

公衆浴場水から分離された *Legionella pneumophila* 株の 遺伝子解析

瓜生佳世・馬場愛・樋脇弘・武田昭

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Genetic Analysis of *Legionella pneumophila* Strains Isolated from Public Bath Water in Fukuoka City

Kayo URYU, Ai BABA, Hiroshi HIWAKI, and Akira TAKEDA

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and Environment

Summary

RAPD-PCR is not a standard method to the analysis of *Legionella* strains compared with PFGE, although it is a quick test.

To examine the effectiveness of RAPD-PCR, 42 strains of *Legionella pneumophila* isolated from public bath water in Fukuoka City during 2000-2003 were analyzed by RAPD-PCR and PFGE.

As a result of this examination, the matching rate of DNA patterns between RAPD and PFGE was low. It was thought that the problem is to select the appropriate RAPD-PCR primers of *Legionella pneumophila* and improve a protocol from preparation of bacterial culture to cluster analysis.

Key Words：レジオネラニューモフィラ *Legionella pneumophila*,
公衆浴場水 public bath water, パルスフィールドゲル電気泳動 PFGE,
RAPD 解析 RAPD-PCR analysis, 福岡市 Fukuoka City

I はじめに

近年、静岡県、茨城県、宮崎県、鹿児島県などの入浴施設において、レジオネラ集団感染が相次いで発生し^{1,2)}、死亡者が出たこともあって、大きな社会問題となった。

このような集団感染事例においては、患者由来株と浴槽水からの分離株についてパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による遺伝子解析を実施し、その解析結果から速やかに感染源を特定することが必要である。

しかし、PFGE は試験操作が煩雑であり、結果を得るのに迅速性にかける欠点がある。一方、Random amplified polymorphic DNA（RAPD）は、試験操作も簡単であり、結果判明までわずか 1 日である。RAPD は、一部の菌種には型別法として有用とされているが、レジオネラ属菌の疫学解析としては一般的ではない^{1,2)}。

今回、福岡市内の公衆浴場の浴槽水から分離されたレジオネラ属菌について、PFGE および RAPD による遺伝子解析を試み、疫学解析の有用性を検討したので報告する。

II 材料および方法

1. 使用菌株

2000 年から 2003 年にかけて、当研究所にて分離した公衆浴場水由来の、*Legionella pneumophila* (Lp) 41 株 (SG1；32 株, SG3；1 株, SG4；1 株, SG5；3 株, SG6；3 株, SG8；1 株)、および *L. micdadei* 1 株の計 42 株を用いた。

2. PFGE および RAPD

PFGE は制限酵素 *Sfi* I（BioLabs）を用い、国立感染症研究所の「レジオネラ症検査・診断マニュアル」に準

じて行った。

RAPD は、Ready-To-Go RAPD Analysis Kit（Amersham Biosciences）付属のプライマー 1, 2 および 4 の 3 種類を使用し、使用説明書に基づき実施した。

なお、電気泳動は、PFGE では CHEF-DR III チラシシステム（BIO-RAD）を、RAPD ではマイクロチップ（日

立サイエンスコスモアイ）を用いて行った。

PFGE および RAPD で得られた電気泳動像は、Finger Printing II（BIO-RAD）を使用して画像解析を行い、Dice 係数法に基づき相似係数を算出し、平均距離法（UPGMA）による系統樹を作成し、クラスター解析を行った。

