

して感染アメーバをシャーレ内で移動させながら、持ち込んだ遊離レジオネラから分離した。最終的に感染アメーバはマイクロマニピュレーション法により 12 穴マイクロプレートウェルに用意した 1ml の蒸留水に移し、アメーバを自然崩壊させ菌の遊出を誘導した。なお、菌の放出は位相差顕微鏡で確認した。アメーバ崩壊後、無菌的にピペティングで菌浮遊液を均一に混和した後、100  $\mu$ l を BCYE  $\alpha$  培地に接種し、35°C で培養した。菌数測定は培養後、4 ~ 5 日目に行った。

## C: 結果

### 1) アメーバのレジオネラ感染

アメーバとレジオネラ属菌を PYGC 培地中で共培養すると、時間とともに浮遊するアメーバ数が増加した。そして 2~3 日後にはアメーバ内で旋回運動するレジオネラ属菌が観察され始めた (図 - 1)。レジオネラ感染の明らかなアメーバは、*Acanthamoeba* 属に特徴的な棘状の偽足 (Acanthopodia) が消失し、細胞表面は平滑なほぼ球形の細胞に形態的に変化しており、同じフラスコ内で接着運動する栄養体とは大きく異なっていた。しかしながら、このようなアメーバの形態から細胞内感染の程度を推定することは難しく、これを知るにはギムザ染色が必要であった。ギムザ染色像からは、アメーバ細胞内のレジオネラ属菌の増殖段階は既に大きな菌塊として観察されることがあれば、個々の菌の形態が確認できる程度に少量の場合もあり、アメーバ集団としてみた場合、その細胞内レジオネラ属菌数は極めて不均一であった。そこで本研究では、アメーバ内で菌が活性化した時点を最大増殖段階として考え、その菌数測定することとした。

### 2) レジオネラ感染アメーバの単離

動物への感染実験にあたっては、菌の性質を一定にすべく、感染アメーバを分取することが必要となることから、単一アメーバを分別採取する、即ちアメーバ単離に関する技術的な方法を検討した。単離の方法としてはマイクロマニピュレーションにより吸引採取するという方法を試みた。アメーバが接着性を失い浮遊した状態では、吸引採取は容易であり、菌が細胞内運動性を示しているアメーバであっても、損傷を与えずに多数のアメーバ細胞集団の中から目的のアメーバを単離することが可能であった。また、清浄な PBS (-) あるいは PYGC 培地に単離した後、再び新しいものを用いて単離を繰り返すことで元のカルチャーからの遊離した菌の混入を低減することができた。

### 3) 細胞内増殖レジオネラ菌数の培養法による定量

各発育段階によるレジオネラ属菌の感染性を比較するためには、感染させるレジオネラ属菌の定量性が重要である。アメーバ細胞内に増殖した菌の数を測定するにあたっては、超音波による感染アメーバの破碎は可能であったが、破碎の程度が不明なこと (肉眼的に確認不能)、過剰処理による菌へのダメージが避けられないことから、本研究では高張な溶液中で培養したアメーバを蒸留水という低張液に移すことにより浸透圧差を利用して細胞破壊に導く方法

を用いた。本法では蒸留水中に移動後、数分後で感染アメーバが自然崩壊し、細胞内で活発に運動していた菌が一斉に放出されることを肉眼的に確認できた（図-2）。

放出後も菌には高い運動性が保持されており、蒸留水中に徐々に拡散していった。完全なアメーバの破壊と菌濃度の均一化のために菌浮遊液を 10 回ピペッティングにより混和し、100  $\mu$  を BCYE  $\alpha$  に接種した。なお、実験に用いた BCYE  $\alpha$  プレートは要時調整して用いた。またバックグラウンドとして遊離している菌の混入の可能性があることから、アメーバを 1 次単離した時のアメーバ周辺の PBS あるいは PYGC のみを約 10  $\mu$  l、同様に蒸留水に入れ、その菌数を測定した。

予備試験として、菌が細胞内活性化したアメーバ 19 個に関する菌数定量を行った。結果を図-3 に示す。アメーバ 1 細胞内で増殖したレジオネラ属菌の数は予想外に差が大きく、最小で 7cfu/Am、最大で約 3,100 cfu/Am であった。全体としては 52.6% が 500 cfu/Am 以上であった。

アメーバ間の菌数の差が大きかったことから、アメーバ由来の菌の培養条件は通常の場合とは異なる可能性もあることを考え、BCYE  $\alpha$  を標準培地としていくつか培養条件を再検討した。まず培養条件として pH を変動させた時の結果を図-4 に示した。pH6.3 から 0.3 毎に設定し pH7.5 まで 5 段階の pH について調べたところ、pH6.3 で菌数が低いものの、pH6.6 ~ pH7.5 までは、同一アメーバにおいて菌数に大差は見られなかった。なお、この時対照として用いた栄研化学製の市販レジオネラ用 BCYE  $\alpha$  プレートは、意外なことにすべてのアメーバに関して最も低い菌数を示し、標準的 pH 条件である pH6.9 における結果と比較して、その菌数は各アメーバにおいて 5~16.2% にとどまった。

図-5 は、培地サプリメントとして用いられるピロリン酸鉄の濃度の影響を調べた結果を示した。この時も同時に栄研化学製の市販レジオネラ用 BCYE  $\alpha$  プレートを用いた。ピロリン酸鉄の標準濃度（0.04%）を x 1 として、x 2 と x 3 濃度を比較したが、同一アメーバ内での鉄濃度による菌数の違いは見られなかった。この実験では、アメーバ崩壊後の蒸留水中での菌の失活が起こる可能性を考慮し、アメーバ崩壊後は直ちに x 2 の PBS を加えイオン調整を行い、BCYE  $\alpha$  プレートに接種することで、実験操作に伴う時間的影響を最小限にした。しかしながら、アメーバ間の菌数の差は依然として認められ、また栄研化学製のプレートの菌数はこの実験でも最少であることが示された。

さらにアメーバへの感染とその後の細胞内増殖は 30°C で行われることから、菌数に対する培養温度の影響を調べた。30°C と 35°C における菌数を図-6 に示したが、両方で菌数に差は認められなかった。

