

令和5年2月16日
令和4年度 希少感染症診断技術研修会

レジオネラ

国立感染症研究所

細菌第一部

前川純子

jmaekawa@niid.go.jp

レジオネラ属菌が増殖する“人工”水系

◆冷却塔



◆加湿器



◆シャワー等の給湯や給水



生じるエアロゾル（微小な水の粒）に菌体が含まれていると、経気道感染する。

◆浴槽

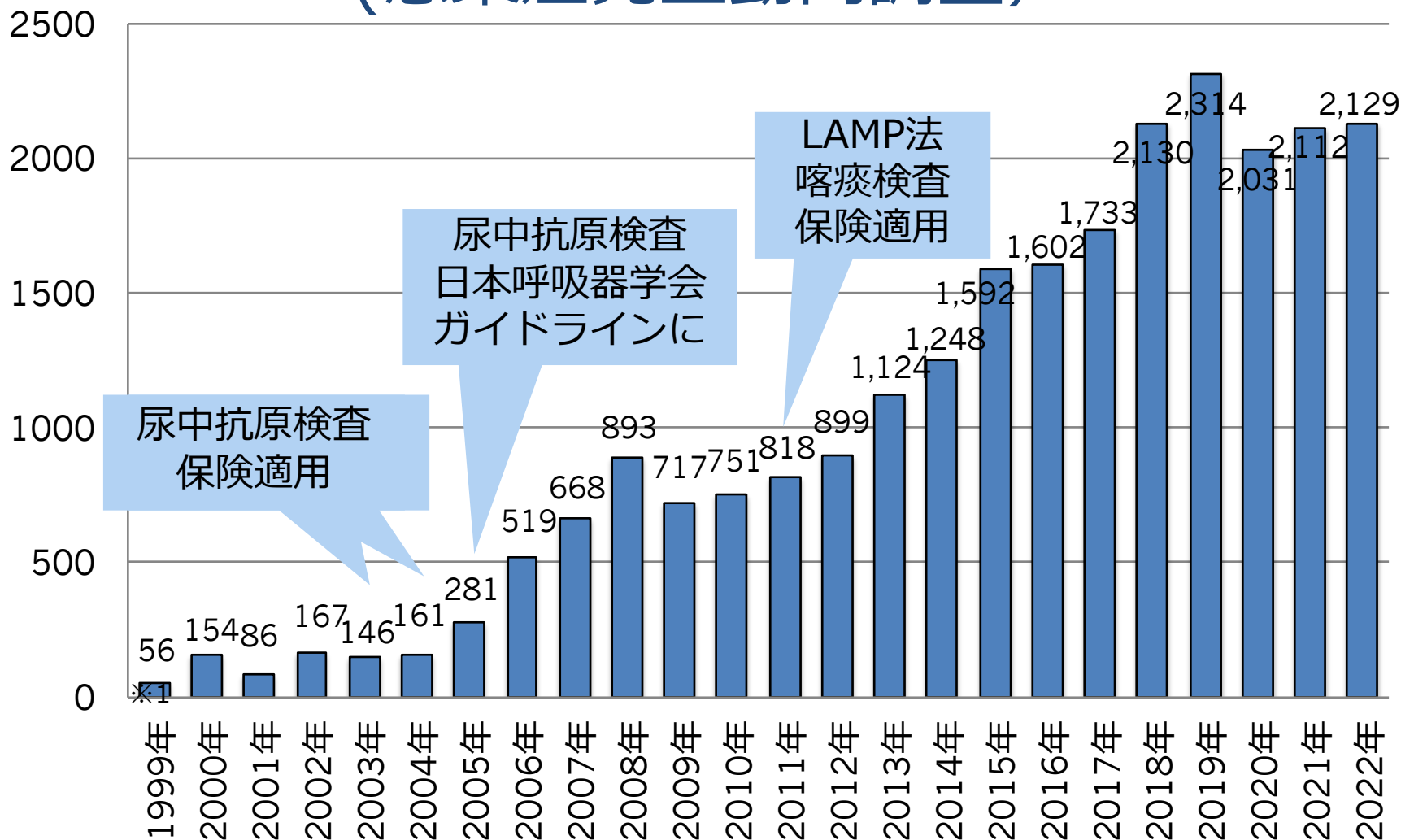


・掲載にあたり、一部修正しました。

年別レジオネラ症報告数

(感染症発生動向調査)

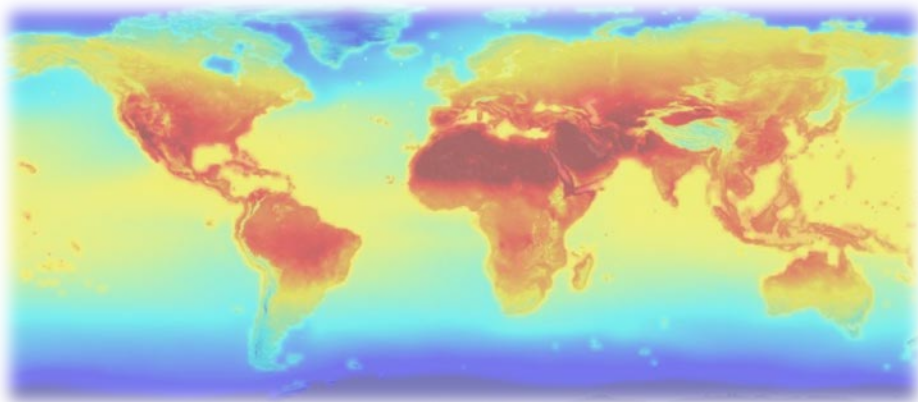
(報告数)



