

[症例報告]

グラム染色を契機にレジオネラ肺炎を疑い、複数血清群の *Legionella pneumophila* を検出した1症例

大野達也¹⁾・田中洋輔¹⁾・安西桃子¹⁾・小松奈央¹⁾・若竹春明²⁾

¹⁾ 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院臨床検査部

²⁾ 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院救命救急センター

(平成 28 年 8 月 2 日受付, 平成 28 年 10 月 4 日受理)

症例は基礎疾患のない 79 歳の女性で、自宅浴槽にて顔を水没させていたところを発見され、意識障害のため当院に救急搬送された。意識障害の原因として、インフルエンザを契機に脱力・脱水をきたし浴槽にて溺水し、低酸素脳症になったものと診断された。入院時の画像所見にて左下葉に浸潤影を認めていたが、Peramivir および第 3 世代セファロsporin 系薬の使用により症状の改善を認め第 7 病日に抗菌薬は中止された。しかし第 9 病日の夜間に呼吸状態が悪化し、右上葉に新たな浸潤影を認めたため人工呼吸器関連肺炎を疑い Tazobactam/Piperacillin (TAZ/PIPC) が投与開始された。さらに第 10 病日に実施した気管内吸引痰のグラム染色にて *Legionella* 属菌を疑ったため、Levofloxacin (LVFX) が追加投与された。その後簡単な受け答えが出来るまでに意識状態は改善したが、第 14 病日以降は酸素化不良による低酸素状態が続き、第 19 病日に全身状態が悪化し永眠された。

本症例では、気管内吸引痰のグラム染色にて白血球内にものみグラム陰性短桿菌を認めていたことから *Legionella* 属菌を疑い、*Legionella pneumophila* sero group (LPSG) 5 および 6 を検出した。今回、グラム染色と医師との連携は LPSG1 以外のレジオネラ肺炎における迅速な診断、治療につながった。

Key words: *Legionella pneumophila*, 浴槽水, sero group 5, sero group 6, グラム染色

序 文

レジオネラ症は、*Legionella* 属菌に汚染されたエアロゾルを吸入することによって起こる感染症であり、重症化しやすいレジオネラ肺炎とインフルエンザ様疾患のポンティアック熱に大別される¹⁾²⁾。レジオネラ肺炎は症状の進行が早く、適切な抗菌薬投与の遅れが死亡率の上昇に直結するとされている³⁾。しかし原因菌である *Legionella* 属菌はグラム染色に難染性を示

し、検出には特殊な培地を必要とするために、医師からの依頼や旅行歴、溺水などの臨床情報がない場合に見逃されてしまう可能性がある。今回われわれは、意識障害を主訴に搬送された患者の、入院第 9 病日に採取された気管内吸引痰のグラム染色より *Legionella* 属菌を疑い、*Legionella pneumophila* sero group (LPSG) 5 および 6 を検出し治療に貢献し得た 1 症例を経験したので報告する。

症 例

患者：79 歳，女性。

既往歴：特記事項なし。

生活歴：認知症の夫と二人暮らし。

主訴：意識障害。

現病歴：20XX 年 2 月上旬，自宅浴槽にて顔を水没させていた状態を夫が発見し，当院救命救急センターに搬送された。

著者連絡先：(〒241-0811) 神奈川県横浜市旭区矢指町 1197-1
聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院臨床検査部
大野達也
TEL: 045-366-8428
FAX: 045-366-1157
E-mail: ohno-marianna-tatsuya@marianna-u.ac.jp

Table 1. Laboratory findings

Item (unit)	The first medical examination	
WBC	(μ L)	6200
Hb	(g/dL)	15.4
Hct	(%)	45.8
Plt	($10^3/\mu$ L)	10.9
TP	(g/dL)	8.2
Alb	(g/dL)	4.9
AST	(IU/L)	151
ALT	(IU/L)	56
LDH	(IU/L)	607
CPK	(IU/L)	611
NH ₃	(μ g/dL)	43
CRP	(mg/dL)	0.63
BUN	(mg/dL)	19.3
Cre	(mg/dL)	1.33
eGFR		29.9
Na	(mEq/L)	134
Cl	(mEq/L)	102
K	(mEq/L)	3.6
GLU	(mg/dL)	160

