

東京都（多摩地域及び島しょ地域）におけるプール水及びジャグジー水等からの レジオネラ属菌の検出状況（平成30年度～令和2年度）

鈴木 澤^a, 武藤 千恵子^a, 梅津 萌子^a, 高久 靖弘^a, 田中 和良^a, 中嶋 順一^a, 守安 貴子^b, 猪又 明子^c

東京都におけるレジオネラ症防止対策の一環として、平成30年度～令和2年度に多摩地区及び島しょ地域に所在する施設のプール水及びジャグジー水等785件についてレジオネラ属菌を調査した。水質基準である「検出されないこと」（10 CFU/100 mL未満）を超過した割合は3.8%であった。その内訳は、プール水で0.9%、ジャグジー水等では10.2%であった。また、レジオネラ属菌が検出された120検体について抗血清、Multiplex-PCR法、LAMP法及びリアルタイムPCR法を用いて156株の菌種を同定した。その結果、*Legionella pneumophila*が150株で94.9%を占めた。また、*Legionella* spp.分離株についてシーケンシング法を行った結果、*Legionella anisa*, *Legionella londiniensis*, *Legionella nautarum*, *Legionella saintthelensi*の同定ができた。

キーワード：レジオネラ属菌，レジオネラ症，プール水，ジャグジー水，遊離残留塩素，血清群，迅速検査法

はじめに

レジオネラ属菌は細胞内寄生性を特徴とする好気性のグラム陰性桿菌であり、土壌や河川など自然界に広く生息しており、生活環境中においては冷却塔や浴槽、プールなどの人工環境水中に生息している。浴槽やプールでは、配管の消毒や清掃を怠るとバイオフィームが形成され、レジオネラ属菌はその内部に存在する原生動物に捕食されるが、消化されずに増殖を続け、最終的にその細胞を破壊して外界へ放出される¹⁾。

レジオネラ属菌に汚染された水から発生するエアロゾルを吸い込むことで、菌が肺へと到達し、肺胞内マクロファージで増殖し、レジオネラ症を発症する¹⁾。特に高齢者や免疫力の低下した人が罹患しやすく、適切な治療が遅れた場合、死に至るケースもある。

東京都は平成16年に「プール等取締条例」²⁾を改正し、新たにジャグジーなどの小規模プール等を対象に追加した。さらに、構造設備の基準や施設の維持管理に関する新たな規定を設け、レジオネラ属菌の水質検査基準値を新たに設定することにより、レジオネラ症対策を強化した。

東京都健康安全研究センター（以下、当センターと略す）では、多摩地域及び島しょ地域におけるプール水等のレジオネラ属菌検査を継続して実施しており、レジオネラ属菌の検出状況の把握³⁻⁵⁾に努めている。なお、東京都ではプール等取締条例施行規則⁶⁾においてレジオネラの水質基準を「検出されないこと」としている。「検出されないこと」とは「10 CFU/100 mL 未満」として運用しており、この基準を超えた施設に対して改善指導を行っている。

本稿では、平成30年度～令和2年度に当センターに搬入

された試料水についてレジオネラ属菌検出状況調査結果を報告する。また、抗血清で菌種の同定が困難であった菌株について、遺伝子検査により菌種を同定したので、併せて報告する。

実験方法

1. 試料水

平成30年度～令和2年度に採取された多摩地域及び島しょ地域のプール水等785件を試料とした。試料の採取及び遊離残留塩素濃度の測定は都保健所の環境衛生監視員が行った。

プール水及びジャグジー水等は、都条例²⁾に基づき営業を許可されたプールのうち、加温装置を使用している施設から採水した。

プール水等の分類について、法令や都条例等で明確な規定はないが、本稿ではレジオネラ症発生リスクの観点から、「プール水」及び「ジャグジー水等」に分類した。エアロゾルが発生するおそれのある気泡発生装置等を備えたもの、水温がレジオネラ属菌の発育至適温度（35℃前後）付近である採暖槽及びマッサージプール等から採水された試料を「ジャグジー水等」とした。「プール水」はこれらを除く試料とした。

2. 検査方法

1) 培養法

培養法は、前報³⁻⁵⁾に従った。すなわち、試料1,000 mLを孔径0.22 µmのメンブランフィルターでろ過濃縮後、酸処理を行った100倍濃縮液をレジオネラ属菌の選択分離培地

^a 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

^b 当時：東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

^c 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

であるWYO α 寒天平板（栄研化学）とGVPC α 寒天平板（日研生物医学研究所）各2枚（計4枚）に0.25 mLずつ計1 mL塗布し、37℃で7日間培養した。なお、本法におけるレジオネラ属菌の検出限界値は1 CFU/100 mLである。

