

行う必要があると考えられた。

各検査法については、尿中抗原測定やPCR法では培養や血清抗体価測定より陽性例が多く見られたが、陽性率は最高でも約20%であり、単独では見逃しが避けられないが、一つの検査のみ陽性となる場合も多く、いずれの検査法も存在価値があると考えられた。血清抗体価測定はマイクロプレートによる微量凝集法を用いたが、広く用いられている間接蛍光抗体法（IFA）と比較して感度は低下するが特異度はIFAと同等に高くIFAより手技が容易でかつ結果を客観的に観察できると報告され¹⁴⁾、有用と考えられた。PCR法については、*L. pneumophila*のみを検出するプライマー⁵⁾を用いたが陽性率は高く、検査手技は複雑で偽陽性（コンタミネーション）・偽陰性（検体中の多糖などの反応阻害物質）という結果の解釈の問題はあるが、陽性率の高さは注目すべきである。

尿は気道検体より採取が容易で品質のばらつきも少ない。尿中抗原検査について、3つのキットを比較したところ、Biotest EIAで最も陽性者が多く、*Legionella* 属の尿中抗原を広く検出できるとされるBiotest EIAの高い有用性を示すヨーロッパでの報告¹⁵⁾に一致した。しかし、我々は、培養陽性であった*L. pneumophila* 血清型3および5の症例でBiotest EIAによる尿中抗原検出が陰性となった事実を確認している。今回の検討では、*L. pneumophila* 血清型1ではいずれのキットも 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。家兎の実験感染ではレジオネラの尿中への抗原の排出量は 10^6 CFU/mlと報告¹⁶⁾されており、レジオネラ肺炎の多くを占める¹⁶⁾とされる*L. pneumophila* 血清型1には有用でもその他のレジオネラの診断には必ずしも充分ではないことが予想された。以上の点に留意すれば、Binax社とBiotest社のキットでは約3時間で結果が判明するため迅速診断として有用と考えられた。迅速診断キットは15分で結果が判明し操作も容易で⁸⁾、検査室以外でのレジオネラの診断に道を開くものと考えられた。

以上、レジオネラ肺炎87名の診断学および臨床的特徴および各検査法の有用性について報告した。 β ラクタム系抗菌薬が無効で急速に進行し、多発性肺胞性陰影、肺拡散障害をとまなう著明な低酸素血

症、特徴的な臨床検査値異常（肝機能障害、CPK高値など）を呈する肺炎を見た場合には、レジオネラ肺炎を鑑別診断の1つに加え、培養法の他に血清抗体価測定、尿中抗原検出法、PCR法を組み合わせる必要があると考えられた。近年レジオネラの研究が進み、わが国でもレジオネラ肺炎は市中肺炎の起炎菌の一つであると考えられ、1999年からレジオネラ肺炎は感染症新法による第4類感染症（全数届出）に指定された。現時点では、保険適用は培養検査のみであるが、今後は他の検査法に対する経済的裏付けが検査体制の充実のためにも必要と考えられる。

文献：

1. 厚生省レジオネラ肺炎診断基準と診断・検査及び治療指針. 厚生省レジオネラ症研究班. 1992
2. Sathapatayavongs B, Kohler RB, Wheat LJ, and White A. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease by urinary antigen detection; comparison of ELISA and radioimmunoassay. *Am J Med* 72 : 576-582 ; 1982
3. Tang, PW and S. Toma. Broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Legionella* soluble antigens. *J Clin Microbiol* 24 : 556-558 ; 1986
4. Helbig, J. H., S. Ulduim, P. C. Lueck, and T.G. Harrison. Comparison of the Binax NOW urinary antigen test with two other commercial tests and three in-house ELISA's. Proceedings of the 14th meeting of European Working Group of *Legionella* Infections, Abstract No.39, Dresden, 1999
5. Engleberg NC, Carter C, Weber DR et al. DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* 57 : 1263-1270, 1989.
6. 斎藤 厚、下田照文、長沢正夫 他：本邦ではじめての Legionnaire's disease (レジオネラ症) の症例と検出菌の細菌学的性状. *感染症誌* 55 : 124-128, 1981

7. 荒川迪生、中浜 力、田口善夫 他：培養陽性本邦レジオネラ肺炎症例について、1980年から1990年まで。感染症誌 66 : 1513-1523, 1992
8. Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. Arch Intern Med 154 : 2417-2422, 1994
9. 山城祐子、比嘉 太、小出道夫 他：レジオネラ肺炎の血清診断。-当科における最近3年間の検査成績- 感染症誌 68 : 1256-1263, 1994
10. 田代隆良、藤田紀代、重野芳輝 他：Nosocomial pneumoniaとしてみられたレジオネラ症41例の病理学的検討。日胸疾会誌 23 : 456-462, 1985
11. Edelstein PH, Meyer RD. *Legionella* pneumonia. Respiratory infections; Diagnosis and management. 3d edition. Pennington J.E. Raven Press, Ltd. New York. 1994
12. 田口善夫、中浜 力、稲松孝思 他：培養陽性本邦レジオネラ肺炎の胸部X線像の検討、1980年から1990年まで。感染症誌 66 : 1580-1586, 1992.
13. Hurter T, Rumpelt HJ, Ferlinz R. Fibrosing alveolitis responsive to corticosteroids following Legionnaires' disease pneumonia. Chest 101 : 281-283, 1992
14. 小出道夫、斎藤 厚、山城祐子、草野展周：微量定量凝集法における *Legionella* 感染症の診断 — 間接蛍光抗体法との比較 — 感染症誌 70, 1254-1257, 1996
15. Harrison, T. S., S. Uldeum, S. Alexiou-Daniel, et al. A multicenter evaluation of the Biotest *legionella* urinary antigen EIA. Clin Microbiol and Inf 4. 359-365, 1998
16. 中里博子：ELISA法による尿中 *Legionella* 抗原の検出 — その基礎的検討 — 感染症誌 62, 921-930, 1988

臨床像からみたレジオネラ肺炎の鑑別診断

分担研究者：

川崎医科大学呼吸器内科

二木 芳人

研究協力者：

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

Differential Diagnosis of *Legionella pneumonia* by Clinical Features

Yoshihito Niki, Toshiharu Matsushima, Masamitsu Nakajima, Naoyuki Miyashita, and Kohichiro Yoshida

Division of Respiratory Diseases, Department of Medicine, Kawasaki Medical School

研究要旨

1997年から1999年の3年間に我が国で報告されたレジオネラ肺炎症例で、臨床症状や検査成績の経過が追える53例を対象とし、本症の臨床的特徴を確認した。各種患者背景因子や臨床症状、検査成績などは従来から示されているものと大差はなく、その確認作業にとどまることも多かったが、温泉入浴との高い関連性や冬期・春期に多いその季節性などは、我が国に特有のものと考えられた。また、中枢神経系症状の合併が多いことも確認できたが、比較的若年の男性への集中は興味深かった。過去の内外の報告に、今回の成績を加味して市中肺炎、院内肺炎の各々における本症の鑑別診断表を作成した。市中肺炎については臨床症状や経過、検査成績から比較的明確に他の病原菌による肺炎との区別も可能であろう。

はじめに

近年レジオネラ感染症の診断技術の進歩は著しく、各種抗体測定法やPCR法に加えて、簡便で迅速性や特異性も高い尿中抗原測定法などが我が国でも普及しつつある。これに伴ってレジオネラ感染症が確定診断される頻度も徐々に高まりつつあるとも考えられるが、これらの病原診断法が正しく実施されるためには、まず臨床医が本症を疑うことが必要とされる。そのためにはレジオネラ感染症の臨床的特徴を十分に理解し、患者状態とも照らし合わせて他の病原体との鑑別診断を確実にすすめることが求められる。

今回の研究では、まず過去の症例報告から我が国で発症したレジオネラ肺炎の臨床像の特徴を再評価し、それと過去の研究成績を基にして、市中肺炎および院内肺炎の各々におけるレジオネラ肺炎の他の肺炎との鑑別のポイントを明らかにすることを目的とした。

