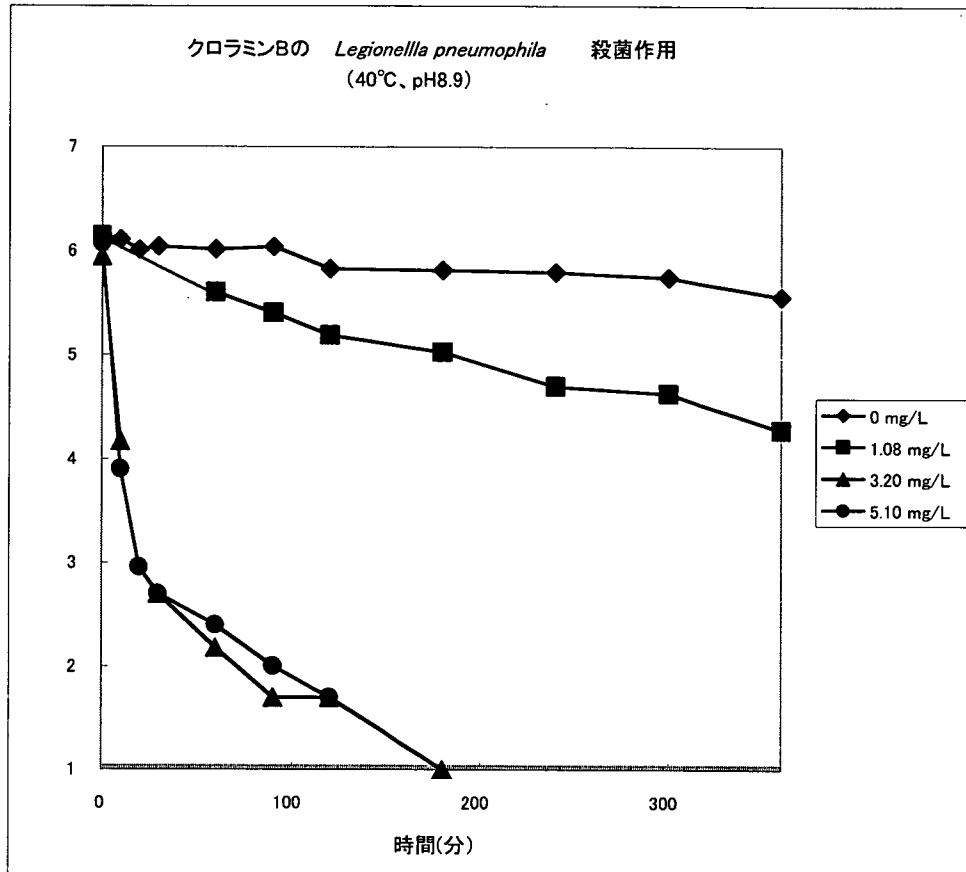


	クロラミン B 濃度 (塩素濃度として、mg/L)			
時間(分)	0	1.1	3.45	5.45
0	6.16	6.19	6.17	6.16
10	6.08	N.T.	3.95	3.49
20	6.03	N.T.	2.70	2.30
30	6.05	N.T.	<2.7	<1.7
60	6.04	5.18	<1.7	<1.7
90	6.13	5.08	<1.7	
120	6.12	4.85	<1.7	
180	6.10	4.35	<1.7	
240	6.15	3.85		
300	6.11	2.65		
360	5.93	<1.7		

図4 実験 2, pH 7.7

N.T.: not tested



クロラミン B 濃度 (塩素濃度として、mg/L)				
時間	0	1.08	3.2	5.1
0	6.15	6.14	5.95	6.08
10	6.11	N.T.	4.18	3.91
20	6.01	N.T.		2.95
30	6.04	N.T.	2.70	2.70
60	6.02	5.60	2.18	2.40
90	6.04	5.40	1.70	2.00
120	5.83	5.19	1.70	1.70
180	5.82	5.03	<1.7	
240	5.80	4.70		
300	5.75	4.63		
360	5.57	4.28		

図5 実験 2, pH8.9

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)

分担研究報告書

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究

一般細菌等へのクロラミンBの消毒効果の評価

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
研究協力者	神澤 啓	アクアスつくば総合研究所

研究要旨： 公衆浴場における浴槽水のレジオネラ属菌対策としては、塩素剤による消毒が一般的であるが、遊離残留塩素濃度を常時一定に維持して管理することは必ずしも容易でない。これは、遊離残留塩素の反応性に原因するもので、即効性で高い消毒効果という特性ゆえの短所である。また、高濃度に維持した場合は塩素臭刺激や皮膚刺激性、消毒副生成物、金属類に対する腐食性が問題となることがある。そこで塩素剤に代わるレジオネラ属菌の消毒方法として、結合型塩素であるクロラミンBの採用を検討した。本試験研究では、浴槽を想定したモデルにおいてクロラミンBと塩素剤(次亜塩素酸ナトリウム)のバイオフィルム生成に対する抑制効果を比較評価した。また、レジオネラ属菌の定着したモデル浴槽水を使用して、クロラミンB、塩素剤等によるレジオネラ属菌に対する殺菌効果を評価した。

その結果、クロラミンBのバイオフィルム抑制効果及びレジオネラ属菌殺菌効果が確認された。但し、クロラミンBの効果は塩素剤に比較して弱いこと及び長時間維持して効果を発揮させる使用方法が適することが示され、今後 実際の浴槽水において使用方法を確立するために有益な知見を得た。

A. 研究目的

公衆浴場における浴槽水のレジオネラ属菌対策を目的とした消毒は通常、塩素剤(次亜塩素酸ナトリウム溶液、塩素化イソシアヌル酸塩など)を添加して、遊離残留塩素濃度を0.2~1.0mg/L程度の範囲に常時維持することにより行われている。この処理により浮遊性のレジオネラ属菌を殺菌すると同時に、浴槽壁面やろ過装置のろ材へのバイオフィルム付着を抑制し、

浴槽水中のレジオネラ属菌を不検出に維持管理する。

しかし、遊離残留塩素は反応性が高いため、ヒトの入浴による有機物との接触やジェット浴での曝気、あるいは時間経過とともに濃度が変化しやすい。また濃度が高い場合は皮膚刺激性や臭気、消毒副生成物、金属材質に対する腐食性が問題となる。

クロラミンBは結合性の塩素であり、反応

性が緩やかなことから、遊離残留塩素の各種欠点が緩和される可能性がある。クロラミンBを使用した場合の、バイオフィルム生成抑制効果とレジオネラ属菌に対する殺菌効果等を評価し、クロラミンBの実浴槽水での適用可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 概要

試験は、①バイオフィルムの生成抑制効果を評価する試験 ②レジオネラ属菌に対する殺菌効果を評価する試験 の2種類を行った。

①バイオフィルム生成抑制試験

浴槽水を模した条件で、クロラミンB、塩素剤、無処理の3条件で、壁面へのバイオフィルムの付着状況、水中の細菌数等の経時変化を調査した。

②レジオネラ属菌殺菌試験

レジオネラ属菌の定着した循環式のモデル浴槽水を試験水として、クロラミンB、塩素剤、臭素剤を添加した場合のレジオネラ属菌数等の変化を調査した。

2. 消毒剤について

試験に使用したは消毒剤を以下に示す。

① クロラミンB:化学

$C_6H_5ClNNaO_2S \cdot xH_2O$ 、無水の場合の分子量は 213.62.

