

[原 著]

レジオネラ肺炎における尿中抗原検査と LAMP 法遺伝子検査のレジオネラ属菌検出率の比較

白坂 渉<sup>1)</sup>・篠崎正博<sup>1)</sup>・櫛引千恵子<sup>2)</sup>・勝川千尋<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 岸和田徳洲会病院救命救急センター

<sup>2)</sup> 岸和田徳洲会病院臨床検査課

<sup>3)</sup> 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課

(平成 31 年 1 月 10 日受付, 令和元年 5 月 16 日受理)

レジオネラ肺炎は重症化しやすく早期診断治療が重要である。迅速診断には尿中抗原が広く用いられるが *Legionella pneumophila* 血清 1 型以外は検出できず尿中抗原陰性でもレジオネラ肺炎は否定できない。一方、吸引痰に対する Loop-mediated isothermal amplification 法 (LAMP 法) は *Legionella* 属の多くの菌種、血清型の検出が可能で迅速かつ正確な検査である。当院に LAMP 法が導入された 2015 年 4 月から 2018 年 3 月までの 36 ヶ月間に 12 例のレジオネラ肺炎を診断し、うち 8 例が尿中抗原陰性で吸引痰の LAMP 法陽性から診断し得た。そこで 2012 年 4 月から 2018 年 3 月までの 72 か月間に当院の救急外来を受診した患者のうち、レジオネラ肺炎が疑われた 667 例に対し、尿中抗原のみ実施していた LAMP 法導入前 (2012 年 4 月～2015 年 3 月の 36 か月間) と LAMP 法導入後 (2015 年 4 月～2018 年 3 月の 36 か月間) でレジオネラ属菌の検出率を比較した。結果、尿中抗原のみ実施した 346 例中、尿中抗原陽性は 3 例 (0.87%)、LAMP 法導入後の 321 例中、LAMP 法陽性は 12 例 (3.74%) であり、LAMP 法の検出率は尿中抗原と比較し有意に高かった (P=0.0166)。よってレジオネラ属菌の検出及びレジオネラ肺炎の迅速診断には吸引痰の LAMP 法が有用である。

**Key words:** レジオネラ肺炎, 尿中抗原検査, LAMP 法

序 文

レジオネラ肺炎の迅速診断には尿中抗原検査が有用で<sup>1)</sup>広く用いられているが *Legionella pneumophila* 血清 1 型以外の検出が困難であり<sup>2)</sup>、診断には尿中抗原のみでは不十分であると考えられる。一方、吸引痰に対する Loop-mediated isothermal amplification 法遺伝子検査 (以下 LAMP 法) は *L. pneumophila* 血清 1 型を含むレジオネラ属の多くの菌種、血清型に対応しており、感度・特異性ともに高くレジオネラ属菌の検出に有用<sup>3)</sup>とされている。当院に 2015 年 4 月から LAMP 法が導入されて以降、2018 年 3 月までの 36 か月間に我々はレジオネラ肺炎を 12 例経験しているが、12 例中 8 例と高率に尿中抗原陰性で LAMP 法陽性により診断し得た。過去の報告からも、本邦においてレジオネラ肺炎の見逃しが存在することが指摘されている<sup>4)</sup>。そこで、尿中抗原で見逃されているレジオネラ属菌の検出に LAMP 法が極めて有用ではないかと考え、当院における LAMP 法導入前の 36 か月間と導入後 36 か月間のレジオネラ属菌の検出率を比較検討した。

