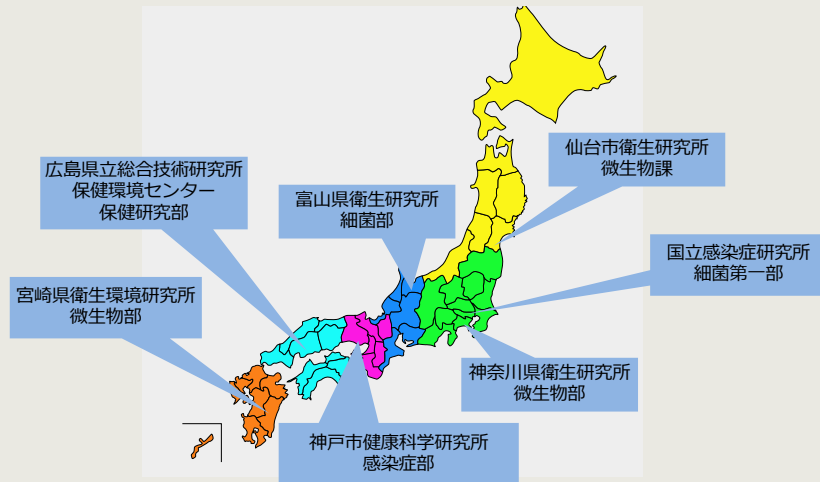


レジオネラ・レファレンスセンター会議



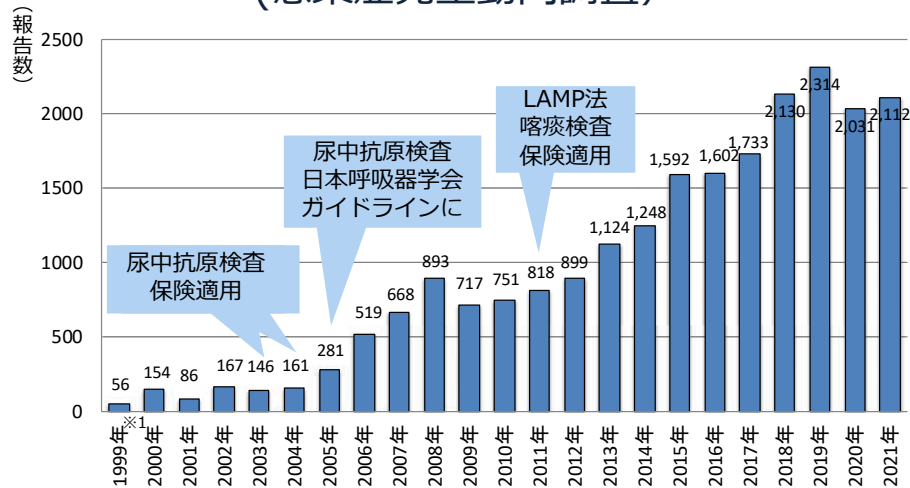
衛生微生物技術協議会第41回研究会
Zoom Meeting 2022.7.8. 16:00-



