

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（令和3年度～令和5年度）

大谷 彩恵^a, 武藤 千恵子^a, 梅津 萌子^a, 高久 靖弘^a, 田中 和良^a, 木下 輝昭^a, 猪又 明子^b

東京都におけるレジオネラ症防止対策の一環として、令和3年度～令和5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740件についてレジオネラ属菌を調査した。レジオネラの水質基準である「検出されないこと」（10 CFU/100mL未満）を超過した割合は、6.4%であった。その内訳は、プール水で2.7%、ジャグジー水等では13.6%であった。また、レジオネラ属菌が検出された147検体について抗血清、Multiplex-PCR法、リアルタイムPCR法を用いて209株の菌種を同定した。その結果、*Legionella pneumophila*が198株で94.7%を占めた。また、*L. spp.*分離株についてシーケンシング法を行った結果、*L. maceachernii*, *L. nautarum*, *L. saintelensii*が同定された。

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、1976年にアメリカで開催された在郷軍人集会で、原因不明の集団肺炎が発生し、アメリカの疾病対策予防センター（Centers for Disease Control and Prevention: CDC）によって肺炎の原因菌として分離された、*Legionella pneumophila* を発端にして発見されたグラム陰性の桿菌である¹⁾。

レジオネラ症の病型は、重症化によって致死的となりうるレジオネラ肺炎と、インフルエンザ様の症状を呈すポンティアック熱の2つである。レジオネラ症の診断は、菌の培養、尿中抗原検査、遺伝子診断、血清抗体価測定によって行うが、簡便性や迅速性などの理由により尿中抗原検査がレジオネラ症報告例で最も多い検査法である¹⁾。近年では*L. pneumophila* 血清群1～15を検出できる尿中抗原検査キットが発売されるなど²⁾、今後もレジオネラ症の診断の一助として尿中抗原検査が重要になると考えられる。

レジオネラ症は、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発症するため¹⁾、東京都は平成16年に「プール等取締条例」³⁾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⁴⁾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⁵⁾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/100mL 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、令和3年度～令和5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の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

令和3年度～令和5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740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³⁾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のリスクの観点から、「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

レジオネラ属菌の培養法は、既報⁴⁾に従った。

すなわち、試料水1,000 mLを孔径0.22 μmのメンブラン

^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 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

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であるWYO α 寒天平板(栄研化学)とGVPC α 寒天平板(日研生物)各2枚(計4枚)に0.25 mLずつ計1 mL塗布し、37°C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/100mL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(栄研化学)及びウマ脱繊維血液(ジャパン・ラム)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*L. 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. sainthelensi* SG1及び2, *L. jordanis*, *L. anisa*, *L. bozemanae* SG2)を用いて菌種の同定を行った。

(2) 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、リアルタイムPCR法によりレジオネラ属菌の同定を行った。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。CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を用い、Thermal Cycler Dice® Real Time System IIIで測定した。

(3) Multiplex-PCR法による*L. 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、同定できなかったものについて、QIAGEN Multiplex-PCR Kitを用いて、*L. pneumophila*の血清群の同定を行った。遺伝子抽出は(2)と同一の簡易抽出キットを用いて行った。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

リアルタイムPCR法により、レジオネラ属菌と同定できた菌株について、シーケンシング法を用いて菌種の同定を行った。16S rRNA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、3500 Genetic Analyzerで増幅産物の塩基配列を決定した²⁾。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に示す。令和3年度～令和5年度において740検体中147検体(19.9%)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/100mLを超過した検体は、47検体(6.4%)であった。その内訳はプール水490検体中13検体(2.7%)、ジャグジー水等では250検体中34検体(13.6%)で、ジャグジー水等の方が10.9ポイント高かった。

また、10 CFU/100mL未満であるが、レジオネラ属菌が検出された検体は100検体(13.5%)であった。その内訳はプール水では35検体(7.1%)、ジャグジー水等で65検体(26.0%)であった。各年度において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、これは既報⁴⁾と同様の結果であった。

本調査において、プール水に比べてジャグジー水等でレジオネラ属菌が多く検出された要因として、ジャグジー水等はプール水より水温が高く、レジオネラ属菌の至適温度(36°C前後)付近の水温であることが考えられる。

