

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）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部

令和6年度分担研究報告書

入浴施設におけるレジオネラ汚染の実態調査および分子疫学的解析の活用

研究分担者 黒木俊郎 岡山理科大学 獣医学部

研究分担者 陳内理生 神奈川県衛生研究所 微生物部

○研究協力者 中嶋直樹 神奈川県衛生研究所 微生物部

レジオネラ属菌による汚染に苦慮する入浴施設1か所を対象として、2015年から継続的にレジオネラ属菌による汚染の実態を調査してきた。これまで遊離塩素濃度を高値に保つ対策等を実施してきたが、わずかな汚染が残って完全には排除できておらず、本報告は2022～2024年の状況についてまとめた。レジオネラ属菌の汚染源の可能性がある、循環装置に付随するろ過器を検査の対象として追加するとともに、分離したレジオネラ属菌を分子疫学的方法で詳細に解析した。この期間中の遊離塩素濃度は、およそ高値（各年の中央値: 0.68、1.59および0.36 mg/L）に維持されていた。地下貯湯槽および高置貯湯槽、ならびに浴室1の各試料からは、レジオネラ属菌は分離されなかった。浴室2はろ過器とカランから *Legionella pneumophila* が分離されたものの、カランは2023年に10 CFU/100 mLと低値だったこと、ろ過器は血清群1および血清群9、カランはろ過器とは異なる血清群の6であったことから、レジオネラ属菌の増殖はおよそ抑えられていると考えられた。Sequence-based typing (SBT) および Single nucleotide variant (SNV) の解析によると、2015～2016年に浴室1のカランや浴室2の湯口から分離された株が、浴槽2のろ過器由来株と近縁だった。2016年頃に施設内にレジオネラ属菌による汚染が広がったものの、これまでに実施した対策により汚染が軽減・拡散が防がれて、現在はろ過器および一部の配管に限定的な汚染が残存していると推定された。

A. 緒言

本研究は、レジオネラ属菌による汚染および感染症の予防対策を目的とし、2015年から継続的に入浴施設1か所を対象とした汚染実態の調査をしてきた。対象の入浴施設では、次亜塩素酸ナトリウム添加装置の設置で遊離塩素濃度を高値に保つ対策等を実施し、レジオネラ属菌に汚染された配管の清浄化を目指してい

た。これまでの結果として、2015～2018年度には調査した8か所中5か所（最大3,000 CFU/100 mL）からレジオネラ属菌が検出されたが、2019年度の調査では3か所の検出まで減少していた（10～300 CFU/100 mL）。2020年度の新型コロナウイルス感染症の対策である緊急事態宣言に際しては、休業期間中の衛生管理を徹底することで（配管内の遊離塩

素濃度を継続的に高値に保つ等)、2021 年度には 1 か所 (20 CFU/100 mL) のごくわずかな検出まで汚染が軽減されていた [1]。

本報告ではさらなる低減を目指して実施した、2022~2024 年の調査についてまとめた。これまでと同様の検査に加えて、レジオネラ属菌の供給源を探索するため、その可能性のある、浴槽の循環装置に付随するろ過器を検査対象に追加した。さらに本調査を含む、これまでに分離されたレジオネラ属菌を対象に、Sequence-based typing (SBT) および Single nucleotide variant (SNV) の解析を実施し、汚染状況をより詳細に把握することを目的とした。

B. 研究方法

1. 試料

神奈川県内の入浴施設 1 か所において、2022~2024 年の各 7 月に調査した。2 つの浴室 (浴室 1 および 2) の浴槽、湯口、カラン、シャワー、配管末端放水部 (夜間・休館日等において、常時開口し、配管内循環を維持することを目的として、ボタン式のカラン・シャワーを撤去し、代わりにレバー式の蛇口を設置した部分で、配管の最末端)、ろ過器、地下および高置貯湯槽から、計 18 試料を採水した。シャワーとカランからの試料は、開栓直後の初流水を採水した。一部のカラン試料は、開栓 3 分後 (3 分流水後水) にも採水した。試料は 500 mL をチオ硫酸ナトリウムが添加された滅菌容器に採水し、レジオネラ属菌の分離および従属栄養細菌数の測定に供した。これとは別の 50 mL を遠沈管に採水し、pH (ガラス電極法)、遊離残留塩素濃度 (DPD 法) およびアンモニア態窒素濃度 (インドフェノール法) の測定に供した。温度の測定は、試料採水時にデジタル温度計で実施

