

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5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： 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第1部  
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、ATP法、フローサイトメトリー (FCM) 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4ヶ所で現場調査を実施し、迅速検査法の結果をもって、施設衛生管理者との対話を試みた。1つ目の入浴施設調査では、日常的な消毒作業の有効性を衛生管理者に認識させることにより施設側の安心感につなげることができた。2つ目の施設では様々な消毒処理でも排除できなかったレジオネラ属菌の汚染源を特定して該当部の撤去と設備改修ならびに衛生管理マニュアルの改善につなげることができた。3つ目の施設では、過去のレジオネラ汚染により実施している現行の衛生管理手法の有効性を衛生管理者に認識させることができた。4つ目の施設ではシャワーのレジオネラ汚染のエビデンスを衛生管理者に認識させることで適切な設備管理に繋げることができた。モノクロラミン消毒の適用事例では、

遊離塩素消毒時には多人数の入浴により大きく影響を受けて追加消毒等を余儀なくされていた循環ろ過系統にモノクロラミン消毒を適用したことにより、残留塩素濃度が安定して、塩素臭もなく、レジオネラ属菌も継続して検出されない入浴環境を提供することができた。保健所や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ト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、ATP法、フローサイトメトリー（FCM）法および遺伝子検査法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。

ATPは、あらゆる生物がエネルギー源として保持する物質で、細菌などの微生物をはじめ、肉・野菜などの食べ物、ヒトの体液といった、生物を含む多くの有機物に含まれている。食品製造や医療の現場では、これらが残っていると細菌の増殖や感染症の伝播が疑われるために、微生物汚染の指標として活用されて

いる<sup>2)</sup>。入浴施設でも衛生管理に応用されており、いわゆる白湯において有効性が高いことが知られている<sup>3)</sup>。FCMは、さまざまな分野で各種細胞の性状解析等に利用される方法で、浴槽水中の浮遊細菌を解析することでレジオネラリスク汚染の指標となりうることを示されてきた<sup>4)</sup>。予め核酸染色した浴槽水試料をフローサイトメーターにセットすると、サンプルが微細管の流路に取り込まれ、個々の細胞が一行となって照射レーザーを通過する。このときに得られる散乱光と蛍光がそれぞれ細菌の大きさと細菌由来の核酸に対応しており、それらを解析することにより浴槽水中の細菌数を迅速に計測することができる。さらに、消毒等で破壊された細菌は染色態度が変化して清浄細胞と区別されるために消毒状態を速やかに判定することができ、その結果がレジオネラ汚染の存否と密に関連するとされる。遺伝子検査法は、レジオネラ属菌遺伝子の特異的に検出する技術で浴槽水中のレジオネラを定量的に解析することが可能である。膜透過性を利用した生死鑑別法を適用することにより、より実用的な浴槽水のレジオネラ汚染評価ができる<sup>5)</sup>。

本研究では、これら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、循環ろ過式の4施設の事例を紹介する。

## 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。モノクロラミン消毒の場合は全塩素測定用の DPD と中濃度用残留塩素測定器(柴田科学)を用いた。

### 1.2. 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 Surface/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>6)</sup>に従って処理した。

### 1.3. FCM 法

フローサイトメーターとして、RF-500 (Sysmex 社製) を使用し、田栗らの方法<sup>7)</sup>に準拠して設定した測定領域 (Gate) を用いて各種浴用水を測定した。Gate 内の細菌数が暫定的な基準値 (200 cells/mL, 以降基準値という) 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。現地での測定を求められた場合には、携帯型フローサイトメーター miniPOC (Sysmex-Partec 社製) を用いた。これは従来用いていた装置で、蛍光試薬と測定原理は同じであるが、RF-500 とレーザー光の波長および解析方法が異なり比較的感度が劣るために、基準値は 1000 cells/mL である<sup>8)</sup>。

### 1.4. 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>9)</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>10)</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 (genetic unit: GU/100mL) と全遺伝子量 (GU/100mL) とした。

### 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>11)</sup>でろ過濃縮法により行った。培地は GVPC $\alpha$ 培地 (ビオメリュー) 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>12)</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。

### 1.6. 従属栄養細菌検査法

従属栄養細菌数は R2A 寒天培地 (塗抹法) を用いて 30°C で 7 日間培養した。

## 2. 施設調査

### 2.1.1. 施設調査の方法

施設調査は田栗らの報告<sup>13)</sup>に倣って実施した。即ち、1 番目に、保健所や民間の衛生管理事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、これら対策を衛生管理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 法用試料はさらにグルタルアルデヒド（GA; 終濃度 0.05%）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. K 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 K 循環ろ過施設は、1 日入浴者数が 10 人程度の小規模浴槽で約 4 t の薬湯 と約 2 t のサウナ用水風呂を利用していた。共に水道水を原水として、2 系統の循環ろ過により管理されていた。ろ過器容量は共に 100 L 程度で、ろ材は 5 年に 1 回の頻度で交換し、調査時点では交換直後であった。