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に示す。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⁷⁾。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の内訳は、残留塩素濃度が0.4 mg/L未満であった6検体のうちの1検体(16.7%)、0.4～1.0 mg/Lを保持していた340検体のうちの10検体(2.9%)、1.0 mg/L超を保持していた144検体のうちの2検体(1.4%)であった。プール水での最大検出菌数は75 CFU/100mLで、この時の残留塩素濃度は0.7 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の内訳は、残留塩素濃度0.4～1.0 mg/Lを保持していた106検体のうちの24検体(22.6%)、1.0 mg/L超を保持していた141検体のうちの10検体(7.1%)であった。ジャグジー水等での最大検出菌数は490 CFU/100mLで、この時の残留塩素濃度は1.0 mg/Lであった。

以上のことから、既報と同様に残留塩素濃度0.4 mg/L以上に維持するのみではレジオネラ属菌の抑制は難しいことが示唆された⁴⁾。

3. 分離されたレジオネラ属菌の血清群及び菌種

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

令和3年度～令和5年度においてレジオネラ属菌が1 CFU/100mL以上検出された検体はプール水で48検体、ジャグジー水等で99検体であった(表1)。これら計147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に示す。プール水、ジャグジー水等からの分離株209株

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 (令和3年度～令和5年度)

	年度	令和3年度	令和4年度	令和5年度	合計
	試料数	153	173	164	490
プール水	1-9 CFU/100mL 検出数 (%)	9 (5.9)	15 (8.7)	11 (6.7)	35 (7.1)
	10 CFU/100mL以上 検出数 (%)	5 (3.3)	4 (2.3)	4 (2.4)	13 (2.7)
	総検出数 (%)	14 (9.2)	19 (11.0)	15 (9.1)	48 (9.8)
	試料数	81	77	92	250
ジャグジー水等	1-9 CFU/100mL 検出数 (%)	26 (32.1)	21 (27.3)	18 (19.6)	65 (26.0)
	10 CFU/100mL以上 検出数 (%)	8 (9.9)	11 (14.3)	15 (16.3)	34 (13.6)
	総検出数 (%)	34 (42.0)	32 (41.6)	33 (35.9)	99 (39.6)
	試料数	234	250	256	740
小計	1-9 CFU/100mL 検出数 (%)	35 (15.0)	36 (14.4)	29 (11.3)	100 (13.5)
	10 CFU/100mL以上 検出数 (%)	13 (5.6)	15 (6.0)	19 (7.4)	47 (6.4)
	総検出数 (%)	48 (20.5)	51 (20.4)	48 (18.8)	147 (19.9)

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 (令和3年度～令和5年度)

種類	年度	残留塩素 濃度 (mg/L)	試料数 (%)	10 CFU/100mL以上 検出数 (%)	検出菌数別試料数内訳 (件)		
					1-9 CFU/100mL	10-99 CFU/100mL	100- CFU/100mL
プール水	令和3年度	>1.0	52 (34.0)*	2 (3.8)**	3	2	0
		≥0.4-≤1.0	99 (64.7)	3 (3.0)	6	3	0
		<0.4	2 (1.3)	0 (0.0)	0	0	0
		計	153 (100.0)	5 (3.3)	9	5	0
	令和4年度	>1.0	54 (31.2)	0 (0.0)	5	0	0
		≥0.4-≤1.0	117 (67.6)	3 (2.6)	10	3	0
		<0.4	2 (1.2)	1 (50.0)	0	1	0
		計	173 (100.0)	4 (2.3)	15	4	0
	令和5年度	>1.0	38 (23.2)	0 (0.0)	0	0	0
		≥0.4-≤1.0	124 (75.6)	4 (3.2)	10	4	0
		<0.4	2 (1.2)	0 (0.0)	1	0	0
		計	164 (100.0)	4 (2.4)	11	4	0
合計	>1.0	144 (29.4)	2 (1.4)	8	2	0	
	≥0.4-≤1.0	340 (69.4)	10 (2.9)	26	10	0	
	<0.4	6 (1.2)	1 (16.7)	1	1	0	
	計	490 (100.0)	13 (2.7)	35	13	0	
ジャグジー水等	令和3年度	>1.0	50 (61.7)	3 (6.0)	12	2	1
		≥0.4-≤1.0	30 (37.0)	5 (16.7)	13	4	1
		<0.4	1 (1.2)	0 (0.0)	1	0	0
		計	81 (100.0)	8 (9.9)	26	6	2
	令和4年度	>1.0	36 (46.8)	1 (2.8)	6	0	1
		≥0.4-≤1.0	40 (51.9)	10 (25.0)	15	8	2
		<0.4	1 (1.3)	0 (0.0)	0	0	0
		計	77 (100.0)	11 (14.3)	21	8	3
	令和5年度	>1.0	55 (59.8)	6 (10.9)	3	4	2
		≥0.4-≤1.0	36 (39.1)	9 (25.0)	14	8	1
		<0.4	1 (1.1)	0 (0.0)	1	0	0
		計	92 (100.0)	15 (16.3)	18	12	3
合計	>1.0	141 (56.4)	10 (7.1)	21	6	4	
	≥0.4-≤1.0	106 (42.4)	24 (22.6)	42	20	4	
	<0.4	3 (1.2)	0 (0.0)	2	0	0	
	計	250 (100.0)	34 (13.6)	65	26	8	