入院時検査所見：血球算定および血液化学検査所見を Table 1 に示す。細菌学的検査として、血液、髄液、尿および気管内吸引痰が採取されたが有意な細菌の検出は認めなかった。尿中レジオネラ抗原は陰性であり、インフルエンザウイルス抗原検査で B 型が陽性であった。意識障害の精査目的で、頭部 CT、MRI を実施したが明らかな急性期病変は認めず、胸部単純レントゲンおよび胸部 CT 所見にて左下葉に浸潤影を認めた。薬物中毒検査は陰性であり、髄液細胞数、蛋白、浸透圧、糖も基準値範囲内であった。

入院経過 (Fig. 1)：インフルエンザウイルス抗原検査にて B 型が陽性であったため、インフルエンザを契機に脱力・脱水をきたし浴槽にて溺水し、低酸素脳症による意識障害および誤嚥性肺炎を合併したと診断された。入院時に気管挿管がおこなわれ、Peramivir 300 mg の投与および、Ceftriaxone (CTRX) 1 g \times 2/day が投与開始された。第 3 病日に肝障害の悪化を認めたため、CTRX から Cefotaxime (CTX) 2 g \times 2/day に変更され、第 7 病日には全身状態が安定したために抗菌薬は中止された。しかし第 9 病日の夜間に呼吸状態の悪化を認め、新たな右上葉の浸潤影を認めたため人工呼吸器関連肺炎を疑い Tazobactam/Piperacillin (TAZ/PIPC) 4.5 g \times 3/day の投与が開始された。さらに、第 10 病日に実施した気管内吸引痰のグラム染色にて *Legionella* 属菌を疑ったため、救命時に自宅

浴槽での溺水があったことと併せてレジオネラ肺炎も考慮し Levofloxacin (LVFX) 750 mg \times 1/day が追加投与された。その後簡単な受け答えができるまでに意識状態の改善を認めたが、第 14 病日以降は酸素化不良による低酸素状態が続き、第 19 病日に全身状態が悪化し永眠された。

細菌学的検査

塗抹検査：第 9 病日に採取された気管内吸引痰のグラム染色所見 (Bartholomew & Mittwer 法, B & M 法) を Fig. 2 に示す。Geckler 分類 5 群の膿性痰で、口腔内常在細菌は認めず白血球内のみグラム陰性短桿菌 (1+) を認めた。染色形態は両端がややとがった直線的な短桿菌であり、長さは 1~2 μ m であった。白血球は空胞変性を多く認め、空胞内に菌体を認める傾向や細胞内の辺縁に菌体を認める傾向があった。追加で実施したヒメネス染色所見 (武藤化学) を Fig. 3 に示す。また、入院時に採取した気管内吸引痰のグラム染色は Geckler 分類 6 群で口腔内常在細菌しか認めず、培養検査においても口腔内常在細菌のみしか検出されなかった。

培養検査：第 9 病日に採取された気管内吸引痰の培養はヒツジ血液寒天培地 (日水製薬)、チョコレート寒天培地 EXII (日水製薬)、B-CYE α 寒天培地 (栄研化学)、WYO- α 寒天培地 (栄研化学) を 35 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 湿潤環境下で培養し、マッコンキー寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) を 35 $^{\circ}$ C 好気環境下で培養した。24 時間培養後は *Acinetobacter baumannii* complex および *Candida albicans* を少数認めるのみであったが、72 時間後に B-CYE α 寒天培地および WYO- α 寒天培地にのみ 1.5~3.0 mm の乳白色で光沢のある大小不同の集落を検出した (Fig. 4)。集落からのグラム染色所見では 3~15 μ m の大きさのグラム陰性桿菌で、一部フィラメント化を認めた (Fig. 5)。

