

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）

公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の
衛生管理手法の開発のための研究
令和元年度分担研究報告書

MLVA タイピングの確立とゲノム分子疫学との比較解析

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	野本竜平	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。そこで、本研究では、これまでの研究から見出された問題点を解決するために、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れることで、SBT と MLVA のタイピングの妥当性評価を行い、より最適な MLVA 領域の検討を行うことで、遺伝子型別方法としての MLVA タイピングを確立し、汎用性を高めることを目的とする。

今年度は、ST が一致で MLVA 型が異なる例、MLVA 型が一致で ST 型が異なる例について計 28 株のゲノム配列を決定し、ゲノム系統解析の結果と各分子疫学解析手法の解析結果との比較検討を行った。その結果、それぞれの例において、分子疫学的手法としての MLVA と SBT は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられた。MLVA を菌株のスクリーニング（SBT の代替的）に用いることは、有用である。ただし、それぞれの手法だけでは、菌株識別できない場合も存在するので、双方の手法を併用するのが望ましいと考えられた。また、Miseq のリードデータから ST を決めるパイプラインの構築について大部分で完了した。Miseq リードデータから直接に多検体の ST を決定できるので、非常に有用な解析ツールとなると期待される。

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。近年、細菌の遺伝子型別解析として MLVA 法がよく用いられている。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。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法を*L. pneumophila*において導入することで、それら従来法の課題を克服できることが期待される。これまでに、約800株の*L. pneumophila*を用いて、従来法であるPFGEやSBTと比較し、MLVAタイピングの有用性について評価を行ってきた。その結果、MLVA型は、SBTのタイピングと同等の菌株識別能力を有することが明らかになった。その一方で、遺伝子型別の手法間の相違点も見出された。また、他自治体間との比較の際にも、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が見出され、汎用性の高いタイピングとしてのMLVAを確立するためには、プロトコル整備の必要性が示唆された。

そこで、本研究では、これまでの研究から見出された問題点を解決するために、全ゲノム配列を用いた系統解析を取り入れることで、SBTとMLVAのタイピングの妥当性評価を行い、より最適なMLVA領域の検討を行うことで、遺伝子型別方法としてのMLVAタイピングを確立し、汎用性を高めることを目的とする。

B. 研究方法

① 菌株：STが一致でMLVA型が異なる例としてST507の9株を用いた（表1）。また、MLVA型が一致でST型が異なる例として20株を用いた（表2）。さらに、ST1でMLVA型が大きく異なる1株を用

いた。

②MLVA：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°C15分後に95°C30秒、60°C1分、72°C70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）10μlに混合し、95°C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²⁾。

③ゲノム解析：QIAseqFX(QIAGEN)を用いてDNAライブラリを調製し、Miseq reagent Kit v.3を用いてリードデータを取

得した。A5-Miseq でアッセンブリし、PROKKA でアノテーションを行った。全ゲノム配列による系統解析には kSNP3 を用いて解析した^{3,4)}。

C. 研究結果

(1) Miseq リードデータから ST を決める方法の確立

L. pneumophila の ST は、EWGLI (The European Working Group for Legionella Infections) により運用されている website に 7 遺伝子の必要な部分の配列情報を照合することで決定するが、ドラフトゲノムのコンティグ配列から当該遺伝子配列部分のみを正確に抽出するのは効率的ではないため、リードデータをそのまま当該遺伝子配列にマッピングしすることで直接 ST が決定できるパイプラインの構築を目指した。

まず、公開されている配列情報から 7 遺伝子 (*flaA*, *pliE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) の SBT データベースを作成した。そのデータベースに対して、Miseq で得られたリードデータを、SRST2 を用いてマッピングを行い、得られたアリルプロファイルを既知の ST データベースと照合し、ST を決定するパイプラインを構築した。但し、*mompS* についてはゲノム上にタンデムに存在するオルソログ領域のリードがマッピングされ、アリルが正しくアサインされないケースが稀に存在したため、今後異なるツールを併用することで対応する予定である。

