

Table 2 Microbial contamination of hot spring samples (n = 403)

Organism	Parameter	Bathtub	Inlet faucet Pouring gate	Storage tank	Source	Total
<i>Legionella</i> spp.	No. of positive samples/total (%)	78/198 (39.4)	33/148 (22.3)	5/21 (23.8)	3/36 (8.3)	119/403 (29.5)
	with $\geq 10^2$ CFU/100mL	29/198 (14.6)	9/148 (6.1)	2/21 (9.5)	1/36 (2.8)	41/403 (10.2)
	Geometric mean (CFU/100mL)	$8.1 \times 10$	$4.1 \times 10$	$8.0 \times 10$	$4.8 \times 10$	$6.6 \times 10$
	Maximum count (CFU/100mL)	$6.8 \times 10^3$	$4.0 \times 10^3$	$6.7 \times 10^2$	$1.8 \times 10^2$	$6.8 \times 10^3$
Amoebae	No. of positive samples/total (%)	57/188 (30.3)	6/137 (4.4)	4/21 (19.0)	1/33 (3.0)	68/379 (17.9)
	Geometric mean (PFU/100mL)	$3.5 \times 10$	$2.0 \times 10$	$1.2 \times 10$	5	$3.2 \times 10$
	Maximum count (PFU/100mL)	$2.5 \times 10^3$	$1.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10$	5	$2.5 \times 10^3$
<i>Mycobacterium</i> spp.	No. of positive samples/total (%)	7/189 (3.7)	0/136 (0.0)	0/21 (0.0)	0/34 (0.0)	7/380 (1.8)
	Geometric mean (CFU/100mL)	$2.1 \times 10$				$2.1 \times 10$
	Maximum count (CFU/100mL)	$1.0 \times 10^2$				$1.0 \times 10^2$
<i>Escherichia coli</i>	No. of positive samples/total (%)	80/198 (40.4)	6/124 (4.8)	1/17 (5.9)	0/30 (0.0)	87/369 (23.6)
	Geometric mean (MPN/100mL)	$4.2 \times 10$	$1.2 \times 10$	9		$3.8 \times 10$
	Maximum count (MPN/100mL)	$2.4 \times 10^3$	$1.5 \times 10^2$	9		$2.4 \times 10^3$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No. of positive samples/total (%)	60/195 (30.8)	5/121 (4.1)	1/17 (5.9)	1/29 (3.4)	67/362 (18.5)
	with $\geq 10$ MPN/100mL	32/195 (16.4)	1/121 (0.8)	1/17 (5.9)	1/29 (3.4)	35/362 (9.7)
	Geometric mean (MPN/100mL)	$2.8 \times 10$	7.4	$1.4 \times 10^3$	$2.4 \times 10^2$	$2.8 \times 10$
	Maximum count (MPN/100mL)	$2.4 \times 10^3$	$1.5 \times 10^2$	$1.4 \times 10^3$	$2.4 \times 10^2$	$2.4 \times 10^3$
<i>Staphylococcus aureus</i>	No. of positive samples/total (%)	60/195 (30.8)	3/121 (2.5)	0/17 (0.0)	0/29 (0.0)	63/362 (17.4)
	with $\geq 10^2$ MPN/100mL	13/195 (6.7)	0/121 (0.0)	0/17 (0.0)	0/29 (0.0)	13/362 (4.1)
	Geometric mean (MPN/100mL)	$2.3 \times 10$	3.3			$2.1 \times 10$
	Maximum count (MPN/100mL)	$2.4 \times 10^3$	4			$2.4 \times 10^3$

Table 3 Isolation of *Legionella* and Amoebae at different temperature and pH

Characteristic	No. of positive samples/total (%)*			
	Bathtub		Inlet faucet/pouring gate, Storage tank, Source	
	<i>Legionella</i> spp.	Amoebae	<i>Legionella</i> spp.	Amoebae
Temperature				
55°C $\leq$			1/26 (3.8)	0/24 (0.0)
50-54°C	0/4 (0.0)	0/4 (0.0)	4/31 (12.9)	0/28 (0.0)
45-49°C	4/11 (36.4)	5/11 (45.5)	10/39 (25.6)	0/39 (0.0)
< 45°C	74/183 (40.4)	52/173 (30.1)	26/109 (23.9)	11/100 (11.0)
pH				
8.5 $\leq$	15/30 (50.0) <sup>a</sup>	11/30 (36.7) <sup>a</sup>	10/35 (28.6) <sup>a</sup>	7/30 (23.3)
7.5-8.4	40/81 (49.4) <sup>a</sup>	31/74 (41.9) <sup>c</sup>	20/80 (25.0) <sup>a</sup>	2/74 (2.7)
6.0-7.4	21/44 (47.7) <sup>a</sup>	15/42 (35.7) <sup>c</sup>	10/37 (27.0) <sup>a</sup>	2/35 (5.7)
3.0-5.9	2/11 (18.2) <sup>a</sup>	0/11 (0.0) <sup>df</sup>	1/8 (12.5) <sup>a</sup>	0/8 (0.0)
< 3.0	0/32 (0.0) <sup>b</sup>	0/31 (0.0) <sup>b,d</sup>	0/45 (0.0) <sup>b</sup>	0/44 (0.0)

\*Isolation differed significantly between a and b; c and d; e and f.  
(Tukey multiple comparison test,  $p < 0.05$ ).

黄泉, 塩素濃度 0.2mg/L 以上で検出率が低下する傾向がみられたが, 多重ロジスティック回帰分析で有意な関係は認められなかった。

### 考 察

一般に, 掛け流し式温泉は循環式浴槽に比較してレジオネラ属菌汚染のリスクは小さいというイメージがあるが, これは過去の集団感染事例がレジオネラ属菌に高濃度に汚染された循環式浴槽によって引き起こされたことによる<sup>12)</sup>. 温泉のレジオネラ汚染に関する全国調査では, 笹原ら<sup>7)</sup>が循環式浴槽を中心とした調査で49.5%, 古畑ら<sup>8)</sup>が循環式38.0%, 掛け流し式27.3%の検出率を報告している. 今回, 掛け流し式温泉を対

象とした全国調査の結果, 浴槽水の39.4% (78/198件) からレジオネラ属菌が検出され, 掛け流し式浴槽においても循環式浴槽と同程度の頻度で検出されることを明らかにした. 検出菌数は100CFU/100mL未満の試料が62.8% (49/78件) を占め (Table 2), 循環式浴槽 (35~48%)<sup>7,8)</sup>と比較すると低濃度側に分布していると考えられる. しかし, 100 CFU/100mL未満であっても, 糖尿病等の基礎疾患を持つ易感染者ではエアロゾルの多い環境で感染が成立するため<sup>13)</sup>, 今後一層の衛生管理の充実が望まれる. 今回の調査で, 掛け流し式温泉での汚染場所が明らかとなったことは重要である. 湯口からの源湯が汚染されていれば浴槽の

Table 4 *Legionella* species and serogroups isolated in hot spring water (n = 403)

Organism	No. of positive samples (%)				
	Total	pH		Temperature (°C)	
		< 7.5	7.5 ≤	< 45	45 ≤
<i>L. pneumophila</i>	102 (85.7)	27 (79.4)	75 (88.2)	84 (84.0)	18 (94.7)
serogroup 1	26 (21.8)	13 (38.2)	13 (15.3)	18 (18.0)	8 (42.1)
2	1 (0.8)		1 (1.2)	1 (1.0)	
3	21 (17.6)	5 (14.7)	16 (18.8)	17 (17.0)	4 (21.1)
4	17 (14.3)	3 (8.8)	14 (16.5)	12 (12.0)	5 (26.3)
5	25 (21.0)	4 (11.8)	21 (24.7)	22 (22.0)	3 (15.8)
6	26 (21.8)	5 (14.7)	21 (24.7)	22 (22.0)	4 (21.1)
7	4 (3.4)		4 (4.7)	3 (3.0)	1 (5.3)
8	6 (5.0)	3 (8.8)	3 (3.5)	5 (5.0)	1 (5.3)
9	5 (4.2)	3 (8.8)	2 (2.4)	5 (5.0)	
10	8 (6.7)	2 (5.9)	6 (7.1)	7 (7.0)	1 (5.3)
11	2 (1.7)	1 (2.9)	1 (1.2)	2 (2.0)	
13	1 (0.8)		1 (1.2)	1 (1.0)	
15	1 (0.8)		1 (1.2)	1 (1.0)	
UT	28 (23.5)	4 (11.8)	24 (28.2)	22 (22.0)	6 (31.6)
<i>L. dumoffii</i>	2 (1.7)	1 (2.9)	1 (1.2)	1 (1.0)	1 (5.3)
<i>L. londiniensis</i>	8 (6.7)	1 (2.9)	7 (8.2)	4 (4.0)	4 (21.1)
<i>L. micdadei</i>	1 (0.8)		1 (1.2)	1 (1.0)	
<i>L. oakridgensis</i>	5 (4.2)		5 (5.9)	5 (5.0)	
<i>L. rubrilucens</i>	2 (1.7)		2 (2.4)	2 (2.0)	
Other <i>Legionella</i> spp.	23 (19.3)	10 (29.4)	13 (15.3)	21 (21.0)	2 (10.5)
Total	119 (100)	34 (100)	85 (100)	100 (80)	19 (100)

汚染リスクは7倍に上昇することから (Table 5), 浴槽のみならず湯口あるいは上流側での定期検査を実施し, 汚染場所を特定した上で適切な対策を講じる必要があると考えられる。

レジオネラ属菌は pH 3.0以下の酸性泉や 65°C 以上の高温では棲息できないことが知られている<sup>9)</sup>。有機物汚染の激しい浴槽と汚濁負荷の小さい上流側とを区別してリスク評価を行った結果, 両者に共通のリスク要因は pH であった。今回の調査では pH 3.0~5.9 の弱酸性泉が少なかったため pH 6.0 を境界として評価したが, pH 6.0未満ではレジオネラ汚染リスクは 0.06~0.12 倍に低下した。Ohno ら<sup>10)</sup>は温泉中のレジオネラ属菌が pH 5.0の酸性条件で長時間増殖能を維持できることを実験的に示しているが, 今回 pH 6.0未満の温泉で検出率が低下した要因として, レジオネラの増殖装置の役割を果たすアメーバが pH 6.0未満で全く検出されなかったこと (Table 3) が考えられた。

湯口から上流側においては, pH に次いでレジオネラ汚染の重要なリスク因子は温度である。レジオネラ属菌の至適増殖温度は 32~42°C で, 48.4~50.0°C が上限とされる<sup>9)</sup>。今回の調査でレジオネラ属菌検出の上限は 56.3°C の湯口水で, 55°C 以上のオッズ比は 50°C 未満の 1/10 に低下した (Table 6)。調査した施設の 6 割は貯湯槽を保有しているが, 衛生管理要領等に定める 60°C 以上で管理している施設は 4 割に満た

