

多摩地域における浴槽水及びプール水からのレジオネラ属菌検出状況（平成19～20年度）と

Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)法の応用

楠 くみ子, 石上 武, 山本 宣和, 栗田 雅行

**Detection Frequencies of *Legionella* Species in Bath Waters and Swimming Pool Waters of the Facilities
Approved in the Tama Area, Tokyo (Apr. 2007 - Mar. 2009), and the Detection Properties of the LAMP Method**

Kumiko KUSUNOKI, Takeshi ISIKAMI, Nobukazu YAMAMOTO and Masayuki KURITA

[正誤表 Errata]

東京健安研七年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **60**, 265-272, 2009

多摩地域における浴槽水及びプール水からのレジオネラ属菌検出状況（平成19～20年度）と

Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)法の応用

**Detection Frequencies of *Legionella* Species in Bath Waters and Swimming Pool Waters of the Facilities
Approved in the Tama Area, Tokyo (Apr. 2007 - Mar. 2009), and the Detection Properties of the LAMP Method**

268ページ 表4. プール水, ジャグジー水の遊離残留塩素濃度別レジオネラ属菌検出状況（平成19～20年度）

種類	年度	塩素濃度 (mg/L)	試料数 (%)	陽性数 (%)	検出菌数 (CFU/100 mL)			
					1～9	10～99	100～999	1000～
プール水	20							
[誤 Error]		<0.4	14 (5.7)		2	1		
[正 Correct]		<0.4	14 (5.7)		2			

多摩地域における浴槽水及びプール水からのレジオネラ属菌検出状況（平成19～20年度）と

Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)法の応用

楠くみ子*, 石上武*, 山本宣和**, 栗田雅行*

平成19～20年度に、多摩地域に所在する施設の浴槽水1,737件とプール水659件のレジオネラ属菌検出状況を調査した。基準値（10 CFU/100 mL未満）を超えていた浴槽水は19年度6.8%、20年度5.5%、プール水は1.2%、0.8%、ジャグジー水は9.2%、11.9%であった。一方、基準値は満たしていたものの両年度で浴槽水の10.1%、プール水の5.1%、ジャグジー水の22.8%からもレジオネラ属菌を検出した。また、冷凍保存試料552件の検査結果では、培養法で基準値以上であった94件中、84件はLAMP法でも陽性で培養法と一致したが、10件は陰性で反応阻害物質の関与が示唆された。培養法で検出限界値未満の347件中、122件がLAMP法では陽性でレジオネラ属菌の遺伝子を検出したことから、LAMP法は確実なレジオネラ感染防止対策の指標として有用であると考えられた。

キーワード：レジオネラ属菌，公衆浴場，浴槽水，プール水，遊離残留塩素，血清群，LAMP法

はじめに

多くの水環境施設（人工環境水）がレジオネラ症感染源として報告されている。我が国では入浴施設が感染源の85%を占めており、全国でたびたび事故が発生し、大規模な集団感染も起きている¹⁾。

東京都は、入浴施設が関与するレジオネラ症防止対策として、「公衆浴場の設置場所の配置及び衛生措置等に関する条例」、「旅館業法施行条例」を一部改正（平成15年4月1日施行）した^{2,3)}。また、水泳プールに対してもプール水のレジオネラ属菌汚染防止を目的として、「プール等取締条例」を改正し、平成16年4月1日施行した⁴⁾。これら条例の施行により、都における営業施設のレジオネラ症発生防止対策を強化している。

著者らは、これらの対策の有効性を検証する目的で、多摩地域に所在する施設におけるレジオネラ属菌の生息状況調査を行ったので、その概要を報告する。

なお、レジオネラ迅速検査法として開発された Loop-mediated isothermal amplification（以下 LAMP と略）法⁵⁾を用いて、冷凍保存していた濃縮試料の検査を試みたので、通常使用する培養法との比較結果も併せて報告する。

