

平成 28-30 年度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
「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」
平成 28 年度分担研究報告書

「入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査」

研究分担者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
研究分担者	泉山信司	国立感染症研究所
研究協力者	縣 邦雄	アクアス株式会社
研究協力者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
研究協力者	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所
研究協力者	政岡智佳	神奈川県衛生研究所
研究協力者	中嶋直樹	神奈川県衛生研究所

研究要旨

入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染の実態を明らかにし、汚染予防対策を確立することを目的として調査を行った。神奈川県内の 1 入浴施設において、カラン・シャワーにレジオネラ属菌による汚染があり、段階的に対策を実施し、その効果を検証した。カラン・シャワーの営業前の流水とシャワーヘッドの消毒ではレジオネラ属菌の汚染を取り除くことはできなかった。続いてカランおよびシャワーの交換を行ったが、検査によりレジオネラ属菌が検出された。さらに、高置貯湯槽とカラン・シャワー及びその間の配管に高濃度塩素消毒を施したところ、レジオネラ属菌は培養にて検出されなくなった。医療機関については、これまでの調査により給水系がレジオネラ属菌に汚染されていることが明らかとなっている。そこで、医療機関の給水系・給湯系の状況及び給水系の理化学項目の測定結果とレジオネラ属菌による汚染の関連性を明らかにすることを試みた。その結果、今年度の調査では関連性を明らかにすることはできなかった。

A. 研究目的

本調査は、入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染を調査し、汚染予防対策ならびに感染症予防対策を策定するための基礎的情報を得ることを目的として実施した。調査の対象は入浴施設ならびに医療

機関の給水・給湯設備とした。

B. 研究方法

1) 試料の採取

調査の対象は、神奈川県内の 1 入浴施設、
3 医療機関とし、医療機関との比較対象と

して 1 研究機関を加えた。調査の試料は水試料とした。

入浴施設では浴槽水、湯口水、蛇口水、シャワー水を水試料として採取した。医療機関及び研究機関では、洗面台の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。レジオネラ属菌及び従属栄養細菌用水試料は、25%チオ硫酸ナトリウム 1.0ml を添加した滅菌容器に 500ml を採取した。シャワーや蛇口からの水は放水直後に採取した。水試料は温度を採取時に、pH を実験室に搬入時にガラス電極法で測定した。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりハンディ水質計“アクアブ”AQ-101 型（柴田科学）を用いて実験室に搬入時に測定した。各試料は冷蔵にて実験室に搬送し、搬入当日に実施する検査まで冷蔵保存した。

2) 理化学項目の測定

水質とレジオネラ汚染の関連性を解析するために、医療機関及び建築物の蛇口水と受水槽から採取した水試料を対象に、以下の理化学項目を常法により測定した。

全有機炭素 (TOC): 湿式酸化法

アンモニア態窒素: グルタミン酸脱水素酵素法

塩化物イオン: アミラーゼ酵素法

カルシウムイオン: フレーム原子吸光法 (JISK 0101-15.2.2)

マグネシウムイオン: フレーム原子吸光法 (JISK 0101-15.3.2)

鉄: フレーム原子吸光法 (JISK0101-60.2)

マンガン: フレーム原子吸光法 (JISK0101-58.2)

亜鉛: フレーム原子吸光法 (JISK0101-52.1)

銅: フレーム原子吸光法 (JISK0101-51.2)

ニッケル: ICP 発光分光分析法 (JISK0101-54.3)

3) Legionella 属菌の分離

試料は直径 47mm、孔径 0.2 μ m のポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、5ml の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した。試料の浮遊液は 0.5ml を 50、20 分の加熱処理を行った。別の 0.5ml に同量の pH2.2 緩衝液を加え、4 分間酸処理した。未処理の試料及び処理後の浮遊液を 50 倍希釈 PBS で 10 倍段階希釈し、原液と 10 倍および 100 倍希釈液の各 100 μ l を MWY 寒天平板培地 (Oxoid) 及び GVPC 寒天平板培地 (日水製薬) に塗抹し、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。Legionella 属菌を疑う集落を BCYE α 寒天平板培地 (Oxoid) に転培し、性状により鑑別を行った。