同定検査：初代分離にて得た集落から、ためし凝集試験としてレジオネラ免疫血清「生研」(デンカ生研) を用いて血清型別試験を実施したところ LPSG5 \cdot 6 に同時に凝集を認めた。使用した血清が当院で管理外試薬として保管していた免疫血清であったため、横浜市衛生研究所に精査を依頼した結果、血清型別試験にて LPSG6 と同定された。しかし当院で *Legionella* 属発育確認試験を実施し、発育した集落から血清型別試験を実施したところ LPSG5 に凝集を認めた。このことから再度複数集落を純培養し、血清型別試験を実施した結果 LPSG5 \cdot 6 の異なる血清群に凝集を認め、複数血清群感染であることが分かった。各血清群にお

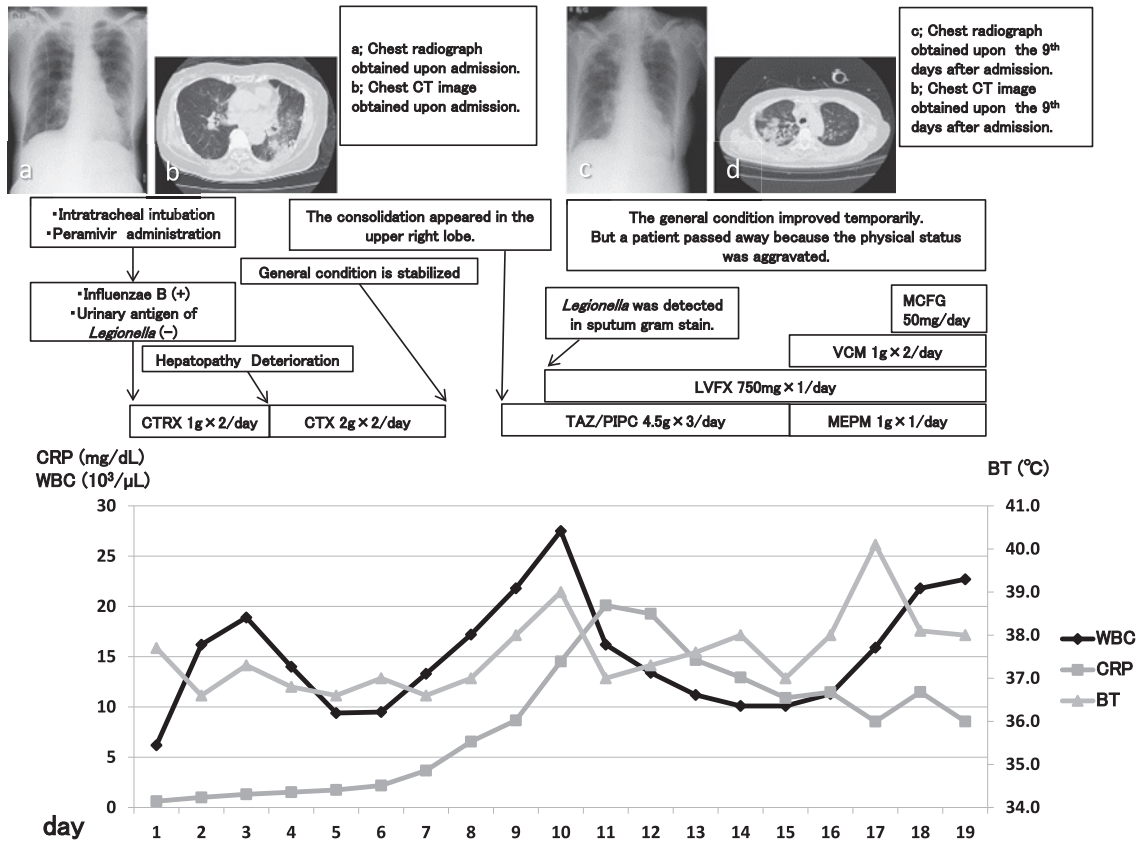


Fig. 1. Clinical course.

CTR: Ceftriaxon, CTX: Cefotaxime, TAZ/PIPC: Tazobactam/Piperacillin, LVFX: Levofloxacin, VCM: Vancomycin, MEPM: Meropenem, MCFG: Micafungin.