した。

2. レジオネラ属菌の分離培養・菌種同定

試料 500 mL を直径 47 mm、孔径 0.2 μm のポリカーボネートメンブランフィルターで吸引ろ過し、濃縮物を 1/50 希釀した PBS の 5 mL に再浮遊した (以下、濃縮液)。濃縮液に対し、前処理は次の方法で行った。酸処理は、等量の pH 2.2 緩衝液を加えて 4 分間静置した。熱処理は、50°C の恒温水槽中で 20 分間静置した。一部濃縮液は、これらの前処理を行わず培養した (未処理)。

各処理液の 100 μL を GVPC 寒天培地 (島津ダイアグノスティクス) および MWY 寒天培地 (関東化学) に塗抹し、36 \pm 1°C で少なくとも 7 日間培養した。レジオネラ属菌を疑うコロニーを BCYE α 寒天培地 (日研生物) に転培し、レジオネラ属菌および *Legionella pneumophila* に特異的なプライマーを用いた PCR 法 [2-3] により菌種同定を行った。*L. pneumophila* だった場合は、レジオネラ免疫血清 (デンカ) を用いて血清群 (Serogroup; SG) を決定した。

3. 従属栄養細菌数

濃縮前の試料を PBS で 10 倍段階希釀し、それらの 1 mL を混釀法により R2A 寒天培地 (BD) に接種した。20°C で 7 日間培養し、集落数を計数した。

4. SBT

European Working Group of *Legionella* Infections (EWGLI) の方法に従った [4]。アルカリ熱抽出法で抽出した DNA を鋳型に用いて、7 つの遺伝子領域 (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) を PCR により増幅後、

サンガー法でそれぞれ塩基配列を決定した。塩基配列をデータベースと比較し、各遺伝子の Allele 番号と sequence type (ST) を決定した。

5. 全ゲノム解析

菌株から DNA をフェノール・クロロホルム法で抽出し、エタノール沈殿法で精製した。QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) を用いてライブラリ調製し、外注により NovaSeq 6000 System (Illumina) を用いてリードデータを得た (Rheliax)。リードデータから snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>) を用いて SNV を抽出し、Gubbins [5] を用いて推定組み換え領域を除去した。マッピングに用いたレファレンス配列は ReferenceSeeker (<https://github.com/oschwengers/referenceseeker>) を用いて選択した。抽出した SNV を基に PopART [6] でネットワーク図を作成した。

C. 結果および考察

2022～2024 年における調査結果を表 1 に示した。

遊離塩素濃度は 2023 年まで高値 (2022 および 2023 年の中央値: それぞれ 0.68 および 1.59 mg/L) に維持されていたが、施設の方針に変更があり、2024 年に中央値 0.36 mg/L まで濃度が低下しており、汚染の悪化が懸念された。

従属栄養細菌数はいずれも低値 (2022～2024 年の中央値: $1.5 \times 10^0 \sim 1.2 \times 10^1$ CFU/mL) を示した。地下貯湯槽および高置貯湯槽、ならびに浴室 1 の各試料からはレジオネラ属菌は分離されなかった。浴室 1 の試料では 2020 年以前の調査でレジオネラ属菌による汚染が確認されていたが、2020 年に実施した休業期間中の衛生管理により清浄化され、

そこから現在まで保たれていることが確認された。このことから少なくとも現状の遊離塩素濃度を維持することで浴室 1 の配管内のレジオネラ属菌の増殖は抑えられると考えられた。

一方、浴室 2 のいくつかの試料ではレジオネラ属菌が分離された。浴室 2 の試料のうち、カラン 4 と一体化しているシャワーとろ過器を除く 7 試料 (シャワーはカラン 4 から分岐していることからほぼ同一であるため、ろ過器は浴槽の循環水を含むため除外した) における、遊離塩素濃度、レジオネラ属菌数および従属栄養細菌数 (中央値) を図 1 に示した。遊離塩素濃度は全試料における傾向と同じで、2022 年は中央値 0.67 mg/L だったのが、2023 年は中央値 1.74 mg/L に上昇し、2024 年度は中央値 0.32 mg/L に低下した。従属栄養細菌数は 2022 年から 2024 年にかけて低値 (中央値: $1.5 \sim 2.5 \times 10^1$ CFU/mL) に抑えられていた。カラン 3 では、2022 年にレジオネラ属菌は分離されたものの、2023 年以降は分離されておらず、2023 年の高い遊離塩素濃度により清浄化された可能性が示唆された。一方、カラン 4 (3 分流水後水) では、2022 年にレジオネラ属菌が分離 (50 CFU/100 mL) され、2023 年に 10 CFU/100 mL まで減少したものの、2024 年に再び 40 CFU/100 mL まで上昇した。カラン 4 は利用頻度が低いのかもしれません、このため遊離塩素によるレジオネラ属菌に対する消毒効果が得られにくい可能性が考えられた。

