

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 法の改良と普及

研究分担者	前川純子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	佐伯 歩	国立感染症研究所 細菌第一部
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。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る。本法は判定までの日数が短いことから、感染源の特定に有用と期待できる。血清型別判定の根拠となる PCR 産物のサイズは、近接したサイズ間で数 10~100 bp 前後の違いが生じるように設計されているが、不慣れな場合、産物のサイズを見誤ることがある。PCR 時にコントロール DNA を併用することで、PCR 産物のサイズの判断が容易になる。当初は、抽出ゲノム DNA を混合してポジティブコントロールとしていたが、調製が煩雑で、保存時の安定性に課題があった。そこで、人工遺伝子を混合したコントロール DNA を作製した。コントロール DNA が安定して供給できるようになり、本法がより使いやすくなった。

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が、2 から 15 の群別の必要性が高まりつつある。また、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。昨年度の改良により、1 段階目の PCR で、SG1、2、3/15、5、6/12、7、8、9、11、13、14 の判定ができるようになった (3 と 15、6 と 12 は区別することができない)。1 段階目の PCR でいずれの血清群のバンドも得られなかった場合は、SG4/10 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、SG4 か 10 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。今年度は、ポジティブコントロールかつサイズマーカーとなる人工遺伝子の作製を行い、血清型別 M-PCR 法の普及を図った。

B. 研究方法

1. 使用菌株

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。

（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. コントロール DNA の作製

コントロール DNA として用いる人工遺伝子は、表 1 に示した GenBank/ENBL/DDBJ の accession no. の塩基配列に従って、各プライマーで増幅される領域を持つように設計、作製された³⁾。これらの人工遺伝子をコントロールとして用いて *Legionella* SG pre-mix primer set を用いて PCR を行うと、適切な大きさの増幅産物が確認できた。株式会社ファスマックから令和 5 年 6 月から市販されることになった *L. pneumophila* 血清型別マルチプレックス PCR 用試薬取扱説明書を掲載した（添付書類 1）。

2. *L. pneumophila* 血清型別マルチプレックス PCR 用試薬の購入と配布

昨年度および今年度、株式会社ファスマックが製造したプライマーおよびコントロール DNA をレジオネラ・レファレンスセンターが購入して、希望する 72 地衛研に配布した。

D. 考察

M-PCR で血清型を確定するためには、増幅産物をアガロースゲル電気泳動して、そのバンドサイズを測定しなければならない。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。必要に応じて、抽出ゲノム DNA を混合してポジティブコントロールとしていたが、調製が煩雑で、保存時の安定性に課題があった。そこで、人工遺伝子をコントロール DNA とすることで、コントロール DNA の安定性が増した。さらに、*Legionella* SG pre-mix primer set およびコントロール DNA が市販されるようになり、簡便に使用可能となった。従来の血清群別法では、型別不能となる菌株が多く存在したが、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。

本法は分離菌株を対象としているが、喀痰からレジオネラ属菌が分離できなかった場合でも、LAMP 法等により、レジオネラ陽性であることが判明している喀痰 DNA を鋳型として、本法を用いて起因菌が SGg13 であると同定されたという論文報告が今年度あった⁴⁾。これまで喀痰 DNA からの直接同定が可能な血清群は SG1 だけだったが⁵⁾、本法を用いるとそれ以外の血清群も同定可能であることが初めて示された。今回の報告では喀痰 DNA 中のレジオネラ DNA 量が十分にあったことが同定の成功要因となったと議論されており、今後、少量の DNA でも血清型別が可能となるリアルタイム PCR の開発が望まれる。

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、改良した M-PCR 法により、型別することがで

きるようになった。PCR を用いた本法では、ごく少量の菌で実施が可能となることから、本法は判定までの日数が短くなり、感染源の特定に有用と期待できる。

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) Nakae 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.
- 4) Seto J, Takahashi J, Sampei M, Ikeda T, Mizuta K. A case of *Legionella pneumophila* serogroup 13 pneumonia based on the detection of serogroup-specific genes in culture-negative sputum. *Jpn J Infect Dis. JJID.*2023.302. 2023.
- 5) Mérault N et al. Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. *Appl Environ Microbiol.* 77:1708-1717. 2011.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 前川純子: レジオネラとレジオネラ症. *モダンメディア.* 69:219-225. 2023.
 - 2) 的場洋平、瀬戸順次、池田辰也、水田克巳、遠藤優子、三浦朗子、青木敏也、藤井俊司、佐伯 歩、前川純子、明田幸宏. *ダイレクト sequence-based typing* 法により感染源を追究した自宅浴槽での *Legionella pneumophila* 感染事例—山形県. *IASR.* 44:207-208. 2023
2. 学会発表
 - 1) 前川純子. レジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の開発のための研究. 第 87 回ウォーター研究会. 2023 年 6 月. 東京.
 - 2) 中臣昌広、井上浩章、前川純子. 令和 4 年台風 15 号による大雨被災地からの泥から検出されたレジオネラ属菌について. 日本防菌防黴学会第 50 回年次大会. 2023 年 8 月. 大阪.
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. 2023 年 5 月. Web 対応.
 - 2) 前川純子: レジオネラ検査法. 令和 5 年度新興再興感染症技術研修. 2023 年 10 月. web 対応.
 - 3) 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. 2023 年 11 月. 和光市.
 - 4) 前川純子: レジオネラ症および検査法全般. 令和 5 年度「地域保健総合推進事業」関東甲信静ブロック地域レファレンスセンター連絡会議. 2023 年 11 月. Web 対応.
 - 5) 佐伯 歩: レジオネラ分子疫学解析. 令和 5 年度「地域保健総合推進事業」関東甲信静ブロック地域レファレンスセンター連絡会議. 2023 年 11 月. Web 対応.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 人工遺伝子作製に用いた配列

Target	Accession no.	Nucleotide position of F primer	Nucleotide position of R primer
MP_SG1	NC_002942	839256..839235	839007..839030
MP_SG2	LC586135	38033..38052	38576..38557
MP_SG3/15	LC586134	51624..51649	520332..52008
MP_SG5	CP014256	879332..879353	879537..879518
MP_SG6/12	CP003192	878012..878033	878710..878690
MP_SG7	LC586136	32146..32165	32981..32961
MP_SG8	LT906452	938340..938364	938506..938485
MP_SG9	LC586133	31774..31796	32408..32386
MP_SG11	LC586137	21666..21686	21980..21958
MP_SG13	FR747827	11660..11679	12121..12101
MP_SG14	CP113435*	1605760..1605737	1604797..1604774
SP_SG4/10	LC586140	40773..40794	41008..40988
5S rRNA	AP024961	431324..431344	431410..431431

*人工遺伝子作製にあたっては未登録配列を用いたが、blast 検索を行ったところ、用いた領域について 100%同一の配列が登録されていたので、参照として示した。

Legionella pneumophila 血清型別マルチプレックス PCR 用試薬

GenCheck® <i>Legionella</i> SG pre-mix primer set	商品コード:5-0002
GenCheck® <i>Legionella</i> SG control set	商品コード:5-0003
GenCheck® <i>Legionella</i> SG pre-mix primer & control set	商品コード:5-0004

取扱説明書

I 製品説明

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 または 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。M-PCR には *Legionella* 属特異的プライマーも加えてあり、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。

II 製品内容

	名 称	数 量
I	GenCheck® <i>Legionella</i> SG pre-mix primer set 商品コード:5-0002	Primer set1 (1 段階目 M-PCR 用) 40 反応分 (100 μ L \times 2 本) (SG4/10 primer 以外、及び <i>Legionella</i> 属特異 5SrRNA primer) Primer set2 (2 段階目 M-PCR 用) 40 反応分 (35 μ L \times 1 本) (SG4/10 primer 及び <i>Legionella</i> 属特異 5SrRNA primer)
II	GenCheck® <i>Legionella</i> SG control set 商品コード:5-0003	PTC1 20 反応分 (20 μ L \times 1 本) (5SrRNA=108 bp, SG8= 166 bp, SG1= 249 bp, SG3/15= 408 bp, SG2= 543 bp, SG6/12= 698 bp, S14= 986 bp) PTC2 20 反応分 (20 μ L \times 1 本) (5SrRNA=108 bp, SG5= 205 bp, SG11= 314 bp, SG13= 461, SG9= 634 bp, SG7= 835 bp, SG4/10= 235 bp)
III	GenCheck® <i>Legionella</i> SG pre-mix primer & control set 商品コード:5-0004	Primer set1 (1 段階目 M-PCR 用) 40 反応分 (100 μ L \times 2 本) (SG4/10 primer 以外、及び <i>Legionella</i> 属特異 5SrRNA primer) Primer set2 (2 段階目 M-PCR 用) 40 反応分 (35 μ L \times 1 本) (SG4/10 primer 及び <i>Legionella</i> 属特異 5SrRNA primer) PTC1 10 反応分 (10 μ L \times 1 本) (5SrRNA=108 bp, SG8= 166 bp, SG1= 249 bp, SG3/15= 408 bp, SG2= 543 bp, SG6/12= 698 bp, S14= 986 bp) PTC2 10 反応分 (10 μ L \times 1 本) (5SrRNA=108 bp, SG5= 205 bp, SG11= 314 bp, SG13= 461, SG9= 634 bp, SG7= 835 bp, SG4/10= 235 bp)

