

## MLVA を活用した *L.pneumophila* 対策の提案

環境衛生科学研究所 ○水本嗣郎 中島慶太郎 大越 魁 小川 紋 森主博貴  
石神勝幸 長岡宏美

### 【はじめに】

旅館や公衆浴場においてレジオネラ属菌が分離された場合には汚染源を特定し、的確な清掃及び消毒を実施する必要がある。

しかし、複数の箇所から菌が分離された場合、汚染源の特定が困難であり、漠然と施設全体の清掃及び消毒が実施され、効果的な措置がとられない恐れがある。

このため、複数箇所から *L.pneumophila* が分離された施設において、分子疫学解析手法の1つである Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) を用いて菌の遺伝子型を比較したところ、汚染箇所が推定 (絞り込み) され、より有用性の高い衛生管理の実施が可能となったため、その事例について報告する。

### 【材料及び方法】

2016年から2020年に2施設(A・B)から分離された *L.pneumophila* 15株を供試した(表1)。

施設Aでは、原湯(未殺菌)及び2箇所の浴槽吐水口(浴槽に入る直前の検体(水))1及び2の計3箇所から同日に分離された *L.pneumophila* 血清群5(SG5)3株の遺伝子型を比較した。なお、施設Aでは原湯からレジオネラ属菌が検出されることがあるため、貯湯槽内で原湯を殺菌した後、配管で浴槽に配湯されており、菌が分離された同日の貯湯槽内の温泉水からはレジオネラ属菌は検出されなかった(図1)。

施設Bでは浴槽水7箇所(浴槽1~7)、拭き取り1箇所(浴槽1)及び吐水口2箇所(浴槽5及び6)から分離された *L.pneumophila* 血清群1(SG1)の12株の遺伝子型を比較した。施設Bの配湯経路を図2に示す。浴槽1と浴槽2~7は別の原湯(未殺菌)が配湯されているが、2014年に浴槽1の原湯を浴槽2~7に使用した経緯があった。また、浴槽3~5と浴槽6及び7は同じ循環装置であり、吐水口の検体⑫は原湯と浴槽3~5の循環した浴槽水が混合したものであり、検体⑮は原湯と浴槽6及び7の循環し

た浴槽水が混合したものであった。

遺伝子型の比較で実施したMLVAはSobralら<sup>1)</sup>によって報告された12領域(Lpms01、Lpms03、Lpms13、Lpms19、Lpms31、Lpms33、Lpms34、Lpms35、Lpms38、Lpms39、Lpms40、Lpms44)について確認した。前川ら<sup>2)</sup>の方法に従い、蛍光標識したプライマーを用いて、4領域を1セットとした3種類のmultiplex PCR-A(Lpms01、Lpms31、Lpms33、Lpms35)、PCR-B(Lpms03、Lpms13、Lpms19、Lpms34)、PCR-C(Lpms38、Lpms39、Lpms40、Lpms44)とした。PCR条件は、95°C15分後に95°C30秒、60°C1分、72°C70秒を35サイクル行った。50倍希釈したPCR産物1µlをサイズマーカー0.25µl(GeneScan 1200 LIZ Size Standard(PCR-A及びPCR-B)、GeneScan 600 LIZ Size Standard(PCR-C)及びHi-Di Formamide(ABI)10µlに混合し、95°Cで3分加熱後、水中条件で2分間急冷した。その後、AB3500 Genetic Analyzerにてフラグメント解析を行った。得られたデータはGeneMapper(Applied Biosystems)を用いて、リピート数を測定した。

## 【結果及び考察】

供試した *L.pneumophila* の MLVA 型の各領域におけるリピート数を表 2 に示す。

施設 A では原湯及び 2 箇所の浴槽吐水口から分離された 3 株の SG5 の MLVA が、それぞれ 3 領域以上でリピート数が異なり、遺伝子型のパターンは一致しなかった。

この結果から、原湯のレジオネラ属菌が消毒されずに浴槽まで到達したのではなく、貯湯槽から浴槽までの配管内の清掃及び消毒が不十分であったため、菌が残存していたと考えられた。本結果を当該施設の管理者に報告し、貯湯槽から浴槽までの配管の清掃及び消毒を徹底したところ、後日に浴槽の吐水口から採水した検体からはレジオネラ属菌は検出されなかった。

施設 B では検体⑥を除く 11 検体で完全一致又は 1 領域違いであり、同一クローン由来の可能性が示唆された。複数の浴槽水等で同一クローン由来の可能性が示唆されたため、未殺菌である原湯又は原湯を供給する配管に残存する SG1 が浴槽循環における消毒では滅菌されずに残存したと考えられた。また、浴槽 1 と浴槽 2～7 については異なる原湯であるが、2014 年に浴槽 1 に使用していた原湯を一時的に浴槽 2～7 に使用していた経緯があることから、その際に配管に SG1 が混入し、浴槽までの配管に残存している可能性も考えられた。しかし、原湯のみの検体が得られず、SG1 の分離及びその遺伝子型の比較が実施できなかったため、今後の検討課題となった。

なお、施設 B を所管する保健所では、原湯又は原湯を供給する配管の汚染の可能性があると考え、原湯自体の消毒を実施するよう施設管理者に指導している。

## 【まとめ】

今回、2 施設において MLVA により *L.pneumophila* の遺伝子型別を行うことで菌の汚染源を推定し、効果的なレジオネラ属菌の防止対策へとつながる可能性が示唆された。