本調査で新たに追加したろ過器試料においては、浴室 1 ではレジオネラ属菌は分離されず、浴室 2 では *L. pneumophila* SG1 および *L. pneumophila* SG9 (10～260 CFU/100 mL) が分離された (表 1)。浴室 2 のろ過器はレジオ

ネラ属菌による汚染が確認されたものの、低値であり、両浴室のろ過器は良好に管理されていた。当該施設では営業終了後に毎日ろ過器の逆洗が行われており、加えて遊離塩素濃度の維持が適切に行われたと考えられた。

一方、浴室 2 のカラン 3 から *Legionella* sp. が、カラン 4 から *L. pneumophila* SG6 および *Legionella* sp. が分離された。これらはろ過器とは異なる血清群の *L. pneumophila* およびレジオネラ属菌であり、ろ過器の汚染の拡散ではなかった。しかし、今回ろ過器から分離された *L. pneumophila* SG1 および *L. pneumophila* SG9 は過去にはカランや湯口から分離されたことがあったため、これらが同じ汚染由来か検討することとした。

過去に分離された株（2015～2023 年分離株）を含め、SBT 法を実施したところ、2022 および 2023 年のろ過器分離株と同じ ST (ST1 および ST1907) が、過去の分離株にあったことが判明した（表 2）。ST1 は、2016 年の浴室 2 の湯口および 2018 年のカラン 3 から検出されていた。ST1907 は、2015 年と 2016 年のカラン 1 およびカラン 3 から検出されていた。すなわち、同じ ST が 8 年もの間、分離場所は異なるが、施設内に維持されていた。この ST の一致が偶然によるものか、さらに詳細な検討を加えた。

これら ST1 および ST1907 株を対象 (ST1 の 4 株、および ST1907 の 6 株、直近の 2024 年分離株は未実施) に、SNV 解析を実施した（図 2）。マッピングに使用したリファレンス配列は、ST1 に *L. pneumophila* Corby (GenBank accession number CP000675)、ST1907 に *L. pneumophila* Flint 2 (同、NZ_CP021281) とした。

ST1 については、浴室 2 のろ過器 2 株およ

び湯口 1 株の SNV 差が 1～3 と僅かで、非常に近縁であった。これはろ過器の湯が湯口に届くためと考えられた。ST1907 については、浴室 2 のろ過器の 2 株および浴室 1 のカラン 1 の 2 株における SNV 差が、5～26 と近縁だった。ST1907 の多くは 2015～2016 年に分離された株で、遊離塩素消毒による汚染対策が徹底される前のものであった。2016 年頃はこの ST1907 が浴室 1 と 2 に共通して、施設の広い範囲を汚染していたが、その後の対策により汚染が軽減され、現在は浴室 2 のろ過器に限定的な汚染が残存していると推測された。

D. 結論

2015 年から追跡してきた入浴施設 1 か所における、2022～2024 年の汚染実態についてまとめた。遊離塩素濃度は高く維持されていた。浴室 2 のカランと新たに検査対象に追加した浴室 2 のろ過器からレジオネラ属菌が分離されたものの、低値であったことから、増殖は抑えられていると考えられた。血清群、SBT 法および SNV 解析の結果から、過去に汚染の拡散があったが、現在はろ過器からの汚染は拡大しておらず、一部の配管に限定的な汚染が残存していることが推定された。

E. 参考文献

1. 黒木俊郎, 泉山信司, 大屋日登美, 陳内理生, 中嶋直樹ら. 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 3 年度分担研究報告書.

2. 山本啓之. PCR 法による *Legionella* 属細菌の検出・同定. 日本臨床, 1992, 50 特別号: 394-399.
3. Mahbubani MH, et al. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular 55 Probes, 1990, 4:175-187.
4. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 2005, 43:2047-52.
5. Croucher NJ, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. Nucleic Acids Res. 2015, 43:e15.
6. Leigh JW, Bryant D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol Evol. 2015, 6:1110-1116.

