

汚染負荷は、循環式浴槽に比べて小さいものと考えられる。しかし、掛け流し式温泉を対象とした過去の調査で10~27%程度のレジオネラ属菌検出率が報告されているが<sup>7,8)</sup>、調査規模が限られているうえ、いずれも浴槽での汚染状況を面的に把握したに過ぎず、上流側にあたる源泉、貯湯槽、湯口等を含めた施設全体の汚染状況を調査した報告は見当たらない。また、入浴施設のレジオネラ対策を検討する上では、汚染の実態を明らかにするだけでなく、施設構造及び管理方法を併せて調査し、レジオネラ汚染を引き起こす要因を明らかにすることが重要である。

そこで、掛け流し式温泉の運用形態に即した衛生管理手法を確立するため、全国13府県の掛け流し式温泉を対象に泉質、構造設備、衛生管理方法等を含む実態調査を行い、レジオネラ汚染に影響を及ぼすリスク要因を解析した。

### 対象と方法

#### 1. 検査対象

浴槽内に循環配管あるいは連通管等の配管を一切持たず、かつ、温泉法に基づく「温泉」を利用する施設を「掛け流し式温泉」とみなし、調査対象とした。

2005年6月~2006年12月にかけて、全国13府県の掛け流し式温泉182施設について構造設備及び衛生管理状況を調査するとともに、403件の温泉水を採取し微生物汚染状況を調査した。検査項目は、温度、pH、遊離残留塩素、レジオネラ属菌、抗酸菌、アメーバ、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌を実施した。

#### 2. 検査方法

試料温度、pH、遊離残留塩素濃度は採水時に測定した。試料採取後、アメーバ分離用検体は室温で、他の微生物的検査用の検体は速やかに保冷して各研究機関に搬入し、48時間以内に検査を開始した。

レジオネラ属菌の同定及び菌数測定は新版レジオネラ症防止指針<sup>9)</sup>に準拠した。即ち、冷却遠心濃縮法の場合は試料200mLを6,000g、10分間で、ろ過濃縮法の場合は試料500mLを孔径0.45 $\mu$ mのポリカーボネートフィルター(ミリオア)でそれぞれ100倍に濃縮後、50 $^{\circ}$ C、20分の熱処理を行い、その0.1mLをGVPC寒天培地(日本ビオメリユール)上に塗布し、36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cで10日間培養した。レジオネラ属菌様の集落を血液寒天培地とBCYE $\alpha$ 寒天培地で確認培養後、スライド凝集反応(デンカ生研)、ラテックス凝集反応(OXOID)、DNA-DNAハイブリダイゼーション(極東製薬)、*mip*遺伝子の増幅及び16S rRNA遺伝子の塩基配列決定により、菌種及び血清群の同定を行った(検出限界10CFU/100mL)。抗酸菌検査は、100倍濃縮試料に等量の4%NaOHを加えて室温20分間処理後、0.1mLを2%小川培地(極東製薬)に塗布し36 $\pm$

1 $^{\circ}$ Cで8週間培養した。分離菌を純化後、国立感染症研究所にて生化学的性状、DDH、塩基配列決定などにより菌種の同定を行った。大腸菌はコリラートMPN(アスカ純薬)を使用し、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌は食品衛生検査指針に基づきMPN値を求めた。アメーバ検査は遠藤ら<sup>10)</sup>の「アメーバ分離・検出マニュアル」に準じた。

#### 3. 統計解析

統計パッケージはR version 2.6.2 (R Development Core Team)<sup>11)</sup>を使用した。多群間の比率の差はTukeyの多重比較を用い、多群間の平均値の比較はパラメトリック法としてTukeyの多重比較を、また、等分散の仮定が棄却された場合にはTurkeyの多重比較に替えてノンパラメトリック法のSteel-Dwassの多重比較を用い、いずれも有意水準は危険率5%未満とした。レジオネラ属菌汚染に関与するリスク因子を評価するため、レジオネラ属菌検出の有無を目的変数とし、各説明変数のオッズ比(OR)及び95%信頼区間(CI)を算出した。多重ロジスティック回帰モデルの構築には、step関数を用いた変数減少法及び変数増減法を実施し、AIC(Akaike's Information Criterion)を指標に変数選択を行った。

### 成 績

#### 1. 施設及び管理状況

調査施設の設備及び管理状況をTable 1にまとめた。pH 3.0未満の酸性泉が20.3%と多く、温泉を消毒している施設は22.5%であった。貯湯槽を持つ施設は58.4%で、そのうち温度を60 $^{\circ}$ C以上に維持している施設は37.0%、年1回以上清掃している施設は57.6%であった。また、配管系の定期清掃を行っている施設は34.5%にとどまった。浴槽については、約半数の施設が容量5m<sup>3</sup>以上の大浴槽を持ち、毎日完全換水及び清掃を実施している施設は74.4%であった。