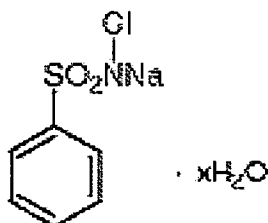


図1 クロラミンBの構造式

市販試薬(東京化成)を使用。試薬の25

重量%を全塩素濃度として検出した。

(3.7水塩相当) 水中の残留濃度はDPD法の全残留塩素測定法により求めた。

②塩素剤:12% 次亜塩素酸ナトリウム溶液(食品添加物規格品)

③臭素剤:1-ブロモ-3-クロロ-5,5-ジメチルヒダントイン(BCDMH)BWA社製グラニュール剤を純水に溶解して使用した。

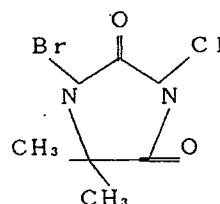


図2. BCDMHの構造式

3. 試験方法

3-1. バイオフィルム生成抑制試験

- ① つくば市水にグルコース 15mg/L(過マンガン酸カリウム消費量 30mg/L分)を添加した試験液を調製。
- ② 試験液8Lを角型開放容器に入れ、つくば市内の研究所1階南向き屋外(地上高1m)に設置し、水温 42℃維持、日中開放、夜間・休日は蓋をした。
- ③ 試験容器内に、シリコンゴム板(50×25×3mm)を複数枚数浸漬した。
- ④ 消毒条件は、無処理(薬品無添加)、次亜塩素酸ナトリウムによる遊離残留塩素濃度 0.5mg/L常時維持(ポーログラフ法残留塩素濃度測定計器により濃度測定、薬品を自動注入して残留濃度調整)、クロラミンBによる全残留塩素濃度 3mg/Lに調整(平日の朝と夕、人手により残留濃度を測定し薬品を添加)とした。

⑤ 定期的に角型開放容器の試験浴槽水を採取し、一般細菌数、従属栄養細菌数、ATP濃度を測定した。同時に水中に浸漬したシリコンゴム板(50×25×3mm)を取り出し、50mL遠沈管に入れ表面付着物を10mL滅菌水に懸濁させてその試験液の一般細菌数、従属栄養細菌数、ATP濃度を測定した。なお、ATP濃度は東亜DKK社製AF-100型により測定

した。

⑥ 試験終了時の各試験液の水質分析を行った。

試験実施中の様子を写真1.に示す。左から無処理、クロラミンB処理、塩素剤処理である。塩素剤処理では、循環システムを設けて遊離残留塩素濃度の測定及び自動薬液(次亜塩素酸ナトリウム溶液)注入を行っている。



写真1. バイオフィーム生成抑制試験の様子

3-2. レジオネラ属菌殺菌試験

① レジオネラ属菌の定着が確認されているモデル浴槽水(水槽容量500L、砂ろ過器を備えた循環式)3Lを5L容器に入れ、40℃に維持して攪拌した。

② 各種殺菌剤を所定濃度添加し、添加後30分、1時間、3時間、24時間に採水し殺菌剤の残留濃度を測定し、チオ硫酸ナトリウムで中和後、レジオネラ属菌数、一般細菌数を検査した。

③ 殺菌剤は、クロラミンB(全残留塩素濃度3mg/L)、次亜塩素酸ナトリウム(残留塩素濃度3mg/L)、BCDMH(臭素剤、残留塩素濃度3mg/L)とした。各殺菌剤の濃度は、初期の添加濃度であり追加投入はしていない。

試験に使用したモデル浴槽水の水質分析結果を表1に示す。

表 1 浴槽水の水質分析結果

項目	値
pH	8.4
電気伝導率(mS/m)	87
全硬度(CaCO ₃)	175
カルシウム硬度(CaCO ₃)	110
マグネシウム硬度(CaCO ₃)	65
塩化物イオン	140
酸消費量(pH4.8)(CaCO ₃)	92
シリカ	8
硫酸イオン	100

単位:pH、電気伝導率(mS/m)を除きmg/L

表 2 試験終了時の水質分析結果

試料名	無処理	NaClO	クロラミン B
pH	7.9	7.8	7.7
電気伝導率(mS/m)	29	50	32
全硬度(CaCO ₃)	77	70	69
カルシウム硬度(CaCO ₃)	50	43	42
マグネシウム硬度(CaCO ₃)	27	27	27
塩化物イオン	38	87	54
酸消費量(pH4.8)(CaCO ₃)	52	69	37
シリカ	3	3	3
過マンガン酸カリウム消費量	27	32	140

単位:pH、電気伝導率(mS/m)を除きmg/L

C. 結果と考察

1-1. バイオフィーム生成抑制試験

(1) 結果

試験開始後、21日目までの試験水中の細菌数等を調査した結果を表3及び図3、4、5に示す。また、シリコンゴム板に付着した細菌数等を調査した結果を表4及び図6、7、8に示した。水中の一般細菌数は、無処理で $10^4 \sim 10^5$ cfu/mLであるが、次亜塩素酸(以後塩素剤とする)、クロラミンBともほぼ10cfu/mL以下と高い殺菌効果を示した。従属栄養細菌数は、無処理で $10^5 \sim 10^6$ cfu/mLであるが、塩素

剤では10cfu/mL以下、クロラミンBでは 10^3 cfu/mL程度であった。ATP値は、無処理で $6 \sim 8 \times 10^2$ pmol/L、塩素剤で 10^1 pmol/L(一時120)、クロラミンBでは安定的に 2×10^1 pmol/L程度であった。シリコンゴム板のバイオフィーム付着量の評価では、一般細菌数は無処理で 10^5 cfu/mL程度、塩素が 10^1 cfu/mL程度、クロラミンBが 10^2 cfu/mL程度であった。同じく従属栄養細菌数は、無処理で 10^5 cfu/mL程度、塩素剤で 10^2 cfu/mL程度、クロラミンBで 10^3 cfu/mL程度であった。ATP値は、無処理で 10^2

pmol/L 程度、塩素剤で 10^1 pmol/L 程度、クロラミンBで 10^1 pmol/L 程度であった。試験終了時の各試験液の水質分析結果を表2に示した。

水質分析の結果では、塩素剤を添加したものは塩化物イオン濃度が上昇し、電気伝導率が上昇している、これは水の入れ替えが無いバッチ式試験に対して次亜塩素酸ナトリウムを添加し続けた結果、塩化ナトリウムが増加したものと考えられる。

また、次亜塩素酸ナトリウム溶液はアルカリ成分を含むため酸消費量(pH4.8)の値が増加している。クロラミンBの場合は、塩素剤に比較して塩化物イオンの増加は小さいが、化学物質としては有機物であるため、過マンガン酸カリウム消費量の値が大きくなっている。また、試験終了時の試験液は、クロラミンBを添加したものだけ、黄色く着色していた。試験終了時の各試験液の着色程度を写真2. に示す。