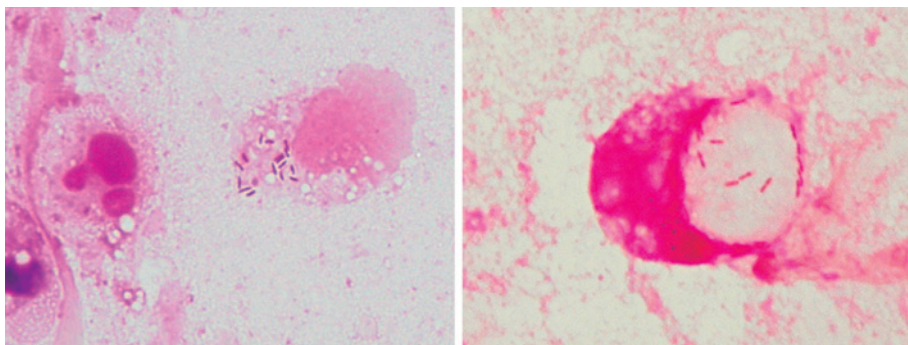


Fig. 2. Gram stain of *Legionella pneumophila* from suction sputum. (x1000)

ける集落の形態に大きな違いを認めなかったが、LPSG5はLPSG6と比較し集落が大きい傾向にあった (LPSG5: 2.0~3.0 mm, LPSG6: 1.5~2.0 mm)。

薬剤感受性検査: *Legionella* 属菌は Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI) で定められた薬剤感受性測定法がないため, Etest Application

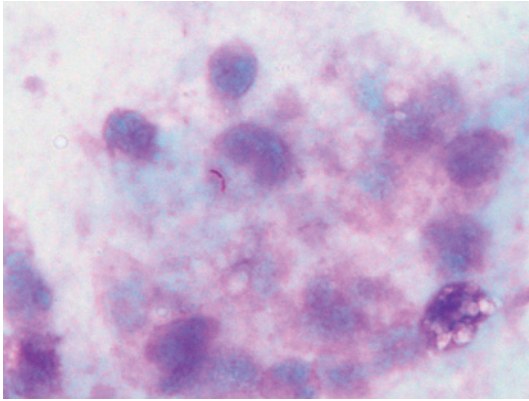


Fig. 3. Giménez stain of *Legionella pneumophila* from suction sputum. (×1000)

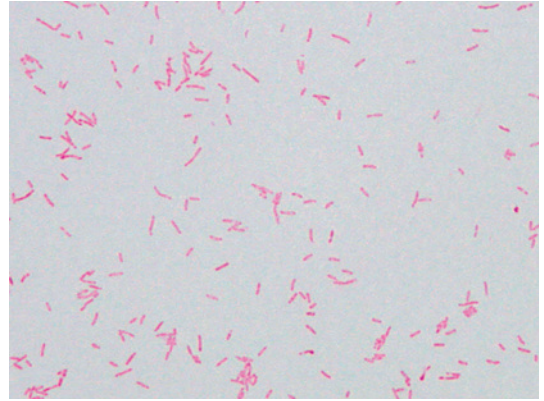


Fig. 5. Gram stain of *Legionella pneumophila* from colony. (×1000)

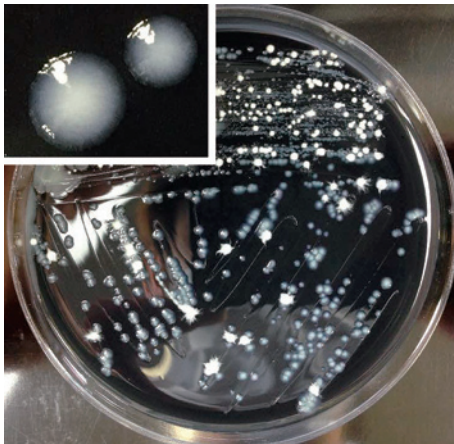


Fig. 4. Glistening and white colonies of *Legionella pneumophila* on WYO-α agar. After 72 h culture at 35°C 5%CO₂ in high humidity condition.

