

令和7年度厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

公衆浴場等におけるレジオネラ発生防止及び衛生管理推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部

分担研究報告書

公衆浴場におけるモノクロラミン消毒と配管洗浄

研究代表者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	鍋田 信吾	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
研究協力者	八木 美弥	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
研究協力者	寺井 克哉	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
研究協力者	美澤 克俊	静岡県西部健康福祉センター 掛川支所
研究協力者	田中 慶郎	株式会社マルマ
研究協力者	杉山 寛治	株式会社マルマ
研究協力者	細川 賢人	花王株式会社
研究協力者	野村 健太	花王株式会社
研究協力者	山田 耕造	花王株式会社
研究協力者	茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社

研究要旨

公衆浴場におけるレジオネラ発生防止対策は、浴槽水の消毒とバイオフィルム除去が主な方法である。一方で、これらの管理を県条例の規定を遵守して実施している施設においてもレジオネラ属菌が検出されることがある。本研究では、レジオネラ属菌が継続的に検出される施設において、浴槽水のモノクロラミン消毒及び配管洗浄剤の効果を検討した。モノクロラミン消毒試験期間中にモノクロラミン濃度は適正に維持されていたが、浴槽水検体から *Legionella pneumophila* が検出され、同検体からレジオネラ生菌死菌遺伝子が換算値で 8.9×10^2 CFU/100 mL 検出されたことから、系統内にバイオフィルムが蓄積していると推測された。その後、過炭酸ナトリウムと助剤からなる製剤で配管洗浄を実施したところ、洗浄直後に生菌死菌遺伝子の減少が見られたが、洗浄4日後に洗浄前の値に戻った。さらに、配管拭取り検体から検出された *L. pneumophila* が同施設から過去に分離された菌株と MLVA 型が 12 ローカス全て一致したことから、拭取り検体分離株は、系統内に数年間定着していると推測された。以上の結果から、対象浴槽の系統内に残存するバイオフィルム除去は配管洗浄だけでは難しく、ろ過器等の衛生管理の改善が必要であると考えられた。

A. 研究目的

レジオネラ症の届出数は、年々増加しており、公衆衛生上の問題になっている。レジオネラ属菌はヒトからヒトへの感染は起こらないことから、感染源の特定と排除が対策として重要である。日本国内のレジオネラ症集団発生は、入浴施設を原因とした事例が多く報告されている¹⁾。入浴施設におけるレジオネラ症防止対策は、レジオネラ属菌が増殖する場所となるバイオフィルムの除去と浴槽水の消毒の2点が重要である。しかしながら、これらの対策を県条例施行規則に則って実施していてもレジオネラ属菌が検出されることもあるため、施設の状況に応じた効果的な管理手法を提案する必要があると考えられる。

モノクロラミンは遊離塩素よりバイオフィルム除去効果が高いことが報告されており²⁾、本研究ではレジオネラ属菌が継続して検出されている施設において、モノクロラミンによる消毒試験を実施し、加えてバイオフィルム対策として配管洗浄を行い、その効果を調べた。

B. 研究方法

1 対象施設

静岡県内の公衆浴場でモノクロラミン消毒試験期間中の1日あたりの利用者は200～300人だった。実験浴槽は循環式浴槽A（総容量8.9トン）、浴槽B（11.8トン）で、共に砂式ろ過器があり、水道水を使用して、週1回換水している。イソシアヌル酸ナトリウム製剤による塩素消毒装置で営業時の残留遊離塩素濃度は0.5～1.0 mg/Lに維持されていた。また、営業後にイソシアヌル酸ナトリウム製剤添加により残留塩素濃度5.0 mg/Lに上げた状態で一晩循環した後、

翌日の営業前にチオ硫酸ナトリウムで中和する高濃度塩素循環を週4回、モノクロラミン製剤添加（フリップフラップ法）を週2回実施していた。ろ過器の逆洗浄は、週1回、逆洗浄4分の後、洗浄1.5～2分行われている。ろ過器の定期点検が年2回行われているが、ろ材の交換時期は不明だった。また、配管接合部にゴムパッキンが使用されていることを試験中に確認している。

実験浴槽は令和2年以降にレジオネラ属菌が浴槽Aから5回、浴槽Bから2回、浴槽水から検出されている。そのうち静岡県環境衛生科学研究所で実施した検査において、*L. pneumophila* が浴槽Aの2検体と浴槽Bの1検体から10～220 CFU/100mL検出されている。

2 モノクロラミンの注入等

(1) モノクロラミン生成装置

モノクロラミン添加は、モノクロラミン生成装置（クロラクター：ケイ・アイ化成）により、注入量・頻度を濃度が5.0 mg/L程度になるようにタイマー式自動注入で行った。また、週1回、モノクロラミン濃度を15 mg/Lに上昇させて一晩循環した後に排水した。

(2) 配管洗浄

施設管理者が年1回実施している配管洗浄は、過炭酸ナトリウム製剤を製品取扱説明書に従って、浴槽Aは試験開始4日前の遊離塩素消毒時、浴槽Bが試験29日目に行われた。さらに、試験中に検査結果から配管洗浄後にバイオフィルムの残存が推測されたため、試験90日目に本研究班で開発した過炭酸ナトリウムと助剤からなる製剤³⁾を使用して浴槽A、Bを配管洗浄した。

(3) 試験実施期間

令和 7 年 10 月 10 日から遊離塩素消毒管理時に検査した後、11 月 10 日に浴槽 B、11 日に浴槽 A をモノクロラミン消毒に切替えた。モノクロラミン消毒試験は、浴槽 A の開始日を試験 0 日目として結果を示す。

3 検体採取及び検査項目

(1) 検体採取

実験浴槽の浴槽水を週 1 回の換水日から置いて採水可能な日(浴槽 A は 3 日後、浴槽 B は 4 日後)に採取した。試験開始前の遊離塩素消毒時に 4 回、試験期間中は 31 日目までは 1 週間毎、87 日目までは 2 週間毎、90 日目の洗浄前後に加え、94 日目以降は 1 週間毎に採水した。加えて、ヘアキャッチャー付近の配管について、ワイプチェック(佐藤化成工業所)を用いて拭取り検査を適宜実施した。

(2) 検査項目

1) 塩素及びモノクロラミン濃度の定量

モノクロラミン消毒試験中の残留全塩素濃度は施設管理者が 1 日 3～4 回、DPD 法(MD100, Lovibond)で測定した。また、水質検査用に浴槽水を採取し、全塩素濃度を DPD 法(HI97734, HANNA)、モノクロラミン濃度をインドフェノール法(Pocket Colorimeter II, Hach)にて測定した。なお、採水から数時間後に測定したため、これらの測定値に影響があった可能性も考えられる。

2) 微生物検査

レジオネラ属菌培養検査は、浴槽水をメンブレンフィルターろ過による 100 倍濃縮後、無処理、酸処理及び熱処理の検体各々を GVPC 培地(島津ダイアグノティクス)に塗抹して 36℃で 7 日間培養した。配管拭取り検体は PBS10 mL に振り出し、遠心分離

(5,000rpm、30 分)後に 3 mL に濃縮した無処理及び酸処理検体を検査に供した。また、浴槽水検体については、一般細菌数、自由生活性アメーバ数及び従属栄養細菌数を常法により定量した。

3) レジオネラ属菌遺伝子検査

浴槽水中のレジオネラ属菌の生菌遺伝子の検出を EMA-qPCR 法、死菌を含む生菌死菌遺伝子の検出を qPCR 法により行った。

qPCR 法は、Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 (タカラバイオ)及び Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ)を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。EMA-qPCR 法は、qPCR 法の DNA 抽出前に Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver. 2.0 (タカラバイオ)及び LED Crosslinker 12 (タカラバイオ)を用いて EMA 処理した。得られた遺伝子コピー数を取扱説明書に従って CFU/100 mL に換算した。

検査で分離されたレジオネラ属菌株について、過去に同施設から分離された菌株との関連を調べるため、前川らの方法⁴⁾で反復配列多型解析法(MLVA)による分子疫学的解析を行った。

浴槽水のレジオネラ属菌、一般細菌数、自由生活性アメーバの検査は試験 24 日目まで実施した。レジオネラ属菌遺伝子検査及び従属栄養細菌数については、それ以降も継続して確認を行った。

C. 結果及び考察

施設管理者が実施した全塩素濃度測定においては、一部の逸脱を除いて 3.0～8.0 mg/L の範囲で維持されていた(図 1)。一方で、採取した浴槽水の測定の結果は、全塩素濃度及びモノクロラミン濃度は、ともに 3.0

mg/L 未満の値も見られたが、モノクロラミン生成装置の稼働により、試験期間中のモノクロラミン濃度は一部を除いて 3.0 mg/L 以上に維持されていると考えられた。

浴槽水検体のレジオネラ属菌検査の結果、試験 24 日目の浴槽 B から *L. pneumophila* 血清群不明が 10 CFU/100 mL 検出された(表 1)。なお、その他の浴槽水検体では、検出されなかった。浴槽水の消毒が適正濃度で維持されている状態でレジオネラ属菌が検出される場合は、系統内にバイオフィームが存在することが疑われることから、後述するように配管洗浄によるバイオフィーム除去を試みた。

従属栄養細菌数は、遊離塩素消毒時は 14 ~94 CFU/mL であったが、モノクロラミン消毒開始 10 日目に浴槽 A が 1.4×10^4 CFU/mL、浴槽 B が 1.4×10^5 CFU/mL まで増加し、その後は $10^2 \sim 10^6$ の値であった(図 2)。従属栄養細菌数がモノクロラミン消毒開始後に増加するという報告があり⁵⁾、本研究の結果も同じ傾向であった。なお、一般細菌数、アメーバ数は全ての検体で検出されなかった。

浴槽水のレジオネラ属菌生菌死菌遺伝子は、遊離塩素消毒時はほぼ検出されなかったが、モノクロラミン消毒時は $10^1 \sim 10^3$ CFU/100 mL の値が検出された(図 3)。一方、EMA-qPCR の生菌遺伝子は qPCR の値より顕著に低く、浴槽水中のレジオネラ属菌遺伝子はほとんどがモノクロラミン消毒により殺菌された死菌遺伝子であったが、最大 4.3 CFU/100 mL 検出され、分離培養検査の基準値 10 CFU/100 mL 未満ではあるが生菌が存在するリスクがある。

浴槽水中の DNA は、遊離塩素によって短

時間で失活するのに対して、モノクロラミン存在下では長時間残存する⁶⁾。遊離塩素消毒とモノクロラミン消毒の生菌死菌遺伝子量の差は消毒剤による DNA の損失差であって、系統内のレジオネラ属菌の状態に大きな変化はなかったと思われる。遊離塩素消毒と比較して、モノクロラミン消毒時は、生菌死菌遺伝子量がレジオネラ属菌の潜在的なリスクの指標として有用であると考えられる。

レジオネラ属菌生菌死菌遺伝子量は、試験 3 日目から 87 日目の期間において、浴槽 A が $4.7 \times 10^1 \sim 1.9 \times 10^3$ CFU/100 mL、浴槽 B が $1.9 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^3$ CFU/100 mL と、過去の報告値 ($10^0 \sim 10^2$)^{7, 8)} と比べて高い値であった。なお、*L. pneumophila* が検出された浴槽水検体の遺伝子量は、 8.9×10^2 CFU/100 mL であった。

浴槽 B の浴槽水から *L. pneumophila* が検出された後、浴槽 B の配管洗浄(試験 31 日目)が実施されたが、洗浄後の検体における生菌死菌遺伝子量に明瞭な減少が認められなかった。ろ過系統内にまだバイオフィームが残存していると考えられたことから A 及び B の配管洗浄を試験 90 日目に実施した。配管洗浄前後に採水した浴槽水検体において、洗浄直後の生菌死菌遺伝子量は浴槽 A 2.8×10^1 CFU/100 mL、浴槽 B 2.1×10^1 CFU/100 mL に減少したものの、4 日後(試験 94 日目)には浴槽 A 5.2×10^2 CFU/100 mL、浴槽 B 4.9×10^2 CFU/100 mL で、洗浄前と同等の値に戻っていた。また、従属栄養細菌数も配管洗浄直後に減少したが、数日で洗浄前の値に戻っていた。

