

## 資料

温泉における *Legionella pneumophila* の分子疫学的調査金子 紀子, 大谷 勝実, 青木 敏也<sup>1)</sup>Examination of epidemiological molecular analysis of *Legionella pneumophila* isolated from hot spring.

by Akiko KANEKO, Katsumi OOTANI and Toshiya AOKI

A, B 二つの温泉施設から長期間にわたり分離された *Legionella pneumophila* (Lp) 血清群 1 (SG1) についてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) により遺伝子型別を行った。A 温泉では約 2 年半, B 温泉では約 1 年半, それぞれ長期間にわたり同一遺伝子型の株が存在していた。B 温泉の調査から, 日常の清掃で除去されなかったバイオフィームが同一遺伝子型定着の要因になったと考えられた。Variable-number tandem-repeat (VNTR) による型別は PFGE の型別結果とほぼ一致し, Lp における分子疫学解析の有力な手法になると思われた。

**Key Words** : *Legionella pneumophila*, PFGE, Variable-number tandem-repeat (VNTR)

## I はじめに

わが国におけるレジオネラ肺炎は温泉を原因とした事例が多く認められている。このため, 温泉水のレジオネラ属菌による汚染実態については数多くの報告がある。レジオネラ属菌は塵埃などとともに入水環境に侵入し, 宿主となるアメーバ内で増殖することが知られている。温泉施設においては, 浴槽壁, 配管, 濾過材などに形成されたバイオフィームに生息するアメーバ内で増殖・定着するといわれている<sup>2), 3)</sup>。しかし, 長期にわたり同一の温泉施設から分離されたレジオネラ属菌について精査した報告はない。今回, 同一の温泉施設から長期間にわたり分離された Lp SG1 がどのような遺伝子的関連性があるのかを明らかにするため, PFGE を用い分子疫学的調査を行った。また, 分子疫学的手法として最近報告された<sup>(1)</sup> PCR を用いた VNTR による型別についても検討したので報告する。

## II 方法

(1) 菌分離及び保存

1) 山形県村山保健所検査課

表1 用いたL.pの由来及び採材時期

採材月日	由来	血清型	株数
H12.12.9	A温泉	1	12
H13.1.21	A温泉	1	1
H13.2.21	A温泉	1	1
H13.2.27	A温泉	1	1
H13.8.22	A温泉	1	2
H14.1.10	A温泉	1	2
H14.2.22	A温泉	1	2
H14.8.30	患者K.S	1	2
H14.8.30	A温泉	1	2
H14.9.7	A温泉	1	1
H15.4.24	患者J.S	1	3
H15.4.25	A温泉	1	2
H14.12.9	B温泉	1	1
H15.1.20	B温泉	1	1
H17.8.16	B温泉	1	2
H18.2.13	B温泉	1	2
H18.8.12	B温泉	1	2
H18.10.16	B温泉	1	2
H19.1.22	B温泉	1	1
H19.1.24	B温泉	1	1
H19.1.30	B温泉	1	2

山形県内の A 及び B 温泉施設を対象とした。温泉水は遠心濃縮法により 100 倍濃縮し, 0.2M HCl-KCl buffer (pH2.2) で酸処理後 WY0 α 培地 (栄研化学) に塗布した。37℃ 湿潤環境下で 7 日間培養した。発育した灰白色コロニーを釣菌し, 性状確認後レジオ

ネラ免疫血清(デンカ生研)でSG1型菌を検出した。分離した菌株は20%スキムミルク溶液に懸濁し、 $80^{\circ}\text{C}$ で保存した。調査に用いたLpの由来及び採水時期は表1に示した。

### (2) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

新鮮培養菌を蒸留水  $100\ \mu\text{l}$  に懸濁し、1% Low Melt Agarose (BIO-RAD) を等量加え、ゲルプラグを作成した。ゲルプラグを  $1\text{mg/ml}$  Lysozyme で4時間、 $1\text{mg/ml}$  ProteinaseK で1晩処理した。さらに、制限酵素 *Sfi* I (10U/プラグ) で1晩処理した。処理したプラグを1% Pulsed Field Certified Agarose (BIO-RAD) に包埋し、GENE Path System (BIO-RAD) を用い、電圧  $6.0\text{V}$ , pulse time  $5.3\text{--}34.9$ , 角度  $120$  度、泳動用緩衝液温度  $14^{\circ}\text{C}$ , 泳動時間  $19.7$  時間で電気泳動を行った。泳動後臭化エチジウムで染色し泳動像を観察した。

