

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 28-30 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	米澤武志	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
研究協力者	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨：MLVA 法は、その特性として、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) 法やパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) 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本研究の目的とした。

*L. pneumophila* 血清群 1 の菌株コレクション 439 株 (臨床分離株 256 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 49 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 MLVA 型を決定した。さらに、血清群 1 以外の *L. pneumophila* についても、187 株の MLVA 型を決定した。その結果、MLVA の分解能は、SBT 法と比較して同等の値を示し、SBT のタイピングと概ね相関した。また、過去の集団事例 8 事例について、MLVA を適用し、PFGE および SBT との比較を行ったところ、MLVA 型は、PFGE および SBT のタイピングと概ね相関していた。

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) 法である。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、これらの課題を克服できることが期待される。

そこで、本研究では、*L. pneumophila* のMLVAの網羅的データ蓄積を行い、従来法との比較をすることで、MLVAのタイピング法としての有用性を評価することを目的とした。

## B. 研究方法

### 菌株：

(1) *L. pneumophila* 血清群(SG)1 の菌株コレクション

*L. pneumophila* SG1 の菌株コレクション計 439 株 (臨床分離株 256 株、浴槽水由来 55 株、冷却塔水由来 49 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) を用いて解析を行った(表 2)。

(2) SG1 以外の他の血清型

SG1 以外の *L. pneumophila* 187 株を用いた(表 3)。内訳は、SG2(14 株)、SG3(30 株)、SG4(12 株)、SG5(21 株)、SG6(27 株)、SG7(10 株)、SG8(13 株)、SG9(18 株)、SG10(16 株)、SG11(3 株)、SG12(5 株)、SG13(12 株)、SG14(3 株)、SG15(2 株)、SGUT(1 株)を用いた。分離由来別には、

臨床分離株(P)68 株、浴槽水由来(B)64 株、冷却塔水由来(C)31 株、土壌由来(SO)22 株、給湯水由来(K)2 株となる。

### (3) 過去の集団事例

過去の集団事例については、7 事例を用いた。7 事例の中で、一番大きな集団事例である菌株は図 2a の通りである(図 2a)。臨床分離株 45 株、3 つの浴槽水由来 (B1, B3, B5) 21 株、浴槽ふきとり由来 (B1, B3, B5) 22 株を用いた(図 2a)。浴槽水 B1 の拭き取りは F13, F16, F21、浴槽水 B3 の拭き取りは F11, F23、浴槽水 B5 の拭き取りは F19 に対応している。

残り 6 事例 (事例 A~事例 F) に関して、表 4 に示した。

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。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 1μl をサイズマーカー 0.25μl (GeneScan 1200 LIZ Size Standard (PCR-A と PCR-B), GeneScan 600 LIZ Size Standard (PCR-C))

と Hi-Di Formamide(ABI) 10 $\mu$ 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<sup>2)</sup>。また、各 MLVA 領域の多様性評価には、PIC (polymorphic information content) を算出した<sup>3)4)</sup>。

## 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(方法参照)。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), Lpms31 (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。

### *L. pneumophila* SG1 の菌株コレクションの MLVA 型

164 種類の ST (sequence type) を含む計 439 株は、233 種類の MLVA 型に分類

された。439 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 とある程度関連した樹形となった(図 1)。同一 ST において、MLVA 型が細分化される例も見られた一方で、異なる ST が同一 MLVA 型を示した例も存在した(図 1 矢印)。

さらに、439 株における SBT 法と MLVA 法の分解能 (HGDI) を比較したところ、それぞれ 0.9599、0.9717 となり、ほぼ同等の値を示した。また、各 MLVA 領域における PIC 値は、Sobral ら<sup>1)</sup>の報告とほぼ同等の値を示した(表 5)。

### SG1 以外の *L. pneumophila* の MLVA 型

119 種類の ST (sequence type) を含む計 187 株は、131 種類の MLVA 型に分類された。同一 ST 株は MLVA 型も 1、2 ローカス違いとなった(表 6)。しかしながら、3 つ以上の遺伝子が異なる ST68、ST114、ST537 において、MLVA 型が一致しており、ST によっては、現行の 12 VNTR 領域では菌株が識別できないことを示唆する結果となった(表 6)。

187 株における MLVA の分解能 (HGDI) は、0.9898 となり、SBT 法と同等の値を示した(表 5)。

### 過去の集団事例における MLVA の評価

7 事例についての MLVA 型を決定し、PFGE および SBT 型別との比較を行った(図 2 および表 4)。どの事例においても、患者株と一致または 1 ローカス違いの

MLVA 型の株が浴槽水等の感染源とされる環境から分離されており、ST および PFGE パターンとも概ね相関する結果となった。

#### MLVA の汎用性の評価

4 自治体に当所で作製した MLVA プロトコルを提供した。また、1 つの自治体は、5 月に研修を実施し、MLVA の汎用性の評価を行った。その結果、他の自治体においても、MLVA 型が PFGE と SBT タイピングと相関する結果が得られた。

#### D. 考察

国際的に普及しているタイピング法である SBT と MLVA の比較において、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。しかしながら、同一 ST でも MLVA 型が 3 ローカス以上異なる例、3 つ以上遺伝子の異なる ST で MLVA 型が一致する例、SG1 と他の SG の MLVA 型が一致した例など少数見出されており、遺伝子型別の手法間の相違点が示された。今後は、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れることにより、SBT と MLVA のタイピングの妥当性評価と、より最適な VNTR 領域の検討も必要になることが考えられる。

その一方で、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、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

関しており、MLVA タイピングが感染源特定のためのスクリーニングとして迅速なタイピング方法としての有用性を示唆している。また、施設の衛生管理の際には、菌株の定着性を調べるための評価にも有用であると考えられる。

また、他の自治体においても、当所のプロトコルで MLVA を活用し、有用性を評価することができた。その一方で、他の自治体間での比較の際に、フラグメントの大きさがずれる点や MLVA 領域によってリピート数換算の際に判断に迷う点等いくつかの課題も見出された。汎用性の高いタイピングとして MLVA を確立していくためには、見出された課題について、今後検討していく必要があると考えている。

#### 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、感染源の推定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（宮城県衛生環境研究所）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.

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

1) 田中忍、中西典子、有川健太郎、岩本朋忠、都倉亮道：人工水系におけるレジオネラ属菌の分布状況と宿主アカントアメーバ中での増殖様式. 第43回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会. 平成28年12月、大阪.

2) 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.

3) 中西典子、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：レジオネラ属菌の生活環境における分布状況と遺伝学的特徴. 環境微生物系学会合同大会2017. 平成29年8月、仙台.

4) Noriko Nakanishi, Shinobu Tanaka, Kentaro Arikawa, Tomotada Iwamoto: Distribution and molecular characteristics of *Legionella* spp. strains isolated from cooling tower and hot spring in Kobe City, Japan. The 9<sup>th</sup> International Conference on *Legionella*. 平成29年9月, Italy Roma.

5) 中西典子、野本竜平、田中忍、有川健太郎、岩本朋忠：冷却塔に定着する *Legionella pneumophila* のゲノム分子疫学. 第13回日本ゲノム微生物学会. 平成31年3月、東京.

### 2. 誌上発表

1) 温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証. 神戸市環境保健研究所報 46; 39-42, 2018.

H. 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)-TGAATTTCTCCCTTTGCTTG Lpms01R GCATATGACAAAGCCTTGCC		45	5
	Lpms31	Lpms31F (FAM)-CCTCGCAAGCCTATGTGG Lpms31R ATCGCCTAATTGCCGCTA		45	5
	Lpms33	Lpms33F (VIC)-GACACCACAGCAGTTTGAAC Lpms33R CGAGGAAATCTTCTTCAGCC		125	1.25
	Lpms35	Lpms35F (PET)-GAATCTGAAACAGTTGAGGATG Lpms35R TATCAACCTCATCATCCCTG		18	1.25
B	Lpms03	Lpms03F (VIC)-GGACAAACAACCAATGAAGC Lpms03R TGATGGTCTCAATGGTTCCG		96	5
	Lpms13	Lpms13F (NED)-CTCACCAGGATGCTTTGTGCG Lpms13R GCATCGGACTGAGCAAAGTA		24	5
	Lpms19	Lpms19F (PET)-GAACTATCAGAAGGAGGCGGA Lpms19R TCCAGAGGCTCTGGATTATC		21	1.25
	Lpms34	Lpms34F (FAM)-AAGGAATAAGGCGCAGCAC Lpms34R ATGCGAGGATGTTTGCGCATG		125	1.25
C	Lpms38	Lpms38F (NED)-CCTATCAACAGATGACGCTT Lpms38R GGATTGCCTTGGCATTAAAT		8	2
	Lpms39	Lpms39F (PET)-CTTGACGAGTAGGTGTGGG Lpms39R CCAACTCCTCAACGCAACAA		6	2
	Lpms40	Lpms40F (FAM)-TAGATCTCTTGCCGAGCTTC Lpms40R TTACCCAAGCCCTTATTGCG		6	2
	Lpms44	Lpms44F (VIC)-GCTACTGCAGCAACATCC Lpms44R TTATGCGAGAGTTTCATGA		6	2

