

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）

令和4年度 分担研究報告書

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者： 泉山信司 国立感染症研究所

フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究

- 研究分担者： 田栗 利紹 長崎県環境保健研究センター  
研究分担者： 中西 典子 神戸市健康科学研究所  
研究協力者： 平塚 貴大 広島県立総合技術研究所保健環境センター  
研究協力者： 井上 浩章 アクアス株式会社  
研究協力者： 縣 邦雄 アクアス株式会社  
研究協力者： 新道 欣也 株式会社お風呂のシンダー  
研究協力者： 鳥井 良太 株式会社お風呂のシンダー  
研究協力者： 齋藤 利明 株式会社ヤマト  
研究協力者： 木村 哲也 株式会社ヤマト  
研究協力者： 小森 正人 株式会社ヤマト  
研究協力者： 山本 哲司 花王株式会社  
研究協力者： 細川 賢人 花王株式会社  
研究協力者： 小田 康雅 シスメックス株式会社  
研究協力者： 下田 貴宗 株式会社シモダアメニティサービス  
研究協力者： 蔡 国喜 長崎県環境保健研究センター  
研究協力者： 加藤 定男 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

入浴施設におけるレジオネラ属菌の問題には、アメーバや生物膜による消毒からの回避など制御の難しさに加えて、施設の営業規模や泉質の違いなど、衛生状態が多様である等の課題がある。従来は培養時間と専門性を要する平板培養法の検査がなされてきたが、多様な施設や衛生状況をあまり考慮していなかったかもしれない。本研究は、従来とは異なる視点で培養検査法を補完できる、フローサイトメトリー (FCM) 法、ATP 法、レジオネラ属菌生菌遺伝子および全遺伝子検査法などの非培養検査法に着目して検討を進めた。これらの利点を生かして、効率的に現場の状況を把握して衛生管理に反映させることを目指した。具体的には現場調査を実施し、迅速検査法の結果をもって、施設事業者との対話を試みた。ある循環ろ過式入浴施設調査では、浴槽水の消毒効果を FCM 法で可視化した結果を施設衛生管理者と共有し、衛生状態の改善につなげる工程を実践できた。循環ろ過系統の消毒が不足気味であったことから、研究班で開発した省力化配管洗浄技術を試験し、施設事業者自身が洗浄を体験できた。別の掛け流し式入浴施設では、レジオネラ属菌の培養検査だけでなく、非培養検査を用いた原因究明により、施設事業者の理解、汚染源の推定、適切な判断や処置につなげることができた。民間事業者等と連携したこれらの実践は、多様な施設や衛生状態に関わらず、入浴施設のレジオネラ問題を軽減できるものと期待された。

## A. 研究目的

レジオネラ属菌は、レジオネラ症およびポ  
ンティアック熱の原因となる細菌であり、公  
衆衛生上懸念される水媒介病原体である。レ  
ジオネラ属菌は、生活環境中では人工水中に  
遍在しており、原生動物や微生物群により形  
成される生物膜の中で消毒から保護されるこ  
とが知られている<sup>1)</sup>。消毒の難しさに加えて、  
営業規模や設備による管理の違いや、泉質に  
よる消毒効果の違いもあり、施設の衛生状態  
は様々である。こうしたことが現場における  
レジオネラ属菌の制御を複雑化させており、  
入浴施設のレジオネラ属菌対策や衛生管理を  
難しくしている。

レジオネラ属菌は培養検査が標準検査法と  
して知られているが、7~10 日間を必要とす  
る専門性の高い検査であるために、現場の日  
常的な指標として衛生管理に反映させるには  
かなりの努力を要する。我々は、これまでに現  
場への迅速な適用を目指して、フローサイト  
メトリー (FCM) 法<sup>2)</sup>、遺伝子検査法<sup>3)</sup>および  
ATP 法<sup>4)</sup>等の非培養検査法を用いて、浴槽水  
のレジオネラ属菌汚染に関する衛生状態を迅  
速に評価する方法を検討してきた。それぞれ  
の方法の有用性は認められてきたものの、こ  
れら検査法の現場への実装は簡単ではない。  
迅速な非培養検査法の利点を生かしての、現  
場の衛生管理への反映を実証する必要がある。

我々がこれまでに評価してきた 300 を超え  
る浴槽水は、適切に消毒されていれば泉質の  
違いに関わらず、FCM 法の細菌数（種類を問  
わない雑菌の濃度）が一定の水準を下回る状  
態となり、レジオネラ属菌はほとんど検出さ  
れなかった。一方、浴槽水中の細菌数が閾値を  
超えた状態では、レジオネラ属菌の検出率が  
急激に上昇した<sup>5)</sup>。すなわち細菌数は、レジオ  
ネラ汚染とゆるやかに相関し、迅速な指標と  
してレジオネラ汚染を検知するのに有用と考  
えられる。細菌を指標とする検査であれば、濃  
度が桁違いに高く、低濃度なレジオネラ検査  
で行われる濃縮操作が不要である。細菌をフ

ローサイトメーターで検出する方法は、1 週  
間以上を要する培養と全く異なり、レーザー  
光で細菌由来の散乱光と蛍光を検出するので、  
染色と測定操作の時間が分単位と短い。人の  
主観の入りにくい機器測定であり、再現性が  
高く、多検体処理にも向いている。循環ろ過式  
や掛け流し式浴槽といった浴槽や泉質の種類  
も問われない。

本研究では、この FCM 法等の非培養検査の  
結果を施設衛生管理者と共有し、対話により  
消毒や細菌汚染による衛生状態等への施設の  
理解を促すことで、公衆浴場の衛生管理の向  
上に繋げられることを期待している。

具体的には入浴施設の協力を得て、民間事  
業者等と連携して、現場施設を調査、予防・改  
善の実施例を蓄積する。当該研究では、循環ろ  
過式と掛け流し式の 2 施設の事例を紹介する。  
必要により、省力化配管洗浄による生物膜対  
策を、施設衛生管理者が実体験する機会も用  
意した。掛け流し式では、源泉ポンプ付近の汚  
染源調査を発見に至った経緯を説明する。加  
えて、新しい試みであるろ過器のオゾン消毒  
にも協力し、非培養検査法による衛生状況の  
把握の測定の技術面について説明する。

## B. 材料と方法

### 1. 調査で用いた検査法

#### 1.1. 遊離塩素濃度の測定

検水の遊離塩素濃度は DPD (*N,N*-diethyl-*p*-  
phenylenediamine, Hach)法を用いて測定し  
た。

#### 1.2. FCM 法

フローサイトメーターとして、RF-500  
(Sysmex 社製) を使用した<sup>6)</sup>。従来の緑色レ  
ーザーではなく、より短波長な 488 nm 青色  
レーザーを使用している。散乱光は、感度や精  
度の向上を期待して、その検出信号のピーク  
高さ (Height) ではなく、信号面積 (Area) を  
検討対象とした。

