

市販抗血清に反応しない水試料由来レジオネラ属菌の遺伝子プローブ法による確認と分類

榎 田 隆 一*, 保 坂 三 継*, 矢 口 久 美 子*

Application of a Gene Probe Method to Identification of *Legionella* spp. Detected from Water Samples that Does not React with Anti-serums

Takaichi ENOKIDA*, Mitsugu HOSAKA* and Kumiko YAGUCHI*

Keywords : レジオネラ属菌 *Legionella* spp., 遺伝子プローブ gene probe, VIT-レジオネラ VIT-*Legionella*, DDH レジオネラ DDH *Legionella*

はじめに

著者らは、環境水のレジオネラ汚染状況を詳細に把握するため、環境水試料から検出されたレジオネラ属菌について可能な限り菌種の決定を行っているが、分離菌株の中にはレジオネラ属菌を疑う菌株であるものの、市販抗血清のどれにも反応しないものが少なからず見られる。

このような中で、近時、遺伝子プローブ法¹⁾に基づくレジオネラ属菌の検出用キットが発売されるようになった。

平成 16 年度中に著者らの研究室に持ち込まれた冷却塔水、給湯水、浴槽水、雑用水など 405 件から計 163 株がレジオネラ属菌として検出された。このうち 19 株が市販のレジオネラ免疫抗血清に反応しない株であったが、遺伝子プローブ法に基づく検出キットを中心にした確認及び同定によりすべて決定することができ、本キットの有効性が示されたので報告する。

材料と方法

1. 菌株

試料とした菌株は平成 16 年度に試験した環境水試料から分離されたレジオネラ属菌を疑う菌株 19 株である。これらは免疫血清によるレジオネラ判定試薬である *Legionella* Latex Test (Oxoid) 及びレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) に反応しなかったが、L-システイン要求性のグラム陰性桿菌であり、ISO²⁾ 及び上水試験方法³⁾ の定義に基づきレジオネラ属菌として保管していたものである。

2. 試薬

菌種決定のためのキットとして以下のものを用いた。

1) 遺伝子プローブ法に基づくレジオネラ属菌検出キット : VIT-*Legionella* (以下 VIT と略す), Vermicon 社製
VIT はレジオネラ属菌の 16S ribosomal RNA を標的とした 2 種類の蛍光標識された DNA プローブを含んでおり、1

つは *Legionella* 属菌に共通な塩基配列に結合し、もう 1 つは *L. pneumophila* に特異的な塩基配列に結合するように設計されている。これらの蛍光プローブで菌体を染色したのち、染色像を蛍光顕微鏡で観察する。

2) DNA-DNA ハブリダイゼーションキット : DDH レジオネラ '極東' (以下 DDH と略す), 極東製薬製

3) API 20NE : 日本ビオメリユー社製

3. 実験方法

市販の免疫血清に反応しないレジオネラ属菌の菌種の決定は以下の方法で行った。

1) VIT

VIT では、染色対象が菌体内 16S ribosomal RNA であるため供試菌は新鮮培養菌であることが欠かせない。そこで、実験材料として BCYE α 寒天培地で 1 日ないし 3 日間培養した菌体を使用した。VIT の試験操作は以下の通りである。

試料の新鮮コロニーから付属の固定液に菌体を浮遊させ、専用スライドガラスの 3ヶ所のホールに塗布した。乾燥後、それぞれのホールに陽性コントロール試薬、VIT 試薬、陰性コントロール試薬を 1 滴ずつ滴下した。これを専用リアクターに格納して 46°C の孵卵器内で 90 分間反応させた。その後、あらかじめ 46°C に加温してある洗浄液をリアクターに満たし、そこにスライドガラスを戻して 46°C の孵卵器内に 15 分間置いた。次いでスライドガラスを蒸留水で 1 回すすいだ後、乾燥させ、付属の "Finisher" 液を滴下してカバーガラスをかけて約 15 分静置してプレパラートとし、その日のうちに観察した。

染色したプレパラートは落射蛍光顕微鏡 (OLYMPUS 製 BX50) で観察した。まず 400 倍で全体の染色状況を観察した後、蛍光顕微鏡用油浸オイルを使用して 1,000 倍で観察した。

* 東京都健康安全研究センター環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

2) DDH

DDHにおいても同様に新鮮培養菌を使用した。VITによってレジオネラ属菌と判定された株について DDH により DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験を行い、菌種の同定を試みた。

3) API 20NE

VIT で蛍光を発しない株については、*Legionella* 以外のグラム陰性桿菌として、API 20NE により同定した。

結果及び考察

1. VIT による判定結果

VIT では、B 励起で緑色に発光し、かつ G 励起で赤色に発光するものは *L. pneumophila* と判定され、B 励起で緑色に青く発光するだけの菌は *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌と判定される。また、いずれの励起光でも発光しないものはレジオネラ属菌以外の細菌と判定される。

