

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5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	金谷潤一	富山県衛生研究所	
研究協力者	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所	
研究協力者	陳内理生	神奈川県衛生研究所	

研究要旨：本研究では、NGS解析による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や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、国内で比較的良好に検出される遺伝子型であるST1 (n=77) とST138 (n=59) に着目して、全ゲノム解析を行った。SNV (Single-nucleotide variant)解析は、BactSNPによりコールされたSNVsから、Snippyによるコア領域の推定、Gubbinsによる組換え領域の除去に加え、繰返し領域の除去を行い、SNVsを抽出し系統関係を描画した。その結果、ST1では、由来別に大きく4つのCladeに分岐し多様性のある遺伝系統であることが確認された。一方で、日本に特有の遺伝子型ST138は、ST1と比較して多様性の乏しい遺伝子型であることが明らかとなったことから、感染事例における菌株同一性の判断については注意する必要があると考えられた。

以上のことから、遺伝系統によって多様性が異なることが明らかとなったことから、国内で検出される遺伝子型を中心にゲノム解析を進め、遺伝系統の特徴を把握す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<sup>1)</sup>。昨年度は、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、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。

一方で、次世代シーケンサー (NGS) の普及に伴い、全ゲノム解析でより詳細に菌株の同一性を確認することや、網羅的な菌叢解析により汚染実態の把握にも利用できるようになってきた。

そこで本研究では、NGS解析による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や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、国内で検出される主要な遺伝子型について、散発例や集団事例、環境由来株などの全ゲノム比較解析を行い、集団事例の評価および遺伝系統の特徴について解析を行った。

## B. 研究方法

菌株：遺伝子型 ST1 の菌株は計 77 株を解析した。内訳は、給湯系統が感染源となった院内感染事例由来 18 株（同一患者由来 4 株、給湯水由来 11 株、冷却塔水由来 3 株）、2 地域（Region A と B）で分離された浴槽水由来 25 株、冷却塔水由来 31 株、Region A と C での散発 3 事例の患者由来 3 株である。

遺伝子型 ST138 の菌株は、公衆浴場集団事例の 2 事例の関連株 45 株と 8 株、2 地域（Region A と B）で分離された浴槽水由来 5 株、Region C での散発例患者由来 1 株の計 59 株を解析した。

②ゲノム解析：QIAseq FX DNA Library kit (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。SNV (Single-nucleotide variant)解析は、既報に従い実施した<sup>2)</sup>。すなわち、BactSNP<sup>3)</sup>によりコールされた SNVs から、Snippy によるコア領域の推定、Gubbins<sup>4)</sup>による組換え領域の除去に加え、繰返し領域の除去を行った。Reference 配列として *L. pneumophila* str. Paris 株 (Accession no.; CR628336.1)のゲノム配列を用いた。また、ST138 の比較ゲノム解析には、自施設で分離された ST138 株の完全長配列を決定し Reference として用いた。

## C. 研究結果

### (1) 遺伝子型 ST1 の比較ゲノム解析

ST1 である *L. pneumophila* str. Paris 株を Reference 株として用いたところ、Core genome size は 2,966,943 bp となり、ゲノムカバー率は約 85%であった。

ST1 は大きく 4 つの Clade (I-IV)に分岐した(図 1)。Clade I は院内感染事例、Clade II は浴槽水由来が多い系統、Clade III と IV は冷却塔水由来が多い系統となった。各 Clade 間の SNVs は 600 個以上検出された。院内感染事例の患者株と給湯系統由来株 Clade I に存在しており、株間の SNV は数個であった。一方で、院内感染事例で分離された冷却塔由来株は、冷却塔水由来の Clade III と IV に存在していたことから、給湯系統が感染源であることが確認された。Region C の散発例は Clade I に含まれた。

### (2) 遺伝子型 ST138 の比較ゲノム解析

ST138 は、全体の株間の SNVs は約 50 個以内となり、ST1 よりも SNVs は少なかった。Reference として *L. pneumophila* str. Paris 株用いたところ、疫学的に関連性のない Region B の浴槽水由来株と集団事例株間の SNVs が 0~3 個となった。そこで、ST138 の完全長配列を取得し Reference 株として再解析したところ、Core genome size が、2,564,350 bp から 2,834,011 bp となり、コアゲノム領域が 269,661bp も拡大された。上記の株間における SNVs 数は増大し、解像度はより高くなった(図 2)。しかしながら、離れた地域で分離され、疫学的に関連性のない株間でも SNVs が 10 個以内となった。

