

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～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	水本嗣郎	静岡県環境衛生科学研究所
研究協力者	高橋直人	静岡市環境保健研究所
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 領域の検討を行い、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。

Miseq および MinION を用いて、12 株の完全長配列を決定し、計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 領域やフラグメントが検出されない MLVA 領域について詳細に解析した。リピート領域は存在しているが、primer のミスマッチにより増幅されない MLVA 領域の存在が明らかになり、新たに primer を検討したところ、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。一方で、Intermediate-size として扱っていた MLVA 領域は、リピート領域が始まる上流の長さが短くなっていること、最後のリピートの長さも短くなっていることが明らかとなった。

各分子疫学解析手法の比較では、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。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。さらに、PFGE、MLVA、SBT の相違点が見いだされた集団事例についても同様の検討を行った結果、PFGE、SBT、MLVA のタイピングでは、すべての株が相同性の高い株として認識されるが、コアゲノム SNPs 解析ではそれぞれの手法の結果を反映した系統樹となった。

MLVA を活用に関しては、複数の自治体にプロトコルを提供し、集団事例での検討や施設の衛生指導にも活用した。

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、解析フローを作成した。

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。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した。

B. 研究方法

①菌株：

- (1) 完全長配列決定の菌株は、リピート数が 0 になる株や Intermediate-size の株 12 株を用いた (表 1)。
- (2) ST が一致で MLVA 型が異なる例として ST507 の 9 株を用いた (表 2)
- (3) MLVA 型が一致で ST 型が異なる例として 20 株を用いた (表 3)。
- (3) 集団事例 A で用いた菌株は、表 4 の通りである。
- (4) MLVA の primer 評価には *L. pneumophila* SG1 の菌株 439 株を対象とした¹⁾。

(5) 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5)。

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^{5,6)}。完全長ゲノム配列は、MinION (Nanopore社)から得られたロングリードとMiseqのショートリードデータをUnicyclerによりHybrid assemblyして決定した。

④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SRST2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) MLVA 領域の検討

計算上推測されるフラグメントの大きさから外れる MLVA 型を示した菌株の完全長ゲノム配列を取得し、MLVA 領域周辺構造を解析した。その結果、Intermediate-size として扱っていた MLVA 領域 (Lmps31) は、リピート領域が始まる上流の長さが Philadelphia 株と比較して短くなっていた。さらに、最後のリピートの長さも短くなっていた。

フラグメントが検出されない菌株の中には、リピート領域は存在しているが、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 6)。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 が異なることから、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 6)。

また、増幅しない株が多かった ST23、ST384、ST550 に着目すると、増幅されなかった領域が 2nd primer により増幅され、同一 MLVA 型となる株が増えた。従って、同一 ST 内において、より正確な MLVA

型別が可能となった。

(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、さらに、ある集団事例についてゲノム解析を行い、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 2 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 (表 3)、ST に基づく菌株間の関連性を図 2 (A) に示した。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集団事例におけるゲノム分子疫学を用いた PFGE、MLVA, SBT の遺伝子型別の

比較

PFGE、MLVA、SBT の相違点が見いだされた集団事例について、ゲノム系統解析を用いて各分子疫学解析手法の解析結果との比較検討を行った。

PFGEにおいて、患者由来株と F20-1 (図 3A、⑥レーン) と F25 (同⑦レーン) 株以外の浴槽水由来株および拭き取り由来株の PFGE パターンは完全に一致した。拭き取り由来株である F20-1 と F25 は他の菌株と 3 バンド違いで、UPGMA による近似性は 86.9% となった。

PFGE を実施した SG1 の 13 菌株の ST は、ST59 と ST2592 の 2 種類に分かれ、それらは *neuA* の 1 遺伝子違いであった。ST59 を示した 2 株は同じ浴槽の浴槽水と拭き取り由来であった。MLVA 型は、ST59 の 1 株が 1 領域違いであったが、他の 12 株の MLVA 型は一致した。