2) レジオネラ属菌の同定

(1) ラテックス凝集反応及び免疫血清による血清群の同定

培養後に確認された集落のうち、青みを帯びた灰白色の湿潤集落を斜光法で確認後、レジオネラ属菌様集落として計数し、代表的な集落をBCYE α 寒天平板（日研生物医学研究所）及びウマ脱繊維血液（ラムジャパン）を用いて作製した血液寒天平板に画線培養した。血液寒天平板に発育せず、BCYE α 寒天平板のみに発育した菌株をレジオネラ属菌と推定し、ラテックス凝集反応（OXOID）及び免疫血清（デンカ生研）にて血清型を同定した。ラテックス凝集反応において*Legionella* spp.に凝集がある菌株については、レファレンスセンターから配布された免疫血清

(*L. londiniensis* SG1及び2, *L. feeleii* SG1及び2, *L. longbeachae* SG1及び2, *L. saintelensi* SG1及び2, *L. jordanis*, *L. anisa*, *L. bozemanii* SG2)を用いて菌種の同定を行った。

(2) LAMP法及びリアルタイムPCR法によるレジオネラ属菌の同定

ラテックス凝集反応及び免疫血清により血清型を同定できなかった菌株について、レジオネラ属菌であることを確定するために、LAMP法及びリアルタイムPCR法による定性試験を行った。遺伝子抽出はレジオネラ検出試薬キットE（栄研化学）に付属する簡易抽出キットを用いて行った。LAMP法では、レジオネラ検出試薬キットEに追加プライマーとして*Legionella londiniensis*用LAMP法キット（ニッポンジーン）を添加した後、リアルタイム濁度測定装置（LA-320C）を用いて、65℃で60分間測定し判定した。リアルタイムPCR法では、CycleavePCR *Legionella* (16s rRNA) Detection Kit（タカラバイオ）を用い、Applied Biosystems® 7500 Real Time Systemで測定した。

(3) Multiplex-PCR法による*Legionella pneumophila*の血清群の同定

免疫血清で交差反応や自己凝集が見られたものについて、QIAGEN Multiplex-PCR Kitを用いて、*L. pneumophila* の血清群の同定を行った。20 μ Lの滅菌純水中にBCYE α 寒天平板からコロニーを滅菌爪楊枝の先で釣菌し、100℃で5分間インキュベート後、8,000 gで数秒間スピンドウンし遺伝子を抽出した。そのうち1 μ Lを用いてPCR反応を行い、その反応物を2%アガロースゲルで電気泳動を行い、バンドの位置により血清群を確定した。

(4) シーケンシング法による菌種の同定

LAMP法、リアルタイムPCR法による定性試験により、レジオネラ属菌と確定できた菌株について、シーケンシングを行って菌種の同定を行った。16SrRNA遺伝子または*mip*遺伝子によるPCR反応後にシーケンス反応を行い、

3500Genetic Analyzerで増幅産物の塩基配列を決定した⁹⁾。得られた配列はNCBIのBLASTで相同性検索を行い、菌種を同定した。

結果及び考察

1. プール水及びジャグジー水等からのレジオネラ属菌検出状況

プール水等からのレジオネラ属菌の検出状況を表1に示した。平成30年度～令和2年度において785検体中120検体（15.3%）からレジオネラ属菌が検出された。

水質基準値である10 CFU/100 mLを超過した検体は、30検体（3.8%）であった。その内訳はプール水540検体中5検体（0.9%）、ジャグジー水等では245検体中25検体（10.2%）と検出率に大きな差が表れた。

また、10 CFU/100 mL未満であるが、レジオネラ属菌が検出された検体は90検体（11.5%）であった。その内訳はプール水では32検体（5.9%）、ジャグジー水等で58検体（23.7%）であった。各年度においてもジャグジー水等はプール水より検出率が高くなっており、このことは既報³⁻⁵⁾と同様の結果であった。

本調査において、ジャグジー水等はレジオネラ属菌の至適温度（35℃）付近の水温であることが多く見受けられた。そのためプール水よりレジオネラ属菌の検出が多くなったと考えられた。