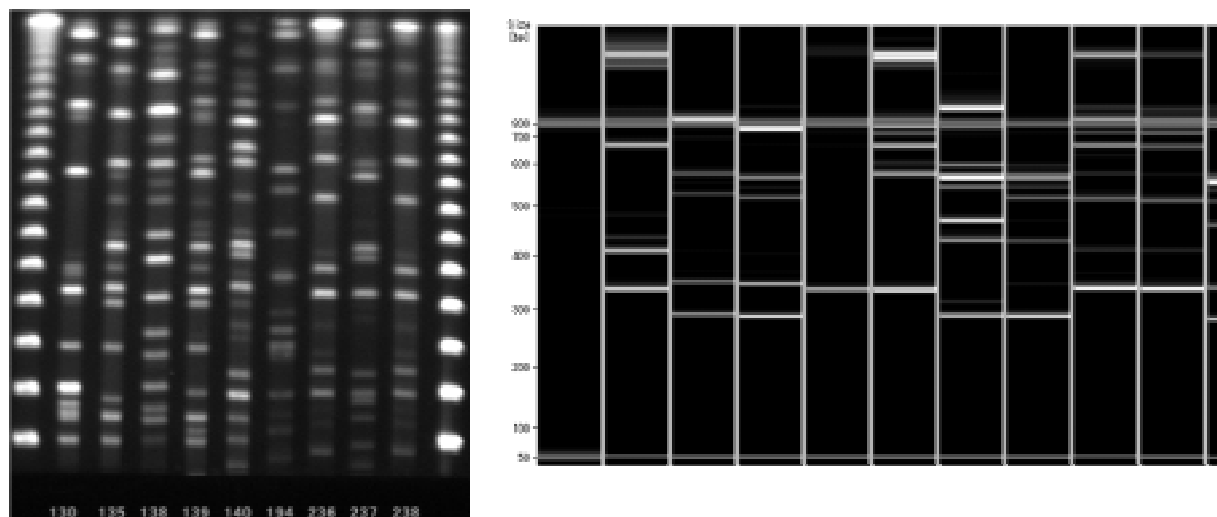


図 1 PFGE および RAPD で得られた電気泳動像（一例）

III 結果

PFGE および RAPD で得られた電気泳動像の一部を図 1 に、供試した 42 株の解析結果を表 1 に示した。

1. PFGE 解析

供試菌 42 株には 10 ～ 20 本のバンドが認められ、これらは 40 種類の遺伝子パターンに分類された。

同一の遺伝子パターンを示した株は、同じ時期に同じ施設の異なる浴槽から採取された № 1 と № 2 の Lp（ともに SG6）の 2 株、および異なる時期に同じ施設から採取された № 3 と № 4 の Lp（ともに SG1）の 2 株であった。

残りの 38 株は全て異なるパターンであったが、これらの株のうち、№ 5 と № 6 の 2 株、および № 7 と № 8 の 2 株については、相似係数は 90% 以上であり、いずれも採取日は異なるが同じ施設から分離された Lp（SG1）であった。

2. RAPD プライマー 1 による解析

プライマー 1 では、認められたバンドの数は、5 ～ 8

本であり、供試菌の遺伝子のパターンは 37 種類に分類された。

そのうち № 1（SG6）と № 11（SG4）の 2 株、№ 9 と № 10（ともに SG1）の 2 株、№ 12 と № 13（ともに SG5）の 2 株、および № 14・№ 15（ともに SG1）の 2 株が、それぞれ、同一の遺伝子パターンであった。№ 9 と № 10 については、同じ時期に同じ施設の異なる浴槽から採取された株であった。

残りの 34 株は全て異なるパターンであったが、これらの株のうち、№ 16 と № 17（ともに SG1）の 2 株の遺伝子パターンは、90% 以上の相似係数を示し、採取日が異なったが、同一施設由来であった。

3. RAPD プライマー 2 による解析

プライマー 2 で認められたバンドの数は、7 ～ 10 本であり、供試菌の遺伝子パターンは 38 種に分類された。

№ 1（SG6）と № 11（SG4）の 2 株、№ 4 と № 18（ともに SG1）の 2 株、および № 12（SG5）と № 13（SG5）と № 19（SG8）の 3 株が、それぞれ、同一の遺伝子パターンを示した。№ 4・№ 18 の株については、採取した施設は別であった。