F9-2、F20-2 の ST、MLVA 型は他の菌株とは異なっていた (表 4)。

これら 15 株のコアゲノム SNPs の系統解析を行った (図 3B)。F9-2、F20-2 は、他の菌株と比較して SNP 数が 10000 個以上となり、他の菌株とは系統的に離れた位置にカテゴリズされた。患者由来株は系統的に近い位置に集約された。患者由来株と SNP 数 20 個以内の株が拭き取り由来 F9-1 と F10 であった。患者由来株と同一 ST だが、PFGE で 3 バンド違いだった F20-1 と F25 株は、患者由来株との SNP 数約 300 個であり、PFGE の結果を反映していた。また、ST59 の 2 株も患者由来株との SNP 数は約 300 個であり、

SBT の結果を反映した系統樹となった。

(3) MLVA 法の活用

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 4)。

③ 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。

(4) 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し、解析フローを作成した（図 5）。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。

D. 考察

MLVA 周辺構造の解析から、フラグメントが増幅されない菌株の中には、リピート領域は存在しているが、primer の mismatches により MLVA 領域が増幅されていないことが明らかとなった。このような 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。一方で、MLVA 領域の中には、Intermediate-size として扱っていた MLVA 領域があったが、リピート領域前の flanking region の長さが異なっていることや最後のリピートの長さが中途半端な長さであった。このような株は、計算通りのリピート数をとる菌株とは区別する必要があると考えられた。

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。

集団事例におけるコアゲノム SNPs 解析では、SBT、PFGE それぞれの手法の結果を反映した系統樹となっていたが、全ゲノム系統解析から、患者由来株と近縁な 2 株（SNP 数が 20 個以内）は同一の浴槽の拭き取りから分離されており、その浴槽が直接の感染源となっていた可能性

が考えられた。また、PFGE、SBT、MLVA のタイピングでは SNP 数 300 個程度の菌株間を clonal complex として認識されていると考えられた。このように、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。今後も引き続き、レジオネラ症事例におけるゲノム解析を行い、検討を重ねる必要がある。

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。

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た。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考えられた。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。

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。

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）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。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、集団事例でのゲノム解析事例を増やし検討を重ねていく必要がある。

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。

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解析フローを提示した。

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) 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.parisaclay.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.
- 5) 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.
- 6) 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) 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 卷 39-42 頁 2021
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1: 完全長配列決定の菌株

strain ID	SG	ST	Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33
KL06-287	1	1	9.5	7	17	4
KL10-682	1	1008	9.5	7	17	4
KL05-209	13	2603	6.5	7	3	2
KL10-685	UT	2603	6.5	7	3	2
KL09-603	1	154	0	0	8	2
KL12-819	7	1422	9.5	7	17	4
KL09-578	13	2603	6.5	7	3	2
KL09-548	1	598	0	8	8	2
KL10-679	1	1334	0	0	11	1
NIIB3710	1	507	13.5	7	25	4
NIIB3758	1	507	16.5	7	25	4
NIIB3150	1	22	15.5	8	26	5

表 2 : ST507 の MLVA 型

ID	Lpms31	Lpms01	Lpms35	Lpms33	Lpms34	Lpms13
NIIB2532	13.5	7	25	4	3	5
NIIB2630	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3309	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3758	16.5	7	25	4	3	5
NIIB3280	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3637	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3710	13.5	7	25	4	3	5
NIIB3261	13.5	7	25	4	2	4
NIIB3204	13.5	8	27	4	3	11

