

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6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ドー

研究協力者： 鳥井 良太 株式会社お風呂のシンドー

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 シスマックス株式会社

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によるレジオネラ属菌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でき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、現場の状況を効率的に把握して衛生管理に反映させることを目的に検証を行った。具体的には4ヶ所で現地調査を実施し、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。最初の2つの入浴施設調査では、高温の温泉を利用する掛け流し式で、外冷気の影響を受けやすい冬季と保温しやすい夏季で調査を行った結果、貯湯槽の高温保持、適切な洗浄と配管洗浄が重要であることが確認された。残りの2つの施設は、省力化配管洗浄剤を適用した事例で、迅速検査法による洗浄汚濁物可視化により、施設営業者は配管洗浄の重要性を認識できた。これらの事例では、洗浄時の検体からFCM法により細菌を確認し、顕微鏡により配管から剥離したと思われる生物膜様物質を観察した。

これらに加えて、令和5年度から取り組んできたモノクロラミン消毒装置の設置施設において、消毒対象を拡大して、最終的に4系統の循環ろ過式浴槽を一括管理することにより全ての浴槽でレジオネラ属菌が不検出の状態を長期にわたり維持することができた。

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¹⁾。消毒の難しさに加えて、泉質による消毒効果の違いや、営業規模や設備による管理の違いもあり、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。

レジオネラ属菌の検査は培養法が標準検査とされているが、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、多くの物に含まれている。食品製造や医療の現場では、ATP量が微生物汚染の指標として活用されている²⁾。入浴施設でも衛生管理に応用されて、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³⁾。

FCM法は、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

遊細菌をフローサイトメーターで測定することで、レジオネラ属菌汚染リスク汚染の指標となりうることが示されてきた⁴⁾。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、サンプルが微細な流路に取り込まれ、個々の細胞が一列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、細菌数を迅速に計測することができる。さらに、遊離塩素消毒下で破壊された細菌は蛍光強度が変化して生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、レジオネラ属菌の遺伝子を特異的に検出することで、浴槽水中のレジオネラ属菌を定量することができる。膜透過性を利用した生死鑑別法を組み合わせることにより、生きたレジオネラ属菌による汚染を評価できる⁵⁾。

本研究では、これらFCM法等の非培養検査法の結果を施設衛生管理者と共有し、対話により衛生状態の理解を促すことで、公衆浴場の施設自身による衛生管理の向上を期待している。

本研究では迅速検査法を活用して入浴施設現場施設の調査・予防・改善につなげる実施例を蓄積する。ここでは施設4事例の適用事例を紹介する。モノクロラミン消毒については迅速検査法との関係の中で遊離塩素消毒と異なる知見が得られたので報告する。

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 法を用いた。この時、遊離残留塩素濃度は遊離残留塩素用試薬（笠原理化工業社製）、モノクロラミンは全残留塩素用試薬（笠原理化工業社製）を残留塩素測定容器 中濃度用（柴田科学社製）を用いて測定した。本検査法の検出限界は遊離塩素濃度の場合 0.1 mg/L モノクロラミン消毒に適用した全塩素濃度の場合は 2.0 mg/L である。

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 A3 Water（液体測定用），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⁶⁾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⁷⁾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、感度が異なるために、検出限界値は 1300 cells/mL、消毒効果の基準値は 1000 cells/mL である⁸⁾。

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⁵⁾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⁹⁾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（CFU-equivalent unit: CFU-eU/100mL）と全遺伝子量（CFU-eU/100mL）とした。

1.5. レジオネラ属菌の培養方法

平板培養法によるレジオネラ属菌の培養検査は森本らの方法¹⁰⁾でろ過濃縮法により行った。培地は GVPC α 培地（ビオメリュー）を使用し、100 倍濃縮した検水を、酸処理か熱処理の後、塗抹して 36°C で 3~7 日間培養した。システィン要求性の湿润集落をレジオネラ属菌として計数した。消毒剤としてモノクロラミン消毒を供した施設では平板培養法と同時にレジオラート（アイデックス）を行った。同法は淀谷らの報告¹¹⁾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

FCM 法で大量に細菌が検出されるなど浴槽水の消毒に影響を与えそうな場合は、施設と相談の上で、細菌の生死を確認するために従属栄養細菌の検査を実施した。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。

1.7. 共焦点レーザー顕微鏡法

研究の中で細菌の顕微鏡学的証明のために用いた共焦点レーザー顕微鏡法は下記のとおりである。

即ち、洗浄中、中和後の浴槽水を 3 mL ずつ、それぞれ 15,000 rpm、10 分間遠心後、沈査をスライドグラスに塗抹し蛍光試薬で染色して共焦点レーザー顕微鏡（LSM880、ZEISS 社製）で観察した。蛍光試薬は核酸染色用に SYTO9（Thermo Fisher Scientific 社製）、糖の染色用に Rhodamine Concanavalin A（VECTOR LABORATORIES 社製）を、カルシウムとマグネシウムを含まない生理食塩水（DPBS, Thermo Fisher Scientific 社製）にて最終的にそれぞれ 1,000、250 倍に希釈され

るよう混合して用いた。顕微鏡観察時の光路設定は付属のソフトウェア ZEN2 の Smart Setup により SYTOX Green、rhodamine を選択して設定した。透過光観察像と重ね合わせて画像を取得した。

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⁷⁾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、調査対象とする浴槽水、貯湯タンク水、ろ過器排水、ろ過器逆洗浄水などの試料と検査方法を決める。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法も加える。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施してもらう。5番目に、培養法で浴槽水のレジオネラ属菌陰性を確認する。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、日常管理に役立てもらう。

2.1.2. 検水の採取方法

検水を採取する場合には、最初に検水をそのまま用いて遊離塩素濃度と ATP 量を測定し、その後検水に含まれる塩素を中和した後のサンプルを用いて FCM 法、遺伝子検査法、培養法に用いた。

FCM 法用の試料は 100 mL 減菌採水瓶（栄研, TG2000）、培養法用の試料は 1 L 減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 (GA) 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

検査法は平板培養法の濃縮サンプルを用いた。

2.2. O 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 O 施設は高温の温泉利用の掛け流し式施設で、4 階建て構造の全客室で温泉を直接利用している。105°C超の源泉を冷却装置で 60°C程度にして受湯槽に貯留させ、ポンプで屋上の貯湯槽に組み上げたお湯を各室に配湯する仕組みとなっている（図 1-a）。冷却装置は吐出時に析出するスケール除去にも役立っている。

今回の調査は、管轄保健所主催の営業施設向け衛生講習会が縁で実施した。自主管理として実施している高圧洗浄による貯湯槽の洗浄と高濃度次亜塩素酸ナトリウムによる配管洗浄の有効性について、O 施設の経営者から相談を受けたものである。なお、本施設では年 2 回の貯湯槽洗浄消毒と月 1 回の高濃度塩素による配管洗浄を行っていた。

2.2.2. 調査の概要

外冷気の影響を受けやすい冬季と保温しやすい夏季で比較するために、調査は令和 5 年 12 月と令和 6 年 8 月の 2 回行った。一次冷却後の受湯槽、屋上の貯湯槽並びに客室浴槽について、湯温を現地で測定し、ATP 法、FCM 法、レジオネラ遺伝子検査法の検体を採水した（図 1-a）。配管汚染を探知するために貯湯槽から最も遠い位置にある客室の浴槽水（直前に貯めたもの）を採水したが、冬季の ATP 量が高く浴槽壁汚染の影響を排除できなかつたため、夏季には浴槽水から湯口水に変更し、貯湯槽近辺と遠方の客室から採取して比較した。

2.3. P 入浴施設の調査

次に協力を得た施設は O 施設と同じ地域の温泉で、同じく高温の温泉を利用している。施設から離れた場所にグランピング (GP) 施設を設置して令和 5 年春から営業している。

こちらも保健所主催の衛生講習会の際に、

長距離配湯におけるリスク管理について質問を受けたことから調査協力を得たものである。

2.3.1. 施設の衛生管理の状況

当温泉は間欠泉で、最初に源泉から吐出された熱湯を近くにある本館のコンクリート製貯湯槽に貯留していた（図 2-a）。GP 施設へは、約 1 km の配管を通して本館貯湯槽から配湯され、GP 施設の貯湯槽を介して 10 棟の入浴設備に分配する構造となっていた。本施設と GP 施設の貯湯槽は温度管理を徹底しており、年 1 回程度、全部排水後に高圧洗浄機を用いてスケール除去していた。

2.3.2. 調査の概要

○ 施設と同様に、調査は令和 5 年 12 月と令和 6 年 8 月の 2 回行った。源泉、本館貯湯槽、GP 施設貯湯槽および GP 施設湯口水について、湯温を現地で測定し、ATP 量、FCM、レジオネラ遺伝子検査の検体を採水した（図 2-a）。

2.4. Q 入浴施設の調査

3 番目に協力を得た循環ろ過施設は、令和 5 年度に循環系外のレジオネラ汚染源を発見して改善に至った施設である¹²⁾。流路の排水溝上蓋のモニタリングを ATP 法にて定期的に実施していたところ、 10^4 オーダーの高値が出るようになったことで施設衛生管理者から相談を受け、省力化配管洗浄剤の適用を試みた。

2.4.1. 施設の衛生管理の状況

利用者数は 1 日あたり約 700 人であった。対象は 1 t 規模の壺形浴槽が野外に 3 つ併設されている循環系統で、ほぼ同量の回収槽を持つ構造となっていた。塩素消毒とともに週 1 回の高濃度塩素洗浄（20 mg/L × 2 時間）と年 3 回の配管洗浄を実施していた。

2.4.2. 調査の概要

浴槽水と回収槽水（合計約 6 t）を省力化配管洗浄剤¹³⁾（花王株式会社、R3 年度厚労科研の成果品）で処理した。作業マニュアルに沿って洗浄作業を行った。A 剤、B 剤、C 剤の 3 つ

の薬剤を浴槽水 1 トンあたり各 2 kg の割合で浴槽水に投入して 1 時間反応させたのち、1 kg の中和剤で 15 分処理し、すすぎ操作を 2 回実施した。主な作業工程のうち濃縮作業が不要な①洗浄前、②洗浄中、③中和後、④すすぎ 2 回後および⑤翌日の浴槽水を ATP 法と FCM 法に供した。②洗浄中と③中和後のサンプルは濃縮操作が困難であったため、レジオネラ属菌培養検査法および遺伝子検査法用には①洗浄前、④すすぎ 2 回後および⑤翌日の浴槽水を検査に供した。

2.5. R 入浴施設の調査

4 番目に協力を得た施設は、入所者 150 人程度の社会福祉施設であった。研究協力者である民間事業者を通じて、消毒装置故障後の営業再開について相談を受けたものである。循環停止中の生物膜除去のために省力化配管洗浄を試みた。

2.5.1. 施設の衛生管理の状況

当該施設の浴槽は男女 2 つの浴槽が単一の 200 L 規模のろ過器を用いた循環ろ過がなされており、毎日 50 人程度が利用していた。自動注入による遊離塩素消毒管理で、塩素濃度は毎日計測されており、0.4～1.0 mg/L に保たれていた。今回、消毒装置タンク底部に経年劣化により穴が開き 1 週間ほど装置を止めていた。原水は井水だが、200 L 程度の温泉由来の鉱石をろ材として使用していた。年 3 回、過炭酸ナトリウムでの洗浄を行っていた。

2.5.2. 調査の概要

女湯（2 t）と男湯（1 t）を省力化配管洗浄剤で処理した。洗浄剤を投入して 1 時間反応させたのち、中和剤で 15 分処理した後すすぎ操作を 2 回程度実施した。①洗浄前、②洗浄中、③中和後、④すすぎ 2 回後の浴槽水を ATP 法と FCM 法に供した。濃縮作業が必要なレジオネラ属菌の平板培養法とレジオネラ属菌遺伝子検査法用には、女湯の④すすぎ 2 回目後

と⑤翌日の塩素消毒後の浴槽水を採水した。

3.1. モノクロラミン消毒の適用事例

既報の通り¹²⁾、令和5年9月から17t規模の循環系統にモノクロラミン消毒装置を供用して安定的なモノクロラミン濃度を保ち、実施した全ての検査でレジオネラ属菌が検出されなかった施設において、本年度はモノクロラミン消毒装置の機能拡大を試みた。

同じ井水を利用する他の循環系統でもモノクロラミン消毒を行うため、令和6年7月に、既存の消毒装置に制御装置と分配配管を増設した。設置済のジェット浴18tに加え、野外にある歩行浴25tおよびサウナと併設する冷水浴8tを対象とし、3つの系統は同時制御とした。消毒装置から分配された配管をこれらの循環系統の消毒液注入口に連結して、タイマー制御により20分毎に自動的に分配先が切り替わるように設定した。モノクロラミンの生成条件等は既報のとおりである¹²⁾。毎日4~5回DPD法によりモノクロラミン濃度を測定し、高濃度の場合は停止させるなどして概ね4.0~4.5mg/Lを目標値として調整していた。既報¹²⁾のとおり、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、各月のモノクロラミン濃度としてその推移を比較した。

さらに令和6年10月に追加工事を行い、同じ井水を用いる6t規模の薬湯系統もモノクロラミン消毒の対象とした。調整器の仕様により分配機能は3系統に限られたため、毎日換水のジェット浴と薬湯を独立分配制御とし、7日間隔の換水でモノクロラミン濃度が安定していた歩行浴と冷水浴は1本の分岐配管に接続して手動切り替えとした(図1)。

以上のとおり、10月の増設後は井水系統全てをモノクロラミン消毒に切り替えた。水質検査は、7月以降3系統、10月以降4系統の浴槽水を月1回の間隔で採水し、ATP法、FCM法、従属栄養細菌数検査、レジオネラ属菌の培養検査法およびレジオネラ属菌遺伝子検査法

を実施した。施設側の要望を受けて同菌の特異的検出に有効なレジオラート法を平板培養法と同時に供試した。

C. 結果および考察

1.1. O入浴施設の調査

図1(b)にO施設の冬季と夏季の測定結果をまとめた。冬季の受湯槽、貯湯槽および遠方客室浴槽水の温度はそれぞれ57.5°C、51.5°Cおよび47°C、ATP量はそれぞれ41RLU、28RLU、132RLU、FCMによる細菌数は733cells/mL、1047cells/mLおよび807cells/mLであった。受湯槽、貯湯槽および遠方客室浴槽水のレジオネラ属菌遺伝子検査法においてレジオネラ属菌の全遺伝子は、それぞれ12CFU-eU/100mL、12CFU-eU/100mLおよび32CFU-eU/100mLであったが、生菌遺伝子はすべて不検出(<1CFU-eU/100mL)であり全て死菌由来の遺伝子と判定された(図1O-1)。冬季の結果から配管の汚染状況を精査するために、夏季の調査では客室検体を浴槽水から湯口水に変更するとともに、貯湯槽に近い客室を加えた。本研究のFCM法では細菌の生死判別ができないのでFCM法で検出された細菌の状態を確認するために従属栄養細菌数を項目に追加した。夏季の受湯槽、貯湯槽、近辺客室および遠方客室湯口水の温度はそれぞれ63°C、64°C、54°Cおよび55°C、ATPはそれぞれ44RLU、12RLU、16RLUおよび44RLUであった。FCMによる細菌数は<200cells/mL、13,827cells/mL、<200cells/mLおよび27,760cells/mLであったが、従属栄養細菌数は全て検出限界以下(<200CFU/mL)であった。レジオネラ遺伝子量は検査した全ての検体で生菌遺伝子および全遺伝子ともに検出限界(<1CFU-eU/100mL)以下を示した(図2O-2)。

O施設で、受湯槽と貯湯槽温度が60°Cに達しなかった冬季では受湯槽と遠方客室からレジオネラ属菌遺伝子(死菌由来)が検出されたが、60°Cを超えた夏季では不検出となつた。

夏季に貯湯槽や遠方客室で細菌増殖が確認されたがほぼ殺菌されていた。このように、受湯槽、貯湯槽および遠方客室の状態によりレジオネラ遺伝子が僅かに増加することがあっても、細菌とレジオネラ属菌は全て殺菌されていると考えられ、受湯槽や貯湯槽の高温管理はレジオネラ属菌制御に効果があるとともに 60°C という値が維持管理の目標値として適切であることが改めて確認された。

本施設は原水が 100°C を超す高温泉であり、一旦冷却装置を通して一次冷却とスケール除去したお湯を屋上の貯湯槽に送る構造をとっていた(図 1(a))。高温のために冷却装置の洗浄管理はできないが温度によりリスクは低いと考えられていた。今回の調査で冬場の受湯槽と遠位客室の浴槽水からのみレジオネラ属菌の遺伝子が検出される一方で夏季には同じ調査個所からレジオネラ属菌遺伝子は検出されなかつた。これらのことから受湯槽の高温管理の重要性が認識されるとともに施設が自ら逸脱を探知する手段が必要と考えられた。今回の調査で高温管理が難しい冬季には ATP 法がレジオネラ属菌遺伝子の出現を探知できており有用なスクリーニング手段と考えられた。

1.1.2. 調査に基づく対応

○ 施設では冬場の温度管理が重要管理点の一つであることが明らかとなり、対策としてリスクの高い受湯槽、貯湯槽および遠方客室の定期的な温度測定を提案して了承された。また、これまで定期的に実施されてきた貯湯槽の洗浄消毒と塩素剤による配管洗浄の有効性が確認されたことと ATP 法が汚染指標として優れていたことも伝えて、施設責任者により今後の衛生管理に活用する旨の回答を得た。

1.2. P 入浴施設の調査

図 2 (b) に P 施設の測定結果を示した。冬季の源泉、貯湯槽、GP 施設貯湯槽および GP 施設湯口水の温度はそれぞれ 90°C 、 79.1°C 、 56.3°C および 57.5°C 、ATP 量はそれぞれ 69 RLU、19 RLU、35 RLU および 66 RLU、FCM

による細菌数は 240 cells/mL 、 227 cells/mL 、 220 cells/mL および 233 cells/mL であった。これらのレジオネラ遺伝子量は全ての検体で生菌遺伝子および全遺伝子とともに検出限界($<1 \text{ CFU-eU/100 mL}$)以下を示した(図 2 P-1)。夏季の調査では、○ 施設と同様に細菌の生死判別のために従属栄養細菌数を項目に追加した。受湯槽、貯湯槽、GP 施設貯湯槽および GP 施設湯口水の温度はそれぞれ 80.4°C 、 81.8°C 、 63.5°C および 51.5°C 、ATP 量はそれぞれ 12 RLU、16 RLU、44 RLU および 13 RLU であった。FCM による細菌数は 2460 cells/mL 、 5480 cells/mL 、 2360 cells/mL および 473 cells/mL であったが、従属栄養細菌数は全て検出限界以下($<200 \text{ CFU/mL}$)であった。レジオネラ遺伝子量は GP 施設の貯湯槽と湯口水でわずかに検出された(それぞれ 27 CFU-eU/100mL と 17 CFU-eU/100mL)が、生菌遺伝子はともに検出限界($<1 \text{ CFU-eU/100 mL}$)以下を示した(図 2 P-2)。

P 施設の貯湯槽は冬季でも 79.1 と高温を保持できており、源泉や GP 湯口水から若干の ATP は検出されたものの、細菌数やレジオネラ遺伝子は低く保たれていた。当該温泉は間欠泉で微量の土砂が含まれることを確認しており(データ不掲載)、ATP はこの土砂に由来すると推測された。しかしこの ATP が貯湯槽で低下していたことと、季節を問わず貯湯槽では他の指標も低く抑制されていたことから、これらの現象は貯湯槽での何らかの制菌作用が疑われ、当該施設の貯湯槽がコンクリート製であったことから、その保温性の高さによるものと考えられた。

夏季の GP 施設貯湯槽では、冬季には見られなかつた ATP とレジオネラ遺伝子(死菌由来)の集積が認められた。その量はどちらもわずかで湯口水では減少しており、若干検出された細菌も全て死菌であった。この GP 施設の貯湯槽もコンクリート製であったことから、その保温性による微生物制御により湯口水のリスクも低く保たれていると考えられた。

1.2.2. 調査に基づく対応

P 施設では貯湯槽の優れた温度保持により温度制御の難しい冬場でも温泉の清浄度が保たれていると考えられた。施設には貯湯槽の保温性が優れているため衛生状態が良好に保たれていることと、既に実施されている貯湯槽の温度管理の徹底と年1回の洗浄の継続を伝えて調査を終了した。

1.3. Q 入浴施設の調査

Q 施設の調査結果を表1に示した。①洗浄前、②洗浄中、③中和後、④すすぎ2回目後および⑤翌日のATP量は、それぞれ457RLU、1066RLU、1071RLU、51RLUおよび2RLU、FCMによる細菌数は1292cells/mL、44,337cells/mL、4029cells/mL、60cells/mLおよび99cells/mLであった。①洗浄前、④すすぎ2回目後および⑤翌日のレジオネラ属菌数はそれぞれ<10CFU/100mL、40CFU/100mLおよび<10CFU/100mLで、レジオネラ遺伝子量はそれぞれ<1CFU-eU/100mL、13CFU-eU/100mLおよび<1CFU-eU/100mLであった。

処理前に培養検査や遺伝子検査で検出限界以下であったにもかかわらず、2回目のすすぎ後の検体からレジオネラ属菌およびレジオネラ属菌遺伝子が検出されたが、翌日の検水からは検出されなかった。一方で、ATP量と細菌数は洗浄中に急激に上昇し、すすぎにより減少していた。施設の意向で写真を掲載できなかったが、通常透明な浴槽水が洗浄中に茶褐色に着色し、中和時には黒色に変化してすすぎにより透明化した。衛生管理者によるとこの色の変化はこれまでの配管洗浄では認められなかった。メーカーによるとこれらの変化は生物膜に付着した鉄イオンが中和により析出したもので、生物膜と思われる有機物が剥離・洗浄されたと考えられた。これらのことから、すすぎ水に含まれていたレジオネラ属菌は剥離された生物膜が影響していたのではないかと思われた。

今回の調査で、洗浄処理前の浴槽水からは

レジオネラ属菌もその遺伝子も検出されなかった（表1）。洗浄処理後のすすぎ水から検出されたものの、その量は僅かで洗浄剤による生物膜除去後に認められた。排水口の上蓋は汚染時の木製から鉄製に交換されており、定期的な洗浄・消毒も実施されていた¹²⁾。これらのことから、すすぎ2回目後のレジオネラ属菌は上蓋汚染の再発と考えるよりは、ろ材か配管内生物膜深層に定着したレジオネラ属菌が洗浄剤により顕在化したと考える方が適切かもしれない。

1.3.2. 調査に基づく対応

調査の結果を施設に伝えたのち、施設の衛生管理の中で排水口上蓋表面の月1回程度の定期的な監視と洗浄・消毒に加えて年3回の配管洗浄を継続することとなった。

今回の事例では特に衛生管理の強化に繋がることはなかったが、衛生管理者に対して、循環系統の潜在リスクの存在と生物膜対策の必要性認識を高めるには大いに役立った。昨年度¹²⁾よりも衛生状態が改善していたことは明らかであったものの、定着したレジオネラ属菌排除の難しさが感じられた事例であった。

1.4. R 入浴施設の調査

R 施設の調査結果を表2に示した。①洗浄前、②洗浄中、③中和後、④すすぎ2回目後および⑤翌日のATP量は、それぞれ0RLU、1RLU、10RLU、23RLUおよび5RLU、FCMによる細菌数は233cells/mL、197,740cells/mL、2633cells/mL、913cells/mLおよび433cells/mLであった。④すすぎ2回目後および⑤翌日のレジオネラ属菌数はそれぞれ<10CFU/100mLおよび<10CFU/100mLで、レジオネラ遺伝子量はそれぞれ14CFU-eU/100mLおよび<1CFU-eU/100mLであった。

各工程からはATPはほとんど検出されなかった（表2）。色の変化は洗浄前無色、洗浄中に褐色に変化して、中和で黒色化、2回のすすぎで元に戻った。洗浄時には浴槽水の褐色化

が進行し、中和時には多量の泥状物が出現して ATP 法の結果と矛盾する現象が認められた（図 3 A,B-a）が、すすぎ 2 回目後の浴槽水は無色・透明（井水の色）にもどった。施設側の強い要望により中和時に出現した泥状物の探索を行った。洗浄中の浴槽水からは、FCM により大量の細菌が検出され（表 2, 図 3 A-b）、共焦点レーザー顕微鏡でも多量の核酸と糖が観察された（図 3 A-c）。これらのことから、泥状物は配管系統から剥離された生物膜に由来すると考えられた。

ATP 法は細菌汚染を推察する有用な方法であるが、温泉への応用では時に反応阻害を生じるとされている³⁾。今回調査した浴槽水は井水を利用していたが、ATP 量測定の明らかな阻害が観察された。前項に示した Q 施設も井水であったが ATP 法は細菌汚染の状況を反映できており、R 施設とは全く異なる結果であった（表 1）。目視結果は FCM 法や顕微鏡観察により証明されたため、施設の衛生管理者とよく対話したところ、ろ材の中に温泉由来の鉱石を含んでいることが明らかとなった。ATP 法の阻害は本成分によるものと考えられたが、原石が入手できず確認できていない。しかし、ATP 法の結果が目視の状況と矛盾していたことは明らかで、現地測定での活用を目指す場合は、事前に反応阻害がないことを確認する必要があると考えられた。

1.4.2. 調査に基づく対応

本施設では、もともと消毒装置の故障から循環式衛生管理の停止を検討していたが、今回の調査結果を伝えたところ、施設側が循環式浴槽における生物膜対策の重要性とその難しさを再認識し、衛生管理方法を再考することが了承された。また、調査終了後に自主検査を実施してレジオネラ属菌が不検出であったとの報告を受けた。また、後日、施設側が自ら毎日完全換水方式への切替を決断、切り替えたと聞いている。

2.1. モノクロラミン消毒の適用事例

図 4-1 にモノクロラミン製造装置と本消毒を適用した循環系統の概要図を示した。

図 4-2 に 4 つの循環系統における浴槽水中残留塩素濃度の推移を示した。各月のサンプル数は概ね 120～135 であった。

ジェット浴では設置直後の令和 5 年 10 月と、追加系統増設後の令和 6 年 8 月に若干の値のばらつきが認められたものの一貫して概ね 3.5～4.5 mg/L を維持しており調査期間を通して安定して推移していた（図 4-2）。歩行浴と冷水浴はほとんど値のばらつきが認められず推移した。薬湯は、容量が小さいことから、他の浴槽と比べて値のばらつきが大きいようであった（図 4-2）。施設では薬剤費に関して、コスト的に満足いく状況とのコメントがあった。

表 3 にモノクロラミン消毒時の各種微生物指標の値をまとめた。ジェット浴、歩行浴、冷水浴及び薬湯の ATP 量は、それぞれ 548 ± 407 RLU、140 ± 68 RLU、121 ± 103 RLU および 177 ± 25 RLU であり、FCM による細菌数は 137,483 ± 156,338 cells/mL、2,783 ± 2,599 cells/mL、2,115 ± 1,867 cells/mL および 103,019 ± 59,173 cells/mL と、他に比べて高い値であった。しかしながら、全ての浴槽水でレジオネラ属菌は平板法とレジオラートとともに不検出であった。田栗ら¹⁴⁾は、次亜塩素酸ナトリウム消毒下では FCM 法（報告では RDM 法と記載）による細菌数がレジオネラの平板培養法結果のスクリーニング法として有用であると述べている。今回はモノクロラミン消毒を行ったが、次亜塩素酸ナトリウム消毒の場合と異なり、細菌数とレジオネラ属菌の関連は認められなかった。またレジオネラ属菌の遺伝子検査では、レジオネラ属菌全遺伝子がジェット浴で 80 ± 103 CFU-eU/100mL という値を示したもの歩行浴と冷水浴の値は検出限界値（1 CFU-eU/100mL）程度に過ぎず、これらは全てのレジオネラ属菌生菌遺伝子は不検出であり全て死菌と判定された。従属栄養細菌数は 3,177 ± 4,194 CFU/mL、230

± 296 CFU/mL、 $2,014 \pm 2,563$ CFU/mL および 537 ± 611 CFU/mL を示したことから、ATP と FCM の値は従属栄養細菌に由来すると考えられた。従属栄養細菌対策として月に 1 回程度 10 mg/L × 3 時間程度の高濃度モノクロラミン洗浄を行うようにした。

D. まとめ

レジオネラ汚染の制御を目的に、FCM 法などの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するための調査を実施した。今回調査した施設のうち 2 施設は掛け流し式、残り 2 施設とモノクロミン消毒の導入施設は循環ろ過式入浴施設であった。

・高温の温泉利用の O 施設は、温度と比較した非培養検査法の結果から、施設管理者は独自の冷却装置と配管給湯の遠位客室の管理の必要性を認識できた。冬季と夏季の成績比較により、60°C という管理指標の有益性を施設管理者は認識できた。保温の難しい冬季は特に管理目標の遵守が重要である。

・高温の温泉利用の P 施設も、温度と非培養検査法の結果から、施設管理者は温泉の湧出個所と GP 施設をつなぐ長い配管のリスク管理の重要性を認識できた。施設管理者が貯湯槽の材質がコンクリート製であったことで保温性が高まり、レジオネラ属菌を含む微生物制御に役立つことを認識できた。

・Q 施設は、配管洗浄により、衛生管理の強化に繋がることはなかったが、培養法に非培養検査法を加えることで、衛生管理者に対して循環系統の潜在リスクの存在と生物膜対策の必要性認識を高めるには大いに役立った。生物膜由来と思われるレジオネラ属菌が認められ、施設管理者は循環系統の潜在リスクと生物膜対策の重要性を再認識できた。

・R 施設では、非培養検査法と顕微鏡検査により、配管洗浄の泥状成分が細菌を含む生物膜と確かめられた。施設管理者は循環式浴槽の生物膜対策の重要性とその難しさを認識し、

衛生管理の見直しに繋がった。

・モノクロラミン消毒の適用事例では、4 つの循環系統に利用拡大した後でも、モノクロラミン濃度は安定し、レジオネラ属菌の不検出を長期間に維持できた。非培養検査法を用いた評価により施設衛生管理者は従属栄養細菌対策の重要性を認識し、定期的な高濃度モノクロラミン消毒の導入に繋がった。

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.

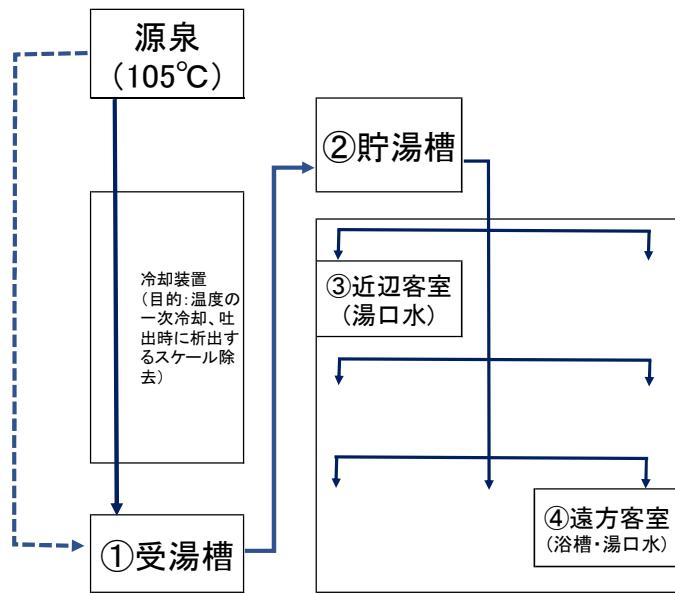
6. キッコーマンバイオケミファ, ルシパック A3 Water (液体測定用) 取扱説明書, <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/download/?id=11410>
7. 田栗利紹ら, フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した衛生管理の推進に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究」令和5年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 泉山信司, 102-115, 2023.
8. 田栗利紹ら, 携帯型フローサイトメーターによる環境水中レジオネラリスクの現地評価技術の標準化, 厚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, Cyleave PCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit 取扱説明書, 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.
12. 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5年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 泉山信司, 102-115, 2023.
13. 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」令和元年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 14-26, 2020.
14. 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30年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 33-34, 2018.

F. 研究発表

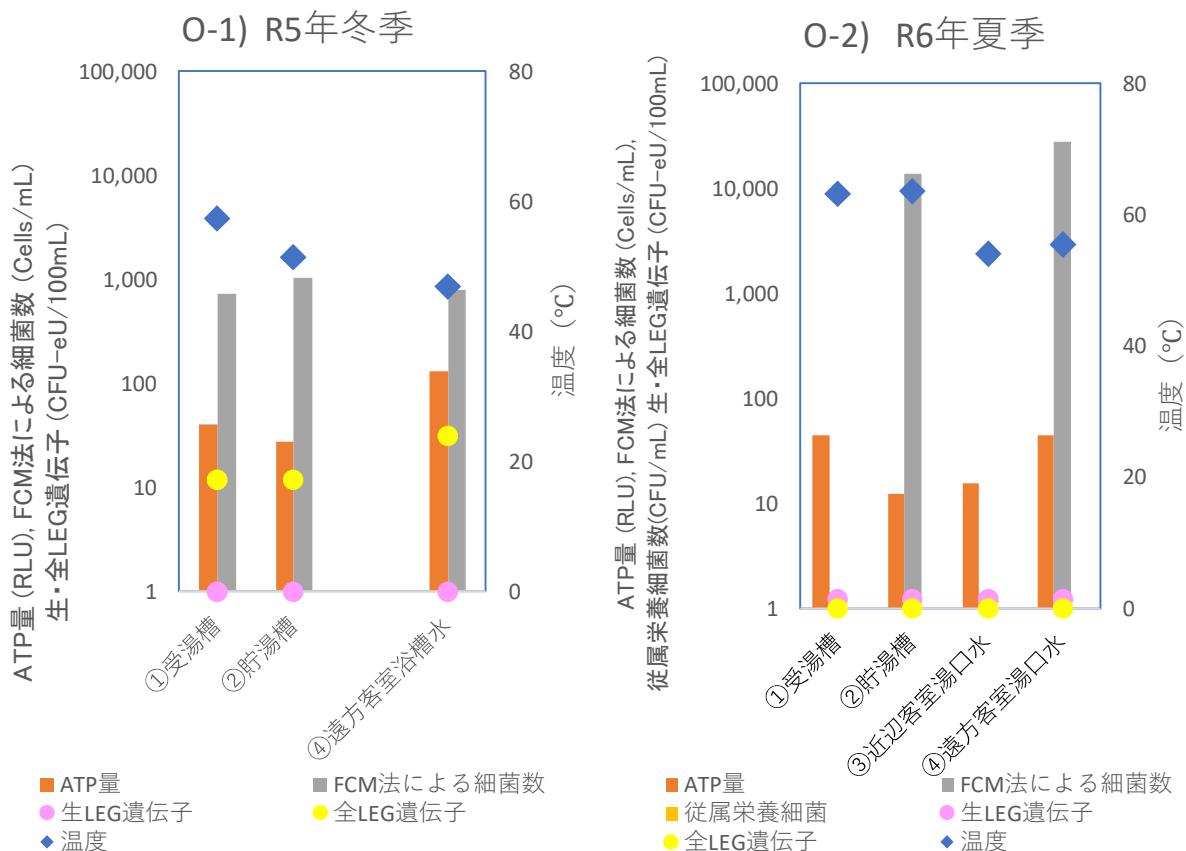
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



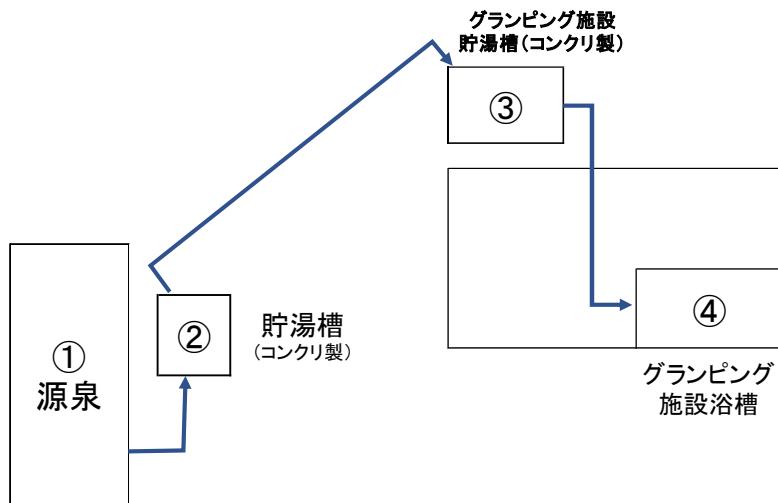
(a) O 施設の構造と採水地点



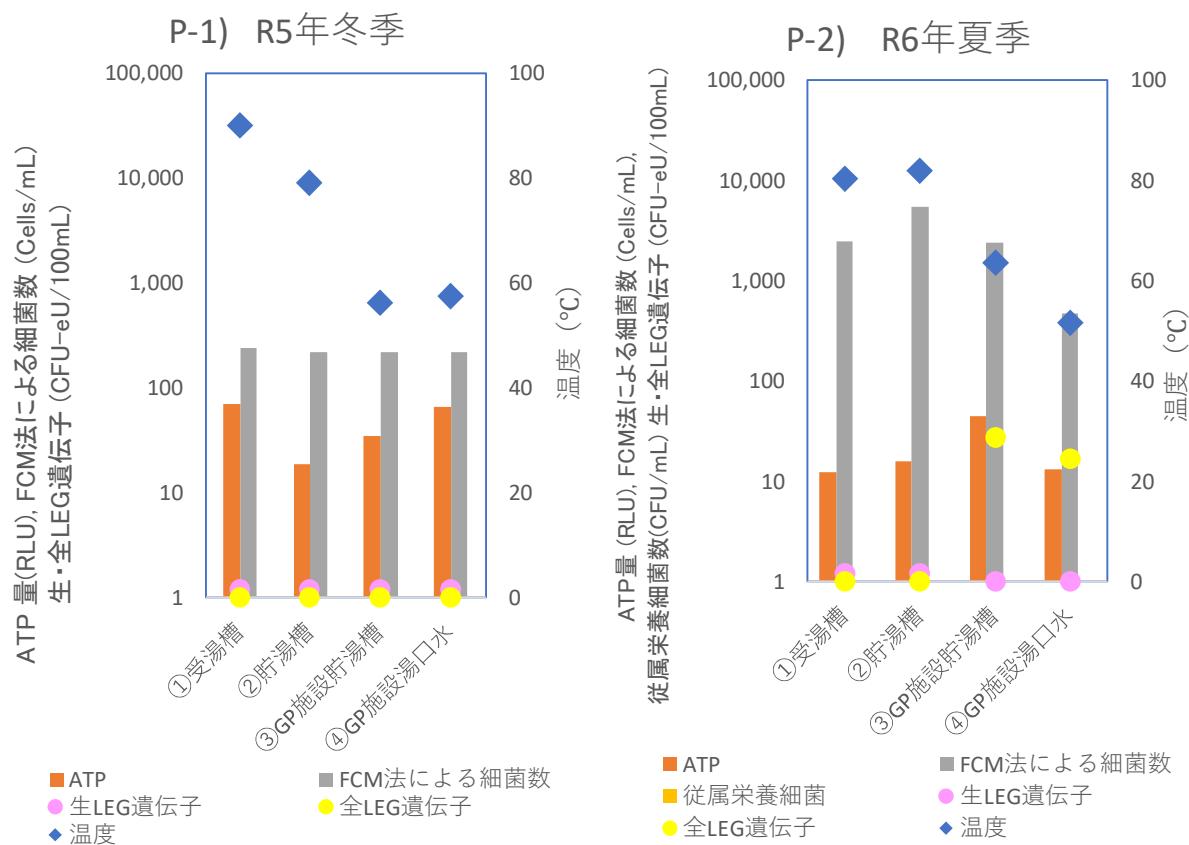
各種検査法の検出限界は ATP 法: 1 RLU, FCM 法による細菌数: 200 cells/mL (検出限界以下は非表記), 従属栄養細菌数 200 CFU/mL (検出限界以下は非表記), 遺伝子検査法: 1 CFU-eU/100mL.

(b) 冬季と夏季の各種指標の比較

図1. O 施設の調査結果



(a) P 施設の構造と採水地点



各種検査法の検出限界は ATP 法: 1RLU, FCM 法による細菌数: 200 cells/mL, 従属栄養細菌数 200 CFU/mL (検出限界以下は非表記), 遺伝子検査法: 1 CFU-eU/100mL.

(b) 冬季と夏季の各種指標の比較

図2. P 施設の調査結果

表1 省力化配管洗浄剤による洗浄工程ごとの各種指標の推移(Q施設)

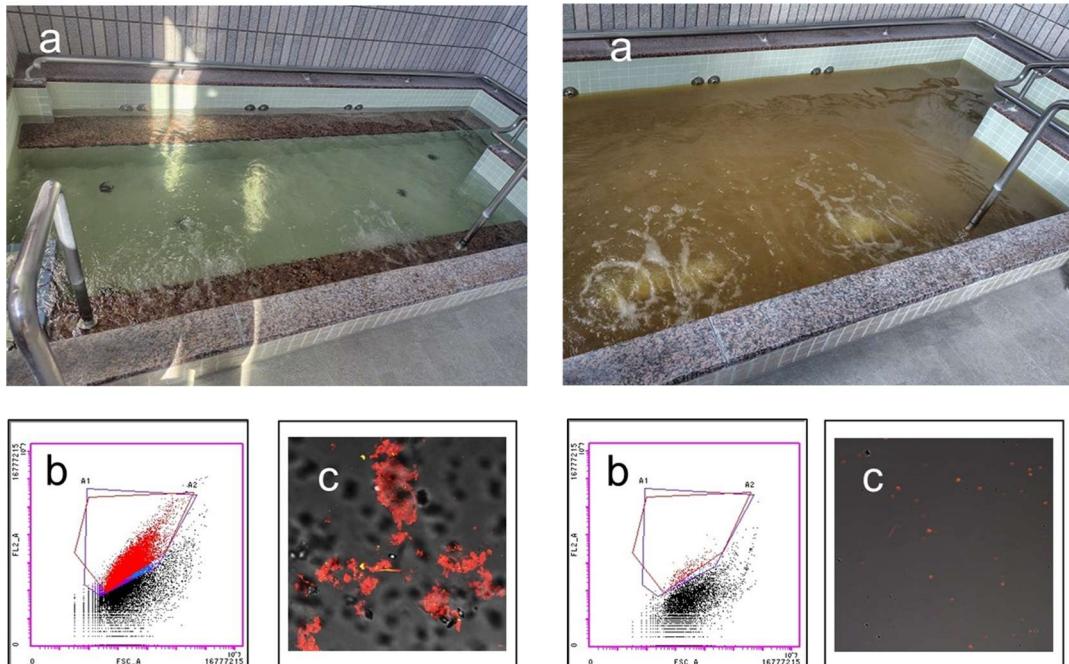
番号	作業工程	ATP (RLU ¹⁾)	Flow cytometry (cells/mL)	レジオネラ属菌 (CFU ²⁾ /100 mL)	レジオネラ遺伝子 (CFU-eU ³⁾ /100 mL)
①	洗浄前	457	1,292	<10	<1
②	洗浄中	1,066	44,337	NT	NT ⁴⁾
③	中和後	1,071	4,029	NT	NT
④	すすぎ2回目	51	<200	40	13
⑤	翌日	2	<200	<10	<1

¹⁾Relative Lights Unit, ²⁾Colony Forming Unit, ³⁾ CFU-equivalent Unit, ⁴⁾Not Tested, 各種検査法の検出限界は、ATP法:1 RLU, FCM法による細菌数: 200 cells/mL, レジオネラ属菌検査: 10 CFU/100mL, 遺伝子検査法: 1 CFU-eU/100mL.

表2 省力化配管洗浄剤による洗浄工程ごとの各種指標の推移(R施設)

番号	作業工程	ATP (RLU ¹⁾)	Flow cytometry (cells/mL)	レジオネラ属菌 (CFU ²⁾ /100 mL)	レジオネラ遺伝子 (CFU-eU ³⁾ /100 mL)	従属栄養細菌 (CFU/mL)
①	洗浄前	<1	233	NT	NT ⁴⁾	NT
②	洗浄中	1	197,740	NT	NT	NT
③	中和後	10	2,633	NT	NT	NT
④	すすぎ2回目	23	913	<10	14	230
⑤	翌日	5	433	<10	<1	<200

¹⁾Relative Lights Unit, ²⁾Colony Forming Unit, ³⁾ CFU-equivalent Unit, ⁴⁾Not Tested, 各種検査法の検出限界は、ATP法:1 RLU, FCM法による細菌数: 200 cells/mL, レジオネラ属菌検査: 10 CFU/100mL, 遺伝子検査法: 1 CFU-eU/100mL, 従属栄養細菌検査: 200 CFU/mL.



【A_洗浄処理中】

【B_中和処理中】

図3 省力化配管洗浄剤の洗浄工程の写真(R施設)

a: 目視写真、b: フローサイトメトリーのスキャッタグラム(赤は細菌)
c: 共焦点レーザー顕微鏡写真(赤は糖、緑は核酸、黄は両者の重なり部分)

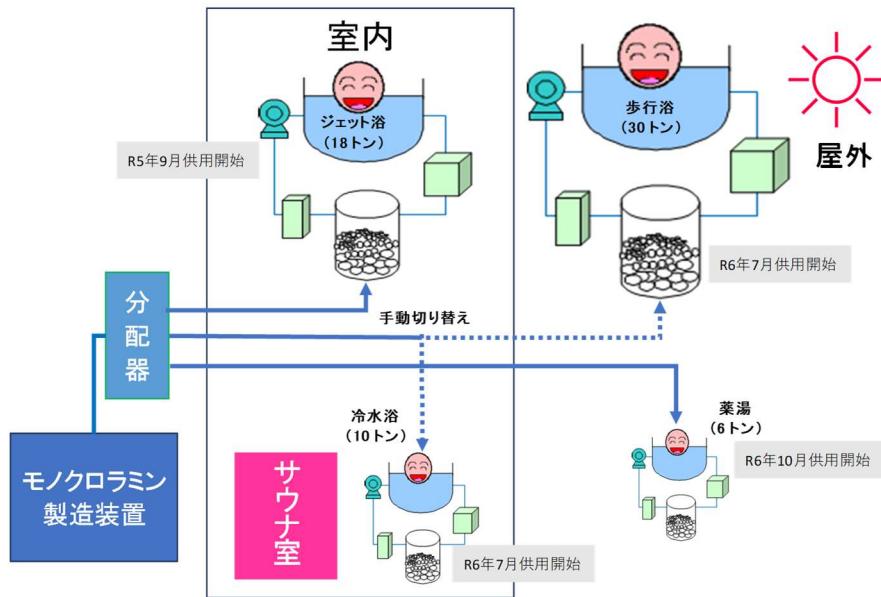


図4-1 モノクロラミン製造装置と循環系の模式図(Q施設)

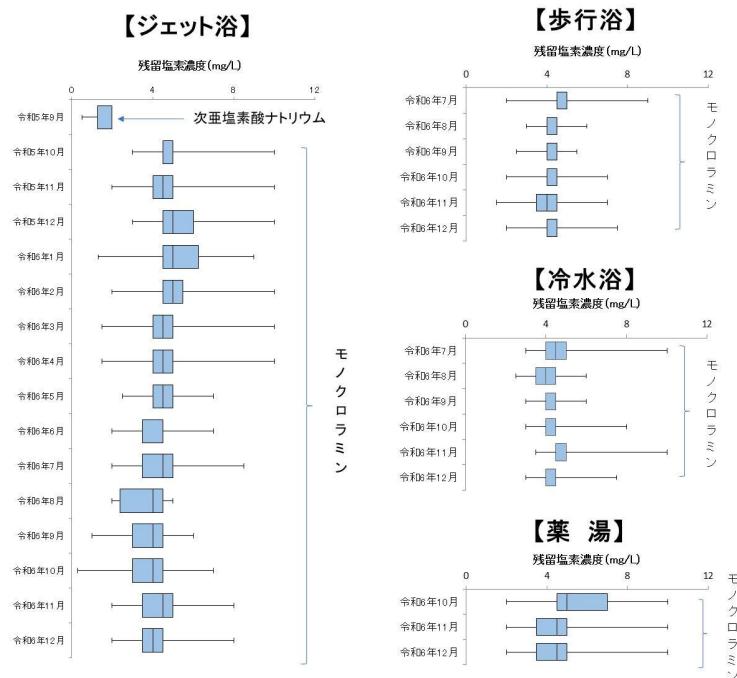


図4-2 モノクロラミン適用前後の浴槽水中の残留塩素濃度の推移(Q施設)
モノクロラミン濃度は毎日4~5回測定した値を各月で集計し比較した。各月のサンプル数は120~135。

表3 モノクロラミン消毒下の各種指標の比較(平均±標準偏差)(Q施設)

循環系統	N数	ATP量 (RLU ¹⁾)	Flow cytometry (cells/mL)	レジオネラ属菌		レジオネラ遺伝子		従属栄養細菌 (CFU/mL)
				平板培養法 (CFU ^{2)/100 mL)}	レジオラート (MPN ^{3)/100 mL)}	生菌 (CFU-eU ^{4)/100 mL)}	全遺伝子 (CFU-eU/100 mL)	
ジェット浴	11	548±407	137,483±156,338	<10	<10	<1	80±103	3,177±4,194
歩行浴	7	140±68	2,783±2,599	<10	<10	<1	11±8	230±296
冷水浴	7	121±103	2,115±1,867	<10	<10	<1	13±9	2,014±2,563
薬湯	3	177±25	103,019±59,173	<10	<10	NT ⁵⁾	NT	537±611

¹⁾Relative Lights Unit, ²⁾Colony Forming Unit, ³⁾Most Probable Number, ⁴⁾CFU-equivalent Unit, ⁵⁾Not Tested

各種検査法の検出限界はATP法: 1 RLU, FCM法による細菌数: 200 cells/mL, 平板培養法: 10 CFU/100mL, レジオラート: 10 MPN/100mL, 従属栄養細菌数 200 CFU/mL, 遺伝子検査法: 1 CFU-eU/100mL。