

## (2)保管

防錆剤の保管は、衛生に留意し、湿気を避け、冷暗所に保存しなければなりません。その際は密封保管が望ましく、開放保管をすると、吸湿等により使用できなくなることがありますので注意が必要です。

Q7：メンテナンス上の留意点としてどのようなものがありますか？

A7：

飲料水に使用する薬剤なので、衛生的に取り扱うことが重要です。

防錆剤の取扱者が、発熱や下痢など病的症状が出ているときや、体調不良時には、防錆剤や機器の取扱いは中止すべきです。そのために、6ヶ月に1回程度健康診断（細菌検査）を受けることを推奨しております。

また、塊状剤を使用している場合の専用容器への充填は、防錆剤を素手や使い古しの軍手で扱うことなく、殺菌されたゴム手袋、マスクを着用するなど、衛生面には充分注意する必要があります。

液状剤の使用では、希釈などはせずに原液をそのまま使用します。固形状防錆剤のうち、粉末状、鱗片状防錆剤は、溶解させて使用しますが、使用場所で溶解させる場合、溶解に使用する器具は、溶解作業中はもちろんのこと、保管時にも衛生面に十分注意する必要があります。

薬剤の保管場所、保管期間についても適切な対応が必要です。

### Ⅲ. 給水用防錆剤を用いた適切な管理

#### 3. 給水用防錆剤注入装置の維持管理方法

Q 8 : 防錆剤注入装置の維持管理においてチェックリストを作りたいのですが、どのような項目を盛り込めばよいですか？

A 8 :

チェックリストには、特に衛生面での項目に重点をおきます。

#### 液状防錆剤及び固体状防錆剤共通

(固体防錆剤にあつては溶解器本体)

- 1 薬液タンク内に衛生害虫やほこり、ゴミ等の異物が混入していないか。
- 2 薬液が沈殿分離や変色していないか。
- 3 希釈している場合は上水(水道水)を使用しているか。
- 4 装置内部の内装の剥がれ、腐食、傷みは無いか。
- 5 作業員の体調は良いか。(下痢、発熱していないか。)
- 6 薬液ポンプ、薬液タンク及び付属品は正常か。(メーカーの取説点検内容を熟読)
- 7 薬液の保管状態は良好か。(冷暗所:鍵のかかる保管庫が望ましい。)
- 8 定期的に薬液タンクを洗浄しているか。
- 9 防錆剤投入時には決められた保護具(ゴム手袋、マスク、保護メガネ等)を着用しているか。
- 10 装置の運転状況や性能は良好・適当であるか。

以上の項目を加えるとともに、適時防錆剤販売管理者と相談の上作成してください。

### Ⅲ. 給水用防錆剤を用いた適切な管理

#### 4. 帳簿書類

Q9：帳簿を作成したいのですが、どのような項目を盛り込めばよいですか？

A9：

給水用防錆剤の使用と管理に必要な次の帳簿書類を備え記録する必要があります。

##### 1. 給水用防錆剤の含有率検査に関するもの

- ・採水の日時、場所
- ・検査の日時
- ・検査の結果
- ・検査の実施者名
- ・検査の方法

##### 2. 給水用防錆剤の注入装置に関するもの

- ・点検、整備、補修等を実施した年月日
- ・実施者名
- ・作業内容 等

### Ⅲ. 給水用防錆剤を用いた適切な管理

#### 5. その他

Q10：どこに相談すればよいですか？

A10：

まずは給水用防錆剤製造メーカー、販売店の給水用防錆剤販売管理者に相談してください。  
なお、詳細が知りたい場合は下記の省庁及び法人、メーカー団体にお問い合わせください。

##### ①所管官庁

厚生労働省健康局 生活衛生課

〒100-8916 東京都千代田区霞ヶ関1-2-2

TEL03-3595-2301 FAX03-3501-9554

##### ②所管法人

財団法人 ビル管理教育センター 調査研究部

〒108-0073 東京都港区三田1-4-28 三田国際ビル1階120区

TEL03-5765-7041 FAX03-5765-7041

##### ③メーカー団体

\*厚生労働省品質規格適合品表示団体 \*防錆剤管理責任者講習会等実施団体

日本給水用防錆剤協会 事務局

〒101-0063 東京都千代田区神田淡路町2-21-12

TEL03-3255-5979 FAX03-3255-5990

## **IV. 研究成果**

### **3. 循環式浴槽の維持管理手法に関する検討**

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）  
「建築物における環境衛生管理に関する研究」  
循環式浴槽の維持管理手法に関する検討部会報告書

## はじめに

循環式浴槽におけるレジオネラ属菌の調査研究として、平成 11 年度厚生科学研究費補助金(厚生科学特別研究事業)「社会福祉施設における衛生環境に関する実態調査」では、特別養護老人ホーム等の社会福祉施設の循環式浴槽におけるレジオネラ属菌汚染実態調査を関東地区及び大阪地区で実施した。その結果、約半数の浴槽からレジオネラ属菌が検出され、特に残留塩素が保持されていない浴槽で高率にレジオネラ属菌が検出されることが確認された。

平成 12 年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)「室内空気中の微生物汚染に関する調査研究」では、研究の 1 つとして、平成 11 年度厚生科学研究の研究成果を鑑み、「建築物の水利用設備におけるレジオネラ防止対策の検討部会」を設置し、循環式浴槽の設備概要と衛生上の問題点、管理上の安全対策等の内容で構成された、循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルが作成された。

このマニュアルは、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルについて」(平成 13 年 9 月 11 日健衛発第 95 号厚生労働省健康局生活衛生課長通知)によって、具体的な管理方法等をまとめたマニュアルとして、循環式浴槽利用者や設備維持管理者、設計・製造・販売者、行政等の関係者らに配布され、レジオネラ症防止対策が普及啓発された。

