

ローブ法 (VIT-Legionella ; vermicon社) により染色し、発光状況を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(4) モデル浴槽における洗浄・殺菌効果試験

過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤 (グッドジョブ®配管洗浄剤, (株)ヘルスケミカル) ならびに過酸化水素を用いて洗浄・殺菌試験を行った。前者は、有機酸を主成分としたA剤、過炭酸ナトリウムを主成分としたB剤及び中和剤であるC剤の3剤を組み合わせた洗浄剤で、3剤の使用濃度は各々、湯量1t当たり0.6kg, 4.6kg及び2.5kg (計7.7kg)である。過酸化水素は循環水中の濃度が2.3%となるように投入した。作業手順は図3に示す通りである。各々洗浄前後のろ過材 (表層部), ヘアキャッチャー内のストレーナー, VP配管, テフロンパッキン及びEPDMパッキン上のレジオネラ属菌検査を行った。なお、検査法は前述の通りである。

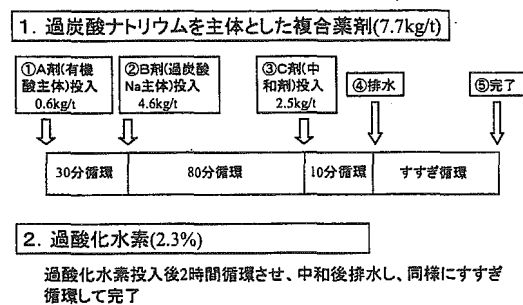


図3 モデル浴槽における洗浄・殺菌効果試験の手順

(5) 走査型電子顕微鏡によるバイオフィーム形成EPDMパッキン表面の劣化状況の観察

試験に用いたEPDM及びテフロンパッキンの表面を清浄にした後、観察部位を切り出し、乾燥後、金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡で観察した。

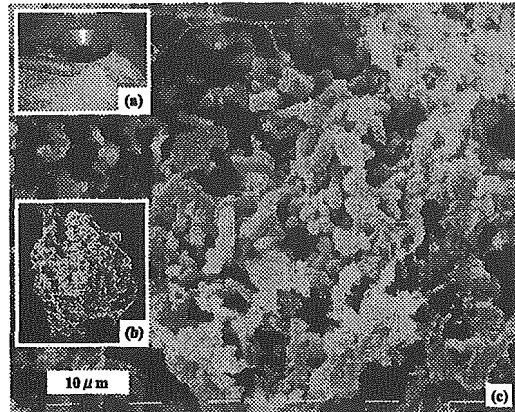


写真1 ろ過材に形成されたバイオフィームの走査電顕像 (無殺菌循環21日後)

- (a) ろ過器内部
  - (b) セラミック製ろ過材粒子
  - (c) バイオフィーム拡大像
- レジオネラ属菌数:  $2.8 \times 10^6$  CFU/g

3. 試験結果

(1) ろ過材, VP配管テストピース及びEPDMパッキンに形成されたバイオフィームの走査型電子顕微鏡による観察ならびにレジオネラ属菌検査

無殺菌循環21日後のろ過材表面には多量の桿菌と繊維状物が観察された (写真1)。この繊維状物は、バイオフィーム構成成分である粘液多糖類 (菌体外産生物質) が、電子顕微鏡標本作成過程の脱水操作により生じたものと思われる。また, VP配管テストピースでは、無殺菌循環3日後で桿菌の散在が観察され、同6日後では長桿菌と短桿菌の集積像が観察された (写真2)。一方、無殺菌循環18日後のEPDMパッキンでは、接液部において肉眼的にも明らかな白色コロニーが観察され、走査型電子顕微鏡により、繊維状に伸長した菌体が絡み合っている像が観察された (写真3)。

なお、隣接部位におけるレジオネラ属菌数は、ろ過材, VP配管テストピース (無殺菌6日後) 及びEPDMパッキンにおいて、各々、 $2.8 \times 10^6$ CFU/g,  $1.7 \times 10^4$ CFU/5mm<sup>2</sup>及び $5.0 \times 10^5$ CFU/swabであった。

