

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）

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における  
衛生管理手法に関する研究

平成 28 年度分担研究報告書

MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴

|       |      |            |       |
|-------|------|------------|-------|
| 研究代表者 | 前川純子 | 国立感染症研究所   | 細菌第一部 |
| 研究分担者 | 中西典子 | 神戸市環境保健研究所 | 感染症部  |
| 研究協力者 | 田中忍  | 神戸市環境保健研究所 | 感染症部  |
| 研究協力者 | 野本竜平 | 神戸市環境保健研究所 | 感染症部  |

研究要旨：MLVA 法の特長として、安定性・迅速性・比較の容易性から、利便性の高い分子タイピング法となっている。*L.pneumophila* においても MLVA 法を適用し、従来の遺伝子型別法である SBT (Sequence based typing) 法との比較を行うことで、MLVA 法の菌株の識別能力の評価し、感染源の特定のための迅速な遺伝子型別法としての有用性を検討することを目的とした。Sobral ら<sup>1)</sup>によって報告された 12 の MLVA 領域に関して、PCR 手法を改変し、利便性の高い MLVA タイピング手法を確立した。さらに、32 種類の ST(sequence type)の臨床分離株 47 株を用いて MLVA 法を行った結果、36 の MLVA タイプに分類され、MLVA 法は SBT 法と同等の識別能力があることが示唆された。また、MLVA 法によるタイピングは、SBT 法による ST と関連した樹形を描くことを見出した。以上の結果から、簡便な MLVA タイピングは、感染源の推定のための遺伝子型別の迅速なスクリーニングに期待できると考えられた。

A . 研究目的

菌の遺伝子型別は感染源の解明に欠かすことはできない。従来、*L.pneumophila* の遺伝子型別は、SBT (Sequence based typing) 法が用いられてきた。SBT法は、7 つの遺伝子 (*flaA*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) のシーケンスを行い、その塩基配列により型別を行う手法で

ある。7遺伝子の中には、病原性遺伝子が含まれているため、他の細菌でのMLSTに比べ、菌株の識別能力は高い。しかしながら、SBT法は、時間・予算を要することが課題となっていた。そこで、SBT法よりも簡便で、かつSBT法と同等、あるいはそれ以上の識別能力をもつと期待されるMLVA法を導入することで、網羅的に*L.pneumophila*

の遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした。

## B . 研究方法

菌株：リファレンスセンターで収集された既に ST(sequence type)が決定している臨床分離株を 47 株を用いた。32 種類の ST で分類されており、内訳は ST23:7 株、ST42:4 株、ST120:3 株、ST507:3 株、ST1:2 株、ST1187:2 株、その他 26 種類 ST:1 株である。

MLVA：Sobral ら<sup>1)</sup>によって報告された 12 領域 (Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31, Lpms33, Lpms34, Lpms35, Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44) を用いた。表 1 のように蛍光標識したプライマーを用いて、4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR- A (Lpms01, Lpms31, Lpms33, Lpms35), PCR-B (Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms34), PCR-C (Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44) とした (表 1)。PCR 反応は、QIAGEN Multiplex を用いた。PCR 条件は、95 15 分後に 95 30 秒、60 1 分、72 70 秒を 35 サイクル行った。50 倍希釈した PCR 産物 1 μl をサイズマーカー 0.25 μl (GeneScan 1200 LIZ Size Standard (PCR-A と PCR-B), GeneScan 600 LIZ Size Standard (PCR-C)) と Hi-Di Formamide (ABI) 10 μl に混合し、95 で 3 分加熱後、氷中条件で 2 分間急冷した。その後、AB3500 Genetic Analyzer にてフラグメント解析を行った。得られたデータは GeneMapper

Ver. 4 (Applied Biosystems) を用いて、フラグメントサイズおよびリピート数を測定した。また、フラグメント解析におけるリピート数のコントロールとして、ゲノム解読済みの *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* Philadelphia 1 の DNA を用いた。得られた MLVA 型による株間の類縁関係を明らかにするために、BioNumerics Ver4.2 を用いて、Minimum spanning tree (MST) を作成した。

## C . 研究結果

### MLVA 法の最適化

Sobral ら<sup>1)</sup>によって報告された 12 領域に関して、4 領域を 1 セットとした 3 種類の multiplex PCR に改変した。さらに、primer 濃度を最適化することで、4 領域がきれいに増幅される条件を決定した (表 1)。

