

## 東京都内の冷却塔水におけるレジオネラ属菌の生息実態調査 (平成24年度)

武藤 千恵子<sup>a</sup>, 石上 武<sup>a</sup>, 楠 くみ子<sup>a</sup>, 辻 麻美<sup>a</sup>, 田部井 由紀子<sup>a</sup>, 保坂 三継<sup>a</sup>, 中江 大<sup>b</sup>

国内でのレジオネラ属菌 (*Legionella* spp.) 感染事例は浴槽水に起因するものが最も多いが、海外の事例を考慮すると、国内でも冷却塔水を原因とする感染事例が潜んでいる可能性が考えられる。このような実態をふまえて平成24年度の冷却塔水のレジオネラ属菌の生息実態調査結果を報告する。

冷却塔水220件中93件 (42.3%) からレジオネラ属菌が検出された。レジオネラ症防止指針の指針値100 CFU/100mLを超えたものが64件 (29.1%) あり、最大検出菌数は91,000 CFU/100mL であった。

分離された *Legionella* spp.133 株のうち、*L. pneumophila* は 122 株あり、血清群別では SG (sero group) 1 が 70 株、SG7 が 24 株、SG13 が 14 株、SG5 が 8 株の順で多く、浴槽水での検出頻度の高い血清群とは分布が異なっていた。また、*L. pneumophila* 以外の 11 株中、*L. rubrilucens* が 1 株、*L. feeleii* が 3 株同定され、免疫血清反応で陰性だった 7 株はすべて遺伝子検査 (LAMP 法) で陽性となり *Legionella* spp. と同定された。

また、都内 2 施設の特設建築物の冷却塔 4 基について、稼働期間中に定期的にレジオネラ属菌調査を行ったところ、新築の A 施設の冷却塔 2 基からは調査期間中 1 度もレジオネラ属菌は検出されなかったが、B 施設の冷却塔 B-1 で最大検出菌数 220 CFU/100mL、菌種は常に *L. pneumophila* SG1 を検出し、冷却塔 B-2 では最大 810 CFU/100mL 検出された。菌種は *L. pneumophila* SG13 および *L. feeleii* が検出されており、市販の抗血清等では同定が難しいものであった。

本調査の結果、およそ半数の冷却塔からレジオネラ属菌が検出されていること、市販の抗血清で同定が難しい菌種が検出されていることから、今後も継続して調査が必要である。

**キーワード**：レジオネラ属菌，冷却塔水，血清群

### はじめに

レジオネラ属菌による感染症であるレジオネラ症は、1976 年のアメリカフィラデルフィアのホテルで開催された米国在郷軍人会 (the Legion) で、原因不明の集団肺炎が発生したことが発端となって発見された。それ以降、海外では冷却塔水を原因とするレジオネラ症集団発生事例の報告があり、2011 年から 2012 年においても冷却塔水が原因と推定される集団感染事例が 2 例報告されている<sup>1)</sup>。

一方、日本国内では、冷却塔水におけるレジオネラ管理は各施設管理者に委ねられており、汚染実態についての情報の蓄積が必要である。

このような実態をふまえて、前報<sup>2)</sup>に引き続き、冷却塔水のレジオネラ属菌の生息実態を調査した結果について報告する。

### 材料と方法

#### 1. 試料水

平成 24 年度 (2012 年 4 月～2013 年 3 月) に東京都健康安全研究センター (以下、当センター) に搬入された冷却塔水 220 検体の検査を実施した。

#### 2. 試験方法

前報に従った<sup>2)</sup>。今年度は、免疫血清反応 (デンカ生研、レジオネラ免疫血清「生研」) および、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法 (極東製薬工業 (株)、DDH レジオネラ) については、レファレンスセンターから配布されたレジオネラ免疫血清 (5 菌種：*L. feeleii*, *L. londiniensis*, *L. anisa*, *L. hackeliae*, *L. longbeach*) および DNA-DNA ハイブリダイゼーション追加プレート (6 菌種：*L. busanensis*, *L. gresilensis*, *L. londiniensis*, *L. nautarum*, *L. quinlivanii*, *L. geestiana*) も使用して菌種の決定を行った。