実験方法

1. 平成19～20年度のレジオネラ属菌検出状況

1) 供試水

調査対象は、平成19年4月～21年3月に採水された多摩地域に所在する施設の浴槽水1,737件とプール水659件である。

(1) 浴槽水 「普通公衆浴場」、個室浴場（いわゆるソーブランド）を除く「その他の公衆浴場」及び「旅館業」のうち、ろ過器等により浴槽水を循環利用している施設を調

査対象とした。「普通公衆浴場」及び「その他の公衆浴場」の定義については前々報⁶⁾に記載した。

(2) プール水 許可プールのうちの加温装置を使用しているプールを対象として各年度7月と2月に採水した。

なお、浴槽水とプール水の遊離残留塩素濃度（以下、塩素濃度と略）、水温は採水現場で保健所環境衛生監視員により測定された。

2) 培養法によるレジオネラ属菌の検査方法

レジオネラ属菌の検出は、レジオネラ症防止指針第2版⁷⁾に従い、試料水1,000 mLを、ろ過濃縮法で5 mLに濃縮した。この濃縮液に0.2 M HCl-KCl 溶液（pH2.2）を等量添加し60秒間攪拌し、室温で5分間作用させて酸処理をした。この処理液をレジオネラ属菌の選択分離培地である WYOα 寒天平板（栄研化学）と GVPCα 寒天平板（日研生物医学研究所）各2枚に0.25 mLずつ、計1 mL塗抹した。培養及び同定方法は前々報⁶⁾と同様であるが、さらに必要に応じて16S rRNA 遺伝子を標的としたPCR法⁸⁾及びDDHレジオネラ（極東製薬工業）によるDNA-DNAハイブリダイゼーション（以下DDHと略）法も用いた。

本法による最少検出菌数は1 CFU/100 mLとなる。

2. LAMP法によるレジオネラ属菌の検出

1) 供試水及び試験溶液の調製

平成16年度から18年度に、レジオネラ属菌の検査のために採水された多摩地域の浴槽水及びプール水1,000 mLを上記のように濃縮して5 mLとし、濃縮液3 mLを用いて培養法を行った。残りの濃縮液をマイクロチューブに1 mLずつ分注して-20℃で保存しておいたものをLAMP法の試験溶液として用い、浴槽水339件、プール水121件及びジャグジー

* 東京都健康安全研究センター環境保健部環境衛生研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

表1. 浴槽水からのレジオネラ属菌の検出状況 (平成19~20年度)

年度	施設の 種類	試料数	陽性数* ⁴ (%)	10 CFU/100 mL 未満検出数 (%)	最高検出菌数 (CFU/100 mL)
19	普通* ¹	185	5 (2.7)	15 (8.1)	1.0×10 ³
	その他* ²	563	33 (5.9)	53 (9.4)	4.0×10 ³
	旅館* ³	102	20 (19.6)	16 (15.7)	1.0×10 ⁴
	小計	850	58 (6.8)	84 (9.9)	
20	普通	172	6 (3.5)	12 (7.0)	8.4×10
	その他	586	23 (3.9)	63 (10.8)	3.5×10 ³
	旅館	129	20 (15.5)	16 (12.4)	2.1×10 ³
	小計	887	49 (5.5)	91 (10.3)	
計		1737	107 (14.5)	175 (10.1)	

*1: 普通公衆浴場浴槽水 *2: その他の公衆浴場浴槽水 *3: 旅館業浴槽水

*4: レジオネラ属菌 10 CFU/100 mL以上

水92件の計552件について、培養法の結果と比較した。

2) LAMP法の操作

使用キットとしてLoopampレジオネラ検出試薬キットE (栄研化学) を用い、キット添付文書に従い測定を行った。増幅反応および判定にはLoopampリアルタイム濁度測定装置 (LA-320C, 栄研化学) を用いた。

結果及び考察

1. 浴槽水からのレジオネラ属菌の検出状況

1) レジオネラ属菌の検出状況

浴槽水からのレジオネラ属菌の検出状況を表1に示した。厚生労働省は「公衆浴場における水質基準に関する指針」⁹⁾のなかでレジオネラ属菌のガイドライン値として浴槽水100 mLについて10 CFU未満という値を示した。都はこれを受けて都条例^{2,3)}で「検出されないこと」、すなわち、「10 CFU/100 mL未満」を浴槽水の基準値としている。レジオネラ属菌の検出状況を浴槽水の水質基準値 (10 CFU/100 mL未満) に照らしてみると、19年度の陽性率は6.8% (58/850)、20年度は5.5% (49/887)であった。種類別の陽性率をみると普通公衆浴場浴槽水 (以下「普通」と略) は19年度2.7% (5/185)、20年度3.5% (6/172)であり、その他の公衆浴場浴槽水 (以下「その他」と略) は同じく5.9% (33/563)、3.9% (23/586)、また旅館業浴槽水 (以下「旅館」と略) は19.6% (20/102)、15.5% (20/129)であった。

図1に13年度から20年度まで年度別の陽性率を示した。レジオネラ属菌の陽性率は、平成13年12月に板橋区の銭湯で発生した薬湯槽に生息していたレジオネラ属菌による肺炎死亡事例¹⁰⁾を受けて著者らが緊急調査した結果⁶⁾ (平成13年度) に比較すると、条例改正後の平成15年度では各浴槽共に大きく低下していた。しかし、16年度は陽性率がやや高くなった。17年度はそれぞれ前年度に比し「普通」は上

