

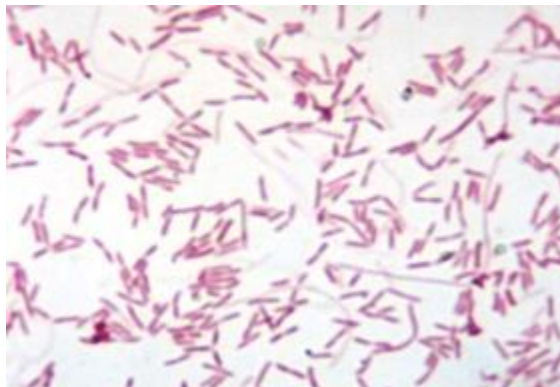
平成24年度生活衛生関係技術担当者研修会
2013. 3. 12

*Legionella pneumophila*の遺伝子型の グループ化と生息環境との対応

国立感染症研究所
細菌第一部
前川純子

Legionella pneumophila

- ・レジオネラ症（レジオネラ肺炎、ポンティアック熱）の主な起因菌。
- ・血清群1が最も多い。
- ・環境中に広く生息。
- ・冷却塔や循環式浴槽、温泉などがヒトへの感染源となる。



L. pneumophila の
グラム染色像
(X1,000)

グラム陰性好気性桿菌
細胞内寄生性

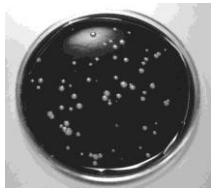
どこから、どんな遺伝子型の菌株が分離されるか



遺伝子型によるカタログ作り



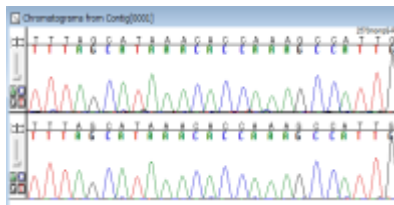
Sequence-based typing (SBT)法



L. pneumophila のコロニーから
DNAを取り出す。



特定（7カ所）のDNA断片を
PCR法で増幅する。



DNA断片の塩基配列を読み取り、
配列の違いに応じて番号をつける。

例) (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*)

= (2, 3, 9, 10, 2, 1, 6) ST23

Legionella pneumophila Sequence-Based Typing

Welcome to the EWGLI **Sequence-Based Typing (SBT) Database** for *Legionella pneumophila*

A consensus Sequence-Based Typing (SBT) epidemiological typing scheme for clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* has been developed by members of the European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) and evaluated for implementation in the investigation of outbreaks of legionellosis caused by *L. pneumophila*.

Using the SBT protocol, the SBT database (version 3.0) allows assignment of the seven ordered alleles, *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, and *neuA* as described by Gaia *et al.* (2005) and Ratzow *et al.* (2007), represented as a Sequence Type (ST), or allelic profile, of the ordered string of allele numbers separated by commas e.g. 1,4,3,1,1,1,1.

The curators encourage the submission of putative new alleles. Submission of putative new alleles can be made via the [Sequence Quality Tool](#) or by the New Allele Submission link (Options menu, left), which examines the forward and reverse chromatogram files. Subject to verification by the curators, a new allele number will be assigned and added to the database. If the curators are unable to verify a new allele, the strain or genomic DNA may be requested to allow sequencing by another designated centre. Submission of strains bearing new allele numbers to the EUL culture collection is strongly encouraged.

2013年2月22日現在 [Norman Fry](#) for further details.