供試菌 19 株について VIT により染色し、観察したところ、1 株は B 励起光により緑色の蛍光（写真 1）と G 励起光による赤色の蛍光（写真 2）を発して *L. pneumophila* と判定された。また 15 株が B 励起光による緑色蛍光のみを発して *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌と判定された。写真 3, 4 には *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌の例として *L. bozemanii* と *L. micdadei* の B 励起光による緑色蛍光を示した。まったく蛍光を発しない残り 3 株については、API20NE により *Moraxella* spp. と同定された。

2. DDH によるレジオネラ属菌の同定

VIT によりレジオネラ属菌と判定された 15 株について DDH によりハイブリダイゼーションを行った結果、*L. erythra* および *L. oakridgensis* が 2 株ずつ、*L. birminghamensis* および *L. sainthelensi*, *L. feelei* がそれぞれ 1 株ずつ同定された。DDH で同定可能なレジオネラ属菌は 25 種であり、残りの 8 株はこれに含まれない菌種であったものと想われた。

L. erythra と *L. birminghamensis* については 366 nm の紫外線の照射によりそれぞれ赤色及び黄緑色の自家蛍光を発するとされている⁴⁾。今回、DDH によって *L. erythra* と判定された 2 株の BCYE α 寒天培地上の集落に 366 nm の紫外線を照射したところ、2 株のうち 1 株が赤色の自家蛍光を発することを確認した。また、*L. birminghamensis* についても同様の確認を行ったが黄緑色の自家蛍光は明瞭ではなかった。

3. 平成 16 年度に分離したレジオネラ属菌の同定結果

表 1 に 16 年度に試験した環境水試料 405 検体から分離されたレジオネラ属菌 160 株の同定結果を示した。

16 年は合計 9 種のレジオネラ属菌が検出され、大部分（129 株、80.5%）が *L. pneumophila* であったが、他に免疫血清によって 7 株（4.4%）が *L. gormanii*, 6 株（3.8%）が *L. bozemanii*, また 3 株（1.9%）が *L. micdadei* と同定された。免疫血清で同定できなかった 16 株についても 1 及び 2 に説明したように VIT によって *L. pneumophila*（1 株）及びレジオネラ属菌（15 株）と判定され、さらにレジオネラ属菌と判定された 15 株の半数（7 株）が DDH によって同定でき、合計して 160 株中 152 株の菌種を明らかにした。

現在、レジオネラ属菌には 50 種が報告されている⁵⁾が、そのうち 20 菌種ほどがヒトに感染性をもつことが報告されている。わが国のレジオネラ属菌による感染事例の多くは *L. pneumophila* によるものであるが、*L. micdadei*^{6,7)}をはじめとしたその他のレジオネラ属菌による感染も発生している。また、著者らの研究室では今回初めて同定された *L. birminghamensis* や *L. feelei* もヒトの疾患に関連した菌種であった^{5,8)}。今後も可能な限り菌種の同定を行い、水環境中のレジオネラ属菌の組成を明らかにしていく必要がある。

表 1. 環境水から検出されたレジオネラ属菌の同定結果と株数

菌種	決定方法	同定株数					菌種別小計	比率 (%)
		冷却塔水	浴槽水	雑用水	給湯水	修景水		
<i>L. pneumophila</i>	免疫血清反応	62	50	8	5	3	128	79.9
<i>L. pneumophila</i>	VIT				1 ^(*)		1	0.6
<i>L. bozemanii</i>	免疫血清反応	2		3		1	6	3.8
<i>L. gormanii</i>	免疫血清反応	3		2	2		7	4.4
<i>L. micdadei</i>	免疫血清反応	2	1				3	1.9
<i>L. birminghamensis</i>	DDH	1 ^(*)					1	0.6
<i>L. erythra</i>	DDH	1 ^(*)		1 ^(*)			2	1.3
<i>L. sainthelensi</i>	DDH	1 ^(*)					1	0.6
<i>L. feelei</i>	DDH		1 ^(*)				1	0.6
<i>L. oakridgensis</i>	DDH		2 ^(*)				2	1.3
<i>Legionella</i> spp.	VIT	1 ^(*)	7 ^(*)				8	5.0
合計		73	61	14	8	4	160	100.0