(2) ゲノム分子疫学における MLVA, SBT の遺伝子型別の比較

SBT と MLVA における相違の要因を NGS を利用した *L. pneumophila* の全ゲノム配列を用いた系統解析から明らかにするために、ST が一致で MLVA 型が異なる例、MLVA 型が一致で ST 型が異なる例についてゲノム配列を決定し、ゲノム系統解析の結果と各分子疫学解析手法の解析結果との比較検討を行った。

① ST が一致で MLVA 型が異なる例

ST507 の 9 株の MLVA 型は 5 種類に分類された。そのうち、1 株だけが、Clonal Complex (CC) から外れた MLVA 型を示した (表 1 と図 1(A))。9 株のコアゲノム SNPs の系統解析を行った。その結果、CC から外れた菌株は、コアゲノム系統樹でも、他の菌株とは系統的に離れた位置にカテゴライズされており、MLVA の MST の近縁関係を反映していた (図 1(B))。

② MLVA 型が一致で ST 型が異なる例

同一 MLVA 型を示した 20 株の ST は、11 種類含まれており、ST に基づく菌株間の関連性を図 2 (A) に示した (表 2)。ST2311 と ST622 は CC から外れた。これらの株のコアゲノム SNPs の系統解析を行った結果、コアゲノム SNPs の系統樹が ST の MST の近縁関係を反映していた (図 2 (B))。

③ MLVA 解析により ST の誤同定が明らかになった事例

ST1 の 77 株のうち、1 株だけが全く異

なる MLVA 型を示したため (図 3 (A))、その株のゲノム解析を行い、冷却塔水より分離された ST1 のゲノム配列との比較を行った⁴⁾。(1)で構築したパイプラインを用いて ST を調べたところ、ST22 であることが判明し、ST1 の株とは異なる系統を示した (図 3 (B))。これまで蓄積してきた MLVA 型のプロファイルから ST22 の MLVA 型との比較を行ったところ、ST22 の MLVA 型と同一の MLVA 型を示した (図 3 (C))。

D. 考察

全ゲノム系統解析から、SBT、MLVA の手法間の相違点について比較した。ST が一致で MLVA 型が異なる例では MLVA 型の MST が、MLVA 型が一致で ST が異なる例においては ST の MST が、それぞれ全ゲノム系統解析の傾向を反映していた。従って、MLVA と SBT はレジオネラの全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられる。しかし、大まかな系統的位置は一致するものの、片方の手法で細分化されているクラスターが、もう片方の手法では遺伝子型が一致するというケースが存在することも明らかとなった。そのため、集団発生事例等個々の菌株の同一性を詳細に確定させたい場合は、可能であればゲノム解析を実施することが望ましいが、コスト等の面で難しい場合は MLVA と SBT を併用して分子疫学解析を実施することが必要であるかもしれない。今後はさらに、このような事例を増やし検討を重ね、より最適な VNTR 領域の提示も必要になるだろう。また、MLVA

型からどの ST グループに入るのか予想できる可能性があることが明らかとなったので、ST 毎の MLVA プロファイルをデータベースとして整備しておくことも重要であることが示唆された。

さらに、Miseq のリードデータから ST を決めるパイプラインの構築について大部分で完了した。Miseq リードデータから直接に多検体の ST を決定できるので、非常に有用な解析ツールとなると期待される。

E. 結論

分子疫学的手法としての MLVA と SBT は全ゲノム系統解析の傾向を十分に反映していると考えられた。MLVA を菌株のスクリーニング (SBT の代替的) に用いることは、有用である。ただし、それぞれの手法だけでは、菌株識別できない場合も存在するので、双方の手法を併用するのが望ましい。

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)、岩渕香織 (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所)、細谷美佳子(新潟県保健環境科学研究所)、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) 中西典子ら, MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴, 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)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28~30 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 37-46, 2019
- 3) Raphael BH, Baker DJ, Nazarian E, Lapierre P, Bopp D, Kozak-Muiznieks NA, Morrison SS, Lucas CE, Mercante JW, Musser KA, Winchell JM., 2016. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol.* 82:3582-3590.
- 4) Nakanishi N, Nomoto R, Tanaka S, Arikawa K, Iwamoto T., 2019. Analysis of Genetic Characterization and Clonality of *Legionella pneumophila* Isolated from Cooling Towers in Japan. *Int J Environ Res Public Health.* 16. doi: 10.3390/ijerph16091664.

