

資料

冷却塔水におけるレジオネラ属菌の汚染状況調査

平塚 貴大, 秋田 裕子, 増田 加奈子, 高尾 信一

Survey of *Legionella* spp. distribution in cooling tower

TAKAHIRO HIRATSUKA, HIROKO AKITA, KANAKO MASUDA, and SHINICHI TAKAO

(Received October 21, 2016)

広島県内の公共施設4棟11塔の冷却塔から冷却塔水を採取し、レジオネラ属菌の検出を行った結果、すべての冷却塔水からレジオネラ属菌の遺伝子が検出され、8塔からレジオネラ属菌が分離された。このうち *L. pneumophila* が4塔から、*L. quinlivanii* が4塔から、*L. busanensis* が1塔から分離された。すべての冷却塔からレジオネラ属菌の遺伝子が検出されたことから、冷却塔水が非常に高率に汚染されていることが明らかとなった。分離した *L. pneumophila* について、当センターで保存していた菌株とともにPulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 法、Sequence-Based Typing (SBT) 法を用いて菌株間の関連性について解析を行った。PFGE法の結果、同一の冷却塔から分離された菌株は、それぞれ独立したグループを形成した。SBT法では3株がST1に分類されたが、これらはPFGE法では異なるグループに分類された。このことから、PFGE法とSBT法では、株間の関連性について部分的に異なる結果を示すことが考えられた。

Key words : レジオネラ属菌, *L. pneumophila*, Pulsed-Field Gel Electrophoresis法, Sequence-Based Typing法

緒 言

レジオネラ属菌は土壌や水中等の環境中に生息している、好気性のグラム陰性桿菌である。四類全数把握疾患に指定されているレジオネラ症の原因菌であるが、人から分離、あるいは抗体価の上昇が認められているのはレジオネラ属菌の一部の種のみであり、すべての菌株が人に対して病原性を有しているかは明らかにはなっていない。レジオネラ症は四類全数把握疾患の中で最も報告が多く、届出数は年々増加傾向にあり、2015年は全国で1587件、広島県内においても33件の届出があった [1, 2]。人には菌体を含むエアロゾルの吸入によって経気道感染し、発症すると発熱、咳、関節痛などの症状を示す。感染源として重要なのは、人が直接エアロゾルを吸入する機会が多いと考えられる設備で、浴槽、シャワー、冷房設備である冷却塔等の水が具体例として挙げられる。日本では循環式の浴槽水を原因とした集団感染事例の報告が多いが、2013年には福岡市で冷却塔水による感染が疑われる事例も発生している [3]。レジオネラ症は発生数も多く、時に死に至る場合もある疾患のため、適切な感染防止対策が必要となるが、一般的な環境中に広く生息する菌であることから、散发例では感染源不明の場合も多い。また、県内における生活環境中のレジオ

ネラ属菌汚染実態に関する調査は行われておらず、環境水を介したレジオネラ属菌への感染リスクは明らかになっていない。今回、環境中のレジオネラ属菌の生息状況を把握するため、冷却塔水を対象に検査を行った。

材料および方法

1 検体

県内の公共施設4施設(A~D)に設置してある、11塔の冷却塔から冷却塔水を採取した。また、PFGE法及びSBT法による解析には、本調査で冷却塔水から分離された *L. pneumophila* と、当センターに保管されていた *L. pneumophila* の菌株を使用した。なお、LE09-1はレジオネラ症発生時に患者が入浴した浴槽水から、LE13-01とK14-13018T、及びLE15-01は患者から分離された菌株である。

2 方法

(1) レジオネラ属菌の培養

検査の流れを図1に示す。県内4施設11塔の冷却塔(A-01~D-01)から、水を1L~2L採取し、濾過濃縮法によって5mLに濃縮した。濃縮検体を直接、あるいは熱処理または酸処理を行った後にGVPC培地に塗抹し、湿潤条件下において36℃で1週間程度培養を行った。培養開