4) LAMP 法による Legionella 属菌遺伝子の検出

LAMP 法による Legionella 属菌遺伝子の検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) により行った。メンブランフィルターでろ過濃縮後、5ml の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した試料に対して、キット添付の説明書に従って実施した。

5) Legionella 属菌の同定

調査試料から分離された Legionella 属菌は、LEG (genus Legionella 16S rRNA gene) および Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) のプライマーを用いた PCR により Legionella 属菌と *L. pneumophila* であることを決定した^{1, 2)}。さらに、型別用血清 (デンカ生研) より種の

鑑別を行った。

5) 従属栄養細菌数

医療機関から採取した水試料を 50 倍希釈 PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の試料の 1.0ml を R2A 寒天培地 (BD) に接種し、混釈培養法により 25℃ で 7 日間培養した。培養後、集落数を計数した。

6) 給水系への次亜塩素酸ナトリウム添加実験

医療機関における給水系のレジオネラ汚染対策として、給水系に次亜塩素酸ナトリウムを添加し、レジオネラ汚染への効果を検証した。調査対象医療機関の受水槽に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置した。添加量は水道水使用量から計算し、受水槽に一定量の次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し、受水槽での遊離残留塩素濃度が 0.5mg/L となるようにした。

C. 結果及び考察

1) 入浴施設

平成 27 年度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「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」において、3 か所の入浴施設におけるレジオネラ属菌による汚染状況調査を実施したところ、1 か所の入浴施設においてカランとシャワーがレジオネラ属菌に汚染されていることが明らかになった。表 1 では 2015 年 11 月 17 日の結果として示した。この結果を受けて当該施設では、まず対策として 毎日、カランとシャワーの営業前の流水と定期的なシャワーヘッドの塩素によ

る消毒を行った。この対策の効果を調べるために、2016 年 3 月 17 日にレジオネラ検査を実施した。その結果、2015 年 11 月 17 日と同様にカランとシャワーからレジオネラ属菌が検出された。そこで、施設ではカランとシャワーの新品の交換を合わせて実施した。2016 年 7 月 26 日に再度レジオネラ検査を行ったところ、レジオネラ属菌の除去はできていなかった。そこで、施設ではさらに 高置水槽からカランとシャワーまでの配管の高濃度塩素による消毒を 2016 年 11 月 25 日に専門業者に依頼して実施した。2016 年 11 月 26 日にレジオネラ検査を実施したところ、レジオネラ属菌は検出されなかった (表 1)。

当該施設は、源泉からの原湯を地下の貯湯槽に受け、高置水槽に上げて、そこからカランやシャワーに配水するとともに、循環装置の設置された浴槽水の補充に用いている。原湯は約 60℃ あり、カランとシャワーでは原湯と水道水を混合して温度を調整している。水道水は公共水道で、塩素濃度は 0.5mg/L で供給されている。高置貯湯槽からカラン・シャワーまでを消毒したことでレジオネラ属菌が検出されなかった。これにより高置水槽からカラン・シャワーの間にレジオネラ汚染があったことが推測された。夜間や休日に高置貯湯槽とその先の配管中の温度が低下し、それによりレジオネラ属菌が増殖したと推測された。

継続的にレジオネラ属菌の汚染を確認するために、2016 年 11 月 25 日の消毒から 3 か月が経過した 2017 年 2 月 28 日にレジオネラ検査を実施した。

2) 医療機関

(1) 理化学項目とレジオネラ汚染の関連性

3 医療機関と 1 研究機関の給水系・給湯系の状況を表 2 に示した。医療機関 A で使用している水道水の原水は井水で、その他の機関で使用している水道水の原水は表流水であった。医療機関 C では水道水に加え、井水を RO 処理して水道水に加えて利用していた。医療機関 A 及び研究機関 D は独自の塩素添加は行っていなかった。医療機関 B 及び C は独自に塩素添加装置を設置し、給水系の残留塩素濃度を 0.5 及び 0.8mg/L に設定していた。3 医療機関の受水槽の容量は 180~290m³ あった。給湯方式は医療機関 A 及び B は集中方式を採用し、医療機関 C と研究機関 D は複数の建物があり、局所方式と集中方式の両方を採用していた。