また、遺伝子検査法は LAMP 法を用いた。滅菌蒸留水 1 mL を 1.5 mL チューブに採り、独立したレジオネラ属

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

菌と推定されるコロニーを白金線等で適宜釣菌して懸濁した後、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) で遺伝子抽出し、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-323C, 栄研化学) を用いて判定した。

なお、本法による検出限界は5 CFU/100mLである。

## 結果と考察

### 1. レジオネラ属菌検出状況

表1に冷却塔水からのレジオネラ属菌の検出状況をまとめた。220検体中93検体(42.3%)から、レジオネラ属菌が検出された。レジオネラ症防止指針第3版<sup>3)</sup>の指針値100 CFU/100mLを超えたものが、64件(29.1%)あり、最大検出菌数は91,000 CFU/100mLであった。「レジオネラ症防止指針第3版」ではエアロゾルを直接吸引する可能性の低い人工環境水中に100 CFU/100mL以上のレジオネラ属菌が検出された場合、清掃、消毒等の対策を講じ、対策後には10 CFU/100mL未満であることを確認するよう明記されている。平成24年度の調査において、約3割の冷却塔において、殺菌・洗浄等の対策を講じなければならない状況であったことが伺えた。以降、この100 CFU/100mLを指針値という。

この傾向を平成14~23年度の10年間における指針値の超過率<sup>2,4,6)</sup>と比較し、図1に示した。定点調査ではないので年度毎に対象となる施設は異なるが、19.0%から38.0%の範囲で推移しており平均超過率は27.0%であった。このことから、今年度の超過率29.1%についても過去の超過率の範囲内であることが示された。

また、本調査期間中に海外で冷却塔が原因と推定されるレジオネラ症集団感染事例が報告されている<sup>1)</sup>。2012年5月に英国スコットランド地方エディンバラで発生した事例は、101名が感染(うち48名が推定感染)、そのうち3名

表1. 冷却塔水からのレジオネラ属菌検出状況

総検体数	220
検出限界*未満	127 ( 57.7 %)
検出限界*以上	93 ( 42.3 %)
菌数 (CFU/100mL)	
5 ≤, <10	7 ( 3.2 %)
10 ≤, <10 <sup>2</sup>	22 ( 10.0 %)
10 <sup>2</sup> ≤, <10 <sup>3</sup>	36 ( 16.4 %)
10 <sup>3</sup> ≤, <10 <sup>4</sup>	25 ( 11.4 %)
10 <sup>4</sup> ≤, <10 <sup>5</sup>	3 ( 1.4 %)
指針値**以上	64 ( 29.1 %)
最大検出菌数 (CFU/100mL)	91,000

\* 検出限界: 5 CFU/100mL

\*\* 指針値: 100 CFU/100mL

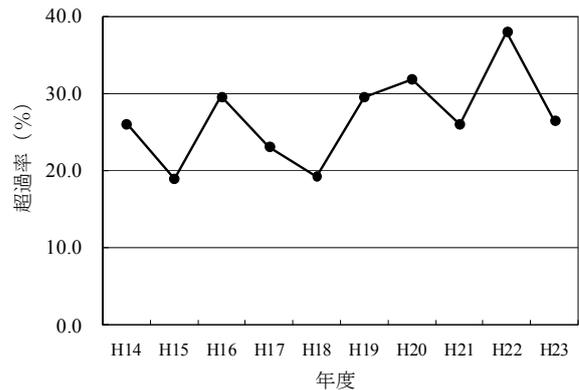


図1. 冷却塔水における過去10年間の指針値(100 CFU/mL)超過率の推移

死亡した<sup>7)</sup>。さらに7月にカナダのケベック州で発生した事例では、感染者数181名、うち3名が死亡というカナダ最大規模のレジオネラ集団感染事例となった<sup>8,9)</sup>。

