

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3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	神戸市健康科学研究所 感染症部
研究協力者	野本竜平	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	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	陳内理生	神奈川県衛生研究所
研究協力者	森本 洋	北海道立衛生研究所
研究協力者	小川恵子	北海道立衛生研究所
研究協力者	蔡 国喜	長崎県環境保健研究センター

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 領域の検出を行うことで、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、フラグメントが検出されない MLVA 領域について、新たに primer を検討した。特に Lpms01, Lpms13, Lpms31 の MLVA 領域で大きく改善され、より正確な MLVA 型別が可能となった。新たな primer を用いた Multiplex PCR のプロトコルを確立した。MLVA を活用に関しては、昨年の緊急事態宣言後に営業再開した施設の菌数増加について、菌株の定着性を明らかにし、施設の衛生指導に役立てた。

Miseq リードデータやコンティグ配列から ST を決める方法を確立し、ST のデータベースを 2021.7.12 時点のもの（3,010 profiles）に更新した。また、解析フローを作成し、複数の連携機関に提供した。

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。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。本研究の目的は、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指すことである。

今年度はprimerのミスマッチにより増幅されないMLVA領域について、primerの検討および評価を行った。また、MLVAの活用促進のために複数の協力機関に協力してもらい、集団事例や施設の衛生管理でのMLVAの有効性を検証した。さらに、ゲノムデータを利用した*L. pneumophila*のSBT解析フローを考案し、複数の協力機関に活用してもらい有用性を評価した。

B. 研究方法

①菌株：MLVAのprimer評価には*L. pneumophila* SG1の菌株439株を対象とした¹⁾。

施設の衛生管理におけるMLVAの活用では、神戸市の3施設において平成24年から令和2年度に分離された*L. pneumophila*を解析対象とした。

②MLVA：Sobralら²⁾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。

また、新たなprimerとして、Pourcelらによって報告されたprimer^{3) 4)}を2nd primerとして用いて、上記の方法でフラグメント解析を行った(表1)。

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。

③ゲノムデータを利用したSBTの解析フ

ロー：リードデータのマッピングによる解析手法として SRST2 (<https://github.com/katholt/srst2>) を、アセンブリしたドラフトゲノム配列から ST を決定する手法として Legsta (<https://github.com/tseemann/legsta>) を、更に mompS が正確に決定できなかった場合に利用するツール (<https://github.com/bioinfo-core-BGU/mompS>) の 3 種類を提案した。それぞれの SBT データベースを最新のものに更新し、特に SRS T2 については SBT を解析するための条件を最適化し、ツールのインストール方法も含めた汎用的なマニュアルを作成して協力機関に提供した。

C. 研究結果

(1) ゲノムデータを利用した *L. pneumophila* の SBT 解析フロー

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。今年度は解析フローを作成した (図 1)。複数の研究機関に Web での研修を複数回行い、解析に必要なソフト等の環境を整えてもらった。実際に、7 株のリードデータ及びドラフトゲノムデータ提供し、実際に解析フローを基に

ST を決定してもらったところ、当所の結果と一致した良好な結果を得ることができた。したがって、他の研究機関にも提供できる解析ツールを提示できることが可能となった。

また、一時的に SBT の web サイトが使用できない状態になっている場合にも有用な解析ツールとなっている。

(2) MLVA 領域における primer の検討

昨年度、primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域 (Lpms31、Lmps01、Lmps13、Lpms39) の存在が明らかになった。そこで、以前解析した *L. pneumophila* SG1 439 株の MLVA プロファイル中で、MLVA 領域ごとに増幅されなかった株 (“null”株) の存在を調べた (表 2)。Lpms13 と Lpms01 はそれぞれ 39 株 (8.9%)、31 株 (7.1%) で増幅されていないことがわかった。

Pourcel ら^{3) 4)}によって報告された MLVA 領域は Sobral²⁾らと同じ MLVA 領域を用いているが、primer が異なる。そこで、Pourcel らによって報告された primer (2nd primer とする) を用いて増幅されなかった株について検討した。その結果、Lpms01、Lpms13、Lpms31 の MLVA 領域において大きく改善された (表 2)。