2. 残留塩素濃度別レジオネラ属菌検出状況

プール水等の残留塩素濃度別レジオネラ属菌検出状況を表2に示した。残留塩素濃度の水質基準は都条例で0.4-1.0 mg/L以下であることが望ましいとされている^{9,10)}。しかしながら、プール水でレジオネラ属菌が水質基準値を超過した検体は平成30年度～令和2年度において5検体（0.9%）であり、そのすべてが残留塩素濃度0.4-1.0 mg/Lであった。また、ジャグジー水等でレジオネラ属菌が水質基準値を超過した検体は、平成30年度～令和2年度において25検体（10.2%）であった。これらは残留塩素濃度0.4-1.0 mg/Lを保持していた101検体のうちの15検体（14.9%）、1.0 mg/L以上を保持していた143検体のうちの9検体（6.3%）であった。以上のことから、残留塩素濃度0.4-1.0 mg/Lを維持しているだけではレジオネラ属菌の抑制は難しいことが示唆された。

3. 分離されたレジオネラ属菌の菌種及び血清群

1) ラテックス凝集反応及び免疫血清による血清群の同定

平成30年度～令和2年度においてレジオネラ属菌が1 CFU/100 mL以上検出された検体はプール水で37検体、ジャグジー水等で83検体であった（表1）。これら計120検体から分離されたレジオネラ属菌の菌種及び血清群の内訳を、表3に示した。プール水等からの分離株は*L. pneumophila*が150株（96.2%）を占め、他にラテックス凝集反応で*Legionella* spp.が2株検出された。

表1. プール水及びジャグジー水等からのレジオネラ属菌検出状況 (平成30年度～令和2年度)

	年度	平成30年度	令和元年度	令和2年度	合計
	試料数	193	192	155	540
プール水	1～9 CFU/100 mL 検出数 (%)	12 (6.2)	8 (4.2)	12 (7.7)	32 (5.9)
	10 CFU/100 mL以上 検出数 (%)	1 (0.5)	1 (0.5)	3 (1.9)	5 (0.9)
	総検出数 (%)	13 (6.7)	9 (4.7)	15 (9.7)	37 (6.9)
	試料数	89	85	71	245
ジャグジー水等	1～9 CFU/100 mL 検出数 (%)	26 (29.2)	18 (21.2)	14 (19.7)	58 (23.7)
	10 CFU/100 mL以上 検出数 (%)	9 (10.1)	6 (7.1)	10 (14.1)	25 (10.2)
	総検出数 (%)	35 (39.3)	24 (28.2)	24 (33.8)	83 (33.9)
	試料数	282	277	226	785
小計	1～9 CFU/100 mL 検出数 (%)	38 (13.5)	26 (9.4)	26 (11.5)	90 (11.5)
	10 CFU/100 mL以上 検出数 (%)	10 (3.5)	7 (2.5)	13 (5.8)	30 (3.8)
	総検出数 (%)	48 (17.0)	33 (11.9)	39 (17.3)	120 (15.3)
	試料数	89	85	71	245

表2. プール水及びジャグジー水等の遊離残留塩素濃度別レジオネラ属菌検出状況 (平成30年度～令和2年度)

種類	年度	残留塩素 濃度 (mg/L)	試料数 (%)	10 CFU/100 mL以上 検出数 (%)	検出菌数別試料数内訳 (件)			
					1～9	10～99	100～999	1000～
					CFU/100 mL	CFU/100 mL	CFU/100 mL	CFU/100 mL
プール水	平成30年度	>1.0	35 (18.1) *	0 (0.0) **	1	0	0	0
		≥0.4～≤1.0	153 (79.3)	1 (0.7)	11	0	1	0
		<0.4	5 (2.6)	0 (0.0)	0	0	0	0
		計	193 (100.0)	1 (0.5)	12	0	1	0
	令和元年度	>1.0	48 (25.0)	0 (0.0)	1	0	0	0
		≥0.4～≤1.0	142 (74.0)	1 (0.7)	7	1	0	0
		<0.4	2 (1.0)	0 (0.0)	0	0	0	0
		計	192 (100.0)	1 (0.5)	8	1	0	0
	令和2年度	>1.0	46 (29.7)	0 (0.0)	3	0	0	0
		≥0.4～≤1.0	108 (69.7)	3 (2.8)	9	3	0	0
		<0.4	1 (0.6)	0 (0.0)	0	0	0	0
		計	155 (100.0)	3 (1.9)	12	3	0	0
	合計	>1.0	129 (23.9)	0 (0.0)	5	0	0	0
		≥0.4～≤1.0	403 (74.6)	5 (1.2)	27	4	1	0
		<0.4	8 (1.5)	0 (0.0)	0	0	0	0
		計	540 (100.0)	5 (0.9)	32	4	1	0
ジャグジー水等	平成30年度	>1.0	51 (57.3)	4 (7.8)	9	3	1	0
		≥0.4～≤1.0	38 (42.7)	5 (13.2)	17	4	0	1
		<0.4	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	0
		計	89 (100.0)	9 (10.1)	26	7	1	1
	令和元年度	>1.0	52 (61.2)	2 (3.8)	3	1	1	0
		≥0.4～≤1.0	33 (38.8)	4 (12.1)	15	3	0	1
		<0.4	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	0
		計	85 (100.0)	6 (7.1)	18	4	1	1
	令和2年度	>1.0	40 (56.3)	3 (7.5)	4	3	0	0
		≥0.4～≤1.0	30 (42.3)	6 (20.0)	10	5	1	0
		<0.4	1 (1.4)	1 (100.0)	0	1	0	0
		計	71 (100.0)	10 (14.1)	14	9	1	0
	合計	>1.0	143 (58.4)	9 (6.3)	16	7	2	0
		≥0.4～≤1.0	101 (41.2)	15 (14.9)	42	12	1	2
		<0.4	1 (0.4)	1 (100.0)	0	1	0	0
		計	245 (100.0)	25 (10.2)	58	20	3	2

