

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590530

研究課題名(和文) レジオネラの遺伝子解析

研究課題名(英文) Sequence-based typing of Legionella pneumophila isolates in Japan

研究代表者

前川 純子 (Amemura-Maekawa, Junko)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：20238843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：レジオネラ・ニューモフィラ(以下Lp)は浴槽水で増殖し、レジオネラ肺炎を引き起こすが、およそ半数のレジオネラ肺炎患者は入浴施設を利用しておらず、感染源は不明である。そこで、浴槽水の他に、冷却塔水、土壌、噴水、シャワー水などから採取されたLpの遺伝子型を調べ、患者由来Lpの遺伝子型と比較した。浴槽水が感染源と考えられた患者由来Lpの遺伝子型は、浴槽水由来Lpと遺伝子型が同じグループに属するものが多く、感染源不明の患者から分離されたLpの遺伝子型の多くは、浴槽水以外の環境から分離されたLpの遺伝子型と似ていた。したがって入浴施設以外の感染源の調査、衛生管理も重要である。

研究成果の概要(英文)：Legionella pneumophila (Lp), the causative agent of Legionnaires' disease, grows in the bath water. Over half of Legionella pneumonia patients, however, do not use the bathing facility, and in most such cases, the sources of infection are not clear. I examined the genotypes of Lp strains derived from various environments: cooling tower water, soil, fountains, and shower water as well as bath water, in order to compare the genotypes of Lp strains derived from patients. The genotypes of Lp strains derived from patients who were suspected to infect Lp through bath water were belonged to the genotype groups including most Lp strains derived from bath water. The genotypes of Lp strains derived from patients whose sources of infection were unknown were belonged to the genotype groups including Lp strains derived from environments other than bath water. Therefore inspection and hygiene management of various environments other than bathing facilities as the source of infection are important.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：レジオネラ Legionella pneumophila sequence-based typing 遺伝子型別 浴槽水 冷却塔水 土壌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 重篤な肺炎等をおこすレジオネラ症の主な起病菌である *Legionella pneumophila* は環境細菌で、冷却塔や浴槽などの人工水系に生息し、飛沫を介して人に感染する。

レジオネラ症は感染症法において、全臨床医に届出義務のある四類感染症である。2004年までは100症例台だったものが、尿中抗原迅速診断法の普及にともない、診断数が急増し、2009年の届出数は689例(暫定)となっている。わが国においては、温泉等入浴施設がレジオネラ症の感染源である例がおよそ半数を占め、感染の季節性はないと考えられていたが、届出数が増えたことにより、毎年7月が患者数のピークとなることがわかった。この季節性は湿度と関連して( IASR 2008. 29:327-8)、入浴施設での感染と湿度との相関は低い。レジオネラ症例のおよそ半数は感染源不明であり、まだ認識されていない感染源による事例に季節性が見られることが示唆される。

(2) レジオネラ症のさまざまな情報を共有するためのヨーロッパの研究者の組織である EWGLI (European Working Group of Legionella Infection) において、集団感染の察知や感染源の解明のための分子疫学方法として、SBT (sequence based-typing) 法が提唱された (Gaia V, et al. 2005. J Clin Microbiol 43:2047-52; Ratzow S, et al. 2007. J Clin Microbiol 45:1965-8)。これは *L. pneumophila* の7つの遺伝子の一部の領域の塩基配列を決定し、型別するものである。2007年10月より英国 HPA (Health Protection Agency) が中心となり、*L. pneumophila* SBT のデータベースの運用が開始されている ([http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php))。

(3) 日本初の臨床分離株(1980年)から2008年に分離された株まで86株の *L. pneumophila* 臨床分離株の SBT を行ったところ53の遺伝子型に分かれ、型別能を示すIODは0.979となった (Amemura-Maekawa J, et al. 2010. J Med Microbiol 59:653-9)。諸外国の臨床分離株の IOD は、英国で0.901 (Harrison TG, et al. 2009. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28:781-91)、アメリカで0.946 (Kozak, NA et al. 2009. J Clin Microbiol 47:2525-35)、カナダでは0.964 (Reimer AR, et al. 2010. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 29:191-205) で、日本の臨床分離株の遺伝的多様性が高いことが分かった。

## 2. 研究の目的

培養細胞や、マウスへの感染実験からは、環境分離株も臨床分離株も同様の病原性を示すが、近年発展してきた分子疫学的手法を

用いると、環境に生息する *L. pneumophila* のごく一部が人へ感染することがわかってきた。本研究は、遺伝子型別法を用いて、*L. pneumophila* 臨床分離株と環境分離株を網羅的に解析し、人に感染しうる株がどのような遺伝学的特徴をもっているかを明らかにし、また、人に感染しうる株がどのような環境で生息しているかを調べることにより、レジオネラ症の感染予防に役立てることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 臨床分離株の収集：国立感染症研究所と全国の地方衛生研究所の6支部ブロック代表から構築されるレジオネラレファレンスセンターにおいて、臨床からの菌の分離の必要性を呼びかけるとともに、臨床分離株収集のシステムを構築した。レジオネラの臨床分離株は当研究所へ随時送付された。

(2) 環境分離株の収集：全国各地の環境水のレジオネラ検査を行っている東京都予防医学協会、および株式会社アクアスから浴槽水、冷却塔水等からの分離菌の分与を受けた。土壌分離株は日本各地から分離された菌株を麻布大学・古畑勝則教授から分与された。そのほか一部の環境分離株については臨床分離株同様レジオネラレファレンスセンターを通じて、地方衛生研究所から分与された。

(3) 遺伝子型別法：送付された菌株について、血清群を確認し、DNAを抽出し、EWGLI (European Working Group for Legionella Infections) の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA* の7つの遺伝子座の内部領域が増幅されるように設定した7組のプライマーを用いて、それぞれPCRを行った。PCR産物を精製し、サイクルシーケンス反応を行い、7遺伝子の型別を行い、各菌株の遺伝子型別を行った。必要に応じてEWGLIのSBTデータベースにデータを登録し、新規遺伝子型を有する株を登録すると、新しい番号が付与された。得られた遺伝子型間の関係を図示するために、minimum spanning tree をBioNumerics (Applied Maths社)を用いて作成した。

## 4. 研究成果

(1) 臨床分離株の遺伝子型別：日本各地からの *L. pneumophila* 臨床分離株の遺伝子型別(7遺伝子配列による SBT 法)を行った。335株の臨床分離株が157種類の遺伝子型(ST)に分けられ、SBT法の遺伝子型別法としての有用性が示された。一部の菌株で増幅が不可能だった *neuA* 遺伝子に新しいプライマーが研究期間中に導入されたので、今まで型別できなかった14株についても型別できたのは特筆すべきことである。遺伝子型が多様であっ

た一方、一部特定の ST が多く分離されていて、ST23 (19 株) および ST138 (17 株) は複数の入浴施設における集団感染事例の起原菌となっていた一方で、ST120 (17 株) は集団感染事例がなく、ほとんどが感染源不明事例であった。ST1 (15 株) も集団感染事例はなく、感染源不明、あるいは院内感染事例が多かった。

(2) 環境分離株の遺伝子型別：血清群 1 の環境分離株 251 株（浴槽水由来 96 株、冷却塔水由来 89 株、土壌由来 37 株、噴水・修景水 18 株、シャワー水 8 株、給湯水 3 株）について、遺伝子型別を行った。251 株は 81 種類の遺伝子型に分けられた。臨床分離株に比べて遺伝子型数が少ないのは、冷却塔水の 7 割が 1 つの遺伝子型 (ST1) のためである。

浴槽水分離株 96 株は 種類に分けられ、非常に多様であった。

冷却塔水 89 株は、14 種類に分けられ、ST1(57 株)、および ST1 に遺伝子型が似ているものが 8 割 (72 株) を占め、次いで多かった ST154(4 株) と ST154 に遺伝子型が似ているものが 1 割 (10 株) あった。

噴水・修景水由来 18 株は冷却塔水と同様におよそ 7 割 (13 株) が ST1 だったが、それ以外の遺伝子型の傾向は冷却塔水とは異なっていた。

シャワー水由来 8 株は 5 種類の遺伝子型に分かれ、給湯水由来 3 株は 3 種類の遺伝子型に分かれ、多様であった。

土壌由来 37 株は 13 種類に分かれ、多様性の高い浴槽水、シャワー水、給湯水分離株と、多様性の少ない冷却塔水、噴水・修景水分離株の間であった。ST48 が 9 株、ST739 が 6 株と多く、他の由来の環境分離株ではすべて存在した ST1 が見られなかった。

(3) Minimum spanning tree 法による解析：血清群 1 の臨床分離株および環境分離株の遺伝子型について、遺伝子型間の関係を見るために、minimum spanning tree 法による解析を行ったところ、大きく 10 の遺伝的グループに分けられた。浴槽水分離株が多い B1、B2、B3、土壌分離株が多い S1、S2、S3、冷却塔水分離株が多い C1 (ST1 グループ)、C2 (ST154 グループ)、および由来がさまざまなグループ U である (図 1)。シャワー水は、B、C、S、U グループに散らばり、遺伝的傾向が一定しなかった。噴水・修景水はおよそ 7 割が ST1 (C1 グループ) となったが、それ以外は S、U グループなどに分散した。

臨床分離株はすべてのグループに存在したが、入浴施設が感染源と推定される患者分離株は B グループが過半数を占めたが、S グループに属する菌株も一部見られた (図 2)。これは土などに混じって *L. pneumophila* が浴槽水に混入している可能性を示唆する。感染源不明の患者分離株は S グループあるいは U グループが多かった。本研究期間中に、土