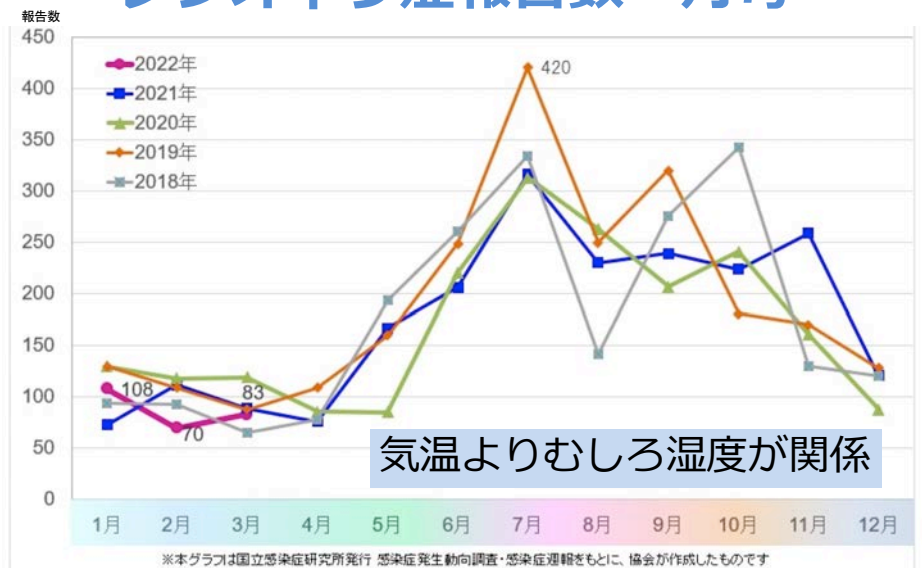
今日の議題

- レジオネラ症発生動向
- 臨床分離株の収集
- 昨年度活動報告
- 今年度活動予定
- 各支部報告

年別レジオネラ症報告数 (感染症発生動向調査)



レジオネラ症報告数・月毎



レジオネラ症の推定感染源・ 感染経路の割合

2011年第1週～2021年第35週
国立感染症研究所 感染症疫学センター

水系感染 5,465例 (32.5%)
 塵埃感染 953例 (5.7%) (重複あり)
 → 多くは不明

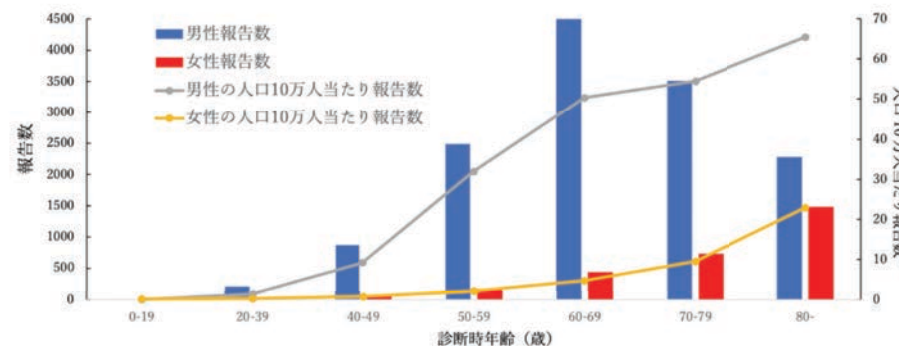
入浴施設での感染疑いは3割程度？

レジオネラ症患者の性別年齢分布

2011年第1週～2021年第35週
国立感染症研究所 感染症疫学センター



16,841例 50歳以上が93%

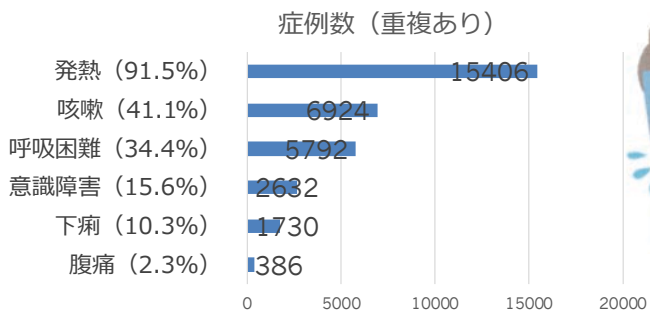


*2015年人口推計値を使用

レジオネラ症患者の症状

2011年第1週～2021年第35週 16,841例

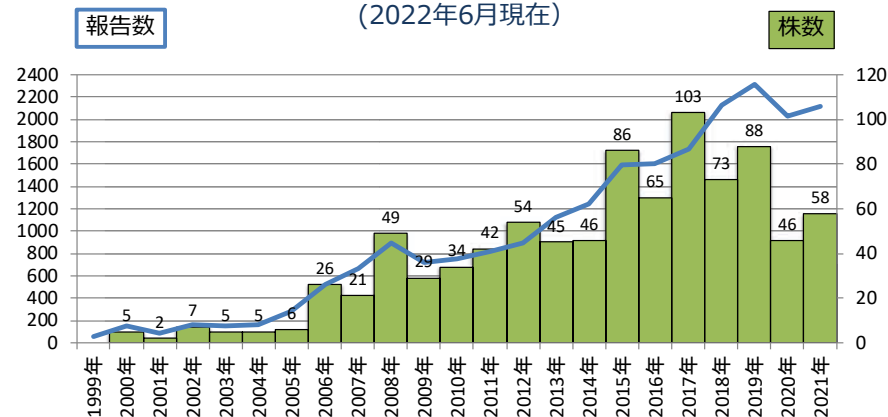
肺炎型 94.8% (15,973例)
 ポンティアック型 4.3% (726例)
 無症状病原体保有者 0.8% (142例)
 届出時多臓器不全 7.9% (1,332例)
 届出時死亡 1.4% (229例)