表2. *L. pneumophila* SG1 439株のSequence type (ST)

Sequence type (ST)	No. of isolates	Sequence type (ST)	No. of isolates
ST1	77	ST905	3
ST23	23	ST954	3
ST48	15	ST2	2
ST120	15	ST52	2
ST89	13	ST86	2
ST739	11	ST122	2
ST42	10	ST127	2
ST138	9	ST154	2
ST507	9	ST211	2
ST22	8	ST256	2
ST505	8	ST278	2
ST384	6	ST445	2
ST550	6	ST493	2
ST59	5	ST553	2
ST353	5	ST593	2
ST502	5	ST599	2
ST876	5	ST604	2
ST129	4	ST644	2
ST132	4	ST763	2
ST142	4	ST788	2
ST566	4	ST973	2
ST609	4	ST977	2
ST679	4	ST1027	2
ST687	4	ST1186	2
ST701	4	ST1187	2
ST1346	4	ST2061	2
ST352	3	ST2128	2
ST448	3		
ST642	3	other STs	108

表3. SG1以外の*L. pneumophila* 187株のSequence type (ST)

Sero groups	No. of isolates	ST (No. of isolates)
SG2	14	ST354 (7), ST1354 (4), ST39(3)
SG3	30	ST93 (10), ST508(3), ST506(2), ST710(2), ST87 (1), ST305(1), ST392(1), ST430(1), ST465(1), ST995(1), ST1080(1), ST1712(1), ST2343(1), ST2394(1), ST2623(1), ST2650(1), ST2675(1)
SG4	12	ST1966(2), ST145 (1), ST246(1), ST392(1), ST643(1), ST1975(1), ST2586(1), ST2633(1), ST2649(1), ST2654(1), ST2671(1)
SG5	21	ST1032(3), ST1427(3), ST1413(2), ST114(1), ST313(1), ST1146(1), ST1424(1), ST1531(1), ST1628(1), ST1631(1), ST1632(1), ST1975(1), ST2397(1), ST2494(1), ST2651(1), ST2656(1)
SG6	27	ST114(4), ST537(4), ST68(3), ST242(2), ST1143(2), ST1945(2), ST64(1), ST1049(1), ST1341(1), ST1616(1), ST1992(1), ST2580(1), ST2661(1), ST2662(1), ST2665(1), ST2667(1)
SG7	10	ST1422(3), ST2626(3), ST1720(1), ST2641(1), ST2663(1), ST-(1)*
SG8	13	ST2617(4), ST2664(3), ST1376(2), ST1324(1), ST1866(1), ST2609(1), ST2629(1)
SG9	18	ST390(3), ST1808(2), ST73(1), ST484(1), ST512(1), ST768(1), ST1097(1), ST1136(1), ST1283(1), ST1817(1), ST2094(1), ST2415(1), ST2616(1), ST2666(1), ST2674(1)
SG10	16	ST1288(1), ST1409(2), ST1425(1), ST1426(1), ST1427(2), ST1516(1), ST2004(1), ST2618(1), ST2622(1), ST2624(1), ST2625(1), ST2668(1), ST2672(1), ST2673(1)
SG11	3	ST-(3)*
SG12	5	ST68 (3), ST461 (1), ST863(1)
SG13	12	ST2256(9), ST1826 (1), ST2113 (1), ST2603(1)
SG14	3	ST1374 (1), ST1638 (1), ST1873(1)
SG15	2	ST392 (1), ST1996 (1)
UT	1	ST1136 (1)

\* ST-: neuA(h)が増幅できず、ST番号が付与されなかった株

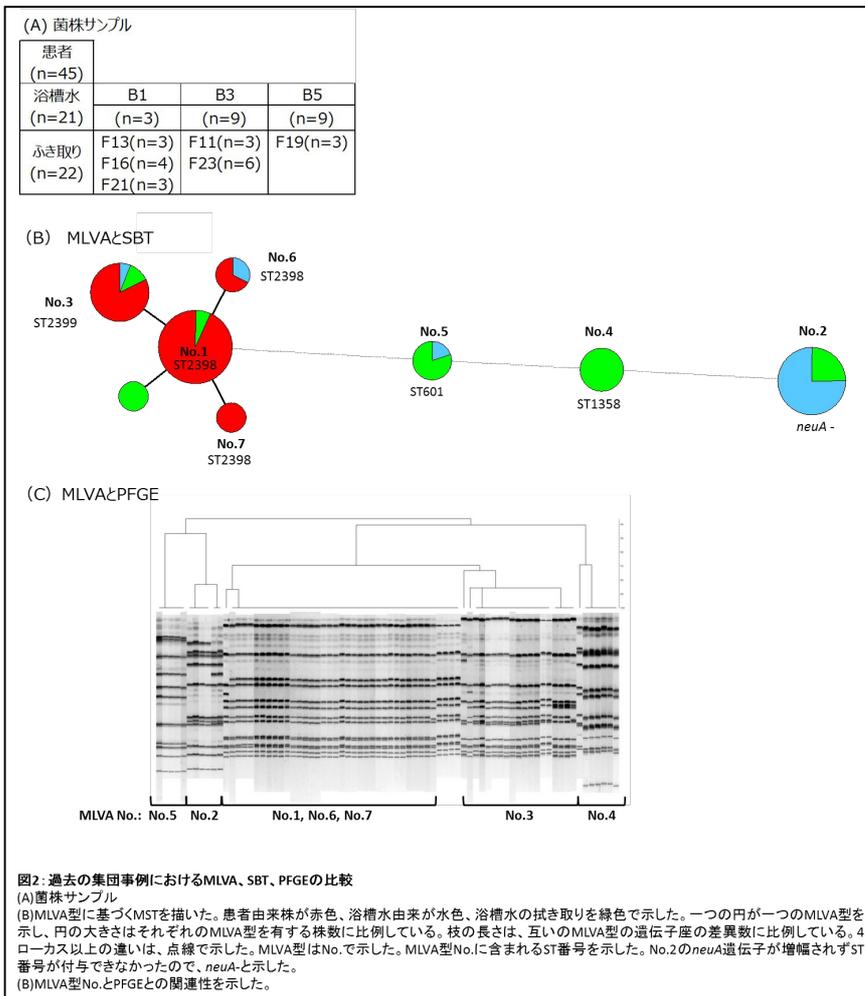
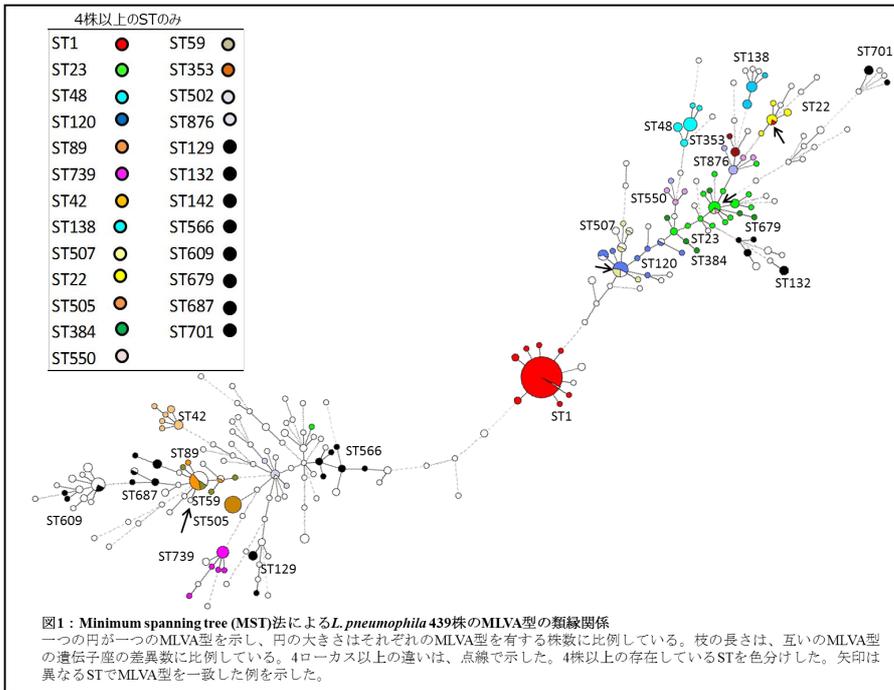


