

厚生労働科学研究費補助金

地域健康危機管理研究事業

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 16～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 遠藤 卓郎

平成 19 (2007) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告書

- 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. 資料編

1. 循環式浴槽におけるバイオフィーム形成とその対策 23
杉山 寛治・泉山 信司・八木田健司・大畑 克彦
2. 循環浴槽水の微生物制御手法としての珪藻土ろ過の有用性 33
泉山 信司・八木田健司・杉山 寛治・大畑 克彦・小野 更生
山中 俊治・松本 英樹
3. 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 41
縣 邦雄
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 .. 49
神野 透人・香川 聡子・高橋 淳子
5. 浴槽水からのレジオネラ属菌の検出状況 61
—*Legionella pneumophila* 血清群1の増加—
倉 文明・前川 純子・常 彬・橋本・鈴木 敦子・市瀬 正之
6. 浴槽水からの抗酸菌の検出状況と検出株の同定 67
山崎 利雄・杉山 寛治・大畑 克彦
7. 宿主アメーバ内におけるレジオネラ属菌の増殖性ならびに 75
感染性に関する研究
八木田健司・倉 文明・泉山 信司・下河原理江子
8. HACCP システムの導入を伴う循環式浴槽の管理について 87
黒木 俊郎

III. 別 刷

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）

総合研究報告書 (16-18)

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 寄生動物部長

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㈱	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

研究要旨 循環式浴槽システムを正確に把握すれば、矛盾を抱えた構造であることが知られる。当該研究事業では多方面からレジオネラ汚染に至るメカニズム、あるいはシステムが抱える問題点を科学的に示すことで循環式浴槽を介したレジオネラおよびその他の微生物に起因する感染症の発生防止に寄与することを目的とした。

浴槽水の濁度あるいは KMnO_4 消費量（有機物量）は入浴者が持ち込む汚れと溢水/補給湯量との単純な関係から成り立っており、それらは持ち込み汚染量を補給湯量で除した値に収束する。濁質等の持ち込み量は1人当たり精製カオリンに換算して0.1~0.5g、 KMnO_4 消費量は約0.5g（平成16年度報告）とされる。一方、入浴者の平均体重を50kgとすると溢水/補給湯量はおおよそ50Lとなる。これらを基にすると、濁度は2~10mg/L（2~5度）に収束し、 KMnO_4 消費量は10mg/Lに収束するものと計算される。濁度の基準値が5度であることから、1人当たりの入浴者の濁質の持ち込み量を0.25g以上とすればろ過装置の設置が必須となる。一方、過マンガン酸カリ消費量は持ち込み量が概ね0.5gとされることから通常の管理が行われていれば現行の基準値を超えることはない。これにより、いわゆる「生物浄化装置」と称される微生物を多量に付着させたるろ過槽は不要であることが示された。ところで、レジオネラの発生源であるバイオフィームは構造物と浴槽水との接水面に定着・繁殖するが、ろ材の接水面積が極めて大きいことを示し、ろ過槽の微生物対策がきわめて重要であることを指摘した。あわせて、使い捨てろ材である珪藻土を用いたろ過装置と遊離残留塩素濃度（0.2~0.4mg/L）、週1回の配管洗浄の組み合わせによって長期間（21日間）にわたりレジオネラ属菌および宿主アメーバのほぼ完全制御が達成された。

各種水質における殺菌剤のレジオネラ属菌に対する殺菌効果評価を行い、塩素消毒が難しいとされる高pH条件での殺菌効果を検討した。その結果、二酸化塩素および臭素が効果的であることが確認された。一方、塩素等の薬剤の使用によって生じる問題点を指摘した。1点はトリハロメタンに代表される消毒副生成物の精製で、入浴を介して経

皮的および経氣的暴露は免れず、使用に際しては慎重な管理が前提となる。また、厚生労働省による塩素管理の勧奨の前後で、浴槽水から分離される菌種のうち病原性が最も高いことで知られる *Legionella pneumophila* 血清群 1 の占める割合が高くなる傾向が示されている。すなわち、塩素消毒はレジオネラ対策に効果的であるが、無計画な使用はかえって *L. pneumophila* 血清群 1 の繁殖を招く恐れがある。あわせて、循環式浴槽においては *Mycobacterium avium* など非定形抗酸菌症の起原因菌として知られる抗酸菌種が分離・同定された。

遺伝子解析 (DGGE 法) による源泉貯湯槽から浴槽に至る微生物叢の変化の把握、換水・洗浄等の管理状況の把握、あるいは指標微生物の開発に努めたが、作業量の多さから技術の普及には無理があるものと判断された。

環境中であってレジオネラ属菌はアメーバなど原生動物を宿主として増殖するが、アメーバ内で 1,000 個以上にまで増殖する。アメーバ由来のレジオネラと BCYE α 培養の菌とでは水中での感染性維持能に差があり、培地由来の菌はアメーバ由来のものに比べ速やかに VNC (Viable but not-culturable state) 状態に移行することが示された。さらに、いずれの菌もアメーバへの感染性は速やかに消失することも観察された。これまで、VNC 状態にある菌は宿主アメーバ等に寄生することで増殖能を回復するものとされてきたが、当該研究の結果はその考えを支持するものではなかった。

現行では、レジオネラ汚染の検査には培養法が用いられているが、判定までに 1 週間程度を要することから迅速簡便な検査法が求められている。当該研究事業では遺伝子診断法の適用を検討し、培養法との間に生じる陰性/陽性結果の不一致の理由について新たな解釈を示すことでその有用性を確認した。一方、DNA 抽出の難しさや PCR の阻害など遺伝子検査方にかかる問題点も指摘され、慎重な対応が求められる。

循環式浴槽の一般衛生管理について重点管理項目を検討するとともに、HACCP システムの導入の留意点をまとめた。

A 研究目的

循環式浴槽システムにおいて、レジオネラ属菌は浴槽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) が汚染巣である。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である。

B 研究方法

当該研究では以下の諸点につき検討した。

1. 浴槽水中の有機物および濁度対策

1.1. 入浴者 1 人当たりの有機物持ち込み量を既存の資料および浴場施設の管理記録から算定した。

1.2. 循環式浴槽において、バイオフィームの定着面積は構造物の接水面積に等しく、その面積が洗浄の対象となる。そこで、循環式装置の有無による接水面積を比較し、あわせて衛生管理に要する経費の算定資料とした。

