

厚生労働科学研究費補助金

地域健康危機管理研究事業

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

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 博雄

平成19(2007)年4月

目 次

I. 総括研究報告	
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	1
井上博雄	
II. 分担研究報告	
1. 温泉における微生物汚染ポテンシャルの評価	31
烏谷竜哉、遠藤卓郎	
2. 貯湯槽のバイオフィルム生成量調査	45
縣邦雄、遠藤卓郎	
3. PCR-DGGE 法による掛け流し式浴槽等環境中の細菌叢の解析	67
遠藤卓郎、黒木俊郎、烏谷竜哉	
4. 紫外線殺菌装置の有効性評価	87
遠藤卓郎、大谷勝実、黒木俊郎、杉山寛治、縣邦雄	
5. 掛け流し式温泉における病原微生物汚染の実態調査	99
微生物汚染に影響を及ぼすリスク要因	
烏谷竜哉、遠藤卓郎、倉文明、大谷勝実、黒木俊郎、杉山寛治、藏元強	
縣邦雄、山崎和生	
(資料1) 研究協力者の調査概要報告書	
6. 浴槽水から分離された黄色ブドウ球菌および緑膿菌の薬剤耐性調査	161
杉山寛治、大谷勝実、黒木俊郎、藏元強	
7. 温泉施設における ATP ふき取り検査を指標とした洗浄効果判定の試み	165
烏谷竜哉、遠藤卓郎、大谷勝実、黒木俊郎、杉山寛治、藏元強	
(資料1) 施設別 ATP ふき取り検査報告書	
8. 掛け流し式温泉施設の衛生管理	201
黒木俊郎、遠藤卓郎、井上博雄、烏谷竜哉	
(資料1) 浴槽の衛生管理に関する要領等一覧	
(資料2) 掛け流し式温泉における衛生管理の重要ポイント	
(資料3) 掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌対策事例集	
(資料4) HACCP システム導入のステップ	
(資料5) 掛け流し式温泉施設において作成が想定される文書	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	255

I 総括研究報告

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

主任研究者 井上 博雄 愛媛県立衛生環境研究所長

研究要旨

平成 17 年度に引き続き、病原微生物汚染状況や衛生管理などの実態が不明な掛け流し式温泉の実態調査など、特にレジオネラ属菌汚染に関わる諸要因を分析し、その現状を把握するとともに衛生管理手法の改善に資するため、下記の検討を行った。

1. 温泉における微生物汚染ポテンシャルの評価

温泉の有機炭素量（AOC、TOC）に応じてバイオマス量（全細菌、ATP）が増加した。レジオネラ属菌が検出される温泉ではその増殖はバイオマス量と相関し、有機炭素量がレジオネラ属菌の増殖にも関与していることが示唆された。

2. 貯湯槽のバイオフィーム生成量調査

モデル貯湯槽を用いて、水中及び付着微生物量に対する水温と水質の影響を検討した。50℃以上では微生物類の増殖程度は著しく低く、貯湯槽の温度を 50℃以上に維持することが微生物類の増殖抑制に有効であると考えられた。ただし、50℃以上でもバイオフィーム中にレジオネラ属菌は生息するため、定期的な洗浄消毒が必須と考えられた。

3. PCR-DGGE 法による掛け流し式浴槽等環境中の細菌叢の解析

貯湯槽から湯口にかけての配管系に増殖する細菌叢と、浴槽中で増殖する細菌叢があり、双方での微生物汚染が確認された。浴槽の細菌叢は洗浄・消毒後短時間（1～3 日）で復元されることが明らかとなり、毎日の完全換水と浴槽の徹底洗浄が必須であることが確認された。浴槽では *Tepidimonas* と *Sphingomonas* が高い割合で分離されるが、湯口からはほとんど分離されないなど、浴槽から分離される細菌叢は湯口より上流から分離されるグループと系統的に異なる傾向があると考えられた。

4. 紫外線殺菌装置の有効性評価

貯湯槽でレジオネラ属菌が増殖する施設では、湯口間近の配管に紫外線殺菌装置を設置することで湯口水（吐出湯）のレジオネラ属菌を不検出にできた。しかし、消毒効果が残存しないため、浴槽内でのバイオフィーム対策を充分検討する必要がある。また、鉄濃度の高い泉質等では紫外線照射管の汚れを 1 週間 1 度以上の頻度で洗浄、メンテナンスする必要がある。

5. 掛け流し式温泉における病原微生物汚染の実態調査

全国 13 府県掛け流し式温泉 200 施設で病原微生物汚染及び施設状況を調査した結果、浴槽及び湯口でのレジオネラ属菌検出率はそれぞれ 41%、24%で双方でのバイオフィーム対策が必要であった。貯湯槽泉温 55℃以上、pH6.0 特に 3.0 未満（酸性泉）、硫黄泉ではレジオネラ属菌検出率が低く、一方アルカリ性単純温泉、塩化物泉では高率に検出された。洗浄方法ではブラシ主体の洗浄の有効性が確認された。この 2 年間の調査では塩素

消毒を24%の施設で行っていたが、レジオネラ属菌に対する有効性は確認できなかった。

6. 浴槽水から分離された黄色ブドウ球菌および緑膿菌の薬剤耐性調査

病原微生物汚染実態調査で得られた黄色ブドウ球菌 83 株及び緑膿菌 45 株の薬剤耐性を検査し、1 株がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) と同定された。バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA)、多剤耐性緑膿菌に該当する菌株はなかった。

7. ATP ふき取り検査を指標とした浴槽の洗浄効果判定

レジオネラ属菌の検出率は ATP 値が 1,000 RLU を超えると急激に増加するため、洗浄前後の ATP ふき取り検査の清浄度基準値を、暫定的に 1,000 RLU と設定した。浴槽の ATP 値レベルは、洗浄前、洗浄後でそれぞれ 7,447 RLU、1,341 RLU であり、材質及び洗浄方法により除去率が異なった。ATP 値を指標として洗浄方法を最適化することは、浴用施設のレジオネラ属菌対策に有効と考えられた。

8. 微生物汚染に対する重要管理点の整理と対策事例収集

HACCP システムの概念を導入する前提として、源泉、配管、貯湯槽、湯口及び浴槽の各地点において温泉の性状、構造、管理など衛生管理の重要ポイントを特定し、その危害、対策を整理するとともに対策改善事例を収集した。

総合的な観点から掛け流し式温泉の衛生管理に資する有効な知見を得た。

分担研究者氏名・所属機関名・職名

遠藤卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部長
倉 文明	国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官
大谷勝実	山形県衛生研究所 副所長
黒木俊郎	神奈川県衛生研究所 微生物部 主任研究員
杉山寛治	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 主幹
烏谷竜哉	愛媛県立衛生環境研究所 衛生研究課 主任研究員
藏元 強	鹿児島県環境保健センター 微生物部長
縣 邦雄	アクアス株式会社 つくば総合研究所長
山崎和生	株式会社 西原衛生工業所 技術部付部長

A. 研究目的

循環式浴槽によるレジオネラ属菌集団感染の多発を契機に、レジオネラ属菌に対する規制や塩素消毒の徹底が図られてきた。一方、掛け流し式温泉ではその現状も不明な点も多く、また、泉質によっては塩素消毒が適用できない事もあり、安全性の確保に不確定な要素が残る。一般的には安全性が確保できる場合は塩素等無添加で利用することが望ましい。そこで、掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法を確立する事を目的として、平成 17 年度に引き

続いて掛け流し式温泉の構造設備や衛生管理状況の現状分析、微生物学的汚染に係る諸要因の検討ならびに実態調査等を実施した。特に平成 18 年度は浴槽の洗浄効果判定の迅速な指標に資するため簡易 ATP ふき取り検査を導入するとともに衛生管理手法の改善を目指して、HACCP システムに基づき重要管理点を選定し、その危害および対策を整理した。さらに対策、改善事例集を収集した。

