

令和3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3年度分担研究報告書

「入浴施設及び医療機関のレジオネラ汚染実態調査」

研究代表者	前川純子	国立感染症研究所
○ 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	中嶋直樹	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	島崎信夫	国際親善総合病院
研究協力者	中村麻子	国際親善総合病院

本研究では神奈川県内の1入浴施設においてレジオネラ属菌の汚染実態調査を2015年度から継続してきた。当該施設において、不要配管の切除や次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置などの対策を実施した結果、2015～2018年度には調査対象である8カ所中5カ所から最大3,000 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されていたが、2020年度には最終的に2カ所から60 CFU/100 mLが検出されるのみとなった。この調査ののち、配管内の温泉水の停滞を防ぐことを目的として常時くみ上げポンプを稼働させ、定休日前に原湯の貯蔵タンクに次亜塩素酸ナトリウムを添加する対策が追加された。この対策の評価を目的としてレジオネラ属菌汚染実態調査を実施した。その結果、8カ所中1カ所から20 CFU/100 mLの *Legionella pneumophila* SG 6 が検出された。この入浴施設において、レジオネラ属菌は減少したと考えられるものの、完全な排除には至っておらず、配管の洗浄法の変更などさらなる対策が必要と考えられた。

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染は、病院内の環境管理の重要な課題となっている。調査対象の1医療機関では、これまで次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシングなどの対策を実施してきた。今年度新たな対策として、フラッシングを定期的に行う自動排水装置が導入されたことから、その評価を目的としてレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した。その結果、自動排水装置設置後もレジオネラ属菌が検出された。しかし、20 CFU/100 mL と少ない菌数が、計3回の調査において断続的に検出されたことから、蛇口付近で定着しているのではなく、深部配管のバイオフィームからレジオネラ属菌が供給されているものと考えられた。

A. 研究目的

1) 入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査

本研究では、入浴施設におけるレジオネラ属菌の汚染予防対策のための基礎的情報を得ることを目的として、汚染実態調査を継続してきた。

調査対象の入浴施設では、2015年度の調査開始以降、カラン及びシャワーの交換や次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置、不要な配管の切除等のレジオネラ属菌対策を実施してきた。その結果、2015～2018年度には試験した8カ所中5カ所から最大3,000 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されていたものが、2019年度の調査では3カ所において10～300 CFU/100 mLとなった。2020年度には、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言により、この入浴施設においても1ヶ月程度の休業を余儀なくされた。この休業期間中の衛生管理により、営業再開約1ヶ月後には、1カ所から10 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されるのみとなったものの、約5ヶ月後には2カ所から60 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出された。昨年度の調査以降、この入浴施設においてさらにレジオネラ属菌対策が追加されたことから、その評価を目的として、レジオネラ属菌汚染実態調査を実施した。

2) 医療機関におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査

医療機関でのレジオネラ属菌の汚染は、レジオネラ感染症の院内感染の原因となりうることから、病院内の環境管理の重要な課題となっている¹⁾。このため、レジオネラ

属菌汚染の対策の一環として、本研究では2015年度より、医療機関におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査を継続してきた。その対象である神奈川県内の1医療機関では、これまで、次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置、不要配管の切除、毎朝のフラッシングなどの対策が実施されてきた。今年度新たな対策として、フラッシングを定期的に行う自動排水装置が導入されたことから、その評価を目的としてレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施した。

B. 研究方法

1) 調査対象および測定項目

(1) 入浴施設

調査対象は、神奈川県内の1入浴施設において、2021年10月に試料を採取した。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水、地下タンクおよび高置タンクの温水の計14試料を採取した。

シャワーやカランからの水は放水直後に採取するとともに一部のカランについては放水3分後にも採取した。

採取した試料を用いて、レジオネラ属菌の分離培養・遺伝子検査、温度測定、pH測定および遊離残留塩素濃度の測定を実施した。試料は採取当日に検査を開始した。

(2) 医療機関

医療機関の給水・給湯系を対象とした調査は、「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究(研究代表者:松井佳彦)」と共同で実施した。