レジオネラ属菌の増殖性がアメーバ間で大きく異なる原因として、アメーバの単離操作自体が細胞内のレジオネラに何らかのストレスを与えるものと考えられたことから、これを最小限にするために、蒸留水中に移動するまでの単離操作は培養液である PYGC 中で行うことを試みた。結果としては、本法でもアメーバの崩壊は数分で生じることが分かり、放出された菌は直ちに標準サプリメント条件の BCYE  $\alpha$  プレートに接種した。図-7 に示すように、本法においてもアメーバ間の菌数には幅があり、最大で約 4,500 cfu/Am、最小で約 150

cfu/Am であった。アメーバの直径を測定し、菌数との関係を示したのが図-8 である。約 4,500 cfu/Am を示したのは、最大直径を示したアメーバであったが、直径と菌数の関係は明らかではなかった。全体としてアメーバの径が 15-25  $\mu$ m の場合で菌数は 1000 cfu/Am 前後に分布した。

#### レジオネラ属菌増殖用培地のメーカーによる菌増殖性

本研究では、菌の定量にあたり DIFCO 製 Legionella Agar Base にピロリン酸鉄および L-システインを標準濃度で添加し調整した培地を標準的に用いたが、栄研化学社製の市販プレートとの比較から、後者の菌増殖性が大きく低下することが示された。メーカーによる違いは予想外であったので、さらにOXOID製の培地を調整して、3者を比較した。その結果を図-9 示したが、DIFCO 製と比較してOXOID製はやや増殖性が良い傾向が見られたのに対し、栄研化学社製は最も増殖性が低いことが再確認された。なお、OXOID製培地においてもアメーバ間の菌数には差が認められた。

#### D: 考 察

レジオネラ属菌の国内感染事例の調査報告からは、感染源におけるレジオネラ菌濃度は事例によって大きな差があり、また感染者数と菌濃度との間に特に関係がみられないことなど、単に菌の汚染度のみで感染が起きるものではないことが知られている。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が (Clrillo ら、1994、Brieland ら、1996、1997)、本研究ではアメーバ内増殖というプロセスがレジオネラ属菌の感染成立にどのように関係するのか、アメーバ細胞単位でその影響を解析することを目的に、まずアメーバ内で増殖しうる最大菌数を調べた。その結果、アメーバの直径が 15-25  $\mu$ m の場合で培養可能な菌数として、およそ 1000 cfu/アメーバという数値が得られた。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 (*Legionella 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  $1.4 \times 10^5$  と計算されている (Berendt ら、1980)。本研究で得られた 1000 cfu/Am という菌数からは、実験的に感染アメーバ 1 細胞で感染が成立する可能性が示された。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。

本研究から同一発育段階にある菌数として 1000 細胞単位で扱えるという条件が得られ、実験の定量性が向上することが期待される一方、菌の絶対数についてはさらに検討を要するところとなった。蛍光抗体染色、フローサイトメータを応用してみたが、良好なデータは得られていない。また菌発育段階の選定として、本研究ではアメーバ内活性化をマーカーに感染アメーバを選択し、その菌数を測定したが、個々のアメーバにより菌数には予想外に差があることが認められた。原因は明らかではないが、細胞内増殖過程において、菌の性質がアメー

バ個々の細胞内環境に決定される可能性があるものと考えられた。レジオネラ属菌の増殖用培地は現在 BCYE $\alpha$  が標準使用となっているが、その培地条件は必ずしもアメーバ内増殖した菌に対しては最適であるとは言えないことが本研究では示されており、環境中に生存している菌とアメーバ内で増殖していた菌とでは、栄養要求の面で異なる可能性があることを考慮する必要があると思われる。アメーバ内増殖した菌の培養法に関しては、感染源調査においてアメーバから放出された菌を確実に検出する場合に備えて、改良を目的に検討を進めるべきものと考えられる。

## E: 結 論

## 参考文献

Berendt R.F. et al., (1980) Dose-response of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*. J. Infect. Dis., 141(2):186-192.

Brieland J.K. et al., (1996) Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of legionnaires' disease. Infect.Immun. 64(7):2449-2456.

Brieland J.K. et al., (1997) The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of legionnaires' disease. Infect.Immun. 65(12):5330-5333.

Cirillo J.F., et al., (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. Infect.Immun. 62:3254-3261.

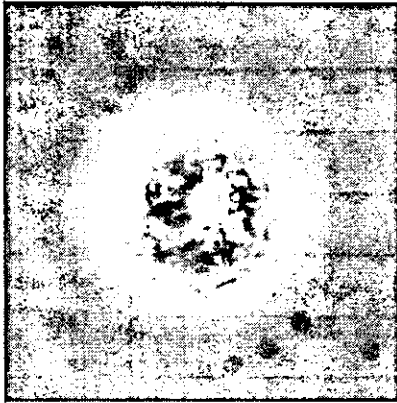


図-1、レジオネラ感染アメーバの形態

既に菌は細胞内に充満するまで増殖し、かつ  
全体的に活発に旋回運動を行っている。

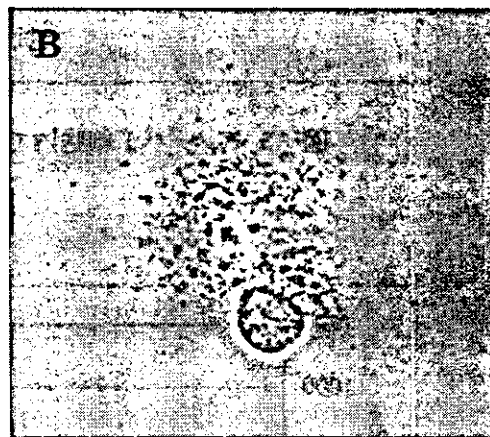
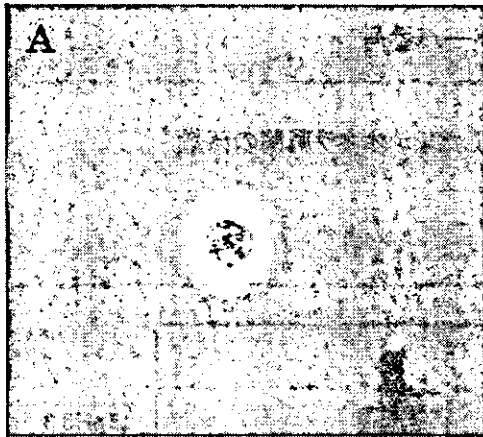