1.3. 実験プラントを用いて使い捨て型ろ材を用いる珪藻土ろ過と塩素管理による微生物汚染制御効果を検討した

2. 消毒にかかる諸問題
 - 2.1. 各種水質における殺菌剤のレジオネラ属菌に対する殺菌効果を検証した
 - 2.2. 塩素消毒下におけるレジオネラ属菌変遷の解析を行った。
 - 2.3. 浴槽水及び浴室空気中の消毒副生成物の測定を行った。
3. 浴槽水より分離された抗酸菌の同定
4. 遺伝子検出法を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の有用性評価
5. 水中に放出されたレジオネラのアメーバ感染性の継時的変化
6. 浴槽内に発生する微生物叢解析
7. HACCP 導入による循環式浴槽管理における重要管理点の整理

C 研究成果

- 1 浴槽水中の有機物および濁度対策
 - 1.1 過マンガン酸カリ消費量： 現行の循環式浴槽では、いわゆる砂ろ過器等を活性汚槽として機能させ、有機物汚染対策に結び付けようとしている。一方、レジオネラ汚染防止の観点からろ過槽の徹底消毒・洗浄（バイオフィルム除去）が勧

奨されている。

現行の浴槽水水質基準は濁度 5 度（精製カオリン 5mg/L）以下、有機物汚染は過マンガン酸カリ消費量として 25mg/L 以下と規定されている。これまでに、入浴者の持ち込む有機物量は 1 人当たりおおむね 0.5g（平成 16 年度報告）と計算されている。また、持ち込まれる濁質はカオリンに換算して 0.1～0.5g とされている（空気・調和衛生工学便覧）。仮に、上記の条件を 10m³程度の浴槽にあてはめて単純計算すると（溢水なしで、単純に入浴者が持ち込む汚染量を浴槽水量で除した場合）、過マンガン酸カリ消費量に関しては 300 人～500 人の利用で上限に達することになる。ところで、・循環式浴槽では厚生労働省により溢水とそれに見合う量の湯水の補給が奨奨されている。したがって、溢水とそれに見合う浴用水の補給が実施されている浴槽システムでは希釈効果が期待され、浴槽水の濁度は（1）式（空気調和衛生工学便覧、pp510-516）で得られるとされる。この式は過マンガン酸カリ消費量の算定にも利用可能である。

$$\omega = m \times N \times \frac{V}{W_i} \left(1 - e^{-\frac{W_i}{V} \times t} \right) \div V \dots \dots \dots (1)$$

ここで、

- ω：浴槽水中の汚染量（濁度/過マンガン酸カリ消費量）
- m：入浴者が持ち込む汚染量（g/人）
- n：入浴者数
- O：溢水に伴う入浴者 1 人当たりの給湯量
- V：浴槽容量
- W_i：給湯量（=N×O）
- t：入浴からの時間（日）

(1) 式からは使用し続けた浴槽水の濁度および過マンガン酸カリ消費量は入浴者の持ち込む汚染量 (m) を利用者あたりの給湯量 (O) で除した値に収斂すること

がわかる。すなわち、(2) 式に示すように (t) を無限大にとると ω は m/O に収斂する。

$$\omega = m \times n \times \frac{V}{n \times O} \left(1 - e^{-\frac{W_i}{V} \times t} \right) \div V = \frac{m}{O} \left(1 - e^{-\frac{W_i}{V} \times t} \right) \Rightarrow \frac{m}{O} \dots \dots \dots (2)$$

濁質等の持ち込み量は1人当たり精製カオリンに換算して0.1~0.5g、過マンガン酸カリ消費量はおよそ0.5g(平成16年度報告)とされることから、入浴者の平均体重を50kgとした際の溢水/補給湯量はおよそ50Lとなり、濁度は2~10mg/L(2~10度)に収束し(図1)、過マンガン酸カリ消費量は10mg/Lに収束する(図2)。濁度の基準値が5度であることから、1人当たりの入浴者の持

ち込みを0.25g以上に想定すれば濁質除去のろ過装置設置が必須となる。一方、過マンガン酸カリ消費量は1人の持ち込み量が1.25gを超えない限り基準値(25mg/L)を超えることはない。したがって、溢水と給湯が実施されている浴槽において過マンガン酸カリ消費量は基準値内に制御されており、生物浄化による対策は必要ないことがわかる。

