

厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業

レジオネラ感染症の新しい診断技術の 開発とその標準化に関する研究

平成11年度 研究報告書

主任研究者

齋藤 厚

琉球大学医学部内科学講座第一

厚生省

厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業

**レジオネラ感染症の新しい診断技術の
開発とその標準化に関する研究**

平成11年度 研究報告書

平成9～11年度総合研究報告書

まえがき

レジオネラ感染症は新興・再興感染症の一つであり、臨床的には市中肺炎あるいは院内肺炎として重要な感染症である。本邦においては1980年の症例の報告以来、多数の症例が報告されるとともに、感染源としてのビル冷却塔水、ビル給湯システム、温泉、家庭用循環風呂などの生活環境のレジオネラによる汚染とこれからの感染事例が報告され、臨床上あるいは公衆衛生上の問題を惹起してきた。1999年4月施行された感染症新法では、本感染症は第4類感染症として全例報告によるサーベイランス対象疾患とされている。このような状況の下、平成9年度にレジオネラ感染症の診断法の開発と標準化を目的として本研究班が組織され、以来3年間に多大な研究成果が得られた。

第一に、新しい診断技術としての尿中抗原検出法の臨床評価を行った。特異性および感度に優れた診断法であるとともに簡便性にも優れ、一般の検査室にても容易に行える検査法として期待される。また、核酸増幅法の有用性の確認および補助診断としての画像所見や血清マーカーKL-6の有用性などにも特記すべき研究成果が得られた。第二に、本症では感染源の特定が重要であるが、その際に用いられる分子疫学の手法としてパルスフィールドゲル電気泳動法や単クローン抗体による菌株のタイピング法を確立した。また、新しい感染源として腐葉土のレジオネラ汚染状況を調査し、ほとんどの検体からレジオネラを分離した。臨床症例の集積から温泉水、家庭用循環風呂に関連した発症例が確認され、これらが感染源として重要であることが明らかとなった。第三には本症の病原性に関する基礎研究が積極的になされ、本症の治療や予防にもつながる新しい知見が得られた。

本研究班ではここに研究成果の概要を報告するとともに、その研究成果に基づいたレジオネラ感染症の新しい診断基準を別途作成する予定である。本研究成果が本邦における感染症対策とそれによる国民の福祉に役立つことを期待している。

平成12年4月

主任研究者：齋藤 厚
琉球大学医学部内科学講座第一

厚生科学研究補助金新興・再興感染症研究事業

「レジオネラの新しい診断法の確立と その標準化に関する研究」

平成11年度 班の構成

主任研究者

斎藤 厚 琉球大学医学部内科学講座第一・教授

分担研究者

河野 茂 長崎大学医学部内科学講座第二・教授

嶋田 甚五郎 聖マリアンナ医科大学微生物学講座・教授

二木 芳人 川崎医科大学呼吸器内科学講座・講師

藪内 英子 愛知医科大学微生物学講座・客員教授

山口 恵三 東邦大学医学部微生物学講座・教授

渡辺 治雄 国立感染症研究所細菌部・部長

CONTENTS

総括研究報告書	1
琉球大学医学部内科学講座第一	斎藤 厚
分担研究報告書	
・レジオネラ感染症の新しい診断技術としての尿中可溶性抗原検出法の臨床的意義に 関する研究	5
琉球大学医学部内科学講座第一	斎藤 厚
琉球大学医学部内科学講座第一	新垣紀子、新里 敬、小出道夫 比嘉 太、健山正男
琉球大学医学部臨床検査医学	草野展周
・レジオネラ肺炎の診断学的・臨床的特徴に関する検討	10
ー過去7年間における87症例の解析ー	
東邦大学医学部微生物学講座	山口 恵三
東邦大学医学部微生物学講座	館田 一博、小林 隆夫、松本 哲哉 石井 良和、馬 リン、磯貝 建次
東邦大学大森病院検査部	村上日奈子
・臨床像からみたレジオネラ肺炎の鑑別診断	16
川崎医科大学呼吸器内科	二木 芳人
川崎医科大学呼吸器内科	松島 敏春、中島 正光 宮下 修行、吉田耕一郎
・レジオネラ感染マウスモデルを用いたPCRによる <i>Legionella pneumophila</i> 検出の基礎的検討	24
長崎大学医学部内科学講座第二	河野 茂
長崎大学臨床検査医学講座	青木志保、宮崎義継
・ <i>Legionella pneumophila</i> 血清群1のパルスフィールドゲル電気泳動および モノクローナル抗体による解析	28
国立感染症研究所 細菌部	渡辺 治雄
国立感染症研究所 細菌部	前川純子、倉 文明
デンカ生研	権平文夫、杉山純一

・ E test と寒天平板希釈法を用いた <i>Legionella</i> における薬剤感受性の検討	33
東邦大学医学部微生物学講座	山口 惠三
東邦大学医学部付属大森病院臨床検査部	村上日奈子
東邦大学医学部微生物学講座	松本 哲哉、小林 隆夫
	磯貝 健次、館田 一博
・ <i>Legionella pneumophila</i> の細胞内増殖性および各種抗菌薬の細胞内増殖抑制効果に関する検討	38
聖マリアンナ医科大学微生物学講座	嶋田甚五郎
聖マリアンナ医科大学微生物学講座	竹村 弘、山本啓之
・ 遺伝子・生理活性による <i>Legionella</i> 属細菌の検出法	45
聖マリアンナ医科大学微生物学講座	嶋田甚五郎
聖マリアンナ医科大学微生物学講座	山本啓之、竹村 弘
・ Signature tagged mutagenesis 法を用いた <i>Legionella pneumophila</i> の病原遺伝子の探索	53
琉球大学医学部内科学講座第一	斎藤 厚
琉球大学医学部内科学講座第一	比嘉 太
ペンシルベニア大学医学部	
病理・臨床検査医学講座、内科学講座	Paul H. Edelstein, Martha A.C. Edelstein
・ 24時間風呂での水中分娩後発症した新生児レジオネラ肺炎の一例	59
国立感染症研究所細菌部	渡辺治雄
名古屋第二赤十字病院小児科	永井琢人、側島久典、岩佐充二
名古屋第二赤十字病院病理	都築豊徳
国立感染症研究所細菌部	倉 文明、前川純子
・ 園芸用資材に無関係なレジオネラ肺炎患者から分離した <i>Legionella longbeachae</i>	63
豊橋市民病院 中央臨床検査室	山口育男
豊橋市民病院 中央臨床検査室	山下峻徳
愛知医科大学 微生物・免疫学教室	藪内英子