※1：1999年の報告数は4～12月までの数値である。

レジオネラ症増加の背景

- 診断の増加（医師の注目、診断薬の普及）
- リスク因子を持った人の増加（基礎疾患、免疫抑制剤）
- 人口の高齢化
- 配管系の老朽化
- 気候変動（温暖化、ゲリラ豪雨等）



Garrison LE (2016) MMWR 65:576

レジオネラ症報告診断法

2011年第1週～2021年第35週 16,841例

国立感染症研究所 感染症疫学センター

*L. pneumophila*のみを検出

尿中抗原検出 95.5%

培養 2.3%

病原体遺伝子の検出 3.6%

血清抗体価測定 0.9%

イムノクロマトグラフィー法

L. pneumophila 血清群1を検出

アンケート
結果

- Binax NOW *Legionella*
(アボット ダイアグノスティクス メディカル) 34.3%
- イムノキャッチ レジオネラ (栄研化学) 15.7%
- クイックチェイサー 肺炎球菌/レジオネラ
(ミズホメディー) 5.1%
- チェックレジオネラ
(アルフレッサファーマ) 0.4%

L. pneumophila 血清群1-15を検出

- リボテスト レジオネラ (極東製薬) 38.3%

レジオネラ症報告診断法

2011年第1週～2021年第35週 16,841例

国立感染症研究所 感染症疫学センター

尿中抗原検出 95.5%

培養 2.3%

病原体遺伝子の検出 3.6%

血清抗体価測定 0.9%

アンケート回答で培養可能病院は17.5%

培養・菌分離の重要性

- ❖ 疫学的情報を得る。
- ❖ 感染源の解明のために、臨床分離株と患者周辺環境から分離された菌株の異同を確認する。

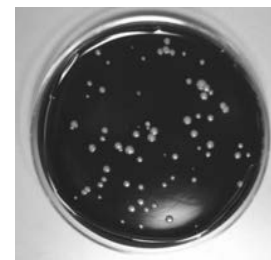
レジオネラ症患者



喀痰採取



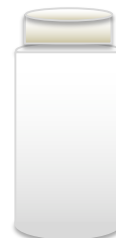
培養



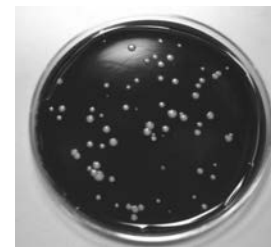
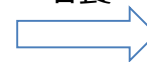
利用入浴施設



採水



培養



レジオネラ症患者臨床検体および分離株分与のお願い

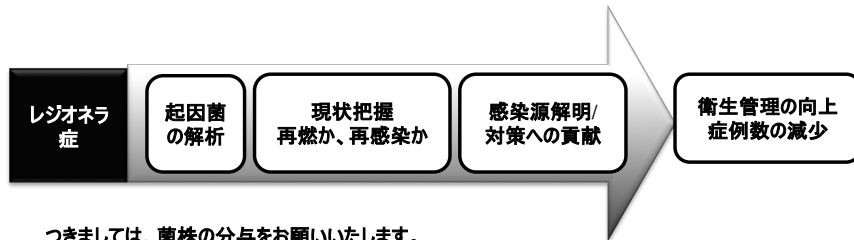
国立感染症研究所および地方衛生研究所で構築されるレジオネラ・レファレンスセンターにおいて、レジオネラ症に対する積極的疫学調査を行っています。

感染症法に基づく発生動向調査によると、

- レジオネラ症患者は2022年には2,129例(暫定数)で、本年は更にそれを上回る可能性があります。
- 届出例中、尿中抗原検出による確定診断は95.5%で、届出時点での培養陽性は2.3%となっています¹⁾。しかし、菌株を分離しないと感染源が確定できず対策が困難となります。

レジオネラ・レファレンスセンターでは、感染症法に基づいた積極的疫学調査として以下の活動を行っています。

- 臨床分離株の菌種、血清群や分子疫学情報などを決定することで、どのような株が感染しているか調査し、その結果を感染研感染症疫学センターのホームページや学術誌等で還元すること^{2),3)}。
- 遺伝子型から推定感染源(浴槽水、土壌、冷却塔水等)⁴⁾をお知らせすること。



つきましては、菌株の分与をお願いいたします。

それが困難な場合には喀痰等の呼吸器検体の確保・分与をお願いします。

患者様を特定する情報は削除し、匿名化していただけると幸いです。

本レファレンス事業にご理解いただけますようお願い申し上げます。

個々の解析結果については、随時報告致します。

ご協力の程、どうぞ宜しくお願い致します。
今後とも宜しくお願い申し上げます。

2023年1月

- 分与いただいた菌株はレジオネラレファレンス活動の参照株として用いることがあります。
- 菌株の目的外の使用および許可なしに第三者への分与は行いません。

参考文献

- 1)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) *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008-2016. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84, pii:e00721-18.
- 3) レジオネラ臨床分離株の型別 —レファレンスセンター活動報告として IASR, 2013, 6:161-3. <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2252/400/3599-tj4004.html>
- 4) Distribution of Monoclonal Antibody Subgroups and Sequence-Based Types among *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates Derived from Cooling Tower Water, Bathwater, and Soil in Japan. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78:4263-70.