測定の陽性対照として、*Escherichia coli*  
NBRC3972 と *Legionella pneumophila*

NIIB0058 を用いた。 *E. coli* は TSB 培地 (Trypticase Soy Broth, BD, 211768) で 37°C、6 時間増菌した。 *L. pneumophila* はレジオネラ growth サプリメント (オキシド、SR0110) を加えた Buffered yeast extract (BYE) 液体培地により 30 °C、72 時間増菌した。増菌液を希釈して約 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> および 10<sup>5</sup> CFU/mL の菌懸濁液を作製した。これらを装置で測定するとともに、 *E. coli* は TSA 培地、 *L. pneumophila* は BCYE $\alpha$ 培地で生菌数を計測した。細菌染色は Propidium Iodide (PI) を用いて、染色時間を 15 分間にした以外は、田栗らの方法<sup>2)</sup>に準拠して実施した。後述の通り、試料をグルタルアルデヒドで固定し、細菌が PI 染色される。

本研究の FCM 法は、浴槽水中の細菌数を測定して、迅速に消毒効果を判定する方法である。培養法と異なり、細菌の生死を指標とするのではなく、生死に関わらず、細菌数を指標として消毒の効果を判定する。塩素などに比較的耐性があり、生物膜やアメーバとの共生により消毒の効きづらいレジオネラに対して考案された方法である。

FCM による測定領域 (Gate) は次の通り設定した。即ち、 *E. coli* および *L. pneumophila* の 10<sup>5</sup> CFU/mL 菌懸濁液に、終濃度 10 mg/L となるように次亜塩素酸ナトリウムを加えて、室温で 2 ~ 3 時間回転振盪して、強い消毒による死菌を用意した。チオ硫酸ナトリウムにより塩素を中和後、死菌サンプルを FCM により測定して、この消毒の効果が強く出た死菌を測定の対象外となるように、測定領域を設定した。すなわち、消毒の効果が少ない、形状を保った細菌が測定対象となるようにした。この特異測定領域を用いて各種浴用水を測定し、エリア内の細菌数が暫定的な基準値 (200 cells/mL, 以降暫定基準値という) 未満であった場合は「消毒効果有り」と判定し、基準値以上の場合は「消毒効果不十分」と判定した。なお、測定は 3 回行い、平均値、標準偏差と変動係数 (CV 値) を求めた。

### 1.3. レジオネラ遺伝子検査法

レジオネラ遺伝子検査は磯部ら<sup>3)</sup>の方法に準拠した。qPCR 法は、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) および Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ) を用い、添付の取扱説明書<sup>7)</sup>に従い実施した。EMA-qPCR 法は、qPCR 法における DNA 抽出の前に、Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 (タカラバイオ) および LED Crosslinker 12 (タカラバイオ) を用いて、EMA 処理を実施した。得られた遺伝子コピー数を取扱説明書に従って CFU に換算した。EMA-qPCR と qPCR の CFU 換算値をそれぞれ生菌遺伝子量 (GU/100mL) と全遺伝子量 (GU/100mL) とした。

### 1.4. ATP 法

ルミテスター PD-30 (キッコーマンバイオケミファ) と ATP ふき取り検査システム (ルシパック Pen-AQUA, キッコーマンバイオケミファ) を用いて、添付の取扱説明書<sup>8)</sup>に従って処理した。

### 1.5. レジオネラ培養法

レジオネラ培養検査は森本らの方法<sup>9)</sup>でろ過濃縮法により行った。培地は GVPC $\alpha$ 培地 (ピオメリュー) を使用し、100 倍濃縮した検水を、無処理のまま、あるいは酸処理か熱処理の後、塗抹して 36°C で 3 ~ 7 日間培養した。システイン要求性の湿潤集落をレジオネラ属菌として計数した。レジオラート (アイデックス) は淀谷らの報告<sup>10)</sup>に準拠して、10 mL の検水に適量の前処理剤 (アイデックス) を加えて 10 分間反応、水酸化カリウムにより反応停止後に、37°C で 7 日間培養した。

## 2. 施設調査

### 2.1.1. 施設調査の方法

図 1 に想定 of 施設調査の手順を示した。1 番目に、保健所や民間の環境衛生管理業者等と連携して入浴施設に研究協力を申し入れる。2 番目に、施設の衛生管理者との対話の中で、調査対象とする試料と検査方法を定める。この

時、非培養検査法を中心に提案するが、管理者の意向によっては培養検査も加える。計画に基づいて検査を実施する。3番目に検査結果を施設の衛生管理者と共有する。4番目に、4-a: 衛生状態が良好な場合は、維持を伝える。4-b: 衛生状態に問題があった場合は、消毒の強化等の改善手段を提案し、必要に応じて配管洗浄等を含めて、これら対策を事業者に実体験してもらう。5番目に、培養法で浴槽水のレジオネラ陰性を確認する。6番目の最終的に、以上から導き出される重要管理点を、施設の衛生管理マニュアルに反映、日常管理に役立ててもらう。

#### 2.1.2. 検水の採取方法

試料の消毒効果を評価する場合には、最初に遊離塩素濃度と ATP 濃度を測定し、塩素を中和した後で FCM 法により細菌数を計測した。

FCM 法用の試料は 100 mL 滅菌採水瓶 (栄研, TG2000)、培養法用の試料は 1 L 滅菌済みポリ容器に採水した。共に終濃度 50 mg/L チオ硫酸ナトリウムにて塩素を中和し、FCM 法用試料はさらに終濃度 0.05% グルタルアルデヒドで固定した。試料は冷蔵保存して遅くとも 1 週間以内に試験に供した。遺伝子検査法は培養法の濃縮サンプルを用いた。

### 2.2. H 入浴施設の調査

#### 2.2.1. 施設の衛生管理状況

最初に協力を得た H 循環ろ過施設は、入浴者 700~千人規模で温泉 (塩化物泉) と井水を利用していた。温泉の内湯および露天風呂と、井水のジェット浴、および薬湯の浴槽があり、主に 4 系統の循環ろ過により管理されていた。