・膿瘍を形成した <i>Legionella</i> 肺炎の 2 例	67
中頭病院内科	宮良高維、渡嘉敷かおり、下地 勉、玉城和則
	栗国尚子、林 正樹、石原 淳、祝嶺千明
同 病 理	新垣京子
同 検 査 科	古謝幸恵
琉球大学医学部内科学講座第一	斎藤 厚
・温泉水の習慣的飲用が原因と考えられたレジオネラ肺炎による急性呼吸不全の 1 例	74
佐賀医科大学内科	青木洋介、富永正樹、林真一郎
同附属病院検査部	草場耕二
愛知医科大学微生物・免疫学	藪内英子
・尿中抗原測定により早期診断されたレジオネラ肺炎の 1 例	78
大垣市民病院診療検査科	石郷潮美、入山純司
同 呼 吸 器 科	進藤 丈、堀場通明
愛知医科大学微生物・免疫学講座	藪内英子
・尿中抗原が長期にわたり陽性であったレジオネラ症の一例	82
岐阜県厚生連中農病院内科	早川賢一、岡山幸弘、松野康成
	加川憲作、田中 孜
同検査科	末松寛之
愛知医科大学微生物・免疫	藪内英子
総合研究報告書	85
琉球大学医学部内科学講座第一	斎藤 厚

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

レジオネラ感染症の新しい診断技術の開発と その標準化に関する研究

主任研究者：

琉球大学医学部内科学講座第一

斎藤 厚

分担研究者：

愛知医科大学微生物・免疫学講座

聖マリアンナ医科大学微生物学講座

東邦大学医学部微生物学講座

国立感染症研究所細菌部

長崎大学医学部内科学講座第二

川崎医科大学呼吸器内科学講座

藪内英子

嶋田甚五郎

山口恵三

渡辺治雄

河野 茂

二木芳人

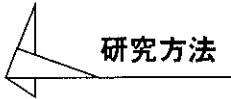
研究要旨

レジオネラ感染症の新しい診断技術の開発として、特に迅速診断法である尿中抗原検出法を検討し、その有用性を明らかとした。本邦におけるレジオネラ感染症の実態およびその臨床像をほぼ明らかにした。これらの解析結果より、本症の診断基準を策定する。感染源としての温泉、家庭用循環風呂の危険性が示され、その安全管理が重要であると思われる。腐葉土についても、本菌群による汚染状況、感染症例など今後も監視を続けていく必要性が示された。本症の治療および病態の理解について有益な情報が集積された。



研究目的

レジオネラ感染症は市中肺炎および院内肺炎の主要な起炎菌の一つであるが、時に重症化し、適切な診断治療の遅れにより致死的な肺炎となりうるものである。従って、本症の迅速診断の確立が急務であり、本研究課題ではレジオネラ感染症の新しい迅速診断技術の開発とその標準化を第一の目的とする。本邦におけるレジオネラ感染症の発生状況、臨床像の解析とその感染源の探索、および生活環境におけるレジオネラ汚染状況に関する全国規模の調査を行い、本邦の現状に即した本症診断基準の作成を行う。レジオネラ感染症の病態および治療についても基礎的および臨床的研究を推進する。



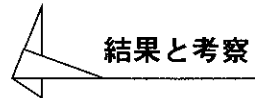
研究方法

- 主任研究者および分担研究者の研究施設において、
- (1)全国から依頼のあったレジオネラ感染症疑い症例を対象に臨床検体（呼吸器検体、血清、尿）を用いて本菌の分離培養、血清抗体価、尿中可溶性抗原検出法、核酸増幅法、薬剤感受性試験などの検査を行い、その感度および特異度、検査結果一致率、迅速性、簡便性の点から各々の検査の有用性を検討した。
 - (2)確定診断が得られた臨床症例を集積し、その臨床像と検査結果を併せて解析し、各種検査法の臨床診断的意義について解析した。また、本邦におけるレジオネラ肺炎の臨床像および画像所見（胸部単純X線、胸部CT）をまとめ、診断基準作成の基礎資料とした。
 - (3)生活環境中のレジオネラ汚染状況を把握する試みとして温泉水、家庭用循環風呂、腐葉土を対象にレジオネラによる汚染調査を行った。また、疫学調査の手法としてパルスフィールド電気泳動法や単クローン抗体を用いて臨床分離株および環境分離株を対象に菌株のタイピングを試みた。
 - (4)細胞内増殖菌であるレジオネラに対する各種抗菌薬の抗菌力を予測する方法として、マクロファー

ジ細胞株（THP1、J774）を用いて細胞内増殖を抑制する最小濃度を菌数カウントあるいはレジオネラの細胞障害性を指標に決定した。

(5)レジオネラ感染症の病態を明らかにするため、その病原因子を検討した。マクロファージに対するレジオネラのアポトーシス誘導能の検討、Signature tagged mutagenesisを用いた新しい病原遺伝子の探索を行った。

【倫理面への配慮】研究対象症例はレジオネラ感染症が疑われる症例であり、各種臨床検体の採取は疾病の診断上必要かつ適切な範囲内とするともに、対象者の同意を十分に得た上で本研究を遂行するものとした。対象者の人権およびプライバシーの侵害がないように、個人情報の管理は厳密に行い、研究成果の公表においても、十分に配慮した。動物の使用に当たっては、不要な苦痛を与えないよう、十分に配慮した。



