

200501214A

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研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 遠藤 卓郎

平成 18 (2006) 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. 循環式浴槽温泉施設における浴槽水との接触面積の検討 ……	19
泉山 信司・縣 邦雄・山崎 和生・烏谷 竜哉	
2. 珪藻土を用いたケーキろ過の微粒子除去性能の事前評価 ……	25
泉山 信司・山中 俊治・松本 英樹・小野 更生	
3. 泉質と消毒法の整理 ……	31
縣 邦雄・藪崎 裕昭	
4. 循環式浴槽における浴槽水及び浴室空気中の消毒副生成物に関する研究 ……	43
神野 透人・高橋 淳子・香川 聡子・大河原 晋	
5. 浴槽水におけるレジオネラ属菌の平成 17 年度検出状況、……	49
一特に <i>Legionella pneumophila</i> 血清群 1 のについて—	
倉 文明・前川 純子・常 彬・鈴木 敦子・市瀬 正之	
6. 浴槽水より分離された抗酸菌の同定 ……	59
山崎 利雄・杉山 寛治・大畑 克彦・鈴木 光彰	
7. レジオネラ属菌迅速測定法の有用性の検討 ……	65
荒井 桂子・吉川 循江・田中 礼子・林 宏子・山口 正	
8. アメーバ内増殖がレジオネラ属菌の感染に及ぼす影響に ……	77
関する研究	
八木田健司・泉山 信司・倉 文明・下河原理江子	
9. 「HACCP」システムの導入を伴う循環式浴槽の管理について ……	89
黒木 俊郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	101

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）

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	縣邦雄	アクアス(株)	つくば総合研究所
	荒井桂子	横浜市衛生研究所	
	泉山信司	国立感染症研究所	寄生動物部
	倉文明	国立感染症研究所	細菌一部
	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所	微生物部
	神野透人	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部
	杉山寛治	静岡県環境衛生科学研究所	微生物部
	福井学	北海道大学	低温科学研究所
	八木田健司	国立感染症研究所	寄生動物部
	山崎利雄	国立感染症研究所	ハンセン病研究センター病原微生物部

概要：循環式浴槽システムにおいて、レジオネラ属菌は水と接触している構造物の表面に着生するバイオフィーム（活性汚泥）が汚染巣となっていることはすでに知られている。その対策として塩素消毒が行われているが、いわば緊急避難的な措置であり最小限に留めることが望ましい。微生物対策の要点は換水と浴槽構造の単純化にあり、水との接触面積を最小限にし、洗浄効果が得られ易い構造とすることが要点である。この観点からすれば現行の循環ろ過式浴槽システムはあるべき姿と対極（最も管理の難しい）に位置する装置といえる。この点への理解がない限りレジオネラ対策は困難と考える。当該研究では、循環式浴槽システムの抱える種々の問題点を逐次検証し、リスク評価を行っている。本年度は下記の10項目について解析・評価を行った。

接水面積：現在、厚生労働省が勧奨するレジオネラ対策はいわば緊急避難的なもので、残留塩素管理による浴槽水の消毒とろ過槽内のバイオフィーム（活性汚泥）の洗浄・除去が謳われている。これらの対策が徹底されることを前提とすれば、ろ過の機能は濁質の除去に限られる。それにもかかわらず、大多数の入浴施設で従来通り生物浄化方式のろ過槽が設置されたままである。そのために過剰な塩素消毒や洗浄処理が必要となっている。ろ材を含むろ過循環経路の接水面積を温泉施設の竣工図面より算出したところ、接水面積のほぼ90%はこの循環システムにあることが示され、循環ろ過システムを廃棄すればバイオフィーム対策の対象となる接水面積はおよそ1/10以下に削減できる。

珪藻土によるケーキろ過：濁質の除去を目的としたろ過方法として珪藻土のケーキろ過が知られている。0.5 μ mのビーズを用いたろ過性能では~4 log程度の除去効果が示された。ケーキろ過の利点は蓄積した濁質をケーキごと廃棄する点にある。本方法は銭湯などで使用されていた実績がある。

過マンガン酸カリ消費量：レジオネラ症の集団発生があった施設において、事件当時に残されていた実測値は65.50mg/Lと大幅に基準値を超えていた。事例発生当時に入浴者の数から算定される過マンガン酸カリウム消費量はさらに高い値で、73.8

～139.3mg/Lと推定された。現場での過マンガン酸カリ消費量測定は技術的に難しい面があるが、入浴者の持ち込む汚染量からの推定は容易である。入浴者数の制限などの指標として活用すべきと考える。

次亜塩素酸ナトリウムを中心とした浴槽の消毒方法と問題点： 温泉水の場合は泉質によっては塩素剤の効果が発揮されない場合があることから、泉質に応じた適切な消毒方法、および循環式浴槽の消毒管理方法の考え方について整理した。酸価剤系の消毒剤では、殺菌力を保証するために酸化還元電位を600mV（飽和銀／塩化銀）程度以上に保つことが条件となる。

塩素消毒に伴う副生成物： 塩素系消毒剤が水中の有機物と反応してトリハロメタン類に代表される消毒副生成物を生じることが周知の事実である。入浴客が浴場の塩素消毒で生じたと考えられる比較的高濃度のクロロフォルムに曝露されている実態が明らかになった。公衆浴場は日常的・恒常的に利用する施設であり、不要の化学物質曝露を避けるために施設の換気等を含めた維持管理の見直しが必要である。

Legionella 属菌の汚染実態調査と L. pneumophila 血清群の推移： 遊離塩素濃度の高い給湯水で病原性が高いとされる L. pneumophila 血清群1が多く検出されるとの報告があり、循環式浴槽においてその副次的な影響で L. pneumophila 血清群1の優勢化が懸念される。当該研究では、遊離残留塩素管理が施行された前後で血清群の検出率の変遷を追跡調査したところ、1996年4月～2000年11月、2001年度、2005年4月～同年12月の3つの期間で、浴槽水のレジオネラ汚染は48.0%、28.6%、10.6%と減少傾向が続いており、塩素管理が普及したことが伺える。その一方で、血清群の推移を見ると平成17年度に分離された浴槽水由来株294株のうち、289株（98%）が L. pneumophila で、その33.0%が血清群1、次いで群別不能株（UT）（22.1%）と血清群5、6（それぞれ15.3%）が多かった。すなわち、この間に分離株のうちに占める血清群1の比率は当初の5%強から33%に増加しており、我々の懸念が的中した。

抗酸菌汚染の実態： 今回の循環式浴槽の浴用水68検体から抗酸菌19株が分離された。ヒトに病原性を示すことが明らかとなっている M. avium 11株、M. fortuitum 1株が同定され、循環式浴槽が非結核性抗酸菌症の感染源となり得ることが示された。循環式浴槽システムではレジオネラのみならずその他の病原微生物の病原巣となりえることが示された。

遺伝子検査法の利用に向けた提言： 浴槽水の水質基準ではレジオネラ属菌は培養法により不検出（10個/100ml未満）であることと定められている。しかしながら、本属菌の培養には時間がかかり、検査の迅速化が求められている。一方、遺伝子検査を利用した検査法では、培養法で陰性でありながら遺伝子検査で陽性と判定される結果の解釈ができなかったことから、利用されていない。培養法とリアルタイムPCRおよびLAMP法の3法を比較した結果、『検体中に多量の死菌が含まれる場合』に培養法による判定とDNA検査法による判定に不一致が生じることが明らかとなった。しかしながら、レジオネラ由来のDNAが多量（ 10^3 CFU/100mL相当以上のDNA量）に存在するにもかかわらず培養により菌が検出されないような状況は自然状態で想定されず、レジオネラが繁殖している浴槽に検体採取に先立って消毒剤を投入したような場合に限られる。すなわち、塩素管理を含めてレジオネラ対策が周到に行われている状況下ではレジオネラの増殖は起こり得ず、死菌が多量に含まれる可能性もないことから、このような状況（多量の死菌の存在）からは管理の不徹底が指摘される。（洗浄後の検査材料であれば洗浄・すすぎの不徹底が指摘される。）これらを踏まえれば、遺伝子検査法は培養法に変わる検査法として利用可能と考えられ、次年度においてさらに詳細な検討を予定している。

レジオネラ感染における Dose paradox： レジオネラ感染症の発生機序に関しては

感染源の菌汚染の度合いが必ずしも感染の規模と結びつかない“Dose paradox”という問題が指摘されている。これに関しては、一般的な経路とされるエアロゾル感染以外の感染経路を想定する必要があると考えられる。本研究ではレジオネラ属菌のアメーバ内における発育増殖と感染性に関する解析から、これまでに動物実験において感染が成立するとされるおよそ 1,000 CFU レベルの菌がアメーバ内で増殖し得ることを明らかにしてきた。本年度は多量のレジオネラ属菌を包含するアメーバ（以下感染アメーバ）の取り込みによって感染が成立する可能性についてマウスを用いた感染実験により検証した。その結果、一個の感染アメーバを吸引したマウスの肺で菌の増殖が確認され、エアロゾル以外の感染経路としてアメーバを介した経路の存在が示された。

また、浴槽水中に放出された菌の生存状況と感染性について検討した。その結果、アメーバから水中に放出されたレジオネラは2ヶ月にわたり生存（培地での増殖活性）するものの、アメーバに対する感染性は短期間のうちに低下することが観察され、実際の浴槽水におけるレジオネラ属菌汚染の特徴の一端が明らかとなった。

管理手法：循環式浴槽の形態・形式は様々であり、全てを同じ様式で管理することは不可能であり、各々の施設や浴槽に適した管理を行わなければならない。それぞれの構造や規模、泉質、環境に合わせて管理の詳細を構築し、HACCPシステムを導入して徹底した管理を行うことが重要である。これにより、安全で安心できる浴槽を提供することが欠かせない。そのための指針を本研究班において作成することを今後とも継続して行っていく。

A. 研究目的

浴槽水のレジオネラ属菌は水と接触する基質に着生するバイオフィーム（活性汚泥）が汚染巣となっていることはすでに知られているところであり、浴槽の構造は単純化に務め、接水面積を減らし、洗浄効果が得やすい構造でなければならない。その意味で、循環ろ過式浴槽施設はその対極にある装置といえる。この点への理解がない限りレジオネラ対策は困難である。

現在、厚生労働省が勧奨するレジオネラ対策は残留塩素管理による浴槽水の消毒とろ過槽内のバイオフィーム（活性汚泥）の洗浄・除去であるが、この措置が必要となる理由は水の使いまわしと浴槽構造の複雑さにあり、浴槽の洗浄だけでは対応できないからである。ところで、

塩素消毒が徹底されれば循環式浴槽システムにとって重要な生物浄化の機能はなくなり、ろ過の目的は濁質の除去に限られる。それにもかかわらず、大多数の入浴施設ではいまだに従来型のろ過槽を経由させた循環が行われている。当該研究では、循環式浴槽システムが抱える種々の問題点を逐次検証しリスクの評価を行っている。本年度では下記の諸点について問題点を解析・評価した。

1. 接水面積
2. 珪藻土ケーキろ過
3. 過マンガン酸カリ消費量
4. 次亜塩素酸ナトリウムを中心とした浴槽の消毒方法と問題点
5. 塩素消毒に伴う副生成物
6. *Legionella* 属菌の汚染実態調査と *L. pneumophila* 血清群の推移

7. 抗酸菌汚染の実態
8. LAMP/Realtime PCR 等の遺伝子検査法の利用に向けた提言
9. レジオネラ感染における Dose paradox
10. 管理手法