Total number of entries:	6875
Number of Sequence Types :	1416
Number of <i>flaA</i> alleles:	36
Number of <i>pilE</i> alleles:	45
Number of <i>asd</i> alleles:	61
Number of <i>mip</i> alleles:	66
Number of <i>mompS</i> alleles:	78
Number of <i>proA</i> alleles:	44
Number of <i>neuA</i> alleles:	47
Number of <i>neuAh</i> alleles:	20

Sample source, total number of records 6875




http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage_body.php



Provided by The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) in conjunction with



The Health Protection Agency and  The European Centre for Disease Prevention and Control

日本国内から分離された
*L. pneumophila*血清群1、225株の
遺伝子型を調べた。

浴槽水分離株	94株
冷却塔水分離株	78株
土壌分離株	34株
噴水・修景水分離株	11株
シャワー水分離株	6株
加湿器分離株	2株

環境分離株の由来により遺伝子型の多様性が異なる。

		遺伝子型	
浴槽水分離株	94株	53種類	} 78種類
冷却塔水分離株	78株	14種類	
土壌分離株	34株	11種類	
噴水・修景水分離株	11株	3種類	
シャワー水分離株	6株	6種類	
加湿器分離株	2株	2種類	

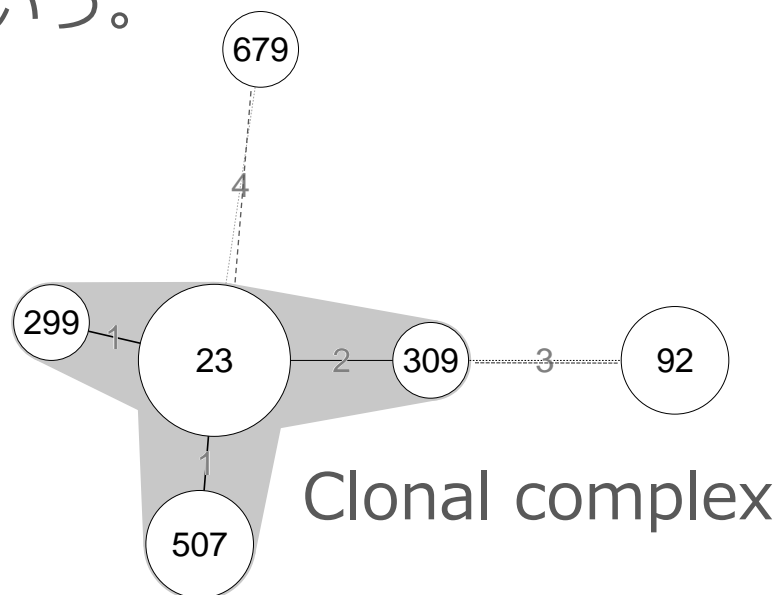
環境分離株の由来による遺伝子型の分布

遺伝子型 (ST)	浴槽水	冷却塔水	土壌	噴水・修景水	シャワー	加湿器	計
1	10	56		9	1	1	77
48	3	2	9				14
129	7		2				9
739	1	1	6				8
22			5		1		6
138	6						6
98	6						6
154		4					4
89	3						3
127	3						3
448			3				3
598		3					3
599	3						3
18		2			1		3
52	2						2
59	2						2
86	2						2
128	2						2
136	2						2
141	2						2
15		2					2
26	2						2
352			2				2
445			2				2
566	2						2
593			2				2
986		2					2
45			1				1
92	1						1
122	1						1
124	1						1
125	1						1
131	1						1
137	1						1
159	1						1
161		1					1
162	1						1
163		1					1
164	1						1