始日から4日目以降に確認された白色すりガラス様のレジオネラ属菌様コロニーを鈎菌し、血液寒天培地、及びBCYE培地に塗抹し培養を行った。BCYE培地のみで発育が確認された菌をレジオネラ属菌とみなし、血清学的検査及び遺伝子学的検査において性状を確認した。

(2) PCR法

濾過濃縮後の検体及び分離培養後の菌株をテンプレートとしてPCRを行った。レジオネラ属菌および*L. pneumophila*同定のためのPCRは病原体検出マニュアルに基づき行った[4]。レジオネラ属菌の同定には山本らの報告によるLEGプライマーを[5]、*L. pneumophila*の同定にMahbubaniらの報告によるLmipプライマーを使用した[6]。反応条件は熱変性94℃/60秒、アニーリング61℃/60秒、伸長72℃/60秒、40サイクルとした。*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌であった株については、塩基配列を決定するため、*mip*を対象にして、Ratcliffらの報告に記載のプライマーを用いてPCRを行った[7]。反応条件は熱変性94℃/30秒、アニーリング55℃/60秒、伸長72℃/120秒、40サイクルとした。Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いてシーケンスを行い塩基配列を決定後、解析サイト Legionella species identification by *mip* similarity. [8] を使用して菌種を特定した。なお、

すべてのPCRにはEx Taq (TaKaRa) を使用した。

(3) Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 法

複数個のコロニーが確認された冷却塔水検体に関しては、2から3個のコロニーを単離し、解析に使用した。病原体検出マニュアル[4]の方法に準拠し、制限酵素はSfiI (Roche) を使用し、電気泳動はBIO-RAD CHEF MAPPER (Bio-Rad) を用いてパルスタイム5-50秒、14℃の条件で21時間行った。PFGEパターンは、BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用い、Dice及びUPGMAによりクラスター解析を行った。

(4) Sequence-Based Typing (SBT) 法

ESGLI SBT GUIDELINE v5.0 [9] に従って、各菌株の7ヶ所の遺伝子増幅産物のシーケンスを行い、SBT databaseにより各遺伝子のAllele Numberを決定後、Allele Numberの組み合わせによりSequence Type (ST型) を決定した。検体は一か所の冷却塔につき1株のみ解析を行った。

結 果

1 レジオネラ属菌による冷却塔水汚染状況

濃縮冷却塔水をテンプレートとしたPCR法の結果、4施設11塔のすべての冷却塔水でレジオネラ属菌の遺伝子が検出された(表1)。*L. pneumophila*特異的なプライマーを用いてPCRを行った結果、6塔が陽性を示した。このうち4塔から菌が分離され、これらの菌株は血清型別の結果、B-01から分離されたものが*L. pneumophila* 血清群7、C-01,C-02,D-01から分離されたものが*L. pneumophila* 血清群1であった。

濃縮冷却塔水検体をテンプレートとしたPCR法で*L. pneumophila*が検出されなかった5塔のうち、4塔から*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌が分離された。これらについて*mip*の塩基配列を解析した結果、3塔から*L. quinlivanii*が、残りの1塔から、*L. quinlivanii*と*L. busanensis*が検出された。

2 分子系統解析

冷却塔水から分離された*L. pneumophila* 4株及び2009年から2015年に事案等で分離された*L. pneumophila* 4株について、PFGE法及びSBT法により分子系統解析を行った。

PFGE法の結果、同一冷却塔から分離した複数の菌株のバンドパターンは全て一致し、類似度は100%であった(図2)。B-01-1とD-01-1の類似度は90%を示したが、これらの血清群はそれぞれ7群と1群であり、PFGE法の結果と血清群は一致しなかった。