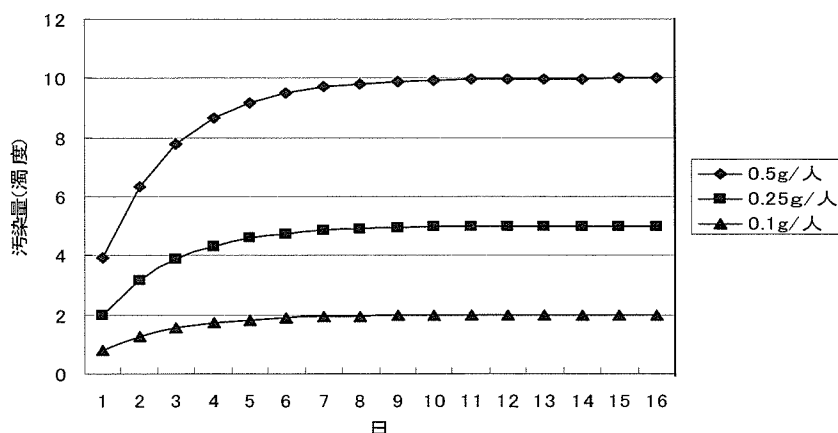


図1. 濁質の持ち込み量と浴槽水濁度との関係

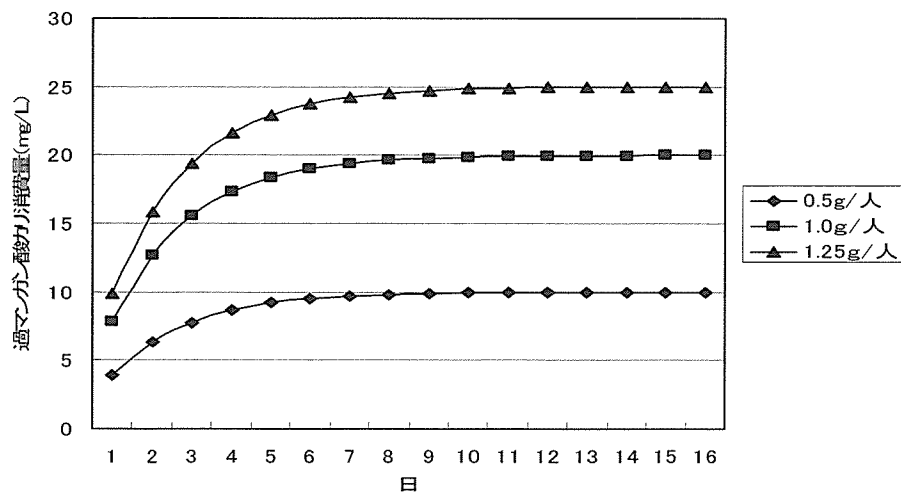


図2. 有機物の持ち込み量と過マンガン酸カリ消費量との関係

なお、砂式ろ過による濁質除去は必ずしも効率的ではなく、近年の性能試験によると、ろ速20~60m/h、ろ過砂粒径0.6mm、ろ過層厚300~600mmの実験条件で単回ろ過での濁度除去率（濁度7NTUの原水使用）は40%未満にとどまることが示されている（浴槽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、（2005.8.9~11、札幌市））。そこで、濁質の除去率を40%として試算したところによれば、この程度の能力であっても1日に2回程度ろ過が行われれば概ね基準値内に収まるものと計算された。しかしながら、砂ろ過は洗浄が難しく、後述するようにろ材の占める接水表面積は浴槽システムの総接水面積の90%以上を占め、最大のバイオフィルムの着生場所となることから、管理面から避けたい装置といえる。

1.2 接水面積：周知のとおり、厚生労働省をはじめとする各種の指針や条例によりろ過槽の徹底洗浄と消毒が強く推奨されている。このことはとりもなおさず、ろ過装置を本来の物理ろ過機能に限定して使用するよう指導するもので、活性汚泥槽としての機能を廃棄させるものである。そこで、活性汚泥槽としての機能を持たないろ過槽を系内に並存させることのデメリットをバイオフィルム対策の観点から検証した。すなわち、循環式浴槽および循環装置の有無による浴槽水との接水面積を比較した。バイオフィルム（=活性汚泥）は水と接する構造物の表面に着生・増殖することから、面積が多いほど管理対象が広がる。砂ろ過器ではろ材の砂の表面積がシステムの総接水面積の90%以上に及ぶことが明らかとなった（表1）。

表1 ろ過循環系の有無による水との接触面積の比較

循環系(有り)	内面積	循環系(無し)	内面積	減少率
補給湯	8.5 t	補給湯	8.5 t	
循環	19.6m ²	循環		
水位計	1.9m ²	水位計		
ジェット	17.5m ²	ジェット		
浴槽	40.0m ²	浴槽	40.0m ²	
ろ過器	5.8m ²	ろ過器		
セラミック 5mm	315.0m ²			
	計 400m ²			90%
砂 0.6mm	2615.0m ²			
	計 2700m ²			98%

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、洗浄効果が得られやすい構造とすることが肝要である。循環式浴槽は極めて複雑な配管系により連結されており、洗浄の難しさから配管内壁はバイオフィーム形成の格好の場となっている点を改めて指摘する。

ルム着生場所とその対策：モデル循環浴槽による実験から、レジオネラ属菌の自然汚染と爆発的な増殖（殺菌停止後、3日目以降にアメーバとともに増殖、最高菌数 10⁵~10⁶cfu/100ml）を確認した。循環浴槽水中では、従属栄養細菌の増殖が起き、その後、それらの細菌をエサとするアメーバの急激な繁殖、これに同調してレジオネラの増殖が起きる。

1.3 循環式浴槽におけるバイオフィ

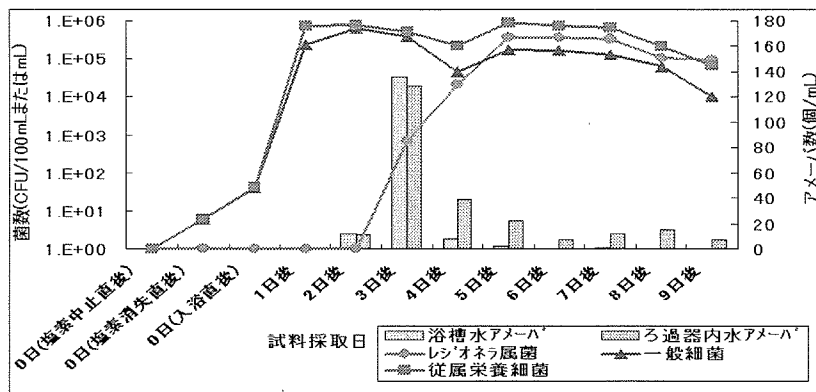


図1. 自然汚染による循環浴槽水中のレジオネラ属菌およびアメーバ等の経日変化

図3. 循環式浴槽水中のレジオネラ属菌およびアメーバ等の経日変

装置内のレジオネラ汚染箇所はろ過器内ろ過材、集毛器、配管、パッキングなど多岐にわたる。特に、循環装置内で最大の表面積を占めるろ過材の表面は、レジオネラやアメーバ等のバイオフィルムの最大の貯蔵庫になっている。無殺菌下で3週間循環させた後に採取したろ過材には、著しいレジオネラ属菌汚染（ろ過材1g当り 2.8×10^6 CFU）が認められた。硬質塩化ビニル（VP）配管では、3日後に桿菌の定着がみられ、6日後では長桿菌と短桿菌の集積像（レジオネラ属菌数： 1.6×10^4 CFU/綿棒拭取り）が観察された。エチレン・プロピレン（EPDM）ゴムパッキングでは繊維状に伸長した菌体が絡み合っている像（レジオネラ属菌数： 5×10^5 CFU/綿棒拭取り）が観察された。モデル浴槽での塩素管理課の入浴実験から、浴槽水への塩素注入では微生物制御に有効であるが、遊離残留塩素濃度の維持管理が容易でないこと、さらに、0.5mg/L程度の残量塩素濃度では、ろ過材、パッキング等ですでに形成されてしまったバイオフィルム中のレジオネラの殺菌には至らないことを確認した。そこで、ろ過器内を毎日5~10mg/Lの塩素により、5分