対象と方法

2012 年 4 月から 2018 年 3 月までの 72 か月間に当院の救急外来を受診し、初診時にレジオネラ肺炎が疑われた 20 歳

以上の患者 667 例を対象とし、尿中レジオネラ抗原検査 (イムノキャッチーレジオネラ, 栄研化学) のみ実施していた LAMP 法遺伝子検査 (Loopamp レジオネラ検出試薬キット C, 栄研化学) 導入以前の 36 か月間 (2012 年 4 月から 2015 年 3 月) の 346 例と LAMP 法導入により尿中抗原と LAMP 法の両者を実施した 36 か月間 (2015 年 4 月から 2018 年 3 月) の 321 例に関して、LAMP 法導入前後でのレジオネラ属菌の検出率を比較した。本研究におけるレジオネラ肺炎疑い患者とは Fiumefreddo らが提唱したレジオネラ肺炎診断における 6 点スコア<sup>5)</sup>で 4 点以上、またはレジオネラ肺炎診断基準である Winthrop-University Hospital Criteria<sup>6)</sup> (以下 WUH スコア) で 5 点以上 (5-15 点: *Legionella* likely, 15 点<: *Legionella* very likely) を満たすものと定義した。尿中抗原、LAMP 法で検査陽性となった症例に関しては、気管内吸引痰のレジオネラ培養検査を実施した。レジオネラ培養検査は検体を 3 等分、未処理、酸処理、熱処理後、それぞれポアメディア B-CYE $\alpha$  寒天培地 (栄研化学)、ポアメディア WYO $\alpha$  寒天培地 (栄研化学) に塗抹、培養 7 日目まで観察した。レジオネラが疑われる集落について、血液寒天培地と B-CYE $\alpha$  寒天培地に植え継ぎ、L システインの要求性が確認された菌を *Legionella* 属菌と推定、レジオネラ免疫血清「生研」(デンカ生研) を用いた凝集反応法で血清群別を行い、*L. pneumophila* の同定と血清群の決定を行った。尿中抗原と LAMP 法のレジオネラ属菌検出率の比較検定は Fisher's exact test を行い、P 値 0.05 以下をもって有意差ありとした。本研究は人を対象とする医学系研究に関する倫理

著者連絡先: (〒596-8522) 大阪府岸和田市加守町 4-27-1  
岸和田徳洲会病院救命救急センター  
白坂 渉  
TEL: 072-445-9915(代表)

Table 1. Patient background before and after introduction of LAMP method

	Before introduction (n = 346)	After introduction (n = 321)	p value
Sex (M/F)	227/119	199/122	0.33**
Age	77.4 ± 13.9	77.2 ± 13.1	0.39*
6 point score (4/5/6)	88/209/49	72/193/56	0.42**
WUH score (5-15/15<)	184/162	168/153	0.88**

Mean ± SD, \*Student's t-test, \*\*Fisher's exact test.

Table 2. Comparison of detection rates of urine antigen and LAMP method

year/month		Positive	Negative	Total	Detection rate
2012/4 ~ 2015/3	Urinary antigen test	3 cases	343 cases	346 cases	0.87%
	LAMP method	12 cases	309 cases		3.74%
2015/4 ~ 2018/3	Urinary antigen test	4 cases	317 cases	321 cases	1.25%

Fisher's exact test: P = 0.0166

Table 3. Results of LAMP method and urine antigen after introduction of LAMP method (2015/4~2018/3, n = 321)

Urinary antigen test	LAMP method		
	Positive	Negative	Total
Positive	4 cases	None	4 cases
Negative	8 cases	309 cases	317 cases
Total	12 cases	309 cases	321 cases

指針に従い、岸和田徳洲会病院倫理審査委員会で審査され、承認された（承認番号：19-02）。

## 結 果

2012年4月から2018年3月までの72か月間で、レジオネラ肺炎診断における6点スコアで4点以上、またはWUH基準で5点以上を満たすレジオネラ疑い症例は667例であった。LAMP法導入前後の患者背景（性比・年齢・6点スコアとWUHスコアの人数分布）に有意差はなかった（Table 1）。LAMP法導入以前の36か月間（2012年4月から2015年3月）に尿中抗原のみ実施した346例中、尿中抗原陽性となった症例は3例でありレジオネラ属菌の検出率は0.87%と極めて低かった。一方でLAMP法導入後の36か月間（2015年4月から2018年3月）にレジオネラ肺炎を疑い、尿中抗原に加え、気管内吸引痰のLAMP法を実施した321例中、LAMP法陽性となった症例は12例であり、検出率は3.74%と統計学的に有意に（Fisher's exact test, P = 0.0166）上昇した（Table 2）。LAMP法を実施した321例の検体は全て気管内吸引痰であり、全例に尿中抗原検査を併用しておりLAMP法を単独で実施した症例はない。また、2015年4月以降で、尿中抗原陽性の4例は全例でLAMP法も陽性であり、尿中抗原陽性でLAMP法陰性となった症例はなかった（Table 3）。本研究期間に検査陽性となった合計15例のうち6例がレジオネラ培養検査陽性で、全例 *L. pneumophila* であった。6例中3例が血清1型で、3型1例、6型1例、8型1例と同定した（Table 4）。2012年度においては、尿中抗原陽性例は0例であった。

