

#### A. 目的

掛け流し式温泉の病原微生物汚染実態調査で、レジオネラ属菌などと並んで、環境への定着性や生残性が高いといわれる黄色ブドウ球菌や緑膿菌などが浴槽水等から分離された。

それらの分離株の中に、感染症法の届出疾患（5 類）の原因菌とされ、抗生物質による治療が困難な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）、多剤耐性緑膿菌が存在するかどうか検査して、浴槽水を感染源とする多剤耐性菌の感染の可能性を調べた。

#### B. 調査方法

H.17、18 年度に実施された掛け流し式温泉の病原微生物汚染実態調査で、10 地方衛生研究所が浴槽水や湯口水から分離した黄色ブドウ球菌 83 株と緑膿菌 45 株について、次の方法で薬剤耐性試験を実施した。

VRSA 検査：バンコマイシン 30  $\mu$ g 含有のセンシ・ディスクを用い、寒天平板拡散法で被検菌の感応度を求め判定した。（VRSA の判断基準：バンコマイシンの MIC 値 32  $\mu$ g/ml 以上）

MRSA 検査：クロモアガーMRSA（スクリーニング培地）に被検菌を画線培養し、コロニー形成の有無を調べた。コロニー形成株については、Eテストでオキサシリンに対する MIC 値を求め、PCR 法で *mecA* 遺伝子保有を確認した。（MRSA の判断基準：オキサシリンの MIC 値 4  $\mu$ g/ml 以上）

多剤耐性緑膿菌：微量液体希釈法で、被検菌のイミペネム、アミカシン、レボフロキサシン等に対する MIC を測定した。（多剤耐性緑膿菌の判断基準：イミペネムの MIC 値 16  $\mu$ g/ml 以上、アミカシンの MIC 値 32  $\mu$ g/ml

以上、レボフロキサシンの MIC 値 4  $\mu$ g/ml 以上の全てを満たすもの）

#### C. 結果および考察

掛け流し式温泉の病原微生物汚染実態調査で、9 地方衛生研究所が 34 カ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、MRSA に該当する株は 1 株であった。本菌株はオキサシリンに対する MIC が > 256  $\mu$ 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（図 1）、MRSA と同定された。

同黄色ブドウ球菌 83 分離株に、VRSA に該当する菌株はなかった（図 2 左）。

7 地方衛生研究所が 16 カ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（図 2 右）。

#### C. 結論

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ル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 感染症の発生にも注意を払う必要がある。

#### D. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

なし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

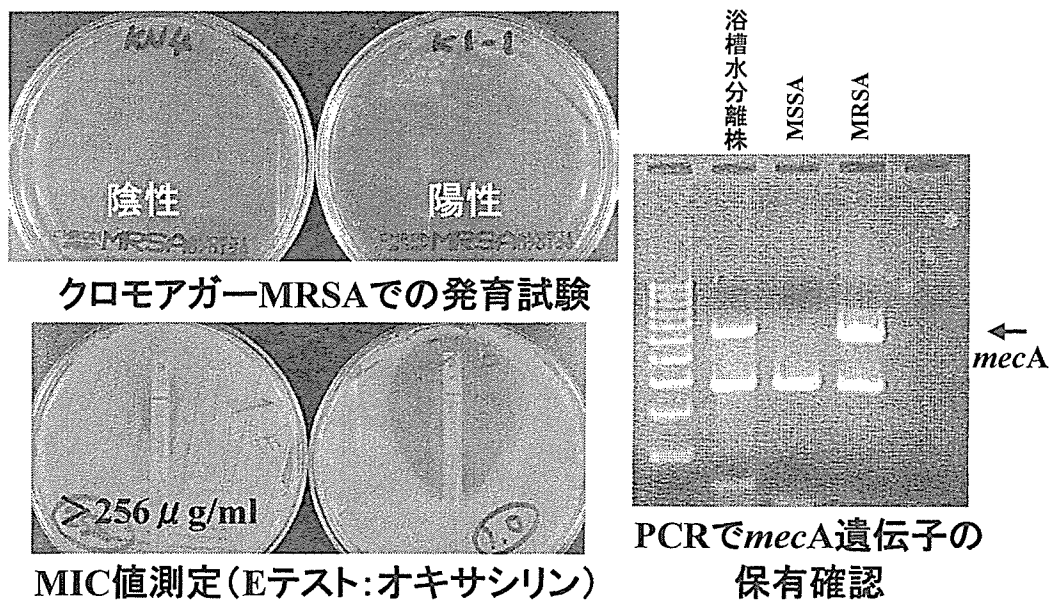


図1 MRSA検査

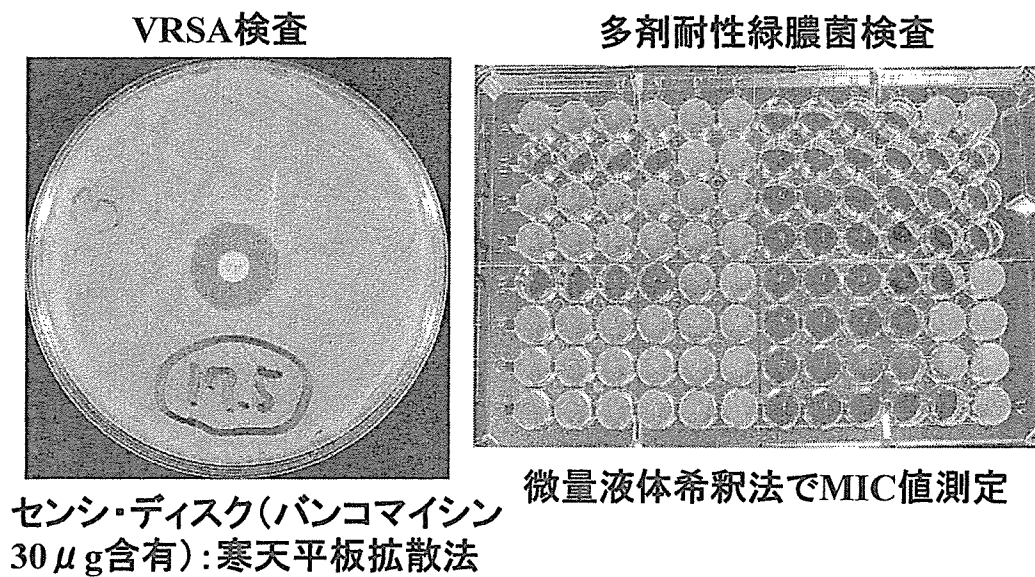


図2 VRSA検査と多剤耐性緑膿菌検査

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  
主任研究者 井上 博雄 愛媛県立衛生環境研究所

分担研究報告書

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

分担研究者

烏谷 竜哉 愛媛県立衛生環境研究所  
遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部  
大谷 勝実 山形県衛生研究所  
黒木 俊郎 神奈川県衛生研究所  
杉山 寛治 静岡県環境衛生科学研究所  
藏元 強 鹿児島県環境保健センター

研究協力者

佐々木美江 宮城県保健環境センター  
山口 誠一 山形県村山保健所  
藤田 雅弘 群馬県衛生環境研究所  
田口 寛 京都府保健環境センター  
中嶋 洋 岡山県環境保健センター  
吉田 紀美 愛媛県立衛生環境研究所  
村上 光一 福岡県保健環境研究所  
田栗 利紹 長崎県衛生公害研究所  
久保園祥子 鹿児島県環境保健センター

研究要旨

浴槽でのバイオフィーム定着を防ぐ管理手法が確立されれば、掛け流し式温泉におけるレジオネラ汚染の約 6 割は解決する。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 ふ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。その結果、ATP 値が 1,000RLU 以上でレジオネラ属菌の検出率は有意に増加し、浴槽の清浄度基準値として 1,000 RLU を一つの目安とすることが妥当と考えられた。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ることがわかった。本法は、簡便な操作によって、現場で即汚染レベルが数値化できることから、ATP 値を指標として洗浄方法を最適化することが、浴用施設のレジオネラ属菌汚染対策に有効であると考えられた。

