

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究
地域特異的な感染源不明クラスターに関する調査(平成 25 年度)

研究分担者 中嶋 洋 岡山県環境保健センター

研究要旨

県内で発生したレジオネラ症患者のうち、平成 20 年～25 年に *L.pneumophila* (Lp) 血清群 (SG) 3 を 9 株収集した。sequence-based typing (SBT) 法による型別の結果、すべての株が sequence type (ST) 93 に型別され、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子パターンも一致した。このことは、患者の感染源及び原因菌が同一である可能性を示唆しており、感染源究明のための調査を継続実施している。現在までのところ、本菌は岡山県内のみで分離されており、地域特異的な菌株である。本年度は、浴槽水等 140 検体を検査し、31 検体からレジオネラが分離された。また、保健所等が分離したレジオネラ菌株 79 株を収集した。これらのうちの Lp SG3 と、過去に浴槽水等から分離された LpSG3 株を含め、131 株について PFGE 法による解析を行ったが、いずれの菌株も患者分離株とは遺伝子パターンが異なっており、感染源の究明には至らなかった。今後もレジオネラ感染防止対策として、多様な検体について調査を行い、感染源を究明していく必要がある。

A. 研究目的

当センターでは、レジオネラレファレンスセンター活動として、平成 19 年より岡山県内のレジオネラ症患者分離株を収集し、血清群別及び遺伝子解析を行っている。また、浴槽水等環境検体のレジオネラ汚染調査を継続実施しており、患者分離株との関連を検討している。患者分離株のうち、*L.pneumophila* (以下、Lp) 血清群(以下、SG) 3¹⁾は、遺伝子解析結果が一致しており、同一菌あるいは同一の感染源による感染の可能性が示唆された。本菌は、岡山県以外では未検出であり、地域特異的なレジオネラであることが確認されている。このため、県内の環境検体における汚染実態の把握と、患者の感染源究明を目的とした調査を、実施

している。本報告では、平成 25 年度の調査結果を報告する。

B. 研究方法

(1)材料

平成 25 年度は、県内のレジオネラ症患者から分離されたレジオネラ菌株 1 株を、収集した。環境検体は、浴槽水等 140 検体を採水し、レジオネラの検査を実施した。また、保健所等が浴槽水等から分離したレジオネラ菌株 79 株を収集し、同定および血清群別を実施した。このうち、Lp SG3 と同定された株と、過去の調査で分離された環境検体由来及び患者由来の Lp SG3 株計 131 株について、遺伝子解析を行っ

て比較した。

(2)方法

環境検体のレジオネラ検査は、濾過法により 100 倍濃縮後、等量の 0.2M HCl・KCl 緩衝液 (pH2.2) で前処理を行い、GVPC 寒天培地及び WYO 寒天培地あるいは MWY 寒天培地に塗抹した。36 で 7 日間培養し、その間に発育したコロニーを斜光法により観察して、血液寒天培地と BCYE 寒天培地に接種してスクリーニングした後、血清群別 (レジオネラ免疫血清: デンカ生研) 及び PCR 法 (*mip* 遺伝子及び 5S rRNA 遺伝子) を実施し、同定した。菌株の遺伝子解析による比較は、パルスフィールドゲル電気泳動 (以下、PFGE) 法を用いて、改良プロトコールによる 2 日間の方法²⁾ で実施した。また、sequence-based typing (以下、SBT) 法による sequence type (以下、ST) の型別と、ST を用いた minimum spanning tree による Lp SG3 株間の類縁関係の解析は、国立感染症研究所に依頼して実施した。

(倫理面への配慮)

患者株の収集にあたっては、患者情報から個人の特定ができないように、最低限の情報のみ示した。

C. 研究結果

公衆浴場の浴槽水等 140 検体を検査し、その結果を表 1 に示した。

レジオネラは 31 検体 (22.1%) から検出され、その内訳は浴槽水が内湯 25 検体 (24.8%)、露天風呂 5 検体 (18.5%)、原水・給湯水は原水 1 検体 (9.1%) であった。ジャグジー及びプールからは、検出されなかった。分離菌の血

清群は、浴槽水由来株は Lp SG1、3、4、5、6、7、8、10、11、12、14、群別不能、原水由来株は Lp SG1 であった。

保健所等が分離したレジオネラ菌株を収集し、血清群別を実施した結果を、表 2 に示した。収集したレジオネラ菌株は 79 株で、浴槽水、シャワー水、ジャグジー水、プール水及び冷却塔水から分離された株であった。菌種と血清群は、浴槽水は Lp が SG1、3、4、5、6、8、9、10、12、群別不能と、*L.anisa*、*L.micdadei* 及び他のレジオネラ属菌であった。シャワー水は Lp SG5、6、ジャグジー水は Lp SG3、10、プール水は Lp SG1、3、10、冷却塔水は Lp SG1、3、13 であった。

現在までに収集したレジオネラ症患者分離株を、表 3 に示した。平成 25 年度は Lp SG3 を 1 株のみ収集し、過去 7 年間に収集した合計株数は 28 株になり、すべての株が Lp であった。血清群は、SG1 が 16 株、SG2 が 1 株、SG3 が 9 株、SG9 が 1 株、SG10 が 1 株であった。患者の症状について、Lp SG1 感染患者は重症度が高い傾向にあり、発熱、咳嗽、頭痛、下痢などの症状以外に、呼吸困難、意識障害、肺炎などが多く見られた。これに対し、Lp SG3 感染患者は比較的軽症例が多く、胸部異常影のみ観察された患者が、9 名のうち 4 名いた。糖尿病を基礎疾患に持つ患者では、死亡例が見られた。患者分離株の SBT 法による解析の結果、SG1 の株は多種類の ST に分類されたのに対して、SG3 の 9 株はすべて同じ ST93 に型別され、PFGE 法による遺伝子パターンも同一であった。患者分離株のうち、SG1 の ST609 と ST1077 及び SG3 の ST93 の各菌株は、国内ではほぼ岡山県のみで地域特異的に分離されている株であった。

同一の遺伝子タイプを示した患者由来の Lp SG 3 と、過去に分離された株を含めた環境由来の Lp SG3 株について、PFGE 法を用いた遺伝子解析により、関連性を検討した。その結果は、表 4 及び図 1 と図 2 に示した。

浴槽水等由来株 122 株の PFGE パターンは 60 パターンに分類され、多様な遺伝子パターンの菌による汚染が示された。しかし、患者分離株と一致する遺伝子パターンは無く、デンドログラム解析では、患者分離株のパターンと最も近い株の類似度が 50%程度で、かなり低い値であった(図 1)。また、minimum spanning tree による解析でも、患者由来の ST93 株は環境由来株と clonal complex を作らず、類縁関係は見られなかった(図 2 左下の黄色の円)。

D. 考察

県内では、平成 23 年以降、毎年 20 名以上のレジオネラ症患者が報告されている。患者の多くは尿中抗原検査により診断されているため、原因菌は主に Lp SG1 と思われるが、分離株はない状況である。このため、感染源と推定される検体から菌が分離されても、感染源の究明に支障を生じている。当センターは、レジオネラレファレンスセンターの活動として、病院でレジオネラ症患者より分離された株を、平成 19 年より収集している(表 3)。今まで収集した患者分離株はすべて Lp であり、SG1(16 株)、SG3(9 株)の順に検出頻度が高い。SG1 感染患者の症状は比較的重症例が多いのに対し、SG3 感染患者の場合は比較的症状が軽い傾向が見られた。また、SG3 は患者の検体から分離される菌数が少ないという情報を得ており、比較の見逃され

易く、菌の分離やレジオネラ症の診断が困難であることが推察できる。このような状況から、特に Lp SG3 の分離には細心の注意を払い、本菌によるレジオネラ症患者の発生について、今後も注視していく必要があると考える。

患者分離株の遺伝子解析により、Lp SG3 はいずれも ST93 で、同一 PFGE パターンを示しており、同じ菌あるいは同じ感染源である可能性が高いことが推察された。しかしながら、今までの調査結果から、どの環境由来株も患者由来株の PFGE パターンと一致したものはなかった。特に、浴槽水由来株については、多数の株の PFGE パターンを比較したが、患者分離株とは異なっていたため、感染源は浴槽水以外の環境検体である可能性も考えられる。一方、Lp SG1 については、多種類の ST に型別された。このうち ST609 と ST1077 は、SG3 同様に地域特異的な株であることが、確認されている。ST609 は、当県以外では鳥取県の冷却塔水からのみ 1 株検出されており、ST1077 は平成 23 年度に国内で初めて岡山県患者から分離された新規遺伝子型である。今後は、これらの株の感染源究明のため、より多様な検体について調査を継続し、地域特異的なクラスターを形成するレジオネラ株の汚染実態を把握して、感染予防対策に役立てる必要があると考える。

なお、本調査にご協力いただきました岡山市保健所、倉敷市保健所および岡山県健康づくり財団の関係者各位、患者株の分与を戴きました倉敷中央病院検査課の藤井寛之 先生、川崎医科大学附属病院検査課の黒川 幸徳 先生に、深謝いたします。

E. 結論

- 1) 平成 25 年度は、県内のレジオネラ症患者から分離された *L.pneumophila* SG3 を、1 株収集した。
- 2) 今まで収集した患者由来 Lp SG3 株はすべて ST93 で、PFGE 法による遺伝子パターンも一致していた。
- 3) Lp SG3 の 131 株 (患者及び浴槽水等環境由来株) について、遺伝子解析 (PFGE 法、SBT 法及び minimum spanning tree) を行った。
- 4) Lp SG3 は、患者由来株と環境由来株では、PFGE による遺伝子パターンが異なり、ST による minimum spanning tree 解析でも、関連は見られなかった。

F. 参考文献

- 1) 西山 明宏、石田 直、興相 陽平、他：
Legionella pneumophila serogroup 3 による呼

吸器感染症の 4 症例 . 感染症誌 2011 ; 85 : 373-379 .

- 2) 常 彬、前川 純子、渡辺 治雄 : レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の改良 . IASR 2008 ; 29 : 333-334 .

G. 研究発表

- 1) 中嶋 洋 , 大畠律子 , 河合央博 , 前川純子 , 倉 文明 , 藤井寛之 , 黒川幸徳 , 船橋圭輔 , 田中知徳 , 吉岡明彦 , 宮井泰三 : 患者由来 *Legionella pneumophila* 血清群 3 sequence type 93 の疫学調査 岡山県 . IASR 2013;34:,164-165

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 検体別レジオネラ検出状況(平成25年度)

検体名		検体数	陽性検体数	検出率(%)	検出菌種及び血清群(検体数)*
浴槽水	内湯	101	25	24.8	<i>L.pneumophila</i> SG1(9),3(5),5(4),6(6),7(1),8(1),10(4),11(1), 12(1),UT(1)
	露天風呂	27	5	18.5	<i>L.pneumophila</i> SG1(3),3(2),4(2),5(1),6(2),10(1),14(1)
原水・給湯水		11	1	9.1	<i>L.pneumophila</i> SG1(1)
ジャグジープール		1	0	0.0	
計		140	31	22.1	

*:重複を含む。 UT:O血清群別不能

表2 保健所等分離レジオネラ株(平成25年度)

検体名	菌株数	検出菌種及び血清群(株数)
浴槽水	65	<i>L.pneumophila</i> SG1(10),3(11),4(6),5(6),6(9),8(1),9(3),10(12),12(1),UT(2) <i>L.anisa</i> (1), <i>L.micdadei</i> (2), <i>Legionella</i> spp.(1)
シャワー水	3	<i>L.pneumophila</i> SG5(1),6(2)
ジャグジー水	2	<i>L.pneumophila</i> SG3(1),10(1)
プール水	3	<i>L.pneumophila</i> SG1(1),3(1),10(1)
冷却塔水	6	<i>L.pneumophila</i> SG1(3),3(2),13(1)
計	79	

UT:O血清群別不能

表3 県内で発生したレジオネラ症患者分離株(平成19年~25年)

菌株No	分離年	血清群	ST	PFGE パターン	住所地	年齢	性別	検体	症状						
									発熱	咳嗽	呼吸困難	意識障害	肺炎	その他	
K9	2007	1	595		倉敷市	64	男	喀痰							
K11	2007	1	593		新見市	69	男	喀痰							
K105	2008	1	609		倉敷市	59	男	喀痰							頭痛
K117	2008	1	609		倉敷市	79	男	喀痰							
K118	2008	1	594		新見市	55	男	喀痰							
K090729	2009	1	550		総社市	37	男	喀痰							下痢
O100216	2009	1	23		不明	54	男	喀痰							
K100118	2010	1	609		総社市	58	男	喀痰							
K100503	2010	1	42		倉敷市	69	男	喀痰							
K110728	2011	1	1077		倉敷市	55	女	喀痰							胸部異常影(糖尿病あり)
K111019	2011	1	120		倉敷市	78	男	喀痰							
KD111109	2011	1	120		倉敷市	78	男	喀痰							腹痛、多臓器不全
K111117	2011	1	1077		倉敷市	91	男	喀痰							
K111213	2011	1	1077		倉敷市	69	男	喀痰							
K120214	2012	1	42		岡山市	55	男	喀痰							
K121108	2012	1	530		倉敷市	71	男	喀痰							ICUに入院
KD110625	2011	2	354		広島市	63	男								肺炎から死亡(糖尿病あり)
K79	2008	3	93		倉敷市	66	男	喀痰							
K86	2008	3	93		空岡市	58	女	喀痰							胸部異常影、症状無し
K95	2008	3	93		倉敷市	79	男	喀痰							胸部異常影、症状無し
K100423	2010	3	93		岡山市	60	女	肺胞洗浄液							
K100712	2010	3	93	一致	倉敷市	74	男	喀痰							
K110707	2011	3	93		総社市	77	男	喀痰							胸部異常影、症状無し
K110908	2011	3	93		倉敷市	59	女	喀痰							胸部異常影、症状無し
K120831	2012	3	93		広島県	58	女	喀痰							胸部異常影、非定型肺炎疑い
K130920	2013	3	93		不明	73	男	喀痰							
K130108	2013	9	1283		倉敷市	65	男	喀痰							全身倦怠感
KD120905	2012	10	1283	類ノ振られず	真庭市	74	男	喀痰							ICUに入院

表4 県内で分離された *L.pneumophila* SG3 株の PFGE パターン数

由来	菌株数	バンドパターン数*
浴槽水	91	51
原湯	3	3
ジャグジー水	3	2
プール水	8	4
プールの過水	5	2
フローリング水	9	1
冷却塔水	3	3
患者	9	1
計	131	61

*検体間の重複を含む

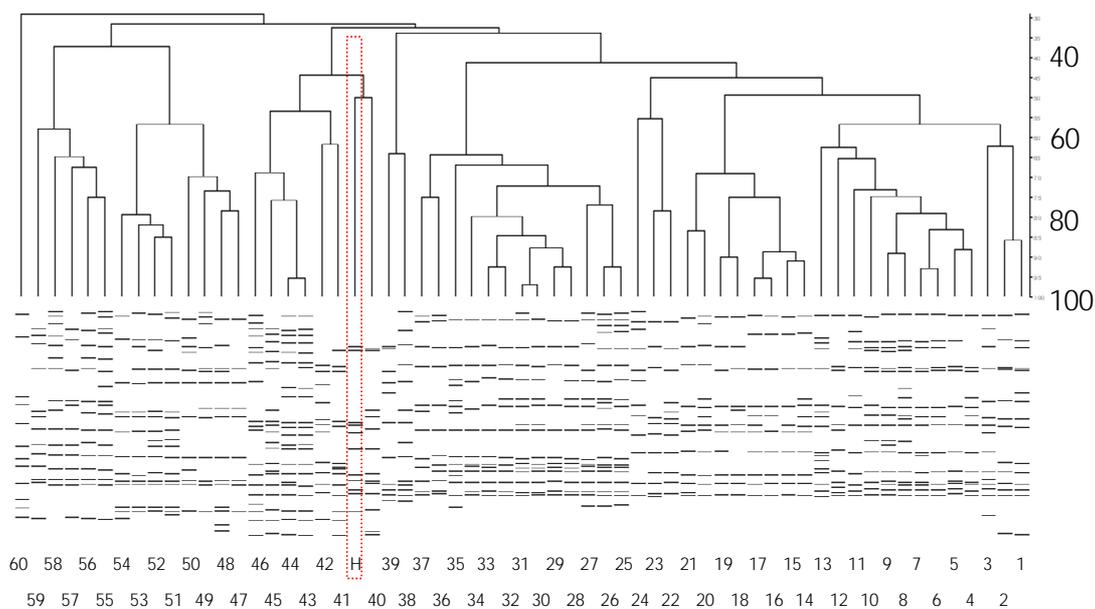


図1 患者および浴槽水等由来 *L.pneumophila* SG3 株の PFGE パターンと
デンドログラム解析結果 (H: 患者由来株)