#### D. 考察

国内で比較的良好に検出される遺伝子型である ST1 と ST138 に着目して、全ゲノム解析を行った。ST1 は冷却塔水からよく分離される遺伝子型で Group-C1 に属し、国内の臨床株でも上位 5 番目に検出されているが、世界で拡散している遺伝子型である<sup>4,8)</sup>。一方で、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<sup>8)</sup>。

ST1 ゲノム解析では、由来別に大きく 4 つの Clade に分岐していた。ST1 は相同組換えが多く、多様度の高い遺伝系統であることが報告されているが<sup>7,9)</sup>、国内で分離された ST1 菌株においても同様の傾向であることが明らかとなった。一方で、今回の解析において、ST138 は ST1 と比

較して、多様性に乏しい遺伝系統であった。ST138 では、離れた地域で分離されていても SNVs は 10 個以内となるケースも確認できたことから、ST138 のような多様性に乏しい遺伝系統での感染事例においては注意する必要がある。また、感染事例等同一 ST 内での比較する場合においては、遺伝的に近縁な株を reference 株とする方がより正確な結果が得られることが明らかとなった。

以上のことから、*L. pneumophila* は遺伝系統によって多様度が異なる可能性が示唆されたため、それぞれの遺伝系統内で同一株と判断される SNVs 数について慎重な議論が必要であるかもしれない。感染事例が発生した際には、菌株間の SNVs 数が行政判断根拠になることから、今後国内で検出される遺伝子型を中心にゲノム解析を進め、遺伝系統の特徴を把握する必要があると考えられた。

#### E. 結論

国内で比較的良好に検出される遺伝子型である ST1 と ST138 のゲノム解析の結果、遺伝系統によって多様度が異なることが明らかとなった。ST138 のような多様性に乏しい遺伝系統での感染事例においては注意す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) Lee K, Iguchi A, Uda K, Matsumura S, Miyairi I, Ishikura K, Ohnishi M, Seto J, Ishikawa K, Konishi N, Obata H, Furukawa I, Nagaoka H, Morinushi H, Hama N, Nomoto R, Nakajima H, Kariya H, Hamasaki M, Iyoda S. Whole-Genome Sequencing of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* OX18 from a Fatal Hemolytic Uremic Syndrome Case. *Emerg Infect Dis.* 2021 May;27(5):1509-1512. doi: 10.3201/eid2705.204162.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) Kozak-Muiznieks NA, Lucas CE, Brown E, Pondo T, Taylor TH Jr, France M, Miskowski D, Winchell JM. 2014. Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J Clin Microbiol* 52:201–211. doi: 10.1128/JCM.01973-13.
  - 6) Cassier P, Campese C, Le Strat Y, Che D, Ginevra C, Etienne J, Jarraud S. 2015. Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaires disease cases in France. *New Microbes New Infect* 3:29–33.
  - 7) David S, Sánchez-Busó L, Harris SR, Marttinen P, Rusniok C, Buchrieser C, Harrison TG, Parkhill J. 2017. Dynamics and impact of homologous recombination on the evolution of *Legionella pneumophila*. *PLoS Genet* 13:e1006855. doi: 10.1371/journal.pgen.1006855.
  - 8) 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
  - 9) Mercante JW, Caravas JA, Ishaq MK, Kozak-Muiznieks NA, Raphael BH, Winchell JM. Genomic heterogeneity

differentiates clinical and environmental subgroups of Legionella pneumophila sequence type 1. PLoS One. 2018 Oct 18;13(10):e0206110. doi: 10.1371/journal.pone.0206110. eCollection 2018.

G. 研究発表  
学会発表

- 1) 小松頌子、田中忍、中西典子. 公衆浴場から分離されたレジオネラ属菌の生態学的・遺伝的特徴(2016~2021). 日本防菌防黴学会第 50 回年次大会. 2023 年 8 月

論文発表

- 1) Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka and Noriko Nakanishi. Prevalence and genetic distribution of Legionella spp. in public bath facilities in Kobe City, Japan. J Water Health. 2023. 21 (11): 1727-1734 doi: 10.2166/wh.2023.247
- 2) 藤永千波、小松頌子、田中忍、八木正博、中西典子、大久保祥嗣、向井健悟. 市内浴場施設における理化学検査とレジオネラ属菌検出との関連性について. 神戸市健康科学研究所報 第 51 巻 58-61 頁 2023.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

