

患者及び浴場施設検体から複数血清群の *Legionella pneumophila* が分離された事例について

市原祥子・江藤良樹・濱崎光宏・村上光一・竹中重幸・堀川和美・
荒牧明世*¹・前川純子*²

浴槽内で溺水し、レジオネラ肺炎を発症した患者の喀痰 1 検体と、当該患者が利用した浴場施設検体 3 検体について、レジオネラ属菌の検査を実施した。その結果、喀痰からは血清群（以下、SG）1 と 6 が、浴場施設検体からは SG 1、3、5、6 及び型別不能の *Legionella pneumophila* が分離された。また、浴場施設検体中のレジオネラ属菌数は、3,900 - 13,800 CFU/100 mL であった。さらに、パルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的解析の結果、患者由来株と浴場施設由来株の遺伝子型は、各血清群で一致した。また、sequence-based typing でも、血清群 1 では sequence type (ST) 1212、血清群 6 では ST 537 を示し、両由来株は互いに一致した。これらの結果から、患者由来株と浴場施設由来株は、同一菌株あるいは相互に関係する菌株である可能性が高いと考えられた。本事例は、浴場施設検体のみならず、患者からも複数の血清群が分離された珍しい事例であった。

[キーワード：浴場施設、*Legionella pneumophila*、血清群 1、血清群 6、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)、sequence-based typing (SBT)]

1 はじめに

レジオネラ症において、臨床検体から分離されたレジオネラ属菌は、*Legionella pneumophila*（以下、*L. pneumophila*）が 9 割以上を占め、そのうちの 8 割が血清群（以下、SG）1 であるとされる¹⁾。

レジオネラ属菌は本来土壌など自然界に存在する細菌であるが、循環浴槽水や空調設備の冷却塔などに入ると、そこでアメーバを宿主として増殖する。そのため、レジオネラ症の感染源の一つとして、浴場施設が指摘されており、厚生労働省により、公衆浴場における衛生管理要領や、循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル等が示されているところである²⁾³⁾。

レジオネラ症は、患者尿中に排泄される可溶性抗原（以下、尿中抗原）の検出による診断で届出が可能であるが、感染源を解明するためには、尿中抗原陽性の診断にとどまらず、患者検体から菌を分離し、患者周辺の環境から分離された菌株との関連性を確認することが重要である。しかし、検体採取が困難などの理由で臨床検体からの菌分離は稀なのが現状

である。今回、我々は浴槽内で溺水後にレジオネラ症を発症した患者と、当該患者が利用した浴場施設検体から、関連性が疑われた複数血清群の *L. pneumophila* が分離された事例を経験したので、その概要を報告する。

2 事件の経緯

当該患者は、72 歳、男性、糖尿病の治療中であった。平成 24 年 2 月、循環式の A 浴場施設大浴場利用中に、浴槽の中で溺れた状態で発見され、医療機関へ搬送された。入院 5 日目に尿中抗原が検出されたため、同日、医療機関から所轄保健福祉環境事務所へレジオネラ症（肺炎型）の患者として届出があり、当該患者が利用した A 浴場施設検体のレジオネラ属菌検査を実施することとなった。

3 検体と方法

3・1 検体

患者検体は、医療機関にて喀痰 1 検体が採取された。また、浴場施設検体は、A 浴場施設から 3 検体を採取した（検体番号 1：患者が利用した大浴場の湯、2：ろ過器に入る直前の湯、3：ヘアキャッチャーのたまり湯）。

