

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）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部

分担研究報告書

Legionella pneumophila 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良

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	中西典子	神戸市健康科学研究所 感染症部
研究協力者	小松頌子	神戸市健康科学研究所 感染症部
研究協力者	田中 忍	神戸市健康科学研究所 感染症部
研究協力者	森中りえか	(株) ファスマック 遺伝子検査事業部

研究要旨： 従来の免疫凝集法では血清群の判定が不能だった *Legionella pneumophila* の菌株について、新しく開発した multiplex-PCR 法とその改良により、血清群の型別を可能にした。本法を用いると判定不能とならず、いずれかの血清群に型別できた。本法の改良では、プライマーの修正と追加により、血清群 13 と 14 の型別能力が向上した。従来の免疫凝集法では、必要な菌体量の確保に培養の日数を要したが、PCR を用いた本法では、ごく少量の菌で実施が可能となった。判定不能を解決した際に、免疫凝集法の前処理における問題点を指摘した。本法は判定までの日数が短く、感染源の特定に有用と期待できる。

A. 研究目的

レジオネラ症の主要な起因菌である *L. pneumophila* は、15 の血清群（Serogroup、以下 SG と略）が知られている。レジオネラ症患者の感染源を特定するには、患者から菌株を分離し、感染源が疑われる入浴施設などからの環境分離株をスクリーニングし、血清群が一致した菌株について、遺伝子解析を行い、その同一性を確認する。従来行われてきた免疫血清を用いた凝集反応による血清群別は、菌体の量を必要とし、培養による菌体の調製に日数がかかるといった欠点があった。また、いずれの免疫血清とも反応せず、群別できない菌株の存在も問題となっていた。

レジオネラ症の診断の 95% は、尿中抗原の検出によって行われている¹⁾。従来の尿中抗原検出キットは、起因菌が *L. pneumophila* SG1 の場合のみ陽性となったが、2019 年より他の血清群の場合も診断可能な尿中抗原キットが販売され、使用率が伸びている²⁾。そうした背景か

ら、従来は SG1 の群別が主であったところを、2 から 15 の群別の必要性が高まりつつある。一方で、できれば培養の時間をかけず少量の菌体から血清群を型別できる方が、感染源の特定には有利である。

そこで当該研究では、血清群別を微量な試料から行うことの出来る、multiplex-PCR (M-PCR) 法を開発³⁾した。本法は 2 段階から成り、1 段階目の PCR で、SG の 1、2、3/15、5、6/12、7、8、9、11、13 の判定ができる（3 と 15、6 と 12 は区別することができない）。いずれの血清群のバンドも得られなかった場合は、SG4/10/14 プライマーを用いた 2 段階目の PCR を行い、バンドを確認する（バンドが得られた場合、SG4 か 10 か 14 のいずれかである）。供試菌株が *L. pneumophila* である場合には、1 段階目か 2 段階目で血清群に特異的なバンドを確認できる。本研究において、M-PCR を用いて、免疫血清では群別不能だった菌株の型別を行った。さらに SG13 と 14 の検出を改良し、その

後にレジオネラレファレンスセンターを通じて普及を進めた。

B. 研究方法

1. 使用菌株

2016年から2020年に神戸市内の浴場水から分離された *L. pneumophila* 220株の内、レジオネラ免疫血清「生研」（デンカ株式会社）を用いて判定不能のSGUTとされた *L. pneumophila* 41株を使用した。基準として、日本国内で分離された、SG1から15の15株を使用した（レジオネラ免疫血清「生研」による判定）。この15株については、SG1は長崎大学から分与された臨床分離株、SG2から15は東京都予防医学協会から分与された環境分離株である。

2. 実験方法

M-PCR法によるSGg (SG-genotypes)の決定は、中植らの方法³⁾にしたがった。混合DNAの作製には、DNA Blood & Tissue Kit (QIAGEN)で抽出した精製DNAを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがった。利益相反委員会の指導・管理に従って、研究協力関係にある企業等について、研究班内で情報共有を行った。開示すべき企業からの経済的利益は受けていない。

C. 研究結果

1. レジオネラ免疫血清において判定不能だった41株のM-PCRによる型別

レジオネラ免疫血清において判定不能のSGUTとされた41株(18.6%)に対して、M-PCRを適用してSGg (SG-genotypes)を決定した。24株(58.5%)がSGg4/10/14、7株(17.1%)がSGg1、3株(7.3%)がSGg5、3株(7.3%)がSGg6/12、3株(7.3%)がSGg8、1株(2.4%)がSGg7に血清群別された(図1)。すなわち、41株全部がいずれかの血清群に定まり、不明がなかった。

