

平成26年度生活衛生関係技術担当者研修会  
2015. 2. 6

# 感染源調査に係る遺伝子型別の 最新情報

国立感染症研究所  
細菌第一部  
前川純子

# *Legionella pneumophila*

## レジオネラ・ニューモフィラ

- ・レジオネラ症（レジオネラ肺炎、ポンティアック熱）の主な起因菌。
- ・血清群1が最も多い。
- ・土壌、淡水中に広く生息。



*L. pneumophila* の  
グラム染色像  
(X1,000)

グラム陰性好気性桿菌  
細胞内寄生性

# レジオネラ属菌が増殖する “人工”水系

◆空調システムの冷却塔



◆給湯施設



生じるエアロゾル（微小な水の粒）に菌体が含まれていると、感染する。

◆循環式浴槽



◆加湿器



# 感染症法に基づく医師の届出の際の 診断方法

**培養**

◆ 分離・同定による病原体の検出

**尿中抗原**

◆ 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

**PCR・LAMP**

◆ PCR法による病原体の遺伝子の検出

◆ 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）

**血清抗体価**

# レジオネラ症報告診断法

(感染症発生動向調査 2008-2012年, 4,081例)

尿中抗原検出	96%
培養	2.8%
血清抗体価測定	1.7%
PCR (LAMP含む)	1.5%

# レジオネラ症報告診断法

(感染症発生動向調査 2008-2012年, 4,081例)

## *L. pneumophila*血清群1のみを検出

尿中抗原検出 96%

培養 2.8% (113例)

血清抗体価測定 1.7%

PCR (LAMP含む) 1.5%

報告後、培養分離された例も加えると  
少なくとも261例 (6.4%)

# 全国の地方衛生研究所の各地区の代表と国立感染症研究所からなる 衛生微生物技術協議会レジオネラ・レファレンスセンター

2007年8月からレジオネラ臨床  
分離株の収集を行なっている。

岡山県環境保健センター  
細菌科

富山県衛生研究所  
細菌部

仙台市衛生研究所  
微生物課

国立感染症研究所  
細菌第一部

宮崎県衛生環境研究所  
微生物部

神奈川県衛生研究所  
微生物部

神戸市環境保健研究所  
感染症部



# 収集臨床分離株の内訳

2014年3月末日現在

<i>L. pneumophila</i> 308株 (97.5%)	<i>L. dumoffii</i> 1株 (0.3%)
SG1 262株 (82.9%)	<i>L. feeleii</i> 1株 (0.3%)
SG2 7株 (2.2%)	<i>L. londiniensis</i> 1株 (0.3%)
SG3 13株 (4.1%)	<i>L. longbeachae</i> 4株 (1.3%)
SG4 2株 (0.6%)	<i>L. rubrilucens</i> 1株 (0.3%)
SG5 7株 (2.2%)	
SG6 7株 (2.2%)	
SG9 3株 (0.9%)	
SG10 2株 (0.6%)	
SG12 2株 (0.6%)	
SG14 1株 (0.3%)	
SG15 1株 (0.3%)	
Untypable* 1株 (0.3%)	

\* デンカ生研レジオネラ免疫血清ニューモフィラ1-15群のいずれにも反応しなかった。

計

316株 (100%)

# レジオネラ症報告診断法

(感染症発生動向調査 2008-2012年, 4,081例)

尿中抗原検出	96%
培養	2.8%
血清抗体価測定	1.7%
PCR ( <u>LAMP含む</u> )	1.5% 

**2011年より保険適用**

# Loopampレジオネラ検出試薬キットC

- ◆ LAMP法の体外診断用医薬品。
- ◆ 喀痰中のレジオネラ属菌を迅速・簡便に検出。
- ◆ *L. pneumophila*血清群1以外も検出可能。
- ◆ 培養法との相関で、尿中抗原測定法より、陽性一致率が高い。
- ◆ 培養陰性の場合でもレジオネラDNAが検出可能。