通常、公衆浴場や旅館等において浴槽水からレジオネラ属菌が検出された場合、菌が検出された浴槽を中心に清掃及び消毒を実施するが、汚染源は不明なままとなる場合が多く、根本的なレジオネラ属菌防止対策が不十分となる場合がある。

MLVA を導入することでレジオネラ属菌の遺伝子型別から汚染源を推定（絞り込み）し、施設の消毒ポイントを明確にすることは、効果的な衛生管理に結びつくものと期待される。

さらに、MLVA は結果が数値化されたデータであるため、パルスフィールドゲル電気泳動法のような画像診断による分子疫学解析手法と異なり、施設管理者への説明が容易である。さらに、過去データとの比較も簡易であり、施設のレジオネラ属菌の定着性を調べる方法として有用であると思われる。

今後も MLVA を活用し、効果的なレジオネラ属菌発生防止の一助となるよう、さらなる検証を図っていきたい。

## 【文献】

- 1) Sobral,D. et al. : High-Throughput Typing Method To Identify a Non-Outbreak-Involved *Legionella pneumophila* Strain Colonizing the Entire Water Supply System in the Town of Rennes, France, *Appl Environ Microbiol.*, 77,6899-6907(2011)
- 2) 前川純子他 : MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴, 平成 28-30 年度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）公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究 平成 30 年度総括・分担研究報告書, 37-46(2019)

表1 検体採材箇所

施設	検体No	採材箇所	循環装置No	採水年
A	①	浴槽1 吐水口	/	2018 (同日に採水)
	②	浴槽2 吐水口		
	③	原湯		
B	④	浴槽1 浴槽水	1	2016
	⑤	浴槽1 拭き取り	/	2017
	⑥	浴槽2 浴槽水		2
	⑦	浴槽1 浴槽水		1
	⑧	浴槽2 浴槽水	2	2019 (同日に採水)
	⑨	浴槽3 浴槽水	3	
	⑩	浴槽4 浴槽水	3	
	⑪	浴槽5 浴槽水	3	
	⑫	浴槽5 吐水口 (原湯及び浴槽3~5の浴槽水が混合)	/	
	⑬	浴槽6 浴槽水	4	2020 (同日に採水)
	⑭	浴槽7 浴槽水	4	
	⑮	浴槽6 吐水口 (原湯及び浴槽6~7)の浴槽水が混合)	/	

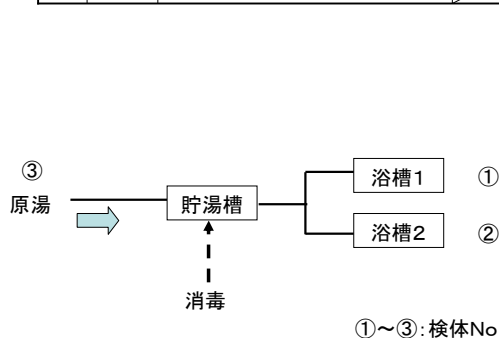


図1 施設Aの配湯経路

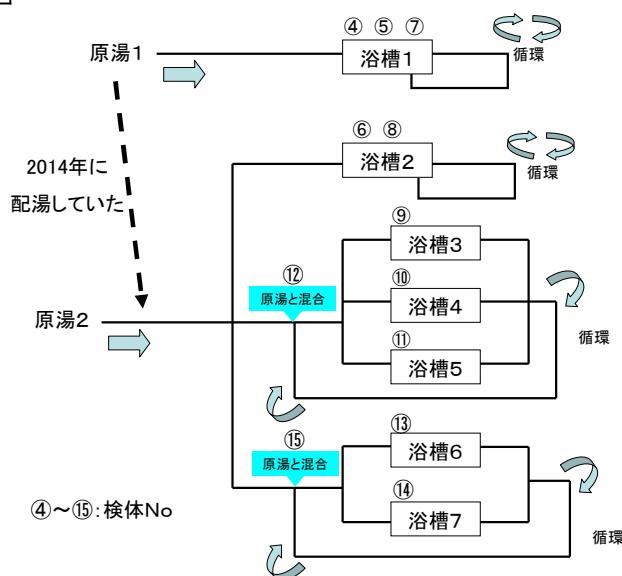


図2 施設Bの配湯経路

表2 MLVA型の各領域におけるレポート数

施設	No	Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39	Lpms44
A	①	3	8	14	2	3	8	6	8	4	0	11	9
	②	14	8	15	2	3	8	6	8	4	19	14	9
	③	14	8	13	2	3	8	6	8	4	0	0	9
B	④	14	9	24	2	3	8	4	8	4	19	0	9
	⑤	14	9	24	2	3	8	4	8	4	19	0	9
	⑥	14	8	14	2	2	10	4	8	4	19	0	9
	⑦	14	9	24	2	3	7	4	8	4	19	0	9
	⑧	14	9	24	2	3	7	4	8	4	19	0	9
	⑨	14	9	24	2	3	7	4	8	4	19	0	9
	⑩	14	9	24	2	3	7	4	8	4	19	0	9
	⑪	14	9	24	2	3	7	4	8	4	19	0	9
	⑫	14	9	24	2	3	7	4	8	4	19	0	9
	⑬	14	9	24	2	3	7	4	8	4	19	0	9
	⑭	14	9	24	2	3	7	4	8	4	19	0	9
	⑮	14	9	24	2	3	7	4	8	4	19	0	9