研究方法

1) 症例報告のレビュー

1997から1999年の3年間に我が国で報告されたレジオネラ肺炎に関する文献の中で、個々の症例の詳細な臨床像が明らかにされているもの53例を調査対象とした^{1)~30)}。調査項目としては、年齢、性別、背景因子、基礎疾患、合併症、診断法と起炎菌、検査成績、胸部X線所見、治療内容、予後などであり、すべてが満足されない場合も項目別には採用し評価した。

2) 鑑別診断表の作成

市中肺炎でレジオネラ肺炎と鑑別すべき疾患としては、肺炎球菌を代表とする一般細菌性肺炎、非定型肺炎としてマイコプラズマ、肺炎クラミジア、オウム病クラミジアの各々による肺炎を取り上げ、主に臨床症状や一般検査成績などからの本症の鑑別のポイントおよび確定診断法などを表に示した。

院内肺炎も同様に、一般細菌性肺炎に加えて、サ

イトメガロウイルス (CMV)、ニューモシステイス・カリニー (PC)、および真菌ではアスペルギルスによる肺炎などが鑑別の対象となるが、市中肺炎ほど各々の臨床的特徴が明確にはならないので、それぞれの臨床像や検査成績および確定診断のポイントを示すにとどめた。

成績

1) 症例報告のレビュー

表1には今回対象とした53例の内訳を示した。年齢は26~91歳と幅広く分布し、平均は59.0歳であ

表1 対象53症例の内訳

対象；本レジオネラ症研究班 平成9, 10年度報告症例	14例
文献的に1997~1999年で検索し得た報告症例	31例
当科ならびに関連施設での最近4年間の経験症例	8例
(院内肺炎 3例, 市中肺炎 50例)	
年齢；26~91才 平均59.0才	
性別；男性 45症例, 女性 8症例	
(8.5 : 1.5)	

た。性別は男性45症例、女性8症例である。市中肺炎として報告されたものが50例で、院内肺炎の報告例はわずかであった。年齢分布、喫煙、飲酒歴の有無、および特別の職歴については表2にまとめて示

表2 症例の背景因子

年齢分布	~39才	男性 3例	女性 1例	計 4例	7.5%
40~49	9	9	3	12	22.6
50~59	8	2	10	18.9	
60~69	12	12	12	22.6	
70~79	9	2	11	20.8	
80~	1	4	4	7.5	
喫煙	喫煙者 23例, 非喫煙者 7例				
飲酒	大飲者 9例, 飲酒習慣 8例, なし 1例				
職業	土木建築関係 3例, 造園業 2例				
	空調設備会社 1例, 配管工 1例				

した。年齢は各年代に比較的偏りなく分布している。嗜好については記載のないものが多かったが、飲酒より喫煙者が多い点が目立った。表3にはリスク・ファクターと考えられている年齢、旅行歴、基礎疾患などの要素をまとめて比率で示したが、診断前、診断時に明らかな感染発症に影響すると思われる基礎疾患を有していたものは41.5%にとどまった。市

表3 症例のリスク・ファクター

年齢	60才以上の高齢者	27例	50.9%
性別	男性	45例	84.9%
旅行歴	有	18例	34.0%
	(内 温泉関係)	14例	26.4%
入浴関連	有	4例	7.5%
基礎疾患*	有	22例	41.5%

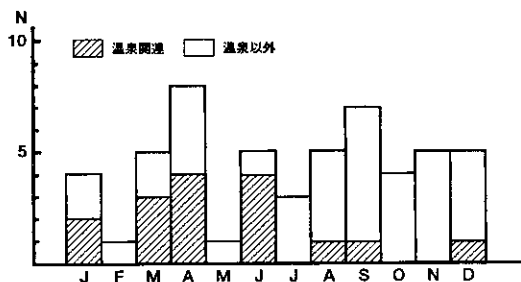
* 感染症に関係するもののみ。高血圧等は除く、腎移植、サリン暴露、歯科治療各1含む

中肺炎例が大半を占めていたためであろう。また、温泉に関連する旅行歴を有する例が14例と多かった。これに表2で述べた嗜好、職業歴を加えた7項目の内、いくつかのリスク・ファクターを各々の患者が有していたかを表4に示した。3項目が該当するもの

表4 症例のリスク・ファクター

リスク・ファクターの数	6項目	1例*	内死亡** 1例
	5	8	2
	4	7	1
	3	23	4
	2	6	
	1	8	
計	53例		8例 (15.1)

* 男性、高齢者、温泉、喫煙、飲酒、基礎疾患
** 5項目以上の死亡率 33.3%
4項目以上の死亡率 25.0%
3項目以上の死亡率 20.5%



温泉入浴（もしくは旅行初日）から発症までの日数2～21日 平均6.9日

図1 発症の時期

が23例と最も多く、5項目以上は9例、1項目のみも8例あった。後述する予後とはある程度の相関が認められる。図1には、各々の症例の発症時期を月別に分けて示した。温泉と関係する発症例が1、3、4、6月に集中してみられ、欧米とは異なる季節性が示されている。

これらの症例から起炎菌と同一もしくは推定されたレジオネラ属菌の種類を表5に示した。複数菌感染とされたものも3症例あったが、全体としてやは

り *L. pneumophila* が最も多かった。診断の方法は血清抗体価や尿中抗原の測定によるものが多いが、その詳細は不明な例も少なからずあった。

表5 起炎レジオネラ属菌

起炎菌	症例数	診断法			
		抗原・抗体	培養	PCR	
<i>L. pneumophila</i>	SG1	28*	22	3	3
	SG3	1	1		
	SG4	2*	2		
	SG5	1		1	
	SG6	3	3		
	<i>L. micdadei</i>	4	4		
<i>L. dumoffi</i>	4*	4			
<i>L. bozemanii</i>	3*	3			
<i>L. longbeachae</i>	1		1		
Legionella 属	9	6	2	1	

* 重複感染による重複あり

表6にはこれらの肺炎陰影の特徴についてまとめしたが、初診の時点ですでに多発性あるいは多区域に

表6 胸部X線像

単発性/多発性	22/30
単発性の場合の領域	右上 2 (9.1)
	中 2 (9.1)
	下 12 (54.5)
	左上 0
	中 2 (9.1)
	下 4 (18.2)
胸水 有	16 (30.2)
空洞形成	1
胸部所見初期不明	1

わたる広範な陰影を呈しているものが53例中30例であった。単発の場合の分布をみると、右下肺野に初発するものが多い傾向があるようである。胸水の記述があるか、あるいはX線写真から確認し得た例は16例、30.2%であった。表7には臨床症状について

表7 臨床症状の種類と頻度

発熱	有	50 (94.3)
		40℃ < 10 (27.0)
		39℃ < 12 (27.9)
		38℃ < 19 (44.2)
	無	3
胸痛等	有	6 (11.3)
咳嗽	有	31 (58.5)
喀痰	有	14 (26.4) (オレンジ, 赤色痰 5)
消化器症状	有	11 (20.8) (下痢 9)
神経症状	有	17 (32.1)
皮膚症状	有	5 (9.4)

示したが、発熱は50例、94.3%でみられ、半数以上は39℃以上の高熱であった。なお、比較的徐脈は本症の特徴の一つとされるが、今回の検討で、体温と

脈拍を同時期に測定し記載されていたものが23例あり、その内14例、61%が比較的徐脈と判定された。

喀痰の記述があったものは14例、25.4%にとどまったが、オレンジゼリー様、赤色痰などが特徴的とするものが内5例にみられた。合併症としての下痢を主とする消化器症状、様々な神経症状も比較的多く、表8には神経症状の種類と年齢、性別を示したが、