温泉は貯湯する段階で塩素を注入し、除鉄除マンガン処理をしていた。これとは別に、循環ろ過系統も、塩素消毒を実施していた。

井水は循環系統のみの消毒であった。

それぞれの循環系統に回収槽があり、週 1 回の清掃消毒を行っていた。生物膜対策とし

て、週 1 回の頻度で 20 mg/L×1 時間の高濃度な遊離塩素による洗浄と、年 3 回の過炭酸ナトリウム製剤による配管洗浄を行っていた。

#### 2.2.2. 調査の概要

調査は事業者との対話により、温泉タンク水と井水タンク水に加えて、温泉は内風呂と露天風呂の 2 系統、井水はジェット風呂と薬湯の 2 系統を対象とした。レジオネラ汚染に対する回収槽のリスクを説明して、各循環系統から浴槽水、回収槽水およびろ過器の逆洗水を対象とした。都合、2 (タンク) + (2+2 系統) × 3 (浴槽水・回収槽水・逆洗) = 14 試料を採取した。それぞれ遊離塩素濃度、FCM 法による細菌数および ATP 濃度を測定した。

#### 2.2.3. 調査に基づく対応

FCM 法により消毒効果を確認し、課題が認められた系統は洗浄した。これらの改善を確認した後に、4 系統の浴槽水のレジオネラを培養法で検査した。

#### 2.2.4. 省力化配管洗浄剤の活用

H 入浴施設は、ジェット浴ノズルにヌメリの課題を抱えていた。施設自身が定期的に市販製品を用いて配管洗浄を実施していたが、処理後に界面活性剤様の粘着物が浴槽表面に付着し、その除去に手間がかかるなどの不便も認められていた。そこで、研究班で開発した省力化配管洗浄剤<sup>11)</sup>を用いてジェット浴の系統を洗浄することとした。

ジェット浴系統の水量は、男女浴槽、回収槽、ろ過器を合わせて約 18 m<sup>3</sup>であった。本検討では、ヌメリ除去の向上を期待して、循環水量を減らさず処理した。新規省力化洗浄剤を、1 m<sup>3</sup>当たり 3 kg (すなわち 54kg) を投入して、1 時間循環させた。中和剤を投与して 15 分間循環させて、排水・すすぎを 2 回繰り返した。処理は休館日に実施して、処理前、洗浄剤反応中、中和剤投与後、すすぎ時および営業開始後に採水した。非培養検査 (ATP と FCM 法による細菌数、遺伝子検査) と培養検査 (レジオラートおよび平板法) を実施した。

## 2.3. J 入浴施設の調査

次に協力を得たかけ流し式施設は、レジオネラ症患者の利用が疑われた施設であった。事前に実施されていたレジオネラ属菌検査により、温泉の原水からレジオネラ属菌が検出され、追加で汚染源調査を実施した。事前の検査結果を表 1 に示した。なお、施設からはレジオネラ属菌が検出されたものの、患者から菌が検出されず、因果関係は証明されていない。

### 2.3.1. 施設の衛生管理の状況

利用者数は 1 日あたり 50～100 人であった。施設は、温泉（塩化物泉）利用の大小浴場および露天風呂と、井水利用の打たせ湯、シャワーおよび水風呂を有していた。温泉系統は消毒しておらず、事前の検査で FCM 法により大量の細菌が検出されていた。井戸水は塩素剤により消毒されており、ほとんど細菌が認められなかった。当該温泉は 1000 m 超の地下から汲出されており、砂除去のろ過器と原水採取用蛇口が備えられていた（図 5 写真および模式図）。ろ過器には糸巻式カートリッジフィルター（以下 CF と略、図 5 D）を挿入して砂除去しており、毎日交換のたびに塩素浸漬により消毒と乾燥をしていた。ろ過器を通過した配管は 20 m ほど離れた浴室に連結しており、10 m<sup>3</sup> 程の浴槽に湯口から温泉を供給していた（図 5 模式図）。

### 2.3.2. 調査の概要

表 1 のとおり、事前調査では温泉原水、大浴場（女湯）および露天風呂（女湯）からレジオネラ属菌が検出されていた。大量の細菌も確認され、汚染源としてろ過器が疑われた。施設との対話の結果、温泉系統の原水（図 5 A）、ろ過器内水（図 5 B）およびろ過器排水（図 5 C）、湯口水（図 5 E）並びに浴槽水（図 5 F）を検査対象とした。CF（図 5 D）を装着しない状態と、装着した状態を測定し比較した。これらの非培養検査（ATP と FCM 数、遺伝子検査）と培養検査（平板法）を実施した。

なお、井戸水を利用する浴用水については、

レジオネラ属菌が検出されておらず、適正に塩素が検出され、かつ FCM 法による消毒効果が確認されたために、調査対象から外した（表 1）。

### 2.3.3. 調査に基づく対応

調査結果を検討し、施設事業者に推測される汚染源について説明した。施設側で対応を決定し、適切な措置を施したうえで、レジオネラ属菌の自主検査が行われた。

## C. 結果および考察

### 1. FCM 法による細菌数の迅速検査

#### 1.1. 培養法との比較試験

FCM 法（フローサイトメーター）により大腸菌とレジオネラを測定した結果は、培養法による結果と高い相関が認められた（図 2 a, b）。FCM 法と培養の双方で測定の際の直線性に問題はなかった（図 2）。FCM 法の標準偏差は 3 回の測定で平均値の 4% 程度と小さかった。培養の生菌数に比べて、若干、フローサイトメーターが高めの値であった。

本研究で使用した FCM 法は、培養によらずに、細菌数を迅速に検査できることを確認した。

#### 1.2. 消毒効果判定用の測定領域の設定

*E. coli* と *L. pneumophila* の 10<sup>5</sup> CFU/mL 懸濁液（図 3. A a, B a）を強く塩素消毒し中和することで、消毒後サンプルを用意した。消毒後の FCM 法の測定結果は、大腸菌もレジオネラもほぼ同じ散布図を示し、狙い通りに設定領域から大腸菌とレジオネラのドットが消失した（図 3. A b, B b）。

## 2.1. H 入浴施設の調査

薬湯以外の 3 系統は、浴槽水、回収槽水およびろ過器逆洗水の全てで、細菌数は暫定基準値（200 cells/mL）未満であり、消毒は適切に行われていることが確認された（図 4, A ①～③, B ①～③, C ①～③）。薬湯系統は、浴槽水が基準値未満であったが、回収槽水とろ過器逆洗水はそれぞれ 233 cells/mL、480

cells/mL と僅かに基準値を上回り、「消毒効果不十分」と判定された (図 4, D ②, ③)。衛生管理者との協議の結果、消毒の強化を試みることにし、別報告<sup>12)</sup>に倣い、ろ過器のオゾン消毒を試験した。