#### 2. 採取地点別検出率

403件中119件(29.5%)からレジオネラ属菌が検出された(Table 2)。採取地点別の検出率は浴槽が39.4%と最も高く、湯口22.3%、貯湯槽23.8%、源泉8.3%で、源泉から浴槽に至る経路に沿って検出率は増加した。レジオネラ属菌陽性119件の平均菌数(幾何平均値)は66CFU/100mLで、地点別の菌数に有意差は認められなかったが、菌数の最高値は源泉、貯湯槽、湯口でそれぞれ180、670、4,000CFU/100mLと増加し、浴槽では6,800CFU/100mLに達した。アメーバもレジオネラ属菌と同様の分布を示し、浴槽30.3%、貯湯槽19.0%の検出率であった。抗酸菌は380件中7件(1.8%)から検出され、すべて浴槽であった。同定された菌種は*Mycobacterium avium*、*M. scrofulaceum*が各2件、*M. szulga*、*M. triplex*が各1件で

Table 1 Facilities and sanitary management at 182 hot springs

Facilities	Number (%)
Source of hot spring	
Temperature	
- $\geq 60^\circ\text{C}$	55 (30.2)
- 50–59 $^\circ\text{C}$	67 (36.8)
- $< 50^\circ\text{C}$	60 (33.0)
pH	
- $\geq 8.5$	31 (17.0)
- 7.5–8.4	74 (40.7)
- 6.0–7.4	35 (19.2)
- 3.0–5.9	5 (2.7)
- $< 3.0$	37 (20.3)
Quality	
- Chloride and/or bicarbonated spring	60 (33.0)
- Simple hot spring	49 (26.9)
- Sulfate spring	34 (18.7)
- Sulfur spring	39 (21.4)
Disinfection	
- Present	41 (22.5)
- Absent	141 (77.5)
Storage tank	
- Present	104 (58.4)
- Absent	74 (41.6)
Temperature	
- $\geq 60^\circ\text{C}$	34 (37.0)
- 50–59 $^\circ\text{C}$	25 (27.2)
- $< 50^\circ\text{C}$	33 (35.9)
Material	
- FRP	56 (57.1)
- Concrete	27 (27.6)
- Wood	7 (7.1)
- Other	8 (8.2)
Cleaning frequency	
- Every month or more	20 (20.2)
- Every 2 to 6 months	23 (23.2)
- Every year	14 (14.1)
- As necessary	15 (15.2)
- None	27 (27.3)
Distribution pipe	
Regular cleaning	
- Present	59 (34.5)
- Absent	112 (65.5)
Bathtub	
Volume of bath	
- $< 5.0\text{m}^3$	82 (51.9)
- 5.0–9.9 $\text{m}^3$	34 (21.5)
- $\geq 10.0\text{m}^3$	42 (26.6)
Main material	
- Tile	77 (41.0)
- Stone	83 (44.1)
- Wood	15 (8.0)
- Concrete	13 (6.9)
Drain and cleaning frequency	
- Daily	134 (74.4)
- Every 2 days	22 (12.2)
- Every 3 to 6 days	12 (6.7)
- Every week or less	12 (6.7)
Cleaning procedure	
- Brush	64 (38.6)
- Brush + detergent	52 (31.3)
- Brush + disinfection (+ detergent)	31 (18.7)
- Non brush (HPW and/or disinfection)	19 (11.4)

\*HPW: High-Pressure Water Jet

あった。大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌はいずれも浴槽から高頻度に検出され、浴槽での検出率はそれぞれ40.4%、30.8%、30.8%であった。

### 3. レジオネラ属菌汚染の特徴

Table 3に温度及びpH別の検出率を、浴槽と上流側（湯口、貯湯槽及び源泉）とに分けて示した。レジオネラ属菌は50 $^\circ\text{C}$ 以上で検出率が低下し、55 $^\circ\text{C}$ 以上では26件中1件（56.3 $^\circ\text{C}$ の湯口）のみの検出であったが、アメーバは50 $^\circ\text{C}$ 以上の試料ではすべて陰性であった。また、レジオネラ属菌はpH 6.0未満で検出率が低下し、pH 3.0未満では検出されなかったが、アメーバはpH 6.0未満の試料ではすべて陰性であった。

### 4. 分離されたレジオネラ属菌の種及び血清群

分離されたレジオネラ属菌は6種で、119件中102件（85.7%）の試料から *Legionella pneumophila* が分離された（Table 4）。*L. pneumophila* の血清群（SG）別内訳は、SG 1, 5, 6がそれぞれ21.8%、21.0%、21.8%と同程度の分離率を示し、SG 3, 4がそれぞれ17.6%、14.3%と続いた。レジオネラ属菌が分離された試料を、*L. pneumophila* SG 1, SG1以外の *L. pneumophila*, *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌の3群に分けて陽性試料のpH及び温度の平均値を比較した。その結果、*L. pneumophila* SG 1（pH 7.6 $\pm$ 0.9）は、SG1以外の *L. pneumophila*（pH 8.0 $\pm$ 0.7）と比較してpHが有意に低く（Steel-Dwass 多重比較,  $p < 0.05$ ）、温度では *L. pneumophila* SG 1（44.3 $\pm$ 4.4 $^\circ\text{C}$ ）は、SG1以外の *L. pneumophila*（42.3 $\pm$ 3.2 $^\circ\text{C}$ ）と比較して有意に高い（Tukey 多重比較,  $p < 0.05$ ）結果が得られた。