A. 研究目的

本研究班における病原微生物汚染実態調査の結果から、掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌の汚染場所としては、源泉から湯口に至る貯湯槽・配管系以上に、浴槽が大きな比重を占めていることが明らかとなった。浴槽でレジオネラ属菌が検出された施設の約 6 割が湯口陰性、浴槽陽性であり、浴槽でのバイオフィーム定着を防ぐ管理手法が確立され

ば、掛け流し式温泉におけるレジオネラ汚染の約 6 割は解決することになる。浴槽での汚染を防止するには、浴槽を繋ぐ連通管や温度測定用の配管等、物理的な洗浄が困難な構造物を一扫することが第一に考えられるであろう。しかし、前述の実態調査により、温泉の泉質、浴槽の材質及び洗浄方法によってレジオネラ属菌の検出率に有意な差が出ることが明らかとなり、浴槽壁自体がレジオネラ属菌定着の場

を提供している可能性が示された。近年の温泉施設は、物理洗浄に向かない高級感あふれる檜の浴槽や、自然の景観を模した複雑な石造りの浴槽など、癒しの空間を演出する構造が好まれる風潮があり、決して洗浄効率を考慮した造りとはなっていない。多様な構造や材質を使用する浴槽においては、施設の状態に応じた最適な洗浄方法を選択したうえで、作業者自らが問題意識を持って日々の作業に従事することが重要である。

そこで、これらの問題を解決する手段の一つとして、食品衛生の分野で既に活用されている ATP ふき取り検査を温泉施設の衛生管理に利用できないかと考えた。HACCP システムにおいて洗浄作業は、CCP（重要管理点）による管理の前提となる一般的衛生管理プログラムとして位置付けられている。そのなかで、ATP ふき取り検査は清浄度の数値的管理だけでなく、合理的洗浄方法の決定や従業員の衛生教育のためのツールとして、既に一定の評価を得ている手法である。しかし、温泉施設において本法を衛生管理に利用した例はほとんど見受けられず、ATP 値の実態も把握されていないのが現状である。そこで本研究では、浴槽での ATP レベルの把握と洗浄に伴う ATP 値の挙動、及び、レジオネラ属菌汚染を抑えるための管理基準値の設定を主な目的とし、その結果得られたデータをもとに、各種材質や洗浄方法の問題点について考察を加えた。

## B. 研究方法

全国 10 府県の地方衛生研究所の協力のもと、掛け流し式温泉 13 施設 14 浴槽を対象に調査を実施した。施設選定の基準は、本研究班の病原微生物汚染実態調査において浴槽水からレジオネラ属菌が検出された施設とし、改善に向けた衛生指導の一環として本調査を行った。調査方法は、浴槽水の排水後、洗浄後、消毒後の各段階で浴槽内壁の ATP 値を測定し、一部の検体についてレジオネラ属菌等の微生物検査を行った。最終的な洗浄効果の確認は、湯張り後の浴槽水の微生物検査により行った。

ATP の測定には、キッコーマン（株）ATP ふき取り検査システム、ルミテスターPD-10N 及びルシ

パックワイドをマニュアルに従い使用した。ATP 量はRLU（Relative Light Unit）値で示した。微生物検査については、平成 17 年度本研究班作成の「細菌検査マニュアル」に従い、それぞれの研究機関にて実施した。統計解析にはフリーソフト R version 2.4.1 及びエクセルアドインソフト エクセル統計 2006（（株）社会情報サービス）を使用した。

なお、ATP 測定に対する pH 及び NaCl の影響を検討する際は、滅菌蒸留水に浮遊させた大腸菌を所定の条件下で  $8.1 \times 10^5$  CFU/ml となるように調整し、その 100  $\mu$ l についてルミテスターPD-10N 及びルシパックワイドを使用して発光強度を求めた。比較のため、ATP アナライザ AF-100（東亜 DKK（株））を使用し、2 種類の ATP 測定キット（東亜 DKK 社製 AF2K1、AF2L1 及びキッコーマン社製ルシフェール HS）で測定を行った。

高濃度塩素による遊離 ATP の分解は、遊離残留塩素濃度を 100 mg/L、1,000 mg/L、10,000 mg/L に調整したリン酸緩衝液中に、一定量の ATP 標準液を添加した後、3 分、10 分、30 分、60 分後に十分量のチオ硫酸ナトリウム溶液で中和し、その 100  $\mu$ l についてルミテスターPD-10N 及びルシパックワイドを使用して残存 ATP 量を測定した。また、高濃度塩素による菌体内 ATP の分解は、遊離残留塩素 100 mg/L、1,000 mg/L、10,000 mg/L を含むリン酸緩衝液中に、R2A 寒天培地で培養した *Pseudomonas fluorescens* P17 株を  $10^7$ CFU/ml 程度になるように懸濁し、3 分、10 分、30 分、60 分後に十分量のチオ硫酸ナトリウム溶液で中和した。その 100  $\mu$ l についてルミテスターPD-10N 及びルシパックワイドを使用して残存 ATP 量を測定するとともに、LIVE/DEAD *BadLight* Bacterial Viability Kit（Molecular Probes）にて生菌数、死菌数をカウントした。

## C. 研究結果

### 1 施設別調査結果

全試料の ATP 平均値及び ATP 値の分布をそれぞれ表 1 及び図 1 に示す。ATP 値の分布は対数正規分布に従うため、幾何平均値及び対数変換後の平均値

と標準偏差を示した。全試料の ATP 値は、洗浄前の平均値で 7,447 RLU ( $3.9 \pm 0.8 \log \text{RLU}$ )、洗浄後の平均値は 1,341 RLU ( $3.1 \pm 1.0 \log \text{RLU}$ ) であり、洗浄前後の幾何平均値で 82.0%低下した。消毒後の ATP 平均値はさらに 44 RLU ( $1.6 \pm 1.0 \log \text{RLU}$ ) まで低下し、洗浄前と比較すると 99.4%低下した。施設別の ATP 平均値を比較すると、最大及び最小の施設で平均値に大きな開きがあったが、全施設の試料を合わせた分布は、洗浄前後ともにほぼ対数正規分布に従った (図 1)。

浴槽ごとに洗浄前、洗浄後、消毒後の ATP 値を比較した結果を表 2 に示す。No.1、No.8、No.13、No.14 については、枝番によって洗浄方法の改善前後のデータを表している。No.1 及び No.13 は、洗浄指導後に顕著な ATP 値の改善が認められ、結果的に浴槽水のレジオネラ属菌が陰性となった事例であった。調査の詳細は別添「施設別 ATP ふき取り検査報告書」に示す。

## 2 材質別 ATP 値比較

浴槽の材質別に洗浄前、洗浄後、消毒後の ATP 値を比較した (表 3、図 2)。洗浄前の ATP 値はタイルが 6,712 RLU で最も低く、目地が 11,928 RLU で最も高い値を示したが材質間で有意差はなく、幾何平均値 7,503 RLU であった。一方、洗浄後の ATP 値は目地で 17,037 RLU と洗浄効果が全く見られず、タイル及び木の洗浄後の ATP 値と比較して有意に高い値を示した (図 2、Tukey の多重比較)。材質別の洗浄除去率を幾何平均値で比較すると、目地では ATP 値の減少が認められず、除去率は 42.8%となった。タイル、木、コンクリートの除去率は 87.6～88.6%とほぼ同じ値を示したが、石では 72.3%と他の材質と比較してやや低い除去率を示した。