しかし、近年、大規模な入浴施設において相次いでレジオネラ症感染事故が発生しており、レジオネラ属菌対策が急務とされている。

レジオネラ症感染事故が発生した原因として、循環配管の内壁等に付着・生成したバイオフィームがレジオネラ属菌の温床となり、爆発的に増殖したレジオネラ属菌によって入浴者が罹患したことが、事故後の検証で明らかになっている。

このため、レジオネラ属菌のみならず、循環配管内に生成されるバイオフィームの除去方法や生成を抑制させるための方法等、循環式浴槽に関する構造、清掃、消毒などについて幅広く調査研究した。これを受けて次年度は、循環式浴槽におけるレジオネラ属菌汚染を防止するための衛生面からみた具体的な維持管理手法の検討を行い、現場に即した循環式浴槽維持管理マニュアルを作成する予定である。

## 1章 微生物によるバイオフィルム形成とその機序

はじめに

古来、人間はバクテリアなど微生物の有機物分解能力を利用して下水や排水 (wastewater) の処理を行ってきた。いわゆる生物浄化であり、水質管理の観点から COD の低下、汚染物質の除去、窒素イオンとリンイオンの除去などを担っている。その場にはバクテリアを主としてつくられるバイオフィルムが存在し、生物浄化を行う有用バクテリアがいつもそこから供給される形となり、バイオフィルムをうまく利用することができていた。しかし、近年、医療で用いられるカテーテルなど体内に挿入される人工的医療器材にバイオフィルムが形成され炎症の原因になること、無菌的でなければならない手術場の手洗いの水が細菌に汚染されているがなかなか除去できない、などバイオフィルムに原因するやっかいな問題がでてきた。さらに、ヒトに肺炎を起こすレジオネラ属の細菌が冷却塔や循環式浴槽にバイオフィルムを温床として生息していて、自由生活アメーバの体内で増殖することがわかり、水利用設備のバイオフィルム対策がにわかにな重要な課題になってきた。

バクテリアは淡水、海水、土壌、植物や動物、人間を住み家として生息している。水の中に生息するバクテリアと聞けば、それらは魚の様に水の中を泳いでいるものと考えがちであるが、実はその99%はバイオフィルム (生物膜ともいう) の中に生息している。土壌中のバクテリアも粒子の表面にバイオフィルムを形成している。微生物の中ではバクテリアの他に、カビもバイオフィルムを形成することが分かっているが、本稿では研究が進んでいるバクテリアがつくるバイオフィルムについて概説したい。

### 1. 1 バイオフィルムとは何か

バイオフィルムとは微生物、主にバクテリアが産生した細胞外多糖類を主成分とし、固体表面や、液体表面に形成される膜である。多くの水中バクテリアが、それを住み家にしており、いわばバクテリアの社会 (コミュニティ) を形成している。バイオフィルム中のバクテリアは水中を泳ぐ (プランクトニック planktonic) 状態のバクテリアとは違った生理学的性質を表現している。空気と水の境界面にできるもので水面に浮いているものを特に菌膜 pellicle ということがある。固形物がないので自分で膜の足がかりをつくらなければならない。

### 1. 2 バイオフィルムがつくられる場所<sup>7)</sup>

川底の石や、熱帯魚を飼っているガラスの容器、花瓶など、特に滞った水があるところには必ずと言っていいほどバイオフィルムが形成されている。また、風呂の湯あか、人体では歯のプラークもバイオフィルムである。

実験では、ポリブチレン、ポリ塩化ビニール、プラスチック、ガラス、ポリスチロール (microtiter well の材料)、金属では銅、ステンレスなどの表面に形成させる。

### 1. 3 バイオフィルムの構造<sup>4)</sup>

バイオフィルムというと厚さが一様な膜をイメージするが、実際はそうではなく、キノコがたくさん生えたもの (mushroom-like structure) 、または、それがつながって枕のようになった (pillow-like structure) 構造である。間には水路 water channel もあり、バクテリアの栄養が

行き渡るようになっているし、バクテリアの移動も容易になると考えられる。同時に水路を通過して原虫がバイオフィームに深く入り込む通路ともなる。<sup>5)</sup> 厚い膜は100 $\mu\text{m}$ 以上にもなり、薄い部分で5 $\mu\text{m}$ である。

#### 1. 4 バイオフィームの成分<sup>1)</sup>

細菌がつくる菌体外多糖類 Extracellular polysaccharide (EPS) が主成分である。例えば、大腸菌はコラン酸(colanic acid)というEPSをつくる。緑膿菌がつくるEPSはalginateと呼ばれ、コロニーはムコイド様になるが、ムコイド様コロニーでなくてもバイオフィームをつくり、その中にalginateは極わずかししか含まれないという報告もある。その他タンパク、核酸、リン脂質や死菌を含んでいる。ジフテリアのときに粘膜上に見られる偽膜もバイオフィームの一種と考えることができよう。

EPSは振とう培養して遠心すると菌体からはずれ培養上清中に遊離する。一方、莢膜多糖体 Capsular polysaccharideは菌体を洗っても菌体からはずれないので区別される。

#### 1. 5 バイオフィームの作り方<sup>4)</sup>

生体の中では細胞外マトリックスであるフィブロネクチン、フィブリノゲン、ビトロネクチン、エラスチンが菌の接着を促しバイオフィーム形成のきっかけとなる。これをConditioning filmという。歯の表面には唾液に含まれる糖タンパクや脂質がおおって、バイオフィームが形成されやすくなっている。自然界では、さまざまな有機物がこの役目を担っていると考えられる。