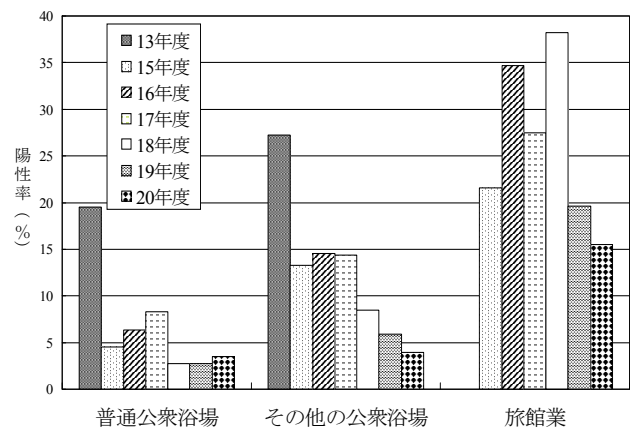


図1. 浴槽水からのレジオネラ属菌の年度別陽性率(平成13~20年度)

(旅館業については平成15年度から検査実施)

昇、「その他」は横ばい、「旅館」は低下という結果に、18年度は「普通」「その他」では大きく低下したものの「旅館」はまた上昇するという結果で、特に「旅館」においては改善があまり進んでおらず、対応の難しさがうかがえた。

東京都では平成18年6月から検出菌数に応じて監視員による指導基準が明確化され、指導が強化された。これを受けて、19、20年度はレジオネラ属菌の陽性率が低下した。公衆浴場のレジオネラ属菌対策は経年的に進展していると考えられる。

一方、基準値は満たしていたものの、レジオネラ属菌が10 CFU/100 mL未満の範囲で検出された浴槽水が19年度は9.9% (84/850)、20年度は10.3% (91/887)あった。種類別に検出率をみると、「普通」は19年度8.1% (15/185)、20年度7.0% (12/172)、「その他」は同じく9.4% (53/563)と10.8% (63/586)であり、「旅館」は15.7% (16/102)と12.4% (16/129)であった。このことは管理を怠ると基準値以上にレジオネラ属菌の増殖が起こり、レジオネラ症の発生につながる危険性があることを意味していると考えられる。

表2. 浴槽水の遊離残留塩素濃度別レジオネラ属菌検出状況 (平成19~20年度)

施設の 種類 ^{*1}	年度	塩素濃度 (mg/L)	試料数		陽性数 ^{*2}		検出菌数 (CFU/100 mL)				
			(%)	(%)	(%)	(%)	1~9	10~99	100~999	1000~	
普通	19	≥1.0	142	(76.8)	0	(0.0)	8				
		≥0.4~<1.0	19	(10.3)	0	(0.0)	2				
		<0.4	21	(11.4)	3	(14.3)	5	2	1		
		不明	3	(1.6)	2	(66.7)			1	1	
	計		185	(100.0)	5	(2.7)	15	2	2		1
	20	≥1.0	129	(75.0)	0	(0.0)	5				
		≥0.4~<1.0	19	(11.0)	1	(5.3)	2	1			
		<0.4	24	(14.0)	5	(20.8)	5	5			
		不明	0	(0.0)	0	(0.0)					
	計		172	(100.0)	6	(3.5)	12	6			
その他	19	≥1.0	284	(50.4)	5	(1.8)	27	3	2		
		≥0.4~<1.0	181	(32.1)	12	(6.6)	16	11	1		
		<0.4	94	(16.7)	16	(17.0)	9	10	3	3	
		不明	4	(0.7)	0	(0.0)					
	計		563	(100.0)	33	(5.9)	53	24	6		3
	20	≥1.0	311	(52.3)	6	(1.9)	16	4	2		
		≥0.4~<1.0	181	(32.6)	8	(4.4)	29	6	2		
		<0.4	83	(15.1)	8	(9.6)	17	5			3
		不明	11	(1.9)	1	(9.1)	1	1			
	計		586	(100.0)	23	(3.9)	63	16	4		3
旅館	19	≥1.0	54	(52.9)	5	(9.3)	5	5			
		≥0.4~<1.0	19	(18.6)	3	(15.3)	2	1	2		
		<0.4	29	(28.4)	12	(41.4)	9	7	3	2	
		不明	0	(0.0)	0	(0.0)					
	計		102	(100.0)	20	(19.6)	16	13	5		2
	20	≥1.0	73	(56.6)	3	(4.1)	7	3			
		≥0.4~<1.0	31	(24.0)	5	(16.1)	4	4	1		
		<0.4	25	(19.4)	12	(48.0)	5	5	4	3	
		不明	0	(0.0)	0	(0.0)					
	計		129	(100.0)	20	(15.5)	16	12	5		3