間以上逆流洗浄する方法が推奨され、毎日の繰り返しによりレジオネラや宿主アメーバの増殖抑制が期待される。各種薬剤による消毒では集毛器網のレジオネラの殺菌は薬剤の種類によって不完全なことが示された。配管接合部のゴムパッキングはバイオフィルムの付着が著しく、一旦形成されたバイオフィルム中のレジオネラの殺菌は検討したどの薬剤でも困難であることがわかった。EPDMパッキングの接液部表面には、塩素材等による劣化に起因すると思われる微小な穴が観察された。そのためバイオフィルムが定着しやすく、除去しにくくなっていることが示された。一方、耐薬品性、撥水性に優れたテフロンパッキングの接液部表面は平滑であり、バイオフィルムが定着しにくく、除去されやすいことが推察された（図4）。これらの解決策として、集毛器網は毎日タワシで物理的に洗浄した後、消毒用エタノール噴霧で殺菌する方法が、またゴムパッキングはバイオフィルム付着の少ない、殺菌・洗浄が可能なテフロン加工パッキングに交換することが強く薦められる。

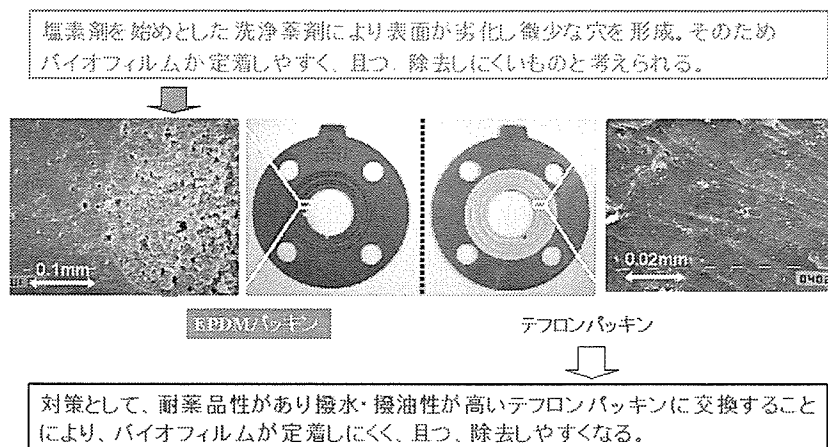


図4. バイオフィルムの定着防止に向けた素材の検討

1.4 珪藻土ろ過：ところで、過マンガン酸カリ消費量や濁度といった水質基準が守られている循環式浴槽においてもレジオネラ汚染は免れず、浴槽水の遊離残留塩素管理と定期的な浴槽システム全体の消毒と洗浄ならびに換水が必須である。

る。バイオフィームは湯水と接する構造物の表面に着生・増殖する。循環式浴槽において総接水面積の90%以上はろ過器内のろ材表面が占めており（平成17年度報告）、バイオフィーム対策上ろ材の消毒、洗浄が最も重要となる。

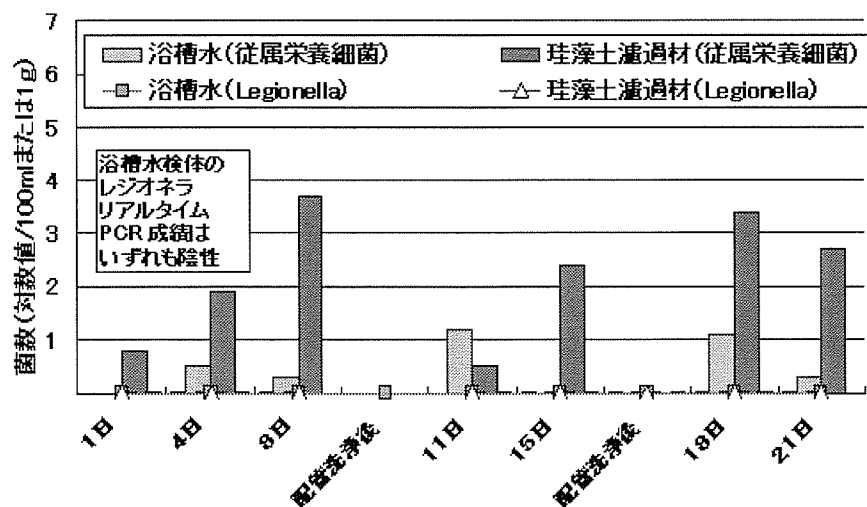


図5. 珪藻土の張替え、塩素管理併用運転時の菌数の推移

一旦、バイオフィーム形成が進むと、塩素等の消毒剤の浸透性が低下し、消毒効果が期待できない。したがって、バイオフィーム対策の要点は高頻度の換水・洗浄と高濃度の塩素処理であり、さらには容易に洗浄ができるよう浴槽構造を単純化することである。

当該研究では接水面積のほとんどを占めるろ材を使い捨て型の珪藻土ろ過にすることで汚染防止を図ったところ、管理の簡素化に著しく貢献することが示された（図5）。珪藻土ろ過は競泳用プールの濁質除去（濁度 0.1 以下の透明度の確保）に広く用いられている装置で、かつては銭湯のろ過装置としても活用されて

いたものである。当該ろ過装置は珪藻土を充填材としたケーキろ過装置で、充填材を日々廃棄するところに特徴がある。すなわち、この装置では濾過捕捉物とともに充填材を廃棄することからバイオフィームの増殖の恐れがない。また、珪藻土の種類や使用料に依存するが、極めて高い濁質の除去効率（表2）が得られており、さらに細菌類の除去効果も期待できる。当該研究は 2m³程度の浴槽を有する実験プラントにおいて珪藻土ろ過と塩素消毒の併用、週に1回程度の換水により長期間にわたりレジオネラ汚染を防止する結果を得た（図5）。

表 2. 珪藻土ろ過による粒子除去性能

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%

2. 消毒に係る諸問題

バイオフィームは水と接触する構造物の表面に着生/増殖し、その防除策として塩素消毒が行われている。塩素消毒は浴槽水を継続使用の是非を戦わす前のいわば緊急避難的な措置で、その使用は最小限に留めることが望ましい。

