

20020081

平成 14 年度 厚生労働科学研究研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

循環式浴槽システムにおける微生物管理手法に関する研究

研 究 報 告 書

主任研究者 遠藤 卓郎

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
循環式浴槽システムにおける微生物管理手法に 関する研究 遠藤 卓郎	1
II. 分担研究報告	
実証試験用の循環式浴槽システムを用いた 微生物管理手法に関する研究 遠藤 卓郎・古畑 勝則・大井 照	7
循環式浴槽施設におけるレジオネラ属菌対策事例 遠藤 卓郎・古畑 勝則・大井 照	37
掛け流し式浴槽水のレジオネラ汚染調査 杉山 寛治・遠藤 卓郎	61
銭湯を感染源とするレジオネラ肺炎による死亡事故について 大井 照	71

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

循環式浴槽システムにおける微生物管理手法に関する研究

主任研究者 遠藤 卓郎（国立感染症研究所）

本研究事業では、実証試験用の循環式浴槽を構築して問題点を再現するとともに、殺菌・洗浄方法、あるいは構造上の改良について実証試験を行った。また、掛け流し式温泉浴槽水（循環系および追い炊き機能をもたない浴槽で、1日あたりの溢水量が浴槽容量以上の浴槽）について、微生物汚染の実態調査と管理方法を検討した。実証試験循環式浴槽において、温泉施設の浴槽と同様なレジオネラの自然汚染・増殖が起り、浴槽壁面、集毛器、配管内、ろ過機内ろ材にレジオネラ汚染個所が確認された。詳細な汚染個所も温泉施設で使用されている循環システム内の汚染個所と一致した。以下、実証試験ろ過装置を使用して、塩素管理、紫外線殺菌装置による循環式浴槽水の殺菌効果について検討した。各種の消毒・洗浄効果は概略以下のようであった。

各種配管材質に対するバイオフィーム付着調査：レジオネラ属菌は銅に対する付着が最も少なく、1cm²当り 15CFU であった。これは他種材質に付着した菌数(10²~10³CFU/100ml) に比べて少ない事が確認された。塩ビ(PVC)及びサニタリー配管(sus316L)も菌数付着が比較的少なく(100CFU 前後)、材質の表面が腐食を起こしていた鉄では 1cm²当り 2,300CFU のレジオネラ属菌が付着していた。

紫外線照射（波長 253.7nm）：紫外線照射による殺菌効果を検討したところ、紫外線殺菌は局所的な殺菌にとどまるものの浴槽水のレジオネラを低濃度に抑えることができた。一方、照射範囲外のろ過槽内の菌数は少なくとも浴槽水より 10 から 100 倍程度高い菌数で推移していることが確認された。

塩素消毒：循環式浴槽において、塩素管理はきわめて有効な手段であり、残留塩素濃度が 0.2~0.4ppm となる管理条件では、少なくともレジオネラ属菌は検出限界以下に抑制されることが示された。ただし、消毒停止後のレジオネラを含む微生物の回復状況からすると、この処理条件では完全殺菌には至らず一部は VNC (viable but nonculturable) の状態にあるものと推測され、持続的な塩素処理が必須と考えられた。

膜ろ過：MF 膜ろ過（ろ過精度 0.45μm）による浴槽内の微生物管理は期待できない結果であった。また、消毒・洗浄を伴わない浴槽水の換水はわずかな希釈効果が認められる程度で、管理方法として不相当と判断された。

過酸化水素洗浄：過酸化水素による洗浄は高い殺菌効果が確認された。なお、過酸化水素の使用上の注意として、洗浄後に本剤が完全に除去（消費）されていることの確認作業の重要性が指摘される。すなわち、過酸化水素とその後の衛生管理に用いる次亜塩素酸は 1:1 で反応することから、過酸化水素が残留する限り次亜塩素酸は消費され、消毒効果が期待できない状態が生じる。

掛け流し式温泉：掛け流し式温泉（循環系および追い炊き機能をもたない浴槽で、1日あたりの溢水量が浴槽容量以上）の浴槽水についてレジオネラ汚染状況を調査したところ、浴槽水からのレジオネラ属菌の検出は低いレベルに留まっていることが示された。なお、掛け流し式浴槽水のレジオネラ汚染対策としては浴槽の洗浄のみならず貯湯槽の殺菌・洗浄が重要であると判断された。

A:研究目的:

入浴施設のレジオネラ症の発生は、平成12年の死亡例を含む集団発生以後も続発しており、その防止対策の周知は緊急の課題である。レジオネラ防止対策については、現在、「新版レジオネラ症防止指針」に基づく環境衛生監視員による指導、パンフレットやマニュアル等を通して営業者に周知を図ってきたが、具体的な指導に際しては必ずしも十分な情報がそろっていない恨みがあった。平成13年12月には、これまでの規則どおり浴槽等を清掃・消毒し、毎日完全換水したとされる銭湯でレジオネラ症の死亡事故が発生した。

これらのことから、本研究では循環式浴槽の管理システムを確立することによって衛生面の安全性を確保しようと企画した。具体的には実証試験用の循環式浴槽を構築して問題点を再現するとともに、殺菌・洗浄方法、あるいは構造上の改良について実証試験を行った。また、掛け流し式温泉浴槽水（循環系および追い炊き機能をもたない浴槽で、1日あたりの溢水量が浴槽容量以上の浴槽）について、微生物汚染の実態調査と管理方法を検討した。

B:研究方法

本研究事業においては、実証試験用の循環式浴槽を構築して、継時的にレジオネラ等の循環式浴槽への定着、殺菌・洗浄方法の検討、塩素管理、紫外線消毒、フィルターによる除去、過酸化水素洗浄、換水効果、配管材質に対するバイオフィーム付着等々の検討・解析を行った。また、掛け流し式浴槽水のレジオネラ汚染に関しては関東近県の掛け流し式の温泉設備を有する8施設の協力を得て、入浴施設の管理状況の調査と、実機でのレジオネラ、アメーバ及び従属栄養細菌の汚染状況を調査した。

C: 研究結果及び考察

1. レジオネラ等の循環式浴槽への定着:

