

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
研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所

分担研究報告書

レジオネラ症の感染源調査における次世代シーケンサーの活用

研究分担者

○金谷 潤一 富山県衛生研究所 中西 典子 神戸市健康科学研究所

研究協力者

小松 頌子 神戸市健康科学研究所

研究要旨

患者由来株の大半を占めるレジオネラ・ニューモフィラ血清群 1 について、富山県内で疫学的に関連があると推定された事例株の全ゲノム SNP 解析を実施した。同一感染源の判断基準となる SNP 数と、感染源調査に最適な全ゲノム解析の手法の確立を目的とした。

過去の 12 の患者株を対象に、患者株と、公衆浴場に由来の環境株との間に検出される SNP 数を調査した。患者株と公衆浴場株で全く差異がなかった（株間に SNP が検出されなかった）事例は、（組み換え領域を除去しない解析結果も含めて）4 事例あった。組み換え領域を除去した解析方法では、患者株と公衆浴場株の間に検出された SNP 数は、最小 0、最大 31 SNPs であった。組み換え領域を除去しない解析でも概ね同様の結果であったが、3 事例は患者株と一部の公衆浴場株との間に 600 から最大 1,088 SNPs が検出された。組み換え領域を除去しない解析は、患者株と公衆浴場株の間に多数の SNP が検出され、本来は同一由来と判断されるべき株が、異なる感染源と判断されるような、判断に影響を与える可能性があることが判明した。換言すると、同時に解析する菌株数や解析方法によって結果が異なる可能性、すなわち感染源の特定、同一の株と判断することの難しさを明らかにした。信頼性の高い調査や判断には、より多くの菌株や事例を検討して、将来に備えることが必要と考えられた。

なお、1 人の患者が、同一潜伏期間内に、2 施設から 2 つの公衆浴場株に感染したと説明できる事例を確認した。国内では公衆浴場を利用する文化が盛んなため、稀とはいえ、このような事例は他にも発生するかもしれない。1 施設だけが原因とされ、もう 1 施設が見逃されるのは正しくない。この例からも、丁寧な疫学調査、細菌学的調査が重要と言えた。

A 研究目的

2025 年の国内におけるレジオネラ症患者報告数は、2,413 件（暫定値）であり、前年比 99.8%であった^{1,2)}。感染源のおよそ 4 割を占めて最も関与が大きいとされる、公衆浴場のレジオネラ症対策は重要である³⁾。レジオネラ属菌は、土壌、浴槽水など環境中に広く生息して、その遺伝子型（Sequence-Based Typing (SBT) による Sequence Type (ST)）は多様であるが、レジオネラ症患者から検出される遺伝子型には偏りがあり、感染源特定の判断に迷う場合がある⁴⁾。実際、富山県でレジオネラ症患者から高頻度で検出される ST の菌株は、複数の公衆浴場からも検出され、遺伝子型だけでは感染源を判断できない場合がある。患者が複数の公衆浴場を利用していることも、感染源の特定を難しくしている要因の一つであると考えられる。

遺伝子型による分子疫学に限界があったことから、全ゲノム解析による、より詳細な分子疫学に期待が寄せられている。これまでの全ゲノム解析による検討はより解像度が高く、患者および患者が利用した公衆浴場から分離された菌株が概ね近縁な系統であり、期待通りの結果が得られている⁵⁾。しかしそれでもなお判断しきれぬ株もあり、患者株、環境株のいずれも背景となる情報の蓄積があるほうが、より正確な判断につながると考えられる。

そこで本研究では、患者株の大半を占めるレジオネラ・ニューモフィラ血清群 1 (Lp1) のうち、富山県内で疫学的に関連があると推定された事例の株について、全ゲノム SNP 解析を実施した。同一感染源と判断する基準となる SNP 数や、感染源調査に適した全ゲノム解析の手法の確立を目的とした。得られた結果は、将来の感染源調査の参考になる。汚染源が的確に把握されることで、問題となった公衆浴場の衛生管理の向上が期待される。

B 材料と方法

1 使用菌株

本研究で全ゲノム解析に用いた菌株は、2005 年以降に富山県で発生したレジオネラ症の、12 の感染事例（疑

い含む）から分離された Lp1 である。患者由来の 61 株と、患者が潜伏期間内に利用した公衆浴場から分離した 58 株を解析の対象とした。

事例 2 は、患者が潜伏期間内に 2 か所の公衆浴場を利用し、患者株と 2 施設から分離された株が同じ ST であった。感染源について精査するため、上述した全ゲノム解析に加え、分離され保存されていた 108 株（患者から 20 株、施設 A から 71 株、施設 B から 17 株）のレジオネラ属菌を対象とし、下記に示す方法で血清型別、SBT および MLVA を実施した。

2 血清型別、SBT および Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat (MLVA)