図-2、蒸留水中におけるレジオネラ感染アメーバの自然崩壊

A:蒸留水中へ移動直後。菌はアメーバ内で運動を持続する。

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。

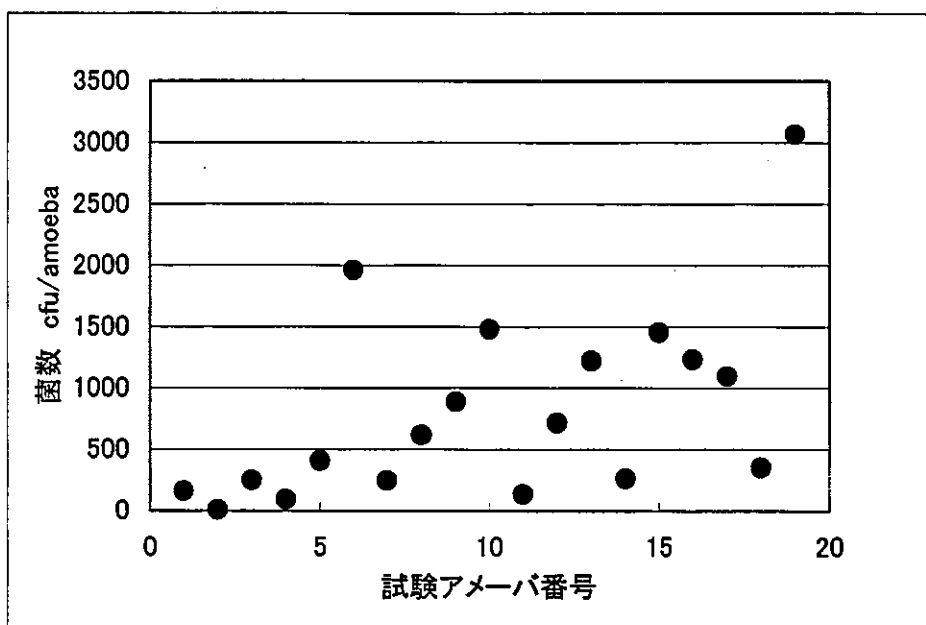


図-3、アメーバ1細胞内で増殖したレジオネラ属菌の菌数

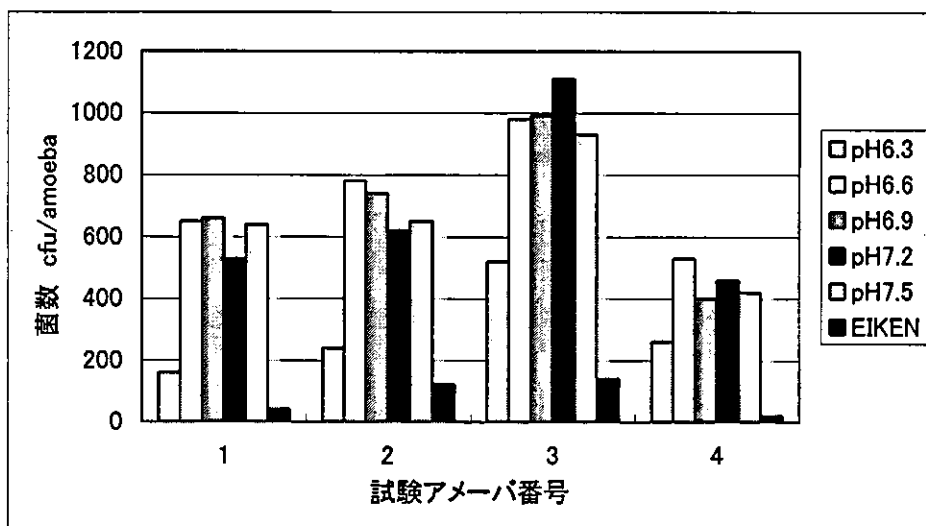


図-4、細胞内増殖したレジオネラ属菌の BCYE $\alpha$  培地における発育に及ぼす培地 pH の影響  
EIKEN は栄研科学の市販プレートを用いた結果を示す。

