

秋田県内で分離された *Legionella pneumophila* SG1 の PFGE による解析

木内 雄 鈴木 陽子 八柳 潤 齊藤志保子 佐藤 宏康

秋田県内の冷却塔水から分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 (LP SG1) 4 株、および24時間風呂等浴用水から分離された *Legionella micdadei* (*L. micdadei*) 3 株について、Arbitrarily primed PCR 法 (AP-PCR) とパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて比較した。AP-PCR では LP SG1 4 株に相違は認められなかったが、PFGE では異なるパターンの LP SG1 が一株確認された。このことから、PFGE は AP-PCR より詳細な分類が可能であることが示唆された。また、PFGE を用いて同一施設の冷却塔水中の LP SG1 の月別パターンを比較したところ各月のパターンは同一であり、同一起源の LP SG1 が定着していることが示唆された。また、温泉保養施設の冷却塔水、浴槽水から分離された LP SG1 のパターンを比較したところ、異なるパターンの LP SG1 が確認されたことから、起源の異なる LP SG1 がそれぞれ存在していることが推定された。秋田市中心部から半径0.5 km以内の場所に位置する2施設の冷却塔水から分離された LP SG1 と、秋田市から約40km程離れた温泉保養施設の冷却塔水から分離された LP SG1 のパターンを比較したところ、市内の冷却塔水から分離された LP SG1 は同一であったが、秋田市郊外の LP SG1 は市内のそれとは異なっていた。

キーワード : *Legionella pneumophila* 血清群 1、冷却塔水、浴槽水、PFGE

I はじめに

平成7年度は、秋田県内の特定建築物等の冷却塔水及び給湯水、温泉保養施設の源泉水及び浴槽水から分離された LP SG1 について、AP-PCR による解析を行い、LP SG1 は幾種類かのパターンに分類が可能であり、その疫学的解析の有用性について報告した¹⁾。

平成8年度は、PFGE を用いて、AP-PCR との比較検討を実施した。

また、PFGE を用いて、同一施設内の冷却塔水における LP SG1 の月毎の変化、冷却塔水、浴槽水から分離された LP SG1 の起源の相同性、LP SG1 の地域別パターンの相違を検討したので報告する。

II 材料と方法

1. 材料

表1に示した、秋田県内の温泉保養施設や特定建築物等4施設の冷却塔水、給湯水、浴槽水から分離された LP SG1 23株を対象とし、採水は1995年6月から1997年2月までに実施した。

AP-PCR と PFGE の比較検討には1995年7月から8月にかけて、秋田県内の温泉保養施設や特定建築物等の冷却塔水から分離された LP SG1 4 株、また、*L. micdadei* 3 株は1997年2月に一般依頼検査として行った秋田県内の24時間風呂等浴用水由来株を供試した。

ATCC33153は LP SG1 株の、ATCC33218は *L. micda-*

表1 調査対象施設概要

施設名	場 所	施設の機能	種 類	採 水 年 月	株数
A施設	秋 田 市 内	公立図書館	冷 却 塔 水	1995. 7～12、1996. 9	8
			給 湯 水	1996. 9	1
B施設	秋 田 市 内	宿泊施設	冷 却 塔 水	1995. 7, 8, 10、1996. 9	4
			浴 槽 水	1997. 2	1
C施設	秋 田 市 内	雑居ビル	冷 却 塔 水	1995. 10～1996. 8	2
D施設	秋 田 市 外	温泉保養施設	冷 却 塔 水	1995. 7～10	4
			浴 槽 水	1995. 9, 10, 12	3
計					23

dei 株の標準菌株として供試した。

2. 方法

AP-PCR は Alex van Belkum らの方法^{2), 3)} に準じて前報と同様に実施した。

PFGE は BIO RAD 社製の CHEF-DR II を用い、図 1 に示す泳動条件で、Sfi I 消化 DNA の泳動パターンにより比較した。

III 結 果

1. AP-PCR と PFGE との比較

図 2 に示すように対象とした LP SG1 は AP-PCR では 4 株とも同様のパターンを示したが、PFGE では、LP SG1,2 が異なるパターンを示した。