鞭毛を使って泳ぎ固形物表面に到着した細菌は、線毛や、接着素とよばれる菌体表面タンパクで固体表面に接着する。そこで菌体外多糖体をつくりながらゆっくりと細胞分裂をして小さなコロニーを形成する。バイオフィームの形成過程にも、開始、成長、成熟、老化がある。一つのコロニーが形成するバイオフィームの形態はキノコ状であり、平たい膜ではない。キノコ状のものは互いに接近し、一部は融合して連続するが、隙間が残り、栄養を取り込んだり、代謝産物を排泄したりする水路の役目をしている。成熟したバイオフィームの一部はちぎれたり、その中にふくまれる細菌は再び水中に泳ぎ出したりして新しい住み家を探すことになる。

#### 1. 6 バイオフィームをつくる微生物<sup>9)</sup>

自然界でバイオフィームをつくる微生物のうち、主なものは細菌と考えられるが、細菌種の同定はあまり行われていない。真菌(カビや酵母)も形成するものが多菌種あると思われるが、研究報告が多数見られるのはヒトに病原性があるカンジダ属である。<sup>2)</sup> 細菌や真菌が付着する固形物として、藻類が大事な役割をしていると考えられる。原虫はバイオフィームのあるところに生息するが、細菌を捕食する原虫にとっては良い餌場であるわけで、原虫がバイオフィームを形成しているわけではないであろう。

一方、人体に形成されるバイオフィームとその機序の研究がさかんに行われている。(後述)



バイオフィームをつくる微生物としてよく研究されているもの<sup>4)</sup>

---

淡水中	レジオネラ、緑膿菌、 <i>Pseudomonas fluorescens</i> 、 <i>Aeromonas hydrophila</i> その他、 $\beta$ -プロテオバクテリアが多い
海水中	コレラ菌
土壌中	枯草菌
人体中	大腸菌、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、緑膿菌 口腔内レンサ球菌 (菌のプラーク) カンジダ ( <i>Candida albicans</i> )

---

### 1. 7 自然界のバイオフィームの特徴

実験室では一菌種 (monoculture) でバイオフィームを形成させ、分子レベルの解析ができる。また、水の流れを静止、層状流水、乱流などに調節できる。一方、自然界では多菌種の細菌がバイオフィームを形成しており、形態、成分、微生物の分布が多様である。

### 1. 8 バイオフィームの解析法<sup>9, 11)</sup>

形態学的観察が基本である。透過型電子顕微鏡では、グリコカリックス glycolyx を Luthenium red で染めることができる。走査型電顕微鏡では無構造に見える。Immunogold を応用できる。

近年、共焦点レーザー蛍光顕微鏡の活用により、バイオフィームの研究が飛躍的に進んだ。単クローン抗体、FITC-conjugated monoclonal antibody も応用できる。

菌の存在は FISH 法 (Fluorescent in situ hybridization) でも解析できる。

膜はそのまま観察したり、ビーズを加え、超音波で膜を破壊したのち観察する。

培養には静止培養または flow cell を用いる。

マイクロタイタープレート microtiter plate は 変異体の選択 mutant selection に有効である。寒天培地表面で細胞外マトリックスを産生する細菌のコロニーは湿潤となり大きくなるか、あるいは、しわ状 (rugose colony という) になる。

### 1. 9 バイオフィームの中のバクテリアの性質<sup>11)</sup>

浮遊 (プランクトニック) 状態のバクテリアと比較すると次のような性質を獲得する。

- (1) 遺伝子の交換が盛んになる。
- (2) クオラムセンシング Quorum sensing が働く。
- (3) 分裂は遅くなる。
- (4) 消毒薬に強くなる。
- (5) 抗生物質に強くなる。 - 人体にできた場合
- (6) 乾燥に強くなる。 - 湖の干満、日照りで湖の水位が下がるなどに  
対抗して進化したと考えられる。

## 1. 10 バイオフィーム形成に必要なバクテリアの遺伝子

接着のために必要な遺伝子

(EPS・接着素 (adhesin)・線毛・接合線毛・type IV 線毛・鞭毛など)

Quorum sensing クオラムセンシングに関する遺伝子

細胞壁合成酵素遺伝子

代謝に関する遺伝子

ストレス応答遺伝子

CsrA (carbon storage regulator A) などグローバルな調節遺伝子

## 1. 11 多細胞社会としてのバイオフィーム<sup>10, 11)</sup>

バイオフィームは多細胞社会 (multicellular community) である。粘菌の fruiting body と似ているところがある。しかしその構造、化学、生理は、微生物と環境により多様性があると思われるものの実像はまだよく分かっていない。とくに細胞外多糖体の多様性が大事である。中の細菌は協力的で (cooperative)、利他的死がある (unselfish behavior, programmed cell death)。その他 cell-cell interaction がある、クオラムセンシング Quorum sensing がある、遺伝子の水平伝播 Horizontal gene exchange がある、などは多細胞社会としての場であることを示唆する。

接合線毛はバイオフィームをつくるのにも役立つし、gene transfer にも役立っている。

## 1. 12 微生物はバイオフィームを形成するか<sup>3)</sup>

微生物がバイオフィームを形成しその中に生息しているのは、自然界や動物体内で生存を続けるのに有利な点があるからである。自然界と人体内に分けてその有利な点を列挙する。

### 1) 自然界

- ・環境ストレス (栄養の枯渇、pH, 酸化ストレス、乾燥) に対する抵抗性が上がる
- ・消毒薬抵抗性が強くなる

浄水にカルキを入れるようになってBF形成コレラ菌 (エルトール型コレラ菌) が流行しだしたのではないかと、我々は考えている)

- ・Yersinia pestis, Y. pseudotuberculosis のバイオフィームは線虫の一種 (Caenorhabditis elegans) から捕食されるのを防ぐ。

### 2) 人体内

- ・接着機構として機能し血流、唾液の流れに抵抗する
- ・食細胞の食菌から免れる
- ・抗生物質抵抗性があがる

EPS が抗生物質透過のバリアーになっている

増殖が遅くなり、増殖中にしか作用しない抗生物質に耐制度が上がる

耐性菌の出現に一役買っている

カンジダ属では薬剤排出ポンプの活性があがる

## 1. 13 レジオネラとバイオフィーム

レジオネラはふつう淡水中や土壌に生息する (しかし古畑勝則委員との共同研究では食塩を含んだ温泉からもレジオネラが分離されている)。レジオネラは環境中ではアメーバの中で増殖し、ま