血清型別は、BCYE α 寒天培地（島津ダイアグノステイクス）に発育した菌を用いて加熱抗原を作製後、レジオネラ免疫血清（デンカ）および *Legionella* Latex Test Kit (オキソイド) を用いて実施した⁶⁾。SBT は、菌株から抽出した DNA を用いて 7 遺伝子の部分塩基配列を解読し、ST を決定した⁶⁾。MLVA は、菌株から抽出した DNA を用いて、既報に従い各 locus のリピート数を算出した⁷⁾。得られた結果から、PHYLOViZ ソフトウェア (<https://www.phyloviz.net/index.html>) を用いて Minimum Spanning Tree を作成した。

3 全ゲノム解析

菌株の DNA は、QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン）を用いて抽出した。DNA ライブラリーは、Nextera XT DNA Library Preparation Kit（イルミナ）または QIAseq FX DNA Library UDI Kit（キアゲン）を用いて作製した。その後、MiSeq Reagent Kit v3 (2 × 300 bp PE) または NovaSeq X Plus system (2 × 150 bp PE) を用いて配列を解読した。取得したペアエンドのリードデータより、SNPcaster (<https://github.com/leeche-r/SNPcaster>) を用いて、SNP を検出した。その SNP 検出の際、リピート領域は除外した。組み換え領域の除外には、Gubbins を用いた。ネットワーク図の作成には、PopART を用いた。NCBI データベースから取得した Paris 株 (accession no. NC_006368) の全長配列をレファレンス配列とした。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者由来株の使用については、研究機関における倫理審査委員会で承諾のもと実施された。

C 結果

1 県内で発生した 12 のレジオネラ症感染事例（疑い含む）における全ゲノム解析

過去に富山県で発生した 12 事例について、全ゲノム解析により、患者株と環境株の間に検出される SNP 数を調査した（表 1）。今回解析した 12 事例は、すべて公衆浴場を感染源とする事例であった。患者が 2～10 日間の潜伏期間に公衆浴場を利用しており、患者由来株と利用した公衆浴場由来株から分離した菌株の ST が一致したことを確認している。組み換え領域を除去しない解析（Gubbins 未実施）では、レファレンスゲノムに対するコアゲノムサイズは 2,778,352-2,950,675 bp (79-84%)、組み換え領域を除去した解析（Gubbins 実施後）では 2,691,055-2,886,734 bp (77-82%)であった。解析する菌株数が 3 株未満の場合、Gubbins は実施できないため、NA（Not Available、利用不可）とした。

4 事例（事例 2 の ST644、4、7、8）については、組み換え領域を除去しない解析結果も含めて患者株と公衆浴場株で配列に全く差異のない（SNP が検出されない）株が検出された。組み換え領域を除去した全ゲノム解析では、患者株と公衆浴場株間に検出された SNP 数は、最小 0、最大 31 SNPs であった。組み換え領域を除去しない解析でも概ね同様の結果であったが、3 事例（事例 2 の ST505、4、11）については、患者由来株と一部の公衆浴場由来株との間に 600 から最大 1,088 SNPs が検出された（図 1～3）。

事例 2 の血清型別および SBT 型別の結果を表 2 に示した。分離された菌株の血清型別の結果では、患者からは Lp1、施設 A からは Lp1、Lp4、Lp9、Lp13、*L. dumoffii* および *Legionella* spp.、施設 B からは Lp1、Lp9、LpUT および *L. dumoffii* が検出された。Lp1 の遺伝子型は、患者株から ST505 および ST644 が検出された一方、公衆浴場株では施設 A から ST644 および ST1094、施設 B

から ST505、ST530 および ST-new が検出された。施設 A から分離された 2 株の Lp1 については、保存株がないため SBT 型別は実施できなかった。ST505 の 12 株および ST644 の 33 株における全ゲノム解析の結果では（ST644 の 7 株は解析可能なデータ量が取得できなかった）、患者株と公衆浴場株との間に検出された SNP 数は、組み換え領域を除去した解析で、最大 13 であった（図 1A、図 4）。Lp1 に加えて、Lp4、Lp9 および Lp13 の MLVA 法による遺伝子型別を実施し、Minimum spanning tree を作成した（図 5）。血清型と ST 型が同じ株は近縁な関係にあった。今回の結果から、事例 2 は、同一潜伏期間内に 2 つの施設でレジオネラ属菌に感染したと推察された。

D 考察

本研究では、12 のレジオネラ症感染事例において、患者および患者が利用した公衆浴場から分離された菌株間の SNP 数を明らかにした。この結果は、分子疫学的な調査を目的とした、全ゲノム解析の方法と SNP 数の目安に関する知見を提供するものである。