表8 神経症状

1. 失見当識, 幻覚, 妄想, 不穏	42才♂
2. 記憶障害, 計算力障害, 構音障害, 失調性歩行	38才♂
3. 逆行性健忘, 注意力低下	47才♂
4. 失見当識, 言動の異常	47才♂
5. 失見当識, 錯乱	31才♀
6. 失禁, 失神, 頭重感	57才♂
7. めまい, 頭重感	58才♂
8. 失見当識, 意識レベル低下	61才♂
9. 幻覚, 失見当識	36才♂
10. 精神症状	40才♂
11. 意識レベル低下	47才♂
12. 意識レベル低下	64才♂
13. 意識レベル低下, めまい	46才♂
14. 意識レベル低下, 筋肉痛, 脱力	72才♂
15. 四肢脱力	69才♂
16. 四肢脱力	55才♂
17. 筋力低下	72才♂

40~50歳の比較的若年の男性に集中してみられていた。

検査成績の特徴は表9、10に示したが、末梢白血球数は8,000/μl以下の正常と考えられるものが23%、16,000/μl以下の高度増多と考えられるも

表9 臨床検査成績

末梢白血球数	~ 6,000/μl	6
	6,001~ 8,000	5
	8,001~10,000	7
	10,001~12,000	9
	12,001~14,000	5
	14,001~16,000	4
	16,001~18,000	6
	18,001~20,000	1
20,001~	5 / 48	
CRP値	~10 mg/dl	7
	10.1~20	14
	20.1~30	13
	30.1~40	3
	40.1~	10 / 47

表10 臨床検査成績及び合併症

肝機能検査異常 (LDH, GOT, GPT, GGT)	有 30	無 11	; 73.2 (56.6)
腎機能検査異常 (BUN, Creat)	有 19	無 20	; 48.7 (35.8)
低ナトリウム血症	有 16	無 21	; 43.2 (30.1)
血小板減少症	有 14	無 14	; 50.0 (26.4)
CPK高値	有 15	無 7	; 68.2 (28.3)
DIC合併	6		; (11.3)
横紋筋融解症	3		; (5.7)

のが25%であった。その他肝機能異常、腎機能異常、低ナトリウム血症などは初診時にみられなくても経過中に出現することが少なくはなく、CPK 高値も15例で記載されていた。

治療については表11、12にまとめたが、マクロライドとリファンピシンの併用が行われた例が多かったが、ニューキノロン系薬やテトラサイクリン系薬が疑診、確診の段階で使用されている例もみられた。しかしながら、第一次選択薬としてはやはり35例、66%で、何らかのβ-ラクタム系薬が単独もしくは併用で用いられており、治療の遅れを反映して、すべての死亡例(8例)はこの治療群に含まれていた。

表11 治療薬

使用された有効抗菌薬		
エリスロマイシン	36/43	83.7%
単独	15	
+リファンピシン	20	
+ニューキノロン	1	
リファンピシン	23	53.5%
クラリスロマイシン	11	25.6%
ニューキノロン系薬	8	18.6%
ミノサイクリン	8	18.6%

治癒症例56例中治療経過の明らかな43例について

表12 治療に関して

抗菌化学療法 (第1次選択薬)	マクロライド単独	2例	13例 (内死亡0)
	+リファンピシン	5例	
	含む併用療法	6例	
	克林ダマイシン含む併用療法	1例	5例 (0)
	ミノサイクリン単独	1例	
	含む併用療法	3例	35例 (8; 22.9%)
β-ラクタム	セフェム単独	18例	
	ペニシリン単独	6例	
	カルバペネム単独	5例	
	同志の併用療法	2例	
その他*		4例	

* AMK単独, VCM+AZT, CTM+TOB, ACV, ●死亡例

2) 鑑別診断について

① 市中肺炎: レジオネラ肺炎と鑑別を必要とする各種市中肺炎の患者背景因子、一般検査成績、胸部X線、臨床症状の特徴、診断のための検査法などを表13 a、b、cにまとめて示した。

一般細菌性肺炎: 肺炎球菌、肺炎桿菌、黄色ブドウ球菌あるいは嫌気性菌群などによる肺炎は重症化しやすく、臨床像は本症に類似する。これらは全身症状に加え、咳や痰などの呼吸器症状が前面に出ることが多く、特に膿性痰の咯出は有力な所見の一つである。グラム染色標本の鏡検も有用である。神経

表13-a レジオネラ肺炎と代表的な市中肺炎との臨床的鑑別のポイント

一患者背景と検査成績一

項目	レジオネラ肺炎	肺炎球菌性肺炎	オウム病	マイコプラズマ肺炎
患者背景				
性別	男性>女性	性差なし	性差なし	性差なし
発症年齢	中~高齢者	高齢者	全年齢層	若年~壮年
基礎疾患	関連性有	関連性有	関連性無	関連性無
職業歴	関連性有	関連性有	時に関連	関連性無
旅行歴	関連性有	関連性無	時に関連	関連性無
季節性	通気性	秋寒~冬期	春期~初夏	通気性
肺炎重症度	中等症~劇症	軽症~劇症	中等症~劇症	軽症~中等症
検査成績				
WBC	正常~軽度増加	軽度増加	正常~軽度増加	正常~軽度増加
肝機能異常	しばしば認める	なし	しばしば認める	しばしば認める
血小板減少	認める	なし	時に認める	なし
低Na血症	認める	なし	なし	なし
CPK上昇	認める	なし	なし	なし

表13-b レジオネラ肺炎と代表的な市中肺炎との臨床的鑑別のポイント

一胸部X線と臨床症状一

項目	レジオネラ肺炎	肺炎球菌性肺炎	オウム病	マイコプラズマ肺炎
胸部X線性状	肺野性~スリガラス様陰影しばしば認める	肺野性陰影	スリガラス様~肺野性陰影	スリガラス様陰影
胸水				
臨床症状				
発熱	高熱	軽~高熱	高熱	高熱
比較的徐脈	認める	なし	なし	なし
咳嗽	軽~高度	軽~高度	軽~高度	軽~高度
喀痰量	無~少量	無~少量	無~少量	無~少量
性状	粘液性	膿性	粘液性	粘液性
呼吸困難	時にホッペリ状			
消化器症状	高度	高度	高度	中~高度
精神・神経症状	認める	なし	なし	なし

表13-c レジオネラ肺炎と代表的な市中肺炎との臨床的鑑別のポイント

一診断法一

項目	レジオネラ肺炎	肺炎球菌性肺炎	オウム病	マイコプラズマ肺炎
迅速診断				
染色	ヒメネス染色	グラム染色	—	—
PCR法	PCR法	—	PCR法	PCR法
尿中抗原測定				
確定診断				
血清抗体測定法	血清抗体測定法		血清抗体測定法	血清抗体測定法
蛍光抗体染色法	蛍光抗体染色法	培養法	蛍光抗体染色法	蛍光抗体染色法
培養法	培養法	(一般培養)	培養法	培養法
(B-CYE α 培地)	(B-CYE α 培地)		(細胞培養)	(PPLO培地)

症状や消化器症状の合併もみられるが頻度は低い。肝・腎機能障害などの合併も稀である。β-ラクタム系薬などが有効だが、近年耐性化が増加しているので注意する。

マイコプラズマ肺炎：前投与薬のβ-ラクタム系薬が無効、比較的高熱が出て乾性咳嗽が強いなどは本症に類似する。また、肝機能異常を伴う頻度も高い。比較的若年層（10~40歳）に多いことや流行の有無を知ることは鑑別上ある程度役立つが、高齢者での発症も稀ならずみられ、散発例も最近多いので注意する。胸部X線ではスリガラス様陰影が特徴的

で、末梢白血球数は正常か軽度上昇にとどまる。しかし、重症例では臨床症状や一般検査、画像からの鑑別は必ずしも容易ではない。

クラミジア肺炎：特にクラミジア・シッタシによるオウム病では、劇症型、重症型の肺炎が多く、発熱や倦怠などの全身症状が前面に出て、精神神経症状や肝機能異常を伴うことなど本症との類似点は多い。鳥類との接触歴を知ることは診断上有力な情報となるが、約半数で確認できない。本症もマイコプラズマ肺炎同様、レジオネラ症との鑑別が難しいことが多いが、幸いいずれもマクロライド系薬が有効なので、疑わしい症例ではエリスロマイシンなどによる治療を開始の上で、血清抗体価測定などによる確定診断を試みる。