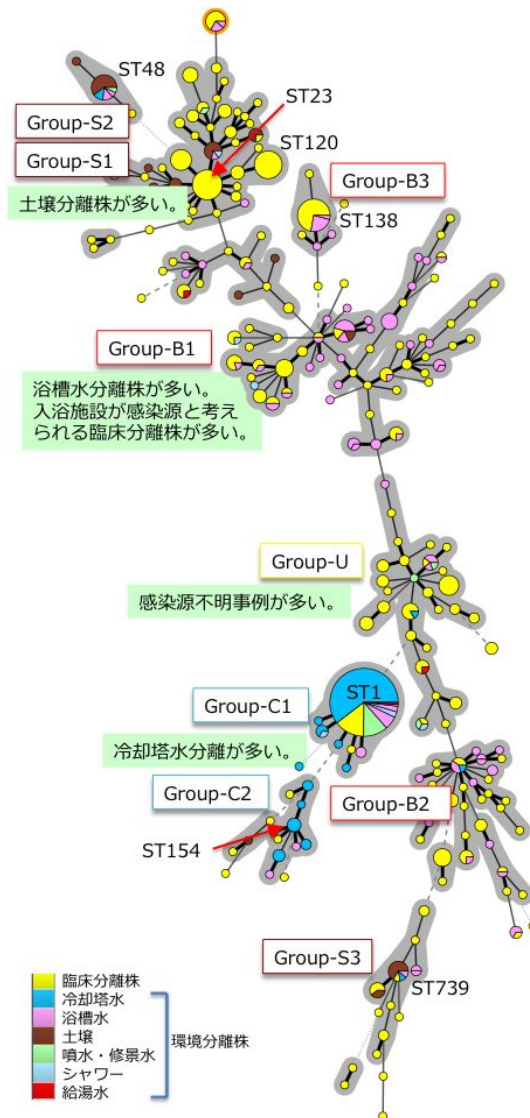


図 1 *L. pneumophila* 血清群 1 株の minimum spanning tree 解析

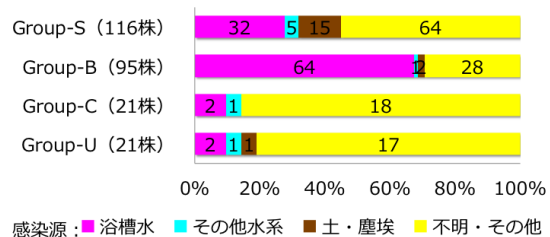


図 2 各遺伝子型グループに属する臨床分離株 (253 株) の実際の推定/確定感染源

もレジオネラ症の感染源となりうるものが周知されるようになったが、推定感染源が畑仕事などの場合、8 割以上の菌株が実際に S グループに属していた (図 2)。

以上のように臨床分離株の遺伝子型により感染源の類推ができることが示された。このことは本研究で初めて明らかとなった成果である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nishizuka M, Suzuki H, Ara T, Watanabe M, Morita M, Sato C, Tsuchida F, Seto J, Amemura-Maekawa J, Kura F, Takeda H. A case of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 12 and treated successfully with imipenem. *J Infect Chemother*. 査読有り, 2014, 20:390-3

市原祥子・江藤良樹・濱崎光宏・村上光一・竹中重幸・堀川和美・西原千鶴子・荒牧明世・前川純子:患者及び浴場施設検体から複数血清群の *Legionella pneumophila* が分離された事例について. 2012. 福岡県保健環境研究所年報、査読有り、2012、第 39 号、76-80.

Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F; Working Group for *Legionella* in Japan. 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*. 査読有り, 2012. 12:4263-70.

### 〔学会発表〕(計 6 件)

前川純子、倉 文明、渡辺祐子、金谷潤一、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司、大西 真. 新しい *neuA* プライマーによる *Legionella pneumophila* 臨床分離株の sequence-based typing (SBT). 第 88 回日本感染症学会. 2014 年 6 月, 福岡.

Junko Amemura-Maekawa, Michiko Koyano, Toshio Yamazaki, Miyo Murai, Makoto Ohnishi, and Fumiaki Kura. Identification of *Legionella pneumophila* subspecies in clinical environmental isolates in Japan using the microplate DNA-DNA hybridization method. The 8th international conference on *Legionella*, Melbourne Australia, Oct.-Nov., 2013.

Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Keiko Kimata, Tomoko Shima, Miwako Sshimuzu, Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Tetsutaro Sata, Masanori Watahiki. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. The 8th international conference on *Legionella*, Melbourne

Australia, Oct.-Nov., 2013.

前川純子、倉 文明、渡辺祐子、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司、大西 真. *Legionella pneumophila* 臨床分離株の遺伝子解析による分類. 第 87 回日本感染症学会. 2013 年 6 月, 横浜.

前川純子、倉 文明、渡辺祐子、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司、大西 真. *Legionella pneumophila* 血清群 1 環境分離株の遺伝子解析による分類. 第 87 回日本感染症学会. 2013 年 6 月, 横浜.

Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Hiroyuki Tawara, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima Shuji Yoshino, Shinjiro Abe, Takako Misaki, Tomoe Shimada, Taku Wakui, Yuki Tada, Makoto Ohnishi. Grouping of clinical isolates of *Legionella pneumophila* SG1 in Japan, using SBT analysis and environmental habitats. ESGLI 2012 (1st Meeting of the ESCMID Study Group for *Legionella* Infections), Dresden, Germany, Sep. 2012.

### 〔その他〕

前川純子、倉 文明、渡辺ユウ、渡辺祐子、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司. レジオネラ臨床分離株の型別 - レファレンスセンター活動報告として IASR, 2013, 6:161-3.

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2252/400/3599-dj4004.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前川純子 (Amemura-Maekawa, Junko)  
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号: 20238843