B. 研究成果および考察

1. 接水面積：

レジオネラ属菌はアメーバなどの原虫類を宿主として増殖するものであるが、レジオネラを含め多様な微生物の集合体が構造物の表面に付着・増殖しバイオフィルムを形成する。したがって、バイオフィルムの付着面積を減らすことはレジオネラ汚染防止の対策の重要な要素となる。当該研究では循環式浴槽システムを採用している温泉施設の竣工図面より水接水面積を求め、循環ろ過・配管系の占める割合を求めた。

浴槽施設における水との接水面積はろ過循環系がかなりの部分を占め、ろ材を除く循環系の接水面積（構造の持つ面積）は全体の 20～55%に達していることが示された。ろ過槽の機能は、固形物のろ過除去と、ろ材の表面等に着生した微生物による浴槽水の生物浄化であり、ろ材そのものに水の浄化作用はない。すなわち、ろ材は微生物の着生表面積を飛躍的に広げるために用いられるもので、は砂やセラミックスなどがろ材として使われている。粒径はさまざまであるが、ここでは $0.6\mu\text{m}$ （砂）～ $5\mu\text{m}$ （セラミックス）の間とし、それらを球体として表面積を求めた。なお、ろ材には水との接水面積を効果的に広げるためにしばしば多孔質の素

材が用いられているが、ここでは計算を単純化するために単純な球体として扱った。その結果 1 L あたりの表面積は粒径が小さい粒子ほど大きくなり、 $5.23\sim 0.63\text{ m}^2$ と計算された。これを基に上記の施設の水との接水面積を再計算し、全体に対するろ過循環経路の面積の占める割合を計算したところ、いずれも 90%以上と極めて大きな比重を占めることが判明した（表 1.）。

現在、厚生労働省が勧奨するレジオネラ対策は残留塩素管理による浴槽水の消毒とろ過槽内のバイオフィルム（活性汚泥）の洗浄・除去である。これらの対策が徹底されることを前提とすれば、循環式浴槽システムの従来の機能である生物浄化は機能せず、ろ過の機能はおのずと濁質の除去に限られる。本来の機能を失った循環ろ過システムを排除すればバイオフィルム対策をすべき面積はおよそ 1/10 以下に削減することになり、レジオネラ対策が容易になることは自明である。

2. 珪藻土ケーキろ過

いわゆる生物浄化方式が否定されてより、浴槽システムにおけるろ過機能はもっぱら濁質（混入固形物）の除去である。従来のろ過層では構造上、有機物やそれに伴うバイオフィルム（汚泥）の蓄積が著しく、洗浄や消毒が困難な状況にある。ところで濁質除去を目的とした装置の 1 つに水泳プール等に導入されている珪藻土を用いたケーキろ過が知られている。本装置は銭湯のろ過装置としても良く知られていた。ろ過装置の構造は多孔質の珪藻土を用いてろ過用のケーキ

(cake) を形成させ、加圧ろ過を行う方法で、微粒子の除去性能に関しては水泳プール等で高い評価がある。本装置の最大の特徴はケーキ（珪藻土）の使い捨て使用が原則となっていることで、蓄積した濁質を持ち越すことなくケーキごと廃棄する点である。本研究では珪藻土によるケーキろ過の実機への適用試験の前段階として事前性能評価を行った。細菌の短径に相当する $0.5\mu\text{m}$ のポリスチレンの蛍光ビーズを用いて除去率を求めたところ、ろ材の量に応じて 74% から 99.99% (-4log) の除去を達成し、浴槽水より直接的な細菌除去が可能であるとの結果が得られた。

珪藻土は孔径の異なった製品が市販されている。孔径の小さな珪藻土を用いると、高い除去性能が得られるが、送水圧力を上げる必要があり、実用面で問題を生じる可能性がある。孔径の大きな珪藻土（#200）を用い、ケーキの層厚を調整して性能評価を行ったところ、 $1.6\text{kg}/\text{m}^2$ のケーキ層厚条件で 1 回のろ過で $0.5\mu\text{m}$ のビーズを 99% 以上除去する結果を得た（表 2.）。一方、ケーキを薄くして $0.5\text{kg}/\text{m}^2$ とした場合には 74% の除去に留まった。得られた結果から珪藻土の量を $0.5\sim 1.6\text{kg}/\text{m}^2$ の間で、より適正な条件を設定すれば細菌類を除去できるものと判断された。ところで、浴槽水において半日程度の間で一般細菌数が $10\sim 10^6/\text{ml}$ に達する（H17 厚生厚生労働科学研究助成掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究報告書（主任研究者：井上博雄））。仮に、細菌の分裂速度を 20 分に 1 回として、1 回のろ過で

99% の除去効果を有するろ過を 1 時間に 1 回繰り返した場合、理論上は分裂速度よりも除去が勝り、浴槽水中の細菌類の除去が可能となる（単純計算では、1 時間で 1 の細菌が 8 に増える間に 99% 除去され、総合で微生物が 0.08 に減少）。ちなみに、最近の砂ろ過器の性能試験によると、ろ速 $20\sim 60\text{ m/h}$ 、ろ過砂粒径 0.6 mm 、ろ過層厚 $300\sim 600\text{ mm}$ の実験条件で単回ろ過 (one pass) での濁度除去率（濁度 7 NTU の原水使用）は 40% 未満にとどまることが示されている（浴場施設におけるレジオネラ対策に関する研究(その 2) 砂式ろ過器のろ過性能試験. 空気調和・衛生工学会大会学術講演論文集、1557-1560. 2005 年 8 月（札幌））

3. 過マンガン酸カリ消費量：

現在の浴槽水の水質基準として以下の項目が設定されている。

ア. 濁度は、5 度以下であること。

イ. 過マンガン酸カリウム消費量は、 25mg/L 以下であること。
(有機物汚染の指標)

ウ. 大腸菌群は、1 個/mL 以下であること。

エ. レジオネラ属菌は、検出されないこと ($10\text{ CFU}/100\text{mL}$ 未満)。

このうち、「エ」の「レジオネラ属菌は、検出されないこと ($10\text{ CFU}/100\text{mL}$ 未満)」のみならず、他の項目の遵守が求められることは自明のことである。「イ」の浴槽水の過マンガン酸カリウム消費量は有機物汚染の指標で、平たく言えば、「入浴者の持ち込む汚れで浴槽水が腐らない（微生物が繁殖しない）」ために規定され

た基準である。ところが、25mg/L以下と規定されているにもかかわらず実際的にはなんら活用されていない。項目を増やすことでの規制の強化は必ずしも好ましいものではなく、レジオネラ対策に関しては既存の規制（過マンガン酸カリ消費量）を遵守させることで効果が期待できるものとする。先年度の当該研究で報告したように、入浴者一人が浴槽水に持ち込む有機物量は過マンガン酸カリ消費量に換算しておよそ5gと計算されている。すなわち、現行の浴槽の設置基準ではろ過能力を規定しておらず、そのため入浴者数の規定もない。しかしながら、入浴施設の規模に沿っておのずから入浴者数の制限があつてしかるべきものである。

水質基準では過マンガン酸カリ消費量とは浴槽系内に蓄積される全有機物量を指すのか浴槽水中の溶存量を指すか詳細な規定はなく、一般には溶存過マンガン酸カリ消費量に制限が設けられている。しかしながら、汚染という概念からは前者が採用されなければならない。「入浴者の持ち込む汚れで浴槽水が腐らない（微生物が繁殖しない）」ために規定された基準であるにもかかわらず、後者の概念では微生物が繁殖した（腐った）水の溶存（固形物が除かれた）有機物量は低下するという矛盾が生じる。

昨年の研究成果に従って、レジオネラ症の集団発生が報告されたある入浴施設の過マンガン酸カリ消費量を入浴者数から推定した。集団感染事例の経緯は、某年4/某日開業した施設において最初のレジオネラ症患者の入浴施設利用は4月

末日とされる。最初の患者の届出は5月下旬になされている。当該施設の4月末までの入浴者の総数は5207人、5月下旬までには9837人との記録が残されており、その浴槽容積は35.3m³（13.5*2+5.6+2.7）であった。この間、浴槽水は換水されておらず、溢水もない状態であったとされていることから、4月末日、あるいはその1ヵ月後までに入浴者によって持ち込まれた過マンガン酸カリウム消費量の推定値はそれぞれ73.8mg/Lと139.3mg/Lと計算される。また、事件当時に残されている溶存過マンガン酸カリ消費量の実測値では65.50mg/Lと大幅に基準値を超えるものであった。

4. 次亜塩素酸ナトリウムを中心とした浴槽の消毒方法と問題点：

浴槽水中のレジオネラ属菌をはじめとする細菌類の殺菌には塩素剤が用いられている。浴槽水の水源として水道水を使用している場合は塩素剤が有効に作用するが、温泉水の場合は泉質によっては塩素剤の効果が発揮されない場合がある。泉質に応じた適切な消毒方法、及び循環式浴槽の消毒管理方法の考え方について整理した。

- 浴槽の水源に水道水又は水道水並みの水質の水を使用している場合は、塩素剤による消毒が有効であり、通常0.2～0.4mg/Lの遊離残留塩素濃度を維持が望まれる。
- 温泉水では泉質により塩素剤による消毒が有効でない場合がある。その場合は各泉質に応じた対応をとるが、定期的な洗浄消毒を組み合わせるこ

とで浴槽水の殺菌効果の低さを補完することが重要。

- 特に、殺菌力を保証するためには酸化還元電位を考慮する必要がある、600mV（飽和銀／塩化銀）程度が保障されることが条件となる（次亜塩素酸ナトリウムの投入量とは異なる点に注意）。
- 二酸化塩素、有機系殺菌剤、紫外線殺菌装置などによる処理は今後、実機での評価データを蓄積することが望まれる。

5. 塩素消毒に伴う副生成物

水道水の浄水処理等において塩素系消毒剤が水中の有機物と反応してトリハロメタン類に代表される消毒副生成物を生じることが周知の事実である。したがって、適切な衛生管理が行われなければ公衆浴場においても経気道的あるいは経皮的な経路で入浴客が高濃度の消毒副生成物に暴露される可能性が懸念される。そこで、本研究では都内5カ所の公衆浴場の協力を得て、施設内の空気及び浴槽水・シャワー水中のトリハロメタン類に関する実態調査を行った。その結果、都内5カ所の公衆浴場において、施設内の空気及び浴槽水・シャワー水中のトリハロメタン類の濃度に関する調査を実施した。浴室空気中のクロロフォルム

(CHCl₃)濃度は45~200 µg/m³であり、何れの施設においてもトリハロメタン類濃度はCHCl₃ >> CHBrCl₂ > CHBr₂Cl > CHBr₃の順であった。浴槽水中のトリハロメタン類の濃度も概ねCHCl₃ >> CHBrCl₂ > CHBr₂Cl > CHBr₃であり、入

浴客が公衆浴場での塩素消毒で生じたと考えられる比較的高濃度のCHCl₃に経気道的及び経皮的に暴露されている実態が明らかになった(図1.)。公衆浴場は日常的・恒常的に利用する機会の多い施設であり、不要の化学物質暴露を避けるためには施設の換気等も含めた維持管理の見直しが必要であると考えられる。