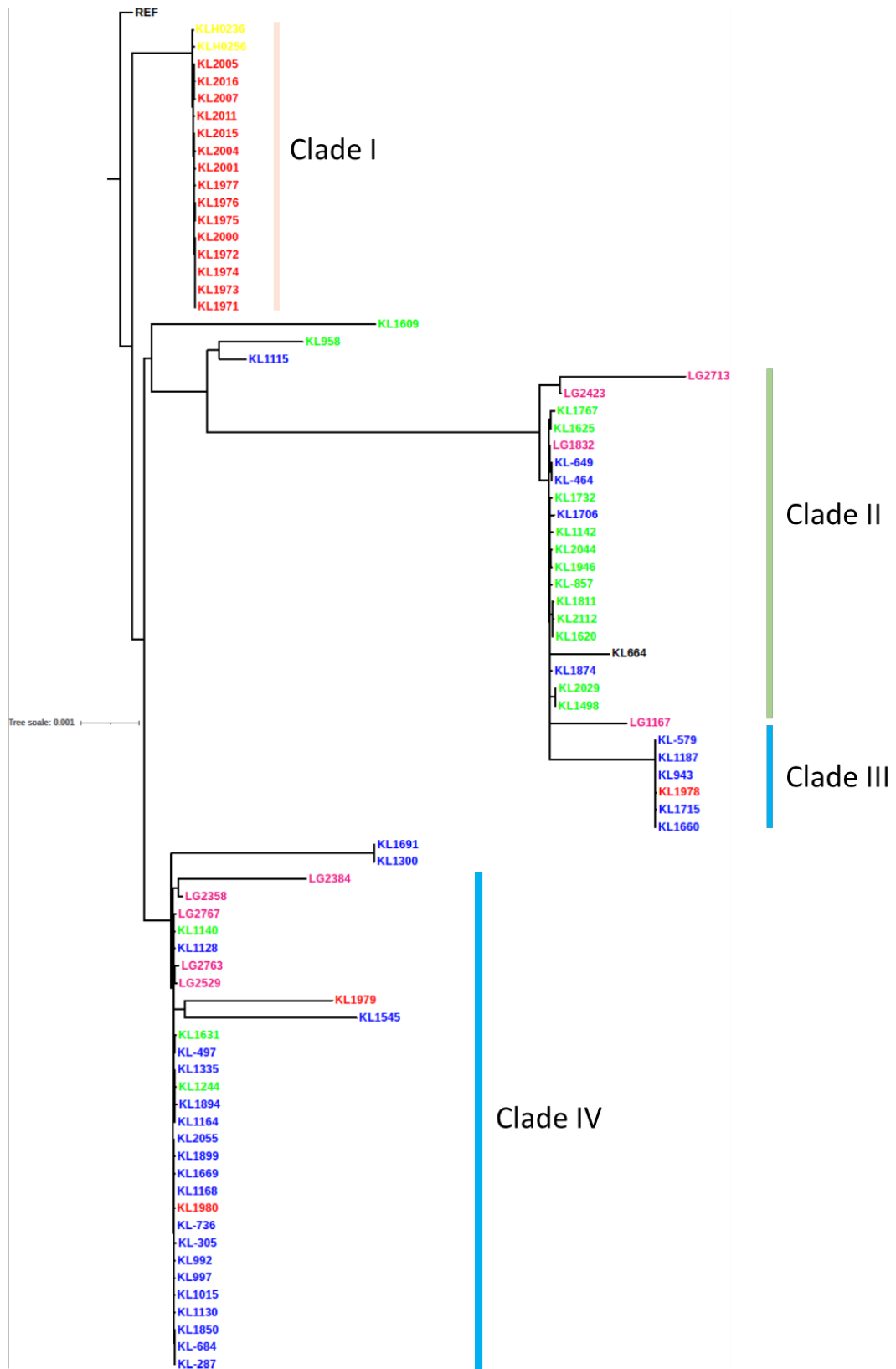


図1. *L. pneumophila* ST1 77株の全ゲノムは配列を用いたSNVs解析による系統樹。院内感染事例関連株は赤色、浴槽水由来は緑色 (RegionA) とピンク色 (RegionB)、冷却塔由来は青色、散発3事例株は黄色 (RegionC) と黒色 (RegionA) で色分けした。