結果と考察

- (1)レジオネラ肺炎に対する早期診断法としての尿中可溶性抗原検出法の検討：欧米にて認可されている尿中抗原検出キットを用いて、その有用性を検討した。従来の検査方法との比較において培養法、核酸増幅法、血清抗体価測定法の一致率は95.4%、97.6%、89.2%であり、尿中抗原検出法はレジオネラ症の診断に高い感度および特異性を有することが示された。3種類のキットを組み合わせることは *L. pneumophila* 血清群1以外よるレジオネラ感染症の診断において有用であった。尿中抗原検出法では本症発症初期より陽性結果が得られ、迅速性および簡便性にも優れたものであった。
- (2)レジオネラ肺炎の診断学的・臨床的特徴に関する検討：1992年10月から1999年9月までの7年間に確定診断のつけられたレジオネラ肺炎87名を対象にその診断学的および臨床的特徴について検討した。患者の平均年齢は58.7歳、男女比は69:18であった。80名が市中肺炎であり、28名では基礎疾患が認められなかった。診断は、培養で14名、血清抗体価測定で29名、尿中抗原検出で46名、PCR法で28名が陽性であった。推定起炎菌は *L. pneumophila* が61名

と多く、うち血清型1が31名を占めた。

胸部X線写真では35名が肺胞性陰影を示し、大部分は多発性であった。間質性陰影は5名のみであった。一つの検査のみ陽性となる症例も多く、感度・手技・キット間の差異の問題はあるが、その診断には複数の検査法を組み合わせる総合的に判断することが必要と考えられた。鑑別診断については、特に重症の細菌性肺炎との鑑別が重要であるが、臨床像のみでは鑑別は困難な場合が多かった。CT所見では、キルト様外観を呈する淡い浸潤性陰影と気管支透亮像の明瞭な均等性陰影が特徴的であった。

(3)本邦で分離された *L. pneumophila* 血清群1の臨床分離株28株と環境分離株37株、計65株を用いて、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法とモノクローナル抗体 (MoAb) による型別を行った。各菌株の染色体を SfiI で消化し、PFGE を行った。バンドパターンを解析し、系統樹を作製した。65株が、47タイプに分類された。冷却塔由来のものとは温泉由来のものがそれぞれ別のクラスターを形成し、遺伝的に距離があることが示された。また、*L. pneumophila* 血清群1に特異的で反応性の異なる5種類のMoAbにより抗原因子型を測定した。A、B、C、D、Eと仮称した抗原因子それぞれの有無で表わされる抗原因子型により全菌株は13種類に分けられた。臨床分離株と環境分離株はそれぞれ8種類に分けられた。臨床分離株と環境分離株の抗原因子型の分布には違いが見られた。特に、臨床分離株は79%が抗原因子Aを有するのに対し、環境分離株で抗原因子Aを有するものは5.4%であった。PFGEによる分類とMoAbによる型別との間には相関が見られ、両方の結果から、臨床分離株、冷却塔由来株、温泉由来株が、それぞれ異なる特徴をもっていることがわかった。わが国の腐葉土からのレジオネラの分離17検体のうち16検体からレジオネラを検出し、*L. longbeachae* 血清群1、*L. bozemanii* 血清群1などが分離された。園芸用培養土からのレジオネラ感染の危険性についてはさらに検討をおこなう必要がある。臨床症例の集積から温泉水、家庭用循環風呂に関連した発症例が確認され、これらが感染源として重要であることが示された。

(4)細胞内レジオネラに対する抗菌力：ヒト肺胞上皮細胞であるA549内で増殖する *L. pneumophila* に対する抗菌活性を測定し、細胞内増殖を抑制する

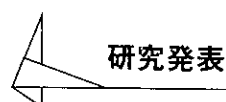
細胞外薬剤最小濃度MIECとして示した。MIECとBYE- α 液体培地を用いた微量液体希釈法によるMICを比較すると、マクロライド系薬、リファンピシン、ミノサイクリンはほぼ同等の値を示した。一方、臨床的にレジオネラ症に無効とされている β -ラクタム系薬のMIECは全て $>64\mu\text{g/ml}$ であった。また、ヒト単球株THP-1に用いた検討との比較から、レジオネラの細胞内増殖抑制効果は薬剤のみではなく感染細胞の種類によって相違があることが示された。

(5)レジオネラの病原因子に関する研究：新しく開発された手法 signature tagged mutagenesis 法を用いてレジオネラの病原遺伝子の検索を行った。13種類の病原遺伝子が同定され、そのうち8種類は新しく発見されたものであった。レジオネラが感染したマクロファージのアポトーシスを誘導する事を *L. longbeachae* 臨床株を用いて検討した。感染初期からマクロファージのアポトーシスがみられ、これらはカスパーゼの関与が示された。このようなアポトーシスは細胞内増殖能が欠損した変異株では誘導されなかった。

結 論

レジオネラ感染症の新しい診断技術の開発として、特に迅速診断法である尿中抗原検出法を検討し、その有用性を明らかとした。本邦におけるレジオネラ感染症の実態およびその臨床像をほぼ明らかにした。これらの解析結果より、本症の診断基準を別途策定する。

感染源としての温泉、家庭用循環風呂の危険性が示され、その安全管理が重要であると思われる。腐葉土についても、本菌群による汚染状況、感染症例など今後も監視を続けていく必要性が示された。本症の治療および病態の理解について有益な情報が集積された。



研究発表

1. Koide M, Saito A, Okazaki M, Umeda B, Benson RF: Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup I from potting soils in Japan. Clin Infect Dis 29(4):943-4, 1999
2. Higa F, Kusano N, Saito A, et al: Simplified quantitative assay system for measuring activities of drugs against intracellular *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 36(5):1392-1398, 1998
3. Edelstein, PH, Edelstein, MAC, Higa F, Falkow S: Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model. PNAS USA 96:8190-8195, 1999
4. Amemura-Maekawa J, Watanabe H: Cloning and sequencing of the dnaK and grpE genes of *Legionella pneumophila*. Gene 197:165-168, 1997
5. Amemura-Maekawa J, Mishima-Abe S, Kura F, Takahashi T, Watanabe H: Identification of a novel periplasmic catalase-peroxidase KatA of *Legionella pneumophila*. FEMS Microbiol Lett 176:339-344, 1999
6. 倉 文明: レジオネラ症の集団発生 オランダ、病原微生物検出情報 20;171, 1999
7. 倉 文明: レジオネラ肺炎、1998年 - ヨーロッパ諸国、病原微生物検出情報20;251, 1999
8. 倉 文明、渡辺治雄: レジオネラ症、感染症週報 2(2);10-11, 2000
9. 健山正男、斎藤 厚: レジオネラ肺炎、臨床医25;190-192, 1999
10. 健山正男、斎藤 厚: 感染症症候群レジオネラ症 日本臨牀別冊11-14, 1999
11. 小出道夫、斎藤 厚: 感染症とその治療レジオネラ症. 最新医学 54;618-628, 1999
12. Arakaki N, Higa F, Koide M, Tateyama M, Saito A, et al.: Concurrent infection with *Legionella pneumophila* and *Pneumocystis carinii* in a patient with adult T cell leukemia. 38;160-164, 1999
13. 小出道夫、斎藤 厚: レジオネラ肺炎. 医学のあゆみ別冊313-315, 1999

