

## 短報

# 新しい遺伝子型別法であるVariable Number of Tandem Repeat (VNTR) を利用したレジオネラ ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) の型別について

渡辺祐子, 高橋智恵子, 大屋日登美, 岡崎則男

## Genotyping of *Legionella pneumophila* by using variable number of tandem repeat analysis

Yuko WATANABE, Chieko TAKAHASHI,  
Hitomi OHYA and Norio OKAZAKI

### はじめに

レジオネラ属菌は温泉をはじめとして、循環式浴槽、冷却塔等の環境水中で増殖し、これを含んだエアロゾルを吸引することで、肺炎等を主徴とするレジオネラ症を引き起こす。特に、免疫力の低下している高齢者等は感染しやすく、しばしば集団感染を引き起こし、死亡例も報告されている<sup>1)</sup>。また、近年はレジオネラ症の散発例が増加傾向にあるため、感染源の究明が重要となっているが、多くの場合実施されていないのが現状である。

感染源の究明には原因施設を特定し、最終的にはその施設から検出されたレジオネラ属菌と患者から分離されたレジオネラ属菌が同一菌であることを確認する必要がある。この手段としては遺伝子型別法の一つである pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 法が主に利用されている。しかし、PFGE法は煩雑な操作と3~4日の日数を要し、加えてレジオネラ属菌の発育が遅いことから、結果が判明するまでに10日間以上を要する。このため、迅速な感染源の究明が難しく、効果的な予防対策や拡大防止対策の実施に支障をきたしている。あわせて、高価な装置が必要であること、得られる結果が画像データであること等から、検査施設間における結果の比較が容易ではない。

最近、PFGE法以外のレジオネラ属菌に対する迅速な

遺伝子型別法として、variable number of tandem repeat (VNTR) 法が注目されている<sup>2, 3)</sup>。VNTR法は、DNA塩基配列の複数箇所が存在する反復塩基配列の反復数が多様性を示すことを利用した遺伝子型別方法であり、結核菌や大腸菌O157の疫学解析においては実用化されつつある。基本的には一般的に実施されているPCR操作と同様で、PFGE法よりも簡便かつ迅速に結果が判明することが特徴である。また、結果の数値化が可能であるため、検査施設間での比較が容易であり、将来的にはデータベース化も可能とされている。

本報では、*Legionella pneumophila*分離菌株49株を対象としてVNTR法による遺伝子型別を行い、結果をPFGE法と比較することでその有用性について調べた。

### 材料及び方法

#### 1 菌株

1997年から2006年に神奈川県内で分離された冷却塔水由来19株、温泉水由来15株、家庭用24時間風呂水由来6株、循環式浴槽水由来1株、ミネラルウォーター製品及び原水等由来4株、腐葉土由来1株、超音波加湿器水由来1株、患者(同一)由来2株の計49株の*L. pneumophila*を用いた。

#### 2 方法

##### (1) VNTR法

*L. pneumophila*のDNA塩基配列における解析部位は、Pourcelら<sup>3)</sup>の報告から、Lpms1b, Lpms3, Lpms13, Lpms17, Lpms19b, Lpms33の6か所とし、これらの各部位を増幅する6組のプライマーを用いた。

DNA抽出は以下のように行った。菌株をBCYE $\alpha$ 寒天培地で培養後、コロニーを滅菌蒸留水(DW)にかき取り、 $1 \times 10^8$  CFU/mlの濃度に調製した。その菌液を100 $^{\circ}$ C、15分加熱後、14,000rpmで20分遠心分離し、上清をDWで100倍希釈してテンプレートDNAとした。

PCR反応液は、1アッセイあたりDW 15.8 $\mu$ l,  $\times 10$  Ex taq Buffer 2.5 $\mu$ l, 2.5mM dNTPs 2.0 $\mu$ l, 0.1M MgCl 1.5 $\mu$ l, Upperプライマー(20 $\mu$ M) 0.25 $\mu$ l, Lowerプライマー(20 $\mu$ M) 0.25 $\mu$ l, Ex Taq 0.2 $\mu$ l, テンプレートDNA 2.5 $\mu$ l (DNA量2.5~5ng)の全量25 $\mu$ lに調製した。PCR条件は、Pourcelら<sup>3)</sup>の方法に従い、前加熱94 $^{\circ}$ C5分後、熱変性94 $^{\circ}$ C30秒、アニーリング60 $^{\circ}$ C30秒、伸長反応72 $^{\circ}$ C45秒を35サイクルとし、その後72 $^{\circ}$ C10分の伸長反応を追加した。PCR産物の電気泳動は、3%アガロースゲルを使用して行い、泳動後、エチジウムブロマイド染色し、KODAK 1D Image analysis software (version3.5)で解析を行った。