B. 研究方法

1 「掛け流し式温泉」の定義

- (1) 浴槽に循環系の配管あるいは連通管等の配管を一切持たない構造。
- (2) 浴槽は一日の営業終了後に完全換水および清掃を行っている。

2 研究の方法

(1) 温泉における微生物汚染ポテンシャルの評価

全国 13 府県の温泉施設から 82 件の湯口水を採取し、同化性有機炭素 (AOC)、全有機炭素 (TOC)、アデノシン三リン酸 (ATP)、全細菌、レジオネラ属菌等について解析を行った。

(2) 貯湯槽のバイオフィーム生成量調査

モデル貯湯槽を用い、水温と水質を変化させた場合の水中及び付着微生物量を経時的に測定した。

(3) PCR-DGGE 法による細菌叢の解析

5 施設の掛け流し式温泉において、源泉、貯湯槽、湯口、浴槽の各ポイントで温泉水を採取し、PCR-DGGE 法 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) を用いた浮遊微生物叢の解析を行った。

(4) 紫外線殺菌装置の有効性評価

泉質の異なる 3 施設の温泉供給配管に流水式紫外線殺菌装置(岩崎電気株式会社)を設置し、湯口、浴槽等のレジオネラ属菌等の挙動を調査した。

(5) 微生物汚染及び衛生管理等の実態調査

全国 13 府県の掛け流し式温泉 93 施設を対象に施設設備、衛生管理及び微生物汚染の実態調査を実施した。施設状況については、地方衛生研究所あるいは保健所職員による現地確認を基本とした。浴槽、湯口、貯湯槽、源泉から 228 件の試料を採取し、レジオネラ属菌をはじめとする各種病原性細菌の汚染実態を調査した。なお、解析については平成 17 年度調査分も合わせ、200 施設、433 件のデータで行った。

(6) 浴槽水から分離された黄色ブドウ球菌および緑膿菌の薬剤耐性調査

病原微生物汚染実態調査で分離された黄色ブドウ球菌 83 株と緑膿菌 45 株について、薬剤耐性を調査した。

(7) ATP ふき取り検査を指標とした浴槽の洗浄効果判定

全国 10 府県、13 施設の掛け流し式温泉を対象に、清掃の各段階で浴槽内壁の ATP 値を測定し、一部の検体はレジオネラ属菌等の微生物検査を行った。

(8) 掛け流し式温泉施設の衛生管理

研究班の分担研究者および研究協力者から、衛生管理の重要ポイント及びレジオネラ対策事例を収集した。

(倫理面への配慮)

実態調査でレジオネラ属菌が検出された場合、守

秘の原則で施設責任者に対して通知し、自主的な改善を求め、継続的な指導を行う事により、研究対象者に対する不利益、危険性の排除に努めた。

C. 研究結果及び考察

I 温泉における微生物汚染ポテンシャルの評価

源泉に含まれる微生物が利用可能な有機炭素量 (AOC、TOC) は源泉ごとに異なると推測され、平成 17 年度の予備的な調査では源泉の AOC 濃度が高い施設にレジオネラ汚染が見られた。平成 18 年度は調査施設数を拡大し、さらにバイオマス指標として全細菌数、ATP 量を測定し、微生物汚染ポテンシャルとレジオネラ汚染との関係を解析した。酸性泉や一部の硫黄泉では明らかに測定阻害が認められたため、検水を pH6~7 に調整し 10 倍希釈液を用いて AOC 値 (Dilution-AOC) を算出し、評価した。

バイオマス量の指標となる全細菌と ATP との間には高い相関が認められ、ATP は全細菌の指標である事が明らかになった (図 1)。全細菌及び ATP 値は従属栄養細菌数 (HPC) との間には明瞭な相関は認められず、全細菌に占める HPC の割合は温泉毎に多様と考えられた。AOC と TOC との間に相関は見られなかったが、両有機炭素とも全細菌及び ATP と有意な相関を示し、温泉中に含まれる有機炭素量に応じて微生物が増殖する結果と考えられた (図 2)。有機炭素量とレジオネラ属菌検出には直接的な相関は見られないが、レジオネラ属菌検出は泉質によって大きく異なり、レジオネラ属菌が検出される場合はバイオマス量に応じてその菌数が増加した (図 3)。結論として、有機炭素量の多い泉質ではバイオマスが増加し、レジオネラ属菌はその増殖に好適な泉質や温度、pH などの性状の温泉ではバイオマスと相関して増殖すると考えられた (図 4)。ATP 量は現場で簡便・迅速に測定することが可能であり、湯口水の ATP を測定することで、レジオネラ属菌数の増加を未然に探知できる可能性を示した。

なお、酸性泉は中性~アルカリ性に比し有機炭素

量(AOC、TOC)とバイオマス量(全細菌、ATP 値)とも有意に高く、酸性泉はレジオネラ属菌の生息に適さないものの、酸性を好む微生物が増殖しやすい環境であると推察された。

II 貯湯槽のバイオフィーム生成量調査

貯湯槽のモデル水槽(ポリプロピレン製 10L 角型水槽)を用いて、水温と水質を変化させ、水中及びシリコンゴム板(図 5)付着の微生物類を経時的に測定した。汚染を受けた浴槽水(レジオネラ属菌 10 CFU/100ml 未満、HPC 等多数)使用時のレジオネラ属菌増殖経過を図 6 に示す。40°Cでは水中及びシリコン板ともに 2 日目から急激に増殖し、14 日では水中で 10⁵ CFU/100ml 検出された。一方、50°C以上では水中での濃度は低く、55°Cでは全く検出されなかったが、シリコン板上では 50°C、55°Cとも 100 CFU/ml 程度検出された。以上の結果から、水温が 45°C以下では水中及び付着性の微生物類が増殖しやすいが、50°C以上では微生物類の増殖程度が著しく低いことがわかった。このため、貯湯槽の水温を 50°C以上に維持する事は微生物類の増殖抑制に有効であると考えられた。ただし、50°C以上であってもバイオフィーム中にレジオネラ属菌は生息している可能性があり、定期的な洗浄消毒は必須と考えられた。

III PCR-DGGE 法による掛け流し式浴槽等環境中の細菌叢の解析

掛け流し式施設の浴槽内の細菌叢は配管系と異なり、独自に発達することが示唆されている。PCR-DGGE 法を用いて浴槽水の細菌叢を質的に捉えることを目的に詳細な解析を行い、管理への反映について考察した。配管前後でパターンを比較すると、配管汚染の反映と考えられる優占種の交代が認められ、汚染の存在を明らかにする方法として有効であった(図 7、レーン 1、2)。バンドパターンの比較

から、配管を通過する間に配管の汚染を受けて優占微生物種が変化する場合と、源泉の増殖ポテンシャルが高く貯湯槽から配管まで同じ微生物叢で占められる場合が認められた。一方、湯口と浴槽の DGGE パターンを比較すると、1 施設では湯口と浴槽水のバンドパターンに変化が認められなかったもの(レーン 3、4)、他の 3 施設では浴槽水において新たに強いバンドが出現しており(レーン 8、12、16)、浴槽中で細菌の相転移が確認された。前者は浴槽水の換水・洗浄が徹底されている施設と考えられ、後者は浴槽水に固有の DGGE パターンが出現していることから浴槽の清掃不備が指摘される。なお、施設間の比較では、湯口、浴槽水を問わずバンドに共通性が低く、それぞれの施設で固有の細菌叢が増殖しているものと考えられた。