② 院内肺炎：院内肺炎としてのレジオネラ肺炎の臨床像は、基本的に市中肺炎と類似の特徴を有するものと考えられる。ただし、院内肺炎では様々な宿主側要因や基礎疾患、医原性要因などによる影響が大きく、各々の肺炎の臨床的特徴や検査成績の特殊性が明確に表現されることは少ないのではないかと考えられる。表14には各々の肺炎で注意すべき患

表14 レジオネラ肺炎と代表的な院内肺炎との臨床的鑑別のポイント

一患者の基礎疾患と臨床症状など一

項目	レジオネラ肺炎	一般細菌性肺炎	サイトメガロウイルス肺炎	カリニ肺炎	アスペルギルス肺炎
患者背景(基礎疾患)					
好中球減少症	○	○	○	○	○
HIV・AIDS	○	○	○	○	○
骨髄・臓器移植後	○	○	○	○	○
血清免疫	○	○	○	○	○
ステロイド長期使用	○	○	○	○	○
検査成績					
WBC	正常~増加	増加	低下~増加	低下~増加	正常~増加
肝機能異常	認める	なし	認める	なし	なし
腎機能異常	認める	なし	認める	なし	なし
血小板減少	認める	なし	認める	なし	なし
臨床症状					
咳嗽	無~少量	軽~少量	無~少量	無~少量	無~少量
性状	粘液性	膿性	粘液性	粘液性	粘液性~膿性
呼吸困難	中~高度	中~高度	中~高度	高度	軽~高度

○ 注意すべき基礎疾患、○ 特に注意すべき基礎疾患、○ 頻度も重症度も高くなる

者背景因子と、若干の臨床症状や検査成績の比較を示したにとどめた。いずれも臨床症状や画像所見・一般検査成績のみでは鑑別が困難な場合が多いが、痰や肺胞洗浄液が得られる場合、細胞診などによる病理組織学的アプローチが迅速性にも優れ有用なことが多い。稀にこれらとレジオネラ肺炎が合併してみられることもある。一部の感染症では血清学的あるいは遺伝子学的診断法も進歩しており、迅速に結果が得られるものもある。

考 察

レジオネラ症は、近年我が国でも改めて注目されている感染症であり、1999年4月のいわゆる感染症新法では四類感染症に指定され、全数報告が義務づけられるようになってきている。最近では温泉や家庭用24時間風呂と本症の関連が報告され話題となり^{31, 32)}、今回の報告症例の中にはそのような症例が多く含まれていたが、未だ我が国におけるレジオネラ症の報告例は欧米のそれに比し少ないと考えられる。社会や家庭環境などの差もあるかもしれないが、やはり本症の迅速かつ確実な診断法の確立と普及の遅れもその理由の一つであろう。最近我が国でも臨床応用されるようになった尿中抗原測定法などは、この観点から期待の持てる診断法の一つとも考えられている。また、その他の診断法の進歩も最近は著しく、その詳細は本報告書の他の報告で述べられている。

しかし、より重要な点は臨床医が本症を疑い適正に診断的アプローチを行うことである。我が国におけるレジオネラ肺炎の臨床的なまとめとしては、1992年に荒川らが報告したものが³³⁾、それらを元として同年厚生省のレジオネラ症研究班が示した診断基準と診断・検査および治療指針がある³⁴⁾。その後先述した様に検査・診断法の進歩³⁵⁻³⁷⁾や新しい感染様式の確認などもあり、その指針を改めて検証すべき時期にあるものと考えられ、本研究班が組織されている。今回の我々の報告は、本症の鑑別診断について、最近報告されたレジオネラ肺炎の臨床的特徴の検討から論じたもので、臨床医が肺炎患者の診療に際し、いかに本症を疑い、いかに他の肺炎との鑑別を考え診断と治療をすすめるかに役立てば幸いである。

今回の症例のレビューでは、本症の臨床症状や検査成績の特徴としてみられたものは、従来から指摘されている項目が再確認されるにとどまるものも多かった³⁸⁻⁴²⁾。しかし、温泉への旅行歴やそれに伴う発病の季節性などは、我が国の特徴的な患者背景因子として位置づけできるものであり、消化器症状や神経症状の具体的な症状や頻度の確認は、改めてそれらの鑑別診断上の有用性を認識させるものでもあろう。検査成績としてはさらに新しい診断や予後の

判定のマーカ―としてKL-6なども注目されており³⁹⁾、我々はCT上のレジオネラ肺炎の特徴的所見の一つとしての、キルト模様状陰影の確認を提唱しているが⁴⁰⁾、これらについてはさらに症例を重ねての今後の評価が期待される。

治療についても若干の検討を行ったが、近年欧米ではニューキノロン系薬の本症治療での位置づけが高い。ただし、これは原則的に注射剤型が用いられるからであり、我が国でも注射用ニューキノロン系薬の早期の承認が待たれるところである。

これらを参考として、今回の鑑別診断のポイントはまとめられたが、市中肺炎については比較的各々の肺炎を区別するための特徴的な項目が明らかにできたと考えている。院内肺炎については今回報告例も少なく、また背景因子などを考えた場合、必ずしも臨床症状や検査成績にこだわって鑑別をすすめることはすすめられない。常に本症の可能性を念頭に置いた多角的な診断アプローチを心がけることが重要であろう。

文 献

- 1) 辻 博 他：遅い診断から救命しえたレジオネラ肺炎の1例。日胸疾会誌35:566-570, 1997
- 2) 張田信吾 他：Legionella micdadeiによる重症肺炎の1例。広島医学 50:929-932, 1997
- 3) 中嶋治彦 他：体外膜型肺（ECMO）によって救命し得た重症レジオネラ肺炎による急性呼吸不全の1例。日胸疾会誌 35:1363-1367, 1997
- 4) 相澤敏也 他：クラリスロマイシンとリファンピシンの長期投与で改善をみたレジオネラ肺炎の1症例。呼吸 16:1725-1730, 1997
- 5) 徳田 均 他：公衆浴場での溺水後発症した Legionella pneumophila serogroup 6 による劇症肺炎の1例。感染症誌 71:169-174, 1997
- 6) 横村一郎 他：急性腎不全を呈したレジオネラ肺炎の1例。呼吸 16:805-809, 1997
- 7) 中村博幸 他：早期治療により治癒したレジオネラ肺炎の2例。内科 82:577-579, 1998
- 8) 山内高弘 他：早期の敗血症性ショック、汎発性血管内凝固症候群による急性心筋梗塞を主徴と

