

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 6 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	藤永千波	神戸市健康科学研究所	感染症部
研究協力者	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター	

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。

今年度も引き続き、大規模な集団事例と散発例で検出された *L. pneumophila* SG2 遺伝子型 ST354 について、分子疫学手法（PFGE, MLVA, SBT）による型別と全ゲノム配列を用いた系統を比較した。その結果、集団事例における全ゲノム系統解析の系統的位置は PFGE, MLVA, SBT による型別を反映していることが明らかとなった。さらに、2 遺伝子違いの異なる遺伝子型（ST）間でも、SNVs 数が約 30 個程度と非常に近縁な遺伝系統であることが明らかとなった。ST354 では、Gubbins による組換え領域を除去するか、除去しないかで SNV 数が大幅に変化したことから、状況に応じて判断し、各遺伝系統の多様度を評価していく必要があると考えられた。以上のことから、引き続き、集団事例や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り。また、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、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高い分解能で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。

今年度も引き続き、国内で発生した散发例や過去の集団事例、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

①菌株：過去の集団事例に関しては、入浴施設で発生した一事例について検証した¹⁾。患者 22 名から分離した 51 株と浴槽水や浴槽ふき取りから分離した環境株 43 株中、ゲノム解析には 32 株を用いた(表)。内訳は、*L. pneumophila* SG1 ST2398 株が 13 株(患者由来 10 株と環境由来 3 株)、ST2399 が 8 株(患者由来 6 株、環境由来 2 株)、環境由来である ST2401 が 1 株、ST601 が 2 株と *L. pneumophila* SG8 が 2 株、SG11 が 6 株である。

さらに、*L. pneumophila* SG2 ST354 の菌株を 23 株解析した。内訳は、2022 年 7 月に発生した散发例の patient1 の 1 株(KL2335)と、2022 年 11 月に発生した散发例の同一患者(patient2)から分離された 14 株(KL2436-00-KL2436-13)、事例

とは全く関係のない入浴施設 A と B で、それぞれ経年的に分離された 5 株(KL1194, KL1286, KL1653, KL1880, KL2643)と 3 株(KL1182, KL1399, KL1884)である。

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²⁾。すなわち、BactSNP³⁾によりコールされた SNVs から、Snippy によるコア領域の推定、Gubbins⁴⁾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。

(倫理面への配慮)

本研究は、臨床分離株の使用にあたっては、各々研究機関において倫理委員会で承諾のもと実施された。

C. 研究結果

(1) 過去の集団事例におけるゲノム解析

本集団事例においては、PFGE、MLVA、SBT の型別は相関していることが確認されている¹⁾。遺伝子型の代表 32 株を選別し、ゲノム系統解析を行った。その結果、大きく 2 つの系統に分類され、同じ ST を示した株は同一のグループに属した(図 1A)。SNV に基づくハプロタイプネットワーク解析の結果、ST2401 を含む ST2399

系統と ST2398 系統は2つのクレードに分かれた (図 1B)。ST2398 と ST2399 の株間の SNV は 30 (P09-1 と P09-2)~42 (P04-4 と P37-1)個であった。ST2398 と ST2399 のクレードに患者株と浴槽水等の環境由来株がそれぞれ含まれ、株間の SNV は数個であった。

(2) *L. pneumophila* SG2 ST354 の比較ゲノム解析

散発の 2 事例と事例とは全く関係のない 2 か所の入浴施設から分離された *L. pneumophila* SG2 ST354 について、Gubbins による組換え領域の除去をする場合としない場合で比較した (図 2)。Gubbins 解析なし (組換え領域を残したまま) の場合、コアゲノムサイズは 2,782,307 bp、ゲノムカバー率が 79.4%であったのに対し、Gubbins 解析あり (組換え領域を排除) の場合、コアゲノムサイズが 2,289,726bp、ゲノムカバー率は 65.4%と減少した。組換え領域の除去によってコアゲノム領域が 492,581bp も削られ、そこに含まれる 25,000 個あまりの SNVs が除外された。一方で、どちらの場合でも、疫学的に関連がないと考えられる患者由来株や環境株間で SNVs が数個になる場合があった。入浴施設由来株は施設毎にクラスターを形成し、経年的に分離した株間において SNV は数個であった。また、今回解析したサンプル群では大まかに 2 つのクラスターに分類されたが、組換え領域の除去の有無によってクラスター間の SNVs は大幅に増減した。

D. 考察

今年度は過去の集団事例と散発的に発生した *L. pneumophila* SG2 ST354 について、全ゲノム解析を行った。

集団事例における全ゲノム系統解析の系統的位置は PFGE, MLVA, SBT による型別を反映していることが明らかとなった。患者由来株が含まれる ST2398 と ST2399 は 2 遺伝子違いであるが、ST2398 と ST2399 の株間の SNV は約 30 個であった。*L. pneumophila* SG1 ST138 の集団事例では、同一患者由来株間の SNV 数は 0~40 個と多様であったことが報告されている⁴⁾。従って、ST2398 と ST2399 は近縁な遺伝系統であることが示唆された。さらに、SNV に基づくハプロタイプネットワーク解析の結果、ST2401 を含む ST2399 系統と ST2398 系統は2つのクレードに分けられることが明らかになった。このことから、ST2398 クレードは、浴場施設の循環系で長期間培養される間に変異が蓄積し、ST2399 クレードから派生した可能性が示唆された。ST2398 および ST2399 クレードの患者株間の SNV 数はそれぞれ 2~13 個と 4~17 個であり多様であった。また、少なくとも 3 人の患者 (患者 04、09、14) には、ST2398 と ST2399 の両方に属する株が分離された。従って、患者は同時に ST2398 と ST2399 の複数の遺伝系統に暴露されたことを示唆した。

L. pneumophila SG2 ST354 にゲノム解析においては、疫学的に関連性がない散発例の患者株と施設 A 由来株において、

SNVs が 5 個以内となるケースも確認されたことから、感染事例が発生した際には疫学的背景を欠いた解釈は誤った結論につながり得るため、疫学情報との統合が不可欠である。また、組換え領域の除去の有無によって SNV 数が大幅に変化する枝があり、遺伝系統間で大規模な組換え領域の存在が示唆された。従って、組換え領域の除去は、解析の目的や対象となる遺伝系統の特徴に応じて判断する必要があると考えられる。今後は、各遺伝系統の多様度を評価していく必要があると考えられた。以上のことから、引き続き、集団事例や国内で頻度の高い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

過去の集団事例における全ゲノム系統解析の系統的位相は PFGE, MLVA, SBT による型別を反映していた。さらに、異なる ST 間でも、SNVs 数が約 30 個程度と非常に近縁な遺伝系統であることが明らかとなった。ST354 では、Gubbins による組換え領域を除去するか、除去しないかで SNV 数が大幅に変化したことから、引き続き、国内で検出された各遺伝系統の多様度を評価していく必要があると考えられた。

F. 参考文献

- 1) 中西典子ら, MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴. 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)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 29 年～30 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 55-65, 2019.

- 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) 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. 22;11:28.doi:10.3390/microorganisms11010028.

G. 研究発表

学会発表

- 1) 小松頌子、田中忍、小川恵子、森本洋、中西典子. レジオネラ症発生事例における *Legionella longbeachae* の細菌学的・遺伝的特徴. 日本防菌防黴学会 第 50 回年次大会. 2024 年 9 月.
- 2) 小松頌子、小川恵子、森本洋、中西典子. 本邦で稀なレジオネラ症起因菌 *Legionella longbeachae* の検査法と分離菌株の性状. 第 94 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 第 72

回日本化学療法学会西日本支部総会
合同学会. 2024 年 11 月.

論文発表

- 1) Shoko Komatsu, Chinami Fujinaga, Noriko Nakanishi. Detection of *Legionella* spp. in influent wastewater in Kobe City, Japan. J Water Health. 2024. 22 (11): 2054-2059 doi: 10.2166/wh.2024.167.

- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表. 過去の集団事例についてゲノム解析を実施した32株

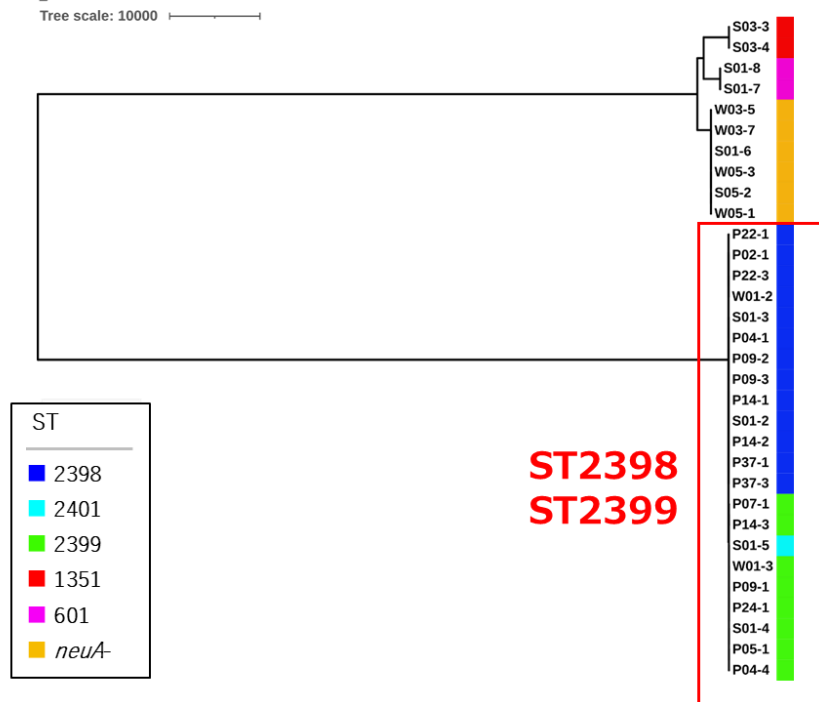
Serogroup	ST	Strain ID
1	ST2399	P07-1
		P14-3 *
		P04-4 *
		P05-1
		P09-1*
		P24-1
		S01-4
		W01-3
	ST2401	S01-5
	ST2398	P04-1*
		P09-2*
		P09-3
		P14-1*
		P14-2*
		P22-1
		P22-3
		P37-1
		P37-3
		S01-2
		S01-3
		W01-2
		P02-1
	ST601	S01-7
		S01-8
8	ST1351	S03-3
		S03-4
11	<i>neuA</i> -	W03-7
		W05-3
		S01-6
		W05-1
		S05-2
		W03-5

neuA -: *neuA* and *neuAh* not detected

P: patient, W: Bath water, S: swab

*: At least three patients (Patients 04, 09, and 14) had isolated strains assigned to both ST2398 and ST2399.

(A)



(B)

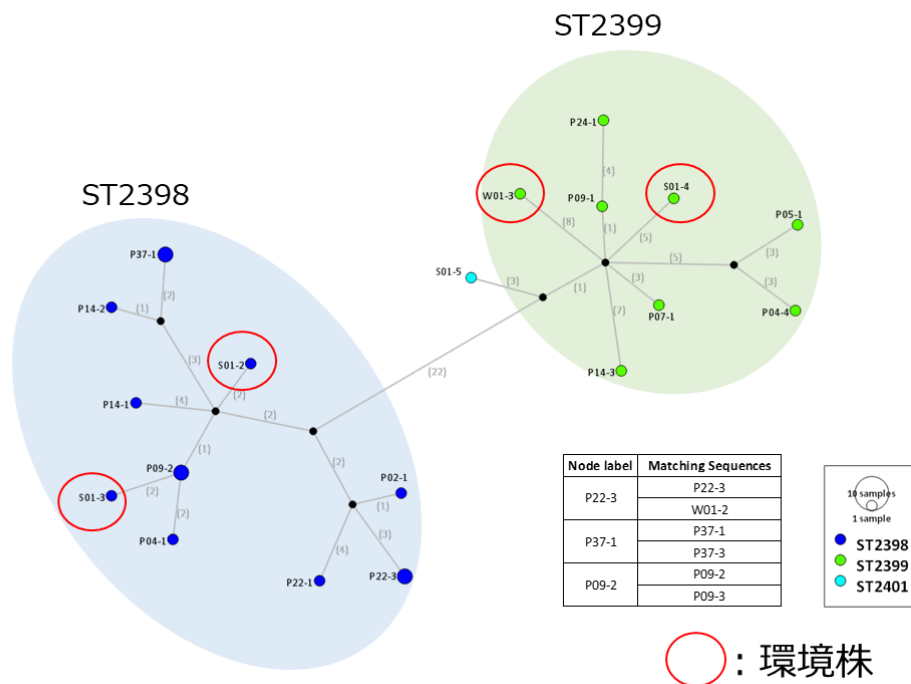


図 1. (A) 32 株の全ゲノム系統樹。 (B) ST2398, ST2399, ST2401 の菌株の全ゲノム配列を用いた SNVs 解析によるハプロタイプネットワーク。各 Node 間の数字は SNVs の数を表す。

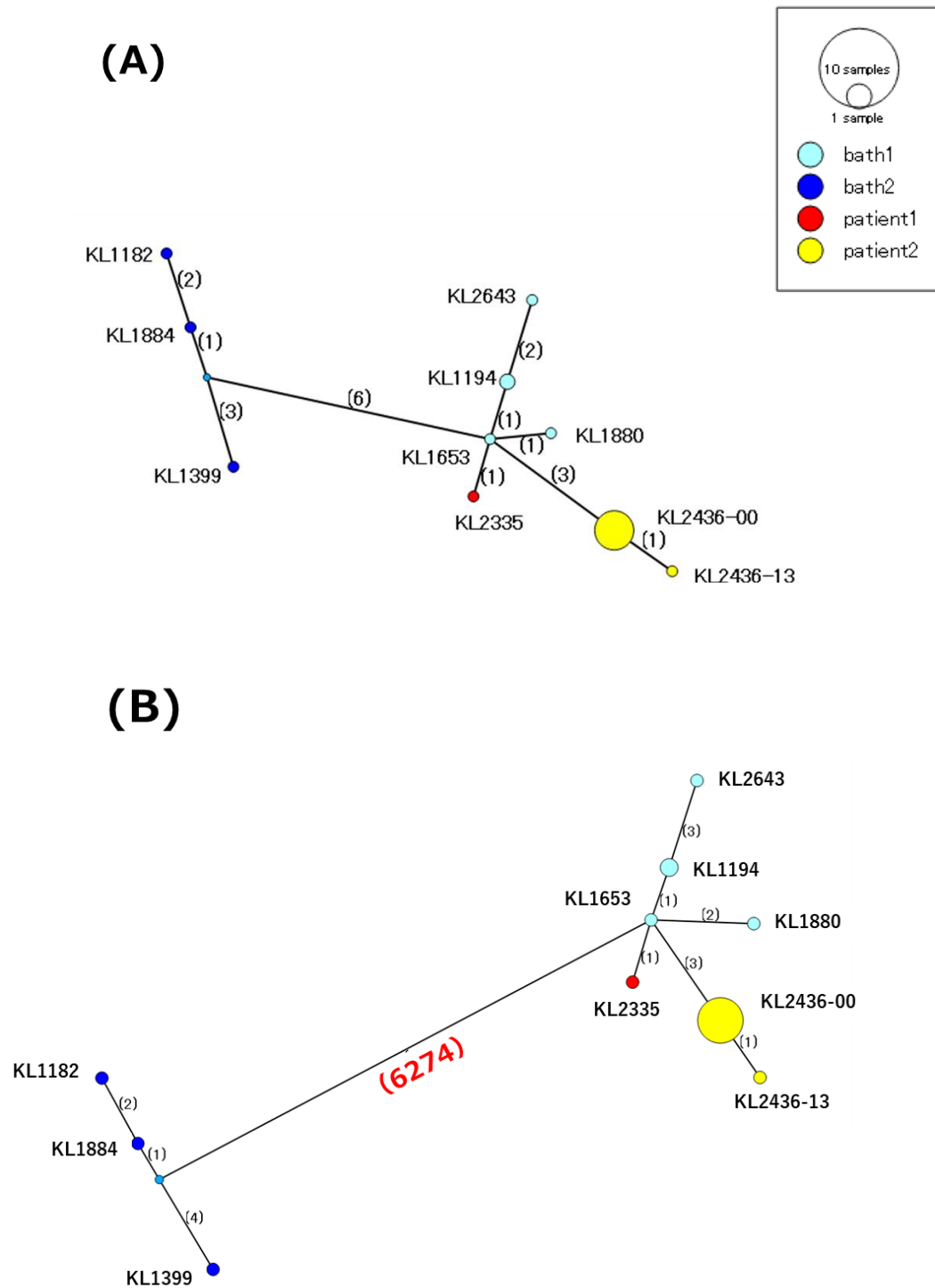


図 2. *L. pneumophila* SG2 ST354 の 23 株の全ゲノム配列を用いた SNVs 解析によるハプロタイプネットワーク。各 Node 間の数字は SNVs の数を表す。(A) Gubbins による組換え除去した場合。(B) Gubbins による組換え除去しない場合。