3・2 浴場施設検体の検査法

浴場施設検体は、pH を測定し、それぞれ 500 mL を 0.2

福岡県保健環境研究所（〒818-0135 太宰府市大字向佐野 39）

*1 福岡県保健医療介護部保健衛生課

（〒812-8577 福岡市博多区東公園 7-7）

*2 国立感染症研究所細菌第一部

（〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1）

μm 径ポリカーボネート製滅菌メンブランフィルター（アドバンテック）を用いて濃縮した。このメンブランフィルターを 50 mL 遠心チューブに移し、5 mL の滅菌精製水を加えて激しく混和した（以下、濃縮検体）。濃縮検体及び非濃縮検体に、塩酸 - 塩化カリウム混合溶液（pH 2.2）を等量加え、雑菌処理後に 100 μL を 2 枚のレジオネラ GVPC 選択寒天培地（以下、GVPC 培地）（Oxoid）に接種し、37±1°C、湿潤下で 7 日目まで培養した。なお、濃縮検体を滅菌精製水で 1000 倍まで 10 倍段階希釈したものについても、同様に培養した。2 枚の GVPC 培地に発育したレジオネラ属菌を疑う集落数を合計し、検体原液 100 mL 中の推定レジオネラ属菌数を算出した。GVPC 培地上に発育した集落に光をあて実体顕微鏡で観察する方法⁴⁾により、レジオネラ属菌を疑う集落を釣菌し、レジオネラ BCYEα 寒天培地（以下、BCYEα 培地）及び羊血液寒天培地に接種し、システイン要求性を確認した。BCYEα 培地にのみ発育した集落について、スライド凝集反応（デンカ生研）及びラテックス凝集反応（Oxoid）による血清型別試験及びグラム染色を実施した。また、polymerase chain reaction（PCR）法により、genus *Legionella* 16S rRNA gene（LEG）及び *L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene（*mip*）の探索を行った⁵⁾。さらに、血清型別不能であった株は、DDH レジオネラ‘極東’（極東製薬工業）を用いて、取扱説明書に従い DNA-DNA ハイブリダイゼーションを実施した。

3・3 患者検体の検査方法

患者喀痰は、安全キャビネット内で喀痰溶解試薬（スプタザイム、極東製薬工業）により溶解処理した（以下、溶解処理液）。図 1 に患者検体の検査の流れを示す。溶解処理液は、そのまま GVPC 培地又は BCYEα 培地に接種するグループ（それぞれ A-1、B-1）、溶解処理液を 3000 rpm、20 分遠心後に沈渣を GVPC 培地又は BCYEα 培地に接種するグループ（それぞれ A-2、B-2）、溶解処理液を塩酸 - 塩化カリウム混合溶液（pH 2.2）で 5 分酸処理後に GVPC 培地又は BCYEα 培地に接種するグループ（それぞれ C-1、D-1）、溶解処理液を 5 分酸処理後に 3000 rpm、20 分遠心し、沈

渣を GVPC 培地又は BCYEα 培地に接種するグループ（それぞれ C-2、D-2）に分け、シングルコロニーを形成するように塗抹した。培養条件及び分離菌株の性状検査は、浴場施設検体と同様に実施した。

3・4 パルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的解析

患者喀痰 1 検体及び浴場施設検体 3 検体から分離された *L. pneumophila* SG 1 及び SG 6（各 3 株）及び無関係事例患者由来 *L. pneumophila* SG 1（1 株）について、パルスフィールドゲル電気泳動（以下、PFGE）による分子疫学的解析を実施した。PFGE の方法は、レジオネラ属菌のパルスフィールドゲル電気泳動法 九州ブロック統一マニュアルに従い実施した（使用した制限酵素は *Sfi*I、泳動条件は 200 V、5-50 秒、14°C、21 時間）。

3・5 Sequence-based typing による分子疫学的解析

PFGE を実施した喀痰由来株 2 株（SG1 : 1 株、SG6 : 1 株）及び浴場施設検体由来株 7 株（検体番号 1 は SG1 : 1 株、SG6 : 1 株、検体番号 2 は SG1 : 1 株、SG6 : 2 株、検体番号 3 は SG1 : 1 株、SG6 : 1 株）について、sequence-based typing（以下、SBT）による分子疫学的解析を国立感染症研究所において実施した。SBT は、The European Working Group for Legionella Infections（EWGLI; <http://www.ewgli.org/>）の方法（Sequence-Based Typing（SBT）protocol for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* Version 3.1）に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA* 及び *neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別を行い、遺伝子型を決定した。

