

- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. & McDade, J. E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med* 90, 656–658.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Gorman, G. W., Wilkinson, H. W., Bibb, W. F., Hackel, M., Tyndall, R. L., Campbell, J., Feeley, J. C. & other authors (1985). Ten new species of *Legionella*. *Int J Syst Bacteriol* 35, 50–59.
- Committee for The Japanese Respiratory Society Guidelines for the Management of Respiratory Infections (2006). Guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults, revised edition. *Respirology* 11, S79–S133.
- Dietrich, P. A., Johnson, R. D., Fairbank, J. T. & Walke, J. S. (1978). The chest radiograph in Legionnaires' disease. *Radiology* 127, 577–582.
- Gaia, V., Fry, N. K., Afshar, B., Luck, P. C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R. & Harrison, T. G. (2005). Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 43, 2047–2052.
- Helbig, J. H., Kurtz, J. B., Pastoris, M. C., Pelaz, C. & Lück, P. C. (1997). Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol* 35, 2841–2845.
- Kirby, B. D., Peck, H. & Meyer, R. D. (1979). Radiographic features of Legionnaires' disease. *Chest* 76, 562–565.
- Kroboth, F. J., Yu, V. L., Reddy, S. C. & Yu, A. C. (1983). Clinicoradiographic correlation with the extent of Legionnaire disease. *AJR Am J Roentgenol* 141, 263–268.
- Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Miller, R., Haff, L., DiCesare, J. & Atlas, R. M. (1990). Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol Cell Probes* 4, 175–187.
- Matsumoto, N., Sasaki, T., Nakao, H., Katoh, T., Fukuda, Y., Nakazato, M. & Okayama, A. (2008). An outbreak of Legionnaires' disease associated with a circulating bathwater system at a public bathhouse. II. Radiological findings of pneumonia. *J Infect Chemother* 14, 123–129.
- Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan (1999). Establishment and implementation of new laws on infectious diseases. In *Annual Reports on Health and Welfare 1998–1999, Social Security and National Life*, vol. 1, part 2, *Activities of Health and Welfare Administration*, chapter 6, section 2, *Measures against New Infectious Diseases* (<http://www.mhlw.go.jp/english/wp/wp-hw/vol1/p2c6s2.html>).
- Miyashita, N., Matsushima, T., Oka, M. & Japanese Respiratory Society (2006). The JRS guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults: an update and new recommendations. *Intern Med* 45, 419–428.
- Niederman, M. S., Mandell, L. A., Anzueto, A., Bass, J. B., Broughton, W. A., Campbell, G. D., Dean, N., File, T., Fine, M. J. & other authors (2001). Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 1730–1754.
- Okada, C., Kura, F., Wada, A., Inagawa, H., Lee, G. H. & Matsushita, H. (2002). Cross-reactivity and sensitivity of two *Legionella* urinary antigen kits, Biotest EIA and Binax NOW, to extracted antigens from various serogroups of *L. pneumophila* and other *Legionella* species. *Microbiol Immunol* 46, 51–54.
- Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J. H., Fry, N. K. & Luck, P. C. (2007). Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminate cytidylyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 45, 1965–1968.
- Saito, A., Shimoda, T., Nagasawa, M., Tanaka, H., Ito, N., Shigeno, Y., Yamaguchi, K., Hirota, M., Nakatomi, M. & Hara, K. (1981). The first case of Legionnaires' disease in Japan. *Kansenshogaku Zasshi* 55, 124–128 (in Japanese).
- Sasaki, T., Matsumoto, N., Nakao, H., Katoh, T., Fukuda, Y., Nakazato, M. & Okayama, A. (2008). An outbreak of Legionnaires' disease associated with a circulating bathwater system at a public bathhouse. I. A clinical analysis. *J Infect Chemother* 14, 117–122.
- Stout, J. E., Rihs, J. D. & Yu, V. L. (2003). *Legionella*. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edn, pp. 809–823. Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller & R. H. Tenover. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Tan, M. J., Tan, J. S., Hamor, R. H., File, T. M., Jr & Breiman, R. F. (2000). The radiographic manifestations of Legionnaire's disease. The Ohio Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. *Chest* 117, 398–403.
- Yagyu, H., Nakamura, H., Tsuchida, F., Sudou, A., Kishi, K., Oh-ishi, S. & Matsuoka, T. (2003). Chest CT findings and clinical features in mild *Legionella* pneumonia. *Intern Med* 42, 477–482.
- Yamamoto, H., Hashimoto, Y. & Ezaki, T. (1993). Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 37, 617–622.

# Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types

Junko Amemura-Maekawa,<sup>1</sup> Fumiaki Kura,<sup>1</sup> Jürgen H. Helbig,<sup>2</sup> Bin Chang,<sup>1</sup> Akiko Kaneko,<sup>3</sup> Yuko Watanabe,<sup>4</sup> Junko Isobe,<sup>5</sup> Masafumi Nukina,<sup>6</sup> Hiroshi Nakajima,<sup>7</sup> Kimiko Kawano,<sup>8</sup> Yuki Tada,<sup>9</sup> Haruo Watanabe<sup>1</sup> and the Working Group for *Legionella* in Japan†

## Correspondence

Junko Amemura-Maekawa  
jmaekawa@nih.go.jp

<sup>1</sup>Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Institute of Medical Microbiology and Hygiene, TU Dresden, Dresden, Germany

<sup>3</sup>Yamagata Prefectural Institute of Public Health, Yamagata, Japan

<sup>4</sup>Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Kanagawa, Japan

<sup>5</sup>Toyama Institute of Health, Toyama, Japan

<sup>6</sup>Public Health Research Institute of Kobe City, Hyogo, Japan

<sup>7</sup>Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health, Okayama, Japan

<sup>8</sup>Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, Miyazaki, Japan

<sup>9</sup>Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

We collected 86 unrelated clinical *Legionella pneumophila* strains that were isolated in Japan during the period 1980–2008. Most (80.2%) belonged to serogroup 1, followed by serogroups 5, 3 and 2. Interestingly, the patients with *L. pneumophila* serogroup 1 had a significantly higher male-to-female ratio (12.4) than the patients with other *L. pneumophila* serogroups (2.0) (OR, 10.5; 95% CI, 2.5–44.5). When the serogroup 1 strains were analysed by monoclonal antibody (mAb) typing, the most prevalent subgroup was Benidorm (34.9% of all isolates). Moreover, 79.7% of the serogroup 1 isolates were bound by mAb 3/1, which recognizes the virulence-associated epitope. When all 86 isolates were subjected to sequence-based typing (SBT) using seven loci, they could be divided into 53 sequence types (STs). The ST with the most isolates (seven) was ST1, to which most isolates from patients and environments around the world belong. However, six of the seven ST1 isolates were isolated before 1994. Other major STs were ST306 ( $n=6$ ), ST120 ( $n=5$ ) and ST138 ( $n=5$ ). All ST306 and ST138 isolates, except for one isolate (ST306), were suspected or confirmed to be derived from bath water, which suggests that these strains prefer bath habitats. The sources of all ST1 and ST120 isolates remain unclear. By combining the SBT and mAb data, the 86 isolates could be divided into 59 types (discrimination index, 0.984). This confirms the usefulness of this combination in epidemiological studies.

Received 11 November 2009

Accepted 21 February 2010

†The members of the Working Group for *Legionella* in Japan are listed in Acknowledgements.

**Abbreviations:** EWGLI, European Working Group on *Legionella* Infections; SBT, sequence-based typing; ST, sequence type.

A supplementary table showing the sequence types, serogroups and monoclonal antibody subtypes of Japanese clinical isolates of *Legionella pneumophila* is available with the online version of this paper.

## INTRODUCTION

Legionellosis is caused by *Legionella* species, which are environmental Gram-negative bacteria. To date, 52 species of *Legionella* have been described (Kuroki *et al.*, 2007). The species that is most commonly found in the environment and also causes the most disease is *Legionella pneumophila* (Yu *et al.*, 2002). To aid the epidemiological surveillance of legionellosis, *L. pneumophila* isolates can be divided into serogroups by antisera that recognize differences on the

LPS molecules. At present, 15 serogroups have been identified (Brenner *et al.*, 1988). Serogroup 1 is responsible for the majority of human infections (Yu *et al.*, 2002) and its subgroups can be delineated by six monoclonal antibodies (mAbs) that recognize specific epitopes (Helbig *et al.*, 1997). *L. pneumophila* isolates can also be characterized by sequence-based typing (SBT) using the six loci (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS* and *proA*) proposed by the European Working Group on *Legionella* Infections (EWGLI; <http://www.ewgli.org/>) (Gaia *et al.*, 2005). Recently, to enhance the delineation of *L. pneumophila* strains, a seventh allele, *neuA*, has been added in SBT (Ratzow *et al.*, 2007).

In Japan, National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases data indicate that hot springs and public baths but not cooling towers are the major sources of *Legionella* infections (Infectious Disease Surveillance Center, 2000). Indeed, there have been four large outbreaks in public bath facilities (Kuroki *et al.*, 2009).

In our previous study (Amemura-Maekawa *et al.*, 2005), we analysed 27 epidemiologically unrelated *L. pneumophila* serogroup 1 isolates (ten from cooling towers, ten from public spas and/or hot spring baths, and seven from patients with public bath-related infections) from Japan by SBT using the six alleles proposed in 2005 by the EWGLI. The 27 isolates could be divided into 14 sequence types (STs). Notably, the 10 isolates from the cooling towers all showed the same allele types, namely *flaA* (1), *pilE* (4), *asd* (3), *mip* (1), *mompS* (1) and *proA*(1), whereas the public bath-derived isolates were more diverse.

Here, to further characterize clinical *L. pneumophila* isolates from Japan and to confirm the usefulness of the mAb- and SBT-based classification methods, we analysed 86 isolates by both typing methods.

## METHODS

***L. pneumophila* strains.** We analysed 86 clinical isolates of *L. pneumophila* that were isolated in Japan during the period 1980–2008. Of these, 42 clinical *Legionella* isolates were from the *Legionella* Reference Center, which collects *Legionella* isolates obtained in six representative prefectural/municipal public health institutes of each district in Japan. The remaining 44 isolates were from the collection of the National Institute of Infectious Diseases, Department of Bacteriology I (NIIB). Of the 86 isolates, 84 were from unrelated cases. The remaining two isolates were obtained from the same patient but belonged to different serogroups (NIIB 2136 and NIIB 2137; Supplementary Table S1 in JMM Online). Nosocomial cases were defined as those in patients who had been hospitalized, and travel-associated cases were defined as those in patients who had spent at least one night away from home before onset of the symptoms. The incubation period was set to 2–10 days, but this depended on the discretion of the physician who notified a patient with legionellosis. Because previous studies (Infectious Disease Surveillance Center, 2000; Kuroki *et al.*, 2009) have indicated that the major sources of *Legionella* infections are public baths without taking into consideration whether or not the infected individuals had engaged in previous travelling or not, the relationship between travelling and legionellosis has not been under active consideration.

Outbreaks were defined as two or more cases for which there was strong epidemiological evidence of a common source of infection, with or without microbiological evidence. The 86 isolates included one representative isolate from each of the 12 *Legionella* outbreaks; all of the outbreaks were community-acquired, of which four were major outbreaks (Kuroki *et al.*, 2009).

**Serogrouping and mAb subgrouping.** Serogrouping of the isolates was performed by slide agglutination tests using a monovalent serum for *L. pneumophila* serogroups 1–15 (Denka Seiken). Serogroup 1 and 5 isolates were then subtyped serologically by using mAbs as described previously (Helbig *et al.*, 1997).

**DNA manipulation, sequencing and sequence typing.** Genomic DNA was extracted by using a High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics) and amplified by using the GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) and previously described reaction mixtures and conditions (Amemura-Maekawa *et al.*, 2005; Gaia *et al.*, 2005). Both strands of the amplicons were sequenced by a model 3100, 3130 or 3130xl ABI Sequencer (Applied Biosystems). The nucleotide sequences obtained were confirmed and the allele numbers were determined using the online Sequence Quality Tool of the EWGLI website (Underwood *et al.*, 2006). Putative novel variants were submitted to the site 'Sequence Quality Tool' for verification and assignment of new allelic numbers. New combinations of allelic numbers were also submitted to the curators via the EWGLI website for assignment of new ST numbers. In this study, the isolates that failed amplification of *neuA* (indicated allele number as '0') were not given ST numbers but were allocated arbitrary numbers that start with J (J1, J2, etc.). A minimum spanning tree was generated by BioNumerics software (version 5.1; Applied Maths) using as parameters the categorical coefficient of similarity and the priority rule of the highest number of single-locus variants.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Patient age, gender and sources of isolates

The mean and median age of the 85 legionellosis patients (72 males, 10 females and 3 unknown cases) was 59.2 and 60 years, respectively (range 0–81; excluding the three patients whose ages were unknown). It has been shown previously that many more males than females contract legionellosis (Infectious Disease Surveillance Center, 2008; Neil & Berkelman, 2008; Ng *et al.*, 2008), although the reasons for this are unclear. There were seven nosocomial cases (8.2%), eight travel-associated cases (9.4%), 49 community-acquired cases (57.6%) and 21 cases for which the source could not be identified (24.7%). The source of infection for 35 of the 85 patients was suspected to be public bathing facilities ( $n=30$ , 35.3%), many of which apparently had circulation systems and 25 of which used hot-spring waters, domestic baths ( $n=2$ ), a shower ( $n=1$ ), a humidifier ( $n=1$ ) and a cooling tower ( $n=1$ ). The sources of the infection for 16 of these 35 cases were indeed confirmed to be public baths ( $n=15$ ) and a humidifier ( $n=1$ ) by comparing the PFGE DNA patterns (Amemura-Maekawa *et al.*, 2005) of the clinical isolates to those of environmental isolates from the suspected origin of the infection at prefectural/municipal public health institutes. The sources of infection of the remaining 50 cases (61.2%) are unknown. In addition, 12 isolates (14.1%) were

derived from 12 individual outbreaks, of which 9, 1, 1 and 1 outbreaks occurred at public bath facilities (hot-spring waters were used at eight of the nine facilities and tap water was used at the remaining one), a nursing home (Maesaki *et al.*, 1992), the cooling tower of a waste-processing plant (Isozumi *et al.*, 2005) and the spa of a cruise ship (Kura *et al.*, 2006) (Supplementary Table S1), respectively.

## Serogroups

The majority of the isolates ( $n=69$ , 80.2%) belonged to serogroup 1, including 11 of 12 outbreak-derived isolates. Two, five, one, seven (including the remaining one outbreak-derived isolate), one and one isolate(s) belonged to serogroups 2, 3, 4, 5, 6 and 9, respectively (Supplementary Table S1). The majority of the male patients (87.5%) were infected with serogroup 1 strains whereas only 40% of the female patients were infected with serogroup 1 strains. Thus, the serogroup 1-infected patients were significantly more likely to be male (male:female ratio=12.4) than the patients infected with isolates belonging to other serogroups (male:female ratio=2.0; OR, 10.5; 95% CI, 2.5–44.5). The reasons for this difference remain to be elucidated.

## mAb subgroups

Of the 69 serogroup 1 isolates, 79.7% ( $n=55$ ) had the virulence-associated epitope that is recognized by mAb 3/1 and is not present on any other serogroups (Helbig *et al.*, 2002). Thus, of the 86 *Legionella* isolates, 64.0% were mAb 3/1-positive, which is similar to the frequency of 66.8% reported by the pan-European study. The 69 serogroup 1 isolates belonged to the Benidorm (44.9%), Allentown/France (17.4%), OLDA (14.5%), Philadelphia (10.1%), Knoxville (7.2%), Oxford (4.4%) and Bellingham (1.5%) mAb subgroups. The distribution of mAb subgroups in Japanese isolates differs from that in pan-European isolates, which most frequently have the Philadelphia subgroup (28.5%) and then the Benidorm subgroup (20.0%) (Helbig *et al.*, 2002). Eleven of the 12 outbreak-derived isolates were mAb 3/1-positive (the single serogroup 5 outbreak-derived isolate lacked this marker).

## STs

The 86 clinical isolates could be divided into 53 STs (discrimination index, 0.979) (Hunter & Gaston, 1988), though amplification of the *neuA* target failed for eight isolates of serogroups 2, 4 and 5 (Table 1 and Supplementary Table S1). The minimum spanning tree illustrates the distribution of the STs (Fig. 1). The tree has seven clonal complexes. The ST with the largest number of isolates was ST1 (seven isolates). ST1 is the most prevalent ST in the world (Borchardt *et al.*, 2008; Cazalet *et al.*, 2008; Harrison *et al.*, 2009; Kozak *et al.*, 2009; Reimer *et al.*, 2010), although a Canadian study has reported that the prevalence

of ST1 clinical isolates has decreased dramatically during the past 12 years (Tijet *et al.*, 2010). Indeed, in our study, six of the seven known clinical ST1 strains were isolated before 1994, and it is now unusual to isolate clinical ST1 strains; thus, it is striking that the majority of environmental isolates from cooling tower water still belong to ST1 (Amemura-Maekawa *et al.*, 2005; Cazalet *et al.*, 2008). The next major STs were ST306 (six isolates), ST120 (five isolates) and ST138 (five isolates). Notably, all of the ST138 and ST306 isolates but one (ST306) were suspected or confirmed to be derived from public bath water, which suggests that these strains prefer bath habitats. Both ST138 and ST306 are unique to Japan according to data submitted to the EWGLI SBT database as of 12 January 2010. In contrast, the sources of all but one of the Japanese isolates belonging to ST1 and ST120 remain unclear (one isolate was suspected to come from shower water). Four isolates were ST23 strains, two of which (Supplementary Table S1, NIIB 292 and NIIB 374) were derived from two large public bath facility-associated outbreaks that affected hundreds of people (Nakamura *et al.*, 2003; Okada *et al.*, 2005). In Europe, clinical isolates often belong to ST23 (Borchardt *et al.*, 2008; Cazalet *et al.*, 2008). These major STs (ST1, ST23, ST120 and ST306), except for ST138, belonged to clonal complexes, and these STs were distinct from each other, with the exception of ST23 and ST120 (Fig. 1). ST430 and J2 had three isolates each, and the other seven STs had two isolates each (Table 1). The remaining 39 STs each had one isolate. Thirty-four of the 53 STs were unique to Japan as of 12 January 2010, including two SBT profiles that could not be assigned to STs because they failed *neuA* amplification (Table 1). With regard to the 12 outbreak-derived strains, two belonged to each of ST23, ST138 and ST139, and the remaining six belonged to different STs (ST2, ST36, ST89, ST142, ST434 and J4). Notably, for ST142, there was not only an outbreak-derived isolate but also another unrelated non-outbreak-derived isolate. Similarly, ST2, ST36 and ST89 isolates have also been found in patients elsewhere in Japan (unpublished results) and/or abroad, as Philadelphia 1 was typed to ST36 (Ratzow *et al.*, 2007).

The discrimination index (0.979) in our investigation was higher than that described in previous reports which were based on isolates from England and Wales (0.901; Harrison *et al.*, 2009), USA (0.946; Kozak *et al.*, 2009) and Canada (0.964; Reimer *et al.*, 2010). This may reflect the different infection sources in Japan: the main infection source was public bath water (Supplementary Table S1), whereas those of outbreaks in Europe were hot- or cold-water systems and cooling towers (Ricketts *et al.*, 2007). (There have been no reports for the dataset of the infection sources of sporadic cases in Europe, as far as we know.) The water of Japanese public baths is often obtained from hot springs. The characteristics of hot spring water, namely chemical features such as pH and temperature, are highly variable, whereas the water from hot- or cold-water systems and cooling towers tends to

**Table 1.** Sequence types of 86 Japanese clinical isolates of *Legionella pneumophila*

ST, Sequence type: seven-allele profile; J2 and J5, arbitrary numbers allocated to each unique six-allele profile without *neuA*; Others, STs each presented by only a single isolate.

ST	No. of isolates	%	mAb (no. of isolates)
Serogroup 1	69	80.2	
1	7	8.1	OLDA (6), Oxford (1)
306*	6	7.0	Benidorm
138*	5	5.8	Benidorm (4), Allentown/France (1)
120	5	5.8	Benidorm
23	4	4.7	Allentown/France (2), Philadelphia (1), Oxford (1)
122*	2	2.3	Benidorm
42	2	2.3	Benidorm
118*	2	2.3	Philadelphia
123*	2	2.3	Benidorm
139*	2	2.3	Allentown/France (1), Benidorm (1)
142*	2	2.3	Allentown/France
Others†	30	34.9	(Not shown)
Other serogroups (serogroup)	17	19.8	
430* (3)	3	3.5	
J2 (5)	3	3.5	Dallas (2), Cambridge (1)
J5 (5)	2	2.3	Dallas
Others‡ (2, 3, 4, 5, 6, 9)	9	10.5	(Not shown)
Total	86	100.0	

\*Described only in Japan as of 12 January 2010.

†Nineteen of 30 STs only in Japan as of 12 January 2010.

‡Seven of nine STs were described only in Japan as of 12 January 2010.

have rather similar characteristics due to similar water treatment procedures in addition to the environmental selective pressure. Thus, reflecting the wider array of *Legionella*-suitable environmental niches in Japan, the Japanese clinical isolates may be more genetically variable than Western isolates. This idea is supported by previous reports from our laboratory, which showed that Japanese isolates derived from public baths differ genetically from Japanese isolates derived from cooling towers (Amemura-Maekawa *et al.*, 2005, 2008).

### Combining sequence typing and mAb subgrouping

Some STs were composed of isolates belonging to the different mAb subgroups (and vice versa). Thus, six of the seven ST1 isolates were OLDA subgroup ( $n=6$ ) and the remaining ST1 isolate was an Oxford subgroup, while two of the four ST23 isolates were Allentown/France subgroup and the other two were Philadelphia and Oxford subgroups. All six ST306, all five ST120 and four of the five ST138 isolates were Benidorm subgroup. Moreover, in six of the seven STs, each of which consisted of two isolates, both isolates belonged to the same subgroup. By combining the SBT and subgrouping data, we could divide the 86 isolates into 59 types (discrimination index, 0.984) (Table 1 and Supplementary Table S1).

### Importance of *Legionella* isolation

Based on the Infectious Diseases Control Law, legionellosis in Japan has been classified as a category IV notifiable infectious disease and has been monitored by the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases (NESID) since 1999. Consequently, in Japan, physicians must notify the authorities about legionellosis cases. In 2008, 884 legionellosis cases were reported, which represents a remarkable fivefold increase in the previous 5 years (Infectious Disease Surveillance Center, 2008). However, this increase is thought to be due to the widespread use of a highly accurate urine antigen assay, which is easier to perform than the laborious and time-consuming process of isolating *Legionella* from the patients. From January 2003 to September 2008, 2460 legionellosis cases were reported, of which only 97 cases were diagnosed by the isolation of *Legionella* (Infectious Disease Surveillance Center, 2008). We collected 29 isolates during the same period. Therefore, our study may not entirely faithfully delineate the strains responsible for legionellosis in Japan. Health workers should isolate the bacterium from the patient and identify the infection source by genotyping the organism and comparing this genotype to those of environmental isolates from the surroundings of the patient.

The legionellosis incidence in Japan did not vary in a seasonal fashion (Infectious Disease Surveillance Center,



City Institute of Public Health and Environment; T. Koyama, Nagano Environmental Conservation Research Institute; K. Sugiyama, Shizuoka Institute of Environment and Hygiene; Y. Kanazawa, Shizuoka City Institute of Environmental Sciences and Public Health; N. Furuta, Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences; N. Agata, Nagoya City Public Health Research Institute; T. Kobayashi, Respiratory Division, Internal Medicine, Ichinomiyanishi Hospital; Y. Ito, Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University; M. Taguchi, Osaka Prefectural Institute of Public Health; H. Tsuji, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences; K. Ogata, Oita Prefectural Institute of Health and Environment; K. Horikawa, Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences; K. Uryu, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment; Y. Shimizu, Kitakyushu City Institute of Environmental Sciences; A. Saito, Japanese Red Cross Nagasaki Genbaku Isahaya Hospital; N. Ueno and S. Kubozono, Kagoshima Prefectural Institute of Environmental Research and Public Health.

## REFERENCES

- Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Chang, B. & Watanabe, H. (2005). *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol Immunol* **49**, 1027–1033.
- Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Chang, B., Suzuki-Hashimoto, A., Ichinose, M., Endo, T. & Watanabe, H. (2008). Distinct difference of *flaA* genotypes of *Legionella pneumophila* between isolates from bath water and cooling tower water. *Microbiol Immunol* **52**, 460–464.
- Borchardt, J., Helbig, J. H. & Lüch, P. C. (2008). Occurrence and distribution of sequence types among *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**, 29–36.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Epple, P., Bibb, W. F., McKinney, R. M., Starnes, R. W., Colville, J. M., Selander, R. K., Edelstein, P. H. & Moss, C. W. (1988). *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascalii* subsp. nov. *J Clin Microbiol* **26**, 1695–1703.
- Cazalet, C., Jarraud, S., Ghavi-Helm, Y., Kunst, F., Glaser, P., Etienne, J. & Buchrieser, C. (2008). Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res* **18**, 431–441.
- Fisman, D. N., Lim, S., Wellenius, G. A., Johnson, C., Britz, P., Gaskins, M., Maher, J., Mittleman, M. A., Spain, C. V. & other authors (2005). It's not the heat, it's the humidity: wet weather increases legionellosis risk in the greater Philadelphia metropolitan area. *J Infect Dis* **192**, 2066–2073.
- Gaia, V., Fry, N. K., Afshar, B., Lüch, P. C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R. & Harrison, T. G. (2005). Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **43**, 2047–2052.
- Harrison, T. G., Afshar, B., Doshi, N., Fry, N. K. & Lee, J. V. (2009). Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000–2008). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**, 781–791.
- Helbig, J. H., Kurtz, J. B., Pastoris, M. C., Pelaz, C. & Lüch, P. C. (1997). Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol* **35**, 2841–2845.
- Helbig, J. H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S., Lindsay, D., Lüch, P. C., Marques, T. & other authors (2002). Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**, 710–716.
- Hunter, P. R. & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* **26**, 2465–2466.
- Infectious Disease Surveillance Center (2000). Legionellosis, April 1999–July 2000. *IASR* **21**, 186–187.
- Infectious Disease Surveillance Center (2003). Legionellosis, April 1999–December 2002, Japan. *IASR* **24**, 27–28.
- Infectious Disease Surveillance Center (2008). Legionellosis, January 2003–September 2008, Japan. *IASR* **29**, 327–328.
- Isozumi, R., Ito, Y., Ito, I., Osawa, M., Hirai, T., Takakura, S., Iinuma, Y., Ichiyama, S., Tateda, K. & other authors (2005). An outbreak of *Legionella pneumonia* originating from a cooling tower. *Scand J Infect Dis* **37**, 709–711.
- Kozak, N. A., Benson, R. F., Brown, E., Alexander, N. T., Taylor, T. H., Jr, Shelton, B. G. & Fields, B. S. (2009). Distribution of *lag-1* alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J Clin Microbiol* **47**, 2525–2535.
- Kura, F., Amemura-Maekawa, J., Yagita, K., Endo, T., Ikeno, M., Tsuji, H., Taguchi, M., Kobayashi, K., Ishii, E. & Watanabe, H. (2006). Outbreak of Legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. *Epidemiol Infect* **134**, 385–391.
- Kuroki, H., Miyamoto, H., Fukuda, K., Iihara, H., Kawamura, Y., Ogawa, M., Wang, Y., Ezaki, T. & Taniguchi, H. (2007). *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. *Syst Appl Microbiol* **30**, 273–279.
- Kuroki, T., Ishihara, T., Ito, K. & Kura, F. (2009). Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan, with a special focus on *Legionella* concentrations in water. *Jpn J Infect Dis* **62**, 201–205.
- Maesaki, S., Kohno, S., Koga, H., Kaku, M., Yoshitomi, Y., Yamada, H., Matsuda, H., Higashiyama, Y., Hara, K. & other authors (1992). An outbreak of Legionnaires' pneumonia in a nursing home. *Intern Med* **31**, 508–512.
- Nakamura, H., Yagyu, H., Kishi, K., Tsuchida, F., Oh-Ishi, S., Yamaguchi, K. & Matsuoka, T. (2003). A large outbreak of Legionnaires' disease due to an inadequate circulating and filtration system for bath water – epidemiologic manifestations. *Intern Med* **42**, 806–811.
- Neil, K. & Berkelman, R. (2008). Increasing incidence of legionellosis in the United States, 1990–2005: changing epidemiologic trends. *Clin Infect Dis* **47**, 591–599.
- Ng, V., Tang, P., Jamieson, F., Drews, S. J., Brown, S., Low, D. E., Johnson, C. C. & Fisman, D. N. (2008). Going with the flow: legionellosis risk in Toronto, Canada is strongly associated with local watershed hydrology. *EcoHealth* **5**, 482–490.
- Okada, M., Kawano, K., Kura, F., Amemura-Maekawa, J., Watanabe, H., Yagita, K., Endo, T. & Suzuki, S. (2005). The largest outbreak of legionellosis in Japan associated with spa baths: epidemic curve and environmental investigation. *Kansenshogaku Zasshi* **79**, 365–374 (in Japanese).
- Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J. H., Fry, N. K. & Lüch, P. C. (2007). Addition of *neuA*, the gene encoding *N*-acetylneuraminidase cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus

sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 45, 1965–1968.

**Reimer, A. R., Au, S., Schindle, S. & Bernard, K. A. (2010).** *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29, 191–205.

**Ricketts, K. D., Joseph, C. A. & European Working Group for Legionella Infections (2007).** Legionnaires disease in Europe: 2005–2006. *Euro Surveill* 12, E7–E8.

**Sakamoto, R., Ohno, A., Nakahara, T., Satomura, K., Iwanaga, S., Kouyama, Y., Kura, F., Kato, N., Matsubayashi, K. & other authors (2009a).** Is a puddle on asphalt roads on rainy days a risk for Legionnaires' disease? *Emerg Infect Dis* 15, 1295–1297.

**Sakamoto, R., Ohno, A., Nakahara, T., Satomura, K., Iwanaga, S., Kouyama, Y., Kura, F., Noami, M., Kusaka, K. & other authors (2009b).** Is driving a car a risk for Legionnaires' disease? *Epidemiol Infect* 137, 1615–1622.

**Tijet, N., Tang, P., Romilowych, M., Duncan, C., Ng, V., Fisman, D. N., Jamieson, F., Low, D. E. & Guyard, C. (2010).** New endemic *Legionella pneumophila* serogroup I clones, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis* 16, 447–454.

**Underwood, A., Bellamy, W., Afshar, B., Fry, N. & Harrison, T. (2006).** Development of an online tool for the European Working Group for Legionella Infections sequence-based typing, including automatic quality assessment and data submission. In *Legionella: State of the Art 30 Years After Its Recognition*, pp. 163–166. Edited by N. P. Cianciotto, Y. Abu Kwaik, P. H. Edelstein, B. S. Fields, D. F. Geary, T. G. Harrison, C. A. Joseph, R. M. Ratcliff, J. E. Stout & M. S. Swanson. Washington, DC: American Society for Microbiology.

**Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C. M. & other authors (2002).** Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* 186, 127–128.



## 症 例

*Legionella pneumophila* serogroup 3 による呼吸器感染症の 4 症例<sup>1)</sup> 倉敷中央病院呼吸器内科, <sup>2)</sup> 国立感染症研究所細菌第一部

西山 明宏<sup>1)</sup> 石田 直<sup>1)</sup> 興梠 陽平<sup>1)</sup> 小西 聡史<sup>1)</sup>  
 坪内 和哉<sup>1)</sup> 伊賀 知也<sup>1)</sup> 國政 啓<sup>1)</sup> 岩破 将博<sup>1)</sup>  
 福山 一<sup>1)</sup> 仲川 宏昭<sup>1)</sup> 伊藤 明広<sup>1)</sup> 生方 智<sup>1)</sup>  
 吉岡 弘鎮<sup>1)</sup> 橋 洋正<sup>1)</sup> 有田真知子<sup>1)</sup> 橋本 徹<sup>1)</sup>  
 前川 純子<sup>2)</sup>

(平成 22 年 7 月 5 日受付)

(平成 23 年 5 月 6 日受理)

Key words: *Legionella pneumophila*, serogroup 3, respiratory infection

## 序 文

抗菌薬治療の発達にも関わらず、市中肺炎はいまなお高い罹患率と致命率を呈する重要な疾患である。なかでもレジオネラ属菌による肺炎は、重症化しやすく致命率の高い肺炎として知られている。欧米に比して、本邦でのレジオネラ症の頻度は低いとされてきたが、近年その報告数が増加してきている。その背景として 2003 年にレジオネラ尿中抗原迅速診断キットが保険適応となったこと、および感染症法の改訂によりレジオネラ症が感染症法 4 類の全数把握疾患に指定されたことが考えられる。

報告数が増加するにつれて、軽症と考えられるレジオネラ症例もしばしば認められるようになってきたが、その実態についてはいまだよく知られていない。また、レジオネラ症の多くは *Legionella pneumophila* serogroup 1 によるものであり、その他の血清群および菌種による報告は比較的少ない。また、肺炎以外のレジオネラ属菌による呼吸器感染症についての報告も稀である。

今回、我々は気道内定着の可能性も否定できないが、肺炎をはじめとする *Legionella pneumophila* serogroup 3 (以下 SG3) が検出された呼吸器感染症 3 例に加え、院内発症の 1 症例を経験したので、文献的考察を加え報告する。

## 症 例

## 症例 1

患者：66 歳・男性。

主訴：湿性咳嗽。

現病歴：2008 年 6 月中旬から、2 週間続く湿性咳嗽と鼻汁を認め、近医を受診し、感冒薬を処方されるも軽快なく当院を受診した。発熱はなく、咳嗽と粘度の低い喀痰を認めるのみであった。24 時間風呂や銭湯の使用、温泉への旅行歴はなく、周囲に同症状の患者も見られなかった。

既往歴：肺結核 (22 歳時)、高血圧、糖尿病 (経口血糖降下薬内服)、アルコール性肝障害。

嗜好歴：喫煙歴なし、20 歳から 60 歳まで缶ビール 2 缶 (1 缶 350mL)/日。

アレルギー歴：薬剤アレルギーなし、食物アレルギーなし。

初診時身体所見：血圧 124/60mmHg、体温 36.7°C、脈拍 68/分、呼吸回数 18 回/分、意識清明、胸部聴診上異常を認めず、その他に有意な所見なし

初診時検査所見：白血球 6,900/μL、CRP 22.0mg/dL、LDH 204IU/L、Na 136mEq/L、胸部単純レントゲン (Fig. 1) では右中肺野及び左下肺野にすりガラス様陰影を認めた。胸部 CT (Fig. 2) では両肺野に非区域性に網状影をともなうすりガラス影が多発しており、所謂 crazy-paving-appearance であった。

提出された喀痰は粘膿性で、Gram 染色では Gram 陰性小桿菌と口腔内常在菌を認めた。

治療経過：日本呼吸器学会市中肺炎ガイドライン<sup>1)</sup>による肺炎の重症度は軽症であった。非定型肺炎として妥当な画像であり、アジスロマイシン (以下 AZM) 500mg/日を 3 日間内服した。治療開始 4 日目で咳嗽、倦怠感、食欲は改善し、治療開始 15 日目に胸部レントゲン上での陰影と症状の消失を認めた。初診時の喀痰培養にて *Haemophilus influenzae* が 10<sup>6</sup>cfu/mL 培養

別刷請求先：(〒710-8602) 岡山県倉敷市美和 1-1-1

倉敷中央病院呼吸器内科

西山 明宏

平成 23 年 7 月 20 日

Fig. 1 Chest X-ray in case 1 showing bilateral ground-glass opacities.

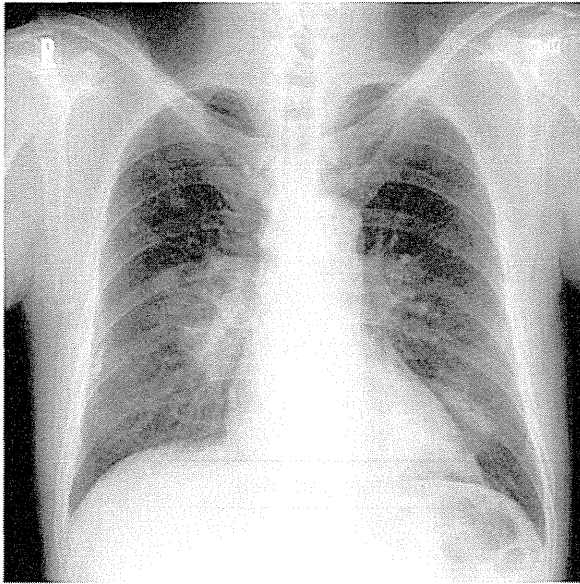
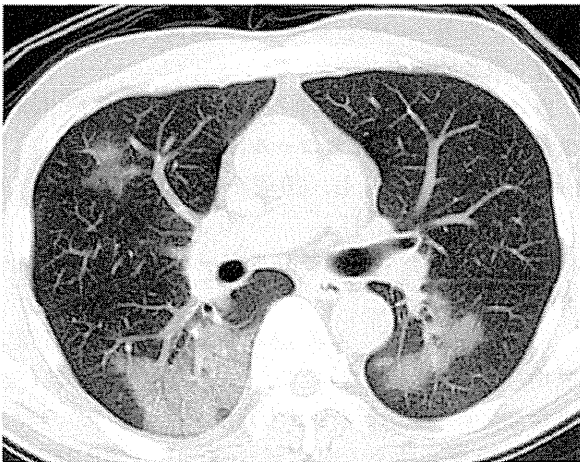


Fig. 2 Chest CT scan showing nonsegmental ground-glass opacities with reticular shadow in bilateral lung fields.



され AZM に感受性があった。その5日後に SG3 が少量培養された。外来で経過観察したが、症状の悪化は認めなかった。治療開始11日目にレジオネラ尿中抗原を検索したが陰性であった。

#### 症例 2

患者：58歳・女性。

主訴：湿性咳嗽。

現病歴：以前から感冒後で湿性咳嗽が遷延することを認めていたが、放置していた。2008年7月に検診で胸部異常陰影を指摘され、当院紹介となった。

既往歴：特記すべき事項なし。

嗜好歴：喫煙歴なし、飲酒歴なし。

Fig. 3 Chest X-ray showing miliary nodular shadows in the left lung field.

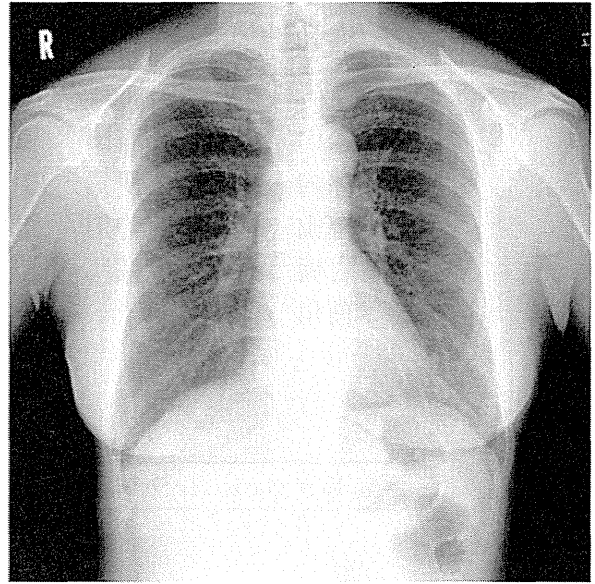
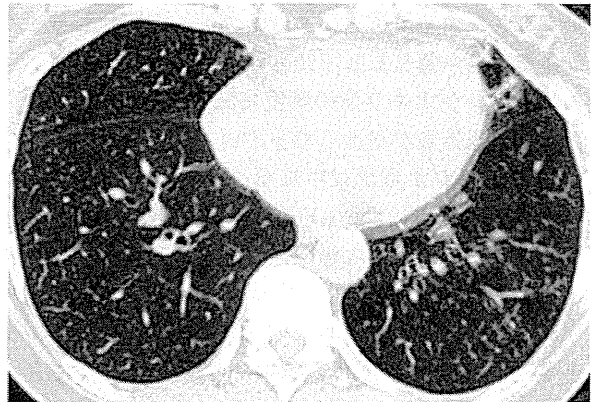


Fig. 4 Chest CT scan showing miliary nodular shadows and bronchiectasis in the left lung.



アレルギー歴：薬剤アレルギーなし、食物アレルギーなし。

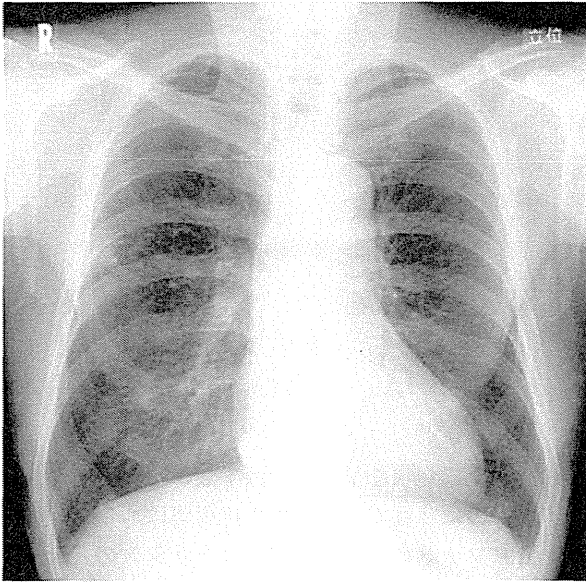
初診時身体所見：体温 37.0℃、脈拍 96/分、SpO<sub>2</sub> 98% (室内気)、聴診上左背側に coarse crackles と rhonchi を聴取、その他に有意な所見なし。

初診時検査所見：白血球 6,600/μL、CRP 0.11mg/dL、LDH 195IU/L、Na 139mEq/L、胸部単純レントゲン写真 (Fig. 3) では左中下肺野に粟粒大の粒状影を認めた。胸部 HRCT (Fig. 4) では左舌区ならびに左下葉に散在性の小粒状影と気管支拡張像を認めた。

提出された喀痰の性状は粘膿性で Gram 染色では口腔内常在菌と思われる Gram 陽性球菌を認めた。

治療経過：当初、非結核性抗酸菌症などの慢性気道感染を疑ったが喀痰の抗酸菌塗抹検査は陰性であった。下気道感染症として、AZM 500mg/日を投与し

Fig. 5 Chest X-ray showing small nodular shadows and consolidation in the right middle field.



湿性咳嗽はほぼ消失し、聴診所見も改善した。初診日から10日目に喀痰培養からSG3が検出されたが、レジオネラ尿中抗原は陰性であった。抗酸菌培養は陰性であった。4カ月後、CTを再検したところ、小粒状影は消失していた。

#### 症例 3

患者：79歳・男性。

主訴：胸部異常陰影。

現病歴：2004年から右中葉に陰影を指摘されていたが、近医で経過観察されていた。2008年8月に陰影の増強を認め、当院へ紹介受診となった。極く僅かに粘性の喀痰が喀出されたが、咳嗽、発熱などの症状は認めなかった。直近の旅行歴や入浴歴はないが、自宅浴槽の水は2、3日入れ替えなく使用していた。

既往歴：認知症。

嗜好歴：喫煙歴なし。

アレルギー歴：薬剤アレルギーなし、食物アレルギーなし。

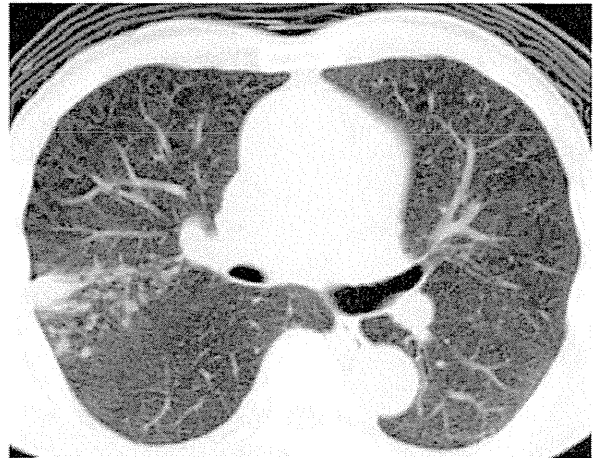
初診時身体所見：体温36.1℃、脈拍56/分、SpO<sub>2</sub> 98%（室内気）、呼吸音正常、その他有意な所見なし。

初診時検査所見：白血球5,400/μL、CRP 0.03mg/dL、LDH 224IU/L、Na 145mEq/L。胸部単純レントゲン写真（Fig. 5）では右中肺野外側に粒状影を認めた。胸部CT（Fig. 6）では右S2b領域に気道散布性の粒状影と浸潤影を認めた。

提出された喀痰は粘性でGram染色では口腔内常在菌と思われるGram陽性球菌を認めた。抗酸菌塗抹は陰性であった。

治療経過：画像上は非結核性抗酸菌症を疑わせる所

Fig. 6 Chest CT scan showing small nodular shadows along respiratory tract and consolidation in the right S2 segment.



見であり、症状がないため経過を追った。しかし、初診時に採取した誘発喀痰からSG3が培養されたので、AZM 500mg/日を3日間投与した。初診から1カ月後の喀痰の性状に変化はなく、再検するとSG3は消失していた。2カ月後の胸部単純レントゲン写真では右中肺野の粒状影は軽快していた。抗酸菌に関しては、初診時の喀痰から培養されなかったが、1カ月後に再検した喀痰から *Mycobacterium avium* complex (MAC) が培養された。またレジオネラ属菌検出後、尿中抗原を検索したが陰性であった。

#### 症例 4

患者：60歳・女性。

主訴：呼吸困難、発熱。

現病歴：2009年6月より当院血液内科にて多発性骨髄腫の治療を受けていた。2010年2月に骨髄移植目的に入院。移植後にサイトメガロウイルス感染症、生着症候群、血球貪食症候群、出血性膀胱炎・ヒトポリオーマBKウイルス腎症、腎後性腎不全からの心不全などを発症し、加療されていた。4月下旬に呼吸状態の悪化と発熱を認め、酸素投与を開始したが、翌日に呼吸状態はさらに増悪し、集中治療室にて気管挿管・人工呼吸器管理となり呼吸器内科に紹介された。気管挿管後に検体採取のために気管支鏡にて気管支洗浄を施行し、同検体からSG3のみが培養された。

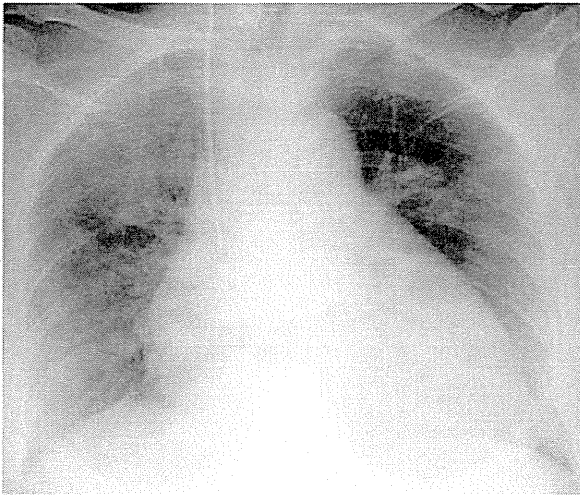
既往歴：特記すべき事項なし。

嗜好歴：喫煙・飲酒なし。

アレルギー歴：薬剤アレルギーなし、食物アレルギーなし。

気管挿管時身体所見：体温38.8℃、脈拍94/分、SpO<sub>2</sub> 94%（ベンチュリーマスク12L 50%）、呼吸回数32回/分、両肺野でcoarse cracklesを聴取、下腿浮腫を

Fig. 7 Chest X-ray showing extensive bilateral ground-glass opacities and cardiomegaly.



軽度認め、その他有意な所見はなかった

気管挿管時検査所見：白血球 5,900/ $\mu$ L (Seg 80.0%, Band 14.0%, Eos 0.0%, Baso 0.0%, Lym 5.0%, Mono 1.0%), CRP 17.47mg/dL, LDH 42IU/L, Na 142mEq/L, 胸部単純レントゲン写真 (Fig. 7) では、右下肺野に有意な濃度上昇と心陰影の拡大を認めた。胸部CT (Fig. 8) では肺野末梢を除きびまん性に高吸収域となった。

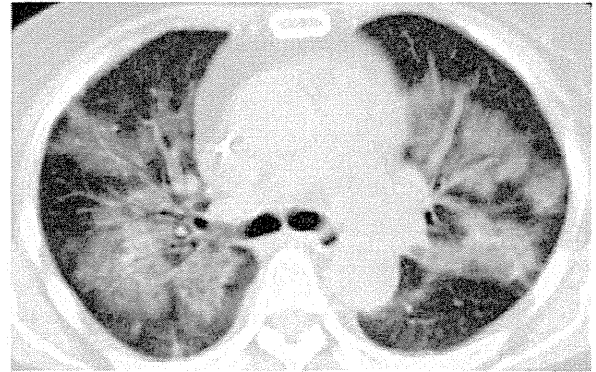
治療経過：挿管直後に気管支洗浄を行い、検体を細菌検査に提出していたが、6日後にSG3が培養された。出血性膀胱炎・BKウイルス腎症に対してシプロフロキサシン（以下CPFX）400mg/日が投与されていたが、AZM 500mg/日を追加した。しかしながら胸部レントゲン上、肺炎像の改善はなく呼吸状態は徐々に増悪し38°C台の発熱も遷延し、集中治療室に入室してから2週間で死亡された。

#### 考 察

迅速診断法の普及と全国的にサーベイランスが実施されるようになったことにより、本邦でのレジオネラ症の届出数は増加し、2008年には884例の届出があった<sup>2)</sup>。当院でも、2007年以前に経験したレジオネラ症は年間1~3例であり、肺炎例では市中肺炎入院患者の2%前後であったが、2008年は年間8例に増加し、全国的な傾向と一致していた。このうち3例が今回報告したSG3による軽症例である。

レジオネラ症は急速に進行に進展し、重症化する可能性のある致死率の最も高い呼吸器感染症の一つであるが、最近の循環式給湯式公衆浴場での集団発生の検討から、軽症レジオネラ症例も比較的多いことが報告されている<sup>3)</sup>。その報告では、軽症レジオネラ肺炎を8例検討し、全例において38°C以上の発熱を認めて

Fig. 8 Chest CT scan showing diffuse bilateral ground-glass opacities with sparing of peripheral regions.



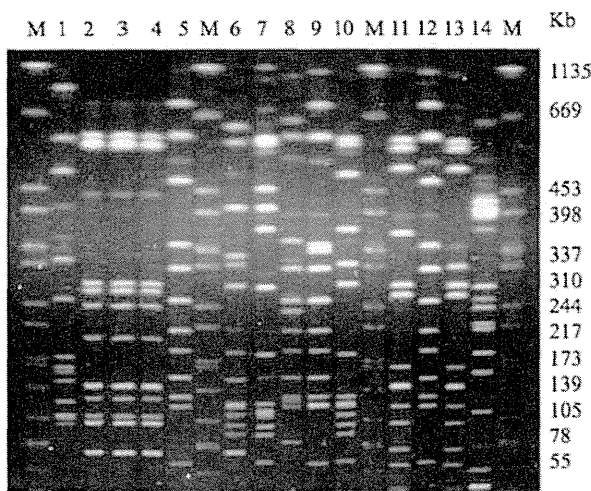
いる。呼吸器症状を呈したのは半数の4例、基礎疾患を有するのは2例であり、使用抗菌薬はエリスロマイシンとリファンピシン、レボフロキサシンの組合せが大半であった。またレジオネラ肺炎の早期において10%に胸部異常陰影が認められなかったという報告<sup>4)</sup>、39例のレジオネラ肺炎のうち8名は重症肺炎ではなかったという報告<sup>5)</sup>がある。

今回経験した4症例のうち、症例1は市中肺炎であった。インフルエンザ桿菌の有意な菌量が培養されているので細菌感染が持続したものと考えられるが、画像所見は非定型肺炎に合致したものであった。他の2症例は慢性の気道感染症を疑わせるもので、特に症例3は肺MAC症と診断されている。呼吸器症状も乏しいので、呼吸器検体からレジオネラ属菌が検出されたからといってレジオネラ急性感染症とすることには疑問があるかもしれない。一般には臨床検体からレジオネラ属菌が検出されたら、少量であっても起炎菌とされているが、慢性の気道感染症でcolonizationのような状態があるのか今後検討する必要がある<sup>6)</sup>。症例4は免疫抑制状態の患者に発症した院内肺炎症例であった。サイトメガロウイルス肺炎やニューモシチス肺炎の関与を除外する必要がある。当初からこれら病原体に対する予防策は施行され、また血清マーカーが陰性であることから、それらの関与を否定的とした。気道にcolonizationしていたレジオネラ属菌は宿主の免疫系が進行性に障害された時点で病原性を増すという報告もあり<sup>7)</sup>、症例4の病態を示唆しているかもしれない。尚、院内環境調査を実施したが、同菌の検出はみられなかった。

レジオネラ肺炎の原因菌の多くは*L. pneumophila* SG1であり、全体の84.2%と報告されている<sup>8)</sup>。その他の菌種では、*L. pneumophila longbeachae*等が続き、SG3の頻度は1.0%にしかすぎない。

本邦におけるSG3の報告はこれまでに1995年と

Fig. 9 Restriction profiles of *Legionella pneumophila* serogroup 3 digested by *Sfi*I using pulsed-field gel electrophoresis. Electrophoresis condition was as follows: a linearly ramped switching time from 5 to 50 s was applied for 19 hr at 6 v/cm and 14°C. Isolates of lane 1 and lanes 5-14 are epidemiologically unrelated with isolates of lanes 2-4 in Okayama. Lane 1, NIIB 0167, a clinical isolate; lane 2, NIIB 2503 (K76), a clinical isolate; lane 3, NIIB 2504 (K89), a clinical isolate; lane 4, NIIB 2505 (K95), a clinical isolate; lane 5, NIIB 2535, a clinical isolate; lane 6, NIIB 0818, an environmental isolate from bath water; lane 7, NIIB 1150, an environmental isolate from bath water; lane 8, NIIB 1245, an environmental isolate from bath water; lane 9, NIIB 1623, an environmental isolate from bath water; lane 10, NIIB 1686, an environmental isolate from bath water; lane 11, NIIB 2064, an environmental isolate from bath water; lane 12, NIIB 2100, an environmental isolate from bath water; lane 13: NIIB 2423, an environmental isolate from hot water supplier; lane 14, NIIB 1612, an environmental isolate from cooling tower water; M, marker, *Salmonella* Braenderup H9812/*Xba*I.



2005年に報告された2例<sup>9)10)</sup>のみであり、症例数が少なく、SG3の臨床像については検討されていない。また海外においては、4名の患者が造血幹細胞移植後にSG3が院内肺炎の起炎菌となったことが報告されている<sup>11)</sup>。

レジオネラ肺炎では早期診断・早期治療が救命率を上げる重要なポイントであり、ガイドラインでは迅速診断キットの使用を推奨している<sup>1)</sup>。レジオネラ尿中抗原迅速診断キットの特異度は97.1%と報告しているものもあるが、注意すべきは*L. pneumophila* serogroup1しか検出しないことであり、すべてのレジオネラを含めるとその感度は80%まで下がる<sup>12)</sup>。またレジオネラ肺炎を臨床像から鑑別するWinthrop

University Hospital criteriaがあり、有効性が報告されている<sup>13)</sup>。

今回経験した4症例のうち3症例は当初、レジオネラ肺炎を念頭に治療介入する必要があるような緊急性はなく、うち2症例は胸部異常陰影を主訴に無症状で来院した。レジオネラ属菌はルーチンの細菌検査では培養されないため、見逃されている症例が多いと危惧されているが、当院の細菌検査室では肺炎が疑われる呼吸器感染症の検体は全例WYO-α培地でレジオネラ属菌の培養を試みており、このため今回の4症例の診断しえた。

レジオネラ属菌は細胞内寄生菌であり、マクロファージやアメーバ内で増殖する。レジオネラ属菌のライフサイクルは鞭毛形成発現と大きく関り、鞭毛形成の無いタイプはwild typeと比べて感染性が減弱する<sup>14)</sup>。この4症例の臨床分離菌株を国立感染症研究所でSequence-Based Typing (SBT)に従って遺伝子解析を行い、いずれも同一の型(ST93)であることが判明した。鞭毛形成に関しては位相差電子顕微鏡を用いればその有無を確認できるが、この4症例についての鞭毛形成の有無は不明である。また症例4を除く、3症例の菌株の同一性を検討するべくパルスフィールド電気泳動を行い、3株とも同一パターンを示しており、同一の汚染環境を疑うところではあるが、感染源の同定には至らなかった(Fig. 9)。

診断に至る一助として、画像所見がある。レジオネラ肺炎の胸部画像所見に関してはYagyuらによる検討にて軽症レジオネラ肺炎のCT所見として、consolidationとすりガラス陰影の混在などを挙げ<sup>3)</sup>、SakaiらはHRCT所見を検討し、consolidation intermingled with GGOとしている<sup>15)</sup>。症例1は非定型肺炎パターンであり、レジオネラ肺炎を鑑別疾患として十分考慮できるものであるが、症例1はインフルエンザ桿菌肺炎が続発しているため、インフルエンザ桿菌による修飾は受けた可能性はある。症例2, 3の画像所見は非結核性抗酸菌症等の慢性気道疾患に類似したものであり、レジオネラ症の陰影とは考えにくい。治療介入にて陰影の改善を認めている事は、非結核性抗酸菌症がAZM内服で改善したとも考えられ、一概にレジオネラ症が気管支肺炎像をとるとは言えない。前述のYagyuらの報告<sup>3)</sup>では軽症レジオネラ肺炎の画像所見で慢性気道感染、気管支肺炎像を呈したものはなかった。症例4は、心不全の合併が疑われるため画像上正確な評価は困難と思われる。

外来治療が可能であった3症例にはAZMを使用し、院内肺炎の1症例にはAZMとCPFXを使用した。また軽症例に関しては、内服抗菌薬テリスロマイシンが有効であった報告もある<sup>16)</sup>。

最近では、レジオネラ症発症頻度は、夏（6月～8月）と秋（9月～11月）に比較的高い傾向がある<sup>17)</sup>とされており、その他に月間降水量の増加<sup>18)</sup>やレジオネラ肺炎が発症する6日から10日前に認められる高い湿度<sup>19)</sup>との関連も取り上げられている。今回報告した3例の症状発現の時期は6月から8月の夏場であった可能性がある。病歴・画像所見だけではなく、軽症例の存在や特定の季節発症の存在を知ることで、ルーチンにレジオネラ属菌を狙った培養検査をしない施設においても、レジオネラ症を疑い特殊検査を施行することが診断向上につながるかもしれない。

外来治療が可能であったSG3による軽症の呼吸器感染症3症例とSG3による院内肺炎の1例を報告した。日常臨床でこのような軽症のレジオネラ症が存在すること、さらにレジオネラ属菌は院内肺炎の重要な起炎菌であることを認識し、レジオネラ症も指向した検査を行う必要があると思われる。

#### 文 献

- 1) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会：成人市中肺炎診療ガイドライン。日本呼吸器学会，東京，2005。
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：感染症発生動向調査，感染症報告数 1999—2009。
- 3) Yagyu H, Nakamura H, Tsuchida F, Sudou A, Kishi K, Ohishi S, *et al.* : Chest CT findings and clinical features in mild Legionella pneumonia. *Int Med* 2003 ; 42 : 477—82.
- 4) Tan MJ, Tan JS, Hamor RH, File TM Jr, Brreiman RF, the Ohio Community-based Pneumonia Incidence Study Group : The radiologic manifestations of Legionnaire's disease. *Chest* 2000 ; 116 : 398—403.
- 5) Heath CH, Grove DI, Looke DFM : Delay in appropriate therapy of Legionella pneumonia associated with increased mortality. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis* 1996 ; 15 : 286—90.
- 6) Marrie TJ, Bezanson G, Haldane DJ, Burbridge S : Colonization of the respiratory tract with *Legionella pneumophila* for 63 days before the onset of pneumonia. *J Infect* 1992 ; 24 : 81—6.
- 7) Ditommaso S, Giacomuzzi M, Gentile M, Rugenini Moiraghi A, Arione R, Baldi S : Legionella colonization of the respiratory tract in patients without nosocomial exposure. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008 ; 29 : 470—1.
- 8) Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A : Distribution of legionella species and serogroups Isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis : an international collaborative survey. *J Infect Dis* 2002 ; 186 : 127—8.
- 9) Nozue T., Chikazawa H., Miyashita S., Shimazaki T., Oka R., Shimazaki S., *et al.* : Legionella pneumonia associated with adult respiratory distress syndrome caused by *Legionella pneumophila* serogroup 3. *Intern Med* 2005 ; 44 : 73—8.
- 10) Shiota R, Takeshita K, Yamamoto K, Imada K, Yabuuchi E, Wang L : *Legionella pneumophila* serogroup 3 isolated from a patient pneumonia developed after drowning in bathtub of a hot spring spa. *Kansenshougaku Zasshi* 1995 ; 69 : 1356—64.
- 11) Oren I, Zuckerman T, Avivi I, Finkelstein R, Yigla M, Rowe JM : Nosocomial outbreak of *Legionella pneumophila* serogroup 3 pneumonia in a new bone marrow transplant unit : evaluation, treatment and control. *Bone Marrow Transplant* 2002 ; 30 : 175—9.
- 12) Helbig JH, Uldum SA, Luck PC, Harrison TG : Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urine Antigen EIA. *J Med Microbiol* 2001 ; 50 (6) : 509—16.
- 13) Gupta SK, Imeriale TF, Sarosi GA : Evaluation of Winthrop-University Hospital Criteria to Identify Legionella Pneumonia. *CHEST* 2001 ; 120 : 1064—71.
- 14) Heuner K, Steinert M : The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of virulent phenotype. *Int. J. Med. Microbiol.* 2003 ; 293 : 133—43.
- 15) Sakai F, Tokuda H, Goto H, Tateda K, Johkoh T, Nakamura H, *et al.* : Computed tomographic features of *Legionella pneumophila* pneumonia in 38 cases. *J Comput Assist Tomogr* 2007 ; 31 : 125—31.
- 16) 伊藤明広，富岡広海，磯部昌憲，山本 剛，大西 尚，多田公英，他：テリスロマイシンが有効であったレジオネラ肺炎の3例。感染症誌 2006 ; 80 : 418—22.
- 17) Neil K, Berkelman R : Increasing incidence of legionellosis in the United States, 1990-2005 : changing epidemiologic trends. *Clin Infect Dis* 2008 ; 47 : 591—9.
- 18) Hicks LA, Rose CE Jr, Fields BS, Dress ML, Engel JP, Jenkins PR, *et al.* : Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis. *Epidemiol Infect* 2007 ; 135 : 811—8.
- 19) Fisman DN, Lim S, Wellenius GA, Caroline Johnson C, Britz P, Gaskins M, *et al.* : It's not the heart, it's the humidity : wet weather increases legionellosis risk in the greater Philadelphia metropolitan area. *J Infect Dis* 2005 ; 192 : 2066—73.

Four Cases of Respiratory Infections Caused by *Legionella Pneumophila* Serogroup 3

Akihiro NISHIYAMA<sup>1)</sup>, Tadashi ISHIDA<sup>1)</sup>, Youhei KOUROGI<sup>1)</sup>, Satoshi KONISHI<sup>1)</sup>, Kazuya THUBOUCHI<sup>1)</sup>,  
Chiya IGA<sup>1)</sup>, Kei KUNIMASA<sup>1)</sup>, Masahiro IWASAKU<sup>1)</sup>, Hajime HUKUYAMA<sup>1)</sup>, Hiroaki NAKAGAWA<sup>1)</sup>,  
Akihiro ITOU<sup>1)</sup>, Satoshi UBUKATA<sup>1)</sup>, Hiroshige YOSHIOKA<sup>1)</sup>, Hiromasa TACHIBANA<sup>1)</sup>,  
Machiko ARITA<sup>1)</sup>, Toru HASHIMOTO<sup>1)</sup> & Junko AMEMURA-MAEKAWA<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>Department of Respiratory Medicine, Kurashiki Central Hospital. <sup>2)</sup>Department of Bacteriology I,  
National Institute of Infections Disease

*Legionella* pneumonia tends to be severe and is known to be fatal. Introduction of the urinary *Legionella* antigen test and changes in the Infectious Disease Law have led to increased numbers of reports, and milder cases are now occasionally seen. We experienced three cases demonstrating mild respiratory infections and one case demonstrating nosocomial pneumonia associated by *Legionella pneumophila* serogroup 3. Case 1 showed multiple ground-glass opacities on HRCT and productive cough. Cases 2 and 3 showed abnormal findings on chest X-ray, and chest CT findings in both cases suggested chronic respiratory infection. Case 4 experienced fever and hypoxia, and pulmonary edema was noted on X-ray. All of them four cases were diagnosed with respiratory infections isolated *L. pneumophila* serogroup 3 by culture results, and three of them cases were treated in the outpatient clinic. Thus, milder cases of *Legionella* pneumonia may be encountered during routine care, and tests for *Legionella* should be performed in such cases.

[J.J.A. Inf. D. 85 : 373~379, 2011]

## 解 説

## 基 礎

## レジオネラ感染の分子機構と診断法の進歩

前川 純子 倉 文明

**要 旨** レジオネラ属菌は本来アメーバや繊毛虫の細胞内で増殖する環境細菌であるが、経気道感染し、“accidental pathogen”としてヒトのマクロファージ内で増殖することができる。遺伝子解析技術の進展に伴い、代表菌種である *Legionella pneumophila* について病原性の解明が進んだ。*L. pneumophila* は、本来の宿主である原生生物から水平伝播により獲得したと考えられる 100 種類以上のエフェクタータンパク質を宿主細胞内に分泌して、自己の増殖に有利になるように宿主の細胞伝達系を操作するという複雑な機構を有する。また、菌株間の遺伝的多様性が極めて高く、エフェクタータンパク質のレパートリーが株間で大きく異なっていることが分ってきた。臨床分離株の遺伝子型別の結果からもその多様性が明らかになり、遺伝子型別法は感染源の解明にも有用だと考えられる。

前川 純子 倉 文明：レジオネラ感染の分子機構と診断法の進歩，呼吸 30(2)：124—128，2011

キーワード： *Legionella pneumophila* 細胞内寄生細菌 尿中抗原 SBT(sequence-based typing)

## はじめに

レジオネラ症の起原菌であるレジオネラ属菌は本来、河川、湖沼、土壌などに生息し、環境中では自由生活性アメーバや繊毛虫などの細菌捕食性単細胞生物の細胞内に寄生し、増殖する。本菌を含むエアロゾルをヒトが吸い込み、経気道感染を起こすことがある。その場合、アメーバと似た食作用をもつ肺中のマクロファージのなかで増殖し、肺炎を引き起こされる(レジオネラ肺炎)。感冒様の症状のポンティアック熱という病態で留まる場合もある。ヒトからヒトへの感染はない。

レジオネラ属菌の代表菌種である *Legionella pneumophila* は、1976年7月に米国フィラデルフィアのホテルで開催された在郷軍人会(the American Legion)の州総会

で起きた重症肺炎の集団感染の起原菌として発見された<sup>1)</sup>。近年、水冷式空調設備、給湯設備等の人工水系が発達してきたが、それらの適切な衛生管理が行われなかった場合、本菌の増殖を招き、レジオネラ症の発生へとつながる。したがって都市生活の人工水系に起因するとされるレジオネラ症が認識されているのは先進国のみであり、発展途上国での実態は殆ど不明である。米国での集団感染もホテル空調の冷却塔水が感染源であった。その後、現在までに 50 種以上のレジオネラ属菌が同定されているが<sup>2)</sup>、本菌種の半数以上は環境中からのみ分離されており、ヒトへの病原性が報告されているのはおよそ 4 割である。レジオネラ症の起原菌のおよそ 9 割が *L. pneumophila* で、さらにその 8 割以上が 15 ある血清群のうちの血清群 1 によるものである<sup>3)</sup>。

## I. 病原性

レジオネラ属菌の病原性については *L. pneumophila* での解析が進んでいる<sup>4)</sup>。病原性の本質はマクロファージでの殺菌抵抗性にある。*L. pneumophila* がマクロファ-

Molecular mechanism of *Legionella* infection and improved diagnosis of legionellosis

国立感染症研究所細菌第 1 部

Junko Amemura-Maekawa and Fumiaki Kura

Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan



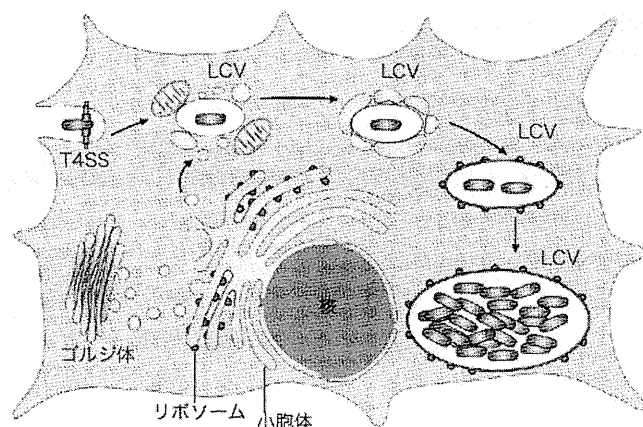


図1 *L. pneumophila* のマクロファージあるいはアメーバ内での増殖の様子  
T4SS: type four secretion system, LCV: Legionella-containing vacuole  
(Isberg RR, et al<sup>5)</sup>. *Nature Reviews* 7:2009 より引用, 改変)

ジに取り込まれて形成される食胞 (*Legionella*-containing vacuole, LCV) は、小胞体から分泌される小胞と融合し、小胞体マーカータンパク質を獲得し、初期においては酸性化やリソゾームとの融合が阻止され、殺菌されない。LCV の周囲にはミトコンドリアが接近している像も観察される。さらに *L. pneumophila* が増殖している LCV には粗面小胞体が集積し、LCV 膜にはリボソームが点在しており、栄養を供給していると考えられる。LCV は *L. pneumophila* が自ら作り出したその増殖にふさわしい環境であり、宿主細胞内が菌でいっぱいになるまで増殖が進むと LCV 膜および宿主細胞膜が破裂し、菌体が飛び出し、感染を広げてゆく (図1)<sup>5)6)</sup>。

*L. pneumophila* は感染に際して、自身の作るIV型分泌装置(T4SS)を用いて、エフェクターと呼ばれる複数のタンパク質を宿主細胞に分泌する。T4SSは *dot/icm* 遺伝子群にコードされる20数種のタンパク質からなる複雑な構造体で、菌体の細胞膜を貫通している。*dot/icm* 遺伝子群は、そこに突然変異が生じると、LCVの周りに細胞内小器官が集まってこなくなり (defect in organelle trafficking, *dot*)、宿主細胞内で増殖 (intracellular multiplication, *icm*) ができなくなることから、レジオネラの病原性に寄与する遺伝子群として見出された<sup>7)8)</sup>。*dot/icm* 変異体が病原性を失っているのは、その変異によってT4SSが不完全になり、宿主細胞に働きかけるエフェクタータンパク質が宿主細胞質に分泌されなくなるためである。エフェクタータンパク質の多くは、宿主膜輸送系にかかわる因子を様々な段階で制御するものである。似た機能をもつエフェクタータンパク質がゲノム上に複数コードされているため、突然

変異体を用いた解析は進まなかったが、ゲノム解析技術の進展により、現在では100種類以上のエフェクタータンパク質が存在し、そのレパートリーは株により異なることが分ってきた<sup>9)10)</sup>。エフェクタータンパク質は真核生物特有のモチーフを有しているものが多く、本来の宿主であるアメーバや繊毛虫のゲノムから水平伝播により遺伝子を獲得したと考えられている<sup>11)</sup>。そのために宿主細胞の情報伝達系に働きかけることができ、*L. pneumophila* の増殖に都合のよい環境を作り上げる。

## II. 臨床

レジオネラ肺炎は消化器症状を伴う率が高く、中枢神経症状を起こすこともある点などに特徴があるが、他の細菌性肺炎との区別は困難である。したがって、発症の2~10日前にレジオネラ属菌に汚染された水で経気道感染を起こす機会がなかったか、また、通常の細菌性肺炎治療薬が効果を奏さないことなどがレジオネラ肺炎診断の契機となる。患者は50歳以上の高齢者が多く、小児は極めて少ない。また男性の患者が8割強を占め、その理由は不明だが、危険因子である喫煙、飲酒歴と関連があるという指摘もある。その他、糖尿病などの基礎疾患が危険因子となる。適切な治療を行わないと急速に悪化することがあるため、成人市中肺炎診療ガイドラインにおいては、エピソードにかかわらず、入院治療患者へのレジオネラ尿中抗原検査が奨励されている<sup>12)</sup>。

レジオネラ属菌はグラム陰性桿菌だが、細胞内寄生細菌であるため、塗抹標本ではグラム染色されにくく、ヒメネ

ス、アクリジンオレンジなどの特殊染色で検出される。また、血液寒天培地などの通常の培地には生育しないため、本菌の分離を念頭において、専用培地による培養を行わなければならない。本菌の鉄要求性やシステイン要求性に応えた専用の BCYE $\alpha$  培地、あるいはそれにさらに他の細菌や真菌の生育を抑える薬剤を加えた選択培地を用いる。

治療には細胞内透過性のよい抗菌薬を用いる必要がある。そのため  $\beta$  ラクタム剤は MIC 上で感受性であっても無効である。マクロライド系、フルオロキノロン系が選択される。現在のところ薬剤耐性菌の報告はない。

### Ⅲ. わが国での現状

レジオネラ症は感染症法に基づく感染症発生動向調査において医師に全数届出が義務づけられている 4 類感染症で、2004 年までは 100 症例前後だったが、尿中抗原検査の普及に伴い届出数が急増し<sup>13)</sup>、2007 年以降は 600~900 症例を推移している。

海外の集団感染事例の感染源は空調の冷却塔水によるものが大半だが、日本の集団感染事例の殆どが循環設備をもった入浴施設で起こっており、入浴好きの国民性を反映している。したがって、旅行歴や温泉の入浴歴などからレジオネラ感染を疑うことができるが、届出症例からみるとむしろ感染源不明の事例が多い。また、毎年 7 月が患者発生ピークとなっており、この季節性は湿度と関連していると考えられ<sup>14)</sup>、認識されていない季節性を示す感染源があるのかもしれない。

レジオネラ症の確定診断のためには、臨床的特徴があり、なおかつ菌の分離、あるいはレジオネラ特異的な抗原、遺伝子、抗体などを検出することが必要である。尿中抗原陽性での診断例が 2008 年には 95% を超え<sup>15)</sup>、培養、血清抗体価の測定、PCR による確定診断は極めて少ない。起原菌が *L. pneumophila* 血清群 1 以外の場合、殆ど尿中抗原陰性となり、尿中抗原検査だけでは診断がつかないため注意を要する。レジオネラ属菌を広く検出できる遺伝子増幅法を用いた体外診断薬が 2010 年に承認されたので、有効な方法として期待される。また、レジオネラ症患者発生時に感染源を解明するためには、臨床検体から菌を分離し、患者周辺の環境から分離された菌株との異同を確認する必要がある。したがって、抗原や遺伝子による診断に留まらず、臨床検体から菌を分離することは非常に重要である。

### Ⅳ. 分子疫学

感染源を明らかにするための分子疫学的手法としては、

パルスフィールドゲル電気泳動が現在のところ最も優れている。これは菌株のゲノム DNA を数個から数十個に制限酵素を用いて切断し、DNA 断片を電気泳動により分離・視覚化し、得られるバンドパターンを比較する方法である。分別能に優れ、感染源と推定される環境からの分離株と患者分離株、あるいは患者同士の分離株を比較するのに適している<sup>15)</sup>。しかし、再現性に乏しく(手技者の技量に依存するところが大きい)、異なる実験間で得られたデータの比較が難しいなどの問題がある。

近年、各種病原細菌で行われるようになった MLST (multilocus sequence typing) は、7~8 個の遺伝子の一部領域の塩基配列を決定し、番号をふって型別を行う方法である (<http://www.mlst.net>)。塩基配列決定が以前と比べて簡単に安価に行えるようになり普及してきたが、菌株ごとのデジタルデータが得られ、異なる地域や時期の菌株の比較が容易である。MLST には、変異の度合いに経過した時間が比例すると考えられる生育に必須なハウスキーピング遺伝子が用いられるが、*L. pneumophila* の場合、ハウスキーピング遺伝子を用いると多様性に欠けるため、鞭毛遺伝子やタンパク質分解酵素遺伝子など生育に必須でないもの、*mip* 遺伝子のように病原性に関係すると考えられている遺伝子も使われている。そのため通常の MLST と区別するために SBT (sequence-based typing) という名称が用いられている<sup>16)17)</sup>。方法は一元化され、データベースも運用されている ([http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php))。2010 年 10 月現在、日本を含め、約 40 カ国、4,600 株、910 sequence type のデータが登録されている。

筆者らは、日本各地の温泉や冷却塔水から分離された *L. pneumophila* について SBT を行ったところ、温泉分離株は多型であるのに対し、冷却塔水分離株は遺伝的に比較的均一であることを見出した<sup>18)</sup>。さらに、わが国における 86 株の *L. pneumophila* 臨床分離株の SBT を行ったところ 53 の遺伝子型に分かれ、SBT の型別法としての有用性が確認できた(図 2)。臨床分離株の遺伝的多様性が欧米諸国に比べ高く、欧米とは異なる感染源である浴槽水からの分離株の多様性を反映している可能性がある<sup>19)</sup>。

### おわりに

レジオネラ肺炎が認識されるようになって 30 年余り、稀な疾患だと考えられていたが、現在では、全数届出が義務づけられている 4 類感染症のなかでレジオネラ症は最多の疾患である。環境細菌であるレジオネラ属菌が、循環式

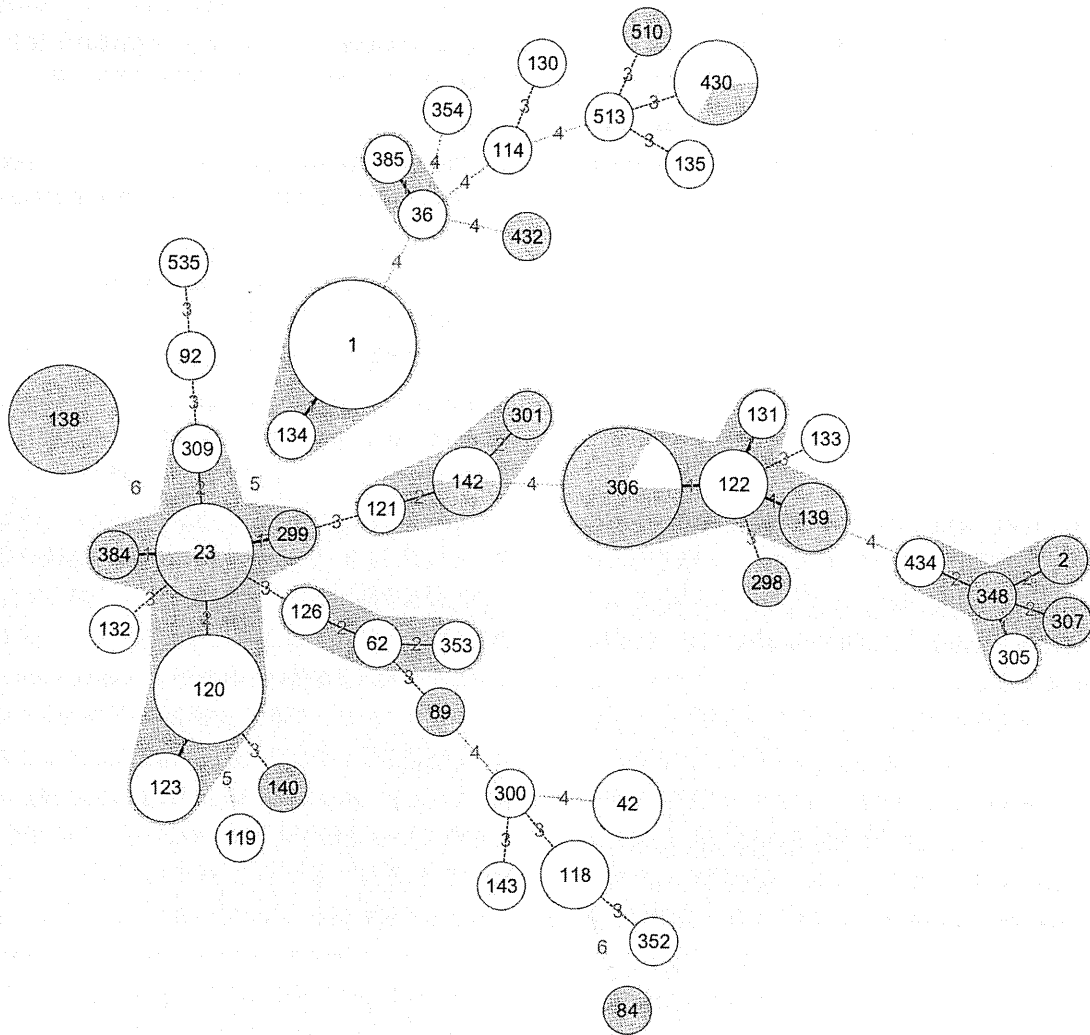


図2 7つの遺伝子座により決められた日本の *L. pneumophila* 臨床分離株の遺伝子型の分布図

調べた臨床分離株は1980~2008年にかけて、すべて独立の事例で得られた。それぞれの円中の数字は7つの遺伝子座の塩基配列により一義的に定められた遺伝子型(ST)番号である。円の大きさはそれぞれのST番号を有する株数を表している。ST1は7株、ST306は6株、ST120とST138は5株ずつである。円と円を結ぶ線上の数字はST間で配列の異なる遺伝子数を示しており、1つないし2つの遺伝子座のみが異なる遺伝的に似通っているSTの集団(クローナルコンプレックス)は大小7つ存在しており、周囲を灰色に塗って示されている。円の一部あるいは全部が灰色に塗られているのは感染源が浴槽水と確定あるいは推定されている患者に由来する株であり、白色は感染源不明株であることを示す。したがって、ST138やST306の株が分離された患者の感染源は殆どが浴槽水であるのに対し、ST1やST120の株が分離された患者の感染源はすべて不明であることが分る。

(Amemura-Maekawa J, et al<sup>19)</sup>. *J Med Microbiol* 59: 2010 より引用)

浴槽や冷却塔のような身近な人工水系に混入するのを防ぐことは不可能である。人工水系の管理が不十分で水中の細菌が増えると、それを捕食するアメーバが繁殖し、最終的にはレジオネラ属菌が増殖する。それを防ぐために消毒剤の使用が推奨されているが、バイオフィームが形成されると消毒剤が届かなくなり、レジオネラ属菌などの温床とな

るため、物理的清掃によるバイオフィームの除去も重要である。レジオネラ症に対するワクチンも開発されていない現在、一番有効なレジオネラ症の予防法は、人工水系の適切な衛生管理である。また、レジオネラ肺炎に罹患した場合は、迅速な診断に基づき適切な抗菌薬の投与が必要であることはいうまでもない。

## 文 献

- 1) Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDate JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med* 90 : 656—658, 1979
- 2) Kuroki H, Miyamoto H, Fukuda K, Iihara H, Kawamura Y, Ogawa M, Wang Y, Ezaki T, Taniguchi H. *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. *Syst Appl Microbiol* 30 : 273—279, 2007
- 3) Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Cheresky A. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* 186 : 127—128, 2002
- 4) 宮本比呂志. レジオネラ属菌の細菌学. 防菌防黴 38 : 99—111, 2010
- 5) Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews* 7 : 13—24, 2009
- 6) Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev* 23 : 274—298, 2010
- 7) Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA. Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 9607—9611, 1992
- 8) Berger KH, Isberg RR. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 7 : 7—19, 1993
- 9) Burstein D, Zusman T, Degtyar E, Viner R, Segal G, Pupko T. Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog* 5 : e1000508, 2009
- 10) Schroeder GN, Petty NK, Mousnier A, Harding CR, Vogrin AJ, Wee B, Fry NK, Harrison TG, Newton HJ, Thomson NR, Beatson SA, Dougan G, Hartland EL, Frankel G. *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *J Bacteriol* 192 : 6001—6016, 2010
- 11) Brüggemann H, Cazalet C, Buchrieser C. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol* 9 : 86—94, 2006
- 12) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会. 「呼吸器感染症に関するガイドライン」成人市中肺炎診療ガイドライン: 2007
- 13) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課. <特集>レジオネラ症 2003.1~2008.9. 病原微生物検出情報 29 : 327—328, 2008
- 14) Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, Kura F, Kato N, Matsubayashi K, Okumiya K, Yamaguchi K. *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. *Emerg Infect Dis* 15 : 1295—1297, 2009
- 15) Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of pulsed-field gel electrophoresis agarose plugs for the analysis of *Legionella isolates*. *Jpn J Infect Dis* 62 : 54—56, 2009
- 16) Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 43 : 2047—2052, 2005
- 17) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 45 : 1965—1968, 2007
- 18) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol Immunol* 49 : 1027—1033, 2005
- 19) Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, Watanabe H; Working Group for Legionella in Japan. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *J Med Microbiol* 59 : 653—659, 2010