他方、海外における冷却塔を原因とする感染事例では、患者株と環境株間は 5 SNPs 以内との報告であった⁸⁾。しかしながら、日本国内の公衆浴場を感染源とする事例の菌株では、今回の検討で示した通り、5/12 事例（事例 1、5、6、10、11）で患者株と公衆浴場株の間で 5 SNPs 以上であった。この結果は、過去の報告で指摘された通り、浴槽水におけるレジオネラ属菌の遺伝的な多様性が反映されていると考えられた⁴⁾。

多様性が生じる理由を想像してみると、冷却塔の環境が割と均一であろうことに対して、公衆浴場では、温泉、井水、水道水といった水質の異なる湯水が使用されていたり、水質の異なる湯水が異なる温度で管理されていたり、水質は単一であったとしても浴槽ごとに異なる温度で管理されていたり、と一つの施設内、で異なる環境が存在する可能性が高い。また、入浴剤の有無、気泡発生装置の有無、ろ材の種類といったように複数の環境があり得ること、浴槽水では使えないような強い消毒剤を冷却塔で使えること、ろ過器の砂

などにレジオネラ属菌の宿主となるアメーバが豊富に存在し⁹⁾、レジオネラ属菌が盛んに増殖するなど、複数の異なる背景がある。そのため、公衆浴場ではレジオネラ属菌の遺伝的多様性が進行しやすく、患者が吸い込んだレジオネラ属菌と近縁のレジオネラ属菌が公衆浴場から分離される可能性が低くなると考えられる。

過去の検討によると、公衆浴場株の同一検体内から複数の SNV が検出されており、7 株以上を対象に解析を行わないと変異の種類を網羅できないだろうことが経験的に明らかにされている⁹⁾。通常の疫学調査では、感染源と疑われる複数の公衆浴場試料から並行して検査する都合上、公衆浴場株を 1 株しか解析しない場合が多そうである。ということは、どの株を釣菌して解析するかは偶然であり、患者株と環境株間で検出される SNP 数が大きくなっても不思議ではない。余力があれば、公衆浴場株の複数解析することで、患者株と近縁な公衆浴場株を検出できるかもしれないが、それは限られた経費と労力からは贅沢な希望かもしれない。

レジオネラ属菌以外の細菌でも全ゲノム解析による疫学調査が一般的になりつつあるが、疫学的関連性があるとされる SNP の閾値は、*Pseudomonas aeruginosa* で最も多く、37 であった¹⁰⁾。この様に同一性の判断のために行われる SNP 検出は、細菌の種類、解析対象とする株数、解析手法、ST 型別など事前の選別の有無、などによって相当に異なってくる可能性があることを認識しておく必要があるのだろう。

まとめると、今回の結果で患者株と公衆浴場株間に検出された SNP 数は、組み換え領域を除去した場合においても最大 31 SNPs であり、海外で報告されている冷却塔の 5 SNPs より大きかったが、*Pseudomonas aeruginosa* の 37 SNPs より小さかった。同一由来と判断するための根拠を求めて、経験的に基準値を設定するため、より多くの菌株を検討しておくことが課題と考えられる。

組み換え領域の除去 (Gubbins 処理) の必要性について改めて考えてみる。Gubbins の処理を行わずに SNP 解析を実施した場合、患者由来株と公衆浴場由来株間に、疫学的な関連とは相関しない多くの SNP 数が検出

され、同一由来株と考える判断に影響を与える可能性があることが判明した。これは、過去の報告にもあるように¹¹⁾、レジオネラ・ニューモフィラが浴槽水中で相同組み換えによる遺伝子交換を起こしていることを示唆している。従って、Gubbins の処理は、解像度が足りない場合にはなし、解像度が十分な場合にはありとするのが適していると考えられた。

1 人のレジオネラ症患者が、同一潜伏期間内に、2 つの施設でレジオネラ属菌に感染したと推察される事例については、全ゲノム解析からも、この所見を支持する結果が確認された。我々の知る限り、このような事例はこれまでに報告がなかった。同一患者から複数の血清型、遺伝子型、SNV が検出された報告はあるが¹²⁻¹⁴⁾、いずれの報告においても 1 か所の感染源から複数に感染した事例であり、複数の感染源から感染した報告ではなかった。つまりこれからは、同一患者が複数の感染源から複数の株に感染する可能性があることを認識する必要がある。国内では温泉はしご (ハシゴ湯) などと言われる通り、公衆浴場を利用する文化が盛んなため、このような事例が再び発生する可能性はあるのだろう。レジオネラ症患者の感染源の解明には、丁寧な疫学調査、細菌学的調査が必要であることを改めて認識した。

本研究では、公衆浴場におけるレジオネラ属菌の遺伝的多様性と、疫学調査の重要性を改めて確認した。同時に解析する菌株数や解析方法によって結果が異なる可能性、すなわち感染源の特定、同一の株と判断することの難しさを明らかにした。レジオネラ症の感染源調査に全ゲノム解析は有用な方法ではあるが、信頼性の高い調査や判断には、より多くの菌株や事例を検討して、将来に備えることが必要と考えられた。

