

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）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所

分担研究報告書

レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発

研究分担者

○金谷 潤一 富山県衛生研究所

研究協力者

磯部 順子 富山県衛生研究所 稲窪 大治 日本板硝子株式会社

研究要旨

入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染が問題となっているが、培養検査法は7日間以上を要して、汚染源が不明に終わることも少なくない。より迅速な検査と汚染源を追求する分子疫学的手法の確立と普及を目的に、1. モバイル型装置を用いた迅速な検査法の開発、2. 患者および地域流行株の解析によるその特徴の解明、3. 患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株のゲノム SNP 解析を行った。モバイル型 qPCR 装置（PicoGene® PCR1100、日本板硝子）を使用した遺伝子検査法では、これまでのプロトコルを改良した結果、LAMP 法と同等の感度・特異度を示した。本県でレジオネラ症患者から高頻度で検出される遺伝子型（ST23、ST120、ST502、ST505）の菌株について全長ゲノム解析を行い、分子疫学的手法の向上と汚染源の解析を進めた。平均ゲノムサイズに大きな差異はなかったが、外来 DNA によって生じる組換え領域内の SNPs が、ST23 と ST120 は、ST502 や ST505 と比較して多いことが判明した。とりわけ ST120 は、検出された SNPs の 99%以上が組換え領域内であった。通常の SNP 解析では組換え領域内の SNPs を除外しており、ST120 は 2 株間の SNPs が最多でも 40 に限られ、他の遺伝子型に比べて少ない傾向であった。また ST120 は、2 株間の SNPs が 5 以内の組み合わせが 62 通りも存在した。今回解析した菌株の多くは疫学的な関連性がないものであり、より高解像度な株の異同の識別が望ましかった。ST23 や ST120 といった高頻度に検出される遺伝子型の SNP 解析は、組み換え領域を除外しない解析や、実地疫学と分子疫学から総合判断する丁寧な感染源調査が重要と考えられた。

A 研究目的

2022年の国内におけるレジオネラ症患者報告数は、2,129件（暫定値）であり、前年比99.8%であった^{1,2)}。レジオネラ症対策として、感染源のおよそ4割を占める入浴施設の衛生管理の向上は重要である³⁾。したがって、入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態を把握し、新たな検査法を確立・普及することを目的とし、1. モバイル型装置を用いた迅速な検査法の開発、2. 患者および地域流行株の解析によるその特徴の解明、3. 患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株のゲノムSNP解析を行った。

浴槽水などを対象としたレジオネラ属菌検査は、濃縮検体を用いた平板培養法が広く普及している。しかしながら、レジオネラ属菌は発育が遅く、検査結果が判明するまでに7~10日を要する。そのため、培養法と相関する遺伝子検査法は、入浴水の衛生状態を的確に、かつ早期に把握する点から重要な方法である。また近年、モバイル型のリアルタイムPCR装置が普及し始めており、採水現場で直接レジオネラ属菌の遺伝子を検出でき、より迅速な結果の還元が可能となる。したがって本研究では、採水現場で測定可能なモバイル型装置を使用したqPCR法（モバイルqPCR法）について、平板培養法や他の遺伝子検査であるLAMP法と相関が取れるよう、これまで構築してきたプロトコルを改良し、比較検討した。

レジオネラ属菌は、土壌、浴槽水など環境中に広く生息しているが、レジオネラ症患者から検出される遺伝子型（ST、Sequence-Based Typing）には偏りがある³⁾。そこで、本県でレジオネラ症患者から高頻度で検出される遺伝子型の菌株について、ゲノム解析からその特徴を明らかにし、患者に感染・定着しやすいメカニズムの解明に資する知見とする。また、これらの遺伝子型の菌株は複数の環境検体から検出されるため、遺伝子型別結果による感染源特定の判断に迷う場合がある。そこで、患者および患者が利用した入浴施設から分離され

た菌株について、ゲノム配列のSNP数を明らかにする。得られた結果は、感染源調査の際に患者由来株と環境由来株のゲノム解析を実施した場合に、その結果の解釈において参考となる知見となる。本研究により、公衆浴場の衛生管理およびレジオネラ症対策の向上が期待される。

