

# レジオネラ症

令和7年3月1日改訂

## 目次

レジオネラ症の概説.....	4
検査に関する一般的注意.....	5
検査材料の採取、輸送および保存.....	6
1. 臨床検体.....	6
2. 環境検体.....	6
検査の進め方.....	7
届出の基準.....	7
検査方法.....	10
1. 分離.....	10
1) 分離培養法.....	10
(1) 非選択分離培地（BCYE $\alpha$ 寒天培地）.....	11
(2) 選択分離培地（抗菌剤含有の BCYE $\alpha$ 寒天培地）.....	12
2) 臨床検体からのレジオネラ属菌の検出法.....	15
3) 環境検体からのレジオネラ属菌の検出法.....	15
(1) ろ過濃縮法.....	16
(2) 冷却遠心濃縮法.....	16
4) 検体の前処理.....	16
(1) 熱処理法.....	17
(2) 酸処理法.....	17
(3) 熱処理後酸処理法.....	17
5) 接種.....	18
6) 斜光法.....	18
7) 確認培養.....	19
8) アメーバ共培養法.....	19
2. 菌体の検出.....	22
1) ヒメネス染色.....	22
2) 蛍光抗体法.....	23
3. 同定.....	25
1) 特異抗血清を用いた同定法.....	25
2) 核酸を用いた同定法.....	26

(1) PCR 等による <i>L. pneumophila</i> およびレジオネラ属菌の同定 .....	26
(2) マルチプレックス PCR による <i>L. pneumophila</i> 血清群の同定 .....	28
(3) シークエンスによる同定 .....	30
(4) 疫学マーカーとしての <i>lag-1</i> 遺伝子の検出.....	33
4. 核酸の直接検出 .....	34
1) 臨床検体 .....	34
2) 環境検体 .....	35
5. 菌抗原の検出 .....	39
1) 尿中抗原の検出 .....	39
6. 血清抗体価の測定 .....	40
1) 間接蛍光抗体法 (Indirect immunofluorescence assay: IFA) .....	40
2) マイクロプレート凝集反応 .....	42
3) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) .....	44
7. 分子疫学的解析 .....	45
1) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法.....	45
2) Sequence-Based Typing (SBT) 法.....	46
3) Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) 法.....	51
引用文献 .....	52
検査依頼先 .....	59
執筆者一覧 .....	59
図 1. <i>Legionella sp.</i> の分離, 同定手順.....	62
図 2. 分離培地上の集落観察 (暗所推奨) .....	63
図 3. 1 個の大きな <i>L. pneumophila</i> 血清群 1 と 2 個の <i>L. cherrii</i> .....	63
図 4. 同じ分離培地での可視光と長波長紫外光による観察.....	63
図 5. 凝集反応の判定図.....	64
図 6. マルチプレックス PCR (M-PCR) による <i>L. pneumophila</i> 血清群の同定.....	64
表 1. レジオネラ属菌の基準株と血清群および自発蛍光.....	65
表 2. 2008 年～2016 年に国立感染症研究所で収集されたレジオネラ属菌の臨床分離株 .....	68

## レジオネラ症の概説

レジオネラ症はレジオネラ (*Legionella*) 属菌が原因で起こる感染症の総称で、予後良好なポンティアック熱型と重症例の多い肺炎型 (レジオネラ肺炎) に分類される。

ポンティアック熱型は、5～66 時間の潜伏期後、発熱、悪寒、筋肉痛、関節痛、倦怠感、頭痛など風邪症状を示すが、3～5 日で回復することが多い<sup>1,2)</sup>。

肺炎型は進行が早いのが特徴で、2～10 日の潜伏期の後、初期には全身倦怠感、頭痛、筋肉痛などで始まり数日以内に 39℃以上の高熱、乾性咳ときに湿性咳、胸痛、膿性痰、呼吸困難といった呼吸器疾患の症状が現れ、しばしば 48 時間以内に重症化する。また、四肢の振せん、意識混濁などの神経症状が現れることもある<sup>3,4)</sup>。

レジオネラ属菌は好気性のグラム陰性桿菌で、土壌や河川、湖沼などに生息する環境細菌である。そのような自然水系、あるいは空調設備の冷却塔水、循環式浴槽水、給湯器の水といった人工水系中に生息する細菌捕食性のアメーバやテトラヒメナに寄生、増殖すると考えられている。ヒトがこれらの水から発生したレジオネラ属菌を含むエアロゾルや粉塵を吸入することにより経気道感染が起こり、ヒト体内ではマクロファージの中で増殖することが知られている。高齢者や新生児、免疫不全患者などがレジオネラ症のリスクグループである。免疫不全者の場合には、肺炎の劇症化と多臓器不全が起こることがある。

1976 年の米国フィラデルフィアで開催された在郷軍人 (the Legion) 大会における集団肺炎の起原菌として、レジオネラ属菌の基準種である *Legionella pneumophila* が新科 (*Legionellaceae*) 新属新種として 1979 年に命名されて以来、レジオネラ属菌の菌種は 60 種以上 (表 1、<http://www.bacterio.net/legionella.html>)、および *Legionella pneumophila* の 3 亜種 (*fraseri*, *pascullei*, *pneumophila*) が知られている。*L. lytica*、*L. drancourtii* は今のところアメーバでしか培養できない。なお *Legionella* 属を *Legionella*、*Fluoribacter*、*Tatlockia* の 3 属に分けることが提案され国際細菌命名規約において認められているが普及していない。レジオネラ属菌のうち、臨床検体からの分離および血清抗体価の上昇によりヒトへの病原性が示唆された菌種は 30 種で、環境から分離、同定されたのちに、ヒトへの病原性が認められたものも多く、ほとんどのレジオネラ属菌に潜在的に病原性があると考えられる。なお、本邦の医療機関におけるレジオネラ症診断に際してのレジオネラ尿中抗原検査の実施率は 98%以上で<sup>5)</sup>、2008 年～2016 年までに国立感染症研究所で収集された臨床分離株のほとんどは *L. pneumophila* SG1 となっている<sup>6)</sup> (表 2)。

## 検査に関する一般的注意

レジオネラ属菌は P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従い検査を実施する。すなわち、患者または疑わしい患者由来の検査材料、関連した環境水などを取り扱う際にはレベル 2 の施設を備えた検査室で行う。本菌は飛沫感染するので、エアロゾル発生のある作業は安全キャビネットの中で行う<sup>7)</sup>。エアロゾルや跳ねを生じさせる可能性のある操作としては、ピペットからの吹き出し、遠心、すりつぶし、攪拌、強い振とうや混合、超音波破碎、病原体等が入っている缶内圧が外の圧より高くなっているときの開缶作業、感染組織を採り出す等の場合がある。

## 検査材料の採取、輸送及び保存

### 1. 臨床検体

菌を分離培養する場合には、抗菌薬投与前に採取された検体を使用することが望ましいが、抗菌薬投与後も検査可能である。喀痰、気管支肺胞洗浄液、気管内吸引物、胸水、肺組織などの呼吸器由来の検体が主として用いられるが、心嚢液、髄液、血液なども分離培養のための検体となりうる。臨床検体は滅菌容器に採取し、乾燥を避ける。喀痰などでは常在菌がレジオネラの発育を阻害するので、直ちに塗抹検鏡と培養検査を開始することが望ましい。必要に応じて菌の遺伝子の検出も行う。

抗体価測定のための血清は発症初期および2～3週間後のペア血清を採取するとよい。陰性の場合には5～6週間後の血清も検査する。尿中抗原検出のための尿は発症初期から採取可能である。

いずれの臨床検体も0～4℃で輸送、保存し、原則として2日以上保存する際は-70～-80℃で凍結保存する。ただし尿中抗原検出のための尿は2～8℃で2週間保存でき、それ以上は-20℃で保存可能である。

### 2. 環境検体

冷却塔水、浴槽水、給湯水などの検水は滅菌したポリエチレンビン等に500 mL採取する。塩素を含む検水には25%チオ硫酸ナトリウムを1/500量加えて中和する。市販の滅菌ハイポ入採水瓶を用いると便利である。採水に際して、柄杓等を利用して採水ビンに直接検水が触れないようにし、種類、採水部位、日時、設備の型式、水温、pH値、残留塩素濃度などを必ず記録する。

冷却塔では、直接落下水を採取するか、受け皿の中央で水の表層分を採取する。浴槽水は中央部で無菌的に採取する。水道の蛇口、シャワーヘッドなどは滅菌スワブでよく拭いたものを検体とすることも可能である。一例としては、PBS 1～2 mLに拭い取ったスワブを入れボルテックスで混和する。ボルテックス後のPBSを検体とする。PBSの他にリン酸緩衝液、生理食塩水など、市販キットも使用可能である。

検体は採取後速やかに、直射日光を避けて6～18℃で輸送し、2日以内に検査を実施することが望ましい。残余の検水は4～8℃で保存しておき、再検査を含め5日以内に検査を実施する。

## 検査の進め方

尿検体からは可溶性抗原の検出を行い、血清を用いた抗体価の測定も行われる。その他の臨床検体からは培養による菌の分離や PCR 等による遺伝子の検出が行われる。

感染源として疑われる環境検体からの菌の分離は疫学的に重要である。分離培養の他に PCR 等による遺伝子の検出も行われる。

## 届出の基準

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第 12 条第 1 項及び第 14 条第 2 項に基づく届出の基準等については、次のようになっている。

(<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-04-39.html>)

### (1) 定義

*Legionella* 属菌 (*Legionella pneumophila* など) が原因で起こる感染症である。

### (2) 臨床的特徴

在郷軍人病 (レジオネラ肺炎) とポンティアック熱が主要な病型である。腹痛、下痢、意識障害、歩行障害などを伴うことがある。臨床症状で他の細菌性肺炎と区別することは困難である。

免疫不全者の場合には、肺炎の劇症化と多臓器不全が起こることがある。

なお、届出上の病型については、肺炎若しくは多臓器不全の認められるものを肺炎型とし、それ以外をポンティアック熱型とする。

### (3) 届出基準

#### ア 患者 (確定例)

医師は、(2) の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見からレジオネラ症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、レジオネラ症患者と診断した場合には、法第 12 条第 1 項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

#### イ 無症状病原体保有者

医師は、診察した者が(2)の臨床的特徴を呈していないが、次の表の左欄に掲げる検査方法により、レジオネラ症の無症状病原体保有者と診断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

#### ウ 感染症死亡者の死体

医師は、(2)の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、レジオネラ症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、レジオネラ症により死亡したと判断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

#### エ 感染症死亡疑い者の死体

医師は、(2)の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、レジオネラ症により死亡したと疑われる場合には、法第12条第1項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	肺組織、喀痰、胸水、血液、その他の無菌的 部位、気道分泌物
蛍光抗体法による病原体の抗原の検出	
酵素抗体法又はイムノクロマト法による病 原体の抗原の検出	尿
PCR法による病原体の遺伝子の検出	肺組織、喀痰、胸水、血液、その他の無菌 的部位、気道分泌物、尿
LAMP法による病原体の遺伝子の検出	喀痰
間接蛍光抗体法又はマイクロプレート凝集 反応による抗体の検出（ペア血清による抗 体陽転又は抗体価の有意の上昇で、少なく とも1回は128倍以上、又は単一血清で 256倍以上）	血清



なお、全般的な注意事項として、以下のように留意点が記載されている。

(1) 本通知に定める各疾患の検査方法については、現在行われるものを示しており、今後開発される同等の感度又は特異度を有する検査も対象となり得るため、医師が、本通知に定めのない検査により診断を行おうとする場合は、地方衛生研究所、国立感染症研究所等の専門の検査機関に確認すること。

(2) 医師が、病原体診断又は病原体に対する抗体の検出による診断を行う場合において、疑義がある場合は、地方衛生研究所、国立感染症研究所等の専門の検査機関に確認すること。

## 検査方法

### 1. 分離

分離、同定手順概略を図 1 に示した。臨床材料では抗菌剤使用の有無、種類を確認しておく。環境水の検査法はレジオネラ症防止指針第 5 版<sup>8)</sup>、公衆浴場の検査法は「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査法について」<sup>9)</sup>が参考になる。レジオネラ属菌は発育が遅く、検体からの初代分離には通常 3～6 日を要するので、それまでに他の細菌や真菌が過増殖すると、本菌群の発育が見られなくなることが多い。分離された菌が L-システイン不含 BCYE $\alpha$  寒天培地（一般的には血液寒天培地で代用されることが多いが、トリプトソイ寒天培地、普通寒天培地も利用できる）に発育しない場合、レジオネラ属菌とする。希に L-システイン不含培地上での発育が悪い菌株もあることから、さらに PCR 法等（3. 同定 2）核酸を用いた同定法参照）を併用することで、より高い精度での確認が可能となる。

夾雑菌の多い河川水や土壌からの分離には、アメーバを増殖させたプレートの上に環境水や土壌浮遊液を添加して培養するアメーバ共培養法が有効である（8）アメーバ共培養法）。レジオネラ症防止指針の「土壌からの分離」の項目も参照されたい<sup>8)</sup>。

#### 1) 分離培養法

レジオネラ属菌の培養は従来的一般細菌用培地では不可能で、現在 BCYE $\alpha$  寒天培地（buffered charcoal-yeast extract agar with 0.1%  $\alpha$ -ketoglutarate：非選択分離培地）が最もすぐれている。発育至適 pH は 6.90 $\pm$ 0.05、培養温度は 36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、酸素が十分存在する環境下で初代分離には 3 日以上を要する。2 日以内に形成された集落は、そのほとんどがレジオネラ属菌以外の細菌と考えられる。しかしながら、集落観察法によっては、培養 30～35 時間程度からレジオネラ属菌集落を観察できる場合もある（6）斜光法<sup>10)</sup>参照）。

検体には夾雑菌が混入している可能性があるので熱又は酸（夾雑菌が非常に多いと判断される場合は、熱及び酸）による前処理後、抗菌剤入りの選択分離培地へも接種する。なお、夾雑菌が多いと非選択分離培地である BCYE $\alpha$  寒天培地は役立たない場合が多く、選択分離培地を複数枚併用することで良い結果が得られやすい。また、熱、酸による効果も検体によって異なることから、併用することで良い結果が得られやすい<sup>11)</sup>。一方で、熱や酸による前処理や選択分離培地の抗菌剤が、レジオネラ属菌自体に影響を与えることも考えられ、採取された検体の状況により未処理や BCYE $\alpha$  寒天培地の併用を考慮すべきである。特に喀痰や咽頭拭い液以外の臨床検体や清掃消毒直後の浴槽水、浴槽から上

流域の温泉水、プール水、各種非濃縮検水等、比較的夾雑菌が少ないと考えられる環境水検査においては、未処理や BCYE $\alpha$  寒天培地を併用することで好結果を得られる場合もある<sup>11,12)</sup>。

特に、レジオネラ症患者発生時の感染源特定のための検査等においては、検体の様々な状況に応じた適切な検査を実施する必要がある。ISO11731:1998 Water quality - Enumeration of *Legionella* が 2017 年 5 月に改訂され（以下「改訂 ISO 法」という。）たが、そこでも、環境水の状況に応じて、使用培地や前処理法を選択することが推奨されている。検体の状況に応じた検査の実施が、精度の高い結果に繋がると考える。

培養には数日間を必要とすることから、その間、培地の乾燥に注意をしなければならない。蓋付きの水切りバットの外側に純水等を入れ、内側に分離培地を入れて孵卵器に入れると良い。ビニル袋に分離培地と湿らせ丸めたペーパータオル等を入れ、口を結び（状況によって輪ゴムを利用）孵卵器に入れると場所をとらない。

レジオネラ属菌は灰白色湿潤集落を形成するが、実際の検査現場においては、分離培地上に夾雑菌が多数発育している場合や種々の灰白色湿潤集落が発育している場合が多く、その集落の選定がしばしば困難となる。このとき、分離培地上の発育集落に斜光を当て実体顕微鏡で観察すると、レジオネラ属菌は特徴的な外観構造（モザイク・カットグラス様）を呈する。効率よく集落を選定でき、より正確な定量結果の報告が可能となることから、この集落観察法（斜光法）の実施を推奨する。本法により選定された集落は、レジオネラ属菌である可能性が非常に高く、釣菌後の集落に対しては、グラム染色を行う必要はなく、L-システイン要求性の確認だけで良い。急ぐ場合は、斜光法とコロニーPCR の組み合わせによる対応が便利である<sup>13)</sup>。

#### (1) 非選択分離培地（BCYE $\alpha$ 寒天培地）

レジオネラ属菌は、一般的な細菌培養に用いる培地には発育することができない。そのため、レジオネラ属菌の培養には、発育に必須である鉄、L-システイン及び発育阻害物質を吸着するための活性炭末を加えた CYE（Charcoal yeast extract）寒天に、培地の緩衝性を高め発育時間を短縮する ACES Buffer、 $\alpha$ -ケトグルタル酸カリウムを添加した BCYE $\alpha$  寒天培地が用いられる。市販生培地や市販基礎培地に市販サプリメントを添加した培地が利用できる。

利用法：L-システイン要求性試験（7）**確認培養参照**）、釣菌後の培養、夾雑菌が少ないと推定される検体からの分離培養。

組成：

① 基礎培地

ACES Buffer	10 g
酵母エキス	10 g
水酸化カリウム	2.8 g
$\alpha$ -ケトグルタル酸	1 g
活性炭（ノリット A）	2 g
寒天（Bacto agar）	17 g
純水	980 mL