## 考 察

レジオネラ肺炎は市中肺炎の1%<sup>7)</sup>程度と頻度は少ないが、重症化しやすく治療の遅れが死亡率の増加につながる<sup>8)</sup>。レジオネラ肺炎の診断に用いられている検査法には尿中抗原検査、喀痰検鏡検査（ヒメネス染色）、喀痰培養検査、PCR法、血清抗体価測定法などの方法があるが、喀痰培養検査や血清抗体価測定法での診断は結果判定までに時間がかかり早期診断には向かない。またPCR法は測定法が複雑で測定器が高価であり、結果が得られるまでに数日を要する。レジオネラ肺炎の迅速診断にBALF（bronchoalveolar lavage fluid）によるヒメネス染色の有用性を示す報告<sup>9)</sup>もあるが検出率が低く、BALFは侵襲的かつ専門的であり施行可能な施設は限られている。よって、安価で保険適応があり検査法が容易で迅速診断可能な尿中抗原検査が広く用いられており、本邦におけるレジオネラ肺炎の9割以上が尿中抗原検査で診断されている<sup>10)</sup>。しかしながら尿中抗原検査は *L. pneumophila* 血清1型以外の検出が困難であり、陰性であってもレジオネラ肺炎を否定することはできない。よって、尿中抗原検査のみではレジオネラ肺炎を見逃す可能性が指摘されており<sup>4)</sup>、近年レジオネラ肺炎の迅速診断におけるLAMP法の有用性を示す報告がなされてきている<sup>11)12)</sup>。本研究結果からも、2015年4月以降の36か月間に尿中抗原陰性で気管内吸引痰でのLAMP法陽性から診断し得た8例は、尿中抗原のみでは見逃していたことが判明した（Table 3, 4）。

わが国で開発されたLAMP法（Loopampレジオネラ検出試薬キットC。栄研化学）は測定法が簡便であり、測定時間が短く測定装置と試薬があれば院内で迅速に測定可能である

Table 4. List of *Legionella* pneumonia cases in our hospital (2012/4~2018/3)

Period	Sample number	Urinary antigen	LAMP	Routine culture results	Routine culture results plus culture results for LAMP-positive sample
2012/4~2015/3	1	Positive		Negative	
	2	Positive	Not carried out	Not carried out	
	3	Positive		<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	
2015/4~2018/3	4	Negative	Positive		Negative
	5	Negative	Positive		Negative
	6	Negative	Positive		Negative
	7	Negative	Positive		<i>L. pneumophila</i> serogroup 8
	8	Negative	Positive		Negative
	9	Positive	Positive		Negative
	10	Positive	Positive		Negative
	11	Negative	Positive		<i>L. pneumophila</i> serogroup 3
	12	Negative	Positive		Negative
	13	Negative	Positive		<i>L. pneumophila</i> serogroup 6
	14	Positive	Positive		<i>L. pneumophila</i> serogroup 1
	15	Positive	Positive		<i>L. pneumophila</i> serogroup 1

ためレジオネラ肺炎の迅速診断に有用である<sup>13)</sup>。また尿中抗原検査と異なり、レジオネラ属の多くの菌種、血清型に対応している<sup>3)</sup>。日本呼吸器学会の成人肺炎診療ガイドライン2017<sup>14)</sup>でも LAMP 法を含めた遺伝子検査は市中肺炎の診療を大きく変える可能性を指摘している。しかし、尿中抗原と LAMP 法を比較した臨床データの報告は少ない。よって、本研究結果は、単施設での結果ではあるが LAMP 法の検出率が尿中抗原より高いことを示唆する極めて有意な臨床データであると考ええる。

日本化学療法学会のアンケート調査によるとレジオネラ肺炎を疑った場合に必ず施行する検査として尿中抗原検査が 52.8% であるのに対して LAMP 法検査を含めた遺伝子検査は 1% と普及率は未だ低いのが現状であり<sup>15)</sup>、LAMP 法を積極的に実施することで今まで見逃されていたレジオネラ肺炎の迅速診断が可能になると考える。ただし、レジオネラ肺炎の確定診断に最も確実なのは、培養検査陽性を確認することであるが、本結果では尿中抗原陰性かつ LAMP 法陽性の 8 例中 5 例は培養検査陰性であった。本研究からは LAMP 法の検出面での妥当性をサポートするデータがないため、LAMP 法が偽陽性である可能性を含んでいることを理解しておく必要があると考える。一方でレジオネラの分離培養は困難な場合が多く、喀痰の培養陽性率は 16.7%<sup>9)</sup> と低い。よって当院では、臨床症状と合わせて尿中抗原・LAMP 法検査陽性であれば保健所への届け出を行っているのが現状である。

本研究結果から、LAMP 法はレジオネラ属菌の検出率が尿中抗原より有意に高いことを確認した。よって、レジオネラ肺炎の迅速診断には尿中抗原検査のみでは不十分であり、レジオネラ属の多くの菌種、血清型を検出できる LAMP 法が有用である。今後、LAMP 法の普及はレジオネラ肺炎の診断治療を大きく変える可能性がある。そして、レジオネラ肺炎の診断率の向上および早期診断治療につながるものと考ええる。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