Table 2. Antimicrobial-susceptibility for *Legionella pneumophila*

Antimicrobial agents		sero group 5	sero group 6
		MIC (μg/mL)	
benzylpenicillin	PCG	2	2
amoxicillin	AMPC	0.38	0.38
ceftriaxone	CTR3	0.25	0.064
imipenem	IPM	0.047	0.047
meropenem	MEPM	0.003	0.002
erythromycin	EM	0.25	0.25
clarithromycin	CAM	0.047	0.032
levofloxacin	LVFX	0.094	0.064
ciprofloxacin	CPF3	0.19	0.19
spafloxacin	SPFX	0.125	0.094
minocycline	MINO	2	2
β-lactamase		+	+

Tested by E-test (Sysmex-BioMérieux)

Guide⁴⁾(シスメックス・ビオメリュー)に従ってEtest法で実施した。すなわち、McFarland 1に調整した菌液をB-CYEα寒天培地に塗布し、各薬剤のEtestストリップを設置後に35°C、5%CO₂環境下にて72時間培養後に判定した。結果をTable 2に示す。また、セフナーゼディスク(日本ベクトン・ディッキンソン)を用いたβ-ラクタマーゼ産生性試験は陽性であった。

考 察

今回、グラム染色を契機に*Legionella*属菌を疑い検出し、治療に貢献し得た1症例を経験した。我々が

検索した範囲内では、呼吸器材料のグラム染色で*Legionella*属菌の菌体を確認し、検出・診断に至った報告はない。また、ヒト由来検体での*Legionella*属菌のグラム染色所見を得たことも非常にまれなことと考えられる⁵⁾。通常は呼吸器材料のグラム染色にてグラム陰性桿菌の貪食像を認めた場合でも、*Legionella*属菌を疑うことは難しい。それは口腔内に常在する嫌気性グラム陰性桿菌との鑑別が難しく、*Legionella*属菌がグラム染色に難染性を示すという認識があるためである。本症例では気管内吸引によって得られた検体を用いたことにより、口腔内常在細菌を認めず細胞や菌体の観察が十分にできた。白血球の貪食像において

は、白血球内の辺縁に菌体が集まる傾向があったことや空胞変性を多く認めていた所見があった。*L. pneumophila* は宿主細胞内において、異物や一般細菌が取り込まれた際のエンドサイトーシス経路から逸脱し形成された異質な食胞 (*Legionella*-containing phagosome) 内で増殖するとされている⁶⁷⁾。*Legionella* 属菌を疑うグラム染色所見のひとつになる可能性が考えられるが、さらなる症例の蓄積が必要である。

発症時期については、入院時の肺炎所見が第3世代セファロスポリン系薬使用後に改善を認めたこと、第9病日に右上葉に新たな浸潤影を認め呼吸状態が悪化したこと、*Legionella* 属菌の潜伏期間が2~10日であること¹⁾などを考えると、溺水時に浴槽水を誤飲したことにより感染し9日間の潜伏期間を経て発症したものと考えられた。しかし、感染源については救命時に浴槽水が廃棄されており、浴槽水からLPSG5・6の検出をおこなうことができなかつたため確定は得られなかつた。

患者宅では日頃より浴槽水の沸き返しをおこなっていた。過去の報告によると、本邦において毎日換水する非循環式の浴槽水からは*Legionella* 属菌の検出は無かつたとされているが⁸⁾、沸き返しをおこなっていた浴槽水が感染源と考えられるレジオネラ肺炎の報告は複数ある⁹⁾¹⁰⁾。また、人工環境水中における*Legionella* 属菌の血清型分布は、冷却塔水ではLPSG1の割合が32~62%、LPSG5・6が10%未満なのに対し、浴槽水中ではLPSG1が6~39%と減少し、LPSG5が15~34%、LPSG6が16~21%に増加するとされている¹¹⁾¹²⁾。本症例でも浴槽水を誤飲したことにより、LPSG5・6に感染したと考えられた。沸き返しをおこなっている浴槽水の暴露があつた場合には、LPSG1以外の*Legionella* 属菌も十分考慮し検査を進めなければならない。