② L-システイン溶液

L-システイン塩酸塩	0.4 g
純水	約 10 mL

③ ピロリン酸第二鉄溶液

ピロリン酸第二鉄	0.25 g
純水	約 10 mL

作り方：基礎培地を 121°C、15 分間高圧滅菌の後、約 50°C に保温し、0.2～0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過滅菌した L-システインおよびピロリン酸第二鉄溶液を加え、シャーレに分注（最低でも 15 mL 以上とし 20 mL までを目安に）し、平板に固める。Difco 製の粉末基礎培地を利用して各種成分を添加する場合には、ACES Buffer などの量が少ないため、水酸化カリウムの量は 1 リットルあたりオートクレーブ前に 1.5 g 添加の条件が最適である。液体培地は基礎培地から寒天を除き、上述の方法で作製する。

(2) 選択分離培地（抗菌剤含有の BCYE $\alpha$  寒天培地）

選択分離培地は、BCYE $\alpha$  寒天培地に各種抗菌剤を加えて作られている。現在国内で市販され普及している主なものは、GVPC $\alpha$  寒天培地、MWY 寒天培地、WYO $\alpha$  寒天培地である。改訂 ISO 法では、選択分離培地として GVPC $\alpha$  寒天培地を推奨しているが、「新版レジオネラ症防止指針」<sup>14)</sup>にも記載されているとおり、レジオネラ純培養菌の浮遊液を用いて BCYE $\alpha$  寒天培地と比較した実験では、これら 3 種の選択分離培地の発育支持力に大差はなく、検体中に混在する細菌・真菌叢の抑制にどの選択剤が有用かにかかっている。実際の検査においては、検体中に混在する夾雑菌の抑制に有用な選択剤が特定できないことから、特に培地の種類は指定しない。なお、使用されている選択剤は、レジオネラ属菌の発育にも影響を与えている場合があるので注意すること。また、

培地の種類や製造業者の違いにより、形成集落の大きさ等に違いが見られる。検査者は、事前に自施設で使用している培地上でのレジオネラ属菌集落を経日的に観察し、集落の性状等を確認しておくこと。

利用法：夾雑菌が多い検体からのレジオネラ属菌の分離培養。

組成＜BCYE $\alpha$  寒天培地を基礎培地とした選択分離培地、1リットル当たり＞：

① GVPC $\alpha$  培地

ポリミキシシン B	80,000 U
バンコマイシン	1 mg
グリシン	3 g
サイクロヘキシミド	80 mg

② MWY 培地

ポリミキシシン B	50,000 U
バンコマイシン	1 mg
グリシン	3 g
アニソマイシン	80 mg
ブロムチモールブルー	10 mg
ブロムクレゾールパープル	10 mg

③ WYO $\alpha$  培地

ポリミキシシン B	100,000 U
バンコマイシン	5 mg
グリシン	3 g
アンホテリシン B	80 mg

④ BMPA $\alpha$  (PAC) 培地

ポリミキシシン B	80,000 U
セファマンドール	4 mg
アニソマイシン	80 mg

⑤ CCVC 培地

セファロチン	4 mg
コリスチン	16 mg
バンコマイシン	0.5 mg
サイクロヘキシミド	80 mg

⑥ PAV 培地

ポリミキシシン B	40,000 U
アニソマイシン	80 mg
バンコマイシン	0.5 mg

抗生物質含有の選択分離培地は、多数のものが報告されているが、その主なものを上記に示した。

レジオネラ属菌用の主要な生培地の入手先は以下のとおりである。

BCYE $\alpha$ 寒天平板 (非選択培地)	栄研化学、関東化学 (Oxoid 製品)、日本 BD、日研生物、シスメックスバイオメリユー、極東製薬工業、島津ダイアグノスティクス
WYO $\alpha$ 寒天平板 (選択培地)	栄研化学
GVPC 寒天平板 (選択培地)	メルク、関東化学 (Oxoid 製品)、日研生物、シスメックスバイオメリユー、極東製薬工業、島津ダイアグノスティクス
MWY 寒天平板 (選択培地)	関東化学 (Oxoid 製品)
CCVC 寒天平板 (選択培地)	日本 BD (受注品：最長 4 ヶ月の納期が必要)
PAC (BMPA $\alpha$ ) 寒天平板 (選択培地)	日本 BD (受注品：最長 4 ヶ月の納期が必要)
PAV 寒天平板 (選択培地)	日本 BD (受注品：最長 4 ヶ月の納期が必要)

その他、レジオネラ属菌粉末基礎培地 (関東化学：Oxoid 製品、BD BBL 製品、BD Difco 製品)、システインとピロリン酸鉄を含む発育サプリメント (関東化学：Oxoid 製品)、選択剤は GVPC $\alpha$ 、MWY、BMPA $\alpha$ 、GVPN $\alpha$  用が関東化学 (Oxoid 製品) から入手できる。GVPN $\alpha$  培地は、GVPC $\alpha$  培地に添加されているシクロヘキシミド (カビの発育抑制) のヒトに対する毒性が強いことから、ナタマイシンに置き換えられた培地である。なお、市販されている培地の名前が同じでも成分の量が減少していることがあるので注意が必要である。また、シスメックスバイオメリユーから粉末基礎培地 (ボトル培地) と発育サプリメント、BD Difco から発育サプリメントが発売されているが、受注品であり納期には時間を要する。

生培地は、製造業者の推奨温度で保存する。自家調製した培地は、4 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで保存する。保存中の乾燥や結露の発生には十分注意し、検査前に使用に適切な状況であるか判断する。生培地が使用期限内であっても、使用前に十分確認する。少量であれば嫌気ジャー

で、まとまった量であればクーラーボックスに入れ密封し冷蔵保存することで乾燥と結露をある程度防ぐことが出来る<sup>15)</sup>。自家調製培地においても、適切な保存により、3 か月間のレジオネラ属菌発育性能を保持することが可能である<sup>15)</sup>。

## 2) 臨床検体からのレジオネラ属菌の検出法

一般的に医療機関における臨床検体からの検出は尿中抗原によることが多いが、尿は菌分離に使用できない。一方で集団発生事例等の分子疫学調査には患者および環境由来の菌株が必要となる。患者由来菌株を得るためには、喀痰等を用いた分離培養を行うが、レジオネラ属菌は臨床検体からの分離培養による検出率が低いという報告<sup>16,17)</sup> や、喀痰より肺胞洗浄液のほうがレジオネラ属菌の検出率が高いという報告<sup>16)</sup>もある。

ここでは、臨床検体のうち喀痰の分離培養法について示す(図1)。

喀痰からの分離に際しては、その質によっても検出状況が左右されるため、膿性部分が入っている喀痰<sup>18)</sup>が望ましい。なお、一連の検査は、安全キャビネット内で実施すること。

喀痰は、喀痰溶解剤により均質化を行う。喀痰に喀痰溶解剤(スプタザイム、極東製薬工業(株)の場合であれば、約3倍量)を加え、時々混和し、室温で15分置く。この際、喀痰の状態により必要に応じて溶解剤の添加量を調整し、酵素処理時間の延長を行う。検体量が多い場合は、均質化後の試料を遠心(3,000rpm. 30min)し沈渣を検査に供する方法も報告されている<sup>19)</sup>。

以下、環境水の検査法と同様に検体の前処理および接種を行う。なお、喀痰の検査においても、培養条件として前処理や培地の種類を増やすことで、検出率を高めることができる<sup>20)</sup>。また、均質化した喀痰を希釈し、培地に接種することで検出率が高まったとの報告<sup>20)</sup>や遺伝子検査法を併用することで、効率の良い検査を行うことが可能との報告がある<sup>20,21)</sup>(4. 核酸の直接検出参照)。

## 3) 環境検体からのレジオネラ属菌の検出法

採取された検体の菌数を予測出来ないので、環境水は原則として非濃縮検体と濃縮検体を並行して検査する<sup>14,22,23)</sup>。ただし、清掃消毒直後の検水等、レジオネラ属菌数が少ないことが推定される場合においては、濃縮検水のみでもよい。

濃縮は、下記の2方法の何れかで行う。なお、改訂ISO法ではろ過濃縮法を推奨している。また、下記2つの濃縮方法を同一検体に対し比較した報告<sup>24)</sup>によると、ろ過濃縮法の方が冷却遠心濃縮法よりも検出菌数が多く、また菌数が少ない場合、ろ過濃縮法においてのみ、レジオネラ属菌の発育が認められた場合もあった。これらのことから、本稿

においてもろ過濃縮法を推奨する。

バイオフィルムの付着した滅菌スワブや浴槽濾過材などの検体は、滅菌生理食塩水中に懸濁するか、たとえば 20 KHz、130 W、24 秒の条件で密閉式超音波破碎装置により処理して浮遊液とする<sup>25)</sup>。

#### (1) ろ過濃縮法

安全キャビネット内で検水 500 mL を直径 47 mm、孔径 0.20~0.22 μm のポリカーボネートメンブランフィルターで吸引ろ過する。レジオネラ属菌の菌体サイズは 0.3~0.9×2~20μm<sup>23)</sup>であり、孔径 0.40~0.45 μm では、レジオネラ属菌が捕捉されず通過してしまう場合があるので使用しない。セルロース系フィルターは膜に菌が入り込んで回収率が下がる場合があるので使用しない<sup>26)</sup>。フィルターを剥がし 5 mL の滅菌超純水にひたし、vortex mixer で振とうを最大にして 1 分間洗浄した液（100 倍濃縮）を用いる。超音波処理（たとえば 20 KHz、130 W、24 秒）によっても効率良く菌を回収できる場合がある。

#### (2) 冷却遠心濃縮法

ろ過濃縮が困難（検水の質、検査設備等）と判断された場合に行う。また、その基本操作手順は、ISO 11731:1998 を基礎として検討された JIS K 0350-50-10:2006 を参照すること。安全キャビネット内で、滅菌した蓋付きの遠心管に検水 200 mL を入れ、バランスを取った後、遠心加速度 6,000×g で 10 分又は 3,000×g で 30 分、15~25°C で遠心する。使用機器で遠心加速度設定が出来ない場合は、以下の計算式で計算する。

$$\text{遠心加速度(g)} = 1,118 \times \text{回転半径(cm)} \times \text{回転速度}^2(\text{rpm}) \times 10^{-8}$$

遠心はブレーキ設定せず、自然に停止するのを待つ（ブレーキをかける場合は、諸条件を検討し、ブレーキによる影響が出ないことを確認すること）。遠沈管を取り出し、安全キャビネット内において、滅菌ピペットもしくはアスピレーター等で液量が 100 倍濃縮となるまで慎重に上清を除去する。滅菌ピペット等で残した液を用いて管壁に付着したレジオネラ属菌を勢いよく洗って剥がし、沈渣とよく混和する。

#### 4) 検体の前処理

選択培地を用いても発育を抑制できない夾雑菌に対処するため、検体の酸処理や熱処理を行う。酸処理は *Bacillus* の発育抑制効果が得られ、熱処理ではブドウ糖非発酵菌の発育抑制効果が得られる<sup>27)</sup>。両処理による抑制作用は異なっていることから、並行して行うことで良い結果が得られる。環境水では緑膿菌がレジオネラ属菌に発育阻害を示すが、熱処理後に酸処理（この逆はレジオネラ属菌も減少するので不可）を行うと除去できる



28)。共存する夾雑菌量が多いと予想される検体では、当初から熱処理後酸処理も行うと良い。ただし、これらの処理を行っても全ての夾雑菌を抑制できない場合がある。また、これらの前処理がレジオネラ属菌へも影響している可能性がある。そのため、状況に応じ未処理も併用することで良い結果が得られる場合がある（1）分離培養法参照）。

### (1) 熱処理法

50℃で20分間加熱する。ただし、夾雑菌の発育が旺盛な場合には、状況に応じ加熱時間を30分とする方法もある。なお、清掃消毒直後の浴槽水、浴槽から上流域の温泉水等、比較的レジオネラ属菌や夾雑菌が少ないと考えられる環境水検査においては、20分の加熱が良い結果につながりやすい。ウォーターバスとヒートブロックでは加熱状況が異なる場合があるので、機器の表示温度だけではなく実際の温度を処理前に確認する。また、反応時間後の余熱による影響を考慮する場合は、加熱後水冷する手順を加える。検体を60℃、4分以上処理すると、検出率はきわめて低率となるので注意が必要である。

### (2) 酸処理法

pH 2.2 緩衝液（0.2M の塩酸 5.3 mL と 0.2M の塩化カリウム 25 mL を純水 100 mL に加える。武藤化学、日研生物、極東製薬工業、関東化学より購入可能）を検体に等量加えてよく混和し、25℃（実際には室温）で5分間反応させた後、分離培地に接種する。参考文献によって、反応時間が異なっている場合がある。国内においては、過去の地衛研へのアンケート<sup>29)</sup>からも4分間の反応で対応している検査機関も多いと思われる。実際その手技上では、一度に対応する検査数、反応時間後の接種・塗布の間も反応していること等から時間差が生まれている。これらを含め5分前後の反応時間においては、検出に大きく影響を与えることはないと思われる。夾雑菌量が多いと予想される場合には、20分まで処理時間を延長しても良いとされている<sup>8)</sup>。しかしながら、状況により結果は異なり、すべての場合に対応できるわけではない。緩衝作用の強いクエン酸緩衝液（0.1M クエン酸二水素カリウム 23.0 g/L と 0.1M クエン酸 21.0 g/L を混和する、pH 2.2）を使用すると緩衝作用が増加して高率にレジオネラ属菌を分離できるという報告もある<sup>30)</sup>。

### (3) 熱処理後酸処理法

検水中に夾雑菌が非常に多く熱処理又は酸処理だけではそれらを抑制できなかった、もしくは抑制できないと予想される場合に実施する。操作は、前述の熱処理、酸処理に準ずる。

## 5) 接種

安全キャビネット内で行う。非濃縮検体及び濃縮検体について、検体の状況に応じて使用培地や前処理法を選択し、未処理及び熱処理試料は 100 $\mu$ L を、酸処理試料並びに熱処理後酸処理試料は 200 $\mu$ L を培地に接種する。100 $\mu$ L ずつ 2 枚の分離培地へ接種してもよい。試料が培地に完全に吸収されるまでコンラージ棒で塗布し続けてはいけない。接種した試料が培地表面に均等に広がるよう、コンラージ棒の重さだけを利用し軽く塗布し、強く塗り込むことを避ける。コンラージ棒による塗布の力加減が出現集落数に影響する可能性が示唆されている<sup>31)</sup>。

レジオネラ属菌及び夾雑菌が多数存在している場合が多いスワブ検体や喀痰検体、当初から汚染度が高いと予想される環境水は、適宜 10 倍希釈で 2~3 段階希釈し、それぞれ 100 $\mu$ L 接種しておくとう検出しやすい。

## 6) 斜光法

分離培地上の発育集落に斜光を当て、実体顕微鏡で観察 (図 2) すると、レジオネラ属菌は、特徴的な外観構造 (モザイク・カットグラス様 : 図 3) を呈する。従来法では、肉眼で観察し、灰白色湿潤集落をレジオネラ様集落と推定し、菌数測定や釣菌を行ってきた。しかしながら、この方法では、他の発育菌との分別が困難であり、不確かな菌数測定や非効率的な釣菌作業を行わなければならないことが多い。斜光法を利用することで、多数の灰白色湿潤集落を含む集落が分離培地上に発育していたとしても、レジオネラ属菌の存否を高い確率で確認することができる。この結果、夾雑菌の発育の多少にかかわらず、釣菌対象となる集落が限定され、その後の確認検査を効率良く行うことができ、菌数測定も極めて正確に行うことができる。また、実体顕微鏡を利用することから、培養 2 日目 (30~35 時間程度) から特徴的な微小集落を確認できる場合がある。発育早期から高い確率でレジオネラ属菌の存在が確認できることは、定性的な判定日数を短縮できる可能性がある。特に行政検査で早期対応が必要な場合、斜光法とコロニー PCR の組み合わせによる対応が便利である。培養 2 日目以降、しばしば分離培地を観察することで、より正確に定性、定量結果を求めることができる。

斜光法は集落の特徴が確認しやすい暗所で行うことを推奨する。また、暗所で長波 UV ランプを照射し、集落の自発蛍光の有無を観察することで、自発蛍光を有する菌種群が選定できる (図 4、表 1)。

実体顕微鏡での観察は、エアロゾルは発生しないため、安全キャビネットを必要としない。しかしながら、分離培地のフタを開けて集落の確認を行う場合には、空中落下細菌による汚染を十分に注意すること。また、顕微鏡を覗きながら分離培地を観やすい位置

に動かす場合には、取り扱いに十分注意すること。

なお、本法は、CDC での検査にも導入されている<sup>32)</sup>。

## 7) 確認培養

観察期間中、斜光法によりレジオネラ様集落を適宜釣菌し、L-システイン不含 BCYE $\alpha$  寒天培地（一般的には血液寒天培地で代用されることが多いが、トリプトソイ寒天培地、普通寒天培地も利用できる）と BCYE $\alpha$  寒天培地の双方に画線培養し、L-システイン要求性の確認を行う。BCYE $\alpha$  寒天培地に菌苔が観察されるまで培養し、鑑別・同定を行う。一般的には、培養 48 時間程度で十分な発育が確認される場合が多い。L-システイン不含寒天培地には発育が認められず、BCYE $\alpha$  寒天培地に発育した菌をレジオネラ属菌とする。希に L-システイン不含培地上での発育が悪い夾雑菌もあることから、さらに PCR 法等（3. 同定 2）核酸を用いた同定法参照）を併用することで、より高い精度での確認が可能となる。

なお、釣菌時は、元々の分離培地由来の L-システインの持ち込みを防ぐため、培地を引っ搔かないようにし、菌体だけを適切に釣菌すること。また、同一の白金線等で画線する場合には、L-システイン不含寒天培地に、次いで BCYE $\alpha$  寒天培地に画線すること。釣菌した菌体を滅菌生理食塩水などに溶かしてから培地に塗布することで、比較する培地上に等量・均一に塗布することが可能となり、その後の確認がしやすくなる。この工程により、判定ミスが大きく軽減することができる。ヘモグロビンの他に発育促進用に IsoVital X が添加されているチョコレート寒天の生培地は、レジオネラ属菌がわずかに発育し判断を誤ることがあるので使わないほうがよい。例外的に、*L. oakridgensis*、*L. jordanis*、*L. nagasakiensis* は、継代培養後に L-システイン不含培地上で発育可能となることがある<sup>33)</sup>。

