

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）
令和 7 年度研究報告書
「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」

散発事例及び集積事例における遺伝的距離の検討

研究分担者 淀谷 雄亮 川崎市健康安全研究所
研究協力者 小嶋 由香 川崎市健康安全研究所
研究協力者 浅井 威一郎 川崎市健康安全研究所

研究要旨

本研究では、レジオネラ症の散発事例及び集積事例について、分離株間の遺伝的距離を cgMLST 解析及び SNP 解析により比較し、各事例における遺伝的距離に関する基礎データを蓄積するとともに、次世代シーケンサーを用いた感染源調査における遺伝的距離の評価について検討することを目的とした。散発事例 5 事例及び集積事例 1 事例を対象として解析を実施し、臨床分離株と環境由来株の遺伝的距離を評価した。その結果、散発事例のうち 4 事例では cgMLST 解析で 1～4 allele 差、SNP 解析で 1～14 SNPs であった。一方で、1 事例は cgMLST 解析で 9 allele 差、SNP 解析で 24 SNPs であり、他事例と比較して大きな遺伝的距離が認められた。集積事例では cgMLST 解析で 3～23 allele 差、SNP 解析で 4～28 SNPs を示し、近縁の株で構成されたことから、共通の汚染源に由来する可能性が示唆された。さらに、散発事例 1 事例については関連のない同一 ST の株を加えて解析したところ、患者由来株と関連施設由来株で同一クラスターを形成し、関連のない株は施設ごとに別のクラスターを形成した。これらの結果から、ゲノム解析により疫学的関連性のある近縁株の識別が可能であることが示された。

A. 研究目的

レジオネラ属菌の分子疫学解析法として Sequence Based Typing (SBT)法が広く利用されている。しかし、Sequence Type (ST)によっては頻繁に検出される ST が確認されるなど型別結果に偏りがあることが明らかとなっている。このため、レジオネラ症の集団発生時など、より詳細な分子疫学解析が求められる場面では、SBT 法のみでは感染源

の特定が困難となる場合がある。従来、地方衛生研究所においては、より高分解能な解析手法としてパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) が実施されていたが、機器の製造中止により継続的に実施することが困難となっている。近年では全ゲノム解析による解析報告が増加しているものの、国内における事例の集積は不十分であり、結果判定や行政的な判

断が困難になるケースが想定される。本検討では疫学的背景から感染源が判明している事例について cgMLST 解析及び SNP 解析による遺伝的距離を解析し、判断の基礎となる事例データの蓄積を行うとともに、次世代シーケンサーを用いた感染源調査における遺伝的距離の評価について検討した。

B. 研究方法

2014 年から 2025 年までに分離され、疫学調査により感染源が特定されているレジオネラ症散発事例 5 例 (A～E；同一患者由来を含む患者由来株 10 株及び感染源と考えられた環境由来株 15 株) と、2012 年から 2018 年までに同一 ST である ST1346 が分離されているものの、感染源が不明である集積事例 1 例 (患者由来株 6 株) に由来する計 31 株を対象として iSeq 100 (Illumina) を用いてゲノムデータを取得した。さらに、散発 C から検出された ST68 について、散発 C と疫学的に関連のない施設 A 及び施設 B から分離された ST68 の環境由来株 7 株についても同様にゲノムデータを取得した。cgMLST 解析は Ridom 社の cgMLST データベース (<https://www.cgmlst.org/ncs/schema/Lpneumophila/>) から取得したスキーマを用い、1521 遺伝子座について chewBBACA (v3.3.10) を用いて解析を実施した。各株間の遺伝的距離は BioNumerics (Applied Maths 社) を用いて最小全域木 (minimum spanning tree : MST) を作成した。

SNP 解析は SNPcaster (v.0.9.3) を用いて実施した。リファレンスは GenBank より取得した *L. pneumophila* Paris 株の完全長ゲノム配列 (アクセッション番号 : CR628336) 又は各事例内の 1 株について取得した完全長ゲ