ない (Table 1)。「温度」は構造が単純な掛け流し式温泉において施設側で制御し得る数少ない指標であり, 貯湯槽を加温するなど可能な限り高温で維持することが有効と考えられた。温度管理が困難な場合の次善策として塩素消毒が挙げられる。消毒を実施している施設数が少ないため有意な結果は得られなかったが, 0.2mg/L 以上で汚染リスクに低下傾向がみられた (Table 6)。貯湯槽や配湯管の清掃頻度とレジオネラ汚染との相関が得られなかったことから, pH 6.0以上の温泉では湯口より上流の温度を少なくとも 55°C 以上に維持するか, 遊離塩素濃度を 0.2mg/L 以上に保つことが必要であろう。

一方, 浴槽水のレジオネラ汚染に関しては, 湯口水の汚染が明らかでない場合でも, 39.5% (45/114) の浴槽水からレジオネラ属菌が検出されることは注目される (Table 5)。このうち, 湯口陰性が確認された浴槽 82 件中 37 件 (45.1%) からレジオネラ属菌が高率に検出されており, 湯口上流での検出率 (20.4%) と比較すると (Table 6), 掛け流し式温泉においては浴槽での汚染が極めて大きな割合を占めると考えられる。多重ロジスティック回帰分析で浴槽のリスク因子を評価した結果, 浴槽の容量が 5m<sup>3</sup> 以上でレジオネラ汚染が有意に増加することが明らかとなった。単変量解析では浴槽の洗浄に高圧洗浄などブラシを使わない場合にオッズ比が有意に高かったが, 多重ロジスティック回帰分析では除外された。その原因として,

Table 5 Risk factor analysis for *Legionella* contamination in bathtub water (uni- and multivariate logistic regression analysis)

Risk factors	<i>Legionella</i> spp. positive/total (%)	univariate model OR (95%CI)	multivariate model OR (95%CI)	p
Total	64/137 (46.7)			
<i>Legionella</i> contamination of inlet faucet/pouring gate water				
- <i>Legionella</i> -positive	19/23 (82.6)	7.28 (2.32-22.8) <sup>c</sup>	6.98 (2.14-22.8)	0.001
- Negative or not examined	45/114 (39.5)	1.00	1.00	
pH				
- $\geq 6.0$	62/120 (51.7)	1.00	1.00	
- $< 6.0$	2/17 (11.8)	0.12 (0.03-0.57) <sup>b</sup>	0.12 (0.02-0.63)	0.012
Quality of hot spring				
- Chloride and/or bicarbonated spring	26/42 (61.9)	1.86 (0.79-4.37)		
- Simple hot spring	21/45 (46.7)	1.00		
- Sulfate spring	9/24 (37.5)	0.69 (0.25-1.89)		
- Sulfur spring	8/26 (30.8)	0.51 (0.18-1.41)		
Chlorine concentration				
- $\geq 0.2$ mg/liter	2/8 (25.0)	0.36 (0.07-1.85)	0.28 (0.04-1.83)	0.185
- $< 0.2$ mg/liter	62/129 (48.1)	1.00	1.00	
Volume of bathtub				
- $\geq 5.0$ m <sup>3</sup>	38/65 (58.5)	2.49 (1.25-4.96) <sup>b</sup>	2.74 (1.28-5.89)	0.023
- $< 5.0$ m <sup>3</sup>	26/72 (36.1)	1.00	1.00	
Cleaning procedure				
- Brush	10/38 (26.3)	1.00		
- Brush + detergent	27/51 (52.9)	3.15 (1.27-7.81) <sup>a</sup>		
- Brush + disinfection (+ detergent)	15/30 (50.0)	2.80 (1.01-7.74) <sup>a</sup>		
- Non brush (HPW and/or disinfection)	12/18 (66.7)	5.60 (1.66-18.9) <sup>b</sup>		
Main material				
- Stone	32/57 (56.1)	1.42 (0.68-2.94)		
- Tile	28/59 (47.5)	1.00		
- Concrete	2/10 (20.0)	0.28 (0.05-1.41)		
- Wood	2/11 (18.2)	0.25 (0.05-1.24)		
Drain and cleaning frequency				
- Daily	57/109 (52.3)	1.00		
- Every 2 days	3/12 (25.0)	0.30 (0.08-1.18)		
- Every 3 days or less	4/16 (25.0)	0.30 (0.09-1.00)		

<sup>a</sup> p = 0.01 to 0.05.

<sup>b</sup> p = 0.006 to 0.009.

<sup>c</sup> p < 0.001.

浴槽容量が5m<sup>3</sup>未満ではブラシを使わない洗浄が9.7% (7/72)であるのに対し、5m<sup>3</sup>以上では16.9% (11/65)に増加し、両因子に交絡が生じた結果と考えられた。我々は、浴槽の洗浄効果判定にATPふき取り検査を適用し、材質が石の場合や、ブラシを使用しない高压洗浄や消毒のみの場合にバイオフィームの除去効果が低いことを明らかにしている<sup>15)</sup>。今回の結果は、浴槽容積すなわち表面積の増加が、ブラシ洗浄よりも作業の容易な高压洗浄を選択する一つの要因となり、結果的に浴槽壁にバイオフィームが残存する可能性を示唆している。物理的洗浄後の高濃度塩素消毒といった管理方法の徹底のみならず、浴槽容量の適正化や材質の選定など洗浄効率を考慮した施設設計を行う意識改革も必要と考える。なお、浴槽の材質や泉質の影響についてはサンプル数が少なく、今回の解析で有意な相関は認められなかった。

環境水から検出されるレジオネラ属菌は、冷却塔水

では *L. pneumophila* SG 1 が、温泉や循環式浴槽では SG 3, 5, 6 など SG 1 以外の *L. pneumophila* が優勢であることが知られていた<sup>16)</sup>。しかし、入浴施設の塩素消毒が徹底され始めた2001年以降 SG 1 の比率が増加しているとの報告があり<sup>17)</sup>、血清群によって塩素等に対する抵抗性が異なる可能性が指摘されている<sup>18)</sup>。今回の調査では塩素消毒を行う施設の割合が低かったため、SG 1 の検出率が低下した可能性が考えられ、今後、塩素消毒の徹底によって血清群の分布に変化が生じるかどうか、慎重に見極める必要がある。

入浴者に健康被害を及ぼす可能性のある病原体として WHO のガイドライン<sup>19)</sup>に示された、抗酸菌、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌の汚染実態を併せて調査した。レジオネラ属菌と同様の環境を好む抗酸菌は3.7%の浴槽から検出され、浴槽でのバイオフィーム対策が重要であることが示唆された。大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌はほとんどがヒト由来であり、緑膿菌

Table 6 Risk factor analysis for *Legionella* contamination in inlet faucet/pouring gate, storage tank, and source waters (uni- and multivariate logistic regression analysis)

Risk factors	<i>Legionella</i> spp. positive/total (%)	univariate model OR (95%CI)	multivariate model OR (95%CI) p	
Total	41/201 (20.4)			
pH				
- $\geq 6.0$	40/149 (26.8)	1.00	1.00	
- $< 6.0$	1/52 (1.9)	0.05 (0.01-0.40) <sup>b</sup>	0.06 (0.01-0.48)	0.008
Temperature				
- $\geq 55^{\circ}\text{C}$	1/26 (3.8)	0.12 (0.02-0.93) <sup>a</sup>	0.10 (0.01-0.77)	0.027
- 50-54 $^{\circ}\text{C}$	4/25 (16.0)	0.47 (0.15-1.42)	0.37 (0.12-1.18)	0.092
- $< 50^{\circ}\text{C}$	36/150 (24.0)	1.00	1.00	
Quality of hot spring				
- Chloride and/or bicarbonated spring	16/73 (21.9)	0.70 (0.31-1.57)		
- Simple hot spring	16/56 (28.6)	1.00		
- Sulfate spring	5/34 (14.7)	0.43 (0.14-1.31)		
- Sulfur spring	4/38 (10.5)	0.29 (0.09-0.96) <sup>a</sup>		
Chlorine concentration				
- $\geq 0.2$ mg/liter	2/17 (11.8)	0.50 (0.11-2.26)		
- $< 0.2$ mg/liter	39/184 (21.2)	1.00		
Storage tank				
- Present	29/103 (28.2)	2.81 (1.34-5.89) <sup>b</sup>	1.62 (0.72-3.65)	0.240
- Absent	12/98 (12.2)	1.00	1.00	
Cleaning frequency (storage tank or pipe)				
- Every month or more	8/24 (33.3)	1.59 (0.54-4.71)		
- Every 2 to 6 months	7/34 (20.6)	0.82 (0.28-2.41)		
- Every year or less	11/46 (23.9)	1.00		
- None	15/97 (15.5)	0.58 (0.24-1.39)		

<sup>a</sup> p = 0.04.

<sup>b</sup> p = 0.004 to 0.006.

については WHO ガイドラインに示された管理基準値 10/100mL 未満を超える菌数が 16.4% の浴槽から、また、黄色ブドウ球菌については WHO の基準値 100/100mL 未満を超える菌数が 6.7% の浴槽から検出された。いずれも基準値を超えることで直ちに重篤な健康被害に結びつく濃度ではないと考えられるが、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原因となるため、消毒剤を添加しない温泉では注意を払うべき病原体と考えられる。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った<sup>15)</sup>。浴槽水の消毒を行わない施設においては、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、浴槽に入る前に入念にかけ湯を行う等、入浴者への衛生教育を含めた対策を講じる必要性が再確認された。

温泉は源泉の組成や施設構造によって微生物汚染リスクが異なる。施設管理者が自らの温泉の特徴と構造を把握したうえで、経路ごとの汚染の蓄積具合を評価し、独自の管理基準を設定することが望まれる。

本論文の一部は第 66 回日本公衆衛生学会総会(2007 年 10 月、松山市)で発表した。本研究は平成 17、18

年度厚生労働科学研究費補助金(研究課題名: 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, H17-健康一般-020) の支援を受けて行われた。

謝辞: 本研究の実施にあたり、計画の段階からご助言を頂いた国立感染症研究所遠藤卓郎先生、調査にご協力いただいた会員外研究協力者京都府保健環境研究所田口寛先生、栃木県保健環境センター船渡川次次先生及び各地方衛生研究所の皆様様に深謝いたします。また、試料採取及び施設調査にご協力いただいた温泉施設及び保健所の皆様様に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Nakamura H, Yagyu H, Kishi K, Tsuchida F, Oh-ishi S, Yamaguchi K, et al.: A large outbreak of Legionnaires' disease due to an inadequate circulating and filtration system for bath water -epidemiologic manifestations. Intern Med 2003; 42: 806-11.
- 2) 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, 他: 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 2005; 79: 365-74.
- 3) 吉國謙一郎, 中山浩一郎, 本田俊郎, 新川奈緒美, 有馬忠行, 湯又義勝, 他: 循環濾過式浴槽