*1: 表1に同じ

*2: レジオネラ属菌10 CFU/100 mL以上

*3: 各施設の総試料数に対する割合

*4: 陽性率 (その塩素濃度の浴槽水に対する割合)

2) 塩素濃度との関連

都条例では浴槽水の塩素濃度について0.4 mg/L以上に保つこととし^{2,3)}, 運用で1.0 mg/Lを超えないことが望ましいとしている。浴槽水の塩素濃度別レジオネラ属菌検出状況を表2に示した。種類別にみた浴槽水の塩素濃度をみると、基準値の0.4 mg/L以上の浴槽水が、「普通」では19年度87.0% (161/185), 20年度86.0% (148/172), 「その他」では19年度82.6% (465/563), 20年度84.0% (492/586)であり, 「旅館」も19年度71.6% (73/102), 20年度80.6% (104/129)であった。前報¹⁾に比べて塩素濃度の高い施設が増加しており, 特に「旅館」は10~20%増加していた。

しかし, 分離菌株による実験ではレジオネラ属菌は塩素濃度0.4 mg/L以上あれば死滅することが報告されている¹²⁾にも関わらず, 実際の施設においては前報¹⁾と同様に0.4 mg/L以上の浴槽水からも検出された。浴槽水の塩素濃度とレジオネラ属菌の検出状況をみると, 10 CFU/100 mL以上のレジオネラ属菌が検出されたのは, 塩素濃度0.4 mg/L以

上の浴槽水で「普通」は19年度0%, 20年度0.7% (1/148), 「その他」は同じく3.7% (17/465), 2.8% (14/492), 「旅館」は11.0% (8/73), 7.7% (8/104)であった。塩素濃度が0.4 mg/L未満の浴槽水では「普通」は19年度14.3% (3/21), 20年度20.8% (5/24), 「その他」は17.0% (16/94), 9.6% (8/83), 「旅館」は41.4% (12/29), 48.0% (12/25)であった。また塩素濃度が0.4 mg/L未満の浴槽水はレジオネラ属菌の菌数も多く1.0×10⁴ CFU/100 mLを最高に1,000 CFU/100 mL以上の浴槽水が11件もあり, 100 CFU/100 mL以上検出された全浴槽水のうちの64.7% (22/34)を占めていた。以上のことから塩素濃度を高く保持することにより浴槽水を管理することは有効な手段であるといえるが, KMnO₄消費量で示される有機物濃度や濁質量等, 他の水質条件の影響も考慮する必要があると考えられる。検出された菌が残留塩素耐性菌かどうか荒川らの行った方法¹³⁾等により検討する必要がある。

表3. プール水, ジャグジー水からのレジオネラ属菌の検出状況 (平成19~20年度)

年度	種類	試料数	陽性数* ¹ (%)	10 CFU/100 mL 未満検出数 (%)	最高検出菌数 (CFU/100 mL)
19	プール水	243	3 (1.2)	11 (4.5)	9.4×10
	ジャグジー水	87	8 (9.2)	11 (12.6)	5.0×10 ⁵
	小計	330	11 (3.3)	22 (6.7)	
20	プール水	245	2 (0.8)	14 (5.7)	3.5×10
	ジャグジー水	84	10 (11.9)	28 (33.3)	3.1×10 ²
	小計	329	12 (3.6)	42 (12.8)	
計		659	23 (3.5)	64 (9.7)	

*1: レジオネラ属菌 10 CFU/100 mL以上

表4. プール水, ジャグジー水の遊離残留塩素濃度別レジオネラ属菌検出状況 (平成19~20年度)

種類	年度	塩素濃度 (mg/L)	試料数 (%)	陽性数* ¹ (%)	検出菌数(CFU/100 mL)			
					1~9	10~99	100~999	1000~
プール水	19	≥1.0	91 (37.4) * ²		4			
		≥0.4~<1.0	138 (56.8) * ³	2 (1.4)	6	2		
		<0.4	13 (5.3)	1 (7.7)	1	1		
		不明	1 (0.4)					
		計	243 (100.0)	3 (1.2)	11	3		
	20	≥1.0	85 (34.7)		5			
		≥0.4~<1.0	145 (59.2)	2 (1.3)	7	2		
		<0.4	14 (5.7)		2	1		
		不明	1 (0.4)					
		計	245 (100.0)	2 (0.8)	14	2		
ジャグジー水	19	≥1.0	56 (64.4) * ²	2 (3.6) * ³	5	1	1	
		≥0.4~<1.0	26 (29.9)	4 (15.4)	5	4		
		<0.4	5 (5.7)	2 (40.0)	1	1		1
		不明						
		計	87 (100.0)	8 (9.2)	11	6	1	1
	20	≥1.0	39 (46.4)	2 (5.1)	15	2		
		≥0.4~<1.0	41 (48.8)	8 (19.5)	11	5	3	
		<0.4	4 (4.8)		2			
		不明						
		計	84 (100.0)	10 (11.9)	28	7	3	

