

令和元年6月10日現在

機関番号：84505

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16219

研究課題名(和文)生活環境下におけるレジオネラの遺伝的群集構造解析と感染リスク低減のための基盤研究

研究課題名(英文) Analysis of genetic characterization of Legionella isolated in the environment to reduce infection risk

研究代表者

中西 典子(Nakanishi, Noriko)

神戸市環境保健研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：50615490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト生活環境下において、多種多様なレジオネラ属菌生態系の遺伝的群集構造を解析し、ヒト生活環境中でニッチを獲得するレジオネラの生存戦略の解明を目指した。冷却塔には3つの特定の遺伝系統の*L. pneumophila*が定着していること、温泉環境には多様な遺伝子型の*L. pneumophila*が存在し、特徴的な菌種として*L. londiniensis*と*L. israelensis*の存在が明らかとなった。さらに、同一温泉施設から経年的に分離された同一遺伝子型*L. pneumophila*のcore SNP解析の結果、長期に渡りクローナリティーの高い株が定着し続けていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レジオネラ症の発生機構を細菌とヒト宿主との関係に着目する病原微生物学だけでなく、生息環境下における病原細菌の挙動に着目する微生物生態学の観点をも有する点に学術的意義がある。また、長期に渡り環境から集積した多種多様なレジオネラ属菌を扱えることから、レジオネラの病原性獲得機構および生存戦略の進化機序を解明でき、レジオネラ症を引き起こす病原性の高い株の選定や環境リスク因子を抽出できる可能性が考えられ、レジオネラ症の予防対策の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the genetic characteristics and virulence traits of *L. pneumophila* and the distribution of *Legionella* spp. isolated from cooling tower (CT) and hot spring (HS). It was elucidated three high clonal groups, CC1, CC2, and CC3, which had colonized cooling towers in Japan over our ten year monitoring period. On the other hand, we found the high prevalence and genetic polymorphism in HS. We also found that *L. londiniensis* and *L. israelensis* predominated in HS. Furthermore, core SNPs genotypes were elucidated the genomic proximity and stability between *L. pneumophila* strains isolated in the same accommodation in HS, despite the difference in separation years. This study highlights the importance of the epidemiology and ecology of *Legionella* from the standpoint of public health.

研究分野：病原微生物学

キーワード：レジオネラ 遺伝子型別 分子疫学 アメーバ ゲノム比較解析

1. 研究開始当初の背景

レジオネラは自然界では自由生活性アメーバを自然宿主とする細胞内寄生性細菌であるが、ひとたびヒトに感染すると肺炎マクロファージに感染・増殖し、最終的に重篤な肺炎を引き起こす。本邦におけるアウトブレイクの主たる原因は汚染された入浴施設によるものが大多数を占めるが、クーラーの冷却塔、噴水などの修景水、加湿器なども感染源となる。これらレジオネラ症の大多数は *Legionella pneumophila* (以下、*L. pneumophila*) 血清型 1(SG1)によるものと考えられているが、近年、*L. longbeachae*, *L. micdadei*, *L. dumoffii* 等の別種のレジオネラ属菌が起因菌となっている例も多く報告されている。臨床現場では利用される尿中抗原検査が、*L. pneumophila* SG1 のみに対応していることを考慮すると、これら他のレジオネラ属菌の報告は過少評価されている可能性がある。

レジオネラの病原性とレジオネラを取り巻く環境との関係には不明な点が多い。レジオネラの重要な病原性は、レジオネラ全タンパク質の約一割を占めるエフェクタータンパク質群およびこれを輸送する IV 型分泌系が担っている。IV 型分泌系の中には IVA 型と IVB 型とがあるが、特に IVB 型の Dot/Icm 分泌系はレジオネラの病原性に必須である。その一方で、IVA 型分泌系の保有については株レベルで異なることが明らかとなっている。特に、アグロバクテリウムの VirB 系に近縁な Lvh IVA 型分泌系はレジオネラ症を引き起こすレジオネラ属菌に共通して存在し、アメーバ内での侵入・増殖に関与している。そのような遺伝子は他にも、RTX(repeats in structural toxin)をコードする *rtxA* 遺伝子がある。このような可動遺伝子の存在は、レジオネラが人工的水利用環境でニッチを獲得し、さらにヒトにレジオネラ症を引き起こす上で、重要な働きをしていると考えられるが、レジオネラの生態系の中でのその挙動には不明な点が多い。また、*L. pneumophila* は生息環境下において組換え現象によりゲノム進化を促進していることも明らかとなっている。以上のことは、レジオネラがその生息環境との相互作用によって、より高度な病原性を獲得する方向へ進化していることを示唆している。