## 8) アメーバ共培養法

レジオネラ属菌は、環境中でアメーバに捕食され宿主アメーバ内で増殖する。この性質を利用して純培養したアメーバと試料を共培養し、アメーバの中でレジオネラ属菌を増殖させてから検出する手法がアメーバ共培養法である<sup>34)</sup>。レジオネラ属菌には、アメーバ内で増殖するが人工培地では検出することができない菌種が存在する。また、環境中でレジオネラ属菌は、人工培地では発育できないが生きている（viable but non-culturable : VNC）状態になる細菌である。このような細菌学的特徴から、従来法に加えてアメーバ共培養法を行うことにより、より詳細にレジオネラ属菌生息状況を明らかにすることが可能となってきた。*L. pneumophila* が *Acanthamoeba* 内で増殖するためのメカ

ニズムと、*L. pneumophila* がヒト肺胞マクロファージに感染して肺炎を引き起こすメカニズムが同じであることが明らかになっている<sup>35)</sup>。このことは、*Acanthamoeba* 内で増殖するレジオネラ属菌は、ヒトへの病原性をより強く発揮する菌種や菌株である可能性が高いことを示しており、レジオネラ症の発症につながるリスクも高い。

近年、アメーバ共培養法を使って浴槽水、冷却塔水、水景水など種々の環境水を対象としたレジオネラ属菌調査が行われている<sup>36-39)</sup>。アメーバ共培養法を用いることにより、培養法では不検出の試料にレジオネラ属菌が生息していることや、培養不能菌種が存在することが明らかになっている<sup>38,39)</sup>。

#### (1) 環境水濃縮試料とアメーバとの共培養

アメーバ共培養法では、純培養した *Acanthamoeba* を用いる。*Acanthamoeba* 株は、ATCCなどで購入することが可能である。PYGC 液体培地を用いて 30°C で純培養した *Acanthamoeba* (約 10<sup>5</sup> cell/mL) を 12 well のマイクロプレートに 1 mL 入れ、1 時間～半日静置する。*Acanthamoeba* がマイクロプレート底面全体に貼り付いていることを顕微鏡で確認後、PYGC 液体培地を取り除き、30°C のリン酸緩衝液 1 mL でゆるやかに 2 回洗浄する。直ちに濃縮試料 1.0～1.5 mL を入れ、30°C で 5-7 日間、乾燥を防いで培養する。濃縮試料は、培養法のろ過または冷却遠心濃縮法により得られた 100 倍濃縮試料を用いる。

#### PYGC 液体培地<sup>40)</sup>

プロテオースペプトン	10 g
イーストエキストラクト	10 g
グルコース	10.1 g
NaCl	5 g
L-システイン-HCl	0.95 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.74 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.36 g
純水	1000 mL

#### (2) アメーバ共培養法後の試料からのレジオネラ属菌検出

アメーバ共培養法では、レジオネラ属菌だけでなく試料中に存在する夾雑菌も増殖する。夾雑菌が多く存在する場合、培養法では夾雑菌が培地上を覆うように増殖するためレジオネラ属菌検出が妨げられる。そのため、アメーバ共培養と組み合わせるレジオネラ属菌検出法は、リアルタイム qPCR 法、LAMP 法などの遺伝子検査法が適している。アメーバ共培養法後の濃縮試料 1.0～1.5 mL から、DNA 抽出キット等を用いて DNA を

抽出する。DNA 抽出方法は、キットの取扱説明書に従って行う。この DNA を鋳型として、リアルタイム qPCR 法、LAMP 法、PCR 法など遺伝子検査法によりレジオネラ属菌を検出する。遺伝子検査法は、キットの取扱説明書および本マニュアル「4. **核酸の直接検出** 2) **環境検体**」を参照する。リアルタイム qPCR 法は定量することが可能なため、アメーバ共培養法を実施する前後の遺伝子量を比較し、10 倍以上増加したものについては、生きているレジオネラ属菌が存在したと判定する<sup>36)</sup>。

培養法で検出する場合は、アメーバ共培養法後の試料を酸処理または熱処理し、必要に応じて希釈後、選択培地に塗抹する。もしくは、選択培地を用いて画線培養することにより、コロニーを検出する。

## 2. 菌体の検出

培養菌ではグラム陰性桿菌として観察できるが、喀出痰、気管分泌物、肺組織などの臨床材料中ではグラム染色、抗酸菌染色などでは染色されず、Gimenez（ヒメネス）染色（菌は紫色）、Warthin-Starry 染色（菌は黒色）あるいはアクリジンオレンジ染色（菌はオレンジ色）で染め出されるので、グラム染色で細菌が見られない場合は、これらの染色を行う。

### 1) ヒメネス染色

レジオネラ属菌のみを染色する方法ではないが、喀出痰や胸水などの塗抹標本の染色にはヒメネス染色が行われる。

#### <試薬>

##### ① 石炭酸フクシン液原液

a.	塩基性フクシン	1 g
	95%エタノール	10 mL
b.	フェノール	1 mL
	純水	24 mL
c.	純水	65 mL

a, b, c 溶液を混合し、37°C48 時間加温する。室温保存。

##### ② 緩衝液

a.	0.2M リン酸二水素ナトリウム溶液	
	リン酸二水素ナトリウム	2.84 g
	純水	100 mL
b.	0.2M リン酸一水素ナトリウム溶液	
	リン酸一水素ナトリウム	2.76 g
	純水	100 mL

a 溶液を 3.5 mL および b 溶液を 15.5 mL 混合し、さらに純水 19.0 mL を加えて作製する。

##### ③ 石炭酸フクシン染色液

	石炭酸フクシン原液	1 mL
	0.1M 緩衝液	9 mL

##### ④ マラカイトグリーン液

	マラカイトグリーン	0.8 g
	純水	100 mL

### <方法>

- ① 塗抹、火炎固定
- ② 石炭酸フクシン液で、30 秒間染色
- ③ 水洗
- ④ マラカイトグリーンで、6～9 秒染色
- ⑤ 水洗
- ⑥ マラカイトグリーンで、6～9 秒染色
- ⑦ 水洗
- ⑧ 乾燥・鏡検

細菌は赤く染まり、バックグラウンドは青緑色に染色される。細菌が見られたからといって、レジオネラ属菌とは限らない。なおヒメネス染色セットが武藤化学から入手できる。

### 2) 蛍光抗体法

検体中のレジオネラ属菌について特異抗体を用いて染色する方法には、抗体に蛍光色素 (fluorescent isothiocyanate, FITC : 緑色) を直接標識して、菌体を染色する直接抗体法と以下に述べる間接抗体法 (IFA) がある。IFA は特異抗体を作製した動物のグロブリンで免疫した他の動物の免疫グロブリンに、あらかじめ蛍光色素を標識しておいて (標識抗体)、検体中のレジオネラ属菌と特異抗体 (一次血清) とが結合しているところに、この標識抗体 (二次血清) を作用させて、間接的に菌体を染色する方法である。後者の方法が市販されている標識抗体を用いることができるし、感度<sup>41)</sup> や特異性も高いため広く用いられる。この方法によりホルマリン固定肺から *L. pneumophila* 血清群 6 の検出事例が報告されている<sup>42)</sup>。

### <試薬>

- ① リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH7.2)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	9 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	64.54 g
NaCl	160 g

上記成分を純水で溶解し、全量を 20 L にする。

水酸化ナトリウムまたは塩酸で pH を 7.2 に調整し、冷蔵庫 (4℃) で保存。

<方法：IFA 法>

- ① 材料をスライドグラスに塗抹し、風乾後 10%ホルマリンで 15 分固定し、洗浄後、乾燥する（パラフィン包埋標本は脱パラして乾燥）。
- ② 抗レジオネラ家兔免疫血清を標本面に載せる。
- ③ 湿潤箱に入れて、37℃、30 分間反応させる。
- ④ PBS (pH 7.2) で静かにオーバーフローさせて、洗浄する。
- ⑤ PBS を入れたバット内に、スライドグラスを入れて、バイブレーターをかけ 5 分間洗浄する。2 回繰り返す。
- ⑥ 取り出して、再度純水でオーバーフローして 2 回洗浄する。
- ⑦ 検体の周囲の水分を濾紙で拭き取る。
- ⑨ これに、さらに FITC 標識抗家兔ヤギグロブリンを載せる。
- ⑩ ③～⑦までを繰り返す。
- ⑪ 蛍光退色防止剤入封入剤で封入する。
- ⑫ 蛍光顕微鏡で観察。

鏡検までは遮光して、4℃に保存。特異抗体を使用するので、菌体が観察されれば、レジオネラ属菌と同定できる。材料としては、喀出痰、気管吸引物や胸水などが用いられ、肺組織中では、好中球やマクロファージの細胞質中に多く取り込まれている像が観察される。



### 3. 同定

システイン要求性が確認されたレジオネラ属菌様集落はレジオネラ属菌と推定される。レジオネラ属菌の菌種間の鑑別・同定に役立つ表現形質は少ない。表 1 にあるように青白色あるいは暗赤色の自発蛍光を有する菌種群が存在する（ほとんどのレジオネラ属菌は自発蛍光がない）が、この性状では種の鑑別はできない。*L. pneumophila* には 15 の血清群があり、レジオネラ属全体では 83 血清群となっている。一部の菌種については血清学的方法により菌種同定が可能である。その他分離された菌の同定には、*mip* (macrophage infectivity potentiator gene) プライマーによる *L. pneumophila* の同定、シーケンスによる菌種同定などがある。

#### 1) 特異抗血清を用いた同定法

*L. pneumophila* には現在 15 種の血清群がある。この他、*L. bozeman*ae、*L. longbeach*ae、*L. feeleii*、*L. hackelia*e、*L. quinlivanii*、*L. sainthelensi*、*L. spiritensis*、*L. erythra* に各 2 つの血清群がある<sup>43)</sup> (表 1)。現在、*L. pneumophila* の血清群 1~6 および *L. bozeman*ae (血清群 1 のみ)、*L. gormanii*、*L. dumoffii*、*L. micdadei* の 10 種類がレジオネラ免疫血清「生研」(デンカ) で同定できる。また、*L. pneumophila* の血清群 7~15 の抗血清がデンカから研究用試薬として発売されている。Oxoid レジオネラ・ラテックステスト (関東化学) を用いると *L. pneumophila* 血清群 1、*L. pneumophila* 血清群 2-14、その他ヒト疾患に関連する 7 群 (*L. longbeach*ae 血清群 1 および 2、*L. bozeman*ae 血清群 1 および 2、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. jordanis*、*L. micdadei*、*L. anisa*) の 3 種類に鑑別できる。冷却塔水の由来の 60%以上が *L. pneumophila* 血清群 1 であることに加え<sup>44)</sup>、温泉や風呂などからも *L. pneumophila* 血清群 1 が優勢に分離されることが明らかとなっている<sup>45)</sup>。

#### <スライド凝集反応>

BCYE $\alpha$  寒天平板培地で 2~3 日培養した菌をかきとって生理食塩水に濃厚浮遊液 (McFarland No. 7 の 5 倍、約  $10^{10}$ /mL 以上) を作製する。100°C、1 時間あるいは 121°C、15 分間加熱し 900×g、20 分間遠心して上清を捨て新しい生理食塩水に懸濁して抗原液とする。スライドグラスをガラス鉛筆等で数区画に区切り、抗血清を区画内に一滴、滴下する。さらに抗原液を 5-10 $\mu$ L ピペットで滴下し、よく混和し、スライドグラスを前後に傾斜させながら 1 分間反応させて凝集の有無を観察する。単一の抗血清に凝集が認められた抗血清を、被検菌の菌種あるいは血清群とする。1 分以上たつてからの弱い凝集は陰性とする。

## 2) 核酸を用いた同定法

### (1) PCR 等による *L. pneumophila* およびレジオネラ属菌の同定

分離集落が *L. pneumophila* であるか、また、レジオネラ属菌であるかどうかを PCR を用いて鑑別することができる。

#### <LEG プライマーと Lmip プライマーを用いた PCR>

型別判定は LEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene) と Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) の両プライマーを用いて PCR 法で調べ、両遺伝子を持つものを *L. pneumophila* と、LEG だけ持つものを *Legionella* sp. と推定する。

LEG プライマーは山本らの報告によるものを用いる<sup>46)</sup>。

LEG 448A 5'-GAGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3'

LEG 854B 5'-CGGTCAACTTATCGCGTTTGCT-3'

Lmip プライマーは Mahbubani らの報告によるものを用いる<sup>47)</sup>。

Lmip L920 5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3'

Lmip R1548 5'-GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3'

具体的には、上記の BCYE $\alpha$  寒天培地のみに発育した純培養菌を 1  $\mu$ L のエーゼに取り、50  $\mu$ L の純水に懸濁する。100°C で 5 分間加熱し、15,000 $\times$ g、5 分遠心し、上清の 2  $\mu$ L をテンプレートとする。

LEG を確認するには、PCR 反応液 (2 検体分 46  $\mu$ L) として、 $\times$ 10 reaction buffer 5.0  $\mu$ L、dNTP mixture 4.0  $\mu$ L、ultra-pure water 35.75  $\mu$ L、LEG プライマー-F (20  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L、LEG プライマー-R (20  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L、Taq polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L を加え軽くボルテックスし、200  $\mu$ L の PCR 用マイクロチューブに 23  $\mu$ L ずつ分注する。

これに各テンプレートを 2  $\mu$ L 加えてサーマルサイクラーで PCR を行う。

反応条件として、熱変性 94°C 60 秒、アニーリング 61°C 60 秒、伸長 72°C 60 秒、40 サイクル繰り返す。その後 3% アガロースで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色して、430 bp の増幅バンドを検出する。

Lmip の場合も同様な反応液を作り、熱変性 94°C 60 秒、アニーリング 50°C 60 秒、伸長 72°C 60 秒、35 サイクルで PCR を行う。650 bp のバンドが検出できる。

#### <EmviroAmp Legionella Kit のプライマー配列を用いた PCR>

##### ① プライマー配列<sup>48)</sup>

5S rRNA (レジオネラ属特異的) :

Forward primer (5-29) 5'-GGCGACTATAGCGPTTTGGAA-3'

Reverse primer (91-112) 5'-GCGATGACCTACTTTTCPCATGA-3'

*mip* (*L. pneumophila* 特異的) :

Forward primer (948-965) 5'-GCATTGGTGCCGATTTGG-3'

Reverse primer (1092-1115) 5'-GRTTTGCCATCAAATCTTTRTGAA-3'

\*P=A/G, R=C/T

## ② DNA の調製

プレート上の集落を爪楊枝の先で軽くつつき、20  $\mu$ L の滅菌超純水に懸濁し、100°C で5分間加熱し、spin down (8,000 $\times$ g 数秒) した上清を使用する。この操作後には、すぐに③に進む (用時調製)。

## ③ PCR 反応溶液

(最終反応液量 25  $\mu$ L )

Forward primer 10 pmol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Reverse primer 10 pmol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
$\times$ 10 Reaction buffer	2.5 $\mu$ L
2.5 mM dNTP mixture	2 $\mu$ L
Chromosomal DNA	0.5 $\mu$ L
Ultra-pure water	14.8 $\mu$ L
AmpliTaq DNA polymerase	0.2 $\mu$ L

## ④ 反応条件

以下の2ステップ法、3ステップ法のどちらかで反応を行う。熱変性およびアニーリングの温度は用いる酵素に添付された指示に従うこと。

### 2ステップ法の場合

前熱変性	95°C、30秒
熱変性	95°C、30秒
アニーリングおよび伸長	63°C、45秒
熱変性とアニーリングおよび伸長を30サイクル	
最終伸長	72°C、7分

### 3ステップ法の場合

前熱変性	95°C、30秒
熱変性	95°C、30秒
アニーリング	55°C、30秒
伸長	72°C、30秒
熱変性とアニーリングおよび伸長を30サイクル	

最終伸長

72°C、7分

⑤ 電気泳動

2%アガロースゲルでサンプル 5 µL を泳動すると、5S rRNA は 108 bp のバンド、*mip* は 168 bp のバンドとして、それぞれ検出される。5S rRNA と *mip* のプライマーを混合して PCR をすると *mip* のバンドが弱くなるので推奨できない。

なお、市販のキットを利用したリアルタイム PCR や LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法によってもレジオネラ属菌の同定が可能である。タカラバイオ (株) や栄研化学 (株) のキットは特異性が高いことが確認されている。LAMP 法のキットで増幅されない *L. londiniensis* については (株) ニッポンジーンから、LAMP 用の専用プライマーセットが市販されている。

(2) マルチプレックス PCR による *L. pneumophila* 血清群の同定

*L. pneumophila* 血清群特異的配列プライマーを用いたマルチプレックス PCR (M-PCR) で血清群の同定ができる。この M-PCR は 2 段階から成り、1 段階目の M-PCR で、血清群 1、血清群 2、血清群 3/15、血清群 5、血清群 6/12、血清群 7、血清群 8、血清群 9、血清群 11、血清群 13、血清群 14 の判定ができる (血清群 3 と 15、血清群 6 と 12 は区別することができない)。いずれの血清群のバンドも得られなかった場合は、血清群 4/10 プライマーを用いた 2 段階目の PCR を行い、バンドを確認する (バンドが得られた場合、血清群 4 か 10 と判定される。血清群 4 と 10 は区別できない)。供試菌株が *L. pneumophila* である場合には、1 段階目か 2 段階目のいずれかで血清群特異的なバンドが確認できる<sup>49)</sup>。スライド凝集反応でいずれの免疫血清にも凝集せず、UT と判定される菌株も M-PCR ではいずれかに分類される。免疫血清による群別と区別するため、PCR による血清型別は、SG の後に g を加えて、SGg1 のように記載する。M-PCR には *Legionella* 属特異的プライマーも加えてあり、供試菌株が *Legionella* 属菌であることを確認するとともに、PCR 反応が正しく行われているか確認できる。