ノム若しくはドラフトゲノムを使用し実施した。完全長ゲノム配列の決定には、MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies) を用いてロングリードシーケンスデータを取得し、ショートリードと組み合わせた Hybracter (v.0.10.0) によるハイブリッドアセンブリによりゲノム配列を構築した。

C. 結果

各散発事例について cgMLST 解析を実施した結果、患者由来株と環境由来株の allele 差は散発 A では 1～4 allele 差、散発 B では 2 allele 差、散発 C では 9～26 allele 差、散発 D では 4～5 allele 差、散発 E では 3～21 allele 差であった (表 1)。患者由来株と感染源と推定される環境由来株との allele 差は散発事例 5 事例中 4 事例においては最も近い組み合わせで 1～4 allele 差であったが、散発 C では 9 allele の差が認められた。集積事例については患者由来株間で 3～27 allele 差を認め (表 1)、検体採取年が複数年にわたるにもかかわらず、散発事例と同程度の遺伝的距離を示した。

次に、各散発事例及び集積事例について Paris 株をリファレンス株とした SNP 解析を行った。その結果、患者由来株と環境由来株間の SNP 数は、散発 A では 1～2 SNPs、散発 B では 2 SNPs、散発 C では 24～36 SNPs、散発 D では 12 SNPs、散発 E では 6～14 SNPs であった (表 2)。集積事例においては患者由来株間で 4～28 SNPs であった。続いて、リファレンス株を同事例内の 1 株とした場合、いずれの事例においても core genome size が増加した。散発 B では患者由来株と環境由来株間には 3 SNPs に、散発 C では 27～46 SNPs となり SNP 数の増加が認め

られたが、散発 E については 2~11 SNPs と SNP 数が減少した。集積事例においても core genome size が増加し、各患者由来株間で 5~32 SNPs と SNP 数の増加が認められた。

散発 D 及び散発 E については同一患者から分離された複数株を解析した。散発 D では 2 株間で cgMLST 解析及び SNP 解析はともに完全に一致したが、散発 E の 5 株間で 3~11 SNPs であった(図 1)。

さらに、散発事例と同一の ST68 である関連のない環境由来株について cgMLST 解析したところ、各施設に対応したクラスターが形成され、患者由来株は患者と関連する施設由来株と同一のクラスターを形成した(図 2)。また、施設 B については同一の ST ではあるものの、採取年や採取箇所の違いにより allele profile が大きく異なっていた。

D. 考察

本研究において *L. pneumophila* のゲノム解析による遺伝的距離について cgMLST 解析及び SNP 解析を用いて検討した。その結果、散発事例 5 事例中 4 事例において、患者由来株と環境由来株の最も近い遺伝的距離は cgMLST 解析では 1~4 allele 差、SNP 解析では 1~12 SNPs であり、両手法において遺伝的に近縁であることが示された。これは既報¹⁾で疫学的関連性のある株の目安として示されている ≤ 4 allele 及び ≤ 16 SNPs を満たしていた。一方で、散発事例のうち 1 事例では患者由来株と環境由来株の間で cgMLST 解析では 9 allele 差、SNP 解析では 24 SNPs であり、既報の基準を上回る遺伝的距離が確認された。この要因として、本検討における施設 B の結果が示すように、

同一施設内においても複数の allele profile を示す株があり、本事例について施設内に存在したより近縁の株を十分に分離できなかったこと可能性が考えられた。また、同一患者由来株においても最大 11 SNPs の差が認められたことから、解析対象とした株によっては患者由来株と環境由来株間の遺伝的距離の結果が変動する可能性が示唆された。このことから、一定の閾値を厳密に設定した場合に、疫学的に関連のある事例を見逃す恐れがあることが考えられた。以上の結果から、疫学的に関連する株の目安としては基本的に既報の数値が参考となるものの、散発 C のようにその範囲を上回る事例が存在することが明らかとなった。*Legionella* 属菌は遺伝子組み換えを起こしやすいことが知られており、数値のみではなく、疫学情報と併せたうえで一定の幅をもって解釈する必要があると考えられた。