また、Lmps01 と Lmps13 の MLVA 領域が増幅しない株が存在していた ST23、ST384、ST550 の株では、2nd primer により増幅され、MLVA 型が確定できる株が増えたことで、より正確な MLVA 型別が可能となった。

(3) MLVA の活用

①施設の衛生管理における活用

昨年の緊急事態宣言後に営業再開した3施設において10,000 CFU/100 mL以上の菌数が検出された。その施設における菌数増加について、MLVAを用いた菌の定着性を調べた。平成24年から継続的なモニタリング検査で分離された菌株のMLVA型と緊急事態宣言後(令和2年度)に分離されたMLVA型を比較した。その結果、B,C施設では、R2年度に分離された株と同じ遺伝子型の株が、過去にも分離されていた。D施設で分離された2株のうち、一方は宣言前の期間に分離されたものと同一遺伝子型であったが、もう一方はR2年度に初めて分離された(図2)。

②複数の協力機関との連携

今年度は複数の自治体の集団事例において、MLVAを実施してもらった結果、PFGE、SBT、MLVAは概ね関連した結果となった。

D. 考察

primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域は、Pourcel らが報告した primer を用いることで、大幅に改善することが明らかとなった。MLVA 領域自体は Sobral らと同じ領域を解析していることになるので、型別には問題ないと考えられる。“null”の株をより正確に型別したい場合は、2nd primer を用いることが望ましいと考える。さらに、“null”の株が

比較的多数存在している ST は、2nd primer を用いることでより正確な MLVA 型を決定することができた。今後は primer を変えることで大きく改善した Lpms01, Lpms13, Lpms31 については、最初から 2nd primer に変更し、現状の MLVA のプロトコルを改変することも検討する必要がある。そのためには、2nd primer で “null” になる株があるかの評価を行う必要がある。

継続的にモニタリングしている施設において、増加した菌がもともと施設に定着している菌か、あるいは新規の株なのか、簡便な MLVA を用いることで判断することができた。このように、菌株の同一性(定着性)を継続的に調べる解析ツールとして MLVA は有用であり、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。また、今回、複数の自治体で MLVA を導入することができ、集団事例への検証を進めることができた。

さらに、Miseq リードデータやコンティグ配列から ST を決める方法を確立し、ST のデータベースを 3,010 profiles に更新した。また、解析フローを作成し、複数の連携機関に提供し、実際の Web 研修で解析できるような環境を構築することができた。今後も定期的に ST プロファイルを更新する予定である。一時的に SBT の web サイトが使用できない状態になっているが、サンガー法で決定した配列でも利用可能となっており、迅速で有用な解析ツールとなっている。

E. 結論

primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域は primer を変えることで、大幅に改善され、より正確な MLVA 型別が可能となった。

施設の衛生管理における汚染源調査において、簡便な MLVA を用いることで、菌株の同一性（定着性）や新規性を継続的に調べることができ、施設への衛生指導に役立てることができると考えられた。

また、Miseq リードデータやコンティグ配列から ST を決める方法を確立し解析フローを提示した。

F. 参考文献

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) MLVA net support site

(<http://mlva.i2bc.parissaclay.fr/MLVAnet/spip.php?rubrique44>)

- 4) Pourcel C, Visca P, Afshar B, D'Arezzo S, Vergnaud G, Fry NK. 2007. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *J Clin Microbiol.* 45:1190-1199.

