

- ・ 集毛器内網のレジオネラ付着状況はステンレス網、銅網で大差がみられず、材質の違いによる付着防止は実効性に欠けるものと判断された。
- ・ 配管材質ではテフロンライニング>サニタリー配管>PP=VP=銅=酸化チタンコーティング>SUSの順に付着防止効果が認められた。特に、テフロンライニングの防止効果は高かったが、コスト面から考えると現場への応用は現在のところ難しく、薬剤洗浄で除菌が可能なVP配管などが現場に適していると判断された。
- ・ パッキンではテフロン加工が最も付着防止効果が高く、付着後の薬剤による洗浄・除去も容易であった。一方、EPDM等のゴム製はバイオフィルムの付着が著しく、薬剤による洗浄・殺菌効果が期待できないことがわかった。実際の入浴施設で、循環装置内の殺菌・洗浄後も少数のレジオネラが検出されるケースがあり、その原因としてこのようなゴムパッキンのバイオフィルムの存在が推定される。レジオネラの汚染要因を少なくするためにも、現場で広く使われているゴム製パッキンは、コスト面での問題もない市販のテフロン加工パッキンに交換することが提案できる。

#### E. 結論

1. 集毛器では素材の違いによるバイオフィルム付着の差は認められなかった。
2. 配管では材質によりバイオフィルムの付着に差が認められた。テフロンライニングが最もレジオネラ付着が少なかった。
3. パッキンではテフロン加工のパッキンが最もバイオフィルムの付着が少なく、さらに洗浄によりバイオフィルムの剥離が容易であることが示された。

厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)  
分担研究報告書

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

各種理化学項目とレジオネラ属菌類の相関性に関する検討

主任研究者:	遠藤 卓郎	国立感染症研究所
分担研究者:	荒井 桂子	横浜市衛生研究所
研究協力者:	磯田 信一	横浜市衛生研究所
	吉川 循江	横浜市衛生研究所
	田中 礼子	横浜市衛生研究所

研究要旨:

循環水を用いた浴場施設でレジオネラ肺炎の集団発生し、数名が死亡する事件が多発した。レジオネラ属菌が増殖した浴槽水のミストを吸入して、レジオネラ肺炎に感染したと考えられている。レジオネラ属菌は土壌や湖沼等に存在するが、天然に存在する菌濃度は低い。一方、レジオネラ肺炎の集団発生が起こった浴場施設の浴槽水のレジオネラ属菌濃度は非常に高い。これは浴槽水中にレジオネラ属菌を増殖・供給するシステムが浴場施設内に存在することが推測され、そのひとつがバイオフィームであると考えられる。そこで、循環式浴槽を用いた公衆浴場を対象とし、浴槽水、バイオフィームの発生場所の拭取り等(浴槽壁面、ヘアキャッチャー壁面、ろ過装置)を採取し、レジオネラ属菌とバイオフィームの関連を調査した。また、レジオネラ属菌及びバイオフィーム量と簡易的に測定できる理化学項目の関連を調査した。

その結果、循環系の配管等に生成されるバイオフィーム量が多いとレジオネラ属菌が検出される確率が高くなることが判明した。

A. 研究目的

浴場施設の多くは循環式浴槽を用いており、循環水に増殖するレジオネラ属菌の管理が重要になっている。循環水へのレジオネラ属菌供給源はろ過装置等の内壁に発生するバイオフィームと推測されており、その制御と効率的な除去が課題となっている。当該研究では、第一段階としてろ過装置を含む循環系内壁面に発生するバイオフィーム量と浴槽水に浮遊するレジオネラ属菌の実態を把握し、関連を明らか

にする。あわせて、レジオネラ属菌及びバイオフィルム量と簡易的に測定できる理化学項目を調査した。

また、リアルタイム PCR を用いて培養法で把握できないレジオネラ属菌の測定を行い、バイオフィルム量との相関を調査した。

## B. 研究方法

### (1) 対象施設

循環式浴槽を用いた公衆浴場 19 施設の白湯浴槽。19 施設とも原水は水道水を使用していた。

### (2) 試料

各施設から浴槽水、浴槽壁面拭取り、ヘアキャッチャー壁面拭取り、ろ過装置試料（ろ材、逆洗水、ろ過装置内水等）の 4 種類の試料を採取した。拭取り試料は内壁面 10cm×10cm を滅菌綿棒で擦り、綿棒を 10ml 生理食塩水内に懸濁した。

### (3) 検査項目

各試料の検査項目を表 1 に示した。

表 1 各試料に行った検査項目

試料	浴槽水	浴槽壁面拭取り	ヘアキャッチャー壁面拭取り	ろ過装置試料
検査項目	レジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌群、過マンガン酸カリウム消費量、電気伝導度、濁度、残留塩素、水温、pH	レジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌群		

### (4) 検査方法

#### ① レジオネラ属菌（培養法）

- ・ 浴槽水、逆洗水、ろ過装置内水：新版レジオネラ症防止指針に準じ、冷却遠心濃縮、加熱処理で測定を行った。
- ・ 拭取り試料：綿棒を生理食塩水内でじゅうぶんに懸濁し、50℃20 分加温処理した試料水 1ml 及び 0.1ml を孔径 0.22 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過した。ろ過後のメンブランフィルターを WYO $\alpha$  及び MWY 培地に貼付した。その後は新版レジオネラ症防止指針のメンブランフィルター貼付法に従った。結果を懸濁した生理食塩水 10ml あたりに換算した。
- ・ ろ材：ろ材 10g を 200ml 生理食塩水内で十分に懸濁し、上清を試料とした。新版レジオネラ症防止指針に準じ、冷却遠心濃縮、加熱処理後に培地に接種した。結果をろ材 1g あたりに換算した。

## ② レジオネラ属菌（リアルタイム PCR 法）

- ・ 浴槽水、逆洗水、ろ過装置内水：100ml を孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過し、DNA 抽出剤 (TAKARA DEXPAT) に懸濁させた。その後、100°C、10 分間加熱し、25°C、12000rpm、10 分間遠心した。抽出上清をイソプロパノールとグリコーゲンを分注したチューブへ採り、再び 25°C で 10 分間、14000rpm で遠心し沈渣にエタノールを入れ、再度 25°C で 10 分間、14000rpm 遠心した。その後、上清を除去し、風乾して沈渣を回収した。これを試料としてリアルタイム PCR（タカラバイオ社製 Smart Cycler）を行った。

③ 一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌群、過マンガン酸カリウム消費量、電気伝導度、濁度、残留塩素、水温、pH等の項目につき上水試験方法及び衛生試験法に準じて検査した。

## C. 研究結果

各試料のレジオネラ属菌検出結果を表 2 に示した。レジオネラ属菌が検出された試料は浴槽水 2 試料（検出率 10.5%）、浴槽壁面拭取り 2 試料（検出率 10.5%）、ヘアキャッチャー拭取り 1 試料（検出率 5.3%）であった。検出されたレジオネラ属菌の菌種及び血清群は、浴槽水 18 から *Legionella pneumophila* SG1 及び SG4 が、浴槽水 3 から *Legionella* spp. (現在解析中) が、浴槽壁面拭取り 2 及び 3 から *L. pneumophila* SG1 が、浴槽壁面拭取り 3 から *Legionella* spp. (現在解析中) が、ヘアキャッチャー拭取り 19 から *L. pneumophila* SG1 及び SG5 が検出された。