2.1. 各種水質における殺菌剤のレジオネラ属菌に対する殺菌効果評価：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が用いられている。浴槽水の水源として隧道水を使用している場合は塩素剤が有効に作用するが、温泉水では泉質によって塩素剤の効果が発揮されない場合がある。実験室において、塩素剤、臭素剤、二酸化塩素、ヨウ素剤の4種類の酸化性殺菌剤を用いてレジオネラ属菌に対する殺菌効果を評価した。水質条件は、pH4.5～9.5 及びアンモニウムイオン 0、5mg/L とし、殺菌剤の濃度は 0.5mg/L (Cl₂または ClO₂として) とした。その結果、塩素剤は高 pH 及びアンモニウムイオンの存在により殺菌効果が低下したのに対し、二酸化塩素は用いた当該実験条件の範囲では安定した殺菌効果を発揮した。臭素剤も pH の高い領

域でアンモニウムイオンの有無にかかわらず高い殺菌効果を発揮した。今後は実機レベルでの殺菌効果の検証が必要である。

便宜のために、泉質に応じた消毒方法や管理方法を以下のように整理した。

- 浴槽の水源に水道水又は水道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する。
- 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である。
- 各泉質に応じた塩素剤以外の対応の具体的方法には、臭素剤（ブロモクロジメチルダントイン、BCDMH）、ヨウ素剤、二酸化塩素、ほかの酸化性殺菌剤（オゾン、過酸化水素、過酢酸）及び、有機系殺菌剤、金属類（銀・銅）、紫外線殺菌装置などがある。
- 塩素剤以外のレジオネラ属菌除菌対策の有効性については、今後、実機

での評価データを蓄積し科学的に評価することが望まれる。

2.2. 塩素消毒によるレジオネラ属菌相の変遷： 近年、循環式浴槽の塩素消毒が進み、浴槽水におけるレジオネラ属菌の検出率は低下している。一方、集団感染事例の主要な起因菌である *Legionella pneumophila* 血清群 1 (SG1) の分離株に占める割合は増加する傾向が見られる。米国の報告にもあるように、温度と低レベルの消毒が選択圧となって *L. pneumophila* SG1 が生残する可能性が指摘される。特にろ過器の管理が不十分であると、ろ材表面に多量に蓄積したバイオフィームでは内部が十分な塩素濃度に達せず、結果的に上述の状態が作り出されている可能性が否定できない。2001年、

2002年、2005年の保存株と、2006年の分離株（総計 24,250 検体）について菌の分離、ならびに菌種と血清群の同定を行ったところ（図6）、レジオネラ属菌陽性であった検体の比率は、2001年の29%から2006年の10%にまで低下した。同様に100 mL 当りの菌数も年度ごとに漸減し、集団感染事例でみられた 10^4 cfu/100mL 以上の菌数が検出された施設は、1.2%未満であった。*L. pneumophila* の血清群別にみると、2001年度ではSG5が最も多かった。その後、SG1が最も多くなり、他方ではSG3、4の比率が減少した。詳細に調べた2005年、2006年では、SG1、untypable、SG5、SG6の順に検出され、それぞれ10%を超えていた。

浴槽水のレジオネラ属菌の分布推移

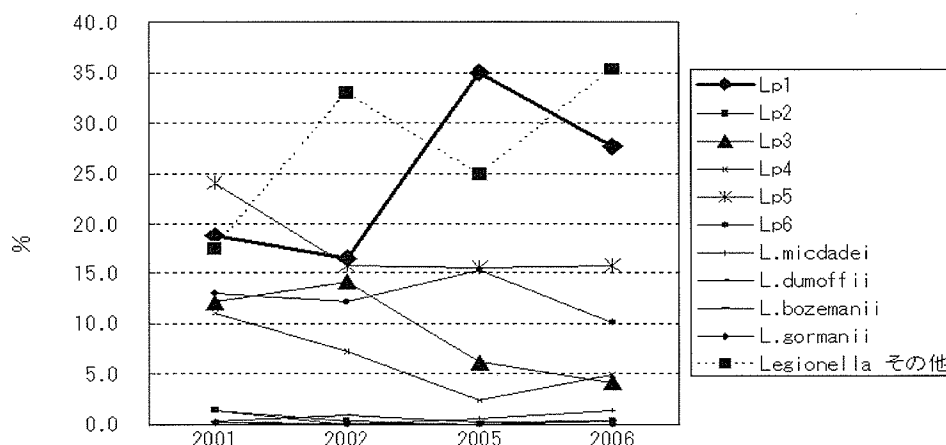


図6. 浴槽水のレジオネラ属菌の分布推移

2.3. 塩素消毒に伴う副生成物の発生： 塩素消毒に伴う副生成物の発生並びに施設内の空气中トリハロメタン類の濃度を調査した。関東地区の公衆浴場において、

脱衣場及び浴室（洗い場並びに浴槽近辺）の空気を75 ml/minの流速で10分間吸引し、直列に接続した2本のTenax TA管（Supelco, 1/4" × 3.5"）でTHMsを捕集

した。空気のサンプリングと並行して、水中 THMs 測定用及び微生物学的な水質検査用に浴槽水及びシャワー水を採水した。Tenax TA 管で捕集した THMs の分析は加熱脱着装置 TDTS-2010 及び GC/MS QP-2010（島津製作所製）を使用し、Headspace - GC/MS による浴槽水及びシャワー水中の THMs 分析には HS-40 及び QO-2010（PerkinElmer 製）を用いた。

平成 18 年度に調査を実施した神奈川県内の 6 施設の浴室内総 THMs 濃度の平均値は 107 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、これは東京都内 5 施設を対象とした平成 17 年度調査の平均値 120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ にほぼ匹敵する値であった。また、浴室内総 THMs 濃度には施設間で最大 10 倍もの濃度差が認められた。

浴室で極めて高い濃度のクロロホルム

(270 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) が検出された一施設 (KNGW-3) について、浴室在室時間を 30 分、体重 50 kg の成人の 1 日あたりの呼吸量を 15 m^3 と仮定して経気道曝露量を概算すると 84 μg (1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) となる。この推定曝露量は、水道水質基準値算定の根拠となったクロロホルムの TDI (12.9 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) の 13% を占めることになり、11 施設の平均でみた場合にも TDI の 4~5% 程度に相当する量のクロロホルムに経気道曝露されることが明らかとなった。これらの調査結果は、公衆浴場での日常的な消毒副生成物曝露が無視できないリスク要因となり得ること、及び消毒副生成物の制御も包含した維持管理方法の策定が必要であることを示していると言える。