た、固形物表面に付着してバイオフィルムを形成する。我々はバイオフィルムの形成能を菌種間で比較したところ、*L. pneumophila* が最も高いことを明らかにした。その他のレジオネラ菌種はバイオフィルム形成能力がほとんど見られなかった。このことは *L. pneumophila* は自身でバイオフィルムを形成できるが、その他のレジオネラ菌種は *L. pneumophila* か、その他の菌属が形成したバイオフィルムに宿るということを意味する。さらに *L. pneumophila* では、培養温度の違いによってバイオフィルムを形成する菌の形態が異なり、37°C、42°Cでは菌は線維状に長く伸長することを見出した。<sup>8)</sup> また、アメーバの中で増殖する菌とバイオフィルムを形成している *L. pneumophila* の加熱殺菌に対する抵抗性について調べ、バイオフィルム中ではわずかながら高熱に対する抵抗性が亢進することを明らかにした。

#### 1. 14 バイオフィルムと原虫の相互関係<sup>5)</sup>

熱帯魚を飼っているとガラス面が汚れる。これは腸管から排泄される細菌がつくるバイオフィルムが一役買っている。これを除くためにガラス面をきれいに掃除してくれる魚を飼う。彼らはいつもガラス面や石の表面をなめまわっている。ミクロの世界で同じようなことをアメーバ類が行っている。

そこでは、細菌→アメーバ→線虫やワムシ→ナメクジという食物連鎖が始まっている。原虫は大きく分けてアメーバ (*amoeba*)、鞭毛虫 (*flagellate*)、繊毛虫 (*ciliate*) に分けられる。それぞれ水中に浮いた (泳いでいる) バクテリアよりも表面に付着した細菌を食べている。その速度をはかると1匹の原虫が1時間当たり数百~千数百個食べている計算になるという。原虫は1日に生まれるバクテリアの30~100%を食べている (Sherretal. 1983)。

原虫はバイオフィルムが形成された場所に集ってくる。そしてバイオフィルム中のバクテリアを捕食し、バイオフィルムを除いている。しかしレジオネラの場合は逆に原虫が増殖の温床になっている。また *Acanthamoeba* のシストはレジオネラを消毒薬から守っている。

#### 1. 15 食物連鎖への反逆

バイオフィルムの中ではバクテリアが原虫のエサになって食物連鎖が始まっている。しかし、バクテリアの中には原虫に捕食されても殺されずエサにならないものがある。その代表的なものがレジオネラである。レジオネラがアメーバに対抗して進化させた機構はほとんどそのままマクロファージの中での生存戦略となり、ヒトに肺炎を起こす能力につながっていった。レジオネラの他に原虫の中で生き延びていることができる細菌として *Coxiella burnettii*、リステリア、*Mycobacterium avium*、*M. intracellulare*、コレラ菌、*E. coli* 0157 などがあり、これらの細菌も原虫の中で生き延びる能力がそのままマクロファージの細胞内殺菌に対する抵抗能力となっているものがある。

また、バクテリアの中には原虫に食べられなくなるように対抗しているものがある。バクテリアが出す色素はその手段の一つで、緑膿菌が出すピオシアニン *pyocyanin*、*chromobacterium violaceum* が出す *violacein*、セラチアが出す *prodigiosin* などがそういう色素の例である。

レジオネラは原虫内増殖は逆に言うと、原虫がレジオネラの体内増殖をサポートしていることになる。

## レジオネラの増殖をサポートする原虫

---

自内生活	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
アメーバ	<i>A. polyphaga</i> <i>A. palestinensis</i> <i>A. royreba</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>Naegleria gruberi</i> <i>N. lovaniensis</i> <i>N. jadini</i> <i>Hartmannella vermiformis</i> <i>H. cantabrigiensis</i> <i>Vahlkamphia jugosa</i> <i>Echinamoeba exudans</i>
繊毛虫	<i>Tetrahymena pyriformis</i> <i>T. vorax</i> <i>T. thermophila</i>

---

### 1. 16 臨床上的の問題点

バイオフィームは人工的な物質（カテーテルや人工関節など）を人体に挿入した時に感染が起こった場合に形成される。また健常な粘膜上皮細胞が傷害を受け、マトリックスが露出した粘膜器官などに形成される。

バイオフィーム中の細菌は

(1) 抗生物質に抵抗性となる。

その理由の一つは細菌の分裂が遅くなることである。

脂溶性の抗生物質は届きにくく 10-1000 倍効きにくくなる。

(2) 食細胞の食菌を妨げる。

菌がかくれて食細胞に認識されるのを防ぐ。

(3) 抗体や補体の作用をまぬがれる。

以上のような性格を獲得するためにバイオフィームは感染のフォーカスになり、発熱が持続する。そして、バイオフィームを除かない限り、炎症が終えんしない状態となる。

### 1. 17 終わりに

微生物学の観点からは自然界でバイオフィームを形成している菌種の同定作業がほとんど進んでいないのが問題で、今後の課題となるであろう。

バイオフィームが形成されるのを予防する方法、形成されたバイオフィームの除去法、消毒などについては具体的なデータを他の委員の報告書の中に見ていただきたい。バイオフィームのコントロールという課題に対しては、工学、材料学、水質学、水質管理の専門家の共同研究が必要である。

今後とも、細菌学者や原虫学者が加わり、バイオフィルムに生息する、レジオネラを中心とした病原菌による感染を予防するために、バイオフィルムのコントロールを学際的に研究しなければならない。

(担当：吉田 真一)