* 各施設の総試料に対する割合

** 10 CFU/100mL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（令和3年度～令和5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. pneumophilla</i>	1群	26 (40.6)	61 (42.1)	87 (41.6)
<i>L. pneumophilla</i>	3群	10 (15.6)	10 (6.9)	20 (9.6)
<i>L. pneumophilla</i>	4群		3 (2.1)	3 (1.4)
<i>L. pneumophilla</i>	5群	3 (4.7)	20 (13.8)	23 (11.0)
<i>L. pneumophilla</i>	6群	8 (12.5)	27 (18.6)	35 (16.7)
<i>L. pneumophilla</i>	7群	3 (4.7)	6 (4.1)	9 (4.3)
<i>L. pneumophilla</i>	8群	4 (6.3)	7 (4.8)	11 (5.3)
<i>L. pneumophilla</i>	9群	1 (1.6)		1 (0.5)
<i>L. pneumophilla</i>	10群		1 (0.7)	1 (0.5)
<i>L. pneumophilla</i>	13群	1 (1.6)		1 (0.5)
<i>L. pneumophilla</i>	2-14群		1 (0.7)	1 (0.5)
<i>L. pneumophilla</i>	SGg4/10*		5 (3.4)	5 (2.4)
<i>L. pneumophilla</i>	SGg6/12*		1 (0.7)	1 (0.5)
<i>L. maceachernii</i> **		3 (4.7)	3 (2.1)	6 (2.9)
<i>L. nautarum</i> **		3 (4.7)		3 (1.4)
<i>L. saintelensi</i> ***		1 (1.6)		1 (0.5)
<i>L. sp.</i>		1 (1.6)		1 (0.5)
計		64 (100.0)	145 (100.0)	209 (100.0)

* Multiplex-PCR

** ラテックス凝集法 (-)

*** ラテックス凝集法 (+)

のうち*L. pneumophila*が198株 (94.7%)を占め、それ以外のレジオネラ属菌がプール水で8株、ジャグジー水等で3株検出された。*L. pneumophila*の血清群の内訳は、プール水では1群が40.6%と高い検出率であり、次いで3群が15.6%、6群が12.5%、8群が6.3%であった。ジャグジー水等でも1群が42.1%と最も高い検出率であったが、次に6群が18.6%、5群が13.8%、3群が6.9%という結果となり、既報における浴槽水からの検出状況と同様であった^{4,6)}。その他の血清群の検出率はいずれも5%未満であった。

また、ジャグジー水等において、4群が3株、10群が1株検出され、12群は不検出であった。この傾向は平成27年度から平成29年度にも見られたが、本報告とは異なる施設での検出であった^{4,6)}。

2) Multiplex-PCR法による血清群の同定

Multiplex-PCR法を用い、交差反応や自己凝集などにより血清群の同定が困難だった*L. pneumophila* 22株の同定を行った。その結果、7群が6株、8群が3株同定できたが、13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⁸⁾、結果が不一致となった13株のうち7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、残り6株については*L. pneumophila* SGg4/10が5株、*L. pneumophila* SGg6/12が1株とした。なお、これらの結果は表3の中に含んでいる。

3) 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、リアルタイムPCR法により*L. spp.*と判定された11株について、シーケンシング法を用いて菌種の同定を行った。その結果、プール水から*L. maceachernii* 3株、*L. nautarum* 3株、*L. saintelensi* 1株、ジャグジー水等から*L. maceachernii* 3株の同定ができた。また、シーケンシング法でも同定不能であった株が1株あった。

ま と め

令和3年度～令和5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740件について、レジオネラ属菌の検出状況を調査し、以下の結果を得た。

1. 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/100mL未満)」を超過した割合は6.4%であった。その内訳は、プール水で2.7%、ジャグジー水等では13.6%であった。

2. レジオネラ属菌が水質基準値未満 (10 CFU/100mL未満) ではあるが検出された割合は13.5%であった. その内訳は, プール水では7.1%, ジャグジー水等では26.0%であった.
3. プール水において, 遊離残留塩素濃度が0.4 mg/L未満の検体の16.7%, 0.4~1.0 mg/L以下の検体の2.9%, 1.0 mg/L超の検体についても1.4%からレジオネラ属菌が水質基準を超過して検出された.
4. ジャグジー水等において, 残留塩素濃度が0.4~1.0 mg/L以下の検体の22.6%, 1.0 mg/L超の検体についても7.1%からレジオネラ属菌が水質基準を超過して検出された.
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, 6群, 8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, 3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. 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22株について, Multiplex-PCR法により7群が6株, 8群が3株, SGg4/10が5株, SGg6/12が1株同定できた.
7. *L. spp.*11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. maceachernii* 3株, *L. nautarum* 3株, *L. saintelensis* 1株, ジャグジー水等から*L. maceachernii* 3株を同定できた. また, シーケンシング法でも同定不能であった株が1株あった.

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) レジオネラ研究者の会: レジオネラ属菌を知る, 第2版, 33-45, 2021年, 株式会社M'sクリエイト, 神奈川県
- 2) 国立感染研究所, 病原体検出マニュアル: レジオネラ症, 28-38, 令和2年9月1日改訂
- 3) プール等取締条例, 昭和50年3月12日, 東京都条例第22号, 令和5年12月13日改正
- 4) 市川めぐみ, 辻 麻美, 武藤千恵子, 他: 東京都健安研七 年 報, **66**, 289-296, 2015
- 5) 山本和興, 武藤千恵子, 田部井由紀子, 他: 東京都健安研七 年 報, **69**, 253-260, 2018
- 6) 鈴木 滯, 武藤千恵子, 梅津萌子, 他: 東京都健安研七 年 報, **73**, 247-252, 2022
- 7) 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5年12月13日改正
- 8) Nakae R, Quin T, Morita M, et al.: J Clin Microbiol., 59:e0015721, 2021. doi:10.1128/JCM.00157., 1-11, 2021

**Surveys on *Legionella* species in water samples from approved swimming pools and whirlpools
in Tama District and Island areas, Tokyo (April 2021-March 2023)**

Sae OOTANI^a, Chieko MUTO^a, Moeko UMETSU^a, Yasuhiro TAKAKU^a, Kazuyoshi TANAKA^a, Teruaki KINOSHITA^a, and Akiko INOMATA^a

To prevent Legionnaires' disease in Tokyo, 740 water samples from approved swimming pools and whirlpools in the Tama district and the island areas in Tokyo were surveyed for *Legionella* contamination from April 2021 to March 2023. The water quality standard of "not detected" (<10 CFU/100mL) for *Legionella* was exceeded in 6.4% of cases. The breakdowns were 2.7% and 13.6% for swimming pool water and whirlpool water, respectively. Of the 147 samples in which *Legionella* spp. was detected, 209 strains were identified using antiserum, multiplex-PCR, and real-time PCR. The results revealed that *Legionella pneumophila* accounted for 94.7% of the total number of 198 isolates. Sequencing of *L.* spp. isolates resulted in the identification of *L. maceachernii*, *L. nautarum*, and *L. sainthelensi*.

Keywords: *Legionella* species, Legionellosis, pool water, whirlpool, free residual chlorine, serogroup, genetic screening method

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