同管理者との対話の中で、ジェット浴系統において、塩素管理に懸念がある旨の話があった。そこでジェット浴には、後述 4.1 のとおり、泉山ら<sup>11)</sup>が開発した省力化配管洗浄剤を用いて配管洗浄を行うこととした。

調査終了後、内湯と露天風呂についてはそのまま、ジェット浴は省力化配管洗浄で処理した後、施設で自主的に実施した培養検査でレジオネラの不検出が確認された。

## 2.2. J 入浴施設の調査

調査前に、温泉原水、女湯の大浴場と露天風呂からレジオネラ属菌が検出されていた (表 1)。温泉は掛け流し式で、残留塩素は不検出であった。井水の残留塩素は 0.5~0.8 mg/L と、こちらは消毒がなされていた。温度が温泉利用箇所で 27.6~37.3°C、井水利用箇所で 19.5~38.0°C と低めであったが、これらは保健所の指示で採水日前日の浴槽水を排水しないで保存していたことによる。

FCM 法による細菌数 (以下 FCM 数と略す。) は、温泉で 1,213~659,950 cells/mL と高い値を示して「消毒効果不十分」であったが、井水では 40~53 cells/mL で全てが「消毒効果有り」と判定され、残留塩素濃度と細菌数は対応していた (表 1)。

ATP も細菌汚染と対応が取れており、温泉由来の浴槽水からは 46~1,234 RLU/0.1mL と比較的高い値が検出されたが、原水からは 6 RLU/0.1mL と低値であった。井水由来の検体は、原水を含めて 2~19 RLU/0.1mL と全て低い値を示し、井水利用系統の管理状態は悪くなかった (表 1)。

施設事業者との対話後に実施した各種測定結果を図 6 に示した。方法の通り、最初に CF を外した状態で原水、ろ過器内水および排水

並びに浴槽の湯口水と浴槽水を採水し、一旦浴槽水を排水した後、CF を取り付けた状態で同じように採水した。その結果、CF を外した状態の全てのサンプルからレジオネラ属菌が検出され、15~150 CFU/100mL であった (図 6 A)。CF を装着した状態のレジオネラ属菌検査結果は、不検出~40 CFU/100mL と若干低下し、CF の効果があったのかもしれないが、完全に取れるものでもなかった (図 6 B)。CF より上流側の汚染が疑われる変化にも受け取れた。

非培養検査は、やや低い値を示したものの、概ねレジオネラ生菌数と同様の傾向であった (図 6 A B)。FCM 数は、CF 取外し時に 733~11,467 cells/mL、CF を装着して 207~13,127 cells/mL であった。すなわち FCM 数は、全て基準値を超過し、消毒がない状況を反映した、消毒効果不十分の結果であった。CF 撤去時の FCM 数は湯口水で最大となり、CF 装着後はろ過器内水の FCM 数が急増し、消毒がなされていても CF の管理は容易ではないこと、ならびに浴槽水の常時の消毒の必要性が改めて示唆された。

ATP は、CF 取外し時に 8.7~40 RLU/0.1 mL、CF 装着後に 9~341 RLU/0.1 mL となり、微生物による汚染が明らかであった。

これら数値の詳細と解釈として大きく分類して 3 点、1:ろ過器前の蛇口の原水から、細菌が低値であるが一定量検出されたこと、2:原水のレジオネラ属菌数が最大で下流に行くに従い希釈されたいこと、および 3:CF と湯口水に起因する細菌が検出された模様であること、を施設に伝えた。

続く施設側との対話の中で、湯口付近にぬめりが付着していることと、併設ろ過器の 1 機が故障により閉塞していたことが判明した (図 5 模式図)。消毒直後の CF のレジオネラ汚染の可能性は低く、ろ過器より上流の配管からの汚染の可能性を指摘したところ、ろ過器の故障とろ過器上位の盲管が判明した。本来なら、好気性の土壌細菌であるレジオネラ

属菌が<sup>13)</sup>、温泉原水から高濃度に検出されることは考えにくいことであった。今回の事例では、採水用に取り付けた蛇口までの配管内が盲管状態となっており、ろ過器は CF を交換する際に外気に開放されていた。つまり、温泉システムのレジオネラ汚染は、地下 1,000 m の原水の汚染ではなく、CF ろ過器前後がレジオネラ汚染を受け、もっとも上流の汚染源になったと考えられた。

結果を受けて、施設は原水ポンプ周辺の配管を改修し、盲管部分を撤去した。その時の配管内部には BF 様の粘着物が付着していたとこのことで、改修後の原水からはレジオネラ属菌が検出されなくなった。丁寧な対話が汚染源の対策になった 1 例であった。

### 3.2 省力化配管洗浄剤の実践

H 入浴施設のジェット浴循環系統 (全水量 18 m<sup>3</sup>) について、省力化配管洗浄剤を用いて洗浄を行った<sup>11)</sup>。A 剤 (過炭酸ナトリウム等の洗浄剤) を 1 m<sup>3</sup> あたり 3 kg の割合で浴槽水に注入し、1 時間循環させた。次に B 剤 (中和剤) を添加し 15 分ほど反応させたのち、すすぎを 2 回実施した。表 3 に工程ごとの各種検査データを示した。

レジオネラ属菌は、処理前の浴槽水からは検出されなかったが、ろ過器逆洗水からはレジオラートと平板法の両方で検出され、ろ過器の汚れが心配された (表 3)。2 回すすいだ後のろ過器逆洗水からは、レジオネラ属菌不検出となり改善が得られた。浴槽水の平板法で 10 CFU/100mL とわずかに検出されたが、この時点では塩素消毒がなく、剥離されたバイオフィルムに由来のレジオネラの検出と考えられた。すすぎが不完全だったかもしれない。なお、数日後の営業中のサンプルでは、塩素消毒がよく効いて、レジオラートと平板法共に不検出となった。

遺伝子検査では、処理前のサンプルからは生菌遺伝子が検出されなかったものの、全遺伝子は検出されており、塩素消毒が欠かせな

い状況にあった。すすぎ後のサンプルは浴槽水のみ検査したが、生菌遺伝子と全遺伝子のいずれも検出されており、やはりすすぎが不完全だったかもしれない。

浴槽水と逆洗水の FCM 数の推移をみると、処理前に一定量の細菌が認められたのち、A 剤処理中に最大となった。中和剤で減少し、すすぎのサンプルからも一定量の細菌が認められて、繰り返しになるが、すすぎが不完全だったかもしれない。数日後の営業中には浴槽水と逆洗水ともに細菌が認められなかった。

ATP は処理前に一定量の数値が認められ A 剤処理後の逆洗水で最大となる工程は FCM と同じであったがすすぎでは低値であった。

本来、すすぎの後のレジオネラ属菌は不検出が望ましいが、本施設の循環系統は男湯と女湯が上下の 2 階構造になっていて、完全にすすぎを行うのが難しかった。不完全なすすぎが、レジオネラや FCM 法の検出の理由と考えられた。

実は本洗浄の 2 週間前に、施設事業者により自主的な配管洗浄を実施したばかりであった。しかし FCM 法では消毒効果が不完全と判定されてレジオネラの死菌が検出されており、洗浄が不完全な様子であった。ここに省力化配管洗浄剤で処理した結果として、洗浄中の試料に多数の細菌の放出が確認され、洗浄効果は明らかであった。洗浄剤は 1 m<sup>3</sup> あたり約 3 kg を使用したが、事業者が使用した製品に比べて 1/2 以下の量で効果が認められた。施設によると、市販洗浄剤で発生していた粘調性の付着物が認められず、すすぎ後の処理が不要となったとのことである。

本配管洗浄剤の有効性を改めて確認できた。今後の施設調査で配管洗浄が必要な場合、営業者の洗浄体験に本洗浄剤を適用したい。

### D. まとめ

レジオネラ汚染の制御を目的に、FCM 法等非培養検査法を用いて浴槽水の衛生状態を迅速評価して、その結果を施設管理に反映させ

るための調査を実施した。

・新規フローサイトメーターを用いた大腸菌とレジオネラ測定では、測定値が生菌数よりも高めの値を示し、強い塩素消毒と中和により作製したサンプルからは測定領域から細菌を示す信号が消失した。

・循環ろ過式入浴施設 (H 施設) の調査では浴槽水の消毒効果を FCM 法を用いて可視化させることにより、施設衛生管理者との間で入浴施設全体の衛生状態を迅速に共有することができた。FCM 法で消毒状態が良好と判定された浴槽水はレジオネラ属菌検査でも不検出であることを確認した。これらの工程は今後の施設調査に応用できる。

・掛け流し式入浴施設 (J 施設) の調査では、レジオネラ属菌の培養検査とともに非培養検査を用いた原因究明実験を行うことにより、施設事業者の状況理解や的確な汚染源推定に役立たせるとともに、不適配管の撤去など施設側の適切な判断と処置につなげることができた。

・H 施設で衛生管理上の不具合が認められた循環系統には研究班で開発した省力化配管洗浄技術を提供した。本洗浄方法では FCM 法により洗浄時の明らかな細菌放出が認められたことで洗浄効果を可視化させることができ、洗浄後のレジオネラ属菌不検出も確認できたために、今後の施設調査における洗浄体験の手段として活用できると考えられた。

## E. 参考文献

1. United States Environmental Protection Agency, *Legionella: Drinking Water Health Advisory*, Office of Science and Technology Office of Water, Washington, DC 20460, EPA-822-B-01-005, 2001. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/legionella-report.pdf>.
2. 田栗利紹ら, レジオネラ属菌検査が現地でも可能となるフローサイトメトリー技術の開発, 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)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 28~30 年度総合研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 31-36, 2019.

3. 磯部順子ら, レジオネラ属菌迅速検査法の評価, 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)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 30 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 13-22, 2018.
4. 黒木俊郎, ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究, 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)「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」平成 20 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 倉 文明, 91-100, 2021.
5. Taguri, T, *et.al.*, Bacterial counts by flow cytometry can determine presence/absence of *Legionella* in bath water. In the 10th International Conference on *Legionella* 2022, P-53, 2022.
6. 田栗利紹ら, 携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化, 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症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和 3 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 52-86, 2021.
7. タカラバイオ, Cycleave PCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit 取扱説明書, [https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/cy240\\_cy240s\\_j.pdf](https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/cy240_cy240s_j.pdf).
8. キッコーマンバイオケミファ, ルシパック Pen-AQUA (液体測定用) 取扱説明書, <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/products/detail/?id=11060>.
9. 森本 洋ら, レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み-: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)

「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 24 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 倉 文明, 93-130, 2012.

10. 淀谷雄亮ら, 新規酵素基質培地キットであるレジオラート/QT 法の有効性の検討-: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症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和 3 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 87-92, 2021.
11. 泉山 信司ら, 省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験-: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症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和 2 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 13-26, 2020.
12. 泉山 信司ら, オゾンを用いた温浴施設循環式ろ過器の消毒・洗浄試験-: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症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究」令和 3 年度総括・分

担研究報告書, 研究代表者: 前川 純子, 33-51, 2021.

13. 石井 當次, アメーバの生態とレジオネラ感染症, 生活衛生 47, 320-327, 2003.

#### F. 研究発表

Taguri, T., Cai, G., Nakanishi, N., Hiratsuka, T., Inoue, H., Shimoda, T., Shinmichi K., Kura F. and Amemura-Maekawa, J., Bacterial counts by flow cytometry can determine presence/absence of *Legionella* in bath water. In the 10th International Conference on *Legionella* 2022, P-53, 2022.

