

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）
公衆浴場等におけるレジオネラ発生防止及び衛生管理推進のための研究
令和7年度分担研究報告書

レジオネラの分子疫学と冷却塔の汚染実態調査

研究分担者	中西典子	神戸市健康科学研究所	第2衛生研究部
研究協力者	野本竜平	神戸市健康科学研究所	第2衛生研究部
研究協力者	小松頌子	神戸市健康科学研究所	第2衛生研究部
研究協力者	岩本智花	神戸市健康科学研究所	第2衛生研究部

研究要旨：本研究では、過去の集団事例および散発事例を含む多様な菌株の型別を行った。特に近年は国内で冷却塔水を感染源とする集団事例が相次いで発生していることから、冷却塔由来株の特徴を明らかにするとともに、冷却塔への定着や経時的变化を検討した。

散発例の患者由来株において、SBT（sequence-based typing）型別に用いる *flaA* 遺伝子の増幅が認められず、遺伝子型が決定できない事例があった。このため、全ゲノム解析により、*flaA* primer 領域のミスマッチの部位を同定したところ、同様の変異を有する株が冷却塔由来株にも存在することが明らかとなった。これに対応するため、ミスマッチ部位を縮重化した新規 primer を用いた PCR 系を構築した。

2003 年から 2025 年にかけて冷却塔水から分離されたレジオネラ属菌 460 株の特徴を明らかにした結果、*L. pneumophila* が最も多く、血清群では SG1, SG13, SG7 が主要であった。*L. pneumophila* SG1 は、ST1 の C1 グループと ST154 の C2 グループが全体の 95 % を占めた。これらの冷却塔由来レジオネラ属菌の分布状況および遺伝的特徴を把握することは、患者発生時の感染源調査に有用であると考えられた。

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。その際に用いられる分子疫学解析手法の sequence-based typing (SBT) 法は一般的な Multilocus Sequence Typing (MLST) 法よりも解像度は高いものの、国外あるいは全国的に検出頻度の高い遺伝子型においては信頼性が低くなる場合がある。一方で、ゲノムシーケンスを利用した SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) 解析はより高解像度

であるものの、レファレンス配列の選択や解析に用いる検体の多様性、組換え領域の除去などの理由により、検出される SNPs 数にばらつきが出るなど解析の妥当性に課題があり、株間の比較プロトコルの整理が必要となっている。

さらには、レジオネラ症の感染源の状況は海外と日本では異なるため、日本の臨床分離株のゲノム情報の蓄積は重要であり、国内の主要な遺伝系統を中心にゲノム解析を進めていく必要がある。

そこで本研究では、これらの課題を解決

するために、過去の集団事例や散発事例を含む多様な菌株のゲノム情報を取得し、全ゲノム配列を用いたSNPs解析手法の標準化と基礎データの蓄積を目的とする。

さらに、近年、国内で冷却塔水を感染源とするレジオネラ集団感染事例が相次いで報告されている¹⁾³⁾。そこで、冷却塔由来株の遺伝的特徴を明らかにするとともに、全ゲノム解析により冷却塔への定着性や経時的变化を検討する。

今年度は散発例の患者由来株において、*flaA*遺伝子の増幅が認められず、遺伝子型が決定できない事例に対応するため、全ゲノム解析を行いSBT型別に用いるprimerの改良を行った。また、2003年から2025年にかけて冷却塔から分離されたレジオネラ属菌について、菌種・血清型別・遺伝子型別を進めた。

B. 材料と方法

①菌株

散発例の患者から分離された *L. pneumophila* SG1 ST818 (KL2644)を用いた。2003年から2025年に冷却塔水254検体から分離されたレジオネラ属菌460株を用いた。

②SBT型別

European Working Group for Legionella Infections (EWGLI)の方法に基づき、*L. pneumophila*の7つの遺伝子*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*の一部領域の塩基配列を解読し、遺伝子型(sequence type: ST)を決定した⁴⁾。

③ゲノム解析

QIAseqFX(QIAGEN)を用いてDNAライブラリを調製し、Miseq regent Kit v.3を用いてリードデータを取得した。Skeseでアセンブリし、PROKKAでアノテーションを行った。

④菌種同定

MALDI-TOF MS (Bruker)を用いた。また、レジオネラ属菌の特異的遺伝子である *mip* (macrophage infectivity potentiator)遺伝子によるシークエンスにより決定した⁴⁾。

(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) SBT型別に用いる*flaA*遺伝子 primer 領域のミスマッチ部位

患者由来株である *L. pneumophila* SG1 ST818 (KL2674) は、SBT型別に用いる7つの遺伝子の一つである*flaA*遺伝子が増幅されなかった(図1)。全ゲノム解析により*flaA*遺伝子周辺配列を比較したところ、従来のprimerにおいて、Forward側に2塩基、Reverse側に4塩基のミスマッチが存在していた(図2)。特に、従来のReverse primerをKL2674の配列に変更したprimerでのみ増幅が認められたことから、Reverse primerの4塩基のミスマッチが*flaA*の増幅に大きく影響していた。

(2)*flaA*遺伝子 primerの改良

ミスマッチ部位を縮重化した primer

を新たに作製した（表 1）。従来 primer で増幅した株と増幅しなかった株も問題なく増幅することを確認した。

(3) 冷却塔由来株を用いた検討

L. pneumophila SG1 ST818 は C2 グループ（cooling tower group）に属し⁵⁾、*flaA*:11 を示す株のグループであった。冷却塔由来株の中に、従来 *flaA* primer では *flaA* の増幅が認められなかった 4 株について、新規 *flaA* primer を用いて PCR を実施したところ、増幅が認められた（図 3）。4 株中 2 株は *flaA*:11 であり、1 株は *flaA*:11 と 1 塩基違いであった。

(4) 冷却塔水由来株のレジオネラ属菌種

レジオネラ属菌 460 株について、菌種及び血清群を同定した結果を表に示した（表 2 と表 3）。*L. pneumophila* が最も多く、血清群では SG1, SG13, SG7 が主要であった。

(5) 冷却塔水由来 *L. pneumophila* SG1 株の遺伝子型

ST1 が最も多く、次いで ST154 の順であった（表 4）。ST1 以外に C1 グループ（cooling tower group）に属する ST は ST1008, ST1019, ST1657 であり、SG1 全体の 80.1% を占めた。また、ST154 を含む C2 グループは、全体の 14.9% であった。

D. 考察

本研究により、SBT 型別に用いる *flaA* 遺伝子 primer 領域にミスマッチが存在し、遺伝子型が決定できない株が生じることが明らかとなった。これに対応するため、primer ミスマッチの部位を縮重化した新

規 primer を設計し、PCR 系を構築した。冷却塔水由来の C2 グループ⁵⁾や SG1 以外においても、*flaA*:11 を示す株では、同様のミスマッチにより *flaA* が増幅しない場合があることが判明した。今回作製した新規 *flaA* primer は、従来 primer で増幅可能であった株においても問題なく増幅されたことから、今後は本 primer を用いた運用へ変更し、病原体検出マニュアルの改訂が必要と考えられた。

本研究により、冷却塔由来のレジオネラ属や *L. pneumophila* の遺伝的特徴を明らかにした。*L. pneumophila* が最も多く検出され、血清群としては SG1, SG13, SG7 が主要であり、過去の報告⁶⁾と同様の傾向を示した。また、東京都の冷却塔水の調査結果とも一致しており⁷⁾、冷却塔由来株に大きな地域差はないと考えられた。一方、浴槽水では SG1, SG6, SG5 が主要な血清群であり⁸⁾、冷却塔水とは異なる分布を示したことから、由来環境ごとに *L. pneumophila* の生態が異なることが示唆された。

冷却塔由来 *L. pneumophila* SG1 の遺伝的特徴としては、ST1 の C1 グループおよび ST154 の C2 グループが主要であり、これまでの報告⁶⁾と一致していた。一方で、2020 年以降は C2 グループに属する遺伝系統は分離されていなかった。また、2023 年に発生した大阪府の集団事例³⁾では、*L. pneumophila* SG1 の新規遺伝子型 (*flaA*:2 or *flaA*:1, *pilE*:10, *asd*:18, *mip*:15, *mompS*:25, *proA*:5, *neuA*:6) が報告されている。さらに、東京都の集団事例²⁾では、*L. pneumophila*

SG1 ST1646 が検出されており、いずれも従来の主要グループに属さない遺伝子型であった。これらのことから、近年、冷却塔水由来の *L. pneumophila* SG1 の遺伝系統に変化が生じている可能性が示唆された。今後も継続的な調査が必要である。

また、1994 年に東京都渋谷区で発生した冷却塔水に起因する集団感染事例では *L. pneumophila* SG7 が原因菌と推定されている。今後も冷却塔から高頻度で検出される菌種については、感染原因として特に注意すべきであると考えられた。

さらに、国内における患者発生ピークと冷却塔の稼働時期が一致することから感染源不明症例の中には冷却塔が原因になっているものが含まれている可能性がある。冷却塔水中のレジオネラ属菌の分布状況とレジオネラ症の発生状況の発生動向について、より詳細な調査が求められる。

E. 結論

SBT 型別に用いる *flaA* 遺伝子の primer に存在するミスマッチにより増幅されない株への対応として、ミスマッチ部位を縮重化した新規 primer を用いた PCR 系を構築した。

冷却塔由来の *L. pneumophila* では、SG1, SG13, SG7 が主要な血清群であり、SG1 においては、ST1 グループと ST154 グループが全体の 95 % を占めた。これらの分布状況や遺伝的特徴を把握しておくことは、患者発生時の感染源調査に有用であると

考えられた。

F. 参考文献

- 1) IASR Vol. 45 p112-114: 2024 年 7 月号)宮城
- 2) IASR Vol. 46 p66-67: 2025 年 3 月号東京
- 3) 西田伸子ら.大阪府内で発生したレジオネラ症アウトブレイクの原因と対策に関する考察. 日本防菌防黴学会誌, Vol.53, No.8, pp.233-242 (2025)
- 4) 国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所, 病原体検出マニュアルレジオネラ症, 2025 年 3 月改訂
- 5) 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
- 6) Nakanishi N, Nomoto R, Tanaka S, Arikawa K, Iwamoto T. Analysis of Genetic Characterization and Clonality of *Legionella pneumophila* Isolated from Cooling Towers in Japan. *Int J Environ Res Public Health.* 2019, 16:1664. doi: 10.3390/ijerph16091664.
- 7) 武藤千恵子ら. 東京都内の冷却塔水におけるレジオネラ属菌の生息実態調査 (平成 17 年~23 年度) 東京健康研セ年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr.*

- Inst. Pub. Health, 63, 275-280, 2012.
- 8) Komatsu S, Tanaka S, Nakanishi N. Evaluation of Legionella pneumophila SGUT Serotypes Isolated from Bath Water Using a Multiplex-PCR Serotyping Assay. Jpn J Infect Dis. 2023. 76:77-79. doi: 10.7883/yoken.JJID.2022.397.
- G. 研究発表 (論文発表)
- 1) Hiratsuka T, Nakanishi N, Akita H, Masuda K, Komatsu S, Nomoto R,

Amemura-Maekawa J. A large outbreak investigation of Legionnaires' disease associated with a public bath facility in Hiroshima, Japan, using PFGE, SBT, MLVA, and whole-genome sequencing. Int J Med Microbiol. 2025 Dec;321:151680.

- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1. *L. pneumophila* SG1 ST818 (KL2644) の SBTの7遺伝子PCR増幅

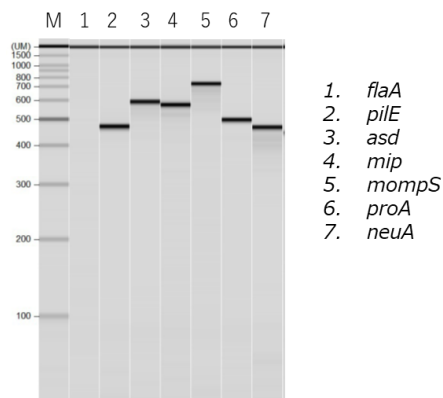


図2. KL2644の*flaA*遺伝子primer変異箇所

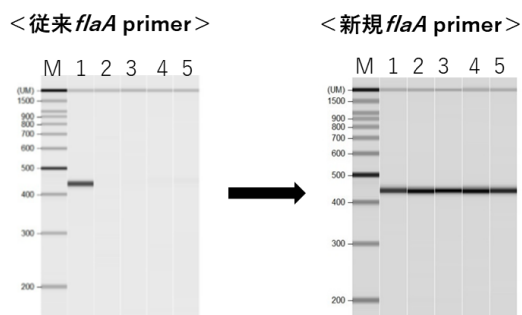
flaA-587F
KL2644
GCGTATTGCTCAAAATACTG
ACGTATTGCCAAAATACTG

flaA-960R
KL2644
CCATTAATCGTTAAGTTGTAGG
CCGTTAATGGTTAAGTTATAAG
**.*

表1. 新規*flaA*遺伝子プライマー配列

プライマー名	プライマー塩基配列 (5'→3')
<i>flaA</i> -FMT2(M13F)	TGTAACGACGGCCAGT <u>RCGTATTGCY</u> CAAAATACTG
<i>flaA</i> -RMT2(M13R)	CAGGAAACAGCTATGACCC <u>RTTAATSGTTAAGTT</u> RTARG

図3. 冷却塔由来4株における新規*flaA* primerを用いたPCR増幅



レーン	菌株ID	SG	<i>flaA</i> allele番号
1	Philadelphia-1	1	3
2	KL1849	g4/10	11
3	KL2069	1	11と1塩基違い
4	KL2906	5	41
5	KL2919	g4/10	11

表2. 冷却塔水から分離された
レジオネラ属菌種 (2003-2025)

菌種	株数 (%)
<i>L. pneumophila</i>	339 (73.7)
<i>L. erythra</i>	29 (6.3)
<i>L. rubrilucens</i>	24 (5.3)
<i>L. anisa</i>	17 (3.7)
<i>L. quinlivanii</i>	9 (2.0)
<i>L. busanensis</i>	7 (1.5)
<i>L. feeleii</i>	6 (1.3)
<i>L. londiniensis</i>	5 (1.1)
<i>L. gresilensis</i>	4 (0.9)
<i>L. taurinensis</i>	3 (0.7)
<i>L. gormanii</i>	2 (0.4)
<i>L. cincinnatiensis</i>	1 (0.2)
<i>L. geestiana</i>	1 (0.2)
<i>L. hackeliae</i>	1 (0.2)
<i>L. israelensis</i>	1 (0.2)
<i>L. jamestowni</i>	1 (0.2)
<i>L. lansingensis</i>	1 (0.2)
<i>Legionella</i> spp.	9 (2.0)
計	460 (100)

表3. 冷却塔水から分離された
L. pneumophila の血清群

血清群	株数 (%)
SG1	216 (63.7)
SG13	46 (13.6)
SG7	31 (9.1)
SG5	14 (4.1)
SGg4/10	11 (3.2)
SG6	5 (1.5)
SG3	4 (1.2)
SG14	4 (1.2)
SG4	2 (0.6)
SG10	2 (0.6)
SG8	2 (0.6)
SG2	1 (0.3)
SG9	1 (0.3)
計	339 (100)

表4. 冷却塔水由来*L. pneumophila* SG1 201株
の遺伝子型 (ST) (2003-2025)

ST	株数	Amemura-Maekawa <i>et al.</i> 's group
1	154	
1008	4	C1
1019	2	
1657	1	
154	24	
598	2	C2
607	2	
986	1	
1065	1	
novel ST ^{#1}	1	
40	2	
2	1	
45	1	
48	1	
59	1	
461	1	
novel ST ^{#2}	2	

#1:*flaA*:3, *pilE*:14, *asd*:16, *mip*:10, *mompS*:15, *proA*:13, *neuA*:11

#2:*flaA*:16, *pilE*:21, *asd*:33, *mip*:1, *mompS*:31, *proA*:1, *neuA*:1