SBT法の結果、解析した8株は6個のST型に分類された(表2)。環境分離株2株(C-01-1、D-01-1)と臨床

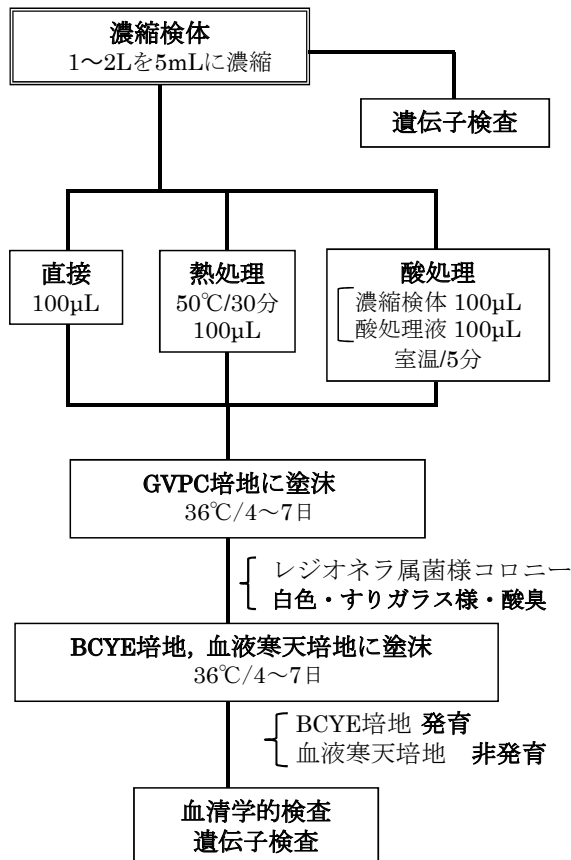


図1 レジオネラ属菌検査の流れ

分離株1株 (LE13-01) は同一のST型 (ST1) を示した。B-01-1はST1422に分類されたが, Allele numberをみるとST1と *mip* 及び *neuA* が異なるのみで, その他のAllele number は一致しており, ST1に近い型であると考えられた。また, 2009年に県内で発生した事案の際に浴槽水から分離した株である, LE09-01は現在登録されているST型に分類されなかったため, 新規のST型であることが考えられた。

PFGE法とSBT法を比較すると (図2), SBT法によってST1に分類されたC-01-1, D-01-1及びLE13-01はPFGE

法での解析の結果, 類似度は40%程度であり, ST型が一致してもPFGEによって類似性を示すとは限らなかった。また, PFGE法ではB-01-1とD-01-1が類似度90%で, 近縁である可能性を示しているが, SBT法ではそれぞれST1422とST1に型別された。

考 察

本調査では, 環境水のレジオネラ属菌による汚染実態調査として, 冷却塔水の検査を行った。その結果, 検体

表1 冷却塔からのレジオネラ属菌検出結果

施設	冷却塔番号	PCR (冷却塔水)		菌分離	PCR (菌株)		菌種	血清群
		レジオネラ属菌	<i>L. pneumophila</i>		レジオネラ属菌	<i>L. pneumophila</i>		
A	01	+	-	+	+	-	<i>L. quinlivanii</i>	-
	02	+	-	+	+	-	<i>L. quinlivanii</i>	-
	03	+	-	+	+	-	<i>L. quinlivanii</i>	-
	04	+	-	+	+	-	<i>L. quinlivanii, L. busanensis</i>	-
B	01	+	+	+	+	+	<i>L. pneumophila</i>	7
	02	+	+	-	NT	NT	NT	NT
	03	+	+	-	NT	NT	NT	NT
	04	+	-	-	NT	NT	NT	NT
C	01	+	+	+	+	+	<i>L. pneumophila</i>	1
	02	+	+	+	+	+	<i>L. pneumophila</i>	1
D	01	+	+	+	+	+	<i>L. pneumophila</i>	1

NT:Not Tested

表2 SBT法解析結果

菌株名	Allele Number							ST型
	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	
B-01-1	1	4	3	19	1	1	215	1422
C-01-1	1	4	3	1	1	1	1	1
C-02-1	3	13	1	10	14	9	11	127
D-01-1	1	4	3	1	1	1	1	1
LE09-01	7	6	17	21	11	11	9	0
LE13-01	1	4	3	1	1	1	1	1
K14-13018T	3	13	1	28	12	9	3	537
LE15-01	27	3	9	15	56	5	6	679

