

レジオネラ症

平成 23 年 10 月 7 日改訂

目次

レジオネラ症の概説

検査に関する一般的注意

検査材料の採取、輸送および保存

1. 臨床検体
2. 環境検体

検査の進め方

届出の基準

検査方法

1. 分離
 - 1) 分離培養法
 - (1) BCYE α 培地
 - (2) 選択培地 (抗菌剤含有の BCYE α 培地)
 - 2) 検体の前処理
 - (1) 酸処理法 acid treatment
 - (2) 熱処理法 heat treatment
 - 3) 確認培養
 - 4) 環境水からのレジオネラの検出法
 - (1) 冷却遠心濃縮法
 - (2) ろ過濃縮法
 - (3) 接種
 - (4) 斜光法
 - 5) 臨床検体からのレジオネラの検出法
2. 菌体の検出
 - 1) 染色法 (蛍光抗体法を含む)
 - (1) ヒメネス染色 (Gimenez stain)
 - (2) 蛍光抗体法
3. 同定
 - 1) 特異抗血清を用いた同定法
 - 2) イムノクロマト法を用いた同定法
 - 3) 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
 - (2) DNA-DNA ハイブリダイゼーション
 - (3) シークエンスによる同定
4. 菌抗原の検出
 - 1) 尿中抗原の検出
 5. 遺伝子(DNA)の直接検出
 - 1) 臨床検体
 - 2) 環境検体
 6. 血清抗体価の測定
 - 1) 間接蛍光抗体法
 - 2) マイクロプレート凝集反応
 7. 疫学的解析
 - 1) パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法
 - 2) Sequence Based Typing (SBT)法
 - 3) Multiple-Locus Variable number tandem repeat (VNTR) Analysis (MLVA)法

引用文献

検査依頼先

執筆者一覧

図 1. *Legionella sp.*の分離, 同定手順

図 2. 分離培地上の集落観察 (暗所で行う)

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

図 4. 凝集反応の判定図

表 1. レジオネラ属 52 種の基準株と血清群および自発蛍光

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 日で回復する場合が多い^{1,2)}。

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³⁾。

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因菌として、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、レジオネラ属菌は現在にいたるまで新種の報告が相次いでおり、2011 年 8 月時点で 52 種 (表 1、<http://www.bacterio.cict.fr/l/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。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。

検査に関する一般的注意

レジオネラは P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従い行う。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。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⁴⁾。

検査材料の採取、輸送および保存

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。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。滅菌ハイポ入採水瓶（栄研化学）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、型式、水温、pH値、残留塩素濃度などの記録を必ず記録する。

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。

検体は採取後速やかに、直射日光を避けて6～18℃で輸送し、検査は出来るだけ早く始める。残余の検水は4～8℃で保存しておく。

検査の進め方

尿検体からは可溶性抗原の検出を行い、血清を用いて抗体価の測定を行う。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 DNA 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 DNA 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/kekkaku-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。

(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
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 3 版（発行・財団法人 ビル管理教育センター）⁵⁾が参考になる。レジオネラは発育が遅く、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-システイン不含培地（一般的には血液寒天培地が代用されることが多い）に発育しない場合、レジオネラ様菌とし同定検査を行う。

1) 分離培養法

レジオネラの培養は従来的一般細菌用培地では不可能で、現在 BCYE α 培地（buffered charcoal-yeast extract agar with 0.1% α -ketoglutarate）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レジオネラ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集落を観察できる場合もある（4）環境水からのレジオネラの検出法：（4）斜光法⁶⁾参照）。検体には他の菌が混入している可能性があるので熱や酸による前処理後、抗菌剤入りの選択培地へも接種する。特に環境検体の場合、雑菌が多いと非選択培地は実際的にあまり役立たない場合が多く、選択培地を 2 種類使用するほうが良い結果を得る。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を得る⁷⁾。しかしながら、前処理や選択培地の抗菌剤がレジオネラ自体にも影響を与えることも考えられ、行政検査においては、採取された検体の状況により未処理や BCYE α 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等、比較的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 α 培地を併用することで好結果を得られる場合もある^{7, 8)}。培養には数日間を必要とすることから、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を入れ、内側にプレートを入れて孵卵器に入れると良い。透明なビニル袋にプレート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、プレート上に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、その集落の選定においては、検査者を悩ませることがしばしばある。このとき、実体顕微

鏡観察により集落を観察（斜光法）し、レジオネラ属菌を外観（灰白色湿潤、モザイク様）で効率よく選定、計数することができる。集落数を数え、濃縮倍数または希釈倍数と接種液量から原液 100 ml 当たりの菌数を仮算定する (CFU/100 ml)。通常 10 個程度の集落を釣菌し、L-システイン要求性を確認するが、斜光法によればプレートの全部の集落を確認可能な場合が多い。これらの確認の結果に応じて最初の菌数算定値を修正する。本法により選定された集落は、レジオネラ属菌である場合が非常に高く、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⁹⁾。

(1) BCYE α 培地

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
α -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

②L-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、ミリポアフィルター（0.22 μ m）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。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) 選択培地（抗菌剤含有の BCYE α 培地）

組成＜BCYE α 培地を基礎培地とした選択培地、1 リットル当たり＞：

①BMPA α 培地

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

②GVPC 培地

ポリミキシン 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

③MWY 培地

ポリミキシン 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

④WYO 培地

ポリミキシン 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

⑤CCVC 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

⑥PAV 培地

ポリミキシン 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。これらを 50°C に冷ました BCYE α 培地に濾過滅菌してから加える。レジオネラ

属菌に対する抗菌物質の影響は菌種ばかりでなく菌株によっても異なり、1つの選択培地では対応しえない。培地とレジオネラ属菌の検出についてはこれまでもいくつかの報告があり^{7,10-16)}、参考にされたい。