新規の実証試験循環式浴槽に市水を張り42℃で稼働させ、レジオネラ属菌で汚染されたセラミックボール2Lを浴槽内に沈めることで浴槽中の菌の定着を図り、微生物数の上昇を確認した。アメーバは立ち上げ後6日目に浴槽水で10PFU未満/100mlであったものが、その後の3日間で 10^3 PFU/100mlレベルまで上昇した。レジオネラ属菌は立ち上げ後8日目に菌数が10CFU/100ml程度であったものが、その後の7日間で 10^4 CFU/100mlにまで上昇した。

別の実証試験循環式浴槽では塩素管理下で入浴を繰り返すことで、レジオネラの自然汚染を確認した。次いで、系内を6%過酸化水素で消毒・洗浄し、レジオネラ等が検出されないことを確認した後に、再度10日間にわたり延べ16名に本施設を利用させた。この間は塩素を注入し(0.3mg/L～1.5mg/Lの範囲)、レジオネラ等が検出されないことを確認した。その後、塩素注入を中止して微生物の発生を継時的に観察したところ、残留塩素が枯渇した時点ですでに一般細菌が検出されはじめ、1日後にはほぼ上限(10^6 CFU・100ml)にまで達した。宿主アメーバは2日目から、レジオネラは3日目から検出された。すなわち、塩素消毒(0.3-1.5ml/L)を行いつつ浴槽を使用しても汚染が確実に進行することが明らかとなった。

これらの実証試験循環式浴槽施設におけるレジオネラ汚染の状況は実際の温泉施設に設置された循環式浴槽と同様で、浴槽壁面、集毛器、配管内、ろ材等々においてレジオネラ汚染が確認された。

2. 配管材質に対するバイオフィーム付着調査

10種類の異なる材質の板を用意し、浴槽内に7日間浸漬した。その後板を取り出し、全面を綿棒で拭き取った。これをりん酸緩衝液に浸し菌数を確認した。各種材質1cm²当りに付着する菌数を求めた。材質は鉄・銅・sus304・アルミニウム・抗菌剤含有の亚克力板・亚克力板・透明塩ビ(PVC)・塩ビ(PVC)・ライニング管(内面PPコーティング)・サニタリー配管(sus316L)とした。その結果、レジオネラ属菌は銅に対する付着が最も少なく、1cm²当り15CFUであった。これは他種材質に付着した菌数(10^2 ～ 10^3 CFU/100ml)に比べて少ない事が確認された。塩ビ(PVC)及びサニタリー配管(sus316L)も菌数付着が比較的少なく(100CFU前後)、材質の表面が腐食を起こしていた鉄では1cm²当り2,300CFUのレジオネラ属菌が付着していた。

3. 紫外線照射

紫外線照射（波長 253.7nm）によるレジオネラ（*L. pneumophila* SG1、および *L. bozmanni*）の殺菌効果は、2mJ/cm² の照射条件で 1-log₁₀ 程度の増殖阻害が認められ、照射量と阻害効果は直線関係にあり 2-log 阻害には 4mJ/cm² であった。また、蛍光灯下で 2 時間の照明により認められる光回復は、1-log 程度であった。

このような基礎的データを基に、実機レベルでの紫外線による殺菌効果を検討したところ、浴槽水のレジオネラを 10²CFU/100ml 程度以下に抑えることができたが、ろ過槽内の菌数は 10⁴CFU/100ml レベルに達することがあり、少なくとも浴槽水より 10 から 100 倍程度高い菌数で推移していることが確認された。紫外線殺菌は局所的な殺菌にとどまるものの、長時間照射によって菌数を減少させる効果は期待できるものと判断された。

4. 塩素管理

砂ろ過装置(ろ材に微生物が付着した状態)の出口側の残留塩素濃度が 0.2~0.4ppm となるように管理した条件では、循環浴槽中に 8,000CFU/100ml 存在していたレジオネラ属菌は、塩素処理後に 10CFU 未満/100ml となり、その後は 240 時間まで 10CFU 未満を維持した。アメーバは処理前で 22PFU/100ml 存在していたが、塩素処理後で 2 未満~3PFU/100ml となり、240 時間後まで推移した。また、一般細菌数は処理前で 12,000CFU/ml 存在していたが、塩素処理後で 20CFU 以下/ml となった。

一方、人の入浴を含め有機物の混入により浴槽水中の塩素濃度は急激に減少することが示され、残留塩素濃度の管理の困難さも判明した。

5. 膜ろ過による除去

砂ろ過装置(ろ材に微生物が付着した状態)の出口側に MF(MF ろ過精度 0.45 μm)を取り付け、ろ過を連続で実施した。この時、MF の前後および浴槽水のレジオネラ属菌の挙動を確認したところ、10⁴~10⁵CFU/100ml オーダー存在していたレジオネラ属菌はろ過後に 10²~10³CFU/100ml オーダーまで減少したが、それ以下には至らなかった。ろ過開始時点での浴槽水中のレジオネラは 80,000CFU/100ml であったが、連続通水期間を通して 10³~10⁴CFU/100ml オーダーで推移し、240 時間後には 25,000CFU/100ml となった。アメーバはろ過以前に 4~40PFU/100ml、ろ過後には 2 未満~9PFU/100ml で、大きな減少にはつながらなかった。また、処理開始後 150 時間前後で MF の差圧が 0.15MPa、240 時間後で 0.21MPa まで上昇し、MF の閉塞が示唆された。

6. 過酸化水素洗浄

レジオネラ汚染が確認された実証試験循環式浴槽を使用して、6%過酸化水素と 10 mg/L 程度の塩素剤による殺菌・洗浄効果を比較した。標記の濃度になるように各薬剤を浴槽水に添加し、ろ過装置内を 2 時間循環させ、処理前後の浴槽水、ろ過材の採材や配管、集毛器、浴槽壁面などの拭き取り材料を用いて殺菌・洗浄効果を調べた。その結果、過酸化水素は高い洗浄・殺菌効果が得られたが、塩素処理ではバイオフィルムの除去が不完全との結果が得られた。なお、過酸化水素による洗浄では洗浄後の過酸化水素の完全な除去（消費）が重要となることが指摘された。すなわち、過酸化水素が残留した状態ではその後に塩素を添加しても速やかに消費（1：1 の中和）されることに注意が必要である。

7. 換水効果

循環浴槽系ではシステム内の殺菌・洗浄が伴わない換水は汚染防止にほとんど効果がないことが筆者らによって指摘されているが、実証試験循環式浴槽を用いて同様のことを追認した。すなわち、10⁵CFU/100ml 程度のレジオネラを含む浴槽水を完全換水した後に循環を開始したところ、翌日に 10⁴CFU/100ml レベルに達した。本装置のろ過槽内の汚泥には 5 x 10⁶CFU/g のレジオネラが存在しており、全換水による希釈効果は認められたものの、ろ過槽等から容易にレジオネラが供給されるところとなっていた。すなわち、ろ過槽を含めた系全体の洗浄・消毒の重要性があらためて指摘される。

8. 掛け流し式浴槽水のレジオネラ汚染調査

掛け流し式温泉浴槽水（循環系および追い炊き機能をもたない浴槽で、1日あたりの溢水量が浴槽容量以上の浴槽水）について、レジオネラ汚染状況を調査した。その結果、数日間程度の周期で完全換水が行われること、換水に際しては浴槽等の洗浄・消毒を徹底することという条件下での、短期間の連続使用ではレジオネラは不検出あるいは、きわめて低いレベルに抑えられることが示された。ただし、貯湯槽が汚染されている場合、あるいは洗浄等の徹底が図られない場合には連続使用の日数に関係なくレジオネラが検出されることが明らかになった。具体的には、レジオネラ不検出の浴槽が40%（12/32）、 $\leq 10^1$ CFU/100mlが40%（12/32）； $\leq 10^2$ CFU/100mlが20%（6/32）で、最多の菌数が190CFU/100mlを数えるにとどまった。

D：結論

実際の循環式浴槽と同様の挙動を示す実験プラントを物理的封じ込めが出来る施設内に設置した。浴槽水中にレジオネラ属菌が存在する条件で、入浴者の感染を心配することなくレジオネラ属菌処理対策を検討した。このことにより、塩素以外に提唱されている各種の処理技術、例えば塩素、紫外線、銀／銅イオンの処理、あるいはろ過膜によるフィルター効果の評価を客観的に行うことが出来るようになった。今回の試験の結果、各種材質のうち、銅はバイオフィーム付着量が少ない結果となっており、銅管表面から溶出するイオンによる殺菌効果が示唆された。今後、更に長期の試験結果を待つ必要があるが、銅管はバイオフィーム付着量が少なくなる可能性が示された。反面、鉄管のように酸化鉄の腐食生成物が嵩高く生じるものは、腐食物の量に付随してバイオフィームが多く定着する危険性があることが判明した。

紫外線殺菌装置では、 $13\text{mJ}/\text{cm}^2$ の照射線量において装置出口でレジオネラ属菌を効果的に殺菌でき、今回の試験期間10日間では効果の低下も見られないことから、実用的に浴槽水のレジオネラ属菌等の殺菌に使用できる可能性が示された。但し、浴槽水中のレジオネラ属菌数は 10^2 CFU/100mlレベルのままであり、やがて残留効果が無いことから浴槽や壁面汚れの影響を受けることが示された。今後の課題として、浴槽内壁や配管内壁の汚染が無い状態で、すなわち、ろ過槽等の汚染源を持たないシステムで紫外線殺菌によるレジオネラ属菌数を抑制する実用的処理法の確立にむけた提案が可能と考えられた。

精密ろ過膜の機能は純粹に物理的なフィルター効果のみで、処理後の浴用水に対して残留効果が期待できないこと、容易に膜の閉塞（目詰り）が生じることなどの問題から、循環式浴槽水の衛生管理の手法として精密ろ過膜の単独での使用は無効であることが確認された。

塩素剤（次亜塩素酸ナトリウム）による殺菌処理は有効であり、バイオフィーム由来のレジオネラ属菌による汚染の激しい循環系であっても浴槽水中の遊離残留塩素濃度を $0.2\sim 0.4\text{mg}/\text{L}$ の範囲に維持することで、浴槽水中の浮遊性レジオネラ属菌を不検出に維持できることが示された。すなわち、浴槽水の遊離残留塩素濃度を監視しつつ適正範囲に管理することで、レジオネラ属菌をはじめとする微生物を抑制できることが確認された。遊離残留塩素濃度の測定は比較的簡便な管理パラメータでありこの管理手法を徹底することが、浴槽水の衛生管理に有用と考えられた。今後の課題として、塩素剤の殺菌効果が低下するpHの高い水質、例えば9.0を超える水質での殺菌効果の評価及び、浴槽水中のレジオネラ属菌がVNC（viable but non-culturable）状態であるかどうかの検証が必要である。また、予備実験として過マンガン酸カリ消費量を指標とした有機物汚染量と使用者数との相関を調べたが、新たな管理指標としての可能性があるものと期待される。実証を要するが、塩素消毒と紫外線照射との効率的な組み合わせはより安全側に傾いた対策を可能とするのではないかと感触を得ている。

掛け流し式の浴槽では貯湯槽を含む衛生管理（定期的な殺菌・洗浄）により比較的容易にレジオネラ属菌等の微生物対策が可能であることが示された。温泉等にあつては、源泉の湧出量如何によって積極的に推奨できるシステムであると判断された。ただし、掛け流し式浴槽水の清掃・換水頻度とレジオネラ汚染頻度との相関は認められず、洗浄・消毒の徹底が必須の条件と考えられた。また、施設によっては貯湯槽からレジオネラが検出されており、貯湯槽を含めた洗浄・消毒が管理上重要であることが確認された。レジオネラ汚染がない施設の管理状況で共通している点は、源泉または貯湯槽への外部汚染がないこと、浴槽水の完全換水、清掃時に4ないし6%次亜塩素酸ナトリウムを浴槽壁にかけ、殺菌洗浄していることなどであった。

