

令和元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」
令和元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 | 岡山理科大学 |
| 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 | 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 |

レジオネラ属菌は水環境に広く分布しており、これまでの調査において入浴施設や医療機関の水道の蛇口水から検出されている。いずれもレジオネラ属菌感染症の感染源となりうるため、管理により菌汚染を除くことで感染を予防する必要がある。今年度の調査では、入浴施設の浴槽、カーン並びにシャワー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った。神奈川県内の1入浴施設においては、カーン及びシャワー水からレジオネラ属菌が検出された。当該施設は塩素消毒と貯湯槽の55℃以上の維持による対策がとられているが、レジオネラ属菌が検出された。医療機関については、神奈川県内の3機関の協力を得て、給水・給湯系におけるレジオネラ属菌による汚染を調査した。いずれの医療機関においても給水・給湯系からレジオネラ属菌が検出された。3機関では受水槽に次亜塩素酸ナトリウムを独自に添加し、給水系の遊離残留塩素濃度を高くして管理していた。しかし、蛇口の初流水の塩素濃度が低い試料があり、レジオネラ属菌の検出と関連していた。医療機関の給水系の蛇口水32試料を用いて *L. pneumophila* 計数用キットの評価を行った。培養により4試料から *L. pneumophila* が検出されたがキットでは検出されなかった。これは検出菌数が10~20 CFU/100mlであったことが原因と推測された。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は建物や配管等の人工物の水環境にも広く分布し、こうした環境はレジオネラ感染症の感染源となりうる。本調査は、入浴施設の浴槽と付随する設備（カーン、シャワー）及び医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染状況を継続的に監視し、汚染除去対策等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並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、本調査に協力をいただいている神奈川県内の1入浴施設及び3医療機関（A、B、C）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、2つの浴室のそれぞれについて浴槽水及び湯口水の各1試料を採取した。蛇口とシャワーは各浴室の各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。レジオネラ検査用試料は、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。温度は採取時に、pHは実験室に搬入時に測定した。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、洗面台等の蛇口水、受水槽水を採取した。蛇口からの放水直後、3L流水後にレジオネラ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。検査用試料は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、前述の入浴施設のシャワー・カーンの試料と同様に行った。

2) レジオネラ属菌の分離

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 $^{\circ}$ C、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。

3) LAMP法によるレジオネラ属菌遺伝子の検出

LAMP法によるレジオネラ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。

4) レジオネラ属菌の同定

調査試料から分離されたレジオネラ属菌は、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 によりレジオネラ属菌と *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）より血清型別及び種の鑑別を行った。

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) 一般細菌数

採取した水試料を PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の試料の 1.0ml を標準寒天培地 (日水製薬) に接種し、混釈培養法により 36℃ で 24 時間培養した。培養後、集落数を計数した。

7) *L. pneumophila* 計数用キットの評価

海外において、水道水における *L. pneumophila* 汚染を簡易に検出し、計数も可能であるキットが市販されている。医療機関の給水系を対象にして、キットの評価を行った。

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。今年度は試料を 2019 年 9 月 20 日に採取して解析した。2 つの浴室のそれぞれの浴槽水、湯口水、カラン並びにシャワーの温水及び地下タンクと高置タンクの温水の計 14 試料を採取した。このうち、レジオネラ属菌は浴室 A の 2 つのカラン並びに浴室 B のカランから検出された。浴室 A の 1 つのカランは初流水のみを検査し、*L. pneumophila* SG9 が 10 CFU/100ml 検出された。もう一方のカランでは、初流水は *L. pneumophila* SG 1 が 40 CFU/100ml、3 分間流水後は *L. pneumophila* SG1、6 及び *Legionella* sp. が 200 CFU/ml 検出された。

2017 年 2 月から 2019 年 9 月までの結果を表 1 に示した。2015 年の調査においてレジオネラ属菌が検出されたことから、①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、②カランとシャワーの新品の交換、③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という対策を行った。カランとシャワーの消毒や交換は効果がなかった。高濃度塩素による消毒によりレジオネラ属菌は検出されなくなったが、しばらくすると再度検出されるようになった。そこで、2018 年に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。これにより菌数の減少はみられたが、*L. pneumophila* が検出された。