*1: レジオネラ属菌 10 CFU/100 mL以上

*2: 各施設の総試料数に対する割合

*3: 陽性率 (その塩素濃度の試料水に対する割合)

2. プール水からのレジオネラ属菌の検出状況

1) レジオネラ属菌の検出状況

プール水及びジャグジー水からのレジオネラ属菌の検出状況を表3に示した。プール水からのレジオネラ属菌の陽性率は19年度1.2% (3/243), 20年度は0.8% (2/245)であった。しかし, ジャグジー水は19年度9.2% (8/87), 20年度は11.9% (10/84)が基準値を超えていた。ジャグジー水は水温が高く, レジオネラ属菌の発育至適温度である35°C以上のものが92.4%を占めていたことがレジオネラ属菌の陽性率が高かった一因と推察された。

図2に15年度から20年度まで年度別の陽性率を示した。プール水のレジオネラ属菌は, 例年低率ながら検出されているが, ジャグジー水の陽性率は平成16年の条例改正後徐々に低下していた。特に18年6月からの東京都による指導強化後の19年度は大きく低下した。しかし, 20年度はまた陽性率が高くなった。

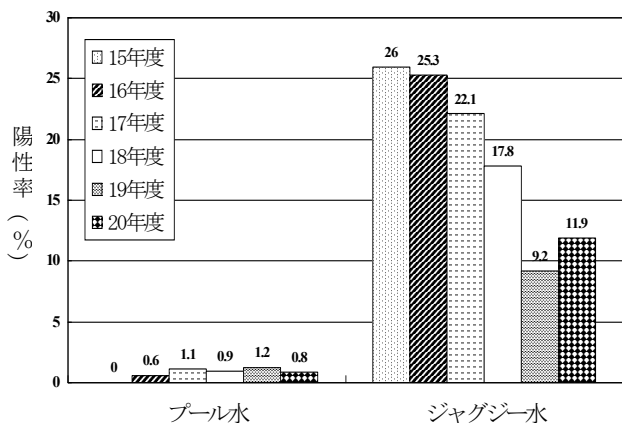


図2. プール水, ジャグジー水からのレジオネラ属菌年度別陽性率 (平成15~20年度)

表5. 浴槽水及びプール水から分離されたレジオネラ属菌の菌種及び血清群
(平成19~20年度)

菌種及び血清群	各施設における分離菌株数 (%)				
	普通*1	その他*1	旅館*1	プール	ジャグジー
<i>L.pneumophila</i> 1群	11 (22.4)	66 (26.1)	16 (11.7)	15 (41.7)	37 (49.3)
<i>L.pneumophila</i> 2群		4 (1.6)	3 (2.2)		
<i>L.pneumophila</i> 3群	2 (4.1)	31 (12.2)	23 (16.8)	1 (2.8)	7 (9.3)
<i>L.pneumophila</i> 4群		4 (1.6)	1 (0.7)		
<i>L.pneumophila</i> 5群	9 (18.4)	30 (11.8)	29 (21.2)	3 (8.3)	5 (6.7)
<i>L.pneumophila</i> 6群	16 (32.9)	76 (29.9)	38 (27.7)	5 (13.9)	13 (17.3)
<i>L.pneumophila</i> 7群		1 (0.4)		4 (11.1)	2 (2.7)
<i>L.pneumophila</i> 8群		6 (2.4)	2 (1.5)		4 (5.3)
<i>L.pneumophila</i> 9群	1 (2.0)	5 (2.0)		3 (8.3)	2 (2.7)
<i>L.pneumophila</i> 10群		8 (3.1)			
<i>L.pneumophila</i> 12群		1 (0.4)	2 (1.5)		
<i>L.pneumophila</i> 14群	2 (4.1)	3 (1.1)			
<i>L.pneumophila</i> 2-14群	5 (10.2)	10 (3.9)	14 (10.2)		1 (1.3)
<i>L.bozemanii</i>		1 (0.4)			
<i>L.micdadei</i>		5 (2.0)	4 (2.9)		
<i>L.dumoffii</i>		1 (0.4)			
<i>L.oakridgensis</i>	1 (2.0)		1 (0.7)		
<i>L.sainthelensi</i>	2 (4.1)			1 (2.8)	
<i>L.rubrilucens</i>			2 (1.5)		
<i>L.maceachernii</i>		1 (0.4)		2 (5.6)	
<i>L.anisa</i>				2 (5.6)	4 (5.3)
<i>L.sp.</i>		1 (0.4)	2 (1.5)		
計	49 (100)	254 (100)	137 (100)	36 (100)	75 (100)