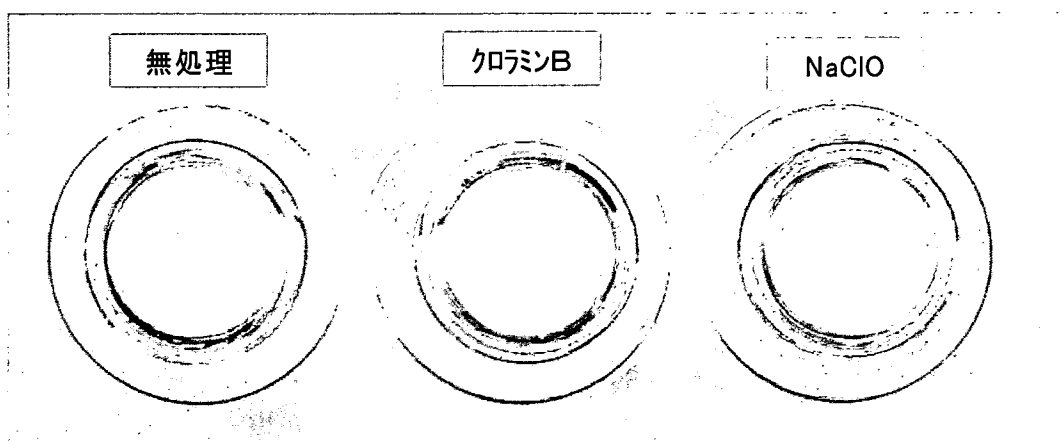


写真2. 試験終了時の試験液の着色の様子

(2) 考察

次亜塩素酸ナトリウムにより水中に遊離残留塩素を 0.5mg/L 程度維持することにより、無処理に比較して格段に、水中の細菌数及びバイオフィルム量を減らすことが出来ている。クロラミンBの場合、遊離残留塩素濃度維持の場合に比較して、水中およびバイオフィルムの細菌数は多くなっているが、無処理と比較した場合 100 分の一以下に抑制できており、効果が確認できた。次亜塩素酸による遊離残留塩素濃度の維持は、計器による連続測定と自動薬注により行ったが、クロラミンBによる全塩素濃度 3mg/L 維持は土日を除く

平日の朝夕の二回手動で行った。この場合も、残留濃度(全残留塩素濃度)が不検出になることは無く、残留濃度の維持管理が容易であると考えられた。

1-2. レジオネラ属菌殺菌試験

(1) 結果

無処理、次亜塩素酸ナトリウム、クロラミンB添加後の一般細菌数、レジオネラ属菌数の時間経過による測定値を表5及び図9、10に示す。各試験液中の残留塩素濃度の時間経過の値を表6示す。

レジオネラ属菌の殺菌効果は、いずれの消毒剤の場合も3時間の接触では十

分でなく、ほぼ初期菌数レベルのままであり最も効果の高いBCDMHの場合も75%の殺菌率であった。24時間後の測定ではレジオネラ属菌数が減少している。殺菌効果は、BCDMH>次亜塩素酸>クロラミンBの順番となっている。クロラミンBは、24時間の接触でレジオネラ属菌数を10分の一に減じている。本試験水の場合、塩素剤を3mg/L添加しても、24時間後に690 cfu/100mLのレジオネラ属菌が残存(殺菌率97.5%)する塩素剤が効きにくい特殊な条件であるが、相対的には十分な殺菌効果は得られていない。

一般細菌数は、30分の接触で98%の殺菌効果を得ている。無処理の場合は24時間後に菌数が増加しているのに対して、殺菌剤を添加したものは塩素剤では30分の状態を維持、BCDMHとクロラミンBは24時間後にはいずれも30分~3時間の菌数に比較して菌数を減少させている。

(2) 考察

クロラミンBのレジオネラ属菌に対する殺菌効果は、BCDMH、次亜塩素酸に比較して弱いと判断される。しかしながら、クロラミンBは全塩素としての残留効果が高く、24時間よりも長時間の接触による殺菌効果が期待される。このことは、残留成分の持続性が高いことにより、24時間後における一般細菌数に対する殺菌効果が高くなっていることからわかる。表6より、3時間後の残留濃度は塩素剤では0.2mg/Lに対し、BCDMHでは1.4~2.0mg/L、クロラミンBは全塩素で2~3mg/Lであった。この結果、24時間後の一般細菌数が塩素に比較してBCDMH

とクロラミンBでは低下していた。

クロラミンBを浴槽水の消毒用として使用する場合は、瞬間的な殺菌効果を期待するのではなく、長時間にわたり残留濃度を維持させることで、殺菌効果を発揮させることが望ましいと考えられた。

なお、本モデル浴槽水のレジオネラ属菌に対して、塩素剤をはじめとする各種酸化性殺菌剤の殺菌効果が十分でない理由についてはわかっていない。

D. 結論

- ・クロラミンBは、全残留塩素濃度として3mg/L程度維持することでバイオフィルムの生成量及び水中の細菌数を無処理時の100分の一以下に抑制することが出来た。
- ・消毒剤の残留濃度を常時維持した場合の水中の微生物殺菌・バイオフィルム抑制効果は、塩素剤0.5mg/LのほうがクロラミンBの全塩素3mg/Lよりも優れる。
- ・クロラミンBは水中の残留濃度に持続性があるので、間欠的に添加した場合の長時間経過後の消毒効果は塩素剤よりも優れる可能性が示された。
- ・クロラミンBのレジオネラ属菌に対する殺菌効果は今回の試験条件では不十分であったが、塩素剤でも効きにくい特殊な条件であることを考慮し更なる評価検討を行い実用性を見極める必要がある。

E. 研究発表

なし

A. F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

表3 バイオフィルム抑制試験、水中の細菌数等の推移

項目	①無処理				②次亜塩素酸Na				③クロラミンB			
	試験水				試験水				試験水			
	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)
12/6 0日												
12/7 1日	2700	5100	32	0	0	10	0	250	22			
12/10 4日	460000	520000	190	1	0	8	250	1500	16			
12/13 7日	560000	890000	350	0	0	8	1	7900	28			
12/17 11日	300000	1800000	690	7	10	3	0	2700	13			
12/20 14日	180000	230000	820	0	2	45	0	1400	21			
12/25 19日	75000	480000	630	3	5	120	4	700	23			
12/27 21日	91000	1200000	840	1	1	10	100	1000	19			

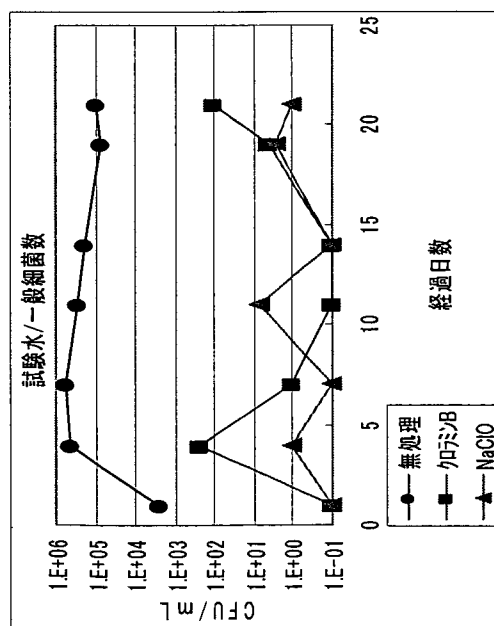


図3. 一般細菌数の推移

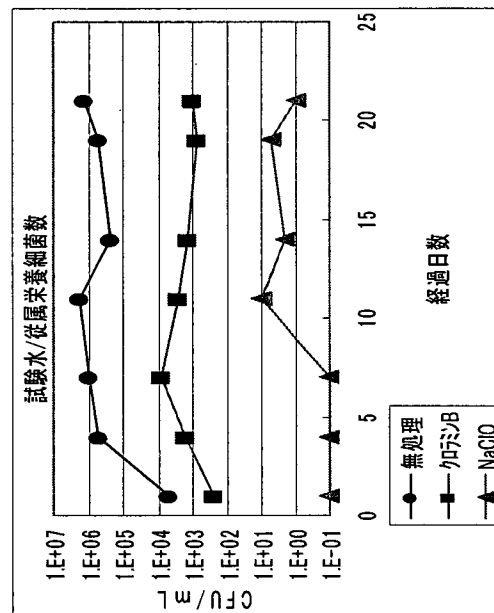


図4. 従属栄養細菌数の推移

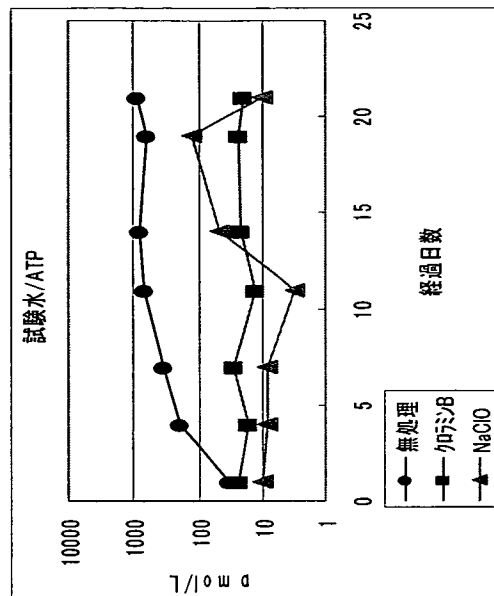


図5. ATP値の推移

表 4 バイオフィルム抑制試験、シリコンゴムの細菌数等の推移

項目	①無処理			②次亜塩素酸Na			③クロロミンB		
	シリコンゴム板			シリコンゴム板			シリコンゴム板		
	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)
12/6 0 日									
12/7 1 日	3000	3400	19	3	2	15	0	14	17
12/10 4 日	3200000	4100000	6900	1	25	16	560	7500	17
12/13 7 日	520000	800000	640	1200	3600	15	8400	14000	26
12/17 11 日	640000	860000	640	75	190	11	540	2000	130
12/20 14 日	120000	640000	640	0	40	17	34	1400	46
12/25 19 日	32000	150000	480	51	150	21	850	2100	23
12/27 21 日	130000	360000	410	25	42	27	49	330	16

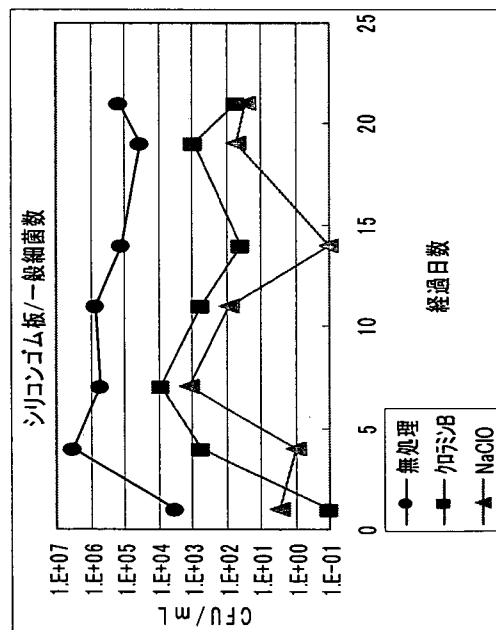


図 6. 一般細菌数の推移

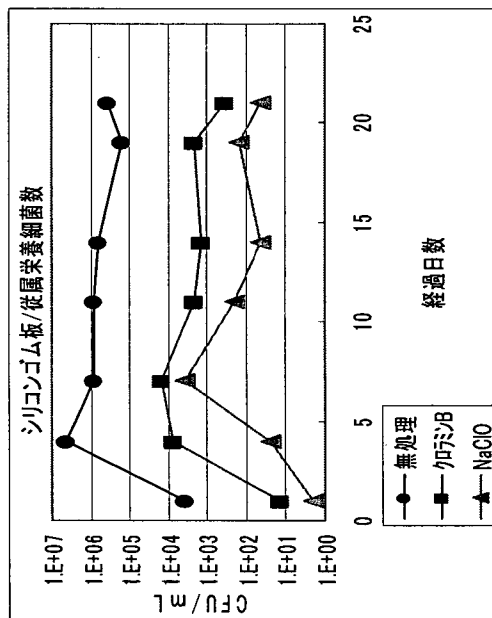


図 7. 従属栄養細菌数の推移

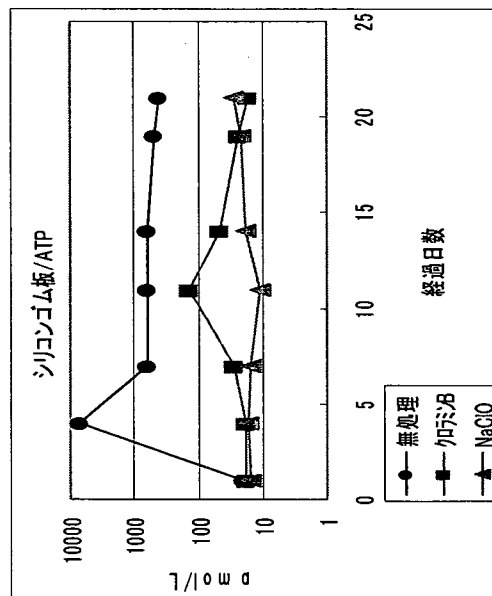


図 8. ATP 値の推移

表5 レジオネラ属菌殺菌試験、一般細菌数と、レジオネラ属菌数の経時変化

時間	無処理		クロラミンB		次亜塩素酸Na		BCDMH	
	一般細菌 (CFU/mL)	レジオネラ (CFU/100mL)	一般細菌 (CFU/mL)	レジオネラ (CFU/100mL)	一般細菌 (CFU/mL)	レジオネラ (CFU/100mL)	一般細菌 (CFU/mL)	レジオネラ (CFU/100mL)
開始時	5800	28000	5800	28000	5800	28000	5800	28000
30分	—	—	46	27000	150	46000	160	27000
1時間	—	—	100	20000	140	34000	160	12000
3時間	5200	24000	160	27000	150	19000	170	7200
24時間	170000	28000	3	3400	150	690	9	60

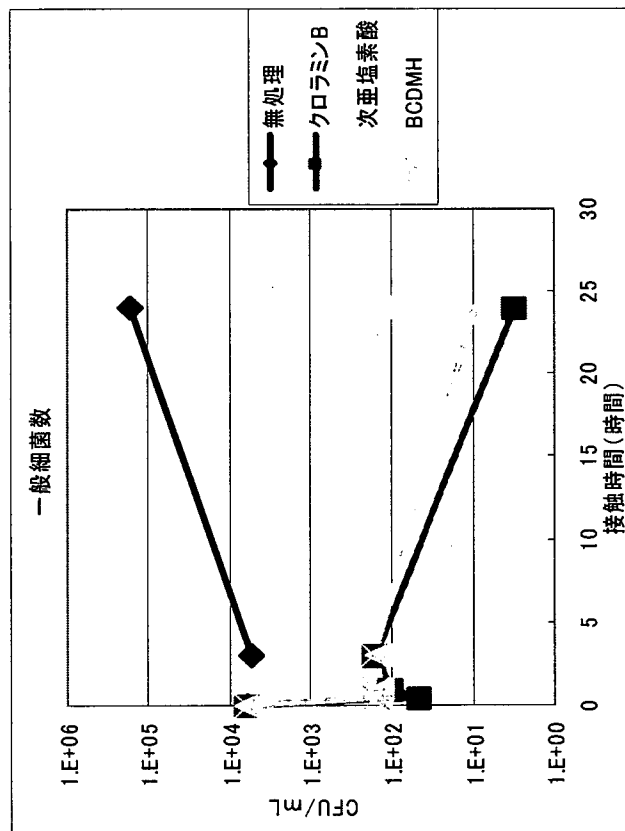


図9. 一般細菌数の推移

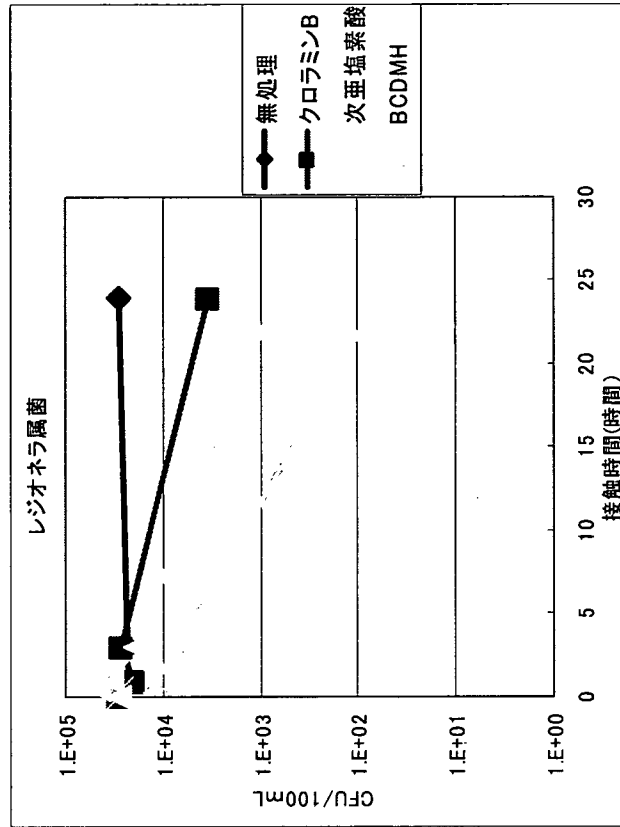


図10. レジオネラ属菌数の推移

表6 レジオネラ属菌殺菌試験、残留塩素濃度の経時変化

時間	クロラミンB		次亜塩素酸 Na	BCDMH
	残留塩素 (mg/L) 全塩素	遊離塩素	遊離塩素 (mg/L)	遊離塩素 (mg/L)
開始時	3.0	—	3.0	3.0
30分	3.0	3.0	0.3	3.0
1時間	3.0	1.4~2.0	0.2~0.3	1.0~1.5
3時間	2.0~3.0	1.4	0.2	1.4~2.0
24時間	0.7~1.0	0.3	<0.1	<0.1

添付資料 クロラミンB、塩素剤の金属に対する腐食性評価

目的：酸化性殺菌剤は金属材質に対する腐食性があるとされ、循環式浴槽で消毒のために使用した場合、腐食問題が懸念される。実用濃度を維持した場合のクロラミンB、塩素剤の軟鋼、銅材質に対する腐食性を評価した。

方法：つくば市水8Lを角型開放容器に入れ、つくば市内の研究所1階南向き屋

外(地上高1m)に設置し、水温 40℃維持、日中開放、夜間は蓋をした。

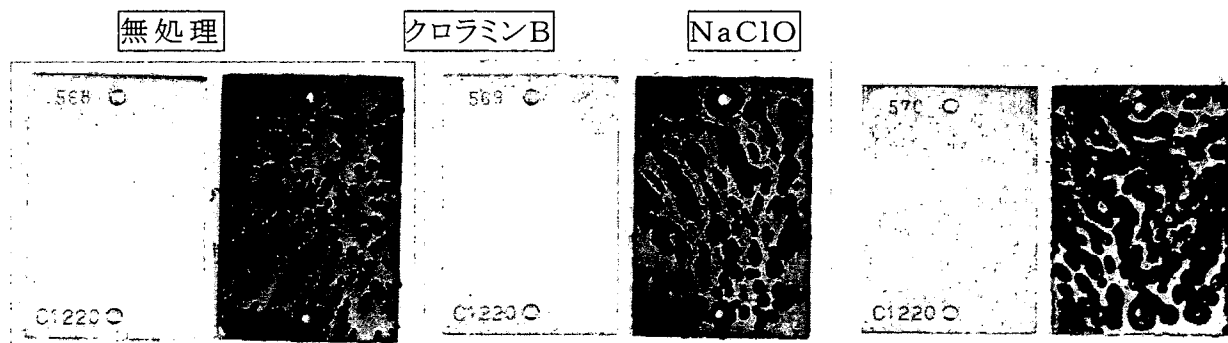
無処理、クロラミンBで全塩素濃度 3mg/L 維持、次亜塩素酸ナトリウムで遊離残留塩素濃度 0.5mg/L 維持の条件とし、腐食度を測定した。試験片は、軟鋼(SPCC)及び銅(C-1220)とし48時間浸漬前後の重量を測定し腐食減量を求めた。

結果：軟鋼及び銅の腐食速度(mdd)と試験片の外観を示す。

	無処理	クロラミンB	NaClO
軟鋼	180	139	160
銅	3.6	6.0	10.1

mdd:mg/dm²/day であり、1日 1dm²あたりの金属の腐食減量(mg)を示す。

試験片写真は、左が銅、右が軟鋼であり、取り出し直後の様子を示す。



考察：軟鋼に対しては、消毒剤を添加した場合、やや腐食速度が小さくなっている。軟鋼の腐食速度の測定には誤差が数10%の誤差があり得るが、本結果では酸化性殺菌剤により腐食速度が低下している可能性がある。この理由として、軟鋼の表面の酸化が促進され酸化性皮膜が防食的に働いたことが考えられる。

銅に関しては、次亜塩素酸ナトリウムでは試験片表面が変色し、溶解している状況である。クロラミンBは無処理に比較して腐

食速度は大きい次亜塩素酸ナトリウムに比較して腐食速度は小さくなっている。

結論：クロラミンBの銅に対する腐食性は、次亜塩素酸に比較して小さいことが確認された。但し、無処理に比較して銅材質の腐食速度が増加するので過剰な濃度で維持しないなどの注意が必要である。

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)
分担研究報告書

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究

民間検査機関に依頼されるレジオネラ検査試料の汚染実態

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

浴槽におけるレジオネラ属菌の集団感染を受けて、緊急避難的な措置として塩素消毒が義務付けられたが、浴槽水で感染したとされる患者数は増加の一途をたどっている。受託検査試料の測定結果に基づき、現在の浴槽の汚染状況について検討した。浴槽試料から培養で高濃度の検出が複数認められ、消毒の必要性を改めて確認した。ろ過機ドレーン等の培養試験では検討対象のほぼ全てから(29/30件)レジオネラ属菌が検出された。ろ過機内のバイオフィームは消毒では対処できず、定期的な洗浄が必要と考えられた。指針ではオーバーフロー槽を使用しないこととしているが、1施設3件の試料よりレジオネラ属菌が検出され、施設の改修等対策の徹底の必要性を改めて認識した。LAMP法による死菌の検出と培養による生菌の検出は、定性試験としての結果は一致したが、定量試験としては一致しなかった。このことは洗浄によって生菌が減少・検出されなくなることで説明がつくが、死菌が残留するということは洗浄が不徹底であることを意味しており、砂ろ過が有する欠陥を改めて認識した。

A. 研究目的

浴槽におけるレジオネラ属菌の集団感染を受けて、緊急避難的な措置として塩素消毒が義務付けられた。ところが、感染症情報センターの集計では、患者数は年々増加している。その多くが浴槽水で感染したとされ、患者分離株の *fla* 遺伝子による解析でも専ら浴槽型が検出されていると報告されている(前川純子ら、*Legionella pneumophila* 血清群 1 の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析、厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業「温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究、主任研究者：倉文明」H18 年度報告書より)。尿中抗原による検査方法の導入によって簡易に診断がつけられるようになったことが統計上の増加の第一理由と考えられるが、

浴槽施設のレジオネラ属菌の危険性は繰り返し喚起されており、それでも患者が発生し続ける現状の浴槽と消毒の必要性について今一度確認が必要と考えられる。

塩素消毒は特有の塩素臭を発生させることから浴槽施設での利用は嫌われるが、消毒剤が無ければ循環式を中心とする現在の浴槽施設ではレジオネラ属菌の増殖を抑えることができない。本来は循環式をやめて掛け流し式にすることが抜本的な解決策であることを繰り返し説いてきたが(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、H18 年度)、入浴者の大型浴槽への欲求と施設者の集客を目的とした設備投資、労働力削減による清掃の不徹底とこれに起因する衛生環境の悪化等々、浴槽施設を取り巻く状況は改善の兆しが

見られない。当該研究では現在の浴槽におけるレジオネラ属菌の最新の汚染状況を明らかにし、消毒あるいは洗浄の必要性について考察した。

LAMP法は死菌を検出することから生菌の検出とは一致するとは限らないが、逆に消毒剤の存在下でも汚染実態を把握することを可能とする利点を有しているといえる。当該研究では受託試料を検討対象として培養試験と核酸検出試験の実際について検討を行った。

B. 研究方法

試料水：平成19年度11～1月中に浴槽施設あるいは管理会社から検査会社に委託された試料の一部、172件を検討対象とした。これらは浴槽施設あるいは管理会社が自発的にレジオネラの検査依頼をしたもので、洗浄等の前後に採水した試料、すなわち採水前に操作の加わっていない実態に即した試料と考えられる。培養陽性試料を優先的に抜粋し、LAMP法による検出を試みた。採水箇所等の情報は受付票を用いた自己申告に従った。

試料調製：採水試料500mlをレジオネラ症防止指針に従って1/100倍にろ過濃縮し、濃縮試料5mlのうち1mlを培養法に使用し、2mlをLAMP法に用いた。培養は濃縮試料1mlを加熱処理(50℃、20分間)後、GVPC寒天培地(関東科学)およびWYOα寒天培地(栄研化学)に植菌した。

レジオネラ属菌の培養と同時に同一の試料を用いて一般細菌数の測定(日水製薬)を行なった。

LAMP法：レジオネラ核酸検出用のLAMPキット(栄研化学)を使用した。DNA抽出はフミン質の影響を回避する目的で、中性域でLysozyme(Sigma)とProteinaseK(Merck)により溶菌処理を行い、次いで微量サンプル対応用のシリカ・

カラム(GLサイエンス)とQiagenQIAamp DNA抽出試薬セットを用いてDNA精製を実施した(平成19年度厚生科学研究報告「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究(主任研究者:倉 文明)」参照)。濃縮試料2mlから20μLにDNAを精製抽出し、熱処理95℃5分の後に5μLを反応に使用した。一部試料は大腸菌群、過マンガン酸カリウム消費量、濁度、pH、色度を併せて測定した。

C. 研究結果および考察

試料水：測定試料の一覧を表1に示す。平成19年度に都内の民間検査機関に搬入された浴槽水等の環境試料におけるレジオネラ属菌の培養陽性率は8%(311/3,719)であった(unpublished data)。当該研究では同年度のある期間に限定して集められた試料を対象としたが、同一事業所由来の試料水の重複を避けたところ172試料となった(内、培養陽性試料は72検体、42%)。172試料の内訳は、浴槽水試料142件と、それ以外の場所の水試料30件(ろ過機ドレン、1件;オーバーフロータンク、2件;源泉貯湯槽、3件;連通管ドレン、4件;ヘアキャッチャードレン、5件)であった。

培養方法：市販のWYOα、およびGVPCの2種類の培地を使用した。培養結果はGVPC培地を用いた場合に多検体で陽性結果を得た(表2)。したがって、培養による陽性率はGVPC培地での検出結果を使用した。

浴槽試料142件のうち、43件が培養でレジオネラ属菌陽性で、その12検体は100cfu/100mlを超え、6検体は1,000cfu/100mlを超えていた。浴槽水から分離されたレジオネラ菌数の最高値は

ら分離されたレジオネラ菌数の最高値は $7 \times 10^5 \text{cfu}/100\text{ml}$ で、未だに高濃度に汚染された浴槽が存在していた。浴槽以外の試料水 30 件の培養結果は源泉タンクの 1 件を除く 29 件 (97%) よりレジオネラ属菌が検出された。なお、源泉タンクの 1 件は、LAMP 法で核酸を検出しており、これ含めれば全 30 件でレジオネラ属菌が検出された。