浴槽に固有の細菌叢が発達することが確認された H 温泉に集中して、質的な検討を行なった(図 8)。湯口より上流の貯湯槽、配管では共通のパターンが得られたが(レーン 1、2、4、5、6、9、12)、浴槽の細菌叢は湯口とは異なっていた(レーン 3、7、8、10、11)。当該施設はレジオネラ属菌の発生に苦慮していたことから、物理洗浄と高濃度塩素による徹底的な浄化を行った。洗浄直後の浴槽では湯口と同じパターンが得られたが(レーン 14、15)、1 日経過後には最も強いバンドが回復し(レーン 16)、3 日経過後には洗浄前とほぼ同じパターンとなり(レーン 20)、レジオネラ属菌も検出された。この結果から、毎日の完全換水と浴槽の徹底洗浄が必須であることが改めて確認された。

DGGE 法並びにコロニー-PCR 法から得られた配列のアライメントを図 9 に示した。浴槽では *Tepidimonas* と *Sphingomonas* が高い割合で分離されるが、湯口からはほとんど分離されないなど、浴槽から分離される細菌叢は湯口より上流から分離されるグループと系統的に異なる傾向があると考えられた。また、DGGE 法で同定された細菌類には *Tepidimonas*、*Luteococcus*、*Pseudomonas*、*Mycobacterium*、*Staphylococcus* など病原種を含む属も含まれていた。多くは環境分離株の配列と一致していたが、ヒトとの関連性については今後とも注意していく

必要があると考えられる。

IV 紫外線殺菌装置の有効性評価

掛け流し式温泉の浴槽水中のレジオネラ属菌抑制対策として、紫外線殺菌装置の有効性を確認するため、3温泉施設の協力を得て供給湯配管に流水式紫外線殺菌装置を設置し、浴槽水のレジオネラ属菌等の挙動を調査した。湯温が50°C未満で貯留し、貯湯槽及び以降の系統でレジオネラ属菌が定着する可能性がある施設において、紫外線処理は湯口水（吐出湯）のレジオネラ属菌を不検出にすることができ、有効であることが確認された（表1）。

紫外線殺菌装置を設置する際の問題点としては、殺菌作用に塩素消毒のような残存効果がないため、殺菌後の配管や浴槽でのバイオフィルムの定着及びレジオネラ属菌の増殖が懸念される。装置はできるだけ湯口（吐出口）に近い場所に設置し、湯口までの配管を極力短くすること、及び、紫外線照射後の配管を容易に取替え可能な構造にするなどの配慮が必要である。また、浴槽の内壁にレジオネラ属菌が定着している場合は、湯口のレジオネラ属菌数が不検出であっても浴槽水から100 CFU/100ml以上のレジオネラ属菌が検出される場合がある。この対策として、浴槽を毎日徹底して清掃・消毒し、隙間や接続配管などにバイオフィルムを残存させない管理が必要であるが、清掃・消毒の効果を最大限に発揮するためには、浴槽壁の材質や構造にも配慮すべきである。微生物が浸透しないような材質を採用した上で、目地等に隙間を作らないように施工・管理し、できるだけ平滑な浴槽内壁とすることが重要である。また、温泉の泉質によっては、紫外線ランプの石英ジャケット管に汚れが付着し、紫外線の照射線量を低下させ、殺菌効果を低下させる場合があるので、こまめに（1週間に1度以上）清掃を行なう必要がある。

紫外線処理は、温泉の泉質を変化させることなく装置出口のレジオネラ属菌を陰性にするのが可能であるが、浴槽でのレジオネラ属菌不検出を保障す

るものではない。設置の際には、配管、浴槽の構造、洗浄方法等を含めたレジオネラ属菌汚染対策を総合的に検討するなかで、湯口水の陰性化を確実にするための一つの手段として考慮すべきである。

V 掛け流し式温泉における病原微生物汚染の実態調査—微生物汚染に影響を及ぼすリスク要因—

1 レジオネラ属菌等汚染のリスク因子について

本調査により、掛け流し式温泉では浴槽水の40.8%から10 CFU/100mlを超えるレジオネラ属菌が検出されるという汚染の実態が明らかとなった（表2）。検出された試料の64%は100 CFU/ml未満であり、菌数としては比較的低濃度の施設が多いが、汚染の事実を認識した上で施設の実情に合わせた対策を講じる必要がある。汚染場所としては、源泉から貯湯槽、配管を経て湯口に至る過程で検出率が8%から24%に上昇していることから、まずは配管及び貯湯槽での汚染対策を講じることで清浄な原湯の供給を確保し、その上で浴槽の汚染対策を施すことが重要である。

汚染のリスク因子としては、本研究によって初めて泉質の影響が明らかとなった（表3）。アルカリ性単純温泉では最も汚染のリスクが高く、塩化物泉においてもリスクが増加する一方、硫黄泉ではリスクが低下する可能性が示唆された（表4、図10）。これらのハイリスク群では、貯湯槽や配管の洗浄頻度を多くすることでバイオフィルムの蓄積を防ぐ等の一層の注意が必要と考えられる。

pH及び温度の影響については、従来から指摘されている通りpH6未満及び50°C以上では検出率が低下し、pH3未満の酸性泉及び55°C以上ではほとんど検出されないという結果が得られた（表5、図11）。温度については、レジオネラ属菌の増殖に関与するアメーバが50°C以上では全く検出されないことから、55°C以上の維持は対策として非常に有効な手段と考えられた（表6、図12）。温泉のpHを施設側でコントロールすることはできないが、温度は貯湯槽などの貯留施設自体を加温することで汚

染を防ぐ指標として活用することが可能であり、汚染のリスクが高い泉質などでは充分考慮する必要があると考えられる。

また、浴槽の汚染においては、洗浄方法が重要なリスク因子であることが明らかとなった（表 7、図 13）。ブラシ主体で洗浄すればリスクは低下し、ブラシを使用しない高圧や消毒ではリスクが高くなるという結果が得られた。浴槽でレジオネラ属菌が検出される場合の 58%が湯口陰性・浴槽陽性であり、浴槽内での汚染が高率であることが明らかとなっているが（図 14）、循環配管や温度センサー等がない掛け流し式の浴槽では、浴槽内壁自体がバイオフィーム提供の場となっている場合が少なくないと考えられる。入浴客が自然の景観を意識した石造りの浴槽を好むこともあり、洗浄効率を考慮しない設計がなされることが多く、結果的に洗浄効果の劣る高圧洗浄に頼ることが推察される。できるだけブラシを使用した洗浄と洗浄後の高濃度塩素噴霧を心がけるとともに、毎日のブラシ掛けが困難な場合においても、ブラシを使用した定期的（隔日等）な徹底洗浄を励行することが重要と考える。

本調査においては浴槽水の消毒を実施している施設が 26%にとどまり、0.2mg/L 以上の遊離残留塩素が検出された試料も全体の 8%に満たなかったことから、塩素消毒の効果を論じるにはデータが不足しているが、1mg/L 未満の濃度では 22%（6/27）の試料からレジオネラ属菌が検出されており、消毒の有意な効果は確認できなかった（表 8、図 15）。消毒効果を得るためには、泉質に応じた適切な濃度を維持して接触時間を充分にとることが重要であるが、掛け流し式では循環式に比較して消毒効果が得られにくいことを認識すべきである。また、浴槽水の消毒を行う場合であっても、管理の基本は施設・設備の徹底洗浄であること指摘したい。

2 ヒト由来微生物汚染のリスク因子について

大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌については大部分がヒト由来であるため、特殊な場合を除きほとんどが浴槽水からの検出であった（表 2）。緑膿菌については WHO ガイドラインに示された管理基準値 10/100 ml 未満を超える菌数が 15.8%の浴槽から、

また、黄色ブドウ球菌については WHO に示された目標値 30/100ml 未満を超える菌数が 6.4%から検出された。いずれも直ちに重篤な健康被害に結びつくものではないが、大腸菌は入浴者による糞便汚染を示し、また、緑膿菌や黄色ブドウ球菌は毛嚢炎等の化膿性皮膚疾患を引き起こす可能性があるため、消毒剤の添加を行わない掛け流し式温泉においては注意を払わなければならない病原体と考えられた。