2 系統ともに毎日換水し、イソシアヌル酸ナトリウム製剤（固形剤）による塩素消毒装置を導入して、カルキ臭を避けるために残留塩素濃度 2.0 mg/L を超えない程度に管理していた。施設の衛生管理者によると、年 1 回市販の洗浄剤で配管洗浄しており、今年の洗浄時に目立った汚物は認められていない。

### 2.2.2. 調査の概要

調査は FCM 法による現地測定を求められたために、携帯型 miniPOC を現地に持ち込んで測定した。管理者との対話により、2 系統の浴槽水とろ過器排水を調査した。予め約  $1.9 \times 10^4$  cells/mL に調整した大腸菌懸濁液を等分して一方は GA（終濃度 0.05%）で固定して陽性対照とし、他方は約 0.1% 次亜塩素酸ナトリウムで 2 時間処理したものを中和して陰性対照とした。最初に、現地で陽性対照と陰性対照を測定し、想定通りに計測できることを確認した後で検水を処理した。その結果、浴槽水とろ過器排水の消毒効果が認められ、衛生管理

者承認の上で、1 週間後に改めて 2 系統の浴槽水を採水して、レジオネラ培養検査を実施した。

## 2.3. L 入浴施設の調査

次に協力を得た循環ろ過施設は、循環系統に回収槽を有しており、塩素で消毒しているものの薬湯利用のために濃度管理に苦慮している施設であった。

### 2.3.1. 施設の衛生管理の状況

利用者数は 1 日あたり 700~1000 人であった。対象の循環系統には、1 t 規模の壺形浴槽が野外に 3 つ並んで設置されていた。塩素濃度は自動注入方式で 0.4~2.0 mg/L に管理しており、週 1 回の高濃度塩素洗浄と年 3 回の配管洗浄を実施していた。

### 2.3.2. 調査の概要

当該浴槽の循環系統は浴槽水から溢出した浴槽水が浴槽近傍の排水口を経て回収槽に取り込まれ、ろ過器を介して循環系に還流される仕組みとなっている。これらは施設開業当初からの構造で、屋内の洗い場から隔離されており回収槽は定期的に洗浄・消毒されている。調査当初、レジオネラは浴槽水からは不検出だったが逆洗浄水から検出された。ろ材の汚染を疑い逆洗浄水のオゾン消毒処理を導入して、一旦レジオネラ不検出となったが再発した。オゾン消毒の強化やろ材交換によって一時的に不活化したが少量のレジオネラが検出／不検出を繰り返し完全な除菌はできていなかった。これらの詳細は別稿に記載する。

再度、衛生管理者と対話して、生物膜汚染の可能性を探ったところ、排水口上蓋は木製の踏み板となっており、表面に滑り止めの人工芝が張り付けてあることが判明した。そこで、人工芝と踏み板表面のおよそ 10 cm×10 cm の区画を滅菌綿棒でふき取り、滅菌生理食塩水 1 mL に懸濁したものを遺伝子検査に供した。同時に浴槽水、排水口水および逆洗浄水を採水して、遺伝子検査及び培養検査を行った。

### 2.3.3. 調査に基づく対応

調査結果を検討し、衛生管理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、再度培養検査を行った。

## 2.4. M 入浴施設の調査

3 番目に協力を得た循環ろ過施設は、過去に貯湯槽内のレジオネラ汚染が認められた施設で、貯湯槽の消毒を追加することによりレジオネラ対策を実施していた施設である。

### 2.4.1. 施設の衛生管理の状況

利用者数は1日あたり400人程度であった。施設には3つの循環系統があり、男女合わせて17tの大浴場、2tのジェット浴および10tの露天風呂からなる。これらの浴槽は全て温泉（炭酸水素塩・塩化物泉）を利用しており、原水は10t貯湯槽への汲上げ時に次亜塩素酸ナトリウムで一次消毒され、循環系に補給された後にイソシアヌル酸ナトリウム製剤（固形剤）で二次消毒される方式となっていた。週1回定休日を決めて清掃・洗浄し、ジェット浴は毎日、他の2浴槽は定休日に換水していた。毎年全てのろ過器ろ材を交換していた。シャワーとかけ湯については井水を利用していた。

### 2.4.2. 調査の概要

温泉消毒の全体像を把握するためにFCMで様々な採水箇所から採水した。原水、1次消毒後の貯湯槽水、および30t貯湯槽水に加えて、大浴場からは湯口水、男女浴槽水、ヘアキャッチャー水とろ過器の逆洗浄水を採水した。ジェット浴からは、男女浴槽水とヘアキャッチャー水とろ過器の逆洗浄水を採水した。露天風呂からは湯口水、男女浴槽水、ヘアキャッチャー水とろ過器の逆洗浄水を採水した。

井水は男女で原水が別系統となっており、それぞれのシャワー水（2か所）とかけ湯を調査した。

### 2.4.3. 調査に基づく対応

調査結果を検討し、衛生管理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、自主検査

を行った。

## 2.5. N 入浴施設の調査

4番目に協力を得た循環ろ過施設は、レジオネラ症患者の利用が疑われた施設であった。事前に実施したレジオネラ属菌検査により、シャワー水からのみレジオネラ属菌が検出されたため、追加で汚染源調査を実施した。事前の検査結果を図4に示した。なお、レジオネラ症に関して施設と患者の因果関係は証明されていない。