## 文 献

- 1) Chen, DJ, GW Procop, S Vogel, et al. 2015. Utility of PCR, Culture, and Antigen Detection Methods for Diagnosis of Legionellosis. *J Clin Microbiol* 53: 3474-3477.
- 2) Shimada, T, Y Noguchi, JL Jackson, et al. 2009. Systematic review and metaanalysis: urinary antigen tests for Legionellosis. *Chest* 136: 1576-1585.
- 3) 安中敏光, 吉野 学, 百田隆祥, 他. 2003. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法によるレジオネラ属菌の検出. *日本臨床微生物学雑誌* 13: 19-25.
- 4) 山口恵三, 館田一博, 石井良和, 他. 1997. *Legionella* 肺炎の診断法と臨床的特徴に関する検討. *感染症学雑誌* 71: 634-643.
- 5) Fiumefreddo, R, R Zaborsky, J Haeuptle, et al. 2009. Clinical predictors for *Legionella* in patients with community-acquired pneumonia to the emergency department. *BMC pulmonary Medicine* 4: 1-9.
- 6) Burke, A, MD Cunha. 2008. Severe Legionella pneumonia: Rapid presumptive clinical diagnosis with Winthrop-University Hospital's weighted point score system(modified). *Heat and Lung* 37: 311-320.
- 7) File, TM. 2003. Community-acquired pneumonia. *Lancet* 362: 1991-2001.
- 8) Heath, CH, DI Grove, DF Looke. 1996. Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality. *Eur J Clin Microbiol InfectDis* 15: 286-290.
- 9) 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. *日本臨床微生物学雑誌* 22: 28-34.
- 10) レジオネラ症 2008.1~2012.12 (2013). *IASR* 34: 155-157.
- 11) 松下久美子, 土黒康平, 有田昇平, 他. 2017. *Legionella longbeachae* による重症肺炎の 1 例と LAMP 法の有用性. *JAR-MAM* 27: 57-63.
- 12) Moriguchi, S, M Abe, M Kimura, et al. 2018. The Diagnosis of *Legionella pneumophila* Serogroup 5 Bacteremic Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 166: 1000-1003.

- monia during Severe Neutropenia Using Loop-mediated Isothermal Amplification. Intern Med 57: 1045-1048.
- 13) 山口恵三, 館田一博, 中森祥隆, 他. 2007. LAMP法を用いた *Mycoplasma pneumoniae* と *Legionella spp* による呼吸器感染症の迅速診断試薬の評価. 医学と薬学 58: 565-571.
- 14) 日本呼吸器学会成人肺炎診療ガイドライン 2017 作成委員会. 2017. 成人肺炎診療ガイドライン. 日本呼吸器学会.
- 15) 宮下修行, 青木洋介, 菊池利明, 他. 2016. 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: 66-67.

### Comparative study of the detection rates of the urinary antigen test and the LAMP method for *Legionella* species

Wataru Shirasaka<sup>1)</sup>, Masahiro Shinozaki<sup>1)</sup>, Chieko Kushibiki<sup>2)</sup>, Chihiro Katsukawa<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Emergency and Critical Care Medicine, Kishiwada Tokushukai Hospital

<sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, Kishiwada Tokushukai Hospital

<sup>3)</sup>Osaka Institute of Public Health, Division of Microbiology, Bacteriology Section

*Legionella pneumoniae* is a severe disease and its early diagnosis and treatment are important. A laboratory test widely used for the rapid diagnosis of *Legionella pneumoniae* is Urinary antigen test (UAT), but it is only detectable *Legionella pneumophila* serogroup 1. However, patients with a negative UAT result could be infected by *Legionella pneumoniae* caused by other *Legionella* species and serogroups. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method of sputum collected by endotracheal suction is an efficient, rapid, and accurate test for the detection of many species and serotypes of *Legionella*. From April 2012 to March 2018 (72 months), among the patients that visited the emergency department of our hospital, 667 patients were suspected of having *Legionella pneumoniae*. From April 2012 to March 2015 (first 36 months), only three of 346 patients were found positive using UAT. From April 2015, when LAMP method was introduced, to March 2018 (next 36 months), 12 of 321 patients were found positive; LAMP method detected all the positive cases and UAT detected only four of the 12 cases. The detection rates of *Legionella* species were compared before and after the introduction of LAMP. The detection rate of LAMP method was 3.74%, significantly higher than the detection rate of UAT (0.87%) ( $P=0.0166$ ). Therefore, we conclude that LAMP of sputum collected by endotracheal suction is a useful method for the detection of *Legionella* species and the rapid diagnosis of *Legionella pneumoniae*.