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 α 寒天平板 (非選択培地)	栄研化学、関東化学 (OXOID 製品)、日本 BD、日研生物医学、シスメックスバイオメリユー、極東製薬工業
WYO α 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)、日研生物医学、シスメックスバイオメリユー、極東製薬工業
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 (特別受注品: 最長 4 ヶ月の納期が必要)
PAC(BMPA α)寒天平板 (選択培地)	日本 BD (特別受注品: 最長 4 ヶ月の納期が必要)
PAV 寒天平板 (選択培地)	日本 BD (特別受注品: 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、日本 BD: Difco 製品と旧 BBL 製品)、システインとピロリン酸鉄を含む添加物 (関東化学: Oxoid 製品、日本 BD: Difco 製品)、選択剤は BMPA α 、MWY、GVPN 用が関東化学 (Oxoid 製品) から入手できる。GVPN 培地は、GVPC 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。Difco 製の粉末培地では、ACES Buffer などの量が少なく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。選択剤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。なお、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、選択剤が発売されているが、特別受注品であり納期には時間を要する。

いずれの培地も 4°C での保存が一般的ではあるが、保存中の乾燥や結露の発生には十分注意し、実験前に使用に適切な状況であるか判断する。生培地が消費期限内であっても、使用前に十分確認することが必要である。少量であれば嫌気ジャーで、大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かなり防ぐことが出来る¹⁷⁾。自家調製培地においても、適切な保存により、3 ヶ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¹⁷⁾。

2) 検体の前処理

選択培地を用いても発育を抑制できない微生物に対処するため、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¹⁸⁾。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¹³⁾。共存する微生物量が多いと予想される検体では、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。

(1) 酸処理法 acid treatment

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 を蒸留水 100 ml に加える。武藤化学、日研生物医学、極東製薬工業より購入可能）を検体に等量加えてよく混和し、25℃（実際には室温）で4～5分間反応させた後、選択培地に接種する。参考文献によって、反応時間が異なっている場合がある。また、実際その手技上では、反応時間後の接種、塗布の間も反応しており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。共存するレジオネラ属菌以外の微生物の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よいとされている⁵⁾。しかしながら、検体に含まれるその他微生物の状況により結果は異なり、すべての場合に対応できるというわけではない。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¹⁹⁾。

(2) 熱処理法 heat treatment

50℃で30分間加熱する。ただし、レジオネラ属菌の検出状況が悪い場合には、状況に応じ加熱時間を20分にしてみるのも一法である。特に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ったことを経験している。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、加熱後急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。

3) 確認培養

L-システイン不含 BCYE 培地か 5%ヒツジ血液寒天培地で行う。BCYE α 培地でのみ発育し、他の培地では発育しない菌をレジオネラである可能性のある菌として同定を行う。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。また、レジオネラ属菌のうち培地に適合した *L. jordanis*、*L. spiritensis* の株および *L. oakridgensis* は L-システインを添加しなくても増殖する。

4) 環境水からのレジオネラの検出法

採取された検体の菌数を予測出来ないので、非濃縮検体と濃縮検体を並行して検査する^{20, 21)}。

濃縮は、下記の 2 方法の何れかで行う。

(1) 冷却遠心濃縮法：検体の汚濁が激しい場合にはこの方法が優れている。

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 3,000 g (通常 5,000 ~7,000 rpm 相当)、30 分間 (たとえば 20°C で) 遠心する。静かに上清を除き、2 ml (100 倍濃縮) の滅菌蒸留水を加えて管内壁をよく洗い、沈渣を懸濁する。デカンテーションによる上清除去の場合、沈渣も除去される場合があることから、ピペット等により慎重に上清を除去する方がよい。

(2) ろ過濃縮法

検水 500 ml を直径 47 mm、孔径 0.2~0.22 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。混合エステルフィルターは膜に菌が入り込んで回収率が減るので使用しない²²⁾。フィルターを剥がし 5 ml の滅菌蒸留水にひたし、フィルターがちぎれる程度に強く手で 5~10 分振盪するか、vortex mixer で 1 分間洗浄した液 (100 倍濃縮) を用いる (経験的には前者の方で回収率が高い傾向にあった)。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。

これら 2 つの濃縮方法を同一検体に対し比較した報告²³⁾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、ろ過濃縮法でしかレジオネラ属菌が検出されなかった場合があった。検体の濃縮にどちらの方法を選択する

かは、検査機関の機材、検査件数、検査時間などの要因に影響されると思われるが、ろ過濃縮法を選択することで、より精度の高い結果が得られる場合があると思われる。

夾雑微生物の多い河川水や土壌からの分離には、環境水や土壌浮遊液にアメーバを添加して培養するアメーバ増菌法が有効である。レジオネラ症防止指針の「土壌からの分離」の項目を参照されたい⁵⁾。

(3) 接種

非濃縮検体および濃縮検体を、未処理、熱処理、酸処理後、その 100 μ l を分離培地（できれば複数枚）に滅菌コンラージ棒で塗布する。酸処理後の濃縮倍数は半分になり、熱処理法後の濃縮倍数は変化しない。そのため酸処理後のレジオネラ属菌数は 2 倍するか、2 枚の分離培地へ 100 μ l ずつ接種する。1 枚の分離培地で対応する場合は、200 μ l を接種しても差し支えない。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し同様に分離培地へ接種する²⁴⁾。ただし、レジオネラ属菌および雑菌が多数存在している場合が多く、適宜 10 倍希釈で 2~3 段階希釈し、それぞれ 100 μ l 塗布しておくことと検出しやすい。スワブは直接選択培地に塗ってもよい。

(4) 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（カットグラス様、モザイク様：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、他の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。

5) 臨床検体からのレジオネラの検出法

入手検体の状況に応じ、臨機応変な対応が必要と思われる。一般的には、血液、組織液、肺・生検材料には他の雑菌の混入が無いと思われる。喀痰や咽頭拭い液等は、他の雑菌が発育することを想定した検査が必要となる。また、増菌培養を併用することで良好な結果が得られる場合がある。増菌培地作製には、市販されているサプリメントを使用すると便利である。検体の状況に応じ、前処理を行ってから増菌培地に接種したり、非選択性の増菌培地を利用することで、良好な結果が得られる場合がある。雑菌が多いと想定される検体においては、増菌後の培養液に対し、前処理をしてから分離培養を行うことで、レジオネラを検出できた事例を経験している。

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) 染色法（蛍光抗体法を含む）

レジオネラ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。

(1) ヒメネス染色（Gimenez stain）

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言って、レジオネラとは限らない。なおヒメネス染色セットが日研生物医学、および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²⁵⁾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²⁶⁾。

<試薬>

- ①リン酸緩衝食塩水（PBS, pH7.2）

NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O	9 g
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ 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。

- ②グリセロール封入剤（pH 9.0）

無蛍光グリセロール（グリセリン） 9 容

0.2M Na₂HPO₄

1 容 冷蔵庫 (4°C) で保存。

グリセロール封入剤の替りに市販の蛍光退色防止剤入封入剤が便利である (後出の間接蛍光抗体法参照)。

<方法 : IFA 法>

- ①材料をスライドガラスに塗抹し、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°C、30 分間反応させる。
- ④PBS (pH 7.2) で静かにオーバーフローさせて、洗浄する。
- ⑤PBS を入れたバット内に、スライドガラスを入れて、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、再度蒸留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。
- ⑩③～⑦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°C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

レジオネラ属の各菌種間の鑑別・同定に役立つ表現形質は少ない。その中で自発蛍光の有無（ほとんどのレジオネラ属菌は自発蛍光がない）と蛍光色の種類を表 1 にまとめた。現在のところ、これらの性状のみでは種の鑑別は容易ではないので、血清学的方法が簡便である。*L. pneumophila* には 15 の血清群があり、レジオネラ属全体では 70 血清群となっている。その他分離された菌の同定には、免疫クロマト法による同定、DNA-DNA hybridization、*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（表 1）。この他、*L. bozemanae*、*L. longbeachae*、*L. feeleii*、*L. hackeliae*、*L. quinlivanii*、*L. sainthelensi*、*L. spiritensis*、*L. erythra* に各 2 つの血清群がある²⁷⁾。現在、このうちの *L. pneumophila* の血清群 1~6 および *L. bozemanae*（血清群 1 のみ）、*L. gormanii*、*L. dumoffii*、*L. micdadei* の 10 種類がレジオネラ診断用の抗血清（デンカ生研）で同定できる。また、*L. pneumophila* の血清群 7~15 の抗血清がデンカ生研から研究用試薬として発売されている。また、レジオネラレファレンスセンターから、*L. longbeachae* 1 群、*L. longbeachae* 2 群、*L. hacckeliae* 1&2 群、*L. feeleii* 1 群、*L. feeleii* 2 群が配付されている。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. longbeachae* 血清群 1 および 2、*L. bozemanae* 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¹¹⁾、近年は温泉や風呂などからも *L. pneumophila* 血清群 1 が高率に分離されることが明らかとなっている²⁸⁾。

<スライド凝集反応>

BCYE α 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℃、1 時間あるいは 121℃、30 分間加熱し 3,000~3,500 rpm、15 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。さらに抗原液を一滴ずつピペットで滴下し、凝集を観察する。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通常非特異的なものである。ただし、抗原性の弱い株の場合には、3

分から 5 分で凝集が認められることがある（他の特異抗血清には反応しないので非特異的凝集ではない）。

また *L. bozemaniae*、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. micdadei* は菌種間に血清の交差反応がみられるため、後述する DDH レジオネラを用いた確認同定試験が推奨される。

2) イムノクロマト法を用いた同定法

環境検査用診断薬として、レジオネラの迅速診断検出キット（Duopath Legionella）が市販されている。選択培地上に発育したレジオネラと疑われるコロニーを用いて、およそ 30 分で判定が可能である。*L. pneumophila* とそれ以外のレジオネラ属菌を鑑別することが可能である。

3) 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

分離されたコロニーが *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²⁹⁾。

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³⁰⁾。

Lmip L920 5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3'

Lmip R1548 5'-GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3'

具体的には、上記の BCYE- α 寒天培地の上に発育した純培養菌を 1 μ l のエーゼに取り、50 μ l の純水に懸濁する。100°C で 5 分間加熱し、15,000 rpm、5 分遠心し、上清の 2 μ 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 μ l)として、 $\times 10$ reaction buffer 5.0 μ l、dNTP mixture 4.0 μ l、ultra-pure water 35.75 μ l、LEG プライマー-F (20 μ M)0.5 μ l、LEG プライマー-R (20 μ M)0.5 μ l、Taq polymerase (5 U/ μ l) 0.25 μ l を加え軽くボルテックスし、200 μ l の PCR 用マイクロチューブに 23 μ l ずつ分注する。

これに各テンプレートを 2 μ 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°C60 秒、アニーリング 61°C60 秒、伸長 72°C60 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°C60 秒、アニーリング 50°C60 秒、伸長 72°C 60 秒、35 で PCR を行う。650 bp のバンドが検出できる。

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

①プライマー配列³¹⁾

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

②DNA の調製

プレート上のコロニーを爪楊枝の先で軽くつつき、20 μ l の滅菌超純水に懸濁し、100°C で 10 分間加熱し、spin down (10,000 rpm 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)。

③PCR 反応溶液

(最終反応液量 25 μ l)

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

④反応条件

(Perkin Elmer Model 9700 を用いた場合、以下の 2 ステップ法、3 ステップ法のどちらでも構わない。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 μ l 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てリアルタイム PCR や LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法によっても同定可能である。タカラバイオ (株) や栄研化学 (株) のキットは特異性がよく確認されている。*L. londiniensis* についてはニッポンジーンから、LAMP 用のプライマーセットが市販されている。

(2) DNA-DNA ハイブリダイゼーション

菌種の同定は分類学的には基準株との全 DNA 相同性が 70% 以上あるとき同一菌種と判定される。従来の菌種同定のための DNA-DNA ハイブリダイゼーション法は放射性同位元素を用いる必要があったが、マイクロプレートとビオチンを用いた方法が考案されている³²⁾。*L. pneumophila* をはじめ、レジオネラ属 25 菌種の基準株の DNA をマイクロプレートに固定したキットが極東製薬より市販されているので (DDH レジオネラ'極東')、簡便に DNA-DNA ハイブリダイゼーションによるレジオネラ属菌種同定を行うことができる。分離コロニーを用いて、約 4 時間で判定が可能である。また、厚労科研の研究班により、市販キットで同定できない *L. busanensis*、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. natarum*、*L. quinlivanii*、*L. geestiana* が同定可能となっている³³⁾。

(3) シーケンスによる同定

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。

①DNA の調製

プレート上のコロニーを爪楊枝の先で軽くつつき、20 μ l の滅菌超純水に懸濁し、100°C で 10 分間加熱し、spin down (10,000 rpm 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³⁴⁾

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。

③PCR 反応溶液

(最終反応液量 25 μ l)

Forward primer 2 pmol/ μ l	2.5 μ l
Reverse primer 2 pmol/ μ l	2.5 μ l
\times 10 Reaction buffer	2.5 μ l
2.5 mM dNTP mixture	2.5 μ l
Chromosomal DNA	2.5 μ l
Ultra-pure water	12.25 μ l
AmpliTaq DNA polymerase	0.25 μ 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	4°C

⑤PCR 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×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×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×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 µl を QIAquick spin column に加える。
11. 1 分間静置する。
12. 10,000×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^{35,36)}

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	4°C

⑨シーケンス

Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer 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³⁷⁾。

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、DNA Data Bank of Japan の BLAST version 2.2.24 (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) で相同性解析する。

上記の 16S rRNA 遺伝子のシーケンスで同定困難な場合、*mip* 遺伝子のシーケンスによって同定できることがある (<http://www.hpa.org.uk/cfi/bioinformatics/dbases.htm>)³⁸⁾。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。

4. 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。操作は簡便で、15分で判定可能であり、保険適用となっている。本法はレジオネラ症の起原菌として70-80%を占めると考えられている *L. pneumophila* 血清群1の熱安定性の可溶性抗原、リポ多糖³⁹⁾を尿中から免疫クロマトグラフィー法により検出する。発症とほぼ同時に陽性になる場合も多く、尿中抗原診断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⁴⁰⁾。感度約80%、特異性はほぼ100%である。BinaxNowレジオネラ（アーリアメディカル）、チェックレジオネラ（アレフレッサファーマ）、Qライン極東レジオネラ（極東製薬工業）などのキットがある。他の検出系を用いたキットとして、マイクロプレートを用いたELISA法によるレジオネラ抗原ミツビシ（三菱化学メディエンス）がある。判定までにおよそ4時間を要するが、検体数の多い場合は比較的安価となる。抗体に結合したHRP (horseradish peroxidase)の発色により、抗原量を測定する。温泉入浴施設における集団発生事例において、治療の経過とともに尿中抗原値の低下が見られた⁴¹⁾。このキットは *L. pneumophila* 血清群1の抗原を高感度で検出するほか、血清群1以外の *L. pneumophila* と他の何種かのレジオネラ属菌とも交差反応する⁴²⁾が、その反応性は低い。

尿中抗原検出法は原則的に *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原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できず、培養やPCRなどの結果がその補助となる。

<注意>

- ①尿検体は感染源として取り扱う。
- ②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。高濃度のリン酸塩、尿酸塩を含む凍結検体は、解凍時に多量の塩を析出することがあるので、37℃に温めて再び溶解させて用いる。

5. 遺伝子 (DNA) 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⁴³⁾、早期診断が可能な、きわめて有用な方法である。*L. pneumophila*のみを検出できる *mip*⁴⁴⁾を標的遺伝子とする方法と、レジオネラ属菌全般 (一部の菌種を除く) を検出できる 16S rRNA⁴⁵⁾、5S rRNA⁴⁶⁾を標的遺伝子とする方法がある。LAMP法やリアルタイムPCR⁴⁷⁾によるキットが市販され、LAMP法では体外診断用医薬品となっている。遺伝子はホルマリン固定肺組織からも検出できる²⁶⁾。以下に *mip* 遺伝子を標的とした *L. pneumophila* を検出する PCR法⁴⁴⁾について述べる。

(1)DNA の調製

1 ml の検体に 0.1 ml の lysozyme (5 mg/ml、和光純薬)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 の蒸留水に溶解しその 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 MgCl₂

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°C 1 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を行い 489 bp の DNA 断片を観察する。

なお、喀痰などの粘稠検体はスプタザイム‘極東’などで液化の前処理が必要である。また、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。

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、菌遺伝子 (DNA) を定性的あるいは定量的に検出する。菌の生死に関わりなく検出されるので、生菌のみを検出する培養検査とは必ずしも結果が一致しないことがある。しかし、遺伝子検査法は迅速に結果が得られるため、患者発生時の原因究明検査や、レジオネラ検出時の改善確認検査などへの活用が期待できる。なお、核酸の抽出精製にあたっては、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の除去が必要である。また、さまざまなレジオネラ遺伝子の検出キット⁴⁸⁾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。以下に環境水からのレジオネラ遺伝子検査法⁴⁹⁾の概要を述べる。

(1) 試料の濃縮

試料採取から濃縮までは培養試験に準じ、500 ml の試料水を 5 ml にまで濃縮する。濃縮液 2 ml を 2 ml 用チューブにとる。13,000~15,000 rpm で 4°C、5 分間遠心分離後、上清を捨て濃縮物 100 µl を回収する。

(2) DNA の抽出

×2 溶解液 (TE 緩衝液 : 1 M NaCl : 10% TritonX-100 をそれぞれ 50、20、10 µl ずつ混合する) を用意する。濃縮試料 100 µl に×2 溶解液 90 µl と 20 mg/ml Proteinase K 溶液 10 µl を加えて、60°C で 1 時間溶解反応を行う。その後、さらに 75°C で 5 分間加温し、直ちにミキサーで激しく攪拌する。15,000 rpm、3 分間遠心分離し、上清の 160~180 µl を新しいチューブに得る。沈殿物を新しいチューブに混入させないように注意する。

(3) DNA 精製

沈殿物から分離した溶解試料に Buffer AL 200 µl を添加、混合する (ナトリウム塩の添加)。エタノール 200 µl を添加、混合する (DNA の析出)。シリカカラムに試料全量をア

プライ、5,000 rpm、1 分間遠心分離する（カラム吸着）。カラムを新しい 1.5 ml チューブに載せかえる。Buffer AW1 300 μ l を添加、10,000 rpm、1 分間遠心分離する（洗浄 1 回目）。カラムを新しい 1.5 ml チューブに載せかえる。Buffer AW2 300 μ l を添加、12,000～15,000 rpm、2 分間遠心分離する（洗浄 2 回目）。カラムを新しい 1.5 ml 低吸着チューブに載せかえる。カラム内部のふちに液が残っていたらキムワイプ等でふき取る。エタノールが混入すると遺伝子増幅反応を阻害する。Buffer AE 50 μ l で 2 回、10,000 rpm、1 分間遠心回収し、ろ液 100 μ l の精製 DNA を得る（DNA 溶出回収）。

(4) 遺伝子増幅反応

遺伝子増幅には精製 DNA 5 μ l を供試する。この DNA 量 5 μ l は採取した環境検体の 10 ml 量に相当する。レジオネラ遺伝子の検出には、市販のレジオネラ属菌検査キットあるいは論文等に記載のプライマー・プローブを用いる。各反応系はそれぞれ特性があり、いずれの試薬でも全ての菌種を検出するものではないので注意が必要である。例えば、*L. londiniensis* は市販の迅速検査試薬では検出できないことがある⁴⁸⁾。したがって、培養法と迅速検査法で結果が異なる場合は、培養法で検出された菌株を確認して、メーカーの公表している反応特異性に係る情報と照合し、慎重に結果を解釈する必要がある。

標的遺伝子は、16S rRNA、5S rRNA、*mip* などが用いられている。遺伝子増幅反応の有無は、リアルタイム PCR では蛍光を、LAMP 法では濁度を用いて検出される。

(5) 検量線の作成と定量

迅速検査法では遺伝子の有無を確認する定性試験とは別に、検量線を用いた定量試験が可能である。市販のレジオネラ属菌検査試薬に添付されている陽性コントロールのプラスミド DNA の希釈系列を用いて検量線を作成することができる⁴⁸⁾。詳細は試薬添付文書を参照。なお、上記 (3) の精製 DNA 5 μ l を用いたリアルタイム PCR 法の定量試験で得られた定量値の 10 倍量が 100 ml 中のレジオネラの菌数に相当する。

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* 血清群 1-6 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

抗原にはレジオネラ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レジオネラを保存培地から BCYE α 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 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）。
- ④3,000 rpm、30 分間遠心し、上清を捨て、0.1%ホルマリン PBS (pH7.2) を加え、McFarlandNo.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 ϕ 、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

- ①U 底マイクロプレートを使用する場合、ドロPPER (25 μ l 用) で、1%BSA を添加した PBS (pH 7.2) を最初の一穴目に 3 滴 (75 μ l)、2 穴目から 1 滴ずつ入れる。
- ②一穴目に被検血清を 5 μ l 加える (16 倍希釈)。
- ③ダイリューター (25 μ l) で 16 倍から 1,024 倍まで希釈を行う。

(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 μ 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。
- ③PBS (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。
- ⑤50 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 μ l 注ぐ。
- ⑥湿潤箱内で、37°C、40 分間反応させる。
- ⑦PBS 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律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⁵⁰⁾

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。デンカ生研から体外診断用医薬品として、レジオネラ凝集反应用抗原「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. bozemaniae*、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. micdadei* 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

①BCYE α 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。

②3,000 rpm、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 8×10^9 /ml に調整する。遮光して 2~10℃で保存する。1 年間は使用可能である。

③使用時に、1 検体当たり 75 μ 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 μ 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 μ l を採取し、次に検体 50 μ 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 μ l ずつ分注。

②1:8 希釈した検体を最下行の穴にダイリューターまたはマイクロピペットで 25 μ l 入れ、

攪拌する。

③1:16 希釈した検体を次の穴に 25 μ 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 μ 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-であることを確認する。もし+で自己凝集が起こればその抗原液は使用しない。

③判定は図 4 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デンカ生研のニューモフィラ群 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。

7. 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生するため、発生後感染源の特定に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。IOD (Index of Discrimination)により識別率が表される⁵¹⁾。

1) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法

PFGE 法による遺伝子型別は、分離された菌株の比較を行うのにもっとも識別率の高い分子疫学的手法である。従来解析に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ため改良法⁵²⁾を記す。

(1) BCYE α 寒天培地上 35°Cで継代培養し、48時間以内の新鮮な菌体を 100~200 μ l の滅菌超純水にマックファーランド 5 程度の濃度に懸濁し、50~55°Cに温めた等量の 1% SeaKem^R Gold Agarose と混ぜ、plug mold (Bio-Rad) に流し込み室温で固まらせてアガロースブロックを作製する。

(2) アガロースブロックを蛋白質分解酵素液 (0.1mg/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。

(3) アガロースブロック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) 1ml に浸し、50°Cで30分振盪洗浄する。液を新しい 4mM Pefabloc SC を含んだ TE バッファーに換え、再び 50°Cで30分振盪洗浄する。液を TE バッファー 1 ml に換え、氷上で30分振盪し、アガロースブロックを洗浄する。液を制限酵素処理のための 1×Mバッファー (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 100 μ g/ml bovine serum albumin) 200 μ l に換え、氷上で30分振盪し、バッファーの平衡化を行う。

(4) 液を 50 units/sample の制限酵素 *Sfi*I (Roche) を含む制限酵素バッファー 100 μ l に換え、50°Cで4時間振盪し消化する。酵素処理を終えたアガロースブロックは液を 0.5×TBE (Tris-borate 45 mM, EDTA 1 mM) に換え、電気泳動を開始するまで 4°Cに置く。

(5) ブロックを 1% SeaKem^R Gold Agarose に埋め室温でゲルを固ませた後、パルスフィールドゲル電気泳動 CHEF DR III System (Bio-Rad) を用いて、0.5×TBE、パルスタイム 5秒から50秒 6 V/cm、泳動時間 21 時間、バッファーの温度は約 14 °Cで行う。電気泳動終了後、ゲルは 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドで染色し、超純水で30分3回洗浄し紫外線照射装置上で写真撮影する。

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決定し、遺伝子型別を行う方法でデジタル化された情報のため菌株が比較しやすく再現性にも優れている。循環式浴槽による集団感染事例を含む日本の培養陽性症例の遺伝子型の分布がレファレンスセンターの事業としてなされている⁵³⁾。また、浴槽や冷却塔という生息環境により遺伝子が異なり冷却塔水由来の *L. pneumophila* 菌株は浴槽由来株に比べ均一であるという報告⁵⁴⁾がされている。EWGLI で標準化され、マニュアルが公開されている。

(http://www.hpa-bioninformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/pht/sbt_homepage.php)

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

MLVA 法は、ゲノム上の複数箇所に存在する反復塩基配列 (VNTR) 数が株により異なることを利用し、型別を行うもので、反復数は VNTR を含む PCR 産物のサイズにより求める。MLVA 法は SBT 法や PFGE 法に比べ手法が簡便であり、感染源の特定のための菌株の迅速なスクリーニングに適している⁵⁵⁾。

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. 国立感染症研究所: 病原体等安全管理規定, 平成 22 年 6 月.
5. 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 3 版, 財団法人ビル管理教育センター, 東京, 2009.
6. 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.環境感染学会誌, 25:8-13, 2010.
7. 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.
8. 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 α 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.
9. 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.
10. 奥田敬一, 池戸正成, 藪内英子: 冷却塔から *Legionella* 属菌を検出するための新選択培地: Wadowsky-Yee-Okuda (WYO) 培地. 感染症学雑誌, 58:1073-1082, 1984.
11. 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.
12. Reinthaler FF, Sattler J, Schaffler-Dullnig K, Weinmayr B, and Marth E: Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in

hospitals. J. Clin. Microbiol., 31: 1213-1216, 1993.

13. 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.
14. 春日 修, 三沢 均, 高木紀美子, 谷 佳都, 池戸正成: 環境水由来レジオネラ属菌の選択培地による効率的検出法の検討. 感染症学雑誌, 76: 41-50, 2002.
15. Lin A, Stout JE, Rihs JD, Vickers RM, and Yu VL: Improved *Legionella* selective media by the addition of fluconazole: results of in vitro testing and clinical evaluation. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 34: 173-175, 1999.
16. Inoue H, Noda A, Takama T, Ishima T, Agata K: Enhanced antifungal effect of the selective medium for the detection of *Legionella* species by a combination of cycloheximide, amphotericin B and thiabendazole. Biocontrol Sci., 11: 69-74, 2006.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Water quality -- Detection and enumeration of *Legionella*: ISO 11731, 1998(E).
21. 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, 印刷中, 2011.
22. 黒木俊郎, 佐多 辰, 山井志朗, 八木田健司, 勝部泰次, 遠藤卓郎: 循環式浴槽における自由生活性アメーバと *Legionella* 属菌の生息状況. 感染症学雑誌, 72: 1056-1063, 1998.
23. 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.
24. 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.

25. 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.
26. Nagai T, Sobajima H, Iwasa M, Tsuzuki T, Kura F, Amemura-Maekawa J, and Watanabe H: Neonatal sudden death due to *Legionella pneumonia* associated with water birth in a domestic spa bath. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 2227-2229, 2003.
27. Benson RF, and Fields BS: Classification of the genus *Legionella*. *Semin. Respir. Infect.*, 13:90-99, 1998.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Perkin Elmer: Package insert, EnviroAmp Legionella Kits. Perkin Elmer Corporation. 1993.
32. Ezaki T, Hashimoto Y, and Yabuuchi E: Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 224-229, 1989.
33. 山崎利雄, 前川純子: 日本の環境水から分離される既存の DNA-DNA ハイブリダイゼーションキットにないレジオネラ属菌の同定. 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, 185-191, 2010.
34. 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.
35. 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.

36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. Kohler RB, Zimmerman SE, Wilson E, Allen SD, Edelstein PH, Wheat LJ, and White A: Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires’ disease. *Ann. Inter. Med.*, 94: 601-605, 1981.
40. レジオネラ症 2003.1～2008.9. 病原微生物検出情報, 29: 327-328, 2008. (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/29/346/tpc346-j.html>).
41. 杉山寛治, 西尾智裕, 郷田淑明, 張 凡非, 増田教子, 秋山真人, 宮本秀樹: 生活環境水のレジオネラ汚染およびレジオネラ症患者調査－循環濾過式浴槽水を感染源とするレジオネラ症集団感染事例と検査－. 静岡県環境衛生科学研究所報告, 43: 1-4, 2000.
42. レジオネラ抗原「ミツビシ」添付文書. 三菱化学メディエンス株式会社, 2010年1月改訂 (第2版)
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, Kobayashi R, Chiba N, Tajima T, and Ubukata K: Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with

community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J. Clin. Microbiol.*, 44: 1440-1446, 2006.

48. 遠藤卓郎, 前川純子, 荒井桂子, 緒方喜久代, 杉山寛治, 田栗利紹, 中嶋洋, 泉山信司, 磯部順子, 佐々木美江, 山本純子, 安中敏光: 遺伝子検査法を用いたレジオネラの定量方法. 厚生労働科学研究費補助金 (地域健康危機管理研究事業) 「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 19 年度総括・分担研究報告書, 23-36, 2008.
49. 遠藤卓郎, 田栗利紹, 泉山信司: DNA 抽出法の改良. 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) 「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, 25-35, 2009.
50. 藪内英子, 斉藤 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.
51. Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, 26:2465-2466, 1988.
52. 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.
53. 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, and 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.
54. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, and Watanabe H: *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol. Immunol.*, 49:1027-1033, 2005.
55. 前川純子, 竹内 彩, 泉山信司: *Legionella pneumophila* の MLVA 法による型別. 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 22 年度総括・分担研究報告書, 199-205, 2011.

検査依頼先

地衛研および国立感染研

執筆者一覧

北海道立衛生研究所	感染症部	森本 洋
静岡県環境衛生科学研究所	微生物部	杉山寛治
富山県衛生研究所	細菌部	磯部順子
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
-----------	------	------

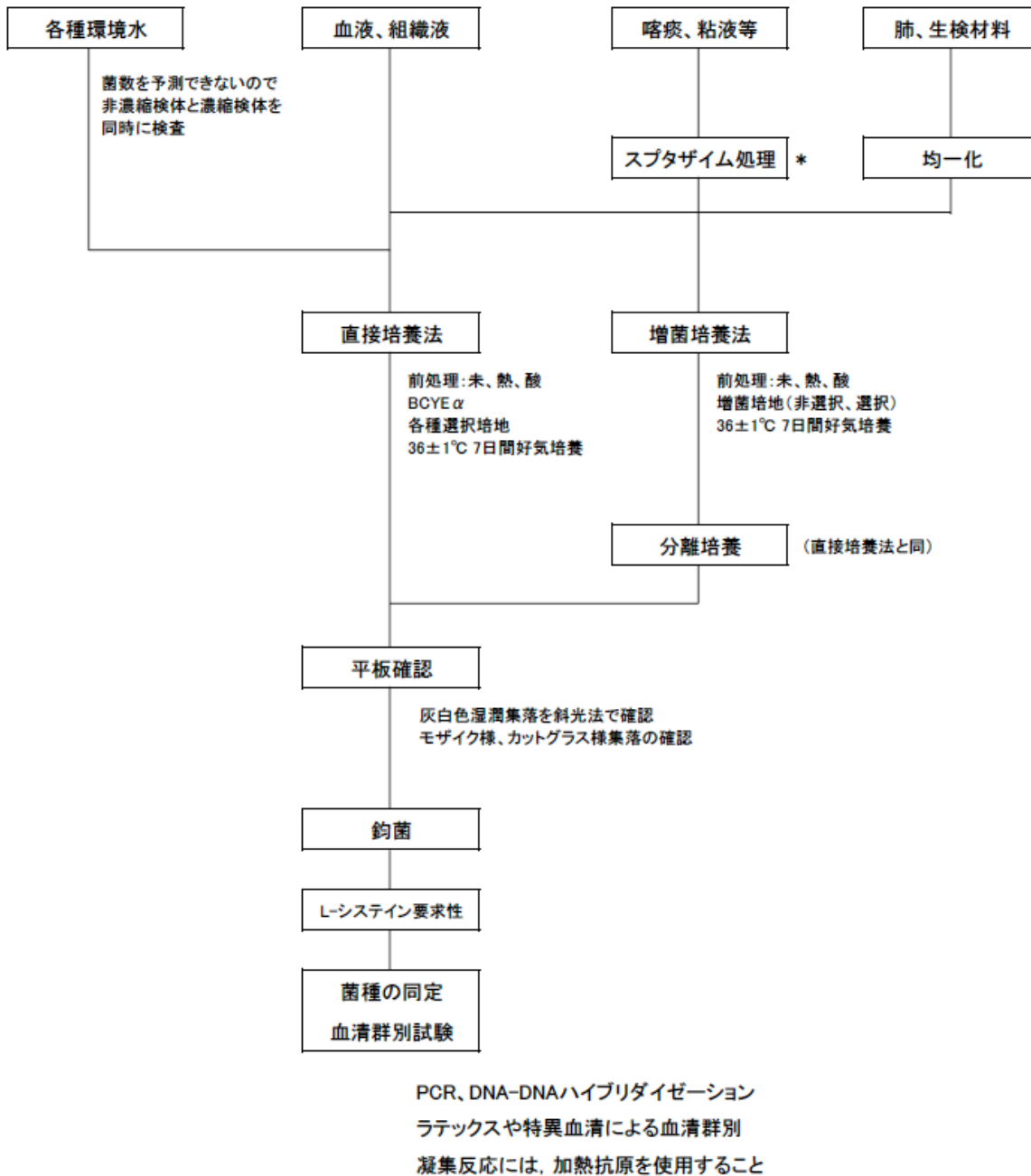


図 1. *Legionella* sp. の分離, 同定手順

*スプタザイム処理: 喀痰と同量あるいは4倍量加え、喀痰を均質化する。



図 2. 分離培地上の集落観察（暗所で行う）

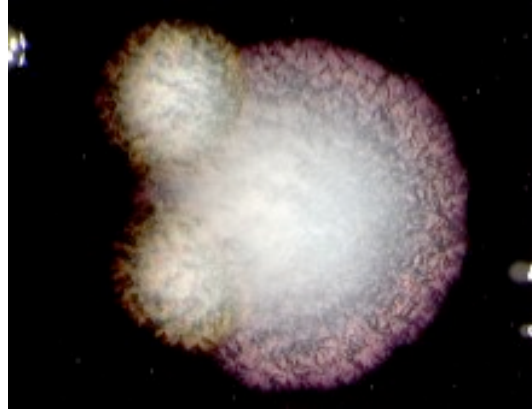


図 3. 1 個の大きな *L. pneumophila*
血清群 1 と 2 個の *L. cherrii*

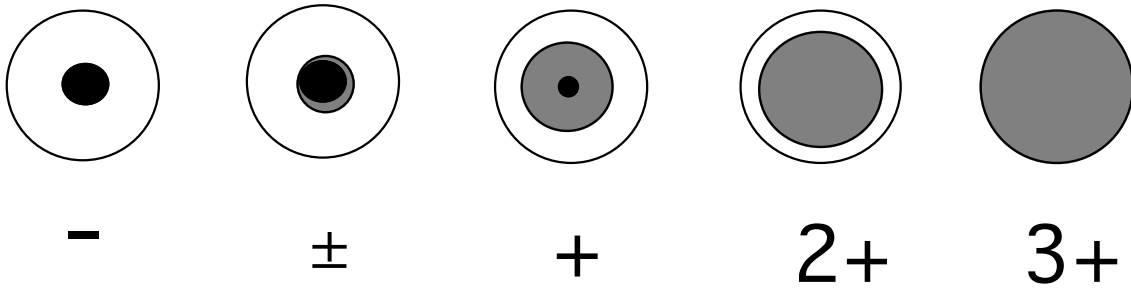


図 4. 凝集反応の判定図

表 1. レジオネラ属 52 種の基準株と血清群および自発蛍光

No	血清群	参考株	ATCC番号	No	血清群	参考株	ATCC番号
1		<i>L. adelaidensis</i>	1 1762-AUS-E 49625	42		<i>L. sainthelensi</i>	1 Mt St Helens 4 35248
2		<i>L. anisa</i>	1 WA-316-C3 35292 B	43		<i>L. santicrucis</i>	1 1489-CA-H 49322
3		<i>L. belliardensis</i>	1 Montbelliard A1 700512	44		<i>L. shakespearei</i>	1 214 49655
4		<i>L. birminghamensis</i>	1 1407-AL-H 43702	45		<i>L. spiritensis</i>	1 Mt St Helens 9 35249
5		<i>L. bozemanae</i>	1 WIGA 33217 B				2 ML 76 12082 *
			2 Toronto 3 35545	46		<i>L. steigerwaltii</i>	1 SC-18-C9 35302 B
6		<i>L. brunensis</i>	1 441-1 43878	47		<i>L. taurinensis</i>	1 Turin I no.1 700508 ***RV
7		<i>L. busanensis</i>	1 K9951 BAA-518	48		<i>L. tucsonensis</i>	1 1087-AZ-H 49180 B
8		<i>L. cherrii</i>	1 ORW 35252 B	49		<i>L. wadsworthii</i>	1 81-716 33877
9		<i>L. cincinnatiensis</i>	1 72-OH-H 43753	50		<i>L. waltersii</i>	1 2074-AUS-E 51914
10		<i>L. drancourtii</i>	1 LLAP 12 50991	51		<i>L. worsleiensis</i>	1 1347 49508
11		<i>L. dresdenensis</i>	1 W03-356 13409 *	52		<i>L. yabuuchiae</i>	1 OA1-2 14148 **
12		<i>L. drozanskii</i>	1 LLAP-1 700990	* NCTC番号, London, England			
13		<i>L. dumoffii</i>	1 NY-23 33279 B	**JCM番号, 理化学研究所バイオリソースセンター 微生物材料開発室, 和光市			
14		<i>L. erythra</i>	1 SE-32A-C8 35303 R	*** <i>L. spiritensis</i> 血清群1と同じ血清群			
			2 LC 217 ****	**** <i>L. rubrilucens</i> と同じ血清群			
15		<i>L. fairfieldensis</i>	1 1725-AUS-E 49588	B, R, V 青白自発蛍光、赤色自発蛍光、Vは株により異なることを示す。			
16		<i>L. fallonii</i>	1 LLAP-10 700992				
17		<i>L. feeleii</i>	1 WO-44C-C3 35072				
			2 691-WI-H 35849				
18		<i>L. geestiana</i>	1 1308 49504				
19		<i>L. gormanii</i>	1 LS-13 33297 B				
20		<i>L. gratiana</i>	1 Lyon 8420412 49413				
21		<i>L. gresilensis</i>	1 Greoux 11 D13 700509				
22		<i>L. hackelliae</i>	1 Lansing 2 35250				
			2 798-PA-H 35999				
23		<i>L. impletisoli</i>	1 OA1-1 13919 **				
24		<i>L. israelensis</i>	1 Bercovier 4 43119				
25		<i>L. jamestowniensis</i>	1 JA-26-G1-E2 35298				
26		<i>L. jordanis</i>	1 BL-540 33623				
27		<i>L. lansingensis</i>	1 1677-MI-H 49751				
28		<i>L. londiniensis</i>	1 1477 49505				
29		<i>L. longbeachae</i>	1 Long Beach 4 33462				
			2 Tucker 1 33484				
30		<i>L. lytica</i>	1 PCM 2298 - BV				
31		<i>L. maceachernii</i>	1 PX-1-G2-E2 35300				
32		<i>L. micdadei</i>	1 TATLOCK 33218				
33		<i>L. moravica</i>	1 316-36 43877				
34		<i>L. nautarum</i>	1 1224 49506				
35		<i>L. oakridgensis</i>	1 Oak Ridge 10 33761				
36		<i>L. parisiensis</i>	1 PF-209C-C2 35299 B				
37		<i>L. pneumophila</i>	1 Philadelphia 1 33152				
			1 Knoxville-1 33153				
			2 Togus-1 33154				
			3 Bloomington-2 33155				
			4 Los Angeles-1 33156				
			5 Dallas 1E 33216				
			6 Chicago 2 33215				
			7 Chicago 8 33823				
			8 Concord 3 35096				
			9 IN-23-G1-C2 35289				
			10 Leiden 1 43283				
			11 797-PA-H 43130				
			12 570-CO-H 43290				
			13 82A3105 43736				
			14 1169-MN-H 43703				
			15 Lansing 3 35251				
38		<i>L. quateirensis</i>	1 1335 49507				
39		<i>L. quinlivanii</i>	1 1442-AUS-E 43830				
			2 LC 870 12434 *				
40		<i>L. rowbothamii</i>	1 LLAP-6 700991 B				
41		<i>L. rubrilucens</i>	1 WA-270A-C2 35304 R				