### (3) VNTR

新鮮培養菌を蒸留水に懸濁し、 $100^{\circ}\text{C}$  10分加熱、遠心し上清をテンプレートとして用いた。tandem-repeat を挟み込むプライマーセットは表に示す10セットを使用した<sup>1)</sup>。PCRはMyCycler (BIO-RAD) を用い  $94^{\circ}\text{C}$  5分のプレヒート後  $94^{\circ}\text{C}$  30秒,  $60^{\circ}\text{C}$  30秒,  $72^{\circ}\text{C}$  45秒のヒートサイクルを35回行った。PCR産物は10%e-パジェル(アトー)を用いポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後臭化エチジウムで染色し泳動像を観察し、増幅産物のサイズを計測、tandem-repeat 数を求めた。

## III 結果

### (1) A 温泉

平成12年12月9日から平成15年4月25日の約2年半にわたりLp SG1が分離された。この期間中A温泉が感染源と想定されるレジオネラ症患者2名からもLp SG1が分離された。

これらの分離株についてPFGEを実施した。その結果Aパターンに分類される株がこの期間中常に認められた(表3)。患者K.Sから分離された株もAパターンと分類され、A温泉が感染源であることが証明さ

れた。患者J.SはA温泉から分離された株とは異なったPFGEパターンを示し、A温泉との関連は証明で

表2 VNTR解析に用いたプライマー

No.	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	Repeat size (bp)
1	Lpms1_bL	ACGAGCATATGACAAAAGCCTTG	45
	Lpms1_bR	CGGATCATCAGGTATTAATCGC	
2	Lpms3L	CAACCAATGAAGCAAAGCA	96
	Lpms3R	AGGGGTTGATGGTCTCAATG	
3	Lpms13L	CAATAGCATCGGACTGAGCA	24
	Lpms13R	TGCTGTGTATCTGGAAAAGC	
4	Lpms17L	CAGCTCACCCCGTATCACTT	39
	Lpms17R	TAACATCAATGACCCGCGAAA	
5	Lpms19_bL	GAACATATCAGAAGGAGCGAT	21
	Lpms19_bR	GGAGTTTGACTCGGCTCAGG	
6	Lpms31L	GCAATCCGGCCTCGCAAGCC	45
	Lpms31R	CAGGCACACCTTGGCCGTC	
7	Lpms33L	ACCACAGCAGTTTGAACATAAT	125
	Lpms33R	GGGAGAAGTTATAGATCTATTTCG	
8	Lpms34L	GAAAAGGAATAAGGCGCAGCAC	125
	Lpms34R	AAACCTCGTTGGCCCTCGCTT	
9	Lpms35L	CTGAAACAGTTGAGGATGTGA	18
	Lpms35R	TTATCAACCTCATCATCCCTG	
10	Lpms37L	GCTTTTGTTCACCTTAATTGCTA	7-8
	Lpms37R	GAATAAATATTTCTTTAAGCT	

きなかった。

VNTRは、温泉由来10株について実施した。PFGEでAパターンと分類された8株はプライマーセットNo9でリピート数21(5株)とリピート数20(3株)に区別されたが、他のプライマーセットでは同一のリピート数であった(表3)。Bパターンと分類された株はAパターンと分類された株と7種のプライマーセットで異なるリピート数であった。Cパターンは同様に5種のプライマーセットで異なるリピート数であった。

### (2) B 温泉

平成14年12月9日から平成19年1月30日の約6年にわたりLp SG1が分離された。これらの分離株についてPFGEを実施した。その結果、平成17年8月16日から平成19年1月30日の約1年半の間に分離されたSG1はbパターンに分類される株が常に認められた(表3)。

VNTRは、PFGEでbパターンと分類された6株で実施した。3株がプライマーセットNo9でリピート数20と21、プライマーセットNo10でリピート数7と8であったが他の8種のプライマーセットでは同一のリピート数であった。

## IV 考察

自然界においてレジオネラ属菌はアメーバ内で増殖している。水環境へのレジオネラ属菌の侵入は塵

埃などともにレジオネラ属菌を含むアメーバシストの形で入ってくると考えられている<sup>2)</sup>。適当な条件下であれば種々のタイプのレジオネラ属菌が温泉といった水環境に入ってくることが想定される。実際、同一の温泉水試料からいくつかのタイプのレジオネラ属菌が分離されることは日常的に経験している。

今回、A及びB二つの同一温泉施設から長期にわたりLp SG1が分離され、それらの菌はPFGEで同一の遺伝子型であることが示された。A温泉では約2年半、B温泉では約1年半同一遺伝子型のLpが検出され、長期間にわたり同一遺伝子型の菌が温泉施設に定着していることが明かとなった。レジオネラ属菌の宿主となるアメーバは浴槽、貯湯槽、配管等の内面に形成されたバイオフィームに多く生息しており<sup>2),3)</sup>、適切な清掃によるバイオフィームの除去がなされないと生息を続ける。このことが、長期間同一遺伝子型のLpが検出される原因と考えられる。徹底的な清掃によるバイオフィームの除去が行われると、定着していたレジオネラ属菌が消失し、新たな遺伝子型のレジオネラ属菌の侵入があると推測される。B温泉においては浴槽壁を構成するタイル状木板の裏面に間隙が生じ、清掃できない木板裏面にバイオフィームが形成されたことが同一遺伝子型Lpの定着になったと考えられた。

レジオネラ肺炎の患者分離株が推定原因施設から分離された株と同一種、同一血清型の場合、PFGE等により遺伝子型の比較を行い、同一遺伝子型であれば原因施設特定の有力な証拠となる。しかし、推定原因施設から分離されない場合、長期間定着するという今回の結果を踏まえると、過去に分離された株が保存されていれば、その株との比較も原因施設特定のためには意義のあることと考えられる。

VNTRは結核菌の遺伝子型別の手法として認知されつつある。最近、LpでのVNTRがヨーロッパを中心として検討されるようになってきている。今回、このワーキンググループが報告した方法に準じてPFGEの結果と併せ検討した。A温泉由来株はPFGEで3種

のパターンに分類された。VNTRでもこれらの3パターンは明らかにそれぞれ異なる結果が得られた。

表3 PFGE及びVNTR結果

採材月日	由来	PFGE	VNTR
H12.12.9	A温泉	A	7,8,11,3,4,15,5,1,21,8
H13.1.21	A温泉	B	8,8,9,3,5,13,2,6,10
H13.2.21	A温泉	A	7,8,11,3,4,15,5,1,20,8
H13.2.27	A温泉	A	7,8,11,3,4,15,5,1,20,8
H13.8.22	A温泉	A	7,8,11,3,4,15,5,1,20,8
H14.1.10	A温泉	A	7,8,11,3,4,15,5,1,21,8
H14.2.22	A温泉	A	7,8,11,3,4,15,5,1,21,8
H14.8.30	患者K.S	A	NT
H14.8.30	A温泉	A	7,8,11,3,4,15,5,1,21,8
H14.9.7	A温泉	C	8,8,11,3,4,16,1,1,3,14
H15.4.24	患者J.S	D	NT
H15.4.25	A温泉	A	7,8,11,3,4,15,5,1,21,8
H14.12.9	B温泉	a	NT
H15.1.20	B温泉	a	NT
H17.8.16	B温泉	b,c	NT
H18.2.13	B温泉	b	7,8,12,3,4,15,5,1,21,8
H18.8.12	B温泉	b	7,8,12,3,4,15,5,1,21,8
H18.10.16	B温泉	b	7,8,12,3,4,15,5,1,20,7
H19.1.22	B温泉	b	7,8,12,3,4,15,5,1,20,7
H19.1.24	B温泉	b	7,8,12,3,4,15,5,1,20,7
H19.1.30	B温泉	b	7,8,12,3,4,15,5,1,21,8

NT: not tested

PFGEで主要なAパターンと分類された株はプライマーセットNo9でリピート数20と21に分かれた。しかし、この領域におけるリピートサイズは18bpと小さいことからリピート数20と21の違いを正しく判断できたか問題がある。同様にPFGEでbパターンと分類されたB温泉由来株はプライマーセットNo9の他にNo10でリピート数7と8に分かれた。プライマーセットNo10の領域のリピートサイズは7-8bpであり、違いを正しく判断できるかさらに困難と思われる。これらの課題があったが、全体としてPFGEの分類とほぼ一致し、VNTRはLpにおける分子疫学上の有力な手法になると思われた。

#### 【文献】

- 1) Christine Pourcel, Paolo Visca, Baharak Afshar, Silvia D' Arezzo, Gilles Vergnaud and Norman K. Fry: Identification of Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) Sequences in *Legionella pneumophila* and Development of an Optimized Multiple-Locus VNTR Analysis Typing Scheme. J. Clin. Microbiol. 45, 1190-1199, 2007
- 2) 厚生省生活衛生局企画課(監): 新レジオネラ症防止指針, (財)ビル管理教育センター, 東京, 1999
- 3) 竹田美文, 林英生(編): 細菌学, 朝倉書店, 東京, 2002