III 保存方法

-20°C

IV 使用期限

外装に記載

V 本製品以外に必要な試薬および機器類

試薬 QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany)
アガロースゲル (濃度 2.0%~2.5%)
ゲルローディングバッファー
電気泳動用バッファー (0.5 \times ~1.0 \times TAE buffer)
DNA 分子量マーカー
ゲル染色液 (エチジウムブロミド溶液、または同等の結果が得られるもの)

機器類 PCR 増幅反応装置 Veriti [アプライドバイオシステムズ社製]、または同等の結果が得られるもの
電気泳動装置および画像解析装置
マイクロピペット、チップ、チューブ
ボルテックスミキサー
卓上遠心機

VI 実施例

[試薬調製および PCR 増幅反応]

1. QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix、Primer set1、Primer set2、PTC1、PTC2 及び RNase-Free Water を解凍した後、ボルテックスミキサーで攪拌し、卓上遠心機等でスピンドアウンする。
 2. 反応液組成表に従い、鋳型 DNA 及び PTC 以外の試薬を必要量調製し、ボルテックスミキサーで混合し、卓上遠心機等でスピンドアウンする。
 3. 調製した溶液から 19 μL ずつを PCR 用チューブまたは PCR 用プレートのウェルに分注する。
 4. 鋳型 DNA または PTC を PCR 用反応チューブまたは PCR 用プレートのウェルに 1.0 μL ずつ加えた後、PCR 増幅反応装置にセットする。
 5. PCR 反応条件に従って、PCR を開始する。
- ※ 反応系へのコンタミネーションがないことを確認するためには、Primer set を加えないもの並びに DNA 溶液を加えないものを陰性コントロールとし、同時に PCR を行なうことを推奨する。
- ※ 鋳型 DNA 1ng 程度あるいは $10^4 \sim 10^6$ CFU 相当レジオネラ菌体（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）

[反応液組成表]

1段階目 M-PCR

2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	10 μL
Primer set1	4.8 μL
鋳型 DNA または PTC または RNase-Free Water	1.0 μL
RNase-Free Water	4.2 μL
Total	20 μL

2段階目 M-PCR

2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	10 μL
Primer set2	0.8 μL
鋳型 DNA または PTC または RNase-Free Water	1.0 μL
RNase-Free Water	8.2 μL
Total	20 μL

[PCR 反応条件]

温度	時間	サイクル数
95°C	15 min	1 cycle
94°C	30 sec	28 cycles
60°C	90 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	1 cycle
4°C	∞	

[電気泳動]

1. TAE バッファーを満した電気泳動槽に 2.5%アガロースゲルをセットし、PCR 増幅反応溶液 2.0~4.0 μL と適当量のゲルローディングバッファーを混合しウェルに全量注入する。
2. 電気泳動を行う。



M: marker (Wide-Range DNA Ladder, Takara Bio Inc.), 数字: 血清群, P1: PTC1, P2: PTC2, N: No Template Control
 1段階目 Primer set1/P1 (下から 5SrRNA, SG8, SG1, SG3/15, SG2, SG6/12, S14), Primer set1/P2 (下から 5SrRNA, SG5, SG11, SG13, SG9, SG7), 2段階目 Primer set2/P1 (5SrRNA のみ), Primer set2/P2 (下から 5SrRNA, SG4/10)

VII 使用上の注意

- (1) 本製品は PCR をするための試薬です。その他の目的にはご使用になれません。
- (2) 試薬についての基礎的な知識のある方以外は、取り扱わないでください。
- (3) 取扱説明書記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- (4) 本製品には使用期限が表示されています。使用期限を守ってご使用ください。
- (5) 廃棄方法は、国または地方自治体の条例に従ってください。※ 素材：0.5 mL チューブ (PP)、袋 (PE)、ラベル (PET)
- (6) 本製品は冷凍保存品となります。使用前に氷上等で融解し、良く混ぜてから使用してください。

VIII 参考文献

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.

製造販売元： **FASMAC** 株式会社ファスマック

お問い合わせ先：株式会社ファスマック 遺伝子検査事業部

〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3 TEL:046-295-8787 FAX:046-294-3738