

令和2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2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

新型コロナウイルス感染症の拡大を原因とした緊急事態宣言に伴う休業が入浴施設におけるレジオネラ汚染に与えた影響を評価することを目的として調査を行った。2015年からレジオネラ属菌の汚染実態調査と対策を継続してきた神奈川県内の1入浴施設において、営業再開前日及び再開後約1、3、5カ月にそれぞれ調査を実施した。前年度では3つの採水箇所において、10~200 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されていたものが、営業再開前日には1カ所から80 CFU/100 mLが、再開の1ヶ月後には同じ採水箇所において10 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出されるのみとなった。これは、休業期間中に定期的に配管内の原湯を入れ替え、循環させるとともに遊離残留塩素濃度を0.8~2.0 mg/Lと高濃度に保ったことによるものと考えられた。しかし、完全な排除には至らず、その後の調査においてレジオネラ属菌が増加している傾向が認められた。このため、今後も調査を継続するとともに新たなレジオネラ属菌対策を実施する必要があると考えられた。

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染は、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。本研究ではレジオネラ属菌と合わせて一般細菌数と従属栄養細菌数を調査し、レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌と一般細菌の指標性を検討した。一般細菌は蛇口水の試料から全く検出されないことから、レジオネラ汚染に関して指標にはならないと考えられた。従属栄養細菌数は、レジオネラ属菌陽性試料で検出される傾向があるとしても、1:1の相関はしなかった。レジオネラ汚染の検討が必要な状況では、指標ではなく、レジオネラそのものを測定することが重要と考えられた。

## A. 研究目的

### 1) 入浴施設におけるレジオネラ汚染実態調査

本研究は、入浴施設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 2015 年から継続してレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施してきた。

調査を開始して以降、この施設では、カラン及びシャワーの交換や塩素添加装置の設置、不要な配管の切除等のレジオネラ対策を実施した。その結果、調査開始当初の 2015 年には検査対象とした 8 か所中 5 か所からレジオネラ属菌が分離されていたが、2019 年の調査では 3 か所まで減少した。分離菌数においても、最大 3,000 CFU/100 mL であったものが、2019 年には 10~300 CFU/100 mL となり、レジオネラ属菌による汚染が減少している傾向が認められた。

本年度、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴う緊急事態宣言が出され、様々な施設が休業した。調査対象の入浴施設においても、4 月から 5 月の約 1 か月間、休業した。このため、この休業期間に、調査対象の入浴施設においてレジオネラ属菌の動態がどのように変化したのかを調べることを目的として調査を実施した。

### 2) 医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ汚染の指標に関する検討

医療機関の給水・給湯系でのレジオネラ汚染は、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<sup>1)</sup>。しかし、レジオネラの培養試験は一般的ではなく、よ

り簡便な細菌検査が指標となることに期待が寄せられることがある。そこで本研究は、一般細菌数と従属栄養細菌数がレジオネラ汚染に対する指標性、有効性の検討を目的とした。

一般細菌数は、ろ過処理や塩素消毒の確認、配水系統での細菌汚染の確認に実施されてきた<sup>2)</sup>。従属栄養細菌数も同様の指標となり、一般細菌数よりも高感度に検出することができるが、培養には長期間（7 日~14 日程度）を要する。これら細菌数の増加は、水の滞留、バイオフィルムの形成といった衛生状態の低下を意味するが、病原細菌の数量と直接の相関をするものではない<sup>2, 3)</sup>。レジオネラ属菌は水中に形成されたバイオフィルム中の原生動物（アメーバ等）を宿主として増殖する菌なので、バイオフィルムの存在、すなわち細菌指標がレジオネラ汚染の可能性を間接的に意味すると期待された。

## B. 研究方法

### 1) 試料の採取

#### (1) 入浴施設

調査対象は、神奈川県内の 1 入浴施設とした。調査の試料は水試料とした。

試料は 5 月の営業再開前日、再開後約 1 ヶ月後の 7 月、約 3 カ月後の 9 月、約 5 カ月後として 10 月、11 月の 2 回の計 5 回採水した。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。ただし、10 月の採水については、上記の採水箇所のうち 2 つの浴室のカラン計 4 カ所において給水系のみを採水し

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。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。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）を用いて実験室搬入時に測定した。各試料は採水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。

調査に協力いただいている神奈川県内の 1 か所の総合病院を対象とした。令和 2 年 10 月 26 日に 7 か所（地下控室 1 か所、倉庫内 1 か所、病室洗面台 4 か所、授乳室 1 か所）の洗面台等の蛇口水を放水直後及び 3L 流水後に採取し、合わせて 16 試料を今年度に試験した。