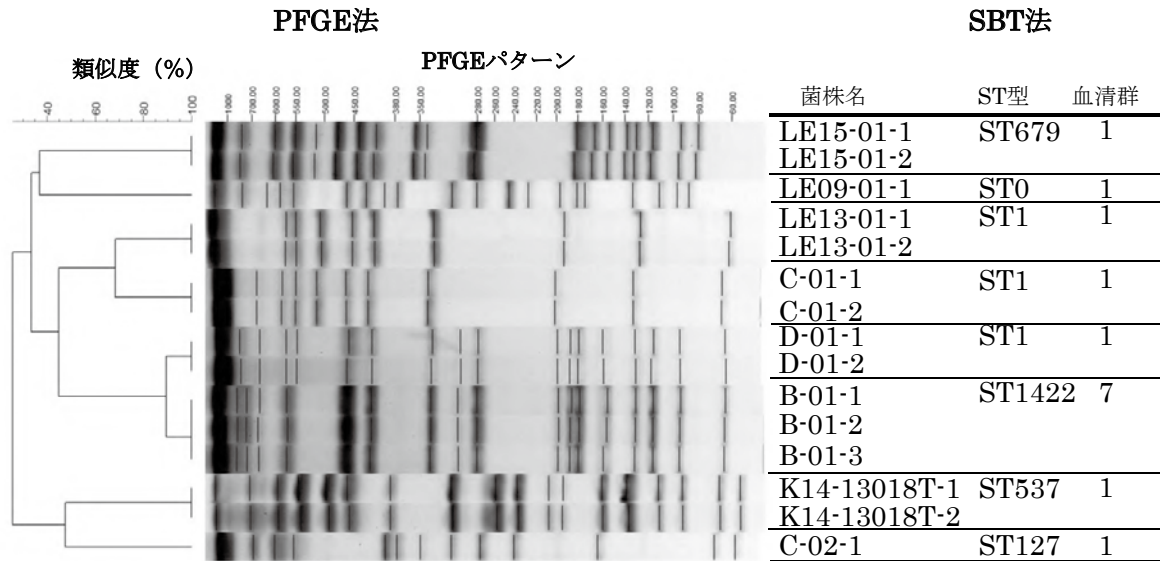


図2 *L. pneumophila*におけるPFGE法の結果及びSBT法との比較

として使用した冷却塔水すべてからレジオネラ属菌の遺伝子が検出されたことから、すべての冷却塔においてこれまでにレジオネラ属菌が存在していたことが示唆された。菌が分離されたのは11塔のうち8塔であり、分離された菌のうち*L. pneumophila*の血清群1及び血清群7や、*L. quinlivanii*は肺炎患者から分離された、あるいは抗体価の上昇が確認されている菌種である。このことから、今回対象とした冷却塔が、病原性を持つと考えられるレジオネラ属菌に高率に汚染されていることが示唆された。*L. pneumophila*血清群7や*L. quinlivanii*は、市販の尿中抗原を使用したレジオネラ症診断用の簡易キットでは検出することができない。そのため、これらの菌による感染症は原因不明の肺炎となる可能性がある。より広範な菌種を検出できる迅速検査法であるLAMP法が保険適用となっているが、尿中抗原検出キットほど普及が進んでいないのが現状である [10]。今後、LAMP法のような広範囲の菌種を検出する迅速診断法が普及し、これまで見逃されていたレジオネラ症が、的確に診断されることが望まれる。また、レジオネラ症の発生を予防するため、レジオネラ属菌を増やさない努力が必要である。冷却塔においては定期的な清掃と消毒がレジオネラ属菌の増殖防止のために重要であり、清掃の頻度と方法によって冷却塔水中のレジオネラ属菌数は大きく変動することが報告されている [11]。また、レジオネラ属菌はアメーバのような原生生物内やバイオフィームなどの環境に住み着くことによって、洗浄剤の殺菌作用から逃れていることが知られているため、これらの環境を除去するためにも、洗浄剤の使用と物理的な洗浄を併用することが望ましい [12]。