## 参考文献

- 1) Branda SS, Vik A, Friedman L, and Kolter R. Biofilms:the matrix revisited. Trends Microbiol. 13:20-26, 2005
- 2) Jabra-Rizk MA, Falkler WA, and Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. Emerg. Infect. Dis. 10:14-19, 2004
- 3) Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm ? FEMS Microbiol. Lett. 236:163-173, 2004
- 4) O'Toole GO, Kaplan HB, and Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54:49-79, 2004.
- 5) Parry JD. Protozoan grazing of freshwater biofilms. Adv. Appl. Microbiol. 54:167-196, 2004
- 6) Rogers J, and Keevil CW. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 58:2326-2330, 1992
- 7) Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, and Keevil CW. Influence of temperature and plumbing materials selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl. Environ. Microbiol. 60:1585-1592, 1994
- 8) Sze CC, Piao Z, Barysheva O, Takade A, and Yoshida S. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilm by *Legionella pneumophila*. (submitted to Appl. Environ. Microbiol.)
- 9) Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, and Levi Y. Amoebae in domestic water systems:resistance to disinfection treatment and implication in *Legionella* persistence. J. Appl. Microbiol. 97:950-963, 2004
- 10) Webb JS, Givskov M, and Kjelleberg S. Bacterial biofilms:prokaryotic adventures in multicellularity. Curr. Opin. Microbiol. 6:578-585, 2003
- 11) Wuertz S, Okabe S. and Hausen M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. Water Sci. Technol. 49:327-336, 2004

## 2章 循環ろ過器による水質の影響(塩素消失量測定等)

### 2.1 既設のろ過装置の性能

循環式浴槽に付設しているろ過装置は浴槽の水質を維持するために欠かせない装置として位置付けられている。既存のろ過装置の性能についての継続的な調査はほとんど行われていないが、浴槽水が異常でないかぎり、ろ過装置の性能について問題視することはなかった。しかし、残留塩素濃度の維持やシステム内のレジオネラ属菌の存在等によって、ろ過装置の性能の確認の必要性が生じてきている。そこで既存のろ過装置の前後の水質の実態調査を実施した。

#### (1) I施設

##### 1) I施設及びろ過装置の概要

表1に施設の概要を示した。本施設は日帰り入浴施設で温泉水を供給している。屋内・露天風呂浴槽のろ過装置は別々であるが、男女浴槽水を1台でろ過している。

表1 I施設の概要

施設用途	日帰り入浴施設	
所在地	宮城県	
竣工年月	93年(平成5年)11月	
利用者数(入浴者数)	約200人/日(平均)	
浴槽系統	屋内	屋外(露天)
浴槽使用時間帯	10:00～22:00	
ろ過装置運転時間帯	9:00～1:00	9:00～0:40
ろ過器種類	砂式	
ろ過器循環量 [m <sup>3</sup> /h]	50.0	35.0
浴槽面積 [m <sup>2</sup> ]	23.0×2槽	8.3×2槽
浴槽容量 [m <sup>3</sup> ]	15.0×2槽	5.4×2槽
循環回数 [R/h]	1.7	3.2
消毒剤の種類	電解次亜塩素酸	
消毒剤の投入方法	ポーログラフ3極式塩素濃度計で計測し、自動注入	

#### 2) 調査方法

##### a 入浴時のろ過装置前後の水質(屋内・露天風呂)

ろ過装置前後で採水した。採水時間はろ過装置の流入前で採水した時点の水がろ過装置を通過したと推定される時間にろ過装置後で水を採水した。その水の遊離残留塩素、pH、電気伝導率、濁度、色度、TOC、アンモニア性窒素の測定を行った。測定頻度は各屋内浴槽水と露天風呂浴槽水とも5分間隔で3回測定した数値を示した。ただし、露天風呂浴槽水は消毒剤の添加時に採水を行ったため、再度採水条件を決めて採水することとした。

b 入浴無時のろ過装置前後の水質(露天風呂)

入浴日にろ過装置の稼動が終了して休止してから、翌日の9時30分にろ過装置を稼動させて、5分おきに採水した。測定項目はpH、電気伝導率、TOC、遊離残留塩素の測定を行った。

3) 水質調査結果

a 入浴時のろ過装置前後の水質(屋内・露天風呂)

表2に屋内浴槽水と露天風呂浴槽水の2種類について、ろ過装置前後の水の水質結果を示した。pHについては、ろ過装置前後でわずかに数値が減少しているものがあったが、同じ数値の場合もみられた。電気伝導率はやや増加の傾向にあるため、ろ過前後で電気伝導率に関する物質の移動が考えられる。アンモニア性窒素濃度はすべてやや減少しており、生物的又は化学的反応が考えられる。TOC、遊離残留塩素ともやや濃度が減少している。濁度、色度については、全体的に極低濃度の中での変化であり、ろ過装置の性能は明らかでない。

表2 I施設の入浴時のろ過装置前後の水質

		1回目		2回目		3回目	
		ろ過前	ろ過後	ろ過前	ろ過後	ろ過前	ろ過後
屋内浴槽水	pH	8.3	8.27	8.5	8.39	8.56	8.55
	電気伝導率 (μS/cm)	1066(5.4)	1103(5.4)	1112(5.6)	1113(5.5)	1101(5.6)	1112(5.7)
	濁度 (度)	0.13	0.16	0.53	0.53	0.56	0.56
	色度 (度)	0.49	0.47	0.64	0.62	0.62	0.47
	アンモニア (mg/L)	0.02	0.01	0.04	0.02	0.02	0.01
	TOC (mg/L)	0.89	0.82	1.47	1	0.69	0.47
	遊離残留塩素 (mg/L)	0.35	0.32	0.43	0.33	0.54	0.5
露天風呂浴槽水		1回目		2回目		3回目	
		ろ過前	ろ過後	ろ過前	ろ過後	ろ過前	ろ過後
	pH	8.45	8.43	8.4	8.4	8.44	8.44
	電気伝導率 (μS/cm)	1142(5.7)	1147(5.8)	1143(5.7)	1134(5.7)	1120(5.8)	1130(5.8)
	濁度 (度)	0.31	0.34	0.28	0.31	0.31	0.31
	色度 (度)	0.47	0.46	0.31	0.31	0.55	0.36
	アンモニア (mg/L)	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01
TOC (mg/L)	1.09	1.01	1.69	1.12	1.19	0.88	

b 入浴無時のろ過装置前後の水質(露天風呂)

表3は入浴者がいない時点の露天風呂のろ過装置前後の水質について、pH、電気伝導率、TOC、遊離残留塩素濃度の測定数値を示した。pHについては、ろ過装置前後でわずかに数値が増加していた。電気伝導率はやや増加の傾向にあるため、ろ過前後で電気伝導率に関する物質の移動が考えられる。TOC、遊離残留塩素ともやや濃度が減少している。

表3 I施設の入浴無時のろ過装置前後の水質

		9:45	9:50	9:55	10:00	10:05	10:10	10:15	10:20	10:25	10:30
pH	ろ過前	7.81	7.8	7.83	7.95	7.91	7.73				
	ろ過後	8.02	8.03	7.89	7.98	7.94	7.94				
電気伝導率 (μS/cm)	ろ過前	1518(26.1)	1525(26.8)	1516(27.8)	1519(28.1)	1524(28.2)	1520(28.2)				
	ろ過後	1523(26.2)	1544(26.8)	1522(27.9)	1521(28.1)	1546(28.3)	1522(28.2)				
TOC(mg/L)	ろ過前	5.08	5.06	5.4	4.9	4.82	4.76				
	ろ過後	4.95	4.98	4.7	4.73	4.54	4.7				
遊離残留塩素 (mg/L)	ろ過前	0.8	0.67	0.62	0.91	0.74	0.63	0.55	0.5	0.48	0.45
	ろ過後	0.77	0.66	0.6	0.88	0.74	0.62	0.53	0.5	0.47	0.44

c まとめ

2種類の採水条件下において、TOCと遊離残留塩素の濃度変化を表4に示す。入浴時および入浴無時においてもTOC濃度、遊離残留塩素濃度ともろ過装置前後で濃度の減少が認められる。ろ過装置を浴槽水が通過するのみでTOC濃度は平均減少率は15%、ただし、高減少率(68.0, 31.9)を除いてみると、平均減少率は5%であった。また、遊離残留塩素濃度の平均減少率は4.6%、高減少率(23.3)を除くと、平均減少率は2.9%であった。

表4 TOCと遊離残留塩素の濃度変化

		TOC濃度変化	残留塩素濃度変化
入浴時の屋内浴槽水	1回目	7.9%減少	8.6%減少
	2回目	68.0%減少	23.3%減少
	3回目	31.9%減少	7.4%減少
入浴無時の露天浴槽水	9:45	2.5%減少	3.7%減少
	9:50	1.6%減少	0.1%減少
	9:55	12.9%減少	3.2%減少
	10:00	3.4%減少	0%
	10:05	5.8%減少	1.5%減少
	10:10	1.2%減少	3.6%減少
	10:15		0%
	10:20		2%減少
	10:25		2.2%減少

(2) Y施設

1) 施設及びろ過装置の概要

Y施設は研修施設の浴槽であり、水道水を原水としている。表5にY施設の概要及びろ過装置の仕様を示す。ろ過装置はカートリッジフィルターに石英斑岩を充填しているろ過装置を組み合わせている。

表5 Y施設のろ過装置の概要

施設用途		研修施設
所在地		宮城県
竣工年月		97年(平成9年)2月
利用者数(入浴者数)		約20,000人/年
浴槽系統		男子   女子
浴槽使用時間帯		朝と夕方～夜
ろ過装置運転時間帯		24時間(女子は、利用期間のみ稼働)
ろ過器種類		カートリッジフィルター+石英斑岩
ろ過器循環量 [m <sup>3</sup> /h]		90.0   30.0
浴槽面積 [m <sup>2</sup> ]		47.6   12.0
浴槽容量 [m <sup>3</sup> ]		31.2   7.7
循環回数 [R/h]		2.9   3.9
2001年度(平成13年度)	消毒剤の種類	トリクロロイソシアヌル酸錠剤
	消毒剤の投入方法	塩素供給装置に投入して、自然溶解
2002～03年度(平成14～15年度)	消毒剤の種類	電解次亜塩素酸
	消毒剤の投入方法	ポーラログラフ3極式塩素濃度計で計測し、自動注入



## 2) 調査方法

女子浴槽の入浴が終了した浴槽水について、ろ過装置前後の水を採水した。

## 3) 水質調査結果

女子浴槽のろ過装置の前後の浴槽水を、5分または10分間隔で水を採水した。その浴槽水のpH、電気伝導率、濁度、色度、TOC、遊離残留塩素を分析した。表5に女子浴槽水のろ過装置前後の水の水質結果を示した。

pHはやや増加、電気伝導率は減少と増加がみられる。濁度、色度については、水質の変化はあるが極低濃度レベル、さらに試料数が少なく変化を判断することは困難である。TOCと遊離残留塩素の濃度変化を表6に示す。TOC濃度の平均減少率は9.9%、異常に高い数値(27.5%)を除くと、平均減少率は1.1%の減少がみられた。さらに遊離残留塩素の平均減少率は13.3%であった。

表5 Y施設の女子浴槽のろ過前後の水質

	1回目			2回目			3回目		
	ろ過前	ろ過後	浴槽	ろ過前	ろ過後	浴槽	ろ過前	ろ過後	浴槽
測定時間	8:30	8:40	9:40	9:45	9:50	10:00	11:30	11:25	11:20
pH	7.35	7.38	7.43	7.46	7.47	7.59	7.61	7.62	7.65
電気伝導率 ( $\mu S/cm$ )	474(11.9)	488(11.8)	473 (1)	473 (1)	467 (1)	462(11.6)	472 (1)	477(11.2)	475(11.1)
濁度(度)	0.19	0.38	0.16	0.28	0.19	0.19	0.19	0.19	0.18
色度(度)	0.24	0.64	0.36	0.56	0.69	0.38	0.47	0.6	0.6
TOC(mg/L)	2.83	2.79	2.69	3.49	2.53	2.62	2.66	2.64	2.74
遊離残留塩素 (mg/L)	0.38	0.33	0.32	0.32	0.27	0.33	0.32	0.21	0.31

表6 TOC濃度と遊離残留塩素濃度の変化

		TOC濃度変化	遊離残留塩素濃度変化
女子浴槽水	1回目	1.4%減少	13.2%減少
	2回目	27.5%減少	13.3%減少
	3回目	0.73%減少	13.4%減少

### (3) まとめ

2施設の3種類の浴槽水について各々のろ過装置の前後の水質の分析を試みた。その結果、ろ過装置前後で、有機物(TOC)は、砂装置では5%、カートリッジフィルター+麦斑石では1.1%、遊離残留塩素は、砂装置では2.9%、カートリッジフィルター+麦斑石では13.3%の濃度減少が認められた。濁度、色度、は明らかな増減の傾向がみられない。今後においては、水質の差異やろ過装置のろ材の種類について、長時間の調査が必要であり、さらに測定回数を増やしてろ過装置の機能の把握に努めなければならない。

(担当：赤井 仁志、岡田 誠之)

### 3章 循環浴槽システムにおけるバイオフィルムの発生抑制実験

#### 1. はじめに

循環浴槽システムにおけるろ過槽内は、最適な生物膜(以下バイオフィルムとする)形成の場となりやすく、このバイオフィルムの中でレジオネラ属菌が保護されると考えられる。また、微生物が集塊化したり、充てん剤に埋設するため、消毒剤が作用しにくいことが挙げられる。

一方、ろ過槽内に自然増殖したバイオフィルム中の微生物は、入浴に伴い負荷される有機汚濁物質を基質として増殖する。すなわち、循環浴槽水中の有機汚濁物質は、微生物によって酸化分解され、一部は微生物に転換され、浴槽水から除去される。

このように、循環浴槽システムにおけるバイオフィルムは、浴槽水を浄化する作用とヒト(易感染者)に対して、感染源になるという両面をもっている。

そのため、不特定多数の入浴者がある業務用循環浴槽システムでは、ろ過槽前段における消毒が義務づけられている。この消毒効果により、浴槽内、配管およびろ過槽内で生成しやすいバイオフィルムの発生が抑制されるため、レジオネラ属菌等による細菌汚染が防止される反面、浴槽水中の溶解性有機汚濁物質は残留蓄積することが課題となっている。

以上の背景から、本研究では、まず実態調査として生物ろ過膜仕様の家庭用循環浴槽システム内に増殖する、バイオフィルムの生成特性について検討した。また、バイオフィルムおよびバイオフィルムから単離したレジオネラ属菌の紫外線照射法および塩素消毒法による、消毒効果について検討した。さらに、実態調査結果を踏まえ、室内規模の実験装置(以下、バイオリアクタとする)による、各消毒方法によるバイオフィルムの発生抑制実験を試みた。なお、本実験では温泉水も対象とした。

#### 2. 家庭用循環浴槽システムに生成するバイオフィルム

##### 2.1 実験方法

###### 2.1.1 家庭用循環浴槽システム

調査対象とした家庭用循環浴槽システムを図2.1および図2.2に示す。本装置の大きさは、寸法が高さ537mm、幅592mm、奥行き192mmとなっている。装置の構造は、ろ過槽(容量:2.66L)が2本設置されている。このろ過槽内には、主担体としてセラミックスが入っており、石英班岩がわずかに混入されている。また、細菌類の消毒に紫外線ランプがろ過槽前段についており、1日8時間の照射となっている。装置内における水の流れをみると、まず循環ポンプによって入水口から吸い上げられ、紫外線殺菌装置、自動洗浄装置を通過後、ヒーターで温められ、ろ過槽内に入り、浴槽内に戻るといった循環系の流れになっている。

本調査は、実際に入浴に使用している、循環浴槽システム内ろ過槽内に増殖するバイオフィルム、および浴槽内壁面に生成するバイオフィルムについて測定した。入浴条件としては、入浴者数は4人であり、浴槽水を洗い湯として使用し、浴槽内は水道水(温水)が補給される条件で行った。

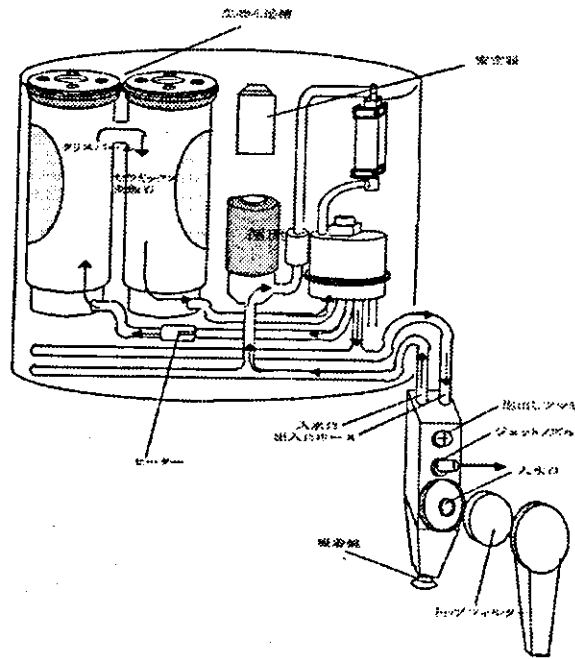


図 2.1 家庭用循環浴槽システム（生物ろ過膜仕様）

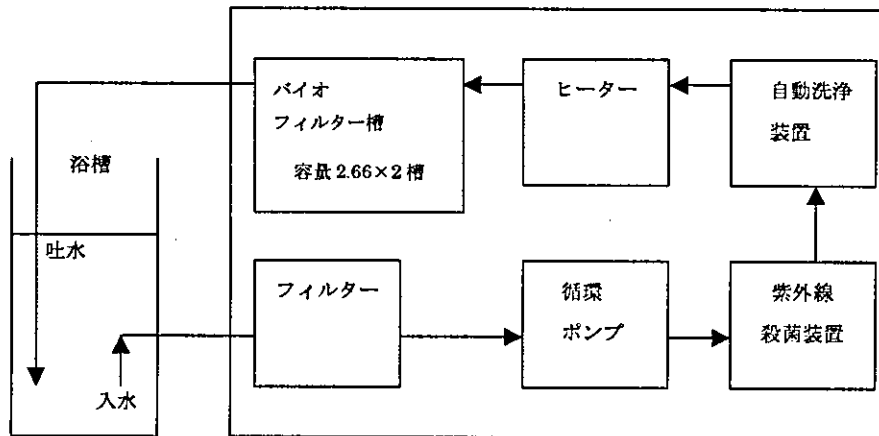


図 2.2 循環浴槽水の流れ

### 2.1.2 浴槽内のバイオフィルムの測定

あらかじめ質量を測定した表面積  $50.6\text{cm}^2$  の透明なフィルム板を浴槽内に 29 日間設置し、バイオフィルムを生成させた。このフィルム板を乾燥機に入れ  $80^\circ\text{C}$  で 1 時間乾燥させる。次にデシケータで 30 分間放冷した後に質量を測定した。

さらに、生成したバイオフィルム中の、①一般細菌、②大腸菌群、③従属栄養細菌、④レジオネラ属菌を培養し、グラム染色を行った。試験方法は上水試験方法に基づいた。なお、一般細菌は標準寒天培地（酵母エキス、トリプトン、グルコースが主成分）、従属栄養細菌は標準寒天培地を 1/100 に希釈、大腸菌群はデスオキシコレイト寒天培地、およびレジオネラ属菌は WYO $\alpha$  寒天培地（栄研器材製）を用いた。

### 2.1.3 ろ過槽内に生成するバイオフィルム

循環浴槽システムのろ過槽内に増殖したバイオフィルムを対象とした。バイオフィルム

循環浴槽システムのろ過槽内に増殖したバイオフィルムを対象とした。バイオフィルムの採取は担体（セラミックスろ材）を容器に移し変え、担体に付着しているバイオフィルムを洗浄・はく離させ、バイオフィルムを採取した。本試料をバイオフィルム試料と呼ぶ。

#### 2.1.4 バイオフィルム内レジオネラ属菌の増殖試験

2.1.3 に示す、バイオフィルム試料を濃度段階に変化させ、基質無添加条件下におけるバイオフィルム濃度、pH、レジオネラ属菌、従属栄養細菌、一般細菌および大腸菌群の経時変化について観察するために、振とう培養実験を行った。

条件は、バイオフィルム試料を 500rpm、5min の遠心分離を行い、濃縮し、滅菌水で 500mL とする。これを、5mL~200mL の範囲にとり、滅菌水で全量 400mL にする。これを培養前の試料として 100mL 分取し、培養用試料として、300mL を分取し、90rpm、25°C で 21 日間の振とう培養試験を行った。

### 2.2 結果および考察

#### 2.2.1 浴槽内におけるバイオフィルムの生成挙動

本項では循環浴槽内に生成するバイオフィルムについて測定した。一般にバイオフィルム内における微生物は、300~400 種<sup>1)</sup> 存在するといわれ、レジオネラ属菌はこのバイオフィルム内で保護され、各種細菌がこのバイオフィルム内から常時遊出していると考えられている。本実験ではバイオフィルム内に増殖したレジオネラ属菌等の細菌を各培地で培養後にグラム染色を行い、顕微鏡観察を行った。

得られた結果を写真 2.1~2.4 に示す。写真 2.1 は、フィルム板上に付着したバイオフィルムを普通寒天培地で培養した結果であり、グラム陽性菌が検出された。写真 2.2 は同様に、デスオキシコレイト寒天培地で培養された大腸菌群であり、グラム陰性桿菌であることが確認された。写真 2.3 は、従属栄養細菌用の寒天培地で培養した細菌であり、グラム陰性菌が確認された。写真 2.4 は、透明フィルム板上に増殖したバイオフィルムを WYO  $\alpha$  寒天培地で培養した、レジオネラ属菌である。グラム陰性桿菌のレジオネラ属菌は、グラム染色陰性であった。また、糸状を形成しておりレジオネラ属菌の特徴を有している。なお、浴槽内におけるバイオフィルムの生成量は、表面積 50.6cm<sup>2</sup> の透明なフィルム板に 1 日あたり 2.06  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> が生成した。以上の結果より、浴槽内壁面に生成したバイオフィルム内からは各種細菌の共存が確認された。

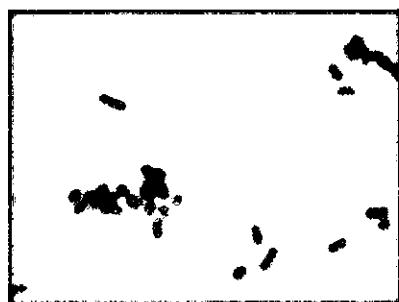


写真 2.1 一般細菌 (×1000)  
グラム染色陽性



写真 2.2 大腸菌群 (×1000)  
グラム染色陰性