表4. 過去の集団事例A-FにおけるSBT, PFGE, MLVAの比較

事例	ID	Patient (P) Bath (B) shower (SH) 拭き取り(BS) ヘアークャップ チャー等(O)	SBT	MLVA type											PFGE	
				Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39		Lpms44
事例A	NIIB0281	B	23	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0282	B	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0284	BS	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0286	B	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0288	B	unknown	17	8	3	1	1	9	5	8	4	0	6	9	unknown
	NIIB0290	B	unknown	14	9.5	18	2	2	0	0	8	4	3	10	9	unknown
	NIIB0291	BS	unknown	15	8	13	1	1	11	4	8	4	3	0	9	unknown
	NIIB0292	P	23	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
	NIIB0293	P	unknown	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB0281型
事例B	NIIB0299	P	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
	NIIB0300	P	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
	NIIB0301	P	2	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
	NIIB0302	B	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	21	9	NIIB0299型
	NIIB0303	B	unknown	12	8	21	2	2	9	4	8	4	3	0	9	NIIB0299型
事例C	NIIB0374	P	23	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0375	P	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0376	P	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0377	P	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0378	B	unknown	13.5	8	25	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0379	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0380	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0381	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB0382	B	unknown	13.5	8	26	4	3	11	4	7	5	3	20	9	NIIB0374型
	NIIB2427	O	unknown	14	9	17	3	4	11	4	8	4	3	10	9	NIIB2427型
	NIIB2428	B	unknown	20	8	16	4	1	11	4	7	5	0	12	9	NIIB2428型
NIIB2429	B	unknown	20	7.5	16	4	1	11	4	7	5	0	12	9	NIIB2428型類似	
NIIB2430	F	unknown	20	7.5	16	4	1	11	4	7	5	0	12	9	NIIB2428型類似	
事例D	NIIB0390	P	1531	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	3	8	9	NIIB0390型
	NIIB0392	B	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	0	8	0	NIIB0390型
	NIIB0393	B	unknown	17	8	3	1	1	12	4	8	4	3	6	9	NIIB0393型
	NIIB0394	B	unknown	17	8	3	1	1	10	4	8	4	0	6	9	NIIB0394型
	NIIB0395	B	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	0	8	0	NIIB0390型
	NIIB0398	B	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	3	8	9	NIIB0390型
	NIIB0401	B	unknown	17	8	3	1	1	12	4	8	4	3	6	9	NIIB0393型
	NIIB0402	O	unknown	12.5	8	22	1	3	8	5	7	4	0	8	0	NIIB0390型
事例E	NIIB3385	SH	679	16.5	8	18	4	3	12	0	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3386	SH	23	13.5	0	18	4	0	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386型
	NIIB3387	B	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3388	B	23	13.5	0	0	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386型
	NIIB3389	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3390	P	23	13.5	0	18	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386型
	NIIB3391	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3392	P	23	13.5	0	18	4	3	0	4	7	5	0	20	9	NIIB3386型
	NIIB3393	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3394	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
事例F	NIIB3395	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3396	P	679	16.5	8	18	4	3	12	4	7	5	3	17	7	NIIB3385型
	NIIB3424	P	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3425	P	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3425型
	NIIB3426	B	2121	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3427	B	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3428	B	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	unknown
	NIIB3429	P	2113	14	9	24	2	3	8	4	8	4	0	0	9	NIIB3425型
	NIIB3430	B	2113	14	9	24	2	3	8	4	8	4	0	0	9	NIIB3425型
	NIIB3431	P	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3425型
	NIIB3432	P	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3434	BS	1447	14	9.5	24	2	2	9	4	8	4	19	0	9	NIIB3434型
	NIIB3435	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
	NIIB3436	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型
NIIB3437	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3424型	
NIIB3438	BS	2113	14	9	24	2	3	8	4	8	4	0	0	9	NIIB3425型	
NIIB3439	BS	2114	14	9	24	2	3	8	4	8	4	3	12	9	NIIB3424型	
NIIB3440	BS	2114	14	9	6	2	3	8	4	8	4	3	0	9	NIIB3425型	
NIIB3441	BS	2115	15	8	13	4	1	12	4	8	4	0	6	9	NIIB3441型	
NIIB3442	BS	2115	25	8	13	4	1	12	4	8	4	0	6	9	NIIB3441型	