(*) VITによりレジオネラ属菌と確認された株

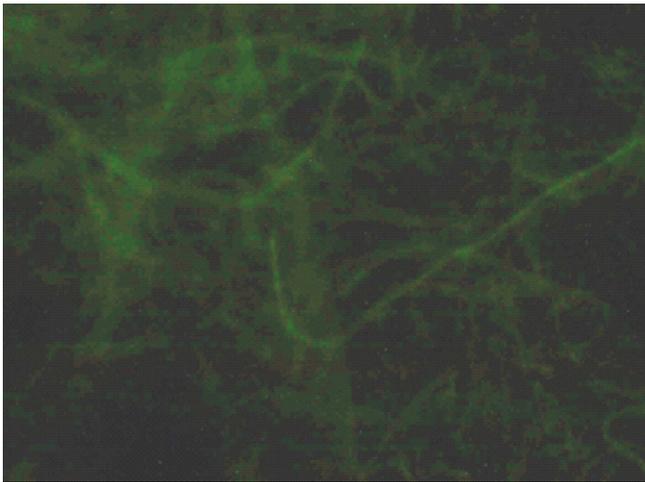


写真 1. *Legionella pneumophila*
B励起光による緑色蛍光

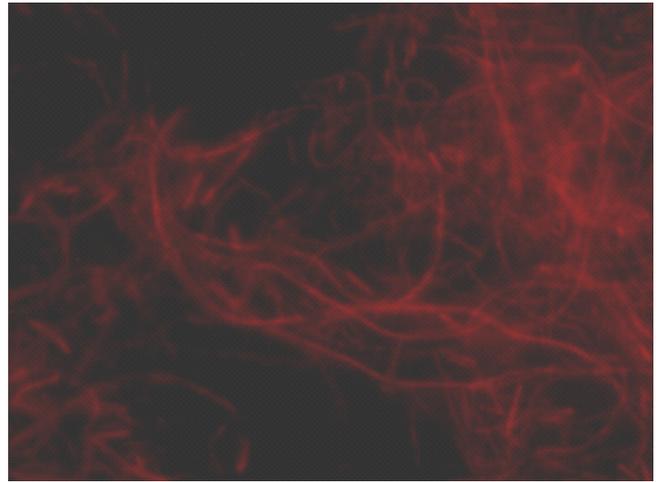


写真 2. *Legionella pneumophila*
G励起光による赤色蛍光

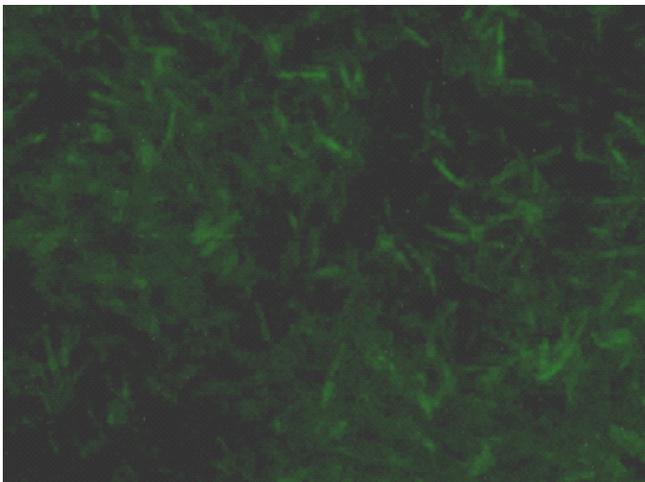


写真 3. *Legionella bozemanii*
B励起光による緑色蛍光

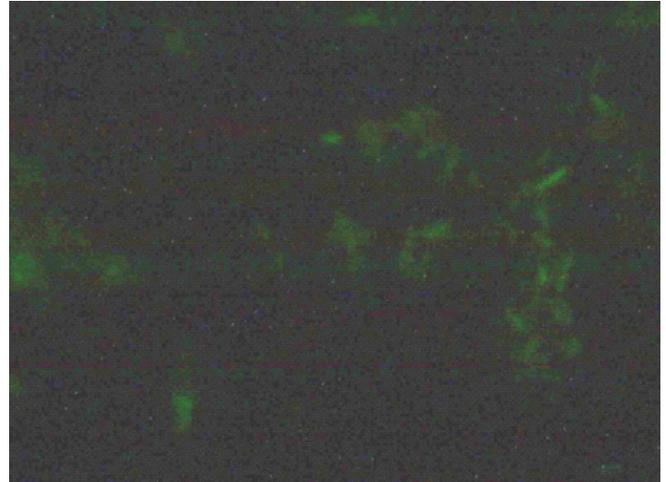


写真 4. *Legionella micdadei*
B励起光による緑色蛍光

4. レジオネラ属菌試験における VIT の有効性

免疫血清による菌種の判定では、非加熱菌体で反応しない場合でも加熱菌体を抗原として試験すると大部分が決定できた。しかし、分離した *Legionella* 属菌のうち 16 株 (10%) は、加熱抗原を用いても *Legionella* Latex Test 及びレジオネラ免疫血清に反応しない菌株であった。*Legionella* Latex Test 及びレジオネラ免疫血清は、前者では *L. pneumophila* (血清群 1-14), *L. longbeachae* (血清群 1, 2), *L. bozemanii* (血清群 1, 2), *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa* の 8 菌種 (ただし *L. pneumophila* 以外の菌種は混合血清), 後者では *L. pneumophila* (血清群 1-6), *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. micdadei* の 6 菌種の検出に対応しており、これらの免疫血清試薬に反応しない株の同定のためには、25 菌種の同定が可能な DDH によって DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験を行う必要がある。しかし DDH キットは高価であり、また試験操作も煩雑である。そのため、多数の検体を処理するルーチン検査において、免疫血清で反応しない菌株がレジオネラ属菌であるか否かを確認する方法

として DDH を常用することは経済性及び作業性から適当でない。加えて、DDH でも同定できない菌種が 20 菌種以上ある。

レジオネラ対策においてはレジオネラ属菌はすべて病原性を持つものとしてとらえる必要がある⁹⁾、検出された菌株がレジオネラ属菌であるか否かを迅速に判断することが重要である。また、*Legionella* の保存温度は $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ が最適とされている¹⁰⁾。そのため不十分な温度コントロールの冷蔵庫で保存した場合は死滅しやすく、レジオネラ属菌の判定並びに菌種の決定は可能な限り早期に実施しなければならない。

遺伝子プローブを用いた蛍光染色法である VIT は、検体によっては緑色の蛍光が弱い場合があり、特に細い菌体では観察しづらいことがあるため、手技の習熟にやや時間を要すると思われるが、L-システイン要求性のグラム陰性桿菌で、加熱菌体抗原によっても免疫血清に反応しない菌株が *Legionella* 属菌か否かを半日程度で判定することができる。今回、免疫血清で未同定のレジオネラ属菌を疑う 19 株に VIT を適用し、蛍光を発しない 3 株を *Moraxella* spp.