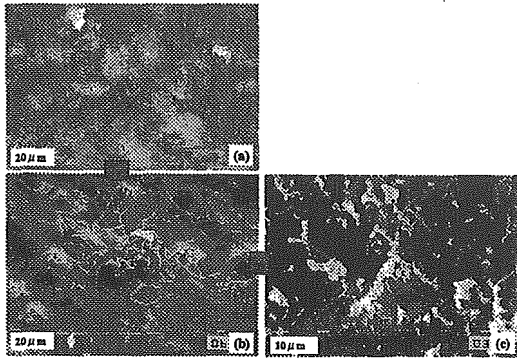


写真2 VP配管テストピースに形成されたバイオフィルムの走査電顕像（無殺菌循環直後・3日後・6日後）

- (a) 無殺菌循環直後
- (b) 無殺菌循環3日後・・・桿菌の散在
- (c) 無殺菌循環6日後・・・長桿菌と短桿菌の集積

無殺菌循環6日後のレジオネラ属菌数：  
 $1.7 \times 10^4$  CFU/5mm<sup>2</sup>

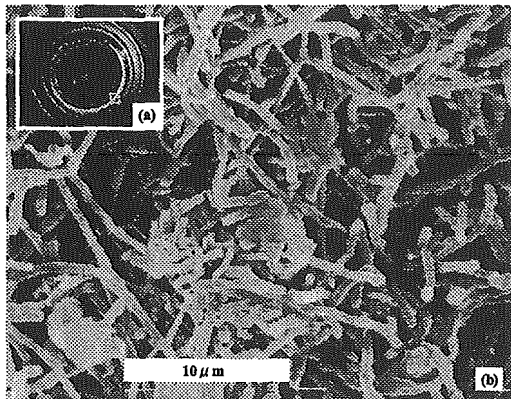


写真3 EPDMパッキンに形成されたバイオフィルムの走査電顕像（無殺菌循環18日後）

- (a) EPDMパッキン接液部付近
  - (b) バイオフィルム拡大像
- レジオネラ属菌数： $5 \times 10^5$  CFU/swab

## (2) EPDMパッキン上バイオフィルム中のレジオネラニューモフィラの同定

今回用いた蛍光標識DNAプローブ法では、緑色に発光した部分がレジオネラ属菌の存在を示し、緑及び赤色に発光した部分がレジオネラニューモフィラの存在を示している。EPDMパッキンから採取したバイオフィルム

はほぼ全域に渡って緑及び赤色の発光を示したことから、レジオネラニューモフィラの存在が確認できた。また、走査型電子顕微鏡により、ほぼ全域に繊維状構造が観察されたことから、EPDMパッキン上ではレジオネラ属菌が繊維状構造を採ってバイオフィルムを形成していることが示唆された。（写真4）

## (3) モデル浴槽における洗浄・殺菌効果試験

過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤（7.7kg/t）ならびに過酸化水素（2.3%）による洗浄前のろ過材、ストレーナー、VP配管及びテフロンパッキン（EPDMにテフロン被覆）においては、 $10^3 \sim 10^6$  CFU/g or swabのレジオネラ属菌が検出されたが、洗浄後では、いずれの薬剤ならびに部位においても、菌数は検出限界未満まで低下し、両者のその効果はほぼ同等であった。しかしながら、EPDMパッキンにおいては、いずれの薬剤も菌数を $10^2 \sim 10^3$ レベル低下させたものの、完全に除去することはできなかった。（表1）

## (4) 走査型電子顕微鏡によるバイオフィルム形成EPDMパッキン表面の劣化状況の観察

EPDMパッキンの接液部表面には無数の微小な穴が観察され、非接液部とは異なり明ら

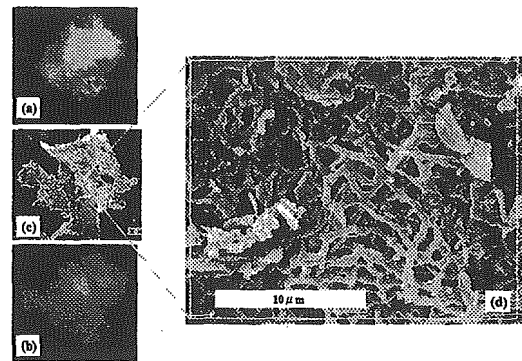


写真4 蛍光標識DNAプローブ法によるEPDMパッキン上バイオフィルム中のLegionella pneumophilaの同定

- (a) 蛍光顕微鏡観察像（緑色発光）
- (b) 蛍光顕微鏡観察像（赤色発光）
- (c) 走査電顕像
- (d) 走査電顕拡大像

表1 過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤ならびに過酸化水素のモデル浴槽における洗浄・殺菌効果