神奈川県内の1医療機関において、令和3年7月に6カ所(地下控室1カ所、倉庫内1カ所、病室洗面台4カ所)の洗面台等

の蛇口水を放水直後及び3L流水後、合わせて12試料を採取した。この6カ所のうち自動排水装置を設置した病室洗面台4カ所について2021年8月および同9月にも同様にして試料を採取した。

採取した試料を用いて、レジオネラ属菌の分離培養・遺伝子検査、従属栄養細菌数の測定、一般細菌数の測定、温度測定、pH測定及び遊離残留塩素濃度の測定を実施した。試料は採取当日に検査を開始した。

2) 試料の採取、温度測定、pH測定および遊離残留塩素濃度の測定

水試料は25%チオ硫酸ナトリウム1.0mLを添加した500mLの滅菌容器に採取した。温度は、試料採取時にデジタル温度計を用いて測定した。pHおよび遊離残留塩素濃度測定用試料は50mL遠沈管に採取した。実験室搬入時に、pHはガラス電極法を用いて、遊離残留塩素濃度はDPD法による吸光度法として、ハンディ水質計“アクアブ”AQ-101型(柴田科学)を用いて測定した。

3) レジオネラ属菌の分離

試料500mLを、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(以下、濃縮試料とする)。濃縮試料0.5mLについて、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。未処理及び処理後の濃縮試料を50倍希釈PBSで10倍希釈し、原液と10倍及び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。レジオネラ属菌を疑う集落をBCYE α 寒天平板培地(日研生物)に転培し、性状により鑑別を行った。

4) 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。3)の濃縮試料1.5mLを用いて、キット添付の説明書に従って実施した。

5) レジオネラ属菌の同定

試料から分離されたレジオネラ属菌は、LEG(genus *Legionella* 16S rRNA gene)及びLmip(*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene)のプライマーを用いたPCR^{2,3)}によりレジオネラ属菌と*L. pneumophila*であることを決定した。さらに、型別用血清(デンカ生研)及び自発蛍光の有無により種の鑑別を行った。

6) 従属栄養細菌数

試料をPBSで10倍段階希釈し、原液及び各段階の1mLをR2A寒天培地(BD)に接種し、混釈培養法により20 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。培養後、集落数を計数した。

7) 一般細菌数

試料をPBSで10倍段階希釈し、原液及び各段階の1mLを標準寒天培地(日水製薬)に接種し、混釈培養法により36 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。培養後、集落数を計数した。

C. 結果及び考察

1) 入浴施設におけるレジオネラ汚染実態

調査

調査対象とした 1 入浴施設では、地下タンクに原湯を引き込み、汲み上げポンプにより高置タンクへと送ったのち、高置タンクからカラン、シャワー及び浴槽水など施設全体に原湯を供給する構造となっている。また、次亜塩素酸ナトリウム添加装置は地下タンクと高置タンクの間設置されている。聞き取りの結果、2020 年度において重点的に実施する衛生管理として以下の 7 点を行っていた。1) 営業日に比色法(DPD 法)により遊離残留塩素濃度を測定し、カラン、シャワーおよび浴槽水で、0.8~2.0 mg/L を維持した。浴槽については、測定時に濃度不足の場合、次亜塩素酸ナトリウムを直接添加した。2) 営業終了時に浴槽の湯を抜き、清掃、その日のうちに湯を満たした。3) ろ過器の逆流洗浄を週 1~2 回実施した。4) 営業日の朝、営業開始前にカランとシャワーのフラッシングを実施した。5) 定休日前日の営業終了後は、次亜塩素酸ナトリウムを浴槽に追加(濃度測定無)し、ろ過器を浴槽の間で 30 分間循環したのち、停止した。6) 定休日には清掃業者による清掃を実施した。7) 年 1~2 回の高濃度塩素洗浄を実施した。