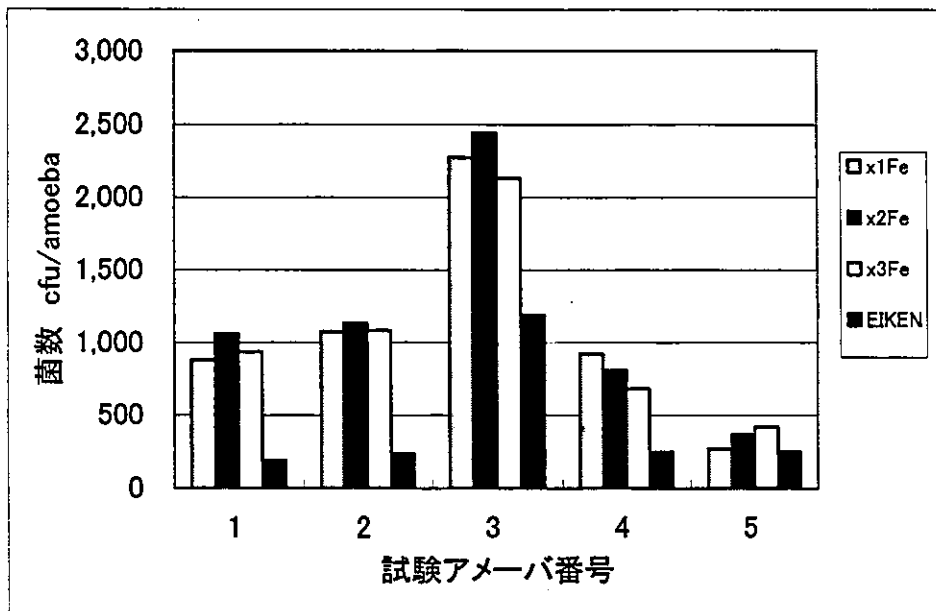


図-5、細胞内増殖したレジオネラ属菌の BCYE  $\alpha$  培地における発育に及ぼす培地ピロリン酸鉄濃度の影響

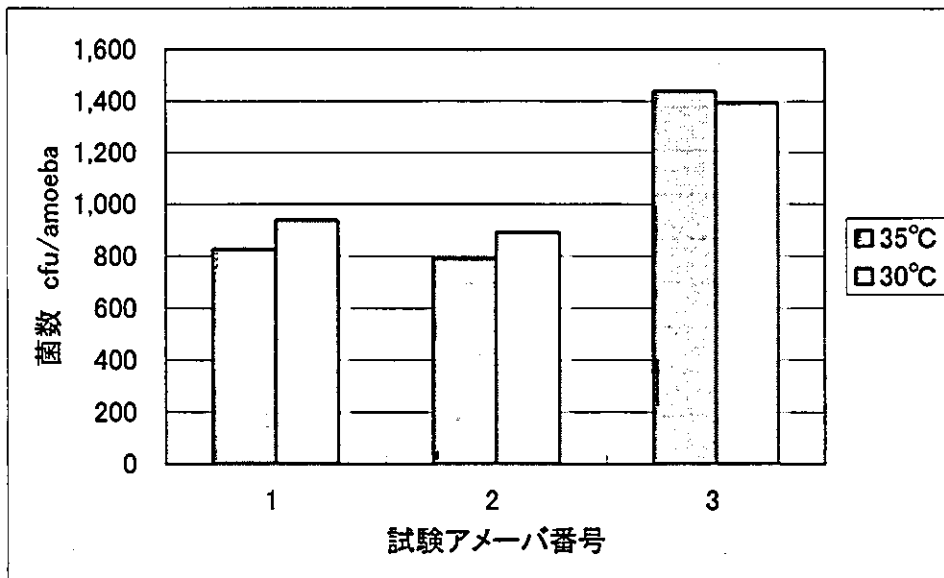


図-6、細胞内増殖したレジオネラ属菌の BCYE  $\alpha$  培地における発育に及ぼす培養温度の影響

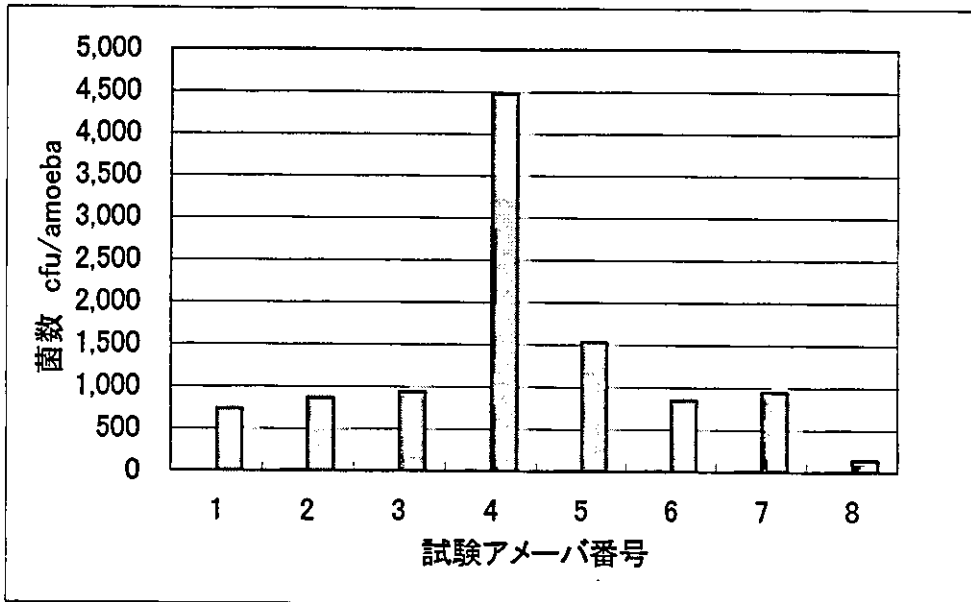


図-7、単離操作をPYGC培地中で行ったときのレジオネラ属菌の細胞内菌数

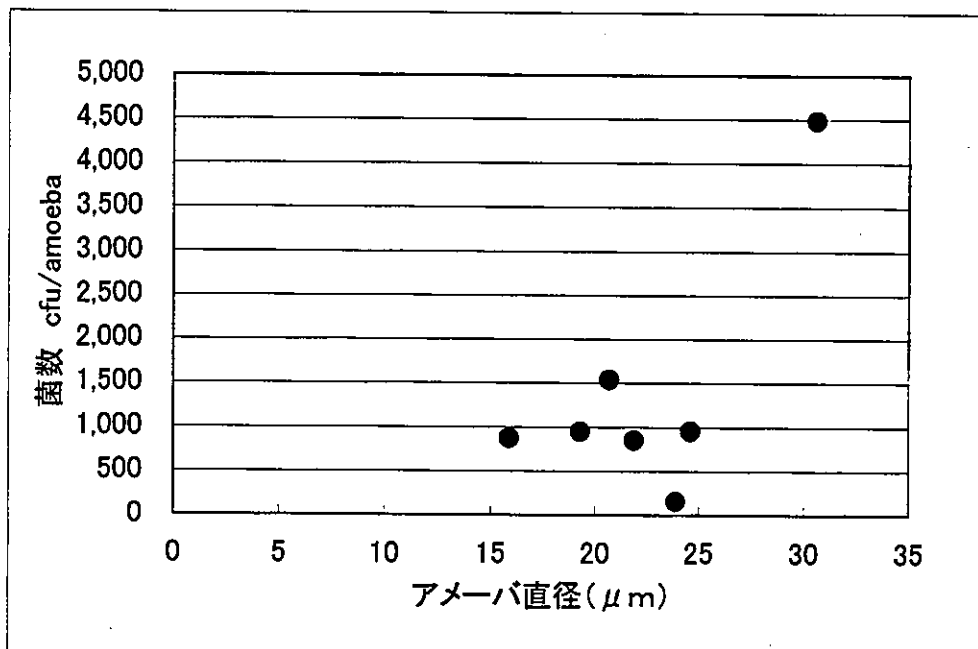


図-8、感染アメーバの直径と細胞内で増殖した菌数の関係



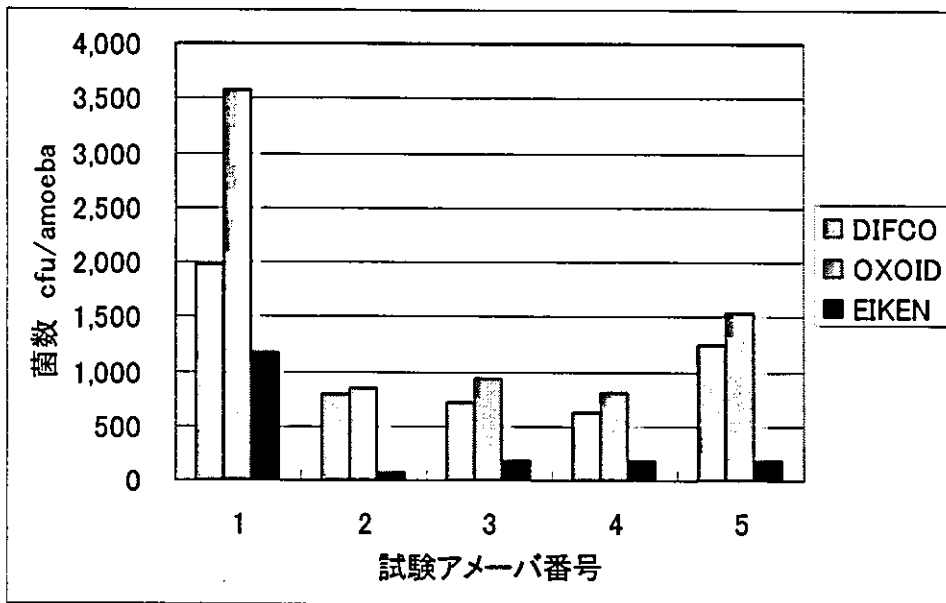


図-9、レジオネラ属菌増殖用培地のメーカーによる菌増殖性

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水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

入浴施設の浴槽水における抗酸菌検出状況

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	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
協力研究者	山崎 利雄	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
	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

概要: 入浴施設の浴槽水における抗酸菌の汚染状況を調査したところ、利用者毎に完全換水を行って使用する浴槽であっても気泡発生装置などが付属されている浴槽から高率に本菌が分離された。また、残留塩素濃度別の抗酸菌検出状況では、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を超える濃度の浴槽水約3分の1から抗酸菌が検出された。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。

A. 研究目的

浴槽水におけるレジオネラ汚染問題は温水を連用することで生ずるものであるが、循環式浴槽ではろ過槽と複雑な配管系を持つことでさらにバイオフィルムの着生場所（汚染巣）を広げている。浴槽の構造上、循環システムを持つ浴槽はそればかりではなく、利用者毎に完全換水を行って使用する浴槽においても気泡発生装置などのため配管される場合がある。これらの清掃は容易でなく、往々レジオネラやその他の病原微生物の繁殖が見られる。微生物学的な汚染はそれだけには留まらない。当該研究では、循環配管されている浴槽を対象に *Mycobacterium* 属菌類の汚染について検討した。

B. 材料および方法