### 5. レジオネラ属菌汚染のリスク因子

レジオネラ属菌の汚染に関与する構造設備及び保守管理の特徴を明らかにするため、浴槽とそれより上流側とに分けて、多重ロジスティック回帰分析を行った。浴槽においては、湯口からの流入水がレジオネラ属菌に汚染されている場合（OR=6.98, 95%CI=2.14~22.8）及び浴槽容量が5 $\text{m}^3$ 以上（OR=2.74, 95%CI=1.28~5.89）でリスクが高く、pH 6.0未満（OR=0.12, 95%CI=0.02~0.63）でリスクが低下した（Table 5）。なお、泉質並びに浴槽の洗浄方法、材質及び換水洗浄頻度についても評価を行い、単変量解析では塩化物/炭酸水素塩泉、ブラシを使わない浴槽洗浄、石の浴槽で検出率が高くな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。

一方、上流側においてはpH 6.0未満（OR=0.06, 95%CI=0.01~0.48）及び温度55 $^\circ\text{C}$ 以上（OR=0.10, 95%CI=0.01~0.77）で有意にリスクが低下し、貯湯槽の存在でリスクが増加する傾向がみられた（Table 6）。なお、泉質、遊離残留塩素濃度及び貯湯槽・配管の洗浄頻度についても評価を行い、単変量解析では硫

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>e</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>d,f</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>4)</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>14)</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>4)</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改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				
- ≥ 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				
- ≥ 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				
- ≥ 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圧洗浄や消毒のみの場合にバイオフィル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圧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ル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ル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>	<u>0.06 (0.01-0.48)</u>	<u>0.008</u>
Temperature				
- $\geq 55^\circ\text{C}$	1/26 (3.8)	0.12 (0.02-0.93) <sup>a</sup>	<u>0.10 (0.01-0.77)</u>	<u>0.027</u>
- 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圭次先生及び各地方衛生研究所の皆様へ深謝いたします。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へ深謝いたします。

#### 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—鹿兒島県. 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>13)</sup>, Toshio YAMAZAKI<sup>15)</sup>, Kunio AGATA<sup>16)</sup> & Hiroo INOUYE<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.



保健医療科学 特集: 平常時・緊急時の衛生対策

<原著> モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策

杉山寛治<sup>1)</sup>、小坂浩司<sup>2)</sup>、泉山信司<sup>3)\*</sup>、縣 邦雄<sup>4)</sup>、遠藤卓郎<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>静岡県環境衛生科学研究所微生物部、<sup>2)</sup>国立保健医療科学院水道工学部、<sup>3)</sup>国立感染症研究所寄生動物部、<sup>4)</sup>アクアス株式会社つくば総合研究所、<sup>5)</sup>国立感染症研究所細菌第一部

和文抄録

【目的】循環式浴槽では肺炎の起因菌であるレジオネラ属菌の汚染が問題となっている。死亡例を含む集団感染が繰り返されたことから、厚生労働省(当時は厚生省)の指導のもとで緊急避難的に遊離塩素消毒による管理が行われ、そのまま平常時の対応となった感がある。しかしながら、今日に至るまで浴槽からレジオネラが検出されており、遊離塩素消毒が全ての浴槽の安全を担保するとは言い難い状況にある。井水や温泉水など多様な水質(泉質)が存在し、また薬湯では添加された薬物成分と塩素が反応したり、高 pH の条件下では遊離塩素の効果が減じたりしているものと考えられる。また臭気などが敬遠されて塩素の使用が必ずしも徹底されない恐れもあり、多方面から代替消毒方法が求められている。本研究では米国の水道で実用化されているモノクロラミン消毒(結合塩素の 1 種)に着目し、モノクロラミン消毒の浴槽施設への応用について検討を行った。

【方法】モデル循環式浴槽を用い、2 週間にわたってモノクロラミン消毒下で入浴を行い、この間のレジオネラ属菌や塩素濃度を測定した。モノクロラミン溶液は、アルカリ性(pH8.4)条件下の井水 1L に次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、次いで塩化アンモニウム水溶液を添加・混合することで生成した。規定量(3mg/L)となるように生成したモノクロラミンをモデル循環式浴槽に加え、その後は不足した塩素を 1 日 1 回程度追加し、濃度維持に努めた。塩素濃度は DPD 吸光度法(全塩素(結合塩素と遊離塩素の和)、あるいは遊離塩素)、インドフェノール法(モノクロラミン)、DPD/FAS 滴定法(遊離塩素、モノクロラミン、ジクロラミン、トリクロラミン)、サリチル酸法(モノクロラミン)、および HS-GC/MS 法(トリクロラミン)の各種方法により測定した。

【結果】2 週間の消毒管理期間中、レジオネラ属菌とアメーバは検出されなかった。同時に測定した従属栄養細菌数も低く、微生物の増殖は抑えられていた。DPD 吸光度法(全塩素)は、他の複数のモノクロラミン測定方法と同等の測定値が得られたことから、DPD 吸光度法による全塩素濃度はモノクロラミン濃度に相当するものと判断され、現場向きの測定法として利用が可能であった。DPD/FAS 滴定法では、ジクロラミンがわずかに検出された程度にとどまり、塩素臭の主要な原因となるトリクロラミンは検出されなかった。高感度な HS-GC/MS 法による測定においても、トリクロラミンは検出されなかった。なお、ボランティア入浴者から、いわゆる塩素臭がほとんどなかったとの感想を得ており、モノクロラミンによる消毒では臭気の低減が期待できた。

