

氏名(本籍)	金谷潤一(富山県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第24号
学位授与年月日	平成26年11月12日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	Molecular epidemiology of <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 isolates from sputum specimens and environmental sources in Toyama Prefecture, Japan (富山県内で分離された患者および環境由来レジオネラ・ニューモフィラ血清群1の分子疫学解析)
論文審査委員	(主査) 古畑勝則 (副査) 岩橋和彦 小西良子

論文内容の要旨

レジオネラ症は、レジオネラ属菌が原因で引き起こされる感染症で、インフルエンザ様の熱症状を示すポンティアック熱と、重症化しやすいレジオネラ肺炎の2つの病型がある。ポンティアック熱は数日で回復する場合がほとんどである。一方、レジオネラ肺炎は2～10日の潜伏期を経て、悪寒、39℃以上の高熱、頭痛、筋肉痛などが起こり、呼吸困難、意識障害の症状がしばしば現れ、まれに死亡することもある。現在まで、レジオネラ肺炎の原因となるレジオネラ属菌の病原遺伝子は報告されておらず、重症化の原因は解明されていない。

2013年には全国で1,124人の患者が報告され、そのうち富山県内の患者数は39人であった。月別に見ると、レジオネラ症患者報告数は梅雨時の7月に最も多かった。富山県の罹患率(人口10万人対)は、全国平均0.88に比べ3.57を記録しており全国で最も高い県であり、この傾向は2005年以降続いている。また、富山県内での過去10年間の罹患率を地域別に見ると、県西部が20.8、県東部が12.0となり、県西部で高い傾向にある。

レジオネラ属菌は、土壌や河川などの自然環境だけでなく、入浴施設や冷却塔など人工的な環境からも広く検出される。これまでレジオネラ属菌は58菌種が報告されているが、レジオネラ症患者から分離されるレジオネラ属菌の8割以上が*Legionella pneumophila*血清群1である。

国立感染症研究所の感染症サーベイランスシステムによると、国内におけるレジオネラ症患者の主な感染源は浴用施設である。富山県において、疫学調査によって感染源を推定できた患者は約半数であり、そのほとんどが浴用施設であったが、疫学調査が十分実施できない場合もあり、その他の患者の感染源は不明の場合が多い。国内における患者由来株については、国立感染症研究所で

Sequence-Based Typing (SBT) による遺伝子解析が行われているが、中でも患者由来株の 5.3%を占める遺伝子型である *L. pneumophila* 血清群 1 の ST120 はこれまで環境由来株として分離された報告はなく、この株に感染した患者の感染源は不明である。近年の報告では、浴用施設、冷却塔、土壌などの環境中からレジオネラ属菌が多数分離され、遺伝子解析が行われている。しかしながら、アスファルト道路の水たまりについては、1年を通して気温や周囲の環境などの条件を加えた調査は実施されておらず、水たまりにおけるレジオネラ属菌の詳細な分布は不明である。また、水たまりが感染源になりうる可能性について、分離菌を用いた詳細な分子疫学解析も行われていない。

そこで本研究では、レジオネラ症患者の浴用施設以外の感染源を解明するため、アスファルト道路の水たまりからのレジオネラ属菌の検出と、分離された *L. pneumophila* 血清群 1 について、当所に保存されている患者および浴用水由来株も含めて分子疫学的解析を行い、以下の結果を得た。

1) 2010年11月～2011年10月にかけて、月に1度、雨天の当日あるいは翌日に、県内6か所のアスファルト道路の水たまりから採水した。これら検体からのレジオネラ属菌の検出率は47.8% (33/69検体)であった。地域による検出率に偏りは見られず、レジオネラ属菌は6か所のすべての地点から検出された。陽性であった33検体の菌数は、10～90 CFU/100 ml が18検体、100～990 CFU/100 ml が14検体、1,000 CFU/100ml以上が1検体であった。気温20℃を基準に見ると、検出率は20℃以上の時(50.0%、12/24検体)と20℃未満の時(46.7%、21/45検体)で有意差はなかったが(χ^2 検定、 $P > 0.05$)、菌数の幾何平均 \pm SD (\log_{10} CFU/100 ml)は 2.30 ± 0.68 (20℃以上)と 1.63 ± 0.47 (20℃未満)となり、気温が高い時の方が有意に高かった(t検定、 $P < 0.05$)。一方で、採水時の平均気温が0℃以下であった1月においても、4/5検体(80.0%)からレジオネラ属菌が検出された。これらの結果から、1年を通してレジオネラ属菌は水たまりに分布しており、気温の高い時期には菌数が増加していることが明らかとなった。