临床上重要なSGg1について、レジオネラ免疫血清による型別を再度検討したところ、前処

理の加熱処理の有無により結果が変化することが判明した。SGg1と判定されたSGUT株について、生菌を用いた免疫凝集反応(Oxoid レジオネラ・ラテックステスト(関東化学))を実施すると、すべてSG1となり、M-PCRの結果と一致した。

2. プロトコールの改良

(1) SG14プライマーの設定

中植ら³⁾が登録したSG14の塩基配列(accession no. LC586140)において、*lpg0745*遺伝子から743 kb下流にSG14特異的な遺伝子が存在したため、その遺伝子を検出するプライマーを設定した。このPCRによりSGg14も群別が可能となった。

なお、先のSGUTからSGg4/10/14と型別できた24株にSGg14は含まれておらず、すべてSGg4/10と判定された。

(2) SG13プライマーの改良

後述する混合DNAを用いたポジティブコントロールの作製にあたり、SGg13のバンドが弱くなる現象が認められた。ATCC 43736の配列(accession no. FR747827)に基づく従来のSG13プライマーには、日本のSG13(accession no. LC586138)³⁾で多く見られる置換変異とのミスマッチが存在したことから、混合塩基から成るプライマーに改良した。

(3) 混合DNAを用いたポジティブコントロールの用意

SGの8、1、3/15、2、6/12、14の精製DNAの同量混合物(セット1)、およびSGの5、11、13、9、7の精製DNAの同量混合物(セット2)、の2セットの混合物を用意した。これを鋳型として1段階目のM-PCRを行うと、それぞれに対応するバンドが得られ、陽性コントロールかつサイズマーカーとなることが確認できた(図2)。

以上により改良したプロトコール(別添1)をレジオネラ・レファレンスセンターを通じて地方衛生研究所に配布した。

D. 考察

免疫血清では判定不能であった 41 株を 6 種類の SGg に分けることができた。本法を用いると判定不能とならず、いずれかの SGg に型別できるので、疫学調査において有用な型別法であると考えられる。また、従来の免疫凝集法を行うのに必要な菌体を確保するための培養には日数がかかるが、PCR を用いた本法は、ごく少量の菌数で施行することができるので、判定までの日数が短くなる。感染源特定の際の時間の短縮が期待できる。血清凝集反応の交叉反応を避ける前処理として加熱処理を行われることがあり、菌株によってはこの加熱処理により本来の免疫原性が失われると判明したが、M-PCR 法ではそのような特別な検討を必要としない。

本法で得られた増幅産物は、アガロースゲル電気泳動で数 10 bp 違いのバンドとして出現するが、市販の 100 bp ラダー-DNA マーカーと一緒に泳動しただけでは、バンドサイズの判断に苦慮することもある。今回開発した混合 DNA を用いたポジティブコントロールを用いることにより、バンドサイズの判定を容易にすることができた。

E. 結論

従来の免疫凝集法で判別不能だった *Legionella pneumophila* の菌株が、新しく開発した M-PCR 法により、型別することができるようになった。SG13 と SG14 の型別能力を向上させる改良を加えた。バンドサイズの判定を容易にするポジティブコントロールを用意した。配布用プロトコールを作成した。

F. 参考文献

- 1) 国立感染症研究所 感染症疫学センター. レジオネラ症の届出状況、2011 年第 1 週～2021 年第 35 週.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/legionella-m/legionella-idwrs/10791-legionella-20211201.html>
 - 2) Kinjo T, Ito A, Ishii M, Komiya K, Yamasue M, Yamaguchi T, Imamura Y, Iwanaga N, Tateda K, Kawakami K. National survey of physicians in Japan regarding their use of diagnostic tests for legionellosis. *J. Infect. Chemother.* 28:129. 2022.
 - 3) Nakaue R, Qin T, Morita M, Ren H, Chang B, Murai M, Amemura-Maekawa J, Ohnishi M. Development of a Multiplex-PCR Serotyping Assay for Characterizing *Legionella pneumophila* Serogroups Based on the Diversity of Lipopolysaccharide Biosynthetic Loci. *J Clin Microbiol.* 59: e0015721. 2021.
- #### G. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Komatsu S, Tanaka S, Nakanishi N. Evaluation of *Legionella pneumophila* SGUT Serotypes Isolated from Bath Water Using a Multiplex-PCR Serotyping Assay. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 76, 77-79, 2023.
 2. 学会発表
 - 1) Nakaue R, Morita M, Murai M, Amemura-Maekawa J. PCR serotyping of *Legionella pneumophila* based on the diversity of LPS biosynthetic loci. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
 - 2) Amemura-Maekawa J, Harada N, Murai M, Morita M, Akeda Y. Evaluating *Legionella pneumophila* NaCl-resistant mutant virulence using *Galleria mellonella* model. The 10th International Conference on *Legionella*. Sep. 2022. Yokohama.
 - 3) 前川純子：レジオネラ属菌検査法の現状と今後の展望. 第 34 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会. 2023 年 2 月. 横浜市.
 - 4) 前川純子、森中りえか、明田幸宏：