№ 20・№ 21（ともに SG1）のパターンは、90% 以上

の相似係数を示し、採取日、施設とも異なっていた。

4. RAPD プライマー 4 による解析

プライマー 4 でのバンドの数は、8 ～ 12 本と今回使用したプライマーの中では、最も多かった。供試菌の遺伝子パターンは 40 種類に分類された。

№ 1 と № 2 (ともに SG6) の 2 株、および № 11 (SG4) と

№ 13 (SG5) の株が、それぞれ、同一の遺伝子パターンを示した。なお、№ 1 と № 2 の株については、PFGE パターンも一致していた。

№ 5 と № 6 (ともに SG1) の 2 株のパターンは、90% 以上の相似係数を示し、採取日は異なるが、同一施設由来であった。

表 1 42 株 (Lp 41 株および *L.micdadei* 1 株) の解析結果

菌株 №	血清型	由来 / 採水時期	PFGE	RAPD1	RAPD2	RAPD4
№ 1	SG6	na/30520	[P14]	[I 15]	[II 25]	[IV 26]
№ 2	SG6	na/30520	[P14]	I 27	II 26-1	[IV 26]
№ 3	SG1	ra/20327	[P7]	I 5-1	II 4	IV 12
№ 4	SG1	ra/10529	[P7]	I 6	[II 13]	IV 11-1
№ 5	SG1	na/20327	(P16-1)	I 1-1	II 18	(IV 1-1)
№ 6	SG1	na/30520	(P16-2)	I 3	II 11	(IV 1-2)
№ 7	SG1	fu/10910	(P19-1)	I 12	II 21-1	IV 3-1
№ 8	SG1	fu/20320	(P19-2)	I 13	II 8	IV 5
№ 9	SG1	aq/30219	P5-1	[I 10]	II 2	IV 14-1
№ 10	SG1	aq/30219	P5-2	[I 10]	II 21-2	IV 3-2
№ 11	SG4	tu/30129	P3	[I 15]	[II 25]	[IV 24]
№ 12	SG5	um/20919	P1-1	[I 26]	[II 17]	IV 21-2
№ 13	SG5	ci/30917	P1-2	[I 26]	[II 17]	[IV 24]
№ 14	SG1	sh/10529	P20-1	[I 8]	II 7-1	IV 9-2
№ 15	SG1	yu/10910	P8	[I 8]	II 7-2	IV 8-2
№ 16	SG1	tu/21127	P23-1	(I 2-1)	II 23	IV 6-1
№ 17	SG1	tu/30129	P2-2	(I 2-2)	II 22-1	IV 6-2
№ 18	SG1	it/030625	P24-2	I 18	[II 13]	IV 23-1
№ 19	SG8	ci/30917	P12-2	I 19-1	[II 17]	IV 22-1
№ 20	SG1	mi/30626	P13-2	I 21-2	(II 14-1)	IV 2
№ 21	SG1	sy/20313	P15	I 20	(II 14-2)	IV 13
№ 22	SG1	yu/00912	P10-1	I 22-2	II 10	IV 19
№ 23	SG1	aq/00919	P6-2	I 14-1	II 1-1	IV 9-1
№ 24	SG1	aq/10515	P18-2	I 11	II 1-2	IV 21-1
№ 25	SG1	sy/30903	P21-1	I 9	II 12-1	IV 15-2
№ 26	SG1	wa/20919	P24-1	I 24-2	II 12-2	IV 4
№ 27	SG5	or/021211	P6-1	I 21-1	II 15	IV 17-2
№ 28	SG1	sa/00912	P17	I 24-1	II 16	IV 14-2
№ 29	SG1	ci/30917	P4-2	I 16	II 19	IV 22-2
№ 30	SG1	fu/10910	P20-2	I 17	II 20-1	IV 8-1
№ 31	SG1	sy/00919	P22-1	I 5-2	II 20-2	IV 11-2
№ 32	SG1	mi/01120	P10-2	I 7-1	II 22-2	IV 15-1
№ 33	SG1	aq/31126	P9	I 28	II 24	IV 20-1
№ 34	<i>L.micdadei</i>	mi/30626	P15	I 29	II 26-2	IV 25
№ 35	SG6	fu/30514	P22-2	I 19-2	II 27	IV 23-2
№ 36	SG1	sh/20320	P18-1	I 14-2	II 3	IV 10
№ 37	SG3	tu/21127	P2-1	I 4	II 3	IV 17-1
№ 38	SG1	pe/0912	P21-2	I 7-2	II 5-1	IV 16
№ 39	SG1	as/10529	P12-1	I 25	II 5-2	IV 20-2
№ 40	SG1	da/00926	P23-2	I 1-2	II 6-2	IV 7
№ 41	SG1	tu/20313	P13-1	I 22-1	II 9-1	IV 18-1
№ 42	SG1	ze/00919	P11	I 23	II 9-2	IV 18-2

[] は 100% 遺伝子パターンが一致。 **()** は 90% 以上遺伝子パターンが一致。

IV 考 察

PFGE 解析は、O157、赤痢菌、サルモネラなど食中毒菌の分子疫学的解析法の標準とされている^{3,4)}。また、

レジオネラ集団感染事例においても患者由来株と浴槽水由来株との遺伝子解析は、PFGE が一般的に用いられている現状である。

今回実施した RAPD 解析では、血清型や採水施設が

異なる疫学的に関連のない株においても、一部、同一の遺伝子パターンを示すことがあった。

また、PFGE と RAPD 解析を比較すると、明らかな相関は認められず、プライマー 1, 2, 4 を使用した RAPD 解析は、レジオネラ属菌の遺伝子解析には不适当と考えられた。

しかし、いずれのプライマーも数多くの多型性が得られており、今後は、PFGE と相関性の高い RAPD プライマーを選択すれば、レジオネラ属菌の遺伝子解析への応用が可能と思われた。

一方、菌株の保存状態やコンピューター画像解析においてもいくつかの問題点が挙げられた。

その一つとして、菌の長期保存によって、遺伝子の一部が損傷を受けたり、遺伝子配列が変異することにより、パターンが変わった可能性も考えられた。

また、画像解析では、不明瞭なバンドや、重なり合って識別できないバンドを採用するか否かが、大きく結果に関わってくる。

特に、PFGE の場合、同一菌であっても、菌の保存状態や菌液の濃度、あるいは画像解析の条件設定で、結果が異なってくるため、今後は菌液の調整からクラスター解析に至るまでの一連の実験条件を検討し、再現性を確立していく必要がある。

VII ま と め

福岡市内の公衆浴場の浴槽水由来のレジオネラ属菌について、PFGE および RAPD による遺伝子解析を行い、遺伝子解析の有用性を検討した。

RAPD では、遺伝子パターンの多型性は認められたものの、PFGE との相関性がなく、今後は PFGE と相関性の高いプライマーの選択が必要と考える。

また遺伝子解析の再現性を確保するため、菌液の調整からクラスター解析に至るまでのプロトコールを見直していきたい。

なお、本報告の一部は、第 51 回福岡県公衆衛生学会において発表したものである。

文 献

- 1) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局 結核感染症課：病原微生物検出情報，21，188～191，2000
- 2) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局 結核感染症課：病原微生物検出情報，24，29～33，2003
- 3) 渡辺治雄他：分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制；パルスネットの構築，感染症誌，76，842～848，2002
- 4) Bala Swaminathan et al：PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States, Emerging Infectious Diseases, vol7, No. 3, 382-389, May-Jun, 2001,