4 結果

4・1 浴場施設検体の理化学性状及び培養検査結果

浴場施設検体の残留塩素濃度は、いずれも 0.05 mg/L 未満で、厚生労働省健康局長通知²⁾で定められている遊離残留塩素濃度の基準（0.2 ないし 0.4 mg/L 程度を保ち、かつ最大 1.0 mg/L を超えないよう努めること）を満たしていなか

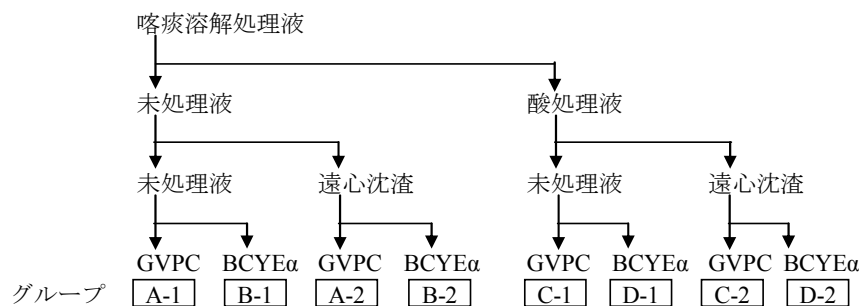


図1 患者検体の検査の流れ

表1 浴場施設検体の培養検査結果

検体番号	検体名	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	分離された <i>Legionella pneumophila</i> の血清群
1	大浴場の湯	3,900	血清群1、3、6
2	ろ過器に入る直前の湯	5,700	血清群1、3、5、6、型別不能* ¹
3	ヘアキャッチャーのたまり湯	13,800	血清群1、6、型別不能* ¹

*¹ DNA-DNAハイブリダイゼーションの結果から、*L. pneumophila*であると判定した。

った。pH はそれぞれ 8.25、8.06 及び 7.69 であった。表 1 に培養検査の結果を示す。GVPC 培地上に発育したレジオネラ属菌数は、3,900 – 13,800 CFU/100 mL であり、厚生労働省健康局長通知²⁾で定められている菌数 (10 CFU/100 mL 未満) を超えていた。各種性状検査の結果、分離菌株はいずれも *L. pneumophila* であった。血清群 (SG) は、1、3、5、6 及び型別不能であったが、このうち、SG 1 及び 6 の *L. pneumophila* は全検体から分離された。

4・2 患者喀痰のレジオネラ属菌検査結果

喀痰溶解処理液を、酸処理の有無、遠心の有無、使用培地の違いにより 8 群に分けて検査した結果、喀痰溶解処理液をそのまま GVPC 培地に接種した群 (A-1) と喀痰溶解処理液を酸処理したものを GVPC 培地に接種した群 (C-1) でレジオネラ属菌の発育を認め、*L. pneumophila* SG 1 及び 6 が分離された。

4・3 パルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的解析結果

患者喀痰 1 検体と浴場施設検体 3 検体から分離された *L. pneumophila* SG 1 (各検体 3 株の計 12 株) 及び SG 6 (各検体 3 株の計 12 株) について、PFGE を実施した (図 2)。その結果、SG 1 については、全検体同一の泳動パターンを示し、SG 6 については、検体番号 2 の 1 株 (図2、Lane 25) を除き、全て同一の泳動パターンを示した。

4・4 Sequence-based typing による分子疫学的解析結果

患者喀痰 1 検体と浴場施設検体 3 検体から分離された *L. pneumophila* SG 1 (各検体 1 株の計 4 株) 及び SG 6 (各検体 1 株、ただし、検体番号 2 は PFGE パターンが異なった株も加えたため 2 株の計 5 株) について、SBT を実施した (表 2)。その結果、得られた sequence type (以下、ST) は、SG 1 は全て ST 1212、SG 6 は全て ST 537 であった。