次に浴槽水の結果を表 3 に示した。レジオネラ属菌が検出された浴槽水は 2 試料で、それらの検出菌数は  $10^1$  cfu/ml、および  $10^2$  cfu/ml が各 1 試料であった。一般細菌が検出されたのは 6 試料（検出率 32.6%）であった。検出菌数は  $10^0$  cfu/ml が 2 試料、 $10^1$  cfu/ml が 3 試料、 $10^2$  cfu/ml が 1 試料であった。従属栄養細菌が検出されたのは 10 試料（検出率 52.6%）であった。検出菌数は  $10^0$  cfu/ml が 5 試料、 $10^1$  cfu/ml が 1 試料、 $10^2$  cfu/ml が 3 試料、 $10^3$  cfu/ml が 1 試料であった。大腸菌群が検出された試料はなかった。酸化還元電位は 466~916mV、過マンガン酸カリウム消費量は 1.6~27mg/l であった。濁度は 0.1 未満が 8 試料で、0.1~0.8 度が 11 試料であった。残留塩素は不検出 (<0.1mg/l) が 2 試料、0.1~1.0 mg/l が 8 試料、1.1 mg/l 以上が 9 試料であった。

浴槽壁面拭取り、ヘアキャッチャー壁面拭取り及びろ過装置試料の微生物検査結果を表 4 及び表 5 に示した。浴槽壁面拭取り 19 試料中 8 試料から一般細菌が検出され、15 試料から従属栄養細菌が検出された。浴槽水からは検出されなかった大腸菌群が 1 試料から検出された。ヘアキャッチャー拭取り 15 試料中 5 試料から一般細菌が検出され、12 試料から従属栄養細菌が検出され、1 試料から大腸菌群が検出さ

れた。ろ過装置試料はろ過装置内部の水 4 試料中 1 試料から一般細菌が検出され、2 試料から従属栄養細菌が検出された。ろ材 2 試料中 2 試料から一般細菌及び従属栄養細菌が検出された。逆洗水 4 試料中 3 試料から一般細菌が検出され、4 試料から従属栄養細菌が検出された。

次に、リアルタイム PCR を用いて、浴槽水及び拭き取り試料からレジオネラ属菌の検出を試みた結果を表 6 に示した。浴槽 6 試料、浴槽壁面拭き取り 10 試料、ヘアキャッチャー拭取り 9 試料、逆洗水 4 試料、ろ過装置内部の水 1 試料、ろ材 2 試料からレジオネラ属菌が検出された。予備的なデータであるが、図 1 に示すように浴槽水を対象としたリアルタイム PCR の結果と従属栄養細菌数との間に閾値が認められた。すなわち、従属栄養細菌数が  $10^2$ cfu/ml を境にして、それ以上では PCR 陽性、それ以下で PCR 陰性となった。一般細菌数との間においても同様の傾向が認められた。今後、この点を精査する予定である。

#### D. 考察

##### 1 バイオフィルムの指標として測定を行った一般細菌及び従属栄養細菌とレジオネラ属菌検出状況

浴槽水及び拭き取り試料から培養法でレジオネラ属菌が検出された施設 2、3、18 及び 19 の浴槽壁面及びヘアキャッチャー壁面の拭き取り試料の一般細菌及び従属栄養細菌の平均は 13,000cfu/ml 及び 45,000cfu/ml であった。一方、レジオネラ属菌が検出されていない施設の浴槽壁面及びヘアキャッチャー壁面の拭き取り試料の一般細菌及び従属栄養細菌の平均は 12cfu/ml 及び 140cfu/ml であった。そこで、浴槽壁面及びヘアキャッチャー壁面の拭き取り試料のレジオネラ属菌と一般細菌及び従属栄養細菌の相関をみたところ、レジオネラ属菌と一般細菌は危険率 0.001、相関係数 0.804、レジオネラ属菌と従属栄養細菌は危険率 0.001、相関係数 0.780、でそれぞれ相関が認められた。拭き取り試料の一般細菌及び従属栄養細菌数をバイオフィルムの指標として考えると、配管等の内壁面に発生したバイオフィルム量が多い時、レジオネラ属菌が検出される確率が高い傾向があった。

リアルタイム PCR を用いたレジオネラ属菌検査では、培養法に比較して、多くの試料から陽性反応が示された。これは、培養できない状態のレジオネラ属菌が存在していても PCR 法では検出できること、PCR 法が培養法よりも検出感度が高いこと等が原因としてあげられる。ただし、予備的な実験結果であるが、浴槽水を対象としたレジオネラのリアルタイム PCR 結果と従属栄養細菌数との間に閾値関係が認められた点は注目される。すなわち、従属栄養細菌数の  $10^2$ cfu/ml を境にしてそれ以上では PCR 陽性、それ以下で PCR 陰性となった。今後、この点を精査する予定である。なお、この PCR 法の結果で浴槽壁面及びヘアキャッチャー壁面の拭き取り試料からレジオネラ属菌が検出された試料の一般細菌及び従属栄養細菌の平均値はそれぞれ 5,100cfu/ml 及び 18,000cfu/ml であった。一方、レジオネラ属菌が検出

されていない拭き取り試料の一般細菌及び従属栄養細菌の平均は 0.1cfu/ml 及び 16cfu/ml であった。

## 2 バイオフィルム量と簡易指標

配管壁面等に生成されるバイオフィルムの量は、簡易的に調べることは難しい。そこで、浴槽水の濁度、過マンガン酸カリウム消費量、酸化還元電位等を測定し、バイオフィルム量の指標とした拭き取り試料の一般細菌及び従属栄養細菌との関連を調査した。その結果、バイオフィルム量の指標とした拭き取り試料の一般細菌及び従属栄養細菌と浴槽水中の濁度、過マンガン酸カリウム消費量、酸化還元電位等のいずれの検査値とも相関が認められなかった。

## E. 結論

1. 拭き取り試料の一般細菌及び従属栄養細菌数をバイオフィルムの指標として考えると、レジオネラ属菌が検出された施設においては配管等の内壁面に発生したバイオフィルム量が多い傾向であった。
2. その一方で、バイオフィルム量が多いことが必ずしもレジオネラ検出に繋がらなかった。しかしながら、バイオフィルムの量が多いことは宿主微生物の繁殖の場が形成されていることを示し、ひいてはレジオネラの増殖の場が確保されていることを示すもので、従属栄養細菌数等の指標性は評価できるものと考えられた。
3. 予備的実験ではあるが、浴槽水中のレジオネラを対象としたリアルタイム PCR 試験において陽性反応は従属栄養細菌数が  $10^2$ cfu/ml を境にそれ以上で認められた。