2) 33検体から分離されたレジオネラ属菌325株について菌種同定を行った結果、75.4% (n=245)が*L.pneumophila*であり、その他のレジオネラ属菌が24.6% (n=80)であった。これらのうち、無作為に選択したの31株について16S rRNA 遺伝子のシークエンスを行ったところ、*L. gresilensis*が22株(71.0%)、*L.longbeachae*が6株(19.4%)、このほか*L. oakridgensis*、*L. sainthelensi*、*L. waltersii*がそれぞれ1株(3.2%)分離された。また血清型別においては、分離された245株の*L. pneumophila*のうち、国内の患者由来株の8割以上を占める血清群1が26検体から62株(25.3%)分離され、最も多かった。次いで血清群5が56株(22.9%)、血清群8が50株(20.4%)分離された。以上のことから、水たまりにはレジオネラ症の原因となる*L. pneumophila* 血清群1をはじめとした様々な菌種が分布しており、市中肺炎の原因として重要であることが明らかとなった。

3) 水たまり由来62株および当所保存78株(浴用水由来51株、患者由来19株、冷却塔水由来5株、シャワー水由来3株)の*L.pneumophila* 血清群1は、SBTによって74種類の遺伝子型(ST)に分類された。このうち、過去に報告されたことのない富山県特有の遺伝子型であるST505が9株(浴用水

由来 5 株、患者由来 4 株) 分離され、最も多かった。この 9 株は Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) によるバンドパターンの比較でも、3 株に 2 バンドの違いが認められたが、同一クローンであると考えられた。このうち、ST505 が分離された患者 3 名は、いずれも感染が疑われる時期に浴用施設を利用しており、患者由来 2 株は利用した浴用施設から分離された株と PFGE によるバンドパターンがそれぞれ一致した。また、ST505 が検出された患者の住所および浴用施設の所在地は、すべて県西部にある河川に沿って分布していた。これらの結果から、富山県特有の遺伝子型である ST505 が県西部の河川を中心とする地域に広く分布しており、県西部でレジオネラ症患者罹患率が高い原因の 1 つであると考えられた。

SBT 型別で次に多かった遺伝子型は、土壌からも最も多く分離される遺伝子型である ST48 (水たまり由来 7 株、冷却塔水由来 1 株) と、環境検体から過去に報告されたことのない ST120 (水たまり由来 7 株、患者由来 1 株) であり、それぞれ 8 株が該当した。水たまり由来 ST48 は 4 か所、ST120 は 3 か所の採水地点から分離された。また、ST48 は 2010 年 11 月、2011 年 2 月、5 月、6 月から、ST120 は 2010 年 11 月、2011 年 1 月、5 月からそれぞれ分離された。なお、今回 ST120 が分離された患者 1 名は、疫学調査においても浴用施設を利用していなかった。これらの結果から、水たまりから検出された ST には地域・季節による特徴はなく、環境由来株としてこれまで報告のなかった遺伝子型 (ST120) の *L. pneumophila* 血清群 1 が水たまりには広く分布していたことから、患者の感染源となりうる事が明らかとなった。

4) 水たまり由来 62 株の *L. pneumophila* 血清群 1 について *lag-1* 遺伝子の検出を行った。本遺伝子は、環境由来株に比べて患者由来株で有意に高い割合で保有されており、レジオネラ症に関連すると考えられている。PCR の結果、59.7% (37/62 株) が *lag-1* 遺伝子を保有していた。ST 別に検出率を見ると、ST120 の 8 株はすべて保有していたのに対し、ST48 の 8 株はすべて保有していなかった。したがって、水たまり由来株の半数以上が *lag-1* 遺伝子を保有していたこと、ST と *lag-1* 遺伝子の保有率に関連があることが明らかとなった。