連絡先
国立感染症研究所
前川純子(細菌第一部担当者)
明田幸宏(細菌第一部 部長)
〒162-8640 新宿区戸山1-23-1
TEL: 03-5285-1111
E-mail: jmaekawa@niid.go.jp

培養

- 病巣部に由来する膿性痰が望ましい。
- 抗菌剤投与前に採取

- 喀出痰
- 誘発喀痰（ネブライザー吸入後）
- 吸引痰
- 気管支肺胞洗浄液

培養前処理

等量～4倍量の喀痰溶解酵素液（スプタザイム等）
で、15分～処理。必要に応じて遠心。

酸処理 pH2.2緩衝液

レジオネラ前処理液を検体に等量加えて
よく混和し、室温で5分間。

熱処理

50℃で20分間加熱

適宜希釈した検体もプレーティング

熱処理

酸処理



レジオネラ専用培地での培養

選択培地

WYO α 寒天培地

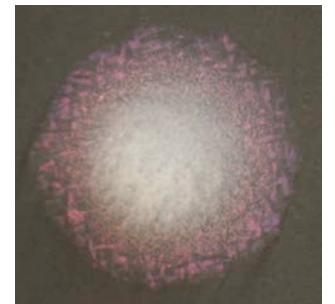
MWY寒天培地

GVPC寒天培地

など



- 36 \pm 1 $^{\circ}$ Cで培養（湿潤箱に入れ、7日間。
ただし経日的に観察）
- 実体顕微鏡で観察（斜光法）
モザイク・カットグラス様集落
- L-システイン要求性の確認
L-システイン不含寒天培地と
BCYE α 培地に画線培養



分離菌の同定法 -血清学的手法-

Oxoidレジオネラ・ラテックステスト（関東化学）

L. pneumophila SG1,

L. pneumophila SG2-14,

その他ヒト疾患に関連する7種

(*L. longbeachae*, *L. bozeman*, *L. dumoffii*,

L. gormanii, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*)

の3種類に鑑別できる。



レジオネラ免疫血清「生研」（デンカ）

スライド凝集法 体外診断薬（加熱死菌、1分間反応）

L. pneumophila SG1-6, *L. micdadei*, *L. gormanii*,

L. bozeman SG1, *L. dumoffii* が同定できる。

L. pneumophila SG7-15 は研究用試薬として使用可能。

市販されていない免疫血清の配布

デンカ（株）が受託生産

ニューモフィラ混合 2-15群

ニューモフィラ混合1 2群、3群、6群、12群、14群

ニューモフィラ混合2 4群、5群、9群、10群、15群

ニューモフィラ混合3 7群、8群、11群、13群

ボゼマニイ 2群

アニサ、ジオルダニス

ロングビーチ 1群、2群

フィーレイ1群、2群

ロンディニエンシス 1群、2群

セントヘレンシ 1群、2群

ハッケリー1群2群混合

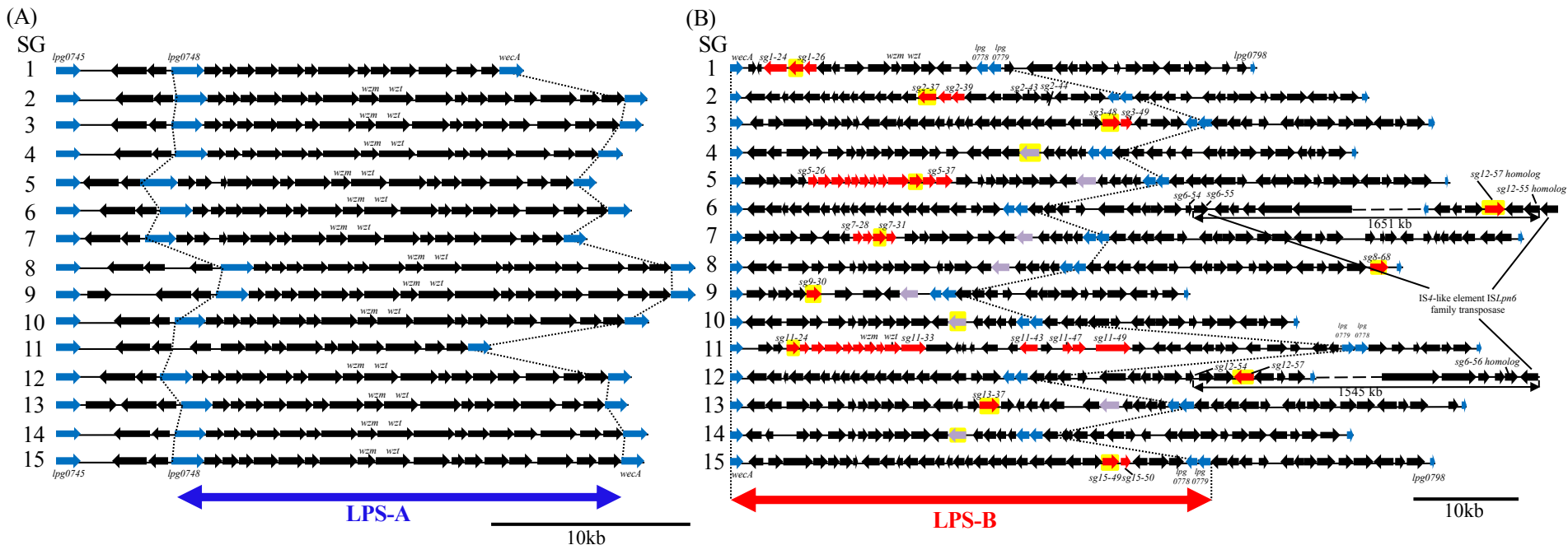
レジオネラ・レファレンスセンターで配布

免疫血清を用いたスライド凝集法の問題点

- すべてのレジオネラ属菌が同定できるわけではない。
- ある程度の量の菌体が必要（レジオネラは生育が遅いので時間がかかる）。
- *L. pneumophila*において、群別不能となる菌株の存在。

