

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4～6年度 総合研究報告書

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の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て検討を進めた。これら非培養検査の利点を生かして、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7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。1つ目の循環式入浴施設では4系統の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汚染個所の改善につなげた。2つ目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。3つ目の入浴施設では、現地で測定したFCM法の陰性結果がレジオネラ属菌検査不検出と一致したことで日常的な消毒作業の有効性を衛生管理者に認識させ施設側の安心感につなげることができた。4つ目の入浴施設ではFCM法の結果により施設衛生管理者に現行の消毒効果を認識させることができた。5つ目の入浴施設ではFCM法と遺伝子検査結果に基づくシャワーのレジオネラ属菌汚染を衛生管理者に認識させることで設備管理の改善に繋

げることができた。6つ目と7つ目の高温温泉を利用する掛け流し式入浴施設の調査では、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、貯湯槽の高温保持と適切な洗浄並びに配管洗浄が重要であることが確認された。以上の他に、省力化配管洗浄剤の体験事例では、洗浄による汚濁物の可視化により、施設営業者は配管洗浄の重要性を認識できた。これらの事例のひとつでは、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4~6年度にはろ過器内の汚染除去に苦労していた施設でオゾン逆洗浄による長期有効性を評価した。調査開始から8か月間は外部汚染源の存在によりオゾンの有効性確認に時間を要したもののその原因を排除した後は約1年間にわたるレジオネラ属菌の除菌を実証した。令和5~6年度には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施設において、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。

さらに、高濃度塩素消毒における効果の判定にFCMの迅速検査法を応用したところ、FCM全菌数は、迅速に測定結果が得られること、現場に持ち込んでの測定が可能であること、そしてレジオネラ汚染量との相関が見られることから、浴槽水の衛生管理、特に高濃度塩素消毒の評価に活用できることが確認された。

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<sup>1)</sup>。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、多くの物に含まれている。食品製造や医療の現場では、ATPが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、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フローサイトメーターで測定することで、レジオネラリスク汚染の指標となりうることが示してきた<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、消毒等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を定量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組み合わせることにより、生きたレジオネラによる汚染を評価できる<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。ここでは対話方式で調査した現地調査 7 事例に加えて、一部の施設で改善方法として提供した省力化配管洗浄剤の事例を紹介する。

また、オゾン逆洗浄処理およびモノクロラミン消毒を適用した施設において迅速検査法を活用するとともに長期の有効性を確認したのでその事例を紹介する。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。さらに、高濃度塩素消毒の効果を迅速検査法の一つである FCM 法により迅速評価できないか検討したので合わせて報告する。

## B. 材料と方法

### 1. 調査で用いた検査法

#### 1.1. 遊離塩素濃度およびオゾン濃度の測定

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 法と中濃度用残留塩素測定器(柴田科学)を用いた。オゾン濃度はデジタル比色計(O3-3F, 笠原理化工業)により計測した。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 Surface/A3 Water(液体測定用), キッコーマンバイオケミファ)を用いた。ルシパック Surface の場合はキットの綿棒により 10 cm<sup>2</sup> 四方をふき取り、ルシパック A3 Water の場合はキットのスティックにより約 0.1 mL の検水を採取したのち、添付の取扱説明書<sup>6)</sup>に従って処理して、発生した発光量 (RLU: Relative Light Unit)として表記した。

#### 1.3. FCM 法

フローサイトメーターとして、RF-500 (Sysmex 社製) を使用した<sup>7)</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 (オキソイド、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 α 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>4)</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属菌に対して考案された方法である。

FCM 法による測定領域 (Gate) は次の通り設定した。即ち、*E. coli* および *L. pneumophila* の  $10^5$  CFU/mL 菌懸濁液に、10 mg/L を維持するように次亜塩素酸ナトリウムを定期的に加えて、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 法により測定して、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 2~3 回行い、平均値と標準偏差を求めた。

現地での測定等に用いる場合には、携帯型フローサイトメーター miniPOC (Sysmex-Partec 社製) を使用し、田栗らの方法<sup>4)</sup>に準拠して設定した測定領域 (Gate) を用いて浴槽水の細菌数を測定した。田栗らは miniPOC による浴槽水消毒効果の暫定基準値を 1000 cells/mL と設定していたが、今回の高濃度塩素消毒による効果を判定する調査では基準値として適用できなかった。よって、遺伝子検査および平板培養法検査結果と比較したのちに基準値を設定して、その基準値に基づいて消毒効果を判定した。

#### 1.4. レジオネラ属菌遺伝子検査法

qPCR 法は、Lysis Buffer for *Legionella* (タカラバイオ) で抽出するか<sup>5)</sup>、アルカリ熱抽出後の試料を NucleoSpin gDNA Clean-up kit (タカラバイオ) で精製し<sup>6)</sup>、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>9)</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 (CFU-equivalent unit: CFU-eU/100mL) と全遺伝子量 (CFU-eU /100mL) とした。LAMP 法は Loopamp® レジオネラ検出試薬キット E を用いて、付属の取扱説明書に従い試料を調製し、リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA (栄研化学) を用いて検出した。反応 60 min 以内に LAMP 特有の遺伝子増幅が認められた試料を LAMP 陽性と判定した。

必要に応じて、*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。

#### 1.5. レジオネラ属菌培養法

平板培養法によるレジオネラ属菌培養検査は森本らの方法<sup>10)</sup>、あるいは ISO 11731<sup>11)</sup>に準拠したろ過濃縮法により行った。培地は GVPC $\alpha$  培地 (ビオメリューまたは日研生物) 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潤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<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

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る場合は、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に混合して用いた。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。

### 1.8. 統計処理

統計解析にはスチューデントの *t* 検定を使用した。差は、有意水準 0.05 および 0.01 の両側検定で確保した。

## 2. 施設調査

表 1 に本研究で実施した迅速評価方法を活用した施設調査の概要を示した。対話方式により 7 施設の現地調査を行い、必要に応じて施設に配管洗浄剤の現地体験をしてもらった。オゾン逆洗浄処理やモノクロラミン消毒の長期にわたる有効性評価を行った。全国の入浴施設から回収した浴槽水を用いて、FCM 法による高濃度塩素消毒の効果判定など活用方法を提案した。

### 2.1. 対話方式による施設調査

#### 2.1.1. 施設調査の方法

図 1 に想定の施設調査の手順を示した。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 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 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。

#### 2.1.3. H 入浴施設の調査

##### 2.1.3.1. 施設の衛生管理状況

H 循環ろ過施設は、入浴者 700～千人規模で温泉(塩化物泉)利用の内湯と露天風呂、井水利用のジェット風呂と薬湯の 4 系統の浴槽が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。

#### 2.1.3.2. 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、温泉は内湯と露天風呂の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・逆洗水) = 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 を測定した。

#### 2.1.3.3. 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属菌を培養法で検査した。

#### 2.1.4. J 入浴施設の調査

J 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。事前に行政検査で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。事前の検査結果を図 5-A 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。

#### 2.1.4.1. 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-B 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-B 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-B 模式図)。

#### 2.1.4.2. 調査の概要

図 5-A 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-B a)、ろ過器内水(図 5-B b1)、ろ過器排水(図 5-B c)、湯口水(図 5-B e)および浴槽水(図 5-B f)を検査対象とした。CF(図 5-B d)を装着しない状態と、装着した状態について、非培養検査(ATP 量と FCM 数、遺伝子検査)と培養検査(平板培養法)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 法により消毒効果が確認されたために、調査対象から外した(図 5-A)。

#### 2.1.4.3. 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。

#### 2.1.5. K 入浴施設の調査

##### 2.1.5.1. 施設の衛生管理状況

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、昨年の洗浄時に目立った汚物は認められていない。

#### 2.1.5.2. 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  $1.9 \times 10^4 \text{ cells/mL}$  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 時間処理したものの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、レジオネラ属菌検査を実施した。

#### 2.1.6. M 入浴施設の調査

M 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。

##### 2.1.6.1. 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 17 t の大浴場、2 t のジェット浴および 10 t 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)を利用しておらず、原水は 10 t 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、30t 貯湯槽を経て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。

##### 2.1.6.2. 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 30 t 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。

##### 2.1.6.3. 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。

#### 2.1.7. N 入浴施設の調査

N 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。事前に行行政検査で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、汚染源調査を実施した。事前の検査結果を図 8 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。

##### 2.1.7.1. 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 0.4~1.0 mg/L に管理していた。全ての浴槽で毎日換水していた。

##### 2.1.7.2. 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いかったため、行政検査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、譲り受けたホース内部の調査をすることになった。

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量、FCM法による細菌数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作成し、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ので、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。

#### 2.1.7.3. 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。

#### 2.1.8. O入浴施設の調査

##### 2.1.8.1. 施設の衛生管理状況

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9-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、自主管理として実施してい

る貯湯槽と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。

##### 2.1.8.2. 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量、FCM、レジオネラ遺伝子検査の検体を採水した(図9-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。

##### 2.1.8.3. 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と重要管理点について説明した。施設側で対応を決定し、適切な措置が施された。

#### 2.1.9. P入浴施設の調査

P施設は、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。

地域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。

##### 2.1.9.1. 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10-a)。GP施設へは、約1km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。

##### 2.1.9.2. 調査の概要

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10-a）。

#### 2.1.9.3. 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と重要管理点について説明した。施設側で対応を決定し、適切な措置を施した。

### 2.2. 省力化配管洗浄剤の活用

#### 2.2.1. H入浴施設での体験事例

##### 2.2.1.1. ジェット浴の事例

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>14)</sup>（花王株式会社、R3年度厚労科研の成果品）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18m<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、1m<sup>3</sup>当たり3kg(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。

##### 2.2.1.2. 薬湯の事例

H施設の薬湯において、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<sup>4</sup>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。

ジェット浴と同様に、浴槽水と回収槽水(合計約6t)を省力化配管洗浄剤<sup>14)</sup>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1トンあたり

各2kgを浴槽水に投入して1時間反応させたのち、1kgの中和剤で15分処理した後すすぎ操作を2回実施した。洗浄前、洗浄中、中和後、すすぎ2回後に、現地でATP量を測定するとともに、FCM法による細菌数、レジオネラ属菌培養検査およびレジオネラ属菌遺伝子検査用の検体を採水した。作業翌日に浴槽水を採水した。

##### 2.2.1.3. 調査に基づく対応

調査結果に基づいて、衛生管理者に推測される汚染源について説明した。

#### 2.2.2. R施設での体験事例

R循環ろ過施設は、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<sup>14)</sup>を試みた。

##### 2.2.2.1. 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200L規模のろ過槽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、毎日計測して0.4~1.0mg/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、200L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。

##### 2.2.2.2. 調査の概要

女湯(2t)と男湯(1t)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。洗浄前、洗浄中、中和後、すすぎ2回後にフローサイトメトリー用に採水、ATPを測定した。レジオネラ検査用には、女湯の最終すすぎ処理後と翌日塩素消毒後の浴槽水を採水した。

##### 2.2.2.3. 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

る汚染源とレジオネラリスクについて説明した。施設側で対応を決定し、適切な措置を施したうえで、自主検査が行われた。

### 2.3. ろ過器のオゾン逆洗浄処理の活用

#### 2.3.1. 施設の衛生管理の状況と調査の推移

1日の入浴者数が千人規模の営業施設の協力を得て試験を実施した。今回、電解オゾン装置を設置したのは薬湯で、井水に入浴剤や生薬などを入れていた。そのろ過器の大きさは約100L、循環系統の水量は約3m<sup>3</sup>であった。試験前の消毒は、次亜塩素酸ナトリウムにより残留塩素濃度1.0～2.0mg/Lと高めに管理されていたが、回収槽の存在や薬湯の影響により、ろ過器内の強い汚染が懸念された。実際、過去のFCM法による調査で継続的に高い細菌数が確認されており、薬湯系統の回収槽水や逆洗浄水の消毒効果が十分でないと見られた<sup>7)</sup>。よって、当該系統には塩素より強い殺菌力が期待できるオゾンを適用して消毒を強化することとした。

