

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 29 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
研究協力者	平塚貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター	

研究要旨：MLVA 法の特性として、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 法の菌株識別能力を評価し、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。

昨年度に確立した MLVA タイピング手法を用いて、117 種類の ST (sequence type) を含む *L. pneumophila* 血清群 1 の菌株コレクション 315 株 (臨床分離株 133 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 48 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 25 株、土壌由来 36 株) の解析を行ったところ、168 種類の MLVA タイプに分類された。MLVA の分解能は、SBT 法と比較して同等の値を示した。

また、過去の集団事例において、臨床分離株 45 株、浴槽水由来 21 株、浴槽ふきとり由来 22 株の MLVA を行い、PFGE および SBT のタイピング結果と比較したところ、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関した。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タイピング方法として期待できると考えられた。

A. 研究目的

感染源の特定には、レジオネラ症患者からの分離株と感染源と推定される環境分離株の遺伝子型を比較し、遺伝子型の一致を確認する必要がある。その際に用いられる方法として主流になっているのが、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) や

世界的に普及している SBT (Sequence based typing) 法となっている。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。しかしながら、これら従来法は、多検体処理の煩雑さ、時間、予算を要する

ことが課題となっていた。そこで、他の細菌の遺伝子型別解析にも利用されている MLVA を *L. pneumophila* において導入することで、それらの課題を克服できることが期待される。昨年度は MLVA タイピング手法を確立した。今年度は *L. pneumophila* SG1 の菌株コレクションから解析サンプル数を増やし、MLVA 法の識別能の評価を行う。また、過去の集団事例について、MLVA 法と従来法の比較を行うことを目的とした。

B. 研究方法

菌株：

(1) *L. pneumophila* SG1 の菌株コレクション

117 種類の ST (sequence type) が決定している臨床分離株 133 株 (内 48 株は昨年度解析済み)、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 48 株、修景水・噴水由来 18 株、シャワー水由来 (SH) 25 株、土壌由来 (SO) 36 株の計 315 株を用いた (表 1)。

(2) 過去の集団事例

臨床分離株 45 株、3 つの浴槽水由来 (Bath1, Bath3, Bath5) 21 株、浴槽ふきとり由来 (Bath1, Bath3, Bath5) 22 株を用いた (表 2)。

MLVA : Sobral ら¹⁾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。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。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 μ l をサイズマーカー 0.25 μ l (GeneScan 1200 LIZ Size Standard (PCR-A と PCR-B), GeneScan 600 LIZ Size Standard (PCR-C) と Hi-Di Formamide (ABI) 10 μ l 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。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 Ver7.6 を用いて、Minimum spanning tree (MST) を作成した。MLVA の分解能評価には、HGDI (Hunter-Gaston Discrimination Index) を算出した²⁾。また、各 MLVA 領域の多様性評価には、PIC (polymorphic information content) を算出した³⁾⁴⁾。

C. 研究結果

L. pneumophila SG1 の菌株コレクションの MLVA 型

117 種類の ST (sequence type) を含む

計 315 株は、167 種類の MLVA 型に分類された。315 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)。

さらに、315 株における SBT 法と MLVA 法の分解能を比較したところ、それぞれ 0.9351、0.9528 となり、ほぼ同等の値を示した。また、各 MLVA 領域における PCI 値は、Sobral ら¹⁾の報告とほぼ同等の値を示した (表 3)。

過去の集団事例

8 種類の MLVA 型に分かれた。患者由来株は 4 種類の MLVA 型 (MLVA 型 No.1, MLVA 型 No.3, MLVA 型 No.6, MLVA 型 No.7) に分かれた (図 2 (A))。MLVA 型 No.3, No.6, No.7 は No.1 と 1 ローカス違いで存在し、clonal complex を形成した。MLVA 型 No.1 には、Bath1 (B1) の拭き取り S13 の株が存在し、MLVA 型 No.3 には B1 と B1 の拭き取り S16 から分離された株が存在した。MLVA 型 No.6 は、B1 の株が存在した。B1 と B1 の拭き取り S16 と S21 からは、MLVA 型 No.5 の株も存在していた。B3 と B5 の浴槽水と拭き取り由来株は、患者由来の株とは異なる MLVA 型 No.4 と No.2 に存在していた。

