

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）

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における
衛生管理手法に関する研究

新しい *neuAh* プライマーを利用した *Legionella pneumophila* 臨床分離株の
SBT 法による遺伝子型別

研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部

研究分担者 前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨：レジオネラ症患者に由来する臨床分離株を収集して、SBT (sequence-based typing) 法を用いて遺伝子型別を行った。2012 年度に収集された臨床分離株は 55 株（うち 2 株は同一の集団感染事例に由来する）で、血清群の内訳は血清群 1 が 50 株、血清群 2、3、5、9、10 が各 1 株だった。臨床分離株 55 株は 41 種類の遺伝子型に分けられ、そのうち新規遺伝子型は 15 種類だった。当初は散発事例と見られていた 2 事例の遺伝子型が一致したことから、2 事例の関連性が確認できた。

A．研究目的

公衆浴場等の入浴施設において衛生管理が不適切な場合、レジオネラ症例が発生することがある。その際、感染源を確定するにはレジオネラ症患者からの分離株と環境からの分離株の遺伝子型を比較し、同一菌株であるかどうかを確認しなければならない。レジオネラ症の起原菌として最も多い *Legionella pneumophila* の遺伝子型別法として世界的に普及している SBT 法を用いて、収集された *L. pneumophila* 臨床分離株について、遺伝子型別を行った。また、これまで主として血清群 1 以外の一部の株が型別不能であったが、それを解消するための新しいプライマーが提案されたので、そのプラ

イマーを評価するために、これまで型別不能であった臨床分離株について型別を行った。

B．研究方法

昨年度（2012 年度）にレジオネラ・レファレンスセンターで収集した *L. pneumophila* 臨床分離株 55 株（さかのぼって収集された 2010 年分離の 2 株、2011 年分離の 4 株以外は 2012 年～2013 年に分離された）およびそれ以前に収集された型別不能株であった *L. pneumophila* 臨床分離株 10 株について、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)}。今までに収集された臨床分離株のうち、*neuA* 遺伝子が従来のプライマーで増幅できない菌株 10 株 (血清群 5 が 7 株、血清群 2、4、10 が各 1 株) および昨年度収集分で *neuA* 遺伝子が従来のプライマーで増幅できなかった菌株 2 株 (血清群 5、10 が各 1 株) については新しく提案された *neuAh* (*neuA* ホモログ) プライマー³⁾ を用いて、遺伝子座を決定した。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) 番号が付与される。

C . 研究結果

臨床分離株 55 株は 1 つの集団感染事例 (患者数 3 名) の 2 人の患者からの分離株を含むため、54 事例に由来している。血清群 1 が 50 株で、血清群は 2、3、5、9、10 が各 1 株ずつだった。感染源が温泉・公衆浴場などの浴槽水と推定・確定されている例が 21 例 (39%)、田・畑作業と推定されている例が 1 例、使用している給水タンクの疑い例が 1 例、旅行後に発症している例が 2 例で、29 例 (54%) は感染源不明だった。別々の自治体から届けられた 2 株は同時期に同一の公衆浴場を利用しており、同じ ST (新規 ST) で、集団感染事例の可能性が示唆された。55 株は 41 種類の ST に分けられた。日本固有の ST である ST138 が 4 株 (集団感染事例を含むため 3 事例) と最も多く、すべ

て温泉関連事例であった。次いで多い ST1、ST23 (各 3 株) は国内外で従来からよく分離される ST で、ST1 の 1 例が自宅風呂と推定されている以外、感染源は不明である。ST89 も 3 株分離されたが、国内では今まで 1 株しか分離されておらず、地域も異なっており、増加した理由は不明である。他に 2 株分離された ST は 5 種類あり、1 株ずつの ST は 32 種類だった。新規 ST は 15 種類あり、EWGLI のデータベースに登録され、ST 番号が付与された (表 1)。

neuA 遺伝子が従来のプライマーで増幅できない血清群 1 以外の株 (血清群 5 が 8 株、血清群 10 が 2 株、血清群 2、4 が各 1 株) について、*neuAh* プライマーを用いたところすべて増幅でき、ST を得ることができた (表 1 の NIIB2915、NIIB2961 および表 2)。

D . 考察

血清群 1 の ST は、minimum spanning tree 解析により、B1、B2、B3、C1、C2、S1、S2、S3、U の 9 つのグループに大きく分けられる。環境分離株で見ると、B1-3 のほとんどが浴槽水分離株で、冷却塔水分離株あるいは土壌分離株のほとんどがそれぞれ、C1-2 あるいは S1-3 に所属している⁴⁾。今回調べられた血清群 1 の臨床分離株は、集団感染事例の重複を除くと、B グループ (候補を含む) が 18 例、S グループが 19 例、C グループが 4 例であった。感染源について、浴槽水 (あるいは温泉) と推定 (あるいは確定) されるのは B グ