国立感染症研究所
感染症疫学センター
2021年11月4日現在

分離年別 収集レジオネラ臨床分離株

(2022年6月現在)



レジオネラ・レファレンスセンターにおいて、
2007年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を行っている。

収集臨床分離株の内訳

2022年6月現在

<i>L. pneumophila</i> 886株 (98.4%)		<i>L. anisa</i> 1株 (0.1%)
SG1 795株 (88.3%)	SG9 9株 (1.0%)	<i>L. bozemanai</i> 1株 (0.1%)
SG2 20株 (2.2%)	SG10 5株 (0.6%)	<i>L. dumoffii</i> 1株 (0.1%)
SG3 18株 (2.0%)	SG12 2株 (0.2%)	<i>L. feeleii</i> 2株 (0.2%)
SG4 4株 (0.4%)	SG13 2株 (0.2%)	<i>L. londiniensis</i> 1株 (0.1%)
SG5 13株 (1.4%)	SG14 1株 (0.1%)	<i>L. longbeachae</i> 7株 (0.8%)
SG6 11株 (1.2%)	SG15 1株 (0.1%)	<i>L. rubrilucens</i> 1株 (0.1%)
SG7 2株 (0.2%)		
SG8 2株 (0.2%)	UT* 1株 (0.1%)	
*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 900株 (100%)

SBTによる遺伝子型別結果は個別に報告

2021年度活動

- 市販されていないレジオネラ免疫血清の受注生産品（デンカ）の配布

レジオネラ・ニューモフィラ混合血清 （混合1, 2, 3, 2-15群）

□ングビーチ1群、2群、
フィーレイ1群、2群、アニサ、ジョルダニス
□ンデニエンシス1群、2群、ボゼマニイ2群
セントヘレンシ1群、2群、ハッケリー（1,2群混合）

- レジオネラ属菌検査外部精度管理
70地衛研等が参加

2022年度活動予定

- 市販されていないレジオネラ免疫血清の受注生産品（デンカ）の配布

**Primer-Mix
も可**

レジオネラ・ニューモフィラ混合血清 （混合1, 2, 3, 2-15群）

□ングビーチ1群、2群、
フィーレイ1群、2群、アニサ、ジョルダニス
□ンデニエンシス1群、2群、ボゼマニイ2群
セントヘレンシ1群、2群、ハッケリー（1,2群混合）

- レジオネラ属菌検査外部精度管理

マルチプレックスPCRによる血清型別法

Legionella pneumophila の15血清群を12のグループに分けることができる。

血清群1、血清群2、血清群3/15、血清群4/10、血清群5、血清群6/12、
血清群7、血清群8、血清群9、血清群11、血清群13、血清群14*

*血清群14のプライマーは未発表データ

26本のプライマー

**マルチプレックスPCR用の酵素
が必要**

→（株）ファスマックがPrimer-Mixを製品化

レジオネラレファレンスセンター活動報告

＜北海道・東北・新潟ブロック＞

(1) レジオネラ属菌外部精度管理サーベイについて

令和3年12月に希望する10地研(北海道4・青森県・宮城県・仙台市・福島県・新潟県・新潟市)が参加した。

(2) 班会議等への出席及び血清配布について

令和3年6月・12月にweb開催された、厚生労働科学研究「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」の研究班班会議への出席及びWGへの参加協力を行った。また、厚労科研費にて購入の血清を、ブロック内で希望する11地研あてに配布した。

(3) ブロック内レジオネラ患者発生状況及び感染研あて菌株送付について(表1・表2)

表1 感染症法による届出数(R3年)