### 2.5.1. 施設の衛生管理の状況

当該施設には隣接する2つの入浴設備（旧館、新館）があり、毎日100人程度が利用していた。日常点検は点検マニュアルに基づき衛生管理を実施しており、点検表を用いて記録していた。残留塩素の測定は1日8～9回測定して残留塩素濃度0.4～1.0mg/Lに管理していた。全ての浴槽で毎日換水していた。

### 2.5.2. 調査の概要

今回の対象とする入浴設備は新館で、行政検査の採水直後から稼働を自粛しており、追加調査時には設備を含めて徹底して洗浄消毒を済ませていた。浴槽表面は目地を含めてブラッシングし、塩素で消毒していた。シャワーはヘッドとカランを分解して洗浄消毒していた。シャワーヘッドは数か月前に交換したばかりだが、ホース部分は開設以来特に洗浄等していなかったため、今回の結果を受けてすぐに新品と交換していた。施設関係者との対話によりこの廃棄ホースが残っていることがわかり、譲り受けてホース内部の調査をすることとなった。

4L滅菌蒸留水を用いてホース内面を洗い出し、洗浄水の原液をATP、FCMおよびレジオラートに供し、100倍ろ過濃縮液を遺伝子検査と平板培養に供した。洗浄後にホースを切開し、内壁に付着していた粘液物を滅菌綿棒でふき取り、1mL滅菌蒸留水に懸濁したものを遺伝子検査と平板培養に供した。この時、生菌が検出されなかったため、洗い出し液から

得た DNA 抽出液を *L. pneumophila* 血清群 M-PCR キット（ファスマック社製）を用いて遺伝子型別を行った。

### 2.5.3. 調査に基づく対応

調査結果を検討し、施設関係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、自主検査を行った。

## 3.1. モノクロラミン消毒の適用事例

遊離塩素濃度の日変化が大きい循環系統にモノクロラミン消毒を適用した。当該施設は、1 日客数 700 人規模の入浴施設で対象循環系統の保有水量は 17 t、ろ過器容量は約 1 t である。回収槽があるが、定期的な高濃度塩素洗浄と配管洗浄により洗浄・消毒を徹底していた。井水を使用しているが、事前のモノクロラミン消費量検査で阻害を認めなかった。

モノクロラミン生成装置によるタイマー管理及び全残留塩素濃度の測定を組み合わせ、循環式浴槽水のモノクロラミン濃度を一定値に調整した。本処理の実施期間において、施設から毎日の浴槽水の残留塩素濃度のデータを入手して解析した。また、必要に応じて、浴槽水のレジオネラ属菌の培養検査を実施した。

## C. 結果および考察

### 1.1. K 入浴施設の調査

図 1 に大腸菌を用いて作製した陽性および陰性対照検体の検査結果および水風呂と薬湯の検査結果を示した。陽性対照と陰性対照はそれぞれ  $1.34 \times 10^4$  cells/mL と 48 cells/mL であった。水風呂の浴槽水と逆洗浄水はどちらも 0 cells/mL であり、薬湯の浴槽水と逆洗浄水はどちらも 95 cells/mL と消毒効果が認められていた。施設側が測定した残留塩素濃度は共に 2.0 mg/L 程度であった。消毒効果を確認できたために、1 週間後に改めて水風呂と薬湯を採水してレジオネラ属菌を培養した。その結果、平板法でもレジオラートでもレジオネラは検出されなかった。

施設の要望により、現地調査では FCM 検査のみ実施したが、その時に判定した陰性という結果は事後に行ったレジオネラ検査結果と一致した。現地では残留塩素も十分な濃度を保てており、想定外の結果はなかったものの、対話の中で衛生管理者がレジオネラ判定結果に対して凄く敏感であることが感じられた。本事例で、消毒効果を衛生管理者に認識させることは彼らに安心感をもたらす有意義な指標であることと、レジオネラ汚染と密に関係する細菌汚染を迅速に探知して予防に繋げる措置はレジオネラの実態を事業者等に理解させ衛生管理の重要性を認識させうる有効な手段であると感じられた事例であった。

### 1.2. L 入浴施設の調査

図 2 に L 施設の調査の概要を示した。浴槽水の ATP と FCM は低く、従属栄養細菌も検出されず、レジオネラ属菌、生菌遺伝子と全遺伝子は全て不検出であった。排水口踏み板と人工芝表面のそれぞれ 3 か所をふき取った値の平均±標準偏差は、ATP がそれぞれ  $201,687 \pm 134,214$  RLU/100 cm<sup>2</sup> と  $46,550 \pm 64,057$  RLU/100 cm<sup>2</sup>、レジオネラ属菌の全遺伝子も  $2,500 \pm 1,619$  GU/100 cm<sup>2</sup> と高い値を示した。培養法によるレジオネラ属菌数は、踏み板表面が  $8,187 \pm 11,251$  CFU/100 cm<sup>2</sup>、人工芝表面が  $3,667 \pm 5,297$  CFU/100 cm<sup>2</sup> を示した。踏み板表面の従属栄養細菌数は 384,000 CFU/100 cm<sup>2</sup> であった。側溝に貯留する水を採水して同様な検査をしたところ、ATP は 29 RLU/mL、FCM は 12,700 cells/mL で従属栄養細菌が 5,440 CFU/mL 検出された。レジオネラ遺伝子検査では、生菌遺伝子が 104 GU/100 mL、全遺伝子が 392 GU/100 mL を示し、培養検査でも 1,190 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出された。