*1:表1に同じ

両年度で、レジオネラ属菌が 10 CFU/100 mL 未満検出された試料水はプール水で 5.1% (25/488) , ジャグジー水で 22.8% (39/171) だった。この結果から浴槽水の場合と同様に、プールの衛生管理を怠るとレジオネラ属菌が増殖し、基準値を超えるプールが増加することが危惧される。

2) 塩素濃度との関連

プール水の塩素濃度別レジオネラ属菌検出状況を表4に示した。塩素濃度が 1.0 mg/L 以上のプール水は 19 年度 37.4% (91/243) , 20 年度 34.7% (85/245) , ジャグジー水は 19 年度 64.4% (56/87) , 20 年度 46.4% (39/84) であった。塩素濃度 0.4 mg/L 以上 1.0 mg/L 未満のプール水は 19 年度 56.8% (138/243) , 20 年度 59.2% (145/245) , ジャグジー水は 19 年度 29.9% (26/87) , 20 年度 48.8% (41/84) であり、0.4 mg/L 未満のプール水は 19 年度 5.3% (13/243) , 20 年度 5.7% (14/245) , ジャグジー水は 19 年度 5.7% (5/87) , 20 年度 4.8% (4/84) であった。塩素濃度を 0.4 mg/L 以上保持している試料水の割合をみると浴槽水が 71.6~87.0%であったのに比し、プール、ジャグジー水は 93.9~95.2%と高かった。特にジャグジー水は前報¹¹⁾より高く保持されていた。塩素濃度が 0.4 mg/L 以上に高く保持されていたにも関わらずレジオネラ属菌が 10 CFU/100 mL 以上

検出された試料水が両年度で、621 件中 20 件 (3.2%) だった。

3. 分離されたレジオネラ属菌の菌種及び血清群

両年度で 1 CFU/100 mL 以上検出した浴槽水 282 件、プール水 30 件及びジャグジー水 57 件から 551 株のレジオネラ属菌が分離された。菌種別に、*Legionella pneumophila* についてはさらに血清群別にまとめて表5に示した。表中の *L. dumoffii* から下は DDH 法により同定されたものである。浴槽水 282 件から分離された 440 株は *L. pneumophila* が 419 株 (95.2%) で、*L. micdadei* 9 株、*L. bozemanii* 1 株、*L. dumoffii* 1 株、その他のレジオネラ属菌 10 株であった。プール水 30 件及びジャグジー水 57 件から分離された 111 株は *L. pneumophila* が 102 株 (91.9%) であった。全てが *L. pneumophila* であった前報¹¹⁾と異なって、*L. anisa* 6 株と他 2 菌種 3 株も分離された。浴槽水は「普通」「その他」「旅館」とも *L. pneumophila* 6 群が最も多く、次いで「普通」「その他」は *L. pneumophila* 1 群が、「旅館」は 5 群、3 群の順に多かった。プール水、ジャグジー水は *L. pneumophila* 1 群が特に多く、それぞれ 41.7% (15/36) , 49.3% (37/75) を占めていた。この傾向は前回の調査¹¹⁾と同様であった。1 試料水について 1 菌種のみ、または

L. pneumophila の単一血清群のみが検出されたのは、浴槽水 61.7% (174/282) , プール, ジャグジー水 78.2% (68/87) であり, 2 菌種または 2 種類の血清群が検出されたのは、浴槽水 27.7% (78/282) , プール, ジャグジー水 17.2% (15/87) , 3 菌種または 3 種類以上の血清群が検出されたのは浴槽水 10.6% (30/282) , プール, ジャグジー水 4.6% (4/87) であった。

4. LAMP 法の応用

レジオネラ症防止指針⁷⁾では、環境水からのレジオネラ属菌の検出には基本的に培養法が用いられているが、培養に3~10日要することから遺伝子増幅法であるLAMP法を測定原理として検出キットが市販された。平成21年発行のレジオネラ症防止指針第3版¹⁴⁾では遺伝子検査法としてLAMP法も掲載された。この検出キットを使用して培養法とLAMP法を比較した結果を表6に示した。

表6. 培養法とLAMP法による浴槽水, プール水からのレジオネラ属菌の検出能の比較

	検出菌数 (CFU/100 mL)	試料水	検査数	LAMP法	
				陽性	陰性
20 ≧		浴槽水	23	22	1
		プール水	2	2	
		ジャグジー水	9	9	
		小計	34	33	1
10 ≧, <20		浴槽水	45	39	6
		プール水	3	2	1
		ジャグジー水	12	10	2
		小計	60	51	9
1 ≧, <10		浴槽水	67	48	19
		プール水	11	7	4
		ジャグジー水	33	21	12
		小計	111	76	35
<1		浴槽水	204	52	152
		プール水	105	54	51
		ジャグジー水	38	16	22
		小計	347	122	225
計			552	282	270