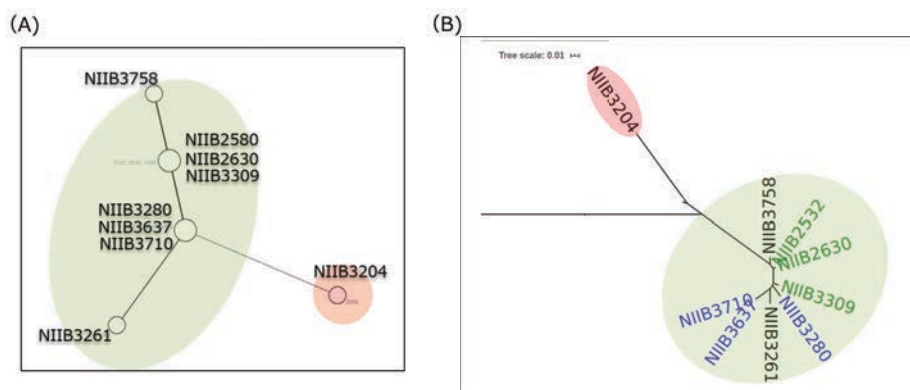


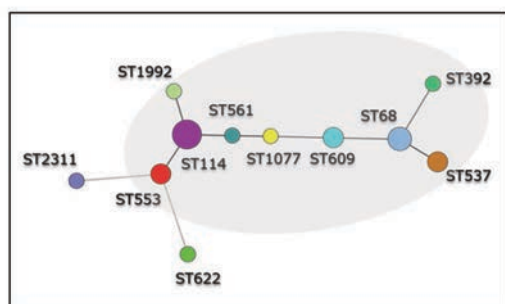
図1. ST507でMLVA型が異なる菌株の全ゲノム系統解析

(A) MLVAに基づくMST (B) コアゲノムSNPsに基づいた系統樹

表 3 : 同一 MLVA 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 IIB1349	6	68	3	13	1	28	14	9	3
N IIB1759									
N IIB2843									
N IIB2552	6	114	3	6	1	6	14	11	9
N IIB0815									
N IIB1786									
N IIB1794									
N IIB3815									
N IIB2603	15	392	3	13	1	6	14	9	11
N IIB2487	6	537	3	13	1	28	12	9	3
N IIB2634									
N IIB3660	1	553	3	6	1	3	14	11	9
N IIB3914									
N IIB3410	1	561	3	6	1	6	14	11	1
N IIB2581	1	609	3	13	1	1	14	9	1
N IIB3464									
N IIB3645	1	622	3	13	1	3	9	9	9
N IIB3811	1	1077	3	6	1	1	14	11	1
N IIB0850	6	1992	3	6	1	6	11	11	9
N IIB3741	1	2311	3	7	1	3	5	11	11

(A)



(B)