遊離塩素消毒時に浴槽 A 及び B の配管拭取り検体から *L. pneumophila* SG 1 が検出

され、モノクロラミン消毒時に浴槽 B の配管拭取り検体から *L. pneumophila* 血清群不明が検出された (表 2)。

配管拭取り検体から分離された *L. pneumophila* SG 1 菌株と令和 4 年及び 6 年に浴槽 A または B から検出された SG 1 菌株を MLVA で比較した結果、菌株 No. 1, 2, 4, 5 の MLVA 型が 12 ローカス全て一致した (表 3)。

以上の結果から、試験浴槽の衛生管理はモノクロラミン消毒によりレジオネラ属菌を殺菌して維持されている状況と考えられるため、モノクロラミン濃度の維持が重要な衛生管理手法である。しかしながら、浴槽水からレジオネラ属菌が分離培養され、EMA-qPCR で生菌死菌遺伝子が検出されているため、配管洗浄によるバイオフィーム除去を試みた。

施設管理者が試験 29 日目に浴槽 B を配管洗浄しているが、洗浄から 2 日後に明瞭な低下は見られなかった。再度の配管洗浄直後に生菌死菌遺伝子量は低下したが、こちらも 4 日後には洗浄前の値に戻っている。さらに、配管拭取り検体から分離された *L. pneumophila* SG 1 と過去分離菌株の MLVA 型が一致した原因として、バイオフィームが数年間残存していると考えられたことから、配管洗浄だけでは試験浴槽のバイオフィーム除去が困難であると推測された。バイオフィーム対策のため衛生管理状況を確認して、ろ過器の逆洗浄時間延長と回数を増やすことを提案した。さらに、ろ材交換時期が不明なため、推奨される 3～4 年の期間⁹⁾を超過したろ過器の使用について、衛生管理の観点から問題がないか確認する必要があると思われる。また、配管接合部に使用さ

れているゴムパッキンも洗浄消毒が困難であるため、テフロン素材への交換が推奨されている¹⁰⁾。その他設備も含めた施設の衛生管理状況を確認して、汚染源を特定して対策を施し、効果的な対策を検討していきたい。

D. 結論

レジオネラ属菌が継続して検出される入浴施設において、モノクロラミンによる浴槽水の消毒と配管洗浄を実施して、その効果を調べた。モノクロラミン消毒は適正な濃度が維持されていたが、浴槽水から *L. pneumophila* が分離され、レジオネラ属菌生菌死菌遺伝子が高い値を示した。試験浴槽の系統内にバイオフィームが残存していると考えられたため、配管洗浄を実施した。洗浄直後に生菌死菌遺伝子量は減少したが 4 日後には洗浄前の値に戻っていた。また、配管拭取り検体から検出された *L. pneumophila* SG 1 菌株が同施設から過去に分離された菌株と MLVA 型が 12 ローカス全て一致した。以上の結果から、配管洗浄では除去が難しいバイオフィームが残存していると考えられた。レジオネラ属菌のリスクをさらに低減させるためには、施設の衛生管理状況を確認して汚染源を特定する必要があると考えられた。

E. 参考文献

1. 国立感染症研究所感染所情報センター：レジオネラ症 2013～2023, 病原微生物検出情報 (IASR), 45(7): 107-109, 2024
2. 縣 邦雄ら：種々の温泉水におけるモノクロラミン消毒効果と高濃度洗浄の検証, 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) レジ

- オネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究 平成 25 年度分担研究報告書
3. 泉山信司ら：省力化配管洗浄法の開発と営業施設における実地試験，厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究 令和 2 年度分担研究報告書
 4. 前川 純子ら：MLVA 法における *Legionella pneumophila* の遺伝学的特徴，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）レジオネラ検査の標準化及び公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究 平成 28 年度分担研究報告書
 5. 長岡宏美ら：社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について，厚生労働科学研究（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 年度分担研究報告書
 6. 泉山信司ら：モノクロラミン消毒の薬湯への応用、並びに雑菌への対応，厚生労働科学研究（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 年度分担研究報告書
 7. 佐原啓二ら，モノクロラミンによる循環式浴槽の消毒効果について 一営業施設における検証試験一，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 年度分担研究報告書
 8. 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 6 年度分担研究報告書
 9. （公財）日本建築衛生管理教育センター：第 5 版レジオネラ症防止指針, 124-126, 2024
 10. 杉山寛治，循環式浴槽の衛生管理 ーフィルター・リフレッシュ法の有用性ー. 温泉工学会誌, 30:98-104, 2008
- F. 研究発表
- 誌上発表
なし
- 口頭発表
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

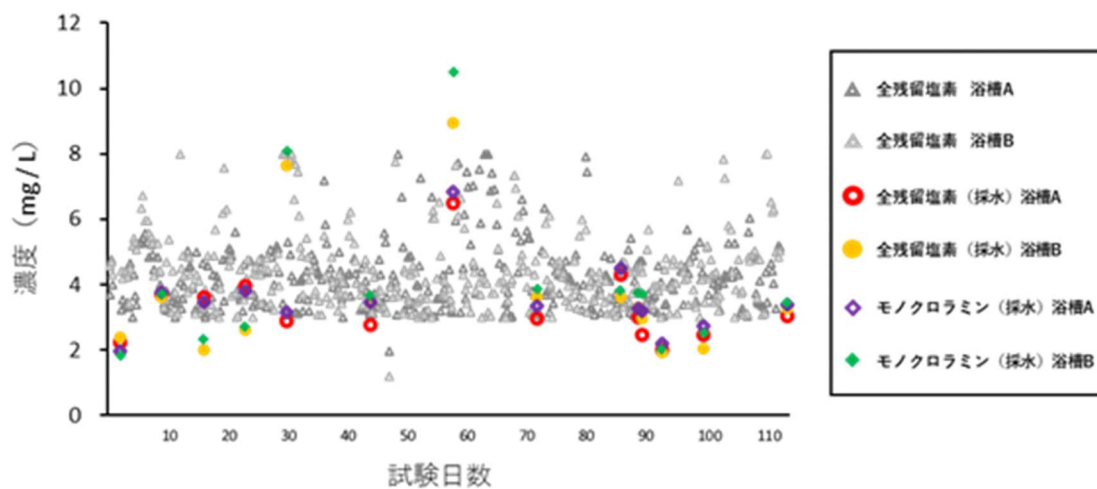


図1 モノクロラミン消毒試験における浴槽水的全残留塩素濃度及びモノクロラミン濃度

表1 浴槽水検体の検査結果

項目	検体	検体採取日							
		35 日前	28 日前	21 日前	14 日前	3 日目	10 日目	17 日目	24 日目
レジオネラ 属菌数 (CFU/100 mL)	A	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10

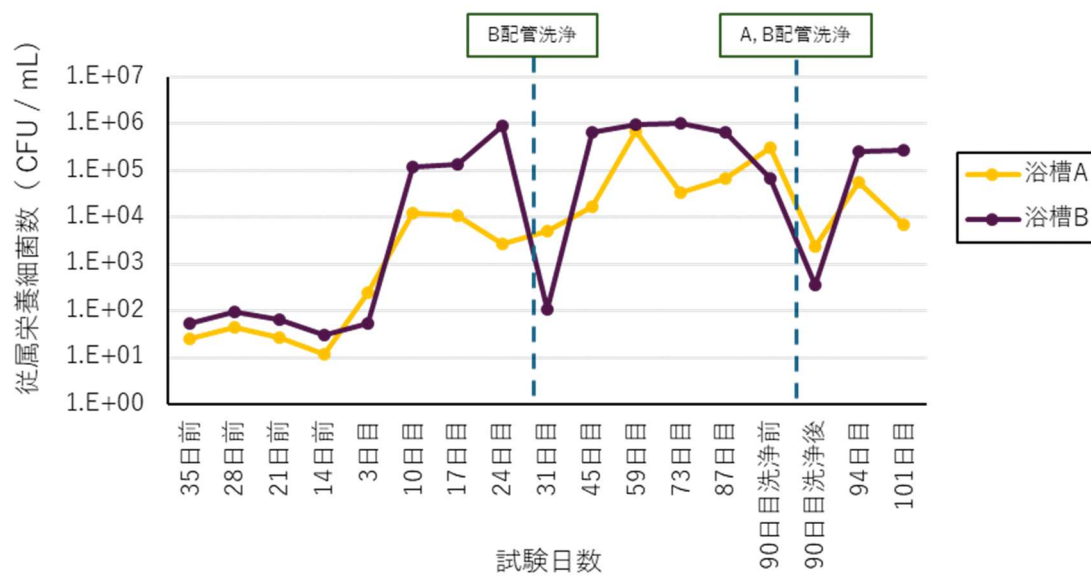


図2 モノクロラミン消毒試験における従属栄養細菌数

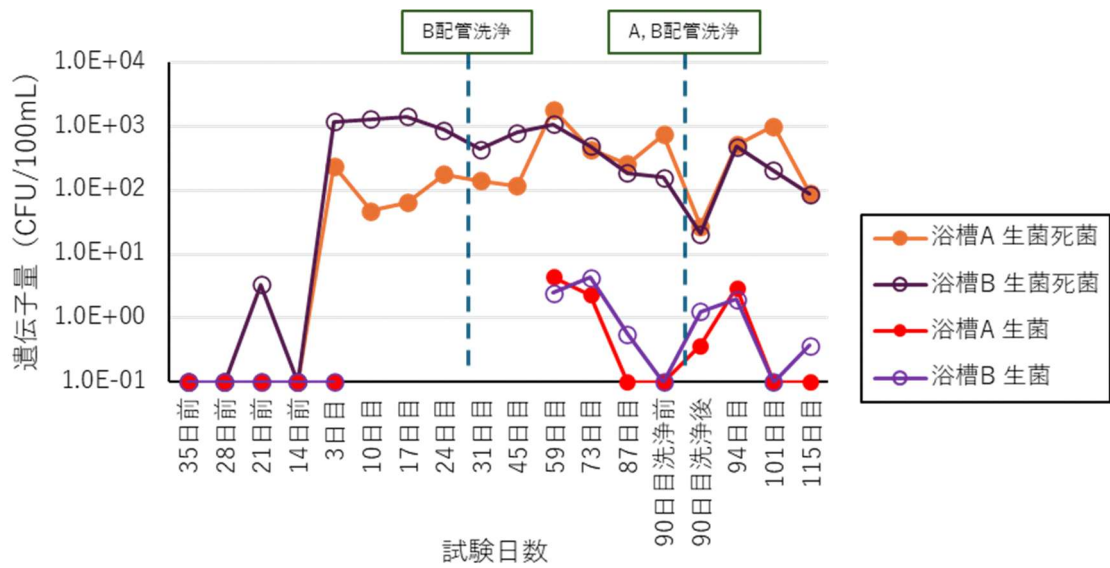


図3 浴槽水から検出されたレジオネラ属菌生菌死菌遺伝子量及び生菌遺伝子量
不検出は 1.0E-01 と示し、検査未実施は空白。

表2 配管拭取り検体のレジオネラ属菌培養検査結果

検体	検体採取日								
	35日前	14日前	3日目	10日目	17日目	24日目	31日目	90日目	
								配管洗浄前	配管洗浄後
A	<i>L. pneumophila</i> SG1	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
B	不検出	<i>L. pneumophila</i> SG1	<i>L. pneumophila</i> 群別不明	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出

表3 試験対象施設から分離された *L. pneumophila* SG1 の MLVA 型

菌株 No.	採取日	検体	MLVA 型											
			Lmps 31	Lmps 01	Lmps 35	Lmps 33	Lmps 34	Lmps 13	Lmps 19	Lmps 03	Lmps 40	Lmps 38	Lmps 39	Lmps 44
1	R4/6/27	A 浴槽水	15	8	18	4	1	10	5	9	4	3	6	9
2	R6/7/8	A 浴槽水	15	8	18	4	1	10	5	9	4	3	6	9
3	R6/7/8	B 浴槽水	11	8	21	2	2	9	4	9	4	3	0	9
4	試験 35 日前	A 配管拭取り	15	8	18	4	1	10	5	9	4	3	6	9
5	試験 14 日前	B 配管拭取り	15	8	18	4	1	10	5	9	4	3	6	9