E 結 論

本研究では、分子疫学調査における全ゲノム解析の方法を整備し、12 のレジオネラ症感染事例について患者株および公衆浴場株の間に検出される SNP 数を明らかにした。その結果、患者株と公衆浴場株間に検出された SNP 数は、組み換え領域を除去した場合において

最大 31 SNPs であった。一方、組み換え領域を除去しない解析では、3 事例で患者由来株と一部の公衆浴場由来株との間に 600-1,088 SNPs と疫学的な関連とは関連しない多くの SNP 数が検出され、同一由来株と考える判断に影響を与える可能性があることが判明した。同時に解析する菌株数や解析方法によって結果が異なる可能性、すなわち感染源の特定、同一の株と判断することの難しさを明らかにした。レジオネラ症の感染源調査に全ゲノム解析は有用な方法ではあるが、信頼性の高い調査や判断には、より多くの菌株や事例を検討して、将来に備えることが必要と考えられた。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ 2025 年第 52 週.
<https://id-info.jihs.go.jp/surveillance/idwr/provisional/2025/52/index.html>
- 2) 国立感染症研究所感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ 2024 年第 52 週.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/13081-idwr-sokuho-data-j-2452.html>
- 3) Amemura-Maekawa J, et al. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018, 84(18), pii: e00721-18.
- 4) Amemura-Maekawa J, et al. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Jun;78(12):4263-70.
- 5) 金谷潤一 他. レジオネラ症の感染源調査のための迅速・簡便な検査法の開発. 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 4~6 年度総合研究報告書, 175-190, 2025.
- 6) 国立感染症研究所. レジオネラ症. 病原体検出マニュアル. <https://id-info.jihs.go.jp/manuals/pathogen-detection/Legionella20250326.pdf>.
- 7) 中西典子 他. 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)「公衆浴場等の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28 年度~平成 30 年度総合研究報告書, 55-65, 2019.
- 8) Raphael BH, et al. Genomic resolution of outbreak-associated *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol.* 2016 May 31;82(12):3582-3590.
- 9) Kuroki T, et al. [Occurrence of free-living amoebae and *Legionella* in whirlpool bathes]. *Kansenshogaku Zasshi.* 1998 Oct;72(10):1056-63. Japanese.
- 10) Schürch AC, et al. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Apr;24(4):350-354.
- 11) McAdam PR, et al. Gene flow in environmental *Legionella pneumophila* leads to genetic and pathogenic heterogeneity within a Legionnaires' disease outbreak. *Genome Biol.* 2014;15(11):504.
- 12) Lück PC, et al. Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. *J Clin Microbiol.* 1998 Apr;36(4):1160-3.
- 13) Wewalka G, et al. Dual infections with different *Legionella* strains. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Jan;20(1):O13-9.
- 14) Hiratsuka T, et al. 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.

F 研究発表 (学会発表)

- 1) 金谷潤一 他. レジオネラ症患者の感染源調査のための全ゲノム SNP 解析. 第 99 回日本細菌学会

総会. 2026 年 3 月. 広島市.

G 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） なし

表 1. 富山県内で発生したレジオネラ症事例（疑い含む）における全ゲノム SNP 解析*

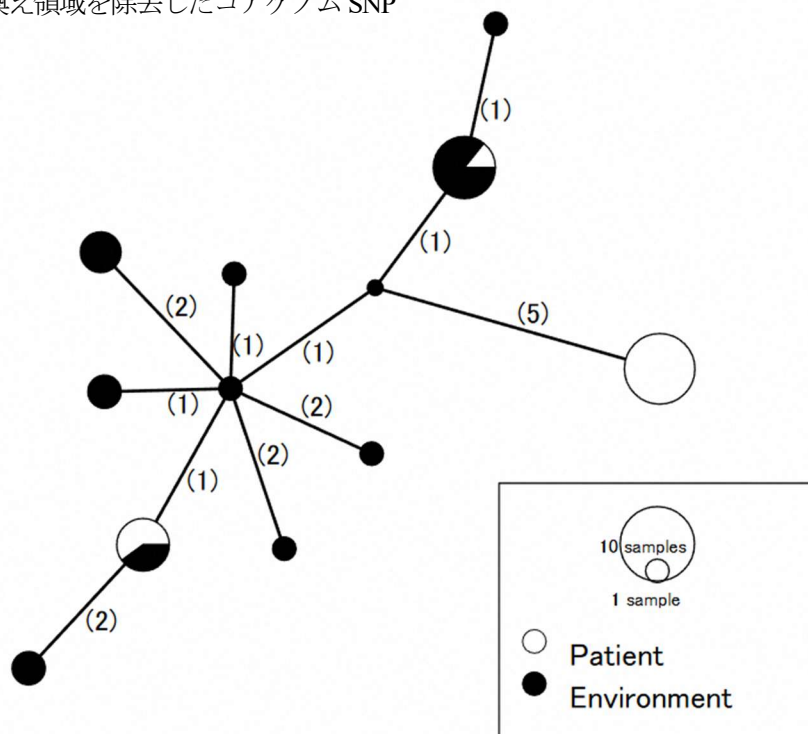
Case no.	Year	Month	Environmental source	No. of PA	No. of isolates		Sequence type	SNPs between PA and EN isolates					
					PA	EN		Recombination filtered (Gubbins)			No recombination filtering		
								Core genome size (bp (%))	Range	Median	Core genome size (bp (%))	Range	Median
1	2005	Aug	Bath water	1	7	1	ST505	2,837,451 (81)	16 between all	16	2,866,185 (82)	16 between all	16
2**	2008	Sep	Bath water	2	6	6	ST505	2,875,735 (82)	2–13	8	2,907,054 (83)	2–13	8
					13	20	ST644	2,691,055 (77)	0–9	6	2,778,352 (79)	0–691	6
3	2014	Jun	Bath water	1	1	1	ST505	NA	NA	NA	2,950,675 (84)	13	13
4	2015	Sep	Bath water	1	1	5	ST502	2,815,139 (80)	0–15	12	2,880,215 (82)	0–1,088	12
5	2016	Aug	Bath water	1	2	2	ST502	2,852,384 (81)	9–11	10	2,878,382 (82)	9–11	10
6	2021	Mar	Bath water	1	4	1	ST502	2,874,845 (82)	31 between all	31	2,902,362 (83)	31 between all	31
7	2022	May	Shower water	1	1	1	ST120	NA	NA	NA	2,950,289 (84)	0	0
8***	2015	Feb	Shower water	5	9	6	ST353	2,832,909 (81)	0 between all	0	2,914,911 (83)	0 between all	0
9	2019	Apr	Bath water	1	1	1	ST493	NA	NA	NA	2,882,898 (82)	24	24
10	2020	Mar	Bath water	1	10	1	ST2930	2,886,734 (82)	7 between all	7	2,886,875 (82)	7 between all	7
11	2024	Mar	Bath water	1	5	12	ST502	2,831,960 (81)	28–29	28	2,892,954 (83)	1,078–1,080	1,078
12	2024	Oct	Bath water	1	1	1	ST122	NA	NA	NA	2,880,136 (82)	10	10

*PA; patient, EN; environment, NA; not applicable.

**Six isolates were obtained from a single patient in which two sequence types were detected.

***Nine isolates were obtained from four patients.

A) 組換え領域を除去したコアゲノム SNP



B) 組換え領域を含むコアゲノム SNP

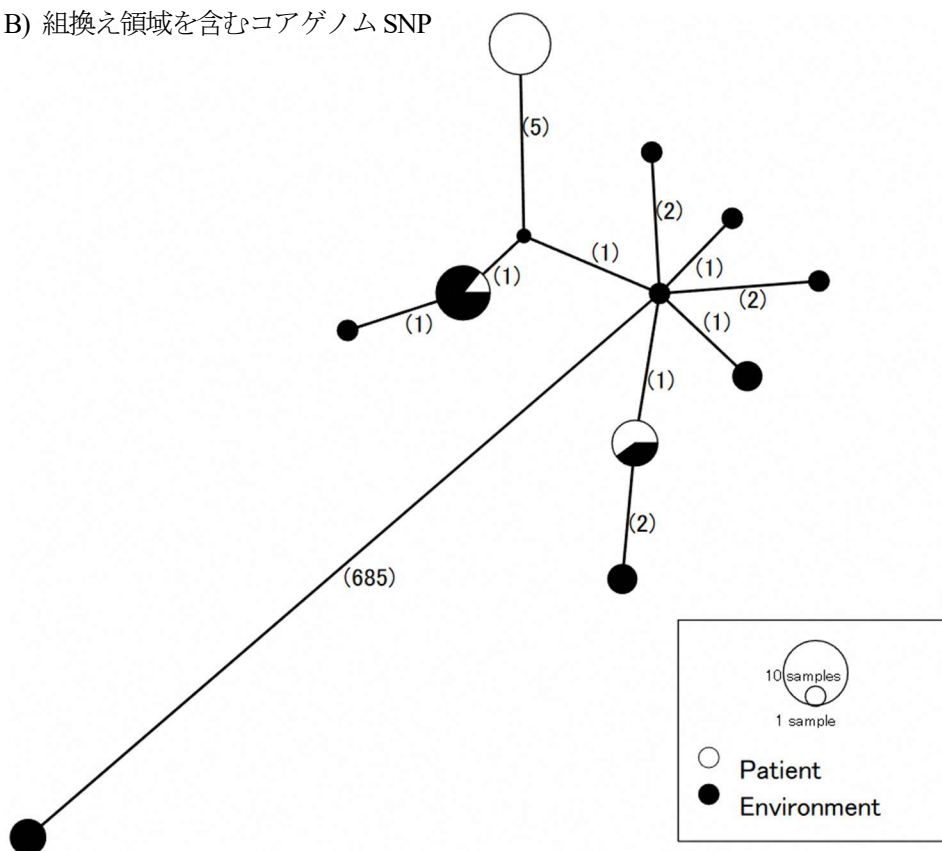
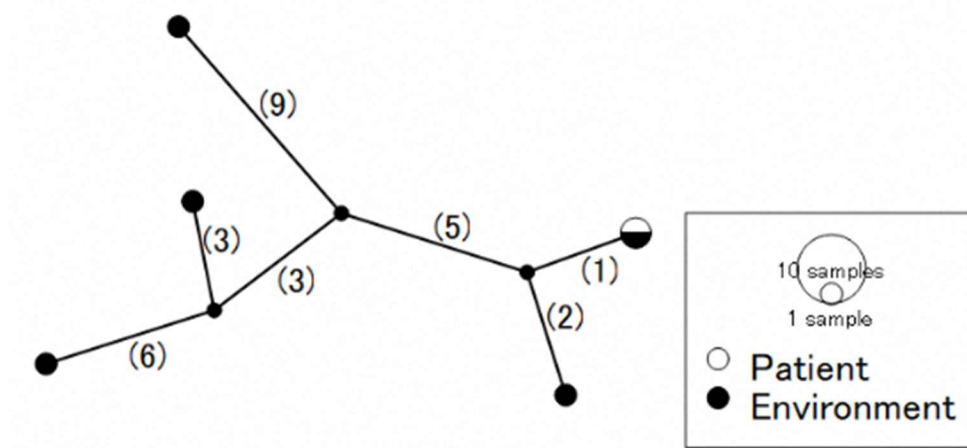