【結論】浴槽における遊離塩素消毒の代替法として、モノクロラミン消毒が有効であることを見出した。

キーワード(5 個前後を和文で): レジオネラ、浴槽、モノクロラミン、消毒、塩素

英文抄録

Sanitary control of bathing water by monochloramine disinfection – prevention of *Legionella* contamination –

(Objectives) Microbiological contamination of whirlpool baths with *Legionella*, a causative agent of pneumonia, is an important issue in Japan. Chlorination in those bath waters was mandatory asked in emergencies after several outbreaks of legionellosis, and chlorination is established as the usual measure until now. However, chlorination has some difficulty to maintain the cleanliness of bath waters, and the detections of *Legionella* are reported repeatedly even now. Chlorine in bath waters sometimes reacts with substances that occur naturally in or are added to hot and/or cold springs and/or wells. Residual active chlorine (hypochlorous acid) is also decreased under the condition of high pH. Strict maintenance of adequate chlorination levels is also unpopular with guests at facilities due to the strong odor of chlorination (the odor maybe comes from trichloramine). An alternative measure is demanded to avoid those problems. In this study, we focused on monochloramine disinfection as an alternative which is applied for municipal drinking water in the USA for prevention of biofilms and disinfection by-products. We applied the monochloramine disinfection for a whirlpool bath model running in our laboratory.

(Methods) Monochloramine concentration was maintained around 3mg/L while volunteers took baths in the whirlpool bath for 2 weeks. A monochloramine solution was added to the bath water immediately after it was made by mixing diluted sodium hypochlorite and ammonium chloride in a beaker of well water (pH 8.4). Amoebae, *Legionella* and heterotrophic bacteria were monitored during the test by using the usual culture methods. Chlorine concentrations were measured by the N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) ferrous titrimetric and colorimetric methods, the indophenol method, the salicylate method, and the HS-GC/MS method.

(Results) Microbiological contamination was suppressed successfully in the bath during the 2 weeks period, by daily disinfection using monochloramine. *Legionella* and/or host amoebae were not detected, and heterotrophic plate counts were 0 or very low. The measurements of the bath waters were almost the same by using the DPD titrimetric method, the DPD colorimetric method, the indophenol method, and the salicylate method so the measurements of total residual chlorine (free plus combined chlorine) could be considered as the monochloramine concentrations. A small amount of dichloramine and no trichloramine was detected by using the DPD titrimetric method. No trichloramine was confirmed by using the sensitive HS-GC/MS method. Volunteers noticed little odor during the bathing, which provided additional evidence supporting the above possibility. This monochloramine disinfection was also successful in suppressing the typical chlorine odor.

(Conclusions) We found monochloramine disinfection to be very recommendable as a measure for the sanitary control and the prevention of *Legionella* contamination in alkaline bath waters.

英語キーワード: *Legionella*, bath, monochloramine, disinfection, chlorine

## 緒言

重篤なレジオネラ肺炎の起因菌であるレジオネラ属菌は、アメーバ等の原生動物に感染し増殖するが、浴槽水など身の回りの温水環境を介して人に感染することから問題となる。浴槽水の長期連用と管理の簡略化(自動化)に導入された循環式浴槽は、その構造上から入浴者の持ち込む汚れの蓄積は免れず、その結果、浴槽内で微生物の繁殖、ひいてはレジオネラ等の病原微生物汚染につながっている。事実、2002年には7名の死亡を含む295名の大規模集団感染が発生し、その他にも集団感染が繰り返されている<sup>1, 2)</sup>。この間、厚生労働省(当時は厚生省)の指導により浴槽水の遊離塩素消毒が行なわれてきたが、当初の消毒方法がそのまま平常時の対応として今日に至っている(公衆浴場における衛生等管理要領等について、生衛発第1811号平成12年12月15日、健発第0214004号平成15年2月14日改正)。

遊離塩素の消毒効果は条件によって著しく減ずる可能性があり、そのため遊離塩素消毒下にもかかわらずしばしばレジオネラ属菌が検出されている<sup>3)</sup>。換言すれば、遊離塩素消毒は全ての浴用施設の安全を担保するものになってはいない。遊離塩素を消費する物質として金属イオン、有機物、あるいはアンモニアなど数多くが知られている。また、高pH環境下で消毒効果が著しく減じる点も問題である。塩素( $\text{Cl}_2$ )は水に溶けると加水分解して塩酸と次亜塩素酸( $\text{HClO}$ )に分かれ、水中では通常 $\text{HClO}$ とその共役塩基である次亜塩素酸イオン( $\text{ClO}^-$ )として存在している<sup>4)</sup>。したがって、遊離塩素消毒とは、実際には、 $\text{HClO}$ と $\text{ClO}^-$ による消毒を意味しているが、高pH環境下では次亜塩素酸イオンが優位となり消毒効果が低下する( $\text{p}K_a=7.5$ )。本来、遊離残留塩素による水の消毒は不連続点塩素処理(不連続点を超えて塩素を注入する処理方法)を基本とするが、浴用水では、上述の物質さらには入浴者の体表で遊離塩素が消費されることから、不連続点

