

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）

令和4年度 分担研究報告書

「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」

浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌の分子疫学解析、施設間での比較

研究分担者 淀谷雄亮 川崎市健康安全研究所

研究協力者 西里恵美莉 川崎市健康安全研究所

研究協力者 吉田裕一 川崎市健康安全研究所

研究要旨

施設におけるレジオネラ属菌の定着状況を把握することを目的として、SBT (Sequence based typing) 法、MLVA (MultiLocus Variable-number tandem-repeat Analysis) 法及びSNV (Single Nucleotide Variant) 解析を用いた分子疫学解析を実施した。対象 18 施設中の 16 施設において、施設内で同一の (SBT による) ST 及び MLVA 型の菌が 11 か月以上の期間に複数回検出され、同一の菌が定着していると示唆された。ST 及び MLVA 型では施設ごとに異なる型が多かったが、同一と判定される株も存在し、解像度の不足する場合があった。これが SNV 解析では、異なる施設の同一 ST 及び MLVA 型であった株でも、由来施設ごとに分類可能であり、解像度が高かった。同一施設の SNV 数は、施設事例ごとに SNV 数に大きな差がみられた。一部施設は複数の ST、MLVA や SNV のタイプが混在していた。

A. 研究目的

公衆浴場法等により浴槽水等からレジオネラ属菌が検出されないことと定められており、年 1 回以上の検査が求められている。レジオネラ属菌が検出された場合、通常、施設では清掃消毒等が行われ、洗浄後に再度検査を実施し、レジオネラ属菌の陰性が確認されている。しかしながら、陰性確認後も継続的に同じ血清群が検出される施設が散見されており、菌が定着していることが疑われている。これらの継続的に検出される菌について各種分子疫学解析法を実施し、

分離菌株の相同性を明らかにし、施設でのレジオネラ属菌の定着状況を把握することを目的として検討を行った。

B. 研究方法

2017 年 4 月から 2022 年 3 月までの 5 年間に当所に搬入された検体のうち、同一施設で異なる時期に採取された検体から同一の血清群が検出されたレジオネラ属菌を対象とした。すなわち、18 施設から分離された *Legionella pneumophila* の保存株 99 株を対象とし、検体採取年月と血清群について

て抽出した。99 株について病原体検出マニュアルを参考に Sequence-Based Typing (SBT)法を実施し、Sequence Type (ST)を決定した。同様に、Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)法を実施し、各領域のリピート数を算出した。また、血清群 1 の 19 株について iseq100 を用いて全ゲノム解析を実施し、Philadelphia1 (NC_002942)を参照株として bionumerics を用いて Single Nucleotide Variants (SNV)解析を行い株間の SNV 数を算出し、菌株間の相同性を検討した。

C. 結果

本調査対象の 18 施設のうち、最も多く分離された血清群は血清群 1 の 9 施設であり、次いで血清群 5 及び血清群 6 が各 5 施設であった（重複を含む）。血清群 1 の 28 株について SBT 法により ST を決定し、MLVA 型ごとに minimum spanning tree で示した（図 1）。9 施設中 6 施設で同一の ST が複数回検出されたが、3 施設においては分離株ごとに異なる ST であった。同一 ST であった 6 施設の株については MLVA 法においても同一若しくは 1 領域違いの MLVA 型となった。ST が一致しない株は MLVA 法においても異なる MLVA 型を示した。一方で、異なる施設から同一の ST (ST1、ST128 及び ST552) が検出され、これらはそれぞれ MLVA 型においても一致若しくは 1 領域違いであった。

血清群 1 以外の血清群が検出されていた 15 施設中 14 施設で同一の ST が複数回検出された（図 2）。同一施設において複数の ST が複数回検出された施設もあった。同一の ST 株の MLVA 型はおおむね同一若しくは 1 領域違いであったが、血清群 5 及び 6 につ

いて SBT 法では異なる ST であったのに対し、MLVA 型は同一になる株が確認された。

同一施設において複数回同一の ST が検出された事例の検体採取年月を示した（表 1）。施設 K 及び施設 L は同一の年月のみに同一 ST が検出されていたが、他の 16 施設については 11 か月から 4 年 2 か月の間隔で同一 ST が検出されていた。

血清群 1 のうち ST が一致するなどした 19 株について全ゲノム解析を実施し SNV 数を算出し minimum spanning tree で示した（図 3）。SNV 解析では ST ごとに分類され、同一 ST が分離されていた株についても分離由来施設ごとに分離することが可能であった。同一施設から分離された株間の SNV 数は 0 のものから最大 55 と施設ごとに大きく異なっていた。特に ST552 が分離されていた施設 E の 4 株については分離年ごとに異なり、多様な株が検出されていた。

D. 考察

本研究において SBT 法及び MLVA 法の解析の結果、本調査対象の 18 施設すべてで同一の ST 及び MLVA 型の菌が複数回検出されていた。このうち、18 施設中 16 施設については 11 か月以上の期間において同一の菌が施設内に定着していることが示唆された。一方で、同一の血清群が検出されていたが、異なる ST もしくは MLVA 型であったケースもあった。ST 及び MLVA 型では施設ごとに異なる型となる事例が多かったが、異なる施設から分離された株について ST 及び MLVA 型ともに同一であると判定される株も存在した。SNV 解析では異なる施設由来の同一 ST 及び MLVA 型であった株も由来施設ごとに分類可能であった。

SBT 法及び MLVA 法はともに感染源調査等で有用な方法である一方で、異なる施設由来であっても同一の ST/MLVA 型となることがあり、感染源調査の際には注意が必要であると考えられた。そのため、検出頻度の高い ST/MLVA 型についてはよく把握しておく必要があると推察された。また、同一施設で分離された株の SNV 数については施設事例ごとに SNV 数に大きな差がみられた。一部施設については施設内で複数の SNV タイプの株が混在している可能性が示唆された。

E. 総括

本検討により一部施設においてレジオネラ属菌が定着していることが確認され、よ

り効果的な監視指導が必要であると考えられる。また、検出頻度の高い ST については、状況に応じて、より詳細な解析が可能である SNV 解析を実施する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

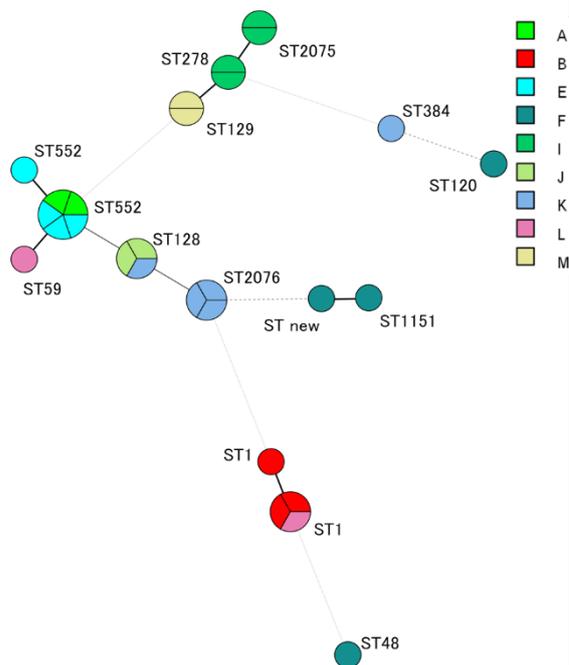


図1 SG1 株の MLVA 型ごとの MST 数値は ST、色は分離由来施設を示す。ST new は ST 番号が付与されていない allele の組み合わせであったものを示す。

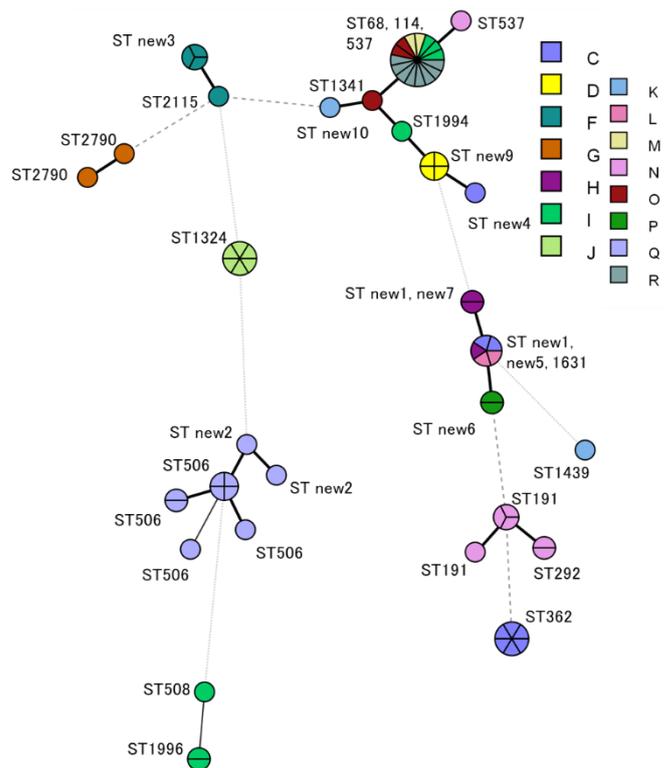


図2 Non-SG1 の MLVA 型ごとの MST 数値は ST、色は分離由来施設を示す。ST new は ST 番号が付与されていない allele の組み合わせであったものを示す。

施設	血清群	ST	株数	検体採取年月				
				2018/10	2020/2			
A	SG1	552	2	2018/10	2020/2			
B	SG1	1	3	2017/11*	2018/10			
C	SG5	new5	2	2018/3	2018/4			
	SG12	362	6	2018/3*	2018/4	2020/2*	2021/12	
D	SG4	new9	2	2020/2	2021/7			
	SG10	new9	2	2020/2	2021/7			
E	SG1	552	4	2017/8	2018/7	2020/7	2021/10	
F	UT	new3	3	2018/2*	2019/2			
G	SG5	2790	2	2017/7	2020/7			
H	SG5	new1	2	2017/8	2021/7			
I	SG1	278	2	2019/2	2021/11			
	SG1	2075	2	2018/3	2021/11			
	SG3	1996	2	2018/3	2019/2			
	SG6	537	2	2018/3	2021/11			
J	SG1	128	2	2017/8	2021/6			
	SG8	1324	6	2017/8	2019/12*	2021/6*	2021/7	
K	SG1	2076	3	2020/11*				
L	SG5	1631	2	2021/6*				
M	SG1	129	2	2020/11	2021/12			
	SG6	114	2	2019/11	2021/12			
N	SG6	191	4	2018/2	2018/3	2020/2*		
	SG6	292	2	2018/2	2019/2			
O	SG6	68	2	2019/1	2019/12			
P	SG5	new6	2	2019/1	2019/12			
Q	SG3	506	8	2017/7	2019/12*	2021/2	2021/7*	2021/8
	SG8	new2	2	2017/12	2019/12			
R	SG6	68	8	2017/8	2018/8	2019/8*	2020/2	2020/8

表1 同一施設で複数回同一のSTが検出された検体採取年月一覧
ST newはST番号が付与されていない allele の組み合わせであったものを示す。

* 表記 ST が同年月に複数の検体から分離されたことを示す。

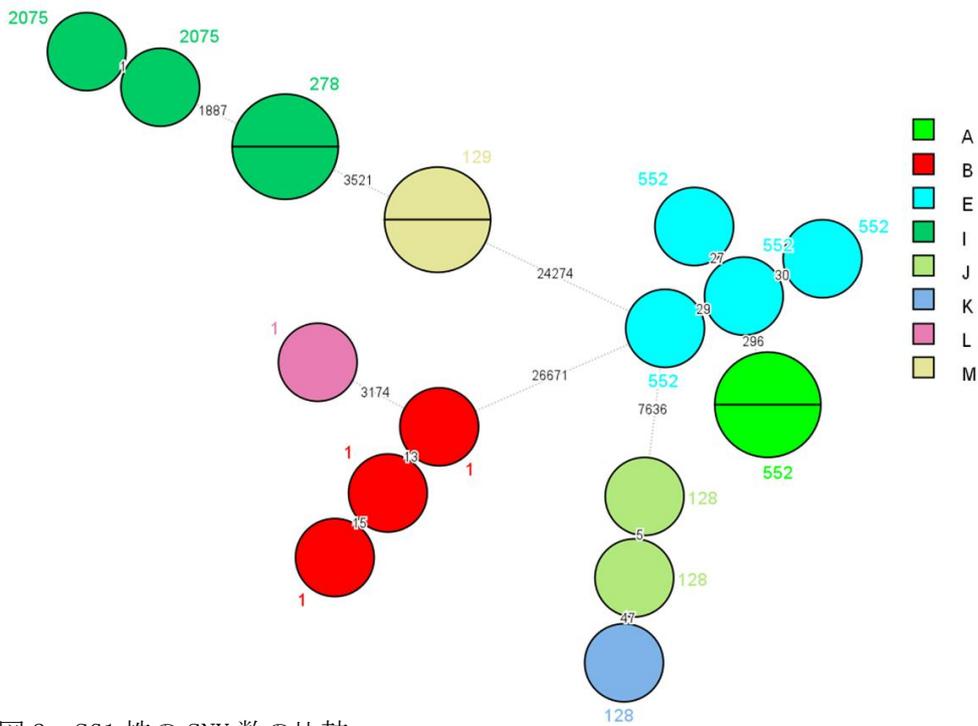


図3 SG1株のSNV数の比較
円の数値はSTを示す。枝間の数値はSNV数を示す。