論文発表

1. 八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎. レジオネラ属菌の水系感染—宿主アメーバの果たす役割. 水環境学会誌. 26(1):14-19, 2003.
2. 河野喜美子、東 美香、齊藤信弘、鈴木 泉、倉 文明、前川純子、渡辺治雄、八木田健司、遠藤卓郎. <特集関連情報>循環式温泉入浴施設を入浴施設を発生源としたレジオネラ症集団感染事例—宮崎県 病原性微生物検出情報. 24(2):3-5, 2003.
3. 八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎. <特集関連情報>温水環境におけるレジオネラ宿主アメーバ類. 病原性微生物検出情報. 24(2):8-9, 2003.
4. P.R.Hunter, Y.Andersson, C.H.Von Bonsdorff, R.M.Chalmers, E.Cifuentes, D.Deere, T. Endo, M.Kadar, T.Krogh, L.Newport, A.Prescott and W.Robertson. Assessing Microbial Safety of Drinking Water—Improving Approaches and Methods. Chapter 7. Surveillance and Investigation of Contamination Incidents and Waterborne outbreaks. World Health Organization, OECD , 205-236, 2003.
5. W.Koster, T.Egli, N.Ashbolt, K.Botzenhart, N.Burlion, T.Endo, P.Grimont, E.Guillot, C.Mobilat, L.Newport, M.Niemi, P.Payment A.Prescott, P.Renaud and A.Rust. Assessing Microbial Safety of Drinking Water—Improving Approaches and Methods. Chapter 8. Analytical Methods for Microbiological Water Quality Testing. World Health Organization, OECD , 237-292, 2003.
6. 鈴木敦子、市瀬正之、松江隆之、天野祐次、寺山 武、泉山信司、遠藤 卓郎. 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況. 感染症学雑誌. 76(9):703-710, 2002.
7. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. 飲料水と健康—現在問題となっている飲料水を介した感染症—公衆衛生. 66(6): 458-461,2002.
8. 古畑勝則:レジオネラ汚染対策におけるアメーバの重要性. 防菌防黴誌, 30:217-223, 2002.
9. 堂ヶ崎知格, 新藤哲也, 古畑勝則, 福山正文: *Legionella pneumophila* に抗菌活性を示すコーヒー成分の化学構造について. YAKUGAKU ZASSHI, 122:487-494, 2002.
10. 古畑勝則, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文: *Legionella pneumophila* に対するコーヒー飲料由来フェノール化合物の抗菌作用. 防菌防黴誌, 30:291-297, 2002.
11. 古畑勝則, 岡部弥穂, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文: 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴誌, 30:555-561, 2002.
12. Yukiko Hara-kudo, Kanji Sugiyama, Mitsusaki Nishibuchi, Ashrafuzzaman Chowdhury, Jun Yatsuyanagi, Yoshimitsu Ohtomo, Akinobu Saito, Hidetoshi Nagano, Tokuhiro Nishina, Hiroshi Nakagawa , Hirotaka Konuma, Michiko Miyahara, and Susumu Kumagai. Prevalence of Pandemic Thermostable Direct Hemolysin- Producing *Vibrio parahaemolyticus* 3:K6 in Seafood and the Coastal Environment in Japan. Applied and Environmental Microbiology. 69(7):3883-3891, 2003.
13. 藪内英子、縣邦雄 日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生 感染症誌 投稿中
14. 縣邦雄 温浴施設:浴槽水の管理 空気調和・衛生工学会誌 77(8):691-696, 2003.
15. 縣邦雄 レジオネラ症の防止対策と課題について 生活と環境 47(6):19-23, 2002.

著書

著者氏名	タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版所	出版地	出版年	総ページ(ページ)
遠藤 卓郎	第 6 章 疾病サーベイランスと水系集団感染	監訳 金子美光 平田 強	水系感染症リスクのアセスメントとマネジメント WHO のガイドライン・基準への適用	技報堂出版 (株)	東京	2003	434 (113-131)
遠藤 卓郎 八木田健司 泉山 信司	・レジオネラ属菌 ・原虫	監訳 金子美光	WHO 飲料水水質ガイドライン第 2 版(Guidelines for drinking-water quality) 追補版 飲料水中の微生物因子	(社) 日本水道協会	東京	2003	130 (35-103)

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

分担研究報告書

循環式浴槽システムにおける微生物管理手法に関する研究

実証試験用の循環式浴槽システムを用いた微生物管理手法に関する研究

分担研究者：	遠藤 卓郎	(国立感染症研究所 寄生動物部)
	古畑 勝則	(麻布大学 環境保健学部)
	大井 照	(東京都板橋区保健所)
研究協力者：	八木田健司	(国立感染症研究所 寄生動物部)
	泉山 信司	(国立感染症研究所 寄生動物部)
	上野 邦夫	(東京都板橋区保健所)
	三井 公夫	(東京都板橋区保健所)
	田村 弘治	(東京都板橋区保健所)

本研究事業では、実証試験用の循環式浴槽を構築して問題点を再現するとともに、殺菌・洗浄方法、あるいは構造上の改良について実証試験を行った。当該実証試験循環浴槽において、温泉施設の浴槽と同様なレジオネラの自然汚染・増殖が認められ、浴槽壁面、集毛器、配管内、ろ過機内濾材にレジオネラによる汚染個所が確認された。詳細な汚染個所も温泉施設で使用されている循環システム内の汚染個所と一致した。以下、実証試験ろ過装置を使用して、塩素管理、紫外線殺菌装置による循環式浴槽水の殺菌効果について検討した。各種の消毒・洗浄効果は概略以下のようであった。

各種配管材質に対するバイオフィルム付着調査：レジオネラ属菌は銅に対する付着が最も少なく、1cm² 当り 15 個であった。これは他種材質に付着した菌数(10²~10³CFU/100ml)に比べて少ない事が確認された。塩ビ(PVC)及びサニタリー配管(sus316L)も菌数付着が比較的少なく(100 個前後)、材質の表面が腐食を起こしていた鉄では 1cm² 当り 2,300 個のレジオネラ属菌が付着していた。

紫外線照射(波長 253.7nm)：紫外線殺菌は残留効果がなく、局所的な殺菌にとどまるものの浴槽水のレジオネラを低濃度に抑えることができた。一方、照射が及ばない範囲、典型的にはろ過槽内の菌数は少なくとも浴槽水より 10 から 100 倍程度高い菌数で推移した。

塩素消毒：循環式浴槽において、塩素管理はきわめて有効な手段であり、残留塩素濃度が 0.2 ~0.4ppm となる管理条件では、少なくともレジオネラ属菌は検出限界以下に抑制された。ただし、消毒停止後のレジオネラを含む微生物の回復状況を考慮、すなわち一部は VNC (viable but nonculturable) と呼ばれる状態でのこることを想定すれば、持続的な塩素処理が必須と考えられた。

膜ろ過：MF 膜ろ過(ろ過精度 0.45μm)装置は短期間で目詰まりに至り、生物浄化槽との併用を目的とした浴槽内の微生物管理は期待できない結果であった。また、消毒・洗浄を伴わない浴槽水の換水はわずかな希釈効果が認められる程度で、管理方法として不相当と判断された。

1. 目的

循環式浴槽システムにおいて、ろ過器が生物浄化システムの状態(レジオネラ属菌が定着している状態)となっている場合を想定し、各種除菌処理技術を適用した場合のレジオネラ属菌の動向を調査し、各処理方式の循環式浴槽のレジオネラ属菌対策としての評価を実施した。

2. 環式浴槽システムの概要

本研究は図1. に示すフローシートの循環式浴槽の実験システムを設置して、各処理方式の評価を実施した。実験システムは、密閉した部屋内に設置し、周辺環境への汚染が無いように注意を払った。

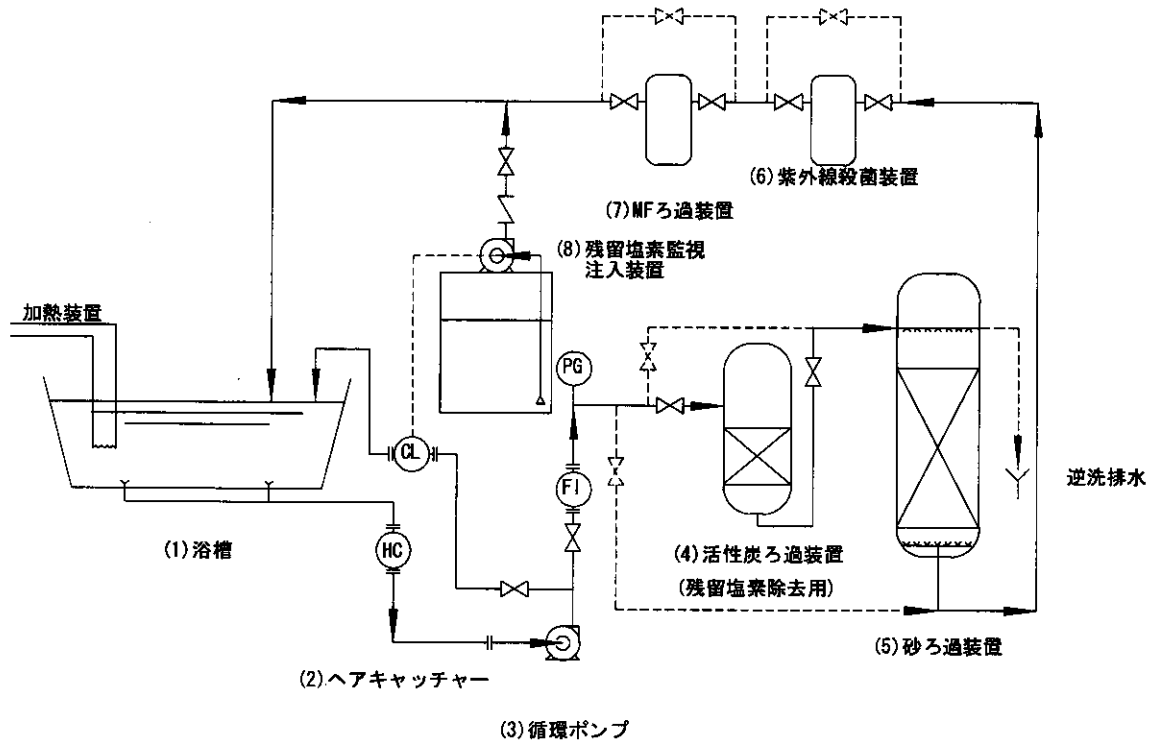


図1. 循環式浴槽システムフロー(黒色点線はバイパス配管を示す)

システム中の各項目の仕様は表 1. の通りとした。

表 1. 循環式浴槽システム仕様

No.	項目	摘要
(1)	浴槽	FRP 製、容量 500L
(2)	ヘアキャッチャー	PVC 製、容量 1L
(3)	循環ポンプ	ステンレス製うず巻きポンプ 最大吐出量 3.0m ³ /h
(4)	活性炭ろ過装置(残留塩素除去用)	FRP 製、活性炭充填量 50L
(5)	砂ろ過装置	透明塩ビ製、φ 200mm×H 1,200mm φ 0.6mm 川砂を 600mm(18.8L) 充填
(6)	紫外線殺菌装置	照射量 13mJ/cm ² (1.2m ³ /h 通水時)
(7)	MF 膜ろ過装置	MF ろ過精度 0.45 μm
(8)	残留塩素監視装置	残留塩素濃度管理と薬液注入装置一体型 タンク容量 100L ポンプ最大吐出量 38mL/min

通水量は 1.2m³/h(ろ過装置における通水速度 LV=40m/h)、水温は 42℃とした。配管の主材質は塩化ビニル(PVC)とし、配管の口径を 20A とした。

循環式浴槽システムの状況を写真 1 から 4 に示す。



写真 1 浴槽

浴槽は容量 500L の FRP 製であり、放熱を防止するためのビニールフィルムをかけている。

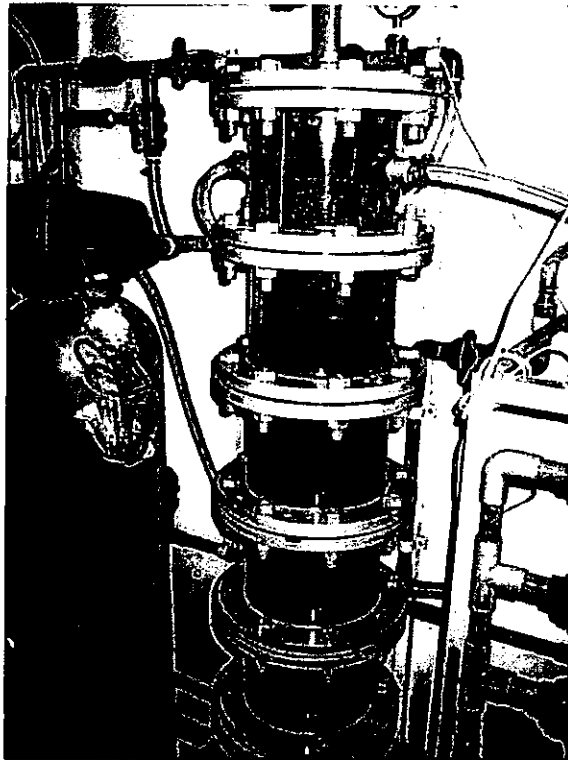


写真2 砂ろ過装置と活性炭ろ過装置

右側のろ過筒が砂ろ過装置であり、浴槽水中の濁質をろ過する。

左側の青い筒は、活性炭ろ過装置であり、

本試験系において、浴槽水中の遊離残留塩素を活性炭により除去する目的で設置した。

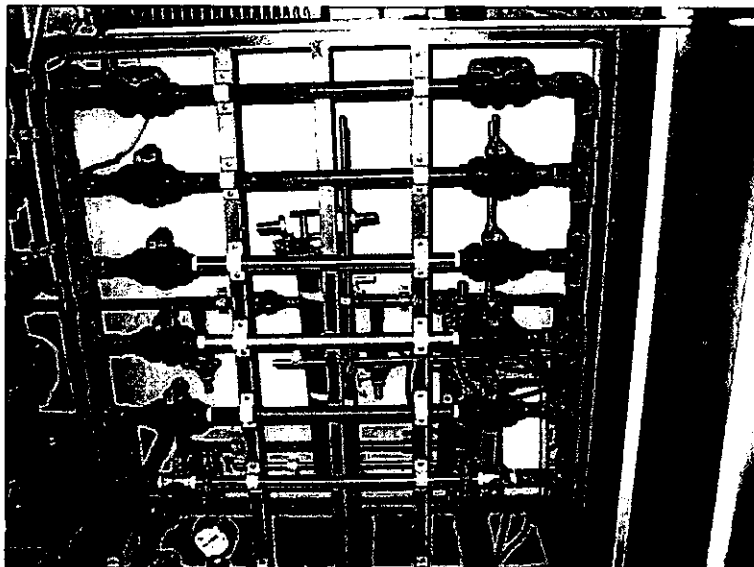


写真3 各種材質の配管

上から PVC (塩ビ)

同じく PVC (塩ビ)

ステンレス

白ガス管(SGP)

ライニング管

サニタリー管

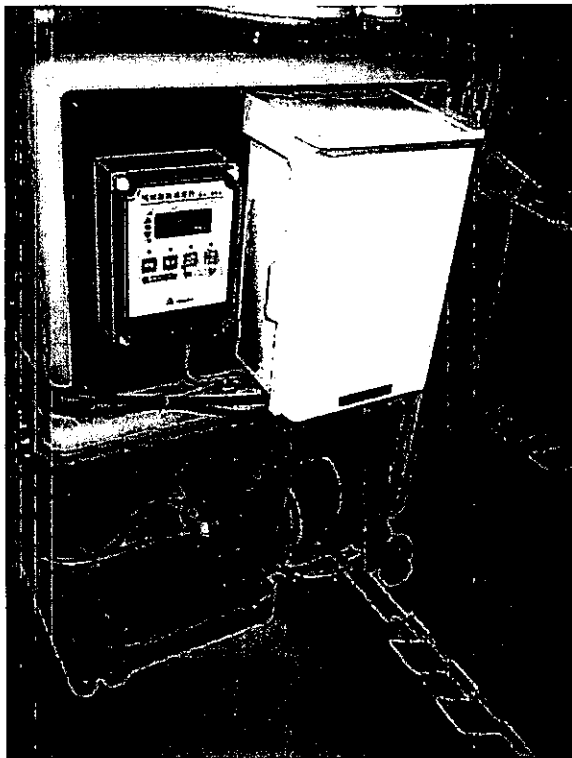


写真4 塩素濃度制御注入装置

塩素剤（次亜塩素酸ナトリウム溶液）を貯留するタンクと、薬液注入ポンプ（下置きタイプ）の組み合わせ。左の箱は、浴槽水の遊離残留塩素測定用計器であり、連続的に浴槽水中の遊離残留塩素濃度を測定して塩素剤の注入を制御している。

上記記載の実験システムを用いて、以下に示す6つの項目について、試験及び調査を実施した。

- (1) 循環ろ過試験系へのレジオネラ属菌の定着挙動
- (2) 各種配管材質に対するバイオフィーム付着調査
- (3) 紫外線処理を実施した場合の浴槽水等でのレジオネラ属菌の挙動
- (4) MF膜処理を実施した場合の浴槽水等でのレジオネラ属菌の挙動
- (5) 塩素(Cl₂)処理を実施した場合のレジオネラ属菌の挙動
- (6) 過酸化水素による洗浄に伴う残留過酸化水素の除去

3. 項目と方法

(1) 循環ろ過試験系へのレジオネラ属菌の定着挙動

循環浴槽に茨城県つくば市の水道水(水質は表2.の通り)を張り込み循環させた。投げ込み式のパイプヒータを用いて、約3日掛けて42℃に加温した。42℃で安定させた後、レジオネラ属菌で汚染されたセラミックボール(家庭用24時間風呂で約半年、無洗浄で使用されたろ材:粒径5.0mm)2Lを浴槽内に沈め(この時点、『立ち上げ開始』とした)、浴槽中のレジオネラ属菌数、一般細菌数、従属栄養細菌数

(但し、培養は 42℃7 日間とした)、アメーバ数を調査した。立ち上げ開始 10 日後で各菌数の上昇が確認されたので、浴槽に沈めたる材を取り出した。尚、この時、塩素剤の添加は実施しなかった。

表 2. 茨城県つくば市水道水の水質(2002 年 11 月 20 日採取)

項目	pH	電気伝導率	全硬度*	カルシウム硬度*	マグネシウム硬度*	鉄	酸消費量 (pH4.8)*	塩化物イオン	シリカ
値	7.5	34	93	57	36	0.12	48	58	19

単位：pH、電気伝導率(mS/m)以外は mg/L である。

尚、※を記した項目については、単位は mg/L(as CaCO₃)で表記される。

(2) 各種配管材質に対するバイオフィーム付着調査

上記(1)でレジオネラ属菌が浴槽水内で確認された後、8 種類の異なる材質の板(材質は鉄・銅・SUS304・アルミニウム・抗菌剤(抗菌剤成分不明)含有の亚克力板・亚克力板・透明塩化ビニル(PVC)・塩化ビニル(PVC)、寸法 W 20×D 60×H 2mm)及び 2 種類の口径 20A の配管(材質はライニング管(内面 PE コーティング)・サニタリー配管(SUS316L)、内径 20mm、管長 150mm)を用意し、浴槽水を 1.2m³/h で循環させながら、浴槽内に 7 日間浸漬した。

その後板及び配管を取り出し、板については全面(総面積 52cm²)を、管については両端より 83mm ずつ(総面積 52cm²)を綿棒で拭き取った。これを 5mL のりん酸緩衝液に浸し、レジオネラ属菌数、一般細菌数、従属栄養細菌数(42℃、7 日間培養)、アメーバ数を調査した。この結果に基づき、各種材質 1cm²当りに付着する菌数を求めた。試験は 2 回(n=2)実施した。

(3) 紫外線処理を実施した場合の浴槽水等でのレジオネラ属菌の挙動

予備的実験として、レジオネラ属菌(*L. pneumophila*, SG1、および *L. bozmanni*)を紫外線照射実験に使用した。BCYE α 寒天培地上に生育した本菌を白金耳で少量取り、滅菌脱イオン水に懸濁し、McFarland の No. 1 標準濁度を用いて濃度を調整した(≒3×10⁸cells/mL)。ここから 200 μL の培養液を 9.8 mL の滅菌脱イオン水の入った 6cm シャーレに取り、紫外線照射実験に供した。紫外線照射後の菌液は滅菌脱イオン水を用いて段階希釈を行い、希釈段階ごとに 3 回ずつ 25 μL を BCYE α 培地に滴下した(Miles&Misla 法)。培地は安全キャビネット内で充分乾燥させた後に 35℃で 3~6 日間にわたり倒置培養した。生菌数は CFU として計数したが、MPN 法を用いた評価と大きな差は見られなかった(data not shown)。

紫外線ランプは極大波長が 254 nm の 5 W 低圧水銀ランプ(岩崎製作所)を 2 本用いた。クランプで固定したランプの直下約 40 cm にジアルジア浮遊液 10 mL

を入れた 60×15 mm シャーレ (Corning430166) を置き (水層: 4.7 mm)、 $0.10\text{mW}/\text{cm}^2$ の強度で所定の線量を照射した。線量計には紫外線積算光量計 UIT-150-A +UVD-S254 (ウシオ電機) を使用した。光回復の条件として 2 時間室温の条件下において、プラスチックカバー付きの 20W 自然色蛍光灯 (FL20SS・ENW/18、National) の下 73cm に静置した。

実験プラントはろ過装置中の砂に生物群が定着している状態で、砂ろ過装置の出口から 2m 後段側、浴槽への吐出口の手前 6m の位置に紫外線殺菌装置を取り付けた。ろ過装置を除いたシステム全体を殺菌する為に、常時遊離残留塩素濃度が 1.5~2.0ppm となるように塩素管理(以下、「高濃度塩素管理」とする)を実施し、5 日間連続で $1.2\text{m}^3/\text{h}$ で循環させた。塩素管理は残留塩素監視注入装置を用いた。塩素剤は食添用 12%濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液を使用した。

尚、砂ろ過装置の前段に活性炭ろ過装置を設置して、遊離の残留塩素を除去した。

この時、活性炭ろ過装置の出口で遊離残留塩素濃度が 0 である事を確認した。

高濃度塩素管理終了時点で、浴槽水中でレジオネラ属菌が検出されない事を確認した後、塩素監視注入装置を停止した。(以下、「塩素管理停止」とする。)

塩素管理停止後 $1.2\text{m}^3/\text{h}$ で循環させながら、紫外線照射処理を照射量 $13\text{mJ}/\text{cm}^2$ として 240 時間連続で実施した。この時、紫外線殺菌装置の前段(紫外線照射前)と後段(紫外線照射後)でのレジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌(42°C 、7 日間培養)、アメーバ、及び浴槽中のレジオネラ属菌の挙動を調査した。

(4) MF 膜処理を実施した場合の浴槽水等でのレジオネラ属菌の挙動

ろ過装置中の砂に生物群が定着しており、なおかつ循環ラインの配管内部にもバイオフィルムが付着している状態で、砂ろ過装置の出口から 2.5m 後段側、浴槽への吐出口の手前 5.5m の位置に MF 膜装置(MF ろ過精度 $0.45\mu\text{m}$) を取り付けた。MF 膜装置設置後、 $1.2\text{m}^3/\text{h}$ で循環させ、MF 膜によるろ過を 240 時間連続で実施した。この時、MF 膜装置の前段(MF ろ過処理前)と後段(MF ろ過処理後)でのレジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌(42°C 、7 日間培養)、アメーバ、及び浴槽中のレジオネラ属菌の挙動を調査した。

また、MF 膜入口と出口での圧力を測定し、MF 膜処理による差圧の上昇挙動を確認した。

(5) 塩素(Cl_2) 処理を実施した場合のレジオネラ属菌の挙動

残留塩素監視注入装置を使用し、砂ろ過装置の中に生物群が定着している状態で、浴槽中の遊離残留塩素濃度が 0.2~0.4ppm となるように塩素管理を実施した。塩素の注入は砂ろ過装置の後段とした。塩素剤は 12%濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液(食品添加物)を使用した。

砂ろ過装置の前段に活性炭ろ過装置(残留塩素除去用、活性炭量 50L)を取り付け、

残留塩素が砂ろ過装置に漏れないように処置を行った。活性炭ろ過装置の出口で遊離残留塩素濃度が0である事を確認した。

上記のシステムにおいて、1.2m³/hで循環させながら、浴槽中の遊離残留塩素濃度が0.2～0.4ppmとなるように塩素管理を実施しながら240時間連続で通水した。この時、砂ろ過装置出口直後と循環浴槽水中のレジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌(42℃、7日間培養)、アメーバの挙動を調査した。

(6) 過酸化水素による洗浄と残留過酸化水素の除去

循環浴槽を過酸化水素で洗浄した後、過酸化水素が残留した条件で塩素を添加しても塩素が検出されない事態が想定される。そこで、過酸化水素残留条件で塩素を添加し、残留塩素濃度(DPD、o-トリジン、シリンガルダジン)とpH、過酸化水素濃度を測定し、事例の再現を確認した。また、あわせて残留塩素濃度測定法の妥当性も確認した。なお、次亜塩素酸ナトリウム溶液(以下、次亜ソ)をつくば市水R0処理水で適宜希釈し、KI滴定法により、有効塩素濃度を求めた(残留有効塩素=3.84%)。

4. 結果及び考察

(1) 循環ろ過試験系へのレジオネラ属菌の定着挙動

結果を表3.及び図2.～図5.に示す。

① レジオネラ属菌

レジオネラ属菌は、立ち上げ開始後7日までは検出限界未満(10個未満/100mL)であったが、8日目に10個/100mL検出され、10日目に120個、14日目に7,100個、17日目に60,000個(いずれも100mL当たり)となった。

一般細菌、従属栄養細菌に比べ、増殖の速度が遅い事が示されたが、循環浴槽システム中に汚れが無くとも、2週間程度でシステム内にレジオネラ属菌が定着する事が示された。

アメーバ数が立ち上げ開始後6日目(2個/100mL)～8日目(1,700個/100mL)で上昇しており、それに追従する形でレジオネラ属菌数が立ち上げ7日目(検出限界未満/100mL)～10日目(120個/100mL)で上昇した。

② 一般細菌

一般細菌は、立ち上げ開始直後で15個/mL存在し、4日目に700個、6日目に66,000個となった。7日目に10,000個となり、菌数が減少したが、8日目に40,000個、12日目に210,000個、17日目には500,000個(いずれも1mL当たり)となった。

③ 従属栄養細菌

従属栄養細菌は立ち上げ開始直後で 40 個/mL 存在し、4 日目に 9,500 個、6 日目に 100,000 個(いずれも 1mL 当たり)となった。レジオネラ属菌、一般細菌に比べ、従属栄養細菌の増加速度が速いことが示された。

その後菌数が減少し、8 日目に 29,000 個となったが、11 日目には 80,000 個、18 日目には 67,000 個(いずれも 1mL 当たり)となった。

6 日目までは菌数の急激な上昇が確認されたが、6 日目以降 18 日目まで、菌数は 10^4 オーダー/mL で安定した。

④ アメーバ

アメーバは立ち上げ開始直後で 1 個/100mL 検出され、6 日目までは 2 個であったが、7 日目に 22 個、8 日目に 1,700 個(いずれも 100mL 当たり)と急激な上昇が確認された。

実際の循環式浴槽と同様の微生物類の挙動を示すモデルを、物理的封じ込めが出来る施設内に確立することが出来た。浴槽水中にレジオネラ属菌が存在する条件で、入浴者の感染を心配することなくレジオネラ属菌処理対策を検討することが出来る。

このことにより、塩素処理の効果、更には塩素以外に提唱されている各種の処理技術、例えば二酸化塩素、オゾン、紫外線、銀/銅イオンの処理効果の評価を客観的に行うことが出来るようになった。

表 3. 循環ろ過立ち上げ後(汚染されたる材投入後)の各菌類の菌数推移結果

経過日数 (日)	レジオネラ属菌数 (個/100mL)	一般細菌数 (個/mL)	従属栄養細菌数 (個/mL)	アメーバ数 (個/100mL)
0	<10	15	40	1
4	<10	700	9,500	2
5	<10	2,000	42,000	2
6	<10	66,000	100,000	2
7	<10	10,000	84,000	22
8	10	40,000	29,000	1,700
10	120	31,000	45,000	1,800
11	230	81,000	80,000	3,600
12	1,900	210,000	70,000	3,400
13	6,500	270,000	92,000	5,700
14	7,100	260,000	60,000	6,000
17	60,000	500,000	42,000	12,000
18	57,000	470,000	67,000	10,000

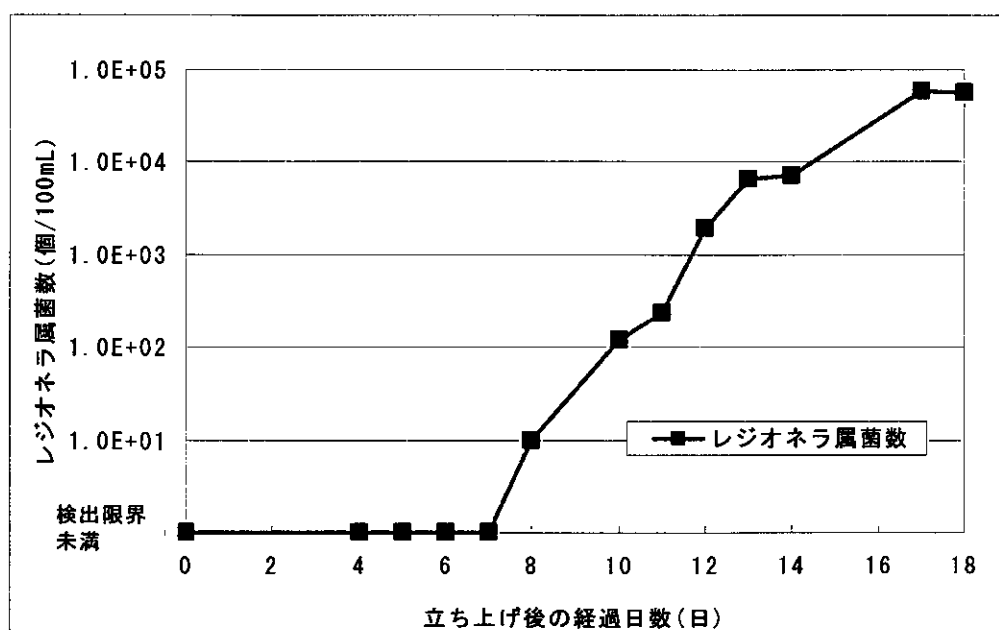


図 2. 循環ろ過立ち上げ時のレジオネラ属菌数の推移