5 考察

レジオネラ肺炎を発症した患者の喀痰と、患者が利用した浴場施設の浴槽水等について調査した結果、喀痰及び浴場施設検体から SG 1 や 6 など複数の血清群の *L. pneumophila* が分離され、PFGE 及び SBT による分子疫学的解析により、それらは同一菌株あるいは相互に関係する菌株である可能性があることが確認された。

1人の患者から複数の血清群の *L. pneumophila* が分離された例は少なく、2011年度にレジオネラレファレンスセンターで収集された 38 名分の臨床分離株の中で、複数の血清群が分離されたのは 2 名であった (本事例を含む)⁶⁾。他の 1 名は浴場施設以外で溺水した患者で、血清群は SG 1、6、9 及び型別不能であった。また、複数血清群ではないが、溺水歴のある他の患者 1 名からは、異なる ST の SG 1 が分離された。このように、溺水事例ではエアロゾルによる感染事例よりも複数の血清群あるいは同じ血清群でも複数の ST の *L. pneumophila* に感染する可能性があると考えられる。

今回の調査では、SG 6 の 1 株が PFGE では他の株と異なる泳動パターンを示したが、SBT による解析では他の株と同一の ST 537 を示した。Amemura-Maekawa ら⁷⁾は、疫学的に無関係の分離株について PFGE と SBT を実施した結果、PFGE で異なるパターンを示した株が SBT では同じ ST を示したことから、SBT は PFGE に比べ discriminatory power が低いと報告しており、本事例における PFGE と SBT のパターンの不一致はこれを支持する結果となった。

また、本事例では SBT の結果、SG 1 は全て ST 1212、SG 6 は全て ST 537 であった。国内の臨床分離株によく見られる ST は、ST 138、ST 23、ST 1 などである⁸⁾。ST 1212 は著者らが調べた範囲ではこれまで国内外の報告例はなく、ST 537 も極めて少ないことから、本事例は稀なケースであることがわかった。浴場施設検体から、稀な ST 1212 と ST 537 が同時に検出された理由は定かではないが、ST などの遺伝子型は、生息環境を反映すると考えられることから、当該浴場施設固有の *L. pneumophila* が生息していたことが示唆された。また、患者喀痰から ST 1212 と ST 537 が同時に検出された理由としては、患者が溺水により、これらの

ST の *L. pneumophila* を含む浴槽水を誤嚥したためと考えられた。

浴場施設の利用が原因と思われるレジオネラ症患者が発生しても、その患者の検体採取が困難なことから、浴場施設と患者の直接的な関連性を示したデータは少ない。そのため、本事例のような浴場施設の環境調査と、患者及び浴場施設検体由来の分離株に関する調査のデータは、患者発生防止のための浴場施設の衛生管理の重要性を示す上でも有用な知見であると考えられる。

文献

- 1) 病原微生物検出情報：29, 332-333, 2008.
- 2) 平成15年2月14日付 健発第0214004号 公衆浴場における衛生管理要領等の改正について. 別添 1 公衆浴場にお

ける水質基準等に関する指針, 別添 2 公衆浴場における 衛生等管理要領.

- 3) 平成13年9月11日付 健衛発第95号 循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルについて.
- 4) 森本 洋：環境感染誌, 25 (1), 8-14, 2010.
- 5) 病原体検出マニュアル4類感染症, レジオネラ症 (平成23年10月7日改訂) .
- 6) 平成24年度衛生微生物技術協議会レファレンスセンター関連会議資料.
- 7) J. Amemura-Maekawa *et al.* : Microbiol. Immunol., 49 (12), 1027-1033, 2005.
- 8) 平成23年度生活衛生関係技術担当者研修会資料.