レジオネラ感染症の新しい診断技術としての尿中可溶性抗原検出法の臨床的意義に関する研究

主任研究者：

琉球大学医学部内科学講座第一

斎藤 厚

研究協力者：

琉球大学医学部内科学講座第一

新垣紀子、新里 敬、小出道夫

比嘉 太、健山正男

琉球大学医学部臨床検査医学

草野展周

Evaluation of kits for detection of soluble antigens of *Legionella* in urine for diagnosis of *Legionella* infections

Atsushi Saito¹⁾, Noriko Arakaki¹⁾, Takashi Shinzato¹⁾, Michio Koide¹⁾, Futoshi Higa¹⁾, Masao Tateyama¹⁾, Nobuchika Kusano²⁾.

¹⁾First Department of Internal Medicine, ²⁾ Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

研究要旨

1990年4月より1999年12月までの約9年間に、当教室に送付されたレジオネラ肺炎疑診例の尿検体(236症例、395検体)を対象として、3種類のキットを用いてレジオネラ尿中可溶性抗原検査を行い、その有用性について検討した。Binax EIAキットでの陽性症例は16例、Biotest EIAキットでは20症例が陽性であった。Binax EIAとNow *Legionella*キットの結果は全て一致した。分離培養法、間接蛍光抗体法、核酸増幅法との結果一致率は、各々93.4%、89.6%、95.6%と優れた結果であった。本検査法は発症早期より陽性となり、迅速性および簡便性にも優れており、臨床的に有用性の高い検査法であると結論される。

目的

1980年の第一症例報告以来、本邦におけるレジオネラ感染症の実態は徐々に明らかにされつつある。しかしながら、欧米においては本症が市中肺炎の2-16%を占めるとの報告がなされていることに対して、本邦では報告例が少ないのが現状である。その要因の一つとして、本症の確定診断法の普及の遅れが指摘されており、特に簡便な迅速診断法がなかったことが大きな課題であった。

尿中レジオネラ可溶性抗原検出法は当初 Radio Immuno assay 法によって開発されたが、改良により EIA (Enzyme Immuno Assay) 法にて十分な感度を得ることができるようになった。また、1996年の米国疾病予防管理センター (Centers for Diseases Control) から提唱された本症の診断基準では、本法もレジオネラ感染症の確定診断法の一つとすることが示されている (表1)。

表 1

Laboratory criteria for diagnosis of Legionellosis			
	WHO October 97	CDC September 96	The Ministry of Health and Welfare in Japan April 92
Isolation	●	●	●
Serum antibody			
IFA single			●
paired sera	●*	●*	●*
microagglutination	●*		○
Direct fluorescent antibody	○	●	○
Urinary antigen	○	●*	○
PCR			○

* *Legionella pneumophila* serogroup 1

● confirmative
○ presumptive

こうした背景のもとに、本研究では欧米で繁用されている3種類の尿中可溶性抗原検出キットを実際の臨床症例の検体を用いて検査を行い、その臨床的有用性を検討した。

材料と方法

対象症例

1990年4月から1999年12月までの期間(9年9ヶ月)に、当教室に検査依頼のあったレジオネラ肺炎疑診症例(236例)の尿検体(395検体)を対象とした。これらの検体については各患者の診断を目的として、患者あるいは家族の同意を得て採取されたものである。患者の情報交換についてはそのプライバシーの保護を十分に留意して行った。

尿中可溶性抗原キット

EIA法を用いたキット2種類およびImmuno-chromatographic membrane assay法を用いた1種類の検査を同時に行った(図1, 図2)。EIA法では

対象と方法: 1990年4月から1999年12月までの過去9年間に、当教室に検査依頼のあったレジオネラ肺炎疑診例の尿検体(236例、395検体)を対象とした。レジオネラ尿中可溶性抗原の検出には以下の3種類のキットを用いた。

Enzyme Immunoassay

* *Legionella* urinary antigen EIA (Binax Portland, Maine) for detection *Legionella pneumophila* serogroup 1.
* Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA (Biotest AG, Dreiech, Germany) for detection of antigens of all *Legionella pneumophila* serogroups with relatively wide spectrum of cross-reactivity as well as antigens of other *Legionella* spp.)

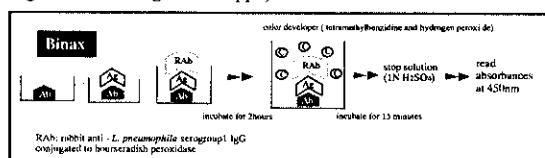


図 1

Immuno-chromatographic membrane assay

* Binax NOW *Legionella* Urinary Antigen Test for detection *Legionella pneumophila* serogroup 1.