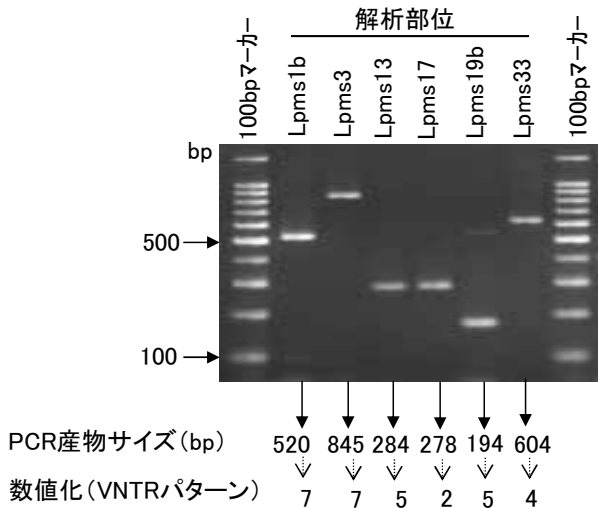


図1 VNTR法におけるPCR産物サイズからの数値化例

図1に、VNTR法におけるPCR産物サイズからの数値化例 (VNTRパターン) を示した。PCR産物の電気泳動像から各解析部位のPCR産物サイズ (bp) を読み取り、反復塩基配列の反復数を算出した<sup>3)</sup>。図1に示した例のVNTRパターンは7,7,5,2,5,4となる。

(2) PFGE法

PFGE法は、病原体検出マニュアル<sup>4)</sup> に準拠し、制限酵素として *Sfi* I (New England Biolabs) を用い実施した。結果の解析にはFingerprinting II (BIO-RAD) を使用した。

結果及び考察

*L. pneumophila* 49株におけるVNTRパターンからのクラスター解析結果を図2に示した。パターンが一致した (類似度100%) 場合を同一菌株としたところ、16株のクラスターが1組、4株が2組、2株が4組の7クラスターを形成し、17株が単独パターンとなった。また、上記49