レジオネラ属菌、従属栄養細菌及び一般細菌検査用の水試料は、25 %チオ硫酸ナトリウム 1.0 ml を添加した滅菌容器に 500 ml を採取し、微生物検査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。pH 及び遊離残留塩素濃度測定用水試料は 50ml 滅菌遠沈管に採取し、冷蔵にて実験室に搬入して、pH をガラス電極法、遊離残留塩素濃度を DPD 法（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。水試料の温度はデジタル

温度計を用いて現場で測定した。

## 2) レジオネラ属菌の分離

試料は直径 47mm、孔径 0.2 $\mu$ m のポリカーボネートメンブレ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 倍希釈し、原液と 10 倍及び 100 倍希釈液の各 100 $\mu$ l を MWY 寒天平板培地（Oxoid）及び GVPC 寒天平板培地（日研生物医学研究所）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 $\alpha$  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。水試料を 5ml に濃縮した試料及びスワブ試料を 50 倍希釈 PBS に浮遊させた試料に対して、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) 及び Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) のプライマーを用いた PCR<sup>7, 8)</sup> 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。

#### 5) 従属栄養細菌数

微生物検査試料を PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の 1 ml を R2A 寒天培地 (BD) に接種し、混釈培養法により 20 °C 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

微生物検査試料を PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の 1 ml を標準寒天培地 (日水製薬) に接種し、混釈培養法により 36 °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

調査対象とした入浴施設は、2015 年 11 月 17 日から継続的に汚染実態調査を実施してきた。この入浴施設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、塩素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。今年度の緊急事態宣言に基づく休業期間中は、3 日に一回程度、汲み上げポンプを稼働させ、新たな原湯を地下タンクに引き込むとともに、施設配管内を循環させ、浴槽水の一部を交換した。ポンプ稼働時はカランのフラッシングを 30 分程度実施するとともに、塩素添加装置を稼働させた。4~5 日に 1 回カラン、シャワー及び浴槽水の遊離残留塩素濃度を測定し、

0.8~2.0 mg/mL に維持されていることを確認した。加えて、浴槽水に別途次亜塩素酸ナトリウムを追加するとともに、地下タンクにも添加した。また、ろ過機の逆洗浄を週 1~2 回実施した。

本研究において、レジオネラ属菌は浴室 A 及び浴室 B のそれぞれ 2 つのカランから検出された。2019 年の調査の際には浴室 A のカラン 2 カ所及び浴室 B のカラン 1 カ所から 10~200 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG1、6、9 及び *Legionella* sp. が検出された。本年度の調査では、営業再開前日には、1 カ所において 80 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 及び *Legionella* sp. が、約 1 カ月後の 7 月には同じ採水箇所から 10 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 が検出されるのみとなった。しかし、営業再開後から約 3 カ月後の 9 月の調査では 3 カ所から 10~20 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6、9 及び *Legionella* sp. が検出され、約 5 カ月後の 11 月の調査では 2 カ所から、それぞれ 60 CFU/100 mL の *L. pneumophila* SG 6 及び 9 が検出された (表 1)。本調査により採取したカラン、シャワー及び湯口からの採水試料は、pH 8.0~8.2 であった。遊離残留塩素濃度は、2019 年度は 0.2~0.4 mg/L であったが、2020 年度は営業再開前日の調査では 1.3~1.9 mg/L で、7 月は 0.1~0.9 mg/L、9 月は 0.5~1.7 mg/L、11 月は 0.4~0.7 mg/L であった。

この入浴施設では緊急事態宣言に伴う休業期間内に、遊離残留塩素濃度を高く保ち、定期的に配管内の原湯を入れ替え、循環させていたことから、レジオネラ属菌が大きく減少したものと考えられた。しかし、レジオネラ属菌の完全な排除には至らず、そ

の後、増加している傾向が認められた。

2020年10月23日に実施した給水系を対象とした調査では浴室Aの2カ所のカランから10~20 CFU/100 mLの*L. pneumophila* SG9及び*Legionella* sp.が検出された(表1)。これらの水試料はpH 7.8~8.1で、遊離残留塩素濃度は、0.3~0.5 mg/Lであった。レジオネラ属菌が検出されたものの、これらのカランは混合栓であることから、ただちに給水系が汚染されているものとは言えず、今後も調査が必要と考えられた。

浴槽水、高置タンクについてはいずれの調査でも分離培養、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、本年度はいずれの調査においても、分離培養は陰性であるもの、LAMPは陽性であった。地下タンク及び高置タンクは、営業開始前日はそれぞれ50.0及び49.6°Cであったものの、その前後の調査では54.9°C以上であった。これらのことから、緊急事態宣言時に原湯を引き込む頻度と量が低下し、温度が低下したことにより、地下タンクに侵入した新たなレジオネラ属菌が定着したのと考えられた。一方で、地下タンクと高置タンクの間塩素添加装置が設置されていること、営業再開後の調査で、地下及び高置タンクの温度が54.9°C以上となっていること、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、現在までのところ、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。

