

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制の強化に関する研究

レジオネラと肺炎球菌の分子疫学

研究分担者	倉 文明	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	前川純子	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	常 彬	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨：レジオネラ症の主要起因菌である *Legionella pneumophila* について、分子疫学的手法である sequenced based typing (SBT) 法は有用である。肺炎球菌についても分子疫学解析に Multi Locus Sequencing Typing (MLST) 法は有用である。MLST 法/SBT 法は結果が ST 型で示されるので、菌株間の異同の確認が容易で、データベース化され、世界規模でのデータが蓄積してきている。日本、中国両国の分離株についても MLST 法/SBT 法による比較が可能である。

A．研究目的

レジオネラ症はレジオネラ属菌を起因菌とした呼吸器感染症で、日本では入浴施設においてしばしば集団感染事例が起きる。諸外国ではホテルの給湯設備や、空調の冷却塔水などによる集団感染事例が報告されている。レジオネラ症の感染源を明らかにするためには患者から分離された菌株と感染源と推測される環境水から分離された菌株の異同を確認する必要がある。Sequence Based Typing (SBT) 法はレジオネラ症の主要な起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子型別法だが、デジタルデータであるため、年代、場所を超えた比較が容易であるため近年広く普及している。

昨年度は日本各地の冷却塔から独立に得ら

れた *L. pneumophila* 血清群 1 分離株 65 株について SBT を行った結果を報告した。今年度は新たに 13 株の冷却塔由来分離株の ST 型を調べ、さらに由来による違いがみられるかどうか噴水・修景水由来の 11 株、シャワー水 6 株についても調べた。

肺炎球菌は肺炎などの呼吸器感染症において最も高頻度に分離される病原細菌のひとつであり、臨床上極めて重要な細菌である。本菌の構成成分である莢膜は複合多糖体で構成され、これによって血清型が決定される。2011 年現在では、肺炎球菌は 93 種類の血清型に分離された。近年、同一血清型の肺炎球菌を分類するため、Multi Locus Sequencing Typing (MLST) 法が広く使われている。本年度は小児侵襲性感染症患者から分離された肺炎球菌

86 株の MLST を調べた。

B. 方法

EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections)の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した^{1,2)}。*flaA* は鞭毛 (flagellin)タンパク質、*pilE* は IV 型線毛 (type IV pilin)タンパク質、*asd* はスレオニン生合成系酵素であるアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aspartate-b- α -semialdehyde dehydrogenase)、*mip* は宿主マクロファージへの感染に寄与する (macrophage infectivity potentiator)タンパク質、*mompS* は主要外膜タンパク質 (major outer membrane protein)、*proA* は亜鉛メタロプロテアーゼ (zinc metalloprotease)、*neuA* は N-アシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼ (N-acetylneuraminate cytidylyltransferase) をそれぞれコードする遺伝子である。7 遺伝子の遺伝子型が決まった分離株を EWGLI のデータベース³⁾に登録すると、新しい遺伝子型の組み合わせについては ST (sequence type) ナンバーが付与される。

肺炎球菌の MLST では、分離株の 7 つ Housekeeping gene (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*) の配列を決定し、<http://spneumoniae.mlst.net> にて検索を行い、Sequence type (ST) を決定した。7 つ遺伝子のうち、5 つ以上の遺伝子が同じである場合、同一の Clonal Complex (CC) に分類する。

C. 研究結果

今年度解析した *L. pneumophila* 血清群 1 分離株の遺伝子型別の結果を表 1 に示した。冷却塔関連株 13 株のうち、6 株が ST1 となり、昨年度の 77% より頻度は低かったものの主要な遺伝子型が ST1 である傾向は変わらなかった。噴水・修景水については 11 株中 9 株が ST1 となり、冷却塔水由来株とよく似た傾向を示すことがわかった。シャワー水分離株 6 株のうち ST1 は 1 株のみで、遺伝子型の分布が冷却塔水由来株や噴水・修景水由来株とは異なっていた。

