

令和3年度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
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」
令和3年度分担研究報告書

「レジオネラ症集団事例における全ゲノム解析」

研究代表者	前川純子	国立感染症研究所
○ 研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学
研究協力者	陳内理生	神奈川県衛生研究所
研究協力者	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所

分子疫学解析の手法として次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析が注目されている。全国の衛生研究所でも使用されているが、レジオネラ症集団事例における全ゲノム解析の利用はあまり事例がない。そこで本研究では、神奈川県において2015年に発生したレジオネラ症集団事例の株を用いて、全ゲノム解析法の一つである Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施してその有用性を検討した。SNPs 解析により、この集団事例は遺伝的関連のある2タイプの *L. pneumophila* SG1 と1タイプの *L. pneumophila* SG13 によって引き起こされた可能性が明らかとなった。さらに SNPs 解析では *L. pneumophila* ST2114 の7株をそれぞれが遺伝的に関連のある2種類のクラスターに区別することができた。ST2114 をより細かく型別でき、高い解析精度を示したことから、本事例において SNPs 解析を利用することは有用と考えられた。本事例を引き起こしたと推察されるこれら3タイプの *L. pneumophila* は、いずれも株間の SNPs の差は21 SNPs 以内であった。このデータは集団事例の SNPs 解析を行政検査として実施する上で、遺伝的関連性を判断する SNPs の値として一つの目安になるものと考えられた。

A. 研究目的

日本においてしばしば発生するレジオネラ症の集団事例^{1,2)}において、原因施設の多くは入浴施設であり、不特定多数の人々に感染を引き起こす。感染拡大防止のため、集団事例の際には、感染源の特定が重要となる。その際、患者および感染源と疑う環境中から分離した菌株を分子疫学手法で比較

することは有用であり、行政判断の一助となる。分子疫学手法として、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) や sequence-based typing (SBT) が広く利用されている。しかし、これらの手法の分解能には限界があり、より高い分解能を有する手法として次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析が注目されている。近年になって急速に次世代シ

ークエンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されているが、レジオネラ属菌に関する全ゲノム解析の利用はあまり事例がない。海外では集団事例の調査に全ゲノム解析を用いた報告^{3, 4)}があり、地衛研においても行政検査として集団事例に全ゲノム解析を用いることは有用と考えられ、その利用を検討する必要がある。

神奈川県において 2015 年に発生したレジオネラ症集団事例²⁾において、Kuroki らは SBT 解析および core-genome multilocus sequence typing (cgMLST)解析を実施した⁵⁾。

そこで本研究では集団事例における全ゲノム解析の有用性を検討することを目的とし、この報告の株の一部を用いて全ゲノム解析の一つである Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施した。

B. 研究方法

1) 供試菌株

2015 年に神奈川県の 1 入浴施設で発生したレジオネラ症集団事例(患者 7 名)において、4 名の患者(1~4)および 2 つの浴槽水(1, 2)から分離された *Legionella pneumophila* (SG1: 8 株, SG13: 3 株)を供試した(表 1)。

2) SBT 解析

菌株からの DNA 抽出はアルカリ熱抽出により実施した。抽出した DNA を用いて、<http://www.ewgli.org/>の方法に従い、7 つの遺伝子 (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) を PCR により増幅し、サンガー法により、それぞれ塩基配列を決定した。決定した塩基配列をデータベースと比較し、各遺伝子の Allele 番号と sequence type (ST) を決定した。

3) SNPs 解析

菌株からの DNA 抽出は QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた。抽出した DNA から QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) を用いてライブラリを調整し、iSeq100 System (illumina) によりリードデータを得た。マッピングに用いるレファレンス配列を決定するため、Genbank に complete genome が公開されている代表的な 6 株の *L. pneumophila* SG1、すなわち Alcoy、Corby、Lens、Paris、Philadelphia および 130b (各アクセッション番号: CP001828, CP000675, NC006369, NC006368, AE017354, FR687201) と供試菌株のリードデータを KmerID (<https://github.com/phe-bioinformatics/kmerid>) により比較した。供試菌株と kmer に基づくゲノムの類似性が最も高い株をレファレンス配列とした。