これらのヒト由来病原体は浴槽内での汚染が問題となるため、温度による制御は困難であるが、レジオネラ属菌と同様に pH 6.0 未満ではリスクが低下すると考えられた（表 5、図 11）。泉質としては塩化物/炭酸水素塩泉で検出率が高くなる傾向がみられたが、有意ではなかった（表 4、図 10）。浴槽内での汚染の動向をみると、いずれの病原体も入浴者数が多いほど、また、採取時刻が遅いほど検出率が明らかに高くなることがわかった（図 16、図 17）。採取時刻の影響は入浴者数の増加と同義と考えられることから、浴槽水の消毒を行わない施設においては、当然のことながら入浴者数が増えるほど汚染のリスクが増加することを充分理解し、入浴者への衛生教育を含めた対策を講じる必要があると考えられた。

VI 浴槽水から分離された黄色ブドウ球菌および緑膿菌の薬剤耐性調査

掛け流し式温泉の病原微生物汚染実態調査で、浴槽水等から分離された黄色ブドウ球菌および緑膿菌の薬剤耐性を検査し、感染症法の届出疾患（5 類）の原因菌とされるバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（VRSA）、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、多剤耐性緑膿菌の浴槽水への汚染の有無を調査した。

9 地方衛生研究所が 34 ヶ所の浴槽水や湯口水から分離した黄色ブドウ球菌 83 株のうち、1 株がオキサシリンに対する MIC が $>256 \mu\text{g/ml}$ （E テスト）と高度耐性を示し、PCR 法で *mecA* 遺伝子の保有が確認され、MRSA と同定された。VRSA に該当す

る菌株はなかった。

7 地方衛生研究所が 16 ヶ所の浴槽水や湯口水から分離した緑膿菌 45 株に、多剤耐性緑膿菌に該当する菌株はなかった。

今回の掛け流し式浴槽水の調査において、MRSA は、黄色ブドウ球菌が分離された浴槽水や湯口水の 2.9% (1/34) にみられた。浴槽水からの MRSA の分離は、ヒトの保菌を反映したものと思われるが、黄色ブドウ球菌がバイオフィームを形成しやすい菌であることから浴槽等の環境に定着している可能性もあり、今後、浴槽水を感染源とする MRSA 感染症の発生に注意を払う必要がある。

VII ATP 拭き取り検査による浴槽の洗浄効果判定

浴槽からレジオネラ属菌が検出された掛け流し式温泉施設において、ATP 拭き取り検査が入浴施設のバイオフィームのモニタリングに活用可能か、また、洗浄方法の最適化の指標となり得るかについて、実際の入浴施設で評価を行った。全試料の ATP 値は幾何平均値で洗浄前 7,447 RLU が洗浄後は 1,341 RLU と 82.0%低下し、消毒後ではさらに 44 RLU と最終的に 99.4%の低下を認めた (表 9)。洗浄方法別で比較すると図 18 に示すように ATP 値は洗浄前 7,447 RLU からブラシのみで 946 RLU と低下するが、高圧洗浄では 11,962 RLU と効果が認められず、実態調査の成績を裏付ける結果が得られた。一部、ATP 拭き取り検査と共に従属栄養細菌(HPC)及びレジオネラ属菌検査を実施した。ATP 値と HPC とには正の相関が認められ、1,000 RLU 以上で特に相関が高い傾向を示した (図 19)。レジオネラ属菌が陽性となる比率は、ATP 値 1,000 RLU 未満で 27.6%に対し 1,000 RLU 以上では 65.0%と高く、オッズ比は 4.9 であった (表 10)。ATP 値の累積相対度数分布を図 20 に示すが、レジオネラ属菌陰性検体の 70%は ATP 値 1,000 RLU 未満に分布するのに対し、陽性検体は 20%程度にとどまり、1,000 RLU を超えると急激に増加した。洗浄方法別拭き取り検査の累積相対度数分布を図 21 に示すが、洗

浄前と高圧洗浄は同程度の分布を示し、洗浄効果は認められない。一方、ブラシ洗浄を行った場合は 1 log (1/10) 低下し、塩素消毒を行うとさらに 2 log (1/100) 低下した。以上の結果から ATP 値 1,000 RLU を浴槽洗浄後の清浄度基準値と暫定的に設定した。この基準値でみると、洗浄前の試料の約 85% が基準値を超え、ブラシ洗浄後 50~60%に減少し、消毒後では 7~8%にとどまった。

ATP 拭き取り検査の導入による効果としては、①汚染程度の数値化、②現場での迅速、簡便検査、③汚染場所の特定、④洗浄効果判定の指標等、問題点及び課題としては①サンプリングなどで時に再現性の問題、②評価基準が未定(当研究班で設定)③阻害物質の影響の可能性等が指摘される。若干の問題点があるが、掛け流し式温泉の浴槽の衛生管理に ATP 拭き取り検査の積極的導入を評価する意見が大勢を占めた。今後、保健所の監視業務の指導材料及び現場従業員への習慣的作業の判断指標や衛生教育のツールとして、広く活用される事を期待する。

VIII 掛け流し式温泉施設の衛生管理

掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌の発生を予防するために、HACCP の導入の検討を行い、更に導入の前提である衛生管理の充実のために、管理上の重要ポイントを選定、整理した。HACCP システムは、一般的衛生管理が確実に行われた上で、その有効性が発揮される。そこで、衛生管理上の重要ポイントを選定して、それぞれの性状を分析し、具体的な対策を掲げる事で、現場での管理に役立つ情報の提供を試みた。自然界に広く分布するレジオネラ属菌の増殖を抑制するための衛生管理を行うには、温泉設備のあらゆる地点を対象としなければならない。そこで、研究班の分担研究者及び協力研究者が一体となって情報の提供を行い、各設備における重要ポイントを挙げ、それぞれにおけるレジオネラ属菌等の微生物の増殖の可能性や対策を検討した (表 11、例示)。更に、分担研究者及び協力研究者から、浴槽のレジオネラ対策で経験した種々の事例につい

て情報を収集し、対策事例集としてまとめた(表 12、例示)。この検討結果が実際の温泉施設の衛生管理に役立つ事を期待したい。

D. 結論

全ての検討課題の結果から演繹される掛け流し式温泉のリスク要因をピックアップし表 13 に示した。pH と泉温は大変重要な性状で、pH6 以上がハイリスク、pH3 未満がローリスクであり、温度は 50℃ 未満がハイリスク、55℃以上はローリスクと考えられる。泉質によっても影響を受け、アルカリ性単純温泉、塩化物炭酸水素塩泉、塩化物泉はハイリスクで、微生物増殖ポテンシャルやスケールのでき易さ、除きにくさ等が関与しているものと思われる。このような泉質では洗浄に先立ち塩酸等を用いて、スケールの除去が必要である。硫黄泉あるいは酸性泉(pH3 未満) はローリスクである。表 12 の対策事例からも理解されるように、貯湯槽は構造上のバイオフィーム定着のチェックポイントである。浴槽の材質では平滑でない石、くぼみや目地、破損部位が

あると水の滞留や洗浄不良を招くため、バイオフィーム定着増殖の好発部位となり、逆に平滑なコンクリートはローリスクの傾向にある。洗浄では高圧洗浄では洗浄効果が認めにくく、ブラシでの徹底洗浄と洗浄後の高濃度塩素噴霧による殺菌が有効である。また、掛け流し式温泉の定義に立ち返って、浴槽の循環系の配管は可能な限り取り去り、毎日完全換水と清掃に務めることが肝要である。これらの条件を考慮し施設状況に応じた洗浄、消毒、検査頻度等を確立する事が重要である。

以上、総合的な観点から掛け流し式温泉の衛生管理に資する有効な知見を得た。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