培養法と本製品（LAMP法）及び尿中抗原測定法との相関性※

		本製品（LAMP法）			尿中抗原測定法		
		+	-	計	+	-	計
培養法	+	21	1	22	13	9	22
	-	0	113	113	0	113	113
	計	21	114	135	13	122	135

陽性一致率：95.5%

陰性一致率：100.0%

全体一致率：99.3%

陽性一致率：59.1%

陰性一致率：100.0%

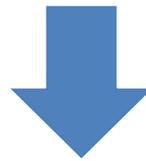
全体一致率：93.3%

※ 添付文書より転載

# LAMP陽性の喀痰



レジオネラDNA (+)

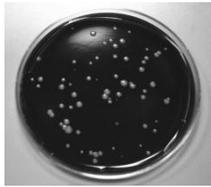


*L. pneumophila* が nested-*mip* PCR\*で確認

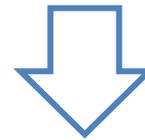
培養結果を待たずに、  
遺伝子型別ができる。

\* 小出ら、感染症誌 67: 1062, 1993

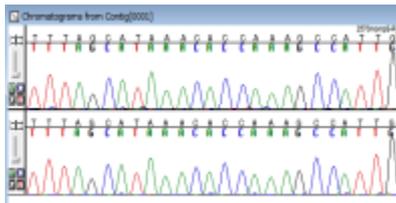
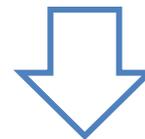
# Sequence-based typing (SBT)法



*L. pneumophila* のコロニーから  
DNAを取り出す。



特定（7カ所）のDNA断片を  
PCR法で増幅する。



DNA断片の塩基配列を読み取り、  
配列の違いに応じて番号をつける。

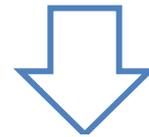
例) (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*)

= (2,3,9,10,2,1,6) ST23

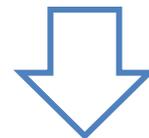
# Sequence-based typing (SBT)法



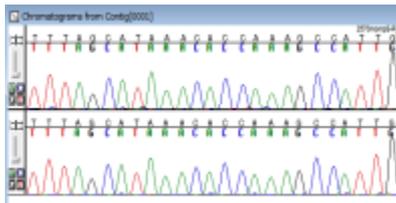
臨床検体から直接  
DNAを取り出す。



特定（7カ所）のDNA断片を  
nested PCR法で増幅する。



DNA断片の塩基配列を読み取り、  
配列の違いに応じて番号をつける。



例) (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*)

= (2,3,9,10,2,1,6) ST23

# 呼吸器検体に直接SBT法を適用

Lück C et al., (2007) J Clin Microbiol, 45:3143

## 最初の報告

- ◆ ドイツ、49歳女性
- ◆ 腫瘍の化学療法で2週間入院後、11日後に肺炎を発症。
- ◆ 喀痰 → *L. pneumophila*血清群1菌株分離 → 紛失  
→ DNA抽出 → *L. pneumophila* 陽性  
→ SBT法でST170
- ◆ 病院の給水系からの分離菌の一部がST170

# 展示浴槽による レジオネラ肺炎集団感染

- ◆ 2012年7月、イギリスのストーク・オン・トレントで、集団感染（21人、2人死亡）が発生。
- ◆ 全員が尿中抗原陽性 → 起炎菌は*L. pneumoiphila* 血清群1
- ◆ 7人の喀痰が*L. pneumoiphila* DNA陽性 → 遺伝子型別 ST1268（新規遺伝子型、その後分離菌でも確認）
- ◆ 21人全員が行っていた小売店の展示浴槽めぐり液も *L. pneumoiphila* DNA陽性 → ST1268

菌分離前、24時間以内に、  
同一遺伝子型であることが判明

Euro Surveill 17 (37) , Sep 13, 2012 ; Telegraph July 30,2012 ; ThisisStaffordshire Aug 02,2012; Mentasti M, The 8<sup>th</sup> Int Conference on LEGIONELLA, Melbourne, Nov 2013, Abstract p24