5) 140 株 (水たまり由来 62 株および当所保存 78 株) の *L. pneumophila* 血清群 1 を対象とし、菌株間の遺伝学的関係を推定する解析ソフトである eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net/>) を用いて SBT による系統解析を行った。SBT で解析する 7 遺伝子のうち、3 遺伝子以内の Variant を Clonal Group (CG) とした。系統解析の結果、全体の 80.0% (112/140 株) が 8 つの CG [CG1 (n=46)、CG2 (n=28)、CG3 (n=19)、CG4 (n=6)、CG5 (n=5)、CG6 (n=4)、CG7 (n=2)、CG8 (n=2)] を形成した。水たまり由来株の 66.1% (41/62 株) は、主に CG1 と CG4 の 2 つの CG を形成し、CG1 には水たまり由来株の 58.1% (36/62 株)、CG4 には 8.1% (5/62 株) が含まれた。一方、浴用水由来株の 74.5% (38/51 株) は CG2 と CG3 の異なる 2 つの CG を形成し、CG2 には浴用水由来株の 49.0% (25/51 株)、CG4 には 25.5% (13/51 株) が含まれた。また、患者由来株は 5 つの CG に分類され、CG1 には患者由来株の 47.4% (9/19 株)、CG2 には 15.8% (3/19 株)、CG3 には 26.3% (5/19 株)、CG4 と CG5 にはそれぞれ 5.3% (1/19 株) が含まれた。これらの結果から、*L. pneumophila* 血清群 1 は生

息環境により遺伝子型に特徴があり、患者由来株の解析から感染源が推定できる可能性が示唆された。

上述のように、気温や場所に関わらず 1 年を通してレジオネラ属菌は水たまりから検出され、気温の高い時期には菌数が増加していることが明らかとなった。また、水たまりにはレジオネラ症の原因となる *L. pneumophila* 血清群 1 をはじめとした様々な菌種が分布しており、市中肺炎の原因として重要である。遺伝子型別の結果では、富山県特有の遺伝子型である ST505 が浴用水および患者から広く検出され、しかも県西部にある河川に沿って分布していたことから、県西部で患者罹患率が高い原因の 1 つであると考えられた。水たまりは、環境由来株としてこれまで報告のなかった遺伝子型の ST120 に該当する *L. pneumophila* 血清群 1 が地域・季節に関連なく広く分布している環境検体であり、レジオネラ症の感染源となりうることが明らかとなった。さらに、水たまり由来株の半数以上が *lag-1* 遺伝子を保有していたことも感染源となりうることを裏付けていた。系統解析による結果では、*L. pneumophila* 血清群 1 は生息環境により遺伝子型に特徴が見られ、患者由来株の解析から感染源が推定できる可能性が示唆された。以上のように、富山県特有の遺伝子型である ST505 の分布状況と、県西部で患者罹患率が高いこととの関連性を明らかにすることができた。また、水たまりは、レジオネラ症の感染源となりうる環境検体であるとの結論に達した。

論文審査の結果の要旨

レジオネラ症は、レジオネラ属菌が原因で引き起こされる感染症で、インフルエンザ様の熱症状を示すポンティアック熱と、重症化しやすいレジオネラ肺炎の 2 つの病型がある。2013 年には全国で 1,124 人の患者が報告され、そのうち富山県内の患者数は 39 人であった。月別にみると、レジオネラ症患者報告数は梅雨時の 7 月が最も多かった。富山県の罹患率（人口 10 万人対）は 3.57 と全国で最も高い県であり（全国平均 0.88）、この傾向は 2005 年以降続いている。また、過去 10 年間の罹患率を地域別にみると、県西部が 20.8、県東部が 12.0 であり、県西部で高い傾向にある。

国立感染症研究所の感染症サーベイランスシステムによると、国内におけるレジオネラ症患者の主な感染源は浴用施設である。富山県においては、疫学調査によって感染源を推定できた患者は約半数であり、そのほとんどが浴用施設であった。しかし、疫学調査が十分実施できない場合もあり、その他の患者の感染源は不明の場合が多い。国内における患者由来株については、国立感染症研究所で Sequence-Based Typing (SBT) による遺伝子解析が行われている。中でも患者由来株の 5.3% を占める遺伝子型である ST120 は、これまで環境由来株として分離された報告はなく、この株に感染した患者の感染源は不明であった。

近年の報告では、*Legionella pneumophila* 血清群 1 がアスファルト道路の水たまりからも分離されているが、1 年を通して気温や周囲の環境などの条件を加えた調査は実施されておらず、水たまりにおけるレジオネラ属菌の詳細な分布は不明である。また、水たまりが感染源になりえる可能性について、分離菌を用いた詳細な分子疫学解析も行われていない。