	R3年
北海道(札幌市・函館市除く)	27
札幌市	21
函館市	3
青森県	11
秋田県	22
岩手県	16
宮城県(仙台市除く)	41
仙台市	28
山形県	39
福島県	38
新潟県	31
新潟市	17
合計	294

表2 感染研への菌株送付状況(R3年)

No	患者年齢	性別	菌種	血清群	その他
1	82歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
2	83歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
3	63歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
4	56歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
5	71歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
6	67歳	女	<i>L.pneumophila</i>	1	
7	73歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
8	66歳	女	<i>L.pneumophila</i>	1	
9	80歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
10	93歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
11	52歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
12	58歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
13	67歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
14	72歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
15	57歳	男	<i>L.pneumophila</i>	1	
合計 15 株(No.1~14 山形県、No.15 新潟県)					

(4) 各地研における検査状況について(詳細は、表3「R3年度 検査状況」参照)

・特筆すべき事例(北海道)

① R3年(2021年)6~7月の事例:

LAMP法で陽性となり届出された患者の気管支洗浄液から、*Legionella* sp.が検出された。分離株の同定は、遺伝子検査(CycleavePCR Legionella (16S rRNA) Detection Kit)及びレジオネラテックステストで行った。この事例では、発症から届出まで約3週間かかった(6/19発症、6/21初診、7/2届出)。

② R3年(2021年)12月の事例:

同一宿泊施設の大浴場清掃員2名が、レジオネラ症として届出され、そのうち1名の喀痰から *L. pneumophila* 血清群1が分離された。

③ R4年(2022年)1月の事例:

別の疾患で長期入院中の患者1名がレジオネラ症として届出され、同一病棟の入院患者に呼吸器症状を呈している者が多数いたことから、届出患者1名、同一病棟の患者(届出なし)6名の喀痰、病棟

内の環境検体(水、拭き取り)41検体に対して遺伝子検査(CycleavePCR Legionella (16S rRNA) Detection Kit)と培養検査を実施した。その結果、届出患者は遺伝子検査・培養検査ともに陰性、同

病棟の患者(届出なし)1名及び環境検体6検体で遺伝子検査陽性・培養検査陰性、その他の患者(届出なし)5名及び環境検体35検体は遺伝子検査陰性であった。

(5) 質問事項について(岩手県より)

MLVA法について、地衛研での普及の状況と今後の方向性

表3 R3年度 検査状況

	検査数	内訳（陽性検体数／検体数）														検出菌・血清群等	
		浴槽水	シャワー水	ふきとり	上がり湯	冷却塔水	給湯水	修景水	プール	貯水槽	その他	喀痰	咽頭拭い液	気管支洗浄液	血液		菌株
北海道	56	0/4	0/12 シャワー・ カラ水	0/13							0/16 トイレ・洗面 台水	2/10		1/1			喀痰から <i>L.p</i> SG1、気管支洗浄液から <i>Legionella</i> sp.
札幌市	81	12/51	4/13 シャワー・ カラ水						0/1	3/12 貯水槽・ 回収槽	2/4 原水						浴槽水から <i>L.p</i> SG 1,3,5,6,7,15、貯水槽・回収槽から <i>L.p</i> SG 3 シャワー水・カラ水から <i>L.p</i> SG 3,5,6、 <i>L.bozemanii</i> 原水から <i>L.p</i> SG 5、 <i>L.bozemanii</i>
函館市	1	0/1															
青森県	0																
秋田県	73	6/66				0/2											浴槽水から <i>L.p</i> SG 1, 3, 5、 <i>L.londiniensis</i> SG2
岩手県	19	0/9	0/3 シャワー・ カラ水								0/5						喀痰から <i>L.p</i> SG1
宮城県	127	26/110			1/17												浴槽水から <i>L.p</i> SG1,2,3,4,5,6,7,9,12、UT、 <i>L.londiniensis</i> SG1、 <i>L.dumoffii</i> 、 <i>Legionella</i> sp. 上がり用湯から <i>L.p</i> SG6
仙台市	15		0/7			2/5		0/1 噴水			0/2 井戸水・加湿 器						冷却塔水から <i>L.p</i> SG1、 <i>Legionella</i> sp.
山形県	26											13/26					喀痰から <i>L.p</i> SG1
福島県	90	15/90															浴槽水から <i>L.p</i> SG 2, 5, 6, 10, 12
新潟県	16	2/2	1/1				1/9						1/4				浴槽水から <i>L.p</i> SG1,14 シャワー水から <i>L.p</i> 給湯水から <i>L.p</i> UT 喀痰から <i>L.p</i> SG1
新潟市	84	6/42 (シャ ワー水 含む)				3/16		1/17 池水					4/5	0/1		3/3	浴槽水から <i>L.p</i> SG1,5、 <i>L.Dumoffii</i> 、 <i>Legionella</i> sp. 冷却塔水から <i>L.p</i> SG1 修景水から <i>Legionella</i> sp. 喀痰から <i>L.p</i> SG1,5 及び 菌株から <i>L.p</i> SG1,5
合計	588	67/375	5/36	0/13	1/17	5/23	1/9	1/18	0/1	3/17	2/22	21/52	0/0	1/2	0/0	3/3	