臨床分離株を用いた解析から、Lpms01 (repeat unit size:45bp), Lpms3 (repeat unit size:45bp), Lpms33 (repeat unit size:125bp) 領域は、リピート数において intermediate-size の株が存在した。

### MLVA における臨床分離株の遺伝学的特徴

臨床分離株 47 株は 36 の MLVA 型に分類された。47 株中 16 株 (34%) が、同一の MLVA 型 No.1 から No.5 に属していた (表 2)。MVA 型 No.1 から No.4 は、異なる ST が同一 MLVA 型を示した。47 株の MLVA 型の株間の類似性を Minimum

spanning tree (図1) で示した。MLVA タイピングにおける樹形は、SBT 法による ST とある程度相関した樹形となった(図1)。

MLVA 型 No.1 と MLVA 型 No.3 は 2 ローカス違いで存在していた(図1)。これら MLVA 型に属する ST120, ST1187, ST1847, ST507 は、*mip* 遺伝子の 1 遺伝子座違いの菌株集団であった。さらに、MLVA 型 No.2 と MLVA 型 No.4 は 1 ローカス違いで存在していた(図1)。MLVA 型 No.2 に属する ST23 と ST507 は、*asd* 遺伝子の 1 遺伝子座違いであった。しかし、MLVA 型 No.4 に属する ST555 と ST1924 は、*neuA* 遺伝子のみしか一致しておらず、6 遺伝子座が異なっていた。

ST23 は 4 種類の MLVA 型、ST507 は 3 種類の MLVA 型に分かれた。ST1 は、1 ローカス違いの 2 種類の MLVA 型が存在した。ST42 は、2 ローカス違いの 3 種類の MLVA 型に分かれた。

#### D. 考察

32 種類の ST の臨床分離株 47 株が 36 種類の MLVA 型に分類されたことから、MLVA 法は SBT 法と同等の識別能力があることが示唆された。類似性の高い ST の菌株は、MLVA 型における MST 解析でも近隣に存在していることから、ST と MLVA 型がある程度相関していると考えられる。SBT では、分離場所により遺伝子型の分布や頻度が異なることが見出されているが、MLVA タイピングにおいても同様の傾向が見られると考え

られるが、今後サンプルを増やし検討する必要がある。また、同一 ST においても、MLVA 型は細分化される可能性を示唆した。しかしながら、MLVA 型 No.4 に関しては、6 遺伝子座が異なる ST が同一 MLVA 型を示しており、遺伝子型別の手法間の相違点についても、検討していく必要があると考えられた。

#### E. 結論

MLVA 領域の特性明らかにし、利便性の高い MLVA タイピング手法を確立した。MLVA タイピングは従来法の SBT タイピングとある程度相関があり、感染源の推定の菌株の迅速なスクリーニングに期待できると考えられた。

#### 謝辞

今回解析した分離株を分与くださった内田順子(香川県環境保健研究センター)、川上慶子(石川県保健環境センター)、金谷潤一(富山県衛生研究所)、小堀すみえ(さいたま市健康科学研究センター)、清水麻衣(京都市衛生環境研究所)、中嶋洋(岡山県環境保健センター)、野田万希子(岐阜県保健環境研究所)、福司山郁恵(熊本県保健環境科学研究所)、細谷美佳子(新潟県保健環境科学研究所)、松永典久(福岡市保健環境研究所)、宮下安子(川崎市健康安全研究所)、山口友美(宮城県保健環境センター)、吉野修司(宮崎県衛生環境研究所)、渡辺祐子(神奈川県衛生研究所)(敬称略)の諸氏に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Sobral D, Le Cann P, Gerard A, Jarraud S, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C. 2011. High-throughput typing method to identify a non-outbreak-involved *Legionella pneumophila* strain colonizing the entire water supply system in the town of Rennes, France. *Appl Environ Microbiol.* 77:6899-6907.

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

- 1) 中西典子、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：温泉環境由来レジオネラ属菌の遺伝学的特徴と病原性遺伝子保有状況. 第90回日本細菌学会総会. 平成29年3月, 仙台.