SNP 解析において、リファレンスゲノムをより近縁な株に変更することで、core genome size 及び SNP 数の増加が認められ、より詳細な解析が可能となった。一方で 1 事例では core genome size は増加したものの、SNP 数の減少が確認された。これは、リファレンスゲノムを近縁株としたことで、リードのマッピング精度が向上し、偽陽性の SNP の検出が減少したと考えられた。

さらに、本研究では同一施設内においても採取箇所や分離した株によって SNP や cgMLST のプロファイルが異なる株が検出されることが明らかとなった。このことから、レジオネラ症集団発生時の感染源調査において、複数の分離株を解析することが感染源の正確な特定に重要であると考えられる。選定した一部の株のみを解析した場

合、遺伝的距離が比較的離れた株を選定してしまう可能性があり、その場合、感染源を見逃す可能性があることを考慮する必要があると考えられた。

本検討は限られた 5 事例を対象とした検討であり、今後さらなる事例の集積と解析を進めることで分子疫学解析結果の解釈や行政対応に資する知見を蓄積する必要がある。

E. 総括

本検討によりレジオネラ症の感染源調査に cgMLST 解析及び SNP 解析が有用であり、さらなる事例の集積と解析を進めることで分子疫学解析結果の解釈や行政対応に資する知見を蓄積する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

1) Mentasti M, Underwood A, Lück C, Kozak-Muiznieks NA, Harrison TG, Fry NK. Evaluation of an optimized epidemiological typing scheme for *Legionella pneumophila* with whole-genome sequence data using validation guidelines. *J Clin Microbiol.* 2016;54(8):2135–2148.

表 1 各散発事例及び集積事例の解析株数、血清群、ST 等情報と患者由来株と環境由来株の cgMLST の allele 差

*散発 D 及び散発 E の患者由来株は同一患者から分離した各株を解析した。

事例	血清群	ST	患者由来株数	環境由来株数	由来環境	患者由来株と環境由来株の cgMLST allele 差
散発 A	Lp SG1	ST1	1	2	冷却塔	1-4
散発 B	Lp SG1	ST42	1	1	浴槽水	2
散発 C	Lp SG6	ST68	1	2	浴槽水/ 貯水槽	9-26
散発 D	Lp SG9	ST2670	2*	2	浴槽 排水口	4-5
散発 E	Lp UT	ST537	5*	8	浴槽水	3-21
集積事例	Lp SG1	ST1346	6	-	-	3-27

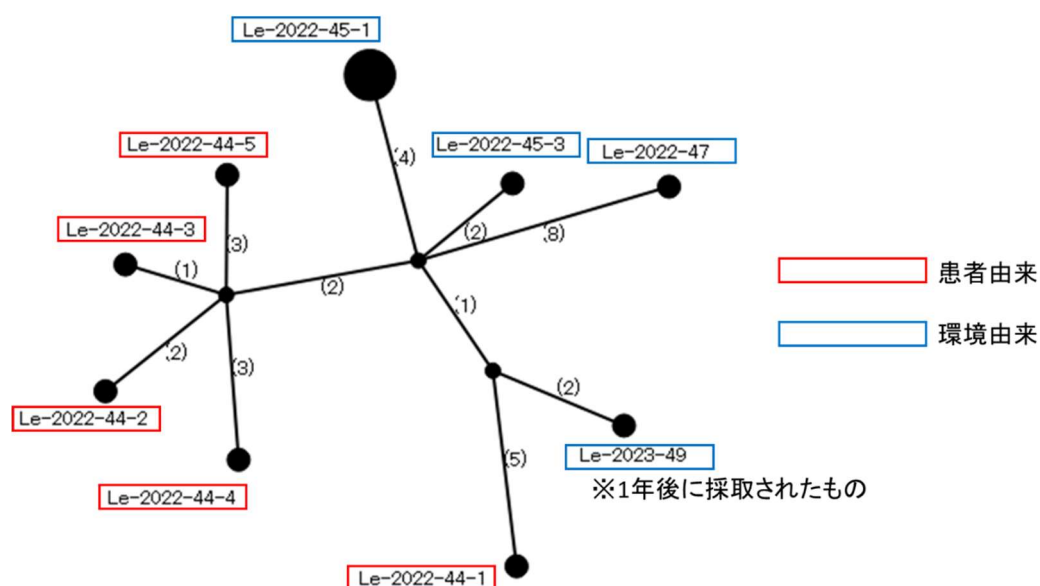
表 2 各散発事例及び集積事例の解析株数、血清群、ST 等情報と患者由来株と環境由来株の SNP 数