6. *Legionella* 属菌の汚染実態調査と *L. pneumophila* 血清群の推移

給湯水のレジオネラ属菌汚染状況の調査(Borella P等、Emerging infectious Diseases 10: 457, 2004; Applied and Environmental Microbiology 71: 5805, 2005)において、遊離塩素濃度の高い給湯水で他の血清群より最も病原性が高い *L. pneumophila* 血清群1が多く検出されることが報告されている。わが国では循環式浴槽の衛生管理として、厚生労働省の勧奨により塩素消毒が行われていることから、その副次的な影響で浴槽での *L. pneumophila* 血清群1の増加が懸念される。当該研究では、遊離残留塩素管理が施行された前後で血清群の検出率の変遷を追跡調査してきた。

先年度の報告で示したように、浴槽水のレジオネラの検出率は平成8年の85%から1996年4月~2000年11月、2001年度、2005年4月~同年12月の3つの期間で、浴槽水では48.0%、28.6%、10.6%と次第に減少傾向が続いており、塩素管理が浸透してきていることが伺える(図2.)。しかしながら、血清群の推移を見ると平成17年度に分離された浴槽水由来株294株のうち、289株(98%)が *L. pneumophila*

で、その33.0%が血清群1、次いで群別不能株(UT)(22.1%)と血清群5、6(それぞれ15.3%)が多かった。すなわち、この間に分離株のうちに占める血清群1の比率は当初の5%強から33%に増加しており、我々の懸念が的中している(図3.)。

7. 抗酸菌汚染の実態

結核菌以外の抗酸菌は、自然界に広く分布している。抗酸菌の中には、何らかの原因で細胞性免疫力が低下している人に感染して発病させる抗酸菌が存在する。以前、家庭用の循環式浴槽(24時間風呂)から分離された抗酸菌が原因とされた感染例も報告されていることから、浴槽水中からの抗酸菌の分離と同定を行った。今回の循環式浴槽の浴用水68検体から抗酸菌19株が分離された。ヒトに病原性を示すことが明らかとなっている*M. avium* 11株、*M. fortuitum* 1株が同定され、循環式浴槽が非結核性抗酸菌症の感染源となり得ることが示された。ちなみに、抗酸菌はヒトに対して病原性のあるものから非病原性のものまでおよそ60種が知られている。抗酸菌のなかで結核菌群(*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*)以外の培養可能な抗酸菌を一括して非結核性抗酸菌(nontuberculous mycobacteria: NTM)と呼び、自然界に広く分布している。また、それによる感染症は非結核性抗酸菌症と呼ばれている。非結核性抗酸菌症の毎年の新規発生状況は不明であるが、非定型抗酸菌症研究協議会が2001年4月から9月までの間に新規に診断した521施設からのアンケート調査結果によれば、全抗酸菌症中29%の

比率で非結核性抗酸菌症が発生していた。その内訳は、*M. avium* 症例が57.8%、*M. intracellulare* 症が25.0%、*M. kansasii* 症が8.1%とこの3菌種で91%を占め、残りの9%が*M. gordonae*、*M. abscessus*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. szulgai*、*M. scrofulaceum*、*M. xenopi*などであった。今回の調査では、*M. gordonae* 2株、*M. avium* 11株、*M. fortuitum* 1株が分離されている。

8. LAMP/Realtime PCR等の遺伝子検査法の利用に向けた提言

浴槽水の水質基準ではレジオネラ属菌は培養法により不検出(10個/100ml未満)であることと定められている。しかしながら、本属菌の培養には時間(一週間以上)がかかり、検査の迅速化が求められている。当該研究では培養法とリアルタイムPCRおよびLAMP法の3法を比較してその結果を解釈した。その結果、以下のような解釈が可能であった。すなわち、培養法、リアルタイムPCR法、LAMP法のそれぞれの検出限界は10、5、10 CFU/100mlと、ほぼ同等であった(表4.)。リアルタイムPCR法、LAMP法はいずれもレジオネラ属菌9種に対して反応することが確認された。生菌を用いた実験で、リアルタイムPCRは培養法との間で高い相関が確認された。浴槽水の塩素管理がなされている浴槽水の検査において、リアルタイムPCRあるいはLAMP法と培養法との間に結果の不一致が見られた(表5.)。その理由は、遺伝子検査法では菌の生死に関わらずDNAの存在を検知するためで、検体中に死菌が含まれる場合に限り培養法との不一致が生じて

いた。ところで、レジオネラ由来の DNA が多量 (10^3 CFU/100mL 相当以上の DNA 量) に存在するにもかかわらず培養により菌が検出されないような状況は自然状態では想定しにくく、レジオネラが繁殖している浴槽へ検体採取の直前に消毒剤を投入したような状況においてのみ発生すると判断される (図 4)。いずれにせよ、塩素管理が周到に行われている状況下ではレジオネラの増殖は起こり得ず、従って、DNA が多量に検出される状況はその直前までレジオネラの増殖があったことを示すもので、管理の不徹底が指摘される。また、営業再開に向けた検査に関しても上記の判断は有効で、本試験方法の有効活用が期待される。次年度において、さらに検査例数を増やし、遺伝子検出法の有効利用の可能性を検討する予定である。

9. レジオネラ感染における Dose paradox

レジオネラ感染症の発生機序に関しては感染源の菌汚染の度合いが必ずしも感染の規模と結びつかない“Dose paradox”という問題が指摘されている。これに関しては、一般的な経路とされるエアロゾル感染以外の感染経路を想定する必要があると考えられる。本研究ではレジオネラ属菌のアメーバ内における発育増殖と感染性に関する解析から、これまでに動物実験において感染が成立するとされるおよそ 1,000 CFU レベルの菌がアメーバ内で増殖し得ることを明らかにしてきた。本年度は多量のレジオネラ属菌を包含するアメーバ (以下感染アメーバ) の取り

込みによって感染が成立する可能性についてマウスを用いた感染実験により検証した。その結果、一個の感染アメーバを吸引したマウスの肺で菌の増殖が確認され、エアロゾル以外の感染経路としてアメーバを介した経路の存在が示された。また、浴槽水中に放出された菌の生存状況と感染性について検討した。その結果、アメーバから水中に放出されたレジオネラは 2 ヶ月にわたり生存 (培地での増殖活性) するものの、アメーバに対する感染性は短期間のうちに低下することが観察され、実際の浴槽水におけるレジオネラ属菌汚染の特徴の一端が明らかとなった (図 5.)。

10.

