

平成23年度生活衛生関係技術担当者研修会
2012. 2. 17

Legionella pneumophila 菌株 の遺伝子型別からわかること

国立感染症研究所
細菌第一部
前川純子



レジオネラ属菌

河川、湖沼、土壌などに生息する環境細菌

人工水系の発達

- ◆ 空調システムの冷却塔
- ◆ 給湯系
- ◆ 加湿器
- ◆ 循環式入浴設備

増殖、
エアロゾルとなり、
感染

収集されたレジオネラ臨床分離株

2011年3月末日現在

<i>L. pneumophila</i>	174株 (96%)
血清群1	146株 (81%)
血清群2	4株 (2.2%)
血清群3	8株 (4.4%)
血清群4	2株 (1.1%)
血清群5	6株 (3.3%)
血清群6	5株 (2.8%)
血清群9	1株 (0.6%)
血清群10	1株 (0.6%)
血清群15	1株 (0.6%)
<i>L. feeleii</i>	1株 (0.6%)
<i>L. longbeachae</i>	4株 (2.2%)
<i>L. rubrilucens</i>	1株 (0.6%)
<i>L. londiniensis</i>	1株 (0.6%)
計	181株 (100%)

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にて
2007年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を開始

尿中抗原検出法の普及による 問題点 その1

- *L. pneumophila* 血清群1以外のレジオネラ
症起因菌は、ほとんど尿中抗原陰性となる
ので、注意が必要である。



Loopamp®レジオネラ検出試薬キットC

平成22年7月12日

喀痰中のレジオネラ属菌を広く検出することを目的とした国内初の遺伝子検査による体外診断用医薬品。

「LAMP 法」を利用し、簡易、迅速、高感度に検出する。

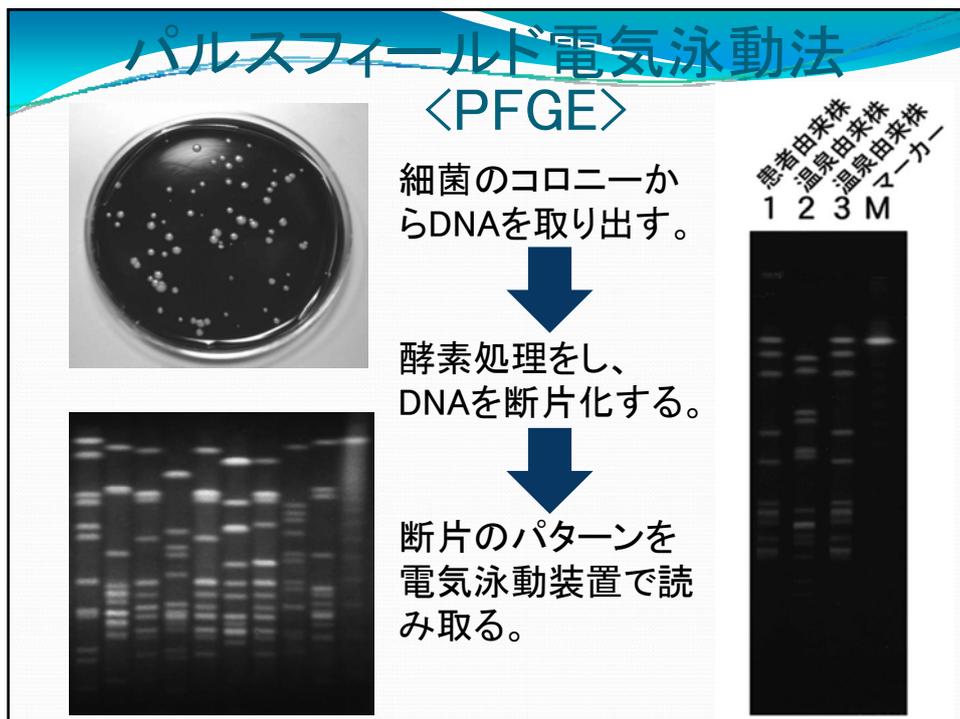
平成23年10月、保険適用。

抗原およびDNA検出法の普及による 問題点 その2

- 菌の分離が不要になる。

レジオネラ症患者発生時に感染源を解明するためには、臨床検体から菌を分離し、患者周辺の環境から分離された菌株との異同を確認する必要がある。





収集されたレジオネラ臨床分離株

2011年3月末日現在

菌種	株数 (割合)	PFGEにより、感染源確定 (17%)
<i>L. pneumophila</i>	174株 (96%)	
血清群1	146株 (81%)	SG1 28株/146株 (19%) 入浴施設 23例 (集団感染は6例) 家庭風呂 3例 公衆浴場シャワー水、加湿器 各1例
血清群2	4株 (2.2%)	
血清群3	8株 (4.4%)	
血清群4	2株 (1.1%)	
血清群5	6株 (3.3%)	SG5 2株/6株 (33%) 入浴施設 2例 (集団感染は1例)
血清群6	5株 (2.8%)	
血清群9	1株 (0.6%)	
血清群10	1株 (0.6%)	
血清群15	1株 (0.6%)	
<i>L. feeleii</i>	1株 (0.6%)	<i>L. rubrilucens</i>
<i>L. longbeachae</i>	4株 (2.2%)	入浴施設
<i>L. rubrilucens</i>	1株 (0.6%)	(<i>L. pneumophila</i> との混合感染)
<i>L. londiniensis</i>	1株 (0.6%)	