2020 年度の調査結果を踏まえて、以下の対策を追加した。8) 定休日中の遊離残留塩素濃度を高く維持することを目的として、定休日前日の営業終了後、地下タンクに次亜塩素酸ナトリウムを添加した。9) 配管内の温泉水の停滞を防止することを目的として、温泉水の汲み上げポンプを夜間も継続して稼働させ、浴室の各系統につき一つの蛇口を開けた。8)、9) の対策を実施して以降、定休日明けにおいてもカラン等の末端

で遊離残留塩素濃度 1.0~2.0 mg/L を維持していた。

本調査での採水試料は、pH 8.0~8.3 であった。遊離残留塩素濃度については、地下タンクで 0.01 mg/L、浴室 A 浴槽水で 0.1 mg/L、浴室 A の湯口で 0.4 mg/L であったのを除き、0.6~1.3 mg/L であった。水温は地下タンクが 57.3 °C、高置タンクが 55.3°C、その他は 32.7~47.2°C であった。分離試験では、浴室 A のカラン 2 から *L. pneumophila* SG 6 が 20 CFU/100 mL 検出されたのみであった(表 1)。2019 年度の調査では、浴室 A のカラン 1 及び 2、浴室 B のカラン 2 から 10~200 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG1、6、9 及び *Legionella* sp. が検出されており、2020 年度の調査では、営業再開約 5 ヶ月後に浴室 A の 2 カ所のカランから、それぞれ 60 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6、9 及び *Legionella* sp. が検出されていた。本年度の調査において、レジオネラ属菌が検出されたカランの数および菌数が減少していることから、この施設におけるレジオネラ属菌が減少した可能性があると考えられた。これは、2020 年度の調査以降に新たに導入された対策により、配管内の温泉水の停滞が防がれたために高い遊離残留塩素濃度が維持されたことが影響しているものと考えられた。加えて、定休日前に地下タンクに次亜塩素酸ナトリウムを添加することも遊離残留塩素濃度の維持に役立っているものと考えられた。一方で、次亜塩素酸ナトリウム水溶液は pH がアルカリ側の場合、次亜塩素酸イオンの割合が高くなることから、pH が酸側の場合と比較して、微生物に対する効果は低くなるとされている。我々の室内実験においても、pH8.0 の場合に pH7.0 の場合よ

りもレジオネラ属菌に対する消毒効果が低くなることが確認された⁴⁾。また、2019年度の医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査では、pHが7.9～8.6と高い値を示した医療機関において、遊離残留塩素濃度が0.93 mg/Lと高い値であっても、400 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出された¹⁾。本研究において調査した入浴施設の温泉水もpH 8.0～8.3であることから、次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が低くなっていると考えられた。しかし、定期的な配管の高塩素濃度洗浄やろ過器の逆流洗浄といった対策に加えて、フラッシングやポンプ稼働による配管内の温泉水の停滞防止といった、遊離残留塩素濃度を維持するための対策を実施することで、レジオネラ属菌の抑制に一定の効果を示しているものと考えられた。

各浴室の浴槽水および高置タンクについてはこれまで同様、レジオネラ属菌の分離培養、LAMPともに陰性であった。地下タンクについては2019年度までは分離培養及びLAMPのいずれでも陰性であった。しかし、2020年度の調査に引き続き、今年度も分離培養は陰性であるもの、LAMPは陽性であった。2020年度の休業期間中に地下タンクに侵入・定着したレジオネラ属菌が排除されていないものと考えられた。しかし、地下タンクと高置タンクの間次亜塩素酸ナトリウム添加装置が設置されていること、2020年度の営業再開後の調査で、地下及び高置タンクの温度が54.9℃以上となっており、今年度の調査でも55.7℃以上と高温が保たれていること、および高置タンクからはレジオネラ属菌が検出されていないことから、地下タンクに定着したレジオ