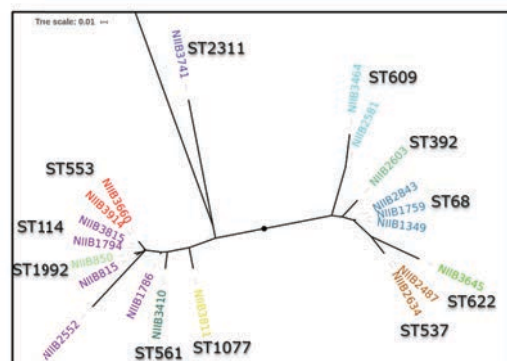


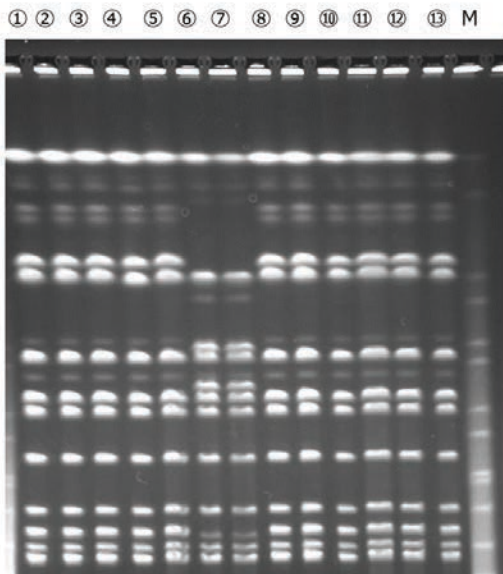
図2. MLVA型が一致でST型が異なる例。

(A) STに基づくMST (B) コアゲノムSNPsに基づいた系統樹

表4：集団事例Aにおける菌株のSTとMLVA型

菌株番号	分離場所	SG	PFGE	ST	allele番号											MLVA型										
					<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	Lpm31	Lpm01	Lpm35	Lpm33	Lpm34	Lpm13	Lpm19	Lpm03	Lpm40	Lpm38	Lpm39	Lpm44			
B69	男2浴槽水	SG1 ①	59	59	7	6	17	3	13	11	11	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
F9-1	男4-1ふき取り	SG1 ②	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
F9-2	男4-1ふき取り	SG5 -	1417	1417	8	6	34	9	2	8	209	15	8	8	3	1	8	0	7	4	0	10	0			
F10	男4-2ふき取り	SG1 ③	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
F14	女4ふき取り	SG1 ④	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
F19	男2ふき取り	SG1 ⑤	59	59	7	6	17	3	13	11	11	15	8	13	4	1	7	5	8	4	3	10	9			
F20-1	男1ふき取り	SG1 ⑥	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
F20-2	男1ふき取り	SG8 -	-	-	2	3	9	10	2	1	-	17.5	7	18	4	3	10	4	7	5	0	22	7			
F25	男8ふき取り	SG1 ⑦	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
SK1	患者2	SG1 ⑧	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
SK2	患者3	SG1 ⑨	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
S1株	患者1	SG1 ⑩	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
S5株	患者4	SG1 ⑪	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
S6株	患者5	SG1 ⑫	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			
S9株	患者7	SG1 ⑬	2592	2592	7	6	17	3	13	11	6	15	8	13	4	1	10	5	8	4	3	10	9			

(A)



(B)

