

200401025A

厚生労働科学研究費補助金

健康科学総合研究事業

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 遠藤 卓郎

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究 ……	1
遠藤 卓郎	
II. 分担研究報告書	
1. バイオフィルム難付着性配管、パッキン等材の選定 ……	15
杉山 寛治・大畑 克彦・鈴木 光彰	
2. 各種理化学項目とレジオネラ属菌類の相関性に関する検討 ……	19
荒井 桂子・磯田 信一・吉川 循江・田中 礼子	
3. 浴槽水中等の微生物類の増殖モデル試験 ……	27
八木田健司・泉山 信司・縣 邦雄・藪崎 裕昭	
4. 温水環境における細菌叢のPCR-DGGE法による解析 ……	41
泉山 信司・福井 学・縣 邦雄・藪崎 裕昭・関根 寛	
5. 浴槽水におけるレジオネラ属菌の検出状況、 ……	67
特に <i>Legionella pneumophila</i> 血清群1の推移について	
倉 文明・前川 純子・常 彬・鈴木 敦子・市瀬 正之	
6. レジオネラ属菌の宿主アメーバ内増殖 ……	77
—細胞内菌数の定量的測定—	
八木田健司・泉山 信司・縣 邦雄・藪崎 裕昭	
7. 入浴施設の浴槽水における抗酸菌検出状況 ……	89
杉山 寛治・山崎 利雄・大畑 克彦・鈴木 光彰	
8. 入浴者による浴槽水の有機物負荷量の試算 ……	95
泉山 信司	
9. 循環式浴槽水の過マンガン酸カリウム消費量の挙動調査 ……	105
縣 邦雄・泉山 信司・藪崎 裕昭	
10. HACCP システムの導入を伴う循環式浴槽の管理について ……	113
黒木 俊郎・林 隆一朗	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	127

厚生労働科学研究費補助金(健康総合科学研究事業)
総括研究報告書

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

主任研究者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所	寄生動物部
分担研究者	八木田健司	国立感染症研究所	寄生動物部
	泉山 信司		寄生動物部
	倉 文明		細菌第一部
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所	微生物部
	縣 邦雄	アクアス つくば総合研究所	
	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所	
	福井 学	北海道大学 低温科学研究所	
	荒井 桂子	横浜市衛生研究所	検査研究課

概要:

当該研究事業では、循環式浴槽に係る衛生管理上重要と考えられる各種項目について検討し、入浴者にとって安全で安心できる浴槽の維持管理方法の構築に資することを目的としている。

当該研究では構造面から資機材の検討を行い、表面加工の違いによりバイオフィーム定着性に差が有ることを示した。貯湯槽の管理手法については管理指標の構築を企図して浴槽原水の保持する微生物を繁殖・維持させる潜在能力の評価方法について検討した。当該年度は原水の保有する有機物量に着目し、従属栄養細菌数、一般細菌数、*Legionella* 属菌数、ならびに宿主アメーバ類などの浴用原水中に繁殖する微生物数との関連性の検討した。

現在、推奨される浴槽水の遊離残留塩素管理はレジオネラ対策として必須の手法であるが、その一方で、病原性が強いとされる *L. pneumophila* 血清群1を選択的に増やしている可能性があることを示した。すでに病原性を有するアメーバや非定型抗酸菌症の病原菌とされる *Mycobacterium* などの報告があるが、改めてこの *Mycobacterium* の汚染状況を調査したところ、浴槽の形態によっては高率に分離された。また、本属菌は残留塩素濃度 0.4ppm を超える浴槽水の約3分の1から検出された。宿主アメーバ内でのジオネラの増殖菌数を定量したところ、アメーバ1細胞あたりに含まれる菌数はおよそ 1,000cfu と算定され、感染アメーバ1細胞が人に取り込まれれば感染成立に至る可能性が示された。

浴槽水の水質基準には過マンガン酸カリ消費量が規定されている。当該研究では、この基準に従った新たな管理指標を提案した。具体的には、循環式浴槽での有機物汚染の定義を明らかにし、その上で入浴者一人が持ち込む汚染量はほぼ一定していることを示した。ここから、単位容積あたりの延べ入浴者数を管理指標とすることを提案した。合わせて、厚生労働省により示された浴場の衛生等管理要領を基に浴槽水管理のための HACCP システムの構築が重要で導入手順書を作成した。

A. 目的

当該研究事業では、循環式浴槽に係る衛生管理上重要と考えられる各種項目について検討し、入浴者にとって安全で安心できる浴槽の維持管理方法の構築に資することを目的としている。循環式浴槽の構造と機能は図 1 に示すとおりである。基本構造は単純であるが、大規模な浴場においてはきわめて複雑で長い配管が敷かれており、ろ過槽やヘアキャッチャー、あるいは貯湯槽内壁などを含めるとバイオフィーム、ひいてはレジオネラ汚染防止を講ずる上で難しい構造となっている。HACCP に沿った危害防止の観点からは系内にろ過槽などレジオネラの発生場所を抱えている点が指摘される。

B. 検討内容

1. 循環装置の材質と易汚染性

これまで、レジオネラとバイオフィームの発生場所としてろ過槽、配管や浴槽の内壁などが指摘されてきた。さらに詳細な検討から、配管やその繋ぎ目に用いられる資機材の素材によりバイオフィーム着生や洗浄効果に差のあることが明らかとなった。配管材質ではバイオフィーム付着の少ない材質は、テフロンライニング>サニタリー配管>PP=VP=銅=酸化チタンコーティング>SUS の順であった。特に、テフロンライニングへのバイオフィームの付着は少なく、素材として評価されるが高価な点が問題となる。パッキンではテフロン加工品がバイオフィームの付着が少なく、また、薬剤による洗浄・除去も容易であった。一方、汎用されている EPDM 等のゴム製品にはバイオフィームが容易に付着し、薬剤による洗浄・殺菌が難しいことがわかった。パッキンの占める面積は限られるが、常に汚染の核として残ることから管理面からは好ましくない素材と言える(図2)。

2. 迅速検査法

現行の検査は培養によるレジオネラ属菌の検出が行われているが、一般の検査機関を利用した場合、結果を得るのに1-2週間を要する。いわば retrospective な検査に終わっており、現場サイドでの衛生管理の指標として機能しているとはいえない状況にある。当該研究では培養法に代わる検査法として、近年開発された遺伝子検査法について、環境水検査への応用性について検討した。循環式浴槽におけるレジオネラ属菌の主な供給源はろ過装置等の内壁に発生するバイオフィームと推測されるが、ろ過装置を含む循環系内壁面に発生するバイオフィーム量と浴槽水に浮遊するレジオネラ属菌の実態を把握し、関連を明らかにすべく検討した。この目的に合わせ、レジオネラ属菌及びバイオフィーム量と簡易的に測定できる理化学項目を調査した。また、リアルタイム PCR を用いて培養法で把握できないレジオネラ属菌の測定を行い、同様にバイオフィーム量との相関を調査した。