当該入浴施設では、次亜塩素酸ナトリウムによる消毒及び貯湯槽の55℃以上の高温水による管理を行っている。こうした管理下でのレジオネラ属菌の検出は、滞留等による塩素濃度及び温度の低下が原因の一部であることが推測される。塩素と温度で管理を行う場合は、配管等における滞留や循環の停止による塩素濃度や水温の低下に留意した衛生管理が求められる。令和元年9月19日に発せられた公衆浴場における衛生等管理要領では、「浴槽に湯水がある時は、ろ過器及び消毒装置を常に作動させること」が追加されている。入浴施設の休館日等で入浴を止める場合にも塩素濃度や水温の低下が起きないようにすることで生物膜の形成やレジオネラ属菌の増殖を防ぐことが必要とされている。今後、滞留の有無の確認や滞留に留意した管理の検討が必要と思われる。

2) 医療機関

医療機関 A では、採水場所は5か所（病室洗面台1か所、トイレ洗面台1か所、手術準備室1か所、手術室手指洗浄場1か所、受水槽1か所）とし、13試料を2019年9月17日に採取した。レジオネラ属菌は受水槽及び手術室手指洗浄場を除く、3か所から採取した7試料から、*L. pneumophila* SG1、*L. feeleii* SG1、*L. anisa* 及び *Legionella* sp.（菌種未同定）が検出され、菌数は10～2000

CFU/100mlであった（表2）。

医療機関 A では末端の遊離残留塩素濃度が高いところでは1.0mg/L程度となっているが、初流水の濃度が0.04mg/Lの病室の蛇口水ではレジオネラ属菌が高い菌数で検出された。0.4mg/Lを超える濃度の試料水でもレジオネラ属菌が検出された。

医療機関 A の蛇口水の遊離残留塩素濃度が0.4～1.0mg/Lと高いにもかかわらずレジオネラ属菌が検出されているのは、蛇口水のpHが8.0を超えていることが関連していると推測される。レジオネラ属菌対策を行う際に、水道水のpH調整を行うことも考慮する必要があると考えられる。

医療機関 B では採水場所は6か所（談話室洗面台2か所、浴室給湯栓1か所、浴室洗面台1か所、病室洗面台2か所）とし、20試料を2019年9月26日に採取した。レジオネラ属菌は6か所17試料から *L. feeleii* SG1、*L. anisa* 及び *Legionella* sp.（菌種未同定）が検出され、菌数は10～97,000 CFU/100mlであった（表3）。

医療機関 B では末端の遊離残留塩素濃度が高い試料では0.5mg/L程度であり、初流水の濃度が0.44mg/Lの蛇口水からはレジオネラ属菌は検出されなかったが、塩素濃度が低い蛇口水では検出された。病室や談話室等で蛇口を使用しないことにより水道水が滞留して塩素濃度が低下し、生物膜の形成やレジオネラ属菌の増殖が起きたことが推測される。このことから、フラッシングによって塩素濃度を高く保つことがレジオネラ属菌増殖防止に効果があると思われ

る。給湯系においても、初流水の水温が低い結果となっており、フラッシングが必要と考えられる。

医療機関 C では、6 か所（地下控室 1 か所、倉庫内 1 か所、病室洗面台 4 か所）とし、12 試料を 2019 年 9 月 30 日に採取した。病室の 2 か所から採取した 4 試料から、*L. pneumophila* SG1 が検出され、菌数は 10 ~ 20 CFU/100ml であった（表 4）。

医療機関 C では末端の遊離残留塩素濃度が高い試料では 0.8~1.2mg/L であるが、*L. pneumophila* が検出された試料の濃度は 0.8~1.1mg/L であった。一方で、ほとんど塩素が消失していた 3 試料では、従属栄養細菌数は高かったが、レジオネラ属菌は検出されなかった。遊離残留塩素濃度が高い試料でレジオネラ属菌が検出され、低い濃度の試料で検出されなかった原因は明らかではない。

3) *L. pneumophila* 計数用キットの評価

医療機関 B の 6 か所 20 試料及び C の 6 か所 12 試料を用いて、*L. pneumophila* 計数用キット（レジオラート：アイデックスラボラトリーズ）による *L. pneumophila* の計数を試みた。医療機関 B の 20 試料ではレジオラートの結果はすべて不検出であった。培養では 17 試料から *L. feeleii* SG1、*L. anisa* 及びレジオネラ属菌 (*Legionella* sp.) が検出されたが、*L. pneumophila* は全く検出されておらず、*L. pneumophila* のみを検出するレジオラートの結果は培養の結果

と一致した。

医療機関 C では 12 試料のうち培養で 4 試料から *L. pneumophila* が検出されたが、レジオラートでは不検出であった。培養検査とレジオラートの結果が一致しなかったのは、培養による検出菌数が 10 ~ 20 CFU/100ml と少なかったことが原因と推測された。

今回のレジオラートの評価においては、*L. pneumophila* 以外の菌種 (*L. feeleii*、*L. anisa* 及び *Legionella* sp.) の菌数が最高 10^4 CFU/100ml であるにもかかわらず陽性を示さなかったことから、特異性が高いことが示された。しかし、*L. pneumophila* の検出菌数が 10~20 CFU/100ml と少ない試料ではレジオラートが陽性反応を示さなかった。レジオラートの感度について、さらに解析する必要があることが示された。

D. まとめ

入浴施設の調査では、塩素消毒と貯湯槽の 55℃ 以上の維持により管理しているが、カランとシャワー水からレジオネラ属菌が検出された。滞留等による塩素濃度あるいは温度の低下を防ぎ、菌増殖を抑える衛生管理が必要と思われる。

医療機関については、いずれの機関も給水系に独自に次亜塩素酸ナトリウムを添加する管理を行っている。遊離残留塩素が通常の水道水よりも高い濃度での管理を行っており、限定的ではあるが効果が出ている。一方で、pH の影響が推測される効果の

低減もあり、さらに解析する必要がある。蛇口の使用頻度が低い場合には配管中の遊離残留塩素濃度は低くなり、それにより生物膜の形成やレジオネラ属菌の増殖が起きるとされている。これは調査対象とした蛇口の試料の解析結果でも示されている。

医療機関の給水系の蛇口水 32 試料を用いて *L. pneumophila* 計数用キットの評価を行った。培養により 4 試料から *L. pneumophila* が検出され

たがキットでは検出されなかった。これは検出菌数が 10 ~ 20 CFU/100ml であったことが原因と推測された。

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 入浴施設におけるレジオネラ属菌の検出状況 (2017~2019年)

検体	2017年						2018年						2019年		
	2月28日			5月9日			1月30日			10月2日			9月20日		
	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数	LAMP	培養	菌数
浴室A 湯口	+	-		-	-		+	-		-	-		-	-	
浴室A シャワー	+	<i>L. p.</i> SG9	X	+	<i>L. p.</i> SG9	1000	+	-		-	-		-	-	
浴室A カラン1	+	<i>L. p.</i> SG9	3000	+	<i>L. p.</i> SG9	1000	+	<i>L. p.</i> SG9, <i>L. sp.</i>	170	-	<i>L. p.</i> SG1, SG9	10	-	<i>L. p.</i> SG9	10
浴室A カラン2	+	-		+	<i>L. p.</i> SG6, SG9	1000	-	<i>L. p.</i> SG1	200	+	<i>L. p.</i> SG1, SG9	400	+	<i>L. p.</i> SG1, SG6, <i>L. sp.</i>	200
浴室B 湯口	-	-		-	-		+	-		-	-		-	-	
浴室B シャワー	+	-		-	<i>L. sp.</i>	10	+	<i>L. sp.</i>	20	+	-		-	-	
浴室B カラン1	+	<i>L. sp.</i>	20	+	-		+	-		+	<i>L. sp.</i>	70	-	<i>L. p.</i> SG1	30
浴室B カラン2	+	-		-	-		+	-		-	-		-	-	

表2 医療機関Aの給水・給湯系試料の性状と細菌汚染状況

検体名	水系	種類	温度 (℃)	pH	遊離残 留塩素 (mg/L)	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌	菌数 (CFU/100mL)	一般細菌 菌数 (CFU/100mL)	従属栄養細菌 菌数 (CFU/100mL)
							検出菌			
病室水道 蛇口	給水系	初流水	24.3	8.62	0.04	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1 <i>Legionella sp.</i>	2000	25	24000
	給水系	3L 流水後	26.6	8.54	0.85	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	30	0	77
	給湯系	初流水	35.1	8.46	0.43	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	10	0	46
	給湯系	3L 流水後	35.8	8.38	0.43	+	<i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	40	0	21
トイレ前 洗面台	混合	初流水	24.7	8.06	0.93	+	<i>Legionella pneumophila</i> 血清 群 1 <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1 <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	400	0	680
	混合	3L 流水後	23.3	8.18	1.01	-	<i>Legionella feeleii</i> 血清群 1 <i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	20	0	40
手術室 準備室 水道蛇口	給水系	初流水	25.1	8.10	0.98	-	不検出		0	19
	給水系	3L 流水後	24.3	8.11	1.00	-	<i>Legionella feeleii</i> 血清群 1	10	0	4
	給湯系	初流水	41.7	8.05	0.33	-	不検出		0	4
	給湯系	3L 流水後	52.9	8.04	0.48	-	不検出		0	1
手術室洗浄 水道蛇口	混合	初流水	30.7	8.06	0.57	-	不検出		0	6
	混合	3L 流水後	38.1	7.91	0.75	-	不検出		0	5
受水槽	混合	初流水	22.2	7.90	0.99	-	不検出		0	9