86 株肺炎球菌のうち、2 株はデータベースに登録されていない新規 ST タイプであった。肺炎球菌は血清型によって、違った ST 型を示すことが多く見られた。血清型 15A、15B、15C、9V 肺炎球菌は、同じ ST 型ないしその近縁にある ST 型 (同じ CC に属する) を示した (表 2)。一方、同一な血清型にもかかわらず、多様な ST 型を示す血清型が多かった。世界中多くの地区から分離される ST 型 (血清型 3 型の ST180、15A 型の ST63、19F 型の ST236、23F 型の ST224、6B 型の ST90 など) は日本での分離も見られた。日本国内の分離株のみが登録された ST 型もあった (血清型 19A 型の ST2331 と ST3111、14 型の ST5240)。欧米や韓国などで 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) が導入された以後に分離率の増加が見られた ST320 型 19A 肺炎球菌⁴⁾ は日本国内からも多数が分離された (7 株)。

D. 考察

日本のレジオネラ症の半数近くの感染源が入浴施設と推定されているが、言い換えれば、半数以上は感染源が不明であり、入浴施設以外の感染源についても注意を払う必要がある。今年度解析した冷却塔水、噴水・修景水、シャワー水からの分離株の遺伝子型の多くは臨床分離株からも見出されるものであり、レジオネラ症の感染源となる危険があり、十分な衛生管理が必要である。

SBT 法は、データベース化が容易であり、異なる時期、場所での結果の比較が可能である。2013 年 2 月 18 日現在、レジオネラ SBT データベースに 6,862 株の *L. pneumophila* の遺伝子型が登録されているが、そのうち日本由来の分離株は 405 株、中国由来の分離株は 224 株となっており、特にこの 1、2 年の中国からの登録数は増えている。中国からの登録のほとんどは環境分離株で、臨床分離株は香港からの登録のみであり、臨床からの分離は今後協調して取り組んでいきたい中国側の課題である。

肺炎球菌感染において、最も重要な病原因子が莢膜であるため、血清型別は疫学調査には不可欠な方法となっている。しかし、MLST 解析は同一血清型を示す肺炎球菌をさらに分類できる方法で、得られた ST 型は肺炎球菌の遺伝情報を示し、異なる地域や時期に分離された肺炎球菌の違いを比較できる再現性の良い方法である。また、肺炎球菌においては、MLST 法は PCV7 ワクチン導入後の Capsular switching (ワクチンに含まれる血清型の肺炎球菌の莢膜遺伝子が非ワクチン血清型の遺伝子と置き換わる現象)⁴⁾ を観測できる有効な方法である。中国においても 2009

年に PCV7 ワクチンが導入されていたが、侵襲性感染症を含む肺炎球菌感染症の実態およびワクチンの効果が不明である。中国側の肺炎球菌感染症由来株の血清型と共に MLST の疫学調査および日本の分離株との比較は今後取り組んでいく課題である。

E . 結論

MLST 法/SBT 法により、分離株の遺伝子型別・比較が容易に行えるようになった。データベースも完備しているので、世界各国の菌株との比較が容易である。

謝辞

今回解析した分離株を分与くださった縣邦雄・井上浩章(アクアス株式会社)、猪又明子(東京都健康安全研究センター)、江川 武・佐々木林子(文京保健所)、清水 寧(北九州市環境科学研究所)、高瀬佳彦(荒川区保健所)、山本一成(新潟市衛生環境研究所)、吉野修司(宮崎県衛生環境研究所)(敬称略)の諸氏に感謝いたします。

F. 参考文献

- 1) Gaia, V, Fry, NK, Afshar, B, Lück, PC, Meugnier, H, Etienne, J, Peduzzi, R, and Harrison, TG. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 43:2047-52.
- 2) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene

encoding N-acylneuraminate cytidylyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J. Clin. Microbiol. 45:1965-8.

- 3) http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php
- 4) Pillai DR, Shahinas D, Buzina A, Pollock RA, Lau R, Khairnar K, Wong A, Farrell DJ, Green K, McGeer A, and Low DE. 2009. Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*. BMC Genomics 10:642.

G . 研究発表

1. 論文発表

1) Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F; Working Group for *Legionella* in Japan. 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. Appl Environ Microbiol. 12:4263-70.

2) Tomohiro Oishi, Naruhiko Ishiwada, Kousaku Matsubara, Junichiro Nishi, Bin Chang, Kazuyo Tamura, Yukihiro Akeda, Toshiaki Ihara, Moon H. Nahm, Kazunori Oishi, the Japanese IPD Study Group. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. Vaccine. 31:845-849, 2013.