以上のことから、排水口のレジオネラ汚染が明らかとなったため、衛生管理者に結果を伝えたところ、木製踏み板の金属製品への交換と人工芝の定期洗浄・消毒を追加すること

となった。本システムでは、これまでろ材を対象とするオゾン消毒を実施してきたが、浴槽水からレジオネラは検出されないのに逆洗浄水から原因不明のレジオネラが検出される状況が続いてきた。汚染源が発覚して上述の処理を追加して以降、レジオネラは逆洗浄水からも検出されなくなった。

### 1.3. M 入浴施設の調査

M 施設では、浴槽水は温泉を用い、シャワーとかけ湯は井水を利用していた。各系統から採水した浴用水を FCM による細菌数と残留塩素濃度で比較した（図 3）。温泉原水には  $10^5$  オーダーの細菌が含まれており、一次貯湯タンクの消毒により  $10^2$  オーダーまで減少したが 2 次貯湯タンクで  $10^4$  オーダーに増加していた。女湯湯口水でも  $10^4$  オーダーを示したが、浴槽水では女湯  $10^3$  オーダー、男湯  $10^1$  オーダーまで減少し、ヘアキャッチャー水と逆洗浄水でも  $10^2$  オーダーと低い値であった。ジャグジーと露天風呂の細菌数は全ての検体で  $10^2$  オーダーであった。遊離塩素濃度は原水と 2 次貯湯タンクで不検出であったものの全ての浴用水で  $2.0 \text{ mg/L}$  を維持していた。

施設の衛生管理者によると、貯湯タンクから大浴場には女湯湯口からのみ供給される構造となっており、男湯と女湯に分岐して使用された水がろ過器を通して浴槽に循環されるということであった。また、過去にレジオネラ汚染が認められたのは 2 次貯湯タンクであり、今回の調査で細菌増殖を認めたことから本施設の重要管理点は原水の消毒にあることを施設事業者にも再認識させることができた。全ての循環系統において、浴槽水の細菌数は  $10^2$  オーダーと低い値を示しており、遊離塩素濃度も高い水準を維持していたことから、循環系に消毒を阻害する要因は認められず、現行の消毒はうまく管理されていると判断した。

一方で、井水を原水とするシャワー水等を見ると原水こそ  $2.0 \text{ mg/L}$  と高い値を示したが、男湯のシャワー水から遊離塩素はほとんど検

出されず女湯でも  $0.1\sim 0.2 \text{ mg/L}$  にすぎなかった。男湯の細菌数は原水と同等であったが女湯では 10 倍になっているものがあつた。そのためにシャワー水によるレジオネラ事故事例を紹介するとともにシャワーの定期的な洗浄消毒の必要性を伝えた。

レジオネラ属菌検査について、当該施設の衛生管理者から追加調査は希望せず、結果の検証は自主検査で対応するとの意向を示したために以上で調査を終了した。

### 1.4. N 入浴施設の調査

図 4 に行政検査時の各種検査データと施設訪問時に入手した廃棄ホースの調査結果を示した。塩素管理がなされている貯湯槽、内湯、露天風呂は ATP と細菌数が共に低い値を示した。塩素管理がなされていない炭酸風呂と水風呂はかけ流し式で毎日換水していた。シャワー水も ATP と細菌数は低かったが、*Legionella pneumophila* SG4 が  $175 \text{ CFU/100 mL}$  検出された。

廃棄ホースの洗い出し液からは、レジオネラ属菌は平板法でもレジオラートでも検出されず、従属栄養細菌も不検出であった。FCM はそれほど高い数値ではなかったが、ATP は  $627\pm 32 \text{ RLU/0.1 mL}$  と高い値を示し、遺伝子結果でも生菌遺伝子は検出されなかったが全遺伝子が  $446\pm 131 \text{ GU/100 mL}$  検出された。この DNA 抽出液を用いて遺伝子型別を行ったところ *L. pneumophila* SG4 には反応せず、5SrRNA に特異的な部分のみ増幅されたのでホース内面に付着していたものは *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌と推定された。廃棄ホースを切開すると内面に茶褐色のバイオフィルム (BF) が広範に付着していた（図 4）。滅菌綿棒でこの BF を拭いたものを  $1 \text{ mL}$  蒸留水に懸濁させて平板法とレジオネラ遺伝子検査（全遺伝子のみ）に供したところ、レジオネラ属菌は平板法で検出されなかったがその遺伝子量は  $26,226 \text{ GU/100 cm}^2$  と高い値を示した（図 4）。

該施設は井水を使用する系統の貯湯タンクで 60°C 以上を保つように管理され、補給される内湯や露天風呂では塩素管理がなされていた。塩素管理されていない炭酸風呂や水風呂においても細菌数は低値に保たれておりレジオネラが不検出であったことから BF 対策は十分であるように思われた。しかしながら市水を使用するシャワーについては保守管理の意識が低く開設以来 5 年間ほとんど何もしていなかった。今回の調査でシャワーホース内面に BF が高度に付着しており汚染源となった可能性が考えられたが、シャワー水からの分離菌株の遺伝子と洗い出し水から得られた遺伝子では菌種が異なっており汚染源として特定することはできなかった。この原因は不明であるが、本事例で、行政検査の立入直後に施設側が自主的に新館での営業を停止して消毒洗浄を実施していた。今回のホースも高濃度塩素を注入した熱水で消毒していたことが判明しており、ホースから生菌が検出されなかった理由となるかもしれない。

今回の事例を受けて、施設側にシャワー設備管理の必要性を再認識させるとともに、シャワーヘッド及びホースの定期交換を定めて管理マニュアルに反映させることができた。

#### 2.1. モノクロラミン消毒の適用事例

図 5-1 にモノクロラミン製造装置の概要図と循環系の模式図を示した。水道水 36 L/h、12%次亜塩素酸 Na 0.36 L/h、15 (w/w) %塩化アンモニウム 0.36 L/h で設定し、生成したモノクロラミン濃度は約 1300 mg/L であった。本循環系統の保有水量 17 m<sup>3</sup> に対して、営業前にモノクロラミン濃度が約 3 mg/L となるように 1 時間連続注入し、営業中はタイマーで 10 分ごとに ON/OFF を繰り返して濃度を制御した。

図 5-2 にモノクロラミン適用前後の浴槽水中残留塩素濃度の推移を示した。本浴槽はこれまで遊離塩素で管理されてきたが、浴室入口に位置するジャグジー形式の浴槽であることから人気が高く、入浴者が多いときは残留

塩素濃度が急降下して手動による塩素追加が必要な場合があった。モノクロラミン適用直後は濃度が安定しない時期があったが、1 ヶ月を経過したころから 3.5~4.5 mg/L と安定するようになった (図 5-2)。浴槽水の塩素臭気は感じず、従属栄養細菌が若干増えた時があったがレジオネラ属菌は装置設置後継続的に不検出であった。1 日 4 回 (金土は 5 回) DPD により全塩素濃度を測定して濃度を制御し、4.5 mg/L 以上の時は手動でタイマーを停止するようにした。4.5 mg/L で 1 時間程度、6 mg/L 以上ならば次の測定の 3 時間後まで停止させていた。衛生管理者によると、濃度が安定するようになってからは、入浴者が 100 人増えた場合でも濃度が 0.5 mg/L を超えて下ることはなく、高濃度への対応はあっても遊離塩素のように激減して追加補充することは無くなり管理が軽減されたとのことであった。

#### 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。今回の 4 施設は全て循環ろ過式入浴施設であった。

・K 施設の調査では、FCM 法を現地で行ったことで施設の衛生管理者との間で浴槽設備の衛生状態を迅速に共有することができた。日常的な作業が消毒効果に反映されていたことの認識が安心感につながり、対話の中で衛生管理について詳細な聞き取りができた。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。

・L 施設の調査では、培養検査と併せて非培養検査を行ったことにより、様々な消毒措置でも排除できなかったレジオネラ属菌の汚染源を迅速に特定するとともに、施設側の状況理解と判断を促すことで汚染源の撤去と改修並びに衛生管理マニュアルの改善につなげることができた。

・M 施設の調査では、現行の消毒手法が有効であることに加えて、貯湯槽の消毒処理がレジオネラ対策の重要管理点であることを施設事業者に再認識させることができた。

・N 施設ではシャワーのレジオネラ汚染の可能性を施設事業者に認識させることができ、定期的なシャワーヘッドとホースの交換など設備管理の改善に繋げることができた。

・モノクロラミン消毒の適用事例では、塩素濃度の安定性向上、塩素臭の消失、レジオネラ属菌の不検出に加えて、遊離塩素の不安定さによる衛生管理者の多大な管理業務を軽減させるなど、利用客にとっても施設側にとっても良質な入浴環境を提供することができた。今後これらの環境を持続させることがモノクロラミン消毒の普及につながると考えられた。

## 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. Poulis JA, et.al., Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP-bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method, *Int J Food Microbiol*, 109-16, 1993.
3. 上木隆人ら, 平成 22 年度地域保健総合推進事業「保健所のレジオネラ対策における簡易迅速な検査法の実用化と自主管理の推進に関する研究」報告書, 15-22 (2011)
4. 田栗利紹ら, レジオネラ属菌検査が現地で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.
5. 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.
6. 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>.
7. 田栗利紹ら, 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, 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)「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和 4 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 泉山信司, 77-89, 2022.
8. 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.
9. 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).
10. 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.
11. 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.

## F. 研究発表

田栗利紹, 蔡 国喜, 加藤定男, 中西典子, 平塚貴大, 井上浩章, 縣 邦雄, 新道欣也, 鳥井良太, 齋藤利明, 木村哲也, 小森正人, 小田康雅, 下田貴宗, 泉山 信司, フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した入浴施設の衛生管理の推進方法, 防菌防黴学会第50回年次大会要旨集, 2023.

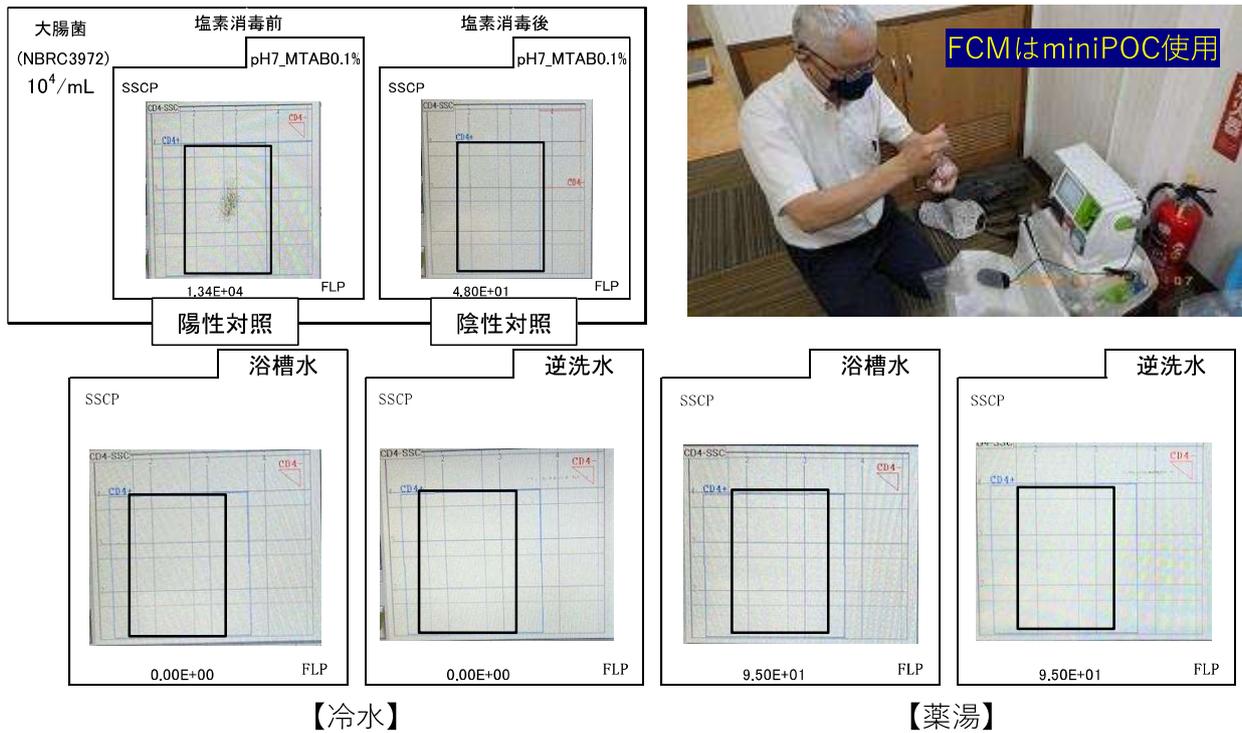
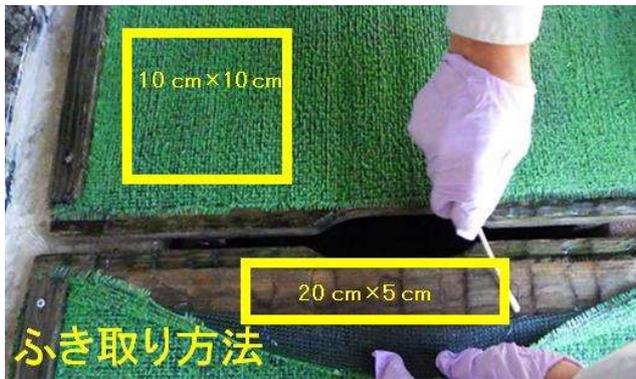


図1 K施設の調査結果

フローサイトメーターによるスキャッタグラムと比較。上が大腸菌を用いた消毒前後の対照検体、下は冷水系統と薬湯系統から採取した浴槽水と逆洗水を示す。写真は現地での実演作業。



検体名	性状	ATP (RLU <sup>1)</sup> /mL)	Flow cytometry (cells/mL)	遺伝子検査 (GU <sup>2)</sup> /100 mL)		レジオネラ属菌 (CFU <sup>3)</sup> /100 mL)		従属栄養細菌 (CFU/mL)
				生菌	全遺伝子	菌数		
浴槽水	水	4	<1,000	<10	<10	<10	<200	
側溝水		29	12,713±365	104	392	1,190	5,440	

検体名	性状	ATP (RLU/100 cm <sup>2</sup> )	遺伝子検査 (GU/100 cm <sup>2</sup> )		レジオネラ属菌 (CFU/100 cm <sup>2</sup> )		従属栄養細菌 (CFU/100 cm <sup>2</sup> )
			生菌	全遺伝子	菌数		
踏み板表面	拭取り	201,687±134,214	NT <sup>4)</sup>	2,500±1,619	8,187±11,251	384,000 (n=1)	
人工芝表面		46,550±64,057	NT	6,573±10,560	3,667±5,297	NT	

<sup>1)</sup> Relative Lights Unit, <sup>2)</sup> Genetic Unit, <sup>3)</sup> Colony Forming Unit, <sup>4)</sup> Not Tested

図2 L施設の調査概要

写真は排水口表面のふき取り作業を示す。  
表は上が浴槽水と側溝水の検査結果、下は拭取り検査の結果を示す。

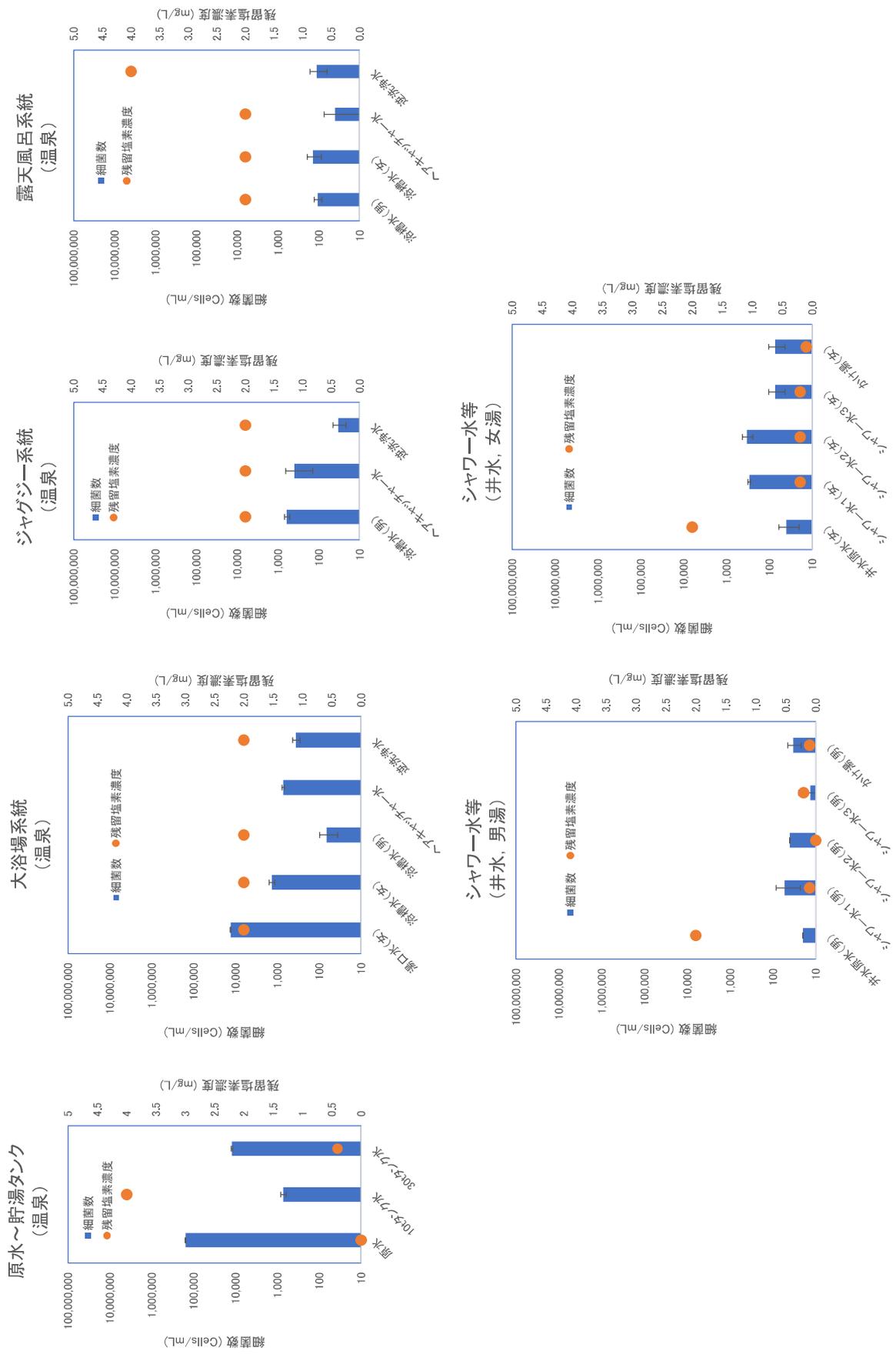


図3 M施設の調査結果  
誤差範囲は平均値±標準偏差。

検体名	検体の種類	ATP (RLU <sup>1)</sup> /0.1 mL)	Flow cytometry (cells/mL)	遺伝子検査 (GU <sup>2</sup> /100 cm <sup>2</sup> )		残留塩素濃度
				生菌	全遺伝子	