各機関の給水系の理化学項目の測定結果をレジオネラ検査の結果を合わせて表 3 に示した。医療機関 A では、後述のように次亜塩素酸ナトリウムの給水系への添加実験を行ったが、理化学項目の測定は添加実験開始前に実施した。3 医療機関の給水系からレジオネラ属菌が検出されているが、検出菌種は異なっていた。研究機関からはレジオネラ属菌は検出されなかった。レジオネラ汚染の有無あるいはその頻度の差と関連すると考えられる項目は、塩素濃度以外には明らかとならなかった。今後、さらに検討を重ねる必要があると考えられる。

(2) 給水系のレジオネラ汚染に対する次亜塩素酸ナトリウムの添加効果

2016 年 12 月 14 日から、医療機関 A の受水槽への次亜塩素酸ナトリウムの添加を開始した。受水槽での遊離残留塩素濃度は、0.6~0.8mg/L で推移した。末端の蛇口での

遊離残留塩素濃度は、0.2~0.4mg/L であった。5 か所の末端の蛇口での初流水の遊離残留塩素濃度を日を変えて 2 回測定したところ、初流水でも 0.1~0.4mg/L (平均 0.26 及び 0.28mg/L) であった。

次亜塩素酸ナトリウム添加前の 2016 年 10 月 6 日に 6 か所の蛇口から採取した水試料では、遊離残留塩素濃度は 0.1mg/L 以下 (平均 0.07mg/L) で、3 か所からレジオネラ属菌が検出された。次亜塩素酸ナトリウム添加を開始し、その効果を判定するための検査は、安定した濃度が継続したと考えられる、開始から 2 か月後の 2017 年 2 月 21 日に実施した。受水槽から採取した 1 水試料及び初流水を採取した 5 水試料では、遊離残留塩素濃度は 0.1~0.4mg/L (平均 0.25mg/L) であった。

当該医療機関は、給湯系は集中方式を採用しており、60 で供給されていた。混合栓の蛇口 (4 か所) では、給水系と給湯系から別々に水試料を採取し、給湯系の遊離残留塩素濃度は 0.05~0.1mg/L (平均 0.09mg/L) であった。

次亜塩素酸ナトリウムの給水系への添加開始後のレジオネラ属菌汚染への効果を検証するために、水試料を採取し、現在調査を進めている。

D. 結論

入浴施設のカラン・シャワーから採取した水試料のレジオネラ属菌による汚染は、高置貯湯槽からカラン・シャワー間でのレジオネラ属菌の増殖が原因であると推測された。塩素消毒後のレジオネラ属菌の再増殖を継続して観察することとしている。

医療機関のレジオネラ属菌による汚染と、

医療機関の給水・給湯系の状況との関連性は明らかにならなかった。また、給水系の理化学項目の測定結果とレジオネラ属菌汚染との関連性も、明らかにならなかった。今後、対象とする医療機関を増やし、レジオネラ属菌汚染と関連する要因を明らかにすることが、予防対策を策定するうえで重要であると考えられる。

E . 文献

1. 山本啓之: PCR 法による *Legionella* 属細菌の検出・同定. 日本臨床, 50 特別号: 394-399, 1992.
2. Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, and Atlas RM : Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular Probes, 4: 175-187, 1990.

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 入浴施設の *Legionella* 属汚染調査

検体	採取日											
	2015年11月17日			2016年3月17日			2016年7月26日			2016年11月26日		
	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数
浴室A 内湯湯口	+	-		+	<i>L. pneumophila</i> SG1	30	-	-		+	-	
浴室A シャワー	-	-		+	-		-	<i>L. pneumophila</i> SG9	10	+	-	
浴室A カラン1	+	<i>L. pneumophila</i> SG9	530	+	<i>L. pneumophila</i> SG1, SG6, SG9	100	+	<i>L. pneumophila</i> SG6, SG9	40	+	-	
浴室A カラン2	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	110	+	<i>L. pneumophila</i> SG9	120	-	<i>L. pneumophila</i> SG9	20	+	-	
浴室B 内湯湯口	+	-		-	-		-	-		+	-	
浴室B カラン1	+	<i>L. pneumophila</i> SG9	80	+	<i>L. pneumophila</i> SG9	10	+	<i>Legionella</i> sp.	100	+	-	
浴室B カラン2	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	690	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	120	-	<i>Legionella</i> sp.	20	-	-	
浴室B シャワー	+	<i>Legionella</i> sp., <i>L. pneumophila</i> SG1	60	ND	ND		-	-		+	-	

菌数：CFU/100ml SG：血清群 ND：実施せず

2015年12月以降、毎日、カランとシャワーの営業前の流水と定期的なシャワーヘッドの塩素による消毒

2016年3月17日以降、カランとシャワーの新品の交換

2016年11月25日に専門業者による高置水槽からカランとシャワーまでの配管の高濃度塩素による消毒

表2 各機関における給水系及び給湯系の状況

機関	A	B	C	D	
配管の材質					
給水	硬質塩化ビニルライニング鋼管 (VA) 埋設部 (HIVP)	水道用内外面硬質塩化ビニルライニング鋼管 水道用硬質塩化ビニルライニング鋼管	ビニルライニング鋼管 (SGP-VA)	塩化ビニルライニング鋼管 (VLP) 水道用硬質塩化ビニルライニング鋼管 (SGP-VA)	
給湯	耐熱性硬質塩化ビニルライニング鋼管 (HTLP)	屋内配管用ステンレス鋼管 ポリブテン管	銅管	耐熱性硬質塩化ビニルライニング鋼管	
塩素の添加	なし	あり	あり	なし	
受水槽の容量(m ³)	250	291	180	5,	58
高置水槽の容量(m ³)	18.75 × 2	33, 17	なし	1.5,	なし
貯湯槽の容量(m ³)	4.5 × 2, 1.5 × 2	6.0	5.0 × 2	なし,	1.2 × 2
水道原水の種類	井水	表流水	表流水	表流水	
井水使用の有無		なし	あり	なし	
給湯方式	集中	集中	局所、集中	局所、	集中
温度					
往き ()	60	60	60	60	
返り ()	55	55	55	55	

機関 D は 2 棟

配管の材質は各協力機関からの回答をそのまま掲載した

表3 医療機関等の給水系における *Legionella* 属汚染と理化学項目及び従属栄養細菌数

機関名	A		B		C		D	
検体数	6		6		6		6	
レジオネラ属菌								
検出(%)	3 (50.0)		4 (66.7)		1 (16.7)		0	
検出菌種	<i>L. pneumophila</i> SG5, <i>L. anisa</i> , <i>Legionella</i> sp.		<i>L. micdadei</i> , <i>L. feeleii</i> SG2, <i>Legionella</i> sp.		<i>L. pneumophila</i> SG1			
菌数 (CFU/100ml)	20, 920, 2160		200,200,300,2900		20			
	平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲
温度()	27.6	21.2-39.7	28.3	19-37.3	22.6	21.1-25.1	23.6	21.7-26.5
pH	7.8	7.7-7.8	7.4	7.4-7.5	7.2	7.0-7.2	7.4	7.3-7.6
TOC(mg/L)	0.07	<0.3-0.4	0.45	0.4-0.5	0.9	0.6-1.2	<0.3	<0.3
NH ₄ ⁺ (mg/L)	<0.1	<0.1	0.03	<0.1-0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Ca ²⁺ (mg/L)	19.2	19.0-20.0	20	18.0-25.0	4.2	4.0-5.0	16.2	15.0-17.0
Mg ²⁺ (mg/L)	6.0	6.0	7.0	7.0	1.0	1.0	4.0	4.0
Cl ⁻ (mg/L)	4.3	4.0-5.0	9.0	9.0	1.8	1.0-2.0	7.2	7.0-8.0
Fe (mg/L)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.01	<0.05-0.06	<0.05	<0.05
Mn (mg/L)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Zn (mg/L)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.04	<0.05-0.18
Cu (mg/L)	<0.05	<0.05	0.01	0.05-0.06	0.01	<0.05-0.05	0.04	<0.05-0.25
Ni (mg/L)	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
遊離残留塩素(mg/L)	0.07	0.02-0.1	0.15	0.03-0.4	0.83	0.68-0.87	0.38	0.03-0.57
HPC(CFU/ml)	41	11-143	5253.4	125-20000	1.2	0-3.0	13.2	0-79400

TOC：総有機炭素、HPC：従属栄養細菌