- したレジオネラ感染疑診例. 感染症学雑誌
72:286-292, 1998
- 9) 藤田 弘 他: レジオネラ感染に伴う紅皮症の
1例. 皮膚科紀要 93:341-342, 1998
- 10) 高森幹雄 他: *Legionella pneumophila*
serogroup 6による劇症肺炎の一例. 日内科誌
87:1127-1129, 1998
- 11) 中館俊英: 温泉を感染源としたレジオネラ肺炎
の集団発生. Therapeutic Research 19:1238-
1242, 1998
- 12) 柳川 崇 他: 著しい精神症状を呈した重症レ
ジオネラ肺炎の1例. 日胸 57:572-577, 1998
- 13) 野村英一 他: 救命し得たレジオネラ肺炎によ
る急性呼吸不全の1例. 日救急医学会関東誌19:270-
271, 1998
- 14) 淡井総朗 他: マイコプラズマ、レジオネラ菌
合併重症肺炎の1例. 日救急医学会関東誌 19:268-
269, 1998
- 15) 橋爪洋一 他: レジオネラ肺炎7例の診断と経
過. 日胸 57(5):385-392, 1998
- 16) 二木芳人 他: 異型肺炎のレジオネラ症鑑別診
断. 厚生科研費補助金 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9年度研究報告書:
48-52, 1998
- 17) 喜屋武幸男 他: 当院にて経験したレジオネラ
肺炎の臨床的検討. 厚生科研費補助金新興・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9年
度研究報告書:56-61, 1998
- 18) 平良恵貴 他: 沖縄県宮古病院におけるレジオ
ネラ肺炎の1例. 厚生科研費補助金 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9年
度研究報告書:62-67, 1998
- 19) 岡崎美樹 他: 造園業者に発症した *Legionella*
longbeachae 激症肺炎の1例. 厚生科研費補助金
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9年度研究報告書:68-71, 1998
- 20) 上村光弘 他: 温泉旅行後に発症したレジオネ
ラ症の3例. 厚生科研費補助金 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9年度研
究報告書:72-77, 1998
- 21) 和田庸子 他: 浴槽での溺水後に発症したレジ
オネラ肺炎の1例. 新潟県病医誌47:19-22, 1999
- 22) Takiguchi Y. et al.: Bilateral pleuritis
caused by *Legionella micdadei*. Intern Med
38:369-371, 1999
- 23) 鈴木和恵 他: 間質性陰影が遷延化したレジオ
ネラ肺炎の一例. 厚生科研費補助金 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10年
度研究報告書:71-75, 1999
- 24) 小山敏枝 他: 温泉で溺水後に発症した重症肺
炎の一例. 厚生科研費補助金 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10年度研究
報告書:76-80, 1999
- 25) 峯下昌道 他: 循環式浴槽が感染源と考えられ
たレジオネラ肺炎の一例. 厚生科研費補助金 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10年度研究報告書:80-82, 1999
- 26) 松原紳一 他: 血液浄化療法併用にて救命し得
た重症 *Legionella micdadei* 肺炎の1例. 厚生科
研費補助金 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10年度研究報告書:83-86,
1999
- 27) 玄間淑子 他: 横紋筋融解症を合併したレジオ
ネラ肺炎の1例. 厚生科研費補助金 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10年
度研究報告書:87-91, 1999
- 28) 藤井一彦 他: 大脳及び小脳機能障害を合併し
た重症レジオネラ肺炎の1例. 厚生科研費補助金
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10年度研究報告書:92-95, 1999
- 29) 吉本健朗 他: 複数の *Legionella* 菌の重複感染
が疑われた *Legionella* 肺炎の1例. 厚生科研費
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10年度研究報告書:96-99, 1999

- 30) 杉山昌裕 他：レジオネラ肺炎の2例。日胸 58(2):142-147, 1999
- 31) 藪内英子 他：日本の温泉水中の *Legionella* 属菌の分布。感染症誌 68:549-551, 1996
- 32) 藪内英子：家庭用24時間風呂浴槽水の *Legionella pneumophila* およびその他の細菌汚染～その生物浄化機構に関連して～。日環感 11:221-227, 1996
- 33) 荒川迪生 他：培養陽性本邦レジオネラ肺炎症例について、1980年から1990年まで。感染症誌 66:1513-1523, 1992
- 34) 上田 泰 他、厚生省レジオネラ症研究班：厚生省レジオネラ肺炎診断基準と診断・検査及び治療指針, 1992
- 35) 斎藤 厚 他：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検討。厚生科研費補助金、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10年度報告書:1-7, 1999
- 36) 山口恵三 他：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6年間における66症例の解析～。厚生科研費補助金 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10年度研究報告書:8-14, 1999
- 37) 斎藤 厚 他：レジオネラ肺炎の予後と補助診断における血清 KL-6 の有用性の検討。厚生科研費補助金 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10年度研究報告書:20-24, 1999
- 38) Plouffe J.F.: Legionnaires' disease and related infections. In Infect Diseases, 5th, ed. by Hoeprich P.D. et al., Philadelphia, J.B. Lippincott Co., pp442-446, 1994
- 39) Cunha B.A.: Clinical manifestations of Legionnaires' disease. Seminar Respir Infect 13:116-122, 1998
- 40) Shah A. et al.: Legionnaires' diseases and acute renal failure; case report and review. Clin Infect Dis 14:204-207, 1992
- 41) Johnson JD et al.: Neurologic manifestations of Legionnaires' diseases. Medicine 63:303-310, 1984
- 42) Fairbank J.T. et al.: The chest radiograph in Legionnaires' disease. Radiology 147:33-40, 1983
- 43) 松島敏春 他：レジオネラ肺炎のCT所見。厚生科研費補助金 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10年度研究報告書:49-58, 1999

レジオネラ感染マウスモデルを用いたPCRによる *Legionella pneumophila* 検出の基礎的検討

分担研究者：

長崎大学医学部内科学講座第二

河野 茂

研究協力者：

長崎大学臨床検査医学講座

青木志保、宮崎義継

Study on PCR detection of *Legionella pneumophila* in murine model for *Legionella* infection

Shigeru Kohno, Shiho Aoki and Yoshitsugu Miyazaki

Second Department of Internal Medicine, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Nagasaki University.

研究要旨

迅速診断に用いるPCR法を血液検体で検討するため、A/Jマウスを用いて *Legionella pneumophila* の感染モデルを作成した。これより採血及び採尿を行い、PCRによるレジオネラ菌の検出の結果と尿中抗原の結果を比較したところ、両者とも感染翌日より陽性となった。感染後7日目にPCRが陰性化し、14日目に尿中抗原は陰性化し、PCRがより早く陰性化することが示唆された。

目的：

レジオネラ肺炎は急激な経過をたどり重症化する症例もあるため、その早期診断は重要である。現在、EIAを用いた尿中抗原検出が頻用されているが、既感染でも陽性を示すことがあり、また必ずしも病勢と一致しないこともあるため、病勢を反映するような新しい診断法が求められている。迅速診断に用いられるPCR法については、気管支肺胞洗浄液を検体とした場合において有用であることが報告されているが、非侵襲的な検査検体を用いたPCR法の応用も求められている^{1,2)}。そこで、我々はレジオネラ感染マウスモデルを用いてPCRによる血液検体からのレジオネラの検出の基礎的検討を行った。

材料と方法：

1. 菌株：*Legionella pneumophila* (ATCC 33152株)を使用した。-80℃で凍結保存していた菌をBCYE寒天培地に接種し、30℃で4日間培養した。1コロニー約菌し5mlのBYE液体培地で、37℃、約24時間振盪培養した後、その菌液を新しいBYE液体培地5mlに接種し更に振盪培養した。OD₅₉₅値が0.5となるまで培養し、3000rpm、15分間遠心で沈殿し、二度生理食塩水にて洗浄し、ペレットを生理食塩水に懸濁し、OD₅₉₅にて菌液の調整を行った。

2. レジオネラ感染マウスモデル：5週齢のオスのA/Jマウスを用い、経気管的に上記要領で調整した*L. pneumophila*の様々な濃度の菌液を0.1mlずつ接種した。ネブプタールにて麻酔をし、27Gのサーフロー針の外筒を用い、口腔から直接気管内へ注入した。感染翌日、3日目、7日目にマウスの眼窩よりEDTA入りの注射器で約50μl採血した。また、尿回収用のゲージへ入れて、感染翌日、3日目、7日目、14日目に尿を回収した。

3. DNAの抽出：CLONTECH社のNucleo Spin Blood Kitを用いてDNAの抽出を行った。

4. PCR：プライマーは*Legionella* 16S rRNA geneをターゲットとしたLSP-GCG-SとCp3.2³⁾を

用いた。PCRの条件は94℃ 4分、94℃1分56℃1分72℃1分を35サイクル、72℃で10分とした。

PCRプロダクトの確認は2%アガロースゲルにて電気泳動をし、0.1%のエチジウムブロマイドにて染色後、UV下にて行った。

5. 尿中抗原の検出：Binax社の尿中抗原検出キットを用いて行った。非感染マウス尿では陰性を示すことを予め確認した。

結果：

1. PCRの感度：PCRの基礎的検討では感度は20fgであった。(図1)

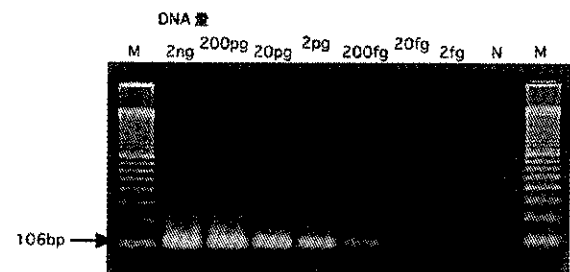


図1. PCRの感度

2. プライマーの特異度：*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *M. pneumoniae*のDNAを用いて同条件でPCRを行ったが増幅は認めなかった。(図2、3) また、*L. pneumophila* serogroup 1~5、*L. micadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeach*

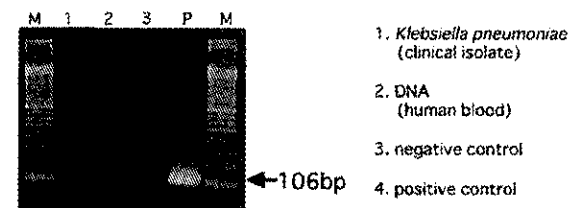


図2. PCRの特異度 (その他)

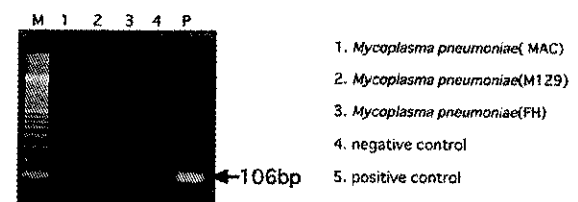


図3. PCRの特異度 (Mycoplasma)

he serogroup 1 ~ 2、*L. gormanii*、*L. jordanis* のレジオネラ 属のDNAでは増幅を認めた。(図4)

考察および結論：

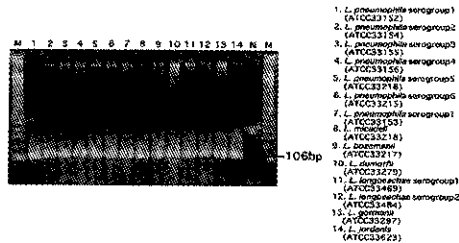


図4. PCRの特異度 (レジオネラ属)

3. マウスの致死率：マウスへの接種菌量は 3×10^6 CFU/mouse とすると感染3日目に致死率は100%であった。 6×10^5 CFU/mouse とすると致死率は40%となった。(図5)

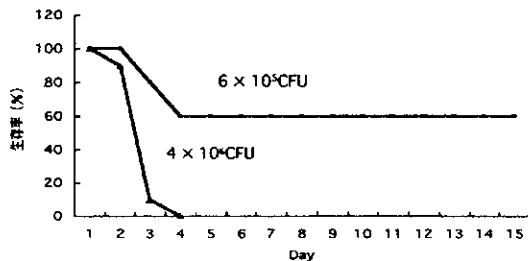


図5. マウス生存率

4. マウス肺病理所見：びまん性に浸出液や細胞浸潤を認め、肺胞構造が破壊している部位が認められ、肺炎像と考えられた。

5. PCR及び尿中抗原の結果マウス由来の血液のPCR及び尿中抗原は、感染翌日より陽性を示し、感染後3日目はどちらも陽性であったが、7日目にはPCRが陰性化し、14日目には尿中抗原が陰性化した(図6)。

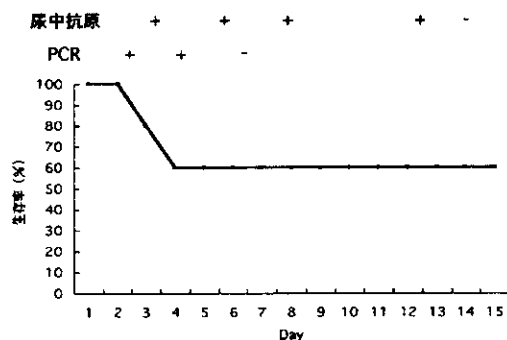
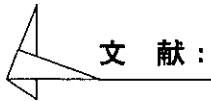


図6. 生存率とPCR尿中抗原の相関

今回、我々はA/Jマウスを用いてレジオネラ肺炎モデルを作製し、その血液検体からPCRによるレジオネラ菌の検出をおこなった。血液検体からのPCRは、血液中の阻害物質のため困難である²⁾といわれていたが、前述のキットを用いてDNAを抽出して行えば可能であった。またその感度は、感染翌日より陽性となり尿中抗原と同程度と考えられた。プライマーの特異度は、Cp.3.2を用いているDaniel.J¹⁾らが確認している *P.aeruginosae* に加えて、市中肺炎や異型肺炎の原因となりうる *K.pneumoniae*、*M.pneumoniae* には反応せず、実用可能であると考えられる。尿中抗原との経時的な比較では、血液検体のPCRの方が1週間はやく陰性化していた。尿中抗原は、臨床的には感染後1~3日で陽性反応を示すものの、肺炎治癒後も陽性が持続することがあり、1年近く陽性であった例³⁾などの報告もある。このため、より病勢と一致する検査が望まれている。今回の結果から、末梢血PCR法は尿中抗原の検出より病勢を反映している可能性があるものの、肺炎の経過中に尿中抗原が陰性になる例もあることや、肺炎の重症度との比較を行っていないことなどから、末梢血PCR法が病勢を反映しているか否かについてはさらなる検討が必要であると考えられた。

尿中抗原の検出は迅速診断法として広く用いられており、その感度・特異度ともに優れたものである⁴⁾が、尿中抗原の本体は未だ不明である。また、菌種により検出困難な場合があることが指摘されている。一方、PCRはレジオネラ肺炎の原因となる菌種に広く保存されているのDNAの一部を検出している。現在まで、気管支肺胞洗浄液や胸水などのPCRが診断に有用であった報告^{5~7)}があるが、検体採取のために非侵襲的な方法が望まれる。この点においても少量の末梢血からのPCRが実用化されれば、有用な迅速診断法の一つとなりうるであろう。今後は臨床検体を用いた検討を行っていく予定である。



文 献 :

- 1) Daniel J, Anika R, Stephan W, Sucharit B. : Enzyme-linked immunoassay for Detection of PCR-amplified DNA of *Legionella* in bronchoalveolar fluid. J Clin Microbiol 33:1247-52, 1995
- 2) Jaulhac B, Reyrolle M, Sodahlon K et al. : Comparison of sample preparation methods for detection of *Legionella pneumophila* in culture-positive bronchoalveolar lavage fluids by PCR. J Clin Microbiol 36:2120-2122, 1998
- 3) Kohler R B, Winn W C Jr, Wheat L J : Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaire's disease. J Clin Microbiol 20:605-7, 1984
- 4) 新垣紀子, 齋藤 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 : 421-27, 1998
- 5) Halold H Kessler, Franz F Reinthaler , Andrea Pschaid, et al. : Rapid detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavage fluids with Enviro Amp *Legionella* PCR amplification and detection kit. J Clin Microbiol 31: 3325-28, 1993
- 6) Susan C Weir, Steven H Fischer, Frida Stock, Vee J Gill: Detection of *Legionella* by PCR in respiratory specimens using a commercially available kit. Am J Clin Pathol 110:295-300, 1998
- 7) M Iwamoto, H koga, S Kohno, M kaku, K hara: Detection of *Legionella* species by polymerase chain reaction. Serodiagn Immunother Infect Disease 7:99-103, 1995

Legionella pneumophila 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

分担研究者：

国立感染症研究所 細菌部

渡辺 治雄

研究協力者：

国立感染症研究所 細菌部
デンカ生研

前川純子、倉 文明
権平文夫、杉山純一

Analyses of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by pulsed-field gel electrophoresis and monoclonal antibodies

Haruo Watanabe¹⁾, Junko Maekawa¹⁾, Fumiaki Kura¹⁾, Fumio Gondaira²⁾, and Jun-ichi Sugiyama²⁾

¹⁾ Department of Bacteriology, National Institute for Infectious Diseases, and

²⁾ Denka Seiken Co., Ltd.

研究要旨

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 UPGMA 法 (Unweighted Pair Group Method of Averages) で解析し、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。

緒言：

レジオネラは河川、湖沼、土壌中などにいる環境細菌であり、給湯設備やクーラーの冷却塔水、加湿器といった人工水系中に土埃などから混入し、消毒などの適切な処置を怠るとそれらの水系中で増殖する。そこから生じるレジオネラを含むエアロゾルを老人、新生児、免疫不全患者などが吸入した場合、重篤な肺炎をおこすことがある。集団感染が生じた際に、どの患者から分離された菌株が同一であることを明らかにすることは感染源の解明のために重要である。また、感染源と考えられる水系から分離された菌株と患者由来株の異同の解析もその後のレジオネラ感染の予防という観点からきわめて重要である。

近年、分子生物学の手法を応用した分子疫学が発達してきた。パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法はそれらの分子疫学的手法のなかでも最も解析力に優れていると考えられる。そこでPFGE法をもちいて本邦で分離された*L. pneumophila*血清群1株の解析を行った。あわせて、すでに*L. pneumophila*血清群1株の型別法として有用であることが確認されているモノクローナル抗体(MoAb)を用いたスライドラテックス凝集法¹⁾を行い、両者の結果を比較検討した。

材料と方法

菌株：本邦で分離された*L. pneumophila*血清群1の臨床分離株28株および、環境分離株37株を用いた。

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法：10%スキムミルク(Difco)中、-80℃で保存していた各菌株をBCYE寒天(Difco)培地に塗布後、35℃3日間培養したものを爪楊枝の先でかきとり、200μlの超純水に懸濁し、等量の1% Low Melt Agarose(Bio-Rad)と混ぜ、plug mold(Bio-Rad)に流し込み氷上で冷却し、アガロースブロックを作製した。アガロースブロックをリゾチーム液(10mg/ml lysozyme, 0.5M EDTA pH8.0)1ml

に浸し、37℃で一晩ゆっくり振盪した。液を蛋白質分解酵素液(1mg/ml proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine, 0.5M EDTA pH 8.0)1mlに換え、50℃で一晩ゆっくり振盪した。アガロースブロックを半分の大きさに切断後、1mM phenylmethane sulphonyl fluorideを含んだTEバッファー(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)1mlに浸し、50℃で1時間ゆっくり振盪した。液を新しい1mM phenylmethane sulphonyl fluorideを含んだTEバッファーに換え、再び50℃で1時間ゆっくり振盪した。液をTEバッファー1mlに換え、氷上で1時間ゆっくり振盪し、アガロースブロックを洗浄した。液を制限酵素処理のためのバッファー(50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 100μg/ml bovine serum albumin)200μlに換え、氷上で1時間ゆっくり振盪し、バッファーの平衡化を行った。液を制限酵素SfiI(New England Biolabs)20unitsを含む制限酵素バッファー100μlに換え、50℃で一晩ゆっくり振盪した。酵素処理を終えたアガロースブロックは液を0.5X TBE(Tris-borate 45mM, EDTA 1mM)に換え、電気泳動を開始するまで4℃に置いた。

PFGEはCHEF DR1I(Bio-Rad)を用いて、1% Pulsed Field Certified Agarose(Bio-Rad), 0.5X TBE、パルスタイム5秒から50秒、200V、泳動時間21時間、バッファーの温度は約16℃で行った。電気泳動終了後、ゲルは0.5μg/mlのエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射装置上でポラロイド107フィルムで撮影した。

モノクローナル抗体(MoAb)を用いたスライドラテックス凝集反応法：権平と杉山の方法²⁾に従って、5種類のMoAbをラテックス粒子に感作したものと、各菌株より調製した抗原液をスライドグラス上で混和し、凝集が認められるか調べた。各MoAbの認識する抗原因子をそれぞれA、B、C、D、Eと仮称し、それぞれの抗原因子の有無で表わされる抗原因子型により各菌株の型別を行った。

結果:

MoAbを用いたスライドラテックス凝集反応の結果、菌株は13種類の抗原因子型に分けられた。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(表1、各菌株の抗原因子型については図1を参照)。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。さらに、環境分離株のなかでも冷却塔由来株では、抗原因子型がBCDあるいはBCDEのものが78%を占めるのに対し、温泉由来株では13%であった。

つぎに、PFGEのゲルの写真をスキャナで読み込み、Molecular Analyst (Bio-Rad) を用いてバンドパターンを解析した。その結果、菌株は、47のタイプに分類された。臨床分離株28株は22タイプに、

表1 *L. pneumophila* serogroup 1 分離株の各抗原因子型の株数

抗原因子型	臨床分離株	環境分離株	計
A	13	0	13
AB	1	0	1
ABC	3	2	5
ABCD	3	0	3
AC	1	0	1
AE	1	0	1
BC	1	1	2
BCD	0	5	5
BCDE	5	17	22
CD	0	1	1
CE	0	4	4
DE	0	2	2
E	0	5	5
計	28	37	65

環境分離株37株は25のタイプに分類され、両者で共通のタイプは存在しなかった(図1)。冷却塔由来

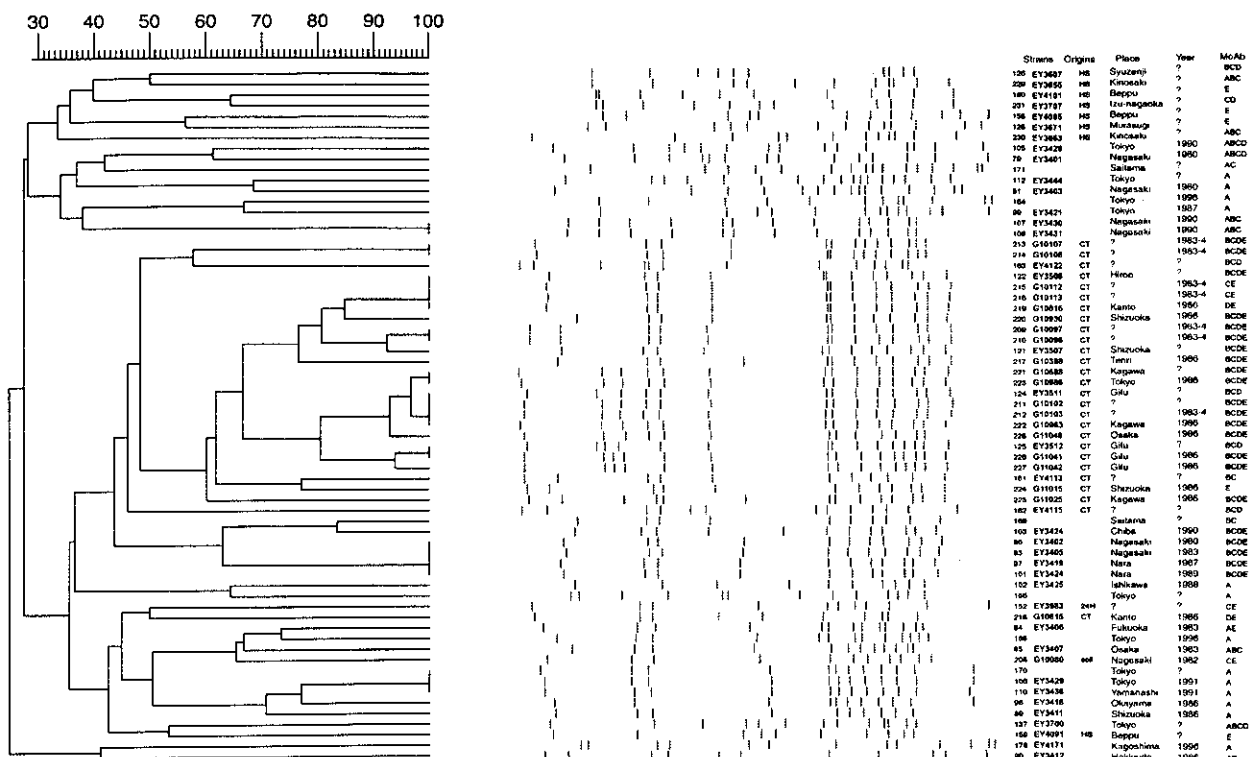


図1. 本邦で分離された *L. pneumophila* 血清群1の臨床分離株と環境分離株の染色体を SfiI で消化して、PFGEを行い、そのバンドパターンを Molecular analyst で解析し、UPGMA法に基づいて系統樹を作製した。Strainsの欄には感染研ナンバーを記し、その隣に分与元のEYナンバーあるいはGIFUナンバー(Gと略記)を併記した。Originsの欄はHSは温泉由来、CTは冷却塔由来、24Hは24時間風呂、soilは土壌由来であることをそれぞれ示し、空欄は臨床由来であることを示す。Placeは環境分離株については採取地、臨床分離株については病院の所在する都道府県を記した。各株のMoAb型も記載した。

のものゝ温泉由来のものがそれぞれ2つの大きなクラスターを形成し、遺傳的に距離があることが示された。抗原因子Aをもたない臨床分離株はすべて冷却塔由来の株のクラスターに属し、抗原因子Aをもつ臨床分離株の大部分は2つのクラスターのいずれにも属さなかつた。

以上のように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つた。

考 察 :

レジオネラはヒトの常在菌ではなく、ヒトからヒトへ感染することもなく、環境に存在する菌が感染すると考えられている。しかし、PFGEによる分類とMoAbによる型別の結果、臨床分離株と環境分離株が、異なる特徴をもっていることがわかつた。この理由として、つぎのようないくつかの可能性が考えられる。ひとつの可能性として、冷却塔と温泉に由来する環境分離株の特徴が異なることから、別の環境に存在する菌は異なる特徴をもつ可能性があるので、今回調べられた多くの臨床由来株の感染源が冷却塔や温泉ではなかつた可能性がある。レジオネラ症の患者の感染源として冷却塔や温泉以外にも考慮しなければならないと考えられ、それら感染源の解明が必要である。第二の可能性としては、環境に存在するごく一部の特別な株が、ヒトに感染症をきたすのであり、今回用いた環境分離株のなかに臨床分離株型の主要なタイプのもものがたまたま検出されなかつたということが考えられる。その場合は、PFGEやMoAbのタイプと病原性になんらかの相関が見出されるかもしれない。最後に、環境分離株と臨床分離株が実際に遺傳的に隔たりがあるという可能性があげられる。その場合は、ヒトからヒトへの感染、あるいは宿主動物の存在を想定する必要がある。

2つの方法の疫学的有用性を考えた場合、PFGE法は非常に細かくタイピングをすることが可能であるが、多くの株を解析する場合にはコンピュータ解析を行わなければならない煩雑である。しかし、同一

のゲルで泳動した株間での比較は容易に可能で、同じゲルパターンを示す場合、それらが同一のクローン由来である確率はきわめて高いと考えられる。それに対し、MoAbによる解析はタイプ数は少なくなるが、手法がPFGEに比べ簡便で、タイピングも容易である。多数の株についてタイピングを行い、データとして蓄積し、解析するのに適した方法であると考えられる。

謝 辞 :

分離菌株を提供していただいた愛知医科大学蘇内英子博士、東邦大学医学部山口恵三博士、聖マリアナ大学山本啓之博士に感謝いたします。

発 表 :

論文 :

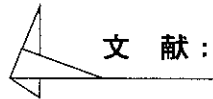
1. Amemura-Maekawa J, Watanabe H: Cloning and sequencing of the *dnaK* and *grpE* genes of *Legionella pneumophila*. *Gene* 197;165-168, 1997
2. Amemura-Maekawa J, Mishima-Abe S, Kura F, Takahashi T, Watanabe H: Identification of a novel periplasmic catalase-peroxidase *KatA* of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* 176;339-344, 1999

著書翻訳など:

1. 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.
2. 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.
3. 倉 文明、渡辺治雄: レジオネラ症、感染症週報 2(2);10-11, 2000.

学会：

1. Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H: Cloning and sequencing of the *dnaK* and *grpE* genes of *Legionella pneumophila*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Cold Spring Harbor, NY, USA), September, 1997
2. 前川純子、倉 文明、渡辺治雄：*Legionella pneumophila*の*katG*遺伝子の解析. 第71回日本細菌学会総会（松本）、1998年4月
3. 倉 文明、後藤紀久、前川純子、塚野尋子、渡辺治雄：NADPH oxidase 活性欠損マウスを用いた *Legionella pneumophila* の感染の研究. 第71回日本細菌学会総会（松本）、1998年4月
4. Kura F, Goto N, Tsukano H, et al: Systemic infection of *Legionella pneumophila* in mice lacking phagocyte superoxide production. 10th International Congress of Immunology (New Delhi), November 1998
5. 倉 文明、後藤紀久、渡辺治雄：X-linked CGD モデルマウスにおける *Legionella pneumophila* 感染. 第6回食細胞機能異常症研究会（東京）、1998年12月
6. 前川純子、倉 文明、渡辺治雄：レジオネラのユニークなカタラーゼ-ペルオキシダーゼについて. 第72回日本細菌学会総会（東京）、1999年3月
7. 倉 文明、後藤紀久、前川純子、塚野尋子、渡辺治雄：自然抵抗性あるいはスーパーオキシド産生に依存するマウスレジオネラ肺炎防御. 第72回日本細菌学会総会（東京）、1999年3月
8. 芳賀伸治、山崎利雄、倉 文明：肺結核症モデル開発のための安全なエアロゾル感染の検討. 実験結核研究会（宇都宮）、1999年4月
9. 倉 文明：レジオネラの診断. 生微生物協議会第20回研究会（名古屋）、1999年7月
10. Kura F, Goto N, Amemura-Maekawa J, Tsukano H, Dinauer MC, Watanabe H: NADPH oxidase and *Lgn1r* are essential for efficient prevention of lethal *Legionella pneumophila* pneumonia, Cold Spring Harbor Laboratory 1999 Meetings & Courses: Microbial Pathogenesis and Host Response (Cold Spring Harbor, NY, USA), September 1999



文献：

1. 権平文夫、杉山純一：モノクローナル抗体を用いたスライドラテックス凝集法による *Legionella pneumophila* serogroup 1 の抗原因子型別とその疫学的有用性について. 感染症学雑誌、70(7); 673-680, 1996
2. De Zoysa AS, Harrison TG: Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by pulse-field gel electrophoresis with *SfiI* and comparison of this method with restriction fragment-length polymorphism analysis. J Med Microbiol 48:269-278, 1999

E test と寒天平板希釈法を用いた *Legionella* における薬剤感受性の検討

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：

東邦大学医学部附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

Susceptibility Testing by E test and Agar Dilution Method for *Legionella* spp.

Keizo Yamaguchi^{1) 2)}, Hinako Murakami²⁾, Tetsuya Matsumoto^{1) 2)},
Takao Kobayashi¹⁾, Kenji Isogai¹⁾ and Kazuhiro Tateda^{1) 2)}

¹⁾ Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University, and

²⁾ Clinical Laboratory, Toho University Omori Hospital

研究要旨

レジオネラ属の臨床分離株23株を対象に Etest および寒天平板希釈法による薬剤感受性について検討を行った。基礎的検討として *S. aureus* と *E. coli* の標準株を用いて基礎培地の違いによる MIC 値の変動について検討したところ、ミュラー-ヒントン培地に比べ BCYE α 培地を用いた方が低い感受性を示し、活性炭などの影響が示唆された。判定時間による MIC 値の変動については経時的に MIC 値が高くなる薬剤がみられた。E test と寒天平板法の MIC 値の相関に関しては低い相関係数を示す薬剤もみられたが、MIC 値の分布から判断すると両者はほぼ類似した値を示した。全体的には、E test の方が寒天平板法よりも 2 管程度低い MIC 値を示した。E test による薬剤感受性成績ではレジオネラ感染症時に使用される薬剤は MINO を除いて全株 MIC 値が 1 μ g/ml 以下の高い抗菌活性を示した。以上の結果とともに操作の簡便性なども考慮すると、E test はレジオネラ属の薬剤感受性検査において有用性が高いと考えられた。