(注) 各事例毎におけるMLVA一致および1ローカス違い(太字)をハイライトで示した。

表5. MLVA-12のHGDIと各VNTR領域の polymorphic information content (PIC)

VNTR(s)	PIC			
	Sobral et al.	This study		
	SG1 (n=320)	SG1 (n=439)	SG2-SG15 (n=187)	all (n=626)
Lpms01	0.6501	0.6913	0.6323	0.6777
Lpms03	0.5054	0.5219	0.4901	0.5421
Lpms13	0.7790	0.8409	0.8401	0.8467
Lpms19	0.2936	0.2869	0.4628	0.3449
Lpms31	0.8563	0.8836	0.8517	0.8943
Lpms33	0.7020	0.6453	0.7714	0.7183
Lpms34	0.6649	0.6772	0.6557	0.6863
Lpms35	0.8815	0.9083	0.8744	0.9196
Lpms38	0.2710	0.4450	0.4760	0.5484
Lpms39	0.8301	0.7885	0.8350	0.8344
Lpms40	0.5054	0.5221	0.3601	0.5222
Lpms44	0.5391	0.4119	0.3327	0.3944
HGDI of MLVA-12	0.9534	0.9717	0.9898	0.9843
HGDI of SBT		0.9599	0.9887	0.9792

表6 . SG1以外の*L. pneumophila* における4株以上ある同一STによるMLVA型

菌株No.	serogroup	ST	Source*	MLVA型											
				Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39	Lpms44
NIIB2503	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2504	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2505	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2609	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2637	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2757	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB2776	3	93	P	17	8	3	1	1	10	4	8	4	3	6	9
NIIB2914	3	93	P	17	8	5	1	1	10	1	8	4	3	6	9
NIIB3069	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	0	6	9
NIIB3859	3	93	P	17	8	3	1	1	10	1	8	4	0	6	9
NIIB0834	13	2256	C	7	7	10	2	1	11	4	7.5	4	0	7	7
NIIB1358	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1371	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1507	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	5	0	7	7
NIIB1620	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1656	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1820	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1929	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	0	0	7	7
NIIB1534	13	2256	C	7	7	10	2	1	0	4	7.5	4	3	7	7
NIIB2464	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB2495	2	354	P	16	7	3	3	2	8	4	8	4	3	6	9
NIIB2758	2	354	P	16	7	3	3	2	9	4	7	4	3	6	9
NIIB3017	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB3475	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB3654	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB3826	2	354	P	16	7	3	3	2	8	6	8	4	3	6	9
NIIB2791	6	68	P	0	8	5	1	1	18	4	8	4	3	6	9
NIIB2865	12	68	P	17	8	5	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1349	6	68	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1759	6	68	C	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2843	12	68	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2844	12	68	B	17	8	3	2	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2552	6	114	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB0815	6	114	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1786	6	114	B	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB1794	6	114	C	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2046	5	114	C	17	8	3	1	1	11	4	8	4	0	6	9
NIIB2137	5	1427	P	17	7	3	1	1	10	4	8	4	0	6	9
NIIB2299	5	1427	P	17	7	3	1	1	10	5	8	4	3	6	9
NIIB2915	10	1427	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	0	6	9
NIIB2961	5	1427	P	17	8	3	1	1	10	4	8	4	0	6	9
NIIB1283	10	1427	B	17	7	3	1	1	11	4	8	4	0	6	9
NIIB2487	6	537	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2634	6	537	P	17	8	3	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB2868	6	537	P	17	8	5	1	1	11	4	8	4	3	6	9
NIIB0864	6	537	B	17	8	3	1	1	9	4	8	4	3	6	9
NIIB0811	8	2617	B	17.5	7	18	4	3	8	4	7	5	0	22	7
NIIB0948	8	2617	B	17.5	8	17	4	3	10	4	7	5	0	29	9
NIIB1446	8	2617	B	17.5	7	18	4	3	10	4	7	5	0	22	7
NIIB2341	8	2617	SO	17.5	8	17	4	3	10	4	7	5	0	29	9

\*P : 患者, B : 浴槽水, C : 冷却塔水, SO : 土壌