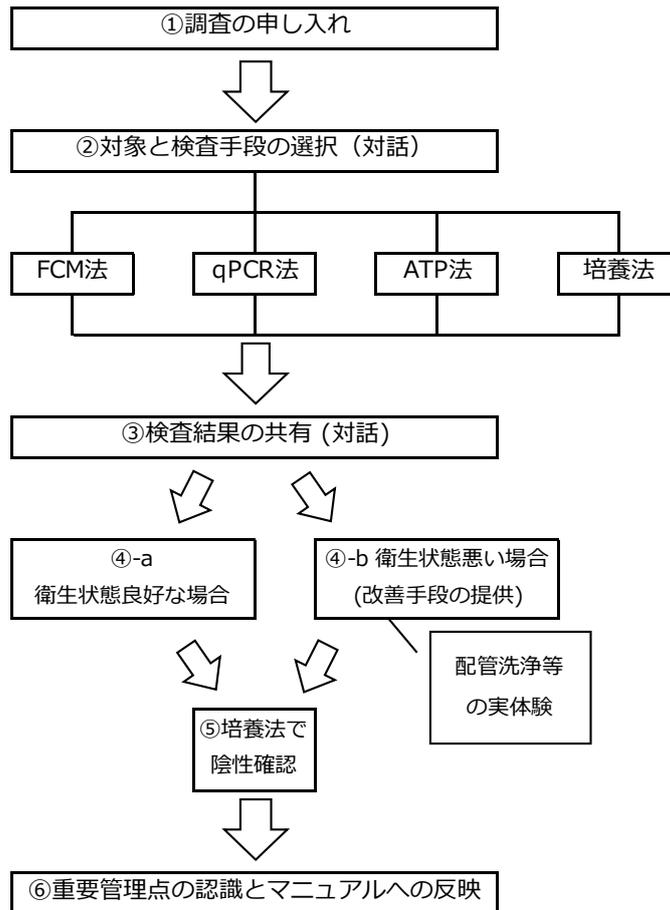


図1 想定される調査フロー

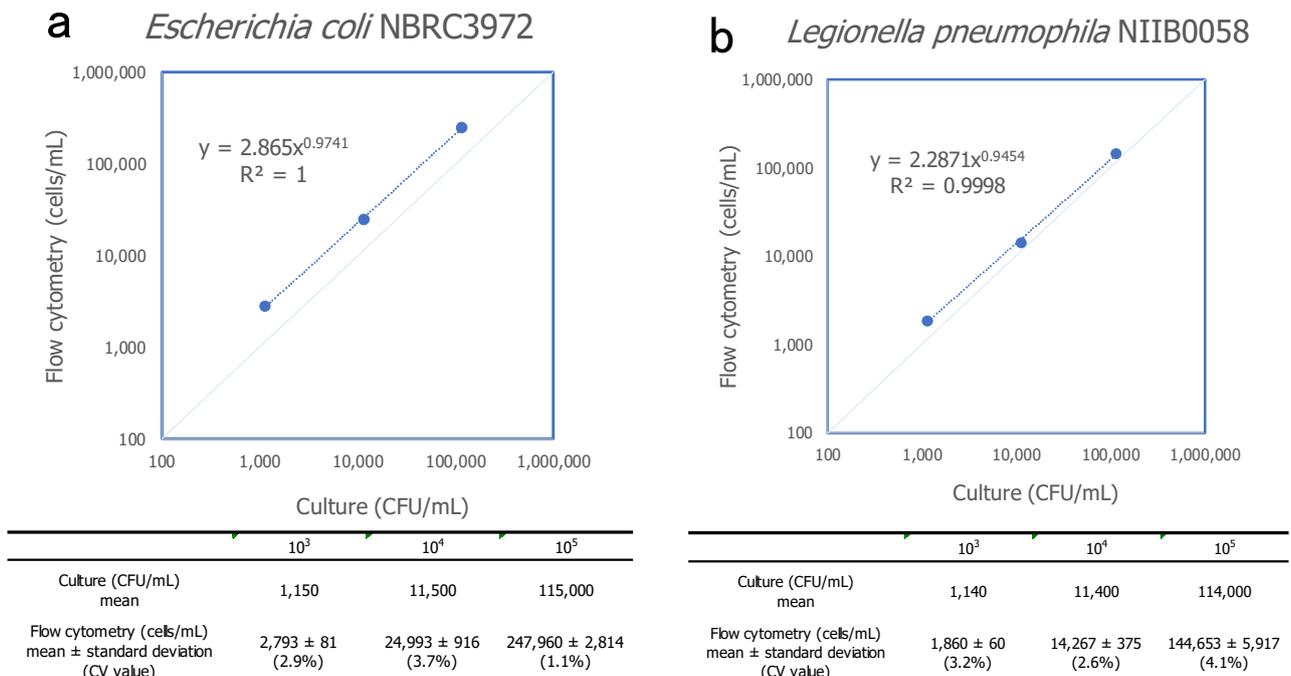
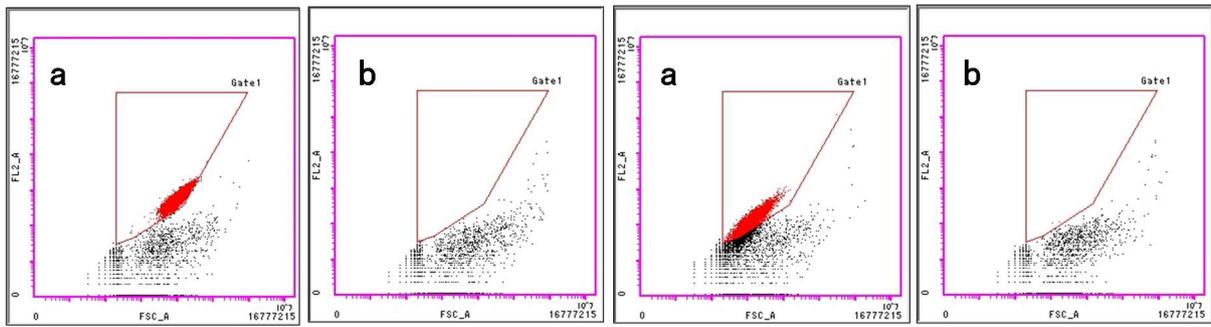


図2 標準株における培養法とFCM法の定量値の比較 (下の表は測定値の再掲)

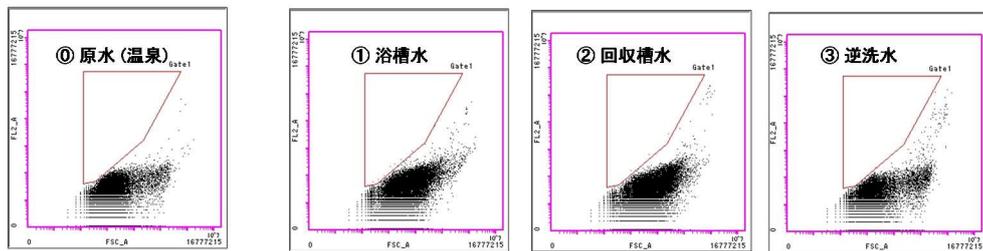


A 大腸菌

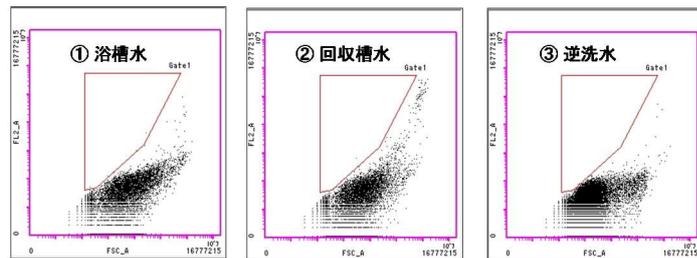
B レジオネラ

図3 FCM法による消毒効果判定のための特異領域の設定

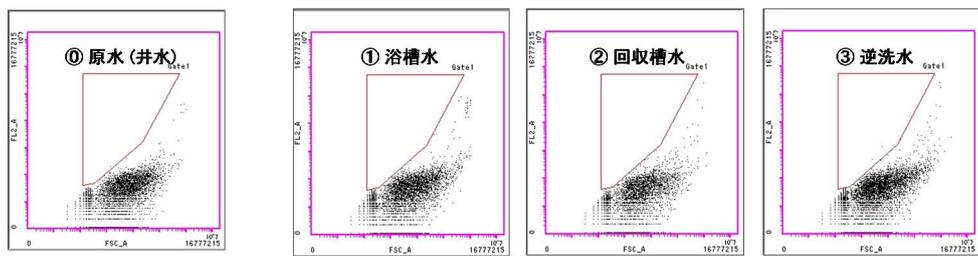
大腸菌 (A) とレジオネラ (B) の  $10^5$  CFU/mL 懸濁液 (a) を遊離塩素消毒処理 (10 mg/L・3 hr) により処理・中和後に設定した特異領域 (b) を示す。散布図の縦軸は蛍光強度、横軸は前方散乱光強度を示す。