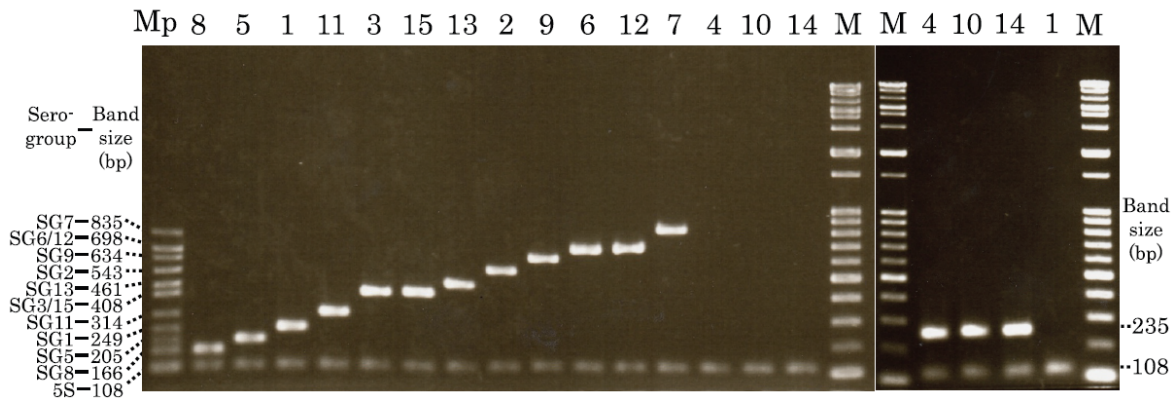


*L. pneumophila*の15血清群のLPS合成遺伝子配列



→ 1 or 2血清群で特異的な遺伝子
 <血清型別PCRの標的部位>

*L. pneumophila*の15血清群のDNAを用いたM-PCRの結果



Multiplex-PCR (M-PCR)による *L. pneumophila* の血清型別法の改良

- SG14のプライマーを追加し、SG14も型別できるようになった。
- SG13のプライマーを改良し、感度を上げた。

TABLE 1 Primer sequences of the PCR serotyping

Primer set	Target gene (Gene name)	Product size (bp)	Target SG(s)	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
SGg1	sg1-25 (<i>srkA</i>)	249	SG1	AAACGCCTCTTTGCTGAACCAG	GTTGGGCATCTTCTTGATTAATCC
SGg2	sg2-37	543	SG2	AAACGAGGGTGACTAAGTGC	TATCAGGGGTAGCTGTTGGC
SGg3/15	sg3-48/sg15-49	408	SG3 and SG15	GGAATTTGTAAAGCAAAGAAAACCAG	AGATGTTTTGATCGCTAAAATGCCT
SGg5	sg5-35	205	SG5	GAACCTATTCTTAATCCAGAGG	TAGACGCATTGCCAAACAAG
SGg6/12	sg12-57	698	SG6 and SG12	TTACTTGGCCATCTAAGTTACC	CTTCACTTCCTTGGACTGTGC
SGg7	sg7-30 (<i>dapA</i>)	835	SG7	TTAGTATTGAGAGGGTTGGC	TGTGTAGGGCTTACAAAGTCC
SGg8	sg8-68	166	SG8	TGCTCACTCTATAGTTTATGATTGG	TAGTTTGACGATCAATTCCAGC
SGg9	sg9-29	634	SG9	TTATCTGGATTATCTTTCACCTCG	GAATGGTATGAGAGAATCACTGG
SGg11	sg11-23 (<i>legI</i>)	314	SG11	ACATTACGGTAGTGGCAAAGG	TGTTTCGATTTACCTAACAATGC
SGg13	sg13-37	461	SG13	ACCTTATGGT(A/C)TTGCAGATTC	CA(G/T)CC(A/C)TCATGATCACTTGG
SGg14	<i>lpg0745</i> to 743 kb downstream gene ^a	986	SG14 and ST23 ^b	GTTTGGTTGATGCCAATAATCTCG	AGCCAGAATATAAGTCATTGTCCG
SGg4/10	sg4-40 /sg10-36 (<i>patA</i>)	235	SG4, SG10 and other SGs ^c	AAACGAGATAAAGTCATATGCC	TACGCAAATACCGTCTTTAGC
Positive control	5S rRNA	108	<i>Legionella</i> genus	GCGACTATAGCG(A/G)TTTGAA	GCGATGACCTACTTTC(A/G)CATGA

^b Detection for SG14 and ST23 among SG1.

^c Detection for SG4, SG5, SG8, SG9, SG10, SG13, SG14, SGUT, a part of SG7, and a part of SG11.