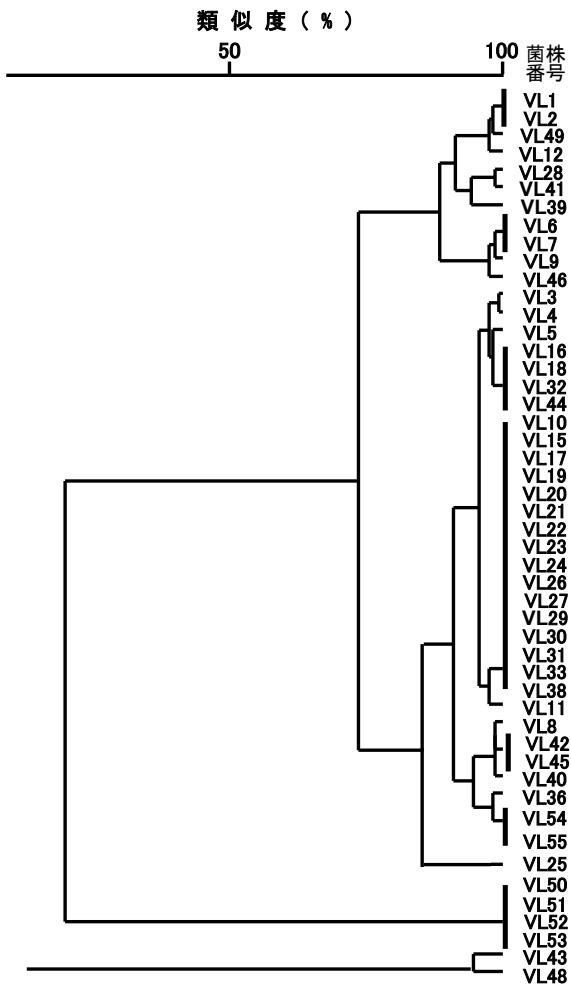


図2 *L. pneumophila* 49株のVNTR法におけるクラスター解析結果

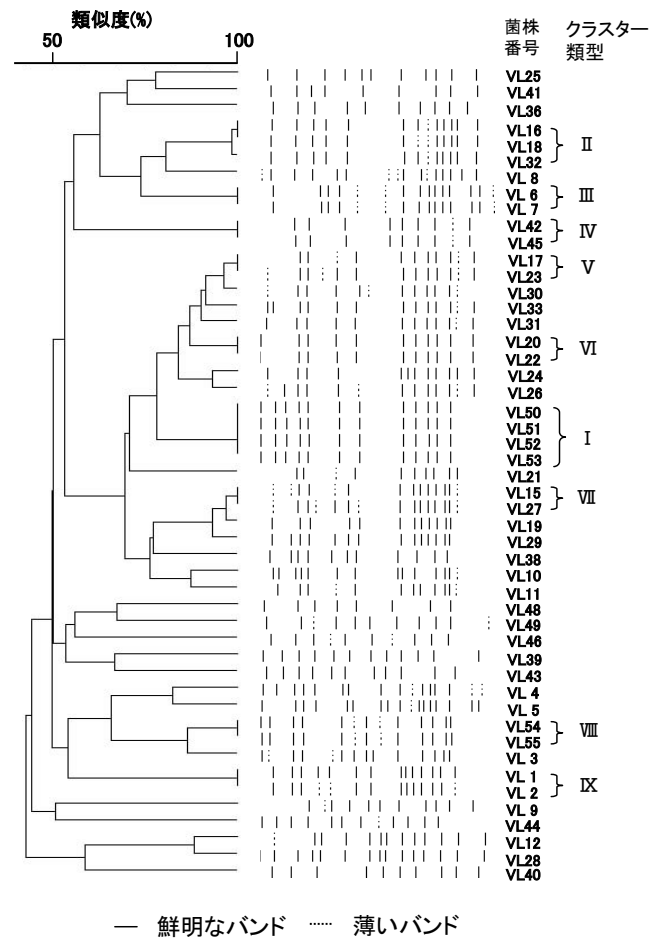


図3 *L. pneumophila* 49株のPFGE法におけるクラスター解析結果

株のPFGE法におけるクラスター解析結果を図3に示した。類似度98%以上を示す場合を同一菌株としたところ、4株のクラスターが1組、3株が1組、2株が7組の9クラスターを形成し、28株が単独パターンとなった。VNTR法で単独パターンとなった17株は、PFGE法でも単独パターンを示した。

表1 VNTR法で同一クラスターを形成した16株のPFGE結果と由来

菌株番号	PFGEパターン	血清型	由来	採水場所	検体採取日
VL17	V	1	冷却塔水	Kビル	97/08/04
VL23	V	1	冷却塔水	KI 荘	97/10/08
VL20	VI	1	冷却塔水	Oビル	97/08/04
VL22	VI	1	冷却塔水	Oビル	97/09/09
VL15	VII	1	冷却塔水	Uビル	97/07/09
VL27	VII	1	冷却塔水	D ストア	97/09/09
VL10	単独	1	冷却塔水	Eビル	07/09/01
VL19	単独	1	冷却塔水	Zセンター	97/08/04
VL21	単独	1	冷却塔水	KOビル	97/09/09
VL24	単独	1	家庭用24時間風呂水	M氏宅	97/02/01
VL26	単独	1	超音波加湿器加湿水	Kセンター	98/02/09
VL29	単独	1	冷却塔水	Zセンター	97/09/09
VL30	単独	1	冷却塔水	Kビル	97/09/09
VL31	単独	1	温泉水	M温泉	02/02/01
VL33	単独	1	冷却塔水	Kビル	97/08/04
VL38	単独	1	冷却塔水	Zセンター	97/10/08