ネラ属菌が高置タンク以降の配管内で定着している可能性は低いものと考えられた。

今年度の調査から、この入浴施設においてレジオネラ属菌が減少している可能性が示されたものの、浴室Aのカラン2からは継続して、*L. pneumophila* SG 6が検出された。2018年度から2020年度までにこのカランから検出された*L. pneumophila* SG 6を用いて、次世代シーケンサーによるSingle Nucleotide Polymorphisms (SNPs)解析を実施したところ、最大で4 SNPsの違いしかなく、非常に近縁であり、同一のクローンを起源とする*L. pneumophila* SG 6が継続して検出されているものと考えられた⁵⁾。今年度検出された*L. pneumophila* SG 6について、SNPs解析は実施していないものの、同じ*L. pneumophila* SG 6が継続して検出された可能性がある。

この入浴施設ではレジオネラ属菌の完全な排除には至っておらず、衛生管理方法によっては、再び増加する可能性がある。今後は配管の個別洗浄や消毒方法の変更などさらなる対策を追加するとともに、汚染実態調査によるモニタリングを継続することが重要と考えられた。

2) 医療機関でのレジオネラ属菌の汚染実態調査

2021年7月の試験では、調査した12試料全てにおいてLAMPおよび分離培養のいずれにおいてもレジオネラ属菌は陰性であった(表2)。このうち、倉庫については、2019年11月に、残り3カ所については2021年3月に自動排水装置が設置されていた。1ヶ月後の8月の試験では、自動排水装置が設置された4カ所中、1病室1試料から

20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG1 (LAMP 陰性) が検出された。この結果を受けて、自動排水装置をそれまでは 3 時間に 1 分間稼働し、フラッシングしていたのを 1 時間に 1 分間稼働するように変更した。この変更後 12 日目に 3 回目となる 9 月の試験を実施した。その結果、2 病室 2 試料から 20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG1 (ともに LAMP 陽性) が検出された。

従属栄養細菌は 7 月の試験では 6 ヶ所 12 試料すべてで、 $1.0\sim 6.8\times 10^3$ CFU/mL の発育を認めた。8 月、9 月の試験においても調査した 4 ヶ所 8 試料すべてにおいて、 $2.0\sim 8.9\times 10$ CFU/mL の発育を認めた (表 2)。遊離残留塩素濃度は今年度の調査に使用したすべての試料で、0.67 mg/L 以上を示し、pH は 7.3~7.8、水温は 20.6~24.8°C であった。

従属栄養細菌は控室の試料において、最大を示し、 6.8×10^3 CFU/mL まで発育しているものの、この場所からはレジオネラ属菌は検出されなかった。倉庫においては、自動排水装置設置前の 2019 年度の調査では、 1.8×10^4 および 1.5×10^3 CFU/mL であったのが、設置後は $2.0\sim 6.9\times 10$ CFU/mL と減少した。しかし、その他の自動排水装置を設置した場所では、設置前から従属栄養細菌数が $0\sim 6.7\times 10$ CFU/mL と低く抑えられており、変化は認められなかった。

協力医療機関ではこれまでも毎日フラッシングを実施しており、今年度の調査でも遊離残留塩素濃度が 0.67 mg/L 以上と高く維持されていた。加えて、レジオネラ属菌は、自動排水装置設置後、一度不検出となり、その後、20 CFU/100 mL と少ない菌数が断続的に異なる蛇口から検出されていることから、蛇口付近で定着しているのではな

く、配管の深部に存在するレジオネラ属菌のバイオフィームの一部が剥がれ落ちるなどしたものが検出されたともと考えられた。

D. 参考文献

1. 黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、陳内理生、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、「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」、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「公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」(研究代表者、前川純子)、令和元年度分担研究報告書より
2. 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.
3. Mahbubani MH, et al.: Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Molecular and Cellular Probes*, 4: 175-187, 1990.
4. 泉山信司、黒木俊郎、中嶋直樹「レジオネラの塩素消毒に対する水道水の pH の影響」、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「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究」(研究代表者 松井 佳彦) 令和 2 年度協力研究報告書より
5. 黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、陳内理生、鈴木美雪、政岡智佳、中嶋直樹、「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」、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「公衆浴場におけるレジオネ
ラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛
生管理手法の開発のための研究（研究代
表者、前川純子）」令和2年度分担研究報
告書より