他方、臨床現場ではレジオネラ症には感染源が特定できないという事例も多い。従って、遺伝子型別解析法による菌株タイピングは感染源推定に効果的である。

以上の背景を踏まえ、長期に渡り環境から蓄積した多種多様なレジオネラ属菌を解析対象とすることで、人工水系中でのレジオネラ属菌の遺伝的群集構造を明らかにすると共に、環境分離株の比較ゲノムと臨床的なメタデータを併せて解析することで、環境中におけるレジオネラ属菌の分類学的分布傾向やレジオネラ属菌の病原性遺伝子の分布傾向を明らかにし、高病原性獲得への経時的変

化機序を解明できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、レジオネラ属菌の遺伝的群集構造を解析することで、ヒト生活環境中でニッチを獲得する機構を明らかにし、レジオネラの生存戦略の解明を目指す。そのために、まず、網羅的に遺伝子型別および種同定を行い、環境中のレジオネラ属菌の分布状況や病原性遺伝子の保有状況について明らかにする。

時間軸、環境要因、病原性遺伝子の保有、共存関係の観点から選定したレジオネラ属菌の複数株のゲノム解析を行い、ゲノムの構造変化や病原性遺伝子獲得機構を解析する。

3. 研究の方法

1) 菌株

温泉環境から分離された *L. pneumophila* 235 株(2003-2014)、および冷却塔水から分離された *L. pneumophila* 161 株(2003-2012)を用いた。さらに *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌は、温泉環境から 126 株と冷却塔水由来 64 株を用いた。また、レジオネラ症患者から分離された *L. pneumophila* 5 株を用いた。

2) SBT 法による遺伝系統解析

EWGLI (European Working Group of Legionella Infections) の提唱する方法(sequence-based typing)に従い、7 種の遺伝子(*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*)の一部領域の塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った。Minimum spanning tree (MST)法を用いて、遺伝的な関連性を調べた。

2) *Legionella*. spp の菌種の同定

mip (macrophage infectivity potentiator)遺伝子のシーケンスを行い、データベースの情報から種を同定した。*mip* 遺伝子が増幅できない場合に関しては、16S rRNA 遺伝子配列により、菌種同定を行った。

3) 病原性遺伝子の保有状況

水平伝播が推定される Lvh Type IV secretion system (SS)や RTX (repeats in toxin)をコードする *rtxA* を PCR 法によって保有状況を確認する。MAb2 および Mab3/1 のエピトープである O-acetyltransferase は *L. pneumophila* SG1 の病原性に関係するとされる。O-acetyltransferase をコードする *lag-1* 遺伝子について、PCR 法によって存在有無を調べた。

4) 宿主となる自由生活性アメーバの分離・同定

温泉水 47 検体、冷却塔水 16 検体を用いた。自由生活性アメーバの分離は、無栄養の寒天培地に加熱処理した大腸菌を塗布した培地を使用し、フィルターろ過により捕集したアメーバを培地に貼付け、30 及び 42 で培養

した。形成したプラークは、顕微鏡観察により形態学的な同定および 18S rRNA 遺伝子配列により同定を行った。

5) 代表的な株のゲノム系統解析

代表的な株を選別し、Miseq でリードデータを取得し、A5-Miseq によるアセンブリ後に、kSNP を用いて系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) 環境由来別の *L. pneumophila* の遺伝的特徴