1. 過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤(7.7kg/t)

検査部位	洗浄前		洗浄後	
	レジオネラ属菌量	血清群	レジオネラ属菌量	血清群
ろ過材(表層部)	$2.8 \times 10^2$ cfu/g	SG1,6	$<1.0 \times 10^2$ cfu/g	—
ストレーナー	$1.3 \times 10^3$ cfu/swab	SG1,6	$<90$ cfu/swab	—
VP配管	$1.1 \times 10^3$ cfu/swab	SG1,6	$<90$ cfu/swab	—
テフロンパッキン	$1.0 \times 10^4$ cfu/swab	SG1,6	$<90$ cfu/swab	—
EPDMパッキン	$1.6 \times 10^4$ cfu/swab	SG6	$7.0 \times 10^3$ cfu/swab	SG6

2. 過酸化水素(2.3%)

ろ過材(表層部)	$7.2 \times 10^4$ cfu/g	SG6	$<1.0 \times 10^4$ cfu/g	—
ストレーナー	$1.2 \times 10^4$ cfu/swab	SG6	$<90$ cfu/swab	—
VP配管	$5.9 \times 10^3$ cfu/swab	SG6	$<90$ cfu/swab	—
テフロンパッキン	$6.4 \times 10^3$ cfu/swab	SG6	$<90$ cfu/swab	—
EPDMパッキン	$5.1 \times 10^4$ cfu/swab	SG6	$2.2 \times 10^4$ cfu/swab	SG6

◇ろ過材: Sg + PBS 50mL

◇ストレーナー・配管・パッキン: 10回拭き取り(綿棒) + PBS 9mL

かに表面が劣化していた(写真5)。一方、テフロンパッキンでは、接液部及び非接液部共に表面構造に差は認められず、ほぼ平滑であった(写真6)。

4. 考察

無殺菌状況下で循環ろ過を行うと、自然汚染による微生物増殖に伴い、極めて短期間でバイオフィームが形成されることが明らかとなったが、その形態や生成のしやすさは、附着箇所の材質や表面微細構造、循環浴槽水の水质(汚染度)、流速等、様々な因子の影響

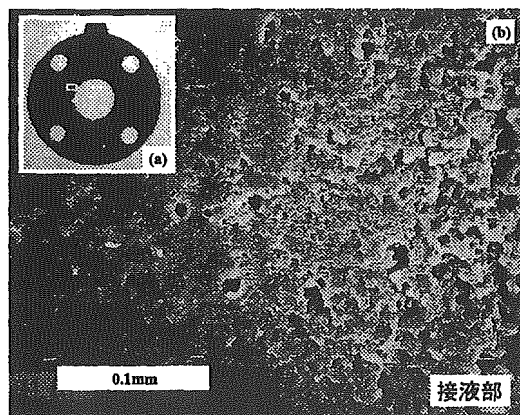


写真5 EPDMパッキン接液部の走査電顕像

- (a) EPDMパッキン全体像
- (b) 拡大像

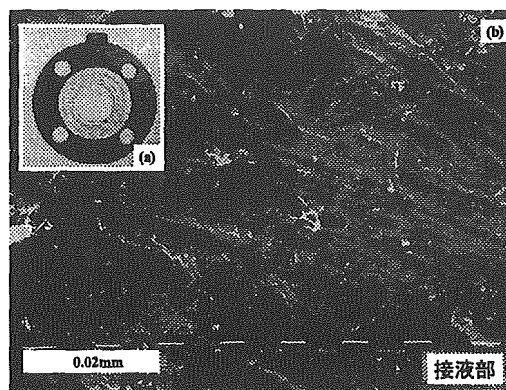


写真6 テフロンパッキン接液部の走査電顕像

- (a) テフロンパッキン全体像
- (b) 拡大像

を受けていることが示唆された。例えば、今回使用しているセラミック製のろ過材は、その表面に微細な空隙を無数に有していることから、より微生物が増殖し、バイオフィームとして定着しやすいものと思われる。

一方、ろ過材を初めとしてストレーナー、VP配管及びテフロンパッキンに形成されたバイオフィームに対して、過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤は優れた洗浄・殺菌効果を示し、今回の試験において、その効果は過酸化水素(2.3%)とほぼ同等であった。過炭酸ナトリウムは水に溶けると、過酸化水素と炭酸ナトリウムに解離し、過酸化水素が分解した時に発生する酸素ガスの酸化作用と発泡作用の働きでバイオフィームを剥離除去する。さらに、アルカリ分である炭酸ナトリウムによる有機物分散・溶解効果も期待できる。また、過炭酸ナトリウムは過酸化水素と異なり医薬用外劇物指定ではないため、安全性の高い薬剤である。

しかしながら、EPDMパッキンに付着したバイオフィームに対しては、いずれの薬剤も菌数をかなり低下させたものの、完全な除去効果を示さなかった。なお、同様に実施した試験において、高濃度塩素(50mg/L)、二酸

表2 各種洗浄・殺菌剤の部位別効果  
参考文献 3) から引用

薬 剤	濃 度	ろ過材	スレー ナー	VP配管	テフロン パッキン	EPDM パッキン
過酸化水素	2.3%	◎	◎	◎	◎	×
次亜塩素酸Na	50mg/L	◎	△	◎	◎	×
二酸化塩素	50mg/L	◎	◎	◎	◎	×
電解次亜塩素酸	50mg/L	◎	◎	◎	◎	×
過炭酸Na系	0.46%	◎	◎	◎	◎	×

◎:洗浄・殺菌可能、△:不完全な場合あり、×:洗浄・殺菌困難

化塩素 (50mg/L) 及び電解次亜塩素酸 (50mg/L) のいずれも、EPDMパッキンに対する洗浄・殺菌効果は不完全<sup>3)</sup> (表2) であった。一般にEPDMは耐薬品性や耐候性、反発弾性に優れているため、パッキンとして多く使用されているが、水中の残留塩素に長期さらされることにより、EPDMの硬化劣化<sup>4)</sup>や軟化劣化<sup>5)</sup>が起こることも知られている。また、過酸化水素も劣化を引き起こしやすい。今回用いたEPDMパッキンも、表面に微小な穴が多数見られたことから、塩素剤等による劣化を受けているものと思われる。そのため、バイオフィームが定着しやすく、且つ、除去しにくくなっているものと考えられる。さらに、フランジ接合に使用するパッキンの構造上、Oリングの中側に微小空隙が存在することも、バイオフィームの定着しやすさ、ならびに除去しにくさを助長しているものと思われる。即ち、強い水流にさらされにくい微小空隙の存在、ならびに塩素剤等による表面劣化という条件が重なると、バイオフィームが定着しやすく、各種洗浄薬剤の効果も発揮されにくい状態になっていることが推察される。それに対して、テフロンパッキンは耐薬品性があり撥水・撥油性も高いことから、バイオフィームが定着しにくく、且つ、洗浄薬剤による除去効果も現れやすいものと考えられる。今回の結果において、洗浄前のレジオネラ属菌数が、テフロンパッキンではEPDMパッキンよりも $10^2 \sim 10^3$ 少なく、洗浄後は検出限界未満まで下がった事実は、前述の説明とよく一

致している。また、今回EPDMパッキン接液部において、レジオネラ属菌が繊維状に増殖している像が観察されたが、レジオネラ属菌を振とう培養で増殖させた場合は、ほぼ全数が短桿状となり、静止培養の場合は、繊維状の菌が優位になる<sup>6)</sup>という報告もあり、このパッキン接液部が強い水流にさらされていないことの裏付けとも言える。

実際の現場では、特にろ過器周辺にフランジ接合部位が多く、これらで使用されているEPDMパッキンをテフロンパッキンに交換することは、レジオネラ感染事故の発生リスクを低減する上で有効な手段と思われる。

一旦バイオフィームが形成されると、その中に棲息するレジオネラ属菌に対しては、日常管理に用いられる濃度の塩素剤等の殺菌効果が発揮されにくくなり、レジオネラ症感染事故発生リスクも高くなるため、各部位のリスク要因を解析し、それぞれに適切な管理措置の実行が不可欠である。特にろ過器内はその機能上、微生物増殖の栄養源となる汚れ(有機物)が溜まりやすい部位のため、逆洗はもちろん、定期的な高濃度塩素消毒の実施が必須である。その中でも、ろ過器内塩素逆洗浄(フィルター・リフレッシュ)法<sup>7)</sup>や、さらに低コストで実施できるろ過器内塩素循環殺菌法<sup>8)</sup>の有用性が注目されている。

#### 4. まとめ

- (1) 循環ろ過式モデル浴槽において、無殺菌循環下、ろ過材表面、VP配管テストピース及びEPDMパッキンへの自然汚染によるバイオフィーム形成が確認できた。
- (2) 過炭酸ナトリウムを主体とした複合薬剤ならびに過酸化水素は、EPDMパッキンを除いて、いずれの箇所においても優れた洗浄・殺菌効果を示し、両者のその効果はほぼ同等であった。
- (3) EPDMパッキン上バイオフィームの一部残存は、塩素剤等による劣化に伴う表面構造

の変化ならびにフランジ接合部における微小空隙の存在に起因することが示唆された。

- (4) 対策として、耐薬品性が高く撥水・撥油性があるテフロンパッキンへの交換が有効である。

謝辞：本研究にあたり、アメーバ検査をしていただいた国立感染症研究所・寄生動物部の遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司、下河原理江子の各先生方に深謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 大畑克彦, 鈴木光彰, 江塚安伸, 曾布川尚民, 杉山寛治, 実験用循環式浴槽水浄化装置を用いた自然汚染, 無殺菌状況下におけるレジオネラ属菌の消長, 防菌防黴, 32, 593-600, 2004 (12)
- 2) 厚生省生活衛生局企画課 (監修), 新版レジオネラ症防止指針, 85-94, (財)ビル管理教育センター, 1999
- 3) 静岡県環境衛生科学研究所レジオネラ・プロジェクトスタッフ, レジオネラプロジェクト研究の成果 —温泉のレジオネラ除菌, モニタリングシステムの開発—, 34-35, 静岡県環境衛生科学研究所, 2005
- 4) 中村 勉, 城戸広宣, 竹田喜一, 大武義人, 合成ゴムの残留塩素による劣化メカニズムについて (第1報) EPDMパッキンの残留塩素による劣化事例とその劣化メカニズム, 空気調和・衛生工学会学術講演会講演論文集, 1529-1532, 2003
- 5) 城戸広宣, 中村 勉, 竹田喜一, 大武義人, 合成ゴムの残留塩素による劣化メカニズムについて (第2報) 残留塩素によるEPDMパッキンの低分子化現象の劣化メカニズム, 空気調和・衛生工学会学術講演会講演論文集, 1533-1536, 2003
- 6) 吉田真一, 生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究 —平成14年度研究報告書—, 7-13, 2003
- 7) 大畑克彦, 鈴木光彰, 倉重英明, 下河原理江子, 泉山信司, 八木田健司, 遠藤卓郎, 江塚安伸, 曾布川尚民, 杉山寛治, 循環式浴槽水浄化装置を用いた濾過器内の高濃度次亜塩素逆洗浄によるレジオネラ除菌効果, 日本防菌防黴学会第31回年次大会要旨集, 62, 2004
- 8) 杉山寛治, 大畑克彦, 鈴木光彰, 徳山千佳, 倉重英明, 江塚安伸, 曾布川尚民, 循環濾過式浴槽における濾過器内塩素循環殺菌法のレジオネラ除菌・増殖抑制効果, 日本防菌防黴学会第32回年次大会要旨集, 146, 2005