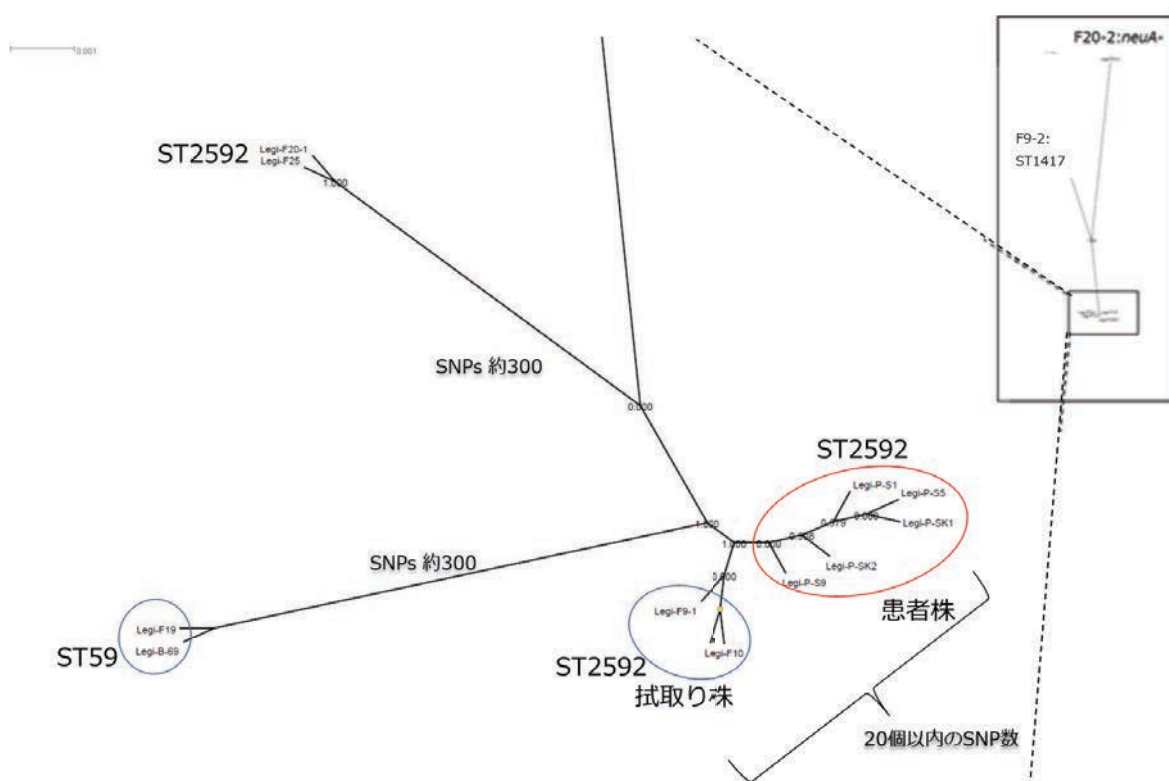


図3 (A) 集団事例AのPFGE。(B) コアゲノム SNPs に基づいた系統樹

表5. 解析したMLVA領域と2nd primer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 GGSTTGATGGTCTCAATG
Lpms13-2nd	Lpms13F_2nd	(NED)-CAATWGCATCGGACTGAGYA
	Lpms13R_2nd	TGCCTGTGTATCTGG R AARGC
Lpms19-2nd	Lpms19F_2nd	(PET)-GAACTATCAGAAGGAGGCGAT
	Lpms19R_2nd	GGAGTTTGACTYGGCTCAGG
Lpms31-2nd	Lpms31F_2nd	(FAM)-GCAATCCGGCCTCGCAAGCC
	Lpms31R_2nd	CAGGCACACCTTGCCGTC A
Lpms34 -2nd	Lpms34F_2nd	(FAM)-GAAAAGGAATAAGGCGCAGCAC
	Lpms34R_2nd	AAACCTCGTTGGCCCTCGCTT
Lpms35-2nd	Lpms35F_2nd	(PET)-CTGAAACAGTTGAGGATGYGA
	Lpms35R_2nd	TTATCAACCTCATCATCCCTG

表6. *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

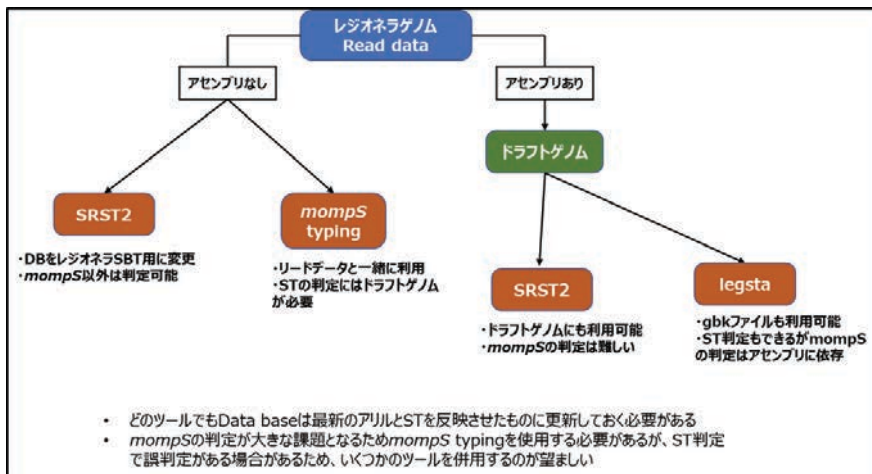
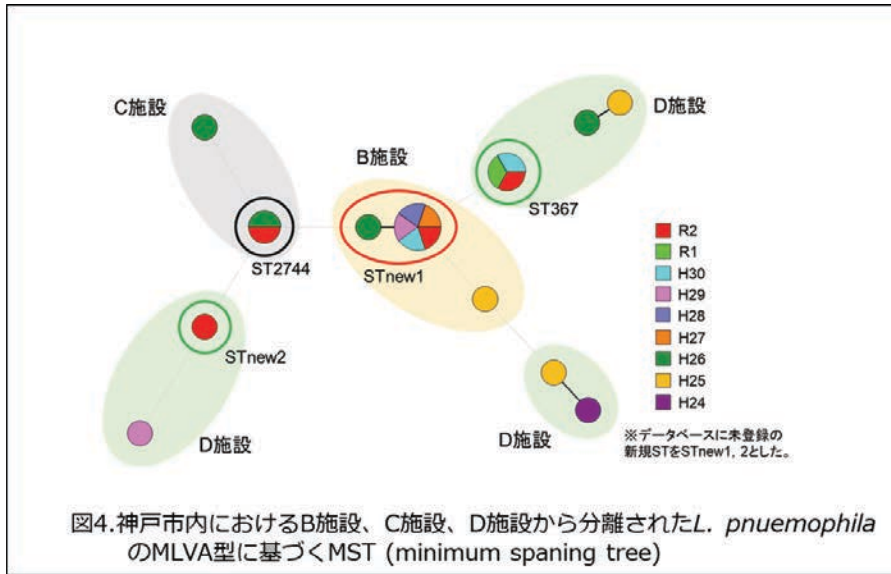


図 5:ゲノムデータを利用した *L.pneumophila* の SBT 解析フロー