Nakaue, et al., The 10th International Conference on *Legionella*, October 2022, Yokohama, Japan を改変
 ・掲載にあたり、5S rRNAのプライマー配列を追加しました。

Multiplex-PCR (M-PCR)による *L. pneumophila* の血清型別法の改良

24本のプライマーを準備して、前もって混ぜる必要がある。

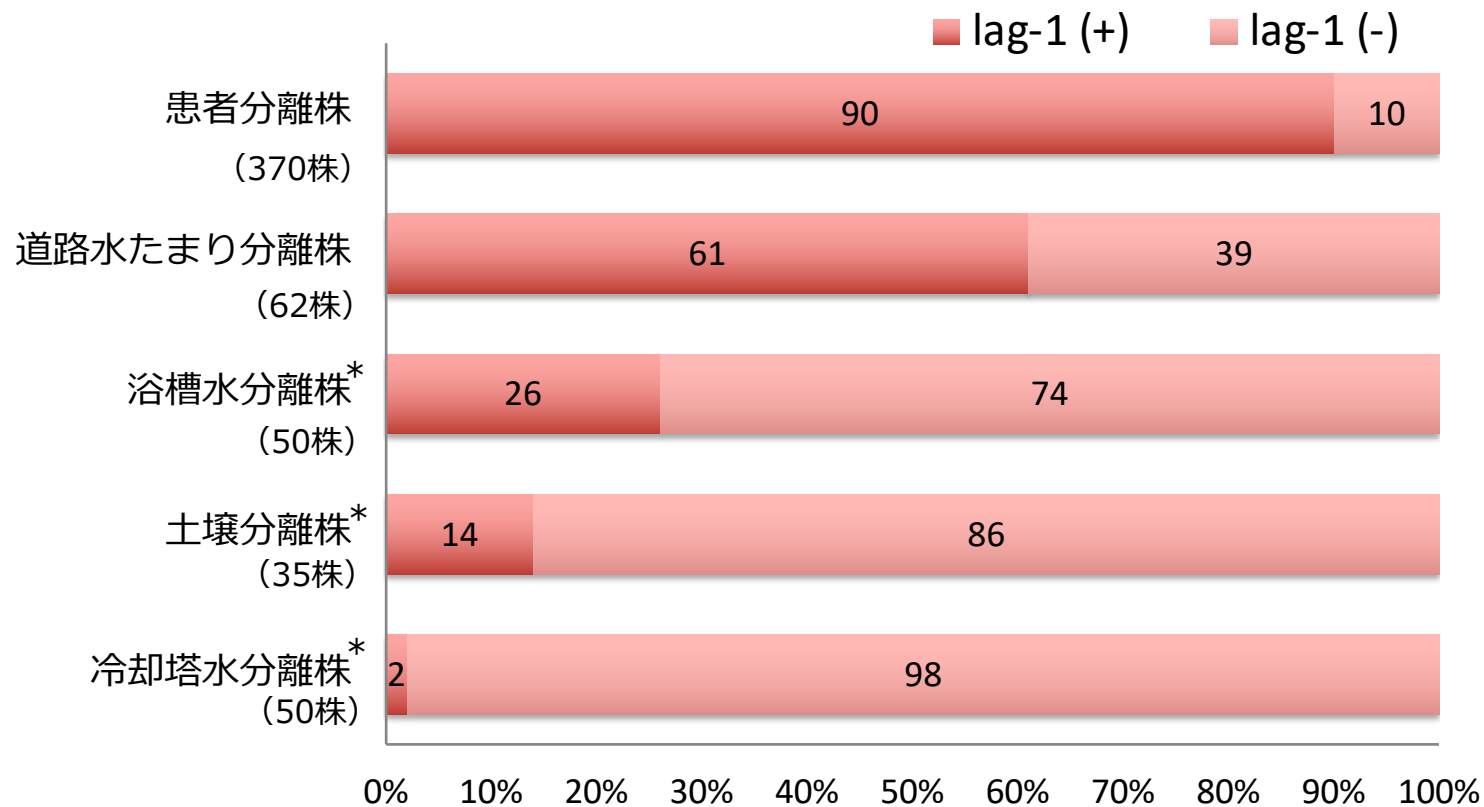
<キット化>

プレミックス・プライマーセット

ファスマックから販売。

レジオネラ・レファレンスセンターを
通じて（追加）配布（予定）。

*L. pneumophila*血清群1株の*lag-1*遺伝子陽性率



*モノクローナル抗体による陽性率

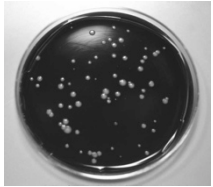
***lag-1*検出PCRは、病原体検出マニュアル「レジオネラ症」に載っています。**

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

最近の国内集団感染事例

年月	感染源	地域	確定患者数	死亡者数
2011.8-9	温泉（スポーツジム）	神奈川県	9	
2012.11	温泉	山形県	3	1
2012.11-12	温泉	埼玉県	9	
2013.4	循環式浴槽（高齢者福祉施設）	宮崎県	2	
2014.5	温泉	埼玉県	3	1
2014.8	温泉	静岡県	8	
2015.5	公衆浴場（オープン直後）	岩手県	13	1
2015.5-6	温泉	神奈川県	7	
2016.9-10	温泉	長野県	2	
2017.2-3			3	1
2017.3	温泉（旅館）	京都府	3	
2017.3	温泉	広島県	58	1
2017.12-2018.1	加湿器（特別養護老人ホーム）	大分県	3	1
2018.1	バス自動洗車装置	北海道	2	
2019.1	加湿器（介護保険施設）	北海道	3	1
2019.6-7	循環式浴槽（フェリー）		3	
2019.7-8	温泉	静岡県	13	
2019.8-9	温泉	山形県	3	
2019.10	加湿器（ラドン浴）	兵庫県	4	
2021.12	温泉	広島県	4	
2022.4	温泉	兵庫県	2	1