平成16年6月～11月（8月は除く）において、静岡県内のホテル、旅館または公衆浴場等44施設の浴槽水計60検体について、抗酸菌の汚染状況を調査し、浴槽の形態①連日使用循環式②毎日完全換水循環式③毎日完全換水式④利用者毎完全換水式）または、浴槽水中の残留塩素濃度との関連を検討した。

## 1. 培養

抗酸菌： 浴槽水を9,000 rpm、30分の遠心を行い、得られた沈渣をアルカリ処理後、2%小川培地に接種して分離培養を行った。検出された菌をチール・ネルゼン染色法で抗酸菌である事を確認した。抗酸菌であることが確認された菌株につき増菌培養を行い、同定試験へ供した。同定試験は、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) 試験等々である。

レジオネラ属菌： 検体400mlを9,000rpm、30分間遠心後、上清を捨て、沈渣を滅菌PBSにより懸濁して100倍濃縮液を作製した(冷却遠心濃縮法)。そして、濃縮液を50°C、20分間加熱処理後、その100 $\mu$ lをGVPC寒天培地(ピオメリュー)に塗布し、37°C7日間、培養した。本菌を疑う集落について、BCYE $\alpha$ 培地(日水)およびSCD寒天培地(栄研)による鑑別培養後、レジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いたスライド凝集反応により、血清群を決定した。

## C. 研究結果

### 1. 抗酸菌の汚染状況

浴槽水60検体中14検体(23.3%)から抗酸菌20株が分離された。同定試験の成績を表1に、菌種の内訳を表2に示した。同定試験の内訳は、*Mycobacterium gordonae* 6株、*M. avium* 6株、*M. intracellulare* 1株、*M. fortuitum* 3株、同定不能4株であった。結核菌(*M. tuberculosis*)は検出されなかった。浴槽原水別に検出状況を見ると、水道水6検体、井水5検体、温泉水3検体であった。

一方、レジオネラ属菌は10検体(16.7%)から検出された(表3)。その菌量は10~3,400CFU/100ml(表4)で、分離株の血清群は、*Legionella pneumophila* SG1、SG3、SG4、SG5、SG9、*L. micdadei*および*L. spp*であった。

### 2. 浴槽形態別抗酸菌の汚染状況

浴槽形態別の本菌検出状況では、利用者毎完全換水式浴槽水において5検体(55.6%)が陽性であったが、毎日完全換水式浴槽水からは検出されなかった(表5)。

### 3. 浴槽水の残留塩素濃度別の抗酸菌汚染状況

抗酸菌が検出された浴槽水14検体における残留塩素濃度別の本菌検出状況は、6検体(42.9%)が残塩0.2ppm未満の浴槽水からの検出で、5検体(35.7%)が残塩0.4ppmを超える浴槽水からの検出であった(表6)。

### 4. 浴槽水の残留塩素濃度別のレジオネラ属菌検出状況

レジオネラ属菌が検出された浴槽水10検体における残留塩素濃度別の本菌検出状況は、4検体(40%)が残塩0.2ppm未満の浴槽水からの検出で、残塩0.4ppmを超える浴槽水からの検出も2検体(20%)あった(表6)。