Legionella pneumophila 血清型別マルチプレックス PCR 法の改良. 第 96 回日本細菌学会総会. 2023 年 3 月. 姫路市.

3. 研修会

- 1) 前川純子：レジオネラ対策、専門課程 I 保健福祉行政管理分野分割前期・専門課程 III 地域保健福祉専攻科、2022 年 5 月、Web 対応.
- 2) 前川純子：レジオネラ属菌の検査と対策、

令和 4 年度 短期研修 環境衛生監視指導研修、2022 年 11 月、Web 対応.

- 3) 前川純子：レジオネラ. 令和 4 年度 希少感染症診断技術研修会、2023 年 2 月、Web 対応.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

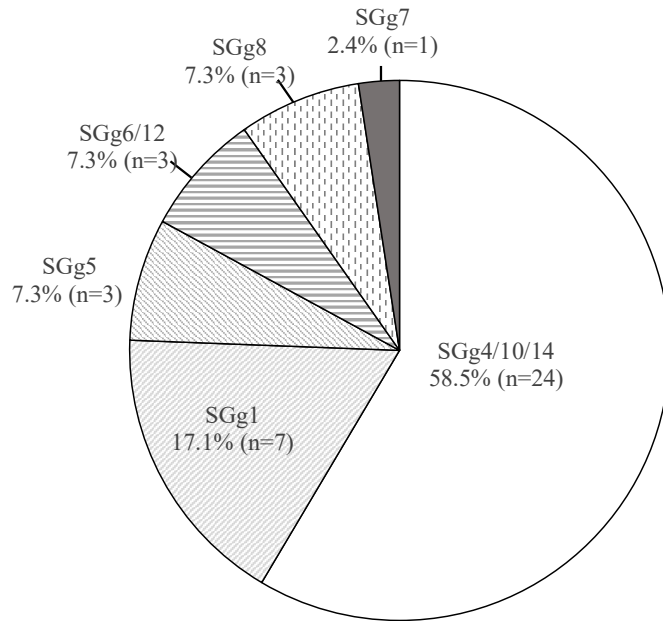


図 1. レジオネラ免疫血清で SGUT と判定された *L. pneumophila* 41 株の、M-PCR 法を用いた血清群別 (SGg) の結果割合

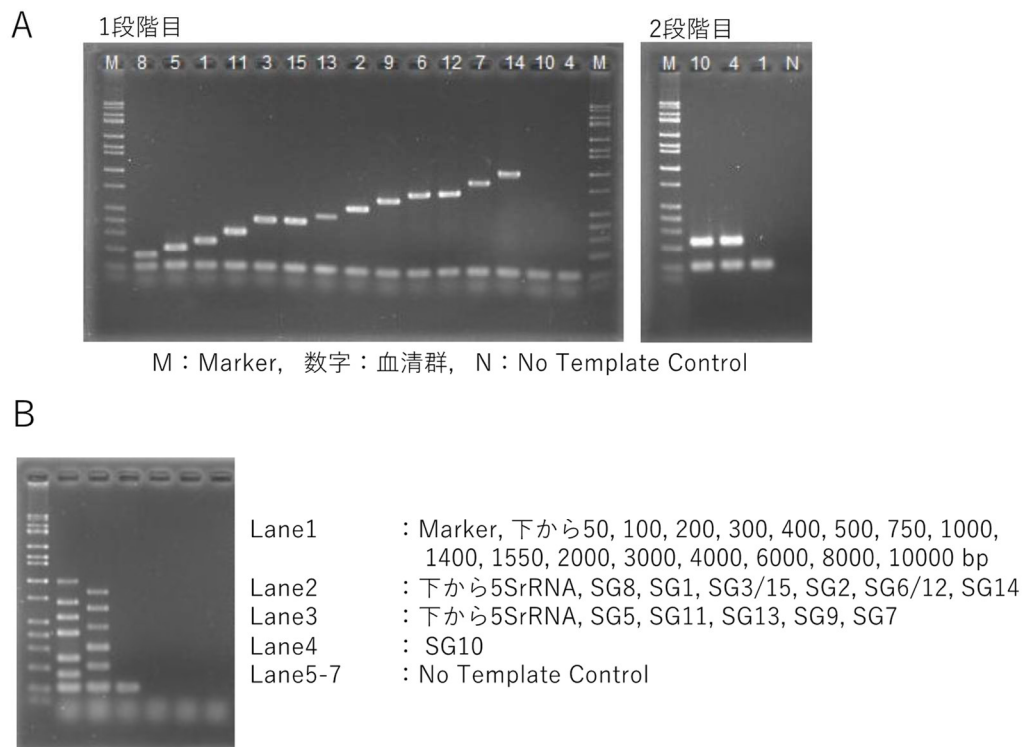


図 2. 基準株を用いたポジティブコントロールの用意

(A) 各血清群の菌株から抽出した DNA を鋳型に用いた、各 M-PCR の結果。(B) 出現するバンドが 1 段おきになるよう、抽出 DNA を混合してポジティブコントロール (2 セット) を用意した。各セットを鋳型に M-PCR を行った結果 (Lane 2 がセット 1、Lane 3 がセット 2 に対応)。

<Legionella pneumophila のマルチプレックス PCR による血清型別法> Ver. 2.0

L. pneumophila は 15 血清群に分けられるが、血清群特異的配列プライマーを用いたマルチプレックス PCR (M-PCR) により、血清群をグループ分けすることができる。この M-PCR は 2 段階から成り、1 段階目の M-PCR で、血清群 1、血清群 2、血清群 3/15、血清群 5、血清群 6/12、血清群 7、血清群 8、血清群 9、血清群 11、血清群 13、血清群 14 の判定ができる (血清群 3 と 15、血清群 6 と 12 は区別することができない)。いずれの血清群のバンドも得られなかった場合は、血清群 4/10 プライマーを用いた 2 段階目の PCR を行い、バンドを確認する (バンドが得られた場合、血清群 4 か 10 と判定される。血清群 4 と 10 は区別できない)。