処理はおろか、遊離塩素濃度の維持も難しい。これらの問題を解消するためには遊離塩素消毒の代替消毒法が求められる。

本研究では、浴槽における代替消毒方法としてモノクロロミン消毒に着目した。モノクロロミンは結合塩素の1種で、遊離塩素消毒に比べて遅効性ではあるが、化学的安定性があることから使いやすい可能性がある。実際に米国の水道では配管系のバイオフィーム対策および消毒副生成物対策として2005年の報告時点で3割の施設にモノクロロミン消毒が取り入れられている実績があり<sup>5)</sup>、また、給湯配管のレジオネラ対策には遊離塩素消毒に比べてモノクロロミン消毒がより有効であるとの報告がある<sup>6)</sup>。わが国の水道でも結合残留塩素による消毒は $0.4\text{mg/L}$ 以上、著しく汚染される恐れがある場合 $1.5\text{mg/L}$ 以上と規定されている(水道法第22条に基づく水道法施行規則第17条第1項第3号)。ここで言う結合残留塩素は主にモノクロロミンと想定される。モノクロロミンを入浴中に使用した場合は皮膚への刺激性等が心配されるが、実験動物を用いた試験結果では問題ないことが確認された<sup>7)</sup>。

浴槽レジオネラ対策としてのモノクロロミン消毒の有効性を検討した報告は見当たらず、本研究において検討を試みた。最初に、浴槽水中のモノクロロミン濃度の維持管理が必要となるが、高い安定性を生かして1日1回程度の添加で足りるのであれば現場での使用には好都合である。また、現場向きのモノクロロミン測定方法が必要である。臭気の原因となるジクロロミンと、主要な原因となるトリクロロミンの生成をできる限り抑制したいが、反応条件としてアルカリ性であること、アンモニア過剰であることが必須と考えられる。入浴により浴槽水は有機物汚染を受けるが、これに伴い消毒効果が低下する有機クロロミンの副生と微生物の増殖が懸念される。これらの一連の検証を、試験管内試験ではない、実際の浴槽施設とほぼ同じと見なせるモデル循環式浴槽において実施したので報告する。

## 材料と方法

### モノクロラミン

モノクロラミンはアルカリ条件下、次亜塩素酸ナトリウムとアンモニアの反応によって得られ( $\text{NH}_3 + \text{HClO} \rightarrow \text{NH}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O}$ )、溶液は用事調製が必要である。アンモニアの不足や pH が酸性側に傾くと、モノクロラミンからジクロラミン ( $\text{NH}_2\text{Cl} + \text{HOCl} \rightarrow \text{NHCl}_2 + \text{H}_2\text{O}$ )、トリクロラミン ( $\text{NHCl}_2 + \text{HOCl} \rightarrow \text{NCl}_3 + \text{H}_2\text{O}$ ) が生成する恐れがあるので注意を要する。また有機物との反応による有機クロラミンの生成にも注意を払う必要がある。本研究では、井水 1L (pH8.4) に、6%次亜塩素酸ナトリウム溶液(オーヤラックス) 90ml を添加・希釈し、次いで 10%塩化アンモニウム溶液(和光純薬) 112.5ml を加え、所定の時間反応させてモノクロラミンを生成した。この時の両剤のモル比は遊離塩素に対してアンモニアが過剰(1:2.5)となっており、ジクロラミンおよびトリクロラミン生成の抑制に努めた。この全量を水量  $2\text{m}^3$  のモデル循環式浴槽に添加、浴槽水のモノクロラミン濃度を  $3\text{mg/L}$  付近に調整した。濃度は WHO のバックグラウンドドキュメント等を参考に設定した<sup>8)</sup>。

### モデル循環式浴槽

モデル循環式浴槽(静岡県環境衛生科学研究所)は、砂ろ過装置を含む循環配管と浴槽や加温装置からなり、水量は循環系を含め  $2\text{m}^3$  ある。これを最初に洗浄消毒し、pH8.4 の井水を満たしてからモノクロラミン消毒を開始した。循環流速を  $4\text{m}^3/\text{h}$  とし、湯温  $40^\circ\text{C}$  に維持した浴槽水に研究所職員が入浴することで有機物汚染を負荷した。モノクロラミンの消費分は計測の上で間欠的に投入・補充し、2 週間の入浴実験を行った。この間、定期的に試料を採取し、常法に従ってレジオネラ属菌(GVPC 寒天培地)、従属栄養細菌(R2A 寒天培地)、自由生活性アメーバ(大腸菌塗布無栄養寒天培地)を定量した。

本浴槽では消毒がなくなると速やかにレジオネラ属菌を含め各種微生物が増殖することを繰り返しており、安全性には十分に配慮して入浴試験を行った。浴槽上部の天井にはドラフトを設置し、換気によるエアロゾル対策に努めた。併せて入浴者による浴槽水の臭気について聞き取り調査を行った。上記の一連の入浴試験を 2 回実施した。

### 塩素濃度測定

モデル浴槽現場での全残留塩素濃度(遊離残留塩素濃度と結合残留塩素濃度の和)ならびに遊離残留塩素濃度は *N,N'*ジエチル-*p*フェニレンジアミン(DPD)吸光度法により測定した(ポケット塩素計、全塩素用ならびに遊離塩素用測定試薬; HACH 社)。予備実験の結果から、上述の方法で生成されたクロラミン溶液には遊離残留塩素は検出されず、全てが結合型塩素として存在しており、また、そのほとんど全てがモノクロラミンであることを確認した。すなわち、全塩素濃度の測定値をモノクロラミン濃度と考えると、現場におけるモノクロラミン濃度は、DPD 吸光度法による全塩素濃度の測定値を用いた。なお、2 回目のモデル浴槽試験では簡易測定試薬(Monochlor F、HACH 社)を用いたインドフェノール法によるモノクロラミン濃度測定もあわせて行った<sup>9)</sup>。インドフェノール法は、有機クロラミン等の影響を受けにくい測定方法であることが知られている。