本症例では入院時と第9病日にレジオネラ尿中抗原検査が実施されていたがどちらも陰性であつた。Okadaらは、McFarland 3に調整した菌液を用いた場合に、イムノクロマト法による尿中抗原検査でLPSG6が陽性反応を示したと報告している¹³⁾。しかし、本症例分離株のLPSG5・6はいずれもMcFarland 3に調整した菌液を用いても陽性反応を示さなかつた。LPSG1以外のレジオネラ肺炎においても尿中抗原検査が陽性であつた報告はあるが¹⁴⁾、LPSG1以外の*Legionella* 属菌の検出は困難である。布施らの報告によると、レジオネラ肺炎の起因菌の約半数はLPSG1以外であるとされている¹⁵⁾。一方、国立感染症研究所の感染症発生動向調査によると2008年~

2012年におけるレジオネラ症の4,081例中3,835例(94%)が尿中抗原検査のみで診断されている¹⁶⁾。これらのデータからレジオネラ症の約半数が診断されていない可能性がある。当院で過去10年間にレジオネラ肺炎と診断された症例は、本症例を含め7例あり、本症例を除いた6例は尿中抗原検査で陽性を示し診断されている。全例で喀痰および気管内吸引痰の培養検査が実施されたが、検出し得たのは本症例含む2例(28.5%)であり、喀痰の培養陽性率は過去の報告¹⁷⁾と同様の値であつた。検出し得た2例はいずれも日本呼吸器学会市中肺炎診療ガイドライン¹⁸⁾の重症度分類における超重症に分類されており、気管内吸引によって得られた良質な検体からの検出であつた。検出ができなかつた5例は重症度が中等症以下であるか、良質な呼吸器材料の採取ができなかつた症例であつた。このことから*Legionella* 属菌の検出には患者の重症度と適切な検体の採取が関連していると考えられた。

本症例分離株では、血清群による集落の大きさの違いをわずかに認めた。*Legionella* 属菌は元来大小不同の集落を形成するために集落の大きさによる鑑別は困難であるとされている。しかし、実体顕微鏡を用いた方法ではあるが、集落性状や発育速度を考慮した*Legionella* 属菌の分別方法は森本らにより報告されており¹⁹⁾、複数血清群感染を疑う所見のひとつになると考えられた。

本症例は、LPSG5・6の複数血清群によるレジオネラ肺炎であつた。*Legionella* 属菌が分離可能だつた患者から、異なる*Legionella* 属菌種または血清群の株が検出される複合感染の事例は、261例中5例(1.9%)とまれである¹⁶⁾。本症例ではためし凝集試験にてLPSG5・6が同時に凝集を認めたことから複数血清群による感染を推定し得た。過去にも浴場施設で溺れし、レジオネラ肺炎を発症した患者の検体および浴場施設の検体から同一遺伝子の複数血清群を検出した報告がある²⁰⁾。浴槽水を誤飲するなどの濃厚な暴露があつた患者では特に、複数血清群による感染も考慮し血清型別試験を複数の集落から実施する必要がある。各血清型におけるレジオネラ症の臨床的特徴や疫学的背景を明らかにし、症例を蓄積することが、今後の診断率および検出率向上につながると思われる。

