

図 3. Summary of Results の表紙

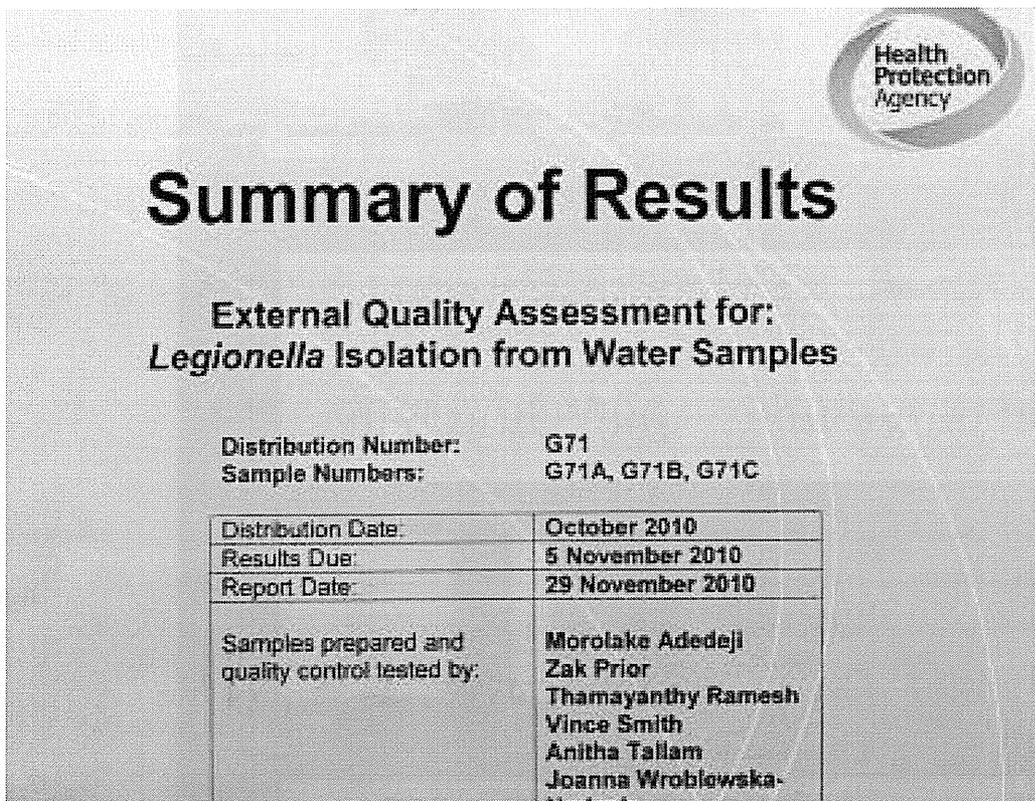


図 4. G 7 1 C サンプルの期待値と結果

Sample: G71C

Contents:

L.pneumophila sg 5, *Acinetobacter* sp., *Enterobacter cloacae* and *Ralstonia pickettii*.

Expected Results:

	Expected Result	Your Result	HPA score for performance assessment	z-score	Comments
Isolation of legionellae	Present	Detected	2		N/A
Identification	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>L.pneumophila</i>	2		
Serogroup	2 – 14	5	2		
Enumeration	$1.6 \times 10^3 - 4.9 \times 10^4$ cfu L ⁻¹	8600 (3.90 log ₁₀)	5	-0.10	
		Results returned	1		
		Total HPA score out of 12	12		

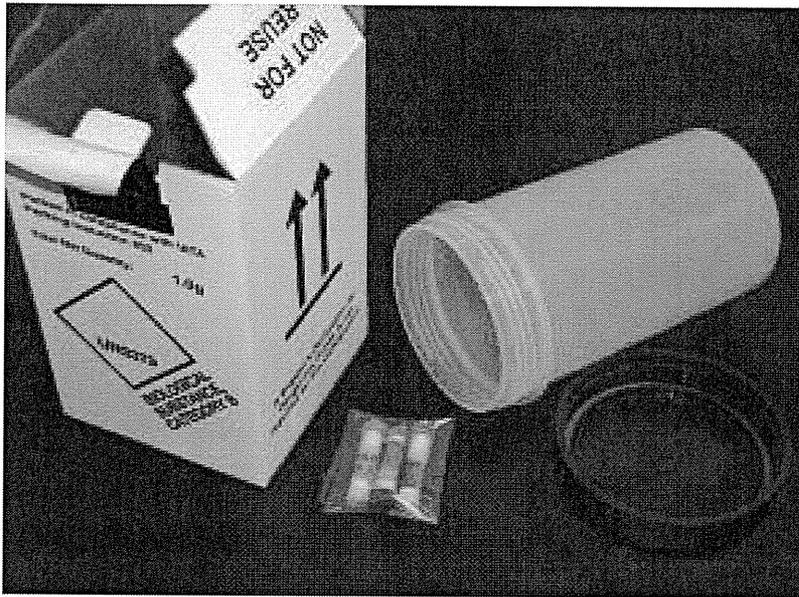


写真 1 .
試料の梱包の状態

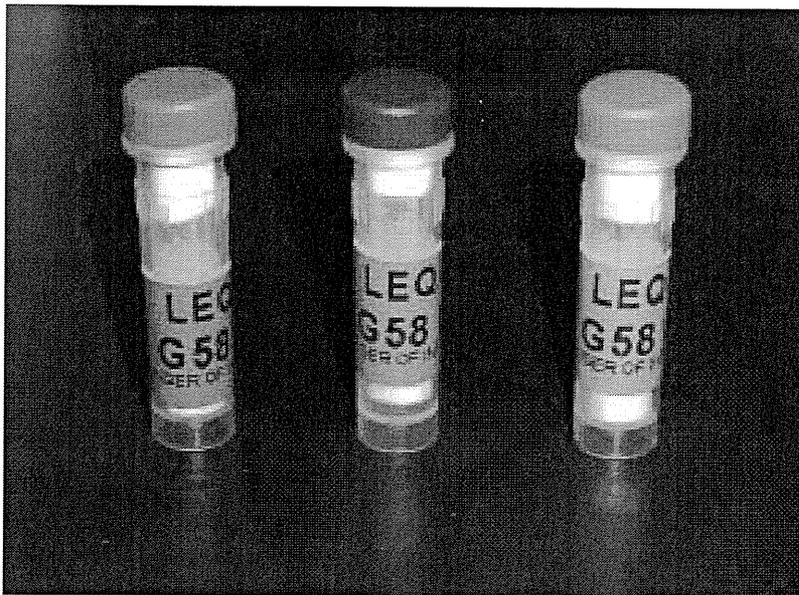


写真 2 .
サンプル容器の外観
(高さ約 4 c m)



写真 3 .
LENTICULE disc
これにレジオネラ属菌
他の細菌類が含まれる

平成22年度厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
分担研究報告書

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究

環境水の新規濃縮ろ過法の検討

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所細菌第一部
研究分担者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所微生物部
研究協力者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所微生物部