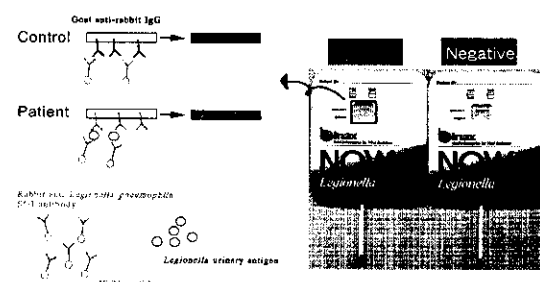


図 2

予め *Legionella pneumophila* SG1 のリポ多糖に対するポリクローナル抗体がコートされているマイクロプレートに陰性コントロール、陽性コントロール、検体を分注し、次に各 well に抗レジオネラ HRP 標識抗体を入れ、2 時間室温にて反応させた。洗浄液で 3 回以上の洗浄を行った後、各 well に発色基質を加え暗所にて 15 分間反応させ、最後に発色停止液を加え、450nm にて吸光度を測定した。結果は検体の平均吸光度と陰性コントロールの比を計算し、3 以上を陽性とし、判定までの所要時間は約 2 時間半であった。

Immunochromatographic membrane assay 法では濾紙上に抗ウサギ IgG 抗体 (コントロール) および抗レジオネラ抗体 (検査用) がバンド状に固定されている。濾紙の一端から、検体と可視粒子にて標識した抗レジオネラウサギ IgG の混和物を濾紙上に拡散させる。尿中にレジオネラ抗原が存在する場合には抗レジオネラ抗体を固定した部位にレジオネラ抗原を介して可視粒子を標識した抗体が凝集し、バンドとして確認される (図 2)。本キットはさらに簡便化されており、特殊な技術を必要とせずマニュアルをみながら、15 分で判定が可能である。

レジオネラ感染症の確定診断

本菌の分離培養、間接蛍光抗体法による血清抗体価測定、および核酸増幅法はこれまでに報告した方法を用いて行った。

結果

Binax 社製のキットで 16 症例、Biotest 社製のキットで 20 症例の陽性結果が得られた。両者いずれかの検査にて陽性となったものは 21 症例であった (表 2, 表 3)。特に Binax キットが陰性で Biotest キットが陽性となった症例が 5 例みとめられたが、これは両者のキットの抗原特異性を反映するものと思われる。すなわち、Binax キットが *L. pneumophila* SG1 のみを検出するのに対し、Biotest キットは *L. pneumophila* のほぼ全血清群を検出しようことによるものと考えられる。実際に、*L. pneumophila*

SG3 が分離培養された症例において Biotest 陽性であるが Binax キットでは陰性であった (表 3)。

培養結果と本検査法の比較では、結果一致率が 93.4% と極めて優れた成績であった (表 4)。抗体価による判定にて感度が 50% と低いものであったが、これは抗体価測定の対象が *L. pneumophila* 以外の菌種 (*L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*) を含むことによる (表 5)。核酸増幅法結果との比較においても優れた一致率をみた (表 6)。

レジオネラ肺炎症例において尿中抗原を経時的に測定した結果では、最長で 10 週間陽性結果が持続した。殆どの症例が初回検査時において陽性結果が得られていた。

表 2

Case	Positive cases for urinary antigen detection test			Culture	PCR	IFA
	Urinary Antigen Binax(EIA)	NOW	Biotest			
1 Y.T. 42 M	+	+	+	(<i>L. pneumophila</i> SG1)	+	+
2 M.M. 48 F	+	+	-	(<i>L. pneumophila</i> SG1)	+	+
3 U.T. 72 M	+	+	+	(<i>L. pneumophila</i> SG1)	+	-
4 Y.T. 81 M	-	-	+	(<i>L. pneumophila</i> SG3)	+	-
5 H.S. 65 M	+	+	+	-	+	-
6 I.M. 63 M	+	+	+	-	-	-
7 M.M. 77 F	-	-	+	-	-	-
8 M.K. 78 M	-	-	+	(no sample)	-	-
9 U.T. 69 M	+	+	+	(<i>L. pneumophila</i> SG1)	+	-
10 M.H. 47 M	+	+	+	-	+	-
11 O.Y. 51 M	+	+	+	(<i>L. pneumophila</i> SG1)	+	-
12 T.I. 69 M	-	-	+	(no sample)	-	-
13 T.T. 54 M	-	-	+	(no sample)	-	-
14 A.T. 68 M	+	+	+	-	-	-
15 W.T. 52 M	+	+	+	-	-	+
16 S.S. 50 F	+	+	+	-	-	+
17 T.H. 51 M	+	+	+	-	+	-
18 O.H. 30 F	+	+	+	(<i>L. pneumophila</i> SG1)	+	+
19 M.Y. 69 M	+	+	+	(no sample)	+	+
20 K.R. 40 M	+	+	+	(<i>L. pneumophila</i> SG1)	+	-
21 K.K. 66 M	+	+	+	-	-	-

表 3

Binax	Comparison between Biotest and Binax EIA kit	
	positive	negative
positive	15 cases	1 case
negative	5 cases	215 cases

表 4

urinary antigen	Comparison between culture and urinary antigen		total
	positive	negative	
positive	8	9	17
negative	0	119	119
total	8	128	136

Sensitivity : 100% (8/8)
Specificity : 93% (119/128)
Overall agreement to culture : 93.4% (127/136)

表 5

Comparison between IFA and urinary antigen

urinary antigen	IFA		total
	positive	negative	
positive	6	12	18
negative	6	149	155
total	12	161	173

Sensitivity : 50.0% (6/12)
 Specificity : 92.5% (149/161)
 Overall agreement to IFA : 89.6% (155/173)

表 6

Comparison between PCR and urinary antigen

urinary antigen	PCR		total
	positive	negative	
positive	11	6	17
negative	0	118	118
total	11	124	135

Sensitivity : 100% (11/11)
 Specificity : 95.2% (118/124)
 Overall agreement to PCR : 95.6% (129/135)

standardである培養法との一致率が高いことは特記すべきであり、本研究成績より尿中抗原検出法も本感染症の確定診断法の一つとして妥当であると考えられる。

注意を要する点としては、尿中抗原の陽性化する時期およびその期間である。これまでの欧米の成績および本研究成績より、尿中抗原は発症3日以内に速やかに陽性となる。本研究でも殆どの症例が最初の抗原検査にて陽性結果が得られている。しかしながら、一例に最初の検査にて陰性であったが、後日尿中抗原が陽性化した例が認められたことより、レジオネラ感染症の疑いが強い症例では検査を繰り返す必要性もあるものと考ええる。一方で、治療開始から約42日間にわたり陽性を示した症例や、最長326日間陽性となった症例などが報告されている。本研究においても、発症後10週間以上も抗原陽性が持続した症例が確認されているので、尿中抗原検査陽性の場合には長期間さかのぼって病歴を聴取し、肺炎の既往などを確認する必要がある。