計	181株 (100%)	

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にて
2007年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を開始

PFGE

長所

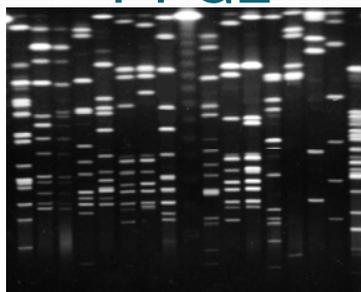
- 分別能にすぐれ、感染源解明のための菌株の異同に最も優れた分別能を示す。

欠点

- データが画像のため、異なる場所、時期に行われた結果の比較が煩雑である。

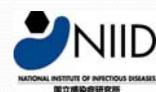


PFGE

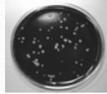


欠点

- データが画像のため、異なる場所、時期に行われた結果の比較が煩雑である。



Sequence-based typing (SBT)法



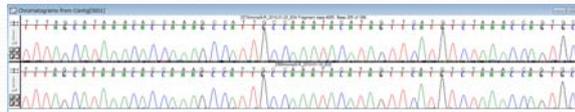
L. pneumophila のコロニーからDNAを取り出す。



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.

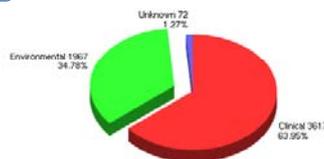
The curators encourage the submission of putative new alleles. Submission of putative new alleles can be made via the Sequence Quality Tool or by the New Allele Submission link (Options menu, left), which examines the forward and reverse chromatogram files. Subject to verification by the curators, a 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.

2012年1月30日現在 Contact Dr. Norman Fry for further details.

Total number of entries:	5656
Number of Sequence Types:	1134
Number of <i>flaA</i> alleles:	32
Number of <i>pilE</i> alleles:	43
Number of <i>asd</i> alleles:	50
Number of <i>mip</i> alleles:	55
Number of <i>mompS</i> alleles:	69
Number of <i>proA</i> alleles:	42

Number of *neuA* alleles: 40

Sample source, total number of records 5656



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

収集されたレジオネラ臨床分離株

2011年3月末日現在

L. pneumophila 174株 (96%)

SG1 146株 (81%)

SG2 4株 (2.2%)

SG3 8株 (4.4%)

SG4 2株 (1.1%)

SG5 6株 (3.3%)

SG6 5株 (2.8%)

SG9 1株 (0.6%)

SG10 1株 (0.6%)

SG15 1株 (0.6%)

L. feeleii 1株 (0.6%)

L. longbeachae 4株 (2.2%)

L. rubrilucens 1株 (0.6%)

L. londiniensis 1株 (0.6%)

計 181株 (100%)

SBTを行った

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にて
2007年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を開始

臨床分離株の遺伝子型と株数

167の *L. pneumophila* 臨床分離株は 91種類の遺伝子型(ST)に分けられた。 **型別能98%**

(*neuA* が増幅できなかつた血清群5の6株と血清群10の1株を除く)

株数	ST
11	<u>ST138</u>
10	<u>ST23</u>
9	ST120
7	ST384
6	ST306
5	ST1, ST93
4	ST353, ST505, ST609
3	ST42, ST132, ST507
2	<u>ST2</u> , ST39, ST59, <u>ST139</u> , <u>ST142</u> , ST211, ST352, ST354, ST392, ST537, ST550, ST566, ST644, ST687, ST876,
1	63種類のST

集団感染事例で見られたSTに下線を付した(ST138、ST139は2事例、ST23は3事例)

臨床分離株の遺伝子型と株数

167の *L. pneumophila* 臨床分離株は
91 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。

型別能98%

(*neuA* が増幅できなかつた血清群5の6株と血清群10の1株を除く)

株数	ST
11	<u>ST138</u>
10	<u>ST23</u>
9	ST120
7	ST384
6	ST306
5	ST1, ST93
4	ST353, ST505, ST609
3	ST42, ST132, ST507
2	<u>ST2</u> , ST39, ST59, <u>ST139</u> , <u>ST142</u> , ST211, ST352, ST354, ST392, ST537, ST550, ST566, ST644, ST687, ST876,
1	63種類のST

日本独自のST。
全国各地から継続的に検出される。
2008年に5例、その後も分離されている。
1例の不明例を除き、感染源は浴槽水と
推定あるいは確定。

集団感染事例で見られたSTに下線を付した (ST138, ST139は2事例、ST23は3事例)

臨床分離株の遺伝子型と株数

167の *L. pneumophila* 臨床分離株は
91 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。

型別能98%

(*neuA* が増幅できなかつた血清群5の6株と血清群10の1株を除く)

株数	ST
11	<u>ST138</u>
10	<u>ST23</u>
9	ST120
7	ST384
6	ST306
5	ST1, ST93
4	ST353, ST505, ST609
3	ST42, ST132, ST507
2	<u>ST2</u> , ST39, ST59, <u>ST139</u> , <u>ST142</u> , ST211, ST352, ST354, ST392, ST537, ST550, ST566, ST644, ST687, ST876,
1	63種類のST

世界各地で臨床分離例あり。
全国各地から分離される。
入浴施設での集団感染3事例の
ほか、浴槽水関連2例、ホテル
シャワー推定1例。
2009年に5例。
病原性の高いSTか？

集団感染事例で見られたSTに下線を付した (ST138, ST139は2事例、ST23は3事例)

臨床分離株の遺伝子型と株数

167の *L. pneumophila* 臨床分離株は
91 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。
(*neuA* が増幅できなかつた血清群5の6株と血清群10の1株を除く)

型別能98%

株数	ST
11	<u>ST138</u>
10	<u>ST23</u>
9	ST120
7	ST384
6	ST306
5	ST1, ST93
4	ST353, ST505, ST609
3	ST42, ST132, ST507
2	<u>ST2</u> , ST39, ST59, <u>ST139</u> , <u>ST142</u> , ST211, ST352, ST354, ST392, ST537, ST550, ST566, ST644, ST687, ST876,
1	63種類のST

全国各地から継続的に検出される。
2010年に4例と多かった。
感染源は温泉2例(推定)のほかは不明。

集団感染事例で見られたSTに下線を付した (ST138、ST139は2事例、ST23は3事例)

臨床分離株の遺伝子型と株数

167の *L. pneumophila* 臨床分離株は
91 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。
(*neuA* が増幅できなかつた血清群5の6株と血清群10の1株を除く)

型別能98%

株数	ST
11	<u>ST138</u>
10	<u>ST23</u>
9	ST120
7	ST384
6	ST306
5	ST1, ST93
4	ST353, ST505, ST609
3	ST42, ST132, ST507
2	<u>ST2</u> , ST39, ST59, <u>ST139</u> , <u>ST142</u> , ST211, ST352, ST354, ST392, ST537, ST550, ST566, ST644, ST687, ST876,
1	63種類のST

日本独自のST。
2007年に3株、その後も全国各地から
継続的に検出される。
感染源は、3例が浴槽水関連と推定。

集団感染事例で見られたSTに下線を付した (ST138、ST139は2事例、ST23は3事例)

臨床分離株の遺伝子型と株数

167の *L. pneumophila* 臨床分離株は
91 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。
(*neuA* が増幅できなかつた血清群5の6株と血清群10の1株を除く)

型別能98%

株数	ST
11	<u>ST138</u>
10	<u>ST23</u>
9	ST120
7	ST384
6	ST306
5	ST1, ST93
4	ST353, ST505, ST609
3	ST42, ST132, ST507
2	<u>ST2</u> , ST39, ST59, <u>ST139</u> , <u>ST142</u> , ST211, ST352, ST354, ST392, ST537, ST550, ST566, ST644, ST687, ST876,
1	63種類のST

日本独自のST。
2007年まで、検出された。4例がA県。
1例の不明例を除き、感染源は浴槽水と
推定あるいは確定。

集団感染事例で見られたSTに下線を付した (ST138, ST139は2事例、ST23は3事例)

臨床分離株の遺伝子型と株数

167の *L. pneumophila* 臨床分離株は
91 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。
(*neuA* が増幅できなかつた血清群5の6株と血清群10の1株を除く)

型別能98%

株数	ST
11	<u>ST138</u>
10	<u>ST23</u>
9	ST120
7	ST384
6	ST306
5	ST1, ST93
4	ST353, ST505, ST609
3	ST42, ST132, ST507
2	<u>ST2</u> , ST39, ST59, <u>ST139</u> , <u>ST142</u> , ST211, ST352, ST354, ST392, ST537, ST550, ST566, ST644, ST687, ST876,
1	63種類のST

世界中の臨床・環境分離株で最も多い。
日本の環境分離株でも最も多く、冷却
塔水株の7割を占める。
2000年以降の日本の臨床分離株では
稀だったが、2010年に3例。うち、1例は
冷却塔水関連と推定。

集団感染事例で見られたSTに下線を付した (ST138, ST139は2事例、ST23は3事例)

臨床分離株の遺伝子型と株数

167の *L. pneumophila* 臨床分離株は
91 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。

型別能98%

(*neuA* が増幅できなかつた血清群5の6株と血清群10の1株を除く)

株数	ST
11	<u>ST138</u>
10	<u>ST23</u>
9	ST120
7	ST384
6	ST306
5	ST1, ST93
4	ST353, ST505, ST609
3	ST42, ST132, ST507
2	<u>ST2</u> , ST39, ST59, <u>ST139</u> , <u>ST142</u> , ST211, ST352, ST354, ST392, ST537, ST550, ST566, ST644, ST687, ST876,
1	63種類のST

2008年に3株、2010年に2株分離。特定の地域から分離されている。

同一感染源による散在的な感染事例？

特定地域の複数の感染源が同一株で汚染？

集団感染事例で見られたSTに下線を付した (ST138、ST139は2事例、ST23は3事例)

臨床分離株の遺伝子型と株数

167の *L. pneumophila* 臨床分離株は
91 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。

型別能98%

(*neuA* が増幅できなかつた血清群5の6株と血清群10の1株を除く)

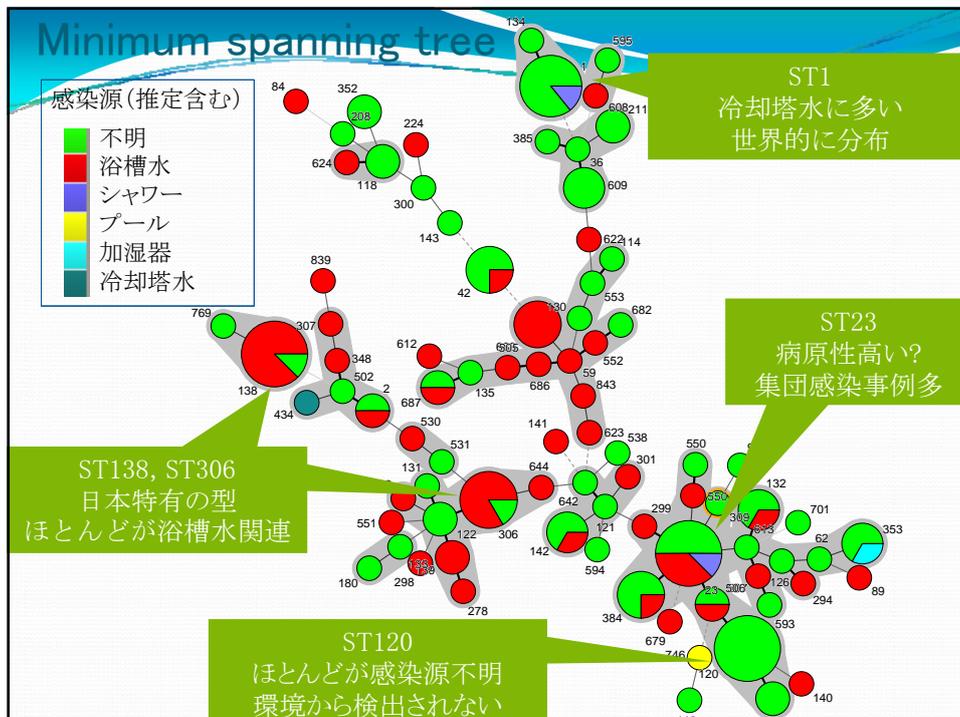
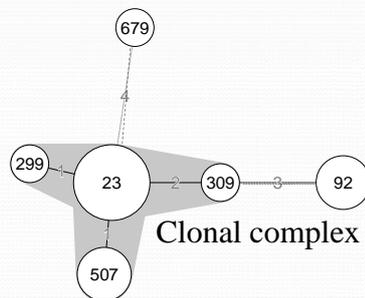
株数	ST
11	<u>ST138</u>
10	<u>ST23</u>
9	ST120
7	ST384
6	ST306
5	ST1, ST93
4	ST353, ST505, ST609
3	ST42, ST132, ST507
2	<u>ST2</u> , ST39, ST59, <u>ST139</u> , <u>ST142</u> , ST211, ST352, ST354, ST392, ST537, ST550, ST566, ST644, ST687, ST876,
1	63種類のST

日本独自のST。
1例は感染源は加湿器と確定。
それ以外は感染源不明。

集団感染事例で見られたSTに下線を付した (ST138、ST139は2事例、ST23は3事例)

Minimum spanning tree法で遺伝子型(ST)間の類縁関係を解析した。

- 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。
- 円の内部の数字は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。



SBTのまとめ

- 感染力の強い遺伝子型がある可能性が示唆された。
- 一部の遺伝子型については、感染源が推測できる。



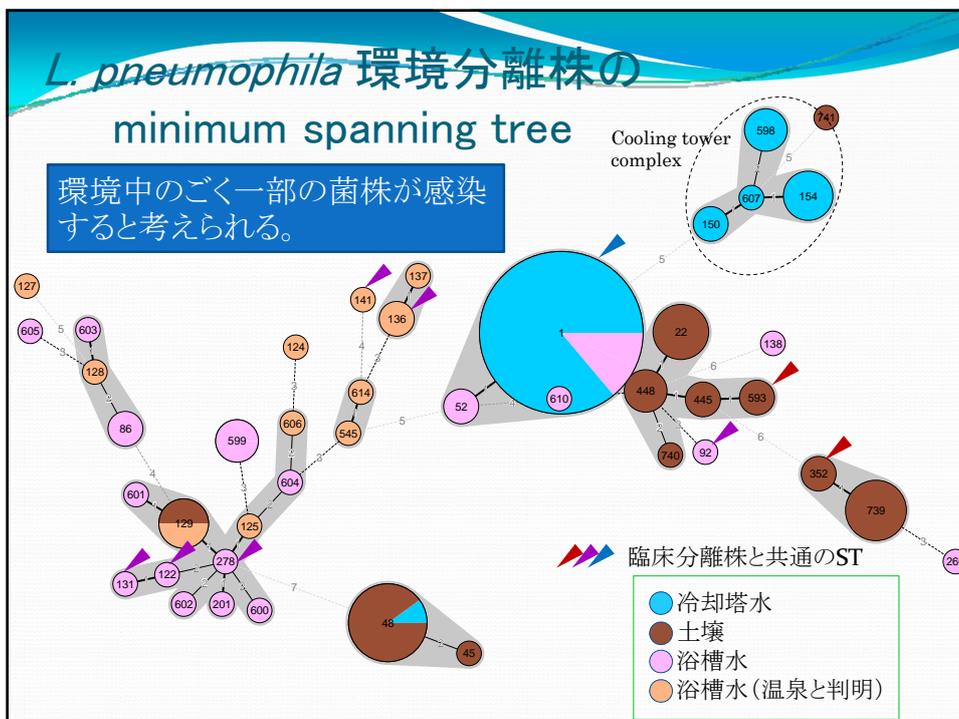
環境分離株の遺伝子型は？

日本の環境分離株 135株

- 臨床分離株と無関係な*L. pneumophila*血清群1
 - 浴槽水分離株 50株
 - 冷却塔水分離株 50株
 - 土壌分離株 35株



浴槽水		土壌		冷却塔水	
型別能97%		型別能89%		型別能40%	
ST	株数	ST	株数	ST	株数
1	6	48	9	1	37
129	5	739	6	154	4
599	3	22	5	598	3
52	2	448	3	150	2
86	2	129	2	その他 (1株ずつ)	4
127	2	352	2	計	50
136	2	445	2		
141	2	593	2		
その他 (1株ずつ)	26	その他 (1株ずつ)	3		
計	50	計	34		



環境中のごく一部の菌株が感染
すると考えられる。

まだ知られていない感染源の存在



修景水

L. pneumophila
血清群1

ST1	9株
ST493	1株
ST876	1株

国外で臨床2株、
環境1株

国内臨床2株

水たまり

富山県衛生研究所の調査では
感染源不明事例でもっとも多く、環境
から分離されたことのなかったST120
を初め、感染源不明事例と同じ遺伝
子型を示す *L. pneumophila* 血清群1
株が多数分離された。

自動車の運転は危険因子か

自動車のウォッシャー液調査

(2010年6月～2011年11月)

レジオネラ検出率 10 / 31 検体 (32.3%)

菌数	検体数
10未満	21
10 - 99	4
100 - 999	3
> 1000	3
合計	31

カーエアコンの

エバポレーター

LAMP法でレジオネラ属菌
のDNAが検出された。

レジオネラ検出率
11 / 22 検体

富山県衛生研究所
磯部順子氏、金谷潤一氏による

Sakamoto R et al. Epidemiol
Infect, 2009, 137:1615.