本症例の要旨は第26回日本臨床微生物学会(2015年)において発表した。

利益相反：なし。

文 献

- 1) Fraser, DW, TS Tsai, W Orenstein, et al. 1977. Legionnaire's disease: Description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 297: 1189-1197.
- 2) Glick, TH, MB Gregg, B Berman, et al. 1978. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol* 107: 149-160.
- 3) Heath, CH, DI Grove, DF Looke. 1996. Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 15: 286-290.
- 4) Sysmex-BioMérieux. 2012. Etest[®] Application Guide.
- 5) 森本 洋, 杉山寛治, 磯部順子, 他. 2011. 国立感染症研究所レジオネラ症検出マニュアル.
- 6) Swanson, M.S, B.K. Hammer. 2000. *Legionella pneumophila* Pathogenesis: A Fateful Journey from Amoebae to Macrophages. *Annu Rev Microbiol* 54: 567-613.
- 7) 三宅正紀. 2008. レジオネラの宿主細胞内増殖性に関する研究. *薬学雑誌* 128: 1763-1770.
- 8) 高田千恵子, 榎田隆一, 保坂三継. 2006. 都市環境水におけるレジオネラ属菌の生息実態と共存生物調査 平成16年度. 東京都健康安全研究センター研究年報 56: 313-317.
- 9) 板東千昌, 天野雅子, 鈴木道明, 他. 2008. 自宅浴槽が感染源と考えられ, 早期診断・治療が奏効したレジオネラ肺炎の1例. *日本胸部臨床* 67: 1038-1042.
- 10) 石井秀明, 富岡洋海, 平田 悠, 他. 2013. 医療・介護関連肺炎として発症したレジオネラ肺炎の1剖検例. *日呼吸会誌* 2: 562-566.
- 11) 中村美雪, 澤村健一, 江田孝志, 他. 2007. 最近3年間の浴槽水, 冷却塔水等からのレジオネラの検出状況について. *埼臨技会誌* 54: 87-91.
- 12) 鈴木敦子, 市瀬正之, 松江隆之, 他. 2002. 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況. 1996年4月から2000年11月まで. *感染症誌* 76: 706-710.
- 13) Okada, C, F Kura, A Wada, et al. 2002. Cross-Reactivity and Sensitivity of Two *Legionella* Urinary Antigens from Various Serogroups of *L. pneumophila* and Other *Legionella* Species. *Microbiol Immunol* 46: 51-54.
- 14) Helbig, J.H., S.A. Uldum, P.C. Luck, et al. 2001. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA. *J Med Microbiol* 50: 509-516.
- 15) 布施 闔, 館田一博, 山口恵三. 2005. 病態・病原性における最近のトピックス 尿中抗原診断 臨床に与えるインパクト. *臨床と微生物* 32: 335-340.
- 16) 国立感染症研究所. 2013. 病原微生物検出情報 月報 34: 155-157.
- 17) 吉岡浩明, 高柳 昇, 石黒 卓, 他. 2012. レジオネラ肺炎診断法に関する検討. *日臨微誌* 22: 28-34.
- 18) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会編. 2005. 成人市中肺炎診療ガイドライン, 東京.
- 19) 森本 洋. 2010. 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. *環境感染誌* 25: 8-14.
- 20) 市原祥子, 江藤良樹, 濱崎光宏, 他. 2012. 患者及び浴場施設検体から複数血清群の *Legionella pneumophila* が分離された事例について. *福島県保健環境研究所年報* 39: 76-80.

A case of *Legionella* pneumonia diagnosed by Gram staining of a suction sputum sample

Tatsuya Ohno¹⁾, Yosuke Tanaka¹⁾, Momoko Anzai¹⁾, Nao Komatsu¹⁾, Haruaki Wakatake²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine Yokohama City Seibu Hospital

²⁾Emergency and Critical Care Center, St. Marianna University School of Medicine Yokohama City Seibu Hospital

We report here a case of *Legionella* pneumonia that was diagnosed by Gram staining of a suction sputum sample. The patient, a 79-year-old woman with no underlying disease, was found drowning in a bathtub at home, and was brought to St. Marianna university school of medicine yokohama city seibu hospital, as she was in a state of impaired consciousness. Considering the impaired state of consciousness, weakness due to drowning, and dehydration due to an influenza virus infection, hypoxic encephalopathy was diagnosed. Pneumonia reported at the time of hospitalization, was ameliorated after the administration of antibiotics. However, on day 9 of admission, the patient's condition was newly consolidated and respiratory status deterioration was noted ; *Legionella pneumophila* was detected on Gram staining the suction sputum sampled at that time. After sharing this information with the laboratory and the clinicians, administration of levofloxacin was initiated. The growth of *Legionella pneumophila* sero groups 5 and 6 was detected on B-CYE α and WYO- α agar media after 72 h of incubation. In this case, we identified the presence of an aggressive, difficult-to-detect *Legionella* sp. by Gram staining. Thus, we were able to contribute to the diagnosis and treatment of *Legionella* pneumonia by sharing relevant information with the laboratory and the clinicians.