マッピングは Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) を用い、SNPs の抽出は Genome Analysis Toolkit (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) を用いた。抽出した SNPs を *L. pneumophila* SG1 の 8 株および *L. pneumophila* SG13 の 3 株それぞれで CLC Genomics Work-bench (QIAGEN) を用いてアライメントし、比較した。

C. 結果及び考察

SBT 解析により、*L. pneumophila* SG 1 は 7 株が ST2114、1 株が ST2121 だった(表 2)。ST2114 と ST2121 は *neuA* 遺伝子の Allele のみが異なり、その塩基配列の差は 1 塩基のみだった。*L. pneumophila* SG13 は 3 株すべてが ST2113 だった。これらの結果は Kuroki らの解析結果と一致していた。

SNPs 解析において、供試した 11 株と kmer に基づくゲノムの類似性が最も高かった株はすべて Corby 株 (kmer similarity 89.9%~91.2%) であり、これをレファレンス配列としてマッピングした。

SNPs 解析により、*L. pneumophila* SG1 の 8 株はクラスター A (KLH24, KLH31, KLH33, KL1528) とクラスター B (KLH22, KLH32, KL1523, KL1524) に分けられた (表 3(1))。クラスター A における株間の SNPs の差は 8~21 SNPs であり、ST2114 の 4 株で構成された。クラスター B における株間の SNPs の差は 3~6 SNPs であり、ST2114 の 3 株および ST2121 の 1 株で構成された。クラスター A および B の株間の SNPs の差は最大で 744 SNPs だった。*L. pneumophila* SG13 の 3 株については、株間の SNPs の差は 16~21 SNPs だった (表 3(2))。

Reuter ら³⁾ は、レジオネラ症集団事例の分離株の SNPs 解析において、5 株 (患者由来 2 株および環境由来 3 株) が遺伝的に関連のあるクラスターを形成し、その SNPs の差は 15 SNPs 以内だったと報告している。また、Graham ら⁴⁾ は、レジオネラ症患者由来 3 株と感染源と疑う病院の給湯由来 1 株の SNPs 解析において、遺伝的に関連のあるクラスターを形成し、最大 20 SNPs の差を認めたと報告している。本研究においても、*L. pneumophila* SG1 のクラスター A は株間の差が 8~21 SNPs、クラスター B は株間の差が 3~6 SNPs であり、前述の報告の SNPs とほぼ同じであることから、クラスター内の株は遺伝的に関連していると考えられた。*L. pneumophila* SG13 においても同様に、株間の差が 16~21 SNPs であり、遺伝的に関連が示唆された。なお、*L. pneumophila* SG1 と *L.*

pneumophila SG13 の株間は 1833~2562 SNPs の差を認めた (表 3 に記載なし)。

本研究で解析した集団事例において、レジオネラ属菌が分離された浴槽水は、浴槽水 1, 2 のみであった。クラスター A に属する浴槽水 2 由来株 (KL1528) およびクラスター B に属する浴槽水 1 由来株 (KL1523, KL1524) は、それぞれ分離された浴槽水のみから分離された。解析した株数が少ないため断定はできないが、クラスター A に属する株は浴槽水 2 を感染源とする株であり、クラスター B に属する株は浴槽水 1 を感染源とする株であると推察された。*L. pneumophila* SG13 についても同様に、浴槽水 1 および浴槽水 2 が感染源と推察された。

L. pneumophila の分子疫学解析における分解能は SNPs 解析、cgMLST 解析、SBT 解析の順に高いとされている⁶⁾。Kuroki らが実施した cgMLST 解析では、ST2114 を 2 つの cgMLST プロファイルに分けることができたが、その差はわずか 1 塩基であった。一方、本研究の SNPs 解析では同じ ST2114 の 7 株をそれぞれが遺伝的に関連のある 2 種類のクラスター A, B に区別することができた。ST2114 をより細かく型別でき、高い解析精度を示したことから、本事例において SNPs 解析を利用することは有用と考えられた。

本事例で分離された *L. pneumophila* SG1 は、各遺伝子 (Allele) の塩基配列が非常に近い 2 種類の ST (ST2114 と ST2121 は 1 塩基の差) だったため、合わせて SNPs 解析を実施したところ、2 種類の ST が同じクラスター B を形成した。このことから、SNPs 解析を実施するにあたり、SBT 解析において ST が同じである株に加え、塩基配列の近い株に

