

循環式公衆浴場におけるレジオネラ属菌の定着性について

北九州市保健環境研究所 藤田 景清

【目的】

本市では浴槽水を原因とするレジオネラ症対策として、平成 19 年より夏期および冬期に循環式公衆浴場におけるレジオネラ属菌の汚染状況を調査している。当所で菌種同定と血清型別を実施しているが、複数年にわたり、同じ施設で同じ血清型が分離される事例が認められ、同一の菌が定着している可能性が示唆された。そこで、同じ血清型を示した菌株の遺伝子解析を行い、菌株間の相同性を比較検討した。また、菌の定着には、バイオフィルムの形成が関与すると考えられ、培養器および培養温度を比較検討したところ、若干の知見が得られたので報告する。

【方法】

(1) 相同性の比較検討について

レジオネラ属菌の分離、菌種同定、血清型別は「新版レジオネラ症防止指針」(平成 11 年 11 月)に準じて行った。浴槽水検体の濃縮および処理は、ろ過濃縮(0.45 μm ニトロセルロース膜)および加熱処理(50℃ 30 分間)を実施した。菌株間の相同性を比較するための遺伝子解析には、レジオネラ ニューモフィラと菌種同定され、同一血清型の菌株が同じ施設内の浴槽で採取され、かつ、採取された時期が異なる菌株を試験に用いた。遺伝子解析は病原体検出マニュアル「レジオネラ症」(平成 23 年 10 月 7 日改訂)を参考に、制限酵素 Sfi I を用いた Chang ら¹⁾の方法による PFGE 法(改良法)で実施した。相同性の分類は、Tenover ら²⁾の分類基準に従い、4 バンド以上の違いを異なる遺伝子パターンとして分類した。

(2) バイオフィルムの培養器および培養温度の比較検討について

レジオネラ症で最も検出の多い菌種血清型がレジオネラ ニューモフィラ血清型 1 であることから、平成 28 年度に当所で浴槽水より分離した同血清型の菌株を使用した。培養器については内径の同じ滅菌試験管(材質:未使用ガラス製、ビーズ損傷ガラス製、未使用ポリスチレン製、未使用ポリプロピレン製)および同径滅菌シリコン製チューブを用いた。また、培養温度については 36℃、25℃の設定温度で、1~2週間一定菌量を BYE プロスにて静置培養して、バイオフィルム形成能および培養器への固着能を比較した。バイオフィルムの染色は、培養液を廃液後、静かに滅菌蒸留水で 3 回洗浄したのち、0.1%(w/v)クリスタルバイオレット水溶液にて 40 分間染色し、水洗風乾後、倒立顕微鏡を用いて観察した。また、バイオフィルムの定量は、染色後の培養器に 95%エチルアルコールを加え色素を溶解後、分光光度計により 590nm で光学濃度(OD 値)を測定し、OD 値の強弱をバイオフィルム形成能の強弱として判定した。さらに方法(1)で得られた結果より、A 施設から分離した 3 血清型のバイオフィルム形成能を比較した。

【結果】

(1) 相同性の比較検討について

市内 7 施設において、同一血清型の菌株が同一施設内の異なる浴槽水や採水時期の異なる浴槽水から分離された計 40 菌株を比較した。血清型 1 は、A 施設 2 株は同一パターン、C 施設 7 株は 3 パターンを示した。血清型 3 は、B 施設 3 株は 2 パターン、G 施設 4 株は 2 パターンを示した。血清型 5 は、E 施設 3 株は同一パターンを示した。血清型 6 は、A 施設 7 株はすべて異なるパターン、C 施設 3 株は同一パターンを示した。血清型 9 は、F 施設 3 株は 2 パターンを示した。血清型 10 は、A 施設 2 株、B 施設 2 株、C 施設 2 株は、それぞれ施設毎に同一パターンを示したが、D 施設 2 株は異なるパターンを示した(表 1)。特に A、B、C および E 施設は、複数年から分離した菌株が同一パターンを示した。