また、本法では *L. pneumophila* のみが検出される。本研究の基礎検討においても *L. micdadei*, *L. dumofii*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* では陰性結果であった。現時点ではレジオネラ他菌種の診断には用いることができない点も留意すべきと思われる。

考 察


レジオネラ尿中可溶性抗原の検出は Tilton ら、および Berdel らによって検討されたのが最初であり、その後に多くの追試がなされている。米国では Binax 社により EIA 法を用いたキットが製品化され、FDA の認可の下に一般の検査施設においても施行可能となっている。1996年の CDC によるレジオネラ症診断基準の改訂では尿中抗原検出法も確定診断の一つとして用いることができるようになった。こうした欧米の現状を背景にして我が国における診断基準の改定の基礎検討として本研究を実施した。

従来の検査法である培養法、血清抗体価測定法、核酸増幅法などとの比較では、尿中抗原検出法は優れた一致率を示した。特に、本症の診断の golden

結 論

従来から用いられているレジオネラ感染症の診断法、特に菌の分離培養法と高い一致率を示したことより、尿中抗原検出法は本症の診断法の一つとして極めて有用であることが明らかにされた。本法は比較的多くの施設で対応可能な EIA 法を用いていること、あるいは Now *Legionella* キットでは非常に簡便な手法によって検査結果が得られることなども臨床的な点で大きな利点であると思われる。


本研究での検査成績と欧米での本法の評価を考慮すると、本邦における診断基準に確定診断法の一つとして尿中抗原検出法を加えることは、十分に妥当性を有するものと考えられる。



参考文献

1. Tilton RC: Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunoassay. *Ann Int Med* 90: 697-698, 1979
2. Berdal BP, Farcy CE, Feeley JC: Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. *J Clin Microbiol* 9: 575-578, 1979
3. Kohler RB, Winn WC, Wheat LJ: Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. *J Infect Dis* 20:605-607, 1984

4. Edelstein MAC, Edelstein PH: Retrospective evaluation of the Du Pont Radioimmunoassay kit for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J Clin Microbiol* 26: 1775-1778, 1988



発表論文

新垣紀子、比嘉 太、小出道夫、斎藤 厚、ほか:
レジオネラ肺炎に対する早期診断法としての尿中抗原検出法の意義. *感染症学雑誌* 73:421-428, 1999

レジオネラ肺炎の診断学的・臨床的特徴に関する検討 — 過去 7 年間における 87 症例の解析 —

分担研究者：

東邦大学医学部微生物学講座

山口 惠三

研究協力者：

東邦大学医学部微生物学講座

館田 一博、小林 隆夫、松本 哲哉
石井 良和、馬 リン、磯貝 建次

東邦大学大森病院検査部

村上日奈子

Clinical and Diagnostic Characteristics in *Legionella* Pneumonia: Analysis of 87 Cases during 7 Years Period

Keizo Yamaguchi¹⁾, Kazuhiro Tateda¹⁾, Takao Kobayashi¹⁾, Tetsuya Matsumoto¹⁾,
Yoshikazu Ishii¹⁾, Lin Ma¹⁾, Kenzi Isogai¹⁾, and Hinako Murakami²⁾

¹⁾ Department of Microbiology and ²⁾ Microbiology section,
Clinical Laboratory Department, Toho University School of Medicine

研究要旨

1992年10月から1999年9月までの7年間に確定診断のつけられたレジオネラ肺炎87名を対象にその診断学的および臨床的特徴について検討した。患者の平均年齢は58.7歳、男女比は69:18であった。80名が市中肺炎であり、28名では基礎疾患が認められなかった。診断は、培養で14名、血清抗体価測定で29名、尿中抗原検出で46名、PCR法で28名が陽性であった。推定起炎菌は *Legionella pneumophila* が61名と多く、うち血清型1が31名を占めた。胸部X線写真では35名が肺胞性陰影を示し、大部分は多発性であった。間質性陰影は5名のみであった。13名が死亡し、うち7例ではマクロライド剤が投与されていなかった。一つの検査のみ陽性となる症例も多く、感度・手技・キット間の差異の問題はあるが、その診断には複数の検査法を組み合わせることで総合的に判断することが必要と考えられた。

目的：

わが国でもレジオネラ肺炎への認識が高まりつつあるが、その診断は容易ではない。治療が遅れば死亡することも稀ではなく、レジオネラ肺炎の検査体制の整備が求められる。これまでに、微量凝集法による血清抗体価測定、ELISAによる尿中抗原検出、PCR法による特異的遺伝子検出という診断法が開発され、その有用性が報告されている。私たちは、過去7年間にレジオネラ肺炎の疑いにて各施設から送付された409名の検体から87例のレジオネラ肺炎を診断し得た。この症例の臨床的特徴を解析すると共に、本症の診断における各種診断法の有用性についても検討したので報告する。

材料と方法：

1. 患者

1992年10月から1999年9月までの7年間にレジオネラ肺炎の疑いにて各施設から東邦大学医学部微生物学教室へ送付された409名の検体について細菌学的検討を行った。当大学で行われた培養法、血清抗体価測定、尿中抗原検出、PCR法のいずれかで陽性となった87名をレジオネラ肺炎と診断し解析した。このうち12名は東邦大学医学部での症例、他の75名は表1に示した施設から依頼のあった症例であった。レジオネラ肺炎と診断された場合、診断確定後に担当医師に症例調査表を送付し記入を依頼した。