冷却塔水由来の *L. pneumophila* 161 株 (2003-2012) は 26 種類の ST に分けられ、大きく 3 つのグループ clonal complex (CC) に分類されることを見出した (図 1)。CC の代表的な ST については、それぞれ CC1 (105/161, 65.2%) は ST1、CC2 (22/161, 13.7%) は ST154、CC3 (20/161, 12.4%) は ST2603 であった (図 1)。

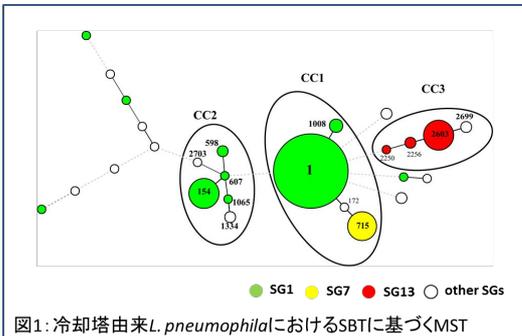


図1: 冷却塔由来 *L. pneumophila* における SBT に基づく MST

温泉環境由来の *L. pneumophila* は 101 種類の ST に分けられた。内訳は、ST1 (SG1) が 23 株 (9.9%)、次いで SG6 で新規の ST 型 (STnew1) が 20 株 (8.7%)、SG10 で新規の ST 型 (STnew2) が 18 株 (7.8%) と続いた。62 種類の新規の ST が分離された。

分離場所由来別の遺伝子型別間関係を図 2 に示した。冷却塔水由来と比較して、温泉環境由来の *L. pneumophila* は多様な ST の存在が明らかとなった。また、温泉環境から分離された遺伝子型と同一の遺伝子型の臨床株

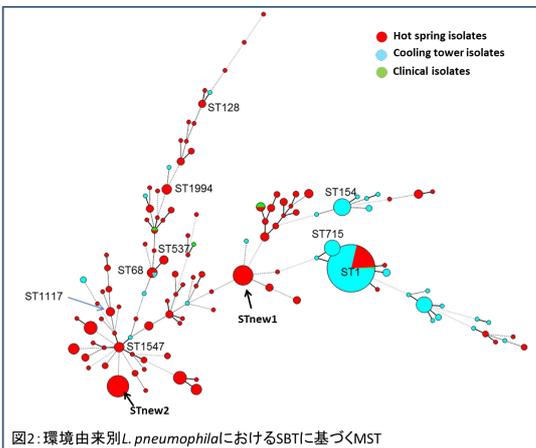


図2: 環境由来別 *L. pneumophila* における SBT に基づく MST

が存在していた。

(2) *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌種の存在

L. pneumophila 以外のレジオネラ属菌種につ

いて、菌種の同定を行った (図 3)。その結果、冷却塔水では、*L. erythra*, *L. anisa*, *L. rubrilucens* 等様々な菌種を特定した。一方で、温泉環境からは、*L. londiniensis* と *L. israelensis* が主要な菌種として検出された。また、*L. israelensis* は *L. pneumophila* や *L. londiniensis* と比較して、増殖が遅いことが明らかとなった。

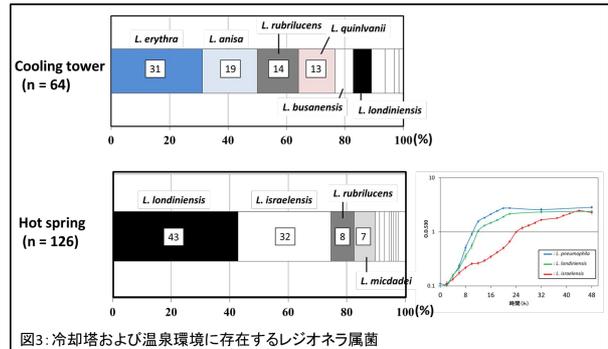


図3: 冷却塔および温泉環境に存在するレジオネラ属菌

(3) 病原性遺伝子の保有状況

温泉環境由来の SG1 に属する 71 株中 *lag-1* 遺伝子を保有していた株は 28 株 (39.4%) 存在していた。一方、冷却塔由来の SG1 の 114 株中 2 株が *lag-1* 遺伝子を保有しており、遺伝子型は ST2 および ST40 であった。

lvh と *rtxA* 遺伝子の保有に関しては、温泉環境では 8.5% (20/235) となり SG5 の保有率が高い傾向となった (表 1)。また、冷却塔由来株では、1.9% (3/161) であった。