HACCP システムでは最終産物 (浴槽水) が基準を満たし、危害が存在しないようにするだけではなく、源泉から貯湯槽、ろ過装置、加熱器などの途中の段階においても同様であること、すなわち、浴槽に入る直前あるいは浴槽において危害を取り除くのではなくどの部位においても危害が存在しないことを目指す。さらに、レジオネラの増殖・定着を防ぐための残留遊離塩素濃度を重要管理点として監視することにより効率的に管理することができる。

循環式浴槽の形態・形式は様々であり、全てを同じ様式で管理することは不可能であり、各々の施設や浴槽に適した管理を行わなければならない。それぞれの構造や規模、泉質、環境に合わせて管理の詳細を構築し、HACCP システムを導入して徹底した管理を行うことが重要である。

これにより、安全で安心できる浴槽を提供することが欠かせない。そのための指針を本研究班において作成することを今後とも継続して行っていく。

C. 結論

レジオネラの増殖は「浴槽水の有機物汚染 ⇒ 細菌類の繁殖 ⇒ 細菌捕食性微生物（アメーバ等の原虫類など） ⇒ アメーバを中心とした宿主生物の繁殖 ⇒ レジオネラ汚染」という浴槽内で増殖する微生物から派生する問題である。従って、当該研究事業では、

1. 浴槽水のレジオネラ対策は浴槽水の使い回しをしないことと浴槽の洗浄を徹底している限りにおいて発生しない問題である
2. レジオネラは環境細菌であることから浴槽水に存在するのは当然であるとの主張は間違いである

との立場を明確にして研究を進めている。

1. の条件は有機物汚染がないか、あっても微生物の繁殖の機会を与えないように管理すれば問題は発生しないからで、2. は循環式浴槽が人工の構造物であり、そこに繁殖するレジオネラ菌数は自然界では容易に達し得ないレベルに達していると考えからである。

循環式浴槽の管理・規制は循環装置の存在を前提として論議されている。あたかも当然のようであるが、公衆浴場法が制定された当時に立ち返ると浴用水の使いまわし（連用）は許されていなかった。その時点でレジオネラ（肺炎）問題が起きていなかったことは単なる偶然とは考

えられない。あるいは、資源保護の立場から循環式浴槽の価値を評価する向きもあるが、全国にこれほど沢山の入浴施設を作り、地下水（温泉）を掘ることの方が資源保護の理念に抵触すると考える。

また、24時間何時でも入浴できるような施設の効率性を資源保護の立場やエネルギー論的に解説したものはない。一歩進めて、入浴施設が衛生施設の枠を超えてレジャー施設としての価値を求めるのであれば、基準や規制、あるいは設置基準などの関連事項は自ずとそれに即したものにしなければならないと考える。

当該年度は浴槽システムで微生物の繁殖に係る各因子を洗い出し、上述の9項目について解析・評価（対策の観点からはリスク解析となる）した。また、当該研究では各行政機関の条例の作成に際して適性に反映されるよう、問題点をわかり易く解説することに努めている。当該年度は以下の項目について報告した。

1. 塩素管理の限界
塩素消毒の適用範囲
酸価還元電位と殺菌能力
2. 塩素消毒の功罪
感染リスク回避にむけた塩素の必要性
血清群1を選択増殖させている可能性の指摘
3. 過マンガン酸カリ消費量を指標とした入浴者数の制限の必要性
4. 構造設計上での要点、
従来のろ過システムの矛盾と代替装置の基礎実験データの提供（珪藻土によるケーキろ過）、

- 循環システムの構造の単純化（管理の効率化をめざした接水面積の削減）
- 浴室の換気の必要性（消毒副生成物対策）
5. 検査の迅速化に向けた遺伝子検査法の適用の可能性
6. その他
- レジオネラ以外の病原体の発生の恐れ、
- エアロゾルの吸引以外の感染経路の可能性
- 水中でのレジオネラの感染性維持能力
- D. 健康危機情報
なし
- E. 研究発表
1. 論文発表
- Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N, Watanabe H: Identification of a novel adhesion molecule involved in virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 73: 4272-4280, 2005.
- Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, and Watanabe H: *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan from a distinct genetic cluster. *Microbiol Immunol* 49:1027-1033, 2005.
- Kura F, Amemura-Maekawa J, Yagita K, Endo T, Ikeno M, Tsuji H, Taguchi M, Kobayashi K, Ishii E, Watanabe H: Outbreak of legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. *Epidemiol Infect*, 134, 385-391, 2006.
- K. Ohata, K. Sugiyama, M. Suzuki, R. Shimogawara, S. Izumiyama, K. Yagita, T. Endo: Growth of *Legionella* in Non-sterilized Naturally Contaminated Bath Water in Facility Which Mechanically Circulates and Purifies the Water. (in preparation)
- K. Sugiyama, K. Ohata, M. Suzuki, R. Shimogawara, S. Izumiyama, K. Yagita, T. Endo: Inhibition of *Legionella* Growth in Circulation Bathing Water by Filter Refreshment Method Using High Concentration Chlorine. (in preparation)
- 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. レジオネラ症 Update —宿主アメーバからみたレジオネラの水系汚染対策. 臨床と微生物 32(4), 383-388, 2005.
- 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 前川純子, 渡辺治雄, 八木田健司, 遠藤卓郎, 鈴木 泉: 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発症状況と環境調査、感染症誌 79(6):365-74、2005.
- 藤井 明、河合自立、松田和也、杉山寛治、大畑克彦、鈴木光彰、加藤宏一: 循環ろ過式モデル浴槽系内におけるバイオフィーム形成とその洗浄・殺菌について. 生活と環境 51 (2) : 67-73、2006.