- 水が原因と推定されたレジオネラ症集団発生事例—鹿児島県、病原微生物検出情報 2003 ; 24 : 31—2.
- 4) Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S : *Legionella* and the prevention of legionellosis. World Health Organization 2007 ; 29—38.
  - 5) 大畑克彦, 鈴木光彰, 杉山寛治, 江塚安伸, 曾布川尚民 : 実験用循環式浴槽水浄化装置を用いた自然汚染, 無殺菌状況下におけるレジオネラ属菌の消長. 防菌防黴誌 2004 ; 32 : 593—600.
  - 6) 厚生労働省健康局長通知 : 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について. 平成 15 年 2 月 14 日. 健発第 0214004 号.
  - 7) 笹原武志, 菊野理津子, 奥田舜治, 関口朋子, 佐藤義則, 高山陽子, 他 : 温泉水における *Legionella* 属菌汚染と泉質に関する調査・研究. 感染症誌 2004 ; 78 : 545—53.
  - 8) 古畑勝則, 原 元宣, 吉田真一, 福山正文 : 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況. 感染症誌 2004 ; 78 : 710—6.
  - 9) 厚生省生活衛生局企画課 : 環境水のレジオネラ属菌検査方法, 新版レジオネラ症防止指針. ビル管理教育センター, 1999.
  - 10) 遠藤卓郎 : 温泉・公衆浴場, その他の温水におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体 *Naegleria fowleri* の疫学と病原性発現に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金健康科学総合研究事業, 平成 15 年度報告書. p. 159—78.
  - 11) R Development Core Team. R : A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008 ; ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
  - 12) 感染症情報センター : レジオネラ症. 病原微生物検出情報 2003 ; 24 : 27—8.
  - 13) 倉 文明 : 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. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業, 平成 18 年度報告書. p. 101—12.
  - 14) Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K : Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. Appl Environ Microbiol 2003 ; 69 : 2540—7.
  - 15) 井上博雄 : 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. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業, 平成 18 年度報告書. p. 165—200.
  - 16) 鈴木敦子, 市瀬正之, 松江隆之, 天野祐次, 寺山 武, 泉山信司, 他 : 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況—1996 年 4 月から 2000 年 11 月まで. 感染症誌 2002 ; 76 : 703—10.
  - 17) 遠藤卓郎 : 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. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業, 平成 18 年度報告書. p. 49—59.
  - 18) Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, et al. : *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. Appl Environ Microbiol 2005 ; 71 : 5805—13.
  - 19) WHO : Guidelines for safe recreational water environments Vol.2 : swimming pools and similar environments. 2006, p. 80—99.

*Legionella* Contamination Risk Factors in Non-circulating Hot Spring Water

Tatsuya KARASUDANI<sup>1)</sup>, Toshiro KUROKI<sup>2)</sup>, Katsumi OTANI<sup>3)</sup>, Seiichi YAMAGUCHI<sup>4)</sup>, Mie SASAKI<sup>5)</sup>, Shioko SAITO<sup>6)</sup>, Masahiro FUJITA<sup>7)</sup>, Kanji SUGIYAMA<sup>8)</sup>, Hiroshi NAKAJIMA<sup>9)</sup>, Koichi MURAKAMI<sup>10)</sup>, Toshitsugu TAGURI<sup>11)</sup>, Tsuyoshi KURAMOTO<sup>12)</sup>, Fumiaki KURA<sup>13)</sup>, Kenji YAGITA<sup>14)</sup>, Shinji IZUMIYAMA<sup>14)</sup>, Junko AMEMURA-MAEKAWA<sup>15)</sup>, Toshio YAMAZAKI<sup>15)</sup>, Kunio AGATA<sup>16)</sup> & Hiroo INOUE<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental science, <sup>2)</sup>Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, <sup>3)</sup>Yamagata Prefectural Institute of Public Health, <sup>4)</sup>Yamagata Prefectural Murayama Public Health center, <sup>5)</sup>Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment, <sup>6)</sup>Akita Prefectural Institute of Public Health, <sup>7)</sup>Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, <sup>8)</sup>Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, <sup>9)</sup>Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health, <sup>10)</sup>Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, <sup>11)</sup>Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health, <sup>12)</sup>Kagoshima Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health (currently working at Kagoshima Prefectural Ijyuin Public Health center), <sup>13)</sup>Department of Bacteriology, <sup>14)</sup>Department of Parasitology and <sup>15)</sup>Division of Biosafety Control and Research, National Institute of Infectious Diseases, <sup>16)</sup>Tsukuba Research Laboratory, Aquas Co., Ltd.

We examined water from 182 non-circulating hot spring bathing facilities in Japan for possible *Legionella* occurrence from June 2005 to December 2006, finding *Legionella*-positive cultures in 119 (29.5%) of 403 samples. Legionellae occurrence was most prevalent in bathtub water (39.4%), followed by storage tank water (23.8%), water from faucets at the bathtub edge (22.3%), and source-spring water (8.3%), indicating no statistically significant difference, in the number of legionellae, having an overall mean of 66 CFU/100mL. The maximum number of legionellae in water increased as water was sampled downstream: 180 CFU/100mL from source spring, 670 from storage tanks, 4,000 from inlet faucets, and 6,800 from bathtubs. The majority - 85.7% - of isolated species were identified as *L. pneumophila*: *L. pneumophila* serogroup (SG) 1 in 22%, SG 5 in 21%, and SG 6 in 22% of positive samples. Multivariate logistic regression models used to determine the characteristics of facilities and sanitary management associated with *Legionella* contamination indicated that legionellae was prevalent in bathtub water under conditions where it was isolated from inlet faucet/pouring gate water (odds ratio [OR]=6.98, 95% confidence interval [CI]=2.14 to 22.8). Risk of occurrence was also high when the bathtub volume exceeded 5m<sup>3</sup> (OR=2.74, 95% CI=1.28 to 5.89). Legionellae occurrence was significantly reduced when the bathing water pH was lower than 6.0 (OR=0.12, 95% CI=0.02 to 0.63). Similarly, occurrence was rare in inlet faucet water or the upper part of the plumbing system for which pH was lower than 6.0 (OR=0.06, 95% CI=0.01 to 0.48), and when the water temperature was maintained at 55°C or more (OR=0.10, 95% CI=0.01 to 0.77). We also examined the occurrence of amoeba, *Mycobacterium* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* in water samples.

【技術論文】

浴場施設でのレジオネラ属菌と宿主アメーバの関連、  
およびレジオネラ属菌を塩素消毒により  
制御する場合の問題点

村上 光一<sup>1\*</sup>、長野 英俊<sup>1</sup>、野田多美枝<sup>1</sup>、濱崎 光宏<sup>1</sup>、  
堀川 和美<sup>1</sup>、石黒 靖尚<sup>1</sup>、乙藤 武志<sup>2</sup>、迎田 恵之<sup>3</sup>、  
泉山 信司<sup>4</sup>、八木田健司<sup>4</sup>、遠藤 卓郎<sup>4</sup>

The Relation between *Legionella* and Free-living Amoeba,  
and the Treatment of Equipment at Bathhouses where *Legionella* is  
Controlled by Chlorination

Koichi MURAKAMI<sup>1\*</sup>, Hidetoshi NAGANO<sup>1</sup>, Tamie NODA<sup>1</sup>, Mitsuhiro HAMASAKI<sup>1</sup>,  
Kazumi HORIKAWA<sup>1</sup>, Yasuhisa ISHIGURO<sup>1</sup>, Takeshi OTOFUJI<sup>2</sup>, Yoshiyuki MUKAEDA<sup>3</sup>,  
Shinji IZUMIYAMA<sup>4</sup>, Kenji YAGITA<sup>4</sup> and Takuro ENDO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Division of Pathology and Bacteriology, Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,  
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

<sup>2</sup>Kasuya Office for Health, Human Services, and Environmental Issues,  
235-7 Tobaru, Kasuya, Fukuoka 811-2312, Japan

<sup>3</sup>Division of Public Health, Department of Health and Human Services, Fukuoka Prefectural Government,  
7-7 Higashi-koen, Hakata-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8577, Japan

<sup>4</sup>Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases,  
Toyama 1-23-1, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

An epidemiological investigation was conducted among public bathhouses that can be used after payment of an admission fee (including hot springs) in Fukuoka Prefecture, Japan, between 2002 and 2004, to estimate the prevalence and distribution of *Legionella* and free-living amoebae in these facilities. As a result, *Legionella* were isolated from 29 of 100 samples, and free-living amoebae were isolated from 27 of 100 samples from 37 bathhouses. There was a significant relation between the existence of free-living amoebae and *Legionella* ( $p < 0.01$ ). After chlorination, 0.7 mg/l and more and 0.5 mg/l and higher concentrations of free residual chlorine were significantly effective in controlling the proliferation of free-living amoebae and *Legionella*, respectively. However, some equipment, including pressurized filtration systems with biological filtration and the collection tanks for recycled bath-water were highly contaminated with *Legionella* and free-living amoebae, despite of presence of free residual chlorine. In addition, because there was no disinfection process, *Legionella* and free-living amoebae were detected in some baths with medicinal herbs. (Accepted 16 July 2008)

**Key words** : Free-living amoebae (自由生活性アメーバ)/Bathhouse (浴場)/*Legionella* (レジオネラ属菌)/Public health (公衆衛生).

<sup>1</sup>福岡県保健環境研究所 〒818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野39 ☎092-921-9944

<sup>2</sup>福岡県粕屋保健福祉環境事務所 〒811-2312 福岡県糟屋郡粕屋町戸原235-7 ☎092-939-1744

<sup>3</sup>福岡県保健福祉部生活衛生課 〒812-8577 福岡市博多区東公園7-7 ☎092-643-3279

<sup>4</sup>国立感染症研究所・寄生動物部 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 ☎03-5285-1111

## 緒 言

レジオネラ属菌は、浴場を含めた水環境の中で、単独で生息するわけではなく、*Pseudomonas*等を主とするバイオフィルム中<sup>1,2)</sup>で、あるいは自由生活性アメーバの中<sup>3)</sup>で温度等の環境変化から守られ存在することが明らかとなっている。また、レジオネラ属菌の増殖には自由生活性アメーバを主とする原生動物が必要であることも明らかとなっている<sup>4)</sup>。一方、自由生活性アメーバはレジオネラ属菌の宿主、あるいは増殖の場としてのみ、この細菌に関与するのではなく、レジオネラ属菌を包含する自由生活性アメーバを、そのまま人が吸入すると、自由生活性アメーバ内のレジオネラ属菌がヒトに感染するという、レジオネラ症の媒体としての役割を担っている可能性も報告されている<sup>5,6)</sup>。このようにレジオネラ属菌と自由生活性アメーバの関係は、レジオネラ症の予防を考える上で重要であり、危害を分析する面からレジオネラ属菌の生息状況を調査する場合、自由生活性アメーバの生息状況も同時に調査しなければ正確な評価はできない。わが国では、浴場を含めた人工的な水環境におけるレジオネラ属菌分布調査が、さまざまに行われてきた。しかし、そのなかで、自由生活性アメーバをも同時に調査したものは黒木ら<sup>7,8)</sup>あるいは古畑の報告<sup>9)</sup>等に限られ、いまだ十分な調査数および報告数とはいえない。

そこで、自由生活性アメーバの存在とレジオネラ属菌の存在が、実際の施設において、統計的に相関するか否か明らかにする目的で、福岡県内の浴場施設を対象として調査した。

さらに、浴場施設での遊離残留塩素の濃度と、レジオネラ属菌の出現状況の関連を明らかにし、塩素消毒の有用性を確認することも、目的として調査した。

## 調 査 方 法

平成14年7月から16年11月にかけて、福岡県内の温泉および浴場（所謂スーパー銭湯等を含む）37施設を対象として調査した。調査対象施設の選定は福岡県内の公衆浴場が約330施設（調査時）

存在することから、その一割を超えて調査し、且つ一定の地域（保健福祉環境事務所の管轄地域）に偏らないように、分散させて選定した。浴槽水等は、滅菌したポリプロピレン製容器（500mlおよび1000ml容量）に採取し、当日中に検査に供した。

レジオネラ属菌の検出は、レジオネラ症防止指針<sup>10)</sup>に従ったが、試料はフィルター処理後、酸処理し、分離培地はWYO- $\alpha$ 寒天培地（栄研化学）を用いた。レジオネラ属菌の確認は、システイン要求性試験、グラム染色、およびpolymerase chain reaction法（山内昌弘、田中智之、杉山明、内山昭則、倉文明、前川純子、2002年、レジオネラ検査マニュアル、国立感染症研究所）にて確認し、必要に応じてDNA-DNAハイブリダイゼーション（DDHレジオネラ、極東製薬）を行った。自由生活性アメーバの検出は、黒木らの方法<sup>7,8)</sup>に準拠した。ただし、検体量は100mlとした。なお、試料のうちろ過器内の内容物（ろ過材や被ろ過物等）については、無菌的に滅菌ポリプロピレン容器に採取し、等量の滅菌蒸留水を加え、混和し、これを試料原液とみなして $10^1$ から $10^5$ まで10倍段階希釈で5段階希釈し、各1mlを大腸菌塗布寒天培地に塗布した。

遊離残留塩素濃度の測定は、調査現場においてDiethyl-*p*-Phenylenediamine法（残留塩素測定器、DPD法、柴田科学）を用いて行った。

## 調 査 結 果

### 1. 調査施設の概要

施設の内訳は、井戸水のみ使用している施設が11施設、井戸水および温泉水を使用している施設が3施設、井戸水、水道水および温泉水を使用している施設が2施設、水道水のみ使用している施設が14施設、使用水の内訳が不明であった施設が7施設であった。施設を循環方式の内容の違いで分類すると、生物ろ過方式による循環が11施設、物理ろ過方式による循環が22施設、生物ろ過と物理ろ過を浴槽によって使い分けている施設が1施設、主として物理ろ過方式を実施してい



るが薬湯に関してのみ循環を行っていない施設が1施設、不明が2施設であった。これらの施設について、試料の遊離残留塩素濃度、試料中の自由生活性アメーバの有無、およびレジオネラ属菌の有無について調査を行った。なお、これらの施設は、消毒を施している場合は、いずれも、塩素消毒を行っており、オゾン等の他の消毒方法を行っている施設はなかった。

試料の採取時期は Table 1 に示すとおりである。内訳は、Table 2 に示すとおり、通常の浴槽水が42、ジェットバスおよび超音波発生装置付浴槽の水が19、露天風呂浴槽水が7、薬湯が10、温泉タンク水および井戸水タンクが3、施設排水が1、ヘアキャッチャー内容物が7、ろ過器内容物が5、回収槽が5、および、逆洗水が1の合計100試料であった。

## 2. レジオネラ属菌および自由生活性アメーバの検出状況

調査した37施設100試料中の13施設 (35.1%)、27試料 (27.0%) から自由生活性アメーバを検出

Table 1. Change in the detection rate of amoebae- or *Legionella*-positive samples

Sampling period	No. of samples tested	Amoebae positive samples (%)	<i>Legionella</i> -positive samples (%)
2002	56	18 (32.1)	20 (35.7)
2003	27	6 (22.2)	6 (22.2)
2004	17	3 (17.6)	3 (17.6)
Total	100	27 (27.0)	29 (29.0)

し、21施設 (56.8%)、29試料 (29.0%) からレジオネラ属菌を検出した。調査年による試料のレジオネラ属菌および自由生活性アメーバの検出率は Table 1 に示すとおり、経年的に両微生物の検出率は減少する傾向が認められた。自由生活性アメーバが検出された試料と、自由生活性アメーバが検出されなかった試料においてレジオネラ属菌の検出率に差があるか否か統計的に検討した結果、自由生活性アメーバが検出された試料は、検出されなかった試料よりもレジオネラ属菌の検出率が有意に高いことが明らかとなった (1%危険率,  $\chi^2$  検定, イエーツの補正) (Fig. 1)。

試料の種類によるレジオネラ属菌と自由生活性アメーバの検出結果を Table 2 に示す。通常の浴槽の23.8%からレジオネラ属菌が、19.0%から自由生活性アメーバが検出された。また、薬湯 (50%) および回収槽 (60%) でレジオネラ属菌あるいは自由生活性アメーバが比較的高率に検出されたが、露天風呂 (0%) では、比較的低い検出率であった。

試料中の遊離残留塩素濃度を測定し、かつ自由生活性アメーバの検出を試みた80検体について、遊離残留塩素濃度と自由生活性アメーバ検出率の関連を検討した結果を Table 3 に示す。遊離残留塩素濃度0.6mg/l以下の試料と0.7mg/l以上の試料で自由生活性アメーバ検出率に統計的な差が認められた ( $\chi^2$  検定, 危険率5%)。また、レジオネラ属菌の検出と遊離残留塩素濃度の関係について Fig. 2 に示す。遊離残留塩素が0.5mg/

Table 2. Incidences of amoebae and *Legionella* in samples

Source	No. of samples tested	No. of samples amoebae - positive (%)	No. of samples <i>Legionella</i> - positive (%)
General bathtub	42	8 (19.0)	10 (23.8)
Bathtub with jet bath or bath with ultrasonic wave generation	19	5 (26.3)	7 (36.8)
Outdoor bath	7	2 (28.6)	0 (0.0)
Bath with medicinal herbs	10	5 (50.0)	5 (50.0)
Tanks of hot-spring-water or well water	3	1 (33.3)	0 (0.0)
Drain of facility	1	0 (0.0)	0 (0.0)
Hair catcher	7	1 (14.3)	2 (28.6)
Filtration machine content	5	2 (40.0)	2 (40.0)
Collection tanks for recycled bath-water	5	3 (60.0)	3 (60.0)
Water that washed the filter of the filtration machine	1	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	100	27 (27.0)	29 (29.0)

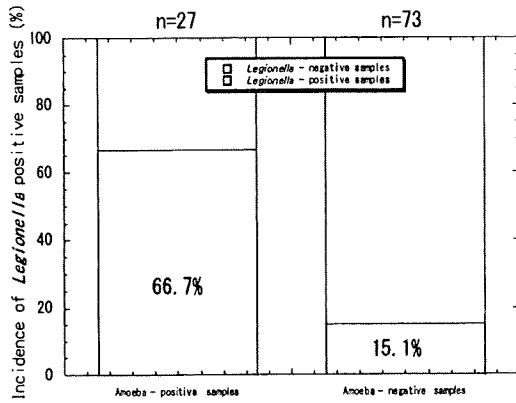


Fig.1. Findings of amoeba and *Legionella* in 100 bathtub water and other samples from bathhouses. There is a significant positive intrasample correlation between the presence of the amoeba and that of *Legionella*, when using Yates' chi-square test ( $p < 0.01$ ).

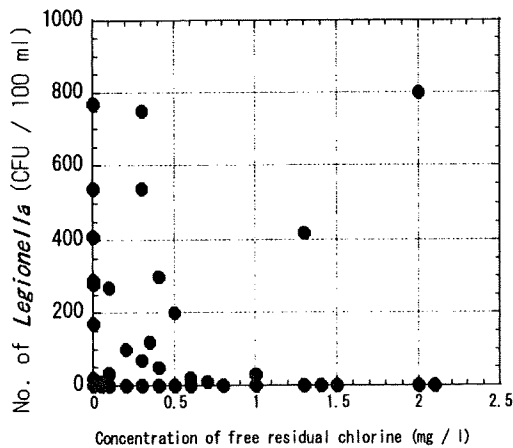


Fig.2. Relation between the presence of *Legionella* and concentration of free residual chlorine in 80 samples. The number of the bacteria significantly decreases at 0.5mg/l or more of free residual chlorine when using Yates' chi-square test ( $p < 0.05$ ).