モノクロラミン・ジクロラミン・トリクロラミンの分別定量は、米国の Standard Methods(第 21 版、2005)の DPD を用いた硫酸第一鉄アンモニウム(FAS)による滴定法(DPD/FAS 滴定法)に準じて行った<sup>10)</sup>。なお、DPD/FAS 滴定法と区別する目的で、本報告では先に説明した現場使用の簡易試験法を DPD 吸光度法と表現した。

DPD 吸光度法ならびに DPD/FAS 滴定法は、有機クロラミンが存在する場合にはその影響を受ける場合がある。これを避けるため、インドフェノール法と同様に

有機クロロミン等の影響を受けにくいサリチル酸法での測定を併用した<sup>11)</sup>。DPD法とサリチル酸法あるいはインドフェノール法による測定値を比較することで、有機クロロミンの生成の有無を確認した。

トリクロロミンの濃度測定は、HS-GC/MS法(ヘッドスペース・ガスクロマトグラフ質量分析法、Agilent 6890N/5975C、Agilent Technologies社)を併用した<sup>12, 13)</sup>。なお、HS-GC/MS法の定量下限値は15µg/Lで、DPD/FAS滴定法よりも高感度にトリクロロミンを測定できる。

現場で実施できないDPD/FAS滴定法、HS-GC/MS法、サリチル酸法による塩素濃度の測定については、消毒副生成物等の測定方法に準じて浴槽水を輸送し、実験室(国立医療科学院)で実施した。すなわち、化学測定用の共栓ビンを用い、空気を入れないよう試料水で容器を満たし、パラフィルムで封じて冷蔵して輸送した。

#### 結果および考察

モノクロロミンによるモデル循環式浴槽のレジオネラ消毒効果

方法に記したように、2m<sup>3</sup>のモデル循環式浴槽水のモノクロロミン消毒による管理を試みた。モノクロロミン濃度3mg/Lを目標に管理して、入浴しながら2週間にわたって浴槽水を使用し続けた。レジオネラ属菌、自由生活性アメーバ、従属栄養細菌の測定を行った結果、レジオネラ属菌、自由生活性アメーバは検出されなかった(表1)。従属栄養細菌は検出されてもわずかであった。モノクロロミン消毒は微生物汚染を抑制することが可能であった。

また、モノクロロミン消毒を停止した浴槽水において、レジオネラ属菌、従属栄養細菌、アメーバの増殖が確認された。これは当浴槽水に細菌増殖のポテンシャルがあったことを意味し、モノクロロミン消毒によってそれが抑えられていたことになる。モノクロロミンの消毒効果の高さが示唆される結果であった。

モデル循環式浴槽におけるモノクロロミン濃度の維持

モノクロロミンを含む塩素とアンモニアの反応は非常に複雑である<sup>4)</sup>。このため、モノクロロミンを高純度で生成させるには、アルカリ条件下で、遊離塩素に対してアンモニアを過剰に保ちつつ反応させることが重要となる。現場での簡易なモノクロロミン溶液の生成方法として、方法に記した手順を用意した。この方法を用いることで、浴槽水の全塩素濃度(モノクロロミン濃度)を所定の濃度(≒3mg/L)に調整することが可能であった(表2)。入浴後の浴槽水中のモノクロロミン濃度は概ね1~3割(最大5割)低下することから、それに応じて1日1回、モノクロロミン溶液を追加することで比較的容易に濃度を維持することができた。モノクロロミン溶液の調製と浴槽中での濃度維持は遊離塩素管理に比べて容易と考えられたが、実施に向けては塩素試薬の安全操作、生成反応や塩素濃度測定とそれに応じた追加塩素量の計算への理解が必要になる。入浴施設など現場への導入およびその普及、あるいは事故防止の観点からは自動注入装置の開発が好ましいと考える。

モノクロロミン、ジクロロミン、トリクロロミン測定

DPD/FAS滴定法によりモノ・ジ・トリクロロミン濃度をそれぞれ測定した結果、わずかな量(0.1mg/L)のジクロロミン生成が認められた以外は全てモノクロロミンであった(表3)。本方法ではトリクロロミンが測定されることは無く、さらに、高感度のHS-GC/MS法によってもトリクロロミンは生成されていないことが確認された(定量下限値:15µg/L)。トリクロロミンは主要な塩素臭の原因物質であるが、トリクロロミンが不検出という測定結果と、入浴を担当したボランティアから得た「試験期間を通して塩素臭はほとんどなかった」との証言は符合した。

なお、DPD吸光度法による全塩素濃度の値はインドフェノール法によって測定されたモノクロロミン濃度と

ほぼ一致しており、DPD 吸光度法により測定された全塩素濃度をモノクロロミン濃度としてよいものと判断された(表 2B)。なお、DPD 吸光度法では微量の遊離塩素が測定されたが、常にアンモニア過剰の条件でモノクロロミン生成を行っており、理論上遊離塩素の存在は考えにくい。DPD 吸光度法の取扱説明書は遊離塩素濃度を測定する際に迅速な操作を求めており、結合塩素が存在する場合には時間の経過とともに発色が進むことから、そのような誤差として上記遊離塩素は検出されたと解釈した。