### G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1. 解析したMLVA領域とプライマー配列

| Multiplex PCR | MLVA locus           | primer                       | Sequence (5'→3') (Labeling) | repeat size (bp) | Primer concn (pmol) |
|---------------|----------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------|---------------------|
| A             | Lpms01               | Lpms01F                      | (NED)-TGAATTTCTCCCTCTTGCTTG | 45               | 5                   |
|               |                      | Lpms01R                      | GCATATGACAAAGCCTTGGC        |                  |                     |
|               | Lpms31               | Lpms31F                      | (FAM)-CCTCGCAAGCCTATGTGG    | 45               | 5                   |
|               |                      | Lpms31R                      | ATCGOCTAATTGCOGCTA          |                  |                     |
| Lpms33        | Lpms33F              | (VIC)-GACACCACAGCAGTTTGAAC   | 125                         | 1.25             |                     |
|               | Lpms33R              | CGAGGAAATCTTCTTCAGCC         |                             |                  |                     |
| Lpms35        | Lpms35F              | (PET)-GAATCTGAAACAGTTGAGGATG | 18                          | 1.25             |                     |
|               | Lpms35R              | TATCAAOCCTCATCCCTG           |                             |                  |                     |
| B             | Lpms03               | Lpms03F                      | (VIC)-GGACAAAACAACCAATGAAGC | 96               | 5                   |
|               |                      | Lpms03R                      | TGATGGTCTCAATGGTTCCG        |                  |                     |
|               | Lpms13               | Lpms13F                      | (NED)-CTCACCAGGATGOTTTGTOG  | 24               | 5                   |
|               |                      | Lpms13R                      | GCATCGGACTGAGCAAAGTA        |                  |                     |
|               | Lpms19               | Lpms19F                      | (PET)-GAACTATCAGAAGGAGGCGA  | 21               | 1.25                |
| Lpms19R       |                      | TCCAGAGGCTCTGGATTATC         |                             |                  |                     |
| Lpms34        | Lpms34F              | (FAM)-AAGGAATAAGGCGCAGCAC    | 125                         | 1.25             |                     |
| Lpms34R       | ATGCAGGATGTTTGCGCATG |                              |                             |                  |                     |
| C             | Lpms38               | Lpms38F                      | (NED)-CCTATCAACAGATGAOGCTT  | 8                | 2                   |
|               |                      | Lpms38R                      | GGATTGCOCTTGGGCATTAAT       |                  |                     |
|               | Lpms39               | Lpms39F                      | (PET)-CTTGACGAAGTAGGTGTGGG  | 6                | 2                   |
|               |                      | Lpms39R                      | CCAACTCCTCAACGCAACAA        |                  |                     |
|               | Lpms40               | Lpms40F                      | (FAM)-TAGATCTCTTGCCGAGCTTC  | 6                | 2                   |
| Lpms40R       |                      | TTACCCAAGCCCTTATTGOG         |                             |                  |                     |
| Lpms44        | Lpms44F              | (VIC)-GCTACTGCAGCAACATCC     | 6                           | 2                |                     |
| Lpms44R       | TTATGCGAGAGTTTCATGA  |                              |                             |                  |                     |

表2: 同一MLVA型を示した株のSTとMLVAプロフィール

| MLVA No. | Size | ST(No. of isolate)   | PCR-A  |        |        |        | PCR-B  |        |        |        | PCR-C  |        |        |        |
|----------|------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|          |      |                      | Lpms01 | Lpms31 | Lpms33 | Lpms35 | Lpms03 | Lpms13 | Lpms19 | Lpms34 | Lpms38 | Lpms39 | Lpms40 | Lpms44 |
| 1        | 5    | ST120 (3), ST1187(2) | 7      | 13     | 4      | 25     | 7      | 5      | 4      | 3      | 19     | 20     | 5      | 9      |
| 2        | 5    | ST23(4), ST507(1)    | 8      | 13     | 4      | 27     | 7      | 11     | 4      | 3      | 3      | 20     | 5      | 9      |
| 3        | 2    | ST1847(1), ST507(1)  | 7      | 12     | 4      | 25     | 7      | 5      | 4      | 3      | 3      | 20     | 5      | 9      |
| 4        | 2    | ST550(1), ST1924(1)  | 8      | 13     | 4      | 27     | 7      | 0      | 4      | 3      | 3      | 20     | 5      | 9      |
| 5        | 2    | ST42(2)              | 7      | 12     | 3      | 12     | 8      | 9      | 5      | 1      | 3      | 0      | 4      | 9      |