共通感染源

# 呼吸器検体に直接SBT法を適用

Mentasti M et al., (2012) Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 31:2017

対象：尿中抗原陽性の呼吸器検体

培養 と 直接PCR (リアルタイムPCR)

- ◆ 培養陽性検体は、すべてPCR陽性 (81/81)。
- ◆ 培養陰性検体は、59% (47/80) がPCR陽性。



Nested PCRによるSBT法で、ST決定は50% (23/46)

菌が分離されなくても疫学調査が可能

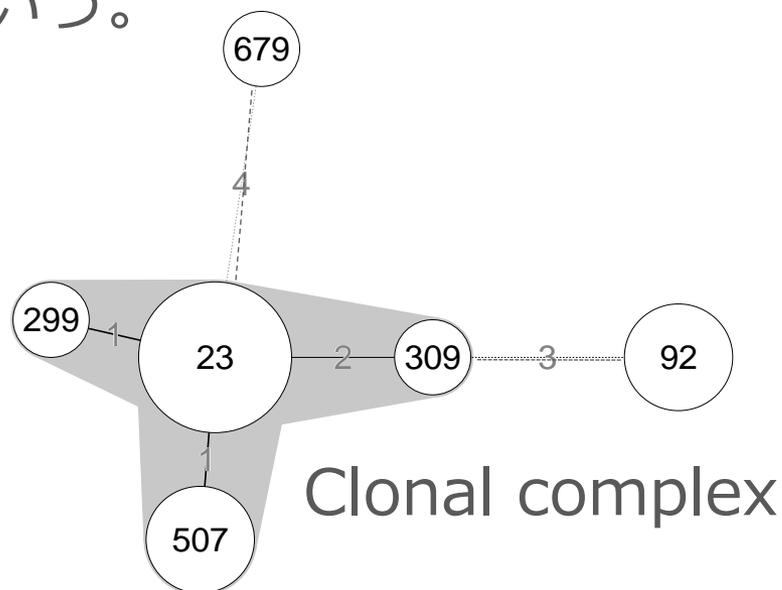
# 日本国内から分離された*L. pneumophila* 血清群1、408株の遺伝子型を調べた。

浴槽水分離株	136株
冷却塔水分離株	110株
水溜り分離株*	82株
土壌分離株	37株
シャワー水分離株	19株
噴水・修景水分離株	18株
給湯水分離株	3株
加湿器分離株	2株
下水分離株	1株