表1: Detection of virulence traits in *L. pneumophila* strains per type of serogroup

Serogroup	No. (%) of strains positive for <i>L. pneumophila</i>		
	<i>lvh</i> locus	<i>rtxA</i> locus	<i>lvh</i> and <i>rtxA</i> loci
1	28/71 (39.4)	27/71 (38.0)	3/71 (4.2)
2	0/1(0)	1/1 (100)	0/1(0)
3	1/9 (11.1)	9/9 (100)	1/9 (11.1)
4	0/5 (0)	4/5 (80.0)	0/5 (0)
5	12/35 (34.2)	33/35 (94.2)	10/35 (28.6)
6	4/40 (10)	36/40 (90.0)	4/40 (10)
7	0/1(0)	1/1 (100)	0/1(0)
8	0/12 (0)	10/12 (83.3)	0/12 (0)
9	1/11 (9)	11/11 (100)	1/11 (9)
10	1/14 (7.1)	9/14 (64.2)	0/14 (0)
11	0/2(0)	0/2(0)	0/2(0)
12	0/3 (0)	1/3 (33.3)	0/3 (0)
13	0/2(0)	2/2 (100)	0/2(0)
15	0/1(0)	1/1 (100)	0/1(0)
UT	2/28 (7.1)	17/28 (60.7)	1/28 (3.6)
Total	49/235 (20.9)	168/235 (71.4)	20/235 (8.5)

(4) 宿主となる自由生活性アメーバの同定

環境由来別にレジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバの生態について調べた。冷却塔水 16 試料中、10 試料 (62.5%) から自由生活性アメーバを検出し、*Hartmannella*

spp.4 株、*Vermamoeba* spp. 4 株、*Naegleria* spp.1 株、*Acanthamoeba* spp.1 株、*Echinamoeba* spp.1 株を分離・同定した。一方、温泉水では、47 試料中 19 試料(40.4%)から検出し、*Stenamoeba* spp. 6 株、*Acanthamoeba* spp.4 株、*Hartmannella* spp.3 株、*Echinamoeba* spp. 3 株、*Vannella* spp.2 株、*Vermamoeba* spp.1 株、*Naegleria* spp. 1 株、*Pharyngomonas* spp.1 株を同定し、多様なアメーバ類の存在を明らかにした。このようなアメーバ類は、*L. pneumophila* と共にニッチを獲得している特定の菌種 *L. israelensis* および *L. londiniensis* の宿主となっていることが考えられた。

(5) コアゲノム解析・系統解析

(A) 冷却塔水由来株のコアゲノム解析

CC 間および CC 内におけるゲノムの多様性や可塑性を経年・定着性の観点から明らかにするために、代表的な 25 株(CC1:10 株、CC2:9 株、CC3:6 株)のコアゲノム解析を行った。解析株全体では約 33,000 個の SNP が検出された。また、各 CC 内での SNP 数を見てみると、CC1 内で 1093 個、CC2 内で 4558 個、CC3 内で 45 個の core SNPs が見出された。core SNPs のアライメントから最尤法により系統樹を作製したところ、ゲノム系統でも大きく三つにクラスターが分かれ、ST のグループを反映した(図 4)。CC2 は他の二つの CC とは大きく離れており、*L. pneumophila* subsp. *fraseri* と同一クラスターに分類された。ゲノム配列から相同性を評価する Average nucleotide identity (ANI)値を計算したところ、CC2 の株と *L. pneumophila* subsp. *fraseri* 間では同種と判定される 95%以上を示し、CC2 は分類学的に *L. pneumophila* subsp. *fraseri* に属することが明らかとなった。