図 1. 事例 2 における Lp1 ST644 のネットワーク図

A) 組換え領域を除去したコアゲノム SNP



B) 組換え領域を含むコアゲノム SNP

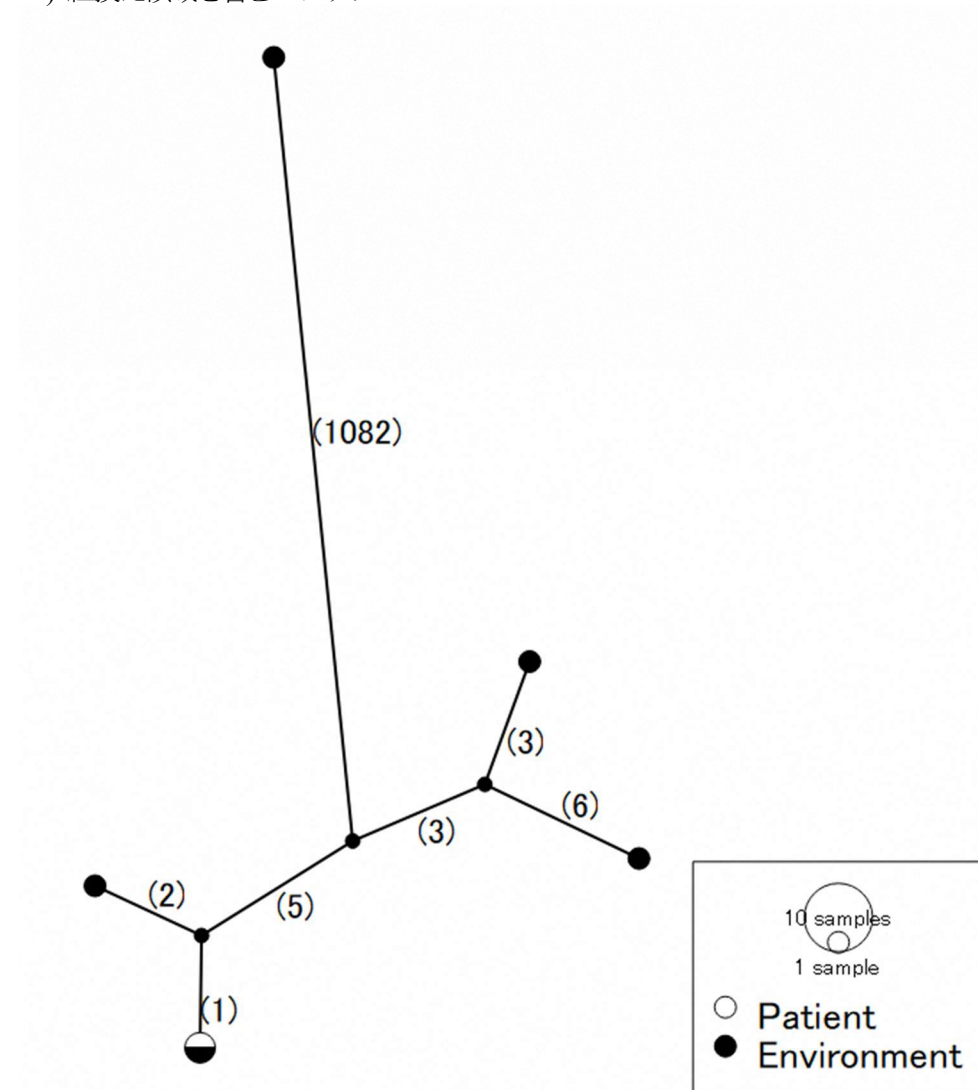
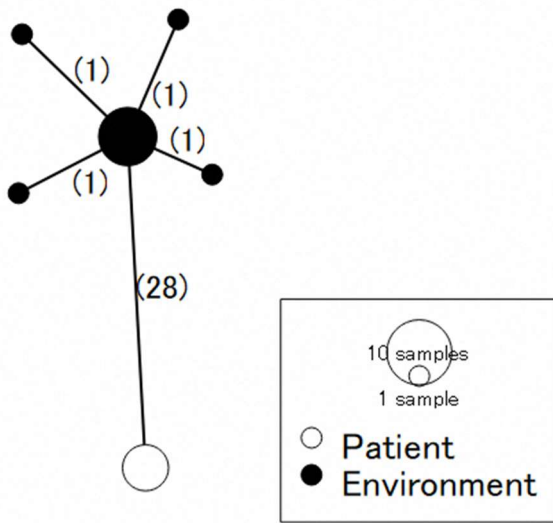