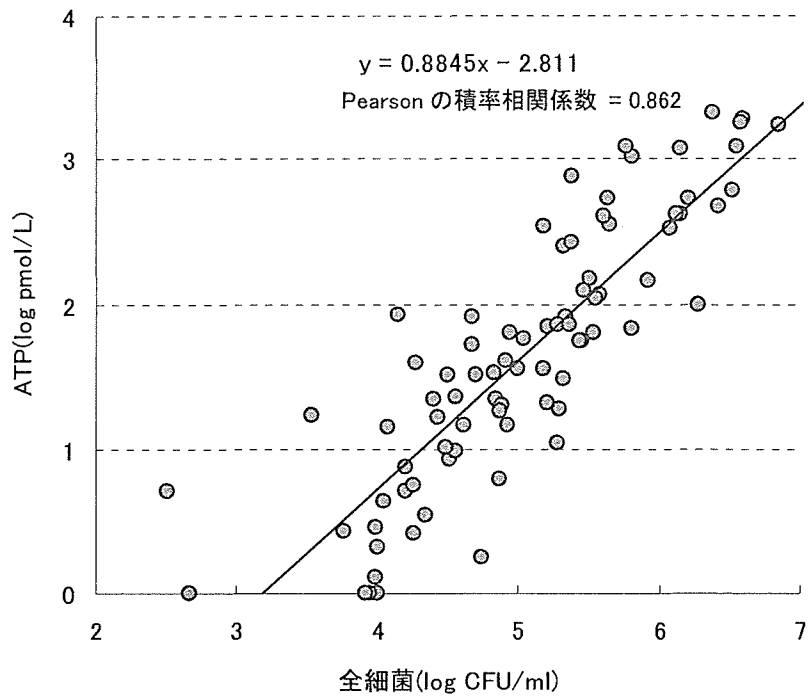


図1 全細菌とATPとの相関

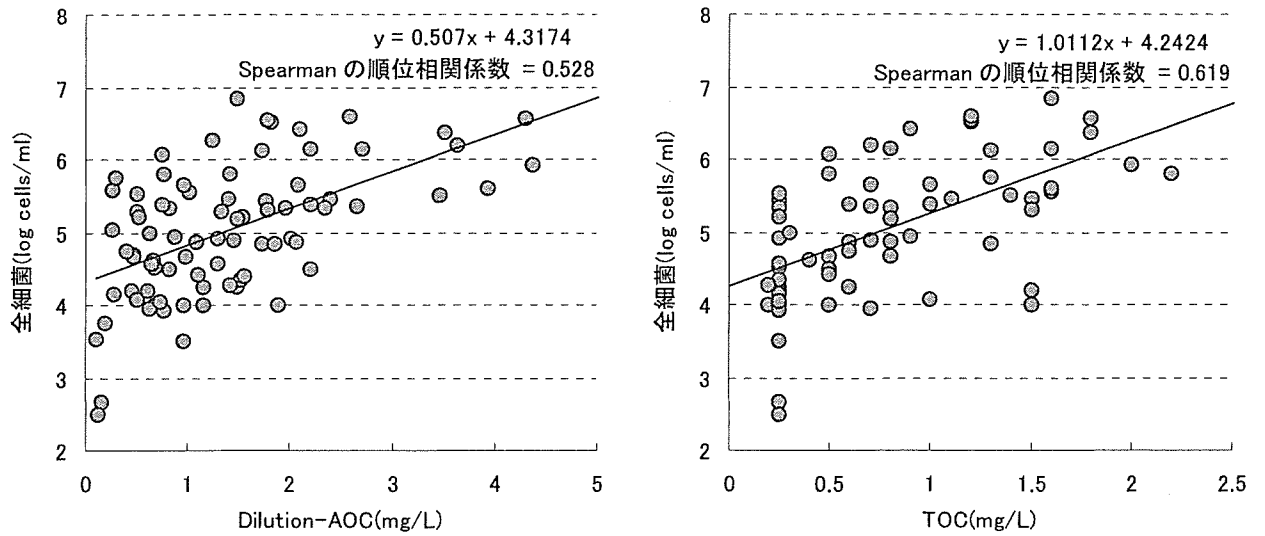


図2 有機炭素量と全細菌との相関

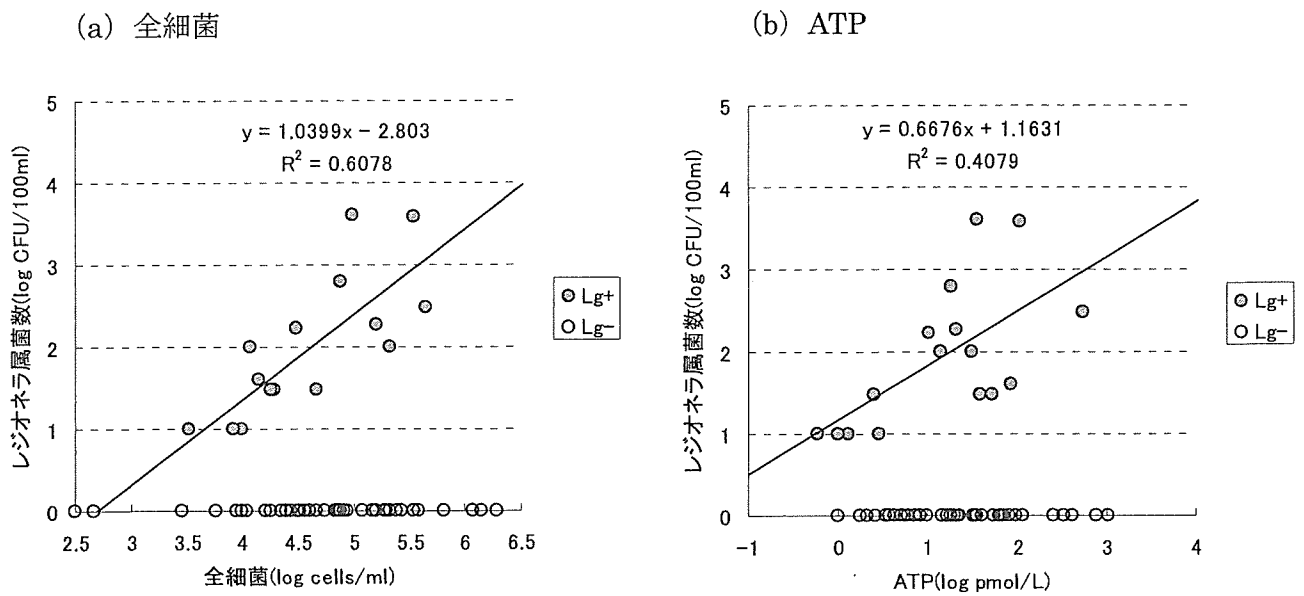


図3 バイオマス量とレジオネラ属菌数

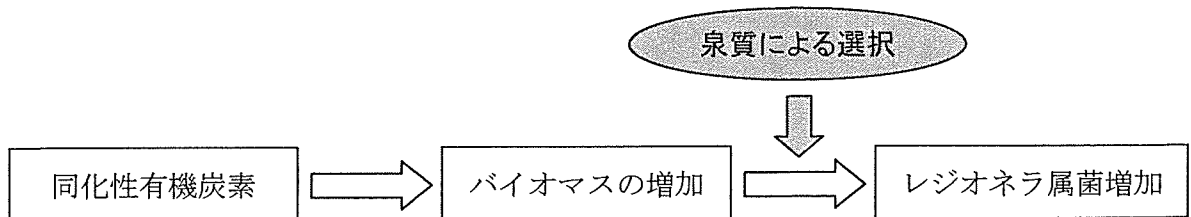


図4 レジオネラ属菌の増加要因

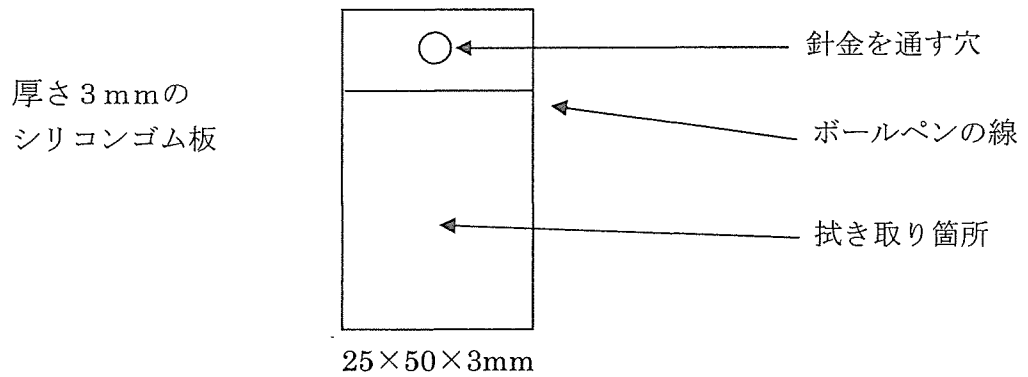


図 5 原泉貯槽のバイオフィルム調査 (シリコンゴム板)