平成16~18年度に培養法で検査された浴槽水, プール水, ジャグジー水の冷凍保存試料の中から552件についてLAMP法を行った。培養法で基準値以上であった94件中, LAMP法では84件 (89.4%) が陽性で培養法と一致した。しかし, 10件 (10.6%) は陰性となり一致しなかった。10件のレジオネラ属菌数は, 10 CFU/100 mL のもの3件, 11 CFU/100 mL のもの1件, 12 CFU/100 mL のもの2件, 15 CFU/100 mL のもの2件と低い菌数の検体が多く, 試料水を分割する際の確率論的な誤差も考えられるが, 24 CFU/100 mL, 19 CFU/100 mLの試料水も各1件あった。血清群は全て*L. pneumophila*であった。試料水の残留塩素は0.01~1.0 mg/Lであった。薬湯は1件, 温泉水が1件含まれた。この「培養法陽性・LAMP法陰性」であった検体の割合は, 安中ら¹⁵⁾, 鈴木ら¹⁶⁾の結果と近似していた。枝川ら¹⁷⁾はLAMP法に

より5.9%の試料で反応阻害が認められ偽陰性の可能性のある試料の存在を明らかにして, LAMP法によるレジオネラ属菌検出時には, 同時に反応阻害確認を行う必要性を主張した。阻害回避試薬を用いた報告もある¹⁸⁾ことから, 早期に活用できることが望まれる。

一方, 培養法で検出限界値 (1 CFU/100 mL) 未満であった347件中, 122件がLAMP法では陽性であった。LAMP法は生菌に加え, 培養不能 (VNC, Viable but non-culturable) 菌, 死菌や核酸のみでも検出する。レジオネラ属菌の生菌は検出されなかったが, 死菌も含めたレジオネラ属菌の遺伝子が検出されたことにより, LAMP法は, 採水直前までの汚染の疑いや, 試料水の循環系はどこかに存在する汚染源の究明のために重要な衛生管理の指標となり得ると思われる。

平成16年度冬のプール水のレジオネラ属菌検査時にLAMP法を併用した。プール水149件中, 培養法で1 CFU/100 mL以上検出されたのは22件 (14.8%) であったが, LAMP法では127件 (85.2%) が陽性であった。プール水は残留塩素が高めに設定されているので, プール本体には生菌が検出されなくても, 配管等にバイオフィームで保護されたレジオネラ属菌が存在していたことも考えられ, なんらかの原因で塩素濃度が低下した時に増殖して混入する恐れもある。LAMP法で不検出ならば, 温湯水系のレジオネラ属菌汚染の安全側での確認に有用であると考えられる。

平成 17~18 年度にレジオネラ属菌を検出し, 除菌対策後の再検査として採水された試料水の冷凍保存試料にLAMP法を試みた。71件中, 45件 (63.4%) はLAMP法陰性で1日で結果を出すことができた。LAMP法は迅速に結果が得られるので, 衛生指導後の陰性確認が短時間で可能なことからレジオネラ属菌管理の有効な手法と考える。

まとめ

1. 平成 19~20 年度に, 多摩地域に所在する施設の浴槽水 1,737 件とプール水 659 件についてレジオネラ属菌検出状況調査を実施し, 以下の結果を得た。

1) 浴槽水からのレジオネラ属菌の陽性率は普通公衆浴場浴槽水では 19 年度 2.7%, 20 年度 3.5%であり, その他の公衆浴場浴槽水では同じく 5.9%, 3.9%, 旅館業浴槽水では 19.6%, 15.5%であった。

2) 水泳プールのレジオネラ属菌の陽性率は 19 年度 1.2%, 20 年度 0.8%であった。ジャグジー水では 19 年度 9.2%, 20 年度 11.9%であった。

3) 基準は満たしているもののレジオネラ属菌が 10 CFU/100 mL 未満の範囲で検出された浴槽水は 19 年度 9.9%, 20 年度 10.3%であった。プール水は 19, 20 年度合わせて 5.2%, ジャグジー水は 22.8%であった。衛生管理を怠ると基準値を超過する施設数が倍増する可能性があることが示唆された。

4) 遊離残留塩素濃度が 0.4 mg/L 以上の試料水の一部からも基準値以上のレジオネラ属菌が検出された。

5) 分離されたレジオネラ属菌は浴槽水では *Legionella pneumophila* 6 群, 5 群, 1 群が多く, プール水, ジャグジー水では *L. pneumophila* 1 群が多かった.