G. 研究発表

- 1) 小松頌子、中西典子、岩本朋忠. 市内温泉施設における緊急事態宣言後のレジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移. 神戸市健康科学研究所報 第 49 巻 39-42 頁 2021

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

MLVA locus	primer	Sequence (5'→3') (Labeling)
Lpms01-2nd	Lpms01F_2nd	(NED)-ACGRGCATATGACAAAGCCTTG
	Lpms01R_2nd	CGGATCATCAGGTATTAATCGC
Lpms03-2nd	Lpms03F_2nd	(VIC)-CAACCAATGAAGCAAAAGCA
	Lpms03R_2nd	R GGG S TTGATGGTCTCAATG
Lpms13-2nd	Lpms13F_2nd	(NED)-CAAT W GCATCGGACTGAGYA
	Lpms13R_2nd	TGCCTGTGTATCTGG R AARGC
Lpms19-2nd	Lpms19F_2nd	(PET)-GAACTATCAGAAGGAGGCGAT
	Lpms19R_2nd	GGAGTTTGACTYGGCTCAGG
Lpms31-2nd	Lpms31F_2nd	(FAM)-GCAATCCGGCCTCGCAAGCC
	Lpms31R_2nd	CAGGCACACCTTGGCCGTC
Lpms34-2nd	Lpms34F_2nd	(FAM)-GAAAAGGAATAAGGCGCAGCAC
	Lpms34R_2nd	AAACCTCGTTGGCCCTCGCTT
Lpms35-2nd	Lpms35F_2nd	(PET)-CTGAAACAGTTGAGGATGYGA
	Lpms35R_2nd	TTATCAACCTCATCATCCCTG

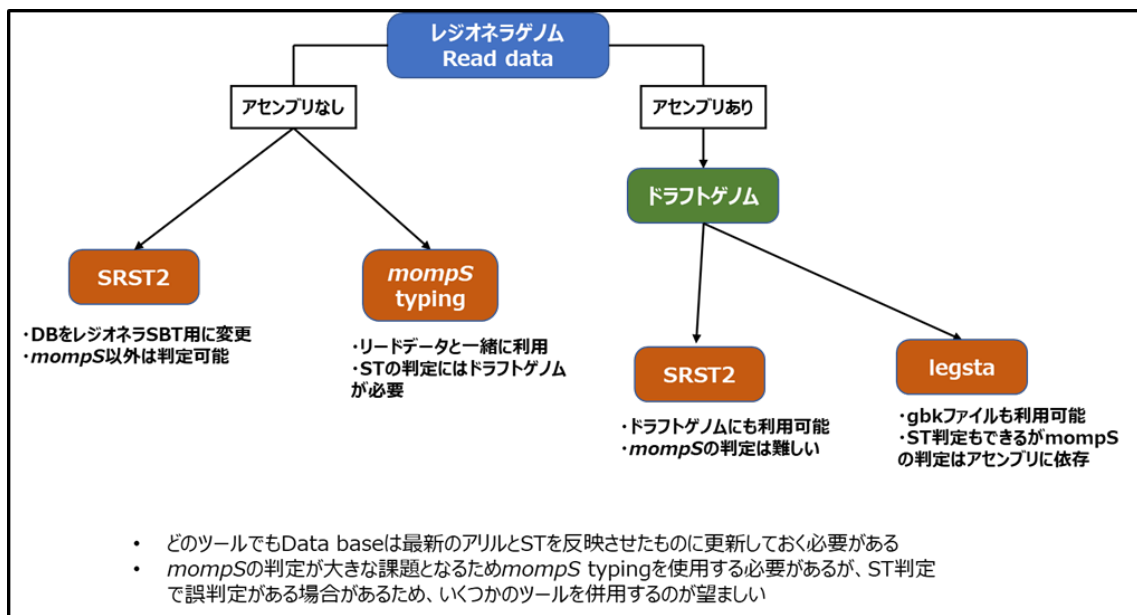


図 1. ゲノムデータを利用した *Legionella pneumophila* の SBT 解析フロー

表2. *L. pneumophila* SG1 439 株における各MLVA領域の増幅

MLVA locus	"null"の株数	2nd primerで 増幅した株数
Lpm s01	31 (7.1%)	→ 22
Lpm s03	3 (0.6%)	→ 3
Lpm s13	39 (8.9%)	→ 37
Lpm s19	10 (2.3%)	→ 4
Lpm s31	13 (3.0%)	→ 11
Lpm s34	13 (3.0%)	→ 1
Lpm s35	6 (1.4%)	→ 1