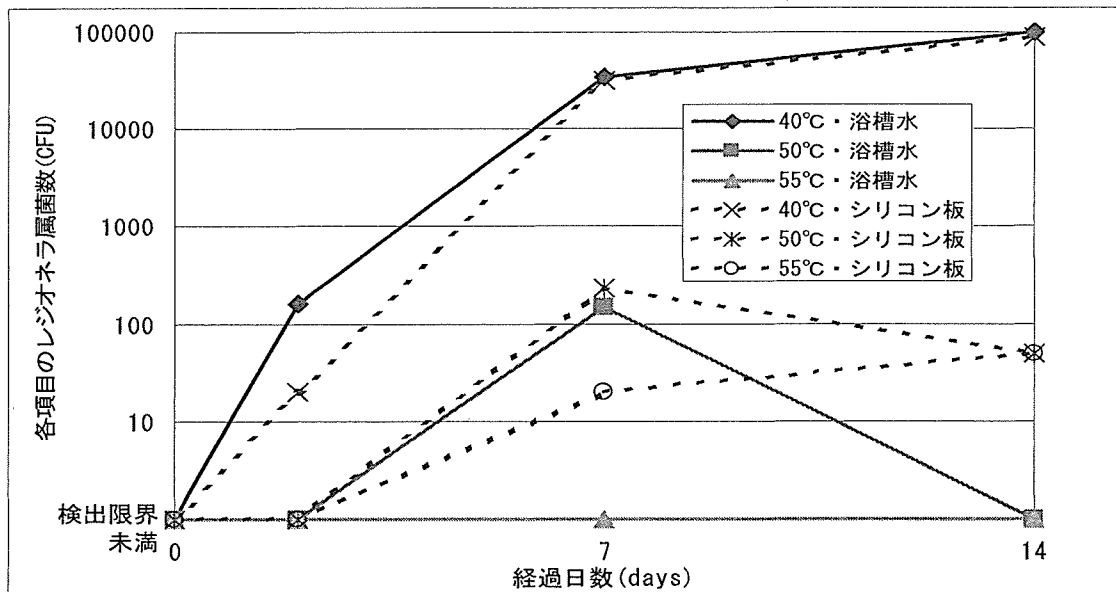
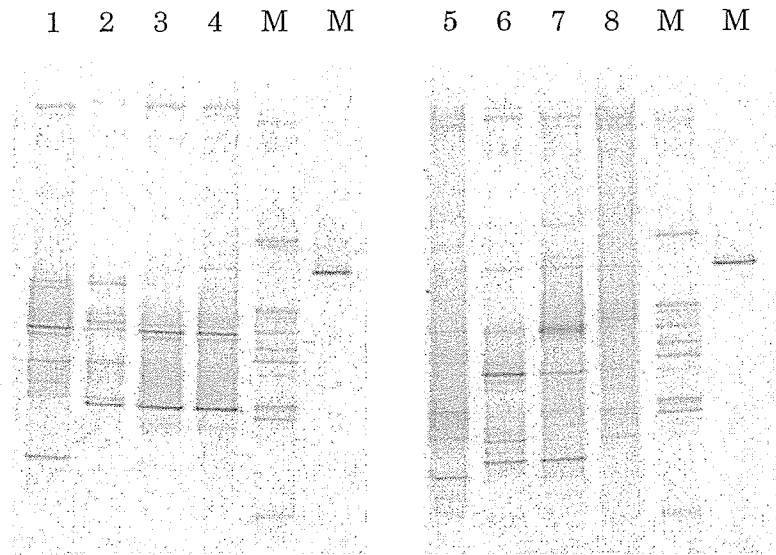


図 6 汚染を受けた浴槽水使用時の水及びシリコン板付着物のレジオネラ属菌数 (浴槽水は 100mL 当たり、シリコン板は試験液 1mL 当たりとする)

A) Y 温泉、I 温泉



B) M 温泉、K 温泉

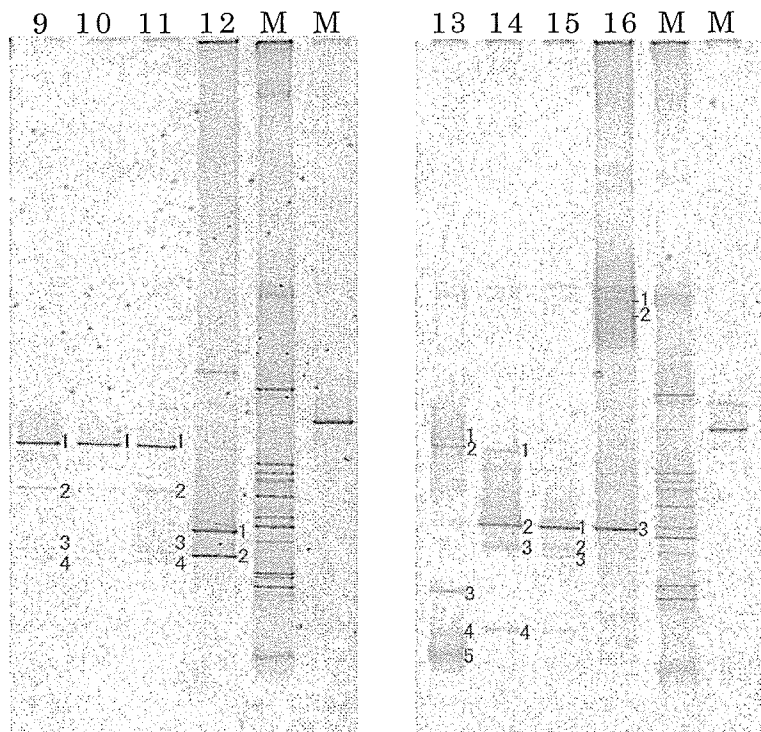
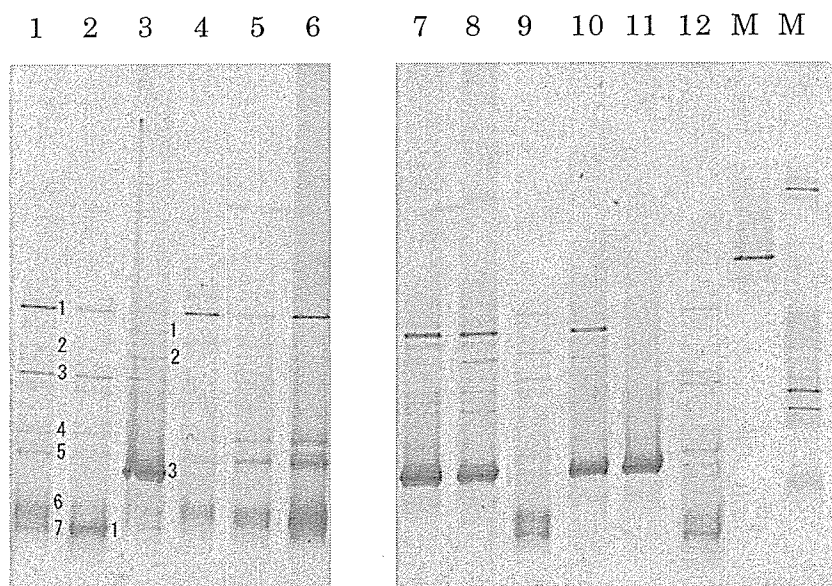