その結果、循環系の配管等に生成されるバイオフィーム量が多いとレジオネラ属菌が検出される確率が高くなる傾向が示された。対象とした循環式浴槽は 19 件で、そのうちレジオネラ属菌が検出された浴槽水は 2 試料(検出率 10.5%)、浴槽壁面拭取り 2 試料(検出率 10.5%)、ヘアキャッチャー拭取り 1 試料(検出率 5.3%)であった(表1)。検出されたレジオネラ属菌の菌種及び血清群は、浴槽水から *Legionella pneumophila* SG1 及び SG4、および *Legionella* spp.(現在解析中)であった。浴槽壁面拭取り試料から *L. pneumophila* SG1、浴槽壁面拭取り試料から *Legionella* spp.(現在解析中)、ヘアキャッチャー拭取り試料から *L. pneumophila* SG1 及び SG5 が検出された。予備的実験ではあるが、浴槽水中のレジオネラを対象としたリアルタイムPCR試験において陽性反応は従属栄養細菌数が 10^2 cfu/mlを境にそれ以上で認められた点は注目される。

レジオネラ属菌が検出された浴槽水 2 試料の菌数は 10^1 ~ 10^2 cfu/ml の範囲であった。一般細菌は6試料(検出率32.6%)から検出され、検出菌数は 10^0 ~ 10^2 cfu/ml の範囲であ

った。また、従属栄養細菌が検出されたのは 10 試料(検出率 52.6%)で、検出菌数は $10^0 \sim 10^3$ cfu/ml であった。試料水の酸化還元電位は 466~916mV、過マンガン酸カリウム消費量は 1.6~27mg/L であった。濁度は 0.1 未満が 8 試料、0.1~0.8 度が 11 試料であった。残留塩素は不検出(<0.1mg/L)が 2 試料、0.1~1.0 mg/L が 8 試料、1.1 mg/L 以上が 9 試料となっていた。一方、浴槽壁面拭き取り 19 試料中 8 試料から一般細菌、15 試料から従属栄養細菌が検出された。また、浴槽水からは検出されなかった大腸菌群が 1 試料から検出された。一般細菌および従属栄養細菌の検出数はそれぞれ $0 \sim 10^4$ /ml、 $0 \sim 10^5$ /ml の範囲であった。ヘアキャッチャー拭き取り 15 試料中 5 試料から一般細菌が検出され、12 試料から従属栄養細菌が検出され、1 試料から大腸菌群が検出された。一般細菌および従属栄養細菌の検出数は、それぞれ $0 \sim 10^3$ cfu/ml、 $0 \sim 10^4$ cfu/ml の範囲であった。ろ過装置試料はろ過装置内部の水 4 試料中 1 試料から一般細菌が検出され、2 試料から従属栄養細菌が検出された。ろ材 2 試料中 2 試料から一般細菌及び従属栄養細菌が検出された。一般細菌および従属栄養細菌の検出数は、それぞれ $0 \sim 10^2$ cfu /ml、 $0 \sim 10^3$ cfu /ml の範囲であった。拭き取り試料の一般細菌及び従属栄養細菌数をバイオフィルムの指標として考えると、配管等の内壁面に発生したバイオフィルム量が多い時、レジオネラ属菌が検出される確率が高い傾向が認められた。

リアルタイム PCR を用いて、浴槽水及び拭き取り試料からレジオネラ属菌の検出を試みたところ、浴槽 6 試料、浴槽壁面拭き取り 10 試料、ヘアキャッチャー拭き取り 9 試料、逆洗水 4 試料、ろ過装置内部の水 1 試料、ろ材 2 試料から陽性反応が認められた。リアルタイム PCR を用いたレジオネラ属菌検査では、培養法に比較して、多くの試料が陽性反応を示した。理化学的な検査結果とレジオネラ検出の相関を検討したところ、レジオネラ陽性検体では有意に浴槽水の濁度が高い値を示した ($p=0.05$)。今後、検査試料を増やして精度を高める予定である。

3. 貯湯槽におけるバイオフィルム汚染指標の開発

レジオネラ汚染は循環浴槽システムに限らず、貯湯槽も監視すべき対象である。指針では、貯湯槽のバイオフィルムの管理として槽内の水温を 60°C 以上に保つことと、年に 1 回以上の洗浄を奨励しているが、具体的な判断基準はない。当該研究では浴槽原水が保持する微生物量を繁殖・維持させる潜在能力の評価方法を検討している。当該年度では、原水の保有する有機物量に着目し、有機物量を過マンガン酸カリ消費量、全有機炭素量 (Total Organic Carbon: TOC)、および同化有機炭素量 (Assimilable Organic Carbon: AOC) 等として測定し、あわせて従属栄養細菌数、一般細菌数、*Legionella* 属菌数、ならびに宿主アメーバ類などの浴用原水中に繁殖する微生物数との関連性の検討を計画している。これらのことより、浴用原水がどの程度の微生物を繁殖させることができるか(ポテンシャル)を評価しようとするもので、ひいては貯湯槽における汚染で度合いを評価する指標の開発につながりたいと考える。

室内で試験水を 40°C に保ち、開放系で微生物の増殖過程を観察した。グルコース 15mg/L (過マンガン酸カリウム消費量に換算して 30mg/L) を添加した某市の水道水では当初の従属栄養細菌数は $10 \sim 15$ CFU/ml であったが、実験開始後 3~5 日で従属栄養細菌等が急激に増殖し、壁面へのバイオフィルム定着が観察された。その後、従属栄養細菌は 1 ヶ月間にわたり $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml 程度が維持されていた。グルコース添加の有無による従属栄養細菌数はほとんど差が認められず、グルコース無添加群がやや多い傾向であった。その中で、観察期間中に宿主アメーバやレジオネラの自然混入が認められた実験群もあった。その場合、実験開始から 7~14 日でレジオネラ属菌及びアメーバ類の大量増殖が確認された。ただし、本実験は屋内で行われたこともあり、多くの実験群でアメーバの自然混入やそれに続くレジオネラの増殖は認められなかった。温泉水を用いた同様の実験では、

検査期間中の従属栄養細菌は $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL を推移した。なお、実験に供された温泉原水には従属栄養細菌が 10^4 CFU/mL 程度含まれていた。また、水道水を浴用原水とした場合と同様、グルコースの添加・無添加群で菌数に差は認められなかった(図3)。

当該実験では、

- 1 添加したグルコースが生物量に反映されなかつたこと、
- 2 浴槽原水の違いにより従属栄養細菌等の繁殖に差が生じること、
- 3 外気に曝されると速やかに従属栄養細菌の繁殖が進行し、3 日後には 10^6 CFU/mL のオーダーに達すること

などが観察された。これらを基に、貯湯槽におけるバイオフィーム着生状況の指標を構築する計画である。

4. DGGE 法による貯湯槽におけるバイオフィーム汚染の定性的評価

貯湯槽の管理指標を構築するため、PCR-DGGE (PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法を用いて *Legionella* 属菌発生に到る微生物叢の挙動解析を試みた。PCR-DGGE 法は GC クランプつきユニバーサルプライマーを用いて PCR と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を行い、複数の配列が混在する PCR 産物から塩基配列の違いを 1 つ 1 つのバンドとして分離解析する手法で、細菌の培養・釣菌・生化学解析を経ることなく、直接的に細菌叢の解析が可能である。当該年度は基礎的資料の集積と応用に向けた泳動マーカーの開発を行った。あわせて、モデル温水における DGGE パターンの経時変化をモニターした。DGGE は泳動条件によりバンドの移動距離が一定しないが、対照となる泳動マーカーがあればゲル間での比較や既知バンドの同定が容易となる。当該分担研究者らにより DGGE バンドとその塩基配列のデータベースが蓄積されつつあり、それらを利用した泳動マーカーの作成を行った。水道水から得たバンドの A1、A5、A7、A9 の 4 本よりマーカーセット A、風呂バイオフィームから得た B2、B4、B5、B7、B8、B9、C11 の 7 本よりマーカーセット BD を用意した。今後蓄積される情報を加味してさらに充実させる予定である(図4)。