1以上の濃度で、明らかにレジオネラ属菌の検出率が低下した ( $\chi^2$  検定, 危険率5%)。遊離残留塩素が2.0mg/lあるいは1.3mg/lと比較的高濃度残留するにもかかわらず、レジオネラ属菌がそれぞれ800CFU/100mlあるいは420CFU/100ml分離された試料があった (Fig. 2)。前者は気泡発生装置付きの浴槽水であり、後者は浴場施設の強化プラスチック製の貯湯槽 (水温41°C)であった。

Table 3. Relation between the incidence of amoebae and concentration of free residual chlorine in samples

Concentration of free residual chlorine	No. of samples tested	Incidence of amoebae-positive samples (%)
<0.05	15	33.3
0.05	2	50.0
0.1	3	0.0
0.2	3	33.3
0.3	5	60.0
0.4	8	37.5
0.5	5	0.0
0.6	4	50.0
0.7	1	0.0
0.8	2	0.0
1.0	7	28.6
1.3	2	50.0
1.4	1	0.0
1.5	5	0.0
2.0	2	0.0
2.0<	15	6.7
Total	80	23.8

### 3. 個別事例の検討結果

次に、本研究により、自由生活性アメーバおよびレジオネラ属菌の汚染が発見された施設のうち、塩素消毒を中心とする管理の上で参考となる施設について詳述する。

施設Aは (Fig. 3), ろ過器および回収槽がレジオネラ属菌および自由生活性アメーバの汚染源であり、そのため浴槽からレジオネラ属菌が検出されたと考えられる施設である。この施設は、循環式の浴場で、源泉 (32°C) および井戸水を使用していた。浴場の浴槽水あるいはオーバーフロー水は、回収槽へと回収される。回収槽内の塩素濃度は自動注入機で調整されていた。回収槽の温湯はろ過後、加温され浴槽へと循環する。この浴場施設では、過去の調査も含めて浴槽水の遊離残留塩素濃度は、0.6から1.0mg/lの範囲で維持されていた。しかし、検査で浴槽からレジオネラ属菌が検出された。Fig. 3は、その後、行った原因究明のための検査時の結果を示すもので、この時点では浴槽からレジオネラ属菌は検出されていない。回収槽は年3回程度清掃が実施され、浴場の換水は週1回行っていた。

この浴場で、ろ過材は、生物ろ過と物理ろ過を同時に行うとされる特殊なろ過材が使用されていたが、ろ過器内の内容物から比較的多数の自由生活性アメーバが検出された。また、回収槽では0.4mg/lの遊離残留塩素が検出されたにもかかわらず

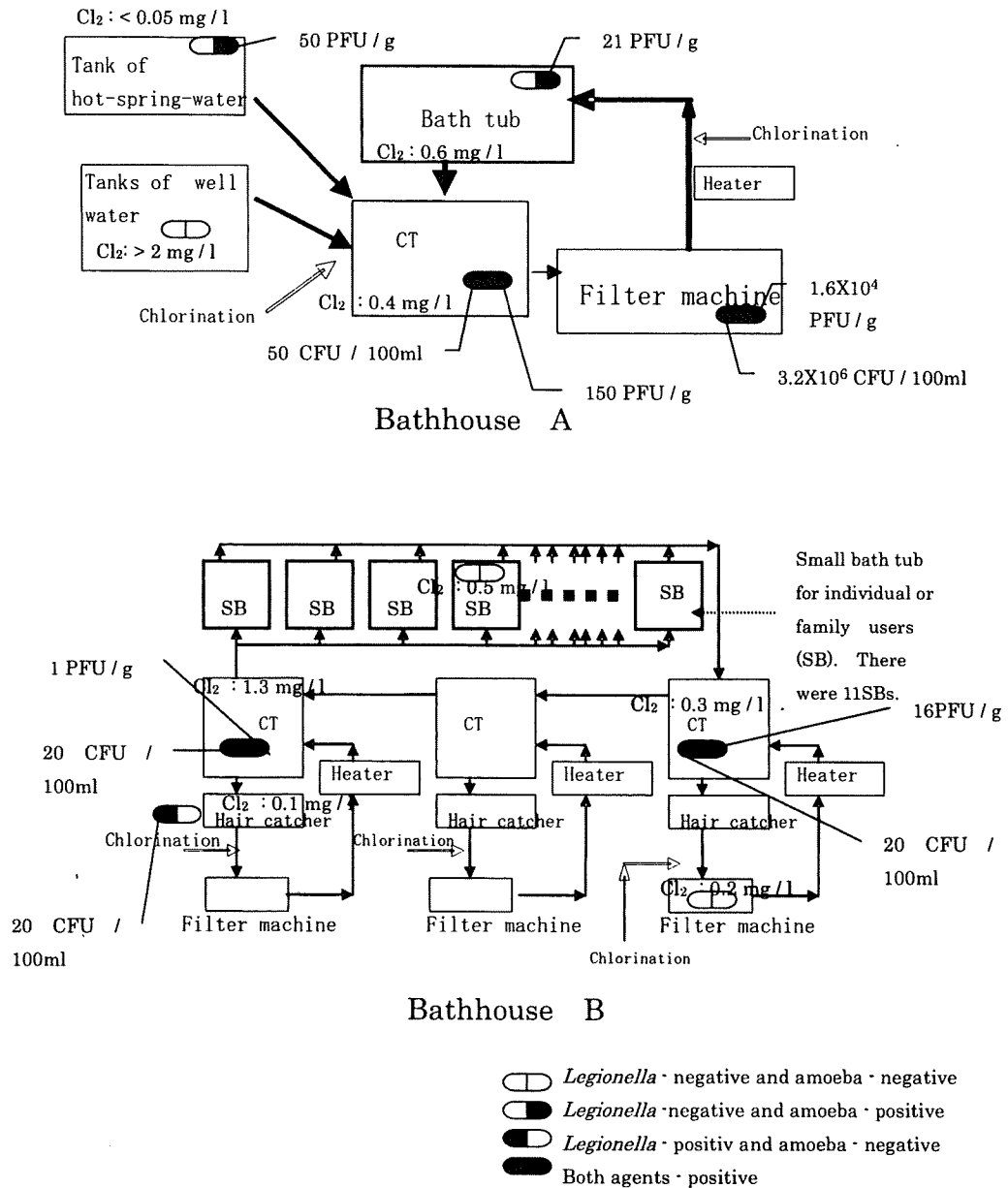


Fig.3. Rough sketches of two bathhouses with collection tanks for recycled bath tub water (CT), labeled Bathhouse A and B. Bathhouse A had 11 small bath tubs for individual or family use whereas bathhouse B had a large bath tub. In bath tubs in both facilities, free residual chlorine was detected.

ならず、レジオネラ属菌が検出されている。

施設 B (Fig. 3) は、多数の家族風呂 (浴槽) を有し、井戸水のみを使用し、物理 (砂) ろ過を用いていた。ろ過器のメンテナンスは未実施 (開業後間もないため)、逆洗は毎朝、営業時間は朝

10時から翌朝 3 時まで、循環は 24 時間、塩素注入は、自動で実施されていた。検査時、遊離残留塩素濃度は試料中 0.1~1.3mg/l であった。オーバーフロー水は再使用していた (ただし洗い場の湯は再使用されない)。個室となった家族風呂が

11あり、回収槽が複数存在し、大変複雑な循環系で、ろ過器を通らずに循環している温湯が多く含まれると考えられた。浴槽水は、いったん浴槽にためられた後、利用者が使用後、全て回収槽に回収され、その後、別の利用者が利用する際に、再び回収槽から浴槽に温湯が蓄えられる。そのため、回収槽におけるレジオネラ属菌汚染は、浴槽の汚染に直結する可能性が高い施設であった。この施設において、浴槽水からは自由生活性アメーバ、レジオネラ属菌は検出されなかったが、遊離残留塩素濃度が0.6あるいは1.3mg/l存在する回収槽の温湯からレジオネラ属菌あるいは自由生活性アメーバが検出された。

## 考 察

今回、レジオネラ属菌と自由生活性アメーバの関連について検討し、浴場施設における両者の存在が統計的に関連することを証明し、塩素消毒の自由生活性アメーバおよびレジオネラ属菌の除去における効果、あるいはその留意点について検討した。

Exnerら<sup>11)</sup>は人工水環境におけるレジオネラ属菌増殖の要因として、25℃～42℃の水温、水の滞留、スケール、堆積物、そして、ある種の自由生活性アメーバの存在をあげている。このうち、自由生活性アメーバに関しては多くの報告がなされ、レジオネラ属菌にとって、少なくとも増殖において自由生活性アメーバを主とする原生動物の存在が不可欠であることは、多くの室内実験で証明されている<sup>9)</sup>。

しかし、実際の浴場施設において自由生活性アメーバの存在と、レジオネラ属菌の存在を、試料の分析結果を用いて、統計的に証明したものは少ない。古畑<sup>9)</sup>は、循環式浴槽水43試料を検査し、自由生活性アメーバとレジオネラ属菌の「共生の事実」を明らかにしたが、統計的検討については詳述していない。今回、我々が試料からの検出頻度をもとに、レジオネラ属菌の存在と自由生活性アメーバの存在が関連することを示したことは、この意味からも意義深いと考えられる。このことは、従来報告された、実験室内での自由生活性ア

メーバとレジオネラ属菌の関係（レジオネラ属菌が自由生活性アメーバの中で増殖する）を、実際の現場のデータを通して、補完するものであり、室内実験の成果を現場に応用する際の根拠となるものである。

一般に人工水環境の自由生活性アメーバあるいはレジオネラ属菌を対象とする消毒法としては、加熱、紫外線、オゾン、銅・銀イオン等が検討されている<sup>11)</sup>。そのうち、60℃以上の加熱が最も効果が高いことは、既に明らかにされているが<sup>11)2)</sup>、費用等の面から、現場で応用することには制限がある。そのため、現場で実際に使用される消毒法は、塩素消毒が多くを占めている。今回の検討では、0.5mg/l以上の濃度の遊離残留塩素の存在下で、レジオネラ属菌の汚染率が有意に低いことが明らかとなり、この結果は、従来の室内実験（塩素消毒が有効であること）を補完するものである。

一方、自由生活性アメーバについては、今回の検討の結果、0.7mg/l以上の濃度の遊離残留塩素の存在下にて、自由生活性アメーバの汚染率が低くなることが判明した。遊離残留塩素は、自由生活性アメーバへの殺菌効果は、あまり高くはないことが報告されているが<sup>4)13)</sup>、遊離塩素濃度が維持されることにより、自由生活性アメーバの餌となる細菌が減少し、結果的に、自由生活性アメーバが抑制される効果が期待できる。また、一部の自由生活性アメーバでは、塩素消毒が直接自由生活性アメーバに効果があると室内実験の報告もある<sup>2)</sup>。遠藤ら<sup>11)</sup>は自由生活性アメーバに関しては0.2mg/lの濃度で効果があると報告しており、今回の検討では必要とする遊離残留塩素の濃度が、この報告よりも高かった。しかし、遊離残留塩素濃度を維持することが自由生活性アメーバ対策に有効であることが同様に浴場で確認された意義は大きい。

一方、遊離残留塩素濃度が十分あるにもかかわらず、レジオネラ属菌が検出される試料があった。塩素消毒が十分に行われにくい生物ろ過器、あるいは回収槽の存廃を含めた議論、あるいは塩素消毒以外の対策の必要性を示すものである。とくに回収槽に関しては、水資源の使用量を削減できる

ものの、レジオネラ属菌汚染の温床になりやすく、廃止すべきであると考えられる。

浴槽の種類に着目した場合、薬湯では50%の試料からレジオネラ属菌および自由生活性アメーバが検出されているが、これは多くの施設で、薬湯の退色防止のために塩素消毒を実施しないことなどによると考えられる。有効な消毒法を導入しない限り、薬湯の使用は十分考慮すべきと考えられる。

## 結 論

福岡県内の浴場施設において、平成14年から16年にかけて調査した37施設、100試料のなかで13施設(35.1%)、27試料(27.0%)から自由生活性アメーバを検出し、21施設(56.8%)、29試料(29.0%)からレジオネラ属菌を検出した。浴場施設での自由生活性アメーバの生息とレジオネラ属菌の生息とは、統計的に関連が認められること、さらに塩素消毒が自由生活性アメーバ(0.7mg/l以上)ひいてはレジオネラ属菌(0.5mg/l以上)の汚染軽減に有効であることが明らかとなった。しかし、塩素消毒を行っていても浴場施設の管理上、回収槽あるいは生物ろ過器の管理は困難さが伴うこと、薬湯では退色防止のため塩素消毒を実施していない施設も多く、それらの設備・機器の存廃を含めた議論あるいは特別な管理が必要なことなどがあわせて明確になった。

今回の検討から、浴場施設のレジオネラ属菌および自由生活性アメーバ汚染の軽減は、施設の配管系内の遊離残留塩素濃度を一定以上に維持すること、および塩素消毒の効率を上げるためにバイオフィームを形成させない構造への変更、あるいはバイオフィームを物理的に除去するための配管等の洗浄により可能であると考えられた。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、様々に御配慮を賜りました福岡県保健環境研究所 吉村健清所長に深謝いたします。また、論文作成に際し、ご助言賜りました竹中重幸博士に深謝します。さらに、試料の採取に関して、ご協力いただきました皆様

方に御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Storey, M. V., Ashbolt, N. J., and Stenström, T. A., (2004) Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila* - a quantitative risk assessment for distributed water. *Water. Sci. Technol.*, 50, 77-82.
- 2) Donlan, R. M., Forster, T., Murga, R., Brown, E., Lucas, C., Carpenter, J., and Fields, B. (2005) *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling*, 21, 1-7.
- 3) Guerrieri, E., Bondi, M., Ciancio, C., Borella, P., and Messi, P. (2005) Micro- and macromethod assays for the ecological study of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 252, 113-119.
- 4) Greub, G., and Raoult, D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 413-433.
- 5) Abu Kwaik, Y., Venkataraman, C., Harb, O. S., and Gao, L. Y. (1998) Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment and invasion by *Legionella micdadei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3134-3139.
- 6) Rowbotham, T. J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.*, 33, 1179-1183.
- 7) 黒木俊郎, 八木田健司, 藪内英子, 縣 邦雄, 石間智生, 勝部泰次, 他 (1998) 神奈川県下の温泉浴槽水中における *Legionella* 属菌と自由生活性アメーバ調査. *感染症誌*, 72, 1050-1055.
- 8) 黒木俊郎, 佐多 辰, 山井志朗, 八木田健司, 勝部泰次, 遠藤卓郎 (1998) 循環式浴槽における自由生活性アメーバと *Legionella* 属菌の生息状況. *感染症誌*, 72, 1056-1063.
- 9) 古畑勝則 (2005) レジオネラ感染症防止対策に関する研究. *防菌防黴*, 33, 397-406.
- 10) 厚生省生活衛生局企画課監修 (2002) 新版レジオネラ症防止指針, pp.85-94, 財団法人ビル管理教育センター.

- 11) Exner, M., Kramer, A., Lajoie, L., Gebel, J., Engelhart, S., and Hartemann, P. (2005) Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *Am. J. Infect. Control.*, 33, S 26-40.
- 12) Kuchata, J. M., Navratil, J. S., Shepherd, M. E., Wadowsky, R. M., Dowling, J. N., States, S. J., and Yee, R. B. (1993) Impact of chlorine and heat on the survival of *Hartmannella vermiformis* and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4096-4100.
- 13) De Jonckheere, J., and van de Voorde, H. (1976) Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 294-297.
- 14) 遠藤卓郎 (2004) 平成13~15年度 厚生労働科学研究費補助金 がん予防等健康科学総合研究事業 温泉・公衆浴場, その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体 *Naegleria fowleri* の疫学と病原性発現に関する研究.

# 循環式浴槽の衛生管理

— フィルター・リフレッシュ法の有用性 —

杉山寛治\*

## レジオネラ属菌は、循環ろ過式浴槽装置のどこで、どのように増えるのか

モデル循環浴槽（入浴による有機物の蓄積が可能で、現場施設と同様な機器を備えた循環ろ過式浴槽装置）を使った実験から、無殺菌状態で循環運転時に、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  $10^5 \sim 10^6$  CFU/100ml）が確認できた（Fig. 1）。循環浴槽水中では、まず蓄積されたヒトの有機物等を栄養源とする細菌の増殖が起き、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があり、ほぼ同時期に、アメーバ内増殖性のあるレジオネラの爆発的な増加が認められた。浴槽水中でのレジオネラ増殖にアメーバが深くかかわっていることが推察される<sup>1,2)</sup>。

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、パッキンなど多岐にみられた（Fig. 2）。これらの汚染箇所は現場の循環浴槽系内の汚染状況とも一致しており、モデル浴槽で現場の汚染箇所が再現できた。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微生物叢（バイオフィーム）の最大の貯蔵庫になっており、ろ過材の殺菌が不十分であれば、換水してもろ過材が浴槽水の新たな汚染源になり、浴槽水のレジオネラ汚染が継続することが明らかとなった<sup>1,2)</sup>。

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  $2.8 \times 10^6$  CFU）が認められ、走査型電子顕微鏡で多量のかん菌と菌体外生産物が観察された（Fig. 3）。VP 配管テストピースでは、3日後にかん菌の散在がみられ、6日後では長かん菌と短かん菌の集積像（レジオネラ属菌数： $1.6 \times 10^4$  CFU/綿棒拭取り）が観察された（Fig. 4）。EPDM ゴムパッキンでは、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： $5 \times 10^5$  CFU/綿棒拭取り）が観察された（Fig. 4）。なお、蛍光標識 DNA プローブ法により、この繊維状の菌体は *Legionella pneumophila* の同定された。

モデル浴槽での自然汚染、無殺菌増殖試験から、レジオネラ属菌は、浴槽水やろ過器内水のアメーバ内で増殖後、浴槽水を介して浴槽系全体に拡散し、ろ過材や配管などの表面に付着しバイオフィーム（生物膜）を形成していることが明らかになった。

## 問題を解決する方法

我々は、モデル浴槽での塩素管理下の入浴実験から、浴槽水への塩素注入は殺菌法としては有効であるが、入浴に伴う有機物等の持ち込みの影響で遊離残留塩素濃度の維持管理が容易でないこと（特にろ過器前に塩素を注入した時）、さらに、残留塩素濃度が 0.5 ppm 程度では、ろ過材、パッキン等ですでに形成されてしまったバイオフィーム

\* 静岡県環境衛生科学研究所

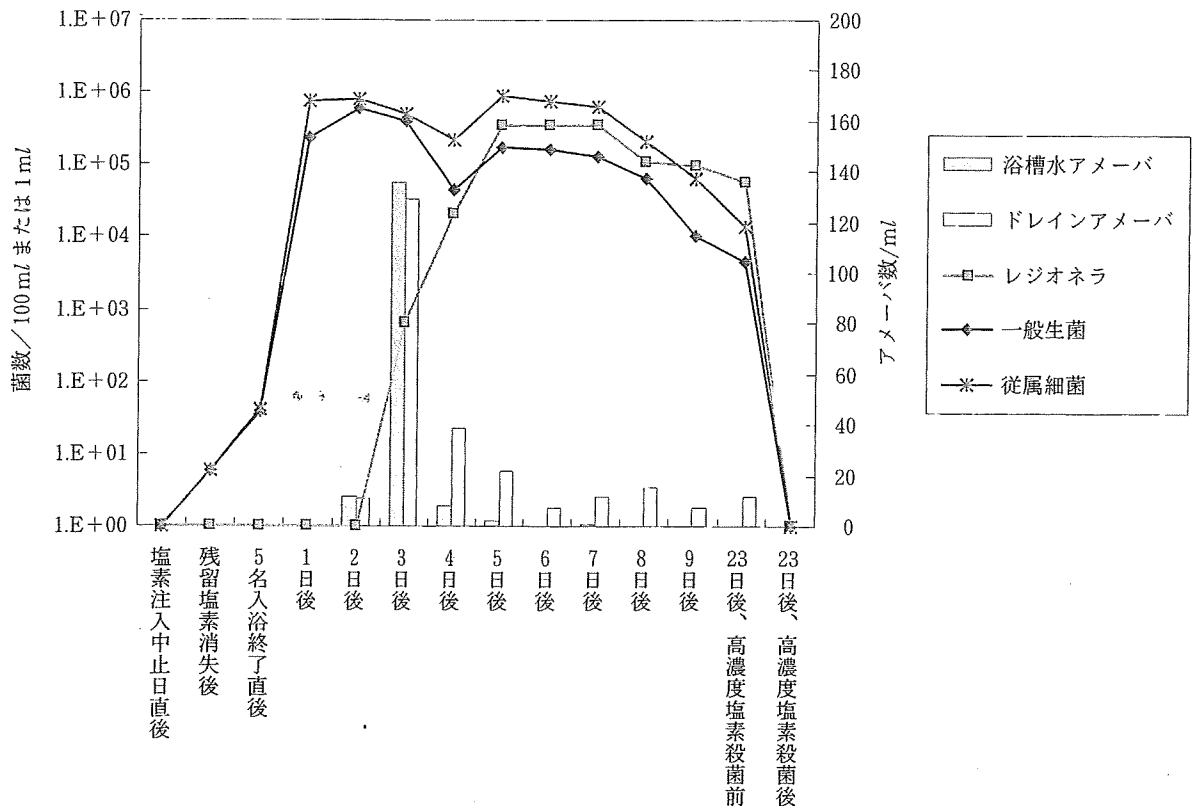


Fig. 1 自然汚染による循環浴槽水中でのレジオネラおよびアメーバ等の経時変化

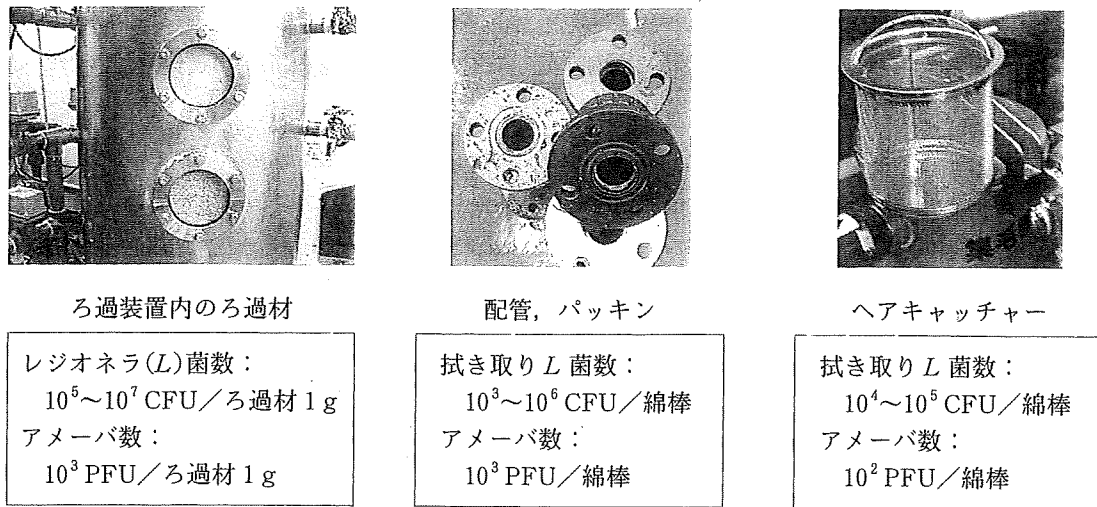


Fig. 2 循環式モデル浴槽における汚染箇所

ム中のレジオネラ殺菌が困難であることを確認した。

また、循環浴槽水を原因とするレジオネラ症集団発生事例は、浴槽水への塩素注入装置を備えた施設で起きていることも考慮すると、循環浴槽水のレジオネラ対策として、浴槽水への塩素注入法

と併用して、ろ過器対策やレジオネラ増殖抑制につながるアメーバ対策を考慮した新たな衛生管理法が必要と考える。そのひとつが、毎日、ろ過器内を5~10 ppm 塩素により、5分間以上逆洗浄する方法（フィルター・リフレッシュ法と呼ぶ）であり、レジオネラやその増殖宿主であるアメー



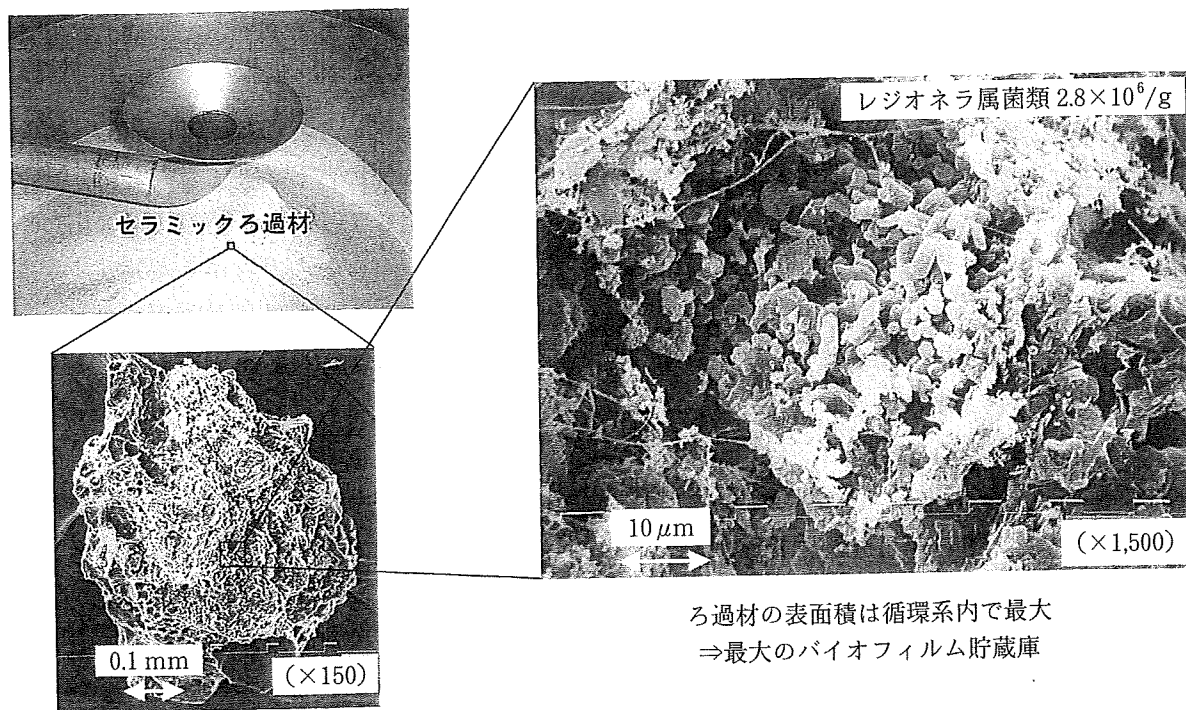


Fig. 3 ろ過器内ろ過材のバイオフィルム

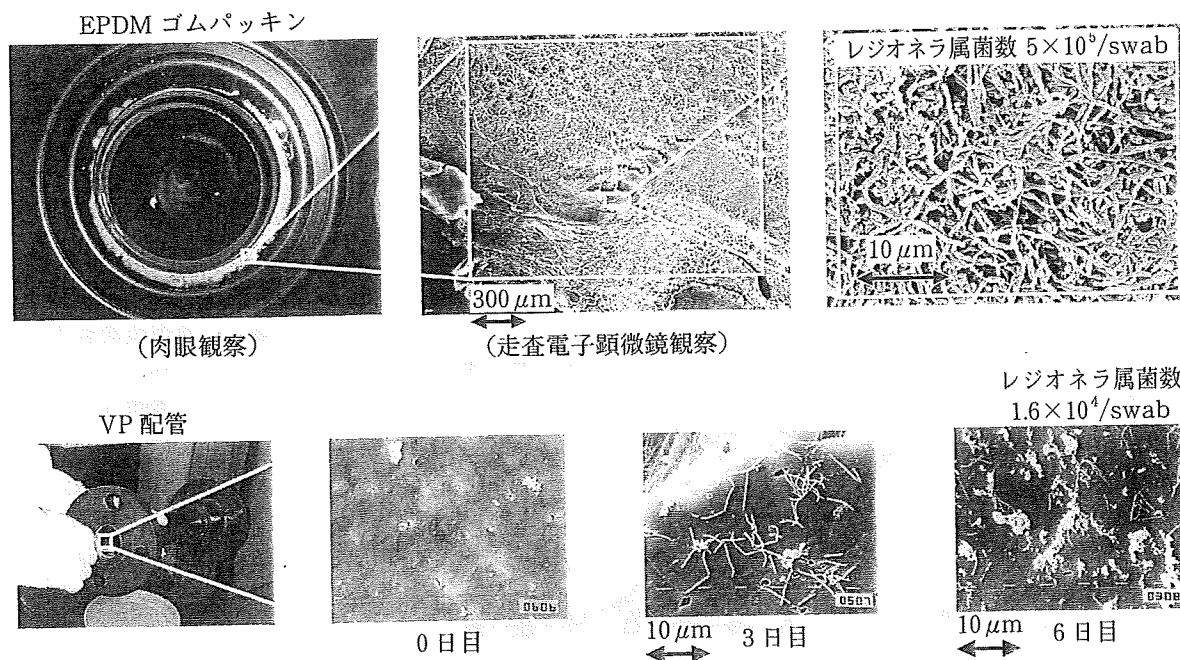


Fig. 4 配管, パッキンのバイオフィルム

バの殺菌効果が高く、毎日繰り返すことでレジオネラ、アメーバの増殖を抑制でき、水質浄化効果も期待できることがわかった。フィルター・リフレッシュ法と浴槽水への塩素注入法と併用することで、二重の安全・防御対策 (Multi-Barrier

System) となり、より安全な循環浴槽水の提供が可能になる。ここでは、フィルター・リフレッシュ法の実証データと、循環ろ過式浴槽水の衛生管理法としての有用性<sup>3)</sup> について紹介したい。

ろ過器内高濃度塩素逆洗浄法（フィルター・リフレッシュ法）の殺菌・増殖抑制効果

モデル浴槽を使用して、ろ過器内高濃度塩素逆洗浄法を実施した時のろ過器内の殺菌・洗浄効果（短期的効果）と、毎日、1回のフィルター・リフレッシュ法を長期日実施した時の浴槽水等におけるレジオネラ、アメーバの増殖抑制効果・水質浄化効果（長期的効果）を検証した。

短期的効果：モデル浴槽内で、自然汚染・増殖によりレジオネラ汚染状況を作り出した後、6%次亜塩素酸ナトリウム液注入（32 ml/分）による5分間のろ過器内高濃度塩素逆洗浄を実施した（ろ過器内塩素逆洗浄法に必要な塩素注入量の計算式： $\text{注入量 (ml/分)} = \frac{\text{目標塩素濃度 (mg/l)} \times \text{逆洗水量 (l/分)}}{\text{使用塩素濃度 (\%)} \div 10}$ ）ただし、ろ過器内の有機物により塩素が消費されるため、目標塩素濃度〔理論値〕の2~3倍量の注入が必要となる）。10分間静置後、正の流れによる塩素注入なしの rins 洗浄を3分間実施し、ろ過器内の高濃度塩素を系外に排出した。この間、ろ過器内水を逆洗浄開始直前から経時的に採材し、レジオネラ属菌、アメーバ等进行检查した。

レジオネラに汚染されたるろ過器内を高濃度塩素

で5分間逆洗浄した時の、ろ過器内水のレジオネラ、一般細菌数と有機物等の短期経時的な推移を Fig. 5 に示した。

逆洗浄開始時に  $10^3$  CFU/100ml あったレジオネラはろ過器内の残留塩素濃度の上昇（最高値 4 ppm）とともに減少し、4分後には検出されなくなった。逆洗浄後のろ過材からもレジオネラは検出されず、本法の殺菌効果が確認された。アメーバも同様に減少させることができた。さらに、逆洗浄の経過とともに、過マンガン酸カリウム消費量で示される溶存有機物量も減少した。なお、逆洗浄、リンス洗浄を終了し、循環ろ過運転を再開後、10分、1時間後の浴槽水の残留塩素濃度を測定したところ、いずれも  $<0.05$  ppm であり、ろ過器内高濃度塩素逆洗浄が浴槽水の残留塩素濃度にほとんど影響を与えなかった。

アルカリ泉（pH 9.3）の浴槽水を使った同様な実験では、残留塩素濃度 9 ppm の塩素水で逆洗浄することにより、ろ過器内のレジオネラを殺菌し、レジオネラ・フリーのろ過器を創出することができた。