図7 4つの温泉における浴槽水の DGGE パターン

- A) レーン 1: Y 温泉貯湯槽 2005 年、2: 同湯口 2005、3: 湯口 2006、4: 浴槽水 2006、M: マーカー、
 レーン 5: I 温泉貯湯槽 2005 年、6: 湯口 2005、7: 湯口 2006、8: 浴槽水 2006
- B) レーン 9: M 温泉源泉 (数字は塩基配列を決定したバンド、配列の名称は eh11~eh14 に対応する)、
 10: 貯湯槽 (eh21)、11: 湯口 (eh3n、n は 1~4 の数字)、12: 浴槽水 (eh4n)、M: マーカー、
 レーン 13: K 温泉源泉 (ka1n)、14: 貯湯槽 (ka2n)、15: 湯口 (ka3n)、16: 浴槽水 (ka4n)、
 M: マーカー。

A) H 温泉



B) H 温泉洗浄前後

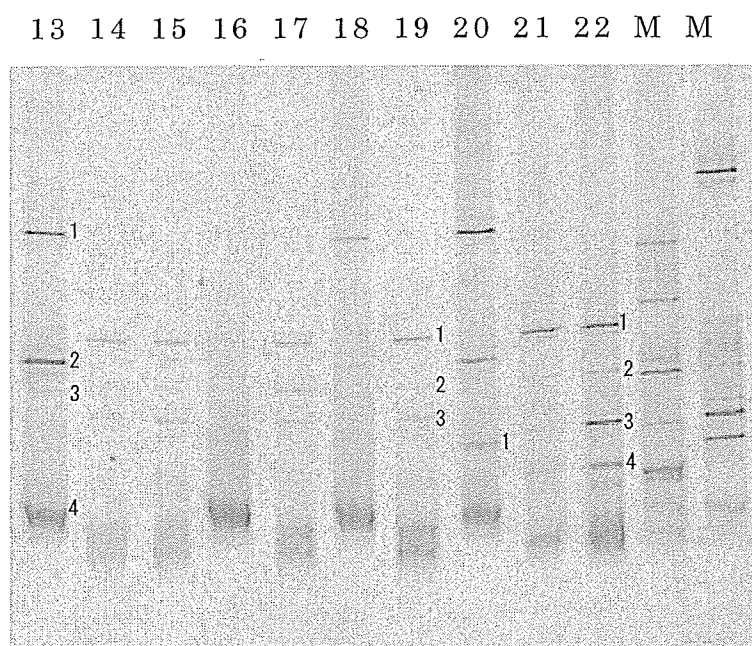
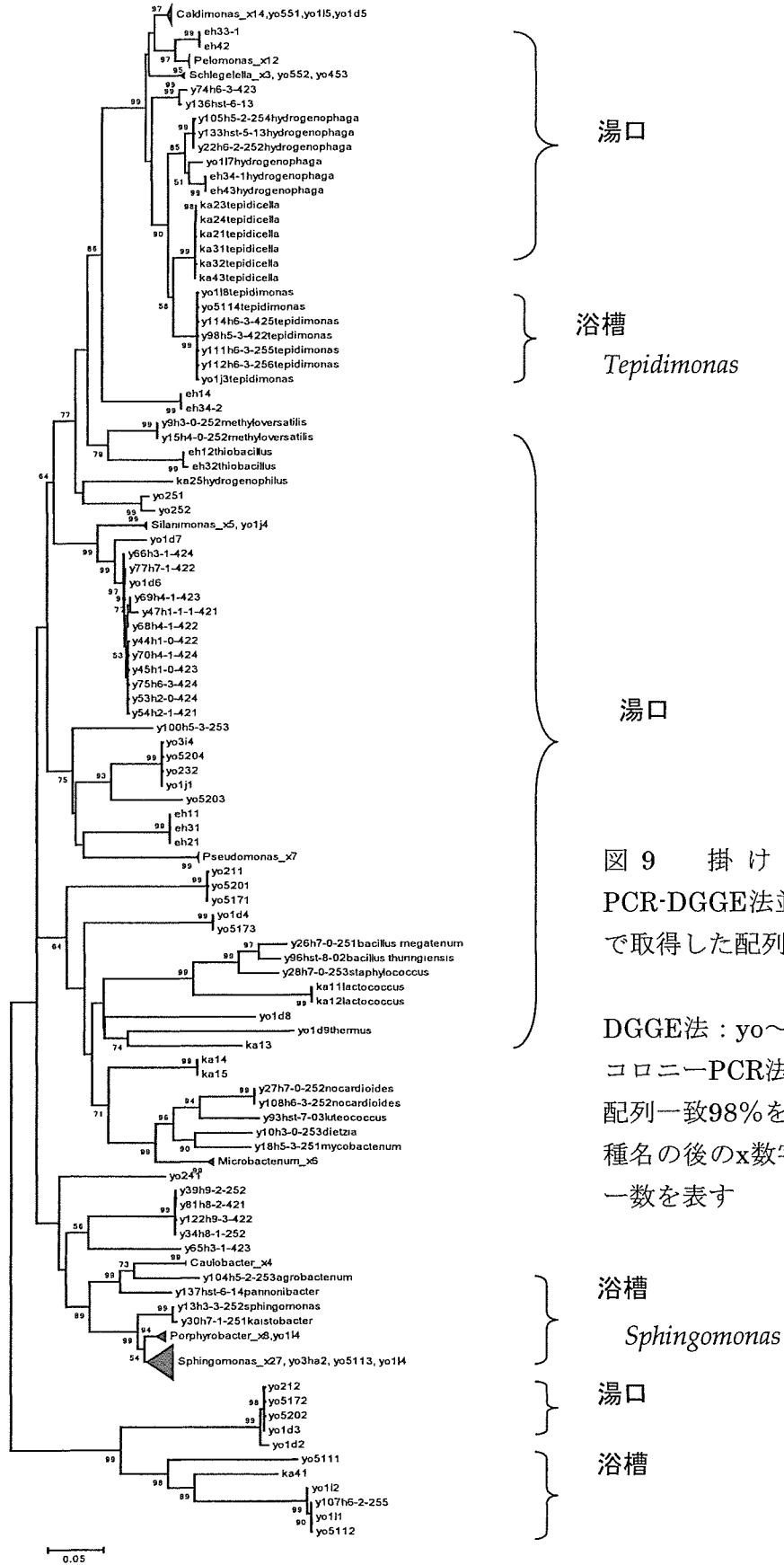


図 8 H 温泉の DGGE パターン

- C) レーン 1: 貯湯槽底 (バンド横の数値は塩基配列を決定したバンドで、図 3、4 の配列 yo3ix、x は 1~4 の数字、と対応する)、2: 湯口、3: 露天浴槽 (yo3hax)、4: 貯湯沈殿、レーン 5: 配管内壁、6: 配管内壁、7: 露天浴槽、8: 内湯浴槽、9: 湯口、10: 内湯浴槽、11: 露天浴槽、12: 湯口、M: マーカー
- D) 13: 洗浄前浴槽 (yo511x)、14: 洗浄直後浴槽、15: 湯口、16: 1 日後浴槽、17: 湯口、18: 2 日後浴槽、19: 湯口 (yo517x)、20: 3 日後浴槽 (yo5181)、21: 貯湯槽、22: 水位計 (yo520x)、M: マーカー。