図2. 事例4における Lp1 のネットワーク図

A) 組換え領域を除去したコアゲノム SNP



B) 組換え領域を含むコアゲノム SNP

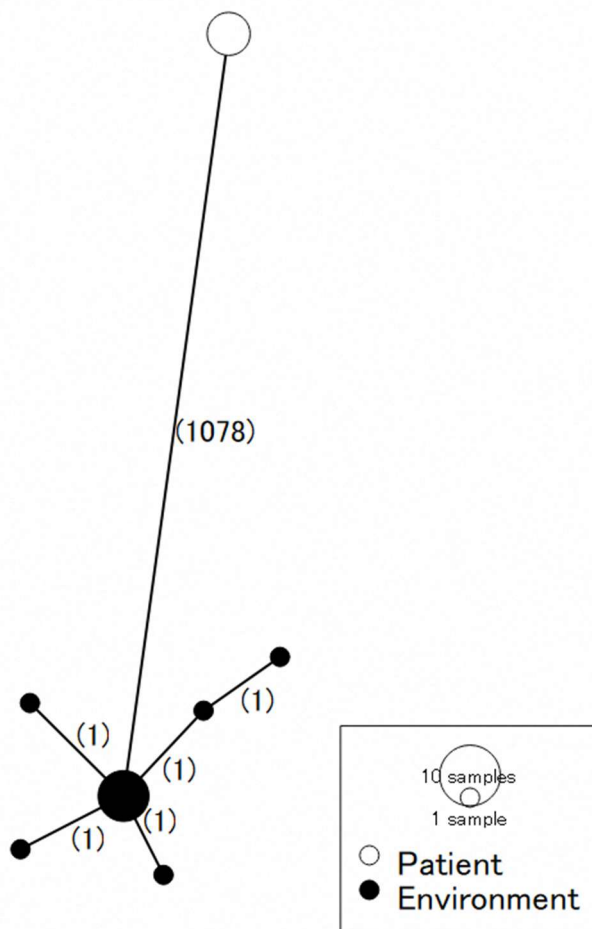


図3. 事例11における Lp1 のネットワーク図

表 2. 事例 2 における各検体からのレジオネラ属菌分離株数一覧

Species and serogroups	SBT		No. of isolates from:			
	ST	Allele no.	Patient	Facility A	Facility B	Total
Lp1	ST505	(7, 6, 17, 3, 11, 11, 9)	6		6	12
	ST530	(6, 10, 20, 6, 9, 4, 9)			2	2
	ST644	(6, 10, 20, 10, 9, 14, 11)	14	26		40
	ST1094	(6, 10, 20, 10, 9, 4, 9)		7		7
	ST-new	(6, 10, 21, 13, 9, 4, 9)			1	1
Lp4				5		5
Lp9				28	6	34
Lp13				1		1
Lp UT					1	1
<i>L. dumoffii</i>				2	1	3
<i>Legionella</i> spp.				2		2
Total			20	71	17	108