ループに属する 18 例中 12 例であるのに対し、S グループでは 19 例中 2 例に過ぎず有意な差があった ($p < 0.001$)。遺伝子型により、大まかな感染源が推定可能であると考えられた。S グループに属する臨床分離株で、実際に田・畑作業が感染源と推定されている例や、感染源は不明とさ

れているものの職業が建設業でそれがリスクファクターと考えられる例が 2 例あった。

これまで血清群 5 の臨床分離株の多くが *neuA* が増幅しないために型別不能であったが、それは *neuAh220* を有するためであったことが分かった。*neuAh220* は国

表 1 2012 年度に収集した臨床分離株 (55 株)

NIB 分離 番号	性別	感染源	環境分離 株との PFGE	種類	血清 群	ST (Sequence Type)	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	<i>neuAh</i>	Group (SG1)*	同じSTの報告があるか
2878	2012	男	循環式温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1251	6	10	15	13	21	7	6		(B1)	無
2898	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6		S1	国内16例目、国外
2902	2012	男	公衆浴場(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1273	7	6	17	10	13	11	6		B2	無
2903	2012	男	公衆浴場(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6		S1	国内3例目、国外
2904	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	2	6	10	19	3	19	4	9		B1	国内3例目、国外2例
2911	2012	男	スーパー銭湯発病5日前利用(2923と同一事例)	<i>L. pneumophila</i>	1	1275	12	6	17	2	53	11	11		(B2)	無
2912	2012	男	給水タンク(推定、製糖業)	<i>L. pneumophila</i>	1	850	2	3	9	50	2	1	6		S1	国内2例目
2913	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1		C1	国内13例目、国外
2914	2012	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	3	93	3	10	1	28	14	9	13		-	国外多、県内8例目
2915	2012	男	浴槽水(温泉)	一致	<i>L. pneumophila</i>	10	1427	3	12	1	6	14	9	220	-	国内3例目
2920	2012	男	不明(配管工)	<i>L. pneumophila</i>	1	1346	7	6	17	3	14	11	6		B2	無
2921	2012	男	温泉(浴槽水からは検出されず、ろ材からの菌とPFGE一致)	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6		B3	国内15例目
2922	2012	男	温泉(推定、週1日利用)	<i>L. pneumophila</i>	1	18	2	10	9	13	2	5	6		S1	国外(欧州)9例
2923	2012	男	スーパー銭湯利用(2911と同一事例)	<i>L. pneumophila</i>	1	1275	12	6	17	2	53	11	11		(B2)	国内2例目
2924	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	609	3	13	1	1	14	9	1		U	国内5例目、国外1
2925	2012	男	不明(運転手)	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10		S1	国内9例目
2926	2012	男	浴槽水(推定)	<i>L. pneumophila</i>	2	39	3	5	1	7	14	9	8		-	国内3例目、国外10例SG2
2927	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1347	12	1	2	5	3	17	15		N	無
2930	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	211	3	10	1	1	14	9	11		U	国内3例目、国外4例
2931	2012	男	浴槽水(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1389	4	7	11	3	11	9	9		N	無
2932	2012	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	530	6	10	20	6	9	4	9		B1	国内3例目
2933	2012	男	田・畑作業(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	550	2	3	6	10	51	1	6		S1	国内3例目
2943	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	644	6	10	20	10	9	14	11		B1	国内4例目
2944	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6		S1	国内15例目、国外
2945	2012	男	不明(建設関係、清掃関係の仕事)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6		S1	国内16例目、国外
2946	2013	男	不明(運転手)	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6		S1	国内4例目
2947	2012	男	不明(旅行後)	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6		S1	国内17例目、国外
2948	2013	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	9	1283	2	3	18	40	2	1	2		-	国外で1例
2951	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6		S1	国内17例目、国外
2952	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	131	6	10	21	13	17	14	11		B1	国内3例目
2953	2012	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6		B3	国内16例目
2954	2012	男	浴槽水(推定、自宅の共同浴場)	<i>L. pneumophila</i>	1	1447	6	10	20	13	9	4	11		B1	無
2955	2012	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	679	27	3	9	15	56	5	6		S1	国内2例目
2956	2012	女	温泉(推定、自宅が温泉)	<i>L. pneumophila</i>	1	131	6	10	21	13	17	14	11		B1	国内4例目
2957	2012	男	不明(建設解体業)	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6		S1	国内4例目、国外
2958	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1458	10	14	16	16	15	13	2		C2	無
2959	2012	女	自宅風呂(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1		C1	国内14例目、国外
2960	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1448	2	3	6	10	51	1	9		S1	無
2961	2013	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1427	3	12	1	6	14	9	220		-	国内4例目(1例はSG10)
2962	2013	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	352	12	8	11	13	10	12	2		S3	国内3例目
2963	2011	男	不明(技術工)	<i>L. pneumophila</i>	1	1449	2	3	6	3	51	1	6		S1	無
2964	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10		S1	国内10例目
2965	2011	男	不明(運送業)	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6		S1	国内5例目、国外
2967	2011	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1450	3	10	19	14	4	4	3		B1	無
2969	2012	男	不明(海外出張、その後ゴルフ)	<i>L. pneumophila</i>	1	1446	7	43	31	3	48	15	1		(B2)	無
2971	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1		C1	国内15例目、国外
2995	2013	男	入浴施設(推定、週2回利用)	<i>L. pneumophila</i>	1	1480	3	13	1	14	14	9	6		U	無
2996	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	224	4	8	11	16	42	12	2		S3	国内2例目、国外
2997	2012	男	温泉(集団感染、2998と同一事例)	一致	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18		B3	国内17例目
2998	2012	男	温泉(集団感染、2997と同一事例)	一致	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18		B3	国内17例目
3003	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	306	6	10	15	13	9	14	11		B1	国内7例目
3004	2013	男	スポーツジム(推定、プールまたは温泉)	<i>L. pneumophila</i>	1	129	6	6	15	28	4	14	11		B1	国内2例目、国外
3012	2013	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	114	3	6	1	6	14	11	9		U	国内3(SG1が2, SG6が1)、国外(SG6)
3013	2013	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1510	2	6	3	6	9	4	11		(B1)	無
3014	2013	男	公衆浴場(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1511	2	23	17	3	11	4	2		N	無