上述の『3. 貯湯槽におけるバイオフィーム汚染指標の開発』と並行して、水道水および温泉水とグルコース添加の有無による計4通りのモデル温水につき、経時的に微生物叢の推移を PCR-DGGE 法により追跡した。42℃に加熱した滅菌水道水を人の往来がある室内に設置し、細菌叢の変化を観察した(図4)。0 日目は水道水(浴槽原水)中に含まれる細菌より得られた泳動パターンであり、1 日目にはすでに泳動パターンの変化が確認された。3 日目からの泳動パターンは安定し、主要な細菌叢の定着が完了したものと推定された。この傾向は 14 日目まで維持されたが、この間にも新たなバンドの出現や消失が観察された。21 日目以降になると細菌叢の大きな変化がみられ、それまでの優占種から異なった細菌叢への交代が観察された。細菌叢の多様化も進行した。水道水にグルコースを添加し、同様の追跡を行ったところ、1 日目では水道水のみ条件と比較して検出されるバンドの数が減少した。バンドの位置も異なっており、グルコースに親和性の高い細菌が優先的に増殖したものと考えられた。このバンドは 5 日目をピークとして減少傾向となり、これに変わって変性剤濃度の低濃度側に主要なバンドが現れた。グルコース無添加の系と比較して菌叢の交代する時期が早まったが、比較的限られた細菌種が増殖する傾向が示された(図5)。

温泉水を用いた場合では水道水の 2 条件とは異なるパターンが取得された(図6)。30 日目までの観察では、バンドの消長は比較的緩やかであった。グルコース添加群ではバンドの本数が少なく、炭素源の変化により適応菌叢の偏りが観察された(図7)。以上のことから、炭素源等の違いを反映して優先種が代わること、系内に定着した細菌類はその後の相変化に置いて淘汰されることはないこと、などが示された。今後は実際の循環式浴槽に近い環境を有するモデルでの実験を計画している。同様な傾向は培養法によっても観察された。すなわち、1 日目で細菌の増殖は急速に進み、菌数は 3 日目にピークに達した。なお、それ

以降は菌数に大きな変化を認めなかった。

5. 浴槽水から分離されるレジオネラ属菌の血清型別

近年、循環式浴槽では厚生労働省の指針に従い塩素消毒が励行されているが、その一方で塩素使用による悪影響が懸念される。海外での給湯水を対象としたレジオネラ属菌の汚染状況の調査(Borella P 等、Emerging infectious Diseases 10:p457, 2004)において、遊離塩素濃度の高い給湯水で *L. pneumophila* 血清群 1 が他の血清群の *L. pneumophila* より多く検出されているとの報告がある。そこで、浴槽水から分離されるレジオネラ属菌の血清型別を行った。周知のとおり、近年いくつかのレジオネラ症の集団感染事例を通じて、循環式浴槽の塩素消毒が進み、相対的にレジオネラ属菌の検出率は低下してきている。一方、その集団感染事例の起因菌となってきた *Legionella pneumophila* 血清群 1 の年度別の推移はこれまで明らかでなかった。そこで、平成 13-14 年度における浴槽水のレジオネラ属菌株の種類を、市販の免疫血清で同定されていなかったレジオネラ属菌株を含め詳細に同定した。その結果、不明株として保存されていた浴槽水由来株の 94% は *Legionella pneumophila* で、群別不能株と血清群 7 が多かった。平成 8 年-12 年度に比べ、平成 13 年度は *Legionella pneumophila* 血清群 1 分離株の割合が増え、検体当りの *Legionella pneumophila* 血清群 1 の陽性率も増加した(表2)。観察された血清型の変遷が塩素消毒を選択圧としているものかは、今後の詳細な調査に待つところであるが、塩素使用を奨励した前後で *Legionella pneumophila* 血清群 1 が増加する傾向が認められたことは注目に値する。

6. 宿主アメーバ内でのレジオネラの増殖

アメーバ細胞内増殖したレジオネラ属菌は形態、また生化学的特性の変化など、試験管培養で増殖した場合とは異なる点が多い。最近の研究でレジオネラ属菌の感染性が宿主であるアメーバ内での増殖により向上することが明らかとなってきた(Clirillo ら、1994、Brieland ら、1996、1997)。また、モルモットに対してエアロゾル吸入によりレジオネラ属菌(*L. pneumophila* Philadelphia-1 strain)を投与した動物感染実験では、菌数として 2,100 の吸入により血清学的に感染が確認され、また 50%致死濃度は 1.4×10^5 と計算されている(Berendt ら、1980)。

これまでの集団感染事例では、暴露を受けた個体が全て発症するとは限らず、むしろ限られた数の発症者に留まっている。同一の暴露条件に曝されたにも関わらず、一様な感染とされない理由について詳細な検討が必要である。当該研究では、感染に至る過程(暴露条件)に宿主アメーバが何らかの役割をなしているものと仮定し、アメーバを含めた暴露系の検討を行っている。当該年度は、アメーバ感染後のレジオネラの発育調整を図り、均質な発育段階の菌を定量的に得ることを検討した。具体的には、宿主細胞内の菌の回収方法を確立し、アメーバ内でのレジオネラの増殖菌数を定量した。宿主アメーバとして *Acanthamoeba castellanii* を用い、*L. pneumophila*/SG1 を感染させ、感染アメーバをマイクロマニピュレーション法で単離し、その細胞内菌数を定量した。その結果、直径 15-25 μm のアメーバ 1 細胞あたりに含まれるレジオネラ菌数はおよそ 1,000 個と算定された(図8)。本研究で得られたアメーバ 1 個あたり 1,000 cfu という菌数からは、感染アメーバ 1 細胞が人に取り込まれれば感染成立に至る可能性が示されたことになる。次年度は、感染濃度と感染の関係、またレジオネラ属菌感染アメーバの吸入による感染の可能性に関して、動物感染実験で検証し、真の菌の感染リスクを明らかにしたい。なお、レジオネラ属菌の増殖用培地は現在 BCYE α が標準使用となっているが、同一培地であってもメーカーの違いにより分離率に著しい差がみられた。環境中に浮遊・生存している菌とアメーバ内で増殖していた菌とでは栄養要求が異なる可能性が示唆された。

7. 浴槽水からの抗酸菌の分離

浴槽水の微生物汚染はレジオネラ属菌に限らず、抗酸菌や他の病原細菌あるいは病原性を有するアメーバ類による汚染も想定される。病原アメーバ類に関して平成 13-15 年度の厚生科学研究事業(がん予防等健康科学総合研究事業 温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体 *Naegleria fowleri* の疫学と病原性発現に関する研究)において報告されている。当該研究では浴槽水における抗酸菌の汚染状況を調査した。その結果、浴槽の形態別では、利用者毎完全換水式浴槽から高率に抗酸菌が分離された。また、残留塩素濃度別に検出状況を見ると、厚生労働省がレジオネラ対策として示している浴槽水の残留塩素濃度上限である 0.4ppm を超える浴槽水の約3分の1から本菌が検出されたことが特筆される。同じ濃度下においてレジオネラ属菌の検出率が 20%であったことから、抗酸菌はレジオネラ属菌よりも強い塩素耐性を持っているものと考えられた。分離された 20 株につき発育速度、集落性状、着色、光発色性試験、DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) 試験により 20 株の同定を行ったところ、*Mycobacterium gordonae* 6 株、*M. avium* 6 株、*M. intracellulare* 1 株、*M. fortuitum* 3 株の存在が証明された。同定不能であった 4 株については引き続き検討している(表3)。なお、結核菌(*M. tuberculosis*)は、検出されなかった。今回の調査で循環浴槽水にはレジオネラ以外にも *Mycobacterium* 属菌類など数多くの病原微生物が定着しており、その管理の難しさが浮き彫りにされた。

8. 過マンガン酸カリ消費量による浴槽水管理

浴場の衛生等管理要領によれば、循環式浴槽では連続使用型循環式浴槽水は一週間に一週間に1回以上完全換水数 r ことが謳われている。その一方で、水質基準では浴槽水中の有機物汚染量を過マンガン酸カリ消費量に換算して 25mg/L 以下とするよう定めている(公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について、平成15年2月14日一部改正)。一方、浴用原水(原湯)有機物量は水道水の水質基準である10mg/L とされている。これらのことから、本基準の趣旨は入浴者により浴槽水中に持ち込まれる有機物量を 15~25mg/L 以内に抑えることを求めているものと承知する。

当然ながら循環式浴槽施設の浴槽水に対してもこの基準が適用されるものであるが、その適用条件は十分検討する必要がある。循環式浴槽ではろ過槽等で繁殖する微生物により溶存有機物が消費される。この作用は生物浄化と称され、下水処理等では有機物の処理に汎用されている。循環式浴槽に生物浄化を組み込んだことはあたかも優れたアイデアのごとく映るが、入浴者が持ち込んだ有機物は形を微生物に変えて系内に保存されている。(これを原因してレジオネラ汚染問題が発生していることは周知のところである。)従って、循環式浴槽では溶存有機物に系内で繁殖している微生物を含めた値が真の有機物汚染量となる。

当該研究事業では、一人の入浴者が持ち込む有機物量を試算した。循環式浴槽と基本構造が類似する施設に水泳プールがあるが、プールでは塩素管理が徹底されており、入浴者によって持ち込まれた有機物は分解・異化されずに溶存状態でおおむね存在する。そこで、水泳プールにおける過マンガン酸カリ消費量の測定値を基に、一日ごとの過マンガン酸カリ消費量を算出するための近似式を立てた(図9)。次いで、実測値と近似値の相関から一人当たりの入浴者が持ち込む過マンガン酸カリ消費量を求めた。その結果、一人の入浴者の持ち込む有機物は過マンガン酸カリ消費量に換算して0.53gと計算された。この値は当該研究事業で行った他の研究報告の結果ともよく一致した(同報告書:循環式浴槽水の過マンガン酸カリウム消費量の挙動調査 参照)。過マンガン酸カリ消費量の基準値を入浴者の持ち込む有機物量で除すことで単位あたりの浴槽容量に対する延べ入浴者数が算出可能となる。

すなわち、循環式浴槽では浴槽水の過マンガン酸カリ消費量を指標とした浴槽の運転管理、具体的には延べ入浴者数を指標とした管理が実用的であると考えられる。

- 1 本基準の趣旨は入浴者により浴槽水中に持ち込まれる有機物量を 15～25mg/L 以内に抑えることを求めているものと解釈されること
- 2 溶存有機物用の測定は系内に蓄積された微生物量が反映されないことから無効であること
- 3 入浴者一人当たりが持ち込む有機物量はおおむね 0.5g と算定されること

を前提条件として、現行の水質基準に充てると、1m³の浴槽水に延べ30～50人の入浴者が許容限界と計算される(15～25 mg/L = 15～25 g/m³ ⇔ 30～50 人/m³ = 6～10 人/200L)。

衛生等管理要領の定めるところを正しく理解すると、浴槽水の完全換水は、週に1回以上の完全換水を前提として、さらに単位あたりの延べ入浴者数が規定値を超えた時点での換水を義務付けるものとなる。

ちなみに、類似の構造を持つ水泳プールの場合は遊泳中にプール水の誤飲があることを前提として、水質基準は過マンガン酸カリ消費量の上限を 12mg/L と安全側に設定している(最多で24名/m³と試算)。しかし、高い温度設定の浴槽水では溶存有機物を栄養源とした微生物の発生は容易に想定されるところである。また、高温であることから塩素の消費も多いものと考えられる。今後、遊離残留塩素による水質管理を前提として、浴槽水の単位容量あたり何人の延べ入浴者が妥当なのか、検討する予定である。

9. HACCP に基づいた管理方法の導入

Legionella 属菌は温水環境において増殖するため、高温期の冷却塔水や循環式浴槽、シャワーヘッドなどで増えた菌によりレジオネラ症の散発事例や集団発生が起きている。特に、循環式浴槽の入浴者における重篤なレジオネラ肺炎の集団発生では多数の患者が発生し、死亡例が報告されている。

このような状況で、厚生労働省は循環式浴槽をはじめとする浴槽の衛生的管理の要領(衛生等管理要領)等を作成した。それによると、浴槽や関連施設の管理の方法や管理基準が示されており、公衆浴場や旅館等の管理者は衛生等管理要領を基にしてそれぞれの施設の管理方法を定め、浴槽等の管理を行うことが求められている。そこで本研究では、循環式浴槽の衛生的管理の機能的な進め方を示すことを目指して、HACCP (hazard analysis and critical control points system)を取り入れた管理方法の検討を行った。HACCP は危害分析重要管理点などと翻訳されている、食品の製造過程管理手法である。米国の宇宙食の安全性を保障するシステムとして開発された。その後、米国の FDA が米国内の食品製造者に対して HACCP システムの導入を義務付け、WHO や Codex により世界的に普及されていった。わが国では平成 7 年に食品衛生法が改正され、「総合衛生管理製造過程」という名称で HACCP システムの導入が図られた。

厚生労働省により示された浴場の衛生等管理要領は、管理の基準等を示し、衛生管理の内容が記されている。HACCP システムは管理をシステムとして進めるための指針とみなすことができ、これにより管理要領等を活用した高機能の管理を実施することが可能となることが期待される。ここでは、以下の12段階の手順を示し、HACCP 導入の参考とした。

- 手順 1 専門家チーム編成
- 手順 2 製品の記述
- 手順 3 意図される使用方法の確認

- 手順4 製造工程一覧図及び施設に図面
- 手順5 現場確認
- 手順6 危害分析(HA)
- 手順7 重点管理点(CCP)の特定
- 手順8 管理基準の設定
- 手順9 モニタリング方法の設定
- 手順10 改善措置の設定
- 手順11 検証方法の設定
- 手順12 記録保存及び文書作成規定の設定