本研究において、この入浴施設では休業中の管理によって、レジオネラ属菌が大幅

に減少したものの、排除しきれなかったレジオネラ属菌が再び増加している可能性が示された。このため、今後も汚染実態調査を継続するとともに、新たなレジオネラ対策の実施が必要と考えられた。

## 2) 医療機関でのレジオネラ汚染の指標の検討

調査した16試料中、2病室の洗面用蛇口3試料から、*L. pneumophila* SG1が検出され、菌数は10~20 CFU/100 mlであった(表2)。一般細菌数はいずれの試料でも不検出であった。一般細菌数は塩素消毒がされていれば滅多に出るものではなく、実際にその通りであった。

従属栄養細菌は8カ所の蛇口のうち7カ所から採取した11試料で発育を認めた。この7カ所のうち給水系の6カ所の蛇口では、初流水と3L流水後の前後で最大2-log(100倍)の菌数の差がみられた。給湯系蛇口では初流水試料と3L流水後のいずれも低い値であったが、水温が56~58°Cと高く、増殖困難な状況と推測された。

この医療機関では給水・給湯系でのレジオネラ属菌の増殖・定着を排除するために水道水の遊離残留塩素濃度を上げ、各蛇口のフラッシングを毎日実施していた<sup>1)</sup>。これまでに実施した調査での、各病室の汚染状況の推移は以下の通りであった(表3)。

病室1の蛇口水は2017年からレジオネラが継続的に検出されている。フラッシングの効果により従属栄養細菌数が大きく減少したが、それでも2019年度にレジオネラがわずかに検出されている。

病室2では、従属栄養細菌数が多かったが、レジオネラは検出されていない。

病室3では、レジオネラが断続的に検出された。従属栄養細菌数は低い傾向にあった。病室4は病室3と同様であった。

上記の結果の範囲では、従属栄養細菌が検出される場合に *L. pneumophila* が検出されることにはならなかった(オッズ比 1.077、95%信頼区間 0.248-4.592)。*L. pneumophila* が検出されても従属栄養細菌がほとんどあるいは全く検出されない試料もあり、バイオフィルムに守られたレジオネラが検出されたり、蛇口から少し離れた配管内で増殖したものが検出されたり、温度の高い環境ではレジオネラが優先して生残したことが想像された。

従属栄養細菌数は、遊離残留塩素濃度が低い蛇口から特に多かった。一方、レジオネラは必ずしもそうではなく、アメーバやバイオフィルム中で守られていることで、塩素濃度との相関が得られていない様子であった。結果には示さないが、レジオネラ菌数と従属栄養細菌数の相関図を作成しても、相関を示唆するような図にはならなかった。もしレジオネラ汚染の検討が必要な状況であれば、指標ではなく、レジオネラそのものを測定することが必要と考えられた。

一般細菌は蛇口水の試料から全く検出されないことから、レジオネラ汚染に関して指標にはならないと考えられた。

#### 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)」より、令和元年度分担研究報告書

2. 日本水道協会、I 総説編 6. 微生物試験。上水試験方法 2011 年版より、日本水道協会、東京、51-52, 2011.
3. WHO, Guidelines for drinking-water quality, fourth edition, ISBN 978 92 4 154815 1, 2011, p. 298.
4. 日帰り温泉施設におけるレジオネラ症集団発生事例ー埼玉県 (IASR Vol. 34 p. 157-158: 2013 年 6 月号)
5. 日帰り入浴施設におけるレジオネラ症集団発生事例と衛生管理上の対策ー神奈川県 (IASR Vol. 37 p. 140-141: 2016 年 7 月号)
6. レジオネラ症 2008.1~2012.12 (IASR Vol. 34 p. 155-157: 2013 年 6 月号)
7. 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.
8. Mahbubani MH, et al.: Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular Probes, 4: 175-187, 1990.