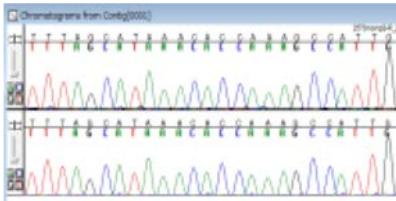
Sequence-based typing (SBT)法



L. pneumophila のコロニーから
DNAを取り出す。



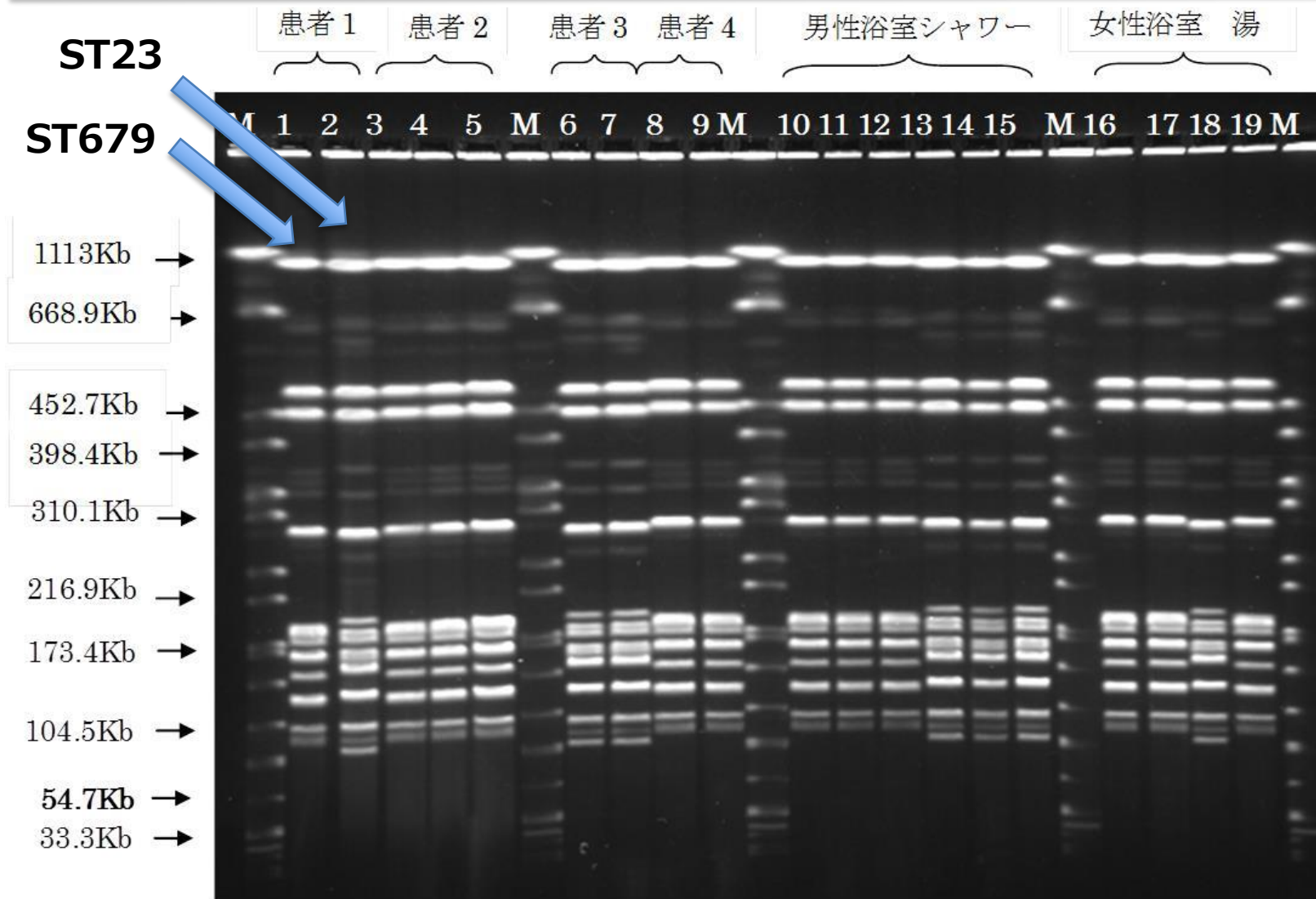
特定（7カ所）のDNA断片を
PCR法で増幅する。



DNA断片の塩基配列を読み取り、
配列の違いに応じて番号をつける。

例) (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*)
=(2,3,9,10,2,1,6) ST23

パルスフィールド電気泳動法結果



平成28年2月5日生活衛生関係技術担当者研修会

岩手県環境保健研究センター 岩淵香織氏 発表資料にST番号を追記

レジオネラ症報告診断法

2011年第1週～2021年第35週 16,841例

国立感染症研究所 感染症疫学センター

尿中抗原検出 95.5%

培養 2.3%

病原体遺伝子の検出 3.6%



血清抗体価測定 0.9%

**2011年よりLAMP法が
保険適用**

レジオネラ属菌を広く検出

Loopampレジオネラ検出試薬キットC

- LAMP法の体外診断用医薬品。
- 喀痰中のレジオネラ属菌を迅速・簡便に検出。
- *L. pneumophila*血清群1以外も検出可能。
- 培養法との相関で、尿中抗原測定法より、陽性一致率が高い。
- **培養陰性の場合でもレジオネラDNAが検出可能。**