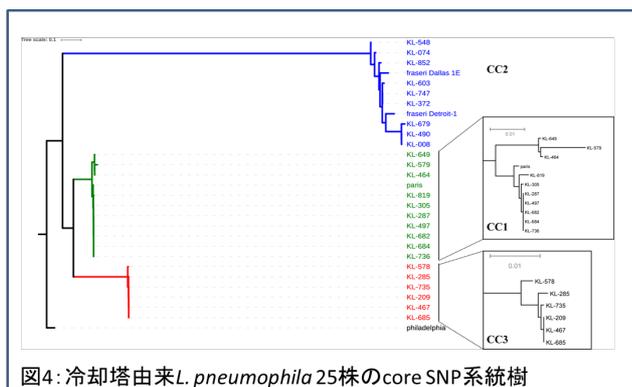


図4: 冷却塔由来*L. pneumophila* 25株のcore SNP系統樹

CC1とCC3にはそれぞれ2つずつサブクラスターが形成されており、サブクラスター内は極めて近縁であったが、サブクラスター間では core SNP 数が数百を超えており多様性が見られた。近縁であった株同士は分離年・施設に関わらず近縁であった為、冷却塔環境において特定の遺伝系統が広く伝播している可能性が示唆された。また、同一施設において経年的に分離された株がそれぞれ別のサブクラスターまたは別の CC に分類されることもあり、同一環境中に複数の遺伝系統の

L. pneumophila が共存している可能性が示唆された。

(B) 同一温泉施設から経年的に分離された *L. pneumophila* の core SNP 解析

同一温泉施設から 2006 年、2010 年、2012 年、2013 年それぞれ *L. pneumophila* SG5 同一の遺伝子型の株が分離されており、そのゲノム構造について解析した。その結果、2006 年、2010 年、2012 年の株間の SNP 数は数十個しか見られず、2013 年の株とその他の株との SNP 数は約 230 個であった。また同様に、2007 年と 2013 年に分離された *L. pneumophila* SG10 ST1547 の株間の SNP 数も 11 個であった。

以上のことから、長期に渡りクローナリティーの高い株が定着し続けていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

田中忍、中西典子、野本竜平、有川健太郎、濱夏樹、岩本朋忠「温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証」神戸市環境保健研究所報 46; 39-42, 2018. [査読無]

Noriko Nakanishi, Ryohei Nomoto, Shinobu Tanaka, Kentaro Arikawa, Tomotada Iwamoto. Analysis of Genetic Characterization and Clonality of *Legionella pneumophila* Isolated from Cooling Towers in Japan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13: 16(9). doi:10.3390/ijerph16091664. 2019 [査読有]

[学会発表](計5件)

田中忍、中西典子、有川健太郎、岩本朋忠、都倉亮道「人工水系におけるレジオネラ属菌の分布状況と宿主アカントアメーバ中での増殖様式」第 43 回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会、2016 年、大阪

中西典子、田中忍、有川健太郎、岩本忠「温泉環境由来レジオネラ属菌の遺伝学的特徴と病原性遺伝子保有状況」、第 90 回日本細菌学会、2017 年、仙台

中西典子、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠「レジオネラ属菌の生活環境における分布状況と遺伝学的特徴」、環境微生物学会合同大会 2017、2017 年、仙台、招待講演

Noriko Nakanishi, Shinobu Tanaka, Kentaro Arikawa, Tomotada Iwamoto 「Distribution and molecular characteristics of *Legionella* spp. strains isolated from cooling tower and hot spring in Kobe City, Japan」The 9th

International Conference on Legionella、
2017年、Italy Roma
中西典子、野本竜平、田中忍、有川健太
郎、岩本朋忠「冷却塔に定着する
Legionella pneumophila のゲノム分子疫
学」第13回日本ゲノム微生物学会、2019
年

6. 研究組織

(1)研究代表者

中西 典子 (NAKANISHI, Noriko)
神戸市環境保健研究所・感染症部・研究員
研究者番号：50615490

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし