

### 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

## 資料 3

### 循環式浴槽の維持管理手法に関する検討

### 資料 3. 循環式浴槽の維持管理手法に関する検討

#### 研究分担者

- ・ 紀谷文樹（神奈川大学工学部）
- ・ 赤井仁志（（株）ユアテック）
- ・ 縣 邦雄（アクアス（株））
- ・ 岡田誠之（東北文化学園大学科学技術学部）
- ・ 小川正晃（（株）ユニ設備設計）
- ・ 野知啓子（関東学院大学工学部）
- ・ 古畑勝則（麻布大学環境保健学部）
- ・ 吉田真一（九州大学大学院医学研究院）

#### 研究協力者

- ・ 稲田朝夫，竹田喜一，中村 勉（須賀工業）
- ・ 山岸祐太（（株）ショウエイ）
- ・ 伊藤雅代，藪崎裕昭（アクアス（株））
- ・ 武安美和，三宅麻由，ハルン・ビン・スライマン（九州工業大学）

#### 研究の目的

近年、浴槽水を循環ろ過して繰り返し使用している浴場施設において、レジオネラ症集団感染事故が多発しており、その原因として浴槽水の消毒の不備が挙げられている。

そのため、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)「室内空气中の微生物汚染に関する調査研究 ～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～」で作成された「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、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、その後も度重なるレジオネラ感染症の発生は、維持管理上の問題もさることながら、システム上の問題点も大きく関係しているものと考えられる。

そこで、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」の一貫として、平成 16 年度より 2 カ年に亘って、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ル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・消毒方法、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維持管理手法等の検討を目的に実施した。

水道法の水質基準に関する省令が平成 15 年 5 月に改正され、「建築物における衛生的環境の確保に関する法律（以下、「建築物衛生法」とする）」でも同様に改正が行われ、平成 16 年 4 月 1 日から施行されている。

今回の改正で、社会的、科学的状況の変化が生じ、原水の種類や浄水方法等による消毒副生成物が問題提起され、健康影響等を考慮し追加された。

建築物衛生法でも給水設備内において水温や塩素量、時間等水の滞留の影響を受け生成されると考えられるシアン化物イオン及び塩化シアンやハロ酢酸等の6項目が追加された。

そこで、建築物内の給水水質の実態調査を全国的に実施し、建築物内給水の水質実態を把握して、健康影響等を考慮した上で検証を行い、建築物内給水設備における維持管理の必要性を示すことを目的とした。

## 1章 微生物によるバイオフィーム形成とその機序

### 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ームが存在し、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、バイオフィー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ー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、などバイオフィー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ー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ーム対策がにわかに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% はバイオフィーム（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ームを形成している。微生物の中ではバクテリアの他に、カビもバイオフィー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ームについて概説したい。

### 1.1 バイオフィームとは何か

バイオフィームとは微生物、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。バイオフィー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

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

バイオフィルムという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。同時に水路を通して原虫がバイオフィル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 バイオフィルムの成分

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ルムをつくり、その中に alginate は極わずかしかな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ル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 バイオフィルムのでき方

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ル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、バイオフィル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。バイオフィルムの形成過程にも、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ルムの形態は

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ル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 バイオフィルムをつくる微生物

自然界でバイオフィル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。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。原虫はバイオフィル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、原虫がバイオフィル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ルムとその機序の研究がさかんに行われている。

バイオフィル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、β-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（歯のプラーク）、カンジダ（ <i>Candida albicans</i> ）

### 1.7 自然界のバイオフィルムの特徴

実験室では一菌種(monoculture)でバイオフィルムを形成させ、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ルムを形成しており、形態、成分、微生物の分布が多様である。

### 1.8 バイオフィルムの解析法

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 glyocalix 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、バイオフィル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。

膜はそのままで観察したり、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

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

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

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B F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* のバイオフィルムは線虫の一種(*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ルム

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℃、42℃では菌は線維状に長く伸長することを見出した。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

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* O157 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 violacenin、セラチアが出す prodigiosin などがそういう色素の例である。

レジオネラの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。

#### レジオネラを増殖をサポートする原虫

自内生活アメーバ	<i>Acanthamoeba castellanii</i> , <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 臨床上的問題点

バイオフィルムは人工的な物質 (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。また健全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。

バイオフィルム中の細菌は

(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ルムは感染のフォーカスになり、発熱が持続する。そして、バイオフィルムを除かない限り、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ル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。

バイオフィル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ルムの除去法、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。バイオフィル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。

## 2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

### 2.1 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。

### 2.2 家庭用循環浴槽システムに生成するバイオフィルム

#### 2.2.1 実験方法

##### (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表2.1及び図2.1に示す。

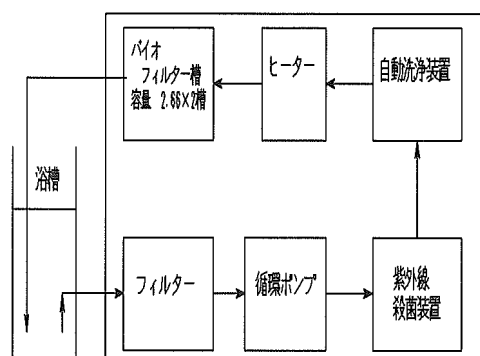


表 2.1 生物ろ過膜仕様循環浴槽システムの仕

型式	BS-4126
外形寸法	高さ537×幅592×奥行192mm
電源	単相100V 50/60Hz
消費電力	946W/978W(ヒーター、循環ポンプ他) (50/60)Hz
ヒーター	850W(セラミックヒーター・空焚き防止センサー付き)
温度表示	マイコン制御デジタル表示
温度調節範囲	39℃～45℃

図 2.1 生物ろ過膜仕様循環浴槽システム

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ーム及び浴槽壁面に生成するバイオフィームを測定した。入浴条件は、入浴者数4人、浴槽水を洗い水として使用し、浴槽には水道水(温水)を補給する条件とした。

## (2)浴槽内のバイオフィームの測定

あらかじめ質量を測定した表面積 50.6cm<sup>2</sup>の透明なフィルム板を浴槽内に 29 日間設置し、バイオフィームを生成させた。このフィルム板を乾燥機に入れ 80℃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ーム中の、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<sup>株</sup>製）を用いた。

## (3)ろ過槽内に生成するバイオフィーム

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

## (4)バイオフィーム内レジオネラ属菌の増殖試験

前述のバイオフィー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ーム濃度、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、採取・濃縮し、滅菌水で 500mL としたバイオフィーム試料を 5mL-200mL の範囲にとり、滅菌水で全量 400mL にする。これを 90rpm, 25℃で 21 日間の振とう培養試験を行い、培養前試料と比較検討した。

### 2.2.2 結果および考察

#### (1)浴槽内におけるバイオフィームの生成挙動

一般にバイオフィーム内における微生物は、400 種程度存在するといわれ、レジオネラ属菌はこのバイオフィーム内で保護され、各種細菌がこのバイオフィー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ー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。

フィルム板上に付着したバイオフィームからグラム陽性菌（写真 2.1）や大腸菌群（写真 2.2）、グラム陰性菌（写真 2.3）、レジオネラ属菌（写真 2.4）が確認された。レジオネラ属菌はグラム陰性の糸状を形成している。なお、浴槽内におけるバイオフィームの生成量は、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

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$  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。

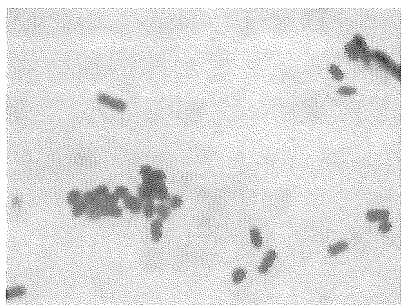


写真 2.1 一般細菌 (×1000)  
グラム染色陽性

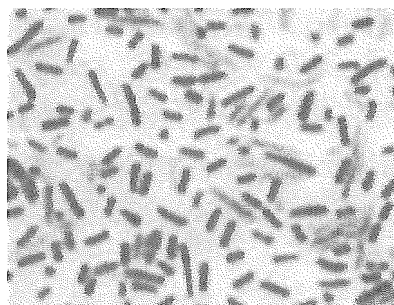


写真 2.2 大腸菌群 (×1000)  
グラム染色陰性

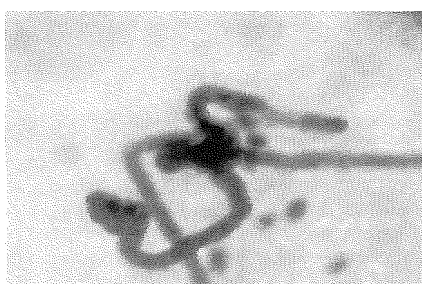


写真 2.3 従属栄養細菌  
(×1000)