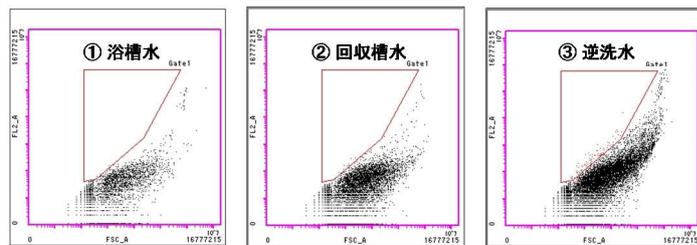
A 内湯循環系統 (温泉)



B 露天循環系統 (温泉)



C ジェット浴循環系統 (井水)



D 薬湯循環系統 (井水)

図4 H入浴施設の各種循環系統におけるFCM法の散布図の比較  
RF-500により得られたFCM法の散布図でエリアは図3に示した特異領域を使用。  
各散布図の縦軸は蛍光強度、横軸は前方散乱光強度を示す。

表 1 調査前に実施した J 入浴施設のレジオネラ属菌等検査結果

採水場所	水の種類	温度 (°C)	pH	残留塩素 (mg/L)	レジオネラ属菌検査		フローサイトメトリー法		ATP (RLU/0.1 mL)	
					定量値 (CFU/100mL)	菌種/血清型	細菌数 (cells/mL)	消毒効果判定 (≥100:有, <100:無)		
1	原水	温泉	37.3	7.3	0.0	70	<i>Legionella pneumophila</i> SG5	1,213	無	6
2	大浴場(男湯)	温泉	33.5	7.7	0.0	不検出		320,647	無	1,197
3	小浴場(男湯)	温泉	33.0	7.8	0.0	不検出		379,473	無	144
4	大浴場(女湯)	温泉	32.5	7.6	0.0	40	<i>Legionella pneumophila</i> SG5	659,950	無	1,234
5	小浴場(女湯)	温泉	31.5	8.1	0.0	不検出		199,060	無	46
6	露天風呂(女湯)	温泉	27.6	8.2	0.0	10	<i>Legionella pneumophila</i> SG1	168,760	無	70
7	原水	井水	20.1	7.6	0.8	不検出		47	有	3
8	打たせ湯(男湯)	井水	38.0	7.3	0.6	不検出		53	有	19
9	水風呂(男湯)	井水	20.0	6.6	0.5	不検出		40	有	4
10	水風呂(女湯)	井水	19.5	7.7	0.8	不検出		53	有	2

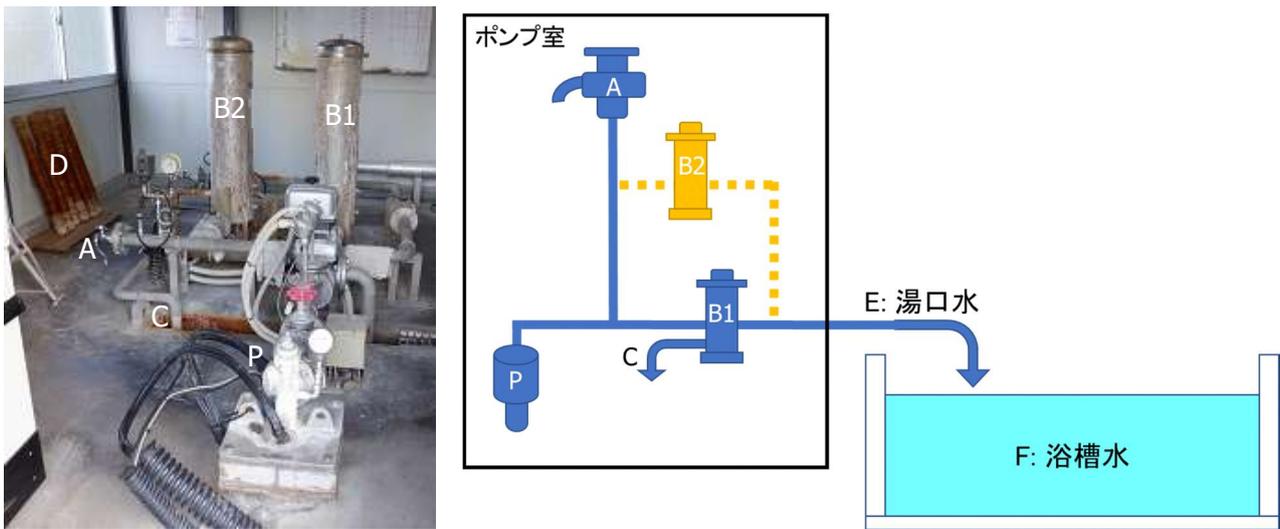


図5 原水の汲上ポンプと併設ろ過器の外観写真(左)と模式図(右)

P: 汲上げポンプ, A: 原水採水用蛇口, B1: 稼働中ろ過器, B2: 閉鎖中ろ過器 C: ろ過器排水  
D: カートリッジフィルター, E: 湯口水, F: 浴槽水, 模式図破線の配管は閉鎖中