研究要旨：これまでのろ過濃縮法の検討において、試料の濃縮時間を短縮し、高い回収率を保つ検査方法として、ハイドロキシアパタイトをろ材として用いることにより浴槽水試料では回収率の上昇がみられた。そこで基礎データを得るため、培養菌を用いた添加回収試験を行ったところ、実際の試料での検討と異なり回収率が低下した。本研究では、この原因解明とろ過濃縮法の改良を目的に培養条件や菌株を変え、高い回収率を得るためのハイドロキシアパタイトの添加量およびろ過フィルターの種類について基礎検討を行ったので報告する。

A. 研究目的

現在広く普及している検査法では、試料の濃縮に時間を要し、短時間に多くの試料を検査することを困難にしている。本研究は、高い回収率を保ちつつ短時間での濃縮を可能にする検査法の改良を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 生菌数の測定方法

供試菌株は、当所保存分離株レジオネラ・ニューモフィラ Lp53-7 株を使用した。培地は、BCYE- α 培地（日研生物化学研究所）、GVPC- α 培地（日研生物化学研究所）を用いた。培養条件は 37°C 1 日間、37°C 4 日間および 30°C 4 日間として平板培地に培養後、PBS にて 550nm で OD 値 0.35 に調整し、10 倍段階希釈を行い希釈系列のうちコロニーが 30~300 カウント可能になるように 2 希釈に培地各 3 枚用いてコロニーカウントを行った。

2. ハイドロキシアパタイトを用いた検討

ろ過フィルターの孔径を小さくすると回収率は高くなるが試料の濃縮に時間を要するという課題がある。そこで、ハイドロキシアパタイトおよび珪藻土をろ材として、濃縮時間を短縮することを試みた。フィルターは、ポリカーボネート孔径 0.2 μ m、セルロースアセテート孔径 0.2 μ m、セルロースアセテート孔径 0.45 μ m (ADVANTEC) を用いた。セルロースアセテート孔径 0.45 μ m にハイドロキシアパタイトを 0、0.2、0.4、0.8、1.6 g 添加し、ろ過濃縮を行った。

実験では、Phosphate Buffer Powder リン酸緩衝剤(組成：Na₂HP0₄ 5.7g, KH₂P0₄ 3.6g、和光純薬工業株式会社) 1/15mol/l、pH7.0 を用い、1/15mol/l PBS を作成後、滅菌蒸留水で 50 倍に希釈したものを試料とした。

試料 1000mL には、30°C 4 日間平板培養した Lp53-7 を 550nm で OD 値 0.35 に

なるよう PBS で調整し、190CFU/100mL 添加した。これを 500mL×2 にして、ろ過を行い、50mL 遠沈管に PBS5mL とろ過を行ったフィルターを入れ、ボルテックスで 1 分攪拌後、手振りでも再浮遊させた。原液と 10 倍希釈を 100 μ l、各々 3 枚の GVPC- α 培地に接種した。

3. アメーバを用いたレジオネラ増菌

平板培養菌を用いたところ、菌数カウントに大きなばらつきが生じたことから、自然環境に近い状態のレジオネラを用い再度ろ過濃縮実験を行った。

アメーバは、*Acanthamoeba*/JACE1（国立感染症研究所より分与）を 30 $^{\circ}$ C 4 日間 PYGC 液体培地で培養した。この培養液を PBS に置き換え、ろ過濃縮実験に用いるレジオネラを 10³CFU/mol とするよう添加した。この培養液中のレジオネラの菌数を培養 0 日、3 日、4 日、5 日、7 日後にアメーバを 5 μ m フィルターで除去したものと除去しないものについて各 100 μ l ずつ、3 濃度 3 枚の GVPC- α 培地を用いてカウントし、アメーバにおけるレジオネラ増菌状況を調べた。

4. ろ過フィルターの種類と孔径

ろ過濃縮法において、フィルターの材質と孔径が回収率に及ぼす影響を調べた。平板培養レジオネラを用い 3 種類のフィルター（ポリカーボネート 0.2 μ m、セルロースアセテート 0.2 μ m および 0.45 μ m）、アメーバ増菌レジオネラは、1 回目 5 種類（ポリカーボネート 0.2 μ m、0.4 μ m、混合セルロースエステル 0.2 μ m、セルロースアセテート 0.2 μ m および 0.45 μ m）、2 回目 6 種類（上記フィルターおよびセルロースアセテート 0.4 μ m）を用い上記 2.3 と同様にろ過濃縮実験を実施した。

C. 結果と考察

1. 生菌数の測定方法

ろ過濃縮法の検討において、添加菌数の調整が不可欠であるが、レジオネラ属菌の生菌数の測定は他の細菌に比較するとバラツキが大きいことが示された。

レジオネラ属菌について、グラム染色で形態が一樣であることが確認できた培養条件である 30 $^{\circ}$ C 4 日間で培養し 550nm で OD 値 0.35 になるように条件をそろえて菌液を調整したところ、菌株間（レジオネラ・ニューモフィラ）によってあるいは菌種間で菌数に 10⁸CFU/mL から 10⁷CFU/mL と相違が生じた。そこで、添加回収実験の際には、毎回添加菌数を測定することにした。

2. ハイドロキシアパタイトを用いた検討

孔径 0.45 μ m のろ過フィルターにろ材としてハイドロキシアパタイトを添加することにより、孔径 0.2 μ m のろ過フィルターに比べろ過速度を上げつつ、回収率を上げることが期待されたが、ろ材添加によって回収率が下がることが示された（表 1）。

珪藻土をハイドロキシアパタイトの代わりに添加したところ、ハイドロキシアパタイトより回収率が高くなったが、ろ材を添加しない場合よりも回収率が低下した（表 2）。

そこで浴槽水試料中のレジオネラに近い状態のレジオネラを用いることによって回収率の低下の要因を確認することにした。

3. アメーバを用いたレジオネラ増菌

アメーバに対して 2.3×10³CFU/mL になるようにレジオネラを接種して増菌したところ 7.0×10⁶CFU/mL となり 1000

倍の増菌が可能であった。また、アメーバ増菌後7日でレジオネラの菌数が6.1~7.0×10⁶CFU/mLになることが確認された(図1)。しかしながら、アメーバで増菌した場合は、菌数を調整するにはOD値での調整は困難であった。そのため、今後はリアルタイムPCRを利用した菌数測定を検討予定である。

4. ろ過フィルターの種類と孔径

フィルターの材質と孔径が回収率に及ぼす影響を調べたところ、平板培養菌もアメーバ増菌培養菌もポリカーボネート0.2μmが最も回収率が高く、次いでセルロースアセテート0.2μmであった。(表3、4)。特に菌数カウントが安定していたアメーバ増菌培養菌について接種菌数が多いものと少ないもので比較してみてもポリカーボネート0.2μmが最も回収率が高く、次いでセルロースアセテート0.2μmで、他に比べ混合セルロースエステルの回収率は低かつ

た。

D. 結論

今年度の検討により、来年度以降の課題として以下の3点が挙げられる。

1. アメーバでレジオネラを増菌した場合は、菌数を調整するにはOD値での調整が困難であるため、リアルタイムPCRを利用した菌数測定を検討することが必要
2. 接種菌量調整と回収率の再現性
3. ろ過フィルターとろ材との組み合わせについて、実際の試料を用いたろ過速度の短縮