#### D. 考察

浴槽の形態別抗酸菌検出状況では、ろ過装置を持たないものの気泡発生装置などのために循環配管されている浴槽から高率に本菌が分離された。本浴槽においては、利用者ごとに換水を行うものの洗浄・殺菌が不十分なため、抗酸菌が生残したものと考えられる。かつて、家庭用の24時間風呂の浴槽水から感染したと考えられる *M. avium* による皮膚感染症例が新聞で話題になり、家庭用の24時間風呂の浴槽水からはレジオネラ属菌と共に非結核性抗酸菌の分離報告がなされている。そこで、本研究班では改めて浴場より採取された浴槽水を対象としてレジオネラ菌と共に非結核性抗酸菌の調査を行った。その結果、61検体中14検体(22.9%)から抗酸菌20株が分離され、*M. avium* は、6株検出された。他に、*M. intracellulare* 1株、着色菌である *M. gordonae* 6株と迅速発育抗酸菌である *M. fortuitum* 3株が分離された。これまでの報告によると、家庭用の24時間風呂では15.6%が培養陽性率であったと報告されており、これに比べれば当該研究で対象とした施設の方が若干高い陽性率(22.9%)であった。DDH試験で同定不能であった株は、「相対類似度が70%以下であること」という判定基準により判定できなかった株で、*M. avium*、*M. noncromogenicum*、*M. gordonae* が予想された。全く判定不能株であった1株も集落性状からは、*M. gordonae* と予想されるが、判定不能株については、塩基配列決定法により、正確な同定を行う予定である。

残留塩素濃度別の抗酸菌検出状況では、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を超える濃度の浴槽水約3分の1から本菌が検出された。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。

表1 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*

表2 抗酸菌20株の菌種の内訳

菌種名	株数
<i>M. gordonae</i>	6
<i>M. avium</i>	6
<i>M. intracellulare</i>	1
<i>M. fortuitum</i>	3
未同定	4

表3 抗酸菌およびレジオネラ属菌検出状況(%)

	レジオネラ属菌 (+)	レジオネラ属菌 (-)	計
抗酸菌 (+)	4 (6.7)	10 (16.7)	14
抗酸菌 (-)	6 (10)	40 (66.7)	46
計	10	50	60

表4 菌数別レジオネラ属菌検出状況(%)

	10~<10 <sup>2</sup> CFU/100ml	10 <sup>2</sup> ~<10 <sup>3</sup> CFU/100ml	10 CFU/
レジオネラ属菌 (+)	5 (50)	2 (20)	3 (30)

表5 浴槽形態別抗酸菌およびレジオネラ属菌検出状況(%)

	連日使用 循環式浴槽	毎日完全換水 循環式浴槽	毎日完全 換水式浴槽	利用者毎 完全換水式 浴槽	
抗酸菌 (+)	7/36(19.4)	2/10(20)	0/5(0)	5/9(55.6)	14
レジオネラ属菌 (+)	4/36(11.1)	1/10(10)	2/5(40)	3/9(33.3)	10

表 6 残留塩素濃度別抗酸菌およびレジオネラ属菌検出状況(%)

	<0.2ppm	0.2~0.4ppm	0.4ppm<	未検査 又は不明
抗酸菌 (+)	6 (42.9)	2 (14.3)	5 (35.7)	1 (7.1)
レジオネラ属菌 (+)	4 (40)	2 (20)	2 (20)	2 (20)

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

入浴者による浴槽水の有機物負荷量の試算

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 泉山 信司（国立感染症研究所寄生動物部）

研究要旨

公衆浴場法による規程では、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解釈される。

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と承知するが、その適用条件は十分検討する必要がある。すなわち、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分解されて減少・消失する。この作用は生物浄化と称されるもので、下水処理等では有機物の除去処理に汎用されている。一見して、優れたアイデアであるが、循環式浴槽では生物浄化装置をシステム内に内在させており、このことがレジオネラ汚染問題の原因となっている。本システムでは入浴者の持ち込んだ有機物は微生物（バイオフィーム）に形を変えて系内に保存され、微生物に変わったことで *Legionella* 属菌の増殖の場が形成されるからである。上記の理由で、生物浄化槽が設置された施設では過マンガン酸カリ消費量の測定によって真の有機物汚染量を把握することはできない。これに代わる汚染の指標が必要である。

当該研究事業では、水泳プールでの過マンガン酸カリ消費量の測定値を用いて一人の入浴者が持ち込む有機物量を試算した。水泳プールの基本構造は循環式浴槽と類似し、塩素管理が徹底されていることから、入泳者が持ち込む有機物のほぼ全量が溶存状態で存在するものと判断される。既存の観測資料を基に一日ごとの過マンガン酸カリ消費量を算定するための近似式を立て、実測値と近似値の相関から一人当たりの入泳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）。入浴者一人の持ち込み量をおおむね 0.5 g とし、現行の基準に充てると、1m<sup>3</sup>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（25 mg/L = 25 g/m<sup>3</sup> ÷ 50 人/m<sup>3</sup> = 10 人/200L）。

類似の構造を持つ水泳プールの場合には遊泳中にプール水の誤飲があるものとして、安全側に基準が設けられている。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。当該研究では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であるか、微生物学的視野から引き続き検討する計画である。



## A. 研究目的

活性汚泥など微生物を用いた生物浄化は有機物の除去に用いられる浄化方法として知られるが、循環式浴槽では *Legionella* 属菌の増殖などを招き安全管理上きわめて深刻な問題となっている。その後、*Legionella* 属菌の発生を抑えることを目的とした浴槽水の塩素管理が推奨され、現在ではほぼ水泳プールにおける水質管理と同様な手法がとられている。水泳プール水では大容量の水を頻繁に交換することは不可能で、衛生管理の手段として遊離残留塩素濃度を 0.4 ないし 1.0mg/L に維持するよう通達（遊泳用プールの衛生基準、平成 13 年 7 月 24 日一部改正）されている。また、プールでは遊泳者の持ち込む有機物量として過マンガン酸カリ消費量に換算して 2~12mg/L 以下であることが定められている。