表3 医療機関Bの給水・給湯系試料の性状と細菌汚染状況

検体名	水系	種類	温度 (°C)	pH	遊離残 留塩素 (mg/L)	LAMP (核酸 検出)	レジオネラ属菌		一般生菌 菌数 (CFU/mL)	従属栄養細菌 菌数 (CFU/mL)
							検出菌	菌数 (CFU/100mL)		
談話室右	加温装置	初流水	39.4	7.68	0.01	+	<i>Legionella</i> sp.	200	0	2700
	加温装置	3L 流水後	41.7	7.61	0.10	+	<i>Legionella</i> sp.	200	0	360
談話室左	加温装置	初流水	41.3	7.52	0.01	+	<i>Legionella</i> sp.	4000	0	6300
	加温装置	3L 流水後	41.2	7.50	0.15	+	<i>Legionella</i> sp.	200	0	1300
個室洗面	給水系	初流水	25.1	7.44	0.02	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	40	0	310
	給水系	3L 流水後	25.2	7.35	0.36	+	<i>Legionella</i> sp.	40	0	34
	給湯系	初流水	28.3	7.31	0.01	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	280	0	550
	給湯系	3L 流水後	45.9	7.27	0.02	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	200	0	37
4人部屋 洗面	給水系	初流水	24.1	7.27	0.44	+	不検出		0	37
	給水系	3L 流水後	23.8	7.22	0.46	-	不検出		0	7
	給湯系	初流水	39.1	7.22	0.02	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	200	0	42
	給湯系	3L 流水後	42.8	7.21	0.01	+	<i>Legionella anisa</i> <i>Legionella</i> sp.	100	0	41
ナース ステー ション 流し	給水系	初流水	25.8	7.14	0.02	-	<i>Legionella feeleii</i> SG1	330	1400	>30000
	給水系	3L 流水後	25.4	7.16	0.07	-	<i>Legionella feeleii</i> SG1	10	16	200
	給湯系	初流水	33.9	7.15	0.02	+	<i>Legionella feeleii</i> SG1	8800	3600	>30000
	給湯系	3L 流水後	53.2	7.17	0.05	+	<i>Legionella feeleii</i> SG1	800	0	1
浴室 シャワー 付き カラン	給水系	初流水	26.4	7.09	0.02	+	<i>Legionella</i> sp.	97000	0	28000
	給水系	3L 流水後	25.0	7.13	0.35	+	<i>Legionella</i> sp.	8000	0	93
	給湯系	初流水	26.0	7.11	0.01	-	<i>Legionella</i> sp.	150	180	>30000
	給湯系	3L 流水後	26.6	7.08	0.02	-	不検出		0	21000

表4 医療機関Cの給水・給湯系試料の性状と細菌汚染状況

検体名	水系	種類	温度 (°C)	pH	遊離残 留塩素 (mg/L)	LAMP (核酸 検出)	レジオネラ属菌		一般細菌 菌数 (CFU/100mL)	従属栄養細菌 菌数 (CFU/100mL)
							検出菌	菌数 (CFU/100mL)		
地下控室 (水栓)	給水	初流水	24.9	7.38	0.82	-	不検出		1	170
	給水	3L 流水後	24.9	7.37	0.88	-	不検出		1	15
倉庫内 (水栓)	給水	初流水	25.0	7.34	0.00	+	不検出		0	18000
	給水	3L 流水後	25.1	7.36	0.01	-	不検出		0	1500
病室1	給水	初流水	23.6	7.36	0.85	+	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	20	0	1
	給水	3L 流水後	22.4	7.37	1.13	+	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	20	0	0
病室2 (手洗い)	加温装置	初流水	24.5	7.42	0.01	-	不検出		8	2600
	加温装置	3L 流水後	22.3	7.38	1.10	-	不検出		1	9
病室3 (洗面用)	給水	初流水	23.1	7.38	1.08	-	不検出		0	4
	給水	3L 流水後	22	7.36	1.16	-	不検出		0	3
病室4 (洗面用)	給水	初流水	26.1	7.36	0.81	-	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	10	0	67
	給水	3L 流水後	24.0	7.34	1.12	-	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	20	0	7