F. 研究発表

紙上発表

なし

学会発表

1. 中嶋直樹、陳内理生、黒木俊郎. 入浴施設の塩素消毒によるレジオネラ対策事例. 第 5 回 Hospital Water Hygiene 研究会学術集会. 2023 年 11 月. 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 2022～2024年の調査結果

	実施年		
	2022	2023	2024
レジオネラ属菌分離			
地下貯湯槽	-	-	-
高置貯湯槽	-	-	-
浴室1			
浴槽	-	-	-
湯口	-	-	-
カラーン1 初流水	-	-	-
カラーン1 3分流水後水	-	-	-
カラーン2 初流水	-	-	-
シャワー	-	-	-
配管末端放水部	-	-	-
ろ過器	-	-	-
浴室2			
浴槽	-	-	-
湯口	-	-	-
カラーン3 初流水	80 (Lsp) [†]	-	-
カラーン4 初流水	-	10 (Lp SG6)	10 (Lp SG6)
カラーン4 3分流水後水	50 (Lp SG6, Lsp)	10 (Lp SG6)	40 (Lp SG6)
シャワー	-	-	-
配管末端放水部	-	-	-
ろ過器	260 (Lp SG1, Lp SG9)	10 (Lp SG1, Lp SG9)	50 (Lp SG1, Lp SG9)
遊離塩素濃度 (mg/L)	0.01–1.61 (中央値: 0.68)	0.02–2.00以上 (中央値: 1.59)	0.12–2.00以上 (中央値: 0.36)
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	0.5×10^0 – 7.0×10^2 (中央値: 1.2×10^1)	0 – 2.3×10^4 (中央値: 1.5)	0 – 9.2×10^2 (中央値: 2.3)
水温 (°C)	34.0–54.1	34.5–56.6	31.1–56.8
pH	8.02–8.17	7.99–8.51	7.86–8.36
アンモニア態窒素濃度 (mg/L)	すべて検出限界 (0.01) 以下	すべて検出限界 (0.01) 以下	すべて検出限界 (0.01) 以下

[†] 数値はレジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)、括弧内は分離された菌種を示す。

Lp: *Legionella pneumophila*, Lsp: *Legionella* sp., SG; Serogroup, -: 不検出 (10 CFU/100 mL未満)