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

表1 ハイドロキシアパタイトを用いた検討結果

No.	メンブランフィルター (ADVANTEC)		ハイドロキシ アパタイト	平板培養菌の添加回収率	
	材質	孔径 μm	添加量 g	CFU/100mL (%)	
1	ポリカーボネート	0.20	0	240	(126.3)
2	セルロースアセテート	0.20	0	280	(147.4)
3	セルロースアセテート	0.45	0	230	(121.1)
4	セルロースアセテート	0.45	0.2	68	(35.8)
5	セルロースアセテート	0.45	0.4	130	(68.4)
6	セルロースアセテート	0.45	0.8	65	(34.2)
7	セルロースアセテート	0.45	1.6	8	(4.1)

*検水量: 500mL×2

**GVPC α 培地使用

表2 珪藻土およびハイドロキシアパタイトを用いた検討結果

No.	メンブランフィルター (ADVANTEC)		ろ材		平板培養菌の添加回収率	
	材質	孔径 μm	種類	添加量 g	CFU/100mL (%)	900 (100)
1	ポリカーボネート	0.20	添加なし	0	350	(38.9)
2	セルロースアセテート	0.20	添加なし	0	270	(30.0)
3	セルロースアセテート	0.45	添加なし	0	220	(24.4)
4	セルロースアセテート	0.45	珪藻土	0.4	140	(15.6)
5	セルロースアセテート	0.45	ハイドロキシアパタイト	0.4	27	(3.0)
6	セルロースアセテート	0.45	ハイドロキシアパタイト	0.8	55	(6.1)
7	セルロースアセテート	0.45	ハイドロキシアパタイト	1.6	36	(4.0)

*検水量: 500mL × 2

**GVPC α 培地使用

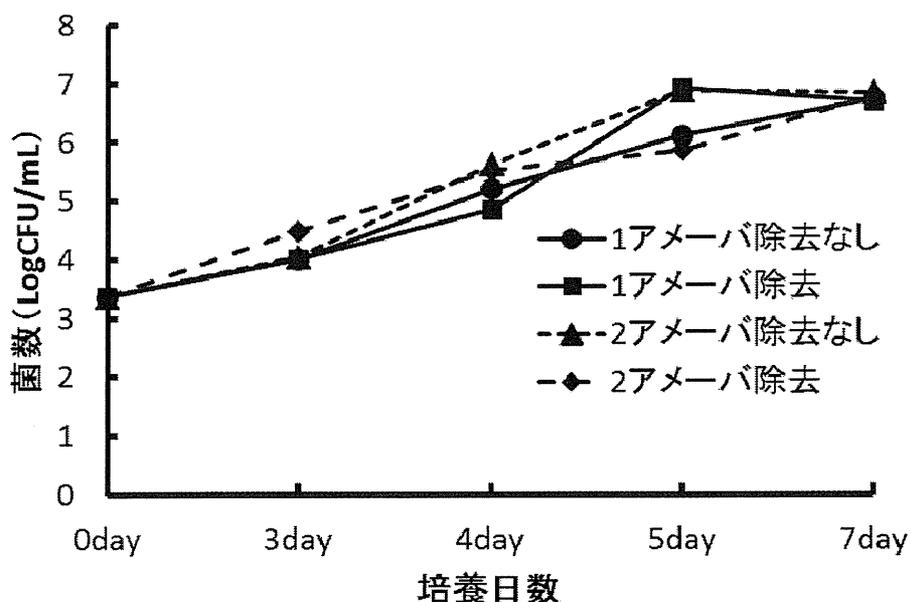


図1 アメーバを用いたレジオネラ増菌1

*GVPCα培地使用

**アメーバ除去: 5μmフィルター使用

表3 平板培養菌とアメーバ増菌培養菌を用いたろ過フィルターの検討結果

No.	材質	孔径 μm	添加回収			
			平板培養菌		アメーバ増菌培養菌	
			CFU/100mL (%)		CFU/100mL (%)	
			900 (100)		14 (100)	
1	ポリカーボネート	0.20	350 (38.9)		12 (85.7)	
2	ポリカーボネート	0.40	ND*		5 (35.7)	
3	混合セルロースエステル	0.20	ND*		1.7 (12.1)	
4	セルロースアセテート	0.20	270 (30.0)		12 (85.7)	
5	セルロースアセテート	0.45	220 (24.4)		1.7 (12.1)	

*ND: Not done

**検水量: 500mL × 2

***GVPC α 培地使用

表4 アメーバ増菌培養菌を用いたろ過フィルターの検討結果

No.	材質	孔径 μm	添加回収			
			CFU/100mL (%)		CFU/100mL (%)	
			14 (100)		260 (100)	
1	ポリカーボネート	0.20	12 (85.7)		370 (142.3)	
2	ポリカーボネート	0.40	5 (35.7)		180 (69.2)	
3	混合セルロースエステル	0.20	1.7 (12.1)		140 (53.8)	
4	混合セルロースエステル	0.40	ND**		180 (69.2)	
5	セルロースアセテート	0.20	12 (85.7)		210 (80.8)	
6	セルロースアセテート	0.45	1.7 (12.1)		170 (65.4)	

* No.1-3,5,6: ADVANTEC、No.4:MILIPORE

** ND: not done

***検水量: 500mL × 2

****GVPC α 培地使用

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた
総合的衛生管理手法に関する研究

Legionella pneumophila の SBT 法による遺伝子型別

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	前川純子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	田栗利紹	長崎県環境保健研究センター
研究分担者	縣 邦雄	アクアス株式会社つくば総合研究所
研究協力者	井上浩章	アクアス株式会社つくば総合研究所

研究要旨：*Legionella pneumophila* を収集して、SBT (sequence-based typing) 法を用いて遺伝子型別を行った。重複していると考えられる菌株を除くと、臨床分離株 25 株、浴槽水分離株 18 株、冷却塔水分離株 15 株について型別を行った。臨床分離株は 21 種類に、浴槽水分離株は 15 種類に型別され、多様であったが、冷却塔水分離株は 3 種類に分けられ、13 株が ST (sequence type) 1 となり、多様性に乏しかった。臨床分離株と浴槽水分離株は多様性とみ、冷却塔水分離株は ST1 が多く、多様性に乏しいという傾向が、近年も続いていることが確認できた。臨床分離株の遺伝的多様性はレジオネラ症の主要な感染源である浴槽水に由来する菌株の多様性を反映していると考えられるが、感染源不明の事例も多くあることから、従来の感染源と考えられる水系からの分離株をさらに調査するとともに、まだ調べられていない水系からの分離株の調査の必要性も示唆された。

A. 研究目的

入浴施設の不適切な衛生管理が感染の一因であるレジオネラ症例の感染源を確定するにはレジオネラ症患者からの分離株と環境からの分離株の遺伝子型を比較し、同一菌株であるかどうかを確認しなければならぬ。その有効性を調べるために、レジオネラ症の起因菌として最も多い *Legionella pneumophila* の臨床分離株、