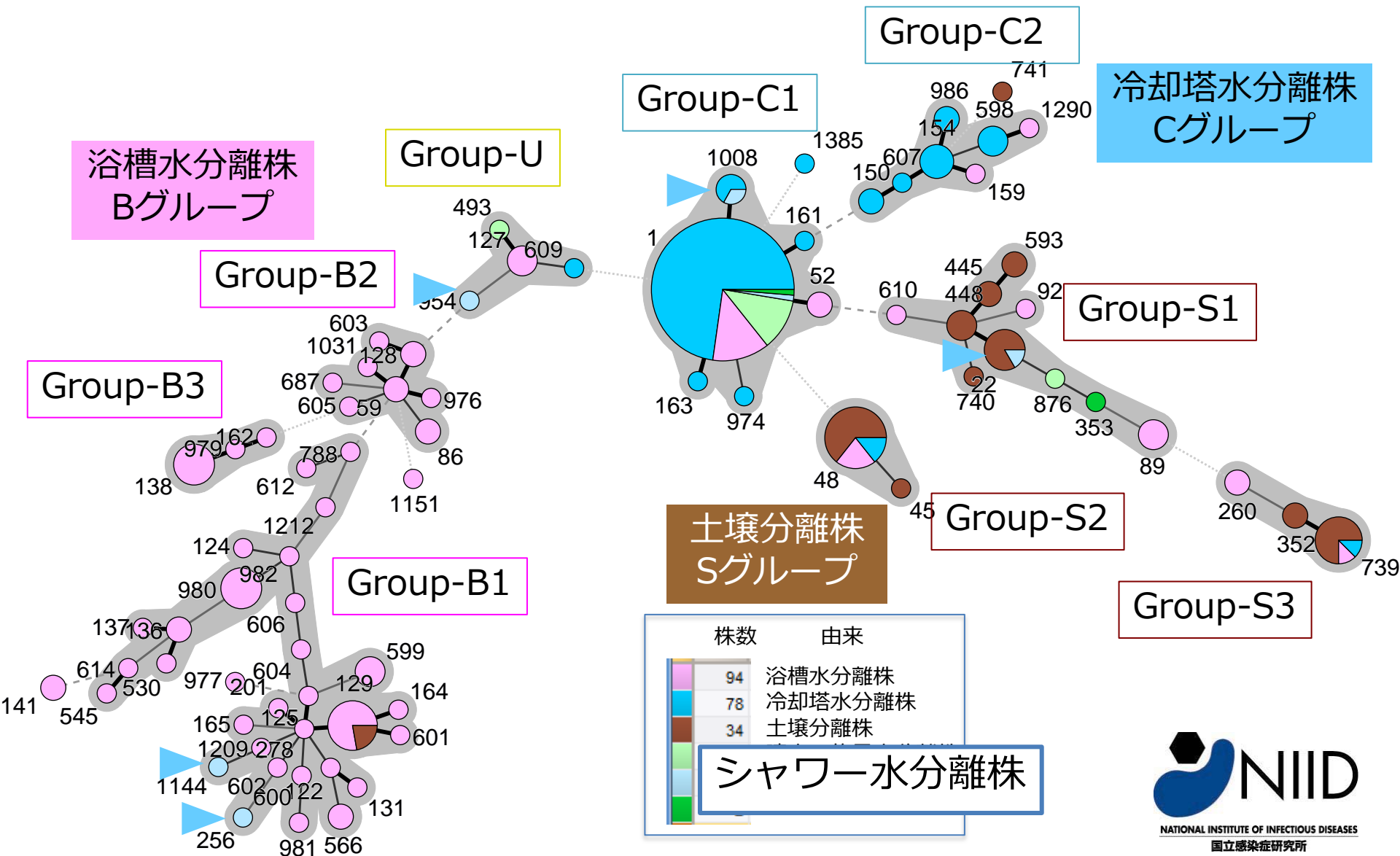
遺伝子型 (ST)	浴槽水	冷却塔水	土壌	噴水・修景水	シャワー	加湿器	計
165	1						1
21	1						1
256					1		1
278	1						1
353						1	1
493				1			1
53	1						1
545	1						1
6	1						1
61	1						1
62	1						1
63	1						1
64	1						1
65	1						1
66	1						1
67		1					1
69		1					1
61	1						1
612	1						1
614	1						1
687	1						1
74			1				1
741			1				1
788	1						1
876				1			1
954					1		1
974		1					1
976	1						1
977	1						1
979	1						1
981	1						1
982	1						1
131	1						1
1144					1		1
1151	1						1
129	1						1
1212	1						1
129	1						1
1385		1					1
計	94	78	34	11	6	2	225

遺伝子型(ST)間の類縁関係を解析する。 —minimum spanning tree法—

- 似ているST同士を各遺伝子の差異数に比例した長さの“枝”で結び、枝の長さの総長が細小になるようにする。
- 数字はST型を示し、円の大きさは、株数に比例する。
- 隣り合う遺伝子座の違いが2つ以下のSTの集団をclonal complexという。



L. pneumophila SG1環境分離株225株の minimum spanning tree



全国の地方衛生研究所の各地区の代表と国立感染症研究所からなる 衛生微生物技術協議会レジオネラ・レファレンスセンター

2007年8月からレジオネラ臨床
分離株の収集を行なっている。

岡山県環境保健センター
細菌科

富山県衛生研究所
細菌部

仙台市衛生研究所
微生物課

宮崎県衛生環境研究所
微生物部

国立感染症研究所
細菌第一部

神奈川県衛生研究所
微生物部

神戸市環境科学保健研究所
微生物部



レジオネラレファレンスセンターにおける 収集臨床分離株の内訳

2012年5月末日現在

<i>L. pneumophila</i>	219株 (97%)	<i>L. feeleii</i>	1株 (0.4%)
SG1	183株 (84.7%)	<i>L. londiniensis</i>	1株 (0.4%)
SG2	5株 (2.2%)	<i>L. longbeachae</i>	4株 (1.8%)
SG3	10株 (4.4%)	<i>L. hygroscopicum</i>	1株 (0.4%)
SG4	2株 (0.9%)		
SG5	6株 (2.7%)		
SG6	7株 (3.1%)		
SG9	2株 (0.9%)		
SG10	1株 (0.4%)		
SG12	1株 (0.4%)		
SG15	1株 (0.4%)		
Untypable	1株 (0.4%)		
計		226株(100%)	

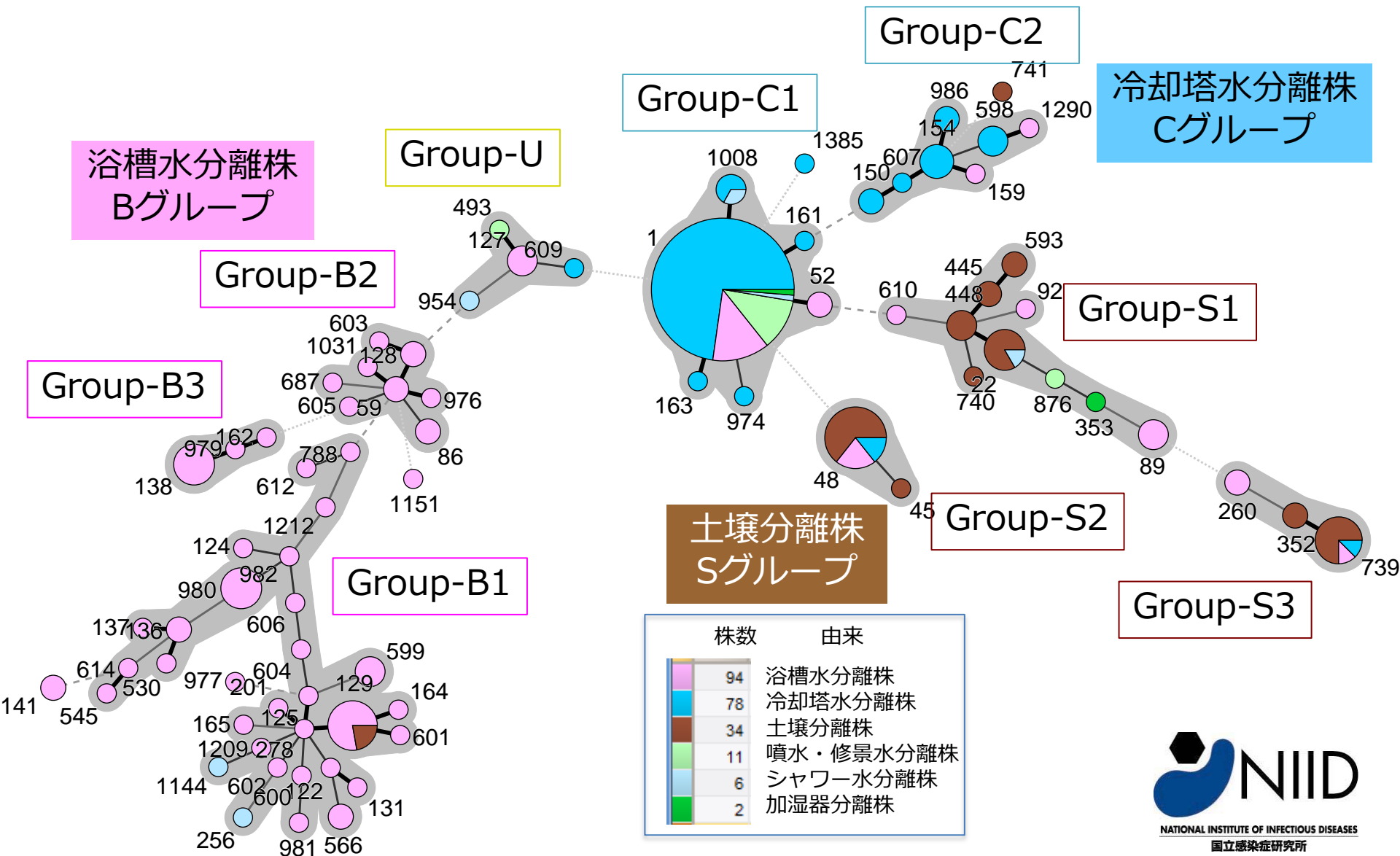
レファレンスセンター発足以前に
収集した34株を追加して解析

SBT法により、217株の*L. pneumophila* SG1 臨床分離株の遺伝子解析をおこなったところ、109種類の遺伝子型に分かれた。

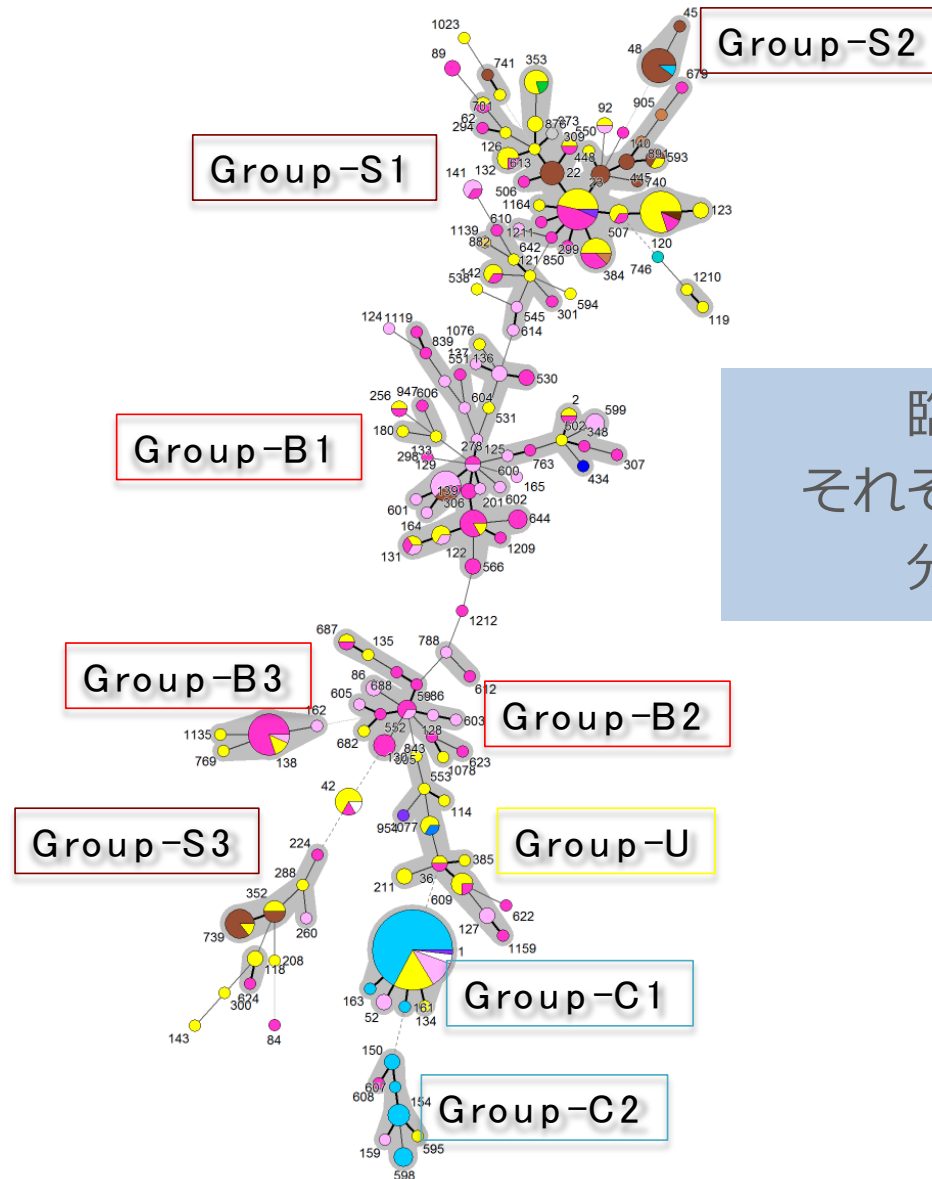
株数	遺伝子型 (ST)	* 2013年2月22日時点で日本固有の型
15	ST23, ST120	
14	ST138*	
12	ST1	
8	ST384*	
6	ST306*, ST42	
5	ST353*	
4	ST132*, ST505*, ST609	
3	ST142*, ST507*, ST644*, ST1077*	
2	ST2, ST36, ST59, ST62, ST89, ST118*, ST122*, ST123*, ST131*, ST139*, ST211, ST256, ST352*, ST530*, ST550*, ST566*, ST687*, ST876*	
1	76 kinds of STs	

IOD 0.979

L. pneumophila SG1環境分離株225株の minimum spanning tree



環境分離株に臨床分離株を加えても、 それぞれのグループは保持された。



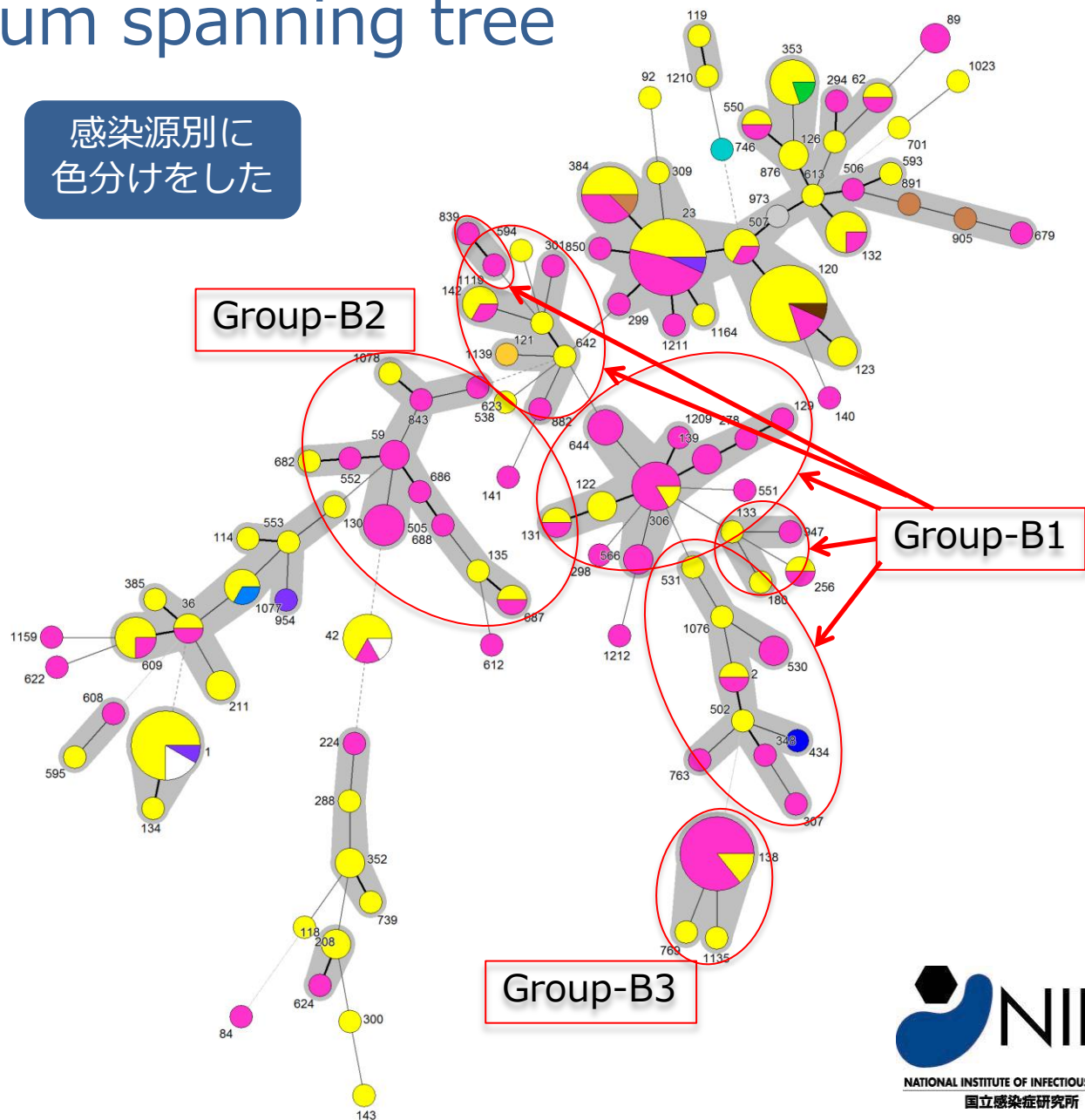
臨床分離株も
それぞれのグループに
分けられる。

L. pneumophila SG1臨床分離株217株の minimum spanning tree

株数 感染源

109	不明
92	浴槽水 (推定/確定)
3	塵埃 (推定)
3	シャワー (推定/確定)
3	院内 (推定)
1	津波 (溺水)
1	プール (推定)
1	土壌 (推定)
1	砂 (推定)
1	エアコン (推定)
1	加湿器 (確定)
1	冷却塔 (推定)

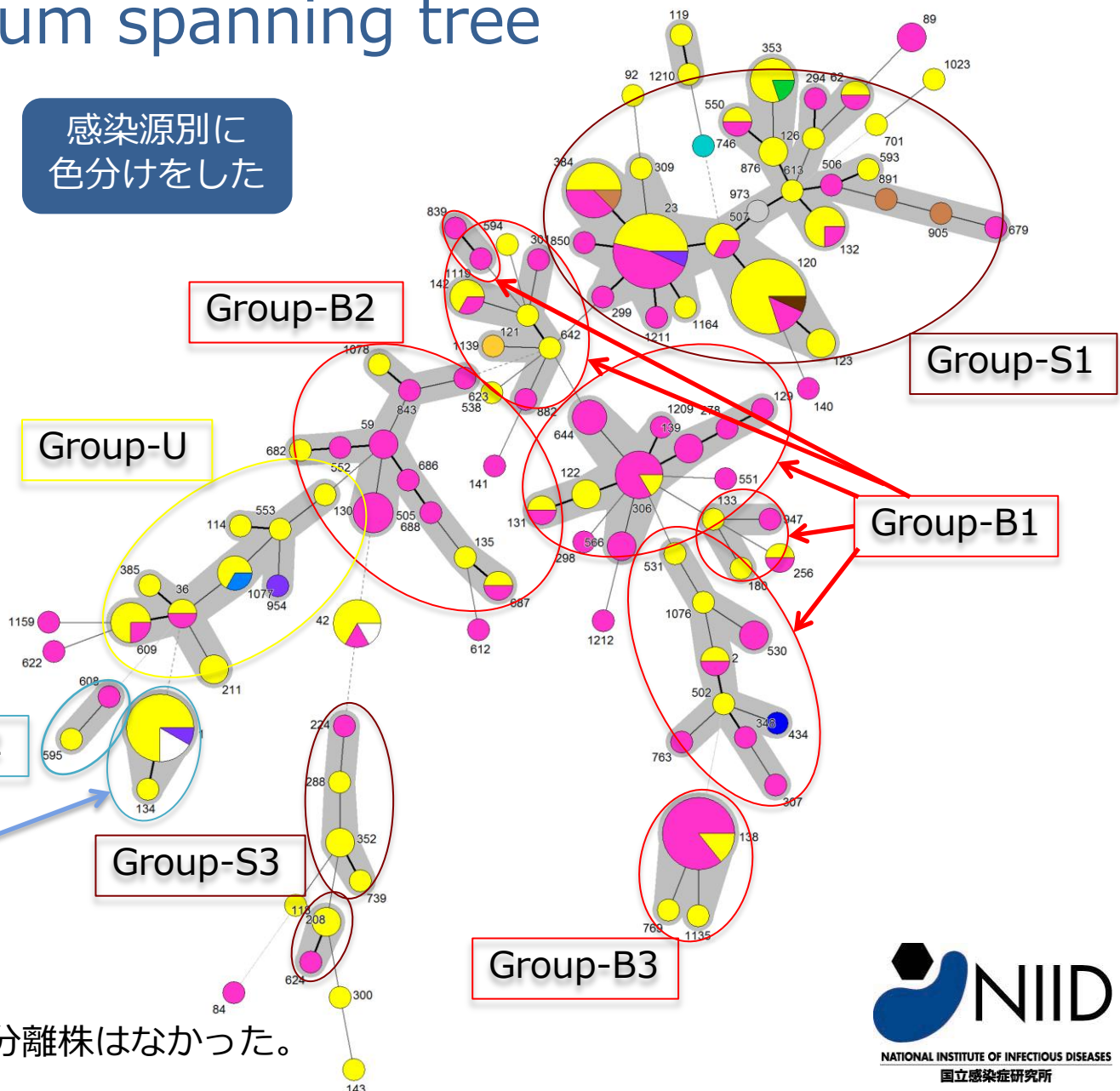
感染源別に
色分けをした



L. pneumophila SG1臨床分離株217株の minimum spanning tree

株数	感染源
109	不明
92	浴槽水 (推定/確定)
3	塵埃 (推定)
3	シャワー (推定/確定)
3	院内 (推定)
1	津波 (溺水)
1	プール (推定)
1	土壌 (推定)
1	砂 (推定)
1	エアコン (推定)
1	加湿器 (確定)
1	冷却塔 (推定)

感染源別に
色分けをした



Group-S2 に属する臨床分離株はなかった。

まとめ

- ◆ レジオネラ症の主要起因菌である*L. pneumophila* 血清群1株は遺伝子型により、浴槽水グループ（B1, B2, B3）、冷却塔水グループ（C1, C2）、土壌グループ（S1, S2, S3）、およびUグループに分けられた。
- ◆ 浴槽水が感染源と考えられる患者からの分離株は、浴槽水グループに属するものが多かった。
- ◆ 感染源不明の臨床分離株の多くが土壌グループに属し、それらについては土壌あるいは土壌が混入した水系からの感染が示唆された。

謝辞とお願い

今回の発表にあたりまして、各地の地方衛生研究所を初めとして、40あまりの諸機関の方々からレジオネラ菌株を分与いただきました。厚く御礼申し上げます。

シャワー水、噴水、給湯水などからの *L. pneumophila* 血清群1分離株の収集にご協力をよろしくお願い致します。

レジオネラ症臨床分離株の収集解析も、レジオネラ・レファレンスセンターで引き続きおこない、衛生微生物技術協議会で報告します。

連絡先 : jmaekawa@nih.go.jp 前川