今後、この手引書を整理・拡充し、広く安全管理に向けた啓発事業に資することを企図する。

C. 結論

循環式浴槽の基本構造は単純であるが、大規模な浴場などではきわめて複雑で長い配管が敷かれており、ろ過槽やヘアキャッチャー、あるいは貯湯槽などを含めるとバイオフィーム、ひいてはレジオネラ汚染防止を講ずる上で難しい構造となっている。循環浴槽施設の資機材としてバイオフィームが定着しにくいこと、洗浄が容易であることなど、テフロン加工品が優れていた。レジオネラ汚染の検査の迅速性を目指してリアルタイム PCR の応用が検討された。貯湯槽の管理として、浴槽原水が保持する微生物を繁殖・維持させる潜在能力の評価方法について検討した。レジオネラ属菌の汚染状況の調査によると、平成8年～12年度に比べ、平成13年度は *L. pneumophila* 血清群1分離株の割合が増え、検体当りの血清群1の陽性率が増加しており、塩素使用が奨励された時期を境にして血清群1の増加傾向が認められたことは注目に値する。塩素消毒の新たな負の要素として検討が急がれる。宿主アメーバ内でのレジオネラの増殖菌数を定量したところ、アメーバ1細胞あたりに含まれる菌数はおよそ1,000cfuと算定され、感染アメーバ1細胞が人に取り込まれれば感染成立に至る可能性が示された。当該研究で改めて抗酸菌による汚染が高率に認められた。また、残留塩素濃度0.4ppmを超える浴槽水の約3分の1から本属菌が検出されたことは特筆される。

わが国では、入浴習慣は単なる健康維持を目的とするのみならず、多分に娯楽(レクリエーション)の要素が加味されている。この風習を是とするものの、その一方で近年開発された入浴関連設備は変化している。現在目にする大型施設は化石燃料の使用や工業技術の発達した今日にあって始めて可能となったもので、旧来の温泉とは全く異なった設備形態となっている。従って、これらの施設に関してはその必要性も含め構造的規制/変更を検討すべきものと考えられる。すでに指摘したように、レジオネラ問題を期に浴槽水の遊離残留塩素管理が推奨・実行されているが、消毒剤の使用は生物浄化という循環式浴槽の主要機能を破壊することに他ならない。

浴場の衛生等管理要領の定めるところを正しく理解すると、循環式浴槽における浴槽水の換水は週に1回以上の完全換水を前提として、さらに単位あたりの延べ入浴者数が規定値を超えた時点で完全換水を義務付けるものとなる。合わせて、衛生等管理要領を基に浴槽水管理のための HACCP システムの構築が重要で導入手順書を作成した。

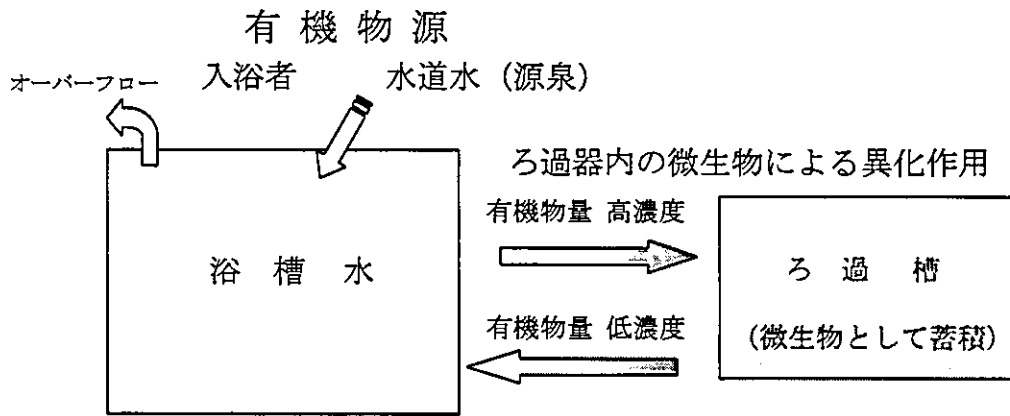
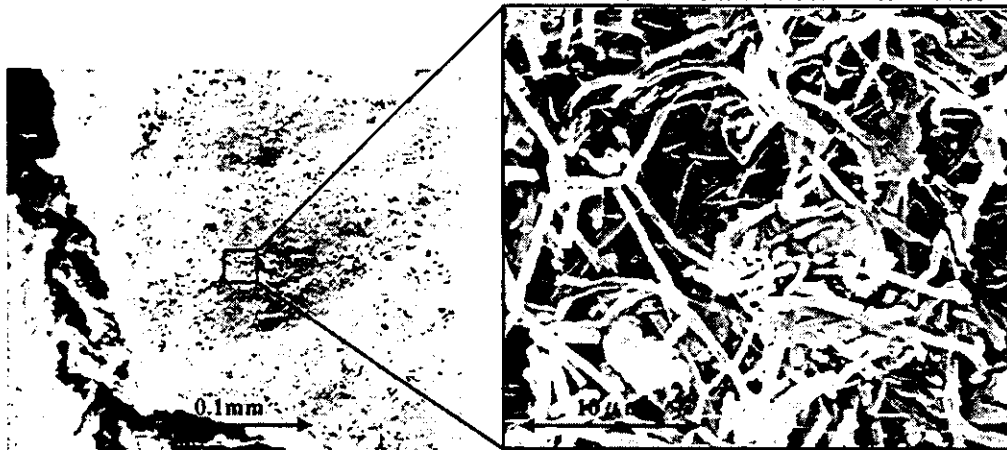


図1. 循環式浴槽における有機物の収支

図2 ゴムパッキンのバイオフィルム (電子顕微鏡写真)

バイオフィルム: 表面に固着した微生物叢



ゴムパッキン (EPDM, ×350)

(×3,500)

劣化したゴムパッキン表面に
複雑なバイオフィルム構造を形成

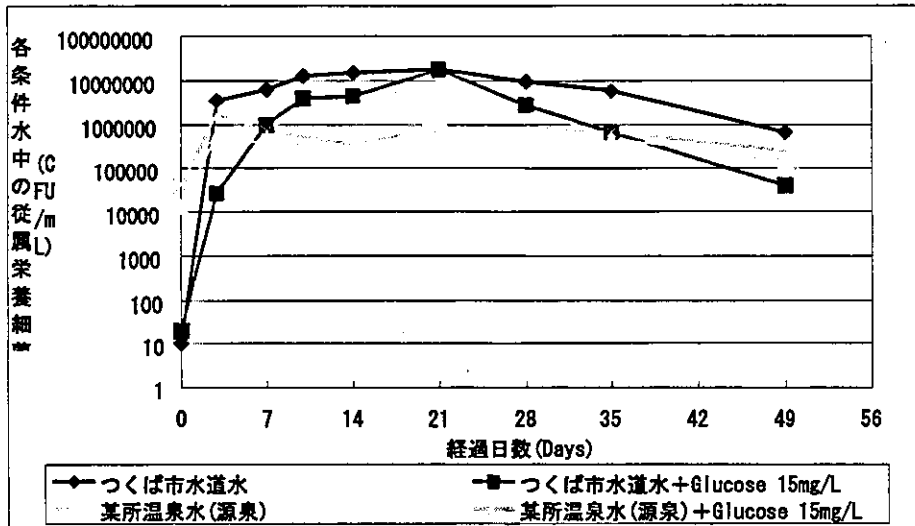


図3. 各条件における従属栄養細菌数の推移グラフ

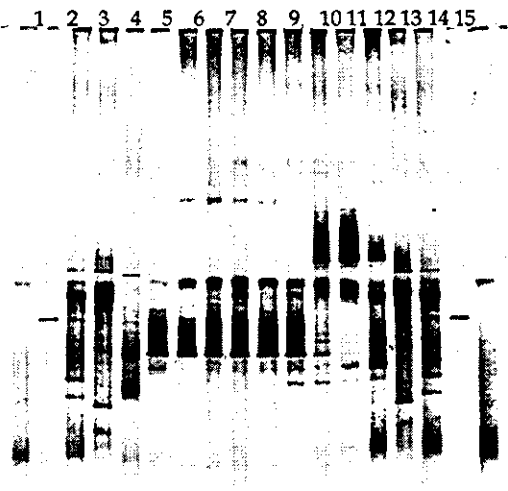


図4 水道水を42℃に加温したモデル浴槽水試料からのDGGE像
 レーン1: *Bacillus subtilis*, 2: *Legionella pneumophila*, 3: マーカー-A, 4: マーカー-BD, 5: 実験0日目, 6: 1日目, 7: 3日目, 8: 5日目, 9: 7日目, 10: 10日目, 11: 14日目, 12: 21日目, 13: 30日目, 14: 42日目, 15: マーカー-BD, 16: マーカー-A

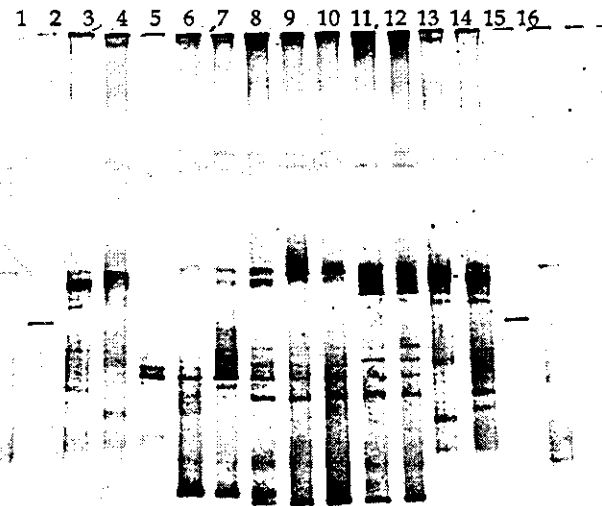


図5 グルコース添加水道水を42℃に加温したモデル浴槽水試料からのDGGE像
 レーン1: *Bacillus subtilis*, 2: *Legionella pneumophila*, 3: マーカー-A, 4: マーカー-BD, 5: 実験1日目, 6: 3日目, 7: 5日目, 8: 7日目, 9: 10日目, 10: 14日目, 11: 21日目, 12: 30日目, 13: マーカー-BD, 14: マーカー-A, 15: *Legionella pneumophila*, 16: *Bacillus subtilis*

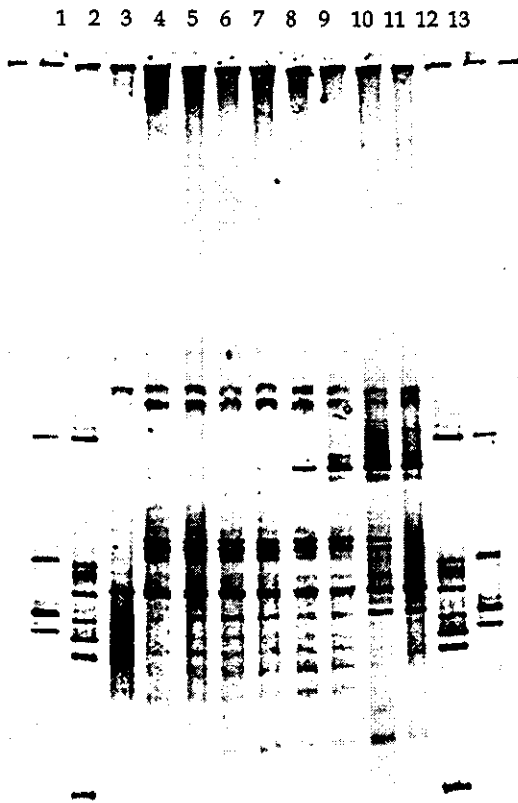


図6 温泉水を42℃に加温したモデル浴槽水試料からのDGGG像
 レーン1: マーカーA、2: マーカーBD、3: 実験0日目、4: 1日目、5:
 3日目、6: 5日目、7: 7日目、8: 10日目、9: 14日目、10: 21日目、11:
 30日目、12: マーカーBD、13: マーカーA

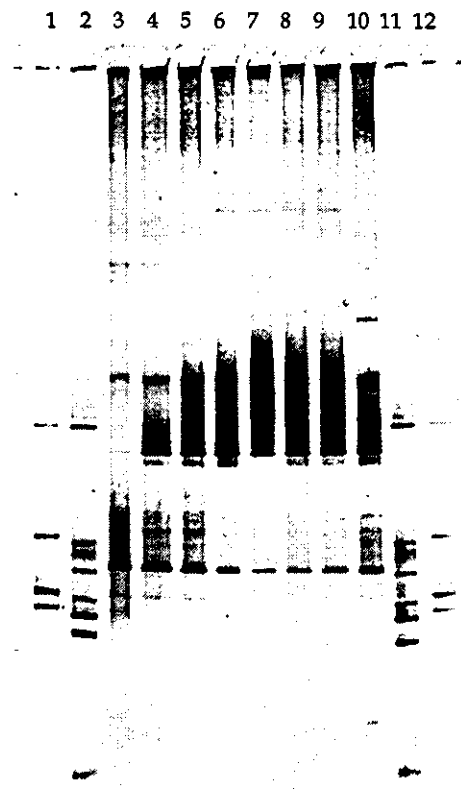


図7 グルコース添加温泉水を42℃に加温したモデル浴槽水試料からのDGGG像
 レーン1: マーカーA、2: マーカーBD、3: 実験1日目、4: 3日目、5: 5日目、
 6: 7日目、7: 10日目、8: 14日目、9: 21日目、10: 30日目、11: マーカーBD、
 12: マーカーA

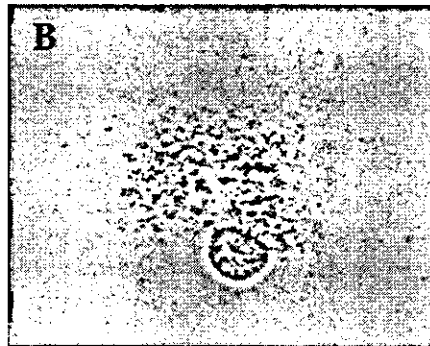
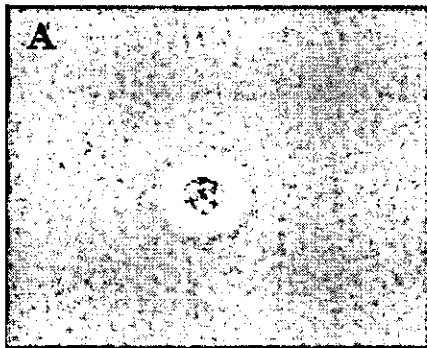
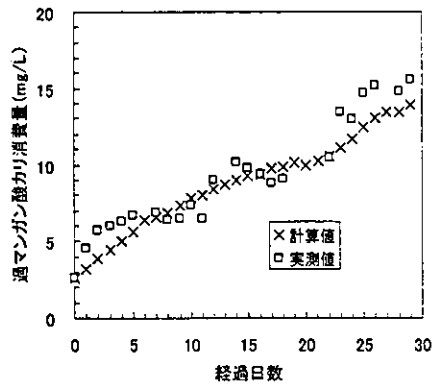
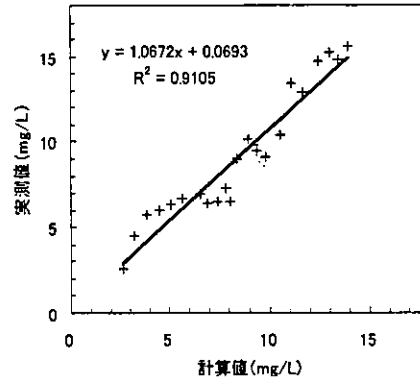


図8、蒸留水中におけるレジオネラ感染アメーバの自然崩壊
 A: 蒸留水中へ移動直後。菌はアメーバ内で運動を継続する。
 B: 数分後、アメーバが崩壊し、細胞内の菌が蒸留水中へ放出される。

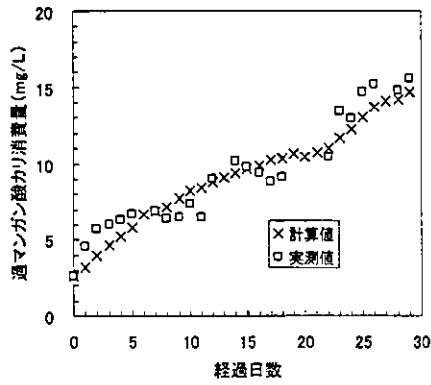
A 過マンガン酸カリウム消費



B 実測値と計算値の相関



C 最適化後の推移



D 実測値と最適化後の計算値

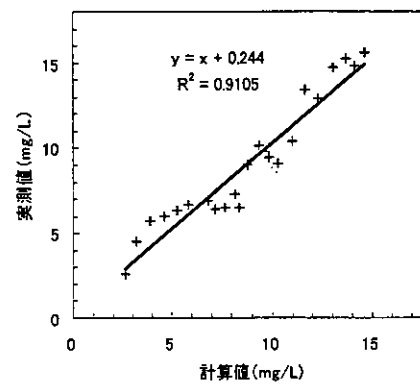


図9 過マンガン酸カリウム消費量の蓄積と計算値の推移

表1 各試料のレジオネラ属菌検出結果

検体番号	浴槽水	浴槽壁面拭 取り	ヘアキャッチャー 壁面拭取り	逆洗水	ろ過装置内 部の水	ろ材
	(cfu/100ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/100ml)	(cfu/100ml)	(cfu/g)
1	<10	0	0			
2	<10	30	0			
3	600	150				
4	<10	0	0		<10	
5	<10	0	0			
6	<10	0	0			
7	<10	0	0			
8	<10	0	0			
9	<10	0				<10
10	<10	0		<10		
11	<10	0	0		<10	
12	<10	0	0			
13	<10	0		<10		
14	<10	0	0			<10
15	<10	0	0		<10	
16	<10	0	0	<10		
17	<10	0	0	<10		
18	90	0	0			
19	<10	0	120		<10	

表中黒マスは試料採取なし

表2. *Legionella pneumophila* 血清群およびその他菌種の分離状況

浴槽水	期間	<i>L. pneumophila</i>						<i>L. micdadei</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. bozemanii</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>Legionella</i> spp.	合計
		SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6						
株数	1996.04 - 2000.11	30	8	116	46	178	86	0	1	0	0	62	527
	2001年度	108	8	70	64	138	75	8	2	1	1	101	576
全株に対する陽性率 (%)	1996.04 - 2000.11	5.7	1.5	22.0	8.7	33.8	16.3	0.0	0.2	0.0	0.0	11.8	100.0
	2001年度	18.8	1.4	12.2	11.1	24.0	13.0	1.4	0.3	0.2	0.2	17.5	100.0
検体当りの陽性率 (%)	1996.04 - 2000.11	2.7	0.7	10.6	4.2	16.2	7.8	0.0	0.1	0.0	0.0	5.6	48.0
	2001年度	5.4	0.4	3.5	3.2	6.9	3.7	0.4	0.1	0.0	0.0	5.0	28.6

表3 浴槽水から検出された抗酸菌20株の同定試験結果

No	発育速度	集落性状		光発色性	DDH*
		型	色		
1	Rapid	Rough	灰白色	無	<i>M. fortuitum</i>
2	Slow	Smooth	黄オレンジ色	無	判定不能
3	Slow	Smooth	黄オレンジ色	無	<i>M. gordonae</i>
4	Slow	Smooth	黄オレンジ色	無	<i>M. gordonae</i>
5	Slow	Smooth	黄オレンジ色	無	<i>M. gordonae</i>
6	Slow	Smooth	黄オレンジ色	無	<i>M. gordonae</i>
7	Slow	Smooth	灰白色	無	<i>M. avium</i>
8	Slow	Smooth	灰白色	無	判定不能(⑨⑩)
9	Slow	Smooth	灰白色	無	<i>M. avium</i>
10	Rapid	Rough	灰白色	無	<i>M. fortuitum</i>
11	Rapid	Rough	灰白色	無	<i>M. fortuitum</i>
12	Slow	Smooth	黄オレンジ色	無	<i>M. gordonae</i>
13	Slow	Smooth	黄オレンジ色	無	<i>M. gordonae</i>
14	Slow	Smooth	灰白色	無	判定不能(⑬⑭)
15	Slow	Smooth	黄オレンジ色	無	判定不能(⑦⑩)
16	Slow	Smooth	クリーム色	無	<i>M. avium</i>
17	Slow	Smooth	クリーム色	無	<i>M. avium</i>
18	Slow	Smooth	クリーム色	無	<i>M. avium</i>
19	Slow	Smooth	クリーム色	無	<i>M. avium</i>
20	Slow	Smooth	黄	無	<i>M. intracellulare</i>

*DDH: DNA-DNA Hybridization法キット (極東製薬工業) による同定結果

⑦: *M. gordonae* , ⑨: *M. avium* , ⑩: *M. intracellulare* ,

⑬: *M. noncromogenicum* , ⑭: *M. terrae*

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

バイオフィルム難付着性配管、パッキン等材の選定

主任研究者： 遠藤 卓郎 国立感染症研究所
分担研究者： 杉山 寛治 静岡県環境衛生科学研究所
研究協力者： 大畑 克彦 静岡県環境衛生科学研究所
鈴木 光彰 静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨

循環濾過システム内の集毛器内網、配管、パッキンには、レジオネラ菌巢（バイオフィルム）が付着し、それが浴槽水へのレジオネラ属菌の汚染源となっている。そこで、バイオフィルムが付着しにくい材質を実証実験で選定し、材質変更などでバイオフィルムの付着の少ない循環濾過システムに改良することを図った。

集毛器内網のレジオネラ付着状況は、ステンレス網、銅網で大差がみられず、材質での付着防止は難しいと考えられた。

配管材質ではテフロンライニング>サニタリー配管>PP=VP=銅=酸化チタンコーティング>SUSの順に付着防止効果が認められた。特に、テフロンライニングの防止効果は高かったが、コスト面を考慮すると現場への応用は現在のところ難しく、薬剤洗浄で除菌が可能なVP配管などが現場に適していると判断された。

パッキンではテフロン加工が最も付着防止効果が高く、付着後の薬剤による洗浄・除去も容易であった。一方、EPDM等のゴム製は付着が著しく、薬剤による洗浄・殺菌効果が期待できないことがわかった。現場で広く使われているゴム製パッキンは、コスト面での問題もない市販のテフロン加工パッキンに交換することを提案する。

A. 研究目的

循環濾過システム内の集毛器内網、配管、パッキン（機器と配管等の接合部に漏水を防ぐため装着するもの）には、レジオネラ菌巢（バイオフィルム）が付着し、それが浴槽水への汚染源となっている。そこで、バイオフィルムが付着しにくい材質の集毛器内網、配管、パッキンを実証実験で選定し、材質変更などでバイオフィルムの付着の少ない循環濾過システムに改良することを図った。

B. 材料および方法

実際の入浴施設と同様な有機物等の蓄積状況をつくりだすために、塩素管理中にモデル浴槽へヒトが入浴した後、塩素注入を停止し、15日間殺菌なしの状態で行った。モデル浴槽の集毛器内網について、ステンレス、銅の材質別にバイオフィーム付着状況を検査した。循環装置配管のテストピース部分には、材質別に、ステンレス(SUS)配管、サニタリー配管(表面構造が滑らかなステンレス配管)、塩化ビニール(VP)配管、ポリプロピレン(PP)配管、テフロン(テトラフルオロエチレン樹脂:撥水性、耐薬品性、耐熱性に優れたフッ素樹脂)ライニング配管、銅ライニング配管、酸化チタンコーティング配管を設置した。パッキン材質別ではゴム(EPDM、FPM)、シリコン、紙、テフロン加工、酸化チタンコーティングパッキンを装着した。これらの部分について、自然汚染時のバイオフィーム付着状況と、薬剤洗浄による除去効果をレジオネラ菌数測定、ATP法で調べた。

C. 研究結果

図1に集毛器内網、配管、パッキンの材質別のレジオネラ付着最高菌数を示した。

配管ではテフロンライニング>サニタリー配管>PP=VP=銅=酸化チタンコーティング>SUSの順に付着防止効果が認められた。パッキンでは撥水性が高く、耐薬品性に優れたテフロン加工のものが、最も付着防止効果が高かった。洗浄薬剤等で劣化しやすい材質のEPDMゴム製はバイオフィームの付着が著しく(図2)、加えて付着後の薬剤による殺菌・除去も困難であった(図3)。

図1 バイオフィーム付着の少ない配管、パッキン等の選定

バイオフィーム付着の少ない材質別に記載。()は拭取りによるレジオネラ属菌の最高菌数を示す。

配管材質: テフロン($<10^2$)、サニタリー(10^3)、PP(10^4)、VP(10^4)、
銅(10^4)、酸化チタン(10^4)、SUS(10^5)

パッキン: テフロン($<10^2$)、FPMゴム(10^3)、紙(10^4)、酸化チタン(10^5)、
シリコン(10^6)、EPDMゴム(10^7)

集毛器網: 銅(10^4)、ステンレス(10^5)

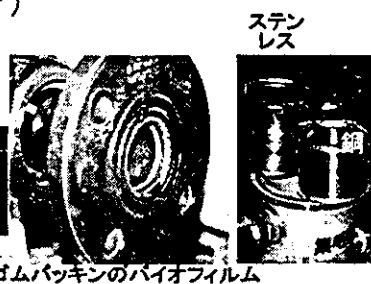
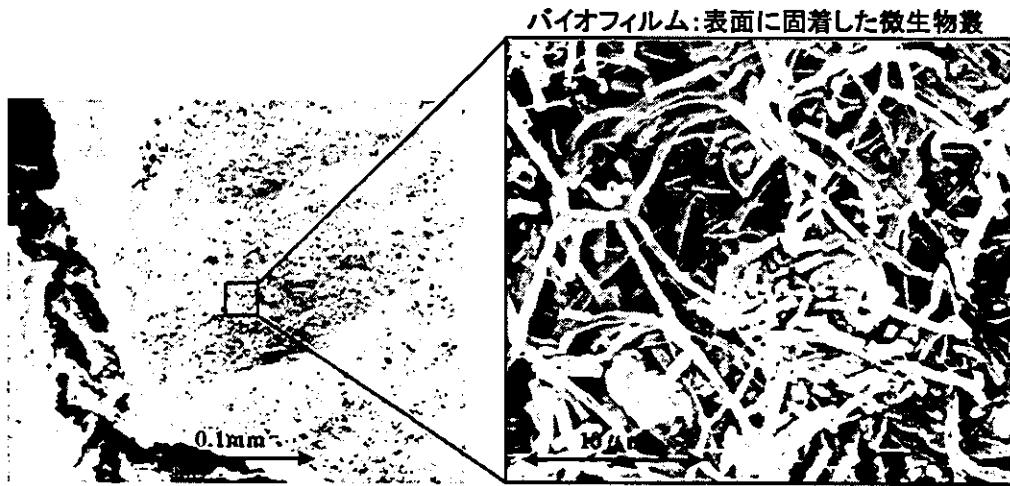


図2 ゴムパッキンのバイオフィルム(電子顕微鏡写真)



ゴムパッキン(EPDM, ×350)

(×3,500)

劣化したゴムパッキン表面に
複雑なバイオフィルム構造を形成

図3 ゴム・パッキンに殺菌洗浄効果は期待できない

< EPDMゴムパッキンの拭取り試験成績 >

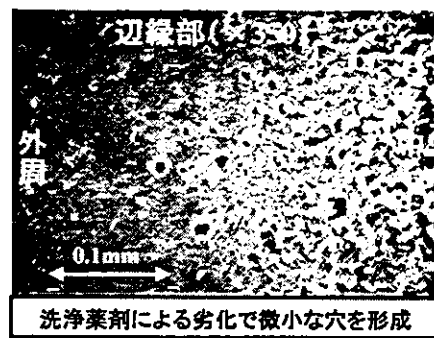
殺菌洗浄前: $10^{5\sim6}$ CFU/綿棒



100ppm塩素剤で2時間循環殺菌後: $10^{3\sim5}$ CFU/綿棒



EPDM(エチレン・プロピレンゴム)パッキン



洗浄薬剤による劣化で微小な穴を形成
ゴムパッキンの走査電子顕微鏡写真

D. 考察および結論

循環式浴槽には、集毛器、配管、パッキンなど循環系全体でバイオフィルムの付着を考慮する必要がある。従って、循環式浴槽のレジオネラ対策を考える上で、浴槽水の殺菌と並行して上述の箇所を中心にバイオフィルム付着を抑える対策が必須である。そこで、コスト面などに考慮しつつ、微生物の付着防止効果と洗浄等によるバイオフィルムの高い除去効果が期待できる材質について検討した。