表 3. 消毒副生成物

消毒副生成物		
施設	経気道曝露量 ($\mu\text{g}/\text{day}$)*1	TDI 占有率 (%)
TKY-1	15.8	2.5
TKY-2	60.8	9.4
TKY-3	25.3	3.9
TKY-4	19.9	3.1
TKY-5	36.5	5.7
KNGW-1	7.4	1.1
KNGW-2	24.4	3.8
KNGW-3	85.7	13.3
KNGW-4	14.7	2.3
KNGW-5	14.6	2.3
KNGW-6	14.6	2.3
平均値	29.1	4.5
中央値	19.9	3.1

*1 浴室在室時間を 30 分、体重 50kg の成人の 1 日あたりの吸収量を 15 m^3 と過程 TDI=12.9mg/kg/day

3. 浴槽水より分離された抗酸菌の同定： ネラのみならず、各種の抗酸菌が分離されることを明らかにした。抗酸菌はヒト

に対して非病原性のものから病原性のあるものまでおよそ 80 種が知られている。非結核性抗酸菌は自然界に広く分布することが知られている。健常人にとって多くの日和見感染菌であるが、治療方法が確立されていないことから難治性疾患として知られる。当該研究における 3 年間の調査では、循環式浴槽の浴水およびろ材の合計 202 検体から抗酸菌 57 株が分離され、43 株が同定された（表 4）。ヒ

トに病原性の高い *Mycobacterium avium*、*M. intracellulare*、*M. scrofulaceum*、*M. fortuitum* が分離された。これらは、いずれも非結核性抗酸菌症の病原体であり、レジオネラ汚染防止に留まらず、抗酸菌による汚染防止も視野に入れた浴水の浄化・消毒方法の検討が必須と考える。なお、本研究期間を通して結核菌（*M. tuberculosis*）は検出されなかったことを付記する。

表 4 浴槽水由来抗酸菌の同定結果

菌種名	株数 (%)
<i>M. gordonae</i>	8 (18.6)
<i>M. scrofulaceum</i>	1 (2.3)
<i>M. avium</i>	22 (51.2)
<i>M. intracellulare</i>	1 (2.3)
<i>M. nonchromogenicum</i>	1 (2.3)
<i>M. fortuitum</i>	4 (9.3)
<i>M. phlei</i>	5 (11.7)
<i>M. flavescens</i>	1 (2.3)
合計	43 (100)

4. 遺伝子検査法の利用に向けた検討：

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、本属菌の培養検査には長時間（一週間以上）を要することから、現場からの検査の迅速化が求められている。当該研究では培養法と遺伝子検査法を比較し、その結果を解釈した。その結果、以下の諸点が確認された。

- DNA 検査法の検出限界は培養法とほぼ同レベルに調整されている
 - わが国で存在が確認されている菌種ならびに臨床株を概ね検出する
 - リアルタイム PCR 法の定量性
 - 最確法等の適用により LAMP 法による定量試験の可能性
- ところが、遊離残留塩素が確認された浴槽水の検査において、DNA 検査法と培養法との間にはかなりの不一致が認めら

れた。遺伝子検査では DNA が存在すれば菌の生死に関わらず陽性反応を呈することで、検体中に死菌が含まれる場合に培養法との不一致が生じる可能性がある。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、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状況である (図7)。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な起こり得ず、従って、DNA が多量に検出される状況は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。DNA 検査は迅速性のみならず採水直前の消毒剤投入などといった不正行為の発見につながる利点があり、洗浄後の確認試験や営業再開に向けた検査などに活用が期待される。

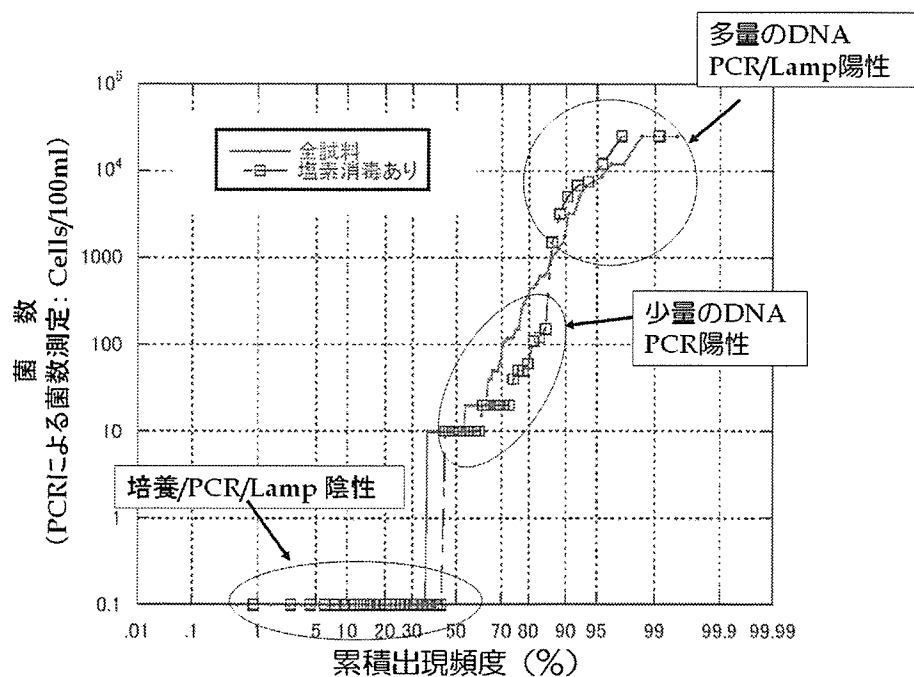


図7. リアルタイム PCR 陽性試料の内容

その一方で、培養法で菌が検出されていながら、DNA 検出法で不検出となった試料の多くは温泉水で、フミンなど温泉成分中に DNA 増幅に阻害的に働く物質が含まれている可能性があることが指摘され、DNA 抽出技術の改良が必要である。