R3(2021)年度の関東甲信静支部活動状況

- 外部精度管理事業に22機関が参加
- 25機関にレジオネラ血清等試薬を配布
- 希望機関にSBTデータベースファイルおよびSBT検索ツールを配布

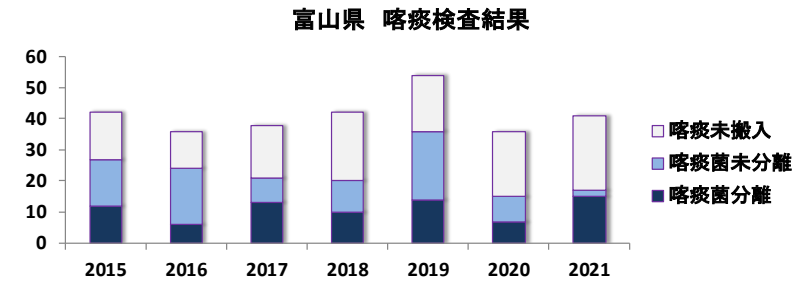
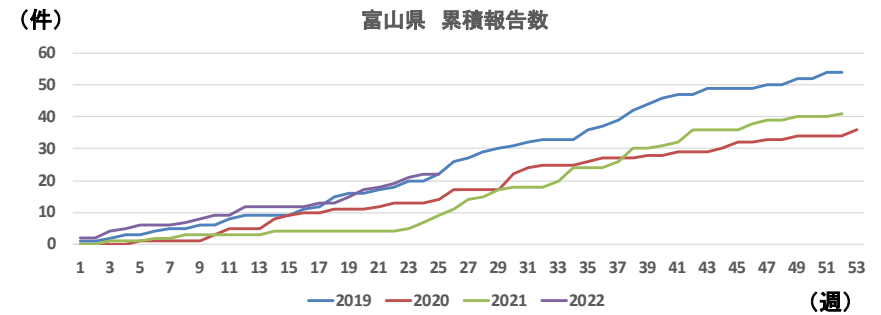
神奈川県における

喀痰検体からのレジオネラ属菌検出状況(2018-2021年度)

	2018	2019	2020	2021
検査検体数	22	33	15	22
検出病原体	件数	件数	件数	件数
<i>Legionella pneumophila</i> 血清群1	7	13	3	8
<i>L.p.</i> 血清群2	0	0	1	0
<i>L.p.</i> 血清群5	0	3	0	1
<i>Legionella sp.</i>	0	3	1	0
<i>L. bozemanae</i>	0	0	1	0
レジオネラ属菌 合計	7 (31.8%)	16 (48.5%)	6 (40.0%)	9 (40.9%)

人口10万人当たり報告数

年	1位	2位	3位	全国平均
2018	岡山	富山	広島	1.67
	4.28	3.87	3.42	
2019	富山	群馬	長野	1.81
	4.97	3.78	3.03	
2020	岡山	富山	栃木	1.61
	4.12	3.32	3.14	
2021	石川	富山	山形	1.66
	3.88	3.78	3.42	
2022 (25週)	富山	長野	岐阜	0.60
	2.03	1.21	1.15	