しかし、逆洗浄水として、高濃度塩素に替えて水道水（残留塩素濃度 0.2 ppm）を使用したところ、レジオネラや一般細菌は殺菌されず、ろ過材

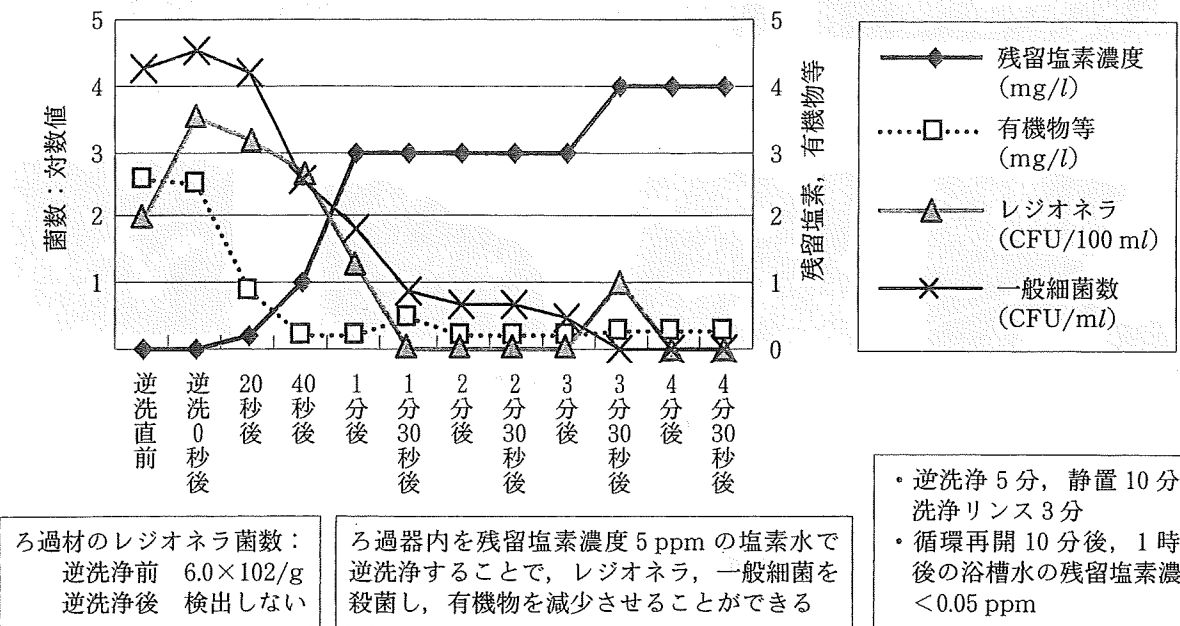


Fig. 5 フィルター・リフレッシュ（ろ過器内塩素逆洗浄）法の短期的効果

のレジオネラ菌数も逆洗浄前、後で大差がなかった。このことは、レジオネラ殺菌効果のあるフィルター・リフレッシュ法を実施するには、5~10 ppm の高濃度塩素による逆洗浄が欠かせないことを示している。

長期的効果：モデル浴槽で、塩素管理下の入浴によって有機物の蓄積後、残留塩素を消失させ、以降、無殺菌状態で循環運転した。ただし、1日、1回定時に、ろ過器内高濃度塩素逆洗浄（フィルター・リフレッシュ法）を実施し、9日目までの毎日、逆洗浄直前（残留塩素不検出を確認）に、浴槽水とろ過器内水を採材し、レジオネラ属菌、アメーバ等を検査した。Fig. 6 に示したように、フィルター・リフレッシュ法のみを毎日、1回繰り返すことで、浴槽水、ろ過器内水のレジオネラ属菌は、 $<10\sim70$  CFU/100 ml の範囲内で推移し、無殺菌に比べ増殖は大きく抑制された。また、アメーバの増殖も防ぐことができ、配管や集毛器網におけるバイオフィーム形成阻止効果も認められた。なお、フィルター・リフレッシュ法停止後に無殺菌循環した浴槽水ではレジオネラの増殖がみ

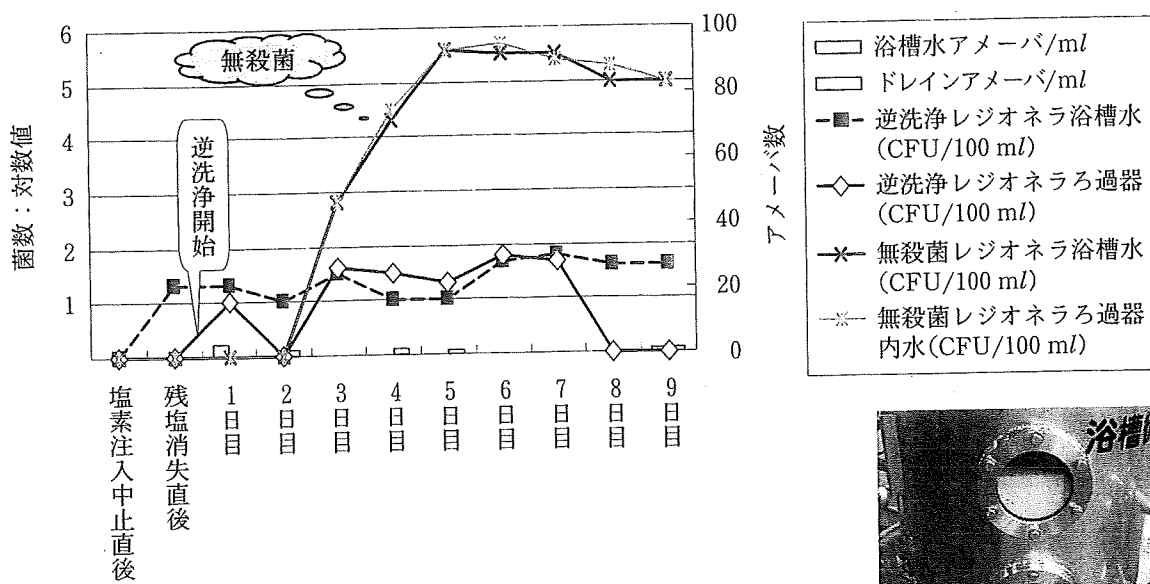
られ、増殖抑制効果はろ過器内塩素逆洗浄に由来することが示された。

フィルター・リフレッシュ法は、ろ過器内の有機物（塩素を消費する）を除けるため、不快な塩素臭（有機物と塩素の結合物質：クロラミン等が原因）が抑えられ、浴槽水への薬剤注入量を減らせる効果も確認できた。なお、塩素を含む逆洗浄水は中和して排水できるため、環境に与える影響は少なかった。

また、アルカリ泉（pH 9.3）の浴槽水を使った長期的効果実験でも、長期間にわたるレジオネラ増殖抑制効果が確認された。

### フィルター・リフレッシュ法の利点とコスト

フィルター・リフレッシュ法は、既存の設備で実施・自動化が可能（一部、塩素定量注入ポンプ、中和剤注入ポンプ、注入点追加工事、制御盤追加工事等のインシヤルコスト約 50 万円必要）で、温泉の泉質にかかわらず、レジオネラ、アメーバの殺菌・除去や増殖抑制が可能な優れた方法である。また、有機物等の汚れを物理的（系外排出）



毎日、繰り返すことで、長期間にわたって、浴槽水のレジオネラやアメーバの増殖を抑制できる

ろ過材を殺菌できるだけでなく、配管やヘアキャッチャー網のバイオフィーム付着を抑えた（レジオネラ菌数：90 CFU/綿棒 以下）



- 5 ppm 塩素, 1日1回, 5分間逆洗浄
- 浴槽水からは残留塩素は検出されない

Fig. 6 ろ過器内高濃度塩素逆洗浄殺菌の長期的効果

に、化学的（ハイパークロリネーション）に減らせる効果があり、塩素臭対策（有機物と塩素の結合物質：クロラミン等の塩素臭成分の生成が抑えられる）としても有効である。フィルター・リフレッシュ法の効果は現場施設でも実証され、ランニングコストも安価（2tのろ過器で薬剤費は約1万円/月）である。

なお、フィルター・リフレッシュ法は、平成16年4月から施行された静岡県公衆浴場法施行条例及び旅館業法施行条例の衛生管理法の中に盛り込まれている。

東京都の条例では、循環式浴槽は毎日換水を義務づけられているが、換水前に5~10 ppmの高濃度塩素による循環殺菌を実施することは、フィルター・リフレッシュ法と同等の効果が期待できると思われる。

さらに、我々は、逆洗浄法の薬剤と洗浄水の使用量を2分の1以下に節約し、循環殺菌で薬剤の作用時間を長くすることで殺菌効果を高めたシステム（ろ過器内塩素循環殺菌法）を開発し、レジオネラ・フリーのろ過器の創出と、循環浴槽水中でのレジオネラ増殖抑制効果や、配管、ヘアキャッチャーでのバイオフィーム形成阻止効果を確認した<sup>4)</sup>。

これらのフィルター・リフレッシュ法（ろ過器内塩素逆洗浄法、ろ過器内塩素循環殺菌法）は、国や他県にはない静岡独自の衛生管理法であり、“静岡発の安全、安心の浴槽水レジオネラ対策”として、県内外の研修会や講習会などで情報発信し、全国への普及をめざしている。

### 配管の洗浄・殺菌はどのような方法でやればよいか

レジオネラが自然増殖したモデル浴槽内を各種薬剤で2時間洗浄した後の、部位別の洗浄殺菌効果を比較して、表1に示した。ろ過材、配管はいずれの薬剤でもレジオネラの殺菌・除去が可能であった。しかし、集毛器網のレジオネラの殺菌は一部の薬剤では不完全であった。配管接合部の水漏れを防ぐために用いられるゴムパッキンはバイオフィームの付着が著しく、一旦形成されたバイオフィー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。

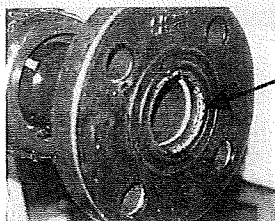
EPDMパッキンの接液部表面には、塩素剤等による劣化に起因すると思われる微小な穴が観察された。そのためバイオフィームが定着しやすく、除去しにくくなっていることが示唆された。一方、耐薬品性、撥水性に優れたテフロンパッキンの接

Table 1 循環ろ過装置内の洗浄法の検討

各種殺菌法による部位別の洗浄・殺菌効果の比較

	集毛器網	ゴムパッキン	テフロンパッキン	配管	ろ過材
過酸化水素 (2.3%)	◎	×	◎	◎	◎
高濃度塩素 (10, 50 ppm)	△	×	◎	◎	◎
二酸化塩素 (10, 50 ppm)	◎	×	◎	◎	◎
ブロム剤 (10, 50 ppm)	◎	×	◎	◎	◎
電解次亜塩素酸 (10, 50 ppm)	◎	×	◎	◎	◎
過炭酸 Na (メーカー指定濃度)	◎	×	◎	◎	◎

◎：洗浄・殺菌可能      △：不完全な場合あり      ×：洗浄・殺菌困難



ゴムパッキンのバイオフィーム

テフロン加工パッキンに交換する

- ・集毛器網を、毎日、清掃・消毒することを条例に盛り込む
- ・方法はタワシで物理的に洗浄後、消毒用エタノール噴霧で殺菌する