塩素管理の徹底が図られるかぎり、循環式浴槽において *Legionella* 等の病原微生物による汚染は回避できるものと考えられるが、浴槽水を無期限に使用することは想定されていない。現行の衛生管理要領に従えば、浴槽水は毎日の完全換水が基本で、それが困難な場合であっても 1 週間に 1 回以上の洗浄・換水を行なうことと定められている。しかしながら、浴槽の規模、足し水による換水率、および入浴者数など汚染に関係する要因は個々の施設により異なるもので、的確な管理指標が必要である。

本研究では、水泳プール水を対象とした過マンガン酸カリ消費量の変動を調査した結果から、一人の利用者（遊泳者）の持ち込む過マンガン酸カリ消費量を推定した。具体的には、水泳プールにおける過マンガン酸カリ消費量の日変動データを用い、過マンガン酸カリ消費量の蓄積をシミュレーションした。得られた結果を基に一人当たりの利用者が持ち込む有機物量を計算し、過マンガン酸カリ消費量の基準値に沿って新たな管理指標を提案する。

## B. 研究方法

### 水泳プールにおける過マンガン酸カリ消費量の日変動記録

当該研究の基礎資料として、昭和 54 年から 55 年にかけて都内の某屋内水泳プールを対象に、入泳者数、補給水量、KMnO<sub>4</sub> 消費量を 1 ヶ月にわたって連日測定した資料を用いた（表 1）（今関修由等、(1980) プールにおける補給水量と過マンガン酸カリ消費量について。東京都衛生局学会、122-113.）。当該プールの管理状況は以下の通りであった。水泳プールの容積は 350m<sup>3</sup> で、循環水量は 100m<sup>3</sup>/時間で終日連続砂ろ過が行なわれた。循環系には 9m<sup>3</sup> のサージタンクが取り付けられており、循環系を含むプール水の総容積はおよそ 360 m<sup>3</sup> であった。オーバーフロー水の一部ろ過再利用が行われており、これに相当量の水道水が補給されていた。以下の計算には循環系を含むプール水の総容積を 360 m<sup>3</sup> とした。水の完全換水を行なった日を記録開始日とし、連日、同一時刻に過マンガン酸カリ消費量が測定が行われた。また、毎日の補給水量、入泳者数も正確に記録されていた。

当該水泳プールの主な利用者は、スイミングスクールに所属する児童であった。なお、本施設は遊泳用プールの衛生基準（厚生労働省）に従った管理が行なわれており、0.4mg/L 以上の残留塩素が保持されていた。したがって、ろ過器内における生物浄化作用（有機物の消費）は無視できるものとした。このことは、表 1 よりろ過槽前後での過マンガン酸カリ消費量の違いを比較することで確認した。すなわち、

ろ過水の値がわずかに小さい（単純平均値でプール水 9.1 に対して濾過水 8.8）傾向にあったが、有意の差は認められなかった。

#### 過マンガン酸カリ消費量測定

過マンガン酸カリ消費量の測定はオルトトリジン法が用いられた。KMnO<sub>4</sub>消費量の測定は採水場所による偏りを平均化するため3点の平均値を持って代表した。水道水由来の過マンガン酸カリ消費量は換水直後に測定して得られたプール水の値（=2.6mg/L）を充て、調査期間中は変動しないものと仮定した。ちなみに、水道が元来有する過マンガン酸カリ消費量は、1日の給水量が20万t以上の浄水場18箇所のH14年データによると、最小0.3mg/Lから最大2.8mg/Lの値をとっており（日水協、水道水質データベース、<http://www.jwwa.or.jp/mizu/>）、上述の2.6mg/Lはこの範囲内であった。

#### 過マンガン酸カリ消費量の日変動のシミュレーション

計算には基本的に Excel (Microsoft) を用い、初期値にしたがって1ヵ月分の過マンガン酸カリ消費量の計算が行なわれるようにセルの数式を入力した。数式の作成における基本的な計算の流れは結果に示すとおりである。

### C. 結果

#### 有機物汚染の蓄積

表1のデータを用いて以降の解析を進めた。表1では時間の経過、すなわち利用者の延べ数の増加とともに過マンガン酸カリ消費量が上昇しているが、プールでは系外に排水される水（捨て水）の量が限られる（補給水が少ない）ことによるものと判断された。同様の管理下にある循環式浴槽においても同じ現象が見られるものと推測される。本研究ではこの日変動をシミュレーションする簡単な数式モデルの作成を試みた。

ここで、水試料中の過マンガン酸カリ消費量= $P_{(x)}$ は、水道水に由来する水由来過マンガン酸カリ消費量= $P_w$ と、残留している人由来過マンガン酸カリ消費量= $HR_{(x)}$ に分けることが出来る（図1）。水道水に由来する水由来過マンガン酸カリ消費量= $P_w$ は水泳プール利用開始前に測定した値の2.6mg/Lを使用し、翌日以降の利用者に由来する有機物汚染の計算から過マンガン酸カリ消費量= $P_{(x)}$ の算出を行なうこととした（式1）。

$$P_{(x)} = HR_{(x)} + P_w \quad \dots\dots\dots (式1)$$

ただし、 $P_w = P_{(0)} = 2.6\text{mg/L}$  とする。

ここで、 $(x)$  は測定から  $x$  日目の日数を表し、 $x$  は0から29の間の値を取る。

入泳者由来の有機物= $HA_{(x)}$  は、当日の入泳者数  $N_{(x)}$  に一人あたりが持ち込む有機物量= $C$  を乗じて求めた。毎日の入泳者数= $N_{(x)}$  は表1から得た。当初、一人あた