## 3 洗浄方法別 ATP 値比較

浴槽の洗浄方法別に洗浄後の ATP 値の平均値を比較した (表 4、図 3)。洗浄前の ATP 値 7,447 RLU に対し、高圧洗浄のみを行った場合は 11,962 RLU であり、洗浄による ATP 値の減少は認められなかった。一方、ブラシ洗浄を使用した場合は洗剤及び

高圧の併用の有無にかかわらず 946～1,450 RLU に減少し、洗浄前及び高圧洗浄と比較して有意に低下した (Tukey の多重比較、 $P < 0.01$ )。消毒を行った場合は 36 RLU とさらに有意に低下した (同、 $P < 0.01$ )。

## 4 清浄度基準値の設定

ATP ふき取り検査と並行して従属栄養細菌 (HPC) 及びレジオネラ属菌検査を実施した 69 件について、ATP 値と HPC との関係を検討した (図 4)。両者に正の相関がみられたが (Spearman の順位相関係数 0.55、 $P < 0.01$ )、ATP が 1,000 RLU ( $3 \log \text{RLU}$ ) 以上で相関が高く、1,000 RLU 未満では相関が低くなる傾向がみられた。また、レジオネラ属菌が陽性となる検体の比率は、ATP が 1,000 RLU 未満では 27.6% (8/29) に対し、1,000 RLU 以上では 65.0% (26/40) と有意に高く (Fisher exact test、 $P < 0.01$ )、オッズ比 (95%信頼区間) は 4.9 (1.7 - 13.8) であった (表 5)。

レジオネラ属菌検査を実施した 69 件について、ATP 値の累積相対度数分布を図 5 に示した。レジオネラ属菌陰性検体の 70%が 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。洗浄方法別にふき取り試料 450 件の累積相対度数分布を比較すると (図 6)、洗浄前と高圧洗浄は同程度の分布を示し、洗浄効果があまり得られていないことがわかる。一方、ブラシ洗浄を使用した場合は ATP 値が  $1 \log$  (1/10) 低下し、塩素消毒を行うとさらに  $2 \log$  (1/100) 低下した。仮に 1,000 RLU を清浄度基準値として設定した場合には、洗浄前の試料の約 85%が基準値を超えることになるが、ブラシ洗浄後の試料では 50～60%に減少し、消毒後の試料では 10%未満に収まった。

## 5 ATP ふき取り検査導入の効果及び問題点

別添「施設別 ATP ふき取り検査報告書」から抜粋した ATP ふき取り検査導入の効果及び問題点を表 6 にまとめた。導入による効果としては、① 汚染の程度を数値化できること、② 現場で迅速・簡便

に結果が得られること、③ 汚染場所が特定できること、④ 洗浄の効果を判定できること等が挙げられた。一方、問題点及び課題としては、① 再現性が得られない場合がある、② 評価基準が定められていない、③ 阻害物質の影響を受ける可能性がある等が指摘された。

#### (参考)

##### (1) ATP の測定感度に影響を及ぼす要因

ATP の測定感度に影響を及ぼす要因として、pH 及び NaCl について検討を行った (図 7)。ATP ふき取り検査に使用するルシパックワイドは、pH 10 以上のアルカリ性で発光強度が 140~200%に増加した。また、NaCl 濃度が 0.5%、1%、2%では発光強度がそれぞれ 83%、51%、26%に低下した。

##### (2) 塩素消毒による ATP の分解

浴槽洗浄の際に塩素消毒を行う場合が多いことから、塩素による ATP の分解について検討した。遊離 ATP については、遊離残留塩素濃度 100 mg/L 中では 60 分の接触時間で減少は認められなかったが、1,000 mg/L では 10 分後に 40%、30 分後に検出限界まで低下し、10,000 mg/L では 3 分後に検出限界未満となった。一方、*Pseudomonas fluorescens* P17 株菌液を用いた菌体内 ATP については、遊離残留塩素濃度 100 mg/L では、時間の経過とともに菌体が破壊され、DEAD cell 数の減少が認められたが、ATP 量は変化しなかった。1,000 mg/L では、3 分後には菌体がすべて消滅し、DEAD cell も認められなかったが、ATP は 10 分後に 55%、30 分後に検出限界に低下し、遊離 ATP と同様の挙動を示した。10,000 mg/L では 3 分後に ATP が検出限界未満となった。

#### D. 考察

本研究班における掛け流し式温泉を対象とした病原微生物汚染実態調査の結果から、浴槽内壁でのバイオフィーム定着を防ぐ洗浄方法の最適化が、レジオネラ属菌汚染を解決するための大きな課題であることが明らかとなった。浴槽内は常に 40~42℃に保たれ、入浴者が持ち込む汗や垢などの有機物が豊富

に存在するため、微生物が増殖しやすい環境であることは明らかであり、適切な洗浄が行われなければ浴槽内部にバイオフィームの定着を招くことは容易に想像される。泉質や浴槽の材質、構造は施設によって異なるため、施設ごとに最適な洗浄方法も異なると考えられる。今回、食品衛生の分野で既に活用されている ATP ふき取り検査が、温泉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を評価するため、実際の温泉施設で検討を行った。

ふき取り検査によって得られた ATP 量と微生物量との間の相関はあまり高いことが知られている。その原因は、培養法で検出できる細菌が一部の細菌に限られること、入浴者由来の垢などに含まれる遊離 ATP が存在することなどが考えられる。しかし、ATP 測定の目的が微生物量の定量ではなく、バイオフィーム除去を含めた清浄度の指標と考え、ATP 量の低下が最終的にレジオネラ属菌等の汚染防止につながるのであれば、活用の意義は充分あると考えられる。

ふき取りによって得られた ATP 値と微生物検査の結果を比較した結果、ATP 値が高ければ従属栄養細菌数も高く、1,000 RLU 以上でレジオネラ属菌の検出率も有意に高くなることが明らかとなった。ATP 値が 1,000 RLU を超える汚染レベルの分布は、洗浄前、ブラシ洗浄後、消毒後の試料のそれぞれ 85%、50~60%、10%未満を占めることとなり、1,000 RLU を一つの基準値あるいは目標値として設定することが妥当なレベルと考えられた。

洗浄後の ATP 値を材質別に比較すると、目地では 17,037 RLU と洗浄効果が得られにくく、石でも 1,898 RLU と基準値レベルを超えた。また、洗浄方法別に比較すると、高圧洗浄では 11,962 RLU と ATP 値を低下させるには不十分であり、ブラシを使用すると 946 RLU と基準値未満に除去することが可能であった。以上の結果は、実態調査におけるレジオネラ属菌の検出に影響を及ぼすリスク要因と合致するものであり、ATP 値を指標として洗浄、消毒の方法を最適化することがレジオネラ属菌汚染対策に有効と考えられた。

現実に ATP ふき取り検査を導入する場合の効果としては、簡単な操作によって、現場で即汚染レベルが数値化できる特徴を生かし、汚染場所の特定や、適切な洗浄方法の設定（SSOP：衛生標準作業手順の設定）に有効と考える。また、保健所の監視業務の指導材料としても十分に活用可能であろう。一方で、本法は酵素による発光反応を利用した方法であるため、阻害物質による影響を受けることが知られている。NaCl によって阻害を受けることは明らかであり、旧泉質名で食塩泉あるいは強食塩泉といわれる温泉では、使用法によっては感度が低下する場合が考えられる。他にも阻害要因が存在する可能性はあるが、洗浄、水洗後に使用する等で影響を最小限に抑えることは可能と考える。機器の購入や、検査単価（1 回 300 円程度）など、コスト面での課題も残るが、技術的には施設管理の現場で充分適用可能であると考えられる。

#### E. 結論

ATP ふき取り検査が、入浴施設のバイオフィル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。その結果、浴槽の清浄度基準値として 1,000 RLU を一つの目安とすることが妥当と考えられた。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が、浴用施設のレジオネラ属菌汚染対策に有効であると考えられた。

#### F. 参考文献

- 1 井上博雄ほか：厚生労働科学研究費補助金健康科学総合研究事業「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 17 年度研究報告書，平成 18 年 4 月。
- 2 月刊 HACCP：ATP ふき取り検査，平成 17 年 2 月
- 3 R Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1 浴槽の ATP 値 (n=463)

	全施設		最大施設		最小施設	
	幾何平均 (RLU)	対数平均±SD (log RLU)	幾何平均 (RLU)	対数平均±SD (log RLU)	幾何平均 (RLU)	対数平均±SD (log RLU)
洗浄前 (n=135)	7,447	3.9±0.8	281,546	5.4±0.2	185	2.3±0.4
洗浄後 (n=259)	1,341	3.1±1.0	142,191	5.2±0.3	13	1.1±0.9
消毒後 (n=69)	44	1.6±1.0	11,398	4.1±0.7	8	0.9±0.4

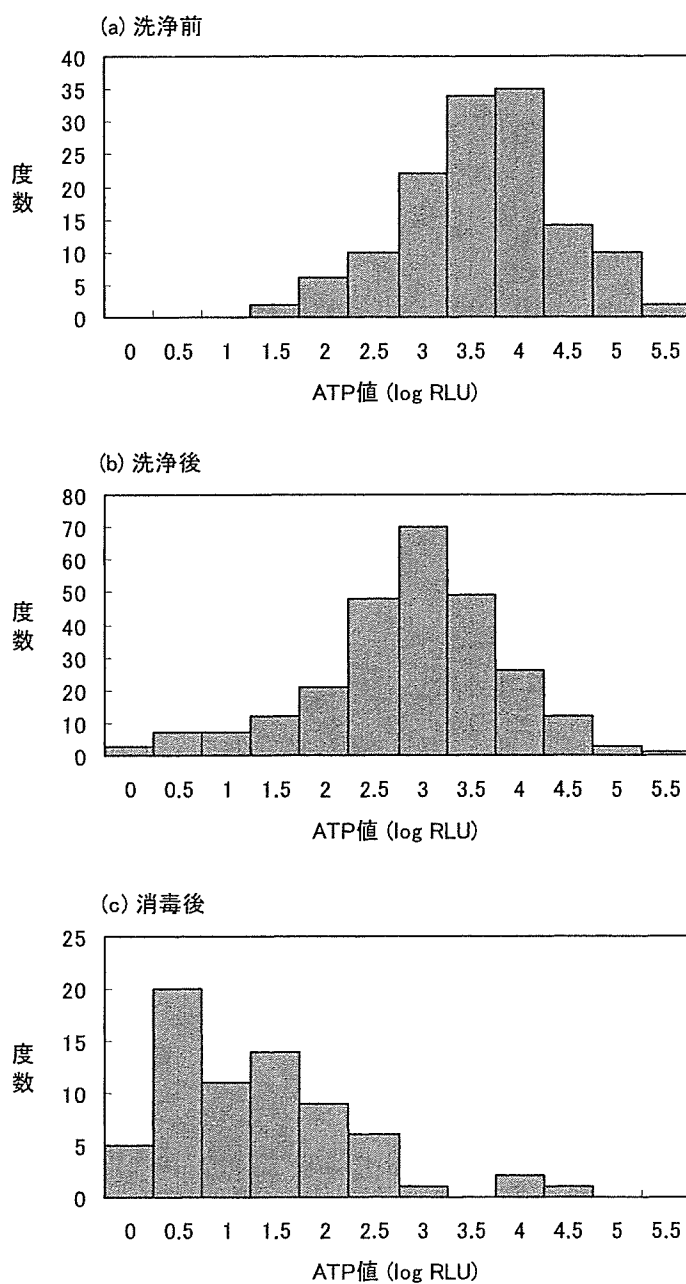


図 1 全試料の ATP 値の分布



表 2 施設別 平均 ATP 値一覧 (n=446)

No.	泉質名	浴槽材質	洗浄方法	ATP値 (幾何平均RLU)		レジオネラ 検出の有無
				洗浄前	洗浄後	
1-1	単純温泉	タイル	高圧→塩素系洗浄剤+ブラシ→高圧		3,871	+
1-2	単純温泉	タイル	高圧→塩素系洗浄剤+ブラシ→高圧	22,823	201	-
2	Na・塩化物・炭酸水素塩温泉	木	ブラシ+水洗	27,900	5,952	153
3	含硫黄・Na・Ca・塩化物温泉	石	高圧+ブラシ	21,757	4,413	-
4	Na・Ca・塩化物・硫酸塩温泉	タイル	竹箒+水洗	281,546	142,191	11,398
5	Na・硫酸塩・塩化物温泉	タイル	ブラシ+水洗	185	13	-
6	Na・塩化物泉	石	高圧+消毒+高圧		22,078	231
7	単純弱放射能温泉	石、タイル	塩素系洗浄剤+ブラシ		128	-
8-1	アルカリ性単純温泉	石	塩素系洗浄剤+ブラシ		8,884	+
8-2	アルカリ性単純温泉	石	塩素系洗浄剤+ブラシ		1,594	1,840
9	アルカリ性単純温泉	檜、陶器	ブラシ、消毒剤	10,155	482	+
10	アルカリ性単純温泉	石、タイル	洗剤、ブラシ、高濃度塩素	1,297	734	-
11	アルカリ性単純温泉	檜	ブラシ(毎日)、高圧(週1)	5,299	2,962	
12	アルカリ性単純温泉	石	ブラシ(毎日)、高圧(週1)	3,493		
13-1	Na・炭酸水素塩泉	石	消毒(5ppm, 15分)+高圧	17,908	13,908	13,908
13-2	Na・炭酸水素塩泉	石	洗剤、ブラシ、高圧、高濃度塩素	24,932	2,530	313
14-1	Na・Ca・塩化物泉	石、コンクリート	ブラシ、高圧、洗剤、高濃度塩素		2,046	8
14-2	Na・Ca・塩化物泉	石、コンクリート	ブラシ、高圧、洗剤、高濃度塩素		421	13
計				7,447	1,341	44

表 3 浴槽材質別 ATP 値の洗浄除去効果 (n=432)

浴槽材質	ATP値:幾何平均RLU (log RLU、平均±SD)			洗浄除去率 (%) (a-b)/a
	洗浄前 (a)	洗浄後 (b)	消毒後	
目地	11,928 (4.1 ± 0.9)	17,037 (4.2 ± 1.0)	333 (2.5 ± 0.1)	-42.8
石	6,845 (3.8 ± 0.8)	1,898 (3.3 ± 1.1)	32 (1.5 ± 1.0)	72.3
タイル	6,712 (3.8 ± 1.1)	831 (2.9 ± 1.0)	59 (1.8 ± 1.1)	87.6
木	7,994 (3.9 ± 0.7)	913 (3.0 ± 0.8)	110 (2.0 ± 0.3)	88.6
コンクリート	9,643 (4.0)	1,175 (3.1 ± 0.8)	12 (1.1 ± 0.4)	87.8
計	7,503 (3.9 ± 0.8)	1,281 (3.1 ± 1.0)	33 (1.5 ± 0.9)	82.9

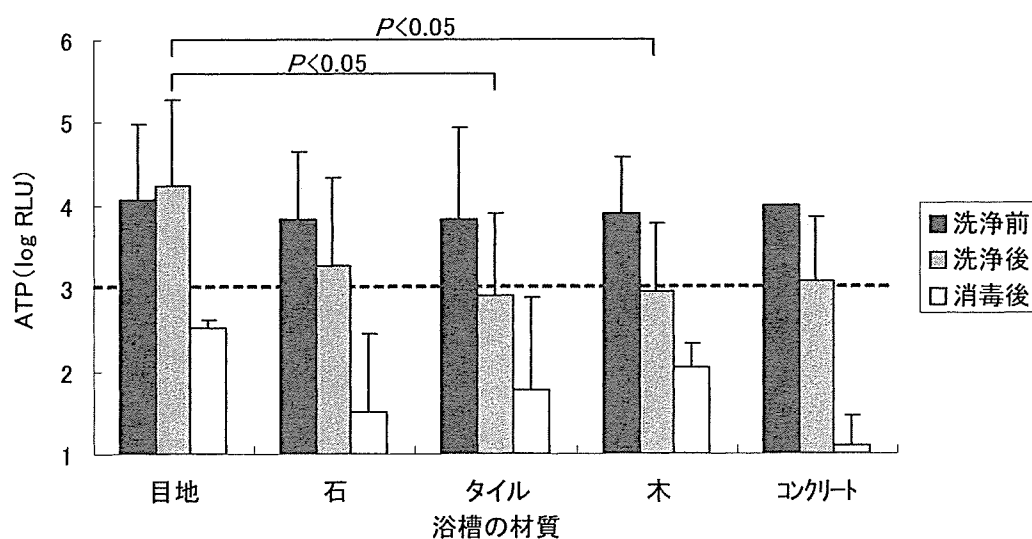


図 2 浴槽材質別 ATP 値の洗浄効果比較 (平均値)  
(Tukey の多重比較)

表 4 洗浄方法別 ATP 値の洗浄除去効果 (n=450)

洗浄方法	幾何平均値 (RLU)	平均±SD (log RLU)
洗浄前	7,447	3.9 ± 0.8
ブラシのみ	946	3.0 ± 1.1
ブラシ+洗剤	1,355	3.1 ± 0.9
ブラシ+高圧	1,450	3.2 ± 0.8
ブラシ+洗剤+高圧	1,180	3.1 ± 0.9
高圧のみ	11,962	4.1 ± 0.4
消毒	36	1.6 ± 0.9

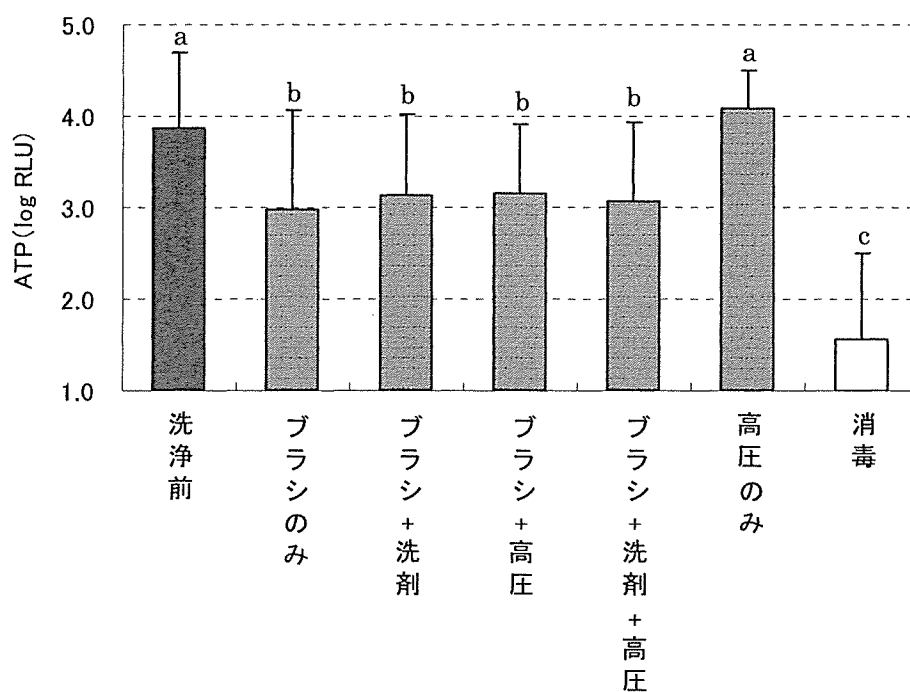


図 3 洗浄方法別 ATP 値の分布 (平均値)

グラフ上の同一英小文字は ATP 値に有意差がないことを示す。

(Tukey の多重比較、 $P<0.01$ )

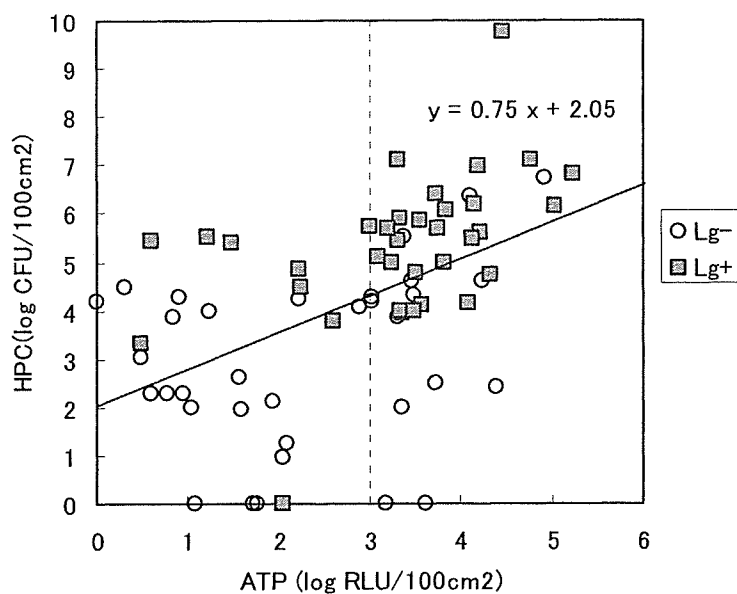


図4 ふき取り検体の ATP 値と従属栄養細菌数 (n=69)  
(Spearman の順位相関係数 : 0.55、 $P<0.01$ )

表5 ふき取り検体の ATP 値とレジオネラ属菌検出の有無

RLU	レジオネラ属菌		計	陽性率 (%)
	陽性	陰性		
$\geq 1000$	26	14	40	65.0
$< 1000$	8	21	29	27.6
計	34	35	69	49.3

オッズ比 (95%信頼区間) : 4.9 (1.7 – 13.8)  $P<0.01$  (Fisher exact test)

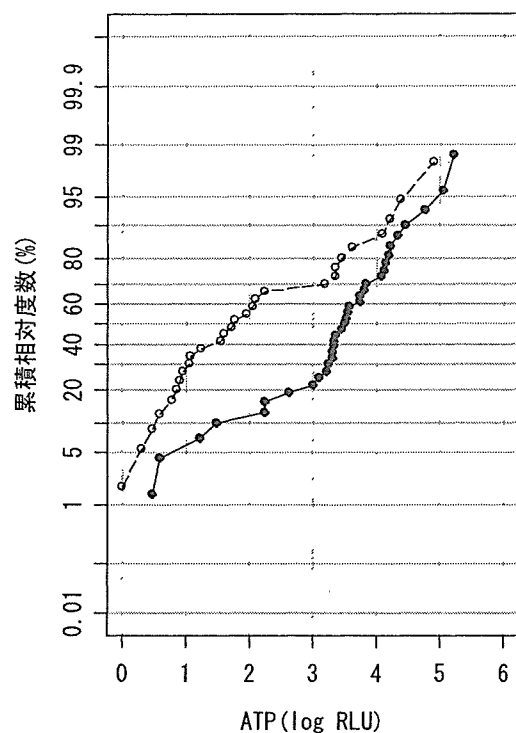


図5 ふき取り検体の累積相対度数分布 (n=69)  
(●-レジオネラ属菌陽性試料、○-レジオネラ属菌陰性試料)

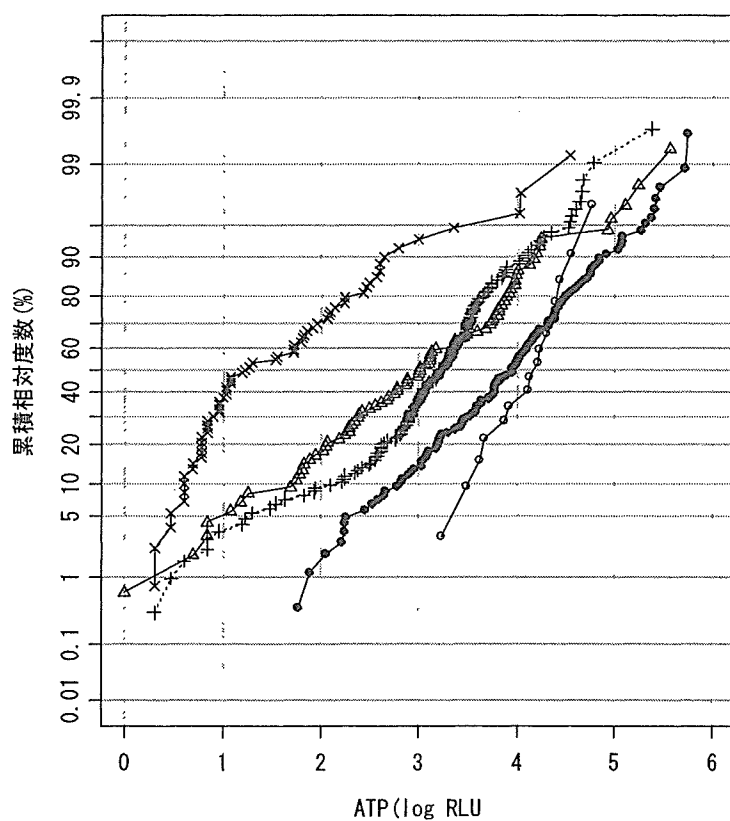


図6 洗浄方法別累積相対度数分布 (n=450)  
(●-洗浄前、○-高圧洗浄、△-ブラシのみ、+-ブラシ+α、×-消毒)

表 6 ATP ふき取り検査の導入による効果（研究協力者のコメントから抜粋）

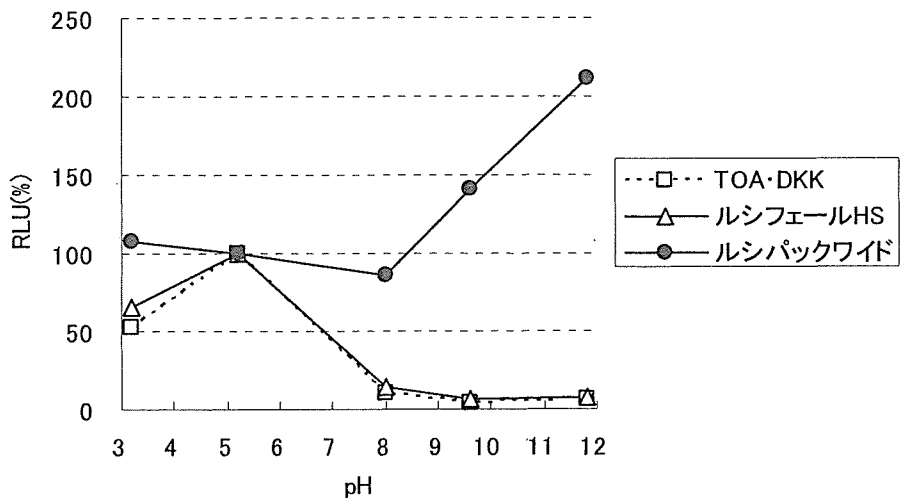
導入による効果	
1 数値化	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 洗浄の到達状況を現場で速やかに数値として見るができるため、清掃従事者にとっても効果大きい。</li> <li>○ 想定される汚染場所や洗浄困難場所を数値として確認・指摘でき、衛生監視指導の上でも効果があると思われた。</li> <li>○ 汚れが定着しやすい部分を徹底的に洗浄するようにATP値を確認しながら指導した結果、浴槽からレジオネラ属菌は検出されなかった。</li> <li>○ ATP値を低下させる清掃を行うことで、レジオネラ属菌の汚染も防止できると推測される。</li> </ul>
2 迅速性、簡便性	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ATP拭き取り検査は結果が早く得られるため、施設側への清掃効果の確認には有用であると思われた。</li> <li>○ ATP検査は短時間でしかも簡単に微生物汚染が分かり、汚染状況の把握には有効と思われた。</li> <li>○ 入浴施設の管理者が日常の衛生管理手法として容易に実施でき、監視業務の現場指導にも活用可能と考えられた。</li> </ul>
3 汚染場所の特定	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ RLUがあまり下がらなかった場所は、目地の破損部、浴槽角部、組み石の隙間等で、洗浄しにくい部分と想定された。</li> <li>○ 浴槽の角や窪みなど洗浄困難場所は通常の洗浄では不十分であり、適切なブラシ等を用いて洗浄することが必要である。</li> <li>○ 洗いにくい目地の奥や連絡管のように奥まったところでATP値が高く、清掃がし難い箇所に生物膜が形成され、レジオネラ属菌の生息場所となっている可能性があることが分かった。</li> <li>○ 浴槽内階段側壁のように洗浄しにくいと思われた場所が比較的高い値を示した。</li> <li>○ 洗浄前後の除去率は石を材質とするものが最も低く洗浄が難しい材質であると推察される。</li> <li>○ 岩表面よりも目地の方が、培養法、ATP法共に比較的高い数値を示し、後者のRLU値は洗浄消毒後も高い値を示した。</li> </ul>
4 洗浄効果の確認	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 洗浄効果を確認する上で、ATP拭き取り検査は有効と思われた。</li> <li>○ 高圧水による洗浄では、平滑でない目地部分や、洗浄しにくい角や死角になる部分、排水がはけにくい部分の従属栄養細菌、レジオネラの除菌が充分とは言えず、ATP値も高かった。</li> <li>○ 浴槽、貯湯槽の洗浄・殺菌効果の確認に、綿棒タイプのATP測定法が応用でき、衛生管理手法として有用であると思われた。</li> <li>○ 洗浄方法はブラシ使用と塩素剤の使用であったが、ブラシによる物理的な除去が有効であった。</li> <li>○ 洗剤とブラシによる洗浄でATP値はかなり改善されたことから、この方法での洗浄に加えて消毒剤の噴霧などを行うことが、レジオネラ対策として効果があると考えられる。</li> <li>○ 洗浄方法と消毒方法を変えたことにより、RLU値は劇的な減少を示した。レジオネラ属菌、アメーバは検出されなかったことから、ATPの拭き取りによるRLU値の減少が微生物学的にも検証できた。</li> <li>○ 明瞭な迅速性と簡便性は非常に魅力的であり、清掃（洗浄）方法や消毒方法を検討しているときは、ATP法を目安として活用すれば、適切に作業の有効性を確認できるように思われた。</li> <li>○ ATP高値域においては、レジオネラ属菌は高率に検出されたことから、浴槽内のできるだけ多くの箇所を測定することにより、ATP値は総合的に洗浄効果を判断する指標に利用可能と考える。</li> </ul>

表 7 ATP ふき取り検査導入への問題点、課題（研究協力者のコメントから抜粋）

問題点、課題	
1 再現性	
	○ 清掃が進むにつれて減少傾向を示したが、逆に増加する場合があります、岩の接合部や奥まって目の見えないところであり、毎回同じ箇所のみを正確にふき取ることができなかったことが原因と思われる。
2 評価基準の設定	
	○ 岩風呂等の目地部分などではふき取り面積等を一定にできないことから、厳密に数値の絶対値での判断は難しいところもあると思われた。
	○ 今後材質ごとや管理状況ごとの基準値を明確にしていけば、温泉や公衆浴場の衛生管理指標になりうると考えられた。
3 阻害物質等	
	○ 生物全てが保持しているATPを標的にしていることや、酸化剤などの阻害物質の存在、或いはある種の有機物が持つ非特異反応の存在などが考えられる。
	○ ATP値が低値でもレジオネラ属菌が検出された箇所が散見され、阻害物質の検討等課題が残った。

(参考)

(a) pH の影響



(b) NaCl の影響

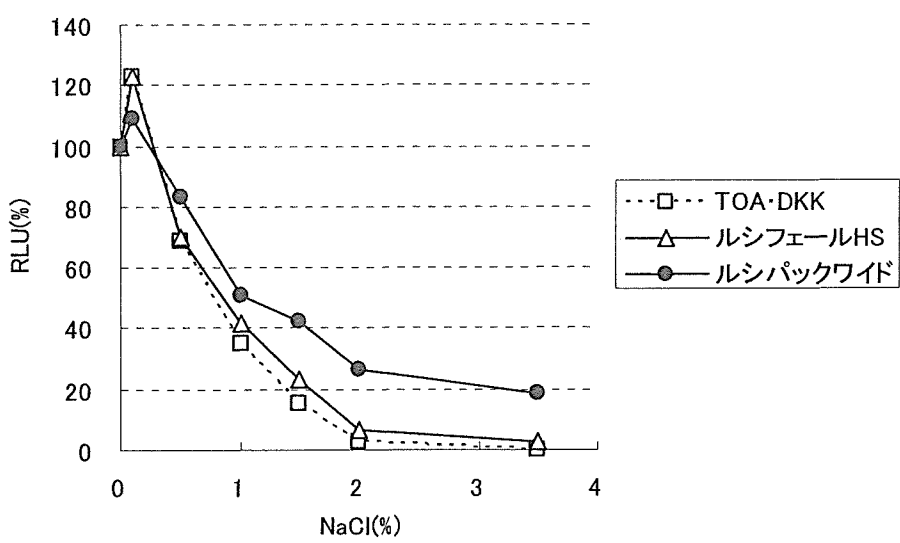


図 7 ATP 測定キットの感度に影響を及ぼす要因



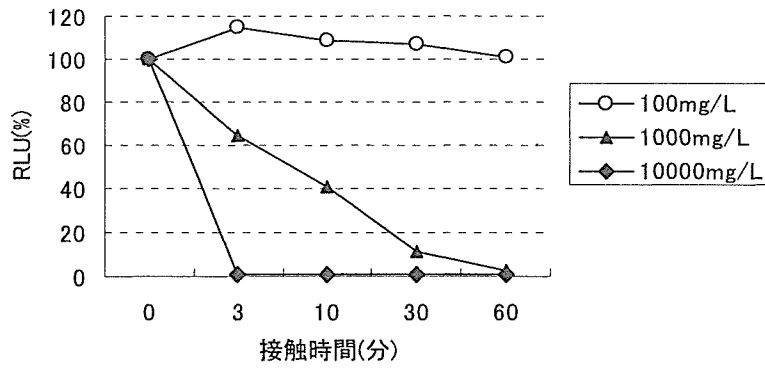


図 8 遊離 ATP の塩素による分解

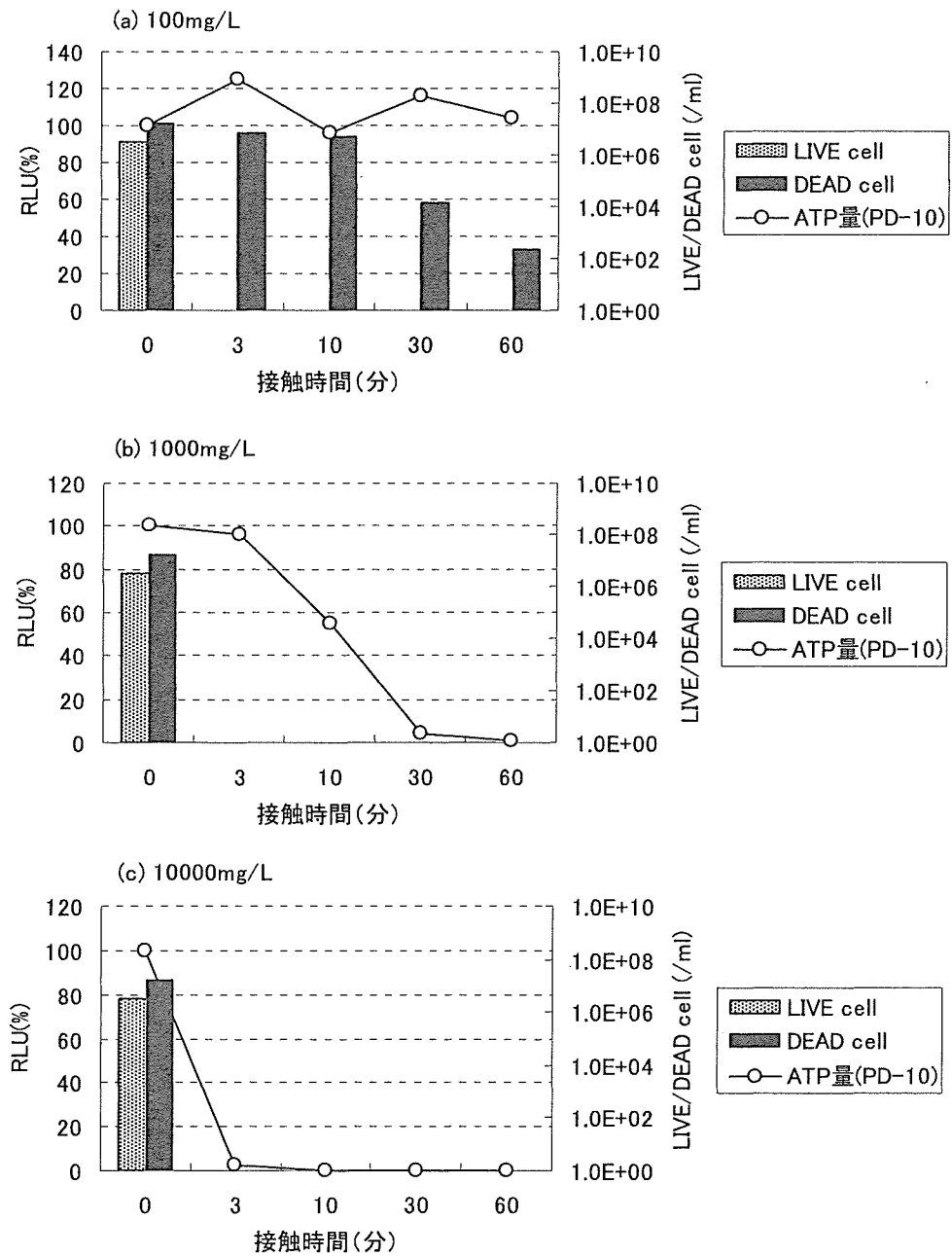


図 9 菌体内 ATP の塩素による分解

## 【 A 】

## 1 研究方法

調査は、1 施設を対象として ATP 拭き取り検査を清掃前後に行った。同時に湯口水および浴槽水のレジオネラ属菌の検査を実施して清掃効果を確認し、ATP 拭き取り検査が清掃効果の判定に有用であるか調べた。

## 2 研究結果

調査は 2 回実施した。

## (1) 調査 1 回目

ATP 拭き取り検査は、施設で通常行っている方法で清掃を行った直後に、湯口、浴槽の側面、床、縁等について実施し（図 1）、レジオネラ属菌の検査は湯口水、浴槽水および湯口、中央湯口岩等の拭き取りについて行った。

その結果、ATP 値はすべての箇所が高値を示し、特に中央湯口岩では高く 235, 271RLU であった（表 1）。

レジオネラ属菌は湯口から検出されなかったが、清掃前の浴槽水から 20cfu/100m L、清掃後は 10cfu/100m L と清掃によって菌を除去することが出来なかった。また、清掃後の拭き取り検査で浴槽側面に設置した温度計より *L. pneumophila* SG1 が分離された。

## (2) 調査 2 回目

1 回目の調査結果を受けて中央湯口、浴槽の縁、温度計を重点的に清掃するように指導を行い、清掃前後に調査を実施した。

踏み台、浴槽側面・床においては清掃前後で、ATP 値が約  $10^3$ RLU 減少した（表 2）。また、調査 1 回目と清掃後の ATP 値を比較したところ、すべての箇所で ATP 値が減少した。

レジオネラ属菌は、1 回目と同様に湯口水から検出されなかった。また、浴槽水では清掃前に 10cfu/100m L 菌が検出されたが、清掃後には検出されなかった。

## 3 考察

調査対象施設は源泉温度 65℃、単純温泉低張性弱アルカリ性高温泉で、浴槽にはタイルを使用しており、一部のタイルが破損していた。

この施設の清掃方法は塩素入洗剤を使用して浴槽の縁から電動ブラシとブラシで洗浄後、浴槽内を同様に洗い、高圧洗浄で水洗いしていた。しかし、タイルの破損部位は表面が粗いため汚れが定着しやすく、1 回目の清掃では洗浄が行き届かなかったと推察された。そこで 2 回目の調査では、清掃手順を 1 回目と同様に行い、汚れが定着しやすい部位を徹底的に洗浄するように ATP 値を確認しながら指導した結果、浴槽からレジオネラ属菌は検出されなかった。このように源泉温度が高く菌が湯口から検出されない施設においては、浴槽および周辺の清掃を徹底することで衛生管理が可能であると確認された。

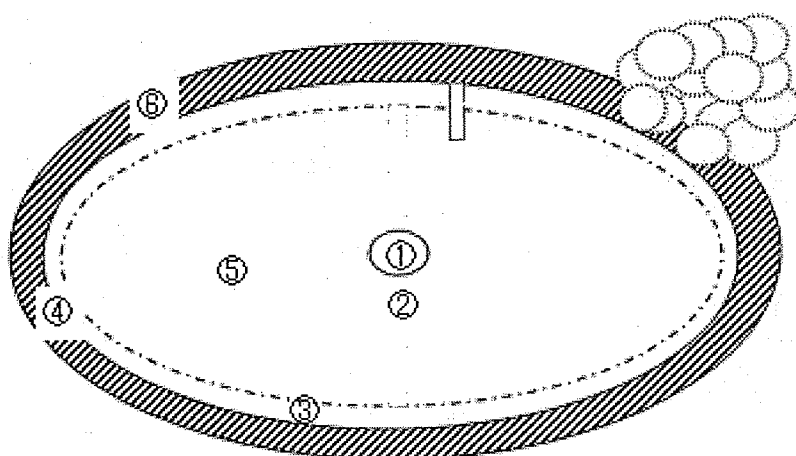
今回の調査は、検査数が少ないため、ATP 値とレジオネラ属菌の相関性については述べられないが、ATP 値は他の微生物やバイオフィルムの存在によっても高くなることが考えられるため、ATP 値を低下させる清掃を行うことで、レジオネラ属菌の汚染も防止できると推測される。また、ATP 拭き取り検査は結果が早く得られるため、施設側への清掃指導時の清掃効果の確認には有用であると思われる。

表1 清掃後のATP拭き取り検査（1回目）

	採取地点	ATP 値(RLU)
①	中央湯口岩	45,863
		235,271
②	中央湯口周辺	2,276
③	踏み台	2,047
④	浴槽側面	880
		467
		3,012
		704
⑤	浴槽床	402
		636
⑥	縁	38,932
		35,564
⑦	温度計	2,830

表2 ATP拭き取り検査（2回目）

	採取地点	ATP 値(RLU)	
		清掃前	清掃後
①	中央湯口岩	—	66
②	中央湯口周辺	—	85
③	踏み台	3,904	17
④	浴槽側面	20,832	34
⑤	浴槽床	14,193	43
			5,408
⑥	縁	9,936	1,090
			3,216
			198
⑦	温度計	—	198



- ①中央湯口岩（石）
- ②中央湯口周辺  
（タイル）
- ③踏み台（タイル）
- ④浴槽側面  
（タイル）
- ⑤浴槽床（タイル）
- ⑥縁（御影石）  
（ ）内は材質

図1 浴槽におけるATP拭き取り場所

## 【 B 】

## 1 方法

調査対象温泉施設は、循環系配管を持たない毎日完全換水をしている県内4施設で実施した。調査は平成18年10～11月に行った。検査は営業終了後通常の洗浄等を行う時点で実施した。浴槽水を排水した後、洗浄前、通常の洗浄後、必要に応じ再洗浄後、消毒後に同一部位をふき取った。ふき取った後直ちにATP測定器で測定した。

## 2 結果

各施設の検査結果を下表に示した。

洗浄前のRLUと比べ洗浄後は1オーダー程度低い値になっているところと、あまり変わらないところがあった。RLUがあまり下がらなかった場所は、目地の破損部、浴槽角部、組石の隙間等で、洗浄しにくい部分と想定された。

図1にI施設の結果をグラフで示した。洗浄前は $10^4$ オーダー前後であるが、通常の洗浄で1オーダー

—RLUが低くなる場所と、目地破損部のようにあまり下がらない場所があった。高濃度塩素洗浄後は洗浄困難な場所も低下が認められ、 $10^1 \sim 10^2$ まで下がった。

レジオネラ及び従属栄養細菌は表1に示すとおりRLUの低下（洗浄）により減少することが確認された。

## 3 考察

洗浄効果を確認する上で、ATPふき取り検査は有効と思われた。洗浄の到達状況を現場で速やかに数値として見るができるため、清掃従事者にとっても効果大きい。また、想定される汚染場所や洗浄困難場所を数値として確認・指摘でき、衛生監視指導の上でも効果があると思われた。浴槽の角や窪みなど洗浄困難場所は通常の洗浄では不十分であり、適切なブラシ等を用いて洗浄することが必要である。

I施設				
	ふき取り部位	洗浄前	洗浄後	高濃度塩素
1	温度計設置跡壁面	67,037	8,577	173
2	同上埋設部	9,643	591	62
3	階段目地破損部	16,908	13,144	285
4	木板剥離部目地	14,788	17,504	390
5	排水口付近壁	104,596	6,404	70

K施設				
	ふき取り部位	洗浄前	洗浄後	塩素洗浄後丁寧にブラシ
1	浴槽ふち目地破損部分	233,807	90,455	
2	浴槽角腰掛	205,152	125,844	
3	浴槽角腰掛目地	502,690	357,632	
4	浴槽角	260,592	172,232	34,597
5	洗い場目地破損部分		82,898	3,755

Y施設		
	ふき取り部位	洗浄前
1	排水口脇壁面	57
2	ゴミ取り管上部周辺	328
3	浴槽中の椅子下	380
4	浴槽木枠の目地破損部	276
5	湯口下部底	110

T施設			
	ふき取り部位	洗浄前	洗浄後
1	内湯 丸太の裏 洗い場側	44,741	16,481
2	内湯 丸太の裏 浴槽壁側	54,617	12,556
3	内湯 湯口の下	58,202	2,952
4	内湯 石の表A	24,527	163
5	内湯 石の裏	20,615	12,703
6	内湯 石の表B	48,482	2,857
7	内湯 排水口の内側	28,610	1,852
8	内湯 排水口のふたの裏	52,522	332
9	露天風呂 湯口の下	1,615	2,913
10	露天風呂 石の表面A	3,668	4,024
11	露天風呂 石の表面B	10,364	2,118
12	露天風呂 排水口	115,594	7,412
13	露天風呂 石の間奥	20,903	18,566
14	内湯から露天への踏み石	1,201	674