reference として *L. pneumophila* Paris 株の完全長ゲノム配列(アクセッション番号:CR628336)で解析した結果を上段に、各事例内の 1 株について取得した完全長ゲノム又はドラフトゲノムで解析した結果を下段に示した。

* 散発 D 及び散発 E の患者由来株は同一患者から分離した各株を解析した。

** ドラフトゲノムを reference とした。

事例	血清群	ST	患者由来株数	環境由来株数	由来環境	reference	Core genome size	患者由来株と環境由来株のSNP数
散発A	Lp SG1	ST1	1	2	冷却塔	CR628336	3303952	1-2
						2014-16	3424211	1-2
散発B	Lp SG1	ST42	1	1	浴槽水	CR628336	2855748	2
						2019-14	3221079	3
散発C	Lp SG6	ST68	1	2	浴槽水/貯水槽	CR628336	2985864	24-36
						2024-24**	3411237	27-46
散発D	Lp SG9	ST2670	2*	2	浴槽排水口	CR628336	2893133	12
						2025-08**	3370721	12
散発E	Lp UT	ST537	5*	8	浴槽水	CR628336	2872985	6-14
						2022-46	3172001	2-11
集積事例	Lp SG1	ST1346	6	-	-	CR628336	2939928	4-28**
						2012-34	3262342	5-32**



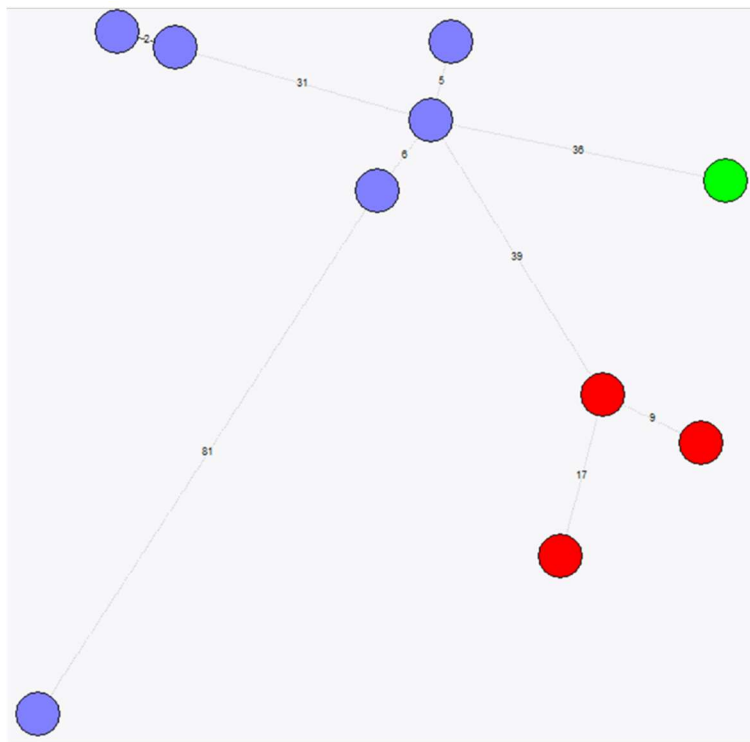


図2 分離由来施設別 ST68 10 株の cgMLST 解析に基づく MST 図

分離施設ごとに色分けしており、緑は施設 A 由来株、青は施設 B 由来株、赤は散発事例 C 由来株を示す。株間に示した数値は allele 差を表す。