

資料

レジオネラ症患者発生に伴うPFGE解析について

穂積 和 佳 中山 浩一郎 中堂園 文 子
 岩 元 由 佳 浦 元 千 織 御供田 睦 代

1 はじめに

レジオネラ症は、レジオネラ属菌を原因とする感染症で、肺炎などを引き起こし重篤な場合死に至ることもある。レジオネラ属菌は自然界の土壌や淡水に広く生息していて、人工的な水循環設備（循環式浴槽、冷却塔、給湯設備等）に侵入して、繁殖する。そこで発生するレジオネラ属菌を含むエアロゾルを人が吸入することで感染する。

今回、レジオネラ症患者の発生に伴って感染源と思われる入浴施設の検査とパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法¹⁾による疫学解析を実施したので報告する。

2 概要

2016年4月、県内に住む50代の女性が肺炎に罹り、尿中抗原検査でレジオネラ症と診断された。家族からの聞き取りで、女性が鹿児島県内の温泉施設A館を利用していたことが判明した。原因究明のため、温泉施設A館の温泉水10件、患者の喀痰1件が当センターに搬入された。

3 検査方法

国立感染症研究所病原体検出マニュアル「レジオネラ症」に準じて実施した。

3. 1 患者喀痰の培養・同定

スプタザイム（極東）で喀痰を均質化し、選択培地で培養後、L-システイン要求性の確認、PCR法による*L. pneumophilla*遺伝子の検索、血清型別により同定した。

3. 2 浴槽水の培養・同定

500mLをメンブランフィルターでろ過濃縮し、フィルターに5mLの滅菌蒸留水を加え酸処理を行い、選択培地で培養した。その後患者喀痰と同様の方法で同定した。

3. 3 遺伝子解析

分離した*L. pneumophilla* 8株について、PFGE法により遺伝子解析を行った。当センターではこれまで4日間を要する従来法を用いていたが、今回は常¹⁾の改良による2日間の方法を菌株解析に用いた。従来法のLysozyme処理を省略し、proteinaseK（和光純薬工業（株））処理を50℃で1時間実施し、制限酵素処理はSfi I（Roche）で50units、50℃で4時間実施した。電気泳動は、スイッチタイム5-50秒、6.0V/cm、泳動時間19時間、温度14℃の条件で、CHEFF-DR II（Bio-Rad）を用いて行った。

4 結果

4. 1 患者喀痰の培養・同定

患者喀痰からはレジオネラ属菌が分離され、遺伝子検査、血清型別により*L. pneumophilla* SG1と同定された。

4. 2 浴槽水の培養・同定

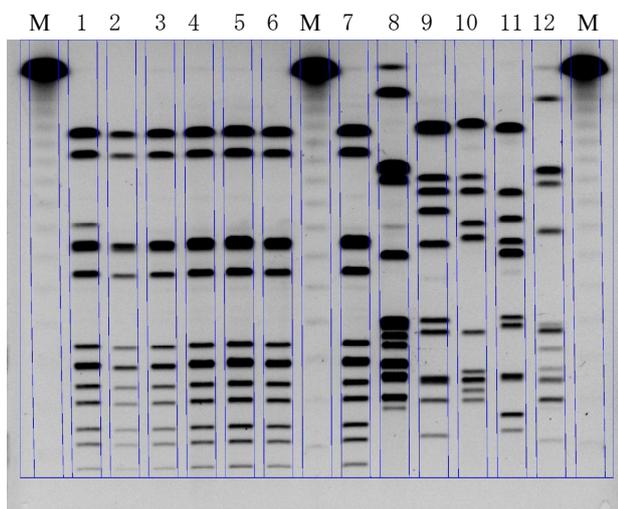
浴槽水の検査結果を表1に示す。浴槽水3検体から基準値を超えるレジオネラ属菌が検出され、患者喀痰と同様に*L. pneumophilla* SG1と同定された。また、レジオネラ属菌の検出された3検体については残留塩素濃度が0.05mg/L以下であった。

4. 3 遺伝子解析

PFGEの結果を図1に示す。患者喀痰から分離された3株と、浴槽水2検体から分離された4株はPFGEパターンが一致した。比較対象として他の施設の浴槽水から分離された*L. pneumophilla* SG1についてもPFGEを実施し、それぞれ異なる泳動パターンを示した。

表1 施設浴槽水におけるレジオネラ属菌検出状況

検体名	菌数	血清型	残留塩素濃度 (mg/L)
女 大浴槽	検出限界未満		0.5~0.6
女 水風呂	検出限界未満		0.5~0.6
女 露天風呂 (歩行浴)	検出限界未満		2以上
女 露天風呂	検出限界未満		1.0~1.3
女 露天風呂 (シャボン)	2.0×10CFU/100mL	<i>L. p</i> SG1	0.05以下
女 原湯	27.5×10CFU/100mL	<i>L. p</i> SG1	0.05以下
女 原水	検出限界未満		0.05~0.1
女 カラン	1.0×10 CFU/100mL	<i>L. p</i> SG1	0.05以下
男 大浴槽	検出限界未満		0.6~0.8
家族風呂	検出限界未満		0.6~0.8



1, 2, 3: 患者 4, 5: 女 露天風呂 (シャボン)
 6, 7: 女 原湯 8: 女 カラン
 9~12: 他事例で分離されたSG1株
 M: Lambda ladder

図1 分離株のPFGEパターン

5 考察とまとめ

患者喀痰及び浴槽水から分離された *L. pneumophila* SG1は、PFGEで同一の遺伝子パターンを示し、同一起源の菌であると考えられた。このことから、今回の事例は、温泉施設A館を原因施設としたレジオネラ感染症であることが判明した。搬入された浴槽水の残留塩素濃度は、レジオネラ属菌の検出された浴槽水では、0.05mg/L以下と明らかに低い値であり、これらの浴槽水について

は塩素での殺菌が不十分であったのではないかと推測された。

浴槽水1検体についてはSG1が検出されたが、患者分離株とは異なる遺伝子パターンを示した。このことから、同一起源の菌であると判定するには血清型別に加え、PFGE等による遺伝子型別が必須であることが確認できた。

今回の事例においてPFGEの改良法を用いた事で、短時間で遺伝子解析が行え、感染源の特定に繋がった。今後も、本法をレジオネラ症発生時の疫学調査に活用していきたい。

参考文献

- 1) Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of pulsed-field gel electrophoresis agarose plugs for the analysis of Legionella isolates. Jpn. J. Infect. Dis., 62, 54~56 (2009)