

尿中レジオネラ抗原検査

Detection of urinary antigen of *Legionella*

むら かみ ひ な こ
村上日奈子
Hinako MURAKAMI

要 旨

レジオネラ症は2003年11月に新4類感染症と規定され、診断後直ちに届出が必須となった。レジオネラ肺炎は急激に進行し、重篤で死亡率が高くβ-ラクタム系抗菌薬が無効であるために早期診断が重要になる。診断法としては抗原検査、抗体検査、鏡検・培養検査、遺伝子検査の4つに大きく分類されるが、鏡検・培養以外の検査法は保険適用外であり、検査キットも入手が困難であることから普及しておらず、これまで診断に至らなかった症例も多かったと思われる。

平成15年4月1日より感染症血清反応検査として尿中レジオネラ抗原検査が新たに保険適用となり、病院内などの検査室でルチン検査として行うことが可能になった。尿中抗原検査は非侵襲的に検体が採取でき、感度・特異度とともに優れ、短時間で結果が得られるなどの利点を備えている。今回保険適用となった検査キットの特徴としてはレジオネラ症の主要な病原体である *Legionella pneumophila* 血清群1に対する感度は90%以上、特異度は95%以上と報告されている。一方、血清群1以外のレジオネラ属菌に対しては、感度は低いものの、一部の菌種は検出可能である。以上の点からレジオネラ尿中抗原検査はレジオネラ症の診断に非常に有益な検査法として今後普及するものと期待される。

はじめに

レジオネラ症は重篤な呼吸器感染を起こす重要な

新興感染症の1つであり、感染症法が2003年11月に見直されてから新4類感染症と規定され、診断後直ちに届出が必須となった。最近でもスーパー温泉といわれているレジャー施設、高齢者施設での集団感染や大学病院などでの循環式浴槽が感染源と考えられた院内感染が報告されている。近年、培養以外の検査法についても進歩が目覚ましく以前に比べてレジオネラ症の診断率も向上している。ただし、培養以外の検査法は従来保険適用外検査であったため、一部の施設でしか実施されていなかった。

しかし尿中レジオネラ抗原検査が平成15年4月1日より保険適用となり、一般の施設でも広く利用が可能となった。尿中レジオネラ抗原検査を解説するにあたっては、レジオネラ症が他の細菌感染症とさまざまな点で異なることを無視できないので、本稿ではまずレジオネラ症の全体像について細菌学的特徴を含めて概説し、それを踏まえて尿中レジオネラ抗原検査について解説する。

I. レジオネラ症とは

病原体は *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* をはじめとするレジオネラ属菌である。ヒトへの感染様式は、レジオネラが存在するエアロゾル（気体中に浮遊する微小な液体または固体の粒子）を吸入して感染を起こす¹⁾。ヒトからヒトへの感染はないとされている。生活環境中でもビルの屋上などに設置してある冷却塔水や、24時間風呂などの循環式風呂から高頻度に本菌が検出され、市中肺炎、院内感染の原因となっている²⁾。また、最近ではガーデニングが流行しているが、*L. longbeachae* によるレ

ジオネラ肺炎は園芸用腐葉土との関係が指摘されている³⁾。

臨床で経験する主なレジオネラ症は、重症型のレジオネラ肺炎と軽症で風邪様症状のポンティアック熱に大きく分類される。レジオネラ肺炎は急激に進行し、重篤で死亡率が高く、β-ラクタム系抗菌薬が無効であるために、早期に診断し適切な治療を行うことが重要になる。主な臨床症状として強い呼吸困難、意識障害、高度の低酸素血症などがあげられる。検査所見は白血球数、CRPなどの炎症マーカーが上昇するが、LDH、AST、CPKなどの酵素も上昇することが多い。レジオネラ肺炎は基本的に糖尿病などの基礎疾患を有する症例や免疫不全患者に発症することが多いが、健常人にも発症する場合もある。その他レジオネラ症に罹患しやすいリスクファクターとしては大量飲酒歴、大量喫煙歴、土木・粉塵作業歴、温泉旅行歴なども重要である。レジオネラ肺炎の最初の報告事例は1976年の米国フィラデルフィアで開催された在郷軍人大会での*L. pneumophila* 血清群1による集団発生であった。200人余りが罹患し、そのうち30人ほどが死亡している^{4,5)}。このことから菌名の由来としてThe Legion：在郷軍人会、pneumo：肺、phil：好むという意味から*Legionella pneumophila*と命名され、レジオネラ肺炎のことを日本では在郷軍人病と呼ぶ場合もある。わが国では1981年に斎藤らが第1例目のレジオネラ肺炎を報告している⁶⁾。レジオネラ肺炎の起原菌は*L. pneumophila* 血清群1が最も多い^{7,8)}。当施設のデータでも200症例中、*L. pneumophila*は135症例(67.5%)を占め、そのうち*L. pneumophila* 血清群1は87症例(43.5%)と全体の約半分が*L. pneumophila* 血清群1による感染であった(図1)。また、発熱や関節痛などのインフルエンザ症状を示すが肺炎に至らないポンティアック熱はわが国では1994年に*L. pneumophila* 血清群7による集団発生例があった⁹⁾。