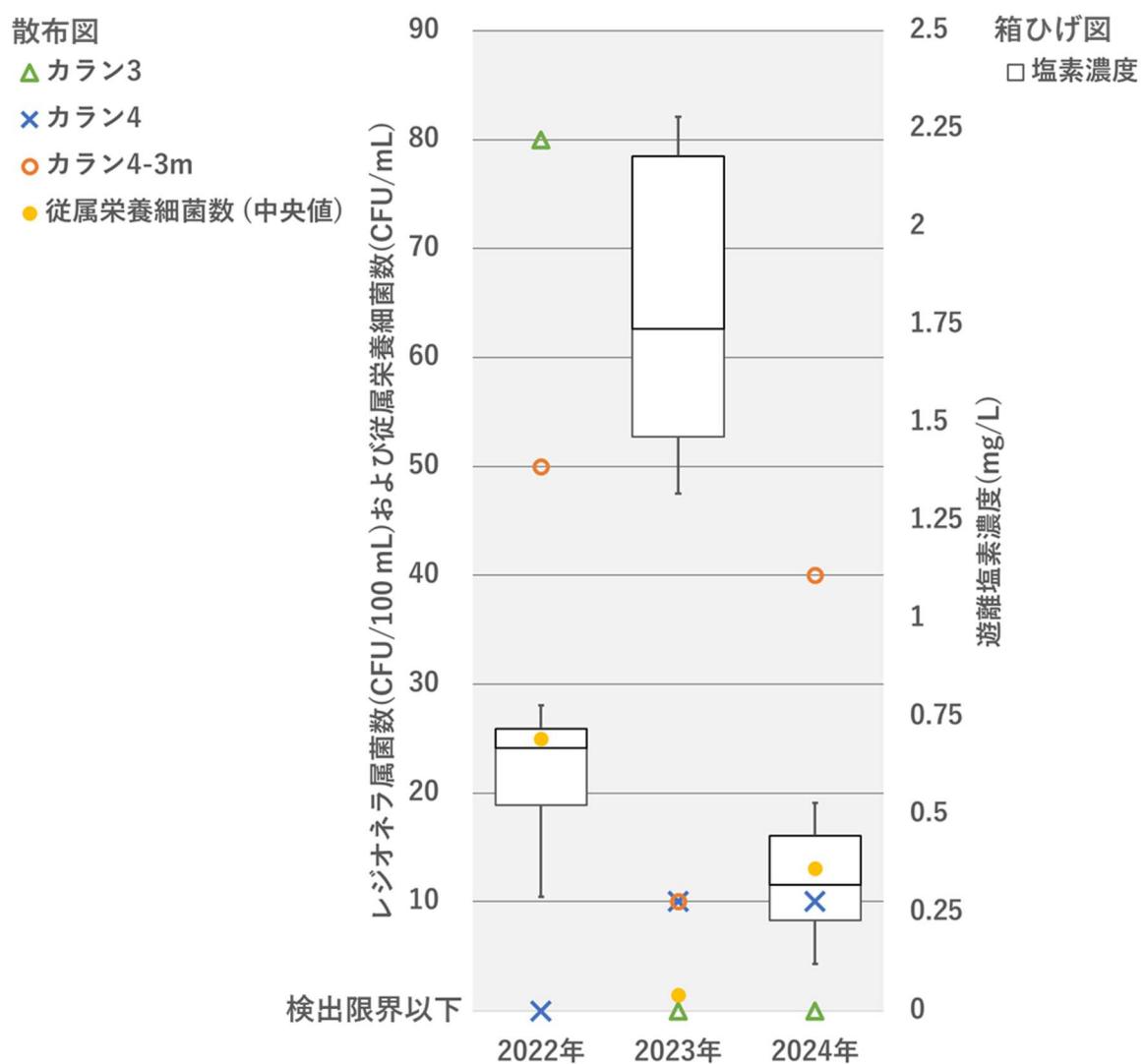


図1 洗室2由来の7試料における調査結果

注) レジオネラ属菌数については7試料のうち各年いずれも検出限界以下であった試料を除く3検体を表示

表2 2015～2023年に分離された *L. pneumophila* SG1 および SG9 の ST

実施年	浴室1		浴室2			ろ過器
	カラーン1	カラーン2	カラーン3	カラーン4	湯口	
2015年	ST1907	ST552	ST1907	ST552	-	N. T.
2016年	ST1907	ST552	ST1907	ST2693	ST1	N. T.
2017年	-	-	ST2693	ST2693	-	N. T.
2018年	-	-	ST1, ST2693	ST552, ST2693	-	N. T.
2019年	ST552	-	ST2693	ST552	-	N. T.
2020年	-	-	ST2693	-	-	N. T.
2021年	-	-	-	-	-	N. T.
2022年	-	-	-	-	-	ST1, ST1907
2023年	-	-	-	-	-	ST1, ST1907

ST1およびST552: *L. pneumophila* SG1、ST1907およびST2693: *L. pneumophila* SG9、N.T.: not tested

ST: Sequence type, SG: Serogroup

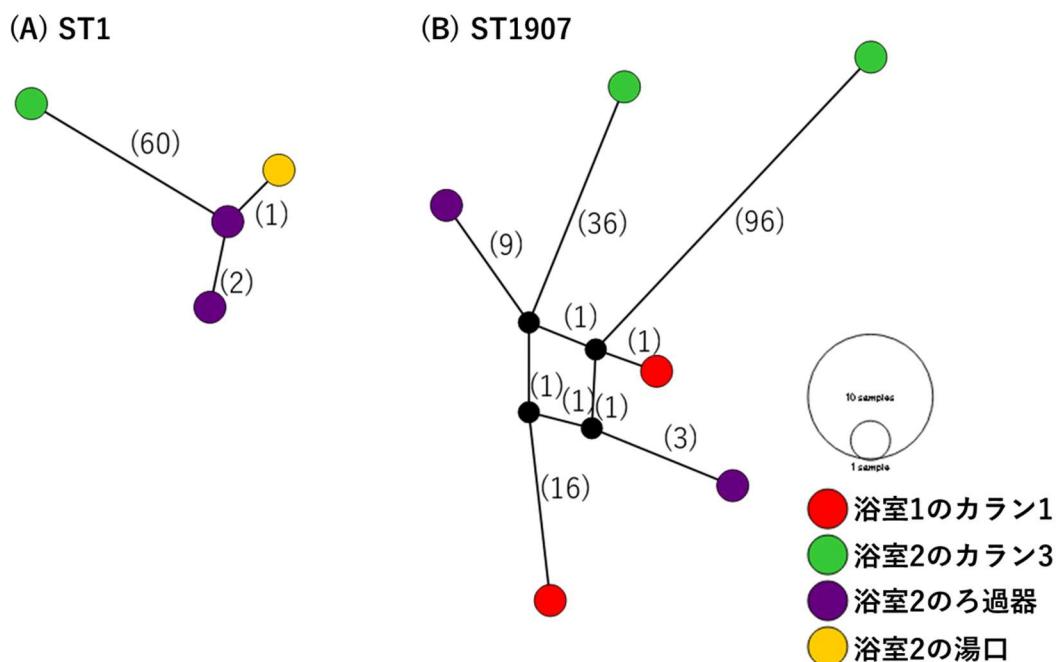


図2 (A) ST1 および (B) ST1907 株を対象とした Single nucleotide variant (SNV) 解析に基づくネットワーク図

図中の括弧内の数値は株間の SNV 差を示す。

ST: Sequence type