* 各施設の総試料に対する割合

** 10 CFU/100 mL以上検出した施設の割合

表3. プール水及びジャグジー水等から分離されたレジオネラ属菌の菌種及び血清群（平成30年度～令和2年度）

菌種	血清群	プール水 菌株数 (%)	ジャグジー水等 菌株数 (%)	合計 菌株数 (%)
<i>L. pneumophila</i>	1群	12 (29.3)	49 (42.6)	61 (53.0)
<i>L. pneumophila</i>	3群	6 (14.6)	10 (8.7)	16 (13.9)
<i>L. pneumophila</i>	5群	3 (7.3)	15 (13.0)	18 (15.7)
<i>L. pneumophila</i>	6群	2 (4.9)	28 (24.3)	30 (26.1)
<i>L. pneumophila</i>	7群	4 (9.8)	2 (1.7)	6 (5.2)
<i>L. pneumophila</i>	8群	1 (2.4)	5 (4.3)	6 (5.2)
<i>L. pneumophila</i>	9群	3 (7.3)	2 (1.7)	5 (4.3)
<i>L. pneumophila</i>	12群		1 (0.9)	1 (0.9)
<i>L. pneumophila</i>	13群	2 (4.9)		2 (1.7)
<i>L. pneumophila</i>	15群		1 (0.9)	1 (0.9)
<i>L. pneumophila</i>	2-14群	1 (2.4)	1 (0.9)	2 (1.7)
<i>L. pneumophila</i>	SGg4/10*	1 (2.4)	1 (0.9)	2 (1.7)
<i>L. saintelensi</i> **		1 (2.4)		1 (0.9)
<i>L. anisa</i> **		1 (2.4)		1 (0.9)
<i>L. nautarum</i> ***		3 (7.3)		3 (2.6)
<i>L. londiniensis</i> ***		1 (2.4)		1 (0.9)
計		41 (100.0)	115 (100.0)	156 (100.0)

* Multiplex-PCRによる型別

** ラテックス凝集反応 (+)

*** ラテックス凝集反応 (-)

*L. pneumophila*の血清群の内訳を種類別で見ると、プール水では1群が29.3%と高い検出率であり、次いで3群が14.6%、7群が9.8%であった。ジャグジー水等でも1群が42.6%と一番高い検出率であったが、次に6群で24.3%、5群で13.0%という結果となり、既報におけるプール水等からの検出状況とほぼ同様であった³⁻⁵⁾。その他の血清群の検出率はいずれにおいてもわずかであった。

2) シーケンシング法による菌種の同定

ラテックス凝集反応、LAMP法またはリアルタイムPCR法により *Legionella* spp.と判定された6株についてシーケンシング法により菌種の同定を行った。その結果、プール水から *L. nautarum* 3株、*L. saintelensi*、*L. anisa*、*L. londiniensis*各1株の同定ができた。

3) Multiplex-PCR法による血清群の決定

Multiplex-PCR法を用いて、交差反応や自己凝集により血清群の同定が困難だった *L. pneumophila* 10株の同定を行った。その結果、5群が3株、6群が3株、7群が1株、13群が1株が同定できたが、2株については免疫血清とMultiplex-PCR法での結果の不一致により同定ができなかった。また、血清群4群と10群、血清群6群と12群についてはMultiplex-PCR法では判別不可能であるため⁷⁾、1株は免疫血清でより強く凝集が確認された血清群をその菌株の血清