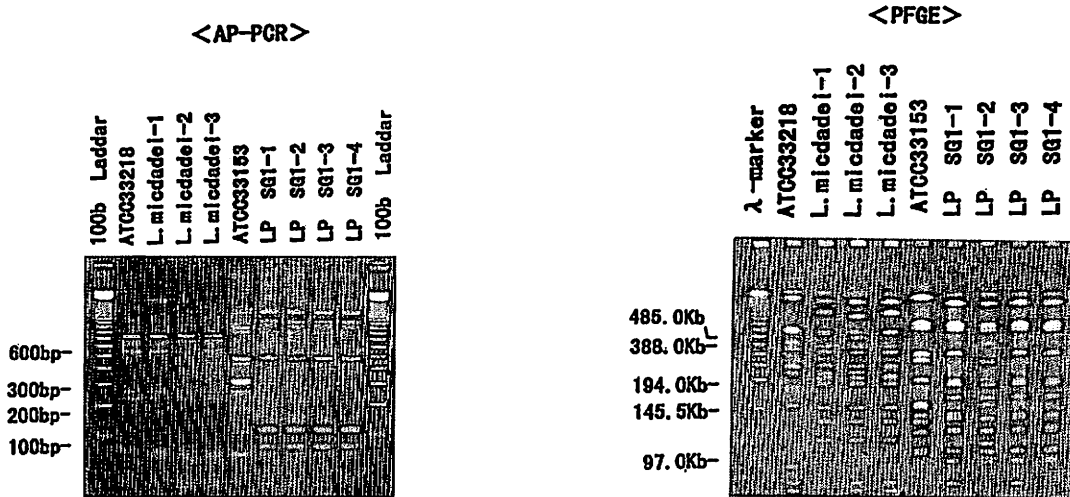
また、L.micdadei は、AP-PCR では ATCC33218 ; L.micdadei 株を含め明らかなパターンの違いは確認されなかったが、PFGE では ATCC33218 ; L.micda-

図 1 LP SG1 の PFGE における
使用制限酵素および泳動条件

使用制限酵素 ; S f i I
泳動条件 ;
block 1 : 6 V / cm : 11 h : Initial 4 sec → Final 8 sec
block 2 : 6 V / cm : 9 h : Initial 8 sec → Final 50 sec

dei 株は明らかな相違が認められ、また L.micdadei2 株は 436.5 Kb 以上の DNA 断片で他の 2 株と異なっていた。

このことから、PFGE は AP-PCR と比較して泳動パターンが明瞭であり、より詳細な分類が可能であることが明らかとなり、PFGE は LP SG1 や L.micdadei の疫学解析手法として有用と考えられた。



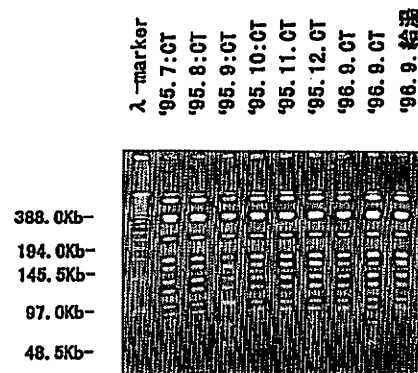
※ ATCC33153 ; LP SG1 株、ATCC33218 ; L.micdadei 株

図 2 AP-PCR と PFGE との泳動像の比較

2. (1) 同一施設内における冷却塔水中の LP SG1 の月毎の変化と給湯水中の LP SG1 との DNA パターンの比較

図 3 に示すように A 施設の冷却塔水中から 1995 年 7 月から 12 月までに分離された LP SG1 6 株と、1996 年 9 月に分離されたコロニー形状が異なる LP SG1 2 株、及び 1996 年 9 月に給湯水から分離された LP SG1 1 株の合計 9 株についての PFGE による DNA パターンは全て同一であった。

このことから、A 施設では各年、各季節に関係無く同一菌種が冷却塔水中に定着していること、さらに給湯水についても冷却塔水と同一起源の菌に汚染されていることが推定された。



※ CT ; 冷却塔

図 3 A 施設から分離された LP SG1 の Sfi I PFGE パターン

(2) 同一施設内における冷却塔水と浴槽水から分離された LP SG1 の DNA パターンの比較

図4に示すようにD施設の冷却塔水は1995年7月から10月、浴槽水は1995年9、10、12月に採水した。冷却塔水から分離された LP SG1 の P F G E パターンは同一であったが、浴槽水から分離された LP SG1 の P F G E パターンは冷却塔水からの分離株のパターンと異なっていた。また、浴槽水から分離された LP SG1 は1995年10月、12月と同じパターンであったが、9月の分離株とは異なるパターンを示した。これより、浴槽水は月によって LP SG1 の菌種に変動のあることが確認された。

(3) LP SG1 分離株の地域別 DNA パターンの比較

秋田市から約40km離れた郊外に位置する温泉保養施設D施設の冷却塔水から分離された LP SG1 と、秋田市中心部から半径0.5km以内の比較的近い場所に位置するB施設とC施設の冷却塔水から分離された LP SG1 の泳動パターンを比較すると、比較的近い距離のB施設とC施設の冷却塔水から分離された LP SG1 の泳動パターンは全て同一であったが、D施設の冷却塔水から分離された LP SG1 は異なっていた。(図4、5)

このことから、常在している LP SG1 は地域によって異なる DNA パターンを示すことが確認された。

IV 考 察

LP SG1 4株と L.micdadei 3株を用いて A P - P C R と P F G E による泳動パターンを比較した。A P - P C R では同一の泳動パターンを示した4株中1株は、P F G E の泳動パターンでは異なるパターンを示した。一方、L.micdadei についても同様の結果が得られたことから、P F G E はレジオネラ属菌感染症の感染経路の解明に有用であることが確認された。