B 材料と方法

1 検査材料

2022年に公衆浴場などから採水した試料を用いた。試料は、浴槽水、シャワー水、カラン水であった。

2 平板培養法

平板培養法は、「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法（薬生衛発0919第1号）」に準じて実施し、10 CFU/100 mL以上を陽性とした。

3 LAMP法

検水の100倍濃縮液2 mLを用いて、Loopampレジオネラ検出試薬キットE（栄研化学）を使用して取扱説明書に従い実施した。

4 モバイルqPCR法

検水500 mLをフィルターろ過後（ポリカーボネート、0.2 μm、47 mm）、現在開発中の核酸抽出試薬200 μLを添加した手もみ式簡易破碎容器にフィルターを入れ、室温で30秒間手もみした。新規の活性炭を含む吸収剤を40 μL添加し、核酸抽出試薬と混和したものを核酸抽出液とした。qPCR反応は、PicoGene® *Legionella* spp. Kit（日本板硝子）およびPicoGene® PCR1100（日本板硝子）を用いて実施した。

5 次世代シーケンサー解析

2005年以降に県内でレジオネラ症患者から高頻度に検出された4つの遺伝子型（ST23、ST120、

ST502、ST505) の菌株について、SNP 解析を実施した。解析には、患者の他に、浴槽水、シャワー水、カラン水、水たまり、土壌から分離されたものを用いた。また、患者および利用した入浴施設から分離された上記遺伝子型の菌株についても、同様に解析した。

菌株の DNA は、QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) を用いて抽出した。イルミナ社のプロトコルに従い、Nextera XT DNA Library Preparation Kit、Nextera XT Index Kit および MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) を用いてライブラリーを作製後、RUN を実施した。遺伝子型ごとに BactSNP で pseudogenome を作成後、Gubbins を用いて組換え領域を除去し、SNPs を比較した⁷⁾。各遺伝子型の任意の 1 株のドラフトゲノム配列をレファレンス配列とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、研究機関内外の倫理委員会等における承認手続きが必要となる研究には該当しない。

C 結果

1 LAMP 法およびモバイル qPCR 法の結果

各遺伝子検査法の平板培養法に対する感度は、LAMP 法で 83.3% (5/6 検体)、モバイル qPCR 法で 100% (6/6 検体) であった (表 1)。特異度は、LAMP 法で 66.7% (16/24 検体)、モバイル qPCR 法で 56.5% (13/23 検体) であった。

2 4 遺伝子型 (ST) における組換え領域と SNPs

解析の結果は表 2 に示した。各遺伝子型の平均ゲノムサイズは 3,375,724~3,430,085 bp であった。そのうち、平均組換え領域は 24,586~79,450 bp であり、ゲノム全体に占める割合は、最も低かった ST502 で 0.7%、最も高かった ST23 で 2.3% であった。検出された総 SNPs は 4,926~18,122 bp であり、そのうち組換え領域内の SNPs は 4,264~17,983 bp であった。ゲノム全体に占める組換え領域内の

SNPs の割合は、ST23 が最も低く 86.6% であり、最も高い ST120 で 99.2% であった。また、組換え領域外の SNPs は 139~780 bp、総 SNPs に占める割合は 0.8~13.4% であった。

各遺伝子型における 2 株間の最大の SNPs を見ると、最も SNPs が少ない ST120 は 40 であった。また、ST120 では、2 株間の SNPs が 5 以内の組み合わせは 62 あった。一方、ST505 は、2 株間の最大の SNPs が 194 であり、2 株間の SNPs が 5 以内の組み合わせは 3 通りのみであった。

各遺伝子型の SNPs による系統樹と、レファレンス配列に対する組換え領域を図 1 に示した。ST23、ST120 においては、多くの株に組換え領域が検出されたが、ST502、ST505 においては、特定の系統に属する株にのみ検出された。