浴槽水とそれ以外の試料との菌数を比較すると、浴槽水以外の試料において明らかに高濃度であった。確率頻度分布図では両者は概ね平行した直線となり、対数正規分布を示すものと判断された (図 1)。採水方法の統一が難しいかもしれないが、より高い濃度の測定値が得られていることを考慮すれば、レジオネラ検査を浴槽水から他の部分の試料水に換えることで、方法を変えることなく感度を上げることができるものとする。今後の検討事項とする。

1 施設において 3 件のオーバーフロータンク (OF タンク) の記載があった。溢水をせず、オーバーフロー水を回収して再利用している施設が存在することが判明した (表 1)。オーバーフロー水には入浴者由来の多量の有機物汚れ (スカム) を含むこと、清掃が難しいことから、最もレジオネラ属菌の繁殖し易い構造である。よって、多くの条例等の指導書ではその使用の自粛が謳われている (厚生労働省告示第二百六十四号 (平成十五年七月二十五日) 「レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針」)。

レジオネラ属菌の培養試験は 1 週間程度を要することから迅速な代替試験法が求められている。レジオネラの代替指標の候補として一般細菌数試験を並行的に実施した。報告によっては一般細菌数の多い環境ではレジオネラが発生する確率が高いとする報告がある (岩淵香織ら、掛け流し式温泉の温泉成分検査、微生物実

態調査、および施設の衛生管理状況についての調査、厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業「温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究、主任研究者: 倉文明」H18 年度報告書より)。当該研究の結果からは両者の間に直接の相関が認められず、代替試験法としての利用は否定的であった (図 2)。一方、一般細菌の濃度とレジオネラ属菌の出現確率の間には比例関係が認められ、倉らの報告した相関が確認された (図 3)。浴槽システムでは、雑菌類を餌としてアメーバが増殖し、そのアメーバに感染してレジオネラ属菌が増殖する。従って、一般細菌数が高ければレジオネラ属菌が検出される確率が高くなるのは自然で、この確率上の相関が一般細菌数試験に向けられる期待の源と考えられた。直接の相関が無い一般細菌数測定を代替試験とすることには無理があるが、日常の管理指針、換言すればリスク管理上の指標としては利用可能と判断された。

核酸試験法について当該研究でも併せて測定を行った。定性試験としての比較を行った場合、培養陽性と一致する結果 (X^2 乗検定有意水準 $P=0.001$) が得られた (表 3)。培養陽性で LAMP 陰性の 9 試料は、1 例 (*Legionella* spp. の $1,590 \text{cfu}/100\text{ml}$) を除き菌数の少ない試料 ($10 \sim 150 \text{cfu}/100\text{ml}$) であった。問題の 1 例については菌種、阻害物質、手技の問題のいずれにあるのか検討中である。培養陰性で LAMP 陽性は 23 試料あり、死菌が含まれているものと考えられた。LAMP 法で陽性となった試料は培養法で 73% ($63/86$) が陽性となっており、迅速な定性試験法としての利用には問題が無いものと判断された。

一方、検量線を利用した LAMP 法による菌数の定量結果と培養菌数を比較した場合は相関が認められなかった (図 4、相関

係数 $R^2=0.08$)。本試験が定量性に欠ける原因は不明であるが、試料採取が洗浄・消毒の前後に限定されていたり、生菌が消毒剤によって障害されていたりすること、あるいは洗浄が不十分で死菌が残留している可能性があることなど多くの要因が推察される。引き続き、検討の予定である。

D. 結論

浴槽におけるレジオネラ属菌の感染事故は増加しつつあり、消毒あるいは洗浄の必要性を考えることを目的として現在の浴槽の汚染状況について検討した。浴槽試料

から高濃度にレジオネラ属菌が培養で検出され、消毒の必要性を改めて確認した。浴槽以外の試料では、ほぼ全ての試料からレジオネラ属菌が検出され、徹底した洗浄が必要と考えられた。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

表 1 測定試料一覧

検体番号	GYPC (cfu/100 ml)	WYO (cfu/100ml)	血清型	LAMP(検体)	LAMP Tt値	LAMP 計算濃度 (cfu/ml)	備考	一般生菌数 (cfu/ml)	採取者2	採水箇所	ドレン等 *1	施設No	検水種類	検水種類2 *2	消毒状 況*2	消費状 況*2
7065	10	60		+	1,152	1,802		14,000	業者	ろ過機ドレン	1	12	温泉水	循環式 公衆浴場		
8030	20	0		+	2,430	7		5,520	業者	シルクろ過機ドレン	1	90	浴槽水	循環式 公衆浴場		
6898	30	0		+	1,434	106		400,000	業者	露天日管透過ドレン	1	42	浴槽水	循環式 公衆浴場		
7376	50	40		+	1,368	313		100	業者	女子プール 濾過器ドレン	1	22	浴槽水	循環式 公衆浴場		
7984	50	20	L.SG5	+	3,132	0		50	業者	濾過器ドレン	1	22	浴槽水	循環式 公衆浴場		
7981	70	90		+	1,692	197		1,720	業者	濾過器ドレン	1	22	浴槽水	循環式 公衆浴場		
8031	70	40	L.spp	-	0	0		55,000	業者	露天ろ過機ドレン	1	90	浴槽水	循環式 公衆浴場		
6821	90	120		+	1,200	517		12,000	業者	シルクろ過ドレン	1	80	浴槽水	循環式 公衆浴場		
7066	100	0		+	1,242	657		18,000	業者	ろ過機ドレン	1	12	温泉水	循環式 公衆浴場		
7374	100	350		+	1,332	363		11,000	業者	女子ハイプラ 濾過器ドレン	1	22	浴槽水	循環式 公衆浴場		
6899	210	500		+	1,272	253		240,000	業者	露天風呂透過ドレン	1	42	浴槽水	循環式 公衆浴場		
8115	260	0		+	2,352	30	検水水色	44,000	業者	主浴槽 濾過機ドレン	1	10	浴槽水	循環式 公衆浴場		
6817	1220	2800		+	1,206	483	濁り 臭い 水色	56,000	業者	寝湯ろ過機ドレン 5秒後	1	44	浴槽水	循環式 公衆浴場	毎日	毎日
8300	1590	430	L.spp	-	0	0		4,000	業者	男子主浴ろ過機ドレン	1	97	浴槽水	循環式 公衆浴場		
6895	2200	1640		+	1,584	78		880	業者	白湯透過ドレン	1	42	浴槽水	循環式 公衆浴場		
6346	2,300	2,210		+	1,284	229		180,000	業者	露天ドレン	1	10	浴槽水	循環式 公衆浴場		
6819	2800	4000		+	1,206	483	濁り 臭い 水色	14,600	業者	寝湯ろ過機エア抜き30秒後	1	44	浴槽水	循環式 公衆浴場	毎日	毎日
6818	4000	5000		+	1,212	451	濁り 臭い 水色	31,200	業者	寝湯ろ過機ドレン 30秒後	1	44	浴槽水	循環式 公衆浴場	毎日	毎日
8434	10	60		+	1,158	3,687		4,560	業者	主浴 OFタンク	2	88	浴槽水	循環式 公衆浴場		
8436	40	10	L.spp	-	0	0	検水水色	1,680	業者	日替り OFタンク	2	88	浴槽水	循環式 公衆浴場		
8435	140	170		+	1,380	597		3,600	業者	露天 OFタンク	2	88	浴槽水	循環式 公衆浴場		
7241	0	0		+	1,200	3,965		60,000	業者	男性源泉	3	59	浴槽水	循環式 公衆浴場		
8249	10	0	L.spp	-	0	0	検水水色	7,000	業者	高温泉槽	3	95	温泉水	循環式 公衆浴場		
8148	10	0		+	2,208	196		360,000	業者	岩風呂連通管ドレン	4	93	浴槽水	循環式 公衆浴場		

表 1 測定試料一覧 (続き)

検体番号	GVPC (cfu/100 ml)	WYCO (cfu/100ml)	血清型	LAMP(定性)	LAMP T値	LAMP 計算濃度 (cfu/ml)	備考	一般生菌数 (cfu/ml)	採取者2	採水箇所	ドレン等 *1	施設№	採水種類1	採水種類2	採水施設	汚染状 況*2	消滅状 況*2
7603	360	1,500		+	1,104	3,805		3	業者	操場 通過管ドレン 30秒後	4	44	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6816	1810	5400		+	1,362	140	緑色 黄色	26,000	業者	操場 通過管ドレン 30秒後	4	44	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6815	3400	7600		+	1,260	280	緑色 黄色	18,400	業者	操場 通過管ドレン 5秒後	4	44	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6345	10	20		+	2,022	7	緑色 黄色	600,000	業者	JETヘアキッチャー	5	10	浴槽水	循環式	公衆浴場		
7519	10	10		+	1,332	363		360	業者	女下着コーナーシャワーヘアキッチャードレン	5	87	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
7518	20	210		+	1,350	335		1,560	業者	男子スローハークシャワーヘアキッチャードレン	5	87	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6299	0	0		-	0			1	業者	浴槽		1	浴槽水	循環式	老人ホーム	毎日	
6302	0	0		-	0			0	業者	女子JET浴槽		2	浴槽水	循環式	宿泊施設		
6311	0	0		-	0			23	業者	浴槽		3	浴槽水	循環式	ホテル/クラブ	一週間	毎日
6319	0	0		+	3096	0.05		0	業者	浴槽		4	浴槽水	循環式	老人ホーム	毎日	毎日
6341	0	0		-	0			430	業者	ジャグジー		5	浴槽水	循環式	エステ	毎日	
6342	0	0		-	0			1,500	業者	ジャグジー		6	浴槽水	循環式	エステ	毎日	
6343	0	0		-	0			0	業者	水風呂		6	浴槽水	循環式	エステ	毎日	
6362	0	0		-	0			51	業者	浴槽		7	浴槽水		運動場		
6410	0	0		-	0			0	施設者	24時間循環浴槽		8	浴槽水	循環式	老人ホーム	一週間	毎日
6446	0	0		-	0			2,112	業者	家族風呂		9	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6451	0	0		+	3120	0.05		0	業者	女性露天		9	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6480	0	0		-	0			0	業者	主浴槽		10	浴槽水	循環式	公衆浴場		
6516	0	0		-	0			15	業者	女子浴槽		11	浴槽水	循環式	公衆浴場		
6528	0	0		+	2292	0.66		0	業者	男子ジェット浴槽		12	浴槽水		公衆浴場		
6558	0	0		-	0			9	業者	特殊浴槽		13	浴槽水		福祉施設		
6559	0	0		-	0			0	業者	特殊浴槽		13	浴槽水		福祉施設		
6560	0	0		-	0			62	業者	特殊浴槽		13	浴槽水		福祉施設		
6561	0	0		-	0			8,000	業者	特殊浴槽		13	浴槽水		福祉施設		
6562	0	0		-	0			110	業者	特殊浴槽		13	浴槽水		福祉施設		

表 1 測定試料一覧 (続き)

検体番号	GVPC (cfu/100 ml)	WYVO (cfu/100ml)	血清型	LAMP(定性)	LAMP Tt値	LAMP 計数濃度 (cfu/ml)	備考	一般生菌数 (cfu/ml)	採取者Z	採取箇所	ドレン等 #1	施設No.	検水種類 #2	検水種類2 #2	採水施設	濃縮状 状況#2	濃縮状 状況#2
6567	0	0		-	0			0	施設者	白湯		14	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6570	0	0		+	1608	3,373		550	施設者	白湯		15	浴槽水	循環式	公衆浴場	一週間	毎日
6572	0	0		+	1746	249,777		1,270	施設者	男湯 浴槽		16	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	一ヶ月
6574	0	0		-	0			0	施設者	浴槽		17	浴槽水	循環式	公衆浴場	毎日	一週間
6577	0	0		-	0			1	業者	浴槽		18	浴槽水	循環式	老人ホーム	一週間	毎日
6592	0	0		-	0			0	施設者	浴槽		19	浴槽水	循環式	公衆浴場		
6595	0	0		-	0			0	施設者	男湯白湯		20	浴槽水		公衆浴場	一週間	毎日
6597	0	0		+	1266	401		20	施設者	男湯 マグナムバス		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6598	0	0		-	0			0	施設者	男湯 露天岩風呂		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6599	0	0		-	0			0	施設者	男湯 桜風呂		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6600	0	0		-	0			0	施設者	男湯 あつ湯		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6601	0	0		-	0			0	施設者	男湯 水風呂		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6602	0	0		-	0			0	施設者	女湯 ダイエットバス		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6603	0	0		-	0			0	施設者	女湯 露天岩風呂		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6604	0	0		-	0			0	施設者	女湯 白湯		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6605	0	0		-	0			0	施設者	女湯 あつ湯		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6606	0	0		-	0			0	施設者	女湯 水風呂		21	温泉水	循環式	公衆浴場	毎日	毎日
6613	0	0		-	0			0	業者	女子浴槽		22	浴槽水	循環式	公衆浴場		
6621	0	0		+	1944	2,56		40,800	業者	露天浴槽		10	浴槽水	循環式	公衆浴場		
6625	0	0		-	0			0	業者	内風呂		23	浴槽水	循環式	公衆浴場	一週間	毎日
6640	0	0		-	0			5	施設者	浴槽		24	浴槽水		公衆浴場	毎日	
6642	0	0		-	0			1	施設者	薬湯		25	浴槽水		公衆浴場	毎日	毎日
6646	0	0		-	0			50,000	施設者	浴槽		26	浴槽水		公衆浴場	毎日	毎日
6650	0	0		-	0			26	業者	浴槽		27	浴槽水	循環式	公衆浴場	一週間	毎日
6668	0	0		-	0			0	施設者	浴槽		28	浴槽水	循環式	公衆浴場	一週間	毎日