表2 各試料のレジオネラ属菌検出結果

検体番号	浴槽水	浴槽壁面拭 取り	ヘアキャッチャー 壁面拭取り	逆洗水	ろ過装置内 部の水	ろ材
	(cfu/100ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/100ml)	(cfu/100ml)	(cfu/g)
1	<10	0	0			
2	<10	30	0			
3	600	150				
4	<10	0	0		<10	
5	<10	0	0			
6	<10	0	0			
7	<10	0	0			
8	<10	0	0			
9	<10	0				<10
10	<10	0		<10		
11	<10	0	0		<10	
12	<10	0	0			
13	<10	0		<10		
14	<10	0	0			<10
15	<10	0	0		<10	
16	<10	0	0	<10		
17	<10	0	0	<10		
18	90	0	0			
19	<10	0	120		<10	

表中黒マスは試料採取なし

表3 浴槽水の水質検査結果

検体番号	レジオネ ラ属菌	従属栄養		酸化還元		濁度 (度)	過マンガ ン酸カリウム	水温 (°C)	pH	残留塩素 (mg/L)
	(cfu/100ml)	一般細菌 (cfu/ml)	細菌 (cfu/ml)	大腸菌群 (cfu/ml)	電位 (mV)		消費量 (mg/L)			
1	<10	1	1	0	812	0.2	4.6	42.5	7.4	1.5
2	<10	0	0	0	839	0.1	8.9	41.5	7.4	1.0
3	600	270	4900	0	723	0.6	13	42	>7.6	0.2
4	<10	0	0	0	847	<0.1	1.6	31.5	7.6	0.5
5	<10	0	0	0	916	<0.1	1.8	41	7.2	>20
6	<10	0	130	0	796	<0.1	4.6	41	7.3	1.0
7	<10	0	0	0	872	0.2	7.9	42	7.4	>20
8	<10	0	7	0	837	<0.1	6.9	43	7.4	1.5
9	<10	0	0	0	905	<0.1	12	43	6.2	>20
10	<10	0	1	0	880	0.3	2.9	41.5	8.2	2.0
11	<10	0	0	0	907	0.4	10	46	7.2	2.0
12	<10	33	66	0	706	0.5	11	40	7.2	不検出
13	<10	1	1	0	790	0.3	5.1	45	7.6	不検出
14	<10	0	0	0	824	0.3	27	32.5	6.8	2.0
15	<10	0	0	0	590	<0.1	6.1	40.2	7.6	1.0
16	<10	0	0	0	824	<0.1	2.7	31.1	7.5	1.5
17	<10	0	1	0	870	<0.1	4.2	43.5	6.8	0.5
18	90	30	420	0	466	0.3	11	39.5	7.6	0.2
19	<10	51	110	0	705	0.8	6.0	40	7.4	0.1

表4 浴槽壁面拭取り、ヘアキャッチャー壁面拭取りの微生物検査結果

検体 番号	浴槽壁面拭取り				ヘアキャッチャー壁面拭取り			
	レジオネラ属菌	一般細菌	従属栄養細菌	大腸菌群	レジオネラ属菌	一般細菌	従属栄養細菌	大腸菌群
	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)
1	0	0	50	0	0	0	30	0
2	30	590	6100	0	0	1100	5500	1
3	150	63000	250000	2				
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	30	0	0	0	10	0
7	0	1	50	0	0	2	65	0
8	0	0	10	0	0	0	10	0
9	0	0	120	0				
10	0	2	15	0				
11	0	1	120	0	0	0	10	0
12	0	100	120	0	0	220	3100	0
13	0	0	20	0				
14	0	0	15	0	0	0	30	0
15	0	0	0	0	0	0	5	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	5	0	0	0	1	0
18	0	3400	12000	0	0	8900	22000	0
19	0	7900	12000	0	120	6500	9100	1

表中黒マスは試料採取なし

表5 ろ過装置試料の微生物検査結果

検体 番号	ろ過装置試料			
	レジオネラ属菌	一般細菌	従属栄養細菌	大腸菌群
	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)	(cfu/ml)
1				
2				
3				
4	<10(ろ過器内部の水)	0	0	0
5				
6				
7				
8				
9	<10(ろ材)	90	1200	0
10	<10(逆洗水)	300	6800	0
11	<10(ろ過器内部の水)	0	5	0
12				
13	<10(逆洗水)	61	1100	0
14	<10(ろ材)	35	980	0
15	<10(ろ過器内部の水)	0	0	0
16	<10(逆洗水)	10	650	0
17	<10(逆洗水)	0	220	0
18				
19	<10(ろ過器内部の水)	500	3100	0

表中黒マスは試料採取なし



表 6 リアルタイム PCR によるレジオネラ属菌検出結果

検体番号	ヘアキャッチャー-壁面			ろ過装置内部		ろ材
	浴槽水 (cfu/100ml)	浴槽壁面拭き取り (cfu/ml)	拭き取り (cfu/ml)	逆洗水 (cfu/100ml)	の水 (cfu/100ml)	
1	陰性	陽性	陽性			
2	陽性	陽性	陽性			
3	陽性	陽性				
4	陰性	陰性	陰性		陰性	
5	陰性	陰性	陰性			
6	陰性	陰性	陰性			
7	陰性	陽性	陽性			
8	陰性	陰性	陰性			
9	陽性	陽性				陽性
10	陰性	陽性		陽性		
11	陰性	陰性	陰性		陰性	
12	陽性	陽性	陽性			
13	陰性	陰性		陽性		
14	陰性	陰性	陽性			陽性
15	陰性	陰性	陰性		陰性	
16	陰性	陰性	陽性	陽性		
17	陰性	陽性	陽性	陽性		
18	陽性	陰性	陽性			
19	陽性	陽性	陽性		陽性	

表中黒マスは試料採取なし

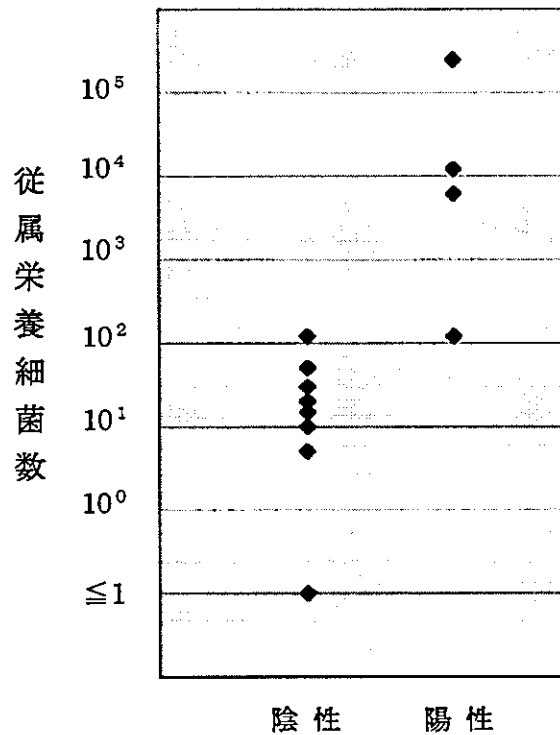


図 1. リアルタイム PCR による浴槽水のレジオネラ検出と従属栄養細菌との相関

厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)  
分担研究報告書

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

浴槽水中等の微生物類の増殖モデル試験

主任研究者:	遠藤 卓郎	国立感染症研究所
分担研究者:	八木田健司	国立感染症研究所
	泉山 信司	国立感染症研究所
	縣 邦雄	アクアス つくば総合研究所
研究協力者:	藪崎 裕昭	アクアス つくば総合研究所

研究概要

貯湯槽内での微生物の定着・増殖の経緯を把握し、貯湯槽の管理に適切な指標の開発を企図した。当該年度は、各種の原湯を大気開放状態で水温を 42℃に保ち、循環式試験（水を常時循環させる方式）及びバッチ式試験（循環経路を有しない方式）の 2 式で微生物類の増殖挙動を継続的に観察し、水質、遊離残留塩素の有無など管理状態と微生物汚染の関連について評価を行った。

A. 研究目的

現在のところ、貯湯槽の微生物汚染（バイオフィーム形成）の管理は貯湯槽内の水温を 60℃以上に保つことが示されているものの、それ以外に適切な指標が示されていない。そのため、指針では『定期的に貯湯槽内の生物膜除去を行うための清掃及び消毒を行うこと』と明記(厚生労働省告示第二百六十四号)されている。研究では浴用原水の含有する有機物量を過マンガン酸カリウム消費量、全有機炭素量 (Total Organic Carbon: TOC) および同化有機炭素量 (Assimilable Organic Carbon: AOC) 等を測定し、従属栄養細菌数、一般細菌数、*Legionella* 属菌数、ならびに宿主アメーバ類などの浴用原水中に繁殖する微生物数との関連性を検討する。これらの結果より、貯湯槽中の *Legionella* 属菌の発生に至るバイオフィーム形成量を把握し、その指標としての有用性の評価を試みた。

B. 研究方法

1. 循環式試験

1.1. 試験方法

循環式試験モデルのシステムフローを図 1 に示した。実際の試験装置の外観は図 2 の通りである。また、システムにおける各項目の仕様を表 1 に示した。

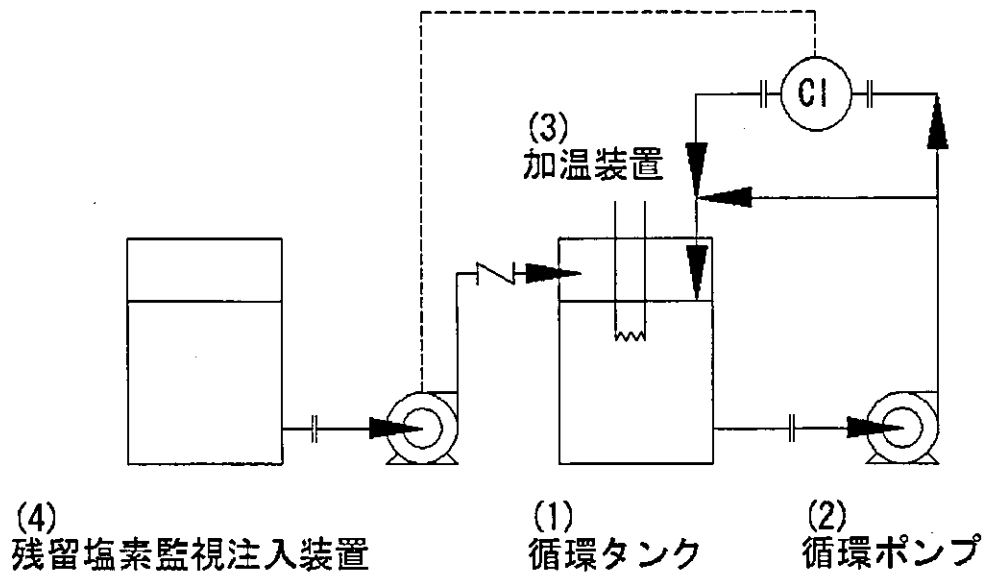


図 1 . 循環式試験システム

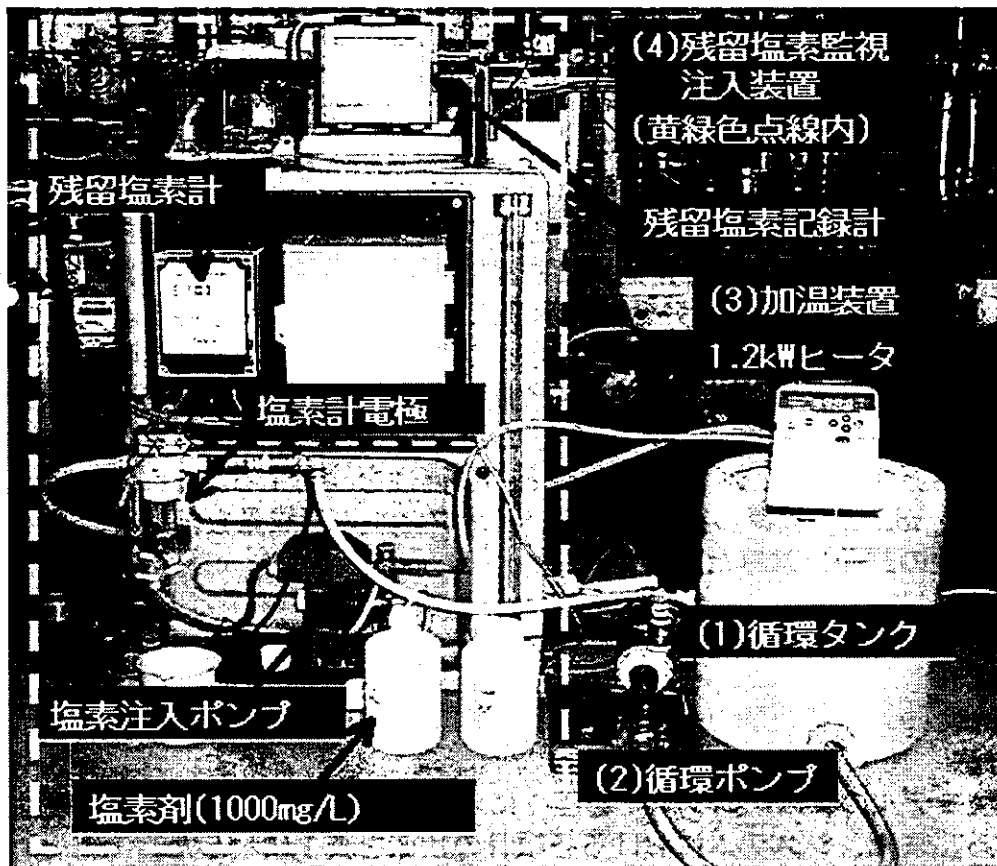


図 2 . 循環式試験システム外観

表1. 循環式試験システムの仕様

No.	項目	摘要
(1)	循環タンク	PE製、最大容量 25L
(2)	循環ポンプ	FRP ヘッド製マグネットポンプ 循環水量 60L/h
(3)	加温装置	電気容量 1.2kW、 市販用恒温水槽ヒータを使用
(4)	残留塩素監視注入装置	残留塩素濃度管理と薬液注入装置 一体型、ポンプ最大吐出量 38mL/min
運転 条件	保有水量	20L
	水温	42℃
	循環水量	60L/h

以上の循環システムにつくば市水道水と茨城県某所温泉水(食塩泉：以下、温泉水)の2種類を浴用原水として満たし、微生物類の定着・増殖の過程を調査した。各試験水の水質は表2に示す通りである。

表2. 試験水の水質

(つくば市水道水、2004年10月採水)

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	過マンガン酸カリウム消費量
値	7.7	37	82	49	33	0.07	51	53	3	4.8

採水時の遊離残留塩素濃度は 0.7mg/L(DPD法による)であった。

(茨城県某所温泉水(2004年11月採水))

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	過マンガン酸カリウム消費量
値	7.8	1700	850	700	150	2.2	71	6000	40	8.4

単位：pH、電気伝導率(mS/m)以外は mg/L、\*を記した項目は、mg/L(as CaCO<sub>3</sub>)。

また、上記2種類の試験水と静岡県内の温泉(源泉から採取)2種類、東京都内の温泉(源泉から採取)1種類について、TOC及びAOCの分析、一般細菌数、従属栄養細菌数を測定した。

### 1.2. つくば市水を用いた循環式試験

循環式試験システムにつくば市水 20L 入れ、グルコースを 15mg/L 添加した。グルコース 15mg/L は過マンガン酸カリウム消費量として 30mg/L に相当する。

その後、42℃で循環しながら、残留塩素監視注入装置を使用しながら遊離残留塩素濃度が 0.2~0.4mg/L となるように維持し、2週間循環した。遊離残留塩素濃度は、ポーラログラフ電極法で測定し、循環水中の遊離残留塩素濃度が 0.2mg/L 以下で次亜

塩素酸ナトリウム溶液(以下、塩素剤とする)を薬液注入ポンプで添加し、0.4mg/L 以上で塩素剤の添加を停止する制御システムにより調整した。

塩素剤による 2 週間の循環処理を実施した後、塩素剤の供給を停止(残留塩素監視注入装置の運転を停止)し、塩素剤の供給を行わずさらに 2 週間継続して観察を行った。試験期間中、継時的に過マンガン酸カリウム消費量、一般細菌数、従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数、アメーバ数を測定した。

### 1.3. 温泉水を用いた循環式試験

循環式試験システムに茨城県某所温泉水 20L を入れ、42℃で 27 日間、塩素剤による殺菌処理を実施せずに循環した。試験期間中、継時的に一般細菌数、従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数、アメーバ数を測定した。

## 2. バッチ式試験

### 2.1. 試験方法

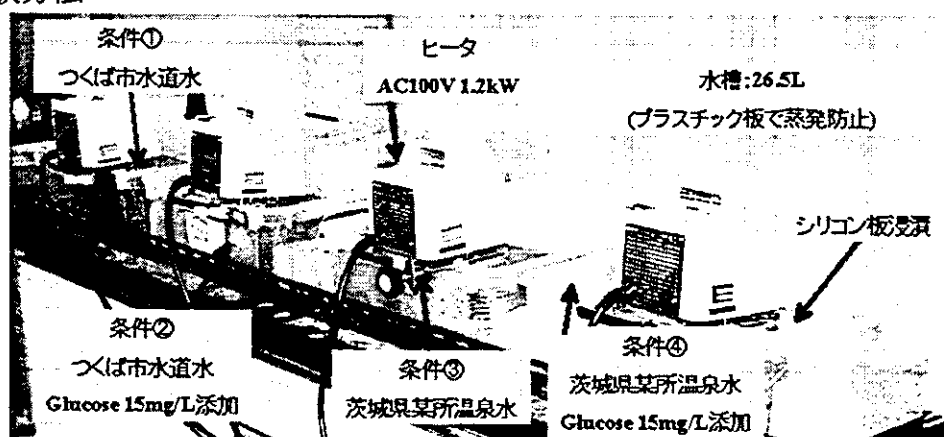


図 3. バッチ式試験用装置外観

バッチ式試験 (4 系列) の外観を図 3 に示したが、ポリプロピレン製 26.5L 容積の水槽壁面を脱脂洗浄し、121℃、15 分間のオートクレーブ滅菌した純水(以下、滅菌純水)で 3 回洗浄した。洗浄実施後、表 3 に示す 4 種の条件の水 25L を入れ、1.2kW ヒータで 42℃に加熱した。

表 3. 試験水質条件

水質条件	摘要・備考
① つくば市水道水(つくば市水)	つくば市水をオートクレーブ滅菌
② つくば市水道水 グルコース 15mg/L 添加	つくば市水をオートクレーブ滅菌後、ろ過滅菌したグルコースを添加
③ 茨城県某所温泉水(温泉水)	源泉より採取、未滅菌
④ 茨城県某所温泉水 グルコース 15mg/L 添加	温泉水を未滅菌で水槽に入れ、ろ過滅菌したグルコースを添加

バイオフィルム付着状況を調査する為に、各水槽内に長さ 50mm×幅 25mm×厚さ

3mmのシリコンゴム板を複数枚取り付けた。シリコンゴム板は、500mg/Lの次亜塩素酸ナトリウム溶液に一晩浸漬後、滅菌純水で3回洗浄したものを使用した。

試験期間中、塩素剤の添加による殺菌処理は行わず、42℃に保持して約1ヶ月間、水中のATP値、一般細菌、従属栄養細菌、レジオネラ属菌、シリコンゴム板に付着蓄積した汚れのATP値を測定した。

シリコンゴム板のATP値は以下の方法で測定した。浸漬したシリコンゴム板を取り出し、オートクレーブ滅菌済の綿棒で40mm×25mm×2面(=20cm<sup>2</sup>)を拭き取り、滅菌純水が2mL入ったガラス製試験管に入れ、ポルテックスミキサーで30秒攪拌懸濁した。懸濁液のATP値を測定し、単位面積(1cm<sup>2</sup>)あたりに付着した汚れのATP値に換算した。

### C. 試験結果

#### 1. つくば市水を用いた循環式試験

表4. つくば市水を用いた循環式試験の結果

経過日数	残留塩素(mg/L)	過マンガン酸カリウム消費量(mg/L)	一般細菌数(CFU/mL)	従属栄養細菌数(CFU/mL)	レジオネラ属菌数(CFU/100mL)	アメーバ数(PFU/100mL)
0	0.2~0.4	35	不検出	不検出	10未満	2未満
1	0.2~0.4	35	不検出	不検出	10未満	2未満
2	0.2~0.4	35	不検出	不検出	10未満	2未満
3	0.2~0.4	34	不検出	2	10未満	2未満
6	0.2~0.4	33	不検出	不検出	10未満	2未満
14	0.2~0.4	29	不検出	6	10未満	2未満
15	0	26	20	1,000	10未満	2未満
17	0	28	3,300	72,000	10未満	2未満
19	0	8.5	5,400,000	7,600,000	10未満	2未満
21	0	7.0	1,300,000	1,300,000	10未満	2未満
28	0	8.7	2,100,000	2,200,000	9,200	>28,000

検査結果を表4にまとめた。一般細菌数、従属栄養細菌数の『不検出』は、培地上にコロニーが形成されなかった事を示す。当該実験では14日の採水後に、塩素剤の添加を停止した。残留塩素濃度は塩素剤の添加停止後、数時間以内に検出限界以下となった。

試験開始からの2週間は、遊離残留塩素濃度を0.2~0.4mg/Lとなるように維持したが、この間は、一般細菌、従属栄養細菌はいずれも不検出もしくは最高6CFU/mL以下であった。レジオネラ属菌は10CFU/100mL未満、及びアメーバ数は2PFU/100mL未満でありいずれの微生物類も十分に抑制されていた。

過マンガン酸カリウム消費量は、初期値が35mg/Lであったが、塩素殺菌を行っていた2週間の間ほぼ同じ値を維持した。これは、微生物の増殖が無く、微生物による過マンガン酸カリウム消費量成分の分解が無かったことを意味するものと考えられた。

塩素剤の添加を停止した後は、一般細菌、従属栄養細菌は徐々に増加し、停止後5日で $10^6$  CFU/mLオーダーとなった。レジオネラ属菌は7日目の採水では検出されず、14日目の採水で9,200 CFU/100mL 検出された。同様にアメーバ類も7日目の採水では検出されず、14日目の採水で28,000 PFU/100mL 以上検出された。塩素剤停止後に過マンガン酸カリウム消費値は急激に減少し、塩素注入停止から5日の間に28mg/Lから8.5mg/Lにまで低下した。

## 2. 温泉水を用いた循環式試験

表5. 温泉水を用いた循環式試験の結果

経過 日数	残留塩素 (mg/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属菌 数 (CFU/100mL)	アメーバ数 (PFU/100mL)
0	0	49	14,000	10 未満	2 未満
4	0	5,700	88,000	10 未満	2 未満
11	0	180	42,000	20	2 未満
18	0	26	4,000	60	2 未満
27	0	130	47,000	10	2 未満

表5に検査結果を示した。一般細菌数は試験開始直後から49 CFU/mLあり、4日目で5,700 CFU/mLと増加したが、以降、 $10^1 \sim 10^2$  CFU/mLオーダーで推移した。従属栄養細菌数は試験開始直後から14,000 CFU/mL 検出され、当該温泉の源泉は、当初より従属栄養細菌が陽性と判断される。以降、 $10^3 \sim 10^4$  CFU/mLで推移した。

循環開始後11日目の試料水からレジオネラ属菌が20 CFU/100mL 検出され、これ以降は常に陽性となったが、菌数は60、10CFU/100mL レベルで推移し、増加の傾向は認められなかった。この間、宿主アメーバ類は検出限界以下であった。

## 3. バッチ式試験における水中の微生物類の挙動

試験結果の数値データを表6と表7に示した。経過日数を横軸に、細菌数等を縦軸にプロットしたグラフを図4～図6に示す。

表6. 各条件における一般細菌数の挙動

経過日数 条件	0	3	7	10	14	21	28	35	49
①つくば市水道水	不検出	$3.3 \times 10^6$	$4.6 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	$6.8 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$3.6 \times 10^5$
②つくば市水道水 + グルコース 15mg/L	不検出	$5.4 \times 10^5$	$3.7 \times 10^6$	$8.1 \times 10^6$	$8.1 \times 10^6$	$8.5 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$6.2 \times 10^5$	$3.4 \times 10^2$
③茨城県某所温泉水	$7.2 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$2.9 \times 10^3$	$2.3 \times 10^4$	$3.7 \times 10^3$	$4.9 \times 10^2$	$4.0 \times 10^2$	$4.3 \times 10^2$	$4.0 \times 10^1$
④茨城県某所温泉水 + グルコース 15mg/L	$1.4 \times 10^4$	$2.3 \times 10^5$	$2.2 \times 10^3$	$4.7 \times 10^3$	$4.4 \times 10^2$	$2.9 \times 10^2$	$1.2 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	$2.8 \times 10^2$

菌数の単位はCFU/mL、検出限界は1CFU/mLとして、検出されないものを『不検出』とした。

表 7. 各条件における従属栄養細菌数の挙動

経過日数 条件	0	3	7	10	14	21	28	35	49
①つくば市水道水	10	$3.4 \times 10^6$	$6.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$	$8.7 \times 10^6$	$5.5 \times 10^6$	$6.3 \times 10^5$
②つくば市水道水 + グルコース 15mg/L	15	$2.7 \times 10^4$	$1.0 \times 10^6$	$3.9 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$	$1.8 \times 10^7$	$2.8 \times 10^6$	$6.5 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$
③茨城県某所温泉水	$1.3 \times 10^4$	$5.6 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$5.9 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	$3.7 \times 10^5$	$4.7 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
④茨城県某所温泉水 + グルコース 15mg/L	$3.9 \times 10^4$	$1.7 \times 10^6$	$6.8 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$8.9 \times 10^5$	$8.9 \times 10^5$	$6.5 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$

菌数の単位は CFU/mL、検出限界は 1CFU/mL として、検出されないものを『不検出』とした。

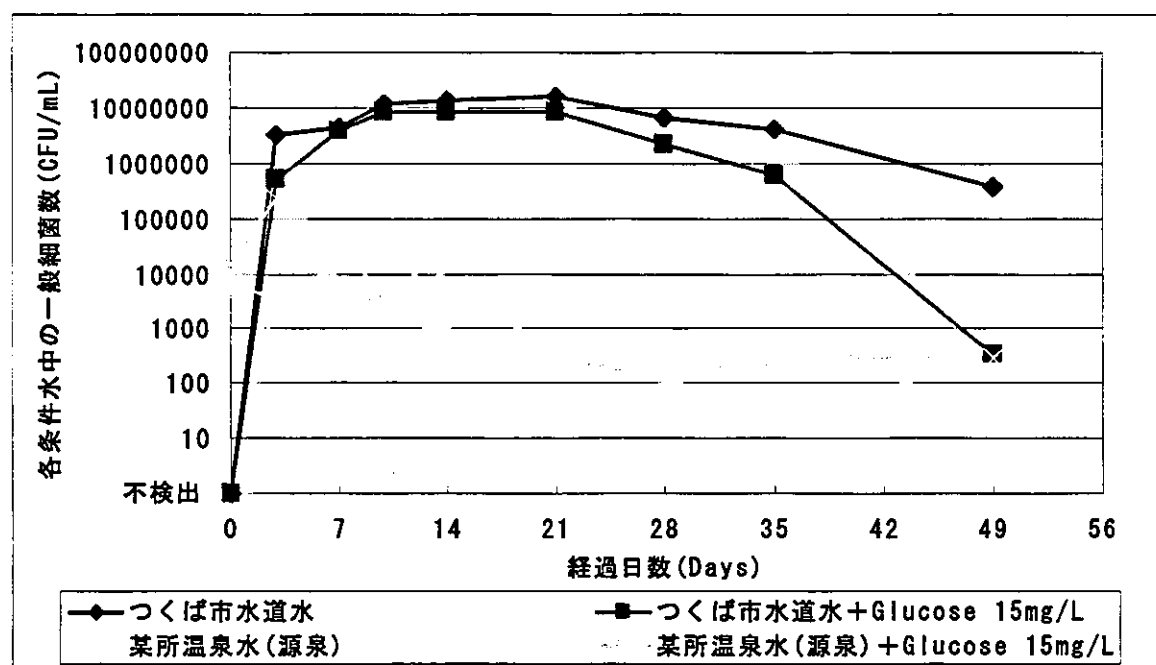


図 4. 各条件における一般細菌数の推移グラフ



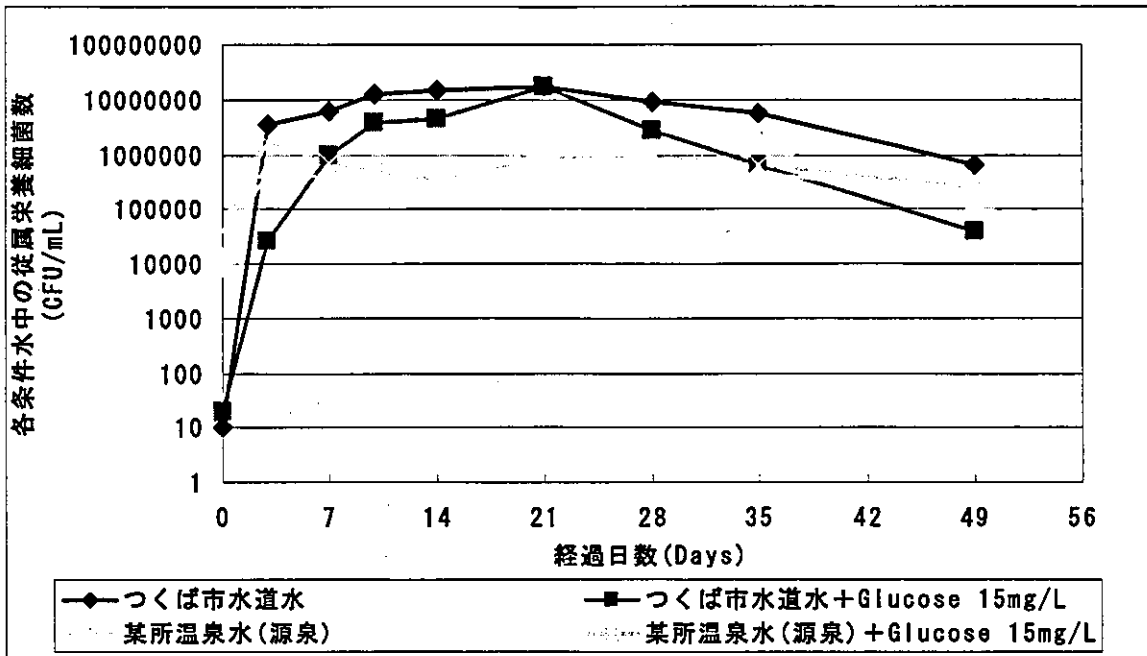


図5. 各条件における従属栄養細菌数の推移グラフ

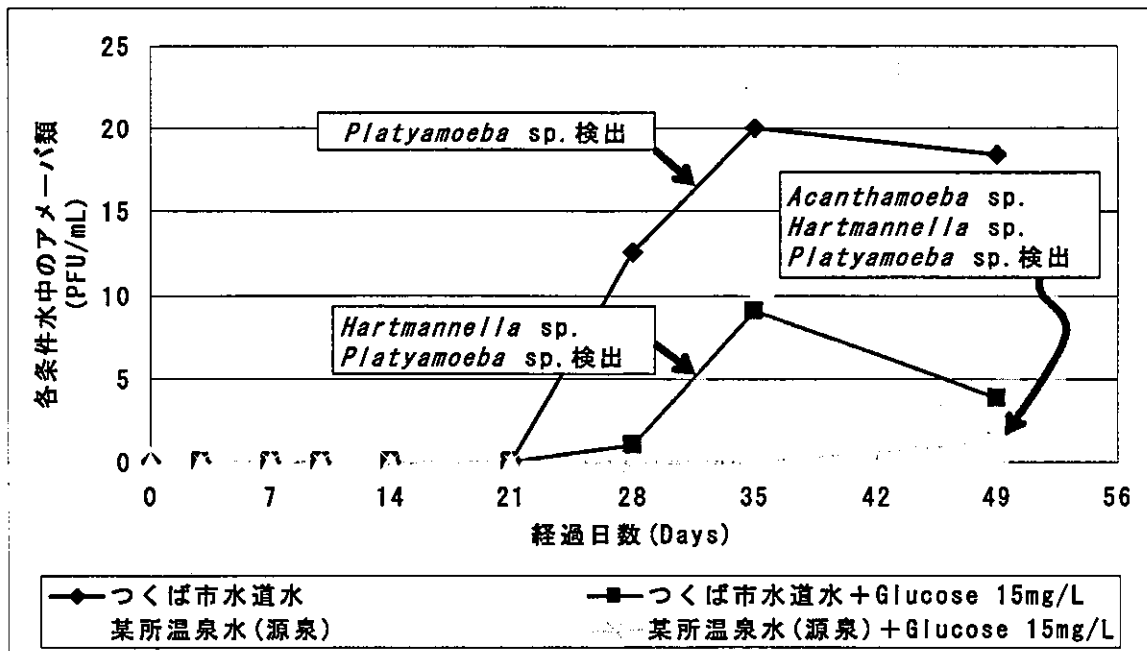


図6. 各条件におけるアメーバ類の個数推移グラフ

### 3.1. 一般細菌:

つくば市水を浴用原水とした場合、グルコース添加・無添加の両群において試験開始時の一般細菌数は不検出であった。試験開始 3 日後にはいずれの群も  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL となり、以降 35 日目まで  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL オーダーで推移した。グルコース添加の有無は菌数に大きな影響を与えなかった。経過日数 35 日目から 49 日目で一般細菌数は暫減傾向を示した。その際、グルコース無添加群では 1 桁の菌数減少に

留まったのに対して、グルコース添加群での減少は大きく、3桁の減少であった。

一方、温泉水の場合は、最初から  $10^4$  CFU/mL 程度存在し、グルコース有りでは3日目に  $10^5$  CFU/mL へと1桁増加したが、その後漸次減少して  $10^2 \sim 10^3$  CFU/mL 程度となった。グルコース無添加群では10日目に菌数の増加が見られその後は漸次減少して  $10^2 \sim 10^3$  CFU/mL にまで低下した。

つくば市水と温泉水の一般細菌数を比較すると、グルコースの有無にかかわらず、温泉水はつくば市水に比較して3桁から4桁低い値であった。

### 3.2. 従属栄養細菌：

つくば市水を浴用水とした場合、グルコース添加・無添加の両群とも当初の従属栄養細菌数は  $10 \sim 15$  CFU/mL であった。試験開始3日後にはいずれも  $10^4 \sim 10^6$  CFU/mL となり、それ以降35日目まで  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL オーダーで推移した。グルコース添加の有無による菌数の差は認められなかったが、グルコース無添加群がやや多い傾向であった。

温泉水は従属栄養細菌を  $10^4$  CFU/mL 程度含んでいたが、検査期間中は  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL を推移した。グルコースの添加・無添加群で菌数に差は認められなかった。温泉水とつくば市水では、明らかにつくば市水中で菌の増殖が多かった。

### 3.3. 宿主アメーバ類：

レジオネラの宿主アメーバは試験開始後28日目に検出された。つくば市水のグルコース無添加群で最も多く認められ、35日目で20PFU/mL 検出された。続いて、つくば市水のグルコース添加群で、35日目に9PFU/mL 検出された。温泉水ではアメーバの検出率が低く、グルコース無添加群では49日目まで不検出、グルコース添加群で49日目にかろうじて1PFU/mL 検出されたに留まった。アメーバの種類は、*Platyamoeba* sp. が多く検出されて、*Hartmannella* sp. 及び *Acanthamoeba* sp. が少数ではあるが検出された。

尚、全ての条件で、試験開始から49日目までの間、レジオネラ属菌は検出されなかった。

### 3.4. 各条件水中における ATP 値

表 8. 各条件水中の ATP 値の挙動

経過 日数	各条件水中の ATP 値(nmol/L)			
	つくば市水	つくば市水 +グルコー ス	温泉水	温泉水 +グルコー ス
0	0.001	0.001	0.019	0.019
1	0.002	0.006	0.061	0.092
3	1.05	0.109	0.201	0.155
7	2.06	1.91	0.085	0.235
10	4.83	5.77	0.088	0.143
14	2.90	3.80	0.069	0.307
21	2.61	4.19	0.164	0.167
28	1.93	4.65	0.191	0.220
35	1.30	1.61	0.056	0.106
49	2.13	2.80	0.098	0.125

各条件水中の ATP 値について、結果数値を表 8 に示した。経過日数を横軸に、ATP 値を縦軸にプロットしたグラフを図 7 に示した。

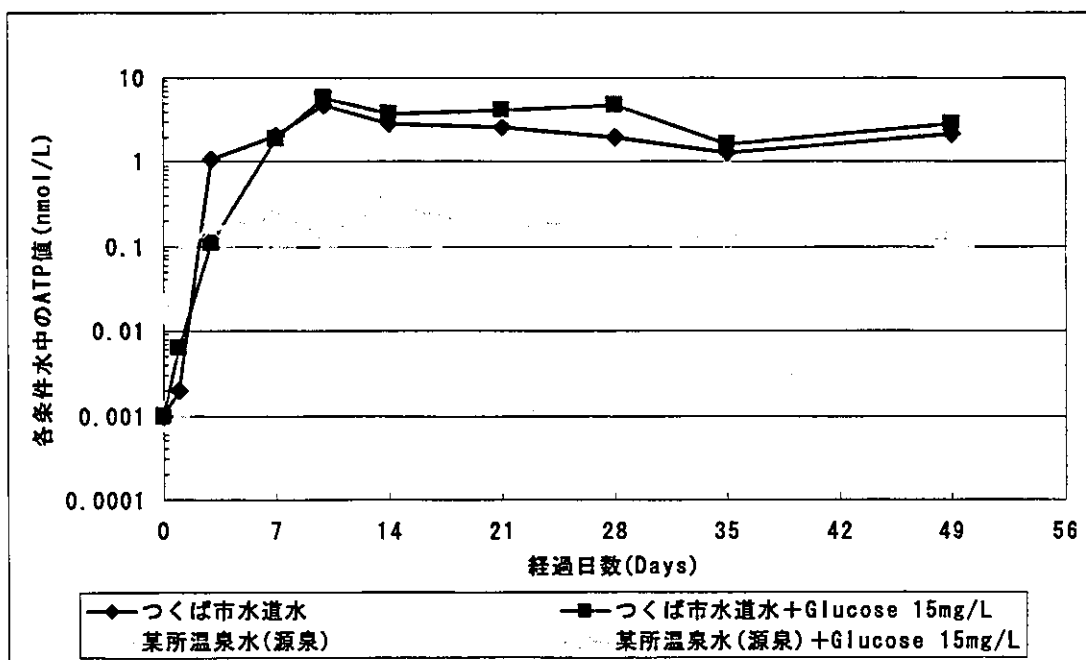


図 7. 各条件水中の ATP 値の推移

各条件水中における ATP 値は、つくば市水が温泉水に比較して約 10 倍高い値を示した。つくば市水では、開始時はほぼ 0 であり、3~7 日後で ATP 値が大きく上昇、最大で 5.0nmol/L 程度となった。グルコース添加の有無による差は確認されなかった。温泉水では、開始時は 0.02nmol/L 程度であり、3 日後以降で ATP 値が 10 倍程度上昇したが、最大でも 0.3nmol/L 程度に留まった。

### 3.5. シリコンゴム板へのバイオフィーム付着状況

シリコンゴム板表面に付着したバイオフィームを拭き取り、ATP 値を測定した結果を表 9 に示した。経過日数を横軸に、ATP 値を縦軸にプロットしたグラフを図 8 に示した。シリコンゴム板付着物の ATP 値は、つくば市水の方が温泉水に比較して約 10 倍高かった。つくば市水では、開始時はほぼ 0 であり、7~10 日後で ATP 値の上昇がみられ、最大で 2.7pmol/cm<sup>2</sup> となった。グルコース添加の有無による差は確認されなかった。

温泉水では、開始時はほぼ 0 であり、7~10 日後で ATP 値が上昇したが、最大 0.16pmol/cm<sup>2</sup> であった。3 日から 14 日の期間、温泉水（グルコース添加無し）は、添加有りに比較して 10 倍程度大きい値を示した。

表 9. 各条件浸漬シリコンゴム板の単位面積当たり ATP 値の挙動

経過 日数	シリコンゴム板付着物の単位面積当たり ATP 値 (pmol/cm <sup>2</sup> )			
	つくば市水	つくば市水 + グルコース	温泉水	温泉水 + グルコース
0	0.001	0.001	0.000	0.001
1	0.011	0.001	0.003	0.004
3	0.043	0.003	0.087	0.024
7	1.024	1.198	0.106	0.016
10	1.532	2.700	0.163	0.033
14	0.460	0.964	0.062	0.025
21	0.242	0.247	0.017	0.028
28	0.282	0.161	0.011	0.108
35	0.103	0.084	0.037	0.008
49	0.110	0.212	0.033	0.067