そこで著者は、レジオネラ症患者の浴用施設以外の感染源を解明するため、アスファルト道路の水たまりからのレジオネラ属菌の検出と、分離された *L. pneumophila* 血清群 1 について、患者および浴用水由来保存株も含めて分子疫学的解析を行った。その概要は以下のとおりである。

1) 2010 年 11 月～2011 年 10 月にかけて、月に 1 度、雨天の当日あるいは翌日に、県内 6 か所のアスファルト道路の水たまりから採水した。これら検体からのレジオネラ属菌の検出率は 47.8% (33/69 検体) であった。地域による検出率に偏りはみられず、レジオネラ属菌は 6 か所のすべての地点から検出した。陽性であった 33 検体の菌数は、10～90CFU/100ml が 18 検体、100～990 CFU/100 ml が 14 検体、1,000CFU/100ml 以上が 1 検体であった。気温 20℃を基準にみると、20℃以上の検出率 (50.0%、12/24 検体) と 20℃未満の検出率 (46.7%、21/45 検体) では有意差はなかったが (χ^2 検定、 $P > 0.05$)、菌数の幾何平均 \pm SD (\log_{10} CFU/100ml) は 2.30 ± 0.68 (20℃以上) と 1.63 ± 0.47 (20℃未満) となり、気温が高い時の方が有意に高かった (t 検定、 $P < 0.05$)。一方で、採水時の平均気温が 0℃以下であった 1 月においても、80.0% (4/5 検体) からレジオネラ属菌が検出された。これらの結果から、1 年を通してレジオネラ属菌は水たまりに分布しており、気温の高い時期には菌数が増加していることを明らかにした。

2) 33 検体から分離されたレジオネラ属菌 325 株について菌種同定を行った結果、75.4% (n = 245) が *L.pneumophila* であり、その他のレジオネラ属菌が 24.6% (n = 80) であった。これらのうち、無作為に選択した 31 株について 16S rRNA 遺伝子のシーケンスを行ったところ、*L. gresilensis* が 22 株 (71.0%)、*L. longbeachae* が 6 株 (19.4%)、このほか *L. oakridgensis*、*L. sainthelensi*、*L. waltersii* がそれぞれ 1 株 (3.2%) 分離された。また血清型別においては、分離された 245 株の *L. pneumophila* のうち、国内の患者由来株の 8 割以上を占める血清群 1 が 26 検体から 62 株 (25.3%) 分離され、最も多かった。次いで血清群 5 が 56 株 (22.9%)、血清群 8 が 50 株 (20.4%) 分離された。以上のことから、水たまりにはレジオネラ症の原因となる *L. pneumophila* 血清群 1 をはじめとした様々な菌種が分布しており、市中肺炎の原因として重要であることが判明した。

3) 水たまり由来 62 株および 78 保存株 (浴用水由来 51 株、患者由来 19 株、冷却塔水由来 5 株、シャワー水由来 3 株) の *L.pneumophila* 血清群 1 は、SBT によって 74 種類の遺伝子型 (ST) に分類された。このうち、過去に報告されたことのない富山県特有の遺伝子型である ST505 が 9 株 (浴用水由来 5 株、患者由来 4 株) 分離され、最も多かった。この 9 株は Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) によるバンドパターンの比較でも、3 株に 2 バンドの違いが認められたが、同一クローンであると考えられた。このうち、ST505 が分離された患者 3 名は、いずれも感染が疑われる時期に浴用施設を利用しており、患者由来 2 株は利用した浴用施設から分離された株と PFGE によるバンドパターンがそれぞれ一致した。また、ST505 が検出された患者の住所および浴用施設の所在地は、すべて県西部にある河川に沿って分布していた。これらの結果から、富山県特有の遺伝子型である ST505 が県西部の河川を中心とする地域に広く分布しており、県西部でレジオネラ症の罹患率が高い原因の 1 つである