3 疫学的関連のある事例の SNPs

疫学的に関連があると推定された 6 事例について、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株のゲノム SNPs を比較した (表 3)。事例 4 においては、SNPs が検出されなかった。一方、事例 6 においては、SNPs が 41 検出された。これらの事例から分離された菌株は、いずれも ST502 であった。ST505 が分離された事例 1~3 は、検出された SNPs が 13~16 であった。

D 考察

モバイル型 qPCR 装置を使用した遺伝子検査法の検討では、検体中に含まれる成分などの影響により遺伝子増幅反応が阻害される結果 (遺伝子陰性培養陽性) を避けるため、今年度はこれまでのプロトコルを改良し、活性炭を含む吸収剤を添加した。結果として、今年度の検討では遺伝子陰性培養陽性検体は認められなかった。また、感度・特異度は LAMP 法と同等であった。モバイル qPCR 法は、濃縮後の DNA 抽出操作において遠心機などの機器が不要であること、反応時間が 30 秒間と短時間での処理が可能であることから、既存の方法

と比較し採水現場での遺伝子検査に適した改良が加えられている。今後は他機関でも検討し、同様の結果が得られるか検討する必要がある。また、採水現場での濃縮を想定した、より簡便なプロトコルについても検討したい。

各遺伝子型のゲノム解析を実施した結果、ドラフトゲノム配列から算出した平均ゲノムサイズは、ST23のみ他の3遺伝子型(ST120、ST502、ST505)より少し大きかったが、大きな差異は認められなかった。検出されたSNPsを比較すると、ST23とST120は、組換え領域内のSNPsがST502やST505と比較し多かった。とりわけ、ST120は検出されたSNPsの99%以上が組換え領域内であった。したがって、ST23とST120は、外来遺伝子を獲得した特定の系統の株が広く伝播している可能性が考えられた。ST502やST505は、浴槽水から高頻度に検出される遺伝子型である一方で、ST120は水たまりから高頻度に検出される⁴⁾。これらの生息環境の違いが変異の蓄積に与える影響についても、今後解析していきたい。

細菌は外来遺伝子を取り込んで相同組換えが生じると、多数のSNPsを獲得してしまうかもしれない。細菌の進化系統解析が目的の際は、変異の蓄積が一定の頻度と速度で生じる分子時計を解析対象にすべく、攪乱の要因になる組換え領域を除いての、SNPsの比較が望ましいとされる⁷⁾。これに準じて、感染源調査を目的としたSNP解析でも、組み換え領域が除外されてきた⁷⁾。

過去の報告では、同一感染事例から分離された菌株のSNPsは、その多くが5未満と少なかった⁵⁾。今回解析した遺伝子型の中では、ST120は2株間のSNPsが5以内の組み合わせは62通りもあった。今回解析した菌株の多くは疫学的に関連がないため、より高解像度な株の異同の識別が望ましかった。ST23やST120といった高頻度に検出される遺伝子型のSNP解析結果は、むしろ組み換え領域内に多数のSNPsを認めており、組み換え領域を除外しない解析を試みるべきかもしれない。当

面のこととして、低解像度な遺伝子型のSNP解析については、分子疫学の結果だけで判断するのではなく、実地疫学データと合わせて総合判断する丁寧な感染源調査が重要であると考えられる。疫学的に関連のある事例でSNPsが最も少なかった事例No.4は、患者および患者が利用した入浴施設から分離されたST502の菌株間のSNPsは0であった。疑い施設での感染を強く支持する結果であった。

一方で、同じST502が分離された事例No.6では、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株間のSNPsは41と多かった。この数字は従来の5SNPs未満の暫定的な閾値に比べてとても多く、この41SNPsの解釈については以下の通りである。