についても合わせて SNPs 解析を実施する必要があることが示された。

本研究の SNPs 解析により、本事例は 3 タイプ(2 タイプの *L. pneumophila* SG1 および 1 タイプの *L. pneumophila* SG13)のレジオネラ属菌によって引き起こしたと推察され、いずれも株間の SNPs の差は 21 SNPs 以内であった。このデータはレジオネラ症集団事例の SNPs 解析を行政検査として実施する上で、遺伝的関連性を判断する SNPs の値として一つの目安になると考えられた。行政検査としてレジオネラ症集団事例への全ゲノム解析の利用を検討するためには、本研究のような集団事例株の全ゲノム解析を実施し、データを蓄積していくことが必要であると考えられた。

D. 参考文献

1. 日帰り温泉施設におけるレジオネラ症集団発生事例－埼玉県 (IASR Vol. 34 p. 157-158: 2013 年 6 月号)
2. 日帰り入浴施設におけるレジオネラ症集団発生事例と衛生管理上の対策－神奈川県(IASR Vol. 37 p. 140-141: 2016 年 7 月号)
3. Reuter S, et al.: A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ Open*, 2014, 33(1), e002175.
4. Graham RMA,; Real-time investigation of a *Legionella pneumophila* outbreak using whole genome sequencing. *Epidemiol Infect*, 2014, 142, 2347–2351.
5. Kuroki T, et al.: Outbreak of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella pneumophila* Serogroups 1 and 13. *Emerg.*

Infect. Dis, 2017, 23, 349–351.

6. David S, et al.: Evaluation of an optimal epidemiological typing scheme for *Legionella pneumophila* with whole-genome sequence data using validation guidelines. *J Clin Microbiol*, 2016, 54, 2135–48.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 供試菌株

菌株番号	菌種	血清型	分離由来
KLH22	<i>L. pneumophila</i>	1	患者1
KLH24	<i>L. pneumophila</i>	1	患者2
KLH25	<i>L. pneumophila</i>	13	患者2
KLH31	<i>L. pneumophila</i>	1	患者3
KLH32	<i>L. pneumophila</i>	1	患者4
KLH33	<i>L. pneumophila</i>	1	患者4
KL1519	<i>L. pneumophila</i>	13	浴槽水1
KL1523	<i>L. pneumophila</i>	1	浴槽水1
KL1524	<i>L. pneumophila</i>	1	浴槽水1
KL1528	<i>L. pneumophila</i>	1	浴槽水2
KL1532	<i>L. pneumophila</i>	13	浴槽水2

表2 SBT解析

Serogroup	菌株番号	SBT									分離由来
		ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>		
1	KLH22	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者1	
1	KLH24	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者2	
1	KLH31	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者3	
1	KLH32	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者4	
1	KLH33	2114	6	10	21	3	17	14	9	患者4	
1	KL1524	2114	6	10	21	3	17	14	9	浴槽水1	
1	KL1528	2114	6	10	21	3	17	14	9	浴槽水2	
1	KL1523	2121	6	10	21	3	17	14	57	浴槽水1	
13	KLH25	2113	6	10	21	10	17	14	209	患者2	
13	KL1519	2113	6	10	21	10	17	14	209	浴槽水1	
13	KL1532	2113	6	10	21	10	17	14	209	浴槽水2	

表3 SNPs解析

(1) *Legionella pneumophila* SG1

クラスター	ST	菌株番号	KLH24	KLH31	KLH33	KL1528	KLH22	KLH32	KL1524	KL1523	分離由来
A	2114	KLH24		5	3	5	740	743	738	742	患者2
	2114	KLH31			4	6	741	744	739	743	患者3
	2114	KLH33				4	739	742	737	741	患者4
	2114	KL1528					741	744	739	743	浴槽水2
B	2114	KLH22						19	14	8	患者1
	2114	KLH32							17	21	患者4
	2114	KL1524								16	浴槽水1
	2121	KL1523									浴槽水1

※表中の数字は株間の SNPs の差(青背景：クラスターA、赤背景：クラスターB)

(2) *Legionella pneumophila* SG13

ST	菌株番号	KLH25	KL1519	KL1532	分離由来
2113	KLH25		16	19	患者2
2113	KL1519			21	浴槽水1
2113	KL1532				浴槽水2

※表中の数字は株間の SNPs の差