

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 29 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	大屋日登美	神奈川県衛生研究所
研究協力者	陳内理生	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の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態調査を行い、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 入浴施設においては、カラン・シャワーにレジオネラ属菌による継続的な汚染が検出され、対策を実施して、効果を検証した。高置貯湯槽とカラン・シャワー及びその間の配管への高濃度塩素消毒を施したところ、施術後はレジオネラ属菌は培養にて検出されなくなったが、その後の経過を追ったところ、レジオネラ属菌が検出されるようになった。そこで、高置貯湯槽の前に塩素添加装置を設置し、貯湯槽と配管中の温水の消毒を行うこととした。消毒開始後の調査では、培養によりレジオネラ属菌が検出された。医療機関については、これまでの調査によりレジオネラ属菌汚染が明らかとなっている 3 医療機関の給水系・給湯系の汚染状況を詳細に調査した。その結果、給水系と給湯系のいずれもがレジオネラ属菌により汚染されていた。初流水と 3L 流水後及び 3 分間（9L）流水後に採取した試料のレジオネラ属菌数及び従属栄養細菌数が減少していたことから、レジオネラ属菌及び従属栄養細菌が蛇口とその近辺の配管中で増殖していることが推測された。

A. 研究目的

本調査は、入浴施設及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染の実態を調査し、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入浴施設及び3医療機関とした。

入浴施設では地下の貯湯槽と高置貯湯槽からの各1試料と、男湯と女湯のそれぞれについて浴槽水、湯口水の各1試料を採取した。蛇口とシャワーは男湯と女湯の各2か所と1か所から放水直後に採取した。また、蛇口2か所のうち1か所からの水は3分間流水後にも採取した。レジオネラ属菌用水試料は、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。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。

医療機関では、洗面台の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。給水系の水と給湯系の温水を分けて採取できる蛇口では、水と温水を分けて採取した。蛇口からの放水直後、3L流水後及び3分間(9L)流水後に、*Legionella*

属菌と従属栄養細菌用の500mlとpH及び塩素濃度測定用の50mlの2本ずつを採取した。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。温度、pH、遊離残留塩素濃度の測定及び搬送は、上記の入浴施設のシャワー・カランの試料と同様に行った。

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 \pm 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

調査対象とした 3 医療機関のうち、1 医療機関において、昨年度から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ている。

C. 結果及び考察

1) 入浴施設

調査対象とした入浴施設は、2015 年 11 月 17 日から汚染実態調査を継続的にしている。これまでの結果を整理して表 1 に示した。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が、2016 年 3 月 17 日にレジオネラ検査によりカランとシャワーからレジオネラ属菌 DNA が検出された。次に、カランとシャワーの新品

の交換を合わせて実施したが、2016 年 7 月 26 日のレジオネラ検査ではレジオネラ属菌の除去はできていなかった。そこで、さらに 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を用いた消毒を実施したところ、2016 年 11 月 2 日のレジオネラ検査ではレジオネラ属菌 DNA は検出されたが、培養では菌は検出されなかった。その後、経過観察として 2017 年 2 月 28 日と 5 月 9 日にレジオネラ検査を行ったところ、培養によりレジオネラ属菌が検出された。

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している。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。そこで、地下の貯湯槽と高置貯湯槽の間に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置して給湯水を消毒する対策を行った。この対策の効果を検証するために、2018 年 1 月 30 日に採水を行い、*Legionella* 属菌等の検査を実施した。その結果、給湯栓及びシャワーから採取した試料から *Legionella* 属菌が検出された。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するとともに遊離残留塩素濃度が低下する、あるいは次亜塩素酸ナトリウムの添加が不十分等の原因となって *Legionella* 属菌が増殖したと推測される。今後、添加量を上げて遊離残留塩素濃度を高める等の対応が必要と考えられる。

2) 医療機関

調査に協力いただける神奈川県内の3か所の総合病院（A、B、D）を対象とした。

医療機関 A では、採水場所は5か所（病室洗面台、トイレ洗面台、手術準備室、手術準備室手指洗浄場、受水槽）とし、13試料を2017年8月15日に採取した。*Legionella* 属菌は受水槽を除く、4か所から採取した10試料から、*L. pneumophila* SG1、SG5、*L. feeleii* SG1 及び *Legionella* 属菌（菌種未同定）が検出され、菌数は10～2100 CFU/100mlであった。初流水と3L流水後の試料では、*Legionella* 属菌及び従属栄養細菌数の減少が観察された。医療機関 A では実験的に受水槽に次亜塩素酸添加装置を設置し、効果を検証中であるが、添加装置設置前と比較して手術準備室2での *Legionella* 属菌検出数の減少がみられたことから、一定の効果があったと考えられるが、その他の地点で *Legionella* 属菌の検出数の変化が小さいことから、添加量を増やして遊離残留塩素濃度を上げる等の検討が必要であると考察された。