感染研への菌株送付(富山県)

2021年 16株

*L. pneumophila*血清群 1 15株

*L. pneumophila*血清群 6 1株 (ST1992)

No.	地域	Year	Month	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	ST	Group
1	W	2021	Mar	6	10	19	3	19	4	6	502	B1
2	E	2021	Feb	2	3	5	11	2	1	6	120	S1
3	W	2021	Jun	7	6	17	3	11	11	9	505	B2
4	W	2021	Jun	6	10	19	3	19	4	6	502	B1
5	E	2021	Jul	2	3	6	15	51	1	6	876	S1
6	E	2021	Jul	2	3	6	11	2	1	6	1621	S1
7	W	2021	Jul	2	3	9	10	2	1	10	384	S1
8	W	2021	Jul	2	3	9	10	2	1	6	23	S1
9	W	2021	Aug	6	10	19	3	19	4	6	502	B1
10	W	2021	Aug	2	3	5	11	2	1	6	120	S1
11	E	2021	Sep	7	10	17	10	13	4	11	1798	B2
12	E	2021	Oct	4	10	11	15	29	1	6	89	S1
13	E	2021	Oct	2	3	9	13	56	5	6	905	S1
14	W	2021	Oct	6	10	19	3	19	4	6	502	B1
15	E	2021	Dec	7	6	17	10	13	11	6	1273	B2

近畿ブロックの活動報告

- レジオネラ外部精度管理のとりまとめ
近畿ブロックから10機関が参加
(尼崎市、東大阪市、和歌山県、姫路市、滋賀県、奈良県、大塚研天王寺C、京都府、堺市、神戸市)
- レジオネラ混合血清を10機関に配布
- SBT検索ツール（神奈川県衛生研究所作成）の配布
大阪、京都府、奈良県、姫路市
- MLVAについて

機関名	参加	配布	検索	その他
神戸市	○	○	○	○
東大阪市	○	○	○	○
和歌山県	○	○	○	○
姫路市	○	○	○	○
滋賀県	○	○	○	○
奈良県	○	○	○	○
大塚研天王寺C	○	○	○	○
京都府	○	○	○	○
堺市	○	○	○	○
尼崎市	○	○	○	○

4. MLVAについて

- MLVAタイピングはSBTと同等の識別能を示した。
- MLVAタイピングは、PFGEおよびSBTのタイピングと概ね相関した。
- 集団事例の際にMLVAの特性が活かせる。

厚労研「公衆浴場の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」H28-H30 分担研究

↓

病原体検出マニュアル レジオネラ症令和2年9月1日改訂

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

MLVA 法は、細菌ゲノム中に存在する複数の反復塩基配列 (VNTR) 数が株により異なることを利用し、遺伝子型別を行う方法である。L. pneumophila においては、12 領域の VNTR (Lpms01, Lpms03, Lpms13, Lpms19, Lpms31, Lpms33, Lpms34, Lpms35, Lpms38, Lpms39, Lpms40, Lpms44) について設計した蛍光プライマーを用いて PCR を行い、ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems) およびフラグメント解析ソフトウェアにより、そのリピート数を解析する方法が報告されている⁷⁰⁾。

MLVA 法は、SBT 法や PFGE 法に比べ、簡便で迅速に多数の検体を型別することができる利点がある。また、MLVA 法による型別は、ST や PFGE 型とも概ね相関していることが明らかとなっている⁷¹⁾。MLVA 法は、感染源の特定のための菌株の迅速なスクリーニングとして活用し、主要な菌株に関しては SBT 法による ST を決定することが望ましい。

MLVAの位置づけ

- 集団事例での感染源特定のためのスクリーニング
- 衛生管理 定着 or 新規株 ? の評価
- 株のセレクション

MLVA

↓

SBT

Gold standard

↓

データベースとの照合

全ゲノム解析

MLVA-12orsay

2011 AEM

High-Throughput Typing Method To Identify a Non-Outbreak-Involved *Legionella pneumophila* Strain Colonizing the Entire Water Supply System in the Town of Rennes, France⁶⁷

D. Sobral,^{1,2,3} P. Le Cann,⁴ A. Gerard,⁵ S. Jarraud,^{3,6,7} B. Lebeau,⁸ F. Loisy-Hamon,⁹ G. Vergnaud,^{1,2,8} and C. Pouchou^{1,2,4}

PCR sets in Kobe institute of Health

A	B	C
Lpms01-NED (45bp)	Lpms03-VIC (96bp)	Lpms38-NED (8bp)
Lpms31-FAM (45bp)	Lpms13-NED (24bp)	Lpms39-PET (6bp)
Lpms33-VIC (125bp)	Lpms19-PET (21bp)	Lpms40-FAM (6bp)
Lpms35-PET (18bp)	Lpms34-FAM (125bp)	Lpms44-VIC (6bp)

LIZ1200 LIZ1200 LIZ600

Kobe Protocol in MLVA typing

(1) PCR QIAGEN Multiplex PCR kit

	A	B	C
2XQiagen multiple PCR master mix	5.00	5.00	5.00
Primer mix 1(5pmol/ul) Lpms31(A) / Lpms13(B) / Lpms38(C)	1.00	1.00	0.40
Primer mix 2(5pmol/ul) Lpms01(A) / Lpms03(B) / Lpms39(C)	1.00	1.00	0.40
Primer mix 3(5pmol/ul) Lpms35(A) / Lpms34(B) / Lpms40(C)	0.25	0.25	0.40
Primer mix 4(5pmol/ul) Lpms33(A) / Lpms19(B) / Lpms44(C)	0.25	0.25	0.40
Template	1.00	1.00	1.00
water	1.00	1.00	2.40
Total w/o Template	9.00	9.00	9.00
	10.00	10.00	10.00

95°C, 15min -> 94°C 30sec, 60°C 1min, 72°C 1min10sec 35 cycles -> 72°C 10min -> 10°C hold

(2) Sequencer

PCR 産物を50倍希釈した溶液1ulを使用する。

↓

Formamide 10ul+ LIZ1200 or LIZ 600 0.25ulを加える。

↓

98°C3min

↓

氷上 1min

↓

Fragment解析 (GeneMapper)