一方、国内では、平成6年8月に渋谷区内の企業研修センタービルの冷却塔水中のレジオネラ属菌を原因としたポンティアック熱の集団感染(感染者数45名)<sup>10,11)</sup>が発生して以来、冷却塔水を原因とするレジオネラ症集団感染事例は報告されていない。しかしながら、図1で示したように、指針値を超えるレジオネラ属菌が検出される冷却塔水の割合は、10年以上にわたって大きく変化していない。そのため、海外の事例のように、日本国内でも冷却塔を原因とするレジオネラ症感染が存在する可能性は否定できない。

### 2. 分離されたレジオネラ属菌の同定

冷却塔水中から分離された*Legionella* spp.133株について、菌種を同定し、血清群を調査した結果を図2にまとめた。*L. pneumophila*は122株あり、血清群別に見ると、*L. pneumophila* SG1 (70株)が最も多く、次いでSG7 (24株)、SG13 (14株)、SG5 (8株)の順であった。浴槽水で検出頻度の高い*L. pneumophila*の血清群はSG1、SG6、SG5、SG3の順であり<sup>12)</sup>、冷却塔水中から検出された血清群とは異なっている傾向はこれまでと同様であった。また、*L. pneumophila*以外の11株は、市販免疫血清で菌種が確定できず、1株のみがレファレンスセンターから配布された抗血清で、*L. feeleii*と同定された。市販免疫血清では同定できなかった10株でLAMP法を行った結果、すべてレジオネラ属菌陽性であった。そのうち4株についてDNA-DNAハイブリダイゼーション法を行い、1株は*L. rubrilucens*と同定された。また、2株はレファレンスセンターから配布された追加プレートで*L. feeleii*と同定された。残りの1株は同定できなかったため、LAMP法陽性であったが、増菌できなかった等の理由でDNA-DNAハイブリダイゼーション法を行えなかった6株と合わせて*Legionella* spp.とした。

国内では、年間のレジオネラ症患者発生のピークは冷却塔稼働開始時期と同様の初夏~夏季となっており、臨床検

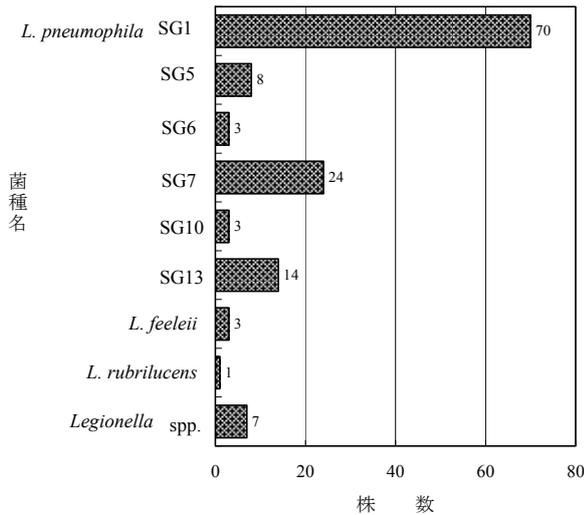


図2. 冷却塔水から分離されたレジオネラ属菌の菌種および血清群 (SG)

体から確保された菌株の8割以上が *L. pneumophila* SG1 である<sup>13)</sup>。これは、レジオネラ症の臨床診断方法の96%が *L. pneumophila* SG1 の検出に限定される尿中抗原によるものであることから容易に予想されることである。平成23年からは迅速検査として LAMP 法が保険適用となっているため、今後、臨床検体からの *L. pneumophila* SG1 以外の菌株の確保が期待でき、冷却塔水を含む浴槽水以外の環境水との関連性が明らかになるのではないかと期待できる。また、平成20~24年に *L. pneumophila* SG1 との混合感染で、*L. feeleii* および *L. rubrilucens* が臨床検体から確保されている<sup>13)</sup>。このことは、本調査で冷却塔水から検出されたレジオネラ属菌が、レジオネラ感染症の原因となる可能性が高いことを示したとも言える。