環境分離株について遺伝子型別を行っている。それにより、臨床分離株に多く見られる病原性が高いと考えられる遺伝子型の存在や、異なる環境により遺伝子型の分布が異なり、臨床分離株の遺伝子型から、感染源が推測できる可能性があることも明らかになってきた。今年度も収集した臨床分離株、環境分離株について、遺伝子型別を行い、情報を蓄積し、新た

な知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1 臨床分離株

昨年度（2009年度）にレジオネラ・レファレンスセンターで収集したレジオネラ臨床分離株 28 株（実際の分離年は 2008 年 3 月から 2010 年 3 月）についてデンカ生研のレジオネラ免疫血清を用いて血清型別を行い、*Legionella pneumophila* については 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* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した^{1,2)}。*flaA* は鞭毛(flagellin)タンパク質、*pilE* は IV 型線毛(type IV pilin)タンパク質、*asd* はスレオニン生合成系酵素であるアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aspartate-b-semialdehyde dehydrogenase)、*mip* は宿主マクロファージへの感染に寄与する(macrophage infectivity potentiator)タンパク質、*mompS* は主要外膜タンパク質(major outer membrane protein)、*proA* は亜鉛メタロプロテアーゼ(zinc metalloprotease)、*neuA* は N-アシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼ (N-acylneuraminate cytidyltransferase) をそれぞれコードする遺伝子である。7 遺伝子の遺伝子型が決まった分離株を EWGLI のデータベース³⁾に登録すると、新しい遺伝子型の組み合わせについては ST (sequence type) ナンバーが付与される。

2 環境分離株 (浴槽水)

2002 年から 2010 年にかけて長崎県の各地の入浴施設から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 の 24 株について SBT を行った。

3 環境分離株 (冷却塔水)

2010 年 9 月から 10 月にかけて全国各地の冷却塔水から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 の 15 株について SBT を行った。

C. 研究結果

臨床分離株 28 株の内訳は *L. pneumophila* 血清群 1 が 23 株、血清群 2、6、15 が各 1 株、*Legionella feeleii* 血清群 1 が 1 株、*Legionella longbeachae* 血清群 2 が 1 株であった。そのうち *L. pneumophila* 血清群 1 の 2 株が同じ感染源によると考えられるふたりの患者に由来する他はすべて独立の事例による。また、*L. pneumophila* 血清群 15、*Legionella feeleii* 血清群 1、*Legionella longbeachae* 血清群 2 の感染事例はそれぞれ本邦初事例である。

臨床分離株の *L. pneumophila* の SBT の結果は表 1 のとおりとなった。同じ感染源によると考えられるふたりの患者に由来する株の遺伝子型は ST23 で一致した。他に無関係な 3 株も ST23 だった。ST42 も 2 株見られたが、それ以外の遺伝子型はすべて 1 株ずつだった。重複を除いた 25 株は 21 種類の遺伝子型に分けられた。新規遺伝子型は 5 つあり、EWGLI のデータベースに登録され、ST 番号が付与された。

表1 2009年度に収集した臨床分離株

NIIB 番号	分離 年	性別	感染源(推定、と記載して いない場合は環境分離株 とPFGE一致)	種名	血清 群	ST (Sequence Type)	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	同じSTの報告があるか(2011 年2月現在)
2550	2009	男	シャワー(ホテル、推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内5例目、国外多
2551	2009	男	不明(数日前に家庭菜園 で作業)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内6例目、国外多
2552	2009	男	公衆浴場(推定)	<i>L. pneumophila</i>	6	114	3	6	1	6	14	11	9	国内1(SG1)、国外3(SG6)
2560	2009	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	687	7	6	17	21	35	11	9	国内2例目
2561	2009	男	プール(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	746	2	10	5	12	38	5	6	無
2562	2009	男	不明(ゴルフ、入浴は不 明)	<i>L. pneumophila</i>	1	550	2	3	6	10	51	1	6	国内2例目
2563	2009	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	769	10	12	7	21	16	18	9	無
2564	2009	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	701	21	14	29	15	15	29	6	フランスで7例
2566	2009	男	院内感染、病院の浴槽 (推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	国内3例目、国外多
2567	2009	男	不明	<i>L. feeleii</i>	1									
2568	2009	男	不明(おがくず?)	<i>L. longbeachae</i>	2									
2569	2009	男	温泉(推定、老人福祉施 設)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内7例目、国外多
2570	2009	男	2569と同一感染源	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	
2580	2009	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	国内4例目、国外多
2581	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	609	3	13	1	1	14	9	1	国内3例目、国外1例
2582	2009	男	不明(院内感染か?)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内8例目、国外多
2583	2010	男	浴槽水(自宅風呂)、貯め 水でタイヤ洗浄の仕事	<i>L. pneumophila</i>	1	59	7	6	17	3	13	11	11	国外(欧米)多
2585	2009	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	142	2	10	3	13	9	4	18	国内3例目
2596	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	211	3	10	1	1	14	9	11	国内2例目、国外1例
2598	2008	男	温泉	<i>L. pneumophila</i>	1	843	7	6	17	11	13	11	6	無
2601	2009	男	浴槽水(推定、検出され ず、健康センター)	<i>L. pneumophila</i>	1	839	6	10	14	10	21	4	3	無
2602	2009	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	180	6	10	15	12	13	14	9	国外で1例
2603	2010	男	温泉(推定、検出されず)	<i>L. pneumophila</i>	15	392	3	13	1	6	14	9	11	国内2例目(初出はSG1)、国外 4例(SG1)
2604	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	国内9例目、国外(フランス3例)
2605	2008	男	不明(塗装業)	<i>L. pneumophila</i>	1	132	2	1	6	15	2	1	6	国内4例目
2606	2008	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	国内9例目
2607	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	850	2	3	9	50	2	1	6	無
2608	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	2	39	3	5	1	7	14	9	8	国内2例目、国内外全てSG2

表2 冷却塔水由来 *L. pneumophila* 血清群1分離株の遺伝子型別

NIIB番号	試料種類	都道府県	採水日	レジオネラ属菌 数(CFU/100ml)	ST	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	ST備考
NIIB2695	冷却水	茨城県	2010/9/21	5800	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2707	冷却水	栃木県	2010/10/29	1400	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2708	冷却水	群馬県	2010/10/28	560	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2703	冷却水	東京都	2010/10/27	170	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2700	冷却水	神奈川県	2010/10/21	390	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2706	冷却水	山梨県	2010/10/28	30	974	1	4	3	10	1	1	11	a)
NIIB2705	冷却水	静岡県	2010/10/26	7000	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2702	冷却水	三重県	2010/10/21	1400	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2694	冷却水	滋賀県	2010/9/17	600	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2704	冷却水	兵庫県	2010/10/19	470	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2696	冷却水	奈良県	2010/9/22	11000	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2701	冷却水	鳥取県	2010/10/20	10	609	3	13	1	1	14	9	1	b)
NIIB2697	冷却水	岡山県	2010/10/5	5600	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2698	冷却水	長崎県	2010/10/9	3100	1	1	4	3	1	1	1	1	
NIIB2699	冷却水	大分県	2010/10/12	300	1	1	4	3	1	1	1	1	

a) 新規遺伝子型

b) 国内臨床4株(感染源不明3例、温泉と推定1例)、国外臨床1株

表3 浴槽水由来 *L. pneumophila* 血清群1分離株の遺伝子型別

NiIB番号	菌株番号	採水日	泉質	cfu	検水のpH	遊離残留塩素濃度(mg/L)	地区	備考	ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	コメント
NiIB2657	94	2002/9/20	温泉	400	7.6	0	本土地区		260	12	8	11	23	29	26	2	浴槽水1、国外臨床
NiIB2658	95	2002/9/17	水道水	360	7.4	0	本土地区		977	23	10	3	28	8	4	9	新規遺伝子型
NiIB2659	97	2002/9/17	温泉	3,750	8.4	0	本土地区		980	6	10	17	28	9	14	3	新規遺伝子型
NiIB2660	107	2002/9/19	地下水	4,700	7.4	0.4	離島地区		申請中	新規	6	17	3	13	11	11	新規遺伝子型
NiIB2661	114	2002/9/18	水道水	30	8.0	0	離島地区		48	5	2	22	27	6	10	12	土壌最多、冷却塔水1、ヨーロッパでは臨床有り
NiIB2662	119	2002/9/17	水道水	640	8.2	0	離島地区		1	1	4	3	1	1	1	1	国内外臨床、環境多、日本では特に冷却塔水
NiIB2663	128	2002/9/17	水道水	30	8.0	0	離島地区		129	6	6	15	28	4	14	11	温泉2、土壌2、臨床1、国内
NiIB2664	140	2003/10	Na炭酸水素塩泉	100	8.6	0	本土地区	温泉スタンドから運搬	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外臨床、環境多、日本では特に冷却塔水
NiIB2666	144	2003/10	Na塩化物炭酸水素塩泉	150	8.4	0.3	本土地区	原水にNH4-N含まれる	980	6	10	17	28	9	14	3	新規遺伝子型
NiIB2667	145	2003/10	Na/Mg-炭酸水素塩温泉	30	7.2	0	本土地区		138	10	12	7	3	16	18	6	国内臨床11、浴槽水1
NiIB2668	147	2003/10	Na/塩化物泉	20	6.4	0.5	本土地区		976	7	6	17	10	13	11	11	新規遺伝子型
NiIB2669	154	2003/10	Na塩化物炭酸水素塩泉	150			本土地区	144と同一施設	980	6	10	17	28	9	14	3	新規遺伝子型
NiIB2670	156	2003/10	水道水(入浴剤入り)	2,430	7.6	0	離島地区		739	12	8	11	2	10	12	2	土壌1、臨床1、国内
NiIB2671	163	2003/11	Na・Ca塩化物泉	150	7.1	<0.05	離島地区		48	5	2	22	27	6	10	12	土壌最多、冷却塔水1、ヨーロッパでは臨床有り
NiIB2672	165	2003/11	Na・Ca塩化物泉	150			離島地区	163と同一施設	48	5	2	22	27	6	10	12	土壌最多、冷却塔水1、ヨーロッパでは臨床有り
NiIB2673	175	2003/11	Na塩化物炭酸水素塩泉	3,610	8.4	0.6	本土地区	144と同一施設、同年2回目検査	980	6	10	17	28	9	14	3	新規遺伝子型
NiIB2674	295	2007/3/14	Na塩化物炭酸水素塩泉	1,120	8.4	0.6	本土地区	144と同一施設	980	6	10	17	28	9	14	3	新規遺伝子型
NiIB2675	300	2007/5/2	Na/Mg-炭酸水素塩温泉	2,200	7.4	0	本土地区	患者発生に伴う関連施設調査	979	10	22	7	3	16	18	6	新規遺伝子型
NiIB2676	373	2007/9/18	Na炭酸水素塩泉	40	9.1	0.2	本土地区	140と同じ温泉スタンドから運搬	687	7	6	17	21	35	11	9	国内臨床2
NiIB2677	432	2008/6/19	Na塩化物炭酸水素塩泉	20	8.2	0	本土地区	144と同一施設	980	6	10	17	28	9	14	3	新規遺伝子型
NiIB2678	450	2008/9/19	温泉	40	8.3	0.88	県外(近畿地方)		981	2	10	19	28	19	4	11	新規遺伝子型
NiIB2679	466	2009/1/8	単純アルカリ泉	90	7.8	0.2	本土地区		89	4	10	11	15	29	1	6	国内臨床1、欧米で患者、環境から
NiIB2680	475	2009/1/29	単純アルカリ泉	10	7.8	0.1	本土地区	466と同じ施設	89	4	10	11	15	29	1	6	国内臨床1、欧米で患者、環境から
NiIB2681	558	2010/10/4	Na塩化物泉	50	8.0	0	本土地区		982	6	10	17	3	21	14	3	新規遺伝子型

環境分離株の *L. pneumophila* 血清群 1 の遺伝子型別の結果を表 2 および表 3 に示した。浴槽水分離株は 24 株のうち、同じ施設から分離され遺伝子型が一致した株を重複例として除くと、18 株が 15 の遺伝子型に分かれた。そのうち、7 つが新規遺伝子型だった。冷却塔水分離株はすべて異なる地域由来だが、15 株は 3 種類の遺伝子型に分かれ、1 種類は新規遺伝子型だった。13 株が ST1 だった。

D. 考察

昨年度にレジオネラ・レファレンスセンターに送付された臨床分離株のうち、*L. pneumophila* 血清群 1 以外は 5 株あった。臨床分離株の解析から、レジオネラ症のおよそ 2 割の起因菌は *L. pneumophila* 血清群 1 以外と考えられる。現在ではレジオネラ症の確定診断の 95%以上を占める尿中抗原検査では、*L. pneumophila* 血清群 1 が起因菌でない場合は、ほとんど陰性となるので、菌分離が行われなければ、これらの事例はレジオネラ症と確定できなかった。また、菌が分離されなければ、感染源の特定も困難であり、起因菌の多くを占める *L. pneumophila* の動向もつかめないで、菌分離の重要性を引き続き訴えてゆく必要がある。

昨年度までに *L. pneumophila* 臨床分離株 149 株（集団感染により、同一株が複数の患者から得られた場合は 1 株のみを選んだ結果の株数）は SBT 法により 96 種類に型別されている⁴⁾。今年度は集団感染事例の重複を除くと、25 株の遺伝子解

析を行った。国内初出の遺伝子型は 8 つで（国外でも報告例がなかったのは 5 つ）、昨年度までの解析した株と合わせて、計 174 株は 104 種類に分けられた。臨床分離株の IOD (index of discrimination)⁵⁾は 0.988 となり、昨年度までの結果 0.989 とほぼ同等であり、本法は高い分別能を有する方法であることが示されている。今年度の調査において 4 事例 5 株で見出された ST23 は世界各国で臨床分離例があり、2002 年にわが国の循環式浴槽施設で起きた大規模集団感染事例 2 例の起因菌の遺伝子型でもある。近年増加傾向にあり、病原性の高い遺伝子型と考えられるので注意が必要である。

浴槽水分離株については、前年度までの全国各地から分離された 40 株を調べた結果では、29 種類に型別され、IOD は 0.972 だった⁴⁾。今年度は一地域について調べたが、18 株が 15 種類に分かれ、一地域にも関わらずやはり多様であった。半数近い 7 つの遺伝子型が新規であったことから、浴槽水に生息するレジオネラの遺伝的多様性が示唆される。IOD は 0.980 となり、ほぼ同等であった。既出の遺伝子型だった ST89、ST129、ST138、ST687 は浴槽水が感染源と推定・確定した臨床例や、浴槽水からの分離例がある遺伝子型で、多様とはいえ、遺伝子型に一定の傾向があることも確認できた。ST48 は土壌分離株で多く見られ、ST739 は土壌から分離されるとともに、臨床分離例もある。土壌からのレジオネラが浴槽水に混入し、感染する可能性が示唆さ

れた。

冷却塔水分離株は、今までの結果では、48株が6種類に型別され、多様性に乏しく、37株(77.1%)がST1であった⁴⁾。これは2006年までに分離された菌株による結果で、株は関東地方由来のものが多かった。今年度は2010年に分離された全国各地からの冷却塔水分離株を用いたところ、ST1の株が86.7%(13株)を占めた。今回の全国的な2010年時点の調査でも、以前の結果と同様の傾向であることが示された。

なお、今回報告の株には含まれていないので詳細は省くが、2008年に3株、2010年に2株、倉敷で感染源不明のST93の*L. pneumophila*血清群3の感染事例が検出されていることを付記する。

E. 結論

昨年度に送付されたレジオネラ臨床分離株28株(実際の分離年は2008年3月から2010年3月)について同定を行い、うち*L. pneumophila*の25株、および2002年から2010年にかけて長崎県の浴槽水から分離された*L. pneumophila*血清群1の24株と、2010年9月から10月にかけて全国各地の冷却塔水から分離された*L. pneumophila*血清群1の15株についてSBTを行った。SBT法の疫学的有用性が確認できるとともに、臨床分離株ではST23が増えているという傾向がわかった。また、以前調べた日本国内の浴槽水分離株の傾向が特定の地域を集中して調べても同様であること、関東地方中心だった2006年

以前の冷却塔水分離株の傾向についても、今回の2010年の全国規模での菌株収集でも同様であったことがわかった。今年度も新規遺伝子型が多数同定されたことから、今後も分離株の遺伝子型を調べ、分離株の動向を明らかにしていく必要がある。

謝辞

今回解析した臨床分離株を分与くださった磯部順子、岩渕香織、上田ひろみ、金澤祐子、金澤裕司、金子紀子、河野喜美子、菊池孝司、黒澤 肇、清水 寧、鈴木匡弘、田村有美、中嶋 洋、伏脇猛司(敬称略)の諸氏に感謝いたします。

F. 参考文献

- 1) Gaia, V, Fry, NK, Afshar, B, Lück, PC, Meugnier, H, Etienne, J, Peduzzi, R, and Harrison, TG. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 43:2047-52.
- 2) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J. Clin. Microbiol. 45:1965-8.
- 3) <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/>

legionella/legionella_sbt/php/sbt_home
page.php

- 4) 厚生労働省科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 19～平成 21 年度総合研究報告書。研究代表者：倉 文明
- 5) Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26:2465-6.

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Matsui M, Fujii S, Shiroiwa R, Amemura-Maekawa J, Chang B, Kura F, Yamauchi K. Isolation of *Legionella rubrilucens* from a pneumonia patient co-infected with *Legionella pneumophila*. J. Med. Microbiol. 59:1242-6 (2010)
 - 2) Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. Jpn. J. Infect. Dis. 63:119-23 (2010).
 - 3) Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, Watanabe H;

Working Group for *Legionella* in Japan. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. J. Med. Microbiol. 59:653-659 (2010)

2. 学会発表

- 1) Junko Amemura-Maekawa, Kiyomi Kikukawa, Akiko Kaneko, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Katsunori Furuhata, Yuki Tada, Miyo Murai, Bin Chang, and Fumiaki Kura. Sequence types of *Legionella pneumophila* isolates from patients and environments in Japan. 25th Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Copenhagen, Denmark. Sep 2010.
- 2) 前川純子、菊川紀世己、常 彬、村井美代、山崎利雄：レジオネラ属菌の菌種同定と遺伝子型別。第 22 回日本臨床微生物学会総会。2011 年 1 月，岡山。

H. 知的所有権の取得状況

前川 純子、渡邊 治雄、倉 文明、常 彬、森林 敦子、杉江 元、早川 洋一：新規イソクマリン系蛍光物質。特許第 4590625 号。登録日 2010 年 9 月 24 日。（レジオネラ菌体に由来する蛍光物質）

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた
総合的衛生管理手法に関する研究

Legionella pneumophila の MLVA 法による型別

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所	細菌第一部
研究分担者	前川純子	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	竹内 彩	埼玉県立大学	健康開発学科
研究協力者	泉山信司	国立感染症研究所	寄生動物部

研究要旨：新しい遺伝子型別法である MLVA (multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis) 法を用いて *Legionella pneumophila* の型別を行った。MLVA 法はゲノム上の複数箇所が存在する反復塩基配列 (VNTR) 数が株により異なることを利用し、型別を行うもので、反復数は VNTR を含む PCR 産物のサイズにより求める。*L. pneumophila* 臨床分離株 40 株、土壌分離株 26 株、冷却塔水分離株 28 株、浴槽水分離株 34 株の計 128 株の VNTR 解析を行ったところ、73 種類に分類された。今回解析した 128 株について、すでに結果が得られている SBT 法では 68 種類に分類されたので、MLVA 法の分解能は SBT 法と比較して同等以上であり、手法も簡便だった。しかし、MLVA 法で同一遺伝子型を示したものを SBT で細分化できる場合があり、SBT のデータベースが世界規模で整備されている現状を考えると、両手法を併用することが有効だと考えられた。現在、感染源の特定のための最適法と考えられているパルスフィールドゲル電気泳動法と比較しても簡便であり、感染源の特定のための菌株の迅速なスクリーニングにも適していると考えられる。

A. 研究目的

わが国においてレジオネラ症の主要な感染源は温泉などの入浴施設であると推測されている。これまでにレジオネラ症の起 因 菌 として 最 も 頻 度 の 高 い *Legionella pneumophila* について、臨床分離株、環境分離株の SBT (sequence-based typing) 法による遺伝子型別を行なって

きた。新しい遺伝子型別法である MLVA (multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis) 法を用いて *L. pneumophila* の型別を行った。MLVA 法はゲノム上の複数箇所が存在する反復塩基配列 (VNTR) 数が株により異なることを利用し、型別を行うもので、反復数は VNTR を含む PCR 産物のサイズにより求

める。得られた結果を従来法の SBT 法と比較した。

B. 研究方法

すでに SBT による遺伝子型が決定して各々独立に分離された、*L. pneumophila* 臨床分離株 46 株、土壌分離株 30 株、冷却塔水分離株 29 株、浴槽水分離株 38 株、計 143 株の *L. pneumophila* を用いた。臨床分離株の血清群の内訳は、血清群 1 が 37 株、血清群 2 が 1 株、血清群 3 が 3 株、血清群 4 が 2 株、血清群 6 が 2 株、血清群 9 が 1 株である。環境分離株については血清群 1 の株を選んだ。血清型別はデンカ生研のレジオネラ免疫血清を用いて行った。Pourcel ら¹⁾の報告に基づき、8 箇所の反復配列領域 Lpms1b、Lpms3、Lpms13、Lpms17、Lpms19b、Lpms33、Lpms34、Lpms35 を PCR で増幅する 8 組のプライマーを用いて MLVA 法を行った。PCR 反応は、AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) Taq ポリメラーゼ、あるいは、Quick Taq HS DyeMix (Toyobo) を用いた。PCR の条件は熱変性 (94°C・30 秒)、アニーリング (60°C・30 秒)、伸長 (72°C・30 秒) を 35 サイクル行った。ただし Lpms33、Lpms34 については非特異的な産物がみられたため、アニーリング条件を (62°C・30 秒) に変更した。PCR 産物は 2%アガロースゲル (Takara Bio) にアプライし、100V、約 30 分電気泳動した後、0.5 µg/mL 臭化エチジウムで染色、UV イルミネーター上で写真撮影した。あるいは、QIAxcel-DNA 自動電気泳動 (QIAGEN) を用いて電気泳動後、データ

解析を行った。PCR 産物の大きさから、各領域の反復配列数を求め、(Lpms1b・Lpms3・Lpms13・Lpms17・Lpms19b・Lpms33・Lpms34・Lpms35) の順に記載し、VNTR 型とした。

得られた VNTR 型による株間の類縁関係を明らかにするために、BioNumerics Ver. 5.1 (Applied Math)を用いて minimum spanning tree を作成した。また、得られた型別数と各株数から index of discrimination (D 値)²⁾を計算した。これは、2 つの株が集団から無作為に選ばれたときに、互いに異なる型となる割合を示す値で、型別能の目安となる。次の式で計算できる。

$$D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

N, 総株数; n_i , i 番目の型に属する株数

C. 研究結果

L. pneumophila 臨床分離株 46 株、土壌分離株 30 株、冷却塔水分離株 29 株、浴槽水分離株 38 株の計 143 株について MLVA 法による VNTR 型別を行った。Lpms13、Lpms17、Lpms19b、Lpms33、Lpms34、Lpms35 領域のいずれか、あるいはそれらの複数の領域において PCR 産物が得られなかった株が 15 株あった。一部 PCR 産物が得られなかった株の血清群は 3 が 1 株、4 が 1 株で、残りは血清群 1 だった。反復単位の塩基数が 18 と短い Lpms35 についてはいくつか異なる反復数の産物について実際に塩基配列を決定し、塩基数を求め、反復数を確認した。

表1 *Legionella pneumophila*株のMLVA法によるVNTR型別

VNTR型	ST	菌株数*	VNTR型	ST	菌株数*
6・8・10・2・5・2・2・19	551	臨床1	8・8・8・2・4・2・3・6	512	臨床1 (SG9)
7・7・5・2・4・4・3・25	120, 507	臨床2	8・8・8・2・5・2・2・6	604	浴槽水1
7・7・7・2・4・2・2・22	610	浴槽水1	8・8・9・2・4・2・1・6	600	臨床1 (SG6)
7・7・8・2・4・3・3・18	132	臨床1	8・8・9・2・4・2・2・6	64	浴槽水1
7・7・9・2・4・4・2・17	1	冷却塔水1	8・8・9・2・4・4・1・18	136	浴槽水1
7・7・10・2・4・4・2・11	1	冷却塔水2	8・8・9・2・4・4・2・22	599	浴槽水1
7・7・10・2・4・4・2・17	1	冷却塔水21、浴槽水4	8・8・10・1・4・1・1・3	93	臨床2 (SG3)
7・7・10・2・4・4・3・17	445	土壌2	8・8・10・2・4・2・3・6	201	浴槽水1
7・7・12・2・4・2・2・22	294	臨床1 (SG2)	8・8・10・2・4・3・1・5	612	臨床1
7・7・12・2・4・3・1・17	48	土壌3	8・8・10・2・4・4・1・18	136	浴槽水1
7・7・13・2・4・4・3・17	593	臨床1、土壌2	8・8・10・2・4・4・1・25	843	臨床1
7・8・8・1・4・3・2・5・3	354	臨床1	8・8・10・2・5・4・1・12	552	臨床1
7・8・9・2・4・4・2・19	599	浴槽水1	8・8・10・2・5・4・1・13	59, 86, 128, 603, 605	浴槽水6
7・8・9・2・5・4・2・18	599	浴槽水1	8・8・11・1・4・1・1・3	609	臨床2 (SG1, 6)
7・8・10・2・4・2・3・6	601	浴槽水1	8・8・11・2・4・1・1・3	211, 537, 557	臨床3
7・8・10・2・4・3・2・22	531	臨床1	8・8・11・2・4・2・1・14	208	臨床1
7・8・10・2・4・4・2・17	52	浴槽水2	8・8・11・2・4・2・1・8	224	臨床1
7・8・11・2・4・4・1・23	125	浴槽水1	8・8・11・2・4・2・3・6	129	浴槽水2、土壌1
7・5・7・12・2・4・3・1・12	48	土壌1	8・8・11・2・5・1・1・3	622	臨床1
7・5・7・12・2・4・3・1・17	48	冷却塔水1、土壌1	8・8・12・1・4・2・3・6	278	浴槽水1
7・5・7・7・2・4・4・1・12	45	土壌1	8・8・12・2・4・1・1・11	392	臨床1 (SG4)
7・5・8・8・2・4・2・2・18	594	臨床1	8・8・12・2・4・3・3・6	602	浴槽水1
8・7・8・2・4・2・5・3・22	138	臨床3	8・8・12・2・4・4・1・13	623	臨床1
8・7・11・2・4・3・3・15	740	土壌1	9・8・8・1・4・2・1・19	141	臨床1、浴槽水1
8・7・11・2・4・4・3・25	448	土壌1	9・8・8・2・4・2・2・18	642	臨床1
8・7・11・2・4・4・3・26	448	土壌1	9・8・8・2・4・2・2・23	644	臨床1
8・7・11・2・4・4・3・30	384	臨床1	9・8・8・2・4・2・3・24	122, 131	浴槽水2
8・7・11・2・4・5・3・26	22	土壌1	9・8・8・2・5・2・1・19	538	臨床1
8・7・11・2・4・5・3・28	22	土壌1	9・8・9・2・4・2・2・18	137	浴槽水1
8・7・11・2・4・5・3・30	384	臨床1	9・8・9・2・4・2・2・19	614	浴槽水1
8・7・12・2・4・3・1・17	48	土壌1	9・8・9・2・4・2・2・28	530	臨床1
8・7・12・2・4・4・3・22	353	臨床2	9・8・10・2・4・2・1・22	739	土壌1
8・7・12・2・4・5・3・26	22	土壌1	9・8・12・2・4・4・2・27	606	浴槽水1
8・7・13・2・4・5・3・26	22	土壌1	9・8・14・2・4・2・1・22	352, 739	臨床1、土壌6
8・8・3・2・4・2・5・1・8	598	冷却塔水1	9・8・9・2・5・2・2・18	545,	浴槽水1
8・8・3・2・5・2・5・2・8	154	冷却塔水1	10・8・3・2・4・2・2・8	154	冷却塔水1
8・8・8・2・4・2・2・12	266	臨床1			

