

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

レジオネラおよび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。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 SBT 法による比較が可能である。

肺炎球菌の分子疫学解析に用いる方法は Multi Locus Sequencing Type (MLST) 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。今年度も引き続き、日本各地の環境から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 株の

SBT を行った。

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。本来であれば菌が検出されない場所(血液や脳脊髄液など)から菌が検出される病態(髄膜炎、菌血症など)を特に侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) と呼ぶ。2013 年 4 月に 7 価肺炎球菌結合型ワクチンが定期接種(A 類)の対象となったことを踏まえ、同時期から IPD が感染症法に基づく感染症発生動向調査において 5 類全数届出疾患となった。肺炎球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 Type (MLST) 法が広く使われている。我々は昨年度に引き続き、本年度は小児および成人侵襲性感染症患者から分離された肺炎球菌それぞれ 141 株 と 34 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-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*-acylneuraminate cytidyltransferase)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。

肺炎球菌の血清型は、Statens Serum Institut 製血清を用い莢膜膨潤法により決定した。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 つ以上の遺伝子は同じである場合、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。冷却塔水(12 株中 11 株)、浴槽水(10 株中 1 株)、噴水(7 株中 4 株)、シャワー(2 株中 2 株)、給湯水(3 株中 1 株)のいずれの由来からも ST1 株が分離された。土壌由来株 2 株はいずれも ST1 ではなかった。したがって ST1 の頻度は由来により異なっていた。

175 株肺炎球菌のうち、7 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。昨年度の報告に比べ、多様な ST 型がみられた(表 2)。小児および成人由来肺炎球菌の間に ST 型の違いが見られなかった。昨年と同様に、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、22F 型の ST433 など) は日本での分離も見られた。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 (11 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。今年度解析した環境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。2014 年 2 月 7 日現在、レジオネラ SBT データベースに 8,300 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 513 株、中国由来の分離株は 288 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ったが、今年度は初めて中国 CDC から 3 株の臨床分離株の遺伝子型の登録があった。

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 法は結合型ワクチン導入後の 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

SBT (MLST) 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)、江川武・佐々木林子 (文京保健所)、内田順子 (香川県環境保健研究センター)、林 千尋 (尼崎市立衛生研究所)、(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-acylneuraminyl 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

Otsuka T, Chang B, Wada A, and Okazaki M. 2013. Molecular epidemiology and serogroup 6 capsular gene evolution of pneumococcal carriage in a Japanese birth cohort study. J. Med. Microbiol. 62:1868-1875.

Ueno M, Ishii Y, Tateda K, Anahara Y, Ebata A, Iida M, Mizuno F, Inamura S, Takahata K, Suzuki Y, Chang B, Wada A, Sugita M, Tanaka T, Nishiwaki Y. 2014. Changes in *Streptococcus pneumoniae* Serotypes in the Nasopharynx of Japanese Children after Inoculation with a Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine. Jap. J. Infect. Dis. 67:40-43.

Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M.

2013. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. Appl. Environ. Microbiol. 79(13):3959-3966.

Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M. 2013. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama prefecture, Japan. J. Infect. Chemother. 19:644-52,

2. 学会発表

Amemura-Maekawa J, Koyano M, Yamazaki T, Murai M, Ohnishi M, and Kura F. Identification of *Legionella pneumophila* subspecies in clinical and environmental isolates in Japan using the microplate DNA-DNA hybridization method. *Legionella* 2013 (the 8th International Conference on *Legionella*), Melbourne, Australia, Oct.-Nov. 2013.

Kanatani J-I, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. *Legionella* 2013

(the 8th International Conference on *Legionella*), Melbourne, Australia, Oct.-Nov. 2013.

of legionellosis in Japan, Jan 2008 - Dec 2012. *Legionella* 2013 (the 8th International Conference on *Legionella*), Melbourne, Australia, Oct.-Nov. 2013.

Kura F, Amemura-Maekawa J, Ohnishi M, Saito T, Kinoshita H, Yoshikura H, Sunagawa T, and Ohishi K. *Epidemiology*

| NIIB番号 | 由来 | 分離年 | 遺伝子型ST | <i>flaA</i> | <i>pilE</i> | <i>asd</i> | <i>mip</i> | <i>mompS</i> | <i>proA</i> | <i>neuA</i> |
|----------|------|------|--------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|
| NIIB0425 | 冷却塔水 | 2004 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2978 | 冷却塔水 | 2011 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2979 | 冷却塔水 | 2011 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2980 | 冷却塔水 | 2011 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2981 | 冷却塔水 | 2012 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2982 | 冷却塔水 | 2012 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2983 | 冷却塔水 | 2012 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2984 | 冷却塔水 | 2012 | 59 | 7 | 6 | 17 | 3 | 13 | 11 | 11 |
| NIIB2985 | 冷却塔水 | 2012 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2987 | 冷却塔水 | 2012 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2988 | 冷却塔水 | 2012 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2989 | 冷却塔水 | 2013 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2974 | 浴槽水 | 2011 | 1544 | 6 | 10 | 19 | 12 | 19 | 4 | 6 |
| NIIB2975 | 浴槽水 | 2012 | 642 | 2 | 10 | 3 | 10 | 9 | 14 | 6 |
| NIIB2976 | 浴槽水 | 2012 | 2 | 6 | 10 | 19 | 3 | 19 | 4 | 9 |
| NIIB2977 | 浴槽水 | 2011 | 1545 | 3 | 10 | 1 | 6 | 9 | 9 | 9 |
| NIIB3019 | 浴槽水 | 2013 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB3022 | 浴槽水 | 2013 | 22 | 2 | 3 | 6 | 10 | 2 | 1 | 6 |
| NIIB3023 | 浴槽水 | 2013 | 137 | 6 | 10 | 21 | 6 | 9 | 4 | 9 |
| NIIB3073 | 浴槽水 | 2013 | 138 | 10 | 12 | 7 | 3 | 16 | 18 | 6 |
| NIIB3074 | 浴槽水 | 2013 | 137 | 6 | 10 | 21 | 6 | 9 | 4 | 9 |
| NIIB3075 | 浴槽水 | 2013 | 1624 | 2 | 10 | 3 | 6 | 9 | 4 | 38 |
| NIIB3005 | 噴水 | 2006 | 48 | 5 | 2 | 22 | 27 | 6 | 10 | 12 |
| NIIB3006 | 噴水 | 2006 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB3007 | 噴水 | 2006 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB3008 | 噴水 | 2006 | 954 | 3 | 6 | 1 | 10 | 14 | 11 | 6 |
| NIIB3009 | 噴水 | 2007 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB3010 | 噴水 | 2007 | 127 | 3 | 13 | 1 | 10 | 14 | 9 | 11 |
| NIIB3011 | 噴水 | 2007 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB0119 | 土壌 | | 1543 | 2 | 10 | 5 | 47 | 18 | 14 | 6 |
| NIIB0208 | 土壌 | 1982 | 593 | 2 | 3 | 40 | 13 | 2 | 1 | 6 |
| NIIB3018 | シャワー | 2013 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB3079 | シャワー | 2013 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB1238 | 給湯水 | 2006 | 1077 | 3 | 6 | 1 | 1 | 14 | 11 | 1 |
| NIIB1790 | 給湯水 | 2006 | 1 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NIIB2238 | 給湯水 | 2007 | 142 | 2 | 10 | 3 | 13 | 9 | 4 | 18 |