分子系統解析の結果、PFGE法では同一冷却塔から分離した株の類似度は100%となり、異なる冷却塔由来の株間では100%を示すものはなかった。また、B-01-1とD-01-1は異なる血清型、ST型であるにもかかわらず、類似度が90%と高い値を示した。今回の結果をみると、解析方法の違いによって菌株間の関連性が異なる結果を示す可能性があることが示唆された。

SBT法は塩基配列をもとにAllele Numberを決定しST型を分けるため、バンドパターンによって解析を行うPFGE法よりも客観性が高い検査法であり、他の検査機関との結果の比較が容易である。加えて、ST型と浴槽水や冷却塔水などの生息環境に、相関がみられることが明らかになっている [13]。今回3株が分類されたST1はST型の中でも世界各地で患者と環境の両方からよく分離される型で、特に冷却塔から分離される割合が高いとされる型である [14]。

SBT法とPFGE法の解析結果において、株間の関連性に相違がみられた。各解析法にはそれぞれ利点があるた

め、目的に応じて適切な解析法を使用することが望ましいが、一方で、ひとつの検査方法で解析を行うと近縁性を示す結果となっても、別の方法を用いると関係性が否定される可能性が考えられる。このため、可能であれば複数の検査結果をみて総合的に判断し、最終的な判定結果を出すことで、より正確な結果を導き出すことができると考えられる。

文 献

- [1] 国立感染症研究所. 感染症発生動向調査感染症週報. 2015;53:6
- [2] 広島県感染症・疾病管理センター. 四類感染症の月別発生状況 [Internet]. [modified 2016 Aug 31; cited 2016 Sep 25]. Available from: <http://www.pref.hiroshima.lg.jp/site/hcdc/hidsc-kanzya-zyouhou-tuki-kousin-4rui.html#40>
- [3] 吉田正法, 重村久美子, 徳島智子, 吉田英弘, 佐藤正雄, 廣瀬みよ子, 門司慶子, 石津尚美, 竹中章, 前川純子. 病院内冷却塔からのレジオネラ感染疑似事例 - 福岡市. 病原微生物検出情報. 2013;36(1)
- [4] 国立感染症研究所. レジオネラ症. 2011
- [5] 山本啓之. PCR法によるLegionella属細菌の検出・同定. 日本臨床. 1992; 50 特別号: 394-399.
- [6] Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, and Atlas RM. Detection of Legionella with polymerase chain reaction and gene probe methods. Mol Cell Probe. 1990;4:175-187.
- [7] Ratcliff RM. Sequence-based identification of legionella. Methods Mol Biol. 2013;954:57-72.
- [8] Legionella species identification by mip similarity. [Internet]. Health Protection Agency. Available from: http://bioinformatics.phe.org.uk/cgi-bin/legionella/mip/mip_MAFFT_NEXUS.cgi
- [9] Legionella pneumophila Sequence-Based Typing [Internet]. [cited 2016 Oct 13]. Available from: http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php
- [10] 国立感染症研究所. レジオネラ症 2008 ~ 2012.12. 2013;34(6)
- [11] 松井隆一, 藤木 敬行, 嶋原 茂, 高橋 佳代子, 木原真隆, 大貫 奈穂美, 古田 賢二. 都内の特定建築物の冷却塔におけるレジオネラ症の発生防止対策. Ann Rep Tokyo Metr Inst Pub Health. 2012; 63:281-284.
- [12] 厚生労働省健康局生活衛生課長: 健衛発第0125001号, 建築物における維持管理マニュアルについて (通知), 2008

- [13] Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhata K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, et al. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bath water and soil in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:4263-4270
- [14] 前川純子, 倉文明, 大西真, 渡辺ユウ, 渡辺祐子, 磯部順子. レジオネラ臨床分離株の型別—レファレンスセンター活動報告として—. 病原微生物検出情報. 2013;34(6)