ろ過器をオゾンで逆洗浄する処理の概要は、以下の通りである。まず、電気分解によりオゾンを発生させる装置を使用した<sup>13)</sup>。本報告では、機器を設置する1ヶ月前の2022年9月24日から、2024年9月29日の2年間に実施した結果を記載する。10月に装置を施設に設置し、11月8日からオゾン注入(流量10L/min、オゾン約1.2～1.8ppm、注入時間20分(200L))を開始した。月～土曜日の営業終了後、ろ過器の逆洗浄に、毎日このオゾン注入を実施した。毎週日曜日に高濃度塩素洗浄を行い、オゾン処理をしないため、採水はオゾンの効果が最も反映される、土曜日夜の逆洗浄時に行った。浴槽水は逆洗浄後に毎日換水されており、採水時は営業終了後の有機物等が最も蓄積した状態であった。

オゾン処理の開始後3ヶ月経過すると、排水からレジオネラが検出されて効果が認められにくくなった。そこでオゾンの消毒効果がより強く發揮されることを期待して、ろ過槽

内水を一旦排水した後からオゾン水を注入する方式に変更した(以降排水オゾン処理という)。排水オゾン処理は2023年2月17日以後、日曜日以外毎日行うようにした。

その後も微量のレジオネラが検出される傾向は変わらなかったために、オゾン開始後8ヶ月後(2023年6月22日)にろ材を交換した。それでもレジオネラが検出され、レジオネラ汚染源を究明して改善に至った経緯は後述2.3.2.のとおりである。即ち、オゾン開始から約10ヶ月後(2023年8月5日)にレジオネラ汚染源を発見し、当該部の消毒洗浄処理を開始し、2024年9月29日まで続けた。

逆洗浄水の採水は、調査全般にわたって月1～2回の頻度で逆洗浄水を採水したが、浴槽水の安全性を確認するために、2023年11月～2024年5月の間は逆洗浄水と同時に浴槽水を調査した。

詳細な採水の操作は、次のとおり実施した。即ち、逆洗浄前に予め検水の残留塩素濃度を測定し、ろ過器内水を排水した。オゾン発生装置を稼働させたら、半自動的に逆洗浄を開始して、逆洗中のオゾン濃度を測定した。20分間のオゾン処理後に、逆洗浄水を採水した。浴槽水を詳細に検査する場合、当日19:00の残留塩素濃度測定と同時に検水を採取した。採水した検水は冷蔵で実験室に運び入れ、非培養検査(ATP、FCM法と生菌遺伝子検査)と培養検査(レジオラートと平板培養法)を実施した。これらの検査は48時間以内に行なったが、レジオネラ全遺伝子の検査については検水の100倍濃縮物を冷凍保管しておき、概ね1か月以内に纏めて実施した。

#### 2.3.2. 外部汚染源究明の調査

##### 2.3.2.1. 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。前述2.3.1.のとおり、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。

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  $10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$  の区画を滅菌綿棒でふき取り、滅菌生理食塩水  $1\text{ mL}$  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。

### 2.3.2.2. 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. モノクロラミン消毒の適用事例

### 2.4.1. モノクロラミン消毒の導入

遊離塩素濃度の日変化が大きい循環系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、令和5年9月から18t規模の循環系に供用した。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。当該装置は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て、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。即ち、水道水  $36\text{ L/h}$ 、12%次亜塩素酸Na  $0.36\text{ L/h}$ 、15(w/w)%塩化アンモニウム  $0.36\text{ L/h}$  で設定し、生成したモノクロラミン濃度は約  $1300\text{ mg/L}$  であった。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。

### 2.4.2. モノクロラミン消毒の適用拡大

前述の通り、当該装置は令和5年9月から18t規模の循環系に供用して安定的なモノクロラミン濃度を保てており、実施した全ての検査でレジオネラ属菌は検出されなかった。加えて、臭気を感じない上に、濃度管理に要する労力の軽減効果が著しい結果だった。

このような結果を受けて、同じ井水を利用する他の循環系へ、令和6年7月から新たに分配装置を増設した。これにより、既存の消毒装置に制御装置と分配配管を増設して3つの系統を同時に制御した。対象とする循環系は、設置済のジェット浴18t、野外にある歩行浴25tおよびサウナと併設する冷水浴8tである。消毒装置から分配された配管をこれらの循環系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。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  $4.0\sim4.5\text{ mg/L}$  を目標値として調整した。

さらに令和6年10月からは同じ井水を用いる6t規模の薬湯系でも追加の増設工事をした。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換えで対応するようにした。

以上のとおり、10月の増設後は井水系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量、FCM、従属栄養細菌数、レジオネラ培養検査および遺伝子検査を実施した。

## 2.5. 高濃度塩素消毒の効果の迅速評価方法

### 2.5.1. 採水方法

浴槽水は生物膜対策として用いられる高濃度塩素消毒後の検水を使用した。現地では 10 mg/L×2 時間の消毒後の採水を推奨しているが基本的に施設衛生管理者に作業を任せているため採水時の消毒状態は必ずしも一定ではない。各施設では、高濃度塩素消毒後に中和して換水し、残留塩素濃度を測定したのちにチオ硫酸ナトリウム入り滅菌ポリ容器に採水して、冷蔵状態で検査施設に持ち込み、搬入後 24 時間以内に検査に供した。

#### 2.5.2. FCM 法と遺伝子検査結果の比較

2023 年 1 月から 2024 年 2 月にかけて 54 検体、2024 年 10 月から 11 月にかけて 95 検体、合計 149 検体の高濃度塩素洗浄後の浴槽水試料を全国各地の温浴施設等から収集した。54 検体については FCM による全菌数測定と遺伝子検査 (qPCR と EMA-qPCR) の定量結果および平板培養法によるレジオネラ検査結果を比較した。

#### 2.5.3. 高濃度塩素消毒の効果の判定

95 検体については、田栗らの FCM によるレジオネラリスク評価方法を基に遺伝子検査 (qPCR または LAMP) の定性結果とレジオネラ生菌数を比較して高濃度塩素消毒の効果を評価した。

#### 2.5.4. 現地における応用

2ヶ所の温浴施設 (A、B) において現地での FCM 測定を実施した。施設 A (2024 年 6 月 20 日実施) は天然温泉で茶褐色の濁質を含んでおり、日頃より遊離塩素処理されている。定期的にレジオネラ検査を実施しており、過去に源泉タンクからレジオネラが平板培養法で検出されたことがある。施設 B (2024 年 8 月 2 日実施) は井水の沸かし湯で濁質等は特に見られず、日頃より遊離塩素処理されている。定期的にレジオネラ検査を実施しており、レジオネラが検出された記録は見られない。

### C. 結果および考察

#### 1. 迅速検査の事前検討結果

#### 1.1. FCM による細菌数の平板培養法との比較試験

大腸菌とレジオネラの標準菌株を用いて、今回、新たに適用したフローサイトメーター (RF-500) の測定精度を確認した。FCM 法による細菌数と平板培養法による細菌数の結果とを比較した結果、高い相関が認められた (図 2 a, b)。FCM 法と平板培養法の双方で測定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。平板培養法の生菌数に比べて、若干、FCM 法による細菌数の方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

RF-500 を用いた消毒効果の判定で用いる測定領域は次の通り設定した。*E. coli* と *L. pneumophila* の  $10^5$  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. 施設調査結果

#### 2.1. 対話による現地調査結果

##### 2.1.1. H 入浴施設の調査結果

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とし、後述 2.3.1 のとおり、ろ過器の才

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 2.2.1. のとおり、泉山ら<sup>14)</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。

### 2.1.2. J 入浴施設の調査結果

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（図 5-A）。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（図 5-A）。

ATP 量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 と比較的高い値が検出されたが、原水からは 6 RLU と低値であった。井水由来の検体は、原水を含めて 2～19 RLU 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（図 5-A）。

施設事業者との対話後に実施した各種測定結果を図 5-C 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 5-C ①）。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 5-C ②）。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、概ねレジオネラ生菌数と同様の傾向であった（図 5-C ①②）。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、CF 装着後に 9～341 RLU 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らしいこと、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-B 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、好気性の土壤細菌であるレジオネラ属菌が<sup>15)</sup>、温泉原水から高濃度に検出される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

泉系統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。

### 2.1.3. K 入浴施設の調査結果

図 6 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  $1.34 \times 10^4 \text{ cells/mL}$  と  $48 \text{ cells/mL}$  であった。水風呂の浴槽水と逆洗浄水はどちらも  $0 \text{ cells/mL}$  であり、薬湯の浴槽水と逆洗浄水はどちらも  $95 \text{ cells/mL}$  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  $2.0 \text{ mg/L}$  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、対話において衛生管理者はレジオネラ判定結果に対して敏感であった。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。

### 2.1.4. M 入浴施設の調査結果

M 入浴施設では、各系統から採水した浴用水を FCM 全菌数と残留塩素濃度で比較した（図 7）。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。ジェット浴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 次貯湯槽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、貯湯槽からの補給水は大浴場女湯湯口からのみ供給される構造であった。その後、男湯と女湯の浴槽水は循環系に流入して合流し一つのろ過器を通してろ過・消毒されて再度各浴槽に循環される。また、過去にレジオネラ汚染が認められたのは 2 次貯湯槽であり、今回の調査で細菌増殖を認めたことから本施設の重要な管理点は原水の消毒にあることを施設事業者に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みると原水こそ  $2.0 \text{ mg/L}$  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った。そのため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。

#### 2.1.5. N 入浴施設の調査結果

図 8 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 FCM 全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 FCM 全菌数は低かったが、*Legionella pneumophila* SG4 が 175 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培養法でもレジオラート法でも検出されず、従属栄養細菌も不検出であった。FCM による細菌数はそれほど高い数値ではなかったが、ATP 量は  $627 \pm 32$  RLU と高い値を示し、遺伝子検査法でも生菌遺伝子は検出されなかつたが全遺伝子が  $446 \pm 131$  CFU-eU/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 8)。滅菌綿棒でこの BF を拭ったものを 1 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培養法で検出されなかつたがその遺伝子量は 26,226 CFU-eU/100 cm<sup>2</sup> と高い値を示した(図 8)。

当該施設は井水を使用する系統の貯湯槽で 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。しかしながら水道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液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つた。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つ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。

#### 2.1.6. O 入浴施設の調査結果

図 9 (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 41 RLU、28 RLU、132 RLU、FCM による細菌数は 733 cells/mL、1047 cells/mL および 807 cells/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遺伝子量(全遺伝子)は、それぞれ 12 CFU-eU/100mL、12 CFU-eU /100mL および 32 CFU-eU /100mL であったが、生菌遺伝子はすべて不検出 (<1 CFU-eU/100 mL) であり全て死菌由来の遺伝子と判定された(図 9 (b) O-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 44 RLU、12 RLU、16 RLU お

より 44 RLU であった。FCM による細菌数は <200 cells/mL、13,827 cells/mL、<200 cells/mL および 27,760 cells/mL であったが、従属栄養細菌数は全て検出限界以下(<200 CFU/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以下(<1 CFU-eU/100 mL)を示した（図 9 O-2）。

O 施設で、貯湯槽温度が 60°C に達しなかつた冬季では受湯槽と遠方客室浴槽水からレジオネラ遺伝子（死菌由来）が検出されたが、60°C を超えた夏季では受湯槽、近辺客室湯口水および遠方客室湯口水で不検出となった。夏季に貯湯槽や遠方客室湯口水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った。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。

以上のことから、O 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

および遠方浴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 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。

#### 2.1.7. P 入浴施設の調査結果

図 10 (b) に P 施設の測定結果を示した。冬季の源泉、貯湯槽、グランピング（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もに検出限界以下(<1 CFU-eU/100 mL)を示した（図 10 (b) P-1）。夏季の調査では、O 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 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以下(<1 CFU-eU/100 mL)を示した（図 10(b) P-2）。

貯湯槽は冬季でも 79.1°C 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った 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。

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。

## 2.2. 省力化配管洗浄剤の活用結果

### 2.2.1. H 入浴施設での体験事例結果

#### 2.2.1.1. ジェット浴の事例

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>14)</sup>。表 2 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つたが、ろ過器逆洗水からは平板培養法で検出され、ろ過器の汚れが心配された（表 2）。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。浴槽水の平板培養法で 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、平板培養法は不検出となった。

レジオネラ属菌の遺伝子検査では、処理前のサンプルからは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、レジオネラ属菌の遺伝子が検出されており、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 法による細菌数の推移をみると、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。中和中に減少し、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浄水ともに細菌が認められなかつた。

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つた。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動的な配管洗浄を実施したばかりであつた。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つたとのことである。

#### 2.2.1.2. 薬湯の事例

薬湯の洗浄結果を表 3 に示した。洗浄の処理前、洗浄中、中和中、すすぎ 2 回目後および翌朝の ATP 量は、それぞれ 457 RLU、1066

RLU、1071 RLU、51 RLU および 2 RLU、FCM 全菌数は 1292 cells/mL、44,337 cells/mL、4029 cells/mL、60 cells/mL および 99 cells/mL であった。処理前、すすぎ 2 回目後および翌朝のレジオネラ属菌数はそれぞれ <10 CFU/100mL、40 CFU/100mL および <10 CFU/100mL で、レジオネラ属菌遺伝子量はそれぞれ <10 CFU-eU/100mL、13 CFU-eU/100mL および <10 CFU-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、翌朝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つたが、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つた。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つた（表 3）。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。これらのことから、すすぎ水中のレジオネラ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。

以上のことから、排水口上蓋表面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つた。

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つたが、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つた。処理前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。

## 2.2.2. R 施設での体験事例結果

R 施設の調査結果を図 11-A に示した。洗浄の処理前、洗浄中、中和中、すすぎ 2 回目後および翌朝の ATP は、それぞれ 0 RLU、1 RLU、10 RLU、23 RLU および 5 RLU、FCM 全菌数は 233 cells/mL、197,740 cells/mL、2633 cells/mL、913 cells/mL および 433 cells/mL であった。すすぎ 2 回目後および翌朝のレジオネラ属菌数はそれぞれ <10 CFU/100mL および <10 CFU/100mL で、レジオネラ遺伝子量はそれぞれ 14 CFU-eU/100mL および <10 CFU-eU/100mL であった。

各工程からは ATP はほとんど検出されなかつた（図 11-A）。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つた。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た（図 11-B,①-a）が、すすぎ（2 回）後の浴槽水は無色・透明（井水の色）にもどつた。洗浄中の浴槽水からは、FCM により大量の細菌が検出され（図 11-A, 図 11 ①-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 11 ①-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 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<sup>3)</sup>。今回調査した浴槽水は井水を利用していたが、ATP の明らかな阻害が観察された。前項に示した H 施設も井水であったが ATP 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 2）。目視結果は FCM 全菌数や顕微鏡観察によ

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 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 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。

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、今回の調査で、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たことにより、毎日完全換水方式への切替えを決断したと聞いている。

### 2.3. オゾン逆洗浄処理の評価

#### 2.3.1. 薬湯循環系統への適用結果

電気分解式のオゾン生成装置（ヤマト）を、入浴施設の薬湯循環系統（ $3\text{ m}^3$  規模）に適用した。装置設置前を含む、約 2 年間、月 1~2 回の頻度で薬湯の逆洗浄水を採水して、各種試験を実施した。

電解オゾン水注入後 1 ヶ月間のレジオネラは、処理前と比べて抑制される傾向を示したが、2 ヶ月ほどたつと効きづらくなかった（図 12）。

ろ過器内を排水した後に電解オゾン水を供給する方式でオゾン処理を強化したところ、一定の抑制は認められたが、低濃度とは言え散発的にレジオネラ属菌の生菌が検出され、一過性に高い濃度のレジオネラ属菌遺伝子が検出された。その後も、微量とはいえ逆洗浄水から、レジオネラの検出が続いた。ろ過器のろ材は長期に使用して交換されていなかったことから、2023 年 6 月にろ材を交換してみた。廃ろ材を検体としてレジオネラ属菌の検査をしたところ、この時の廃ろ材からはレジオネラ属菌の生菌も遺伝子も全く検出されず、ろ材がレジオネラ属菌の汚染源であるとは考えにくかった。

そこで少々時間を要したが、レジオネラ属菌が検出される原因となる汚染源を探した。当該循環系統は、浴槽から溢出した浴槽水が排水口から回収槽に取り込まれ、その後はろ過器を介して循環系に還流される仕組みとなっていた。回収槽は定期的に洗浄・消毒されていた。排水口の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った。これら人工芝と踏み板表面から大量のレジオネラ属菌とレジオネラ属菌遺伝子が検出され、ついにこの場所がレジオネラ属菌の汚染源と特定された。2023 年 8 月 5 日以降は定期的な消毒洗浄を行い、踏み板を金属製のものに交換もして、レジオネラの検出は収まった。

レジオネラ属菌汚染源発見前の 5 か月間と発見後の 1 年 2 ヶ月間について、各種測定値を比較した（表 4）。このとき、レジオネラ属菌の培養検査や遺伝子検査で検出限界以下のものは全て 1.0 として計算した。ATP、FCM による細菌数はあまり変化が認められなかつた。細菌数が高かつたために検査を追加した従属栄養細菌数でも倍半分以上の差にはならなかつた。

レジオネラ属菌の平板培養法では、電解オゾン水供給前の  $7.50 \pm 10.35\text{ CFU}/100\text{mL}$  から、電解オゾン水供給後に  $10.50 \pm 12.12\text{ CFU}/100\text{mL}$  と少し上昇し、排水オゾン処理を始めると  $5.00 \pm 5.77\text{ CFU}/100\text{mL}$  と減少したが、レジオネラ属菌汚染源の改善後は不検出となつた。レジオラートも類似の傾向を示した。レジオネラ属菌遺伝子検査の生菌遺伝子も、汚染源を発見後に減少した。レジオネラ属菌全遺伝子も類似の傾向を示して、汚染の発見後に減少した。

なお、採水時の遊離塩素濃度と、電解オゾン水濃度は、レジオネラ汚染源の発見前後で大きな変動はなかつた。強いて、遊離塩素濃度は減少しているが、レジオネラ属菌の汚染が解消して強い消毒の必要がなくなったことが理由と考えられた。

なお、2023年11月～2024年5月の間に検査した浴槽水からは、レジオネラ属菌の培養検査(平板培養法とレジオラート)と遺伝子検査(レジオネラ属菌生菌遺伝子および全遺伝子)において、逆洗浄水と同様に培養検査では何も検出されず、遺伝子検査でもほとんど検出されなかった(生菌遺伝子: 1.51 ± 1.08 CFU-eU/100mL, 全遺伝子: 3.19 ± 2.85 CFU-eU/100mL, N=16)。

以上のように、オゾン供給の有無や排水オゾン処理による若干の変動は認められたものの、すべての指標で大きな差は認められなかった。レジオネラ汚染源の改善前と改善後の平均値を比較すると、ATP量、FCM法による細菌数、従属栄養細菌数およびレジオネラ属菌の全遺伝子では差が認められなかったが、レジオネラ属菌の培養検査(平板培養法とレジオラート)、レジオネラ属菌の生菌遺伝子および残留塩素濃度で差が認められた(両側t検定、SPSS ver.25.0)。

レジオネラ属菌汚染源の問題が解消後は、レジオネラ属菌の検出がほとんどなく、この状況は約1年間継続することができた。細菌汚染は持続しているにもかかわらず、レジオネラ属菌を抑制できていることになり、これはろ過器を対策できていることが背景にあると考えられた(図12)。排水オゾン処理中にはろ材を交換したが、その時に検査した使用済ろ材からはレジオネラ属菌の生菌および遺伝子は検出されなかった。電解オゾン水のろ過器逆洗浄による清浄化作用はこれまでの報告<sup>13)</sup>でも認められており、オゾンの消毒効果は期待通りに得られていたと考えられた。一方で、電解オゾン水供給後も微量のレジオネラ汚染が続いたのは、ろ過器とは別の汚染源が理由であり、ろ過器の外にあった汚染源に電解オゾン水が通用しなかったのは当然であった。

過去の電解オゾン水逆洗浄処理では、ATP量、一般細菌数およびFCMによる細菌数が減少していた<sup>13,16)</sup>。しかしながら、今回はほと

んど変化が認められなかつた(表4)。施設衛生管理者によると、レジオネラ汚染源であつた排水溝上蓋のATP量は、改善後の8月5日以降もゼロになることはなく、時に10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> RLUを示したこと(データ不掲載)。すなわち、逆洗浄水から検出された細菌は、排除しきれない生物膜由来と考えられた。浴場にとって生物膜の生成は避けられず、常時の消毒と定期的な洗浄が重要であることはまちがいない。今回の調査により、衛生管理者には設備の監視と洗浄消毒を継続して行うことの必要性を理解してもらうことができた。

このような細菌数の高さから生物膜再発が懸念されたが、ろ過器の逆洗浄水からレジオネラ属菌は検出されず、電解オゾン水消毒は機能していたと考えられた(図12)。なお、レジオネラ属菌汚染源改善前の、2023年11月～2024年5月の浴槽水からもレジオネラ属菌の生菌は検出されず、遊離塩素消毒の効果もあつたと考えられた。

### 2.3.2. 外部汚染源の調査結果

図13に前項で記述した外部汚染源の調査の概要を示した。調査時の浴槽水のATP量とFCMによる細菌数は低く、従属栄養細菌も検出されず、レジオネラ属菌、レジオネラ属菌の生菌遺伝子と全遺伝子は全て不検出であった。排水口踏み板と芝生表面のそれぞれ3か所をふき取った値の平均土標準偏差は、ATP量がそれぞれ201,687±134,214 RLUと46,550±64,057 RLU、レジオネラ属菌の全遺伝子も2,500±1,619 CFU-eU/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±11,251 CFU/100 cm<sup>2</sup>、芝生表面が3,667±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量は29 RLU、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 CFU-eU/100 mL、全遺伝子が392 CFU-eU/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属菌汚染が明らかとなつたため、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芝生の定期洗浄・消毒を追加することとなつた。本系統では、これまでろ材を対象とする電解オゾン水による消毒を実施してきたが、浴槽水からレジオネラ属菌は検出されないので逆洗浄水から原因不明のレジオネラ属菌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、レジオネラ属菌は逆洗浄水からも検出されなくなった。

## 2.4. モノクロラミン消毒の適用事例

### 2.4.1. モノクロラミン消毒の導入

図 14-A 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 14-B 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。

令和 5 年 10 月以来、最初にモノクロラミン消毒を導入したジェット浴では、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。

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。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 を超えて下ることではなく、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。

### 2.4.2. モノクロラミン消毒の適用拡大

令和 6 年 10 月、ジェット浴以外に追加系統を増設以降のモノクロラミン消毒について記載する。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 月に若干の変動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 14-B）。歩行浴と冷水浴はほとんど変動がなく推移した。薬湯は、容量が小さいことから、他と比べて変動が大きいようであった（図 14-B）。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。

図 14-C 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 は、それぞれ 548 ± 407 RLU、140 ± 68 RLU、121 ± 103 RLU および 177 ± 25 RLU であり、FCM 全菌数は 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り、次亜塩素酸ナトリウム消毒の場合と異なり、FCM による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、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との歩行浴と冷水浴の値は平板培養法の検出限界値（10 CFU-eU/100mL）

と同等程度に過ぎず、生菌遺伝子はジェット浴、歩行浴および冷水浴で  $10 \text{ CFU-eU}/100\text{mL}$  未満であり、全て死菌と判定された。従属栄養細菌数は  $3,177 \pm 4,194 \text{ CFU/mL}$ 、 $230 \pm 296 \text{ CFU/mL}$ 、 $2,014 \pm 2,563 \text{ CFU/mL}$  および  $537 \pm 611 \text{ CFU/mL}$  を示したことから、ATP と FCM 全菌数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  $10 \text{ mg/L} \times 3$  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。

## 2.5. 高濃度塩素消毒の効果の迅速評価方法

### 2.5.1. FCM 法と遺伝子検査結果の比較

54 検体の浴槽水の測定結果について、FCM (miniPOC) による細菌数測定値と qPCR (または EMA-qPCR) のレジオネラ属菌遺伝子量の関係を平板培養法の結果 (生菌検出／生菌日検出) とともに図 15 に示した。FCM (miniPOC) による細菌数が多いほどレジオネラ属菌の遺伝子量が多く、平板培養法によるレジオネラ属菌の生菌検出も増加する傾向が見られた。qPCR と EMA-qPCR の大きな違いは認められず、EMA 処理の効果は限定的であった。

54 検体のうち 34 検体については FCM(RF-500) による細菌数測定も実施し、同様にレジオネラ属菌遺伝子量と比較したが、RF-500 も miniPOC と同様で、細菌数が多いほど遺伝子量も多かった (図 16)。

### 2.5.2. 高濃度塩素消毒の効果の判定

図 17 に、FCM による細菌数と残留塩素濃度を比較したうえにレジオネラ属菌遺伝子とレジオネラ属菌の検出結果をプロットしたグラフを示した。しかしながら、消毒効果判定の基準値を  $1000 \text{ cells/mL}$  とすると消毒効果ありと判定してもレジオネラ平板培養法で生菌が検出されているケースが散発した。そこで改めてレジオネラ遺伝子及びレジオネラ属菌の生菌と比較して解析すると  $630 (=2.8\log) \text{ cells/mL}$  という値が得られた (図 17)。得られた基準値によりレジオネラ平板培養結果を比

較したところ、消毒効果を認めた検体は 42 検体であったが、消毒効果が認められなかつた 53 検体のうちレジオネラが検出された検体は 15 検体にすぎなかつた (表 5)。このときの FCM によるレジオネラリスク評価は感度 100%、特異度 53% で、有効率 60% であった。

田栗ら<sup>17)</sup>は miniPOC によるレジオネラリスク判定法の判定閾値を  $1000 \text{ cells/mL}$  とした。これはレジオネラニューモフィラ標準液の検出限界値に基づくものであった。一方で、田栗らは、別の報告<sup>18)</sup>で FCM 法の消毒効果は塩素消毒における塩素要求量と関係し、塩素要求量を超えて消毒を行うことにより清浄化ステージに達することを述べている。

今回、田栗ら<sup>17)</sup>と同じフローサイトメーターを使用したが、その基準値は判定閾値として適切ではなく、レジオネラの消毒効果を判定するにはより低い基準値 ( $630 \text{ cells/mL}$ ) が必要であった (図 17、表 5)。これは、消毒という観点から高濃度塩素消毒により細菌破壊が亢進した可能性と、測定の観点からは細菌の検出感度が一定でなかった可能性が考えられる。いずれにせよ、FCM 法により高濃度塩素洗浄後の消毒効果を判定するためには、予めレジオネラ属菌や大腸菌などの標準懸濁液を準備して、消毒条件に基づく基準値と標準試料の検出限界を決定するなど、評価の妥当性を確認する必要があると考えられた。高濃度塩素消毒の効果を判定する場合には通常の塩素管理の状態と区別する必要がある。

表 6 に 95 検体の浴槽水の測定結果から FCM による細菌数の分布に応じて遺伝子検査陽性、平板培養法陽性の試料数を抽出して示した。この結果からも FCM の測定値が高くなるほどレジオネラ属菌の陽性率が上がっており、特に FCM の測定値が  $10,000 \text{ cells/mL}$  を超えた全ての試料について遺伝子検査、平板培養法ともにレジオネラ属菌陽性であった。一方、 $100 \sim 999 \text{ cells/mL}$  と  $1000 \sim 9999 \text{ cells/mL}$  のレジオネラ属菌遺伝子の陽性率はそれぞれ 38% と 65%、レジオネラ属菌生菌の

陽性率はそれぞれ 9% と 30% にすぎなかった。これは高濃度塩素消毒処理が影響しており、FCM によるレジオネラリスク評価の特異度が低いことにつながっていると考えられた（表 5、表 6）。なお、FCM 法は標的が細菌全体でレジオネラ属菌を特異的に検出しているわけではなく、あくまでレジオネラリスクの迅速判定法であり、平板培養法の代替法としての利用を想定していない。塩素濃度が低く FCM の測定値が高い場合はレジオネラ属菌の生菌検出のリスクが高くなることは間違いないなさそうである。

### 2.5.3. 現地への応用

以上の結果を踏まえて、現場施設における現場測定を 2 施設において実施した（表 7、8）。施設 A では FCM による細菌数の測定値が総じて高く、大半の検体が閾値 630 CFU/mL を超えていた。すなわち高濃度塩素消毒の効果が不十分と判定された。判定は別の検査でも裏付けられて、実験室持ち帰りの 8 試料中 7 試料からレジオネラ属菌遺伝子を検出し、消毒が不十分と考えられた。この施設 A は過去に源泉タンクからレジオネラ属菌の生菌が検出されており、濁質が多いことも相まって系内にバイオフィルムが残存している可能性が示唆された。なお、天然温泉に由来の茶褐色の濁質が理由で、ノイズが生じて、FCM による細菌数の測定値が高い傾向となることに注意を要した。

施設 B は FCM による細菌数の測定値が低く、閾値を超えることがなく、PCR、平板培養法でもレジオネラ不検出であった。すなわち高濃度塩素消毒の効果は十分に発揮されていたことが裏付けられた。レジオネラ検出の経験がなく、日頃から衛生管理が徹底されており、洗浄消毒の効果が得られやすいと考えられた。例数は少ないが、高濃度塩素消毒の効果判定に、FCM による細菌数を現場で実施することができた。

## 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、対話方式で調査した施設のうち 4 施設は循環ろ過式、残り 3 施設と掛け流し式であった。省力化配管洗浄剤は循環ろ過式に適用した。オゾン逆洗浄およびモノクロミン消毒の導入施設、並びに高濃度塩素消毒の効力評価で調査した施設は全て循環ろ過式入浴施設であった。

・O 入浴施設は、高温の温泉利用から、温度と非培養検査法の対応から、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。保温の難しい冬季の管理目標ができた。

・P 入浴施設も高温の温泉利用から、温度と非培養検査法の対応から、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を認識できた。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、レジオネラを含む微生物制御に役立つことが想像された。

・Q 入浴施設は、配管洗浄により、生物膜由来と思われるレジオネラが認められ、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 入浴施設では、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。

・薬湯の循環ろ過器に電解オゾン水逆洗浄を行った。当初、レジオネラ属菌検出がわずかに続いたが、それはろ過器の問題ではなく、排水溝にレジオネラ汚染源を発見した。汚染源の対策により、その後はレジオネラ属菌不検出の状態を長期に維持できた。ろ過器内部のろ材が清浄化されて、電解オゾン水逆洗浄の消毒効果が確認できた。

・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。

・高濃度塩素消毒の効果判定にFCMを活用した。FCMによる細菌数が多いほどレジオネラ属菌遺伝子量が多く、平板培養法によるレジオネラ生菌も検出される傾向となった。高濃度塩素消毒後はFCMによる細菌数の判定閾値は低くなった。FCMによる細菌数は、迅速に測定結果が得られること、現場に持ち込んでの測定が可能であること、そしてレジオネラ汚染との相関が見られることから、浴槽水の衛生管理や高濃度塩素による消毒効果の評価に提案したい。

## 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/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. Inoue, H., et al., Phylogenetic characterization of viable but-not-yet cultured *Legionella* groups grown in amoebic cocultures: a case study using various cooling tower water samples. *Biocontrol Sci.*, 24, 39-45, 2019.
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. International Organization for Standardization. Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*. ISO 11731:

2017.

12. 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.
13. 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 年度総括研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 33-51, 2021.
14. 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.
15. 石井嘗次, アメーバの生態とレジオネラ感染症, 生活衛生 47, 320-327, 2003.
16. 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, 52-59, 2021.
17. 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 29 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 前川純子, 87-93, 2017.

18. 田栗 利紹ら, フローサイトメトリー法における不連続点を超えた塩素消毒の清浄化判定, 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 23 年度総括・分担研究報告書, 研究代表者: 倉 文明, 53-56, 2011.

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 迅速検査法を利用した現地調査の概要

番号	実施年月	対象施設の衛生管理方式と浴槽水の種類	供試した迅速検査法等	調査内容	分類	参考文献
1	R4.8	循環ろ過式・温泉・井水	FCM <sup>1)</sup> 、ATP <sup>2)</sup> 、培養(自主検査)	4系統のスクリーニング調査	対話方式	R4総括分担報告書
2	R4.11	掛け流し式・温泉	FCM、qPCR、ATP、培養(自主検査)	【行政検査】に伴う原因究明調査	対話方式	R4総括分担報告書
3	R5.7	循環ろ過式・水道水・サウナ利用	FCM、携帯型FCM、qPCR、ATP、培養	携帯型FCMによる現地測定	対話方式	R5総括分担報告書
4	R5.7	循環ろ過式・温泉・含ヨウ素原水	FCM、培養(自主検査)	レジオネラ汚染経験を持つ施設の調査	対話方式	R5総括分担報告書
5	R5.8	循環ろ過式・井水	FCM、qPCR、ATP、培養(自主検査)	【行政検査】に伴う原因究明調査	対話方式	R5総括分担報告書
6	R5.12	掛け流し式・高温泉	FCM、qPCR、ATP(自主検査)	冬季・夏季の調査、原水を竹製装置で冷却	対話方式	R6総括分担報告書
7	R5.12	掛け流し式・高温泉	FCM、qPCR、ATP(自主検査)	冬季・夏季の調査、1 km離れたグランピング施設への送湯	対話方式	R6総括分担報告書
8	R4～R5	循環ろ過式・井水・ジェット浴、薬湯	FCM、qPCR <sup>3)</sup> 、ATP、培養	省力化配管洗浄剤の洗浄効果判定	洗浄体験	R4,5総括分担報告書
9	R6.8	循環ろ過式・井水利用・溶解性鉱石	FCM、qPCR、ATP、培養	省力化配管洗浄剤の洗浄効果判定	洗浄体験	R6総括分担報告書
10	R4.8～R6.9	循環ろ過式・井水	FCM、qPCR、ATP、培養	オゾン逆洗浄処理の評価、長期有効性の評価	長期調査	R6総括分担報告書
11	R5.7	循環ろ過式・井水・薬湯利用	FCM、qPCR、ATP、培養	系統外汚染源の調査	原因究明	R5総括分担報告書
12	R5.10～R6.12	循環ろ過式・井水、内湯～屋外4系統の一括管理	FCM、qPCR、ATP、培養	モノクロラミン消毒の適用、長期有効性評価	長期調査	R6総括分担報告書
13	R4～R5	全国の循環ろ過式	携帯型FCM、qPCR、培養	高濃度塩素消毒、遺伝子検査法との比較	検査法比較	R6総括分担報告書
14	R6.10～11	全国の循環ろ過式	携帯型FCM、qPCR/LAMP、培養	高濃度塩素消毒の効果判定	消毒効果	R6総括分担報告書
15	R6.11	循環ろ過式	携帯型FCM、qPCR、培養	現地での高濃度塩素消毒の効果判定	現地調査	R6総括分担報告書

<sup>1)</sup>flow cytometry, <sup>2)</sup>adenosine tri-phosphate, <sup>3)</sup>quantitative polymerase chain reaction

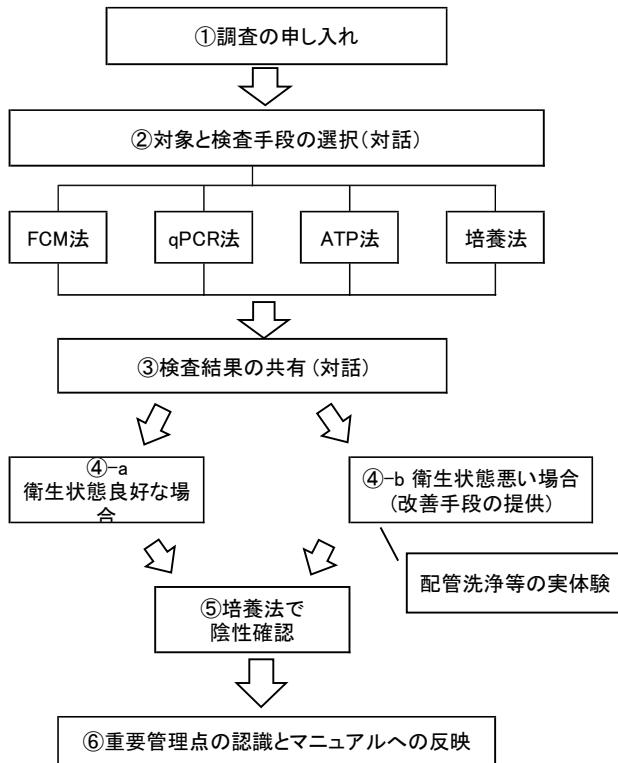


図1 対話方式で実施した調査フロー

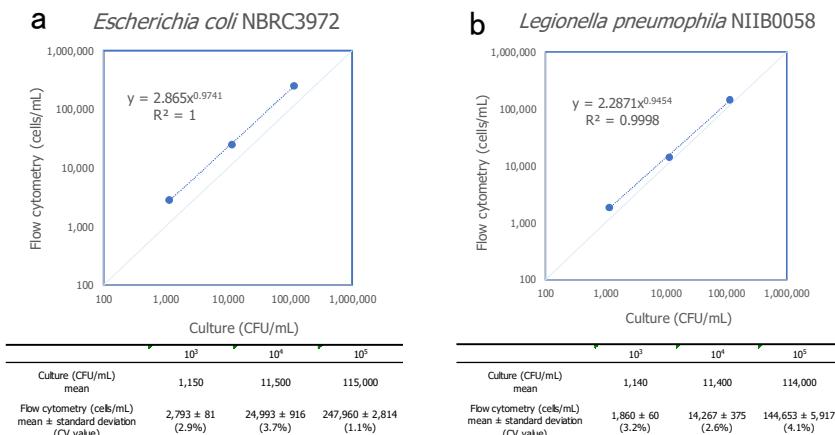


図2 標準株における培養法とFCM法の定量値の比較 (下の表は測定値の再掲)

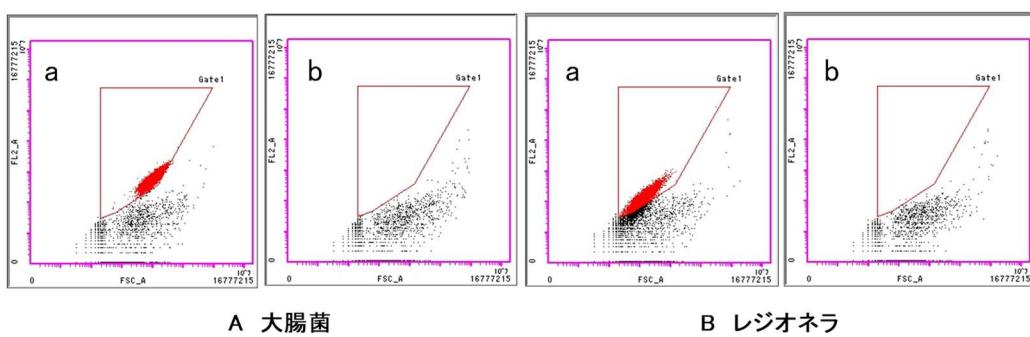
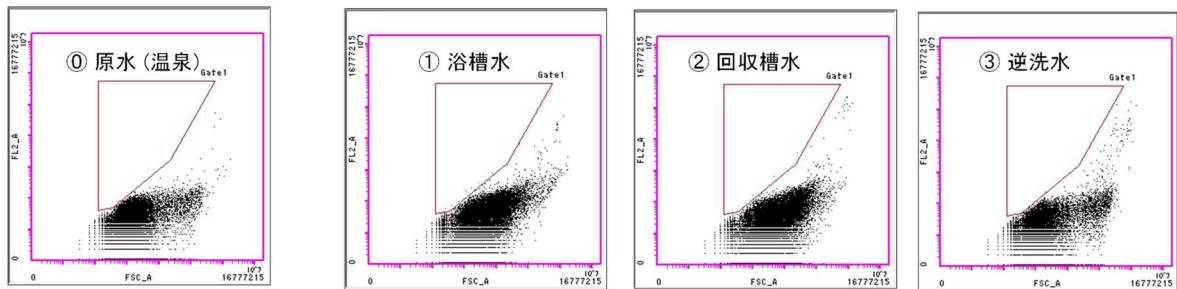
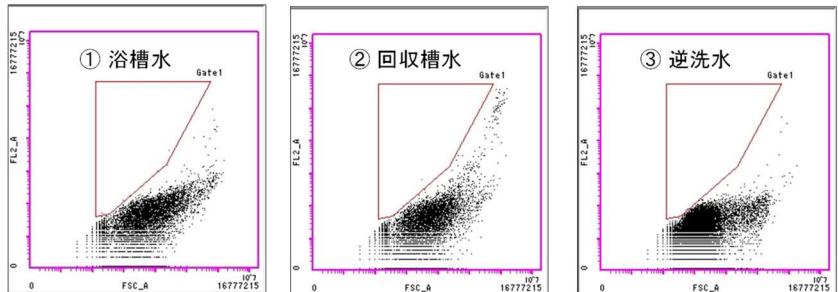


図3 FCM法による消毒効果判定のための特異領域の設定

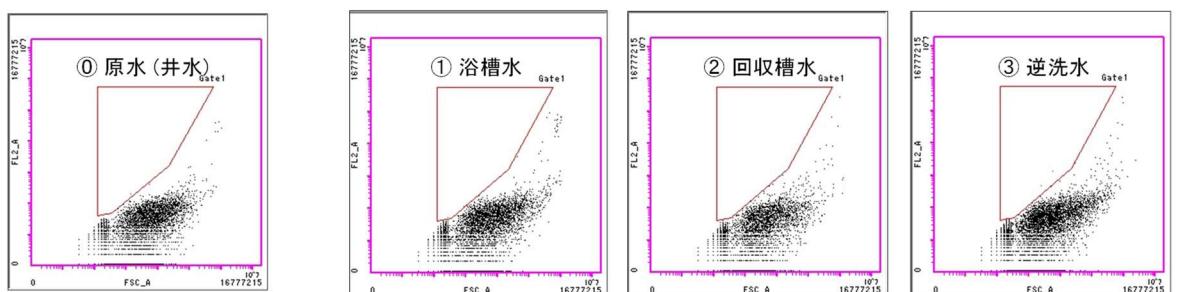
大腸菌(A)とレジオネラ(B)の $10^5$  CFU/mL懸濁液(a)を遊離塩素消毒処理(10 mg/L・3 hr)により処理・中和後に設定した特異領域(b)を示す。散布図の縦軸は蛍光強度、横軸は前方散乱光強度を示す。



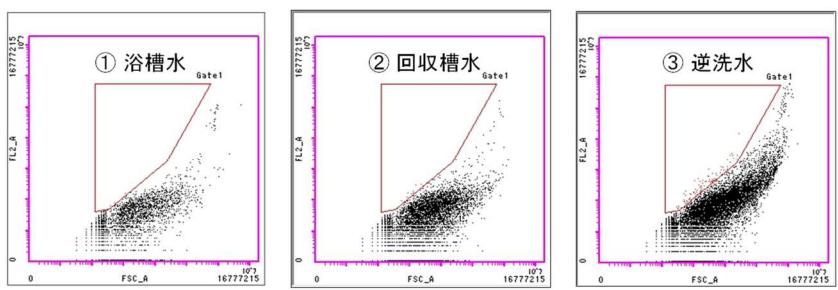
A 内湯循環系統 (温泉)



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)

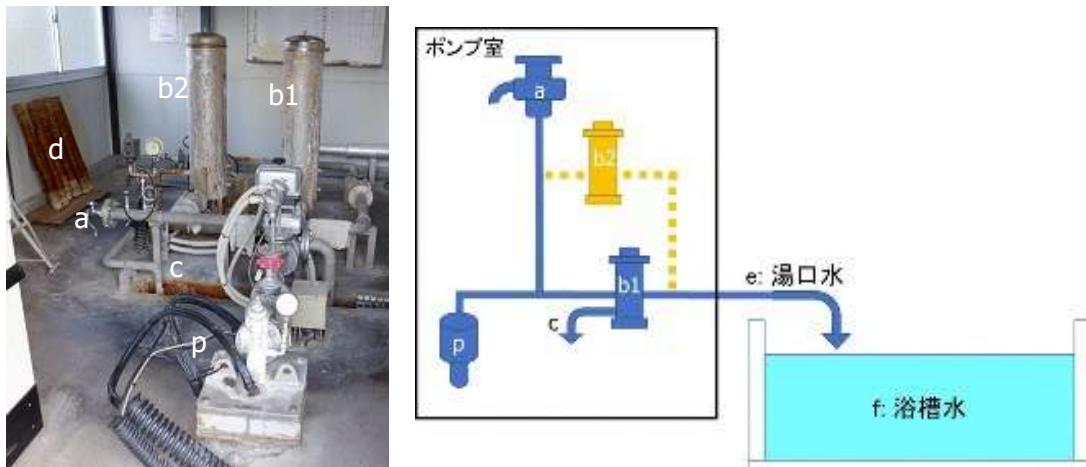
図4 H入浴施設の各種循環系統におけるFCM法の散布図の比較

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。

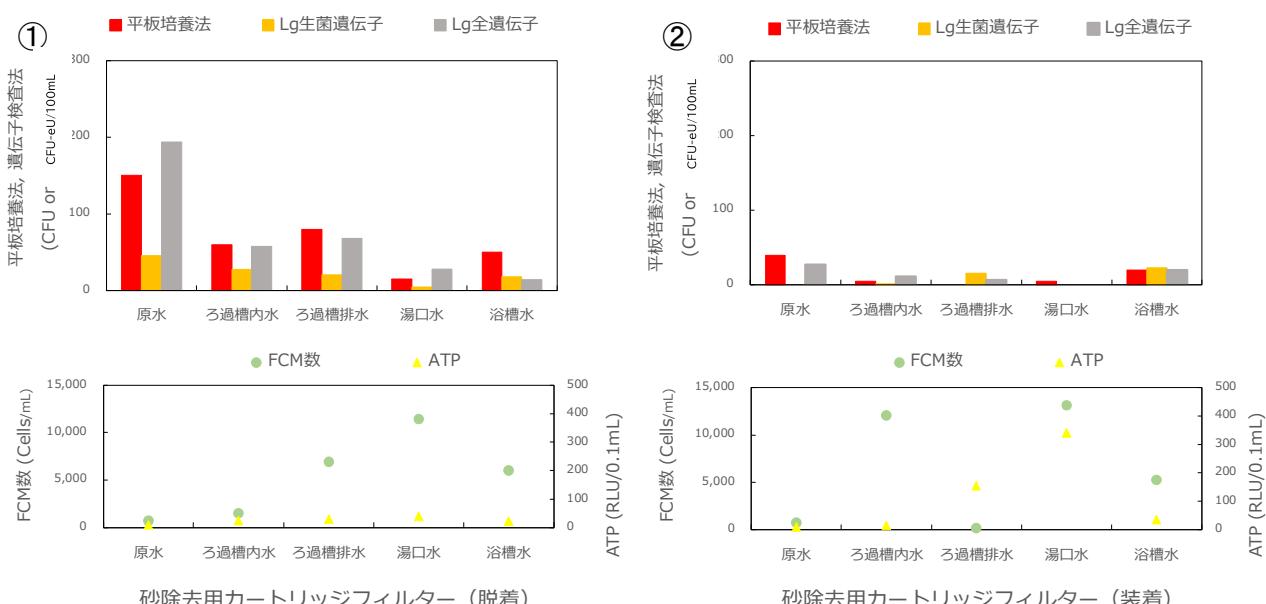
### A 調査前に実施したJ入浴施設のレジオネラ属菌等検査結果

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



### B 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）（J 施設）

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



砂除去用カートリッジフィルター（脱着）

砂除去用カートリッジフィルター（装着）

C 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

### 図5 J入浴施設の調査まとめ

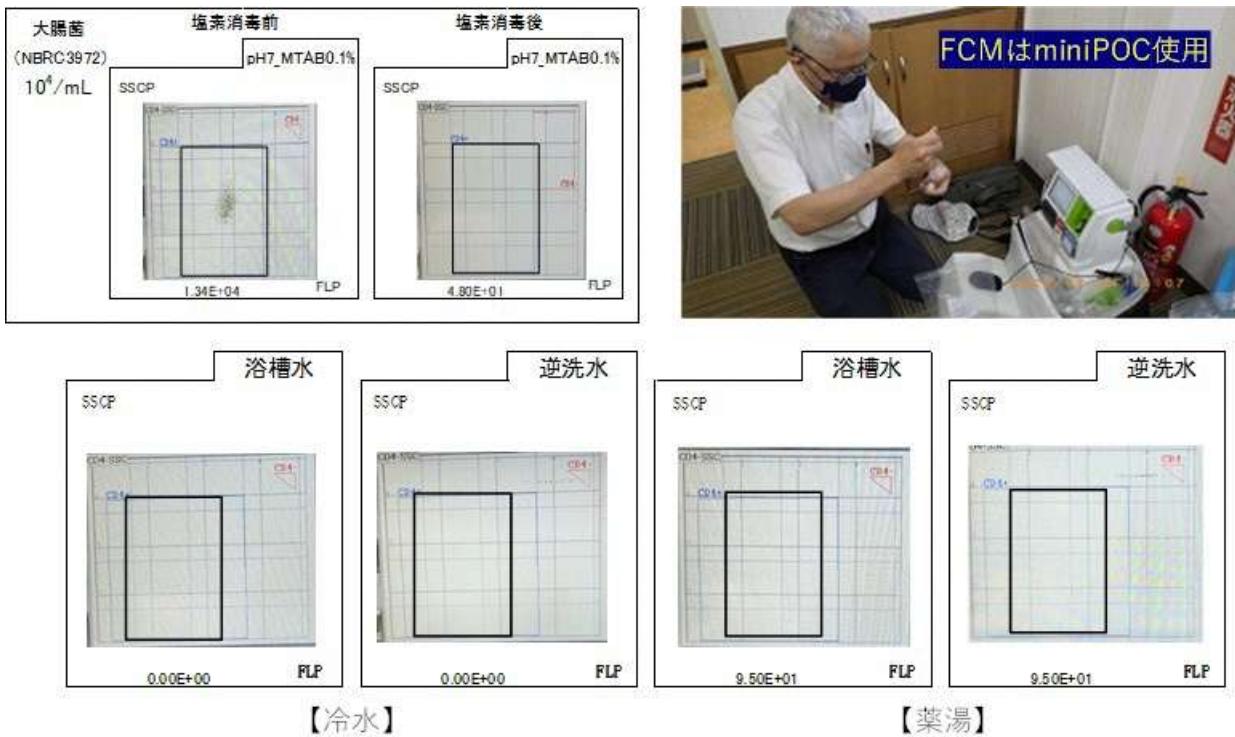


図6 K施設の調査まとめ

フローサイトメーターによるスキャッタグラムの比較。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。

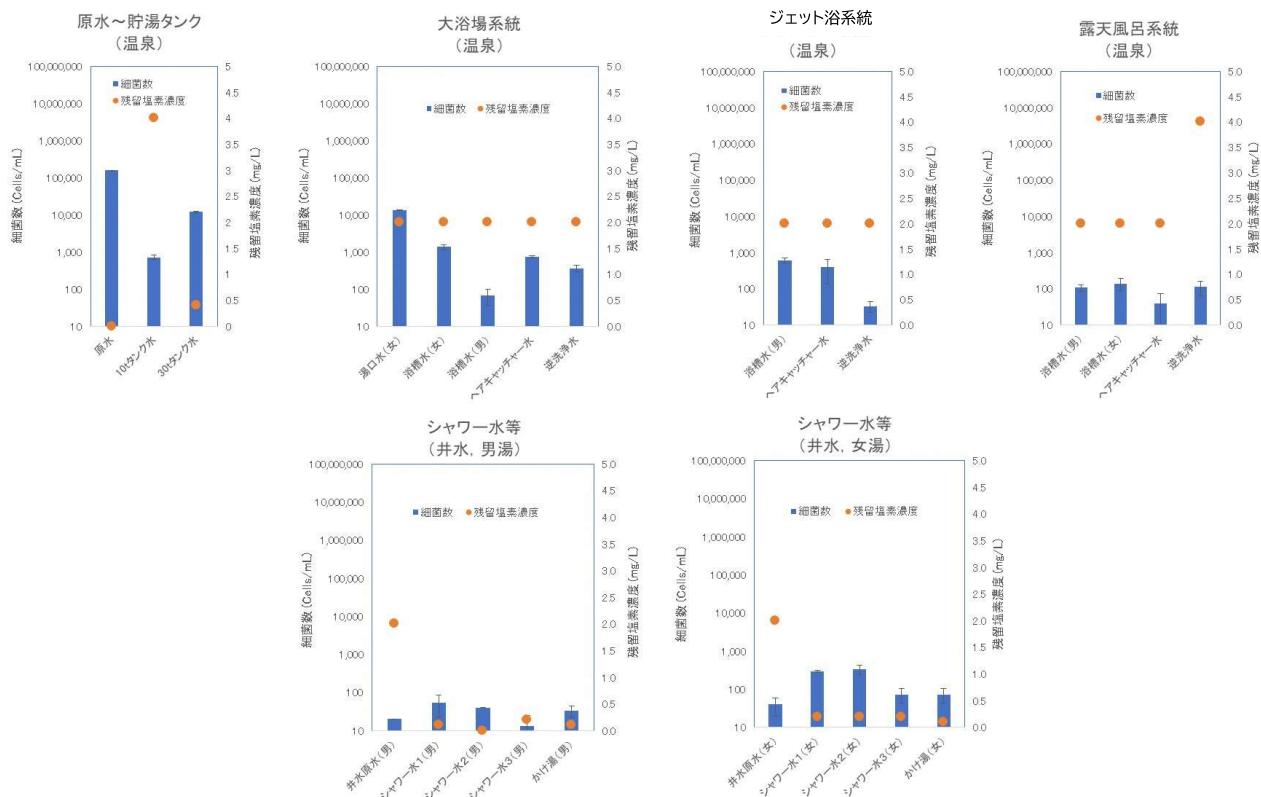


図7 M施設の調査まとめ

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> )	Flow cytometry (cells/mL)	遺伝子検査 (CFU-eU <sup>2</sup> /100 cm <sup>2</sup> )		レジオネラ菌 (CFU <sup>3</sup> /100 mL)	残留塩素濃度
				生菌	全遺伝子		
貯湯槽		5	120	NT <sup>4)</sup>	NT	<10	0.1
内湯	浴槽水	11	113	NT	NT	<10	1.8
炭酸風呂	浴槽水	11	1,207	NT	NT	<10	0
水風呂	浴槽水	48	940	NT	NT	<10	0
露天	浴槽水	11	13	NT	NT	<10	1.3
かかり湯		16	13	NT	NT	<10	0.2
シャワーカラン	シャワー水	9	293	NT	NT	175	0

検体名	性状	ATP (RLU)	Flow cytometry (cells/mL)	遺伝子検査 (GU/100 mL or cm <sup>2</sup> )		レジオネラ菌 (CFU/100 mL)	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	<10	<200
ホース内面	ぬぐい液	NT	NT	NT	28,226	<10	<200

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

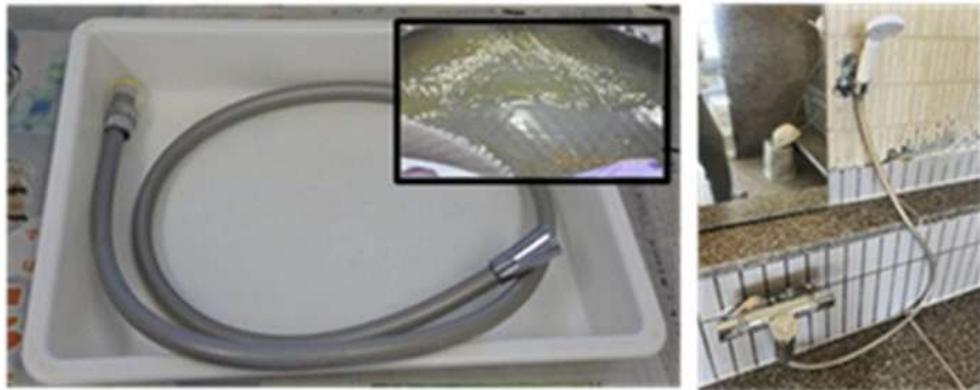
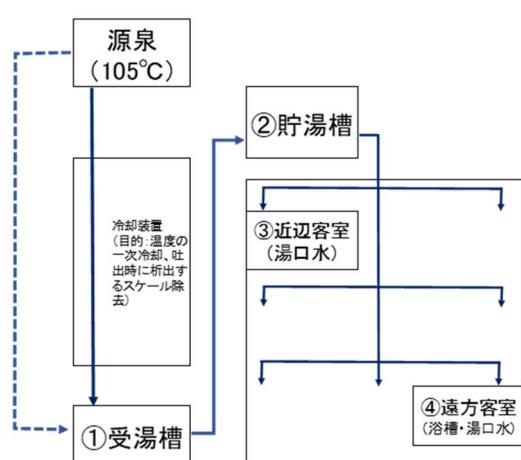


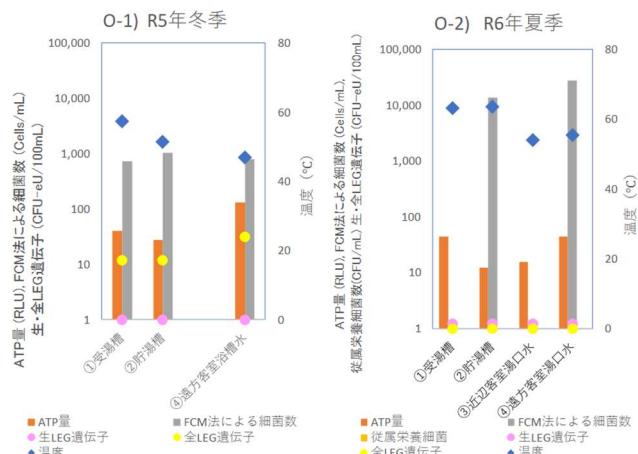
図8 N施設の調査の概要

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廃ホース(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。



(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9 O施設の調査まとめ

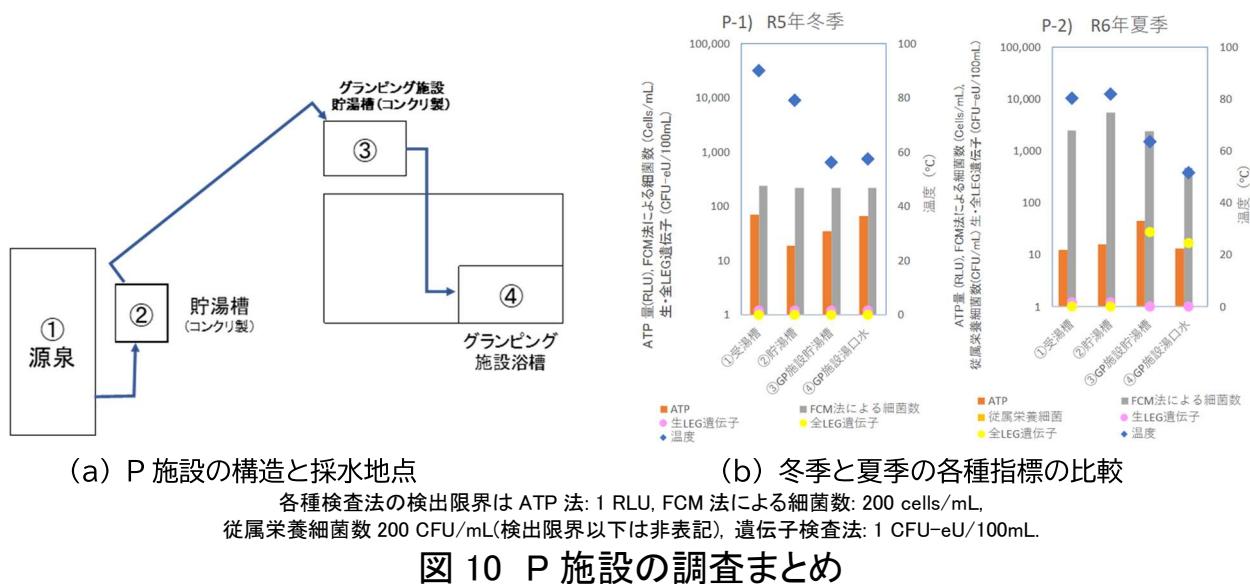


図 10 P 施設の調査まとめ

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(ジェット浴の例)

作業工程	検体	ATP (RLU <sup>1)</sup> )	Flow cytometry (cells/mL)	レジオネラ遺伝子 (CFU-eU <sup>2</sup> )/100 mL	レジオネラ属菌 (CFU <sup>3</sup> )/100 mL
処理前	浴槽水	47	287	19	<10
	逆洗水	52.5	587	7	10
洗浄中	浴槽水	3	103,233	NT <sup>4)</sup>	NT
	逆洗水	137	53,987	NT	NT
中和中	浴槽水	1	493	NT	NT
	逆洗水	10	9,073	NT	NT
すすぎ	浴槽水	5	353	27	10
	逆洗水	4	4,007	NT	<10
通常営業時	浴槽水	33.5	<200	NT	<10
	逆洗水	24	<200	NT	<10

<sup>1)</sup> Relative Lights Unit. <sup>2)</sup> CFU-equivalent Unit. <sup>3)</sup> Colony Forming Unit. <sup>4)</sup> 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,  
遺伝子検査法: 1 CFU-eU/100mL, レジオネラ属菌平板培養法: 10 CFU/100mL.

表3 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(薬湯の例)

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

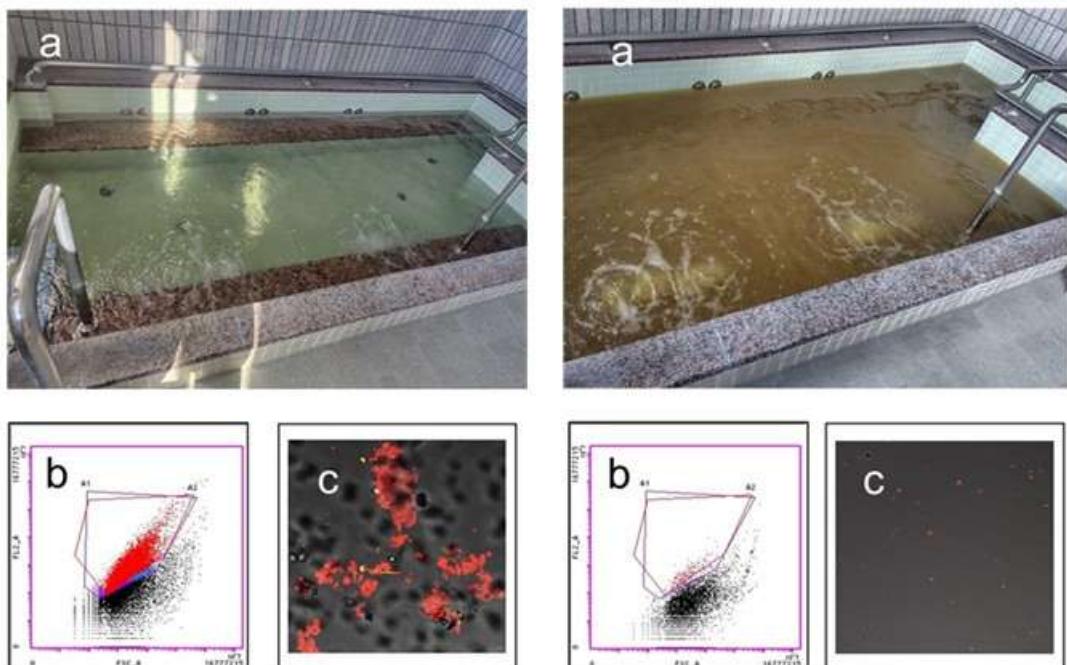
<sup>1)</sup> Relative Lights Unit, <sup>2)</sup> CFU-equivalent Unit, <sup>3)</sup> Colony Forming Unit, <sup>4)</sup> Not Tested

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,  
遺伝子検査法: 1 CFU-eU/100mL(10 未満は<10 と表記), レジオネラ属菌平板培養法: 10 CFU/100mL.

## A 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 <sup>1)</sup> )	Flow cytometry (cells/mL)	レジオネラ属菌 (CFU <sup>2)/100 mL</sup> )	レジオネラ遺伝子 (CFU-eU <sup>3)/100 mL</sup> )	従属栄養細菌 (CFU/mL)
①	洗浄前	<1	233	NT	NT <sup>4)</sup>	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

<sup>1)</sup>Relative Lights Unit, <sup>2)</sup> Colony Forming Unit, <sup>3)</sup> CFU-equivalent Unit, <sup>4)</sup> 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】

B 洗浄工程の写真(R 施設の例)

- 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 11 省力化配管洗浄剤の洗浄工程の概要(R 施設の例)

## オゾン供給前 オゾン不足(試運転) ろ過器内排水後オゾン水供給

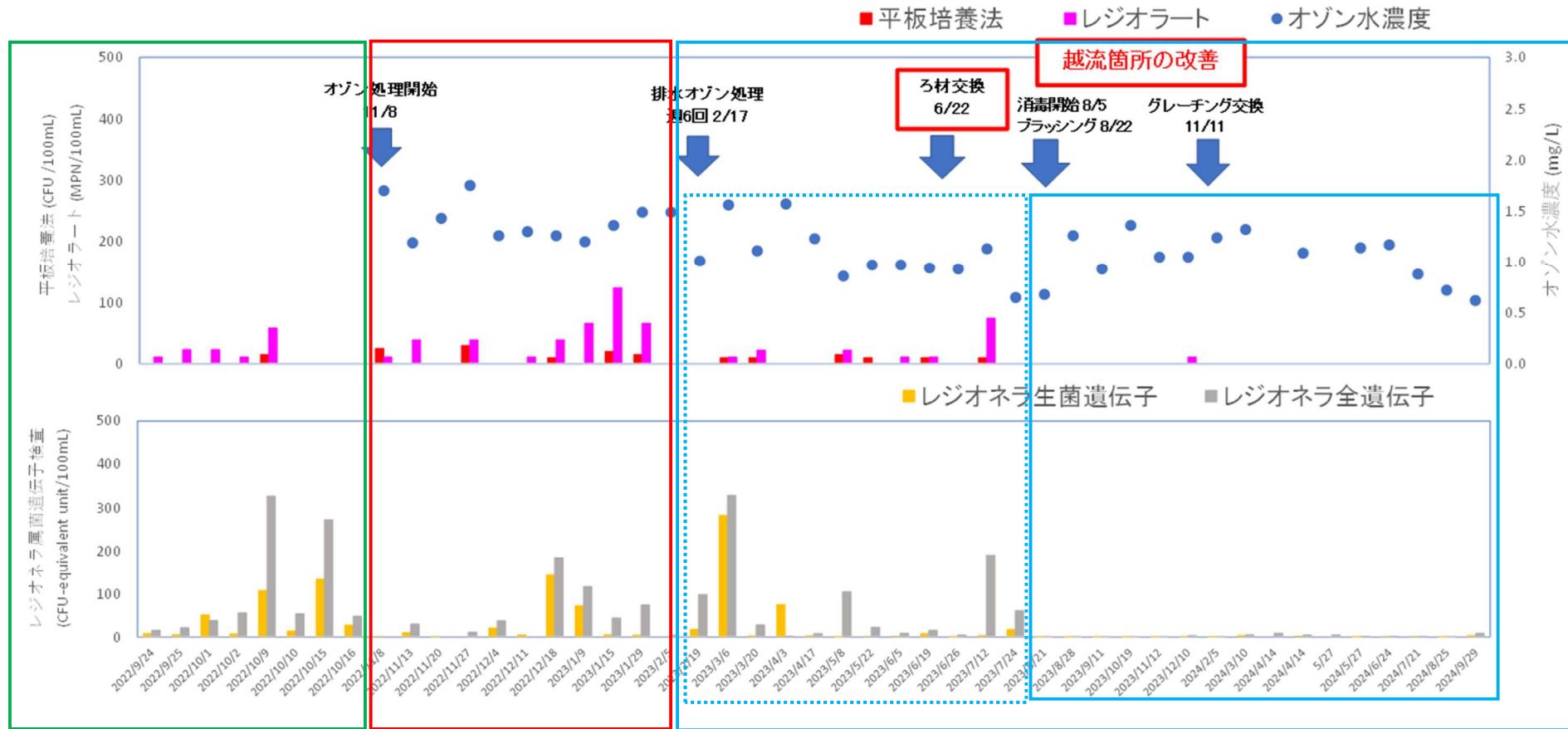


表4 オゾン運転状況による逆洗浄水内の各種検査指標の比較

採水時の運転状況	ATP (RLU <sup>1)</sup> )	Flow cytometry <sup>1</sup> (cells/mL)	レジオネラ属菌検査		レジオネラ属菌遺伝子検査		従属栄養細菌数 (R2A法) (CFU/mL)	遊離塩素濃度 (mg/L)	
			平板培養法 (CFU <sup>2)</sup> /100mL)	レジオラート (MPN <sup>3)</sup> /100mL)	EMA-qPCR (CFU-eU <sup>4)</sup> /100 mL)	qPCR (CFU-eU/100 mL)			
ろ過器外の汚染発見前 (n=31)	オゾン供給前 (n=8)	58.19±51.06	55,640±98,944	7.50±10.35	15.75±19.56	41.89±51.44	104.02±122.07	NT <sup>5)</sup>	1.51±0.66
	オゾン供給初期 (n=10)	63.10±26.74	67,409±103,704	10.50±12.12	39.50±38.43	26.46±46.10	50.21±59.96	NT	1.93±0.16
	ろ過器内排水後 オゾン供給(n=13)	48.08±28.27	22,574±38,972	5.00±5.77	11.62±20.52	31.88±77.77	67.7±95.97	3,386±6,070	1.83±0.30
小計		55.53±34.46	45,570±80,829	7.67±9.39*	22.40±29.32*	34.46±60.58*	73.65±93.16*	3,386±6,070	1.79±0.42#
ろ過器外の汚染発見後 (n=16)		88.89±61.86	33,252±46,422	0 <sup>6)*</sup>	0.69±2.75*	1.51±1.08*	3.19±2.85*	6,449±14,250	1.10±0.76#

<sup>1)</sup>Relative Lights Unit, <sup>2)</sup>Colony Forming Unit, <sup>3)</sup>Most Probable Number, <sup>4)</sup>CFU-equivalent Unit, <sup>5)</sup>Not Tested, <sup>6)</sup>All samples were below the detection limit. I: The RF-500 Flow Cytometer (Sysmex.co.) was used in this study. t-test: \*; P<0.01, #; P<0.05, The values below the detection limit were calculated as 0 in the t-test.

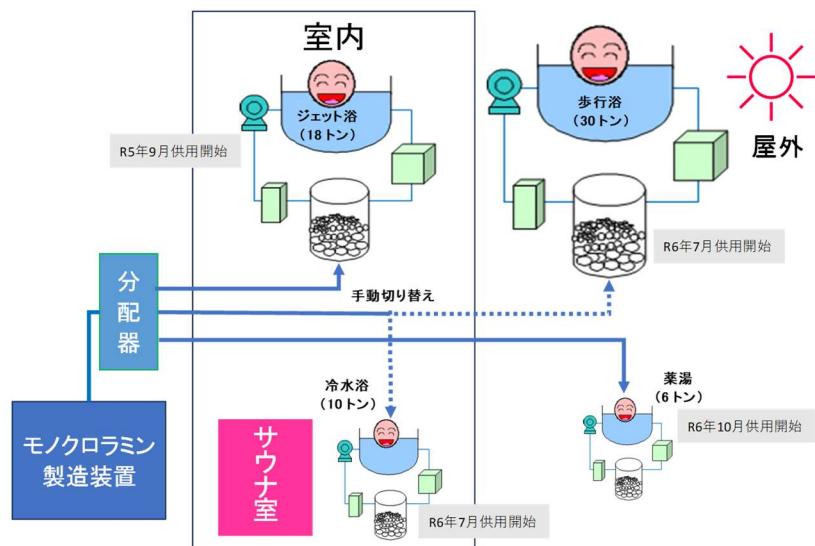


検体名	性状	ATP (RLU <sup>1)</sup> )	Flow cytometry (cells/mL)	遺伝子検査 (CFU-eU <sup>2)/100 mL)</sup>		レジオネラ属菌 (CFU <sup>3)/100 mL)</sup>	従属栄養細菌 (CFU/mL)
				生菌	全遺伝子		
浴槽水	水	4	<1,000	<10	<10	<10	<200
側溝水		29	12,713±365	104	392	1,190	5,440
検体名	性状	ATP (RLU/100 cm <sup>2</sup> )	遺伝子検査 (CFU-eU/100 cm <sup>2</sup> )		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			
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)
芝生表面		46,550±64,057		NT	6,573±10,560	3,667±5,297	NT

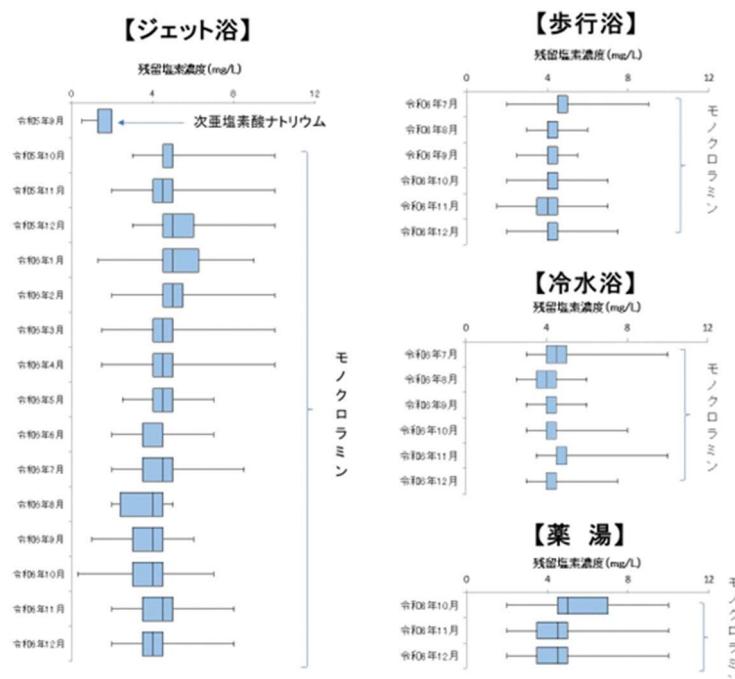
<sup>1)</sup> Relative Lights Unit, <sup>2)</sup> CFU-equivalent Unit, <sup>3)</sup> Colony Forming Unit, <sup>4)</sup> Not Tested

図 13 オゾン逆洗浄処理にかかる循環系統外部汚染源の原因究明調査  
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。



A モノクロラミン製造装置と循環系の模式図



B 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

C 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 <sup>1)</sup> )	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 <sup>2)</sup> /100 mL)	レジオラート (MPN <sup>3)</sup> /100 mL)	生菌 (CFU-eU <sup>4)</sup> /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 <sup>5)</sup>	NT	537±611

<sup>1)</sup> Relative Lights Unit, <sup>2)</sup> Colony Forming Unit, <sup>3)</sup> Most Probable Number, <sup>4)</sup> CFU-equivalent Unit, <sup>5)</sup> 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.

図 14 モノクロラミン消毒の適用事例の概要

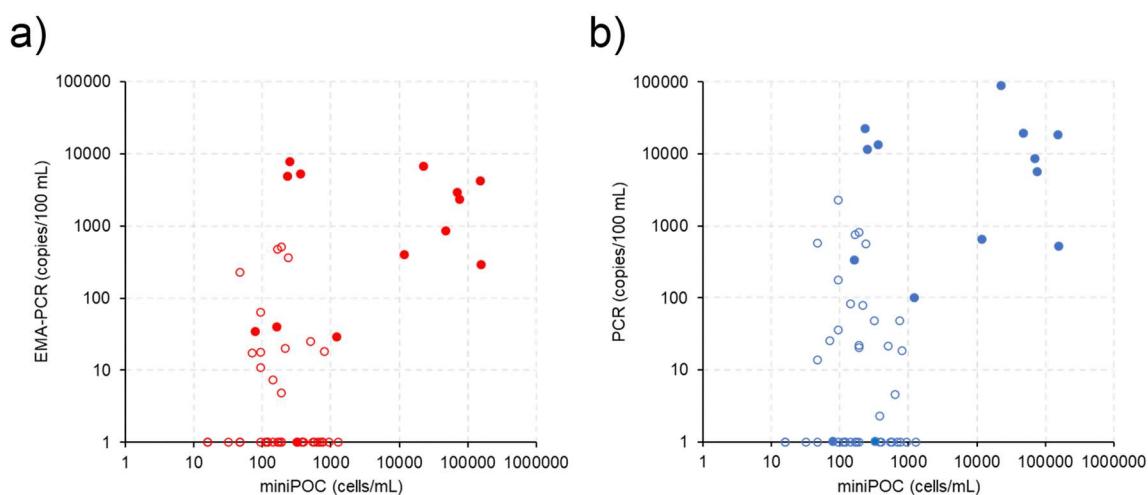


図 15 FCM (miniPOC) による細菌数とレジオネラ遺伝子量 (a は EMA 処理あり、b は EMA 処理なし) の関係 ( $n = 54$ )  
●は平板培養で生菌検出、○は平板培養で生菌不検出

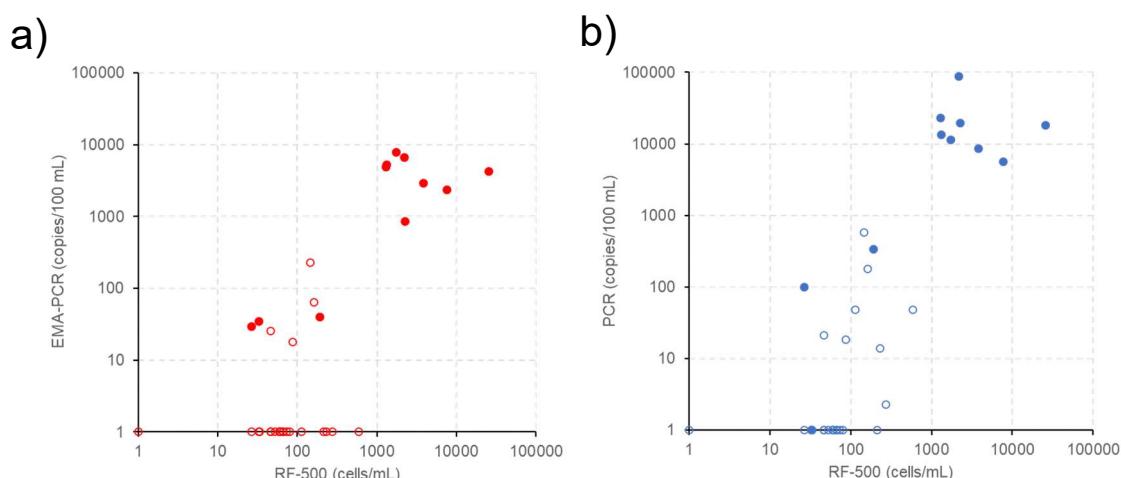


図 16 FCM (RF-500) による全菌数とレジオネラ遺伝子量 (a は EMA 処理あり、b は EMA 処理なし) の関係 ( $n = 34$ )  
●は平板培養で生菌検出、○は平板培養で生菌不検出

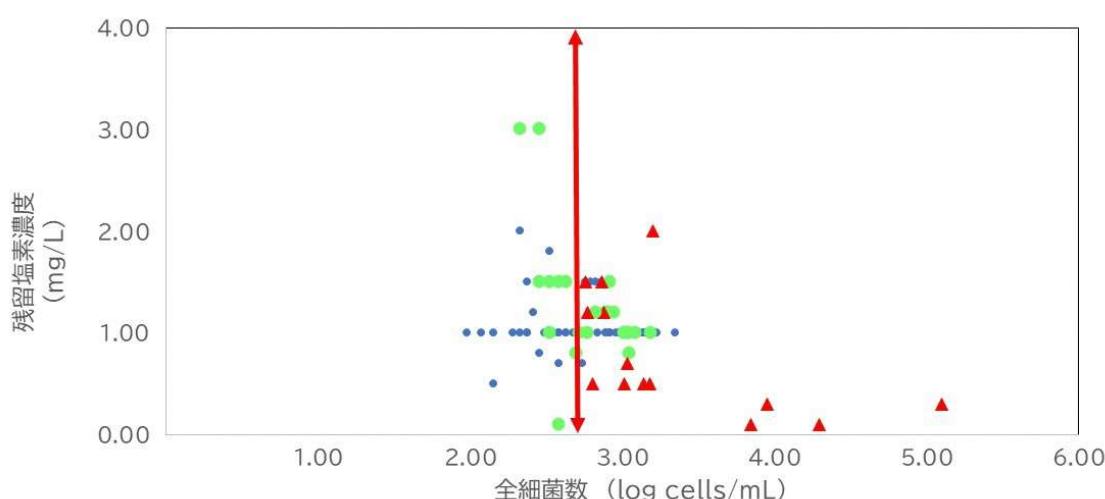


図 17 残留塩素濃度と FCM (miniPOC) による全細菌数の関係と消毒効果の判定閾値 ( $n = 95$ )  
●レジオネラ不検出 ●レジオネラ遺伝子検出 ▲平板法レジオネラ検出

表5 基準値に基づく FCM (miniPOC) の測定値と平板培養法の陽性の関係( $n = 95$ )

	洗浄効果なし ≥630 (cells/mL)	レジオネラ平板法	
		≥10 CFU/100mL	<10 CFU/100mL
フローサイトメトリー	洗浄効果なし ≥630 (cells/mL)	15	38
	洗浄効果あり <630 (cells/mL)	0	42
合計		15	80

感度:100%, 特異度:53%, 有効性:60%

表6 FCM の測定値と遺伝子検査法および平板培養法の陽性の関係( $n = 95$ )

FCM(miniPOC) の測定値 (cells/mL)	試料数	LAMP/PCR	平板培養法
		陽性試料数	陽性試料数
100未満	2	0 (0%)	0 (0%)
100-999	68	26 (38%)	6 (9%)
1000-9999	23	14 (65%)	7 (30%)
10000以上	2	2 (100%)	2 (100%)
合計	95	42 (45%)	15 (16%)

表7 施設 A の測定結果

	FCM (cells/mL)	レジオネラ PCR (+/-)	レジオネラ平板培養 (CFU/100 mL)
浴槽 1	6,167	+	<10
浴槽 2	1,857	+	<10
浴槽 3	476	-	<10
浴槽 4	4,857	+	<10
浴槽 5	6,095	+	<10
浴槽 6	1,952	+	<10
浴槽 7	571	+	<10
浴槽 8	3,619	+	<10

FCM は現場測定, PCR と平板培養は持ち帰り測定

表8 施設 B の測定結果

	FCM (cells/mL)	レジオネラ PCR (+/-)	レジオネラ平板培養 (CFU/100 mL)
浴槽 1	95	-	<10
浴槽 2	190	-	<10
浴槽 3	190	-	<10
浴槽 4	190	-	<10
浴槽 5	190	-	<10
浴槽 6	95	-	<10

FCM は現場測定、PCR と平板培養は持ち帰り測定