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 レジオネラ属菌の検出結果

	2019年						2020年						
	9月20日		5月28日		7月2日		9月4日		10月23日		11月5日		
	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	
浴室A	湯口	-	-	-	-	-	-	-	-	未実施	未実施	-	-
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	-	未実施	未実施	-	-
	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 60
浴室B	湯口	-	-	-	-	-	-	-	-	未実施	未実施	-	-
	シャワー	-	-	-	-	-	-	-	-	未実施	未実施	-	-
	カラン1	-	-	-	-	-	-	-	L. sp. 10	-	-	+	-
	カラン2	-	L. p. SG1 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L. p. : *L. pneumophila*、L sp. : *Legionella* sp.、+ : 陽性、- : 陰性、菌数: CFU/100m L

※2020年10月23日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菌の検出状況

検体名	水系	種類	温度 (°C)	pH	遊離残留 塩素 (mg/L)	レジオネ ラ属菌	一般 細菌数	従属栄養 細菌数
						CFU/ 100mL	CFU/ mL	CFU/ mL
控室 (水栓)	給水	初流水	23.9	7.3	0.60	0*1	0*2	1.0×10 <sup>3</sup>
	給水	3L 流水後	23.5	7.4	1.09	0	0	5.4×10
倉庫内 (水栓)	給水	初流水	23.0	7.3	0.67	0	0	5.6×10
	給水	3L 流水後	23.1	7.3	0.96	0	0	2.0
病室 1	給水	初流水	21.3	7.5	1.06	0	0	0*2
	給水	3L 流水後	20.2	7.6	1.11	0	0	0
病室 2	給水	初流水	23.6	7.5	0.78	0	0	2.9×10
	給水	3L 流水後	19.2	7.5	1.15	0	0	0
病室 3	給水	初流水	22.0	7.5	0.51	10*3	0	5.0
	給水	3L 流水後	20.8	7.6	1.11	20*3	0	0
病室 4	給水	初流水	23.0	7.7	1.08	20*3	0	2.0
	給水	3L 流水後	21.3	7.7	1.11	0	0	0
給湯器	給湯	初流水	56.0	7.4	0.02	0	0	6.0
	給湯	1L 流水後	58.1	7.5	0.01	0	0	9.0
授乳室 蛇口	給水	初流水	31.9	7.6	0.88	0	0	1.5×10 <sup>2</sup>
	給水	3L 流水後	31.8	7.7	0.88	0	0	5.0

\*1 : <10CFU/100mL \*2 : <1CFU/mL

\*3 : 検出されたレジオネラは全て *L. pneumophila* SG1

表3 レジオネラ属菌と従属栄養細菌の検出状況

検体名	年度	水系	種類	温度(°C)	pH	遊離残留塩素(mg/L)	レジオネラ属菌	従属栄養細菌
							CFU/100mL	CFU/mL
病室1	2017	給水	初流水	24.8	7.3	0.05	100 <sup>*1</sup>	13400
			3L 流水後	23.7	7.3	1.3	10	166
	2018	給水	初流水	23.8	7.0	1.12	0 <sup>*2</sup>	2
			3L 流水後	22.7	7.1	1.26	0	0 <sup>*3</sup>
	2019	給水	初流水	23.6	7.4	0.85	20	1
			3L 流水後	22.4	7.4	1.13	20	0
2020	給水	初流水	21.3	7.5	1.06	0	0	
		3L 流水後	20.2	7.6	1.11	0	0	
病室2	2017	給水	初流水	25.9	7.3	0.05	0	5800
			3L 流水後	22.6	7.3	1.2	0	3
	2018	給水	初流水	25.0	7.0	1.14	0	102
			3L 流水後	23.9	7.1	1.16	0	19
	2019	給水	初流水	24.5	7.4	0.01	0	2600
			3L 流水後	22.3	7.4	1.10	0	9
2020	給水	初流水	23.6	7.5	0.78	0	290	
		3L 流水後	19.2	7.5	1.15	0	0	
病室3	2017	給水	初流水	25.1	7.2	1.0	10	24
			3L 流水後	25.7	7.3	1.3	0	2
	2018	給水	初流水	24.8	7.1	0.98	10	0
			3L 流水後	23.5	7.1	1.26	10	0
	2019	給水	初流水	23.1	7.4	1.08	0	4
			3L 流水後	22.0	7.4	1.16	0	3
2020	給水	初流水	22.0	7.5	0.51	10	5	
		3L 流水後	20.8	7.6	1.11	20	0	
病室4	2017	給水	初流水	25.5	7.3	0.8	0	1
			3L 流水後	23.9	7.3	1.3	0	4
	2018	給水	初流水	24.8	7.1	1.13	0	0
			3L 流水後	23.5	7.1	1.29	0	0
	2019	給水	初流水	26.1	7.4	0.81	10	67
			3L 流水後	24.0	7.3	1.12	20	7
2020	給水	初流水	23.0	7.7	1.08	20	2	
		3L 流水後	21.3	7.7	1.11	0	0	

\*1：検出されたレジオネラは全て *L. pneumophila* SG1

\*2：<10CFU/100mL \*3：<1CFU/mL