2. 学会発表

Kura F, Kobayashi S, Amemura-Maekawa J, Aratani Y, Suzuki K, Watanabe H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Legionella pneumophila*. 6th International Conference on Legionella. October 2005, Chicago, USA.

Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H: Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis and sequence-based typing (SBT) of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from Japan. 6th International Conference on Legionella. October 2005, Chicago, USA.

泉山信司、縣 邦雄、遠藤卓郎：浴槽水における有機物汚染の蓄積に関する考察、環境技術学会（大阪）、2005年9月

浴室内における消毒副生成物の曝露評価—浴槽水および浴室空気中における消毒副生成物の消長について—、高橋淳子、村山志帆、宇津木祥子、小島幸一、栗原綱義、渡辺実、青木信道、大沢高温、菅原英治、田幡憲一、佐久間豊夫、松本秀章、矢根五三美、鈴木茂雄、神野透人、高鳥浩介、第33回建築物環境衛生管理全国大会、2006年1月、東京

前川純子、倉 文明、常 彬、渡辺治雄：*Legionella pneumophila* 血清群1の sequence-based typing (SBT)、第78回日本細菌学会総会、2005年4月、東京。

倉 文明：レジオネラ感染症の現状と展望、特別講演、第18回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会、2006年2月、長野

F. 知的財産件の出願・登録状況
なし

表 1.

浴槽名	改修前			改修後 配管類	減少%	配管類のみの 減少%
	配管類	ろ材面積				
露天	38.4	231	269.4	20.8	92.3	45.8
浴室 1	84.8	315	399.8	41.9	89.5	50.6
全体	123.2	546	669.2	62.7	90.6	49.1

表 2.

実験 #	ビーズ um	珪藻土種類 #	使用量 kg/m ²	平均ろ圧 MPa	平均ろ速 m/h	ビーズ濃度(個/ml)		除去率	
						原液	ろ液	log表記	%表記
1	0.5	100	1.6	0.178	9.2	9.5E+03	6.2E-01	4.18	99.99343%
2	0.5	200	1.6	0.089	9.0	1.0E+04	9.8E+01	2.02	99.05299%
3	0.5	200	0.5	0.025	8.9	1.2E+04	3.0E+03	0.59	74.49525%

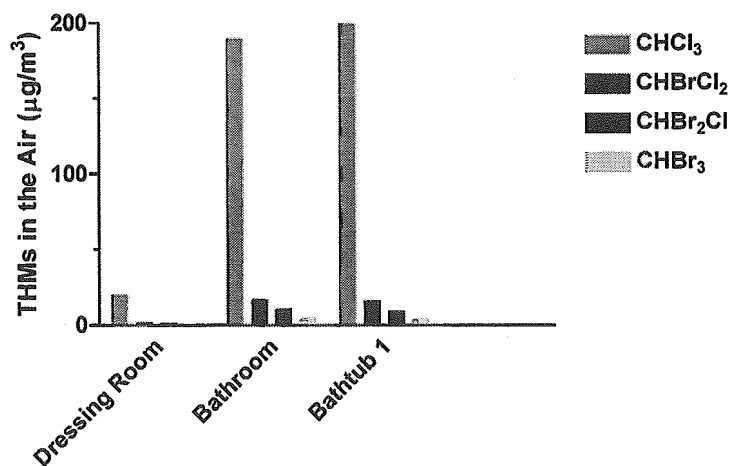


図 1. 公衆浴場の空气中及び浴槽水・シャワー水中のトリハロメタン類濃度

表3 抗酸菌19株の菌種の内訳

菌種名	株数
<i>M. gordonae</i>	2
<i>M. avium</i>	11
<i>M. fortuitum</i>	1
<i>M. phlei</i>	4
未同定	1

図2.

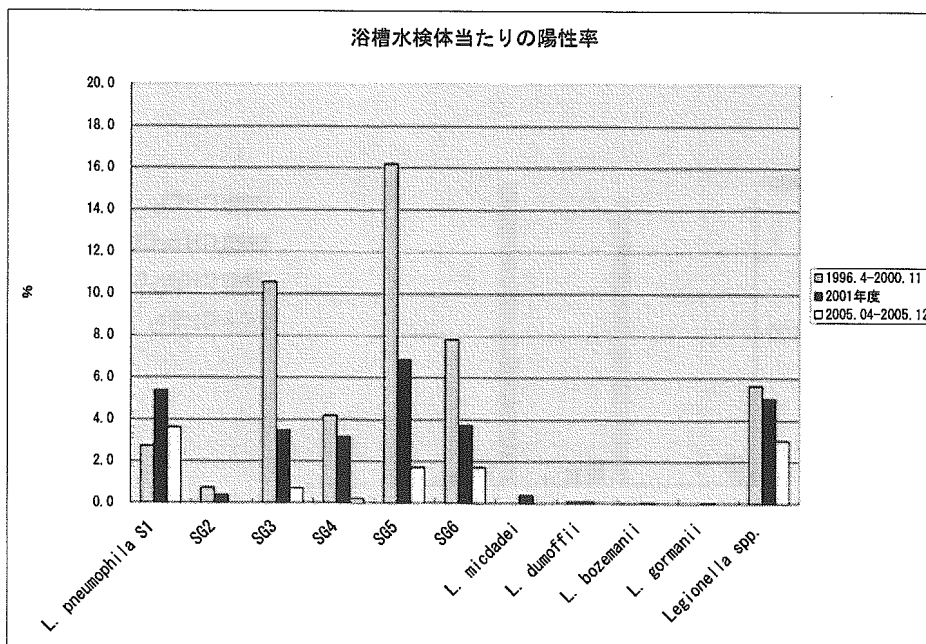


図 3.