2. 学会発表

1) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Hiroyuki Tawara, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima Shuji Yoshino, Shinjiro Abe, Takako Misaki, Tomoe Shimada, Taku Wakui, Yuki Tada, Makoto Ohnishi. Grouping of clinical isolates of *Legionella pneumophila* SG1 in Japan, using SBT analysis and environmental habitats. ESGLI 2012 (1st Meeting of the ESCMID Study Group for *Legionella* Infections), Dresden, Germany, Sep. 2012.

2) 成相昭吉、常彬。2012年。7価肺炎球菌結合型ワクチン接種普及による乳幼児下気道感染症例の上咽頭から検出された肺炎球菌株における血清型および遺伝子型の変化。第16回日本ワクチン学会学術集会。横浜、2012年11月。

表1 *L. pneumophila* 血清群1環境分離株の遺伝子型別

NIIB番号	由来	由来	検体採取日	CFU	ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	ST備考
NIIB2709	冷却塔水	新潟市	2006.6.30	180	986	1	14	16	16	15	13	2	新規遺伝子型
NIIB2710	冷却塔水	新潟市	2006.7.26	400	986	1	14	16	16	15	13	2	新規遺伝子型
NIIB2711	冷却塔水	新潟市	2006.8.8	560	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数
NIIB2712	冷却塔水	新潟市	2007.8.3	1000	1008	1	4	3	1	1	41	1	新規遺伝子型
NIIB2713	冷却塔水	新潟市	2007.8.3	980	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数、日本では特に冷却塔水
NIIB2714	冷却塔水	新潟市	2007.10.12	12000	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数、日本では特に冷却塔水
NIIB2715	冷却塔水	新潟市	2008.7.22	40	48	5	2	22	27	6	10	12	土壌最多、冷却塔水1、温泉水1、浴槽水(水道水)1(以上国内)、ヨーロッパでは臨床、環境有り
NIIB2716	冷却塔水	新潟市	2008.8.11	280	1008	1	4	3	1	1	41	1	新規遺伝子型
NIIB2717	冷却塔水	新潟市	2008.8.11	20	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数、日本では特に冷却塔水
NIIB2718	冷却塔水	新潟市	2008.8.12	2800	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数、日本では特に冷却塔水
NIIB2765	冷却塔水	福岡市	2000.6.7	739	12	8	11	2	10	12	2	2	国内臨床1株、環境2株
NIIB2766	噴水	福岡市	2001.8.13	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2767	噴水	福岡市	2001.8.14	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2768	噴水	福岡市	2001.8.15	876	2	3	6	15	51	1	6	6	国内臨床2株
NIIB2753	噴水	宮崎県	2004.4.12	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2769	修景水	福岡市	2003.3.5	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2770	修景水	福岡市	2003.3.5	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2771	修景水	福岡市	2003.3.19	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2772	修景水	福岡市	2003.3.19	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2773	修景水	福岡市	2003.8.6	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2774	修景水	福岡市	2003.8.13	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2725	修景水	新潟市	2007.8.27	493	3	13	1	28	14	9	11	11	国外で臨床2、環境1
NIIB2833	公衆浴場シャワー水	荒川区	2011.11.9	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2823	公衆浴場シャワー水	荒川区	2011.10.18	1144	2	10	15	12	9	14	11	11	新規
NIIB2649	公衆浴場シャワー水	文京区	2009.10.29	954	3	6	1	10	14	11	6	6	新規(感染源として臨床分離株と一致)
NIIB2740	冷却塔補給水(水道水)	東京都	2010.8.23	55	1385	6	21	33	19	41	1	1	新規遺伝子型
NIIB2686	冷却塔水(患者関連、一致せず)	福岡市	2010.10.6	1	1	4	3	1	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数、日本では特に冷却塔水
NIIB2845	シャワー水	茨城県	2011.10.25	20	1008	1	4	3	1	1	41	1	国内冷却塔水
NIIB2848	シャワー水	茨城県	2011.9.27	310	256	6	10	14	5	39	14	9	国内臨床1、国外臨床多
NIIB2850	シャワー水	茨城県	2011.9.30	20	22	2	3	6	10	2	1	6	国外臨床環境、国内土壌