VNTR法で最大クラスターを形成した16株のPFGE法による解析結果と由来を表1に示した。PFGE法では10株が単独パターンを示し、6株が3クラスターを形成した。このうちVL20及びVL22は、分離時期が約1ヶ月異なるものの、同一冷却塔から分離された菌株であった。VL17及びVL23の2株、VL15及びVL27の2株については地域性等に共通点は見当たらず、PFGEパターンが一致した理由は不明である。なお、16株の内13株は冷却塔水由来菌株であり、これらの菌株に対するVNTR法の型別精度がPFGE法に比べ劣る傾向が見られた。

VNTR法で7クラスターを形成したうちの最大クラスターを除く6クラスター16株について、PFGE法の解析結果を表2に示した。VL6及びVL7は、同一地域の泉源が異なる温泉水から分離された菌株であったが、VNTR法とPFGE法の両者において型別結果は一致した。また、VL42及びVL45も同一地域の異なる施設から分離されたものであるが、VNTR法とPFGE法の型別結果は一致した。これらのことは、レジオネラ属菌が土壌細菌であるため、土壌等といっしょに地域の環境水に進入し、増殖したことを示唆するものと思われる。今後、各地域の環境水から分離された多数の菌株を使用して遺伝子型

表2 VNTR法で6クラスターを形成した16株\*のPFGE法による解析結果

菌株番号	VNTRパターン	PFGEパターン	血清型	由来	検体採取日
VL1	7 7 5 2 4 4	IX	1	患者(同一)	06/10/04
VL2					
VL6	8 8 0 2 4 2	III	1	M温泉水	03/11/21
VL7				Y温泉水	03/11/27
VL16		II	1	家庭用24時間風呂水(S氏宅)	97/07/09
VL18	7 8 9 2 4 4				97/08/13
VL32					97/06/11
VL44	単独				02/02/15
VL42	9 8 8 2 4 2	IV	4	G温泉マンション	02/02/15
VL45				G温泉公衆浴場	02/02/15
VL50					05/09/13
VL51	9 7 5 5 3 4	I	1	ミネラルウォーター 製品等	05/09/13
VL52					05/10/04
VL53					05/10/04
VL54	7 8 10 2 4 2	VIII	1	R温泉水	01/11/11
VL55					01/11/11

\*最大クラスターを形成した16株(表1)を除く

別を実施し、地域差を調べる必要があると考えられた。

さらに、VL50、VL51、VL52及びVL53は、ミネラルウォーターの製品(検出された際の菌数は浴槽水の検出基準である10CFU/100ml以下)とその原水輸送用容器等から分離された菌株で、VNTR法とPFGE法の結果はそれぞれ一致していた。一方、VL16、VL18、VL32及びVL44においては、同一家庭用24時間風呂水から分離された前三者とC温泉水から分離された後一者で異なるPFGEパターンを示したが、VNTR法では同一パターンであった。

これらのことから、VNTR法は*L. pneumophila*の遺伝子型別法として、精度における課題は残されているものの、迅速簡便であることから、現段階でもスクリーニング法としての利用価値はあると考えられる。今後、解析部位を追加し、精度の向上を図ることにより、実用化に向けた検討を進める予定である。

(平成20年7月28日受理)

## 文献

- 1) 感染症情報センター：レジオネラ症1999年4月～2006年(2007年2月28日現在)、感染症週報、9(17:18)、16-21(2007)<<http://idsc.nih.go.jp/idwr/kanja/idwr/idwr2007/idwr2007-17-18.pdf>>
- 2) Pourcel, C., Vidgop, Y., Ramisse, F., Vergnaud, G. and Tram, C.: Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping, J. Clin. Microbiol., 41, 1819-1826(2003)
- 3) Pourcel, C., Visca, P., Afshar, B., D'Arezzo, S., Vergnaud, G. and Fry, K. N.: 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 (2007)

- 4) 山内昌弘, 田中智之, 杉山 明, 山内昭則, 倉 文明, 前川純子: レジオネラ症, 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所, 衛生微生物技術協議会レファレンス委員会編, pp. 840-848(2005)  
<<http://www.nih.go.jp/niid/reference/pathogen/-manual-60.pdf>>