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

E. 健康危険情報

なし

表1 入浴施設におけるレジオネラ属菌の検出結果

	2019年				2020年				2021年						
	9月		5月(営業再開前日)		7月		9月		10月		11月		10月		
	LAMP	培養	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	LAMP	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	
浴室A	湯口	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-	
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-	
	カラン1	-	L. p. SG9 10	-	-	-	-	-	L. p. SG9 10	-	L. p. SG9 10	-	L. p. SG9 60	-	-
	カラン2	+	L. p. SG1 L. p. SG6 L. sp. 200	+	L. p. SG6 L. sp. 80	+	L. p. SG6 10	+	L. p. SG6 L. sp. 20	-	L. sp. 20	+	L. p. SG6 L. sp. 60	+	L. p. SG6 20
浴室B	湯口	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-	
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	N. T.	N. T.	-	-	-	-	
	カラン1	-	-	-	-	-	-	-	L. sp. 10	-	-	+	-	-	-
	カラン2	-	L. p. SG1 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
地下タンク	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	

L. p. : *L. pneumophila*、L. sp. : *Legionella* sp.、+ : 陽性、- : 陰性、N. T. : not tested ※2020年10月は給水系の試料水を採取した。

表2 医療機関蛇口におけるレジオネラ属菌の検出状況

			2019年			2020年			2021年								
			9月			10月			7月		8月			9月			
			LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌 培養 (CFU/100 mL)	従属栄養 細菌 CFU/mL
控室	給水	初流水	-	-	1.7×10 ²	-	-	1.0×10 ³	-	-	6.8×10 ³	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
	給水	3L流水後	-	-	1.5×10	-	-	5.4×10	-	-	3.9×10	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
倉庫 (自動排水装置： 2019年11月設置)	給水	初流水	+	-	1.8×10 ⁴	-	-	5.6×10	-	-	9.0	-	-	3.1×10	-	-	6.9×10 ¹
	給水	3L流水後	-	-	1.5×10 ³	-	-	2.0	-	-	1.7×10	-	-	3.3×10	-	-	2.5×10 ¹
A病棟病室1 (自動排水装置： 2021年3月設置)	給水	初流水	+	<i>L. p</i> SG1 20	1.0	-	-	0	-	-	4.0	-	-	2.0×10	-	-	1.1×10 ¹
	給水	3L流水後	+	<i>L. p</i> SG1 20	0	+	-	0	-	-	1.0	-	-	5.2×10	+	<i>L. p</i> SG1 20	9.5
A病棟病室2	加温装置	初流水	-	-	2.6×10 ³	-	-	2.9×10	-	-	5.3×10 ³	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
	加温装置	3L流水後	-	-	9.0	-	-	0	-	-	1.2×10 ²	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
B病棟病室1 (自動排水装置： 2021年3月設置)	給水	初流水	-	-	4.0	-	<i>L. p</i> SG1 10	5.0	-	-	3.6×10	-	-	1.1×10 ²	+	<i>L. p</i> SG1 20	8.9×10 ¹
	給水	3L流水後	-	-	3.0	-	<i>L. p</i> SG1 20	0	-	-	1.2×10	-	-	3.8×10	-	-	1.1×10 ¹
B病棟病室2 (自動排水装置： 2021年3月設置)	給水	初流水	-	<i>L. p</i> SG1 10	6.7×10	-	<i>L. p</i> SG1 20	2.0	-	-	4.1×10	-	<i>L. p</i> SG1 20	4.9×10	-	-	5.0
	給水	3L流水後	-	<i>L. p</i> SG1 20	7.0	+	-	0	-	-	2.1×10	-	-	1.8×10	-	-	2.0

L. p. : *L. pneumophila*、*L. sp.* : *Legionella sp.*、+ : 陽性、- : 陰性、N. T. : not tested