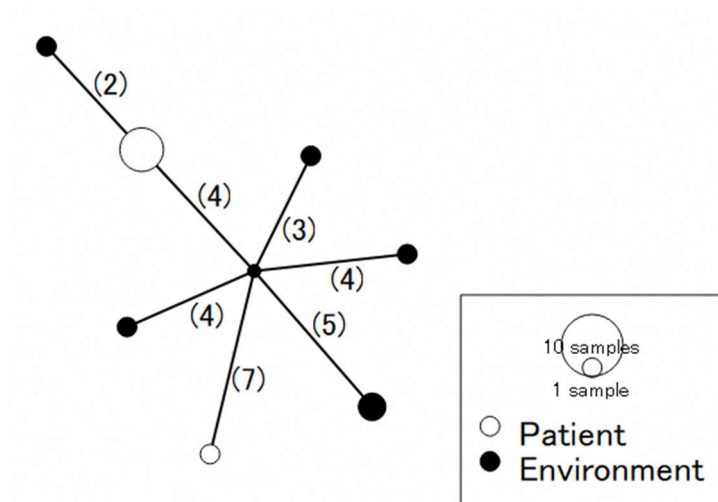


図4. 事例2における組換え領域を除去したコアゲノム SNP による Lp1 ST505 のネットワーク図

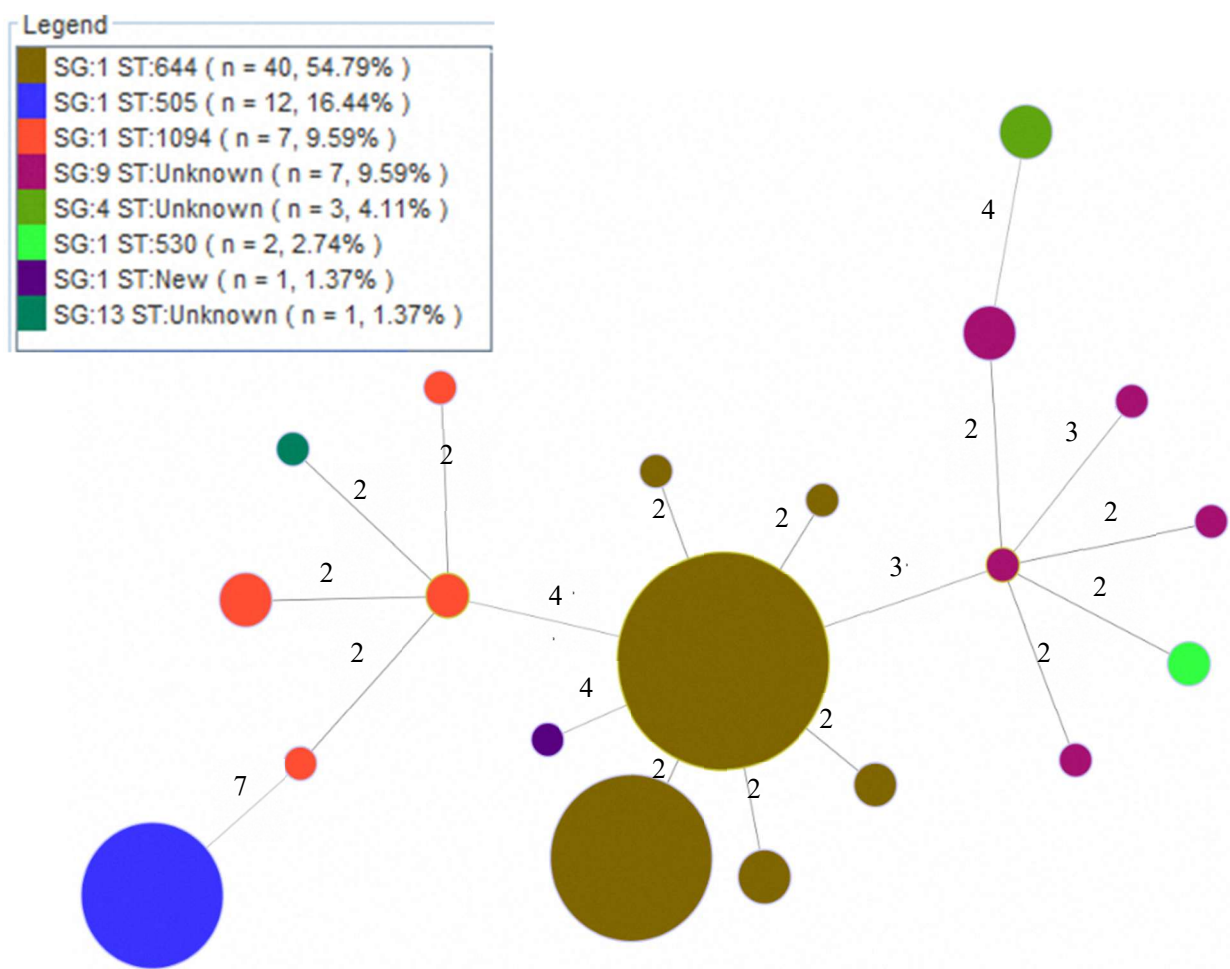


図5. 事例2における Lp1 の MLVA 法による Minimum Spanning Tree