培養法と本製品（LAMP法）及び尿中抗原測定法との相関性 ※

		本製品（LAMP法）			尿中抗原測定法		
		+	-	計	+	-	計
培養法	+	21	1	22	13	9	22
	-	0	113	113	0	113	113
	計	21	114	135	13	122	135

陽性一致率：95.5%

陰性一致率：100.0%

全体一致率：99.3%

陽性一致率：59.1%

陰性一致率：100.0%

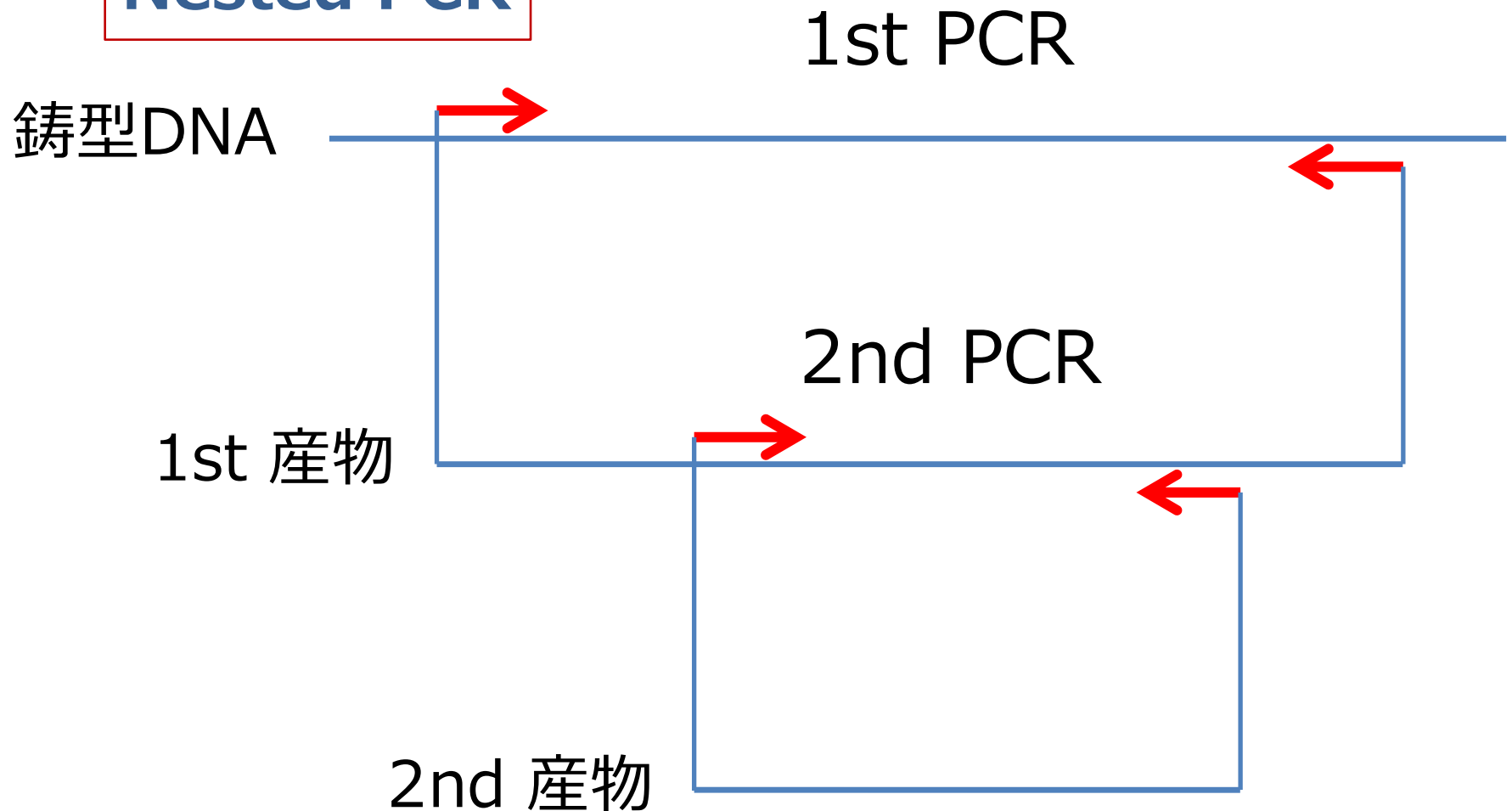
全体一致率：93.3%

※ 添付文書より転載

菌が分離できなくても、
直接SBT法を行うことができる。

LAMP陽性のDNA検体を使用。

Nested PCR



菌が分離できなくても、 直接SBT法を行うことができる。

入浴施設での集団感染事例



2019年8月、3名が山形県の入浴施設を利用した後に発症。

尿中抗原 すべて陽性

喀痰培養 1名のみ検出 ST139

喀痰DNA すべて陽性 → nested SBTにより、ST139

屋内の浴槽水から、ST139が検出された（PFGEも一致）。

露天風呂からは、ST2851。

患者発生時の検査

2012年 日帰り温泉施設における
レジオネラ症集団発生（8名）

浴槽水からの菌株と患者分離株の