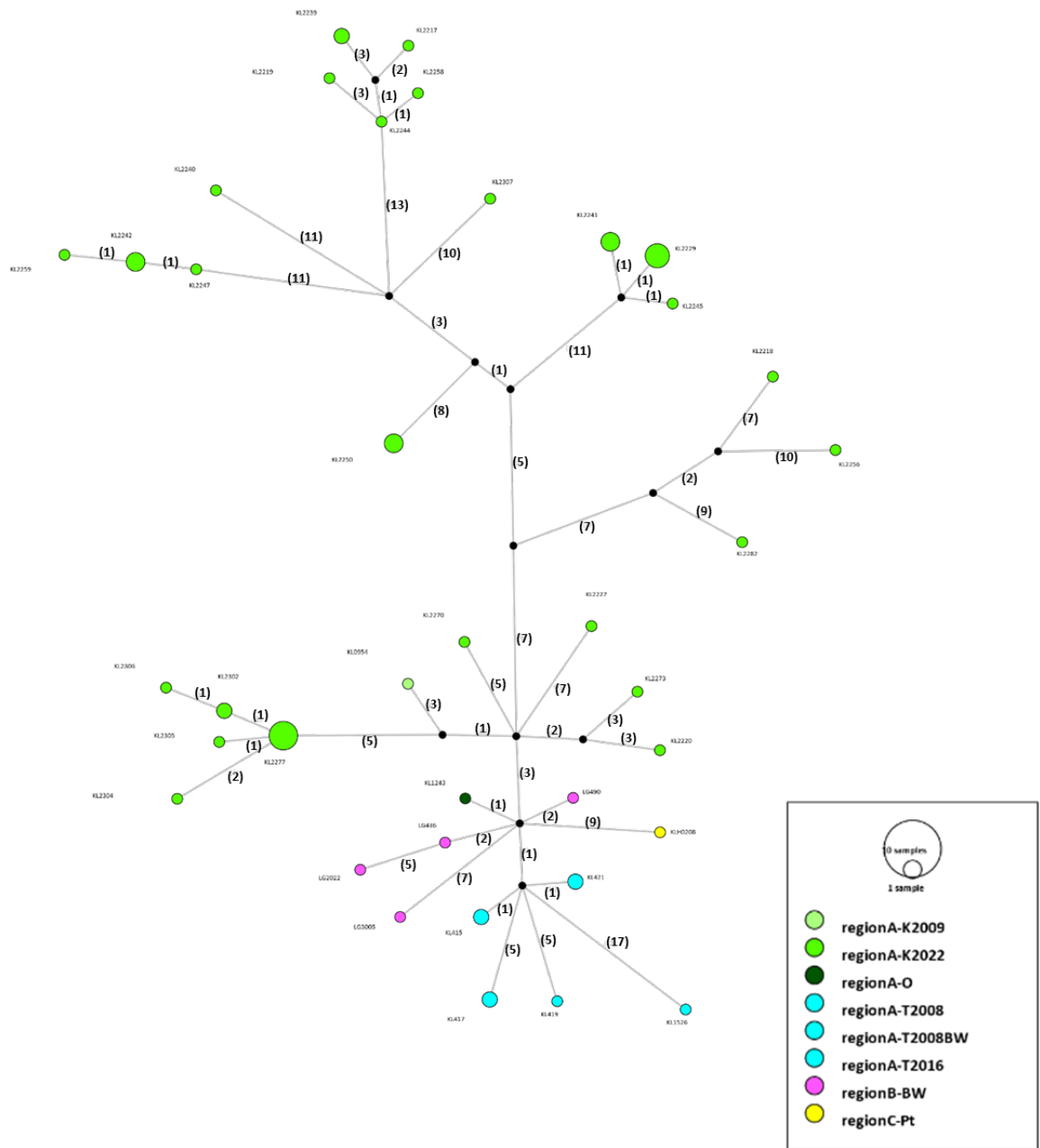


図2. *L. pneumophila* ST138 59株の全ゲノムは配列を用いたSNVs解析によるハプロタイプネットワーク。各Node間の数字はSNVsの数を表す。2つの公衆浴場集団事例関連株は緑色と水色、浴槽水由来は深緑色 (Region A) とピンク色 (Region B) , 散発1事例株は黄色 (Region C) で色分けした。