供試菌株が *L. pneumophila* である場合には、1 段階目か 2 段階目のいずれかで血清群特異的なバンドが確認できる。スライド凝集反応でいずれの免疫血清にも凝集せず、UT と判定される菌株も M-PCR ではいずれかに分類される。免疫血清による群別と区別するため、PCR による血清型別は、SG の後に g を加えて、SGg1 のように記載することとする。M-PCR には *Legionella* 属特異的プライマーも加えていて、供試菌株が *Legionella* 属菌であることを確認するとともに、PCR 反応が正しく行われているか確認できる。

方法

1 段階目の M-PCR 用として、血清群 4/10 以外のプライマーセットと *Legionella* 属特異的プライマーセットからなる 24 種類のプライマー (表 1) 各 20 pmol/μL をプールした Primer-Mix を予め作製する。2 段階目の M-PCR 用には、血清群 4/10 プライマーセットと *Legionella* 属特

異的プライマーセット各 20 pmol/μL をプールする。2 段階目の M-PCR は 1 段階目で血清群が
決まらなかったときに行う。

M-PCR の反応溶液組成は以下の通り（1 検体当たり）。

QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix（Qiagen, Hilden, Germany） 10 μL

Primer-Mix 1 段階目 4.8 μL（最終プライマー濃度 0.2 μM）

2 段階目 0.8 μL（最終プライマー濃度 0.2 μM）

鋳型 DNA 1ng 程度あるいはレジオネラ菌体*（ 10^4 - 10^6 CFU 相当）

滅菌水を加えて、全量を 20 μL にする。

* 滅菌した爪楊枝で平板上のコロニーをつつき、10~100 μL の滅菌水に懸濁し、そのうち
の 1 μL を用いる。

反応条件

95°C で 15 分間の初期変性

28 回の増幅サイクル 94°C で 30 秒の変性

60°C で 90 秒のアニーリング

72°C で 30 秒の伸長

72°C で 10 分間の最終伸長

100—1,000 bp の範囲がよく分離されるような条件（例えば、0.5×TAE buffer、2.0%アガ
ロースゲル）で、ローディングバッファーを添加した PCR 反応液 2 μL を電気泳動にかける。
サンプルの少なくとも片方の隣に、100 bp 刻みの DNA サイズマーカーを泳動する（例えば、
Gene Ladder; ニッポンジーン、2.5 μL/レーン）。