冷却塔水から分離されたレジオネラ属菌は LP SG1 が多く、その菌数は季節変動が認められるが、同一施設から分離される菌型は同一であることを報告した¹⁾。冷却塔水は P F G E を用いた解析によっても季節に関係なく同一な DNA パターンを示す菌が定着していることが確認された。また、給湯水も同一な DNA パターンを示す菌に汚染されていた。このことから、給湯水の温度を一時的に上昇させるなど汚染防止の対策が必要と考えられた。一方、浴槽水については同一施設であっても採水月によって異なる泳動パターンを示す LP SG1 が分離された。これは浴槽水が清掃回数や、入浴する人数等外部環境の影響を直接受けるためと推定された。

温泉保養施設の冷却塔水から分離された LP SG1 に対する P F G E の解析結果から、秋田市内の比較的近い場所の冷却塔水から分離された株の P F G E パターンは同一であった。秋田市郊外の温泉保養施設の冷却塔水か

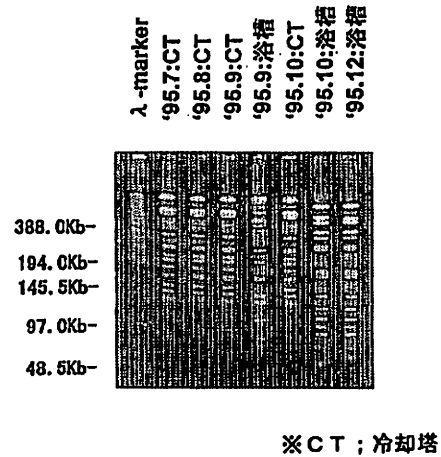


図4 D施設から分離された LP SG1 の Sfi I PFGE パターン

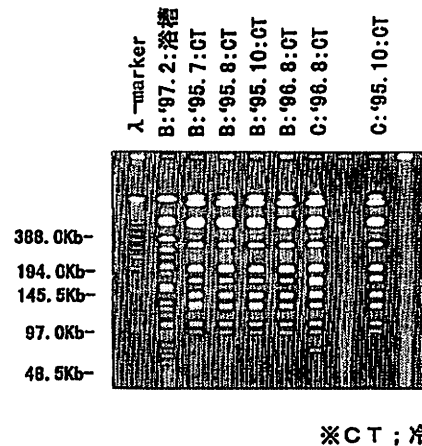


図5 B施設、C施設から分離された LP SG1 の Sfi I PFGE パターン

ら分離された株は、前者とは異なる DNA パターンを示した。このことは、これらの冷却塔が開放型であり、冷却水が外気と接触しているため、冷却塔水中の菌種は設置場所の土壤中に常在しているレジオネラ属菌の菌種に起因するためと考えられた。従って設置地域の土壤中のレジオネラ属菌を調査することにより、冷却塔への汚染経路の解明が可能と考えられた。

以上のように、P F G E はレジオネラ属菌の生態解明や疫学解析の手段として有用であることが実証された。

V ま と め

1. P F G E は A P - P C R と比較して高い再現性があり、また泳動パターンが明瞭であり、詳細な分類が可能であった。
2. 同じ冷却塔水中から分離された LP SG1 は月毎の泳動パターンの変化は認められなかった。このことから、施設内の冷却塔水中には同一起源の LP SG1 が定着していることが示唆された。
3. 同じ施設内から分離された LP SG1 は、冷却塔水と給湯水の泳動パターンは一致していたが、冷却塔水と浴槽水の泳動パターンは異なっていた。このことか

ら同一施設内でも冷却塔水中と浴槽水中の LP SG1 は起源が異なり、特に浴槽水中の LP SG1 は月によって菌種が変動している傾向が認められた。

4. 秋田市内の比較的近い場所に位置する施設の LP SG1 と秋田市から40km程離れた施設の冷却塔水から分離された LP SG1 の泳動パターンは全く異なっていたことから、地域毎に特異的な LP SG1 の存在が示唆された。

VI 文 献

1. 木内 雄, 他. 秋田県内におけるレジオネラ属菌の汚染実態および分離菌の A P - P C R 法による型別

について. 秋田県衛生科学研究所報, 1996 ; 40 : 39 ~42.

2. ALEX VAN BELKUM, MARK STRUELENS, WIN QUINT.

Typing of Legionella pneumophila Strains by Polymerase Chain Reaction-Mediated DNA Fingerprinting. J. Clin. Microbiol, 31 ; 1993 ; 2198 - 2200

3. E. Ledesma, et al. Subtyping of Legionella pneumophila isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Can. J. Microbiol, 1995 ; 41 ; 846 - 848.