パルスフィールドゲル電気泳動パターンは一致
せず。

浴槽壁のふきとり検体と一致。

ST1452

採水だけでなくふき取りも

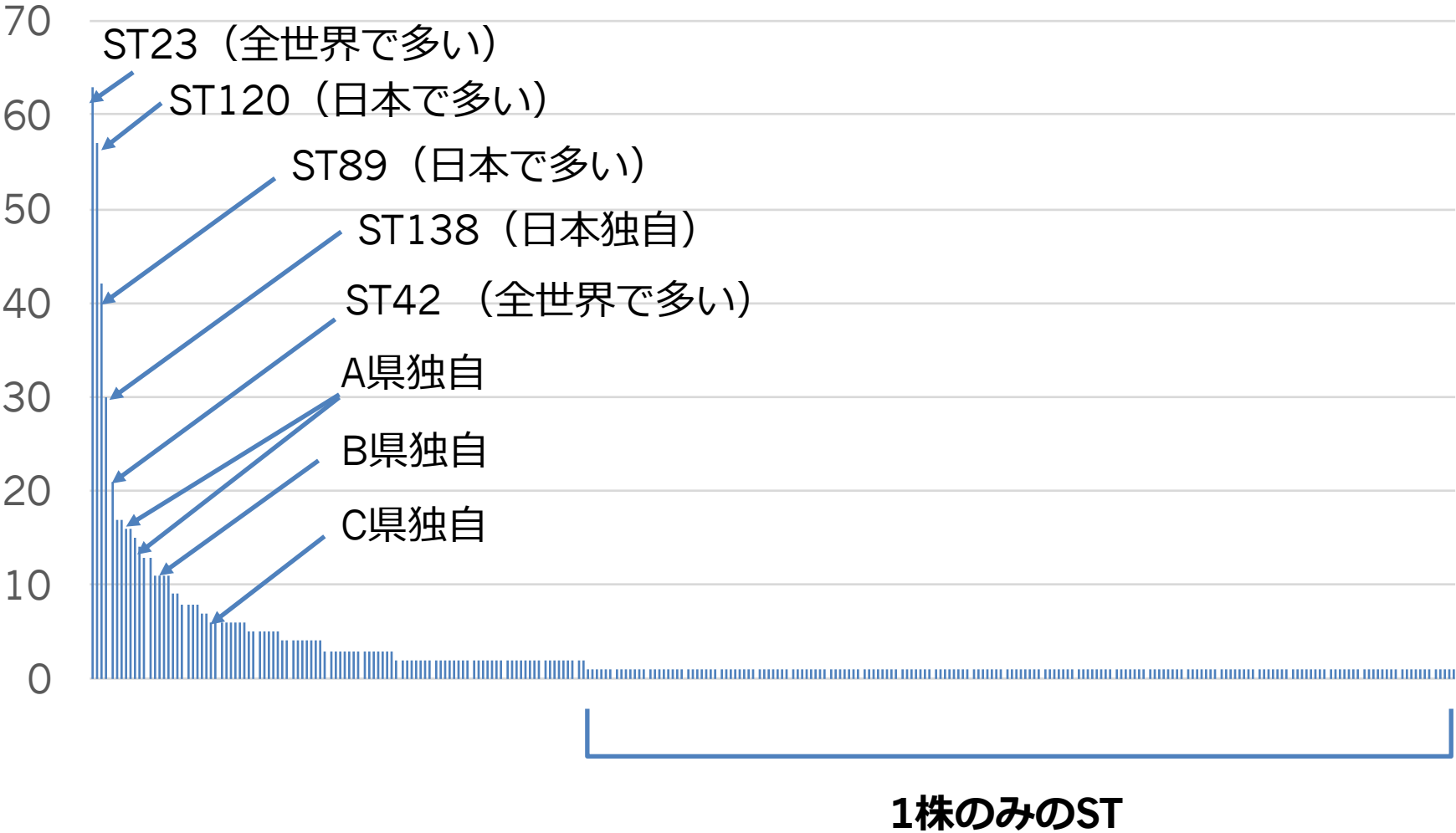
SBTホームページ閉鎖中

- ◆ 神奈川衛研で、簡易検索ツール（SBT検索ツール、エクセルファイル）を作成、レジオネラ・レファレンスセンターを通じて配布。



臨床分離株のSTの分布

株数の多いSTがある



今後の型別法

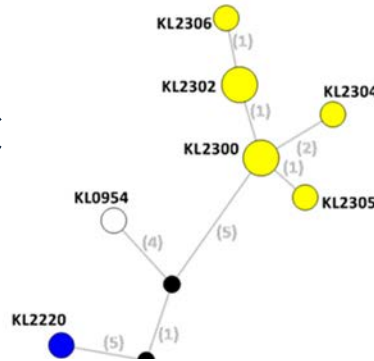
SBT法：区別できない株の存在

NGS解析：同一性をどう定めるかデータの蓄積が必要。感染源の種類、分離株の遺伝的特性により異なるのでは。

集団感染事例におけるNGS解析

全ゲノム配列で異なる塩基数 (SNVs) を算出

患者由来株と環境分離株で2-4のSNVsのcladeの存在。
→感染源と判断



Node label	Matching Sequences
KL2242	KL2242
	KL2255
	KL2257
KL2229	KL2229
	KL2230
	KL2231
	KL2232
	KL2233
KL2246	KL2246
	KL2239
KL2300	KL2300
	KL2301
KL2302	KL2302
	KL2303