SG8、SG1、SG3/15、SG2、SG6/12、SG14 の精製 DNA の同量混合物および SG5、SG11、

SG13、SG9、SG7 の精製 DNA の同量混合物を用いて、1 段階目の M-PCR を行うと、それぞれに対応するバンドが得られ、陽性コントロールかつサイズマーカーとなる。

結果

日本と中国の臨床分離株、環境分離株計 238 株（各血清群の菌株数は、3 から 48 株）について、M-PCR による血清型別を行ったところ、デンカのレジオネラ免疫血清で群別できなかった 5 株を除いて、すべて免疫血清による結果と一致した。免疫血清で群別できなかった 5 株は、SGg4/10 が 3 株、SGg6/12 が 1 株、SGg8 が 1 株であった¹⁾。

参考文献

1 Nakaue R, Qin T, Morita M, Ren H, Chang B, Murai M, Amemura-Maekawa J, and Ohnishi M: Development of a multiplex-PCR serotyping assay for characterizing *Legionella pneumophila* serogroups based on the diversity of LPS biosynthetic loci. J Clin Microbiol. 59: e00157-21, 2021.

問い合わせ先

国立感染症研究所 細菌第一部

前川純子

jmaekawa@niid.go.jp

TABLE 1 Primer sequences of the PCR serotyping ¹⁾

Primer set	Target gene (Gene name)	Product size (bp)	Target SG(s)	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
SGg1	<i>sg1-25 (srkA)</i>	249	SG1	AAACGCCTCTTTGCTGAACCAG	GTTGGGCATCTTCTTGATTAATCC
SGg2	<i>sg2-37</i>	543	SG2	AAACGAGGGTACTAAGTGC	TATCAGGGGTAGCTGTTGGC
SGg3/15	<i>sg3-48/sg15-49</i>	408	SG3 and SG15	GGAATTTGTAAAGCAAAGAAAACCAG	AGATGTTTTGATCGCTAAAATGCCT
SGg5	<i>sg5-35</i>	205	SG5	GAACCTATTCTTAATCCAGAGG	TAGACGCATTGCCAAACAAG
SGg6/12	<i>sg12-57</i>	698	SG6 and SG12	TTACTTGGCCATCTAAGTTACC	CTTCACTTCCTTGGACTGTGC
SGg7	<i>sg7-30 (dapA)</i>	835	SG7	TTAGTATTGAGAGGGTTGGC	TGTGTAGGGCTTACAAAGTCC
SGg8	<i>sg8-68</i>	166	SG8	TGCTCACTCTATAGTTTATGATTGG	TAGTTTGACGATCAATTCCAGC
SGg9	<i>sg9-29</i>	634	SG9	TTATCTGGATTATCTTCACCTCG	GAATGGTATGAGAGAATCACTGG
SGg11	<i>sg11-23 (legI)</i>	314	SG11	ACATTACGGTAGTGGCAAAGG	TGTTCGATTCACCTAACAATGC
SGg13	<i>sg13-37</i>	461	SG13	ACCTTATGGT(A/C)TTGCAGATTC	CA(G/T)CC(A/C)TCATGATCACTTGG
SGg14 ^a	-	986	SG14 and ST23 ^b	GTTTGGTTGATGCCAATAATCTCG	AGCCAGAATATAAGTCATTGTCCG
SGg4/10	<i>sg4-40 /sg10-36 (patA)</i>	235	SG4, SG10 and other SGs ^c	AAACGAGATAAAGTCATATGCC	TACGCAAATACCGTCTTTAGC
<i>Legionella</i> genus	5S rRNA	108		GGCGACTATAGCG(A/G)TTTGGAA	GCGATGACCTACTTTC(A/G)CATGA

^a Amemura-Maekawa *et al.*, The 10th International Conference on *Legionella*, 2022.^b Detection for SG14 and ST23 among SG1.^c Detection for SG4, SG5, SG8, SG9, SG10, SG13, SG14, SGUT, a part of SG7, and a part of SG11.