#positive control : philadelphia -1 DNA

神戸Legi-MLVAプロトコルの提供しています。

静岡県環境衛生科学研究所
長崎県環境保健研究センター
神奈川県衛生研究所
川崎市健康安全研究所
北海道立衛生研究所

MLVAを試してみたい地研はご連絡下さい。

noriko_nakanishi@office.city.kobe.lg.jp

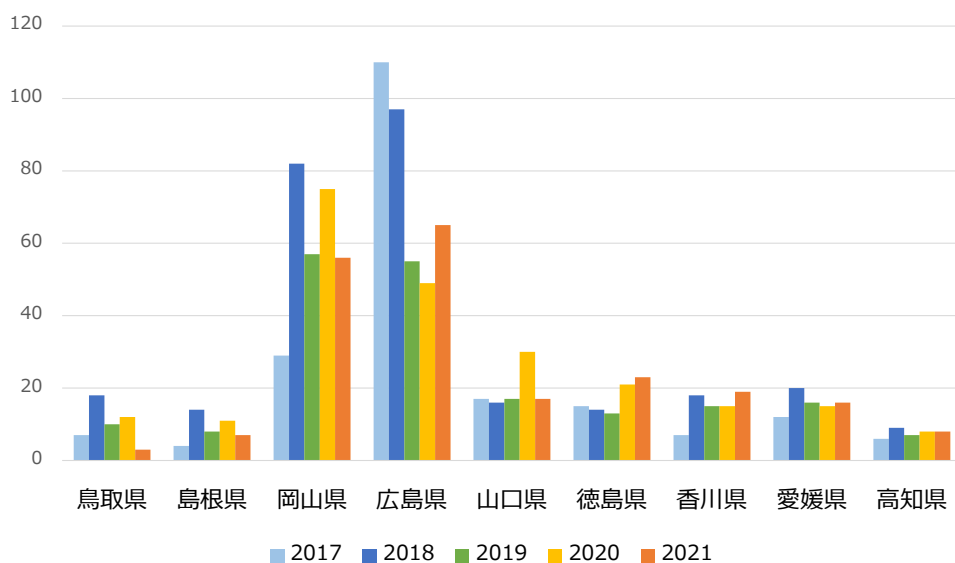
中四国支部報告

広島県立総合技術研究所保健環境センター
平塚 貴大

令和3年度レファレンスセンター活動内容

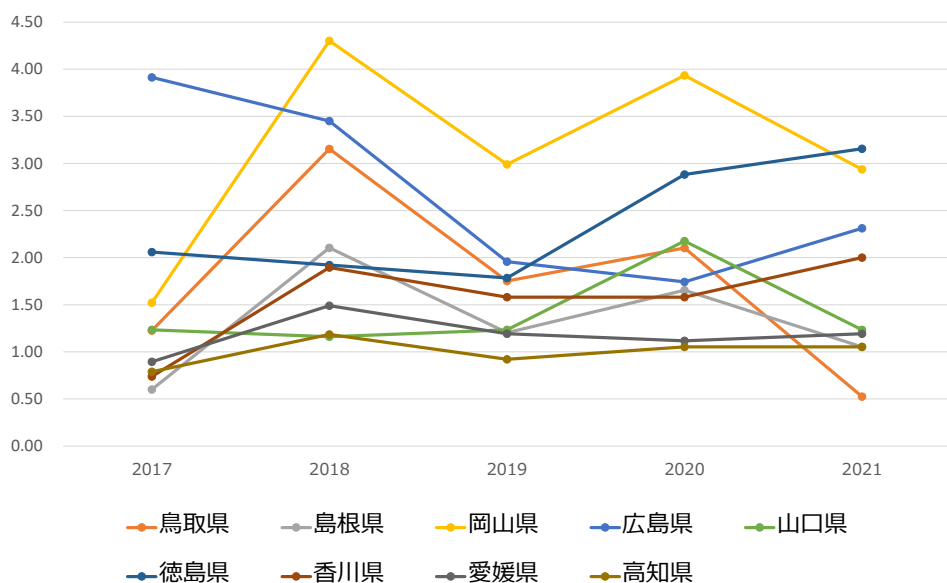
- 「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」班会議への参加 (Web開催)
- 中四国支部の外部精度管理参加募集
- レジオネラ免疫血清 ニューモフィラ混合1～3の配布
- 新規検査法についての周知

中四国地方のレジオネラ症届出数 (実数)



2021年報告数		
	報告数	全国順位
鳥取県	3	47
島根県	7	46
岡山県	56	15
広島県	65	12
山口県	17	33
徳島県	23	28
香川県	19	32
愛媛県	16	36
高知県	8	45

中四国地方のレジオネラ症届出数 (10万人対)



2021年報告数(10万人対)		
	報告数	全国順位
鳥取県	0.53	47
島根県	1.05	43
岡山県	2.94	8
広島県	2.31	14
山口県	1.23	34
徳島県	3.16	5
香川県	2.00	18
愛媛県	1.19	37
高知県	1.05	41

全国平均 **1.67**

届出数まとめ

- 多くの県で例年と同数から減少傾向
- 広島県, 徳島県が増加傾向
- 10万人当たりの報告数では4県が全国平均以上

九州ブロック レジオネラレファレンスセンター報告

宮崎県衛生環境研究所

2022. 6. 30

1. 九州ブロックにおけるレジオネラ患者発生状況(年)

	2017	2018	2019	2020	2021
福岡県	46	55	79	56	60
佐賀県	3	10	9	2	9
長崎県	13	18	28	21	17
熊本県	24	29	46	45	44
大分県	17	18	14	14	14
宮崎県	9	7	8	9	13
鹿児島県	7	8	17	16	13
沖縄県	21	22	30	22	21
九州計	140	167	231	185	191
全国	1731	2142	2316	2058	2131

2. 令和3年度の活動状況

○レジオネラ属菌外部精度管理調査への参加協力依頼（九州ブロック：10地研の参加）

令和2年度は枠が埋まらなかったが、昨年度は参加希望が多く、すぐに埋まった。

○免疫血清の配布

本県を除く6地衛研へ配布した。