レジオネラ症の治療にはマクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系抗菌薬およびリファンピシンなどが使用される。

II. レジオネラ属菌の細菌学的特徴^{2,10)}

レジオネラ属菌は河川、土壌など自然環境中に広く存在しており、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌で

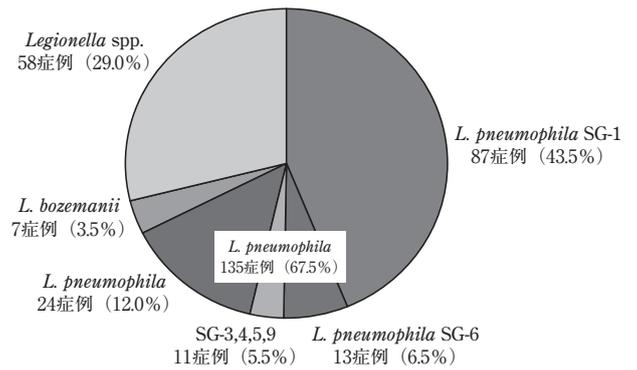


図1 レジオネラ肺炎の起原菌分布 — 200症例の解析—

ある。本菌は*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*をはじめ、現在は*Fluoribacter*, *Tatlockia*の新しい属に分類された菌(以前は*Legionella*属に分類)を含めると40種以上に分かれる。そのうちヒトへの感染が報告されているのは19菌種で、*L. pneumophila*がその多くを占めており、臨床的に最も重要である。本菌の特徴としては、まず細胞内寄生性であることがあげられる。自然界ではアメーバ類の中で増殖しているが、ヒトに感染すると貪食細胞の中で殺菌されず逆に増殖してしまう。細胞内寄生性であるため、検体中の本菌はグラム染色に染まりにくくなる。また、治療においても細胞内移行性の悪いβ-ラクタム系およびアミノ配糖体系抗菌薬は無効である。レジオネラ属菌のもう1つの大きな特徴は、本菌が人工培地上で発育するためにはL-システインと鉄化合物が必須栄養素となる点である。したがってこれらの栄養素が含まれていない血液寒天培地などには発育できないので、レジオネラ用特殊培地を用いて培養を行わなくてはならない。また一般細菌のように培養後1日では発育できず、コロニーを形成するまでに少なくとも3日以上かかる。本菌のコロニーは大小不同の灰白色で特徴的な酸臭を有している。

III. レジオネラの主な検査法^{2, 8, 10~13, 14)}

レジオネラ感染症の検査法は抗原検査、抗体検査、鏡検・培養検査、遺伝子検査の4つに大きく分類される。

抗原検査は呼吸器検体などに存在する菌体自体を検出する方法と尿中抗原検査のように尿中に排泄される可溶性の菌体由来抗原(特異抗原)を検出する方法とがある(表1)。これらの抗原は急性期から

表1 レジオネラの主な抗原検査

方法	検体	所要時間	検出対象
直接蛍光抗体法 (DFA)	喀痰などの 呼吸器検体	約2時間	<i>L. pneumophila</i> 血清群1のみ
尿中特異抗原 酵素免疫測定法 (EIA) レジオネラ抗原「ミツビシ」	尿	約3時間	<i>L. pneumophila</i> 血清群1 (他の血清群, 菌種も検出可能)
免疫クロマトグラフ法 (ICA) Binax NOW Legionella	尿	約15分	<i>L. pneumophila</i> 血清群1のみ