### 3. 冷却塔水中のレジオネラ属菌数の季節変動

東京都内の区部 (A 施設) および市部 (B 施設) の特定建築物2施設各2基の冷却塔計4基について、稼働期間中に定期的にレジオネラ属菌調査を行った。A 施設は5月中旬から3月上旬にかけて冷却塔 A-1 および冷却塔 A-2 それぞれ27検体ずつ、B 施設は6月下旬から12月にかけて冷却塔 B-1 で18検体、冷却塔 B-2 で23検体調査した。

表2に各施設の冷却塔の管理状況を示した。A 施設は新築で、調査期間中にすべての検体においてレジオネラ属菌は検出されなかった。そこで、さらに LAMP 法で検出を試みたが、すべての検体において陰性となった。当研究室に搬入される冷却塔水の多くは、稼働開始後1年以上経過した冷却塔について都の衛生監視員が立ち入り調査した際に採水したものである。今回の A 施設は新築で稼働開始直後であるため、冷却塔のレジオネラ汚染がまだ生じていないと考えられる。よって、A 施設においては稼働1年経過以降のレジオネラ属菌の発生状況を知るために、今後も継続的に調査を行う必要があると思われる。

表2. 都内2施設の冷却塔管理状況

	A施設		B施設	
	冷却塔A-1, 2	冷却塔B-1	冷却塔B-2	
冷却方式	直交流型開放式	直交流型開放式	向流型開放式	
冷熱源設備	冷温水発生機 冷凍機	冷温水発生機 (地域冷暖房)	冷凍機 (ジョットングセンター用)	
原水の種類	上水	上水	上水	
補給水量	最大1,422m <sup>3</sup>	1,456 m <sup>3</sup> (7月) 1,973 m <sup>3</sup> (8月)	3 m <sup>3</sup> /月	
薬剤の投入方法	自動注入	自動注入	冷却塔清掃時に投入	

図3にB施設におけるレジオネラ属菌数の推移を示した。B 施設においては、形状と管理状況が異なる冷却塔が2基設置されていた<sup>14)</sup>。冷却塔 B-1 は補給水量も多く、薬剤も自動注入されていた。施設管理者によるレジオネラ属菌の自主検査は7月中旬と8月中旬に実施されていたが、結果は不検出であった。今回、上記期間を含む6月下旬から12月の調査結果では、最大検出菌数220 CFU/100mL、血清群は常に *L. pneumophila* SG1 を検出した。また、冷却塔稼働率の高い夏季に菌数が指針値を超え続けており、10月上旬に10 CFU/100mL 以下に減少した。

一方、冷却塔 B-2 は補給水量も少なく、薬剤は年1回(3月)の清掃時に投入されているのみであった。レジオネラ属菌の自主検査は8月5日に1度実施されていたが、結果は不検出であった。しかし、8月8日の当センターでの調査結果は660 CFU/100mL 検出されていた。今回の調査期間中、最大検出菌数は810 CFU/100mL (8月15日)、血清群は常に *L. pneumophila* SG13 が検出され、7月中は *L. feeleii* も検出されていた。都の調査結果を受けて、施設側は9月上旬に追加で薬剤の投入を行った。その結果、10月下旬まで検出限界未満(5 CFU/100mL)を保持し、その後1ヶ月間は5~15 CFU/100mL で推移したのち、12月には再び検出限界未満となった。

