

令和2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2年度分担研究報告書

「レジオネラ属菌を対象とした次世代シーケンス解析」

	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	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
	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
	研究協力者	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所
	研究協力者	政岡智佳	神奈川県衛生研究所

近年、次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研究所でも使用されている。しかし、行政検査での利用はあまり進んでおらず、レジオネラ属菌の集団発生事例や入浴施設の管理への応用など、その利用法には検討の余地がある。そこで我々は、利用法の検討のひとつとして、これまで2015年から調査を継続してきた神奈川県内の入浴施設で検出されたレジオネラ属菌を用いて、サンガー法による Sequence-Based Typing (SBT) 解析、および次世代シーケンサーによる Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施した。SBT 解析では同じ遺伝子型とされた複数の菌株において、SNPs 解析でも同一もしくは数塩基違いであったことから同一のクローンを起源とする菌株が継続して検出されている可能性が示唆された。これらの菌株には、この施設において、一年以上にわたり検出されているものや、異なる浴室から検出されたものが含まれていた。このため、この入浴施設内にレジオネラ属菌の供給源があるものと推察された。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は日本ではその感染源の一つとして入浴施設が知られており、しばしば集団発生を引き起こす^{1, 2)}。ヒト-ヒト感染はおこらないことから³⁾、感染源となる環境におけるレジオネラ属菌の制御が重要となる。また、近年になって急速に次世代シーケンサーが普及し、全国の衛生研

究所でも使用されている。しかし、次世代シーケンスデータの行政検査の利用はあまりなされておらず、レジオネラ属菌の集団発生事例や入浴施設の管理への応用など、その利用方法は検討の余地がある。

一方で、我々はこれまで2015年から神奈川県内のある入浴施設 A において、レジオネラ属菌のモニタリングを実施してきた。

加えて、この施設ではモニタリングを開始して以降、カラン及びシャワーの交換や塩素添加装置の設置、不要な配管の切除等のレジオネラ属菌対策を実施してきた。その結果、調査開始当初の2015年には検査対象とした8カ所中5カ所からレジオネラ属菌が分離されていたが、2019年の調査では3カ所まで減少した。分離菌数においても、最大3000 CFU/mlであったものが、2019年には10~300 CFU/mlとなり、レジオネラ属菌が減少している傾向が認められた。さらに、この施設はコロナ感染症拡大に基づく緊急事態宣言により、2020年4月から約1カ月間、休業した。この休業期間中は、3日に一回、くみ上げポンプを稼働させ、施設の配管内の温泉水を循環させるとともに、浴槽水の一部を入れ替えた。この際、カラン、シャワーのフラッシングを30分間実施した。ポンプ稼働時には塩素添加装置も稼働させるとともに、貯湯槽、浴槽水にも別途次亜塩素酸ナトリウムを添加し、カラン、シャワーおよび浴槽水において遊離残留塩素濃度を0.8~2.0 mg/Lに維持した。これらの対策を実施した結果、営業再開前日には、1カ所から80 CFU/mLの*Legionella pneumophila* 血清群 (SG) 6 が検出されるのみとなった。しかしながら、その後の約1ヶ月ごとに4回の調査を継続したところ、2カ所から10~60 CFU/mLのSG6、SG9および*Legionella* sp.が検出されており、完全な排除には至っていない。

そこで本研究では、レジオネラ属菌への次世代シーケンス解析の利用法の検討の一つとして、この入浴施設内のどこでレジオネラ属菌が定着しているか、新たなレジオネラ属菌が侵入しているのかなど、この

入浴施設におけるレジオネラ属菌の動態の解析を目的とした。具体的には、サンガー法による Sequence-Based Typing (SBT) 解析、および次世代シーケンサーによる Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を実施した。

B. 研究方法

1) 使用菌株

神奈川県内の入浴施設 A において、2018年1月から2020年10月までに検出された*Legionella pneumophila*のうち、緊急事態宣言による休業後に検出された株を含む SG1 8 株、SG6 5 株、SG9 5 株について供試した (表1)。

8) 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*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) を PCR により増幅し、サンガー法により、その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、各遺伝子のアレル番号と ST 型を決定した。

9) SNPs 解析

菌株からの DNA 抽出は QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出した DNA を用いて Collibri™ PCR-free ES DNA Library Prep Kit (Thermo Fisher Scientific) によりライブラリを調整し、iSeq100 System (illumina) により、リードデータを得た。得られたリードデータは *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia (アクセッション番号: AE017354) をリファレンス配列と

して、Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) によりマッピングを実施したのち、Genome Analysis Toolkit(<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) を用い、SNP を得た。得られた SNPs を 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 解析において、SG 1 は KL2064 のみが ST1 であり、その他はすべて ST552 であった。SG6 は 5 株すべてが ST191 であった。SG9 はすべて ST2693 であった。(表 2)。

SNPs 解析は *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia をリファレンス配列として、血清型ごとに実施した。SG1 では 11,489 の SNPs が得られた。全 8 株中、KL2064 を除く 7 株の SNPs は全て一致した。KL2064 の SNPs は、7,176 の SNPs が他の株と異なっていた (表 3)。SG6 では 36,119 の SNPs を得られた。SG6 であった株は SBT 解析ではすべて同じ遺伝子型であったものの、SNPs 解析では 1~4 つの SNPs が異なる 3 つの遺伝子型に分けられた (表 4)。SG9 では 87,741 の SNPs を得た。SG9 であった株は SBT 解析ではすべて同じ遺伝子型であったものの、SNPs 解析では 1~2 つの SNPs が異なる 3 つの遺伝子型に分けられた (表 5)。

SBT 解析において同じ遺伝子型であった菌株は、SG1 では SNPs 解析でも全て一致しており、SG6 および SG9 では数塩基異なるのみであった (表 3、4、5)。SNPs 解析は SBT 解析よりも分解能が高いとされていることに加え⁴⁾、Raphael らはニューヨーク州におけるアウトブレイクを起こした SG 1

の解析において、特定のアウトブレイクに関連した分離株は、コア SNPs の違いが 5 つ以下であったことを報告している⁵⁾。これらのことから、本研究において SBT 解析により遺伝子型が一致した菌株については同じクローンを起源としている可能性が高いと考えられた。2018 年 1 月に検出された SG1 である KL1997 と同じ遺伝子型であった菌株は、2018 年 10 月および 2019 年 9 月においても検出された(表 1、3)。加えて、この遺伝子型の SG1 は、浴室 A のカランから KL1997 を含む 6 株が、浴室 B から KL2104 が検出されていることから (表 1、3)、この遺伝子型の SG1 は配管の末端で維持されているものではなく、これら浴室の共通部分に供給源があると考えられた。2020 年 5 月以降、SG1 は検出されていないため (令和 2 年度分担研究報告書「入浴施設及び医療機関のレジオネラ汚染実態調査」表 2 参照)、この遺伝子型の排除に成功した可能性があるが、引き続き注視する必要があると考えられた。

本年度に実施した 5 回の調査うち、4 回目までに検出された SG6 及び 9 のすべてを次世代シーケンス解析に供試した。その結果、本年度に検出された菌株は 2019 年度以前から検出されていた菌株と同じ遺伝子型もしくは近縁株であり、休業期間中に新たに SG6 および 9 が侵入した可能性は低いと考えられた。このことからこの入浴施設内のどこかにこれらレジオネラ属菌の供給源があり、排除できていないものと考えられた。

本研究においては SBT よりも高い分解能を持つとされる SNPs 解析により、同一のクローン由来と考えられるレジオネラ属菌が

継続してこの入浴施設から検出されていることが明らかとなった。今回解析した菌株はこれまでこの入浴施設から検出された菌株のごく一部であり、今後さらに供試菌株を増やすことで、これまでに実施したレジオネラ属菌の対策の前後でどのように菌叢が変化するかを解析することが可能と考えられた。さらには、次世代シーケンサー解析の利用法として、集団感染時における分子疫学的解析が注目されている。そこで、次年度はこの入浴施設における解析を継続するとともに、神奈川県におけるレジオネラ属菌の集団発生事例の菌株を利用した解析を実施する予定である。

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. レジオネラ症 2008.1～2012.12 (IASR Vol. 34 p. 155-157: 2013 年 6 月号)

4. 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, Vol 54, p. 2135-2148.
5. Raphael, B.H. et al.: Genomic resolution of outbreak-associated *Legionella pneumophila* sero-group 1 isolates from New York State. Appl. Environ. Microbiol., 2016, 82, 3582–3590.

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 解析に使用した菌株

採水場所	菌種	血清型	採水年月	菌株番号
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2064
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2018年10月	KL2065
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2019年9月	KL2106
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2020年9月	KL2162
浴室Aカラン1	<i>L. pneumophila</i>	9	2020年10月	KL2170
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年1月	KL1997
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年1月	KL2000
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2066
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2018年10月	KL2069
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2108
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2112
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2018年10月	KL2071
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2019年9月	KL2110
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年5月	KL2155
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年7月	KL2160
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	6	2020年9月	KL2166
浴室Aカラン2	<i>L. pneumophila</i>	9	2018年10月	KL2068
浴室Bカラン2	<i>L. pneumophila</i>	1	2019年9月	KL2104

表2 SBT 解析

血清型	菌株番号	SBT								採水場所	採水年月
		ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>		
1	KL2064	1	1	4	3	1	1	1	1	浴室Aカラン1	2018年10月
1	KL1997	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2018年1月
1	KL2000	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2018年1月
1	KL2066	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2018年10月
1	KL2069	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2018年10月
1	KL2108	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2019年9月
1	KL2112	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Aカラン2	2019年9月
1	KL2104	552	7	6	17	3	13	9	11	浴室Bカラン2	2019年9月
6	KL2071	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2018年10月
6	KL2110	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2019年9月
6	KL2155	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2020年5月
6	KL2160	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2020年7月
6	KL2166	191	6	10	19	28	19	4	6	浴室Aカラン2	2020年9月
9	KL2065	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン1	2018年10月
9	KL2106	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン1	2019年9月
9	KL2162	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン1	2020年9月
9	KL2170	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン1	2020年10月
9	KL2068	2693	10	3	7	28	16	18	6	浴室Aカラン2	2018年10月

表3 *Legionella pneumophila* SG1 SNPs 解析

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2064	KL1997	KL2000	KL2066	KL2069	KL2104	KL2108	KL2112
浴室Aカラン1	2018年10月	KL2064		7176	7176	7176	7176	7176	7176	7176
浴室Aカラン2	2018年1月	KL1997			0	0	0	0	0	0
浴室Aカラン2	2018年1月	KL2000				0	0	0	0	0
浴室Aカラン2	2018年10月	KL2066					0	0	0	0
浴室Aカラン2	2018年10月	KL2069						0	0	0
浴室Aカラン2	2019年9月	KL2104							0	0
浴室Aカラン2	2019年9月	KL2108								0
浴室Bカラン2	2019年9月	KL2112								

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

表4 *Legionella pneumophila* SG6 SNPs 解析

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2071	KL2110	KL2155	KL2160	KL2166
浴室Aカラン2	2018年10月	KL2071		0	4	3	3
浴室Aカラン2	2019年9月	KL2110			4	3	3
浴室Aカラン2	2020年5月	KL2155				1	1
浴室Aカラン2	2020年7月	KL2160					0
浴室Aカラン2	2020年9月	KL2166					

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。

表5 *Legionella pneumophila* SG9 の SNPs 解析

採水場所	採水年月	菌株番号	KL2065	KL2106	KL2162	KL2170	KL2068
浴室Aカラン1	2018年10月	KL2065		1	1	1	2
浴室Aカラン1	2019年9月	KL2106			0	0	1
浴室Aカラン1	2020年9月	KL2162				0	1
浴室Aカラン1	2020年10月	KL2170					1
浴室Aカラン2	2018年10月	KL2068					

※表中の数字は異なる SNP 数を示す。