また、DNA 抽出技術の熟練度により結果に等に十分な理解と技術的な習熟が必要であることも明らかになった。昨年度の報告 (横浜市衛生研究所) では 2 件の例外を除き DNA 検出法による検出菌数が培養法よりも常に高い値を示していたが、

今回の結果では検査機関によっては DNA 検出法による測定結果が培養法に比較して低い値を示すれいが見られた (図 8. A、B)。その理由の 1 つに DNA

増幅反応阻害物質の除去に用いられる吸着樹脂が考えられ、反応系に混入すると著し増幅阻害が起きることが確認された。

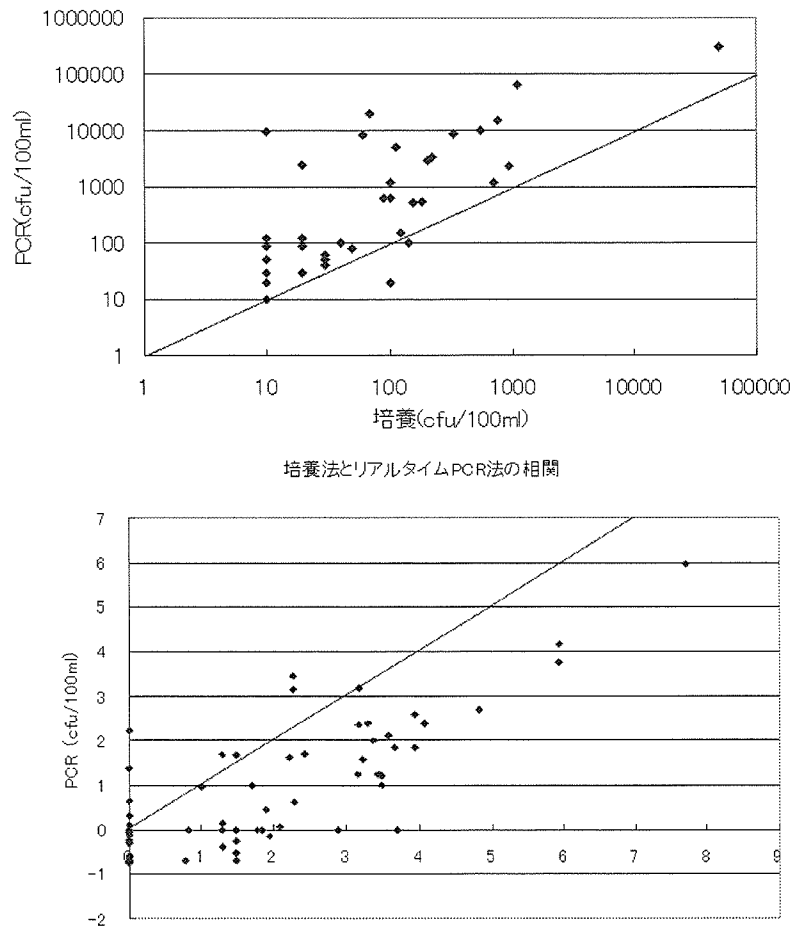


図 8. 培養法とリアルタイム PCR 法の相関

5. 浴槽水中のレジオネラの活性評価：

レジオネラ感染症の集団感染において感染源の菌量が必ずしも感染の規模 (患者数) と結びつかない、いわゆる “Dose paradox” という問題が指摘される。これに関しては、病原体と宿主、あるいは感染経路について新たな視点での

検討が必要である。これまでに、アメーバ内におけるレジオネラ属菌の増殖量は 1,00cfu レベルに達すること、1 個の感染アメーバを吸引させることによりマウス肺で菌の増殖を確認し、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可能性が示されている。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、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（人工培地での増殖活性）するものの、アメーバに対する感染性（ID₅₀）は短期間のうちに低下することが観察された。通常感染実験に用いられる BCYE α 培地で 30°C、3 日間培養された *L. pneumophila* ではアメーバに対する ID₅₀ が 2.5 と算出されたのに対し、温水中に浮遊状態におかれた菌では1週間後に ID₅₀ ≒ 20cfu およそ 1 log₁₀ 程度低下した。また、2週間後には ID₅₀ ≒ 128 と 2 log₁₀ 程度の低下が見られ、水中に遊離状態にあるレジオネラ

は比較的速やかに感染性が低下することが示された（図9）。従来、レジオネラ属菌と宿主アメーバの関係において、人工培地上での増殖能を欠損したレジオネラ属菌（VNC : viable but not culturable）は宿主アメーバに感染することでその増殖活性を回復するものと考えられてきた。しかしながら、当該研究で示された結果はこれまでの通説を支持せず、むしろ逆の関係を示す結果であった。この点に関しては慎重な検証が必要であるが、今後の検討結果によっては浴槽水のレジオネラの汚染許容量に影響するものと考えられる。

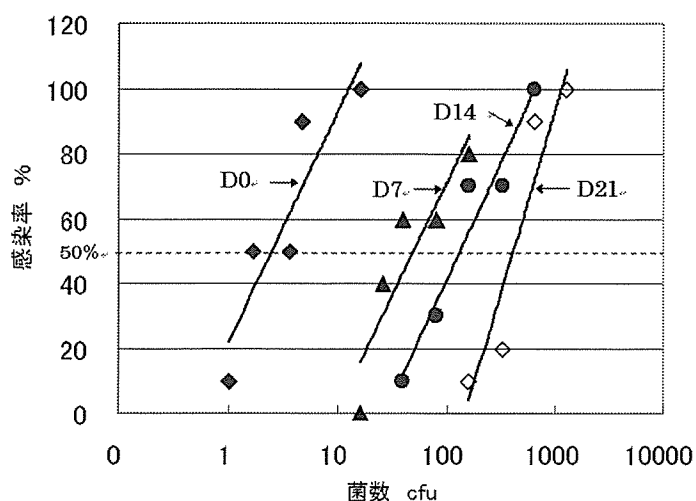


図9. モデル浴槽水を用いた浮遊状態に置かれた菌のアメーバへの感染性の変化
BCYE α プレートで 30°C、3 日間培養した菌を用い、42°C に保った脱塩素水道水（浴槽水を想定）に浮遊状態で維持し、宿主アメーバへの感染症を測定した。その結果、ID₅₀ は継時的に大きな値に移行した移動）。

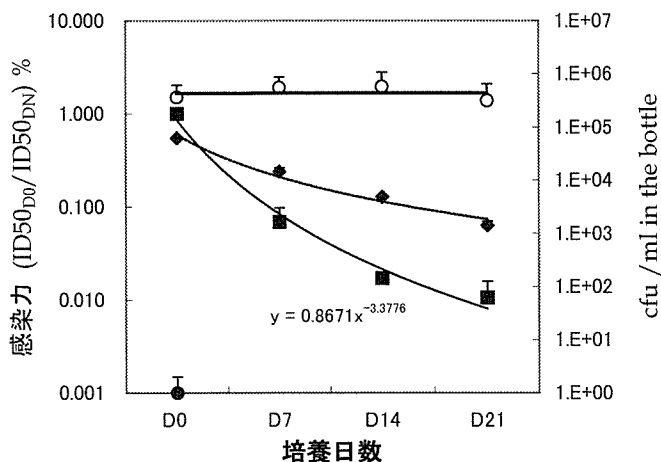


図9. 浮遊状態におかれた菌の感染力および BCYE α 培地での増殖性の変化

宿主アメーバ由来のレジオネラに比べ、BCYE α 培地由来の菌は浴槽水中に遊状態に置かれると速やかに培地での増殖性を喪失(VNC化)した。また、アメーバへの感染能も喪失しており、VNC状態にあるレジオネラが宿主アメーバにより回復する現象は観察されなかった。(左縦軸は感染力(ID50_{D0}/ID50_{DN})、右縦軸はBCYE α 培地での増殖(CFU)を示す。横軸は培養開始後の経過日数を示す。本年度BCYE α 培地発育菌株を用いた感染力(ID50_{D0}/ID50_{DN})を■、本年度BCYE α 培地発育菌株を用いたcfuを◆示した。また、参考として前年度アメーバ内増殖菌株を用いたcfuの継時的推移を記載した(○)。

6. 浴槽水中に発生する微生物の遺伝子解析(DGGE法): 浴場施設における Legionella 属菌の集団感染を受け、現在の浴槽は塩素消毒の徹底が指導されている。しかしながら、現状はバイオフィーム形成とそれに伴う Legionella 属菌の汚染制御に難渋している状況にある。一般に、源泉で Legionella 属菌が検出されることは稀で、源泉を貯留させる源泉タンク以降において Legionella 属菌の発生が認められる。微生物叢の遺伝子解析から、源泉タンクや配管と浴槽の汚染は質的に異なることが示唆された(平成17年度厚生科学研究(H16-健康-一般-059))。また、浴槽での汚染にかかる微生物叢の解析はなされていない。DGGEバンドパターンの解析から、源泉タンクと貯湯タンクでは共通の微生物叢が示されたが、浴槽水では明らかに異なった微生物叢を形成しているものと考えられた。塩基配列解析から、浴槽水中に繁殖する細菌類の一部には病原細菌と近縁の配列も存在した。系統樹

解析からは浴槽水にのみ出現する細菌クラスター、貯湯槽に強く出現するクラスター、両方にまたがって出現するクラスターに大別されたが、汚染指標の候補を選定・抽出することはできなかった。

7. HACCP導入による循環式浴槽管理における重要管理点: レジオネラ症の帽子のために公衆浴場や旅館の浴槽の管理について、厚生労働省から種々の要領が示され、清掃・消毒にいたるまで記載されている。しかしながら、実際の浴槽の管理の現場では、個々の構造や状況に即してさらに細かい留意点や重点的に管理すべき個所があることは容易に想像される。そこで、循環式浴槽の一般衛生管理における重点管理項目を検討するとともに、HACCPシステムの導入の留意点をまとめた。

浴槽の湯を循環するのは、ろ過装置によりゴミや汚れを取り除き、あるいは加熱器により水温を40~42℃程度に保つこ

とで、数日にわたり湯の利用を可能にすることを目的にしている。しかし、浴槽水が継続使用されると構造物の接水表面にバイオフィームが形成され、やがてレジオネラ属菌の供給源となる。そのため、レジオネラ症の発生を防ぐためには換水と清掃・消毒による効率的な徹底管理が不可欠となる。HACCPシステムでは以下の手順により計画を立案し、計画に基づ

いて衛生管理が行われる。

具体的には HACCP の導入の決定を第 1 段階とし、以下の手順書の策定を経て、実施に移り、〔効果判定・評価 ⇒ 改善措置 ⇒ 手順書の再検討 ⇒ 再開〕を繰り返すことで、集積された知識をシステムに還元することでシステムの向上と効率化をはかり安全を高める。

- | | |
|--------|-----------------------------------|
| 手順 1. | 専門家チーム編成 |
| 手順 2. | 製品の記述（管理対象の明確化） |
| 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（浴槽に関連した設備や配管設置の把握） |
| 手順 5. | 現場確認（実際の構造と図面との一致を確認） |
| 手順 6. | 危害分析（HA）（レジオネラに関する科学知識の収集） |
| 手順 7. | 重点管理点（CCP）の特定（整理表の作成） |
| 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 |

D 考察

循環式浴槽は旅館や各種入浴施設において広く設備されている。入浴施設ではレジオネラ等の微生物汚染を含む衛生管理に苦慮しているというのが現状である。繰り返し主張してきたように、その原因は循環式浴槽システムが矛盾を抱えた構造であることによる。当該研究事業では多方面からレジオネラ汚染に至るメカニズム、あるいは循環式浴槽システムが抱える衛生問題を明らかにし、管理の重要性を指摘してきた。また、レジオネラ汚染防止に向けた有効な措置として、ろ過装置等の撤去を中心とした施設の簡素化

（循環配管当の短縮化）、あるいは洗浄・消毒の徹底、使い捨て型のろ材の導入、換水等を提言してきた。その一方で、塩素消毒による副作用（消毒副生成物の経氣的・経皮的暴露、*L. pneumophila* SG1 の選択など）を指摘してきた。現行の循環式浴槽システムを構造面から抜本的に改良しない限りレジオネラ汚染問題は解決できないと考える。さらに、循環式浴槽システムは従来の完全換水型の浴槽システムとは根本的に異なった構造であり、現行の浴槽水水質基準を準用することの是非について改めて検討する必要があるものとする。