今回の調査によって、施設側の自主検査では不検出であったにも関わらず、指針値を超える菌数を検出する例があることが明らかになった。冷却塔 B-1 では自主検査を実施

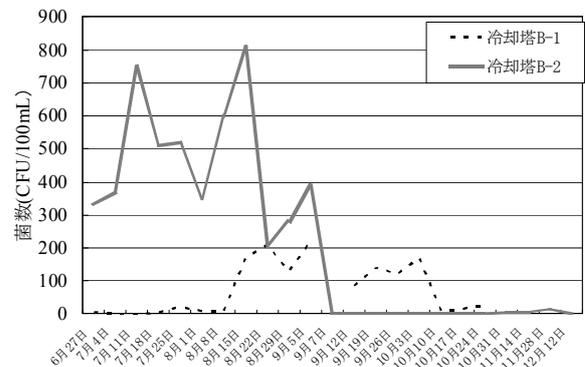


図3. B施設冷却塔水中におけるレジオネラ属菌数の推移

した機関の検出限界値がわからないが、*L. pneumophila* SG1 はレジオネラ属菌検査において基本となる血清群であるため、同定は容易である。一方、冷却塔 B-2 については、検出された *L. pneumophila* SG13 は市販の抗血清セットには含まれていないため、検査機関によっては同定することが困難で検査結果の扱いが難しいことも考えられる。さらに、*L. feeleii* については、レファレンスセンターから入手した DDH の追加プレートで同定されたため、一般の検査機関では同定ができなかったのではないかと思われる。そのため、施設側の自主検査結果では不検出となったと考えられる。

今後は、自主検査を実施する機関の検査技術向上のためにも、検査法の統一や技術レベルの精度管理が必要である。

### ま と め

平成24年度に当センターに搬入された冷却塔水220検体を検査し、以下の結果を得た。

1. 220 検体中 93 検体からレジオネラ属菌が検出された。その最大検出菌数は 91,000 CFU/100mL であった。
2. レジオネラが検出された検体の中で、レジオネラ症防止指針第3版の指針値 100 CFU/100mL を超えていたものが 64 検体あり、約 3 割の冷却塔において、殺菌・洗浄等の対策を講じなければならない状況であったことが伺えた。
3. 冷却塔水中から *Legionella* spp.133 株が分離された。このうち *L. pneumophila* は 122 株であり、*L. pneumophila* SG1 が 70 株、SG7 が 24 株、SG13 が 14 株、SG5 が 8 株の順で多く、浴槽水とは検出頻度の高い血清群が異なっていた。また、*L. pneumophila* 以外の 11 株中、*L. feeleii* が 3 株、*L. rubrilucens* が 1 株同定された。*L. feeleii* は市販抗血清や検査キットでは同定できない菌種であった。他にも LAMP 法陽性で *Legionella* spp. と同定されたものが 7 株あった。
4. 東京都内の特定建築物の 2 施設、計 4 基の冷却塔について、稼動期間中に定期的にレジオネラ属菌調査を行ったところ、新築の A 施設調査期間中にすべての検体においてレジオネラ属菌は検出されなかった。一方、管理状況等が異なる 2 基の冷却塔を設置している B 施設においては、冷却塔 B-1 で最大検出菌数 220 CFU/100 mL、血清群は常に *L. pneumophila* SG1 を検出し、冷却塔 B-2 では最大検出菌数 810 CFU/100mL で、血清群は常に *L. pneumophila* SG13 が検出され、*L. feeleii* が検出されることもあった。