また、MLVA 型と SBT 型の関連性については、MLVA 型 No.1, No.6, No.7 の患者株は ST2398 であった。MLVA 型 No.3 の患者株は ST2399 であった。MLVA 型

No.5 は ST601, MLVA 型 No.4 は ST1358, MLVA 型 No.2 は *neuA* 遺伝子が増幅できず、ST 番号が付与されなかった。

PFGE との関連性について、図 2 (B) に示した。MLVA 型 No.1, No.6, No.7 は PFGE で同一パターンを示した。MLVA 型 No.3 の株は No.1, No.6, No.7 とは異なる PFGE パターンを示したが、70%の相同性があった。MLVA 型 No.2, No.4, No.5 は患者由来株が含まれる MLVA 型 No.1, No.6, No.7 とは異なる PFGE パターンを示した。

D. 考察

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。さらに、過去の集団事例から、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関した。

E. 結論

MLVA タイピングは従来法の SBT タイピングや PFGE と相関があり、分解能は SBT タイピングと同等の値を示したことから、感染源推定のための菌株の迅速なタイピング方法として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) 磯部順子・金谷潤一(富山県衛生研究所) 岩淵香織(岩手県環境保健研究センター) 奥野ルミ(東京都健康安全研究センター) 笠原ひとみ(長野県環境保全研究所) 勝川千尋(大阪府立公衆衛生研究所) 佐々木麻里(大分県衛生環境研究センター) 田村有美(相模原市衛生試験所) 富田望(福島県衛生研究所) 山本一成(新潟市衛生環境研究所) 菊地孝司・小堀すみえ(さいたま市健康科学研究センター) 金子紀子(山形県衛生研究所) 金澤祐子(和歌山市衛生研究所) 黒澤肇(群馬県衛生環境研究所) 小笠原準(大阪市立環境科学研究研究所) 上田ひろみ(長野県環境保全研究所) 清水寧(北九州市環境科学研究研究所) 田中忍(神戸市環境保健研究所) 鈴木匡弘(愛知県衛生研究所) 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研究所) 細谷美佳子(新潟県保健環境科学研究研究所) 吉田英弘・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) 河野喜美子・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) 田栗利紹(長崎県環境保健研究センター) 林千尋(尼崎市立衛生研究所) 佐々木林子・江川武(文京保健所) 井上浩章(アクアス筑波総合研究所) 藤田直久(京都府立医科大学附属病院) 伏脇猛司((財)結核予防会大阪府支部大阪病院) 古畑勝則(麻布

大学) 鈴木敦子((財)東京都予防医学協会) 高瀬佳彦(荒川区保健所) 川口定男(板橋区保健所)(敬称略)の諸氏に感謝いたします。

F. 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.
- 2) Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microb.* 26, 2465-2466.
- 3) Keim, P., Price, L.B., Klevtska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E., 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relations within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182, 2928-2936.
- 4) Iwamoto, T., Yoshida, S., Suzuki, K., Tomita, M., Fujiyama, R., Tanaka, N., Kawakami, Y., Ito, M., 2007. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly

proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol. Lett. 270, 67-74.

Kentaro Arikawa, Tomotada Iwamoto: Distribution and molecular characteristics of *Legionella* spp. strains isolated from cooling tower and hot spring in Kobe City, Japan. The 9th International Conference on Legionella. 平成29年9月, Italy Roma.

G . 研究発表

1 . 学会発表

- 1) Noriko Nakanishi, Shinobu Tanaka,

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 315株のST (Sequence type)

Sequence type	No. of isolates	Sequence type	No. of isolates
ST1	75	ST89	2
ST23	15	ST122	2
ST48	14	ST127	2
ST739	9	ST132	2
ST120	8	ST142	2
ST22	7	ST211	2
ST42	7	ST256	2
ST138	7	ST278	2
ST505	6	ST352	2
ST507	6	ST445	2
ST59	5	ST502	2
ST129	4	ST550	2
ST353	4	ST593	2
ST566	4	ST599	2
ST609	4	ST604	2
ST876	4	ST644	2
ST384	3	ST679	2
ST448	3	ST763	2
ST642	3	ST905	2
ST687	3	ST977	2
ST954	3	ST1187	2
ST2	2	ST2061	2
ST52	2		
ST86	2	other STs	71