*血清群1のSTは、minimum spanning tree解析により、B1、B2、B3、C1、C2、S1、S2、S3、Uの9つのグループに大きく分けられるが、そのいずれに属するかを記載した。

Nは、いずれのグループにも属さないもの、かっこ内に記したのは間をつなぐ菌株の発見により今後属する可能性が高いグループ

表 2 *neuAh* プライマーを用いたこれまで型別不能だった臨床分離株の型別結果

(*neuAh* プライマーを用いた場合の遺伝子座番号は 200 番台となる。)

NIB 番号	分離 年	性 別	感染源	種名	血清 群	ST (Sequence Type)	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuAh</i>	同じSTの報告があるか
0088	1986	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	4	1377	2	14	16	25	7	13	206	国外1例
0092	1986	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1424	23	12	31	6	48	31	220	国内
0098	1987	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1424	23	12	31	6	48	31	220	国内
0100	1988	女	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	2	1354	2	10	24	28	4	4	207	国外2例(環境)
0390	2003	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1531	10	22	7	6	14	8	220	無
2137	2001	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	5	1427	3	12	1	6	14	9	220	国内
2299	2007	男	入浴施設	<i>L. pneumophila</i>	5	1427	3	12	1	6	14	9	220	国内
2304	2002	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	5	1424	23	12	31	6	48	31	220	国内
2651	2010	男	不明(旅行)	<i>L. pneumophila</i>	10	1425	3	4	1	28	14	9	207	無
2682	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1413	8	6	34	9	53	8	209	国外2例(環境)

内固有の遺伝子座である。それ以外の遺伝子座（血清群 2、4、5、10 の株に由来する *neuAh*206、*neuAh*207、*neuAh*209）は国外でも見られる遺伝子座であった。

E. 結論

L. pneumophila 臨床床分離株 55 株について遺伝子型別を行った。別々の自治体から届けられた 2 株は同時期に同一の公衆浴場を利用しており、同じ ST(新規 ST) で、集団感染事例の可能性が示唆された。55 株は 41 種類の ST に分けられ、SBT 法の疫学的有用性が確認できた。15 種類は新規 ST だった。また *neuAh* プライマーが導入されたことによりほとんどの分離株の遺伝子型別が可能となった。今後も分離株の遺伝子型を調べ、分離株の動向を明らかにしていく必要がある。

謝辞

今回解析した分離株を分与くださった緒方喜久代（大分県衛生環境研究セン

ター）、勝川千尋（大阪府立公衆衛生研究所）、金澤祐子（和歌山市衛生研究所）、金谷潤一（富山県衛生研究所）、北川恵美子（石川県保健環境センター）、小嶋由香（川崎市衛生研究所）、後藤考市（群馬県衛生環境研究所）、佐原啓二（静岡県環境衛生科学研究所）、鈴木匡弘（愛知県衛生研究所）、鈴木裕（山形県衛生研究所）、田中忍（神戸市環境保健研究所）、富田隆弘（千葉県衛生研究所）、中嶋 洋（岡山県環境保健センター）、長島史子（宇都宮市衛生環境試験所）、村上光一（福岡県保健環境研究所）、吉田英弘（福岡市保健環境研究所）(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-acetylneuraminyl 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_home_page.php
 - 4) 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

衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 22～平成 24 年度総合研究報告書. 研究代表者: 倉 文明

G . 研究発表 学会発表

Junko Amemura-Maekawa, Michiko Koyano, Toshio Yamazaki, Miyo Murai, Makoto Ohnishi, and Fumiaki Kura. Identification of *Legionella pneumophila* subspecies in clinical environmental isolates in Japan using the microplate DNA-DNA hybridization method. The 8th international conference on *Legionella*, Melbourne Australia, Oct.-Nov., 2013.