群として判断し、もう1株は *L. pneumophila* SGg4/10とした。

ま と め

平成30年度～令和2年度に東京都（多摩地区及び島しょ地域）に所在する施設のプール水等785件に対し、レジオネラ属菌の検出状況を調査し、以下の結果を得た。

- レジオネラ属菌が水質基準値である「検出されないこと（10 CFU/100 mL未満）」を超過した割合は3.8%であった。その内訳は、プール水で0.9%、ジャグジー水等では10.2%であった。
- レジオネラ属菌が水質基準値未満（10 CFU/100 mL未満）ではあるが検出された割合は11.5%であった。その内訳は、プール水では5.9%、ジャグジー水等では23.7%であった。
- プール水の0.9%からレジオネラ属菌が水質基準を超過して検出され、そのすべては都条例で示されている遊離残留塩素濃度である0.4-1.0 mg/L以下の検体であった。
- ジャグジー水等で10.2%からレジオネラ属菌が水質基準を超過して検出され、残留塩素濃度が0.4-1.0 mg/L以下の検体の14.9%、1.0 mg/L以上保持されていた検体についても6.3%から検出された。

5. ラテックス凝集反応及び免疫血清により,
L. pneumophila の血清群を同定したところ, プール水では
L. pneumophila 1群, 3群, 7群の順に多く検出された. ジャ
グジー水等では1群, 6群, 5群の順に多く検出され, 既報
における浴槽水からの検出状況と同様であった.
6. *Legionella* spp. 6株についてシーケンシング法を行った
ところ, プール水から *L. nautarum* 3株, *L. saintelensis*,
L. anisa, *L. londiniensis* が同定できた.
7. 抗血清による凝集法において, *L. pneumophila* の血清型
の同定が困難だった10株について, Multiplex-PCR法によ
り5群が3株, 6群が3株, 7群が1株, 13群が1株, SGg4/10
が同定でき, 1株については免疫血清と Multiplex-PCR法で
の結果の不一致により同定ができなかった.

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) 公益社団法人日本建築衛生管理教育センター: レジオ

ネラ症防止指針, 第4版, 平成29年, 9-15, 東京都.

- 2) プール等取締条例, 昭和50年3月12日, 東京都条例第22号, 平成27年3月31日改正.
- 3) 生嶋清美, 楠くみ子, 石上 武, 他: 東京都健安研セ年報, **63**, 267-274, 2012.
- 4) 市川めぐみ, 辻 麻美, 武藤千恵子, 他: 東京都健安研セ年報, **66**, 289-296, 2015.
- 5) 山本和興, 武藤千恵子, 田部井由紀子, 他: 東京都健安研セ年報, **69**, 253-260, 2018.
- 6) プール等取締条例施行規則, 昭和50年3月31日, 東京都規則第78号, 令和3年4月8日改正.
- 7) Ryota Nakaue, Tian Quin, Masato Morita, *et al.*: *J Clin Microbiol.*, 59:e0015721, 2021. doi:10.1128/JCM.00157.
- 8) 国立感染研究所, 病原体検出マニュアル: レジオネラ症, 28-31, 令和2年9月1日改訂.
- 9) 東京都福祉保健局: 公衆浴場・旅館業・プール施設管理者のためのレジオネラ症防止自主管理マニュアル, 2014.
- 10) プール等取締条例施行規則, 昭和50年3月31日, 東京都規則第78号, 令和3年4月8日改正.

**Surveys on *Legionella* species in Water Samples from Approved Swimming Pools and Whirlpools
in Tama District and Islands Areas, Tokyo (April 2018-March 2020)**

Mio SUZUKI^a, Chieko MUTO^a, Moeko UMETSU^a, Yasuhiro TAKAKU^a, Kazuyoshi TANAKA^a, Jun'ichi NAKAJIMA^a,
Takako MORIYASU^b, and Akiko INOMATA^a

As a part of the measures to prevent Legionnaires' disease in Tokyo, we surveyed *Legionella* contamination in 785 water samples from approved swimming pools and whirlpools in Tama district and the island areas in Tokyo from April 2018 to March 2020.

The water quality standard of "not detected" (<10 CFU/100 mL) for *Legionella* was exceeded in 3.8% of the cases. The breakdown was 5 (0.9%) of 540 for swimming pool water and 25 (10.2%) of 245 for whirlpool water. Of the 120 samples in which *Legionella* spp. were detected, 156 strains were identified using antiserum, multiplex-PCR, LAMP, and real-time PCR. The results showed that *Legionella pneumophila* accounted for 94.9% of the total number of 156 isolates. Sequencing of *Legionella* spp. isolates resulted in the identification of *Legionella anisa*, *Legionella londiniensis*, *Legionella nautarum*, and *Legionella sainthelensi*.

Keywords: *Legionella* species, Legionellosis, pool water, whirlpool, free residual chlorine, serogroup, rapid test method

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

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

^c Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,