表2 . 過去の集団事例におけるサンプル

P患者(n=45)			
B浴槽水(n=21)	B1 (n=3)	B3 (n=9)	B5 (n=9)
Sふき取り(n=22)	Bath1	Bath3	Bath5
	S13(n=3)	S11(n=3)	S19(n=3)
	S16(n=4)	S23(n=6)	
	S21(n=3)		

表3. MLVA-12のHGDIと各VNTR領域の polymorphic information content (PCI)

VNTR(s)	PCI	
	Sobral et al. (n=320)	This study (n=315)
Lpms01	0.6501	0.6690
Lpms03	0.5054	0.4949
Lpms13	0.7790	0.8153
Lpms19	0.2936	0.2581
Lpms31	0.8563	0.8798
Lpms33	0.7020	0.6214
Lpms34	0.6649	0.6720
Lpms35	0.8815	0.8770
Lpms38	0.2710	0.3865
Lpms39	0.8301	0.7614
Lpms40	0.5054	0.5151
Lpms44	0.5391	0.4704
HGDI of MLVA-12	0.9534	0.9528

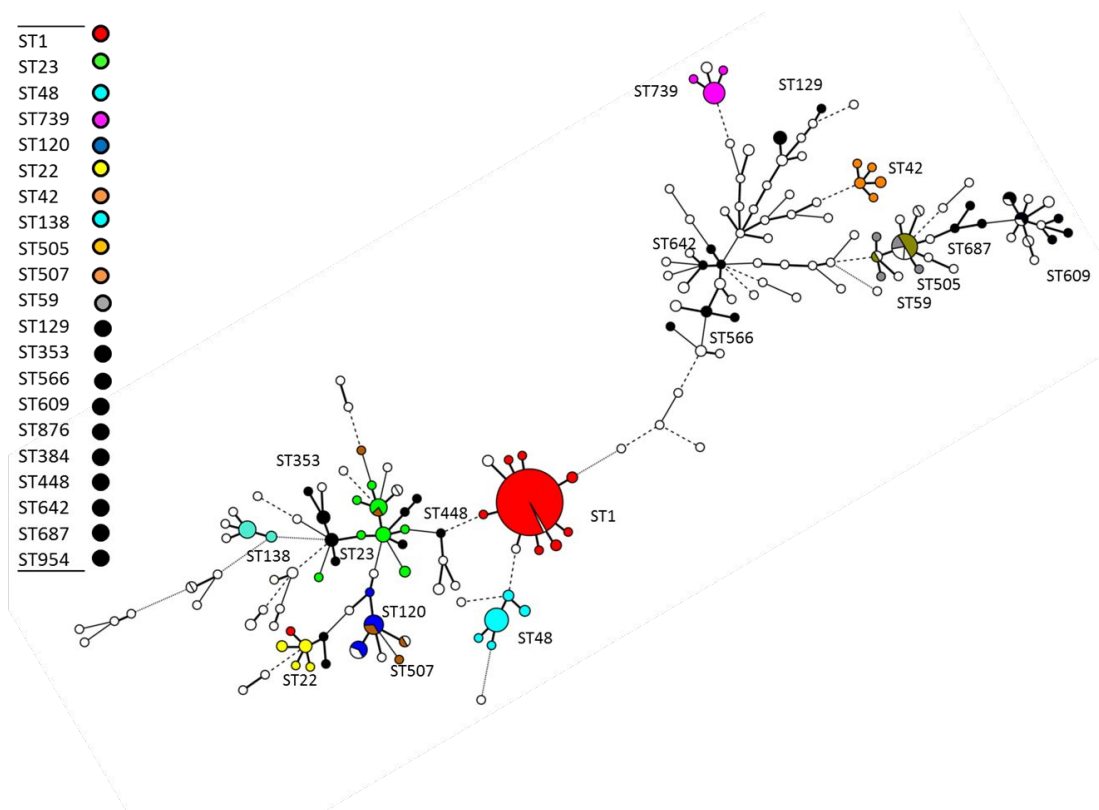


図1: Minimum spanning tree (MST) 法による *L. pneumophila* 315株のMLVA型の類縁関係
 一つの円が一つのMLVA型を示し、円の大きさはそれぞれのMLVA型を有する株数に比例している。枝の長さは、互いのMLVA型の遺伝子座の差異数に比例している。4ローカス以上の違いは、点線で示した。3株以上の存在しているSTを色分けした。