医療機関 B では、6か所（談話室洗面台1、談話室洗面台2、浴室給湯栓、浴室洗面台、病室1洗面台、病室2洗面台）とし、20試料を2017年8月29日に採取した。*Legionella* 属菌は4か所から採取した11試料から検出され、菌数は40～2000 CFU/100mlであった。医療機関 B においても初流水と3L流水後の試料では、菌数の減少が観察された。

医療機関 D では、6か所（地下控室、倉庫内、病室1洗面台、病室2洗面台、病室3洗面台、病室4洗面台）とし、

18試料を2017年8月22日に採取した。*Legionella* 属菌は2か所から採取した4試料から採取された。

医療機関 A と B では、給水系試料と給湯系試料を同一の蛇口から分けて採取することが可能であったが、両方の系から *Legionella* 属菌が検出された。これは給水系及び給湯系のいずれにおいても *Legionella* 属菌に汚染されていたことが推測された。

D.まとめ

入浴施設及び医療機関の給水系及び給湯系におけるレジオネラ汚染が検出され、汚染の原因は使用頻度の低い蛇口や配管における遊離残留塩素濃度の低下、給湯系における温度の低下が推測された。こうした汚染に対して種々の対策を検討してきたが、確実な効果を得ることができない。今後さらに検討すべき対策として、使用頻度の低い蛇口での流水（フラッシング）、塩素濃度・温度の維持、定期的な配管の消毒、使用頻度の低い蛇口の廃止、レジオネラ対策を踏まえた系の設計・管理等が挙げられる。今後の研究活動の中で継続的に汚染状況の把握と対策の検証を行い、効果的な対策の追及を行っていく必要がある。

E. 研究発表

該当なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 神奈川県内の入浴施設における湯口、シャワー及び給湯栓のレジオネラ属菌汚染状況

検体	2015年		2016年				2017年				2018年			
	11月17日 ¹		3月17日 ²		7月26日 ³		11月2日 ⁴		2月28日 ⁵		5月9日 ⁵		1月30日 ⁶	
	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養
男湯 湯口	+	-	+	<i>L.p.</i> SG1	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
男湯 シャワー	-	-	+	-	-	<i>L.p.</i> SG9	+	-	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG9	+	-
男湯 給湯栓 1	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG1, SG6, SG9	+	<i>L.p.</i> SG6, SG9	+	-	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG9, <i>L.</i> sp.
男湯 給湯栓 2	+	<i>L.p.</i> SG1	+	<i>L.p.</i> SG9	-	<i>L.p.</i> SG9	-	-	+	-	+	<i>L.p.</i> SG6, SG9	-	<i>L.p.</i> SG1
女湯 湯口	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
女湯 シャワー	+	<i>L.p.</i> SG1, <i>L.sp.</i>	ND	ND	-	-	+	-	+	-	-	<i>L.sp.</i>	+	<i>L.sp.</i>
女湯 給湯栓 1	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.p.</i> SG9	+	<i>L.sp.</i>	+	-	+	<i>L.sp.</i>	+	-	+	-
女湯 給湯栓 2	+	<i>L.p.</i> SG1	+	<i>L.p.</i> SG1	-	<i>L.sp.</i>	+	-	+	-	-	-	+	-

L. p. Legionella pneumophila、*L. sp. Legionella sp.*、SG 血清型

- 1 実態調査の初回、2 流水処置実施後、3 カラン・シャワー交換後、4 高濃度塩素による消毒後、5 経過観察、
6 次亜塩素酸添加装置設置後

表 2 医療機関 A における給水・給湯系の *Legionella* 属菌の汚染状況

採取場所	水系	採取時点	温度 ()	pH	遊離残留 塩素濃度 (mg/L)	<i>Legionella</i> 属菌			従属栄養細菌	
						LAMP	培養	菌種	菌数 (CFU/100ml)	菌数 (CFU/ml)
病室	給湯	初流水	31.7	7.8	0.1	+	+	<i>L.p.</i> .SG5, <i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	100	181
	給湯	3L 後	32.0	7.8	0.1	+	+	<i>L.sp.</i>	300	33
	給水	初流水	26.9	7.8	0.3	+	+	<i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	1000	31
	給水	3L 後	26.0	7.8	0.4	-	+	<i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	190	34
トイレ	混合	初流水	25.7	7.9	0.5	+	+	<i>L.p.</i> .SG1, <i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	1000	5300
	混合	3L 後	24.6	7.8	0.6	+	+	<i>L.p.</i> .SG1, <i>L.f.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	300	870
手術準備室 1	給水	初流水	24.4	7.8	0.6	+	+	<i>L.p.</i> .SG1, <i>L.sp.</i>	2100	26
	給水	3L 後	23.7	7.8	0.6	-	+	<i>L.sp.</i>	70	10
	給湯	初流水	38.0	7.8	0.2	-	+	<i>L.sp.</i>	10	380
	給湯	3L 後	47.2	7.8	0.2	-	-			2
手術準備室 2	混合	初流水	28.8	7.9	0.2	-	+	<i>L.sp.</i>	10	4
	混合	3L 後	23.9	7.8	0.5	-	-			3
受水槽			21.1	7.8	0.7	-	-			9

L.p. *Legionella pneumophila*、*L.f.* *Legionella feeleii*、SG 血清型

表 3 医療機関 B における給水・給湯系の *Legionella* 属菌の汚染状況

採取場所	水系	採取時点	温度 ()	pH	遊離残留 塩素濃度 (mg/L)	<i>Legionella</i> 属菌			従属栄養細菌	
						LAMP	培養	菌種	菌数	
									(CFU/100ml)	(CFU/ml)
談話室 1	混合	初流水	30.4	7.5	0	+	+	<i>L.sp.</i>	1710	1160
	混合	3L 後	36.8	7.6	0.1	+	+	<i>L.sp.</i>	2000	219
談話室 2	混合	初流水	37.2	7.5	0	+	+	<i>L.sp.</i>	280	4200
	混合	3L 後	37.7	7.7	1.3	+	+	<i>L.sp.</i>	180	139
浴室給湯栓	給水	初流水	26.7	7.5	0	+	-			640
	給水	3L 後	26.5	7.5	1.3	-	-			6
	給湯	初流水	40.9	7.5	0.05	-	-			11
	給湯	3L 後	39.9	7.5	0.1	-	-			6
浴室洗面台	給水	初流水	26.0	7.5	0	-	-			209
	給水	3L 後	26.2	7.5	0.3	-	-			9
	給湯	初流水	26.3	7.5	0.05	-	-			22
	給湯	3L 後	45.9	7.4	0	-	-			12
病室 1 洗面台	給水	初流水	25.9	7.5	0	-	-	<i>L.sp.</i>	100	1100
	給水	3L 後	25.7	7.5	0	-	-	<i>L.sp.</i>	40	38
	給湯	初流水	25.8	7.4	0	+	+	<i>L.m., L.sp.</i>	500	2150
	給湯	3L 後	40.3	7.5	0	-	+	<i>L.m., L.sp.</i>	50	280
病室 2 洗面台	給水	初流水	26.1	7.5	0.2	+	+	<i>L.m., L.sp.</i>	50	257
	給水	3L 後	26.2	7.5	0.3	-	-			275
	給湯	初流水	33.7	7.5	0	+	+	<i>L.m., L.sp.</i>		710
	給湯	3L 後	41.7	7.5	0	+	+	<i>L.m., L.sp.</i>		269

L.m. Legionella micdadei, *L.sp. Legionella sp.*

表 4 医療機関 D における給水・給湯系の *Legionella* 属菌の汚染状況

採取場所	水系	採取時 点	温度 ()	pH	<i>Legionella</i> 属菌				従属栄養細菌	
					遊離残留		菌数		菌数	
					塩素濃度 (mg/L)	LAMP	培養	菌種	(CFU/100ml)	(CFU/ml)
地下控室	混合	初流水	26.6	7.3	1.0	-	-			110
	混合	3L 後	26.6	7.2	0.9	-	-			6
	混合	9L 後	25.5	7.2	1.0	-	-			2
倉庫	混合	初流水	25.6	7.0	0	+	-			35500
	混合	3L 後	25.5	7.2	0	-	-			1220
	混合	9L 後	25.6	7.1	0	-	-			1700
病室 1	混合	初流水	24.8	7.3	0.05	+	+	<i>L.p.SG1</i>	100	13400
	混合	3L 後	23.7	7.3	1.3	+	+	<i>L.p.SG1</i>	10	166
	混合	9L 後	22.5	7.1	1.4	-	-			37
病室 2	混合	初流水	25.9	7.3	0.05	-	-			5800
	混合	3L 後	22.6	7.3	1.2	-	-			3
	混合	9L 後	21.8	7.2	1.1	-	-			3
病室 3	混合	初流水	25.1	7.2	1.0	-	+	<i>L.p.SG1</i>	10	24
	混合	3L 後	25.7	7.3	1.3	+	-			2
	混合	9L 後	23.9	7.3	1.1	-	+	<i>L.p.SG1</i>	10	6
病室 4	混合	初流水	25.5	7.3	0.8	-	-			1
	混合	3L 後	23.9	7.3	1.3	-	-			4
	混合	9L 後	23.4	7.3	1.0	-	-			2

L.sp. Legionella sp.、SG 血清型