貯湯槽		5	120	NT <sup>4)</sup>	NT	0.1
内湯	浴槽水	11	113	NT	NT	1.8
炭酸風呂	浴槽水	11	1,207	NT	NT	0
水風呂	浴槽水	48	940	NT	NT	0
露天	浴槽水	11	13	NT	NT	1.3
かかり湯		16	13	NT	NT	0.2
シャワーカーン	シャワー水	9	293	NT	NT	0

検体名	性状	ATP (RLU/0.1 mL)	Flow cytometry (cells/mL)	遺伝子検査 (GU/100 mL or cm <sup>2</sup> )		従属栄養細菌 (CFU/mL)
				生菌	全遺伝子	
ホース洗浄液	水	627±32	1,333±12	<10	446±131	<200
ホース内面	ぬぐい液	NT	NT	NT	26,226	<200

1) Relative Lights Unit, 2) Genetic Unit, 3) Colony Forming Unit, 4) Not Tested



図 4 N 施設の調査の概要

表は上が事前調査の結果、下が入手したホースの検査結果を示す。

写真はレジオネラが検出された試験ホース(左図)と交換後の外観(右図)で左挿入図は、ホース内面を示す。

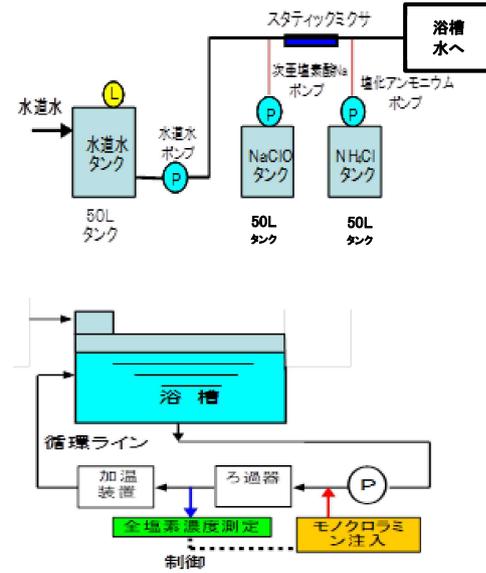


図5-1 モノクロアミン製造装置と循環系の模式図

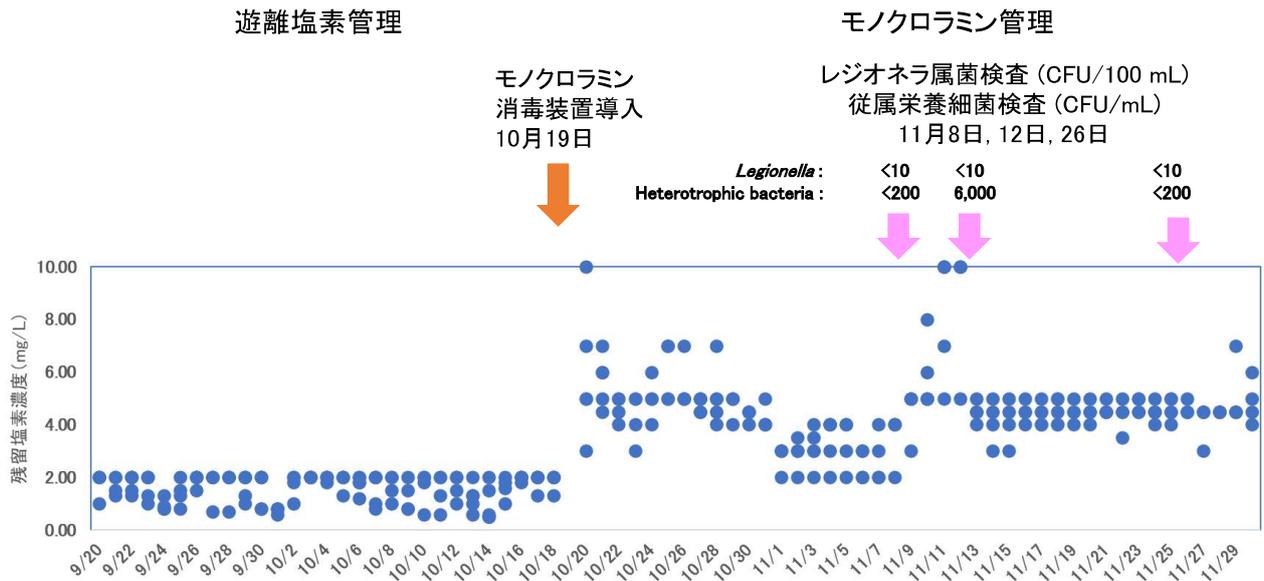


図5-2 モノクロアミン適用前後の浴槽水中の残留塩素濃度の推移