湯口

浴槽

Tepidimonas

湯口

図9 掛け流し式浴槽よりPCR-DGGE法並びにコロニーPCR法で取得した配列で構築した系統樹

DGGE法 : yo~

コロニーPCR法 : y~

配列一致98%を基準に種名を併記

種名の後のx数字は取得配列のコロニー数を表す

浴槽

Sphingomonas

湯口

浴槽

表1 紫外線殺菌装置の有効性評価（貯湯槽水温 47℃）

検査項目		レジオネラ属菌数 CFU/100ml	一般細菌数 CFU/ml(37℃)	従属栄養細菌数 CFU/ml(42℃)
UV入口	10時	4.2×10^2	1.5×10	3.1×10
	13時	1.1×10^3	4	7.1×10^3
	17時	7.0×10	<1	3.2×10^3
UV出口	10時	<10	<1	1.1×10^2
	13時	1.0×10	4.5×10	2.9×10^2
	17時	2.0×10	1.1×10	7.4×10^2
UV吐出湯	10時	<10	<1	1.6×10^4
	13時	<10	7.0×10^2	9.6×10^3
	17時	<10	2.0×10^2	2.1×10^3
UV浴槽水	10時	1.1×10^2	4.4×10^3	5.4×10^4
	13時	2.2×10^2	1.9×10^5	2.9×10^6
	17時	4.4×10^2	3.7×10^5	1.8×10^6
対照吐出湯	10時	1.1×10^2	1	7.0×10^3
	13時	2.2×10^2	<1	8.0×10^3
	17時	1.9×10^2	<1	1.8×10^4
対照浴槽水	10時	4.4×10^2	1.8×10	1.2×10^3
	13時	3.8×10^2	7.8×10^2	1.2×10^4
	17時	1.8×10^3	1.2×10^6	2.6×10^6
源泉	17時	<10	8.0×10	5.0×10
貯湯槽水	17時	6.7×10^2	1.0×10	7.1×10^5

表2 調査地点別 病原微生物等検出状況 (1)

検査項目	種別	検査数	検出数(%) ¹⁾	平均±SD	最大	濃度階級別検出件数			
レジオネラ属菌				(CFU/100ml)		10 ⁻	10 ²⁻	10 ³⁻	
	浴槽	206	84 (40.8) ^a	463 ± 1,181	6,800	54	21	9	
	湯口	164	39 (23.8) ^b	185 ± 640	4,000	28	10	1	
	貯湯槽	26	6 (23.1)	220 ± 254	670	3	3		
	源泉	37	3 (8.1)	77 ± 90	180	2	1		
	計	433	132 (30.5)	361 ± 1,012	6,800	87	35	10	
アメーバ				(PFU/100ml)		<10	10 ⁻	10 ²⁻	10 ³⁻
	浴槽	196	57 (29.1) ^a	282 ± 583	2,500	18	17	16	6
	湯口	151	7 (4.6) ^b	30 ± 35	100	3	3	1	
	貯湯槽	26	5 (19.2)	77 ± 126	300	2	2	1	
	源泉	34	1 (2.9)	5	5	1			
	計	407	70 (17.2)	238 ± 534	2,500	24	22	18	6
抗酸菌				(CFU/100ml)		10 ⁻	10 ²⁻	10 ³⁻	
	浴槽	195	9 (4.6)	26 ± 30	100	8	1		
	湯口	146							
	貯湯槽	25	1 (4.0)	10	10	1			
	源泉	35							
	計	401	10 (2.5)	26 ± 32	100	9		1	
大腸菌				(MPN/100ml)		<10	10 ⁻	10 ²⁻	10 ³⁻
	浴槽	206	80 (38.8) ^a	204 ± 390	2,400	22	31	20	7
	湯口	137	6 (4.4) ^b	36 ± 58	150	4	1	1	
	貯湯槽	22	2 (9.1)	42 ± 47	75	1	1		
	源泉	31							
	計	396	88 (22.2)	189 ± 375	2,400	27	33	21	7
大腸菌群				(MPN/100ml)		<10	10 ⁻	10 ²⁻	10 ³⁻
	浴槽	204	96 (47.1) ^a	594 ± 2,497	24,000	14	36	30	16
	湯口	137	10 (7.3) ^b	74 ± 143	460	5	3	2	
	貯湯槽	22	3 (13.6)	521 ± 551	1,100	1		1	1
	源泉	31	1 (3.2)	460	460	1			
	計	394	110 (27.9)	544 ± 2,338	24,000	20	39	34	17
緑膿菌				(MPN/100ml)		<10	10 ⁻	10 ²⁻	10 ³⁻
	浴槽	203	60 (29.6) ^a	229 ± 510	2,400	28	17	8	7
	湯口	134	5 (3.7) ^b	33 ± 66	150	4	1		
	貯湯槽	22	1 (4.5)	1,400	1,400	1			
	源泉	30	1 (3.3)	240	240	1			
	計	389	67 (17.2)	232 ± 507	2,400	32	17	10	8
黄色ブドウ球菌				(MPN/100ml)		<10	10 ⁻	10 ²⁻	10 ³⁻
	浴槽	203	60 (29.6) ^a	150 ± 387	2,400	27	20	9	4
	湯口	134	3 (2.2) ^b	3 ± 1	4	3			
	貯湯槽	22							
	源泉	30							
	計	389	63 (16.2)	143 ± 379	2,400	30	20	9	4

1) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Fisher exact test、 $P < 0.001$)

表3 レジオネラ属菌の検出に影響を及ぼす要因と調整したオッズ比
(多重ロジスティック回帰)

(a) 全試料及び湯口上流のリスク因子

項目	全試料(n=433)		湯口上流(n=227)	
	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値
温度 ≥55.0(°C)	0.08 (0.01-0.62)	0.015 *	0.13 (0.02-1.01)	0.051
泉質				
酸性泉	0.08 (0.02-0.28)	0.000 ***	0.07 (0.01-0.58)	0.014 *
塩化物/炭酸水素塩泉	1.81 (0.80-4.08)	0.154	0.99 (0.27-3.56)	0.984
アルカリ性単純温泉	2.72 (1.32-5.64)	0.007 **	2.19 (0.78-6.20)	0.140
塩化物泉	1.91 (0.95-3.85)	0.070	1.38 (0.50-3.82)	0.530
硫酸塩泉	1.03 (0.45-2.35)	0.952	0.57 (0.13-2.46)	0.448
単純温泉	1.00 —	—	1.00 —	—
硫黄泉	0.62 (0.26-1.79)	0.278	0.57 (0.13-2.45)	0.448
構造				
貯湯槽あり	1.09 (0.66-1.79)	0.738	1.48 (0.68-3.22)	0.325

(b) 浴槽でのリスク因子

項目	浴槽水(n=206)	
	OR (95% CI)	P値
泉質		
酸性泉	0.13 (0.02-0.69)	0.017 *
塩化物/炭酸水素塩泉	1.79 (0.53-6.06)	0.350
アルカリ性単純温泉	4.73 (1.42-15.78)	0.012 *
塩化物泉	2.64 (0.87-8.04)	0.087
硫酸塩泉	1.27 (0.42-3.84)	0.671
単純温泉	1.00 —	—
硫黄泉	0.60 (0.18-2.03)	0.407
浴槽の材質		
タイル	0.61 (0.23-1.59)	0.310
石	1.20 (0.48-3.00)	0.695
木	0.32 (0.08-1.22)	0.096
コンクリート	0.75 (0.16-3.59)	0.723
浴槽の洗浄方法		
ブラシなし	2.81 (0.83-9.59)	0.098
ブラシ+消毒	1.30 (0.49-3.47)	0.597
ブラシ+洗剤	1.00 —	—
ブラシ主体	0.39 (0.15-0.99)	0.049 *

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$