1 段階目の M-PCR 用として、以下に示す血清群 4/10 以外のプライマーセットと *Legionella* 属特異的プライマーセットからなる 24 種類のプライマー各 20 pmol/µL をプールした Primer-Mix を予め作製する。2 段階目の M-PCR 用には、血清群 4/10 プライマーセットと *Legionella* 属特異的プライマーセット各 20 pmol/µL をプールする。2 段階目の M-PCR は 1 段階目で血清群が決まらなかったときに行う。

<M-PCR の反応溶液組成 (1 検体当たり) >

QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) 10 µL

Primer-Mix 1 段階目 4.8 µL (最終プライマー濃度 0.2 µM)

2段階目 0.8 μL (最終プライマー濃度 0.2 μM)

鋳型 DNA 1ng 程度あるいはレジオネラ菌体\* (10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> CFU 相当)

滅菌水を加えて、全量を 20 μL にする。

\* 滅菌した爪楊枝で平板上のコロニーをつつき、10~100 μL の滅菌水に懸濁し、そのうちの 1 μL を用いる。

SG8、SG1、SG3/15、SG2、SG6/12、SG14 の精製 DNA の同量混合物および SG5、SG11、SG13、SG9、SG7 の精製 DNA の同量混合物を用いて、1段階目の M-PCR を行うと、それぞれに対応するバンドが得られ、陽性コントロールかつサイズマーカーとなる。あるいは予め混合されたプライマーセット及び対応する各人工遺伝子混合物 (GenCheck *Legionella* SG pre-mix primer set と GenCheck *Legionella* SG control set) が、(株) ファスマックから販売されているので、それらを用いることができる。

<反応条件>

95°Cで 15 分間の初期変性

28 回の増幅サイクル

94°Cで 30 秒の変性

60°Cで 90 秒のアニーリング

72°Cで 30 秒の伸長

72°Cで 10 分間の最終伸長

<電気泳動>

TAE バッファーを満たした電気泳動槽に 2.5%アガロースゲルをセットし、PCR 増幅反応溶液 2.0~4.0 μL と適当量のゲルローディングバッファーを混合したものをウェルに全量注入し、電気泳動を行う。図 6 に電気泳動の結果を示す<sup>50)</sup>。

血清群	標的遺伝子	PCR 産物 (bp)	プライマー配列 (5'-3') *
SGg1	<i>sg1-25 (srkA)</i>	249	Forward: AAACGCCTCTTTGCTGAACCAG Reverse: GTTGGGCATCTTCTTGATTAATCC
SGg2	<i>sg2-37</i>	543	Forward: AAACGAGGGTGACTAAGTGC Reverse: TATCAGGGGTAGCTGTTGGC

SGg3/15	<i>sg3-48/ sg15-49</i>	408	Forward: GGAATTTGTAAAGCAAAGAAAACCAG Reverse: AGATGTTTTGATCGCTAAAATGCCT
SGg5	<i>sg5-35</i>	205	Forward: GAACCTATTCTTAATCCAGAGG Reverse: TAGACGCATTGCCAAACAAG
SGg6/12	<i>sg12-57</i>	698	Forward: TTAAGTGGCCATCTAAGTTACC Reverse: CTTCACTTCCTTGGACTGTGC
SGg7	<i>sg7-30 (dapA)</i>	835	Forward: TTAGTATTGAGAGGGTTGGC Reverse: TGTGTAGGGCTTACAAAGTCC
SGg8	<i>sg8-68</i>	166	Forward: TGCTCACTCTATAGTTTATGATTGG Reverse: TAGTTTGACGATCAATTCCAGC
SGg9	<i>sg9-29</i>	634	Forward: TTATCTGGATTATCTTCACCTCG Reverse: GAATGGTATGAGAGAATCACTGG
SGg11	<i>sg11-23 (legI)</i>	314	Forward: ACATTACGGTAGTGGCAAAGG Reverse: TGTTCGATTTACCTAACAATGC
SGg13	<i>sg13-37</i>	461	Forward: ACCTTATGGT(A/C)TTGCAGATTC Reverse: CA(G/T)CC(A/C)TCATGATCACTTGG
SGg14	-	986	Forward: GTTTGGTTGATGCCAATAATCTCG Reverse: AGCCAGAATATAAGTCATTGTCCG
SGg4/10	<i>sg4-40/sg10-36 (patA)</i>	235	Forward: AAACGAGATAAAGTCATATGCC Reverse: TACGCAAATACCGTCTTTAGC
<i>Legionella</i> genus	5S rRNA	108	Forward: GGCGACTATAGCG(A/G)TTTGGAA Reverse: GCGATGACCTACTTTC(A/G)CATGA

\* SGg14のプライマーセットは、SG14と、SG1のうち、ST23が検出される。SGg4/10のプライマーセットは、SG4、SG10以外に、SG5、SG8、SG9、SG13、SG14、SGUT、SG7の一部、SG11の一部が検出される。

### (3) シークエンスによる同定

#### <16S rRNA 遺伝子による同定>

16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅後、その増幅産物の塩基配列を決定する手法が、菌種の同定に有用である。

#### ① DNA の調製

プレート上の集落を爪楊枝の先で軽くつつき、20  $\mu$ L の滅菌超純水に懸濁し、100°Cで5分間加熱し、spin down (8,000 $\times$ g 数秒) した上清を使用する。この操作後

には、すぐに③に進む（用時調製）。

② 増幅用プライマー配列<sup>51)</sup>

27f Forward primer (8-27) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1429r Reverse primer (1492-1510) 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'

( ) 内のポジションは、大腸菌に由来したものである。

③ PCR 反応溶液

(最終反応液量 25  $\mu$ L)

Forward primer 2 pmol/ $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
Reverse primer 2 pmol/ $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
$\times 10$ Reaction buffer	2.5 $\mu$ L
2.5 mM dNTP mixture	2.5 $\mu$ L
Chromosomal DNA	2.5 $\mu$ L
Ultra-pure water	12.25 $\mu$ L
AmpliTaq DNA polymerase	0.25 $\mu$ L

④ 反応条件

前熱変性	95°C、2分
熱変性	95°C、1分
アニーリング	50°C、1分
伸長	72°C、1分30秒
熱変性とアニーリングおよび伸長を 30 サイクル	
最終伸長	72°C、5分
冷却	10-15°C

⑤ PCR 産物の回収

市販キットである QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用する例を示す。

1. PCR 反応液に 5 倍量の PB buffer を加える。
2. 2 mL の collection tube に差し込んだ QIAquick spin column に上記の液を流し込む。
3. 10,000 $\times$ g、60 秒間遠心する。
4. collection tube 内の液を捨て、QIAquick spin column を差し込む。
5. 0.75 mL の PE buffer を QIAquick spin column に加える。
6. 10,000 $\times$ g、60 秒間遠心する。
7. collection tube 内の液を捨て、QIAquick spin column を差し込む。
8. PE buffer を完全に除去するため、もう一度 10,000 $\times$ g 以上の条件で 60 秒間遠心す

る。

9. 新しい 1.5 mL tube に、QIAquick spin column を差し込む。
10. EB buffer 50  $\mu$ L を QIAquick spin column に加える。
11. 1 分間静置する。
12. 10,000 $\times$ g、60 秒間遠心する。
13. 溶出した液を、シーケンス反応のテンプレートとして使用する。

⑥ シーケンス反应用プライマー配列<sup>52,53)</sup>

r1L Reverse primer (518-536) 5'- GTA TTA CCG CGG CTG CTG G -3'

r2L Reverse primer (803-821) 5'- CAT CGT TTA CGG CGT GGA C -3'

r2L' Reverse primer (786-805) 5'- GAC TAC CAG GGT ATC TAA TC -3'

r3L Reverse primer (1093-1111) 5'- TTG CGC TCG TTG CGG GAC T -3'

r4L Reverse primer (1389-1406) 5'- ACG GGC GGT GTG TAC AAG -3'

rE1L Forward primer (327-345) 5'-GTA GGA GTC TGG ACC GTG T-3'

f1L Forward primer (9-27) 5'- GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'

f2L Forward primer (518-536) 5'- CCA GCA GCC GCG GTA ATA C-3'

926f Forward primer (907-926) 5'- AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG-3'

f3L Forward primer (1094-1112) 5'- GTC CCG CAA CGA GCG CAA C -3'

( ) 内のポジションは、大腸菌に由来したものである。

⑦ シーケンス反応溶液

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用して調製する。

⑧ シーケンス反応条件

前熱変性                    96°C、1 分

熱変性                      96°C、10 秒

アニーリング              50°C、5 秒

伸長                         60°C、4 分

熱変性とアニーリングおよび伸長を 25 サイクル

冷却                         10-15°C

⑨ シーケンス

Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer 等を用いて塩基配列を決定する。菌種を同定するためには、最低 500 bp 程度のデータが必要である<sup>54)</sup>。

⑩ シーケンスデータの相同性解析

得られた塩基配列について、NCBI の BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> で Nucleotide BLAST を選択) で相同性解析する。16S rRNA 遺伝子のシーケンスで *L.*



*londiniensis* が *L. nautarum* と誤って登録されている株があるので、*L. nautarum* と同定された場合は注意する。

#### < *mip* 遺伝子による同定 >

特定の塩基配列からのレジオネラ属菌の菌種同定法としては、現在のところ、*mip* 遺伝子の塩基配列の決定が最も有用である<sup>55)</sup>。調べたいレジオネラ属菌種株 DNA を鋳型として、*mip* 遺伝子で種間を超えて保存されている領域に設定されたプライマーにより、上流域 616-659 bp (プライマー配列を除いた長さで、菌種により長さが異なる) を PCR により増幅し、塩基配列を決定する。増幅のためのプライマーは、

Leg-F: 5'-GGGRATTVTTTATGAAGATGARAYTGG-3'、および

Leg-Rm13: 5'-CAGGAAACAGCTATGACTCRTTNGGDCCDATNGGNCCDCC-3'である

(D=A/G/T, N=A/C/G/T, R=A/G, V=A/C/G, Y=C/T)。PCR の反応条件は、94°C 10 分の後、40 サイクルで、94°C、30 秒、55°C、1 分、72°C、2 分である。塩基配列決定には、以下のプライマーを用いる。

Leg-FS: 5'-TTTATGAAGATGARAYTGGTCRCTGC-3'

M13-R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

得られた塩基配列を NCBI の BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> で Nucleotide BLAST を選択) で相同性解析する。*mip* 遺伝子は種間での配列相同性があまり高くない、95%以上塩基配列が一致すれば、通常その菌種であると同定可能である<sup>56)</sup>。

#### (4) 疫学マーカーとしての *lag-1* 遺伝子の検出

*lag-1* 遺伝子は、*L. pneumophila* 血清群 1 に特異的な遺伝子である。*L. pneumophila* 血清群 1 臨床分離株の 90%が *lag-1* 遺伝子を有している<sup>6)</sup> のに対し、環境分離株における保有率は、冷却塔水由来株 2%、浴槽水由来株 26%、水溜り由来株 61%となっており、病原性関連遺伝子マーカーとして有用である。Kozak らの報告によるプライマー (*lag-F*: 5'-CTCACAACAAGTCAAGCAAC-3', *lag-R*: 5'-AAACCATACCAAAGCAACAT-3') を用いた PCR により、0.6 kbp の DNA 断片が増幅される<sup>57)</sup>。PCR の反応条件は、最初の熱変性 95°C 2 分後、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 57°C 30 秒、伸長 72°C 60 秒を 30 サイクル繰り返す<sup>58)</sup>。

#### 4. 核酸の直接検出

##### 1) 臨床検体

喀痰、気管支肺胞洗浄液、胸水、肺組織、全血、血清、尿などの臨床検体から、PCR 法、リアルタイム PCR 法、LAMP 法などで、直接、特異的な菌遺伝子 (DNA) を検出する。遺伝子検査法は培養法、血清抗体価の測定に比べ、陽性率が高く<sup>59)</sup>、早期診断が可能な、きわめて有用な方法である。LAMP 法は、体外診断用医薬品となっている。喀痰などの粘性の高い検体は、スプタザイム (極東製薬工業 (株)) などで液化の前処理が必要である。各臨床検体からの DNA 調製にあたっては、検体の種類に応じた市販のカラム精製キットの使用が便利である。遺伝子はホルマリン固定肺組織からも検出できる場合がある<sup>42)</sup>。また、*L. pneumophila* のみを検出できる *mip*<sup>60)</sup> を標的遺伝子とするプライマー配列や、レジオネラ属菌全般 (一部の菌種を除く) を検出できる 16S rRNA<sup>61)</sup>、5S rRNA<sup>62)</sup> を標的遺伝子とするプライマー配列が報告されている。このうち、*mip* 遺伝子を標的とした *L. pneumophila* を検出する PCR 法<sup>59)</sup> については、以下に述べる。

##### (1) DNA の調製

1 mL の検体に 0.1 mL の lysozyme (5 mg/mL、富士フィルム和光純薬 (株)) を加え、37°C 1 時間作用させた後、100°C 5 分間処理で不活化する。さらに 0.1 mL の proteinase K (1 mg/mL) および 0.1 mL の 20% SDS を加え 55°C 1 時間作用させた後、不活化し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈澱で精製する。精製した DNA を 50 μL の純水に溶解しその 10 μL を 1st step の PCR に用いる。2nd step PCR は 1 μL の 1st step PCR 産物を加えて行う。

##### (2) プライマー配列

1st step primers:

LmipL920 5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3'

LmipR1548 5'-GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3'

2nd step primers:

LmipL997 5'-TAATCCGGAAGCAATGGCTA-3'

LmipR1466 5'-GGGCCAATAGGTCCGCCAAC-3'

##### (3) 反応液 (100 μL)

100 mM Tris-HCl (pH8.3)

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

200 μM dNTP

40 μM primers

## 2.5 U AmpliTaq

### (4) 反応条件 (2 ステップとも)

変性	94°C1 分
アニーリング	55°C1 分
伸長	72°C1 分
30 サイクル	

### (5) 検出

PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、489 bp の DNA 断片を観察する。

## 2) 環境検体

浴槽水、冷却塔水、給湯水などの環境検体から、PCR 法、リアルタイム PCR 法、LAMP 法などで直接、菌の DNA を定性的あるいは定量的に検出する。現在、さまざまなレジオネラ属菌特異的な遺伝子の検出試薬キットが市販されており、それらの利用が精度管理上からも便利である。

一般的に、遺伝子検査法は生菌のみならず死菌 DNA や VNC (viable but non-culturable) 状態の菌も検出する。すなわち、遺伝子検査により陽性となった検水にその時点で必ず生菌が存在するわけではない。しかしながら、その結果はレジオネラ属菌の存在履歴を示すことから、衛生管理上の注意が促される。遺伝子検査法は迅速に結果が得られるため、この特性を有効活用する場としては、清掃・消毒管理された検水におけるレジオネラ属菌の陰性確認や、培養法と併用したスクリーニング検査としての利用が挙げられる。また、患者発生時の原因究明検査への活用も期待できる。遺伝子検査法のうち、リアルタイム PCR 法は検出試薬キットに添付されている試薬などを用いて検量線を作成することにより、遺伝子の定量的な検出が可能である。

遺伝子検査法で生菌のみを検出するには、DNA 増幅反応前に EMA (ethidium monoazide) 処理を行うことで、死菌由来 DNA、膜損傷菌由来 DNA の増幅を抑制し、生菌由来 DNA を選択的に増幅させる。EMA 処理前に液体培養を加えてリアルタイム PCR 法を行うと、より平板培養法と高い相関を示す生菌検出方法となる (LC EMA-qPCR 法)。

遺伝子検査法は反応系によりそれぞれ特性があるので、検出試薬キットの説明書をよく読み理解して用いる。特に注意を要するのは、温泉水などに含まれるフミン質などの遺伝子増幅反応の阻害物質により、偽陰性となることである。したがって、インターナルコントロールを用いるなど、偽陰性確認が可能な検出試薬キットの使用が望ましい。各種遺伝子検査法における結果の判定は、添付の取扱説明書に従う。

以下に、市販の検出試薬キットを用いた環境水における遺伝子検査法の概要と、浴槽水、湯口水、採暖槽水、シャワー水、カラン水、プール水を対象とした実検体における遺伝子検査法の活用例を述べる。

(1) qPCR 法および EMA-qPCR 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、タカラバイオ (株) から市販されている。Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 の取扱説明書に従い、検水の 1,000 倍濃縮液 40  $\mu$ L を作製し、使用する。DNA 抽出は Lysis Buffer for *Legionella*、qPCR 反応は Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いる。反応液にインターナルコントロールが添加されており、反応阻害確認が 1 本のチューブで可能である。また、EMA-qPCR 法は、DNA 抽出前に Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 および LED Crosslinker 12 を用いて、EMA 処理を 1 回実施する。

② 平板培養法との相関<sup>63)</sup>

a. qPCR法

		平板培養法(CFU/100 mL)		
		$\geq 10$	$< 10$	計
qPCR	陽性	120	257	377
	陰性	3	224	227
計		123	481	604

感度 97.6%、特異度 46.6%、陽性的中率 31.8%、陰性的中率 98.7%、一致率 57.0%

b. EMA-qPCR法(EMA処理 1 回)

		平板培養法(CFU/100 mL)		
		$\geq 10$	$< 10$	計
EMA-qPCR	陽性	113	190	303
	陰性	11	299	310
計		124	489	613

感度 91.1%、特異度 61.1%、陽性的中率 37.3%、陰性的中率 96.5%、一致率 67.2%

(2) LC EMA-qPCR 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、タカラバイオ (株) から市販されており、各種試薬の取扱説明書に従い実施する。作製した検水の 1,000 倍濃縮液 0.1 mL を 5 分間酸処理し、*Legionella* LC Medium base、レジオネラ BCYE $\alpha$  発育サプリメント (関東化学) およびレジオネラ MWY

選択サプリメント（関東化学）を用いて作製した MWY 液体培地を添加後、36°Cで 18 時間培養する。増菌液 0.1 mL を分取し、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR および LED Crosslinker 12 を用いて EMA 処理を実施する。その後、qPCR 法と同様に DNA を抽出後、qPCR 反応を実施する。

② 平板培養法との相関<sup>64)</sup>

LC EMA-qPCR法のカットオフ値を 1 CFU/100 mL相当とした場合

		平板培養法(CFU/100 mL)		
		≥10	<10	計
LC EMA-qPCR	≥1	125	82	207
	<1	15	296	311
計		140	378	518

感度 89.3%、特異度 78.3%、陽性的中率 60.4%、陰性的中率 95.2%、一致率 81.3%

(3) LAMP 法

① 試薬および操作

検出試薬キットは、栄研化学（株）から市販されている。検水の 100 倍濃縮液 2 mL を使用する。Loopamp レジオネラ検出試薬キット E を用いて、取扱説明書に従い、添付の試薬を用いて DNA を抽出後、LAMP 反応を実施する。本試薬には、インターナルコントロールは添付されていない。ただし、以下の方法で、試料中の反応阻害物質の有無を確認することが可能である<sup>65)</sup>。1 検体につき 2 本チューブを用意し、1 本目のチューブには試料水の DNA 抽出液 5 μL と LAMP 法試薬 20 μL を加えて反応液とし、2 本目のチューブには 1 本目のチューブと同様の反応液に陽性コントロール 2 μL をインターナルコントロールとして添加する。冷凍保存した DNA 抽出液を用いて LAMP 反応を実施する場合、95°Cで 5 分間加熱し、氷上で急冷後、LAMP 反応に用いる（加熱変性）。

② 平板培養法との相関

	平板培養法(CFU/100 mL)		
	≥10	<10	計
陽性	192	141	333
陰性	39	483	522
計	231	624	855

感度 83.1%、特異度 77.4%、陽性的中率 57.7%、陰性的中率 92.5%、一致率 78.9%

（引用文献 63 および 64 を改変）

(4) 実検体における遺伝子検査の活用例

遺伝子検査法は、下記のとおり、様々な用途で利用できると考えられる。ただし、各施設において遺伝子検査法を導入する際は、それぞれの方法の特性を理解した上で自施設の平板培養法の結果と比較し、どのように利用するかを検討することが望ましい。

① 清掃・消毒管理された検水におけるレジオネラ属菌の陰性を確認する場合

日常的に清掃・消毒管理している入浴施設等において、定期的な平板培養検査の結果、レジオネラ属菌が陰性であることを確認している検水において、遺伝子検査法を用いて、レジオネラ属菌の有無を判定する。この場合の遺伝子検査は、自治体の条例で定められた水質基準に係る検査ではなく、自主的な検査として実施し、衛生管理状態の確認のための参考値として活用する。遺伝子検査法としては、qPCR 法、EMA-qPCR 法、LC EMA-qPCR 法、LAMP 法が使用できる。

② 平板培養法と併用したスクリーニング検査として利用する場合

レジオネラ属菌が検出され、営業を停止している施設・浴槽において、浴槽・配管等の洗浄実施後、迅速な営業再開のために、洗浄効果の確認に利用する<sup>66)</sup>。平板培養法と同時に遺伝子検査法を実施し、遺伝子検査が陰性であることをもって、一旦営業を再開する。ただし、最終的な陰性の判断は、平板培養法の結果により判定する。平板培養法からレジオネラ属菌が検出された場合は、直ちに営業を停止し、必要な措置を講じる。この場合、患者発生リスクが高まる気泡発生装置の使用は控えるのが望ましい。遺伝子検査法としては、qPCR 法、EMA-qPCR 法、LC EMA-qPCR 法、LAMP 法が使用できる。

③ 公衆浴場の水質基準に係る検査として、平板培養法に置き換えて実施する場合

平板培養法との整合性の観点から、遺伝子検査法のみで水質基準に適合しているか否かを判断する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法（LC EMA-qPCR 法）を用いることが望ましい。ただし、検査法は、各自治体の条例等で規定されている場合があるため、事前に確認する必要がある。過去の検討結果<sup>64)</sup>から、平板培養法と最も相関の高い LC EMA-qPCR 法における 1 CFU/100 mL 相当をカットオフ値とし、判定する。

④ レジオネラ症患者発生時における感染源追究のための検査の場合

レジオネラ症患者の感染源として疑われる検水の検査においては、患者検体から菌が分離された場合、遺伝子型別（PFGE 法、SBT 法、MLVA 法など）により分子疫学的な調査も必要となることから、平板培養法により菌を分離する必要がある。ただし、同時に遺伝子検査法を実施することで、汚染されている検水を推定することが可能となり、コロニーの選別の際、有用な情報となる。

## 5. 菌抗原の検出

レジオネラ症の確定診断において、もっとも多く使われている検査法である。

### 1) 尿中抗原の検出

尿中抗原検出法による診断は尿検体を用いるため検体採取が容易で患者負担が軽い。また、発症とほぼ同時に陽性になる場合も多く、尿中抗原検出法の普及は発症から診断までに要する日数の大幅な短縮をもたらした。イムノクロマト法を利用した検出キットが市販されており、保険適用となっている。これらのキットは操作が簡便で、15分で判定可能である。感度は約80%、特異性はほぼ100%である。*L. pneumophila* 血清群1のみを検出するキットは、熱安定性の可溶性抗原であるリポ多糖<sup>67)</sup>を尿中から検出する。BinaxNow レジオネラ (Abbott)、チェックレジオネラ (アレフレッサファーマ)、イムノキャッチ-レジオネラ (栄研化学 (株)) などのキットがある。

また、*L. pneumophila* の血清群1から15を検出できるキットとして、リボテストレジオネラ (極東製薬工業 (株)) が市販されている。本キットは上記のリポ多糖に加え、リボゾームタンパク質L7/L12を検出することで幅広い血清群の検出を可能にした。一部の他種のレジオネラ属菌に対して交差反応性を示すことが確認されている。

尿を検体として取り扱う際には感染源として取り扱う。尿検体が大きい粒子を含む場合は、透明な上澄み液を使う。凍結した検体は高濃度のリン酸塩、尿酸塩を含む場合、解凍時に多量の塩を析出することがあるので、使用時には37℃まで加温して用いる。また、血中のリウマトイド因子が高値の場合や血清病の患者では偽陽性を示す場合がある。偽陽性を疑う場合は95℃で5分間尿を加熱して再度検査すると良好な結果を得られる場合がある<sup>68)</sup>。

尿中抗原検出法は一部を除き *L. pneumophila* 血清群1の抗原を検出する系であり、他の血清群や他種のレジオネラ属菌を起因菌としたレジオネラ症を診断できないことに留意すべきである。したがって陰性であるからといってすぐにレジオネラ症を否定せず、培養やPCRなどの他の検査による結果もみて判断する。

## 6. 血清抗体価の測定

尿中抗原診断法が普及する以前は、血清抗体価の測定がレジオネラ症診断の主流であったが、本法は早期診断には適さないため、実施されることが少なくなってきた。軽症例や検体の採取ができなかった場合などにおける既往的な診断には重要な方法である。従来から行われてきた間接蛍光抗体法とキットが販売されていて容易にできるマイクロプレート凝集反応法がある。また、ELISA 法による *L. pneumophila* に対する血清抗体価測定キットもあり、簡便だが、国内では販売されていない。

### 1) 間接蛍光抗体法 (Indirect immunofluorescence assay: IFA)

抗原にはレジオネラ属菌の参考株が用いられ、発症後 1 週以内の急性期血清と、3-6 週後の回復期血清を測定する。単一血清では 256 倍以上、ペア血清であれば、抗体価 128 倍以上でかつ 4 倍以上の上昇が見られた場合に陽性と判定する。

#### (1) 抗原液の作製

- ① レジオネラ属菌を保存培地から BCYE $\alpha$  寒天培地に展開し、35°C、48 時間培養。
- ② 発育した集落を新たな BCYE $\alpha$  寒天培地に濃厚に展開し、さらに 2 日間培養。
- ③ この培地表面に 1%ホルマリンを加えた PBS (pH7.2) 溶液 (作製法は 2. 菌体の検出 2) 蛍光抗体法 の項を参照) 10 mL を加え、菌体を滅菌スピッツに移し取り、1 夜冷蔵庫に置く (殺菌のため)。
- ④ 1,600  $\times$ g、30 分間遠心し、上清を捨て、0.1%ホルマリン PBS (pH7.2) を加え、McFarland No.4~5 に調整し、これに卵黄 (たとえば Egg Yolk Enrichment 50% (Becton, Dickinson) など) を 0.5% になるように加える。
- ⑤ この時の菌数は約  $10^9$ /mL で、400 倍の鏡検で一視野当り、約 500~600 個の菌が観察されるが、菌数が異なった時は、PBS (pH7.2) 溶液で調整する。
- ⑥ アジ化ナトリウムを 0.5% になるように加えて、4°C に保存する。4 か月は安定である。
- ⑦ レジオネラ菌種の中から、頻度の高いものの抗原を幾つか組み合わせて、多価抗原を作製しておくると便利である。

#### (2) IFA 用抗原スライドガラスの作製

- ① スライドガラス (たとえば 18 穴黒ベタ、5 mm $\phi$ 、UV 用、松浪硝子工業) を、100% エチルアルコールで脱脂して乾燥させる。
- ② 滅菌したヘマトクリット管に抗原液を取り、各ウエルに一定量ずつ滴下する。自然乾燥させる。



③ すべての抗原液を載せ終わったら、アセトン液中で 15 分間固定する。

### (3) 被検血清の希釈

- ① U 底マイクロプレートを使用する場合、マイクロピペットで、1%BSA を添加した PBS (pH 7.2) を最初の一穴目に 75  $\mu$ L、2 穴目から 25  $\mu$ L ずつ入れる。
- ② 一穴目に被検血清を 5  $\mu$ L 加える (16 倍希釈)。
- ③ マイクロピペット (25  $\mu$ L) で 16 倍から 1,024 倍まで希釈を行う。多数検体の場合は 12 連マイクロピペット等が便利である。

### (4) IFA 染色

- ① (2) で作製した IFA 用抗原スライドグラス上に、希釈した被検血清を希釈の薄い方から 10  $\mu$ L ずつ載せていく。
- ② 湿潤箱に入れて、37°C、40 分間反応させる。
- ③ PBS (pH 7.2) で、静かにオーバーフロー洗浄後、PBS を入れたバット内につけて、バイブレーターに 5 分かける。
- ④ 純水を入れたバット内でさらに 4 回ゆすぐ。取り出して、水分を切る。
- ⑤ 50 倍希釈 FITC 標識抗ヒト免疫グロブリン (IgG、IgM、IgA に反応できると感度が高くなる) を、各ウエルに 10  $\mu$ L 注ぐ。
- ⑥ 湿潤箱内で、37°C、40 分間反応させる。
- ⑦ PBS で静かに洗浄後、PBS バット内に入れ、バイブレーターに 5 分間かける。
- ⑧ 純水で 4 回ゆすぐ。
- ⑨ 水分を軽く切って蛍光退色防止剤入封入剤 (たとえば ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) など) で封入する。
- ⑩ 遮光し、30 分落ちつかせて検鏡。

### (5) 判定

#### ① 蛍光の強度

4+ : 菌体が輝くように、黄色～黄緑色に観察される。

3+ : 明るい黄緑～緑色に観察される。

2+ : 緑色に染色された菌体が明らかに観察される。

1+ : 緑色に染色された菌体が観察されるが、蛍光を発しているようには見えないもの。

- : 菌体が見えないか、わずかに少数の菌が観察されるもの。また、抗原液の辺縁部のみが強く染色されていることがあるが、これは判定に考慮しない。

#### ② 菌量

被検血清の希釈倍数が高くなるにつれて、蛍光は弱くなるが、すべての菌の蛍光が一様に低下するとは限らない。はじめの菌数の約 50% のものが 2+ 以上の強度を示す

最高希釈倍数を、被検血清の抗体価とする。

③ 判定 (①および②より)

ペア血清の場合：急性期と回復期の抗体価の差が4倍以上で、かつ回復期血清が128≦の時。シングル血清の場合：256≦の時。

④ 接眼マイクロメーター (1mm 100マスなど) を使用すると、視野区分が明確化され、光っている菌の%が容易に算出できる。

⑤ 抗体価が既知の陽性参照血清を使用して抗体価を標準化する必要がある。

## 2) マイクロプレート凝集反応<sup>69)</sup>

間接蛍光抗体法において、関与する抗体は全てのクラスを含み、IgGが主体であるのに対し、本法では、IgMによる凝集反応を見るので、急性期および発症後2-3週後のペア血清を試験するのがよい。陰性の場合には5-6週後の血清も試験する。デンカ(株)から体外診断用医薬品として、レジオネラ凝集反応用抗原「生研」が販売されている。本キットを用いて、*L. pneumophila* 血清群1-6、*L. bozemanii*、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. micdadei*という各菌種血清群に対する血中抗体価を測定することができる。その場合、これらの菌種について、抗原液の作製は不要である。

### (1) 抗原液の作製

- ① BCYE $\alpha$ 寒天平板培地で2~3日間培養した菌をかきとって、生理食塩水に懸濁し、易熱性抗原による交差反応をさけるため、100℃、1時間、あるいは121℃、30分処理する。
- ② 1,600×g、15分間遠心して上清を捨て、もう一度遠心して洗い、抗原希釈液(防腐剤としてアジ化ナトリウムを0.1w/v%になるよう添加したPBS)で $8 \times 10^9$ /mLに調整する((5)注意④参照)。遮光して2~10℃で保存する。1年間使用可能である。
- ③ 使用時に、1検体当たり75  $\mu$ Lの抗原液をそれぞれ小試験管に採取し、2倍量(1検体当たり150  $\mu$ L)の抗原希釈液を加えて希釈抗原液とする。

### (2) 検体の希釈

- ① レジオネラ症が疑われる患者の血清を56℃、30分処理して非働化する。非働化処理をしないと非特異的反応がでる場合がある。
- ② 小試験管に検体希釈液(1%のBSAあるいは正常ウサギ血清、0.1%のアジ化ナトリウムを含む生理食塩水)350  $\mu$ Lを採取し、次に検体50  $\mu$ Lを加え、攪拌する(1:8希釈)。

### (3) 操作

11種の菌抗原を使用する場合を述べる。

- ① 血清1検体あたり96穴U底マイクロプレート1枚を横にして、右端の1列を残し、11列すべての穴に検体希釈液を25  $\mu$ L ずつ12連マイクロピペット等で分注。
- ② 1:8希釈した検体を最下行の穴にマイクロピペットで25  $\mu$ L 入れ、攪拌する。
- ③ 12連マイクロピペット等で1:16希釈した検体を次の穴に25  $\mu$ L ずつ移し、2倍階段希釈を行う。最上行の穴は検体の希釈は行わず、検体希釈液のみ入れて抗原対照穴とする。
- ④ 各希釈抗原液を対応する穴に25  $\mu$ L ずつ滴下し、マイクロプレートミキサーで攪拌する。
- ⑤ 湿潤箱にいれ常温で一晩（16時間以上）静置する。

#### (4) 判定

- ① 明るい平坦な場所に黒紙を敷いた上にマイクロプレートを置いて、または沈降線観察装置を用いて各穴の沈降像を観察する。
- ② 最初に各抗原の抗原対照穴の判定がーであることを確認する。もし+で自己凝集が起こっていればその抗原液は使用しない。
- ③ 判定は図5に従って行い、+以上を凝集とする。
- ④ 各抗原について凝集が観察される血清の最高希釈倍数を凝集価とする（最下段のみ+なら16）。
- ⑤ ペア血清の場合：急性期と回復期の抗体価の差が4倍以上で、かつ回復期血清が $128 \leq$ の時、シングル血清の場合： $256 \leq$ の時、レジオネラ症とする。

#### (5) 注意

- ① 使用する試薬は使用時に室温にもどしておく。
- ② 手動のダイリューターとポリスチレンのプレートの組み合わせは、底面に傷がついて判定しにくいので使用しない。
- ③ ニューモフィラ群1B、3、6、ミクダデイ抗原に対してマイコプラズマ肺炎では1:128となることがあるので鑑別に注意する。同様に、ニューモフィラ群1B抗原に対してクラミジア肺炎では1:128となることがあるので鑑別に注意する。1:256以上の力価ならレジオネラ症である。
- ④ 菌抗原を自作する場合、菌数はMcFarland比濁法、あるいは光度計でOD660値を計測して調整する。McFarland比濁法の場合は例えばMcFarland No.5の菌を5.3倍遠心濃縮する。*L. pneumophila*は37°Cで培養すると細長く伸びてコロニー数と濁度との関係が不安定になるので、30°Cで4日培養の菌を使うとよい。最終的には、プレート上で菌が沈殿した時にできる白いスポットの大きさがキットの菌抗原と

同程度になるように調整する。

- ⑤ キットに含まれていない *L. pneumophila* 血清群 12 の菌抗原を自作して診断した事例が報告されている<sup>70)</sup>。

### 3) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

IFA 法と ELISA 法を比べた時に、ELISA 法はより客観的・正確で自動化しやすいと考えられている。欧米では *L. pneumophila* 血清群 1-7 に対する IgG/IgM を検出する Serion ELISA classic *Legionella pneumophila* 1-7 IgG/IgM (Virion-Serion, Germany)<sup>71)</sup> や *L. pneumophila* 血清群 1-6 に対する IgG/IgM/IgA を検出する Zeus ELISA *L. pneumophila* IgG/IgM/IgA test system (Zeus Scientific, USA)<sup>72)</sup> 等が使用されている。これらの ELISA ではマイクロプレートに混合抗原が張り付けてあり、それぞれの血清群に対する抗体価を測定できるわけではない。感度については、オランダの集団感染事例で、IFA 法・ELISA 法・凝集反応 (rapid micro-agglutination test、前出のマイクロプレート凝集反応とは少し異なる) について、それぞれ 64%、61%、44% という報告がある<sup>73)</sup>。

## 7. 分子疫学的解析

レジオネラ症は環境から人に直接感染して発症する。そのため、感染源の特定には、患者およびその周辺環境から分離された菌株の遺伝子型別を実施し、遺伝子型の一致を確認する必要がある。その方法として、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法、Sequence-Based Typing (SBT) 法、Multiple-Locus Variable number tandem repeat (VNTR) Analysis (MLVA) 法などがある。*L. pneumophila* においては、SBT 法が国際的な遺伝子型別法として確立されている。

### 1) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法

PFGE 法は、電場の方向を変化させることにより、通常の電気泳動法では分離できなかった巨大 DNA 断片をその長さに従って分離することができる。一般的に、院内感染事例や食中毒の原因菌の特定など分子疫学的調査に用いられている。これまで、純培養から PFGE 解析に 4 日要していたが、2 日に短縮され良好な再現性が得られる改良法<sup>74)</sup> について解説する。

#### プラグの調製

- ① 菌株を BCYE $\alpha$  寒天培地上で継代し、35°C で 2 日間培養を行う。
- ② 48 時間以内の新鮮な菌体を 100~200  $\mu$ L の滅菌超純水に McFarland No. 5 程度の濃度に調整する。
- ③ 50~55°C に温めた等量の 1% SeaKem<sup>R</sup> Gold Agarose と混ぜ、plug mold (Bio-Rad) に流し込む。室温で固まらせてアガロースブロック (プラグ) を作製する。1 検体当たり 2 個のプラグを作製する。
- ④ プラグをプロテアーゼ溶液 (0.1 mg/mL proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine, 0.5 M EDTA, pH 8.0) 1 mL に浸し、50°C で 1 時間振盪処理する。
- ⑤ プロテアーゼ溶液からプラグを取り出し、プラグを適当な大きさに切断後、4 mM Pefabloc SC (Roche Diagnostics) を含んだ TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 1 mL に浸し、50°C で 30 分振盪洗浄する。切断して残ったプラグ片および予備のプラグはプロテアーゼ溶液中に 4°C で保存する。
- ⑥ 洗浄後、新しい 4 mM Pefabloc SC を含んだ TE バッファーに換え、再度 50°C で 30 分振盪洗浄する。洗浄後、TE バッファー 1 mL に換え、氷上で 30 分振盪洗浄する。

### 制限酵素(*Sfi*I)処理

- ① 1.5 mL チューブに 200  $\mu$ L の制限酵素用緩衝液 1×M バッファー (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 100  $\mu$ g/mL bovine serum albumin) を入れ、プラグ片をその中に移す。氷上で 30 分振盪し、プラグ片中のバッファーを制限酵素用緩衝液に置換する。
- ② 制限酵素用緩衝液を除き、100  $\mu$ L の 50 units/sample の制限酵素 *Sfi*I (Roche) を含む制限酵素溶液を加える。50°C で 4 時間振盪し消化する。
- ③ 制限酵素溶液を除き、1 mL の 0.5×TBE (Tris-borate 45 mM, EDTA 1 mM) に加える。電気泳動するまで 4°C に保存する。

### 電気泳動

電気泳動は使用するパルスフィールドゲル電気泳動装置の取り扱い説明書に従う。ここでは、CHEF DR III System (Bio-Rad) を用いた解説を行う。

- ① プラグを 1% アガロースゲル (SeaKem<sup>R</sup> Gold Agarose) に埋め、室温でゲルを固まらせる。
- ② 約 2L の 0.5×TBE を泳動槽に入れ、泳動バッファーを 14°C に冷却する。14°C に冷却後、アガロースゲルをセットし、泳動条件を 6V/cm、パルスタイム 5 秒から 50 秒、泳動時間 21 時間に設定し、泳動を開始する。
- ③ 電気泳動終了後、0.5  $\mu$ g/mL のエチジウムブロマイド溶液で 1 時間染色する。超純水で 30 分 2 回洗浄し、紫外線照射装置上でバンドを検出する。

## 2) Sequence-Based Typing (SBT) 法

SBT 法は、*L. pneumophila* の特定の 7 つの遺伝子 *flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* の一部領域の塩基配列を解読し、その塩基配列により sequence type (ST) を決定する。ST はデジタル化された情報のため菌株間の比較が容易である。SBT 法は European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI) により標準化され、ST のデータベースは定期的な更新および整備がなされているが、ホームページが閉鎖されているため、データベース管理者 ([legionella-sbt@ukhsa.gov.uk](mailto:legionella-sbt@ukhsa.gov.uk)) から情報を入手する必要がある。

レジオネラレファレンスセンター事業の一環として、日本の臨床分離株を収集し、集団感染事例を含む培養陽性症例の遺伝子型(ST)を決定し、その分布傾向について解析が行われている<sup>6)</sup>。また、臨床分離株の中で報告が最も多い *L. pneumophila* 血清群 1 において、浴槽水、冷却塔水、土壌等生息環境により遺伝子型(ST)の分布が異なることが明らかとなっている<sup>75)</sup>。

(1) 分離菌株の SBT 法

- ① 被菌株よりゲノム DNA を精製する。または、簡易法として、被菌株を TE バッファーに懸濁し、95°C で 10 分間の熱処理後、遠心操作により得られた上清をテンプレートとする。
- ② プライマー配列と反応組成を以下に示した。プライマー配列は本来の遺伝子配列の Forward プライマーと Reverse プライマーに、それぞれ M13 Forward 配列と M13 Reverse 配列を付与したプライマーを使用し、PCR 反応を行う。PCR 条件は、95°C 5 分後、95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 45 秒の 35 cycle、最後に 72°C 10 分の伸長反応を行う。

遺伝子	プライマー名	PCR 産物 (bp)	プライマー配列 (5'-3') *
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> -587F (M13F)	414	TGTA AACGACGGCCAGT <u>GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG</u>
	960R (M13R)		CAGGAAACAGCTATGACC <u>CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G</u>
<i>pilE</i>	<i>pilE</i> -35F (M13F)	460	TGTA AACGACGGCCAGT <u>CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA</u>
	<i>pilE</i> -453R (M13R)		CAGGAAACAGCTATGACC <u>GCT GGC GCA CTC GGT ATC T</u>
<i>asd</i>	<i>asd</i> -511F (M13F)	576	TGTA AACGACGGCCAGT <u>CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G</u>
	1039R (M13R)		CAGGAAACAGCTATGACC <u>CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC</u>
<i>mip</i>	<i>mip</i> -74F (M13F)	559	TGTA AACGACGGCCAGT <u>GCT GCA ACC GAT GCC AC</u>
	<i>mip</i> -595R (M13R)		CAGGAAACAGCTATGACC <u>CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C</u>
<i>mompS</i>	<i>mompS</i> -450F (M13F)	711	TGTA AACGACGGCCAGT <u>TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG</u>
	<i>mompS</i> -1116R (M13R)		CAGGAAACAGCTATGACC <u>TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C</u>
<i>proA</i>	<i>proA</i> -1107F (M13F)	481	TGTA AACGACGGCCAGT <u>GAT CGC CAA TGC AAT TAG</u>
	<i>proA</i> -1553R (M13R)		CAGGAAACAGCTATGACC <u>ACC ATA ACA TCA AAA GCC</u>
<i>neuA</i>	<i>neuA</i> -196F (M13F)	459	TGTA AACGACGGCCAGT <u>CCG TTC AAT ATG GGG CTT CAG</u>
	<i>neuA</i> -634R (M13R)		CAGGAAACAGCTATGACC <u>CGA TGT CGA TGG ATT CAC TAA TAC</u>

\* Forward プライマーには M13 Forward (F) 配列が、Reverse プライマーには M13 Reverse (R) 配列がそれぞれ付加されている。下線の塩基配列が本来の遺伝子のプライマー配列である。

血清群 1 以外の *L. pneumophila* 株によっては、*neuA* 遺伝子が増幅されない場合がある。その際は、*neuAh* (N-Acylneuraminate Cytidyltransferase homolog) 遺伝子の下記の primer を用いる。

<i>neuAh</i>	<i>neuAh</i> -L (M13F)	791-794	TGTA AACGACGGCCAGT <u>ATC CAG CAG TTT TTA MAA ATT TAG G</u>
	<i>neuAh</i> -R (M13R)		CAGGAAACAGCTATGACC <u>TGG CTG CAT AAA YTA ATT CTT TAG CCA</u>

10×Taq buffer	2μL
dNTPs (2.5 mM)	1.6μL
10 pmol/μL primer F	0.4μL
10 pmol/μL primer R	0.4μL
Taq DNA polymerase	0.2μL
Nuclease-free water	13.4μL
<u>Template</u>	<u>2 μL</u>
Total	20μL

- ③ PCR反応終了後、増幅を電気泳動により増幅された遺伝子産物を確認する。増幅が確認できれば、PCR産物精製キットを用いて精製する。
- ④ シークエンス反応を行う。シークエンス用のプライマーは、M13 ForwardとM13 Reverseを用いて双方向から解析し、各遺伝子の塩基配列を確認する。

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')
M13 forward	TGTA AACGACGGCCAGT
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGACC

- ⑤ シークエンス反応液から精製キットを用いて未反応のダイターミネーターを除去し、DNAシークエンサーで解析し、遺伝子塩基配列を決定する。
- ⑥ 配列が決定された各遺伝子の塩基配列をEWGLIのデータベースで照合し、STを決定する。

## (2) 検体中の DNA を用いた Nested SBT 法

PCR 法や LAMP 法により、臨床検体や環境検体からレジオネラ DNA が検出された場合、その微量な検体 DNA を用いて、Nested SBT を実施することができる<sup>76)</sup>。

- ① 1st PCRのプライマー配列と反応組成を以下に示した。PCR条件は、95°C 5分後、



95°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 60 秒の 40cycle、最後に 72 °C 10 分の伸長反応を行う。

遺伝子	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> -L-N	TAT GCG TGA GCT TTC CGT TC
	960R	CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G
<i>pilE</i>	<i>pilE</i> -L-N	CGT TGG AAT CGG CTT GTC
	<i>pilE</i> -R-N	CGC ATT GGC AGA GGA ATC TA
<i>asd</i>	<i>asd</i> -1-N	CCC TGG AAG TGA ATC CTC AT
	<i>asd</i> -2-N	TTG CAG TAT TTC AGC GAT CTG T
<i>mip</i>	<i>mip</i> -1-N	TGA AGA TGA AAT TGG TGA CTG C
	<i>mip</i> -2-N	AAT AGG TCC GCC AAC GCT AC
<i>mompS</i>	<i>mompS</i> -450F	TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG
	<i>mompS</i> -R-N	TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C
<i>proA</i>	<i>proA</i> -L-N	CCG CTT CTC CAA CCA ATG A
	<i>proA</i> -R-N	CAC TCA ACA TAC CGC AAC CA
<i>neuA</i>	<i>neuA</i> -F-N	CCT TGC AGT CGT CTT GTT GT
	<i>neuA</i> -R-N	TTT CTG TTA GAG CCC AAT CG

10×Taq buffer	2μL
dNTPs (2.5 mM)	1.6μL
10 pmol/μL primer F	1μL
10 pmol/μL primer R	1μL
Taq DNA polymerase	0.2μL
Nuclease-free water	9.2μL
<u>Template</u>	<u>5μL</u>
Total	20μL

- ② 1st PCR 産物 5  $\mu$ L をテンプレートにして 2nd PCR を行う。2nd PCR のプライマー配列を以下に示した。PCR 条件は、95°C 5 分後、95°C 30 秒、55°C (*flaA*, *pilE*, *mompS*, *proA*, *neuA*) / 62°C (*asd*) / 60°C (*mip*) 30 秒、72°C 60 秒の 35 cycle、最後に 72°C 10 分の伸長反応を行う。

遺伝子	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> -587F (M13F)	TGTA AACGACGGCCAGT <u>GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG</u>
	<i>flaA</i> -R-N (M13R)	CAGGAAACAGCTATGACC <u>GGT ATC ACC TGC GGT TCC A</u>
<i>pilE</i>	<i>pilE</i> -35F (M13F)	TGTA AACGACGGCCAGT <u>CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA</u>
	<i>pilE</i> -453R (M13R)	CAGGAAACAGCTATGACC <u>GCT GGC GCA CTC GGT ATC T</u>
<i>asd</i>	<i>asd</i> -511F (M13F)	TGTA AACGACGGCCAGT <u>CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G</u>
	<i>asd</i> -1039R (M13R)	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC</u>
<i>mip</i>	<i>mip</i> -74F (M13F)	TGTA AACGACGGCCAGT <u>GCT GCA ACC GAT GCC AC</u>
	<i>mip</i> -595R (M13R)	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C</u>
<i>mompS</i>	<i>mompS</i> -509F (M13F)	TGTA AACGACGGCCAGT <u>GAC ATC AAT GTG AAC TGG</u>
	<i>mompS</i> -1015R (M13R)	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CAG AAG CTG CGA AAT CAG</u>
<i>proA</i>	<i>proA</i> -1107F (M13F)	TGTA AACGACGGCCAGT <u>GAT CGC CAA TGC AAT TAG</u>
	<i>proA</i> -1553R (M13R)	CAGGAAACAGCTATGACC <u>ACC ATA ACA TCA AAA GCC</u>
<i>neuA</i>	<i>neuA</i> -196F (M13F)	TGTA AACGACGGCCAGT <u>CCG TTC AAT ATG GGG CTT CAG</u>
	<i>neuA</i> -634R (M13R)	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CGA TGT CGA TGG ATT CAC TAA TAC</u>

10×Taq buffer	2 $\mu$ L
dNTPs (2.5mM)	1.6 $\mu$ L
10 pmol/ $\mu$ L primer F	1 $\mu$ L
10 pmol/ $\mu$ L primer R	1 $\mu$ L
Taq DNA polymerase	0.2 $\mu$ L
Nuclease-free water	9.2 $\mu$ L
1st PCR product	5 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

- ③ PCR反応終了後、増幅を電気泳動により増幅された遺伝子産物を確認する。増幅が確認できれば、PCR産物精製キットを用いて精製する。
- ④ シークエンス反応を行う。シークエンス用のプライマーは、M13 ForwardとM13 Reverseを用いて双方向から解析し、各遺伝子の塩基配列を確認する。
- ⑤ シークエンス反応液から精製キットを用いて未反応のダイターミネーターを除去し、DNAシークエンサーで解析し、遺伝子塩基配列を決定する。
- ⑥ 配列が決定された各遺伝子の塩基配列をEWGLIのデータベースで照合し、STを決定する。

### 3) Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) 法

MLVA 法は、細菌ゲノム中に存在する複数の反復塩基配列 (VNTR) 数が株により異なることを利用し、遺伝子型別を行う方法である。*L. pneumophila* においては、12 領域の VNTR (Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31, Lpms33, Lpms34, Lpms35, Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44) について設計した蛍光プライマーを用いて PCR を行い、ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems) およびフラグメント解析ソフトウェアにより、そのリピート数を解析する方法が報告されている<sup>77)</sup>。

MLVA 法は、SBT 法や PFGE 法に比べ、簡便で迅速に多数の検体を型別することができる利点がある。また、MLVA 法による型別は、ST や PFGE 型とも概ね相関していることが明らかとなっている<sup>78)</sup>。MLVA 法は、感染源の特定のための菌株の迅速なスクリーニングとして活用し、主要な菌株に関しては SBT 法による ST を決定することが望ましい。

## 引用文献

1. 森 正道, 星野啓一, 園田久子, 吉田広海, 藪内英子, 山城祐子, 小出道夫, 斎藤 厚, 岸本寿男, 古畑勝則, 相原雅典, 嶋田昌司: *Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever の集団発生例.I. 臨床所見. 感染症学雑誌, 69: 646-653, 1995.
2. Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW Jr, and Kassanoff I: Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am. J. Epidemiol.*, 107: 149-160, 1978.
3. 斎藤 厚, 下田照文, 長沢正夫, 田中 光, 伊藤直美, 重野芳輝, 山口恵三, 広田正毅, 中富昌夫, 原 耕平: 本邦はじめての Legionnaires' disease (レジオネラ症)の症例と検出菌の細菌学的性状. 感染症学雑誌, 55: 124-128, 1981.
4. Fields BS, Benson RF, Besser RE: *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation: *Clin Microbiol Rev*, 15: 506-26, 2002.
5. 公益社団法人 日本化学療法学会 レジオネラ治療薬評価委員会: レジオネラの診断と治療に関するアンケート調査結果. 日本化学療法学会雑誌, 64: 66-75, 2016.
6. Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Kyoko Chida, Hitomi Ohya, Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima, Takahiro Hiratsuka, Shuji Yoshino, Miho Sakata, Miyo Murai, Makoto Ohnishi, Working Group for *Legionella* in Japan : *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016: *Appl Environ Microbiol*, 84: 721-18, 2018.
7. 国立感染症研究所: 病原体等安全管理規定,令和2年4月.
8. レジオネラ症防止指針作成委員会:レジオネラ症防止指針第5版, 公益財団法人日本建築衛生管理教育センター, 東京, 2024.
9. 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査法について: (令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知)
10. 森本 洋: 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別方法の有用性.環境感染症学会誌, 25:8-13, 2010.
11. 森本 洋, 宮坂次郎: レジオネラ選択分離培地の比較検討. 北海道立衛生研究所所報, 58: 51-54, 2008.
12. 森本 洋: 検査法の検討3 濃縮についての検討. 分離培地としての BCYE $\alpha$  培地活用に関する検討. 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成20年度総括・分担研究報告書, 147-155, 2009.

13. 森本 洋, 岩渕香織, 佐々木美江, 瀬戸順次, 星 俊信, 柳沼 幸, 山本一成, 和栗敦, 磯部順子, 緒方喜久代, 宮坂次郎: 検査法の検討 2 効率の良いコロニー観察法の普及. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 20 年度総括・分担研究報告書, 133-145, 2009.
14. レジオネラ症防止指針作成委員会:新版レジオネラ症防止指針, 財団法人ビル管理教育センター, 東京, 1999.
15. 森本 洋, 磯部順子, 岩渕香織, 緒方喜久代, 佐々木美江, 瀬戸順次, 柳沼 幸, 矢崎知子: 検査法の検討 4 効率の良い集落観察法の普及と検討. 分離培地の保存に関する検討. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 21 年度総括・分担研究報告書, 137-158, 2010.
16. 吉岡浩明, 高柳昇, 石黒卓, 小西光政, 糸井正枝, 丸山茂樹, 杉田裕: レジオネラ肺炎診断法に関する研究. 日本臨床微生物学雑誌, 22: 28-34, 2012.
17. Anneke van der Zee, Harold Verbakel, Caroline de Jong, Raymond Pot, Marcel Peeters, Joop Schellekens, and Anneke Bergmans: Clinical Validation of Diagnosis of *Legionella* Infection, *Legionella*, Editors: Reinhard Marre, Yousef Abu Kwaik, Christopher Bartlett, Nicholas P. Cianciotto, Barry S. Fields, Matthias Frosch, Jörg Hacker, Paul Christian Lück, ASM Press, 189-192, 2002.
18. 小栗豊子【編集】:8 喀痰、臨床微生物検査ハンドブック【第 5 版】, 三輪書店, 87-91, 2017.
19. 小栗豊子【編集】:6 *Legionella* の検査法、臨床微生物検査ハンドブック【第 5 版】, 三輪書店, 213-216, 2017.
20. 森本 洋, 小川恵子, 三津橋和也: レジオネラ症患者の喀痰からいかにしてレジオネラ属菌を検出するか. 第 68 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第 66 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 プログラム・抄録集, 188, 2019.
21. Moosavian M, Seyed-Mohammadi S, Saki M, Shahi F, Khoshkholgh Sima M, Afshar D, Barati S. Loop-mediated isothermal amplification for detection of *Legionella pneumophila* in respiratory specimens of hospitalized patients in Ahvaz, southwest Iran, Infect Drug Resist. 12: 529-534. 2019.
22. Water quality -- Detection and enumeration of *Legionella*: ISO 11731, 1998(E).
23. 森本 洋, 池田徹也, 清水俊一, 山口敬治: 浴槽水中のレジオネラ属菌検査における非濃縮検体の重要性. 北海道立衛生研究所所報, 61, 21-23, 2011.

24. 森本 洋, 池田徹也, 清水俊一, 山口敬治: 濃縮法の違いによる温泉水中のレジオネラ属菌検出結果の比較. 北海道立衛生研究所所報, 59: 73-74, 2009.
25. Kura F, Amemura-Maekawa J, Yagita K, Endo T, Ikeno M, Tsuji H, Taguchi M, Kobayashi K, Ishii E, and Watanabe H: 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, 2006. 20
26. 枝川亜希子, 木村明生, 三輪由佳, 田中榮次, 足立伸一, 宮本比呂志: レジオネラ検査ろ過濃縮法におけるメンブランフィルター材質の回収率比較. 防菌防黴誌, 41:63-66, 2013.
27. 小栗豊子, 中村文子, 三澤成毅: 環境水からの *Legionella* 属菌の検出について. 日本臨床微生物学雑誌, 7: 21-25, 1997.
28. 春日 修, 高木紀美子, 谷 佳都, 絹巻明生: 環境水由来レジオネラ属菌の分離方法に関する検討. 感染症学雑誌, 73: 25-34, 1999.
29. 森本 洋, 磯部順子, 大屋日登美, 緒方喜久代, 中嶋 洋, 金子紀子, 矢崎知子, 吉野修司, 倉 文明, 前川純子: レジオネラ属菌検査法の現状と今後に向けた検討ーレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループの発足及び地方衛生研究所を対象としたレジオネラ属菌検査法アンケート調査結果ー. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 22 年度総括・分担研究報告書, 101-155, 2011.
30. 春日 修, 高木紀美子, 三沢 均, 小野沢正人, 千葉栄次, 谷 佳都, 池戸正成: 環境水由来レジオネラ属菌の検出における有機酸緩衝液前処理の検討. 感染症学雑誌, 76: 1010-1015, 2002.
31. 森本 洋, 磯部順子, 大屋日登美, 緒方喜久代, 中嶋 洋, 小川恵子, 田中 忍, 長瀬敏之, 矢崎知子, 山口友美, 吉野修司, 渡辺ユウ, 倉 文明, 前川純子: レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 24 年度総括・分担研究報告書, 93-130, 2013.
32. CDC Laboratory Guidance for Processing Environmental Samples, 2005.
33. Mercante JW and Jonas M. Winchell JM: Current and Emerging *Legionella* Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. *Clin. Microbiol. Rev.* 28:95-133, 2015.
34. 井上浩章, 枝川亜希子: アメーバ共培養法を用いたレジオネラ属菌の検出. 防菌防黴誌, 47:273-277, 2019.
35. Segal G, Shuman H.A: *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within

- Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun*, 67:2117-2124, 1999.
36. Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Adachi S, Furuhashi K, Miyamoto H: Investigation of *Legionella* contamination in bath water samples by culture, amoebic co-culture, and real-time quantitative PCR methods. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12: 13118-13130, 2015.
  37. 枝川亜希子, 木村明生, 足立伸一, 松島加代, 宮本比呂志: アメーバ共培養-LAMP法を用いた水景施設におけるレジオネラ属菌生息調査. *防菌防黴誌*, 44:585-589, 2016.
  38. Inoue H, Agata K, Ohta H: Phylogenetic characterization of viable but-not-yet cultured *Legionella* groups grown in amoebic cocultures: a case study using various cooling tower water samples. *Biocontrol Sci.*, 24, 30-45, 2019
  39. Edagawa A, Kimura A, Miyamoto H: Investigations on Contamination of Environmental Water Samples by *Legionella* using Real-Time Quantitative PCR Combined with Amoebic Co-Culturing. *Biocontrol Sci.*, 24:213-220, 2019.
  40. 石井圭一: アメーバ図鑑, 金原出版 100, 1999
  41. Brown SL, Bibb WF, and McKinney RM: Retrospective examination of lung tissue specimens for the presence of *Legionella* organisms: comparison of an indirect fluorescent-antibody system with direct fluorescent-antibody testing. *J. Clin. Microbiol.*, 19: 468-472, 1984.
  42. Nagai T, Sobajima H, Iwasa M, Tsuzuki T, Kura F, Amemura-Maekawa J, and Watanabe H: Neonatal sudden death due to *Legionella pneumoniae* associated with water birth in a domestic spa bath. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 2227-2229, 2003.
  43. Benson RF, and Fields BS: Classification of the genus *Legionella*. *Semin. Respir. Infect.*, 13:90-99, 1998.
  44. 小出道夫, 神野 勉, 塚原八重子, 前島健治, 斎藤 厚: 近畿地方のクーリングタワー水からの *Legionella* の分離. *感染症学雑誌*, 65: 1578-1582, 1991.
  45. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Endo T, and Watanabe H: Distinct difference of *flaA* genotypes of *Legionella pneumophila* between isolates from bath water and cooling tower water, *Microbiol. Immunol.*, 52: 460-464, 2008.
  46. 山本啓之: PCR法による *Legionella* 属細菌の検出・同定. *日本臨床*, 50 特別号: 394-399, 1992.
  47. Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, and Atlas RM : Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Molecular and Cellular Probes*, 4: 175-187, 1990.
  48. Perkin Elmer: Package insert, EnviroAmp Legionella Kits. Perkin Elmer Corporation.

1993.

49. Nakaue R, Qin T, Morita M, Ren H, Chang B, Murai M, Amemura-Maekawa J, and Ohnishi M: Development of a multiplex-PCR serotyping assay for characterizing *Legionella pneumophila* serogroups based on the diversity of LPS biosynthetic loci. *J Clin Microbiol.* 59: e00157-21, 2021.
50. 前川純子, 中西典子, 小松頌子, 田中 忍, 森中えりか: *Legionella pneumophila* 血清型別のための multiplex-PCR 法の実施と改良. 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和 4 年度総括・分担研究報告書, 129-137, 2023.
51. 鈴木健一朗, 平石 明, 横田 明: 微生物の分類・同定実験法, 48-61, 2001.
52. Hiraishi A: Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15:210-213, 1992.
53. Hiraishi A, Shin YK, Ueda Y, and Sugiyama J: Automated sequencing of PCR-amplified 16S rDNA on “HydroLink” gels. *J. Microbiol. Methods*, 19: 145-154, 1994.
54. Janda JM, and Abbott SL: 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.*, 45: 2761-2764, 2007.
55. Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, and Heuzenroeder MW: Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 1560-1567, 1998.
56. Ratcliff R M: Sequence-based identification of *Legionella*. In *Legionella Methods and Protocols*, (Buchrieser, C., Hilbi, H., eds.), pp.57–72, *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa. 2013.
57. Kozak NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor TH, Jr, Shelton BG, and Fields BS: 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.* 47:2525–35, 2009.
58. Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M: Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based typing. *Appl Environ Microbiol.* 79:3959–66, 2013.
59. 河野喜美子, 岡田美香, 倉 文明, 前川純子, 渡辺治雄: 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 II. 診断検査法の比較. *感染症学雑誌*, 81: 173–182, 2007.



60. 小出道夫, 斎藤 厚, 比嘉 太, 山城祐子, 伊志嶺朝彦, 普天間光彦, 稲留 潤, 川上 和義, 草野展周: Two step polymerase chain reaction 法による *Legionella pneumophila* の検出. 感染症学雑誌, 67: 1062–1067, 1993.
61. Aoki S, Hirakata Y, Miyazaki Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Tomono K, Yamada Y, Tashiro T, Kohno S, and Kamihira S: Detection of *Legionella* DNA by PCR of whole-blood samples in a mouse model. J. Med. Microbiol., 52:325–329, 2003.
62. Koide M, Higa F, Tateyama M, Nakasone I, Yamane, N, and Fujita J: Detection of *Legionella* species in clinical samples: Comparison of polymerase chain reaction and urinary antigen detection kits. Infection. 34:264–268, 2006.
63. 磯部順子, 佐々木麻里, 田栗利紹, 金谷潤一, 川野みどり, 武藤千恵子, 山口友美, 淀谷雄亮, 上野潤二, 東出誠司, 中筋愛, 吉崎美和, 原口浩幸, 森中りえか: レジオネラ属菌迅速検査法の評価. 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28～30 年度総合研究報告書, 19–33, 2019.
64. 磯部順子, 鳥谷竜哉, 佐々木麻里, 八木田健司, 山口友美, 武藤千恵子, 飯高順子, 淀谷雄亮, 金谷潤一, 浦山みどり, 田栗利紹, 緒方喜久代, 原口浩幸, 森中りえか, 泉山信司: レジオネラ属菌迅速検査法の評価. 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 25～27 年度総合研究報告書, 53–60, 2016.
65. 枝川亜希子, 土井 均, 木村明生, 田中榮次, 肥塚利江, 渡辺 功: LAMP 法を用いた浴槽水からのレジオネラ属菌検出時における反応阻害確認の必要性. 防菌防黴誌, 37:3–8, 2009.
66. 浅野陽子: 核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について, 生活と環境, 52, 89–91, 2007.
67. Kohler RB, Zimmerman SE, Wilson E, Allen SD, Edelstein PH, Wheat LJ, and White A: Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease. Ann. Intern. Med., 94: 601-605, 1981.
68. Pontoizeau, C., Dangers, L., Jarlier, V., Luyt, C.E., Guiller, E., Fievet, M.H., Lecso-Bornet, M., Aubry, A., and Brossier, F. (2014) Ruling out falsepositive urinary *Legionella pneumophila* serogroup 1 and *Streptococcus pneumoniae* antigen test results by heating urine. J. Clin. Microbiol., 52, 4347–4349.
69. 藪内英子, 斎藤 厚, 二木芳人, 田口善夫, 山口恵三, 河野 茂, 本田武司: 抗レジオネラ血清抗体価診断基準値の設定ーマイクロプレート凝集反応ー. 感染症学雑誌,

- 71: 116-124, 1997.
70. Nishizuka M, Suzuki H, Ara T, Watanabe M, Morita M, Sato C, Tsuchida F, Seto J, Amemura-Maekawa J, Kura F, Takeda H. A case of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 12 and treated successfully with imipenem. *J. Infect. Chemother.*, 20:390-393, 2014.
  71. Boshuizen HC, Den Boer JW, de Melker H, Schellekens JFP, Peeters MF, van Vliet JA, Conyn-van Spaendonck MAE. Reference values for the SERION classic ELISA for detecting *Legionella pneumophila* antibodies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 22:706-708, 2003.
  72. Malan AK, Martins TB, Jaskowski TD, Hill HR, Litwin CM. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6. *J. Clin. Microbiol.*, 41:3060-3063, 2003.
  73. Yzerman EPF, den Boer JW, Lettinga KD, Schel AJ, Schellekens J, Peeters M. Sensitivity of three serum antibody tests in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands. *J. Med. Microbiol.*, 55:561-566, 2006.
  74. 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.
  75. Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F; Working Group for *Legionella* in Japan: Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. *Appl Environ Microbiol.*, 78:4263-4270, 2012.
  76. Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M; Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol.* 47:981-987, 2009.
  77. Sobral D, Le Cann P, Gerard A, Jarraud S, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C: High-throughput typing method to identify a non-outbreak-involved *Legionella pneumophila* strain colonizing the entire water supply system in the town of Rennes, France. *Appl Environ Microbiol.* 77:6899-6907, 2011.
  78. 中西典子, 田中 忍, 野本竜平, 米澤武志, 平塚貴大, 水本嗣郎, 前川純子: MLVA法における*Legionella pneumophila*の遺伝学的特徴. 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28 年度～平成 30 年度 総合研究報告書, 55-65, 2019.

## 検査依頼先

地衛研および国立感染研

## 執筆者一覧及び変更履歴

### 令和7年3月改訂版著者

仙台市衛生研究所	微生物課	大森恵梨子
神奈川県衛生研究所	微生物部	陳内理生
富山県衛生研究所	細菌部	金谷潤一
神戸市環境保健研究所	感染症部	中西典子
広島県立総合技術研究所保健環境センター	保健研究部	平塚貴大
宮崎県衛生環境研究所	微生物部	岡部祐未
国立感染症研究所	細菌第一部	前川純子、佐伯 歩

### 変更履歴

**検査方法** 3. 2) (2) マルチプレックス PCR による *L. pneumophila* 血清群の同定を追加した。その他、文言の修正等を行なった。

### 令和2年9月改訂版著者

北海道立衛生研究所	感染症部	森本 洋
仙台市衛生研究所	微生物課	大森恵梨子
神奈川県衛生研究所	微生物部	大屋日登美
富山県衛生研究所	細菌部	金谷潤一
大阪健康安全基盤研究所	衛生化学部	枝川亜希子
神戸市環境保健研究所	感染症部	中西典子
広島県立総合技術研究所保健環境センター	保健研究部	平塚貴大
宮崎県衛生環境研究所	微生物部	吉野修司
国立感染症研究所	細菌第一部	前川純子、倉 文明

### コメント者一覧

山形県衛生研究所		瀬戸順次
川崎市健康安全研究所	呼吸器・環境細菌	淀谷雄亮

新潟県保健環境科学研究所		
富山県衛生研究所	細菌部	磯部順子
長野県環境保全研究所	感染症部	市川 奈緒
浜松市保健環境研究所	微生物検査グループ	疋田都希
姫路市環境衛生研究所	臨床微生物検査担当	横田隼一郎
岡山県環境保健センター	保健科学部細菌科	狩屋英明
福岡県保健環境研究所	保健科学部	重村洋明、大石 明
福岡市保健環境研究所	保健科学課	松永典久
熊本県保健環境科学研究所	微生物科学部	槐島翔一郎
大分県衛生環境研究センター	微生物担当	佐々木麻里

### 変更履歴

**検査の進め方**および**検査方法** 2.1)(1) 蛍光抗体法 以外の内容を改訂した。

**検査方法** 1. 分離 内の項目の順番を変更した。

**検査方法** 1.3)(3) 熱処理後酸処理法、1.8) アメーバ共培養法、3.2)(3) 疫学マーカーとしての *lag-1* 遺伝子の検出、6.3) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) を追加した。

**検査方法** 3.2) イムノクロマト法を用いた同定法、3.2)(2) DNA-DNA ハイブリダイゼーションを削除した。

### 平成 23 年 10 月改訂版著者

北海道立衛生研究所	感染症部	森本 洋
富山県衛生研究所	細菌部	磯部順子
静岡県環境衛生科学研究所	微生物部	杉山寛治
香川県環境保健研究センター	保健科学部門	内田順子
国立感染症研究所	細菌第一部	前川純子、倉 文明

### コメント者一覧

神奈川県衛生研究所	微生物部	渡辺祐子
-----------	------	------

### 平成 15 年 8 月改訂版著者

三重県科学技術振興センター	保健環境研究部	杉山 明、山内昭則
---------------	---------	-----------

堺市衛生研究所  
国立感染症研究所

細菌第一部

山内昌弘、田中智之  
倉 文明、前川純子

### コメント者一覧

静岡市衛生研究所  
名古屋市衛生研究所  
大阪府立公衆衛生研究所

衛生検査担当  
  
公衆衛生部

北條圀生  
野村 寛  
枝川亜希子

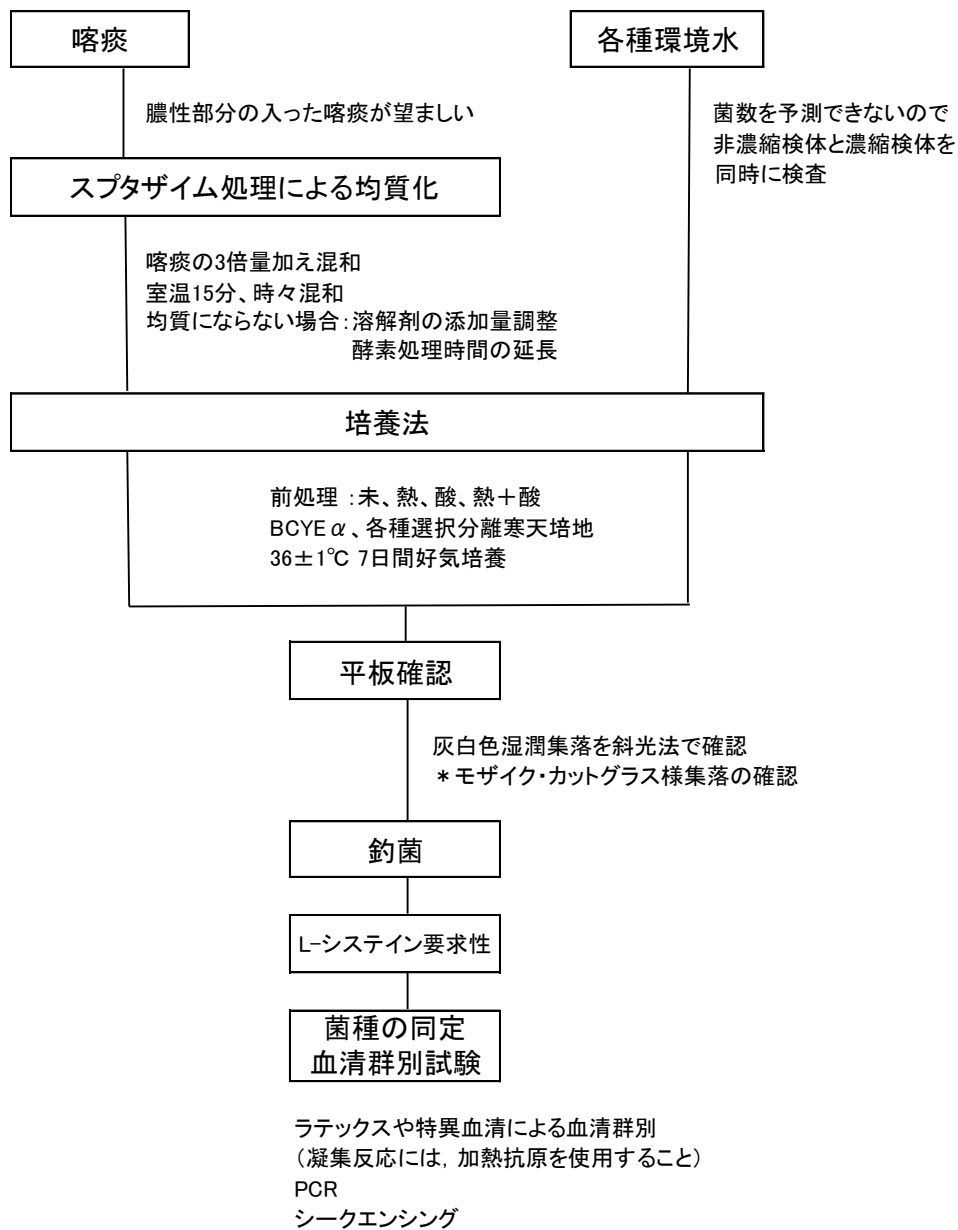


図 1. *Legionella* sp. の分離, 同定手順 (詳細は本文を参照)



図 2. 分離培地上の集落観察  
(暗所推奨)

(提供：北海道立衛生研究所 森本 洋氏)



図 3. 1 個の大きな *L. pneumophila*  
血清群 1 と 2 個の *L. cherrii* の集落

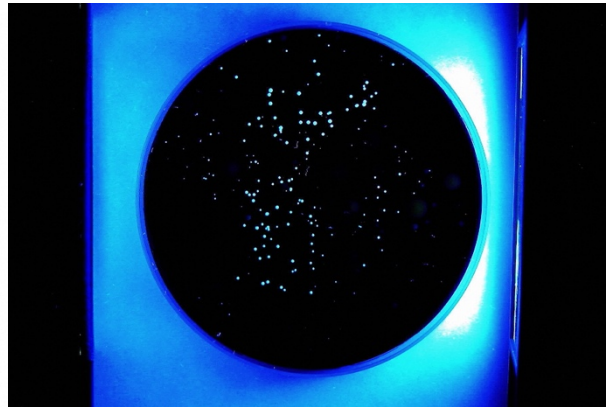


図 4 同じ分離培地での可視光と長波長紫外光による観察

(提供：北海道立衛生研究所 森本 洋氏)

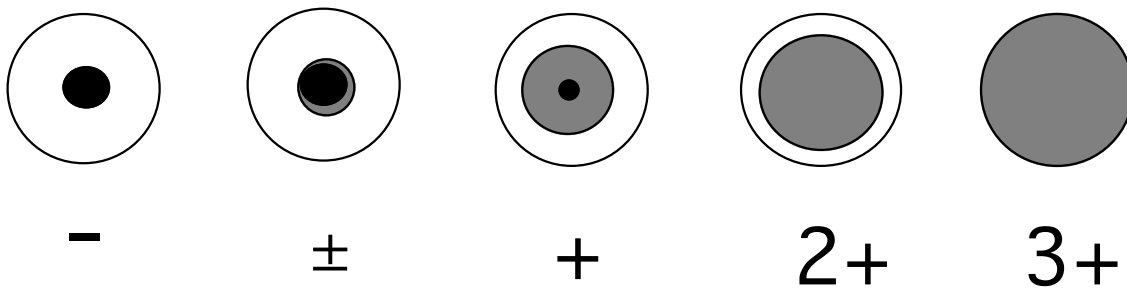


図 5. 凝集反応の判定図

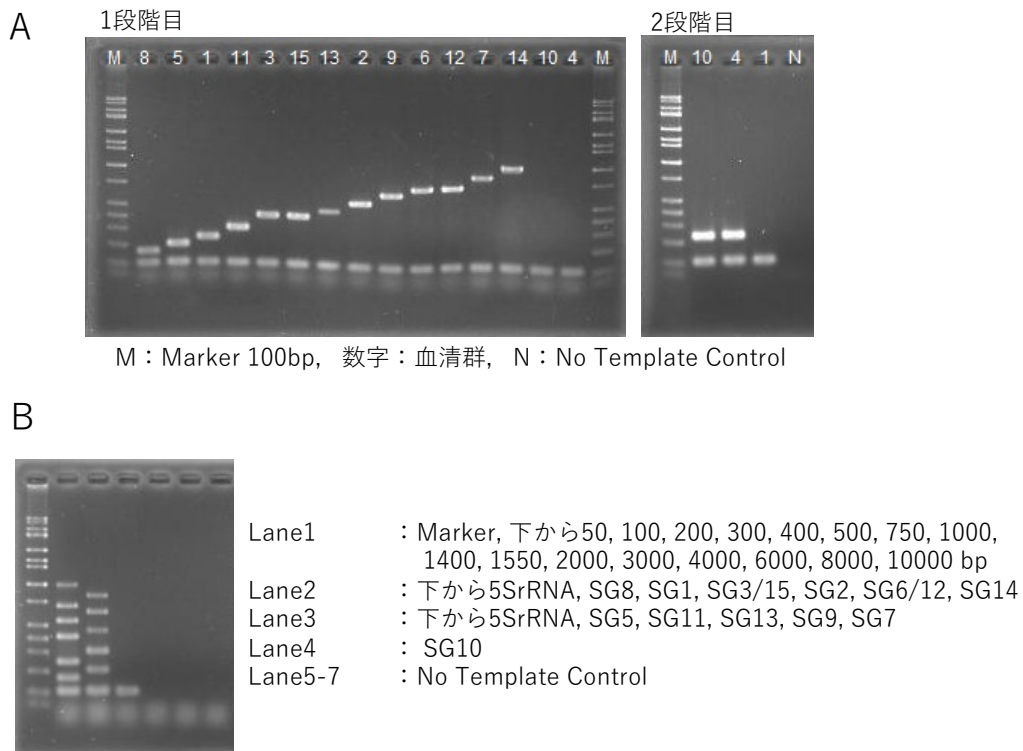


図 6 マルチプレックス PCR (M-PCR) による *L. pneumophila* 血清群の同定

A. 各血清群の菌株から抽出した DNA を鋳型に用いた M-PCR の結果。B. 出現するバンドが 1 段おきになるよう設定した 2 セットのポジティブコントロール (Lane 2, Lane 3) および SG10 (Lane 4) の DNA を鋳型に 1 段階目の M-PCR を行った結果。



表 1. レジオネラ属菌の基準株と血清群および自発蛍光

No	菌種名	血清群	病原性*	参照株	菌株番号**	自発蛍光、その他備考***
1	<i>L. adalaidensis</i>	1		1762-AUS-E	ATCC 49625	
2	<i>L. anisa</i>	1	●	WA-316-C3	ATCC 35292	B
3	<i>L. antarctica</i>	1		TUM19329	GTC 22699 (GCMR, 岐阜大学)	
4	<i>L. beliardensis</i>	1		Montbeliard A1	ATCC 700512	
5	<i>L. birminghamensis</i>	1	●	1407-AL-H	ATCC 43702	
6	<i>L. bononiensis</i>			30cs62	ATCC TSD-262	
7	<i>L. bozemanæ</i>	1	●	WIGA	ATCC 33217	B
		2	●	Toronto 3	ATCC35545	
8	<i>L. brunensis</i>	1		441-1	ATCC 43878	
9	<i>L. busanensis</i>	1		K9951	ATCC BAA-518	
10	<i>L. cardiaca</i>	1	●	H63	ATCC BAA-2315	
11	<i>L. cherrii</i>	1	●	ORW	ATCC 35252	B
12	<i>L. cincinnatiensis</i>	1	●	72-OH-H	ATCC 43753	
13	<i>L. drancourtii</i>	1		LLAP 12	ATCC 50991	アメーバによる培養
14	<i>L. dresdenensis</i>	1		W03-356	DSM 19488	
15	<i>L. drozanskii</i>	1		LLAP-1	ATCC 700990	
16	<i>L. dumoffii</i>	1	●	NY-23	ATCC 33279	B
17	<i>L. erythra</i>	1		SE-32A-C8	ATCC 35303	R
		2		LC 217		<i>L. rubrilucens</i> と同じ血清群
18	<i>L. fairfieldensis</i>	1		1725-AUS-E	ATCC 49588	
19	<i>L. fallonii</i>	1		LLAP-10	ATCC 700992	
20	<i>L. feeleii</i>	1	●	WO-44C	ATCC 35072	
		2	●	691-WI-H	ATCC 35849	
21	<i>L. geestiana</i>	1		1308	ATCC 49504	
22	<i>L. gormanii</i>	1	●	LS-13	ATCC 33297	B
23	<i>L. gratiana</i>	1		Lyon 8420412	ATCC 49413	
24	<i>L. gresilensis</i>	1		Greoux 11 D13	ATCC 700509	
25	<i>L. hackeliae</i>	1	●	Lansing 2	ATCC 35250	
		2	●	798-PA-H	ATCC 35999	

26	<i>L. impletisoli</i>	1		OA1-1	JCM 13919	
27	<i>L. israelensis</i>	1		Bercovier 4	ATCC 43119	
28	<i>L. jamestowniensis</i>	1	●	JA-26-G1-E2	ATCC 35298	
29	<i>L. jordani</i>	1	●	BL-540	ATCC 33623	
30	<i>L. lansingensis</i>	1	●	1677-MI-H	ATCC 49751	
31	<i>L. londiniensis</i>	1	●	1477	ATCC 49505	
32	<i>L. longbeachae</i>	1	●	Long Beach 4	ATCC 33462	
		2	●	Tucker 1	ATCC 33484	
33	<i>L. lytica</i>	1	●	PCM 2298	-	BV アメーバによる培養
34	<i>L. maceachernii</i>	1	●	PX-1-G2-E2	ATCC 35300	
35	<i>L. maioricensis</i>	1		HCPI-6	CECT 30569 (Spanish Type Culture Collection)	
36	<i>L. massiliensis</i>	1		LegA	DSM 24804	
37	<i>L. micdadei</i>	1	●	TATLOCK	ATCC 33218	
38	<i>L. moravica</i>	1		316-36	ATCC 43877	
39	<i>L. nagasakiensis</i>	1	●	CDC-1796-JAP-E	ATCC BAA-1557	
40	<i>L. nautarum</i>	1		1224	ATCC 49506	
41	<i>L. norrlandica</i>	1		LEGN	ATCC BAA-2678	
42	<i>L. oakridgensis</i>	1	●	Oak Ridge 10	ATCC 33761	
43	<i>L. parisiensis</i>	1	●	PF-209C-C2	ATCC 35299	B
44	<i>L. pneumophila</i>	1	●	Philadelphia 1	ATCC 33152	
		1	●	Knoxville-1	ATCC 33153	
		2	●	Togus-1	ATCC 33154	
		3	●	Bloomington-2	ATCC 33155	
		4	●	Los Angeles	ATCC 33156	
		5	●	Dallas 1E	ATCC 33216	
		6	●	Chicago 1	ATCC 33215	
		7	●	Chicago 8	ATCC 33823	
		8	●	Concord 3	ATCC 35096	
		9	●	IN-23-G1-C2	ATCC 35289	
		10	●	Leiden 1	ATCC 43283	
		11	●	797-PA-H	ATCC 43130	
12	●	570-CO-H	ATCC 43290			

		13	●	82A3105	ATCC 43736	
		14	●	1169-MN-H	ATCC 43703	
		15	●	Lansing 3	ATCC 35251	
45	<i>L. qingyii</i>	1		km488	NRBC 113223	B
46	<i>L. quateirensis</i>	1		1335	ATCC 49507	
47	<i>L. quinlivanii</i>	1	●	1442-AUS-E	ATCC 43830	
		2	●	LC 870	ATCC BAA-538	
48	<i>L. resiliens</i>	1		8cVS16	DSM 114356	B
49	<i>L. rowbothamii</i>	1		LLAP-6	ATCC 700991	B
50	<i>L. rubrilucens</i>	1	●	WA-270A-C2	ATCC 35304	R
51	<i>L. sainthelensi</i>	1	●	Mt St Helens 4	ATCC 35248	
		2	●	1489-CA-H	ATCC 49322	
52	<i>L. santicrucis</i>	1		SC-63-C7	ATCC 35301	
53	<i>L. saoudiensis</i>	1		LS-1	DSM 101682	B
54	<i>L. septentrionalis</i>	1		km711	NBRC 113219	B
55	<i>L. shakespearei</i>	1		214	ATCC 49655	
56	<i>L. spiritensis</i>	1		Mt St Helens 9	ATCC 35249	
		2		ML 76	ATCC BAA-537	
57	<i>L. steelei</i>	1	●	IMVS-3376	ATCC BAA-2169	
58	<i>L. steigerwaltii</i>	1		SC-18-C9	ATCC 35302	B
59	<i>L. taurinensis</i>	1		Turin I no.1	ATCC 700508	RV, <i>L. spiritensis</i> 血清群 1 と抗原的に類似
60	<i>L. thermalis</i>	1		L-47	JCM 30970	
61	<i>L. tucsonensis</i>	1	●	1087-AZ-H	ATCC 49180	B
62	<i>L. tunisiensis</i>	1		LegM	DSM 24805	
63	<i>L. wadsworthii</i>	1	●	81-716A	ATCC 33877	
64	<i>L. waltersii</i>	1	●	2074-AUS-E	ATCC 51914	
65	<i>L. worsleiensis</i>	1	●	1347	ATCC 49508	
66	<i>L. yabuuchiae</i>	1		OA1-2	JCM 14148	

\* : ●, 臨床検体からの分離および血清抗体価の上昇によりヒトへの病原性が示唆されるものを含む。

\*\* : ATCC, American Type Culture Collection; DSM, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; JCM, Japan Collection of Microorganisms; NBRC, Biological Resource Center, NITE

\*\*\* : B, 青白自発蛍光; R, 赤色自発蛍光; V, 株により異なる。

表 2. 2008 年～2016 年に国立感染症研究所で収集されたレジオネラ属菌の臨床分離株

菌種	血清群	分離数	(%)
<i>L. pneumophila</i>	1	372	(87.1)
	2	7	(1.6)
	3	11	(2.6)
	4	1	(0.2)
	5	4	(0.9)
	6	6	(1.4)
	8	1	(0.2)
	9	7	(1.6)
	10	3	(0.7)
	12	2	(0.5)
	13	2	(0.5)
	14	1	(0.2)
	15	1	(0.2)
	不明	1	(0.2)
<i>L. longbeachae</i>	2	3	(0.7)
<i>L. bozemanæ</i>	2	1	(0.2)
<i>L. dumoffii</i>		1	(0.2)
<i>L. feeleii</i>	1	1	(0.2)
<i>L. londiniensis</i>	1	1	(0.2)
<i>L. rubrilucens</i>	1	1	(0.2)