レジオネラ症患者からは、しばしば複数の遺伝子型の菌株が検出され、重複感染が生じていると考えられる⁶⁾。つまり、同一患者から分離される同一の遺伝子型からも、様々なSNPsが検出される可能性がある。環境中についても同様で、同一遺伝子型から様々なSNPsが検出されると考えられる。したがって、上述の41SNPsについては、残念ながら菌株の取得が不足して、近縁を捉えることはできたが、完全一致するものを拾えなかったと解釈される。SNPsが完全一致した株を取得するのは容易ではなく、何株を釣菌すれば一致するかは、その環境におけるレジオネラの多様性や割合に左右されそうである。当面の感染源調査は、許される範囲で同一検体から複数の株を解析し、レジオネラの多様性を考慮するのが望ましいと考えられた。このような高解像な結果が得られるのは好ましいことであるが、解析の規模については検討を要する。今後は、同一検体から分離した複数の菌株についてSNP解析を実施し、同一検体内におけるSNPsの多寡について検討する必要がある。

E 結論

モバイル型 qPCR 装置を使用した遺伝子検査法

は、LAMP 法と同等の感度・特異度を示した。全長ゲノム解析を行い、各遺伝子型で組換え領域の割合や SNP 数に差異を認めた。疫学的に関連のある事例を解析した結果、患者および患者が利用した入浴施設から分離された菌株間の SNPs は 0~41 であった。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ 2022 年第 52 週。
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/11740-idwr-sokuho-data-j-2252.html>
- 2) 国立感染症研究所発生動向調査年別報告一覧 (全数把握)
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/11529-report-ja2021-20.html>
- 3) Amemura-Maekawa J et al. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84(18), pii: e00721-18.
- 4) Kanatani J et al. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based typing. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jul;79(13):3959-66.
- 5) Raphael BH et al. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol.* 2016 May 31;82(12):3582-3590.
- 6) Wewalka G et al. Dual infections with different *Legionella* strains. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Jan;20(1):O13-9.
- 7) Croucher NJ et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015 Feb 18;43(3):e15.

F 研究発表

- 1) Kanatani J et al. Characterization of bacterial microbiome in water from public bath, especially focused on *Legionella*. The 10th International Conference on *Legionella*. Yokohama, Japan. September 2022.

G 知的財産権の出願・登録状況 なし

表 1. 遺伝子検査法と平板培養法との相関

A)

		平板培養 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
LAMP	+	5	8	13
	-	1	16	17
		6	24	30

B)

		平板培養 (CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
モバイルqPCR	+	6	10	16
	-	0	13	13
		6	23	29

表 2. 4 遺伝子型 (ST) における組換え領域と SNPs

ST	株数	分離年	平均ゲノムサイズ (bp)	平均組換え領域 (bp)	%	総SNPs	組換え領域内のSNPs	%
ST23	14	2010-2021	3,430,085	79,450	2.3	11,270	10,983	97.5
ST120	21	2006-2021	3,379,816	61,726	1.8	18,122	17,983	99.2
ST502	32	2005-2021	3,375,724	24,586	0.7	4,926	4,264	86.6
ST505	30	2005-2021	3,380,811	59,507	1.8	7,948	7,168	90.2