表1 検体及び患者情報提供施設

多野総合病院、	湘南鎌倉総合病院、	東京医科大学第五内科、
都立駒込病院、	みさと健和病院、	虎ノ門病院呼吸器内科、
三宿病院、	茅ヶ崎徳洲会病院、	自治医科大学呼吸器内科、
都立墨東病院、	相模原協同病院、	社会保険中央総合病院、
都立府中病院、	石川県立中央病院、	横浜市立大学浦舟病院、
関東通信病院、	健和会柳原病院、	帝京大学感染化療研究室、
佐久総合病院、	川崎製鉄千葉病院、	東京都老人医療センター、
九段坂病院、	焼津市立総合病院、	牛久愛和総合病院、
都立大久保病院、	北里大学呼吸器内科、	国立療養所晴嵐荘病院、
岩見沢市立病院、	川口工業総合病院、	石川県済生会金沢病院、
豊川市民病院、	中島病院	

2. 培養検査

喀痰および気管洗浄液・吸引液を対象に培養検査を実施した。検体を常法に従い熱処理および酸処理したのち、無処理検体とともに血液寒天培地（ニッスイ）、チョコレート寒天培地（BBL）、BCYE- α 寒天培地（栄研化学）、WYO- α 寒天培地（栄研化学）に接種した。培養3日目以降に出現したコロニーで、特徴的な形態、臭いを示すものを釣菌し、再び血液寒天培地、BCYE- α 寒天培地に接種しその発育性を確認した。この時点で *Legionella* 属細菌が疑われた場合には診断用抗血清（レジオネラ免疫血清「生研」：デンカ生研）にて凝集を確認するとともに、生化学的性状について検討した。それでも同定不能であった場合にDNA-DNA hybridizationキット（極東製薬）を用いた。

3. 血清抗体価の測定

血清抗体価の測定はデンカ生研で開発中の「*Legionella* 症血清抗体価測定（定量凝集法）」を用いて行った。すなわち、96穴マイクロプレート上にて患者血清を8倍から512倍まで希釈したのち、熱処理死菌菌液25 μ lを添加、室温で一晩静置したのち凝集を判定した。血清抗体価の測定は、*Legionella pneumophila* serogroup 1—6、*L. bozemanii*、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. micdadei*を対象に行った。なお今回の集計においては抗原液添加前の血清希釈系列をもとに、単一血清で256倍以上、またはペア血清で4倍以上の上昇をもって128倍以上の抗体価を示したものを陽性と判定した¹⁾。

4. 尿中抗原の測定

尿中抗原の検出は、Binax社のBinax *Legionella* urinary antigen EIA[®] キットおよびBiotest社のBiotest *Legionella* Urin Antigen EIA[®] キットを用いて行った。前者は *L. pneumophila* 血清型1の抗原を検出²⁾し、後者は *Legionella* 属抗原を広く検出できることが報告されている³⁾。さらに1998年からは、*L. pneumophila* 血清型1抗原の迅速検出キットであるBinax社のBinax NOW *Legionella* [®]urinary antigen test⁴⁾も用いた。

5. PCR法による *Legionella* 遺伝子の検出

喀痰および気管支洗浄液・吸引液からの *L. pneu-*

mophila 特異遺伝子 *mip* の検出を Engleberg らの報告⁵⁾ に従い行った。

6. 尿中抗原検出の基礎的検討

L. pneumophila 血清型 1-6, 9 (ATCC標準株) 及び *L. pneumophila* 血清型 7, 8, 10-15 (岐阜大学微生物学教室・江崎孝行教授より分与された保存株) を BCYE- α 寒天培地にて 35℃ で 72 時間培養し、コロニーを生理食塩水に溶解させて菌液を作り、加熱処理した死菌液を 10^8 - 10^7 CFU/ml に調製し、3種の尿中抗原検出キットで抗原の検出を試みた。

結果:

1. 性別、年齢分布および起炎菌の内訳

図1にレジオネラ肺炎と診断された87名の年齢分布を示した。平均年齢は58.7歳で40歳台～60歳台にピークがみられ、男女比は69:18であった。80例が市中肺炎として発症し、基礎疾患としては高血圧(7例)、糖尿病(8例)などがみられたが28名では認められなかった。図2にこれら87症例における起

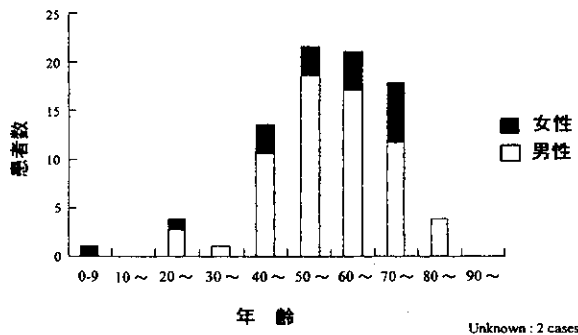


図1 年齢及び性別分布

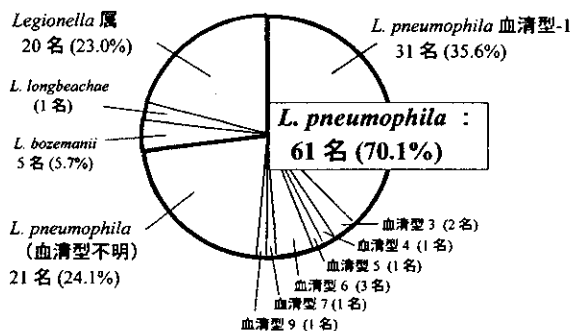


図2 起炎菌の内訳

炎菌の内訳を示した。*L. pneumophila* が61例と多く、うち血清型1が31症例と最多であった。

2. 検討症例数の月別推移および各種検査法における陽性分布

図3に調査期間中における検査依頼数およびレジオネラ肺炎患者数の分布を、図4に各種検査法における陽性数を示した。尿中抗原陽性例が46名と最も多く、血清抗体陽性例が29名、PCR法陽性例は28名、培養陽性例は14名であった。