として排除することができ、また蛍光を発する残り 16 株が *L. pneumophila* 及びレジオネラ属菌と判定され、さらにレジオネラ属菌と判定された 15 株の半数 (7 株) で菌種の同定に結びつけられたことは、レジオネラ属菌としての判定において VIT が有効であることを示したものと考えられる。

なお、今回の調査において、免疫血清に反応しなかったにもかかわらず VIT により *L. pneumophila* と判定された株があった。こうした菌株が他にも存在するかどうか、レジオネラ属菌同定キットの検出精度を評価するうえでも、今後さらに調査が必要であると考ええる。

今後も *Legionella* 属菌による感染例は増加すると思われる、環境中におけるレジオネラ属菌の検出と菌種の確定は環境保健施策を推進するうえできわめて重要な基礎的情報である。VIT を利用することにより簡易にレジオネラ属菌の決定をすることができ、また迅速に次の同定に進むことが可能になった。すなわち、VIT はレジオネラ属菌検査のための有効かつ重要なツールとなるものと期待できる。

ま と め

水環境試料から分離されたレジオネラ属菌を疑う菌株に対する遺伝子プローブ法に基づく検査キットの有効性を中心に検討し、以下の結果を得た。

1) 供試菌 19 株について本法を適用し、1 株は *L. pneumophila* と、15 株はレジオネラ属菌と判定された。残り 3 株は非レジオネラ属菌であり、*Moraxella* spp. と同定された。

2) 本法によってレジオネラ属菌と確認された 15 株について DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験を行い、7 株の菌種を同定できた。

3) 本法は免疫血清に反応しないレジオネラ属菌の確認法として有効であり、水環境におけるレジオネラ属菌の汚染状況等の調査において迅速なデータ提供を可能とするものとして期待できる。

文 献

- 1) Grimm, D, Merker, H, Ludwig, W., *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2686-2690, 1998.
- 2) ISO : Water quality - Detection and enumeration of *Legionella*, International Standard, ISO 11731, First edition, 1998.
- 3) 日本水道協会 : 上水試験方法, 654-658, 2001.
- 4) 坂崎利一 (監訳) : Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き, 第 3 版, 近代出版, 183-184, 1993.
- 5) <http://www.bacterio.cict.fr/l/legionella.html>
- 6) 小出道夫, 南出正之, 貫名正文, 他 : 感染症誌, **62**, 1-5, 1988.
- 7) 宮下修行, 橋口浩二, 中嶋正光, 他 : 感染症誌, **70**, 268-272, 2002.
- 8) Wilkinson, H. W., Thacker, W. L., Benson, R. F., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 2120-2122, 1987.
- 9) 新版レジオネラ症防止指針: 厚生省生活衛生局企画課監修, 財団法人ビル管理教育センター, 1999.
- 10) 小栗豊子 : 臨床と微生物, **32**, 327-333, 2005.