りの持ち込む有機物量を過マンガン酸カリ消費量に換算して  $C=0.5g$  して計算を開始した (式2)。一人あたりの入泳者が持ち込む有機物量  $C$  は後に検討を加えた。

$$HA_{(x)} = N_{(x)} \times C \quad \dots\dots\dots (式2)$$

$HA_{(x)}$ は入泳者数  $N_{(x)}$  の増加に比例して増加するが、当日の補給水により希釈される (図1)。希釈係数  $D_{(x)}$  は水泳プールの保有水量  $T$  と補給水量  $A_{(x)}$  から求めた (式3)。

$$D_{(x)} = \frac{T}{A_{(x)} + T} \quad \dots\dots\dots (式3)$$

翌日に持ち越される過マンガン酸カリ消費量は、前日の残留分に当日の追加分を加えてから希釈係数を乗じて求められる (式4)。

$$HR_{(x)} = (HR_{(x-1)} + HA_{(x)}) \times D_{(x)} \quad \dots\dots\dots (式4)$$

以上の式を基に、1ヵ月間にわたる過マンガン酸カリ消費量の日変動のシミュレーションを行った。この計算は前日の計算結果に依存しており、初期値として与える数値は、表1より利用者数  $N_{(x)}$ 、補給水量  $A_{(x)}$ 、および一人あたりの入泳者が持ち込む有機物量  $C$  である。2日目以降の過マンガン酸カリ消費量  $P_{(x)}$  は近似式を用いて求め、これを実測値と比較した (図2A)。実測値、近似値のいずれも時間の経過とともに (入泳者の数が増すにつれて) 増加することが示された。近似式で得られた値の信憑性については両者の関係から得られる回帰直線の傾き  $a$  で評価した。 $C=0.5$  としたときの、回帰直線の傾きは  $a=1.07$  となり (図2B)、計算値と実測値はほぼ1:1の対応を示した。さらに、 $C=0.53g$  のとき、 $a=1.00$  となった (図2C、D)。

#### D. 考察

従来の公衆浴場等では、浴槽水を毎日完全換水することが基本とされていた。その後、経緯は不明であるが、一日の補給原湯量が浴槽容積を超える場合には換水と看做され、さらには循環式浴槽が普及するところとなった。レジオネラ問題が生じたのは循環式浴槽が導入された後のことである。周知のごとく、水質基準の項目には過マンガン酸カリ消費量の濃度規制が設定されており、入浴者により持ち込まれる汚れ (有機物: 過マンガン酸カリ消費量として測定) の許容上限を定めている。レジオネラ汚染は有機物汚染を端緒として発生するもので (図3)、当該水質項目はレジオネラ汚染に深く関連した事項である。浴槽水の衛生管理には HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point: 危害分析重要管理点) の概念あるいは、複数の安全対策の設置が求められるところで、レジオネラ対策としては特に有機物/微生物の蓄積は避けなければならない。現行の水質基準である過マンガン酸カリ消費量 (25mg/L 以下) の上限規制を有効活用するのであれば、その導入の思想である『持ち込み量の規制』を徹底すべきものとする。すなわち、現行の指針

に示される『毎日完全に換水して浴槽を清掃すること。ただし、これにより難しい場合であっても、1週間に1回以上完全に換水して浴槽を清掃』を前提とし、入浴者数の多い施設では水質基準に照らした換水時期の判断が求められる。しかしながら、本規程の施行時には循環式浴槽の導入は想定されておらず、単に循環浴槽水の過マンガン酸カリ消費量の測定を行えばよいわけではない。

繰り返すが、当該基準は浴槽水の毎日完全換水を前提として設けられた基準で、浴槽水中の汚染物質としての溶存有機物量が測定対象となっている。かつての単純な形態の入浴施設ではろ過槽などが設置されておらず、溶存有機物量は入浴者の持ち込んだ有機物汚染量の全量として差し支えない。一方、循環式浴槽では浴槽水をろ過循環させて継続使用しており、入浴者が持ち込む有機物を取り除くための装置、ろ過槽が設置されている。ろ過槽の機能はいわゆる生物浄化で、微生物（活性汚泥）による溶存有機物の分解である。事実、循環式浴槽では浴槽水中の過マンガン酸カリ消費量が低く抑えられている。ところが、このシステムは閉鎖系であることから入浴者によって持ち込まれた有機物は形を微生物に変えて系内に存在している（図4）。したがって、循環式浴槽での有機物汚染の把握は、溶存量を対象とした測定では十分とはならず、浄化槽等に多量に蓄積される微生物を含めることではじめて把握することができる。しかしながら、そのような試料の採取方法はなく、測定方法も新たに開発を待つほかない。

そこで、当該研究事業ではその代替として、入浴者一人あたりが持ち込む有機物量を割り出し、単位容積あたりの『許容延べ入浴者数』を算定する方法を提案するものである。この方法では、化学的な測定器具を用いることなく浴槽容量と入浴者数を把握することで浴槽水の劣化状況を推定することができる。一人の入浴者が持ち込む有機物量の試算は水泳プールでの過マンガン酸カリ消費量の測定値を用いて行った。水泳プールは、規模や水温の違いはあるものの循環式浴槽と基本構造が同じと考えられる。さらに、水泳プールは塩素管理が徹底されており、系内にバイオフィルムの繁殖はないものと判断され、入泳者が持ち込む有機物はほぼ全量が溶存状態で保存されるものと判断される。事実、水泳プールでは日を追うごとに（延べ入浴者の数が増すにつれて）過マンガン酸カリ消費量が蓄積・増加する（図2）。この観測資料を基に一日ごとの過マンガン酸カリ消費量を算定するための近似式4を得た。実測値と近似値の相関から、一人当たりの入泳者が持ち込む過マンガン酸カリ消費量Cを求めたところ、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 $C=0.53\text{g}$ と計算された（実測値と近似値との間で得られる近似直線の傾きが $a=1.00$ となる時の持ち込み量）。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）。

我々の試算から、入浴者一人が持ち込む有機物量をおおむね $0.5\text{g}$ として、現行の基準を充てると、 $1\text{m}^3$ の浴槽水に延べ30~50人の入浴者まで許容する計算となる。200L程度の家庭用の浴槽では延べで6~10人の入浴者に相当する（ $25\text{mg/L} = 25\text{g/m}^3 \div 50\text{人/m}^3 = 10\text{人/200L}$ ）。これに対し、水泳プールでは基準値が2~12mg/Lであることから、 $1\text{m}^3$ の容量に対して延べ4~24人までを許容していることになる。

水泳プールの場合、遊泳中のプール水の誤飲は避けられないものとして、より安全側に基準が設けられているものと解釈される。しかし、その一方で高い温度設定