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 中西典子、野本竜平、田中忍、岩本朋忠: 冷却塔に定着する *L. pneumophila* が保

有するプラスミドの遺伝的特徴. 第 14 回
日本ゲノム微生物学会年会. 2020 年 3 月、
愛知

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 : ST507のMLVA型

ID	Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13	Lpms19	Lpms03	Lpms40	Lpms38	Lpms39	Lpms44
N IIB2532	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	19	20	9
N IIB2630	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	19	20	9
N IIB3309	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	19	20	9
N IIB3758	16.5	7	25	4	3	5	4	7	5	19	20	9
N IIB3280	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	3	20	9
N IIB3637	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	3	20	9
N IIB3710	13.5	7	25	4	3	5	4	7	5	3	20	9
N IIB3261	13.5	7	25	4	2	4	4	7	5	3	20	9
N IIB3204	13.5	8	27	4	3	11	4	7	5	3	20	9

表2：同一M LVA型を示した菌株のST

ID	SG	ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>
N IIB 1349	6	68	3	13	1	28	14	9	3
N IIB 1759									
N IIB 2843	12								
N IIB 2552									
N IIB 0815	6	114	3	6	1	6	14	11	9
N IIB 1786									
N IIB 1794									
N IIB 3815	12								
N IIB 2603	15	392	3	13	1	6	14	9	11
N IIB 2487	6	537	3	13	1	28	12	9	3
N IIB 2634									
N IIB 3660	1	553	3	6	1	3	14	11	9
N IIB 3914									
N IIB 3410	1	561	3	6	1	6	14	11	1
N IIB 2581	1	609	3	13	1	1	14	9	1
N IIB 3464									
N IIB 3645	1	622	3	13	1	3	9	9	9
N IIB 3811	1	1077	3	6	1	1	14	11	1
N IIB 0850	6	1992	3	6	1	6	11	11	9
N IIB 3741	1	2311	3	7	1	3	5	11	11