#### 有機クロロミンの生成の有無

モノクロロミンの測定において、有機クロロミンの影響を受ける場合がある DPD/FAS 滴定法と、影響を受けないサリチル酸法の比較を行ったところ、両測定法による測定結果はほぼ一致し、浴槽中に有機クロロミンが生成されていないことが確認された(表 3)。このことは、有機クロロミンの影響を受けないインドフェノール法による測定結果との照合からも確認された(表 2B)。

#### 試料輸送について

原則、塩素濃度は現場で測定すべきであるが、モノクロロミンは遊離塩素に比べて安定で、冷蔵輸送でも測定は可能であった。モデル循環式浴槽の現場で測定した DPD 吸光度法による全塩素濃度(モノクロロミン消毒ではモノクロロミン濃度と見なす)の値は、輸送後に実験室で測定した DPD/FAS 滴定法、あるいはサリチル酸法によるモノクロロミン濃度とほぼ一致した(表 3)。冷蔵で 2 晩経過したサンプルにおいても、採水時に現場で測定した全塩素濃度(DPD 吸光度法)あるいはモノクロロミン濃度(インドフェノール法)は、実験室で行った DPD/FAS 滴定法あるいはサリチル酸法によるモノクロロミン濃度とほぼ一致した。

#### 結論

モノクロロミンの消毒効果はレジオネラ対策に効果

が望めるものと期待されたことから、モデル循環式浴槽で実際に管理を試みた結果、2 週間レジオネラ属菌を抑制することができた。1 日 1 回の塩素添加でモノクロロミン濃度を維持することが可能であった。モノクロロミン濃度測定には、DPD 吸光度法(全塩素)を使用することが可能であった。ジクロロミン、トリクロロミン、有機クロロミンの生成はほとんど無視できた。モノクロロミン消毒は、アルカリ性の浴槽水において、遊離塩素消毒を代替する方法となると期待された。モノクロロミン消毒の自動化等整備を進め、浴槽施設への導入・普及を目指したい。

#### 謝辞

本研究は平成 19~21 年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法の研究(研究代表者:遠藤卓郎)」(H19-健危-一般-015)の支援を受けて行った。また、本研究の塩素濃度測定に際して沖縄県企業局の福井 克人氏の助力を得た。ここに謝意を表します。

#### 引用文献

- 1) 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.
- 2) Kuroki T, Ishihara T, Ito K, Kura F. Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan, with a special focus on Legionella concentrations in water. Jpn J Infect Dis. 2009; 62(3):201-5.
- 3) 村上光一, 長野英俊, 野田多美枝, 濱崎光宏, 堀川和美, 石黒靖尚, 他 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、

- 防菌防黴, 2008; 36(11):749-56.
- 4) White GC. Handbook of chlorination and alternative disinfectants, 4th edition, Wiley, 1998.
  - 5) Seidel CJ, McGuire MJ, Summers RS, Via S. Have utilities switched to chloramines? J. Am. Water Works Assoc. 2005; 97:87-97.
  - 6) Flannery B, Gelling LB, Vugia DJ, Weintraub JM, Salerno JJ, Conroy MJ, et al. Reducing Legionella colonization in water systems with monochloramine. Emerg Infect Dis. 2006; 12(4):588-96.
  - 7) 神野透人, 泉山信司, 香川(田中)聡子, 高橋淳子, 畔上二郎. モノクロラミンの皮膚一次刺激性に関する研究 厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業「公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究」(研究代表者:遠藤卓郎. 課題番号:H19-健危-一般-015)」平成 20 年度分担研究報告書, 2009
  - 8) WHO. Monochloramine in Drinking-water (Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality), 2004.
  - 9) Lee W and Westerhoff P. Formation of organic chloramines during water disinfection-chlorination versus chloramination. Water Res., 2009; 43:2233-9.
  - 10) APHA, AWWA, WEF: Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater 21th edition, 2005.
  - 11) Tao H, Chen ZL, Li X, Yang YL and Li GB. Salicylate-spectrometric determination of inorganic monochloramine. Anal. Chim. Acta, 2008; 615:184-90.
  - 12) 小坂浩司. 水道におけるトリクロラミンの実態および前駆物質の低減化. 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業「水道水異臭被害を及ぼす原因物質の同定・評価および低減化技術に関する研究」(主任研究者:西村哲治)」平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008
  - 13) Kosaka K, Seki K, Kimura N, Kobayashi Y and Asami M. Determination of trichloramine in drinking water using head space gas chromatography/mass spectrometry. Water Sci. Technol.: Water Supply, 2010; 10(1):23-9.