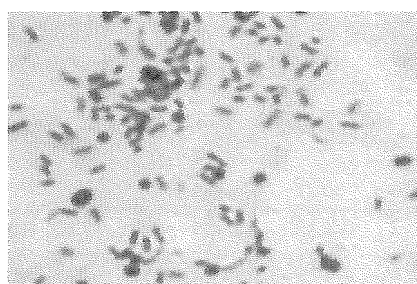


写真 2.4 レジオネラ属菌  
(×1000)

## (2) ろ過槽内のバイオフィルム

ろ過槽内の生細菌数は好気性細菌が優占的に認められ、 $2.2 \times 10^4$  (30°C) -  $2.8 \times 10^5$  CFU/mL (45°C) の範囲内であった。比較的低栄養条件下においても、生息可能な細菌群が優占種であり、低栄養細菌数としては  $3.2 \times 10^6$  (30°C) -  $2.9 \times 10^6$  (45°C) CFU/mL が検出されている。すなわち、これらろ過槽で増殖した細菌による漏えいが、浴槽水中の従属栄養細菌数を高めると考えられた。さらにろ過槽内細菌類の特徴的なこととして、腸内細菌、嫌気性細菌、放線菌、糸状菌、酵母は少数であった。また、細菌性フロックや原生動物が確認された。

次にろ過槽内バイオフィルムの生成量と入浴者の有機汚濁負荷単位を求めた。入浴者からの有機汚濁負荷(TOC) 単位は 0.3 g/人に対し、バイオフィルムとしてろ過槽内での増殖量は 0.3~0.4g/L-BF・日(BF:ろ材)となった。

以上のことから、0.3g/人・日の有機汚濁負荷により 0.3~0.4g/L-BF・日のバイオフィルムが生成したことになる。

## (3) バイオフィルム内レジオネラ属菌の増殖試験

実働中の循環浴槽ろ過槽内のバイオフィルムからレジオネラ属菌が  $10^5$  CFU/mL オーダーで検出される。これらのバイオフィルム中のレジオネラ属菌が滅菌水中、すなわち、基質無添加条件下において、どのように増殖するか 3 週間観察した。その結果、pH は 7.7→6.3 と酸性側に移行し、この傾向は供試バイオフィルム濃度が

高い条件下で顕著に認められた。

バイオフィルム中のレジオネラ属菌は初期値  $10^5$ - $10^6$ CFU/mL が培養 7 日目には  $10^6$ - $10^7$ CFU/mL と最大値を示した。この理由として、バイオフィルム中には原生動物等が共存しているために、日数の経過に伴い、レジオネラ属菌が極端に減少しない要因になっていると考えられた。

一方、大腸菌群は時間に伴う大きな増殖はみられなかったことから、バイオフィルム中は、大腸菌群等の高栄養細菌が増殖する環境にないことが示された。

## 2.3 バイオフィルムの消毒試験

### 2.3.1 実験方法

#### (1)家庭用循環浴槽内の消毒試験

実稼動している循環浴槽システム（図 2.1）に、遊離残留塩素濃度 0.2mg/L 程度に次亜塩素酸ナトリウムを入浴時に加え、塩素消毒による従属栄養細菌の減少量を測定した。

さらに、消毒によるバイオフィルムへの影響について、浴槽中の TOC 変動で観察した。

次に紫外線照射法による消毒効果について検討した。本装置は紫外線ランプをろ過器全段に付設のタイプのため、ろ過槽後段に紫外線ランプを追加し、実験を行った。

#### (2)バイオフィルムおよびレジオネラ属菌の消毒試験(ビーカテスト)

バイオフィルムの消毒効果を明らかにするために、室内規模による不活化実験を行った。塩素消毒および紫外線照射法は次に示す。

塩素消毒試験はバイオフィルムを滅菌水に添加した試験水に次亜塩素酸ナトリウム溶液を 0.05~2.0mg/L の範囲で添加した。対照を滅菌水に継代培養した *L.Pneumophila* を添加した。レジオネラ属菌の測定は、消毒前後における水試料およびバイオフィルム試料について行った。

紫外線照射法による消毒試験は、水試料中のレジオネラ属菌およびバイオフィルム試料を 0.2~1L 入れたビーカーおよび深型シャーレ内をマグネティックスラスタで攪拌する。紫外線の照射は、ビーカーの上部にハンディ型紫外線照射計（UVP 社製 UVGL-58 型）を用いてランプ強度  $0.1\sim 1.1\text{mW}/\text{cm}^2$  の範囲となるように照射した。生残率と紫外線照射時間の関係を次式により算出した。

$$N_t/N_0 = e^{-kC} \dots \dots (1) \quad N_t/N_0 = e^{-kt} \dots \dots (2) \quad , \quad N_t/N_0 = e^{-kIt} \dots \dots$$

ここに、 $N_t$  : t 時間後の微生物濃度、 $N_0$  : 初期 (t = 0) の微生物濃度 (CFU/100mL)

k : 速度定数 (1/s)、C : 残留塩素濃度 (mg/L)、t : 時間 (s)

It : 紫外線量 ( $\text{mW} \cdot \text{t} / \text{cm}^2$ )

## 2.3.2 結果および考察

### (1) 循環浴槽内における消毒効果

塩素剤を添加した浴槽水の水質変化を表 2.2 に示す。表に示すとおり、浴槽水の pH は経過日数が 49 日-102 日までの間は 7.0-7.3 の範囲にあり、大きな変動はみられなかった。本条件下において、塩素添加を 90 日目から開始した結果、従属栄養細菌の極端な減少はみられなかった。浴槽水中の TOC 濃度は塩素添加前 1.5~4.6mg/L(中央値;2.86mg/L、n=9)を示した。塩素添加後の TOC 濃度は 4.0~5.2mg/L の範囲にあり、塩素によるバイオフィームへの影響が懸念された。すなわち、バイオフィームによる浴槽水中有機汚濁物質の浄化作用は低下する傾向にあった。

表 2.2 塩素剤を添加した浴槽水の水質変化

経過日数(日)	pH	電気伝導率 ( $\mu$ S/cm)	TOC (mg/L)	従属栄養細菌 (CFU/mL)
49	7.0	217	—	—
56	7.1	229	2.28	—
58	7.1	240	2.48	—
61	7.2	298	1.52	—
72	7.0	272	2.44	—
78	7.2	306	4.63	50000
82	7.3	305	2.84	1300
84	7.2	276	2.72	12000
86	7.1	272	3.63	16000
89	7.1	272	3.67	—
91	7.3	277	4.88	23000
96	7.2	282	4.37	50000
98	7.2	288	4.0	11000
102	7.2	297	5.23	300000

### (2) 紫外線殺菌装置による浴槽水の消毒

紫外線殺菌装置による浴槽水の変化を表 2.3 に示す。TOC は 3.4mg/L~6.2mg/L(n=10, 中央値 4.0mg/L) が得られた。また、従属栄養細菌数は 1 週間を経過すると、3000CFU/mL~10CFU/mL と安定する傾向にあった。また、浴槽水中におけるレジオネラ属菌の検出率は 16% (2/12、50CFU/100mL)であった。さらに本条件におけるろ過槽内バイオフィーム生成量は紫外線無灯火より約 1/10(生成量:0.04 (g・バイオフィーム/L・BF・d)) に低下した。

表 2.3 紫外線殺菌における浴槽水の水質変化

経過日数 (日)	pH	電気伝導率 ( $\mu$ S/cm)	TOC (mg/L)	従属栄養細菌 (CFU/mL)	レジオネラ属菌 (CFU/100mL)	大腸菌群 (CFU/mL)
5	7.5	196	3.76	—	ND	ND
8	7.4	201	—	12000	ND	ND
10	7.5	206	5.57	3000	50	ND
12	7.4	208	3.95	—	ND	ND
17	7.5	210	3.12	200	ND	ND
19	7.3	222	3.47	30	ND	ND
22	7.4	221	3.35	10	ND	ND
26	7.6	215	—	—	ND	ND
31	7.5	216	5.21	20	ND	ND
33	7.4	22	4.1	210	ND	ND
38	7.3	224	6.22	100	ND	ND
40	7.3	224	5.76	10	50	ND

### (3) バイオフィームおよびレジオネラ属菌の消毒試験(ビーカテスト)

次亜塩素酸ナトリウム溶液によるバイオフィーム中レジオネラ属菌の不活化では、レジオネラ属菌を 99% 不活化するのに必要な残留塩素濃度は 0.2mg/L と得られた。

紫外線照射法による不活化効果では、水試料中およびバイオフィーム試料におけるレジオネラ属菌の生残率と紫外線量の関係より、水試料では 0.34、バイオフィーム試料では 0.35 が得られ、両者に明らかな差異は認められなかった。

各殺菌法によるレジオネラ属菌の 99% 不活化では、塩素殺菌の方が両者に差異が認められた。すなわち、水試料ではレジオネラ属菌を 99% 不活化するのに残留塩素が 0.1mg/L 必要であったのに対し、バイオフィーム試料では 0.2mg/L の塩素が必要となった。

## 2.4 まとめ

本実験では、循環浴槽システムにおけるバイオフィームの生成および発生抑制実験を行った。得られた知見を要約すると次のとおりである。

(1) 実態調査として、生物膜仕様の家庭用循環浴槽システム内に増殖する、浴槽内およびろ過槽内のバイオフィームの生成特性について検討した。まず、浴槽内壁面に増殖したバイオフィーム中からは、一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌群およびレジオネラ属菌が検出された。さらに、ろ過槽内に定着固定したバイオフィーム中の細菌類を同定した結果、細菌性フロック、原生動物が混在するなかで、低栄養細菌が  $10^6$ CFU/mL と優占であり、腸内細菌、嫌気性細菌、放線菌、糸状菌、酵母は 10CFU/mL 以下と少ないことが特徴として挙げられた。

(2) 生成したバイオフィーム中におけるレジオネラ属菌の増殖特性について振とう培養法により検討した。バイオフィーム 90~2100mg/L の濃度範囲において、レ



ジオネラ属菌は  $10^5 \sim 10^7$  CFU/mL の範囲で推移し、約 3 週間は大きな減少はみられなかった。

(3) 塩素および紫外線による消毒試験を行った。浴槽水を対象に消毒試験を行った結果、塩素消毒は細菌類を不活化する一方で、浴槽水中に溶解性有機汚濁物質を残留させることが示された。また、紫外線照射による結果では、紫外線照射をろ過槽後段に設置し、消毒効果が顕著にみられた条件下では、バイオフィーム生成量は常用使用(紫外線をろ過槽前段設置)の 1/10 になった。

(4) バイオフィームの不活化試験として、ビーカテストを行った。その結果、バイオフィーム混在化におけるレジオネラ属菌を 99% 不活化するのに必要な紫外線量は  $13 \text{mW} \cdot \text{s} / \text{cm}^2$  であり、残留塩素は  $0.2 \text{mg/L}$  であった。

### 3章 社会福祉施設の浴槽水調査

#### 3.1 施設の概要

今回の調査施設は、施設 A がデイサービス、施設 B、C、D が介護老人保健施設である。

計測日の入浴の状況は、施設 A と施設 C が午前中のみ、施設 B と施設 D は午前・午後を通して行われた。このために 1 日の入浴者数に対する時間最大入浴者数の割合が、施設 A と施設 C は、それぞれ 70% 前後となっている。単位面積当りの時間最大入浴者数を、厚生労働省健康局通知「公衆浴場における衛生等管理要領」（健発第 0214004 号 平成 15 年 2 月 14 日）にある必要浴槽面積と比べると、計測日の入浴者数では必要面積の 2.2～4.4 倍確保されていた。

浴槽の特徴として、施設 A と施設 D の浴槽深さは 600 mm であったが、施設 B は 500 mm、施設 C は 470 mm と浅めで、溺死等の事故防止や介助しやすさから浅めの浴槽深さとしていると推測する。施設 D には、900 mm × 900 mm の気泡板が設置され、入浴時に使用されている。

ろ材は施設 A と施設 B がカートリッジフィルタと石英斑岩との組み合わせ、施設 C と施設 D は砂を使用している。消毒剤の種類は施設 A がジクロロイソシアヌル酸ナトリウム顆粒、施設 B が電解次亜塩素酸、施設 C と施設 D が次亜塩素酸ナトリウムである。

消毒剤の添加方法では、施設 B と施設 C はポーラログラフ電極式で遊離残留塩素濃度を検出して自動的に注入している。一方、施設 A では毎朝、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム顆粒を浴槽に投入、施設 D では薬注ポンプを手動で稼働させ、次亜塩素酸ナトリウムを注入している。また、施設 D では入浴剤を使用していた。入浴剤の主成分は炭酸水素ナトリウム（重曹）と硫酸ナトリウム（芒硝）である。

なお、施設 D では補給水を多く使用していた。

#### 3.2 浴槽の水質等

それぞれの浴槽において、pH、濁度、過マンガン酸カリウム消費量、アンモニア性窒素、遊離残留塩素、大腸菌、レジオネラ属菌等の経時的変化について調査した。その結果を図 3.1～3.4 に示す。

濁度については、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」（健発第 0214004 号 平成 15 年 2 月 14 日）で『5 度以下であること』とされているが、今回の調査では、入浴剤使用の施設 D を除く、3 施設では基準を大きく下回っていた。

過マンガン酸カリウム消費量（ $\text{KMnO}_4$ ）については、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」で『25mg/L 以下であること』とされているが、各施設の  $\text{KMnO}_4$  の最大値は A 4.11mg/L、B 3.48mg/L、C 2.65mg/L、D 5.97mg/L であった。施設 A と施設 B は換水から 4 日間程度使用した浴槽水でありながら、入浴前の  $\text{KMnO}_4$  が 2.97 mg/L や 0.83 mg/L と低値であった理由として、両施設とも逆洗機能を持たないカートリッジフィルタと石英斑岩を用いたろ過装置のため生物浄化作用によるも

のと推測される。

遊離残留塩素については、「公衆浴場における衛生等管理要領」で『浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して、通常 0.2 ないしは 0.4mg/L 程度を保ち、かつ、遊離残留塩素濃度は最大 1.0mg/L を超えないよう努めること』とされている。また「レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針」(厚生労働省告示第 264 号 平成 15 年 7 月 255 日)でも同様の内容となっている。遊離残留塩素濃度を監視・注入している施設 B と施設 C ではほぼ基準値内であった。一方、施設 A と施設 D では、測定数の約半数が、遊離残留塩素濃度の下限値の 0.2mg/L を下回っている。手動や自然溶融解による塩素剤の投入では、基準を満たしにくいことが伺える。

アンモニア性窒素は、施設 A と施設 D で時間経過とともに上昇傾向が見られた。

細菌検査結果として、大腸菌群は施設 A、施設 C、施設 D で入浴終了時の水から大腸菌群が検出された。「公衆浴場における水質基準等に関する指針」で『大腸菌群は 1 個/mL 以下であること。』と規定されており、上回る値であった。また、施設 D では、午前と午後の入浴前の採水時にレジオネラ属菌 10CFU/100mL が検出された(「公衆浴場における水質基準等に関する指針」では、『レジオネラ属菌は、100mL 中に検出されないこと])。施設 D は計測当日の朝に換水しており、レジオネラ属菌が検出された理由として、給湯系統の問題や気泡板(バイブラマット)に生成された生物膜がレジオネラ属菌の温床になっている等の要因が推測されるが、正確な原因は不明である。

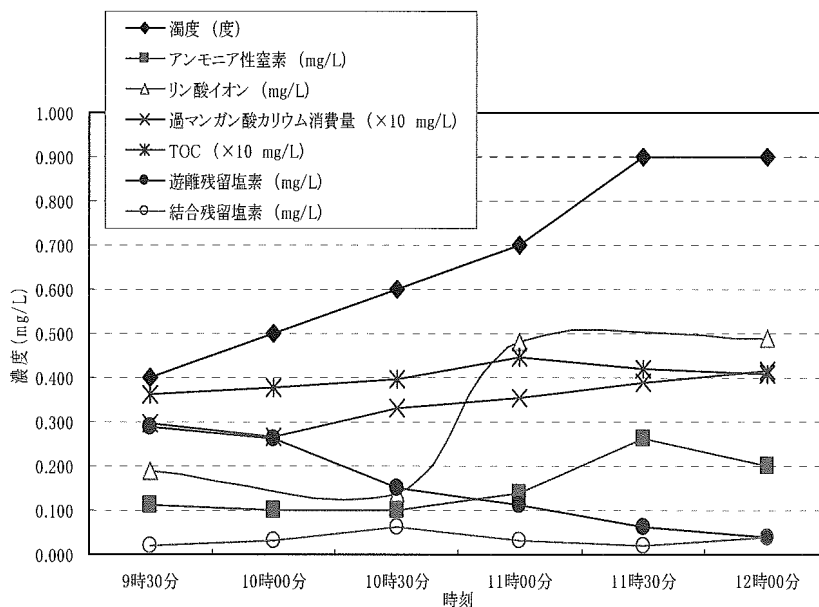


図 3.1 施設 A の水質の変移

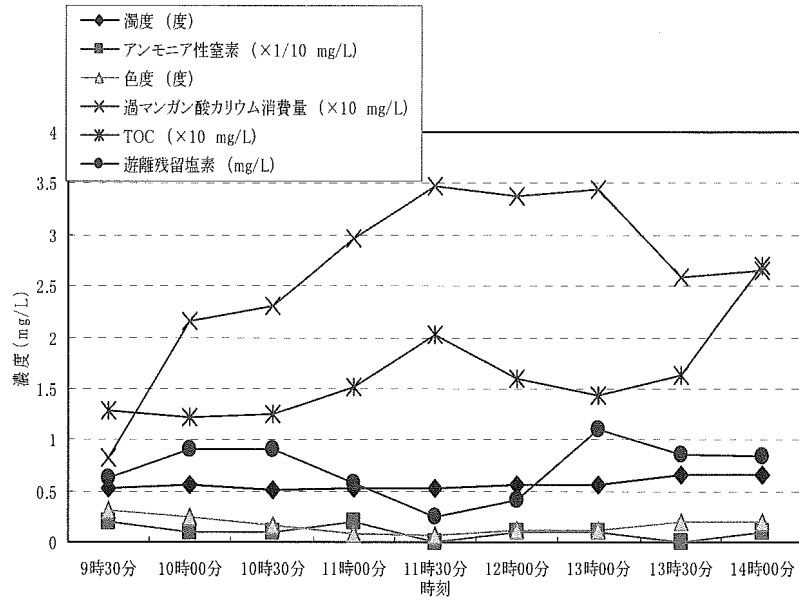


図 3.2 施設 B の水質の変移

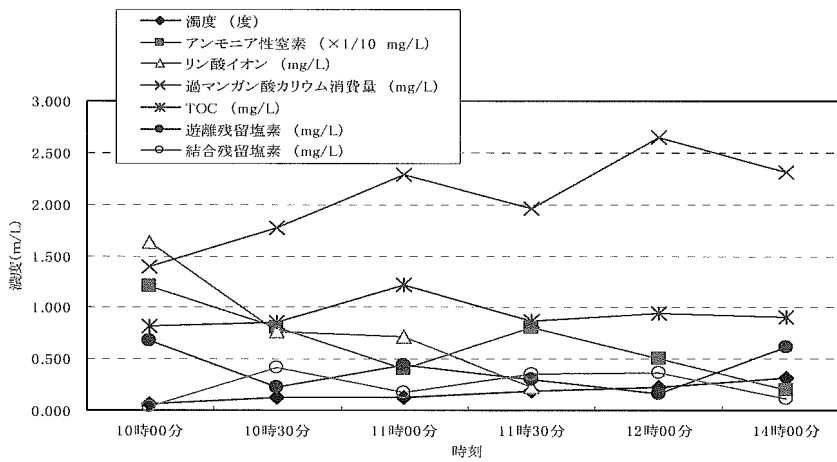


図 3.3 施設 C の水質の変移

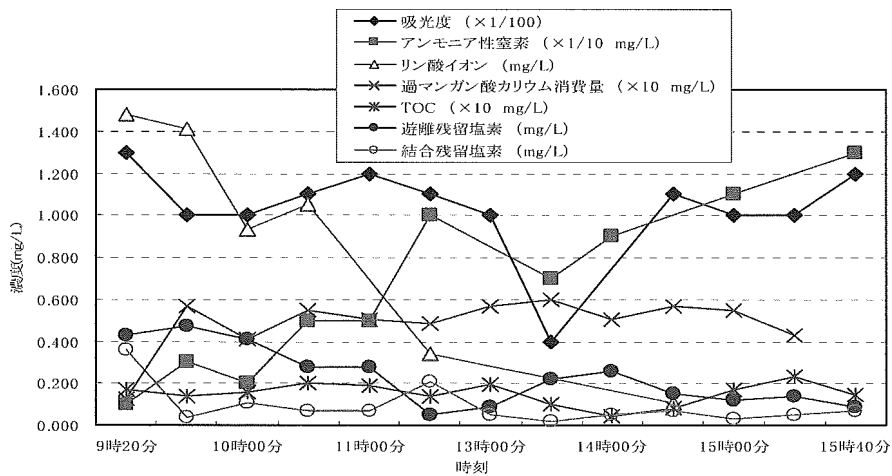


図 3.4 施設 D の水質の変移