*SG: 血清群; 特に記載のないものはSG1

また、反復数が整数でなかったものについてもいくつか選び、塩基配列決定により、塩基数を確認した。

臨床分離株 40 株、土壌分離株 26 株、冷却塔水分離株 28 株、浴槽水分離株 34 株の計 128 株が型別でき、73 種類に分類された。菌株の由来別に見ると、臨床分離株 40 株が 32 種類に型別され、多様性が見られた。最も多かった VNTR 型は、(8・8・11・2・4・1・1・3) と (8・7・8・2・4・2.5・3・22) で、それぞれ 3 株ずつであった。土壌分離株 26 株は 17 種類に型別された。最も多かった VNTR 型は、(9・8・14・2・4・2・1・22) で、6 株であった。冷却塔水分離株 28 株は 7 種類に型別され、多様性に乏しかった。(7・7・10・2・4・4・2・17) が 21 株見られ、冷却塔水分離株の 75%を占めた。浴槽水分離株 34 株は 23 種類に型別され、多様だった。(8・8・10・2・5・4・1・13) が 6 株あり、次に 4 株と多かった (7・7・10・2・4・4・2・17) は冷却塔水分離株で最も多く見られた VNTR 型である。

VNTR 型とその株数を表 1 に示した。異なる由来で共通する VNTR 型は、臨床と土壌で 2 種類、臨床と浴槽水で 1 種類、土壌と冷却塔水で 1 種類、土壌と浴槽水で 1 種類、冷却塔水と浴槽水で 1 種類と少なく、VNTR 型の分布は由来により、異なっていた。

今回得られた結果を minimum spanning tree 法で解析した。各 VNTR 型を遺伝子座の差異数に比例した長さの枝で結び、枝の長さの総長が最小になるように配置

して示した (図 1)。101 株から成る大きな 1 つのコンプレックスと、2-8 株から成る小さな 4 つのコンプレックスが存在した。

型別の分解能を示す D 値は 0.956 だった (表 2)。菌株の由来別に見ると、冷却塔水分離株は 0.442 と低く不十分な値であったが、それ以外は 0.938~0.987 となり、菌株の型別法としては十分な値となった。

表 2 *L. pneumophila* 臨床分離株および環境分離株 (血清群 1) の MLVA 法と SBT 法における D 値

由来 (株数)	MLVA	SBT
臨床分離株 (40)	0.987	0.992
うち血清群 1 (33)	0.989	0.991
土壌分離株 (26)	0.938	0.892
冷却塔水分離株 (28)	0.442	0.267
浴槽水分離株 (34)	0.957	0.977
全分離株 (128)	0.956	0.946

D. 考察

L. pneumophila 臨床分離株、土壌分離株、冷却塔水分離株、浴槽水分離株それぞれで、VNTR 型の分布や頻度は異なっており、各環境に適した遺伝子型が存在すると考えられた。すでに広く行われている

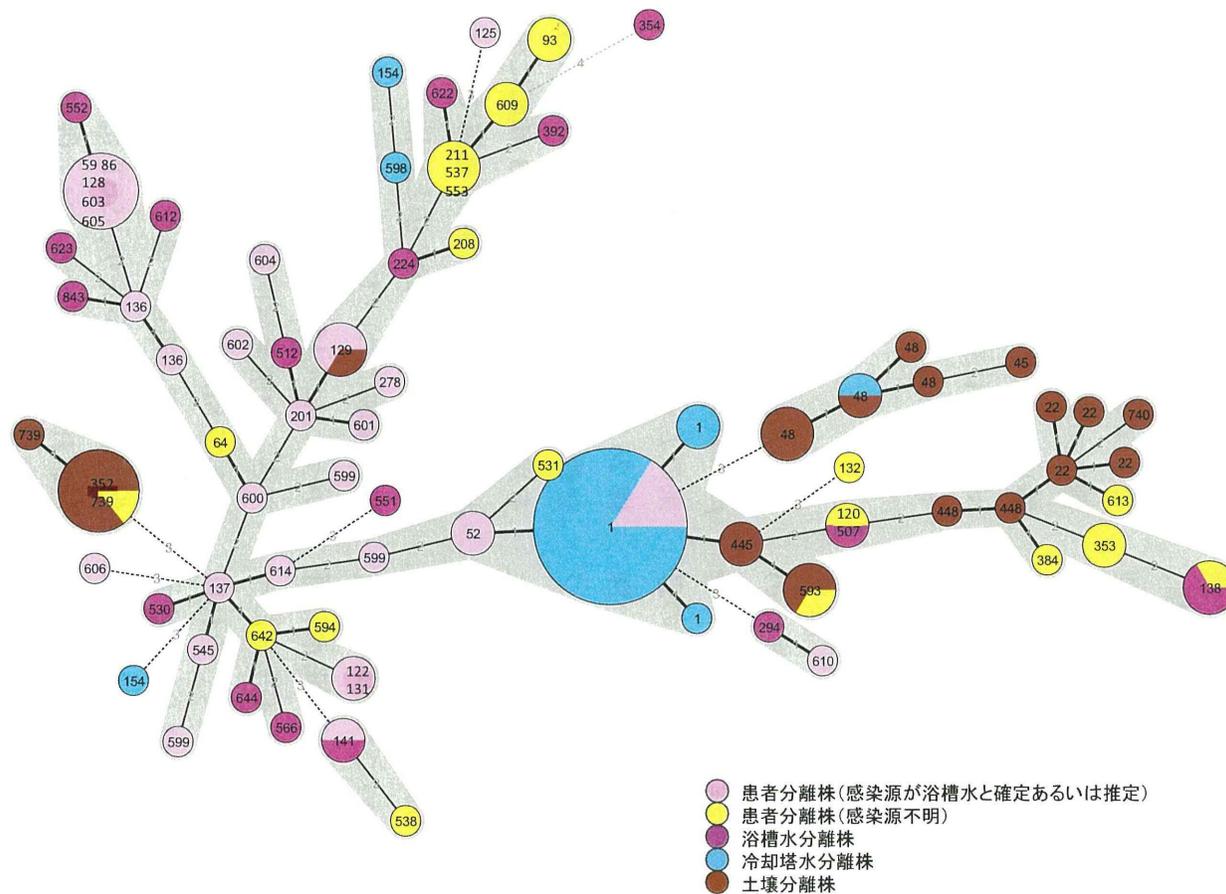


図1 Minimum spanning tree 法による *L. pneumophila* 分離株の VNTR 型の類縁関係。

1つの円が1つのVNTR型を示し、円の大きさはそれぞれのVNTR型を有する株数に比例している。枝の長さは互いのVNTR型の遺伝子座の差異数に比例している。隣り合う遺伝子座の違いが2つ以下のVNTR型およびそれらをつなぐ枝の周囲は灰色に塗られ、コンプレックスを形成していることを示している。円の中の数字は各VNTR型の株のST型(SBT法により決定された遺伝子型)である。