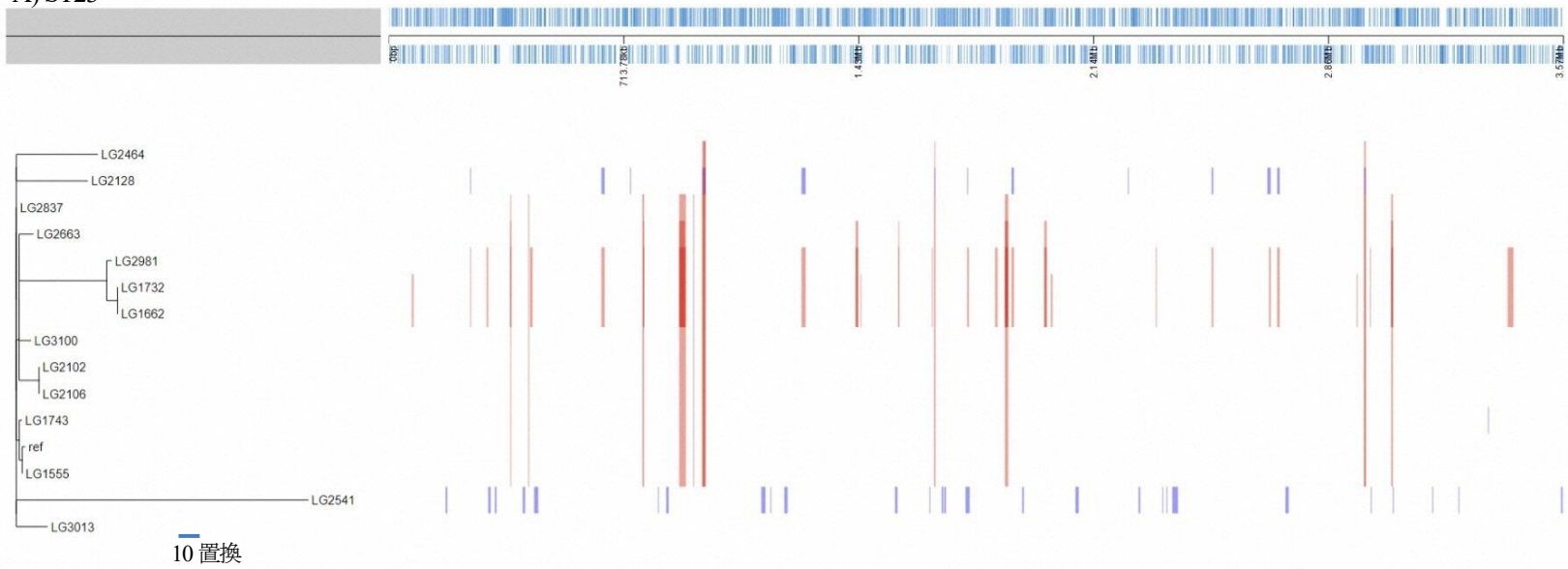
ST	組換え領域外のSNPs	%	2株間の最大SNPs	2株間のSNPsが5以内の組み合わせ
ST23	287	2.5	99	8
ST120	139	0.8	40	62
ST502	662	13.4	191	6
ST505	780	9.8	194	3

表 3. 疫学的に関連のある事例の SNPs

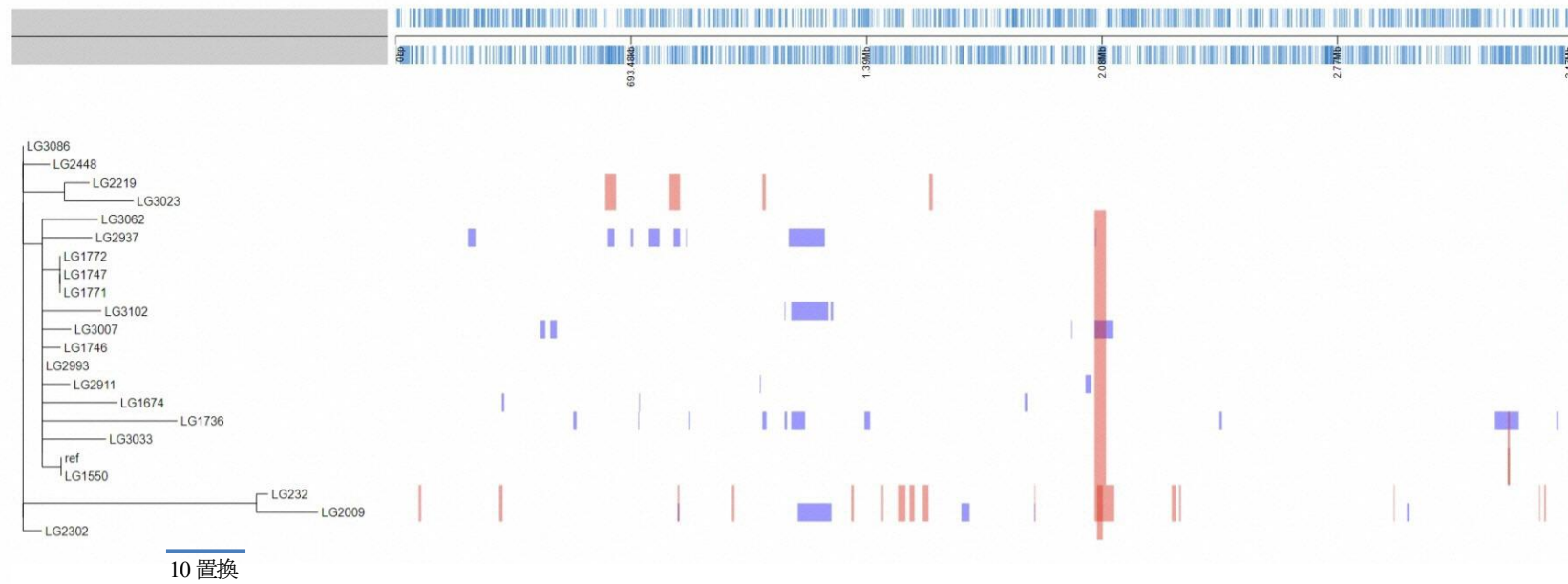
事例	年	月	菌株No.	由来	菌種・血清群	シーケンスタイプ	2株間のSNPs
事例1	2005	8	LG3	患者	Lp1	ST505	16
			LG7	入浴施設 (施設A)	Lp1	ST505	
事例2	2008	9	LG613	患者	Lp1	ST505	13
			LG626	入浴施設 (施設B)	Lp1	ST505	
事例3	2014	6	LG2338	患者	Lp1	ST505	13
			LG2340	入浴施設 (施設C)	Lp1	ST505	
事例4	2015	9	LG2564	患者	Lp1	ST502	0
			LG2566	入浴施設 (施設D)	Lp1	ST502	
事例5	2016	8	LG2684	患者	Lp1	ST502	12
			LG2681	入浴施設 (施設A)	Lp1	ST502	
事例6	2021	3	LG3087	患者	Lp1	ST502	41
			LG3088	入浴施設 (施設A)	Lp1	ST502	