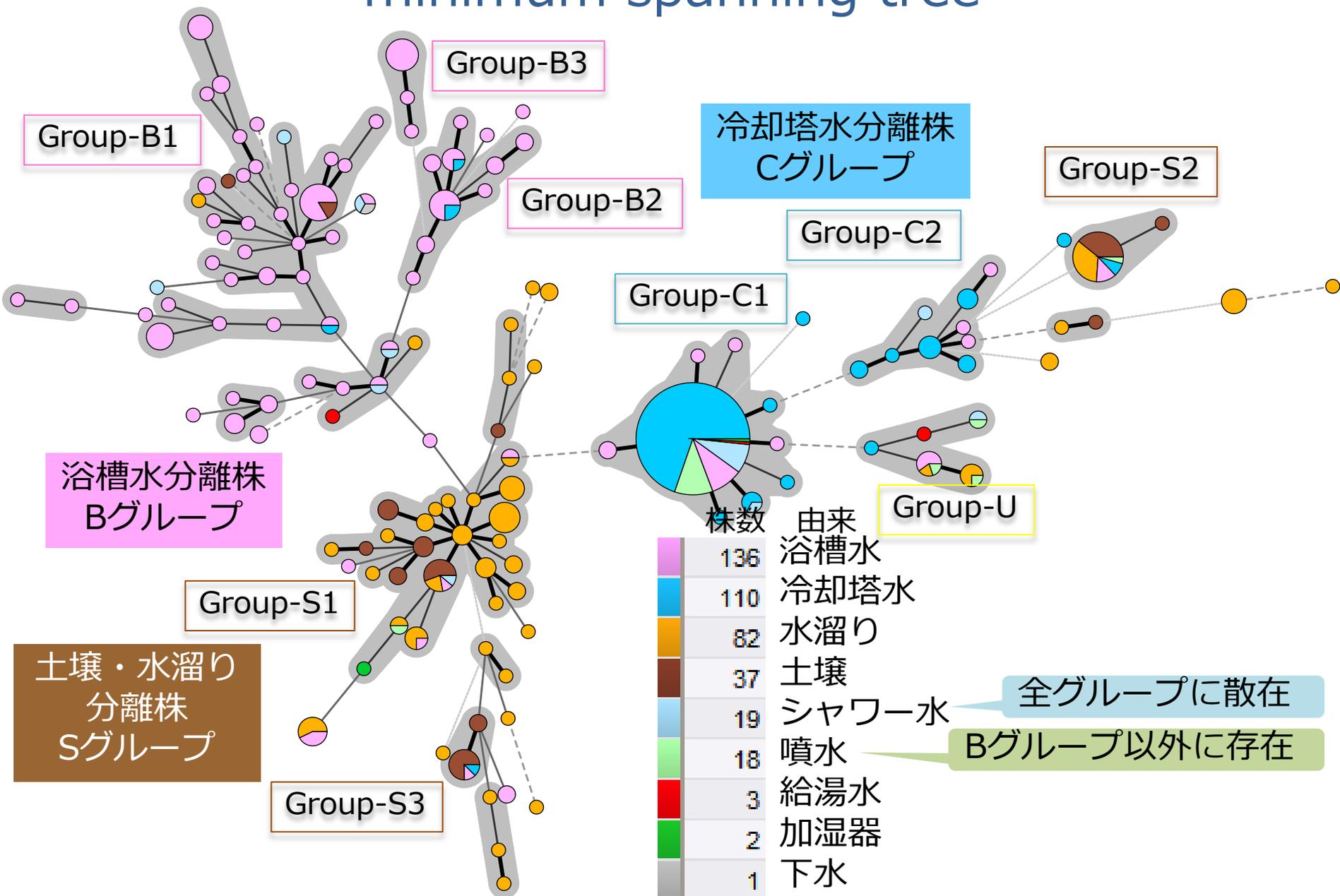
\* Kanatani J, et al., Appl. Env. Micobiol. 79: 3959, 2013

# 遺伝子型(ST)間の類縁関係を解析する。 —minimum spanning tree法—

- 似ているST同士を各遺伝子の差異数に比例した長さの“枝”で結び、枝の長さの総長が細小になるようにする。
- 数字はST型を示し、円の大きさは、株数に比例する。
- 隣り合う遺伝子座の違いが2つ以下のSTの集団をclonal complexという。



# *L. pneumophila* SG1環境分離株408株の minimum spanning tree



# まとめ

- ◆ 起因菌を分離すると感染源の解明が可能。
- ◆ DNA検査によるレジオネラ症診断が増加。
- ◆ 検体からの直接SBT法が可能に。
- 菌が分離されなくても疫学調査が可能に。

# お礼とお願い

各地の地方衛生研究所を初めとして、諸機関の方々からレジオネラ菌株を分与いただいております。感謝申し上げます。

給湯水、修景水などからの*L. pneumophila*血清群 1 分離株の収集に、ご協力をよろしくお願い致します。

レジオネラ症臨床分離株の収集解析も、レジオネラ・レファレンスセンターで引き続き行い、衛生微生物技術協議会で報告します。

臨床検体からDNAを直接検出し、遺伝子型別を行う検査も可能です。お問い合わせ下さい。

連絡先 : jmaekawa@nih.go.jp 前川