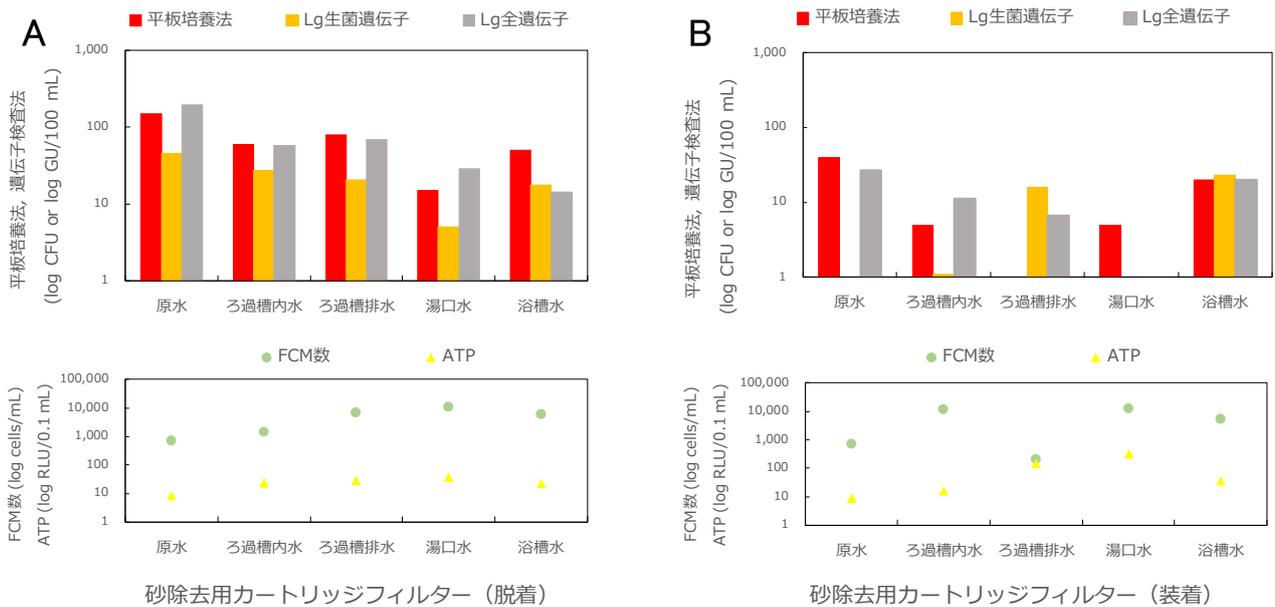


図 6 J 入浴施設の温泉系統におけるレジオネラ属菌と各種汚染指標の推移  
レジオネラ汚染源究明のために砂除去用カートリッジフィルターを脱着状態(A)と装着状態(B)で比較

表2 省力化配管洗浄剤の工程ごとの各種検査データの推移

			処理前		A剤処理1時間後		中和剤注入後		すすぎ		通常営業時	
			浴槽水	逆洗水	浴槽水	逆洗水	浴槽水	逆洗水	浴槽水	逆洗水	浴槽水	逆洗水
培養法	レジオラート	(MPN <sup>※</sup> /100mL)	<10	32	NT <sup>※※</sup>	NT	NT	NT	<10	<10	<10	<10
	平板培養法	(CFU <sup>※</sup> /100mL)	<10	10	NT	NT	NT	NT	10	<10	<10	<10
遺伝子検査法	Lg生菌遺伝子	(GU <sup>※</sup> /100mL)	0	0	NT	NT	NT	NT	7	NT	NT	NT
	Lg全遺伝子	(GU/100mL)	19	7	NT	NT	NT	NT	27	NT	NT	NT
	FCM法	(cells/mL)	287	587	103,233	53,987	493	9,073	353	4,007	90	40
	ATP法	(RLU <sup>※</sup> /0.1 mL)	47	53	3	137	1	10	5	4	34	24
	残留塩素濃度	(mg/L)	0.23	0.53	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.50	0.60

※MPN: most probable number, CFU: colony forming unit, GU: gene unit (CFU-equivalent value), RLU: relative light unit, ※※NT: not tested

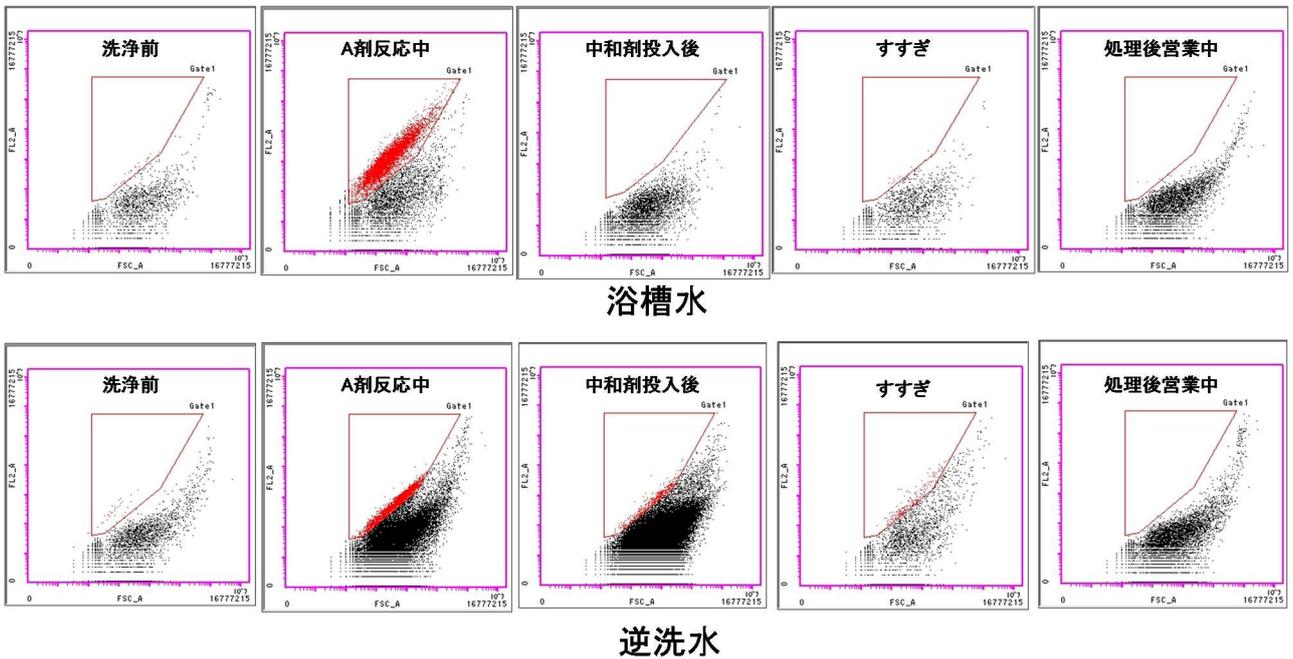


図7 省力化配管洗浄剤の作業工程におけるFCM法スカッタグラムの変化  
 洗浄前は休業中で非消毒の状態、A剤処理中(1時間)、中和剤処理中(15分)、すすぎ後、処理後の営業中に採水した。逆洗水のすすぎは検査せず。