表1 浴槽水の微生物汚染測定結果

A) 1回目				B) 2回目					
管理状態	日数	レジオネラ属菌数(CFU/100mL)	従属栄養細菌数(CFU/mL)	アメーバ数(50mL中)	管理状態	日数	レジオネラ属菌数(CFU/100mL)	従属栄養細菌数(CFU/mL)	アメーバ数(50mL中)
濃度管理入浴前		<10	<10	0	濃度管理入浴前		<10	<10	0
濃度管理入浴	1日目	<10	<10	0	濃度管理入浴	1日目	<10	<10	0
	2日目	<10	<10	0		3日目	<10	<10	0
	3日目	<10	<10	0		7日目	<10	<10	0
	5日目	<10	<10	0		11日目	<10	20	0
	8日目	<10	<10	0	14日目	<10	10	0	
	10日目	<10	<10	0	濃度管理なし	15日目	7.5×10 <sup>2</sup>	3.1×10 <sup>5</sup>	9.5
	12日目	<10	<10	0					
15日目	<10	<10	0						
濃度管理なし	44日目	2.2×10 <sup>4</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	検出					

表2 モデル循環式浴槽塩素濃度推移

A) 1回目						B) 2回目						
管理状態	日数	塩素濃度 (mg/L) *3		モノクロラ ミン投入量 (mg/L) *2	入浴 者数	管理状態	日数	塩素濃度 (mg/L) *3		モノクロラ ミン投入量 (mg/L) *2	入浴 者数	
		全塩素 *1	遊離塩素 *1					モノクロ ラミン *4	全塩素 *1			遊離塩素 *1
モノクロラミン投入前		0.1	0.0		0	モノクロラミン投入前		0.1	0.3	0.0	0	
濃度一定調整時		3.3	0.1	3.0	0	濃度一定調整時		3.0	3.0	0.1	3.6	0
濃度管理	1日後	2.8	0.1	0.4	0	濃度管理	1日後	2.6	2.6	0.1	0.9	0
	2日後	2.7	0.2	0.4	0		2日後	2.5	2.5	0.1	1.0	0
濃度管理入浴	1日目	2.6	0.1	0.7	1	濃度管理入浴	3日後	2.5	2.5	0.2	0.6	0
	2日目	2.5	0.2	0.6	2		1日目	2.3	2.6	0.1	1.6	1
	3日目	2.3	0.1	1.2	3		2日目	2.6	3.0	0.2	1.0	1
	4日目	2.6	0.1	1.0	1		3日目	2.6	2.6	0.1	1.2	3
	5日目	2.8	0.2	0.8	3		4日目	2.7	2.7	0.1	1.0	3
	6日目	2.6	0.2	0.8	1		5日目	2.5	2.7	0.1	1.0	1
	7日目	3.0	0.1	0.3	0		6日目	2.7	2.7	0.1	0.8	1
	8日目	2.2	0.1	0.8	3		7日目	2.6	2.7	0.1	1.2	3
	9日目	2.7	0.1	1.4	3		8日目	2.8	2.6	0.1	0.8	2
	10日目	2.7	0.1	1.0	2		9日目	2.6	2.7	0.1	0.8	1
	11日目	3.1	0.1	0.6	2		10日目	2.4	2.5	0.1	1.2	2
	12日目	2.6	0.2	1.0	3		11日目	2.7	2.6	0.1	1.0	2
	13日目	3.1	0.1	0.4	1		12日目	2.4	2.6	0.1	0.8	1
	14日目	2.4	0.2	0.8	0		13日目	2.3	2.5	0.1	0.8	1
	15日目	3.1	0.1	0	0		14日目	2.4	2.5	0.1	0	0
濃度管理なし	1日目	1.8	0.1	0	0	濃度管理なし	1日目	1.7	1.7	0.1	0	0
	2日目	1.4	0.1	0	0		2日目	1.0	1.9	0.1	0	0
	3日目	1.1	0.1	0	0		3日目	0.7	0.9	0.1	0	0
							4日目	0.4	0.5	0.0	0	0
							5日目	0.3	0.4	0.0	0	0
							8日目	0.1	0.4	0.0	0	0
							9日目	0.1	0.2	0.0	0	0
							10日目	0.0	0.0	0.0	0	0
							11日目	0.0	0.3	0.0	0	0
							15日目	0.1	0.0	0.0	0	0

\*1 全塩素濃度、遊離塩素濃度はDPD吸光度法実測値  
 \*2 モノクロラミン投入量は計算値  
 \*3 塩素濃度は、モノクロラミン投入後の測定値  
 \*4 モノクロラミン濃度はインドフェノール法実測値

表3 各種塩素の分別定量

試験 試料内容	DPD/FAS滴定法				サリチル 酸法	HS- GC/MS法	DPD法 *3	インドフェノー ル法 *3
	モノ	ジ	トリ	遊離塩素				
第一回入浴試験								
最初、モノクロラミン管理 入浴0日入浴前*1	2.4	0.1	不検出	不検出	2.5	不検出	2.6	ND
最初、モノクロラミン管理 入浴0日入浴前	2.5	0.1	不検出	不検出	2.5	不検出	2.6	ND
途中、モノクロラミン管理 入浴4日目	2.6	0.1	不検出	不検出	2.6	不検出	2.6	ND
最終、モノクロラミン管理 入浴15日目	2.3	0.1	不検出	不検出	2.3	不検出	3.1	ND
第二回入浴試験								
最終、モノクロラミン管理 入浴14日目*2	2.4	不検出	不検出	不検出	2.2	不検出	2.5	2.4

\*1:新幹線にて輸送し当日測定した。他は宅配便にて輸送し到着日に測定(冷蔵保存1日相当)  
 \*2:宅配便輸送に要した時間を含め、冷蔵保存2日後に測定  
 \*3:比較用に現場測定値を再掲、他は輸送してモデル浴槽とは別の施設において測定  
 ND:no data