図5に3つの尿中抗原検出キットにおける陽性数の分布を示した。54名がいずれかのキットで尿中

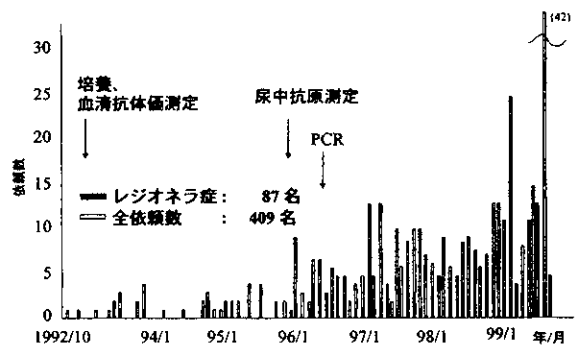


図3 総依頼数およびレジオネラ肺炎患者数

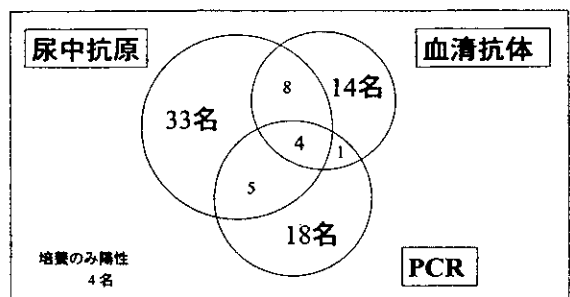


図4 各種検査法における陽性頻度の比較

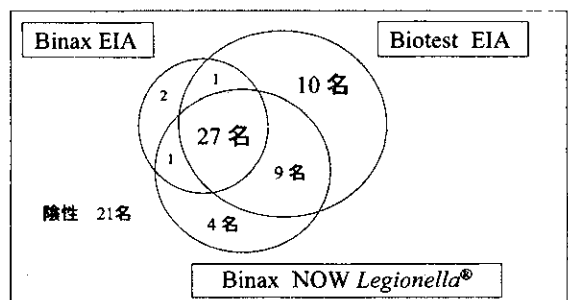


図5 尿中抗原検出キット3種の陽性頻度の比較

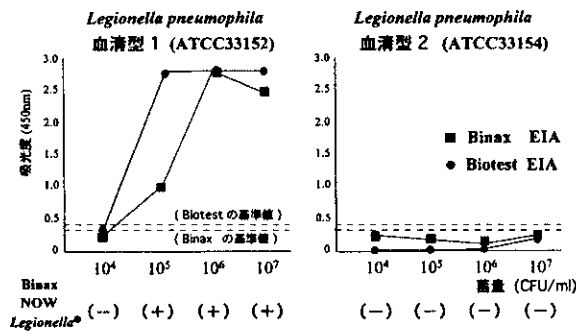


図6 *L. pneumophila* 血清型1と *L. pneumophila* 血清型2における尿中抗原検出キット3種の検出力の比較

抗原が陽性となり、うち27名はこれら3つのキットですべて陽性を示したが、一種類のキットのみ陽性となった症例も存在した。また、図6に示すように、濃度を段階的に設定してレジオネラの菌液を調製したところ、3つのキットとも *L. pneumophila* 血清型1では 10^5 CFU/ml で陽性となったが、*L. pneumophila* 血清型2では 10^7 CFU/ml でも陰性であった。また、*L. pneumophila* 血清型3-15ではいずれのキットも 10^7 CFU/ml で陰性であった（データは示さず）。

3. 胸部X線写真、血液ガス所見

胸部X線写真に関する情報が得られた58名では、41名が多発性陰影、35名が肺胞性陰影を示しており、22名で胸水の貯留が確認された。入院時、17名は PaO_2 が50mmHg未満の著明な低酸素血症を示しており、27名で人工呼吸器管理、25名でステロイドパルス療法が施行されていた。

4. 臨床検査値における特徴

末梢白血球数では約半数の症例で $10,000/\text{mm}^3$ 以上の高値が認められており、その分画はほとんどで好中球が80%以上を占めていた。CRPは $20\text{mg}/\text{dl}$ 以上の高値を示すことが多く、その他の生化学的検査ではGOT、LDH、CPKの高値を示す症例が多く見られた。

5. 使用抗菌薬および予後

入院直後に投与された抗菌薬で最も多かったものは、マクロライド剤とリファンピシンとβラクタム

剤の併用であり、ほとんどの症例で入院経過中にマクロライド剤が投与されていた。死亡例は13名で、うち7名ではマクロライド剤が投与されていなかった。

考察：

1981年に斎藤らにより *L. pneumophila* 肺炎の第1例が報告⁶⁾されて以来、レジオネラ肺炎の報告は全国でみられ、厚生省レジオネラ症研究班は1990年までの10年間に培養陽性により診断されたレジオネラ肺炎患者が28名と報告している⁷⁾。しかし、欧米では市中肺炎の約10%がレジオネラ肺炎であるとされており、米国では1980-1989年の10年間に900名以上のレジオネラ肺炎が発生したと報告されている⁸⁾。これらと比較すれば本邦におけるレジオネラ肺炎の発症頻度は低いが、私達の検討では、臨床的にレジオネラ肺炎が疑われた409症例中87例（21.3%）がレジオネラ肺炎であり、その頻度は過去の報告⁹⁾¹⁰⁾とほぼ同等であった。これらはレジオネラを初めから疑った症例に関するデータではあるが、日本を含む世界での市中肺炎の起炎菌の判明率は40-70%といわれており、従来原因不明とされた肺炎患者の中にレジオネラ肺炎が含まれているという可能性を支持するものである。

レジオネラ肺炎の臨床的および検査データに関しては多くの報告がある¹¹⁾¹²⁾。今回の87症例の解析から得られた臨床検査成績や胸部X線写真における特徴は基本的にこれまでの報告と同様、胸部X線写真における多発性肺胞性陰影と著明な低酸素血症である。また、今回の検討では、その陰影では間質性変化の頻度は低かったにもかかわらず、多くの症例においてA-aDO₂の異常をともなう低酸素血症が観察された。レジオネラ肺炎と間質性肺病変については報告¹²⁾¹³⁾があり、私達もレジオネラ肺炎患者の剖検肺で広範な肺胞隔壁の破壊・線維化を観察している。これらの事実は、レジオネラ肺炎においては潜在的に広範な間質性変化が存在している可能性を支持するものである。今後、レジオネラ肺炎にみられる多発性病変、A-aDO₂異常を伴う低酸素血症などの臨床的特徴と潜在的間質性病変の関連について検討を