本調査の結果、およそ半数の冷却塔からレジオネラ属菌が検出されていること、市販の抗血清で同定が難しい菌種が検出されていることから、今後も継続して調査が必要である。

**謝 辞** 本調査に供した検体の採水は、東京都の環境衛生監視員によって行われたものである。記して関係各位に深謝します。

### 文 献

- 1) <http://www.hcinfo.com/legionnaires-disease/outbreaks/70-outbreaks> (2013年8月日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 2) 武藤千恵子, 石上武, 楠くみ子, 他: 東京健安研七年年報, **63**, 275-280, 2012.
- 3) 目黒克己: レジオネラ症防止指針第3版, 2009, (財) ビル管理教育センター, 東京.
- 4) 勝田千恵子, 保坂三継, 榎田隆一, 他: 東京衛研年報, **54**, 296-300, 2003.
- 5) 高田千恵子, 保坂三継, 榎田隆一: 東京健安研七年年報, **55**, 283-287, 2004.
- 6) 高田千恵子, 榎田隆一, 保坂三継: 東京健安研七年年報, **56**, 313-317, 2005.
- 7) BBC NEWS: Edinburgh Legionnaires' outbreak: Total number of cases reaches 100, <http://www.bbc.co.uk/news/uk-scotland-edinburgh-east-fife-18822748> (2013年8月日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 8) CBC NEWS: Quebec legionnaires' outbreak source found, <http://www.cbc.ca/news/canada/montreal/story/2012/09/19/montreal-quebec-city-legionnaires-outbreak-source-found.html> (2013年8月日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 9) CBC NEWS: Quebec health director won't lay blame for legionnaires' outbreak, <http://www.cbc.ca/news/canada/montreal/story/2012/12/06/montreal-legionnaires-report.html> (2013年8月日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 10) 藪内英子, 森正道, 斉藤厚, 他: 感染症誌, **69**, 6, 654-665, 1995.
- 11) 森正道, 星野啓一, 園田久子, 他: 感染症誌, **69**, 6, 646-653, 1995.
- 12) 生嶋清美, 楠くみ子, 石上武, 他: 東京健安研七年年報, **63**, 267-274, 2012.
- 13) 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報, **34** (6), 155-170, 2013.
- 14) 山下聖子: 平成25年度環境衛生業務発表会, 2013年5月, 東京.

## Survey of *Legionella* Species in Cooling Towers in Tokyo (April 2012-March 2013)

Chieko MUTO<sup>a</sup>, Takeshi ISHIKAMI<sup>a</sup>, Kumiko KUSUNOKI<sup>a</sup>, Asami TSUJI<sup>a</sup>, Yukiko TABEL<sup>a</sup>,  
Mitsugu HOSAKA<sup>a</sup> and Dai NAKAE<sup>a</sup>

Domestic outbreaks of Legionnaires' disease in Japan primarily arise from bath water. In comparison to overseas outbreaks, there is the possibility that domestic outbreaks could be due to cooling tower water may occur. The present paper deals with the occurrence of *Legionella* bacteria in cooling tower water in Tokyo from April 2012 to March 2013. A total of 220 water samples was examined for *Legionella* bacteria and 93 water samples (42.3 %) were positive for *Legionella*. Sixty-four samples (29.1 %) were over 100 CFU/100 mL, the reference value in the guidelines for Legionnaires' infection. The maximum number of *Legionella* bacteria was 91,000 CFU/100 mL. *Legionella pneumophila* was demonstrated in 122 of 133 strains of *Legionella* spp. isolated. *Legionella pneumophila* serogroup (SG) typing revealed that SG1(70 strains) was dominant in cooling tower water, followed by SG7(24 strains) and SG13(14strains). These results were different from typing of the *Legionella* spp. serogroup in bath water, as we have already reported. *Legionella* spp. other than *Legionella pneumophila* were identified as *L. rubrilucens* (1 strain), *L. feeleii* (3 strains) and *Legionella* spp. Four cooling towers of two specific buildings were investigated regularly during the period of operation. All samples were negative at two cooling towers of the new building A. However, *Legionella* bacteria in cooling towers B-1 and B-2 from building B were frequently detected. A maximum number of 220 CFU/100 mL was found at cooling tower B-1. All isolates were identified as *L. pneumophila* SG1. The second cooling tower B-2 showed a maximum number 810 CFU/100 mL, and *L. pneumophila* SG13 and *L. feeleii*. were identified.

**Keywords :** *Legionella* , cooling tower water, serogroup

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan