

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

令和4年度分担研究報告書

分子疫学解析法の活用と環境水における NGS を用いた網羅的解析

研究分担者	中西典子	神戸市健康科学研究所	感染症部
研究分担者	前川純子	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	野本竜平	神戸市健康科学研究所	感染症部
研究協力者	小松頌子	神戸市健康科学研究所	感染症部
研究協力者	田中忍	神戸市健康科学研究所	感染症部

研究要旨：本研究では、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れ、遺伝子型別間での妥当性を評価し、より最適な MLVA 領域の利用により MLVA の解析精度を向上させる。さらに、次世代シーケンサー（NGS）を用いた集団事例での評価や汚染源調査での経時的な網羅的菌叢解析を行い、解析手法の確立と基礎データの蓄積を目指す。

今年度は、MLVA primer のミスマッチにより増幅されない株への対応のため、primer を変えた新たな multiplex PCR の系を構築した。

レジオネラ症発生事例における NGS 解析により、当該事例における施設環境由来株と患者株間の SNVs は 5 個以下であった。さらに、同一患者由来株による多様な遺伝系統が確認されたことから、状況に応じて複数の患者分離株を解析に加える必要があると考えられた。

A. 研究目的

感染源の特定には、レジオネラ症患者からの分離株と、推定感染源とされる環境分離株の遺伝子型の一致を確認する必要がある。これまでパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）や世界的に普及した塩基配列の多型解析（Sequence based typing、SBT）法が主流の方法として用いられてきた。しかしこれら従来法は、多検体処理の煩雑さに加え、時間や費用が課題となっていたことから、我々は *L. pneumophila* においてより簡便な手順で実施可能な反復配列多型解析法（MLVA）を導入し、これま

で評価してきた。その結果、レジオネラの汎用性の高い分子疫学的手法として MLVA 法を普及させてきた。このようにレジオネラの分子疫学には様々な遺伝子型別手法が報告されているが、それぞれの手法間での遺伝子型別結果に相違が生じるケースや新規な手法を自治体へ導入する際の技術的な課題が認められている。さらに、菌株の同一性をより詳細に解析するには全ゲノム配列を用いた系統解析を今後取り入れていく必要がある。

そこで本研究では、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れ、従来法で型別され

た遺伝系統の妥当性を評価することで、より最適なMLVA領域の利用によりMLVAの解析精度を向上させる。さらに、次世代シーケンサー(NGS)を用いた集団事例での評価や汚染源調査での経時的な網羅的菌叢解析を行い、解析手法の確立と基礎データの蓄積を目指す。

今年度は、ゲノム解析により明らかになった、primer部分のミスマッチにより増幅されないMLVA領域について、新たなprimerを用いたMultiplex PCRの系を構築した。また、レジオネラ発生事例においてNGS解析を実施し、得られた全ゲノム配列を用いて系統解析やSNP解析を行い、ゲノム分子疫学的な観点から菌株間の異同性の評価を行った。

B. 研究方法

①菌株：MLVA領域のprimerおよびMutiplex PCR評価には *L. pneumophila* SG1の菌株439株を対象とした¹⁾。

レジオネラ症発生事例におけるNGS解析では、同一患者の喀痰由来14株と施設環境分離株18株(浴槽水由来5株、ヘアークャッチャー由来5株、ろ過器由来8株)および2013年に同一施設の浴槽水由来1株を用いた(表2,3)。

②MLVA：Sobralら²⁾によって報告された12領域(Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31, Lpms33, Lpms34, Lpms35, Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44)を用いた。また、Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31, Lpms33,

Lpms34, Lpms35に関しては、Pourcelらによって報告された primer^{3) 4)}を 2nd primerとして用いた。4領域を1セットとした3種類のmultiplex PCR-A(Lpms01, Lpms31, Lpms33, Lpms35), PCR-B(Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms34), PCR-C(Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44)とした。PCR反応は、QIAGEN Multiplexを用いた。PCR条件は、95°C15分後に95°C30秒、60°C1分、72°C70秒を35サイクル行った。50倍希釈したPCR産物1μlをサイズマーカー0.25μl(GeneScan 1200 LIZ Size Standard(PCR-AとPCR-B), GeneScan 600 LIZ Size Standard(PCR-C)とHi-Di Formamide(ABI)10μlに混合し、95°Cで3分加熱後、氷中条件で2分間急冷した。その後、AB3500 Genetic Analyzerにてフラグメント解析を行った。得られたデータはGeneMapper Ver.4(Applied Biosystems)を用いて、フラグメントサイズおよびリピート数を測定した。MLVA型による株間の類縁関係を明らかにするために、BioNumerics Ver7.6を用いて、Minimum spanning tree(MST)を作成した。

③ゲノム解析：QIAseqFX(QIAGEN)を用いてDNAライブラリを調製し、Miseq reagent Kit v.3を用いてリードデータを取得した。A5-Miseqでアッセムブリし、PROKKAでアノテーションを行った。SNV(Single-nucleotide variant)解析にはBactSNPを用いてPseudogenomeを作成

し⁵⁾、組換え領域の除去は Gubbins を用いた⁶⁾。リファレンスには、*L. pneumophila* str. Pari 株 (Accession no.; CR628336.1)のゲノム配列を用いた。

C. 研究結果

(1) MLVA のプロトコルの改良

primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域 (Lmps01, Lmps13, Lpms31) について、Pourcel ら^{3) 4)}によって報告された primer (2nd primer とする)を用いることにより、大きく改善された。そこで、Lmps01, Lmps13, Lpms31 は 2nd primer に変更し、primer 濃度を最適化することで、4 領域がきれいに増幅される条件を決定し、multiplex PCR の系を構築した(表 1)。

(2) レジオネラ症発生事例における NGS の活用

レジオネラ症発生事例において、患者および感染源の施設環境から *L. pneumophila* SG1 ST138 が分離された。それぞれの株における MLVA 型を表 2 と表 3 に示した。患者由来株 14 株と環境由来株 19 株の *L. pneumophila* SG1 ST138 の MLVA 型は 6 種類に型別された(図 1)。さらに、菌株間の遺伝的類似性を調べるため、NGS 解析を行った。SNV に基づくハプロタイプネットワーク解析の結果、同一患者喀痰由来株および施設環境由来株間の SNVs は 0~42 個の範囲内であった。同一患者由来 14 株間の SNVs は 0~41 個であり、14 株中 12 株は三つの Clade (Clade I, II, III)に分かれ、Clade 内の SNVs

は 10 個以下であった(図 2)。Clade I は、SNV が 0-1 個の患者株 5 株のみで構成されていた。Clade II と III には、患者由来株と環境由来株の両方の株が含まれ、SNV は 4 個以下であった。2013 年に同一施設の浴槽水から分離した KL0954 株と患者由来株間の SNVs は約 30 個であった。さらに、KL0954 株は、ろ過器由来の KL2300 株と KL2301 株、浴槽水由来 KL2220 株との SNVs は 9~10 個であった。

D. 考察

Pourcel らが報告した primer を用いても MLVA 領域自体は Sobral らと同じ領域である。今回、Lpms01, Lpms13, Lpms31 については、最初から 2nd primer に変更した multiplex PCR の系を構築した。今後、菌株数を増やして構築したプロトコルの評価を行っていく必要がある。また、他の複数の連携機関にも有効性を検証してもらう必要がある。

L. pneumophila SG1 ST138 におけるレジオネラ発生事例について NGS による解析を行った。ST138 は、B3 グループ (bathwater group) に属し、散发例や小規模アウトブレイクを引き起こしている日本に特有の遺伝子型である⁷⁾。当該事例においては、施設環境由来株と患者株間の SNVs が 5 個以下となる組合せが確認された。疫学的に関連のある菌株間の SNV 数は 5 個以下と報告されていることから⁸⁾、当該施設が感染源であると判断できる。しかしながら、その一方で、同一患者由来株間の SNV 数は 0~41 個と多

様であり、患者株と近縁な環境由来株が分離できていない clade が存在していたことから、状況に応じて複数の同一患者分離株を解析に加える必要があると考えられた。また、同一患者由来株の多様性は同時に複数の遺伝系統に暴露されたことを示しており、浴槽などエアロゾルが発生する環境に長時間滞在することが影響していると考えられる。さらに、2013年の当該施設分離株との比較においては、患者由来株間の SNVs 数は約 30 個、浴槽由来およびろ過器由来株間の SNVs が 10 個以内であったことから、少なくとも 2013 年から施設内に定着しており、複数の遺伝子系統に多様に分岐した可能性が考えられた。

E. 結論

primer のミスマッチにより増幅されない株への対応のため、primer を変えた新たな multiplex PCR の系を構築した。

レジオネラ症発生事例における NGS 解析により、当該事例における施設環境由来株と患者株間の SNVs は 5 個以下であった。また、同一患者由来株において多様な遺伝系統が確認されたことから、複数の患者分離株を解析に加える必要があると考えられた。

F. 参考文献

1) 中西典子ら, MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析. 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)「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和元年～3 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 220-234, 2022

- 2) Sobral D, Le Cann P, Gerard A, Jarraud S, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C. 2011. High-throughput typing method to identify a non-outbreak-involved *Legionella pneumophila* strain colonizing the entire water supply system in the town of Rennes, France. *Appl Environ Microbiol.* 77:6899-6907.
- 3) MLVA net support site (<http://mlva.i2bc.parisclay.fr/MLVANet/spip.php?rubrique44>)
- 4) Pourcel C, Visca P, Afshar B, D'Arezzo S, Vergnaud G, Fry NK. 2007. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *J Clin Microbiol.* 45:1190-1199.
- 5) Yoshimura, D., Kajitani, R., Gotoh, Y., Katahira, K., Okuno, M., Ogura, Y., Hayashi, T., Itoh, T. Evaluation of SNP Calling Methods for Closely Related Bacterial Isolates and a Novel High-Accuracy Pipeline: BactSNP. *Microb. Genom.* 2019, 5, e000261.

- 6) Croucher, N.J.; Page, A.J.; Connor, T.R.; Delaney, A.J.; Keane, J.A.; Bentley, S.D.; Parkhill, J.; Harris, S.R. Rapid Phylogenetic Analysis of Large Samples of Recombinant Bacterial Whole Genome Sequences Using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, e15.
- 7) Amemura-Maekawa; J. Kura, F.; Chida, K.; Ohya, H.; Kanatani, J.I.; Isobe, J.; Tanaka, S.; Nakajima, H.; Hiratsuka, T.; Yoshino, S.; et al. *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* species Isolated From Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018, 84, e00721-18
- 8) Raphael, B.H.; Baker, D.J.; Nazarian, E.; Lapierre, P.; Bopp, D.; Kozak-Muiznieks, N.A.; Morrison, S.S.; Lucas, C.E.; Mercante, J.W.; Musser, K.A.; et al. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates From New York State. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 82, 3582–3590
- International Conference on Legionella. October 2022, Yokohama, Japan.
- 2) Noriko Nakanishi, Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto. Whole-Genome analysis of *L. pneumophila* strains causing outbreak at bath facility in Kobe, Japan. The 10th International Conference on Legionella. October 2022, Yokohama, Japan.

論文発表

- 1) Nakanishi N, Komatsu S, Tanaka S, Mukai K, Nomoto R. Investigation of a *Legionella pneumophila* Outbreak at a Bath Facility in Japan Using Whole-Genome Sequencing of Isolates from Clinical and Environmental Samples. *Microorganisms.* 2022 Dec 22;11(1):28.
doi: 10.3390/microorganisms11010028.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

G. 研究発表

学会発表

- 1) Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto, Noriko Nakanishi. The genetic characterization of *L. pneumophila* SG1 isolates from bath water in Kobe City, Japan. The 10th

表 1. Multiplex PCRのMLVA領域とプライマー

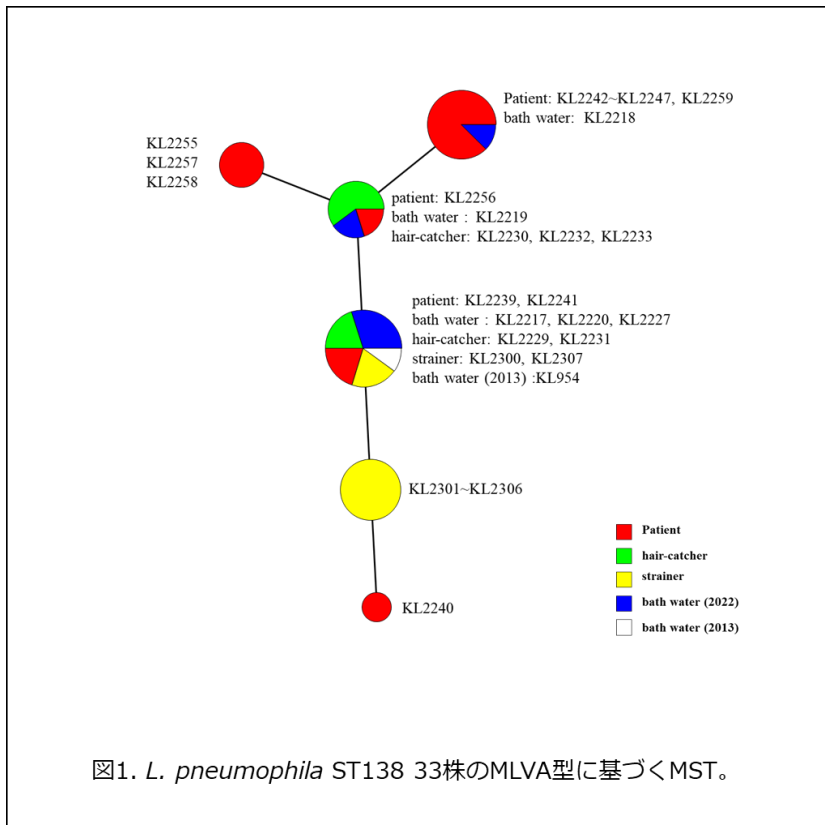
Multiplex PCR	MLVA locus	primer	Sequence (5'→3') (Labeling)	Primer conc (pmol)
A	Lpms01	Lpms01F_2nd	(NED)-ACGRGCATATGACAAAGCCTTG	10
		Lpms01R_2nd	CGGATCATCAGGTATTAATCGC	
	Lpms31	Lpms31F_2nd	(FAM)-GCAATCCGGCCTCGCAAGCC	1.25
		Lpms31R_2nd	CAGGCACACCTTGCCGTCA	
	Lpms33	Lpms33F	(VIC)-GACACCACAGCAGTTTGAAC	1.25
		Lpms33R	CGAGGAAATCTTCTCAGCC	
Lpms35	Lpms35F	(PET)-GAATCTGAAACAGTTGAGGATG	1.25	
	Lpms35R	TATCAACCTCATCATCCCTG		
B	Lpms03	Lpms03F	(VIC)-GGACAAACAACCAATGAAGC	5
		Lpms03R	TGATGGTCTCAATGGTCCG	
	Lpms13-2nd	Lpms13F_2nd	(NED)-CAATWGCATCGGACTGAGYA	5
		Lpms13R_2nd	TGCCTGTGTATCTGGRAARGC	
	Lpms19	Lpms19F	(PET)-GAACTATCAGAAGGAGGCGA	1.25
		Lpms19R	TCCAGAGGCTCTGGATTATC	
	Lpms34	Lpms34F	(FAM)-AAGGAATAAGGCGCAGCAC	1.25
		Lpms34R	ATGCAGGATGTTTGCGCATG	

表 2. 同一患者由来*L. pneumophila* ST138 14株のMLVA型

Patient No.	No. of isolates	MLVA-12 profile											
		Lpms01	Lpms03	Lpms13	Lpms19	Lpms31	Lpms33	Lpms34	Lpms35	Lpms38	Lpms39	Lpms40	Lpms44
A	KL2239	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
	KL2240	8	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
	KL2241	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
	KL2242	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2243	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2244	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2245	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2246	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2247	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2255	0	7	0	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2256	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2257	0	7	0	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2258	0	7	0	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
	KL2259	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9

表3. 環境由来*L. pneumophila* ST138 18株のMLVA型

No. of isolates	year	sample source	MLVA-12 profile											
			Lpms01	Lpms03	Lpms13	Lpms19	Lpms31	Lpms33	Lpms34	Lpms35	Lpms38	Lpms39	Lpms40	Lpms44
KL2217	2022	bath water (man)	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2218		bath water (man)	8	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2219		bath water (man)	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2220		bath water (man)	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2227		bath water (women)	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2229		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2230		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2231		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2232		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2233		hair-catcher	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	9
KL2300		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL2301		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2302		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2303		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2304		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2305		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2306		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	0	3	8	4	0
KL2307		strainer	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0
KL954	2013	bath water	0	7	8	4	12.5	2.5	3	22	3	8	4	0



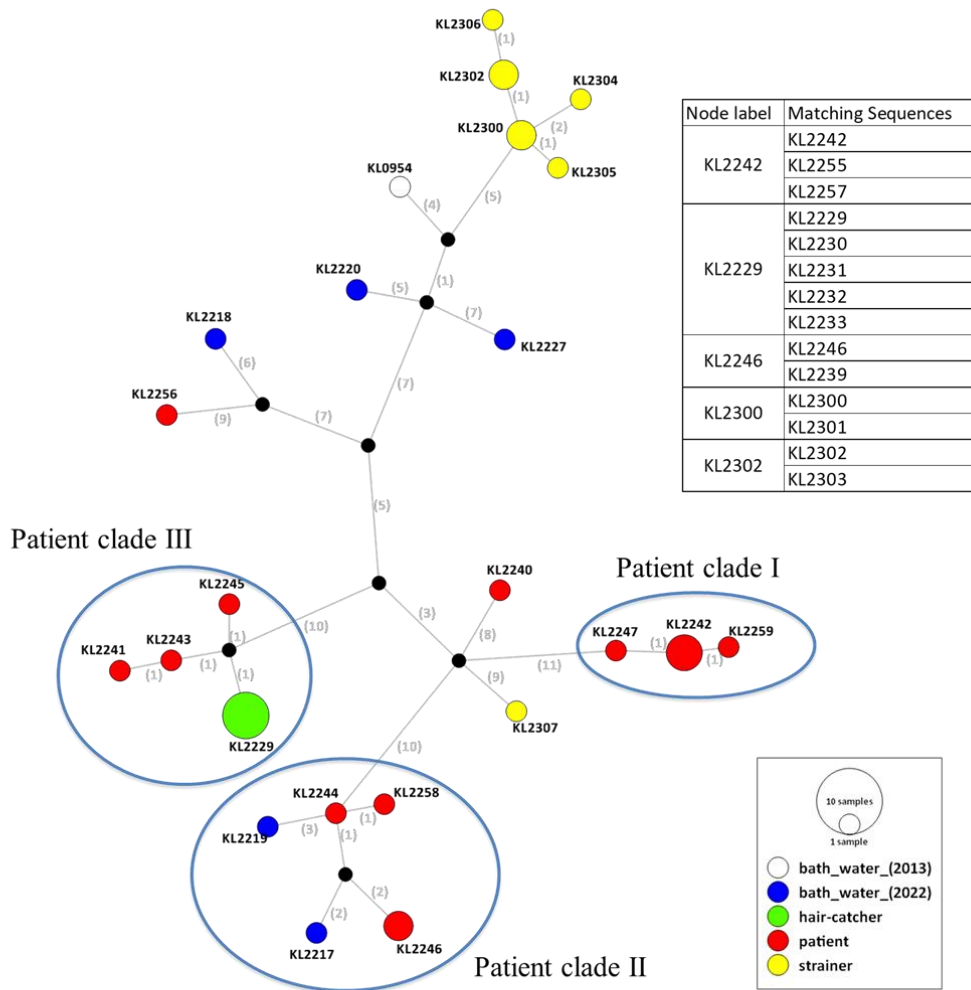


図2. *L. pneumophila* ST138 33株の全ゲノム配列を用いたSNVs解析によるハプロタイプネットワーク。各Node間の数字はSNVsの数を表す。