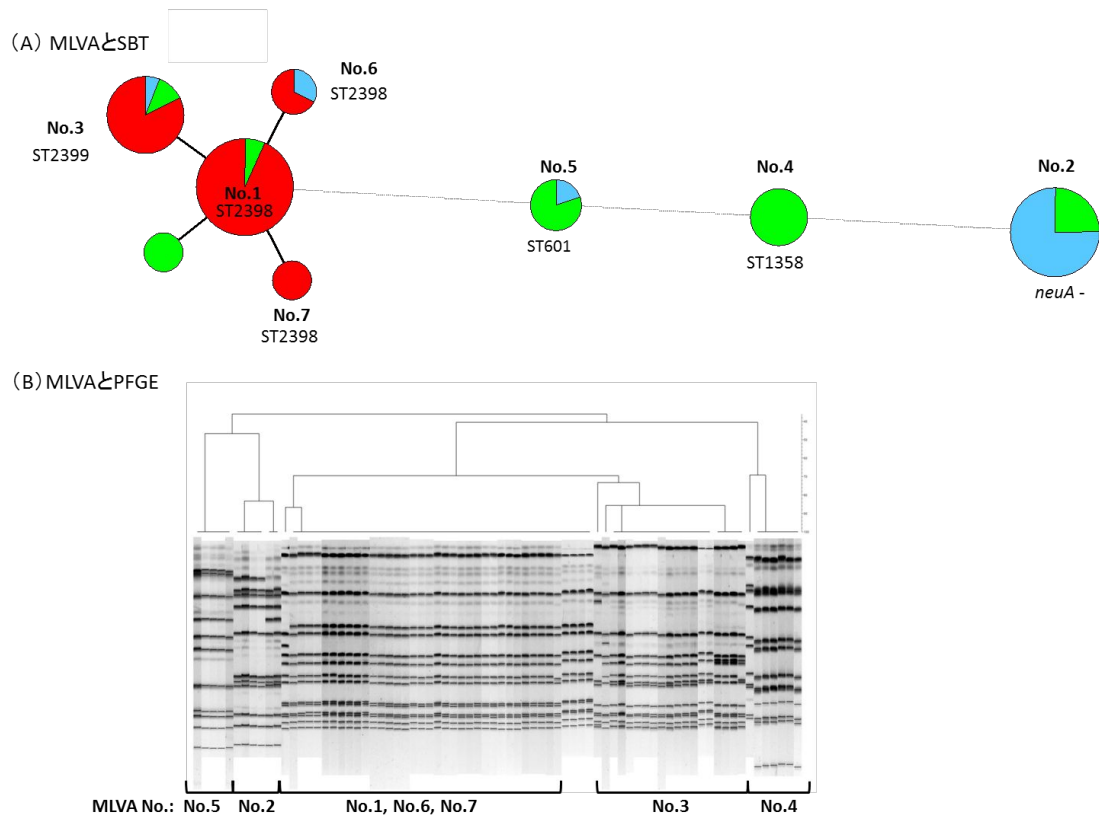


図2: 過去の集団事例におけるMLVA、SBT、PFGEの比較

(A) MLVA型に基づくMSTを描いた。患者由来株が赤色、浴槽水由来が水色、浴槽水の拭き取りを緑色で示した。一つの円が一つのMLVA型を示し、円の大きさはそれぞれのMLVA型を有する株数に比例している。枝の長さは、互いのMLVA型の遺伝子座の差異数に比例している。4ローカス以上の違いは、点線で示した。MLVA型はNo.で示した。MLVA型No.に含まれるST番号を示した。No.2の*neuA*遺伝子が増幅されずST番号が付与できなかったため、*neuA*-と示した。

(B) MLVA型No.とPFGEとの関連性を示した。