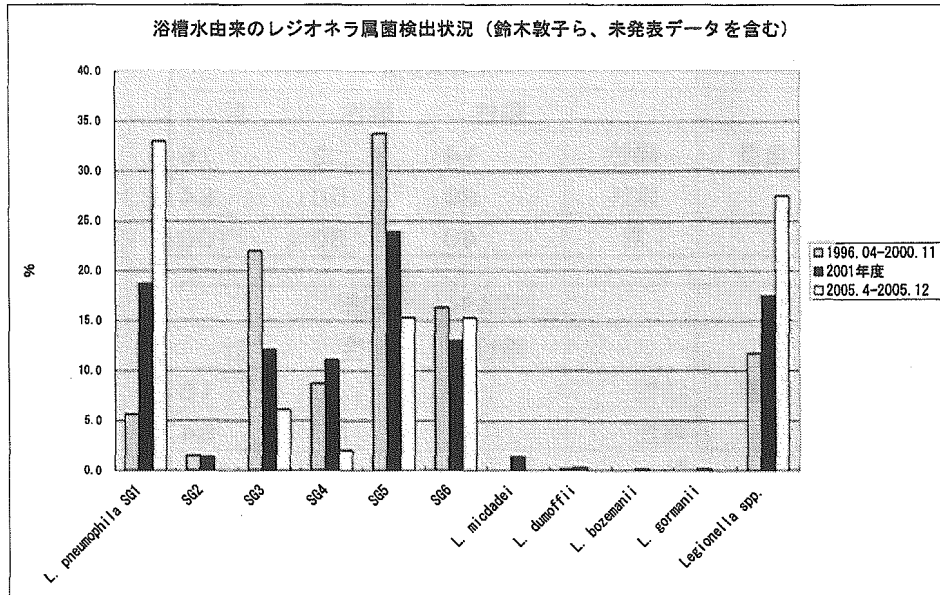


表 4. 検出限界の検討

	リアルタイム PCR法	LAMP法	培養法
検出限界値	5	10	10

(cfu/100mL)

- ◆ 検出限界は培養法と同等かそれ以上
- ◆ レジオネラ属菌 9 種に 2 法とも陽性反応

表 5. 培養法と DNA 検出法との結果の一致度

		LAMP法		
		陽性	陰性	計
培養	陽性	14	2	16
	陰性	26	58	84
計		40	60	100

		リアルタイムPCR法		
		陽性	陰性	計
培養	陽性	16	0	16
	陰性	48	36	84
計		64	36	100

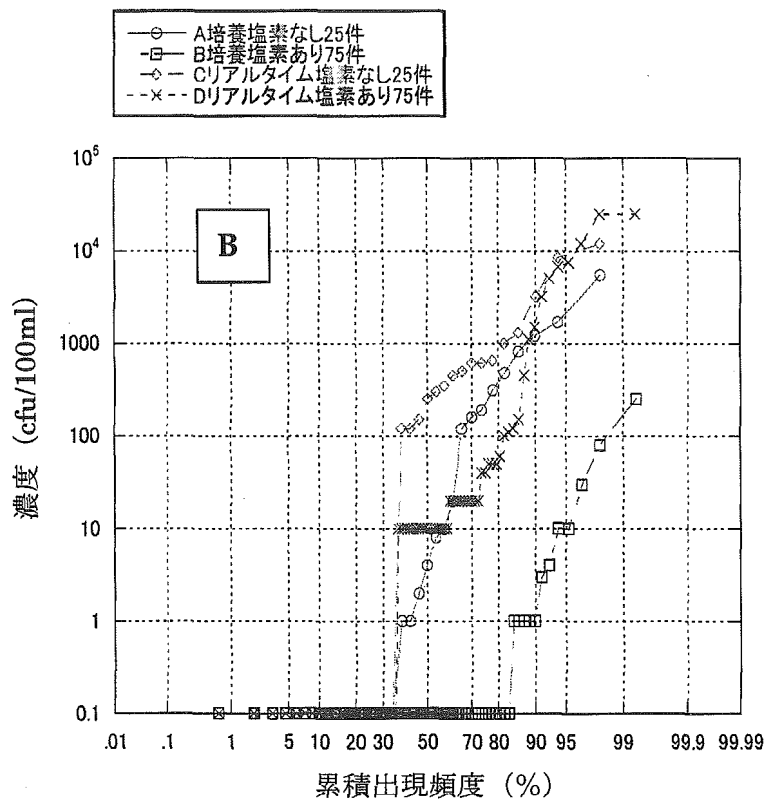


図4. レジオネラ属菌測定値の出現頻度分布

A) 全試料の培養法 (●) およびリアルタイム PCR 法 (□) により得られた試料中の菌数の出現頻度分布を示した (n=100)。両者は平行関係にあり、培養に比べ PCR による測定は 1~2 log 程度高い値を示した。

B) 培養の結果を塩素有り (□ : n=75) と無し (○ : n=25) に分け、同様に PCR の結果も塩素の有り (× : n=75) と無し (◇ : n=25) に分けて出現頻度分布を作図した。培養結果では、塩素処理により 2~3 log 程度の不活化効果が認められた。塩素が検出された試料を PCR により測定すると、出現頻度分布曲線は直線性が失われ、明らかに高濃度域と低濃度域で 2 つの異なった群に分かれた。高濃度域の分布は塩素無し試料の測定結果と重なった。一方、低濃度域では塩素無し試料よりも 1 log 程度低い値で推移していた。すなわち、これらの群では効果的な塩素管理が行われており、レジオネラの増殖が低く抑えられてたものと考えられた。