浴槽水（ジャグジーを含む）の調査^{16, 17)}にて16施設から分離した36株、合計64株の*L. pneumophila*を用いた。標準株として宮崎県衛生環境研究所から分与された国立感染症研究所*Legionella*標準株*L. pneumophila*：N11B0058 (SG1)及びN11B0211 (SG1b)株の2株を用いた。すべての株は、血清群確認のため市販のレジオネラ免疫

血清（デンカ生研）及び*L. pneumophila* 血清群7から15群（デンカ生研）にて凝集試験を実施した。

遺伝子多型解析には、血清型別でSG1に分類された冷却塔水由来15株と循環式浴槽水由来株15株の計30株及び上記標準株2株を用いた。PFGEによる遺伝子多型解析の方法は、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/index.html>)を元にした方法で、以下にしめす点を変更した方法¹⁸⁾にて行った。プラグに使用する菌株はデンシマット（BioMeruex）にてマックファーランド5の濃度に懸濁調整したものをを用いた。プラグ作成用のアガロースには1% SeaKem Gold Agarose（CAMBREX）を使用し、0.7mmのサンプルプラグキャスター（Bio Rad）にて作成した。Protenase K処理後のプラグの洗浄にはPefabroc SC ABESF（Roch Diagnostic）を用いた。制限酵素は*Sfi* I（TaKaRa）を用いサンプルDNAを切断後、泳動条件をパルスタイム5秒から50秒、6.0V/cm、泳動時間19時間、泳動バッファを温度14℃に設定し、GenePath（Bio-Rad）により電気泳動を行った。得られた結果は、Fingerprinting II DST Japanese edition（Bio-Rad）により解析を行った。解析は、Dice係数使用し、Optimization値は1.2、Band-Tolerance値は1.0%、UPGMAを用いて系統樹（Dendrogram）を作成した。

III 結果

循環式浴槽水および冷却塔水由来*L. pneumophila*の血清型を表1に示した。循環式浴槽水由来*L. pneumophila* 36株は6種類の血清群に分類された。SG1が41.7%と最も多く、SG5及びSG6が16.7%、SG3が13.9%でこの4血清群で全体の約9割を占めた。冷却塔水由来の28株は、循環式浴槽水由来株よりも種類が多く、型別不能株を含めると8種類に分類された。循環式浴槽水由来株と同様にSG1が最も多く53.6%と半数以上を占め、ついでSG4が10.7%であった。

表1 循環式浴槽水および冷却塔水由来*Legionella*の血清型

Sero-groups	循環式浴槽水 (%)	冷却塔水 (%)	合計 (%)
SG 1	15 (41.7)	15 (53.6)	30 (46.9)
SG 2		1 (3.6)	1 (1.6)
SG 3	5 (13.9)	2 (7.1)	7 (10.9)
SG 4		3 (10.7)	3 (4.7)
SG 5	6 (16.7)	1 (3.6)	7 (10.9)
SG 6	6 (16.7)	2 (7.1)	8 (12.5)
SG 7	1 (2.8)	2 (7.1)	3 (4.7)
SG 9	3 (8.3)		3 (4.7)
UT		2 (7.1)	2 (3.1)
総計	36	28	64

UT：型別不能

表2 レジオネラ症患者発生状況調査

年	全 国	沖 縄
2005 (H17)	276	5
2004 (H16)	162	3
2003 (H15)	143	0
2002 (H14)	166	3
2001 (H13)	83	2
合計	830	13

国立感染症研究所感染症情報センター及び沖縄県感染症情報センター調べ

表3 人工水環境のレジオネラ汚染状況（沖縄県）

調査対象	調査地点	陽性率 (平均%)	調査年	文献
冷却塔水	特定建築物	40~67	'96~'97	14,15
循環式浴槽水	公衆浴場等	17~20	'02~'03	16,17
修景水（噴水）	公園など	29	2004	19

循環式浴槽水及び冷却塔水由来*L. pneumophila* SG1のPFGEとDendrogram解析結果を図1に示した。30株は25クローンに細分化され、また、大きくA~E]のクラスターに分かれた。クラスターA、B及びCはすべて冷却塔水由来株であり、クラスターDはすべて循環式浴槽水由来株に属し、菌株由来別に異なる傾向を示した。クラスターEに含まれる9株は菌株間の相関係数が80%以上で相同性が高いものの、循環式浴槽水及び冷却塔水由来株が混在する結果であった。

III 考 察

レジオネラ症は1999年4月に施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において全臨床医に届出義務のある4類感染症となった。2001年から2005年の過去5年間に、全国では830名の患者が報告されているが、沖縄県ではこれまでに集団発生の報告が無く、患者は13名にとどまっている（表2）。従来レジオネラ症は冷却塔水を感染源とし、冷暖房の稼働に伴い8月に患者発生が増加する傾向であったが、現在は季節性が無く、感染源の多くは温泉、公共入浴施設である²⁰⁾。我々はこれまでに特定建築物の冷却塔水、ホテル、公衆浴場等の循環式浴槽水及び噴水等の修景水の人工環境水を中心にレジオネラ属菌の汚染状況調査を実施して

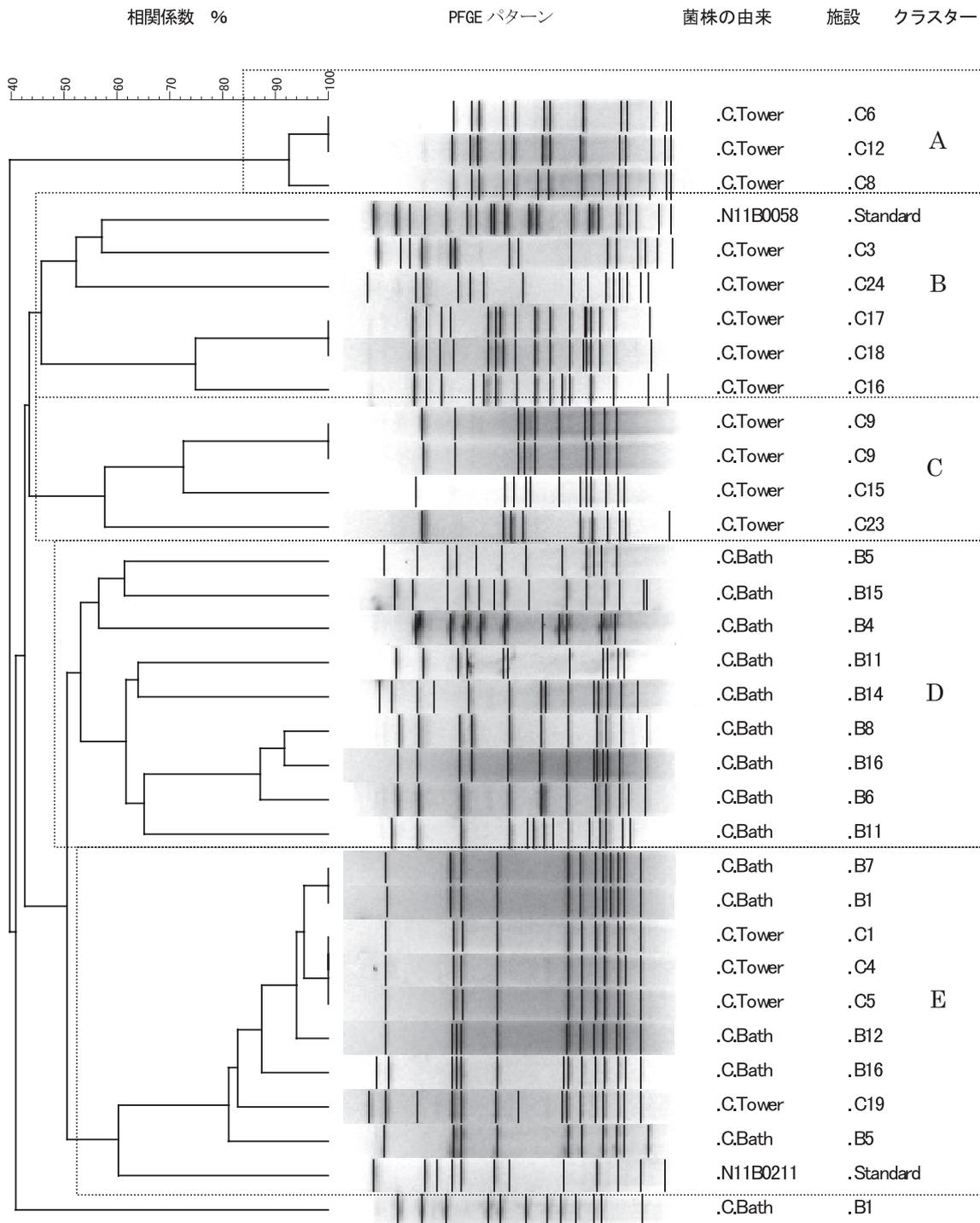


図1 循環式浴槽水及び冷却塔水由来*L. pneumophila* SG1のPFGEとDendrogram

きた。結果を表3に示したが、他府県の調査結果と同様、高率にレジオネラ属菌が検出されており、集団発生につながる可能性が常にあることが示唆され注意が必要である。レジオネラ症患者から検出される原因菌のほとんどは*L. pneumophila* SG1であり²⁰⁾、今回の調査では、冷却塔水及び循環式浴槽水から検出された*L. pneumophila*の血清群はいずれもSG1が有意に検出された。

循環式浴槽水及び冷却塔水由来*L. pneumophila* SG1 30株について、制限酵素*Sfi* IIによるPFGEを行い、Fingerprinting IIによる遺伝子多型性解析を実施した結果、循環式浴槽水と冷却塔水由来株では、異なるクラスターを形成する傾向が見られた。Maekawaらは、日本の冷却塔水、温泉水及び患者由来*L. pneumophila* SG1をPFGE及びモノクローナル抗体による方法で比較した結果、冷却塔水と温泉水由来株は異なる2つの集団に大別され、遺伝学的に独特な集団を形成していると報告²¹⁾しており、今回我々の結果もそれに類似するものであった。従って、感染源が全く不明であっても遺伝子多型性解析をすることにより、ある程度菌の由来を推測する事が出来ることが示唆された。小井出らはこれまでに、冷却塔水と温泉水、24時間風呂では、検出される*Legionella*の種、或いは血清群は異なる傾向にあり、冷却塔水ではSG1、温泉水ではSG4、24時間風呂ではSG5が有意に検出され、温泉水及び24時間風呂では*L. anisa*, *L. erythra*等*L. pneumophila*以外の種はほとんど検出されないと報告している。その原因について、水温が違うこと、レジオネラと共生する藻類が、風呂、温泉ではフィルターで除去されていること、あるいは風呂水、温泉水は人体と接触するので皮膚由来細菌などの影響で共生している原生動物、従属栄養細菌の種類が違うこと事が考えられると考察している²²⁾。今回の調査結果では、同じ*L. pneumophila*のSG1でも、冷却塔水と循環式浴槽水とでは遺伝学的に異なる傾向が見られたが、これと同様な理由によるものと考えられる。

近年、レジオネラ症の病原体診断法が、従来の菌分離から、簡易法である尿中抗原を検出する方法が一般的になってきた。しかしながら、ほとんどのキットは検出する対象病原体がSG1のみであり、他の血清群については検出できないことから、尿中抗原の検出法と平行して、菌の分離培養試験を実施することが望ましい。集団発生時の原因究明調査には、患者から検出された菌と、推定される原因施設の環境から分離した菌が遺伝学的に同一あるいは近縁であるか証明することは不可欠である。その際、今回実施したPFGE法のFingerprinting IIによる遺伝子多型性解析法は感染源特定のための科学的根拠として非

常に重要である。

本県は多数のリゾート施設を有し、浴場施設、冷却塔、修景施設などは、多くの人が頻繁に接触したり、遠方からの利用者が多く訪れる場所であり、患者発生も広域にわたることが予測される。そのため平時より医療機関や保健所とも連携し、レジオネラ症の患者発生が報告された場合には、感染症発生動向調査に基づき疫学調査や環境調査を行い、原因究明と再発防止につとめなければならない。

<謝辞>

本研究は、平成17年度沖縄県衛生環境研究所新興・再興感染症調査事業の一部により実施した。

IV 参考文献

- 1) Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W et al (1977) Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia. N Engl J Med 297 : 1189-1197.
- 2) McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, et al (1977). Legionnaires' disease: Isolation of a bacterium demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med 297 : 1197-1203.
- 3) Morris GK, Patton CM, Feely JC, et al (1979) Isolation of the Legionnaires' disease bacterium from environmental samples. Ann Intern Med 90: 664-666.
- 4) Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, et al (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl Environ Microbiol 41 : 9-16.
- 5) Tobin JO'H, Bear J, Dunnill MS et al (1980) Legionnaires' disease in a transplant unit: Isolation of the causative agent from shower baths. Lancet, 2 : 118-121.
- 6) Bartlett CLR, Kurtz JB, Hutchison JGP, et al (1983) Legionella in hospital and hotel water supplies. Lancet 2 : 1315.
- 7) 齊藤厚, 下田照文, 長沢誠ほか (1981) 本邦ではじめてのLegionnaires' disease (レジオネラ症) の症例と検出菌の細菌学的性状. 感染症学雑誌, 55 : 124-128.
- 8) 藪内英子, 森正道, 齊藤厚ほか (1995) *Legionella pneumophila* serogroup 7によるPontiac feverの集団発生例Ⅱ—疫学調査結果, 感染症学雑誌, 69 : 654-665.
- 9) 杉山寛二, 西尾智裕, 郷田淑明ほか (2002) 生活環境水のレジオネラ汚染およびレジオネラ症患者調査—循環式浴槽水を感染源とするレジオネラ症集団感染事例

- と検査一. 静岡県環境衛生科学研究所報告, 43:1-4.
- 10) Nakamura H, Yagyu H, Kishi K, et al (2003) A large outbreak of legionnaires' disease due to an inadequate circulating and filtration system for bath water epidemiologic manifestations. Intern Med, 42:806-811.
- 11) 岡田美香, 河野喜美子, 倉文明ほか (2005) 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発症状況と環境調査. 感染症学雑誌, 79:365-374.
- 12) Jonas, D., Meyer, HG., Matthes, P. et al (2000) Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. J Clin Microbiol. 38:2284-91.
- 13) Schoonmaker, D., Heimberger, T., Birkhead, G. (1992) Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. J Clin Microbiol, 30:1491-8.
- 14) 大城直雅, 八木田健司, 久高潤ほか (1997) レジオネラの疫学調査 (1). 平成8年度 海洋性危険生物対策事業報告書, 51-53.
- 15) 大城直雅, 八木田健司, 久高潤ほか (1998) レジオネラの疫学調査 (2). 平成9年度 海洋性危険生物対策事業報告書 新興再興感染症調査研究班, 沖縄県衛生環境研究所, 1-4.
- 16) 糸数清正, 平良勝也, 中村正治ほか (2003) 沖縄県における循環式浴槽水のレジオネラ属菌調査(2002). 沖縄県衛生環境研究所報, 37:73-75.
- 17) 糸数清正, 平良勝也, 中村正治ほか (2004) 沖縄県における循環式浴槽水のレジオネラ属菌調査(2002). 沖縄県衛生環境研究所報, 37:83-85.
- 18) 渡辺治雄 (2005) 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. 平成16年度総括・分担研究報告書. 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業, 215-230.
- 19) 中村正治, 久高潤, 糸数清正ほか (2005) 修景水の *Legionella*属菌汚染状況調査(2004). 新興・再興感染症調査研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 1-8.
- 20) 特集 レジオネラ症. (2000) 病原微生物検出情報. No. 247, 186-187.
- 21) Maekawa J, Kura F, Watanabe H, et al (2002) Analysis of Legionella serogroup 1 isolated in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis and monoclonal antibodies. ASM Press, 302-304.
- 22) 小出道夫, 齊藤厚 (1998) レジオネラの疫学. 臨床と微生物, 25:65-68, 1998.