(2) バイオフィルムの培養器および培養温度の比較検討について

培養温度の比較では、36℃に比べ 25℃で培養した場合に、バイオフィルム層を厚く形成した。また、培養器への固着能においても、25℃で培養した場合に、よりバイオフィルムの固着を強く認めた。培養器の比較では、未使用の試験管では、材質がガラス製の場合にポリスチレン製、ポリプロピレン製より多く形成した。また、ガラス試験管をガーネットビーズで 1 分間攪拌し内壁を傷つけた場合には、さらに多くのバイオフィルムの形成を認めた。シリコン製チューブではシリコン自体が染色されたが、バイオフィルム形成能は 0.66(OD 値)となりガラス製に劣った(表 2)。また、A 施設では相同性の認められた血清型 1 および 10、相同性の認められなかった血清型 6 全てにバイオフィルム形成能を認めた(表 3)。

【考察】

市内 7 施設で分離された同一血清型菌株の相同性を PFGE 法で遺伝子解析したところ、それぞれの施設毎に同一あるいは類似した特徴的な遺伝子パターンを保有することが認められた。このことから、同一の菌株に経年的な若干の遺伝子変異が起こっていた場合でも、施設内に同一の菌が定着している可能性が示唆された。特に、A、B、C および E 施設は経年的に同一の菌の定着が考えられた。その一方で、血清型 6 の A 施設では、同一浴槽でも異なる採水時期から分離した菌株間に相同性は認めなかった。このことから、本菌が定着するには、施設毎に定着に関与する何らかの要因があるものと考えられた。今回、レジオネラ属菌が形成するバイオフィルムを定着性の一要因と考え検討した。25℃でビーズ損傷ガラス製試験管を用いて本菌を培養したところ、A 施設から分離した相同性に違いのある 3 血清型すべてにバイオフィルム形成能を認めた。本試験では、レジオネラ属菌の施設への定着には、バイオフィルムの形成能よりはその定着能に違いがあることが推測され、今後は、バイオフィルムの耐熱性および耐塩素性(消毒薬抵抗性)の定着性に及ぼす影響を検討し、本菌の防除対策に役立てたい。

＜参考文献＞

1) Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. Jpn J Infect Dis. 62: 54-56, 2009

2) Tenover, et al. J Clin Microbiol. 33: 2233-2239, 1995

表 1 PFGE 法に供した分離菌株一覧

分離年・時期	血清型	施設名	浴槽番号	PFGE 型	
H21	1	A	1	1a-I	
H27			1	1a-I	
H20夏期		C	1	1c-I	
H20夏期			2	1c-II	
H20夏期			3	1c-II	
H20冬期			4	1c-II'	
H20冬期			5	1c-I	
H20冬期			1	1c-II	
H22		6	1c-III		
H23		10	A	1	10a-I
H26	2			10a-I	
H25	B		1	10b-I	
H26			2	10b-I	
H20	D		1	10d-I	
H25			1	10d-II	
H20	C		7	10c-I	
H22			6	10c-I	
H21	3		B	1	3b-I
H25				3	3b-II
H26		4		3b-II	
H19		G	1	3g-I	
H19			2	3g-I	
H20			1	3g-II	
H20	2	3g-II'			
H19	5	E	1	5e-I	
H20			2	5e-I	
H21		2	5e-I		
H20		A	3	6a-I	
H20			1	6a-II	
H21			3	6a-III	
H23	1		6a-IV		
H26	2		6a-V		
H26	1		6a-VI		
H26	3	6a-VII			
H20	C	8	6c-I		
H20		7	6c-I		
H22		6	6c-I		
H25夏期	9	F	1	9f-I	
H25冬期			1	9f-I'	
H27			1	9f-II	

表 2 培養器ごとのバイオフィルム形成能

培養器	材質	OD 値/A590
試験管	ガラス(未使用)	0.177
	ガラス(ビーズ損傷)	0.352
	ポリスチレン(未使用)	0.067
	ポリプロピレン(未使用)	0.048
チューブ	シリコン(未使用・培養なし)	0.186
	シリコン(未使用・培養あり)	0.252

(OD 値が高いほうが、バイオフィルム形成能が高い。)

表 3

A 施設における各血清型のバイオフィルム形成能(25℃ 3 週間培養 ビーズ損傷ガラス試験管使用)

血清型	OD 値/A590
1	0.384
6	0.371
10	0.656

(OD 値が高いほうが、バイオフィルム形成能が高い。)