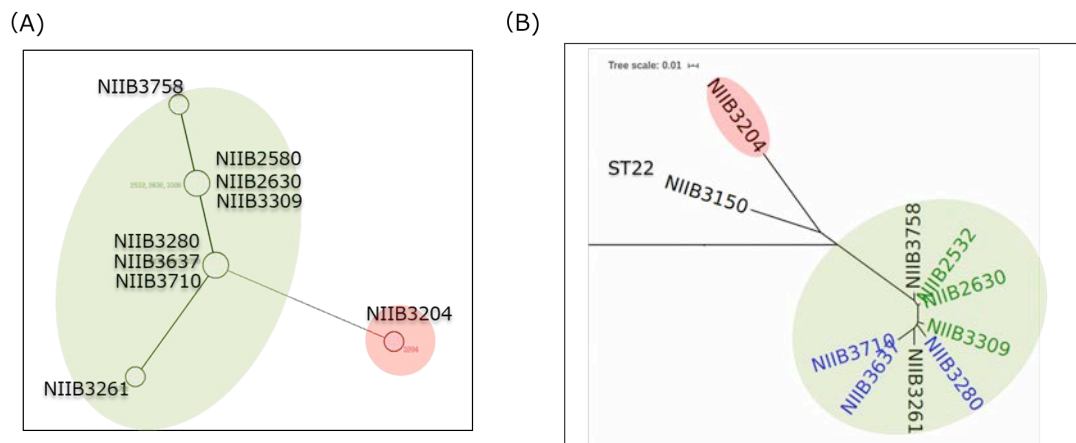


図1. ST507でMLVA型が異なる菌株の全ゲノム系統解析
 (A) MLVAに基づくMST (B) コアゲノムSNPsに基づいた系統樹

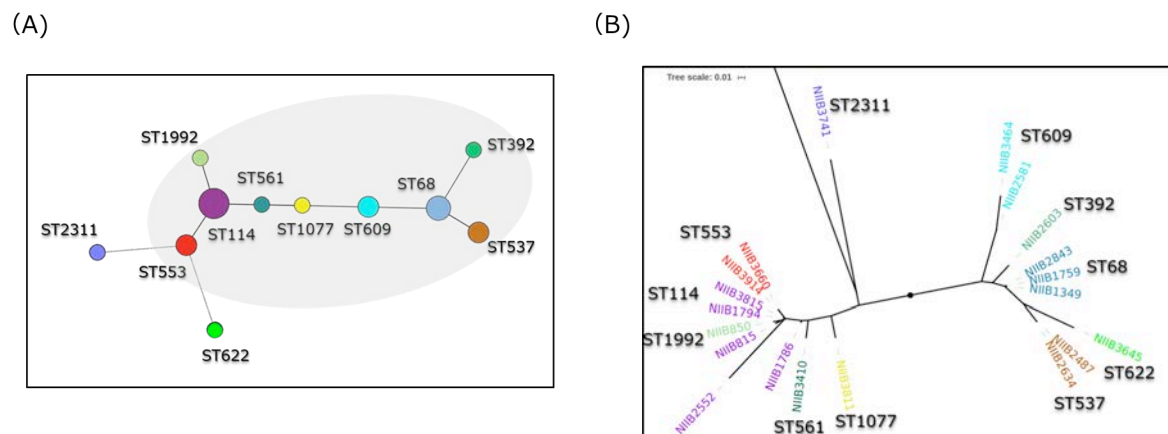
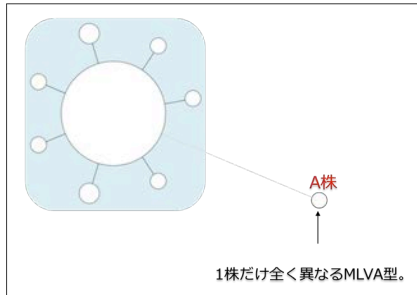
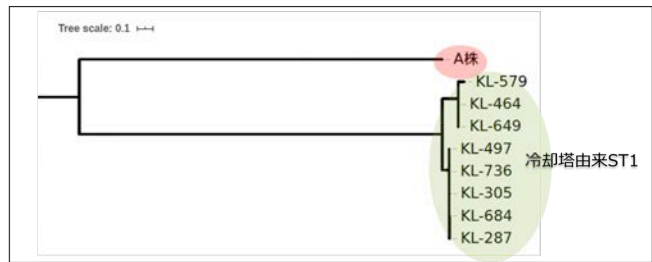


図2. MLVA型が一致でST型が異なる例。
 (A) STに基づくMST (B) コアゲノムSNPsに基づいた系統樹

(A)



(B)



(C)

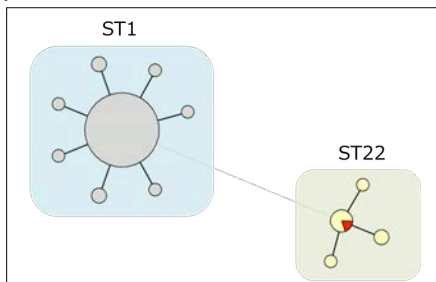


図3. ST1の77株のMLVA型と全ゲノム系統樹。

(A) ST1の77株のMLVAに基づくMST。A株は他のST1とはMLVA型が異なった。

(B) 冷却塔水由来ST1株とA株のコアゲノムSNPsに基づいた系統樹。

(C) ST1とST22のMLVA型に基づくMST。A株（赤色）はST22と同じMLVA型を示した。