図 1. 4 STs における分子系統樹と組換え領域

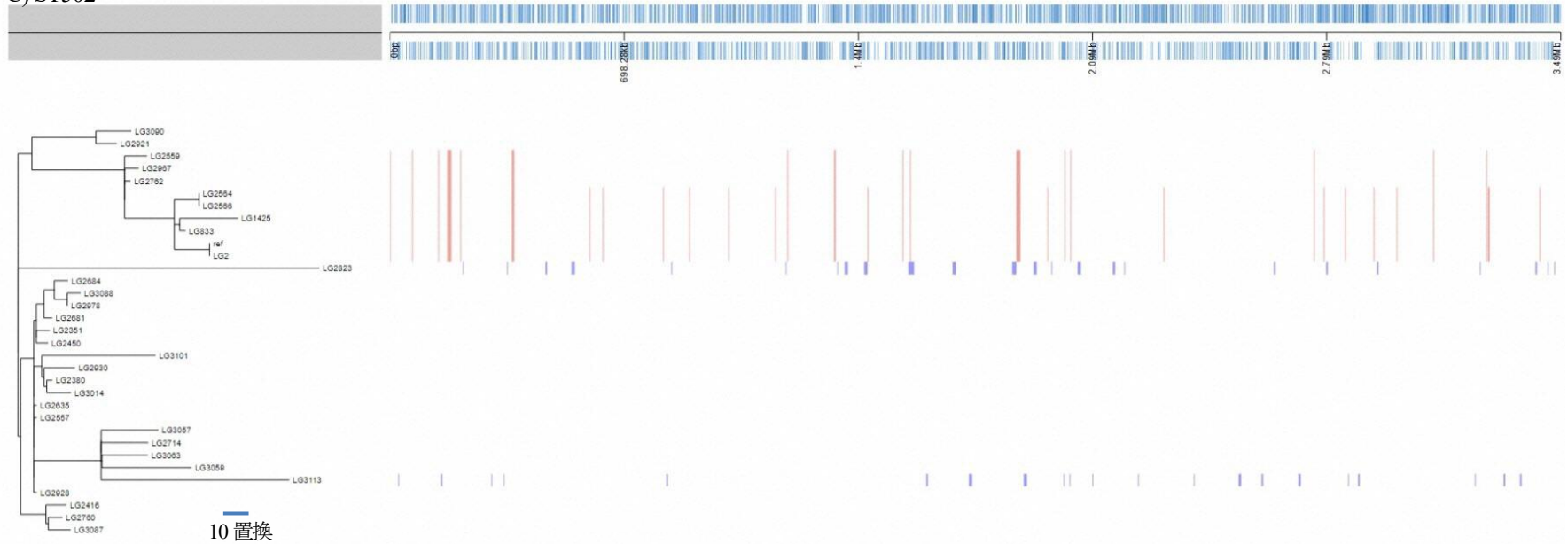
A) ST23



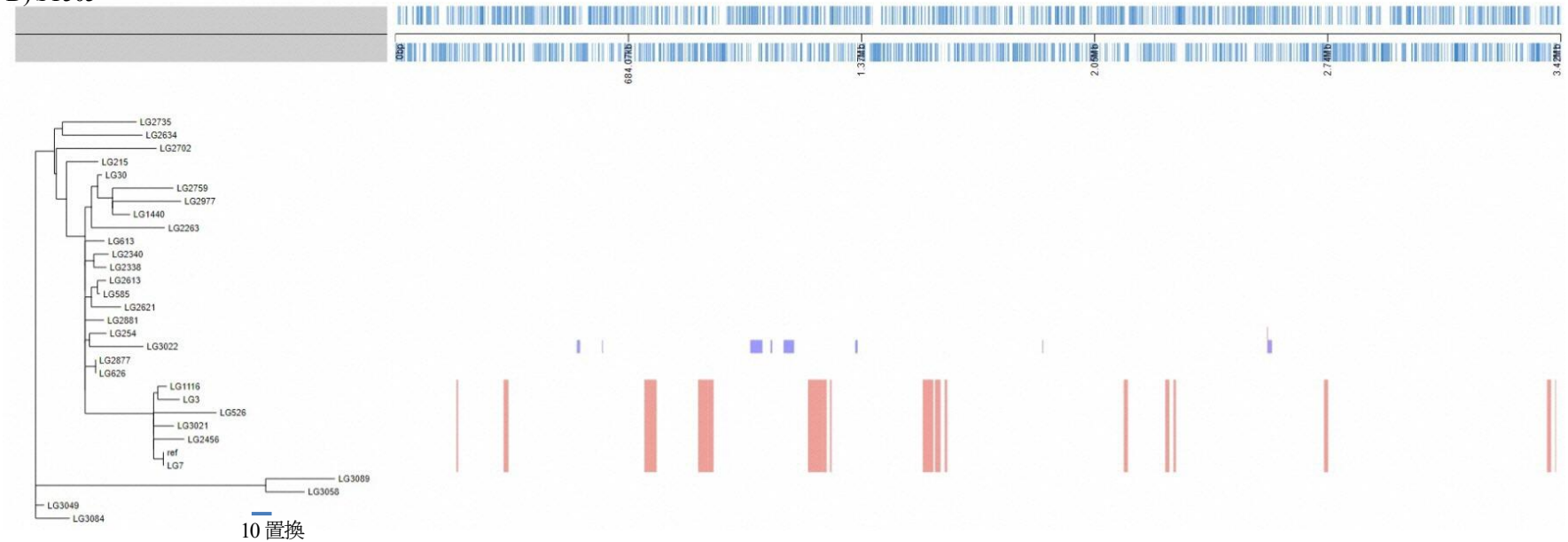
B) ST120



C) ST502



D) ST505



*各遺伝子型の図において、左側は菌株の系統樹を示した。上部は、レファレンス配列の ORF 領域を示した。右下は組換え領域を示しており、赤色は複数の株で検出された領域、青色は 1 株のみに検出された領域である。