と考えられた。

SBT 型別で次に多かった遺伝子型は、土壌から最も多く分離される遺伝子型である ST48（水たまり由来 7 株、冷却塔水由来 1 株）と、環境検体から過去に報告されたことのない ST120（水たまり由来 7 株、患者由来 1 株）であり、それぞれ 8 株が該当した。水たまり由来 ST48 は 4 か所、ST120 は 3 か所の採水地点から分離された。また、ST48 は 2010 年 11 月、2011 年 2 月、5 月、6 月から、ST120 は 2010 年 11 月、2011 年 1 月、5 月からそれぞれ分離された。なお、今回 ST120 が分離された患者 1 名は、疫学調査においても浴用施設を利用していなかった。これらの結果から、水たまりから検出された ST には地域・季節による特徴はなく、環境由来株としてこれまで報告のなかった遺伝子型（ST120）の *L. pneumophila* 血清群 1 が水たまりには広く分布していたことから、レジオネラ症の感染源となりえることを明らかにした。

4) 水たまり由来 62 株の *L. pneumophila* 血清群 1 についてレジオネラ症と関連のある *lag-1* 遺伝子の検出を行った。PCR の結果、分離株のうち、59.7% (37/62 株) が *lag-1* 遺伝子を保有していた。ST 別に検出率をみると、ST120 の 8 株はすべて保有していたのに対し、ST48 の 8 株はいずれも保有していなかった。したがって、水たまり由来株の半数以上が *lag-1* 遺伝子を保有しており、ST と *lag-1* 遺伝子の保有率に関連がみられた。

5) 140 株（水たまり由来 62 株および 78 保存株）の *L. pneumophila* 血清群 1 を対象として菌株間の遺伝学的関係を推定する解析ソフトである eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net/>) を用いて SBT による系統解析を行った。SBT で解析する 7 遺伝子のうち、3 遺伝子以内の Variant を Clonal Group (CG) とした。系統解析の結果、全体の 80.0% (112/140 株) が 8 つの CG [CG1 (n=46)、CG2 (n=28)、CG3 (n=19)、CG4 (n=6)、CG5 (n=5)、CG6 (n=4)、CG7 (n=2)、CG8 (n=2)] を形成した。水たまり由来株の 66.1% (41/62 株) は、主に CG1 と CG4 の 2 つの CG を形成し、CG1 には水たまり由来株の 58.1% (36/62 株)、CG4 には 8.1% (5/62 株) が含まれた。一方、浴用水由来株の 74.5% (38/51 株) は CG2 と CG3 の異なる 2 つの CG を形成し、CG2 には浴用水由来株の 49.0% (25/51 株)、CG4 には 25.5% (13/51 株) が含まれた。また、患者由来株は 5 つの CG に分類され、CG1 には患者由来株の 47.4% (9/19 株)、CG2 には 15.8% (3/19 株)、CG3 には 26.3% (5/19 株)、CG4 と CG5 にはそれぞれ 5.3% (1/19 株) が含まれた。これらの結果から、*L. pneumophila* 血清群 1 は生息環境により遺伝子型に特徴があり、患者由来株の解析から感染源が推定できる可能性を示唆した。

上述のように、著者は気温や場所に関わらず 1 年を通してレジオネラ属菌が水たまりから検出され、気温の高い時期には菌数が増加していることを明らかにした。また、水たまりにはレジオネラ症の原因となる *L. pneumophila* 血清群 1 をはじめとした様々な菌種が分布しており、市中肺炎の原因として重要である。遺伝子型別の結果では、富山県特有の遺伝子型である ST505 が浴用水および患者から広く検出され、しかも県西部にある河川に沿って分布していたことから、県西部で罹患率が高い原因の 1 つであると考えられた。水たまりは、環境由来株としてこれまで報告のなかった遺伝子型である ST120

の *L.pneumophila* 血清群 1 が地域・季節に関連なく広く分布している環境検体であり、レジオネラ症の感染源となりえることが明らかとなった。また、水たまり由来株の半数以上が *lag-1* 遺伝子を保有していたことも水たまりが感染源である可能性を支持した。SBT の系統解析結果において、*L.pneumophila* 血清群 1 は生息環境により遺伝子型に特徴がみられ、患者由来株の SBT 解析は感染源を推定するために有用であった。以上のように、富山県特有の遺伝子型である ST505 の分布状況と、県西部で罹患率が高いこととの関連性を明らかにした。また、水たまりは、レジオネラ症の感染源となりえる環境検体であるとの結論に達した。

このように、本学位申請論文は、*L. pneumophila* を起因菌とするレジオネラ症の公衆衛生学および疫学の基礎的研究の発展に貢献するものであり、それ故に博士（学術）を授与するにふさわしい研究論文であると審査員一同判断した。