検出が可能なので、早期診断に役立つ最も重要な検査法である。尿中抗原検査に関する詳細についてはIVの項で述べる。

抗体検査として行う血清抗体価の測定には間接蛍光抗体法 (IFA) とマイクロプレート凝集法 (MPAT) がある。IFA では IgG 抗体を主として *L. pneumophila* 血清群 1 のみを対象にしているが、MPAT では IgM 抗体を主として *L. pneumophila* 血清群 1 (2 亜種) を含めて 7 血清群と 4 菌種の 11 種類の抗体価を個別に判定できる。厚生労働省のレジオネラ肺炎診断基準では単一血清の場合は 256 倍以上、ペア血清の場合は 128 倍以上を示し、かつ 4 倍以上の上昇が認められれば診断的価値があるとされている。血清抗体価は発症後 2～5 週後に上昇することが多いので、急性期の単一血清のみで診断せずに回復期の血清とペアで測定するのが望ましいとされている。よって早期診断には向かないが、*L. pneumophila* 血清群 1 以外のレジオネラ症で尿中抗原、PCR が陰性の例では有用な検査法と考えられる。

レジオネラの鏡検・培養検査はブドウ球菌や大腸菌のような一般細菌の検査とは異なり特殊性が高い。まず、本菌を疑う場合にはグラム染色と同時にヒメネス染色やアクリジンオレンジ染色などの特殊染色を行う。本菌は細胞内寄生性であるため検体中のレジオネラ属菌はグラム染色に染まりにくく、ヒメネス染色などで炎症細胞内に桿菌が観察される。本菌を目的とした培養検査では BCYE α , WYO α 寒天培地などのレジオネラ用特殊培地に接種し、湿潤状態で 10 日間位まで好気培養を行う必要がある。培養法は現在においてもレジオネラ症診断における Gold standard (基準とすべき最も確立された検査法) であり、他の検査法に比べて感度は低いが特異性は最も高く、培養陽性であればレジオネラ症と断

定できる。

遺伝子検査では PCR (polymerase chain reaction) 法が最も一般的に行われている。培養検査では結果が出るまでに早くても数日を要してしまうが、遺伝子検査では喀痰などを試料として検体中にレジオネラ属菌の遺伝子が存在するか否かを数時間で判定することができる。PCR においては *Legionella mip* (macrophage infective potentiator) 遺伝子、*Legionella* 5s rRNA, *Legionella* 16s rRNA をターゲットとしたプライマーが多く用いられている。またレジオネラ肺炎患者の尿や血清からもレジオネラの DNA が検出可能であるという報告もみられている。PCR の利点としては比較的感度が高く、早期診断に向いている点があげられるが、その一方で偽陽性が起こりやすく、特別な機器が必要で、コスト面でも問題がある。最近では LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法と呼ばれる PCR よりも迅速で簡易的な増幅法が栄研化学株により開発され、新たな遺伝子検査法として注目を集めている。

我々のこれまでの経験から、上記のレジオネラ症の各種検査法は、いずれも単独で陰性であったとしてもレジオネラ症そのものを否定できるほど感度は高くない。そのため複数の種類の検査法を併用し、それらの結果をもとに総合的に診断を行うのが望ましい。

IV. 尿中抗原検査について^{2, 10, 14~16)}

急激に進行して致死率も高いレジオネラ肺炎は早期に的確な診断を行い治療することが大切である。そのため尿中抗原検出などの迅速検査が非常に重要な役割を果たす。本検査はもちろんレジオネラ症を疑った場合に行うのであるが、具体的に言えば進行

が早く高度な低酸素血症を伴う重篤な肺炎像を示す場合、明らかな肺炎像がありながら細菌検査においてグラム染色や一般培養検査で起病菌が検出されない場合、 β -ラクタム系抗菌薬やアミノ配糖体系抗菌薬が無効である場合、生化学検査において炎症マーカーとともにLDH, AST, CPKなどが高値を示した場合にはレジオネラ症の可能性を考慮して積極的に尿中抗原検査を実施するのが望ましい。

発症直後の検体では抗原量が少なく検出が難しい場合もある。そのため臨床的にレジオネラ肺炎が強く疑われるにもかかわらず尿中抗原が陰性の症例では、一定の期間において再度検査を行うことで診断がなされる場合もある。ただし一般的には尿中抗原は感染の急性期に検出されやすく、発症から2週間以内の検体で検査を行うのが望ましい。一方、一部の症例では治癒後も体内に菌体抗原が残存することにより長期間尿中抗原が陽性を示す場合もある。そのため肺炎が軽快しても1カ月以上尿中抗原が検出される例もまれではない。レジオネラ肺炎患者ではしばしば再燃がみられるが、本検査では菌体抗原が長期間体内に残存したために陽性反応を示したのか、あるいは再燃による陽性反応かは判断し難い。したがって持続して尿中抗原が陽性を示す症例では臨床所見を踏まえたうえで診断を行うことが必要である。

尿中レジオネラ抗原検査は尿中に排泄されるリポ多糖(LPS)を主成分とする可溶性の特異抗原を検出する方法である。測定法としては放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、イムノクロマト法(ICA)などがあるが、現在頻繁に使われているのはEIAとICAである。抗体として使用されているのはLPSに対するポリクローナル抗体で、一般的にウサギIgGである。EIAには*L. pneumophila*血清群1のみの抗原を検出するBinax社(米国)のBinax Legionella urinary antigen EIA[®]とTrinity Biotech社(アイルランド)のLegionella Urinary Antigen EIA (Bartels)、およびレジオネラ属抗原を広く検出できるBiotest社(ドイツ)のBiotest Legionella Urin Antigen EIA[®](本邦ではレジオネラ抗原「ミツビシ」として三菱化学ヤトロンが輸入販売)などがある。これらはいずれもマイクロプレートを用いたサンドイッチ法を用いており、約3時間程度で抗原が検出でき、判定にはマイクロプレート

リーダーを使用する。一方、ICAとしてBinax社からBinax NOW[®] Legionella urinary antigen testが発売されており、*L. pneumophila*血清群1の抗原のみの検出ではあるが15分で結果が得られ、操作も簡便でスクリーニング検査に適している。いずれのキットについても迅速性、感度および特異度に優れていることが報告されている。また東邦大学でもレジオネラ肺炎203症例について先に述べた検査法と尿中抗原検査を実施したところ、尿中抗原が63.2%と他の検査法よりも高い検出率を示した(表2)。しかし、残りの約40%は尿中抗原では診断がつかず、PCR、培養、血清抗体価のいずれかで診断がついた症例であり、特に*L. pneumophila*血清群1以外については培養のみ、あるいは血清抗体価のみが陽性を示し診断に結びついた症例もあった(表3)。

尿中抗原検査の利点および欠点をまとめてみると、利点としては①尿を検体として用いるので検体の採取が容易である、②短時間で結果が得られる、③感度・特異度がともに高い、などの点があげられる。一方、欠点としては①コストが高い、②*L. pneumophila*血清群1以外のレジオネラに関しては検出感度が低い、③抗原が長期間陽性を示す場合もあるので治癒の効果判定には不適、といった点があげられる。

尿中レジオネラ抗原検査は、平成15年4月1日より感染症血清反応検査として保険が適用となった。保険点数は200点である(平成16年4月現在)。検査要領を表4に示した。平成16年4月現在で保険適用となっている検査キットはEIA法のBiotest社で開発されたレジオネラ抗原「ミツビシ」のみである。

V. レジオネラ抗原「ミツビシ」について^{2,16)}

レジオネラ抗原「ミツビシ」の原理は先に述べたようにマイクロプレートを使用したEIAで、検体

表2 東邦大学における各種検査法の陽性率の比較
—レジオネラ肺炎203症例の解析—

検査法	検査症例数	陽性症例数(%)
尿中抗原	185	117(63.2)
血清抗体価	191	72(37.7)
培養検査	123	40(32.5)
PCR	121	73(60.3)

表3 *L. pneumophila* SG-1 以外の感染症における各種検査法の結果

起炎菌	年齢/性別	血清抗体価	培養	Binax/Biotest	PCR
1. <i>L. pneumophila</i> SG-3	75 F	-	+	-/-	-
2. <i>L. pneumophila</i> SG-3	74 F	+	-	-/-	-
3. <i>L. pneumophila</i> SG-4	64 M	+	-	+/+	-
4. <i>L. pneumophila</i> SG-4	45 M	+		-/-	
5. <i>L. pneumophila</i> SG-5	79 M	-	+	-/-	
6. <i>L. pneumophila</i> SG-6	50 M	+	-	-/+	-
7. <i>L. pneumophila</i> SG-6	72 M	+	-	-/+	-
8. <i>L. pneumophila</i> SG-9	77 F	+	+		
9. <i>L. bozemanii</i>	51 F	+	-	-/-	-
10. <i>L. bozemanii</i>	58 F	+	-	-/-	
11. <i>L. bozemanii</i>	50 M	+		-/-	

表4 尿中レジオネラ抗原検査要領

検査項目	尿中レジオネラ抗原
区分	準用先区分 D012-23 区分 D-1
保険点数	200点
基準範囲	陰性
製品名	レジオネラ抗原「ミツビシ」
製造元	Biotest AG, D-6072 Dreieich, Germany
輸入販売元	(株) 三菱化学ヤトロン
測定方法	酵素免疫反応 (EIA)
検出対象	<i>Legionella pneumophila</i> 血清群 1 (他の血清群, 菌種も検出可能)
検査所要時間	約 3 時間
検体材料	随時尿
必要検体量	約 1 ml
保存方法	凍結保存

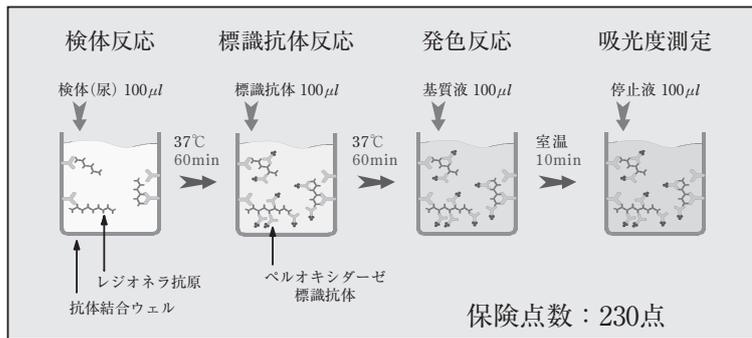
中のレジオネラ抗原 (LPS) を検出する。判定までの検査所要時間は 3 時間ほどで迅速に結果が得られる。本キットの操作は①検体とする尿 100 μ l をマイクロプレートのウェルに加える。②尿中のレジオネラ抗原とウェル中の固相化抗体と結合させるため 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、その後プレートを洗浄液で洗う。③ウェルにペルオキシダーゼ標識抗体を 100 μ l 添加する。④サンドイッチ法によりレジオネラ抗原との免疫複合体を形成させるため 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、その後プレートを洗浄液で洗う。⑤ウェルに基質液 100 μ l を加え、遮光して室温で 10 分間酵素反応させる。⑥ウェルに反応停止液 100 μ l 添加する。⑦反応停止後、マイクロプレートリーダーを用いて 570 ~ 655nm を対照波長として、波長 450 nm の吸光度を測定する (図 2)。判定結果は陰性対照の OD 値 (陰性対照の平均吸光度からブランク吸光度を差し引いた値) + 0.200 をカットオフ値とし、検体 OD 値 (検体の吸光度からブランク吸光度を差し引いた値) がカットオフ値未満ならば陰

性、カットオフ値以上ならば陽性と設定されている。

本キットの添付文書によると、最小検出感度は *L. pneumophila* 血清群 1 について約 2×10^3 菌体/ml であり、尿中共存物質であるグルコース (2000mg/dl)、尿素 (2000mg/dl)、ヘモグロビン (490mg/dl) およびビリルビン (18.4 mg/dl) の影響はないとされている。

本キットの特徴の 1 つとしてパンフレット等に「尿中レジオネラニューモフィラ 血清群 1 LPS 抗原検出試薬」として書かれているが、他の血清群や菌種との交差反応性も認められており *L. pneumophila* 血清群 1 以外のレジオネラ肺炎も診断することも可能である。しかし、各血清群・菌種によって反応性は多様で *L. pneumophila* 血清群 1 に比べると全体的に検出感度は低くなる。*L. pneumophila* 血清群 1 との反応性を 100 としたときの相対値は図 3 に示したとおりであり、*L. pneumophila* 血清群 5 および *L. longbeachae* などは比較的検出しやすいが、*L. pneumophila* 血清群 1 以外の肺炎の場合には本キットが陰性となる場合があるので注意が必要である。

また、斎藤¹⁶⁾ が本キットと Binax 社の EIA および ICA キットについて性能の違いをまとめたものによると、*L. pneumophila* 血清群 1 に対しては 3 キットともに 90% 以上と良好な検出感度を示しているが、*L. pneumophila* 血清群 1 以外に対しては本キットが Binax 社 2 キットよりも高い感度を示し、*L. pneumophila* 血清群 1 に比べ感度は低い培養法や血清抗体価と同等の検出率を有すると述べている。また、ICA キットは EIA キットに比べて特異度は若干低いのが 15 分で判定できるので迅速性の点で大きなメリットがあるとも述べている。



判定までの時間：約3時間
 検出対象：*L. pneumophila* 血清群1
 (血清群1以外も検出可能)

図2 レジオネラ抗原「ミツビシ」(三菱化学ヤトロン)の原理：酵素免疫反応法(EIA)

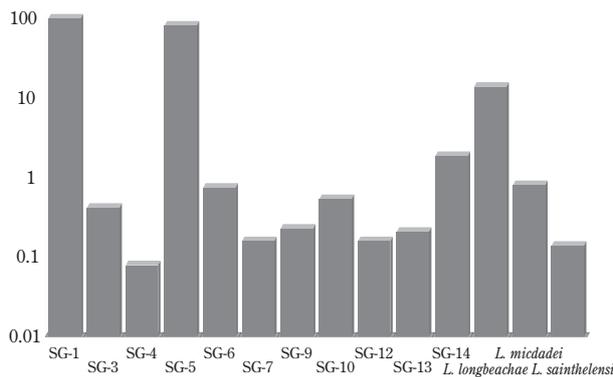


図3 レジオネラ抗原「ミツビシ」各血清群および他のレジオネラ属との交差反応性

おわりに

従来レジオネラの検査は煩雑で難しかったため、起因菌不明の肺炎として扱われる場合が多かったと思われる。しかし、近年早期診断に役立つ検査法の開発が進み、レジオネラ症の診断がより身近なものになってきている。特に尿中抗原検査は他の検査法に比べて感度が高く、検体も採取しやすいことからその有用性が認められているが、最終的な診断は本検査法の特徴を考慮したうえで総合的に判断する必要があると思われる。

文 献

- 1) 斎藤 厚：レジオネラ，微生物検査必携（厚生省監修），第3版，ppF31-F48，日本公衆衛生協会，東京，1987.
- 2) 特集レジオネラ属菌とレジオネラ症—最近の知見，臨床と微生物 25：1-74，1998.
- 3) Koide M. et al.：Isolation of *Legionella longbeachae* sero-

- group 1 from potting soils in Japan. Clin Infect Dis 29: 943-944, 1999.
- 4) Fraser D.W. et al.：Legionnaires' disease. Description of epidemic of pneumonia. N. Engl J Med 297: 1189-1197, 1977.
- 5) McDade J.E. et al.：Legionnaires' disease. Isolation of bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med 297: 1197-1203, 1977.
- 6) 斎藤 厚，他：本邦ではじめての Legionnaires' disease (レジオネラ症) の症例と検出菌の細菌学的性状，感染症誌 55：124-128，1981.
- 7) 山口恵三，他：Legionella 肺炎の診断法と臨床的特徴に関する検討，感染症誌 71：634-644，1997.
- 8) 山城祐子，他：レジオネラ肺炎の血清診断—当科における最近3年間の検査成績—，感染症誌 68：1256-1263，1994.
- 9) 森 正道，他：Legionella pneumophila serogroup 7による pontiac fever の集団発生例. I. 臨床所見，感染症誌 69：646-653，1995.
- 10) Stout J.E. et al.：Legionella. Manual of clinical microbiology, 8th ed. (Murray P.R. et al. ed.) 809-823, American Society for Microbiology, Washington D.C. 2003.
- 11) 厚生省レジオネラ症研究班：厚生省レジオネラ肺炎診断基準と診断・検査及び治療方針. 1992.
- 12) 藪内英子，他：抗レジオネラ血清抗体価診断基準の設定—マイクロプレート凝集反応法—，感染症誌 71：116-124，1997.
- 13) 館田一博：診断・治療と遺伝子検査 *Legionella pneumophila*. 臨床と微生物 26：603-606，1999.
- 14) 山口恵三，他：レジオネラ肺炎，日本臨床 56：2707-2717，1998.
- 15) 小林隆夫，他：尿中レジオネラ抗原検出，臨床検査 47：184-186，2003.
- 16) 斎藤 厚：レジオネラ肺炎の診断と治療—新たに保険適用となったレジオネラ尿中抗原検査 (Biotest 社) を含めて—，化学療法領域 19：1645-1652，2003.