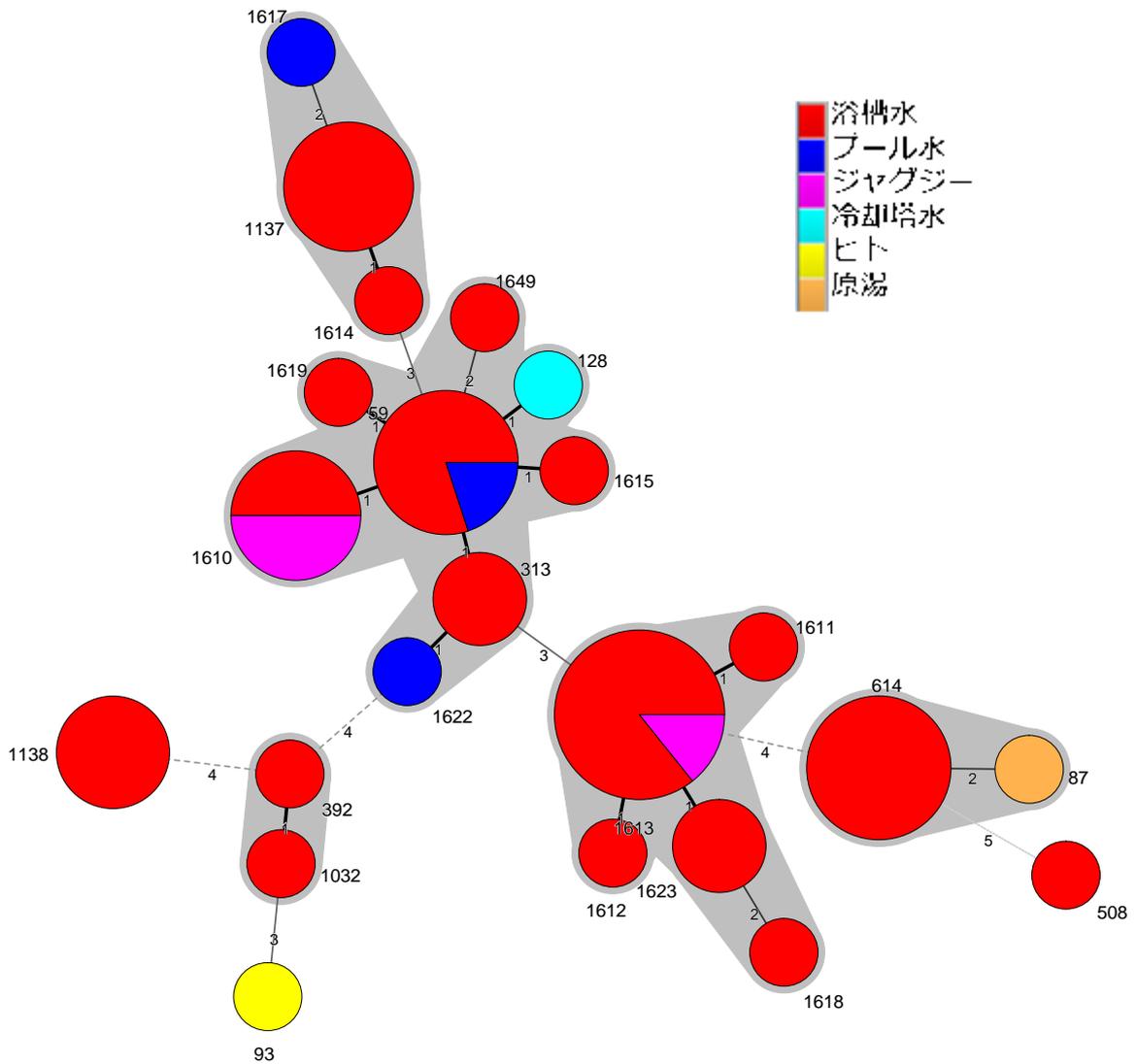


図2 *Legionella pneumophila* SG3 の SBT 法による minimum spanning tree
(感染研: 前川純子先生)

円の大きさは菌株数を示す。

円の中の数字は ST を示す。

短く太い線は、single locus variant

薄い実線は、double locus variant

背景が太い集まりは clonal complex を示し、隣り合う遺伝子座の違いが 2 つ以下の ST の集団を示す。

線の間数字は、7 つの locus の内いくつ違うかを示す。