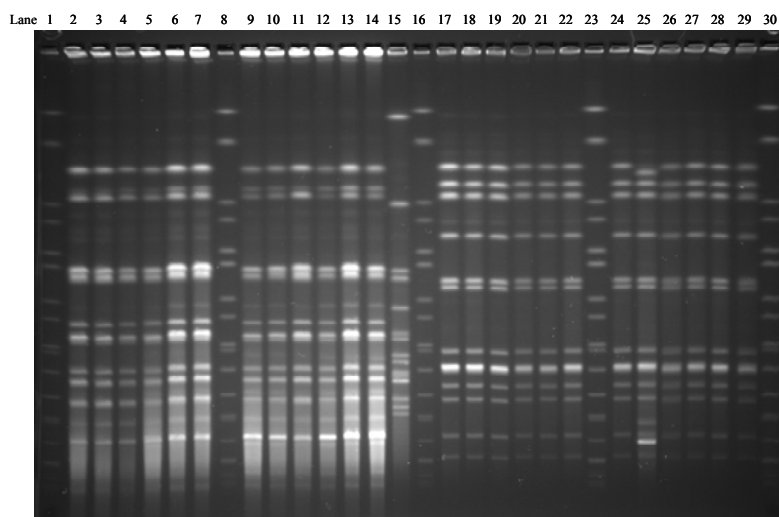


図2 患者及び浴場施設検体から分離された血清群 1 及び 6 の *Legionella pneumophila* のパルスフィールドゲル電気泳動像

- Lane 1, 8, 16, 23及び30： *Salmonella* Braenderup
- Lane 2-4：患者由来株 (SG1)
- Lane 5-7：浴場施設検体1由来株 (SG1)
- Lane 9-11：浴場施設検体2由来株 (SG1)
- Lane 12-14：浴場施設検体3由来株 (SG1)
- Lane 15：無関係事例株 (SG1)
- Lane 17-19：患者由来株 (SG6)
- Lane 20-22：浴場施設検体1由来株 (SG6)
- Lane 24-26：浴場施設検体2由来株 (SG6)
- Lane 27-29：浴場施設検体3由来株 (SG6)

表2 患者及び浴場施設から分離された *Legionella pneumophila* の sequence-based typing

検体(図2 Lane番号)	血清群	遺伝子型	ST No.
患者由来株 (2)	1	2,10,17,14,21,14,	1212
浴場施設検体1由来株 (5)	1	2,10,17,14,21,14,	1212
浴場施設検体2由来株 (9)	1	2,10,17,14,21,14,	1212
浴場施設検体3由来株 (12)	1	2,10,17,14,21,14,	1212
患者由来株 (17)	6	3,13,1,28,12,9,3	537
浴場施設検体1由来株 (20)	6	3,13,1,28,12,9,3	537
浴場施設検体2由来株 (24)	6	3,13,1,28,12,9,3	537
浴場施設検体2由来株 (25)	6	3,13,1,28,12,9,3	537
浴場施設検体3由来株 (27)	6	3,13,1,28,12,9,3	537

Multiple serogroups of *Legionella pneumophila* isolated from a patient and a public bath

Sachiko ICHIHARA, Yoshiki ETOH, Mitsuhiro HAMASAKI, Koichi MURAKAMI, Shigeyuki TAKENAKA, Kazumi HORIKAWA, Akiyo ARAMAKI^{*1}, and Junko AMEMURA-MAEKAWA^{*2}

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

*1 Department of Public Health and Medical Affairs, Division of Public Health, Higashikouen 7-7, Hakata-ku, Fukuoka 812-8577, Japan

*2 Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

The sputum of a patient that nearly drowned in a public bath and was subsequently diagnosed with Legionellosis, and three spa water samples from the public bath were analyzed. *Legionella pneumophila* serogroup (SG) 1 and 6 were isolated from the patient and *L. pneumophila* SG 1, 3, 5, 6 and untypable strains were isolated from the spa samples. The concentrations of *Legionella* spp. ranged from 3,900 to 13,800 CFU/100 mL in the spa samples. Molecular epidemiological analyses of the isolates conducted using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and sequence-based typing (SBT) revealed that the types of isolates from the patient and the bath were indistinguishable at the DNA level, indicating that the patient may have been infected with the pathogen at the bath facility. This is a rare case in which multiple serogroups of *L. pneumophila* were isolated from both a public bath and a patient.

[Key words; public bath, *Legionella pneumophila*, serogroup 1, serogroup 6, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), sequence-based typing (SBT)]