2. 冷凍保存試料を用いて, 迅速検査法として開発された LAMP 法による検査を試み, 以下の結果を得た.

1) 552 件の検査結果では, 培養法で基準値(10 CFU/100 mL)以上であった 94 件中, 84 件は LAMP 法でも陽性で培養法と一致した. LAMP 法は迅速に結果が得られ, 温浴水のレジオネラ属菌管理の有効な手法と考える. しかし 10 件は LAMP 法で陰性で一致しなかったことから, 反応阻害回避試薬の活用が必要である.

2) 培養法で検出限界値(1 CFU/100 mL)未満の347件中, 122件はLAMP法で陽性となった. レジオネラ属菌の遺伝子が検出されたことにより, 重要な衛生管理の指標となり得ると思われた. LAMP法で陰性ならば, 温浴水系のレジオネラ属菌汚染の安全側での確認に有用である.

謝 辞 本調査に供した試料水の採水は, 都保健所の環境衛生監視員によって行われた. 記して関係各位に深謝します.

文 献

- 1) レジオネラ防止対策研究会:レジオネラ対策こうすれば安心, 14-27, 2003, 泉書房, 東京.
- 2) 公衆浴場の設置場所の配置及び衛生措置等に関する条例, 昭和39年東京都条例第184号, 平成15年3月14日改正.
- 3) 旅館業法施行条例, 昭和32年東京都条例第63号, 平成15年3月14日改正.
- 4) プール等取締条例, 昭和50年東京都条例第22号, 平成16年 4月1日改正.
- 5) 安中敏光, 吉野学, 百田隆祥:日本臨床微生物学雑誌, **13**, 19-25, 2003.
- 6) 楠くみ子, 岩谷美枝, 花岡暁, 他:東京衛研年報, **53**, 14-19, 2002.
- 7) 厚生省生活衛生局企画課監修:新版レジオネラ症防止指針, 財団法人ビル管理教育センター, 平成11年.
- 8) 山本啓之:PCR法による*Legionella*属細菌の検出・同定, 日本臨床, **50**, 394-399, 1992.
- 9) 平成12年12月5日付生衛発第1811号, 厚生省生活衛生局長通達.
- 10) 上野邦夫:生活と環境, **47**, 24-26, 2002.
- 11) 楠くみ子, 岩谷美枝, 石上武, 他:東京健安研七 年 報 **58**, 279-284, 2007.
- 12) 藪内英子, 王笠, 矢野郁也, 他:感染症学雑誌, **69**, 151-157, 1995.
- 13) 倉文明:厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業 迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆衛生等の衛生手法に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書, 2008.
- 14) 厚生省生活衛生局企画課監修:新版レジオネラ症防止指針, 財団法人ビル管理教育センター, 平成21年.
- 15) 安中敏光, 小島禎, 池戸正成:日本防菌防黴学会誌 防菌防黴 **32**, 195-201, 2004.
- 16) 鈴木敦子, 池田ほなみ, 松江隆之:日本防菌防黴学会 第32回年次大会, 2007.
- 17) 枝川亜希子, 土井均, 木村明生:日本防菌防黴学会誌 防菌防黴 **37**, 3-8, 2009.
- 18) 倉文明:厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業 迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆衛生等の衛生管理手法に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書, 2009.

Detection Frequencies of *Legionella* Species in Bath Waters and Swimming Pool Waters of the Facilities Approved in the Tama Area, Tokyo (Apr. 2007 - Mar. 2009), and the Detection Properties of the LAMP Method

Kumiko KUSUNOKI*, Takeshi ISIKAMI*, Nobukazu YAMAMOTO* and Masayuki KURITA*

Between Apr. 2007 and Mar. 2009, we investigated the presence of *Legionella* species in 1,737 bath waters and 659 swimming pool waters of the facilities approved in the Tama area of Tokyo. In the fiscal year 2007, 58 (6.8%) of 850 bath waters and 11 (3.3%) of 330 pool waters exceeded the standard value (less than 10 CFU/100 mL). In the fiscal year 2008, 49 (5.5%) of 887 bath waters and 12 (3.6%) of 329 pool waters exceeded the standard value.

We compared a culture method with the LAMP method for analysis of 552 frozen samples of bath water and pool water. We accordingly found that when using the culture method and the LAMP method, 94 and 84 samples, respectively, were *Legionella*-positive. Among the 347 samples that were recorded as *Legionella*-negative using the culture method, 122 samples were found to be *Legionella*-positive using the LAMP method.

Keywords: *Legionella* species, public bath, bath water, pool water, free residual chlorine, serogroup, Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan