

3.3 考察

生物ろ過によるろ過装置を用いていた施設 A と施設 B では、数日間入浴に供した浴槽水であったが、入浴前の濁度と KMnO_4 が「公衆浴場における水質基準等に関する指針」の原湯・原水の値をも大きく下回っていた。さらに施設 A と施設 B のリン酸イオンと硫酸イオンの入浴前の値は、換水後、初めて入浴に使用する施設 C と施設 D の浴槽水水質より小さい値であったことから、微生物を利用した水質浄化を再認識する必要がある。

人為的に塩素を投入している施設 A と施設 D では、遊離残留塩素濃度が適切に維持されておらず、頻繁に遊離残留塩素濃度を計測して残留塩素濃度を確認する必要がある。

欧米では遊離残留塩素濃度の代替や付加項目として、pH や ORP (Oxidation-Reduction Potential: 酸化還元電位) を計測している例もあり、殺菌消毒を評価するマネジメントシステムの構築も考慮すべきである。適度で、適切な塩素消毒を維持するための、計測や制御、解析・評価方法の検討を要する。

4章 ろ過循環系の過酸化水素洗浄調査

4.1 調査の目的

循環式浴槽設備を構成する循環配管、水位検知用連通管などへの生物膜の付着状態を調査し、配管内面での生物膜生成・増殖を抑制する方法の検討や剥離量の調査を目的とする。

4.2 調査方法

1年以上営業している施設を対象とし、循環式浴槽の接続配管内を内視鏡で観察・撮影し、調査を実施した。調査に使用した機材を以下に記す。

管検査用内視鏡：マチダ機器製 PS11-3000

光源装置：高輝度光源装置：L-75X II

録画装置：マチダ機器製 MTC-9000(CCD Compact Color Video System)

4.3 調査結果

4.3.1 施設 E

(1)調査対象施設の概要

施設 E は RC 造 3 階建て延床面積は 1980.15 m²、循環式浴槽 5 を有する日帰り温泉入浴施設で、ろ過装置は各浴槽に砂式ろ過器が設置されている。施設 E ではヘアークッチャの清掃を毎日励行し、常時 0.4~0.6mg/L の遊離残留塩素濃度を保持している。浴槽水は毎日完全換水方式を実施している。毎日営業終了後には 1.5~2.2mg/L 程度の塩素水で 1 時間循環させた後、ろ過器の逆洗を行い、排水している。また換水時に循環配管や水位検知用連通管内には浴槽水が残留しないように配管の最低部に排水弁を設けて、完全に排水するなど生物膜生成予防対策を行っているほか、約 1 年前に源泉槽、温泉槽、配管の過酸化水素洗浄を行い、レジオネラ属菌が不検出であることを確認している。

(2)調査月日

平成 16 年 12 月 6 日に調査・撮影を実施した。

(3)調査

浴槽水の水位を満水時の 1/3 程度まで下げて、配管内に浴槽水が充満している状態で内視鏡を循環吸込口および水位検知用連通管開口部（浴槽底面）から配管内に挿入して撮影した。

(4)調査結果

配管内の状態を写真 4.1~4.7 に示す。

1) 男子大浴槽吸込管・水位検知用連通管

① 男子大浴槽返り管内の状態

浴槽底面の循環湯吸込み口から配管内に内視鏡を挿入して（約 1m）モニター画面で観察し、データを取り込んだ。配管内面全体に白色の付着物が観察された（写真 4.1）。

② 水位検知用連通管

水位検知用の連通管は浴槽底面の開口部より浴場脱衣室まで延長配管されており、毎日1回脱衣室側から次亜塩素酸ナトリウム液を投入している。

目視では内面の付着物は多く、とくに配管接続部の発錆箇所には他所と比較して多くの付着物が観察された（写真4.2）。

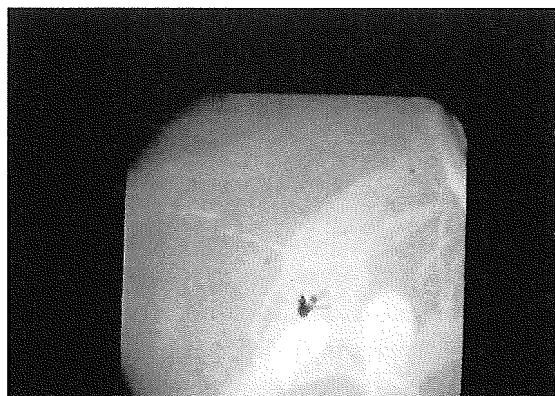


写真 4.1 吸込口接続配管管壁



写真 4.2 水位検知連通管内部

2) 男子露天風呂

吸込管内壁全面に生物膜が付着しており、内視鏡でこすった部分が剥離している

（写真4.3）。

水位検知用連通管内での生物膜の付着は他所に比較して多い（写真4.4）。



写真 4.3 循環水吸込口直下



写真 4.4 水位検知用連通管管壁

3) 女子露天風呂

循環水吸込管の立下り部分の付着状態に比較して横走管内の付着が多く観察された（写真 4.5）。

水位検知用連通管は循環配管と比較し生物膜の付着が多い（写真 4.6）。

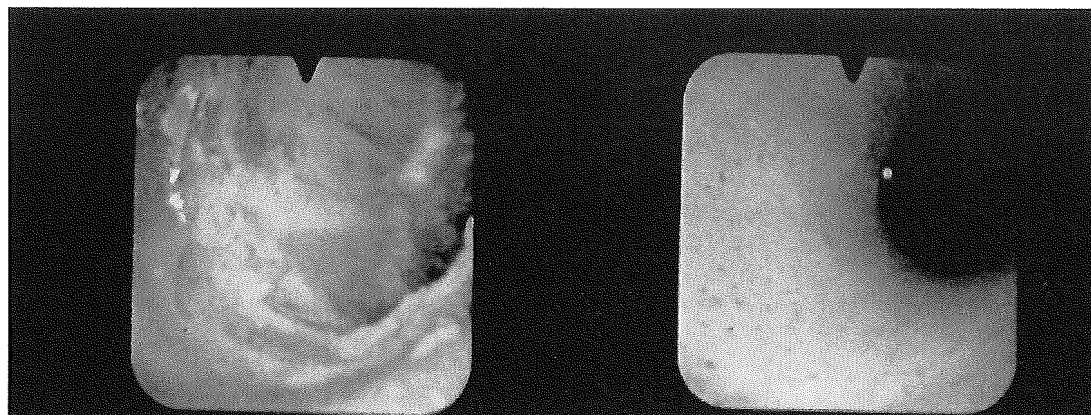


写真 4.5 循環横管部の生物膜 写真 4.6 水位検知用連通管管壁

4) 洞窟風呂

配管内の発錆箇所を核とした生物膜の付着が観察された。（写真 4.7）

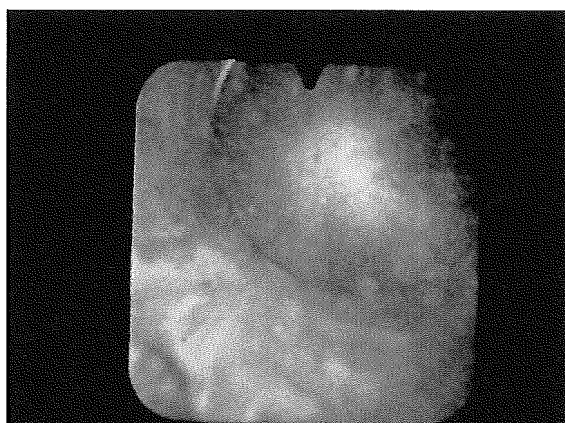


写真 4.7 循環配管曲り部

(5) 考察

施設 E は、毎日完全換水、自動塩素濃度管理システムによる塩素濃度管理、清掃、維持管理体制など、ほぼ理想的な維持管理がなされている施設といっても過言ではない。

しかしその施設において過酸化水素消毒を行った後、1 年を経て全系統の配管内に生物膜の生成が確認され、循環式浴槽システムにおいて生物膜の生成を防ぐことが困難であることが確認された結果、維持管理に際して留意すべき点として下記が挙げられる。

- ① 定期的なシステム全体の化学洗浄が必要であり、1 年に 1 回以上化学洗浄する

ことが望ましい。

- ② 化学洗浄は生物膜を物理的に剥離する過酸化水素などが適している。
- ③ 水位検知管などの、遊離残留塩素を保持した浴槽水が常時流入しない部位の生物膜生成は顕著であり、循環湯が流通しない配管は設けるべきでない。やむを得ず設ける場合には循環湯の一部を注入するなど、配管内の湯が常時遊離残留塩素濃度を保持する方策を考慮する必要がある。
- ④ 配管内に錆などによる突起物が生成されると、それを核として生物膜が生成され易くなるので、発錆し易い金属製継ぎ手などの使用は避けるべきである。
- ⑤ 二酸化塩素は比較的生物膜の生成を抑制するとの報告もあるが、今後その効果を検証すると共に、生物膜が生成され難い消毒剤の開発が望まれる。

4.3.2 施設 F

(1)調査対象施設の概要

施設 F は、川口市に所在する、RC 造 5 階建てで、平成元年(1989)に開業した 24 時間営業のサウナ浴場である。3、4 階に男女浴場施設があり、それぞれに気泡浴槽、ラドン浴槽、打たせ湯浴槽、露天風呂（超音波風呂）、サウナ室各 1 がある。ろ過装置は気泡風呂系統 2 基（男女各 1）、ラドン浴槽系統 2 台（男女各 1）の 4 基が設置されており、ラドン浴槽は打たせ湯浴槽、露天風呂の 3 浴槽で処理しており、全ての浴槽は連通管で接合されている。

施設 F は 2 年前にラドン浴槽を過酸化水素洗浄しており、その際に多量の汚れが排出された経緯があるため、気泡浴槽系統の過酸化水素洗浄を行う前後の循環配管内の内視鏡撮影を行った。当該浴槽の面積は約 26 m²、深さ 80cm、水深 60cm である。

(2)調査年月日

平成 16 年 10 月 19 日(火)に実施した。

(3)調査内容

浴槽水を 30cm 程度入れて、循環吸込口から内視鏡を挿入して撮影した。また、浴槽底面の水位検知用連通管開口部からは、当初堆積物のため挿入できなかったが、洗浄後は挿入して撮影した。過酸化水素の洗浄は 30% 溶液を投入して 5% 程度の過酸化水素溶液をろ材を抜き取った循環系統内を約 2 時間循環させて洗浄した。

(4)調査結果

配管内の状況を、写真 4.8～4.11 に示す。また、洗浄作業の様子と結果を、写真 4.12 に示す。

営業開始以来、過酸化水素洗浄が行われていない浴槽にしては配管内の汚れが少なかった。気泡風呂ということで塩素消毒が過剰に行われていたようで、配管内面の汚れ（生物膜生成）は少なかった。また各気泡風呂に対して専用のろ過器が設置されているため、他の浴槽のごとく連通管を有していないことも生物膜生成を抑制していたと考えられる。

写真 4.10 は水位検知用連通管開口部の堆積物である。営業開始後初めての洗浄と

のことであったが、ろ材を主とする大量の堆積物であり、浴槽に接続された循環系以外の配管内には、異物が沈殿・堆積することが確認された。この現象はとくに浴槽底面に接続した配管で顕著になり、生物膜が容易に生成する危険性をはらんでいることを実証した。

4.5.6 考察

水道水を用いた循環式浴槽の場合、目視可能な過酸化水素の発泡作用が生物膜剥離とは直接関係していないと推測された。むしろ発泡により循環系にエア溜まりが生じ、循環不可能となり、還元反応していない過酸化水素が供給されず、剥離作用が低下する。

施設Eでは浴槽深さの1/3、施設Fでは30cmの深さの浴槽水に過酸化水素を投入した。

本事例では、水道水を浴槽水としていることもあり、少量の過酸化水素でも十分に生物膜除去ができることがわかった。

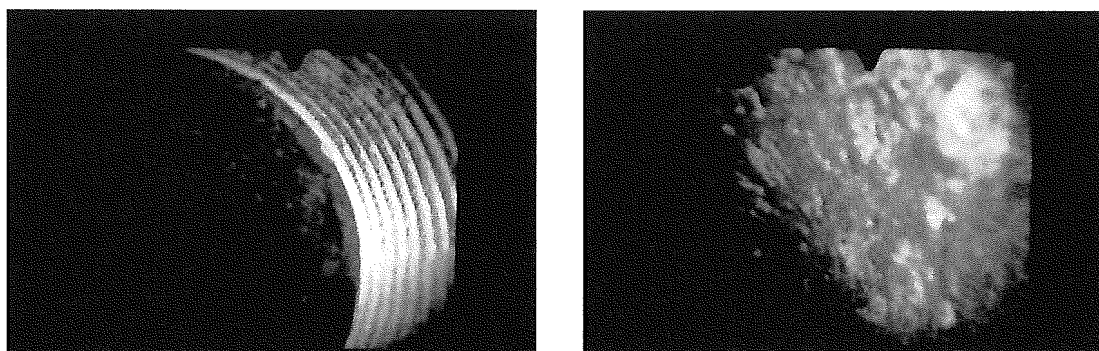


写真 4.8 気泡風呂循環回り管内部（化学洗浄前）

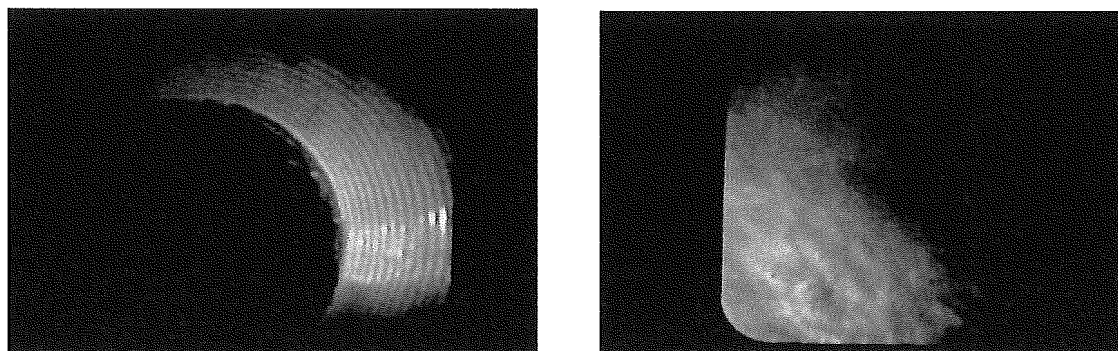


写真 4.9 気泡風呂循環回り管内部（化学洗浄後）

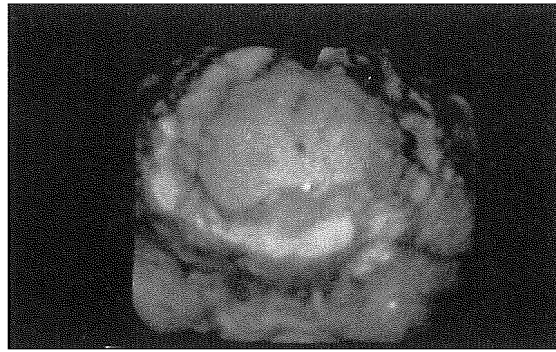
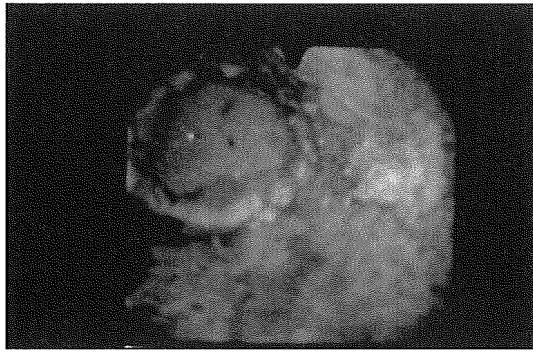


写真 4.10 気泡風呂水位検知用連通管内部（化学洗浄前）

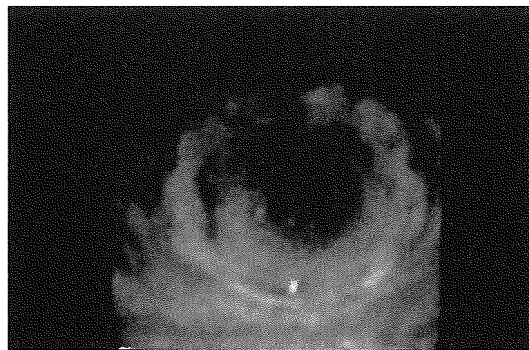
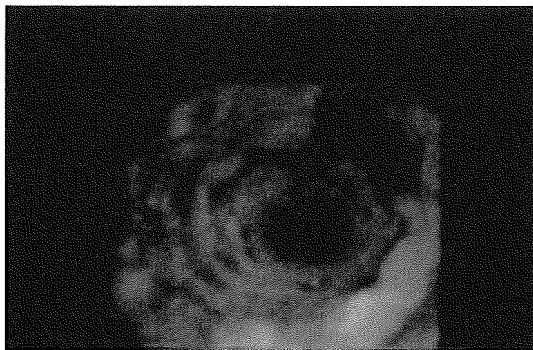
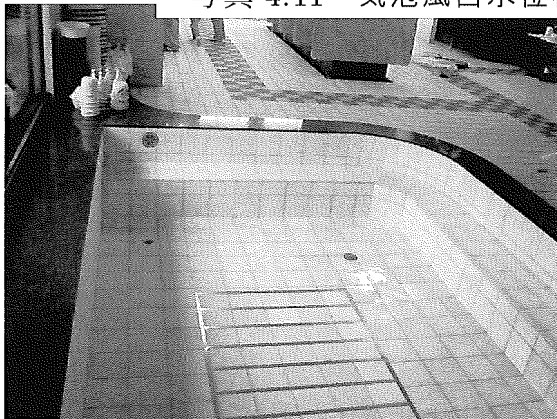
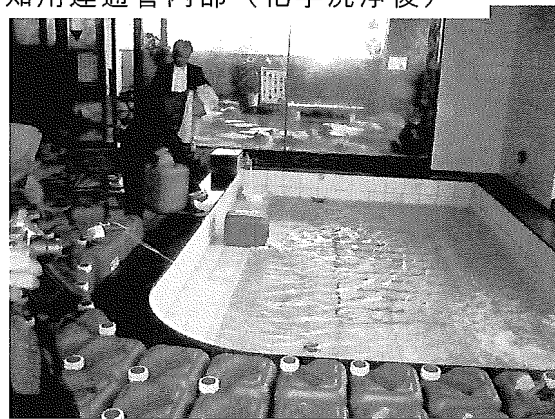


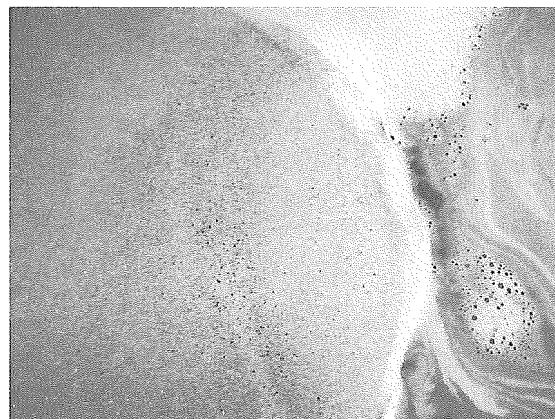
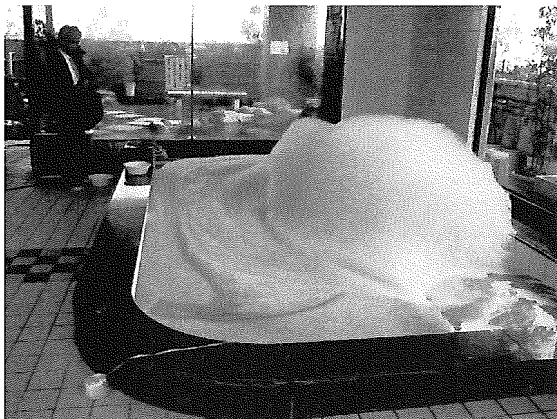
写真 4.11 気泡風呂水位検知用連通管内部（化学洗浄後）



① 気泡風呂底面の埋設空気配管



② 底面より 30cm まで水を張り過酸化水素液を投入



③ 過酸化水素投入後循環水より付着物と共に泡が多量に発生



④ 循環配管より吐出した付着物と泡



⑤ 循環終了後水面上に残った付着物

⑥ 水位検知用連通管内の堆積物
(ろ材砂)

写真 4.12 過酸化水素洗浄作業

5章 レジオネラ属菌の迅速検出法に関する検討

5.1 目的

近年、日本では浴槽水を感染源とする集団感染事例が相次ぎ、浴槽水の衛生的管理の強化が求められている。浴槽水中のレジオネラ属菌数を監視するには培養法による検査が必要であるが、選択培地上での発育が非常に遅いため、試験成績が出るまでには7日から10日を要しているのが現状であり、これは培養法の限界である。試験結果が遅れることは対策の遅れにつながり、結果的に患者数の拡大が懸念される。また、殺菌対策実施後の検証の遅れは長期間の営業停止による大きな経済的損失を招く。こうしたことから、培養法に替わる浴槽水におけるレジオネラ属菌迅速検査法の確立が強く望まれている。

一方、遺伝子増幅法による病原微生物の検出は数時間程度で行えることは周知の事実である。なかでも新しい遺伝子増幅法である LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法は従来の PCR (Polymerase Chain Reaction) 法に比べ、感度及び操作性ともに優れている。そこで今回は、LAMP 法を用いてレジオネラ属菌の検出に関する基礎的検討を行った。

5.2 LAMP 法の特徴

LAMP 法は従来の増幅法にはない以下のような特徴を有している。

- (1)一定の温度で増幅反応が進行：一定温度で増幅可能な方法はほかにもいくつかあるが、一つの酵素のみで実施できるのは LAMP 法だけである。しかも特殊な試薬は不要であり、安価に実施可能である。LAMP 法は 60~65℃付近の一定の反応温度で行い、核酸二重鎖を不安定にする試薬の効果もあり、2本鎖 DNA の変性をあらかじめ行わなくても反応を開始することが可能である。
- (2)高い特異性：他の増幅法では2つの領域で特異性を決定しているが、LAMP 法の増幅反応では6つの領域、4つのプライマーを必要とし、さらにこの6つの領域は順番まで規定されるため、原理的に増幅の特異性は極めて高い。このことにより、増幅の有無によって標的遺伝子が存在したか否か、つまり検出すべき細菌が存在したか否かの判定が可能となる。
- (3)迅速、高い増幅高率（高感度）：LAMP 法は特異性が極めて高いので、標的遺伝子のみを効率よく増幅し、1時間以内に検出可能である。感度も10コピー程度から増幅可能で、PCR 法と同等である。また、鎖置換型合成反応を利用しているので、PCR 法でみられるような生成物阻害もなく、増幅産物は 0.5mg/mL にも達する。増幅時間については、ダンベル構造の 5'末端側にあるループの一本鎖部分に相補的な配列を持つループプライマーを用いることにより、DNA 合成の起点を増やすことが可能となる。これにより、従来利用されていなかったループ部分も利用され、増幅効率は飛躍的に増大した。
- (4)RNA からの 1ステップ増幅が可能：標的遺伝子が RNA の場合、通常はまず逆転写酵素で cDNA を合成してから増幅反応を行うが、逆転写酵素も鎖置換活性

をもっているため、LAMP 法の場合は逆転写酵素を同時に添加しておくことで、DNA の場合と全く同様に増幅が可能である。

- (5)簡易検出が可能：検査、診断用途の場合、結果の信頼性が重要であることから、従来の増幅法では増幅反応後、確認のための検出反応が必須であった。このことが、遺伝子検査における煩雑性の一因になっていたが、LAMP 法は原理的に配列を確認しながら増幅を行っているため、前述したとおり、特異性が高く、結果を増幅の有無で判定可能である。また、増幅産物の量も非常に多いので簡単な検出手段を選択することができる。

5.3 LAMP 法の特異性の確認

5.3.1 供試菌株

Legionella 属菌は *L.pneumophila* の serogroup 11 種を含む 12 菌種 31 株を用い、BCYE α 寒天培地（栄研化学）で 37°C、3 日間培養した。*Legionella* 属以外の菌（非 *Legionella* 属菌）はグラム陰性桿菌 14 菌種、グラム陽性球菌 4 菌種、各 1 株の計 18 菌種 18 株を用いた。これらの菌株のうち *Haemophilus influenzae*、*Branhamella catarrhalis* 以外の菌種は血液寒天培地（栄研化学）を用い、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌は 30°C で 18~48 時間、それ以外の菌は 37°C で 18 時間培養した。*H.influenzae*、*B.catarrhalis* はチョコレート寒天培地（栄研化学）で 5% CO₂ 条件下、37°C で 18 時間培養した。試験に際しては、平板培地上の各菌株のコロニーを生理食塩水中に McFarland No.3.0（約 1.2×10^9 CFU/mL）になるように菌懸濁液を調製した。

5.3.2 方法

各種菌懸濁液を TE 緩衝液（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0）により、*Legionella* 属菌は約 6×10^6 CFU/mL、非 *Legionella* 属菌は約 6×10^6 CFU/mL および約 6×10^8 CFU/mL に希釈した。これらは 95°C で 5 分間の熱処理後、氷冷して、12,000 rpm、4°C、10 分間の遠心分離を行い、その上清 1 μ L を DNA 溶液として試験に用いた。すなわち、*Legionella* 属菌は約 6×10^3 CFU/test 相当、非 *Legionella* 属菌は約 6×10^3 CFU/test 相当および約 6×10^5 CFU/test 相当の DNA 溶液を検体として用いた。

Legionella 属菌の 16S rRNA 遺伝子とした LAMP プライマーを使用して試験した。なお、今回のプライマーは *Legionella micdadei* も増幅可能に改良したものをを用いた。LAMP 反応は鎖置換型 DNA ポリメラーゼである *Bst* DNA polymerase（New England Biolabs、USA）、プライマー、dNTPs（各 1.4mM）、0.8M Betaine、バッファー（20mM Tris-KCl [pH 8.8]、10mM KCl、8mM MgSO₄、10mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Tween20）を含む反応溶液 20 μ L に、検体 5 μ L を添加して 65°C の等温で 90 分間行った。LAMP 増幅産物の検出には専用の濁度測定装置 LA-200（テラメックス）を使用し、濁度を反応開始から経時的に測定し、反応時間内に明らかに濁度の上昇を示した検体を陽性と判定した。

5.3.3 結果

Legionella 属 12 菌種 31 株は、LAMP 法ですべて遺伝子の増幅が認められた。しかし、非 *Legionella* 属 18 菌種 18 株は、LAMP 法では約 6×10^3 CFU/test 相当および約 6×10^5 CFU/test 相当のいずれの場合でもすべて遺伝子の増幅が認められなかった。

表 5.1 LAMP 法によるレジオネラ属菌検出の特異

Bacterial strain	LAMP	Bacterial strain	LAMP
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3677	+	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> supsp. <i>xylosoxidans</i> EKN 6	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3679	+	<i>Acinetobacter baumannii</i> EKN 62	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3680	+	<i>Acinetobacter lwoffii</i> EKN 2575	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> EKN 3681	+	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> EKN 42	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> EKN 3683	+	<i>Branhamella catarrhalis</i> EKN 5652	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3682	+	<i>Chryseobacterium indologenes</i> EKN 358	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F82-1211	+	<i>Empedobacter breve</i> EKN 2590	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F81-1210	+	<i>Escherichia coli</i> EKN 4496	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F78-1163	+	<i>Haemophilus influenzae</i> EKN 2009	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F14-70G	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> EKN 5262	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F1-34G	+	<i>Myroides odoratus</i> EKN 2588	-
<i>Legionella anisa</i> EKN 5828	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EKN 6633	-
<i>Legionella bozemanii</i> EKN 3684	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EKN 2553	-
<i>Legionella dumoffii</i> EKN 3686	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i> EKN 259	-
<i>Legionella erythra</i> EKN 5887	+	<i>Serratia marcescens</i> EKN 233	-
<i>Legionella feeleii</i> EKN 6081	+	<i>Staphylococcus aureus</i> EKN 4542	-
<i>Legionella gormanii</i> EKN 3687	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i> EKN 5172	-
<i>Legionella longbeachae</i> EKN 3689	+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> EKN 4043	-
<i>Legionella micdadei</i> EKN 3685	+	<i>Streptococcus pyogenes</i> EKN 6547	-
<i>Legionella oakridgensis</i> F85-342	+		
<i>Legionella sainthelensi</i> F57-178	+		

5.4 LAMP 法の感度の確認

5.4.1 供試菌株

L.pneumophila ATCC 33152 株を用いた。

5.4.2 方法

供試菌の懸濁液を TE 緩衝液を用いて約 10^5 CFU/test 相当になるよう調製し、これから 6 段階の 10 倍連続希釈系列を作製し、それぞれ 95℃ で 5 分間の熱処理を行った。氷冷後、12,000 rpm、4℃、10 分間の遠心分離を行い、その上清 1 μL を検体として用いた。また無添加の陰性対照をあわせて試験した。菌懸濁液中の菌数は BCYE α 寒天培地を用いた生菌数測定法で確認した。

5.4.3 結果

試験に用いた試料中の菌数は、6 CFU/test から 6×10^5 CFU/test の 6 段階とした。

LAMP 法による *L.pneumophila* ATCC 33152 の検出は 6 CFU/test まで可能であり、検出時間に要する時間は 50 分以内であった。

5.5 温泉水からのレジオネラ属菌検出における LAMP 法と培養法の比較

5.5.1 材料及び方法

(1) 供試材料

2004 年 3 月から 11 月の間に、20 道都県において採取した温泉水 (500mL) 125 試料を試験に供した。地方での採取の場合は冷蔵にて輸送した。原則的に浴槽水であるが、一部源泉や湯口水も含まれた。

(2)試料の濃縮

試料 500mL を 6,000rpm、30 分間の遠心分離により最終的に 5mL に再懸濁し、100 倍濃縮試料を調製した。

(3)培養法によるレジオネラ属菌の検出

「新版レジオネラ症防止指針」に準拠し、滅菌小試に分注した 100 倍濃縮試料 1mL に 1mL の 0.2M HCl-KCl 溶液 (pH2.2) を加え、十分攪拌したものを試料とし、WYO α 寒天培地と GVPC α 寒天培地にそれぞれ 0.1mL ずつ滴下し、37℃で 7 日間培養後、両培地上でレジオネラ属菌の特徴を持つ集落を計数するとともに、培地上から数個の集落を釣菌し、システイン要求性試験を行い、レジオネラ属菌と推定し、グラム染色によって陰性桿菌であることを確認した。菌種の同定にはラテックス凝集反応、免疫血清凝集反応、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを用いた。なお、この試験での検出限界は 10 CFU/100ml である。

(4)LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出

LAMP 法は市販の「レジオネラ検出試薬キット E」を用い、添付資料に準拠した。まず、100 倍濃縮試料 2mL を 13,000 \times g、10 分間、4℃で遠心分離し、上清を除去して 40 μ L 程度を残し、その沈査に「Extraction Solution for Legionella」50 μ L を添加した。次にボルテックスミキサーで攪拌混合してから 95℃、15 分間加熱処理後、直ちに急冷し、1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) 8 μ L を添加して中和した。再度同条件で遠心分離し、上清を核酸抽出液とした。氷上にて LAMP 法反応試薬「マスターミックス」20 μ L に核酸抽出液 5 μ L を加え、Loopamp リアルタイム濁度測定装置を用いて 65℃で 60 分間増幅反応を行った。1 時間以内に増幅に伴う特徴的な濁度上昇が認められた試料をレジオネラ属菌陽性と判定した。なお、酵素失活処理を 80℃、2 分間行った。この試験での検出感度は 10 Cells/100mL である。

5.5.2 結果

(1)培養法及び LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出状況

培養法及び LAMP 法を用いて 125 試料におけるレジオネラ属菌の検出状況を表 5.2 に示した。両法で本菌が共通して検出された試料が 38 試料 (30.4%)、また検出されなかった試料が 47 試料 (37.6%) あり、合計 85 試料 (68.0%) が両法の一致率であった。また、培養法陰性であったが LAMP 法陽性の試料が 38 試料 (30.4%) あった。逆に培養法陽性で LAMP 法陰性の試料が 2 試料 (1.6%) あった。これらのことから両法による検出状況に有意差 ($p < 0.01$) が認められた。すなわち、LAMP 法によりレジオネラ属菌を検出すると、危険倍率 0.303、相対危険度 0.526、寄与危険度 0.288 となり、検出率は培養法より高くなった。

表 5.2 LAMP 法および培養法による温泉浴槽水からの
レジオネラ属菌検出状況

試験方法	LAMP 法		合計	
	陽性	陰性		
培養法	陽性	38 (30.4)	2 (1.6)	40 (32.0)
	陰性	38 (30.4)	47 (37.6)	85 (68.0)
合計		76 (60.8)	49 (39.2)	125 (100.0)

(2)培養法により検出されたレジオネラ属菌

培養法によりレジオネラ属菌が検出された 40 試料の菌数分布は 10～40 CFU/100mL が 18 試料 (45.0%) と最も多かった。次に 50～90 CFU/100mL、100～400 CFU/100mL および 1,000～4,000 CFU/100mL がそれぞれ 6 試料 (15.0%) であった。なお、10 CFU/100mL 未満 (すなわち不検出) が 85 試料 (68.0%) あったが、このうち選択培地上にレジオネラ属菌以外の細菌や真菌が早期に発育することにより、レジオネラ属菌の発育が確認できず、結果として陰性と判定された試料が 7 試料 (8.2%) あった。分離された 49 株を同定したところ、42 株 (85.7%) が *L.pneumophila* に同定され、他に *L.micdadei* や *L.gormanii* がわずかながら同定された。また、*L.pneumophila* の血清型別では 1 群が 17 株 (34.7%) と最も多く、次に 6 群が 8 株 (16.3%) であった。その他、3 群、4 群、10 群に比較的多く型別された。

(3)レジオネラ属菌数と LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出状況

温泉浴槽水 125 試料について、LAMP 法によりレジオネラ属菌の検出を試みた結果を培養法による菌数分布とともに表 5.2 に示す。培養法で不検出 (10 CFU/100mL 未満) の 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料 (44.7%) が陽性を示した。また、培養法で 10～40 CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出された 18 試料については、LAMP 法では 16 試料 (88.9%) が陽性を示したが、2 試料 (11.1%) は陰性であった。これら LAMP 法で陰性を示した 2 試料のレジオネラ属菌数はそれぞれ 10 CFU/100mL、30 CFU/100mL であり、分離された菌種はいずれも *L.pneumophila* であったが、血清型は不明であった。なお、50 CFU/100mL 以上のレジオネラ属菌が検出された 22 試料では、すべて LAMP 法陽性であった。

表 5.3 レジオネラ属菌数と LAMP 法による検出

レジオネラ属菌数 (CFU/100ml)	培養法	LAMP 法	
		陽性	陰性
不検出	85*	38	47
10-40	18	16	2
50-90	6	6	0
100-490	6	6	0
500-990	3	3	0
1,000-4,900	6	6	0
5,000-9,900	1	1	0
合計	125	76	49

*: 試料数

5.5.3 考察

新しい遺伝子増幅法である LAMP 法は *Legionella* 属菌に対して優れた特異性を有し、*L.pneumophila* では 60 CFU/test まで検出可能であり、高い感度を有しているといわれている。この LAMP 法の評価は、蛍光インターカレーターを使用し、リアルタイム PCR 測定装置を用いているが、本測定装置は非常に高価であり、広い設置場所も必要であることから、検査現場での使用はかなり困難であった。LAMP 法は非常に効率のよい遺伝子増幅法であり、増幅産物が 0.5mg/mL と桁外れに多く、増幅の有無を反応過程で生成されるピロリン酸塩とマグネシウムの沈殿物の濁度として計測が可能であることから、今回濁度による測定法により、LAMP 法の評価を行った。その結果、特異性は蛍光による測定と全く変わらず、供試 *Legionella* 属菌のすべてで増幅が確認でき、非 *Legionella* 属菌の 18 菌株は全株とも増幅が認められなかった。今回用いたプライマーは *L.micdadei* に対しても反応するように改良されたものであり、他の *Legionella* 属菌と同様、良好に増幅することが確認できた。また、*L.pneumophila* の血清型 6, 8, 9, 12, 13 と *L.oakridgensis*、*L.sainthelensis* も増幅されることが確認できた。

L.pneumophila ATCC 33152 株を用いた感度試験の結果では、6 cfu/test の菌量でも増幅を確認できたが、この菌液量での試験の再現性を考慮すると 60 cfu/test を検出限界とするのが妥当と思われ、これも蛍光法と同じであった。ただし、濁度法は蛍光法と比べ増幅開始時間が遅れる傾向がみられたが、これは蛍光測定と濁度により吸光度測定の感度の差が影響していると考えられた。しかし、その程度は数分であり、20 分以内に確認可能なことから実用面では全く問題がないと考えられた。今回使用したリアルタイム濁度測定装置 LA-200 は市販されている蛍光リアルタイム PCR 測定装置の約 1/5~1/10 の価格で、装置自身も小さいことから(W245×D282×H188mm)、実際の検査現場で使用しやすい方法と思われた。

レジオネラ属菌の検出方法において、一般的に用いられている培養法の最大の欠点は検査時間が長いことである。このため、迅速検査法の一つとして核酸の検出が普及しつつある。両法の相違点は、培養法では培地上に集落を形成できる生菌のみを対象とするのに対し、遺伝子検査法では、生菌に加え、死菌や培養不能(VNC)菌、さらに核酸のみでも検出可能である。したがって、培養法と遺伝子検査法の結果を完全に一致させることは困難である。

今回は 125 試料の温泉浴槽水について、従来の培養法と近年開発された LAMP 法によってレジオネラ属菌の検出状況を比較検討したところ、培養法でレジオネラ属菌が検出された 40 試料については LAMP 法では 38 試料(95.0%)が陽性を示し、一致率は高かった。なお、培養法で陽性を示し、LAMP 法で陰性を示した 2 試料については、試料中に不溶性物質が多く、温泉浴槽水中に存在する増幅阻害物質の影響が考えられた。また、培養法によって不検出であった 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料(44.7%)が陽性を示した。Ng らは冷却塔水のレジオネラ属菌検査において、培養法では検出されない試料でも PCR 法では陽性を示す要因として死菌や VNC 菌の存在を指摘している。温泉浴槽水においても同様な影響が考えられ、

適切な塩素消毒が行われていても遺伝子検査法では陽性を示す場合がある。このことから、遺伝子検査法は培養法と異なり、陽性結果が即感染性の有無にはつながらない。すなわち、遺伝子検査陽性の温泉浴槽水が直ちに感染源になるとは限らない。この点が今後、遺伝子検査法をレジオネラ属菌の迅速検査法として採用する場合に十分考慮すべき課題である。

一方、塩素などの酸化性殺菌剤を添加した場合、死菌の核酸は分解され、殺菌剤濃度と接触時間によっては遺伝子検査法で不検出となることが報告されている。また、近年 RNA 迅速増幅技術として研究開発されている NASBA 法や TRC 法などが多分野で検討されている。こうした技術の導入により遺伝子検査と培養法による結果を近づけることが可能になるであろう。

5.6 結語

本法は極めて高い増幅能を特長としていることから増幅の有無を反応過程で生成されるピロリン酸塩とマグネシウムの沈殿物の濁度として計測が可能であり、今回この濁度測定を用いた LAMP 法での *Legionella* 属菌の検出を保存菌株を用いて確認した。その結果、LAMP 法を用いた *Legionella* 属菌の検出は、本属菌に対して高い特異性を有し、*L.pneumophila* では 60 CFU/test まで検出可能と高い感度を有していた。このように濁度による感度、特異性は蛍光インターカラータを用いた場合と同等で濁度測定の有用性が確認できた。

日本各地の温泉浴槽水 125 試料について培養法と LAMP 法を併用してレジオネラ属菌の検出を試み、両者の成績について比較検討を行った。培養法でレジオネラ属菌が検出された 40 試料については LAMP 法では 38 試料 (95.0%) が陽性を示し、一致率は高かった。また、培養法において不検出であった 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料 (44.7%) が陽性を示した。このように LAMP 法は従来の培養法に比べて検出率が高く、しかも試験操作が簡便なうえ、数時間で判定が可能であることからレジオネラ属菌の迅速検査法の一つとして有用であった。

6章 文献調査

塩素消毒と臭気の関係について文献調査を行なった結果を示す。

6.1 (社)日本水道協会：上水試験方法 解説編(2001年度版)、pp294～295

13 残留塩素

13.4 水道との関係

次亜塩素酸は、水中にアンモニア、アミノ酸、アミン類などがあると反応してモノクロラミン(NH_2Cl)及びジクロラミン(NHCl_2)を生成する。この反応の最終的な平衡状態における各クロラミンの存在割合は、pH 値及び塩素とアンモニア性窒素との濃度比によって異なる。pH7-8の範囲で、塩素とアンモニアのモル比が1:1(重量比で5:1)のとき、クロラミンの生成量は最大で、モノクロラミンの占める比率が高い。塩素の濃度費が高く、またはpH 値が低い場合はジクロラミンの比率が高くなる。更に、塩素のモル比が高く遊離残留塩素が存在する場合又はpHが4以下だとトリクロラミン(NCl_3)が生成する。また、クロラミンが分解される反応が起こる。

殺菌力はジクロラミンの方がモノクロラミンより強い。また、ジクロラミンは遊離残留塩素よりも塩素臭が強い。トリクロラミンは殺菌力はなく、特有の刺激臭がある。

6.2 森実圭二、梅谷友康、寺嶋勝彦：「浄化処理に起因する臭気の基礎的調査 塩素とアンモニア及びアミノ酸の反応、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績」Vol.49(1997)、pp1-5(1998/8)

水道水の塩素処理における結合型塩素の種類による臭気の種類について調査を行なった結果を報告している。

水道水に強い臭気が発生する条件として、以下の2つがある。

①pHが中性の場合、アンモニアに対する塩素注入モル比が高い場合

pH6.5で、塩素注入モル比の増加に従って、臭気強度が増加する。塩素注入量20～80mg/l(塩素注入モル比0.4～1.6)に比較して塩素注入量100～160mg/l(塩素注入モル比2.0～3.2)で臭気強度が高くなる結果であった。つまり、ブレイクポイント反応により強い臭気が発生する物質が生成された。

ただし、pHが8.3の場合は塩素注入量がpH6.5と同じ場合でも、臭気強度は低いままである。これはpH8.3の場合、塩素注入モル比が1.2以下ではモノクロラミンが生成するためと考えられる。(pH6.5の場合はジクロラミンが生成)

②水のpHが低い場合

pH3.0では塩素注入モル比が0.4でも臭気強度300となり、他のpH条件に比較して少ない塩素注入量でも強い臭気が発生する。

以上の結果から、トリクロラミンが存在する条件で強い臭気が発生すること及び、GC-MSによる解析の結果、3つ以上の塩素が付加した窒素化合物が塩素臭に関係することが明らかになった。

6.3 鍋田好雄、西川真人：カルキ臭の原因物質と低減化、水道協会雑誌、No4,Vol.66、pp16-23(1997)

各種形態の残留塩素の濃度におけるニオイの調査を行なった。また、カルキ臭を低減する塩素添加法について検討を行なった。

塩素注入率と形態別残留塩素濃度の関係を図 6.1 に示す。塩素添加率により、生成される形態別残留塩素の割合は異なり、3つの領域にわけることができる。

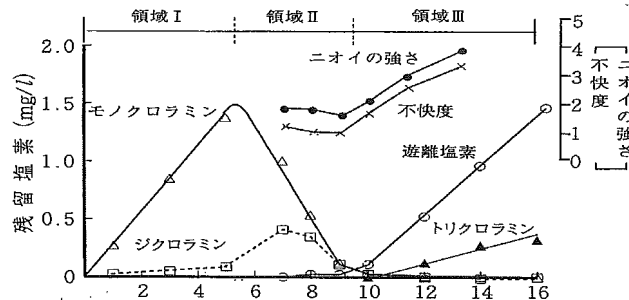


図 6.1 塩素添加率と形態別残留塩素およびニオイの強さ・不快度の関係

嗅覚試験の結果、各領域（I～III）のニオイの種類は次のように分類された。

対照水：遊離塩素のみ：塩素系漂白剤のニオイ（塩素臭）

試験水：領域 I：塩素臭にわずかな甘味を含んだニオイ

領域 II：遊離塩素とほとんど同じニオイ

領域 III：刺激性があり強い

領域 I ではモノクロラミンが、領域 II ではモノクロラミンとジクロラミンが、領域 III では約 1.0mg/L の遊離塩素と 0.3mg/L のトリクロラミンが含まれていた。

臭気を低減する塩素処理法を検討した結果、pH が 8.0 以上でブレイクポイント処理を行なえばトリクロラミンの生成が抑制されることを確認した。実際の浄水場では、最初に不連続点までの塩素量を加えてトリクロラミンの発生を抑制し、その後に必要な遊離塩素確保のための塩素添加を行なうという 2 段処理を行なうことでカルキ臭の抑制が可能である。

6.4 (社)日本プールアメニティ施設協会：水泳プール管理マニュアル、p119

IV プールの水質管理の実際 7 プール水中の化学物質 (2) 結合残留塩素

プール環境では、有効塩素と汗や尿の成分であるアミノ酸や尿素のような水中に混入している窒素化合物が反応して結合塩素であるクロラミンが発生する。クロラミンは目と粘膜への刺激や悪臭のため、入泳者に嫌われる原因となっている。クロラミン類及び特に三塩化窒素(NCl_3)は、強力な刺激物質及び催涙物質として認められている。フランスの INRS の実験結果では、結合塩素による遊泳プールの空気汚染のほぼ 90% が三塩化窒素に起因していると報告している。

6.5 まとめ

浴槽水の塩素消毒に伴う臭気問題に関連して、文献調査(JOIS)を行なった。

浴槽水の塩素臭に関する文献は無く、水道水塩素消毒時の臭気に関する文献を得た。

それらによれば、刺激のある塩素臭の主原因物質はトリクロラミンであり、生成条件は水の pH が 8.0 以下及び、塩素の添加量がブレイクポイント以上である場合とされている。また、pH が 6.5 以下、例えば 3.0 などに低くなると少量の塩素の添加でもトリクロラミンが生成されて臭気が強くなるとされている。

「学校環境衛生の基準」13 文科ス第 264 号（平成 13 年 8 月 28 日）によれば屋内プールの空気中塩素ガス濃度は 0.5ppm 以下が望ましいとされている。これは、施設利用者の健康被害の防止、臭気対策及び室内設備の金属腐食防止対策と考えられる。

浴室内は屋内プールと同様又は臭気に関してはより良い環境であることが望ましい。

浴槽水の塩素臭気対策は、過剰注入による高濃度残留塩素濃度の状態を防止することは勿論のこと、アンモニウムイオンを含有する浴槽水の場合はトリクロラミンの発生を抑制する管理が必要である。

7章 浴槽水の調査・実験と管理

7.1 家庭用循環浴槽水（生物ろ過膜仕様・レジオネラ対応型）の実態調査

7.1.1 目的

浴槽水を循環利用する留意点としては、第一に良質な水質の確保、第二に細菌汚染防止が挙げられる。少なくとも、この二点が満足されていないければ、循環式浴槽水の衛生学的安全性が図られているとはいえない。

これまで、浴槽水を循環系で再利用するために、ろ過槽内に自然増殖する微生物による有機汚濁物質の浄化作用を活用してきた。これら微生物は混合培養系であるため、ヒトに有害となる細菌類の増殖が指摘され、生物ろ過膜適用の見直しに迫られている。しかし、希釈することが本来の有機汚濁物質除去とはいえ、循環系浴槽水に対する有効な有機物除去対策が必要となっている。

以上の背景から本節では、循環系浴槽水の衛生学的安全性を図る基礎資料を得るために、実稼動家庭用循環浴槽水の水質調査を行った。

7.1.2 実験方法

(1) 生物ろ過膜仕様家庭用循環浴槽システム

装置の概要は2章の表2.1及び図2.1のとおりであり、紫外線殺菌灯が生物ろ過槽前段に設置されているタイプである。

(2) レジオネラ対応型循環浴槽システム

レジオネラ対応型家庭用循環浴槽システムの概要を表7.1及び図7.1に示す。本装置は生物ろ過槽後段に紫外線殺菌灯が設置されている。また、浴槽内は1日当たり、3時間の次亜塩素酸イオン(C10⁻)による消毒があり、生物ろ過槽内はレジオネラ属菌の不活化を目的として、1回/2週の70℃熱洗浄が行われる。なお、本装置の仕様では、浴槽水の全換水を1回/月とし、浴槽水に濁り等が生じた場合には適宜全換水することになっており、ろ過槽内バイオフィルムの全洗浄は1回/3月となっている。

表 7.1 レジオネラ対応型循環浴槽システムの仕様

型式	LB-271 (LB-271-HG)
本体外形寸法	高さ 533×幅 500×奥行 175mm
定格電圧	AC 100V
定格周波数	50/60 Hz
浄化システム	生物浄化+物理浄化
温度表示	デジタル表示
温度調節範囲	35～45℃(設定1℃毎)、OFF

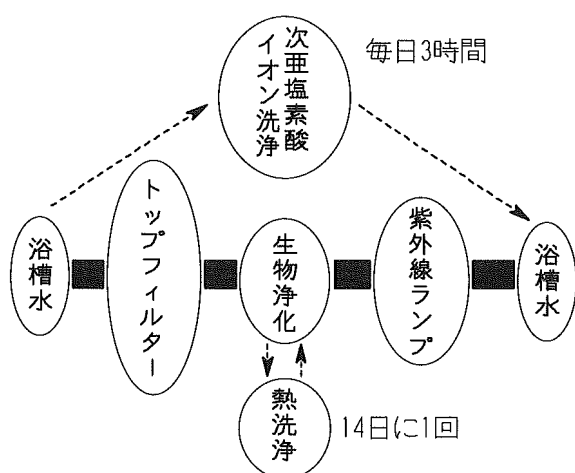


図 7.1 レジオネラ対応型循環浴槽システム

(3) 浴槽水の水質調査

本調査は入浴に使用している家庭用循環浴槽水を対象とし、浴槽水の理化学および細菌試験を経日的に測定した。また、最終日におけるろ過槽内バイオフィルムの生成量を計測した。さらに、レジオネラ対応型循環浴槽システムにおける次亜塩素酸イオン (ClO^-) による消毒効果を評価するために、消毒開始から入浴終了時までの残留塩素濃度について時系列に測定した。また、生物ろ過槽内の充填剤を水道水で洗浄し、生成したバイオフィルム量、細菌数を測定した。

入浴者数は、成人 4 人（男 2 人、女 2 人）であり、浴槽水の採取は入浴後 8 時間以降とし、午前 7 時～8 時に行った。

7.1.3 結果および考察

(1) 生物ろ過膜仕様家庭用循環浴槽水の水質特性

生物ろ過膜仕様家庭用循環浴槽システムにおける水質試験結果を表 7.2 に示す。pH は 7.2～7.8（中央値 7.5, $n=27$ ）であった。また、電気伝導率は 152～185 $\mu\text{S}/\text{cm}$ （中央値 170 $\mu\text{S}/\text{cm}$, $n=27$ ）であった。 KMnO_4 は 2.10～9.65 mg/L （中央値 4.33 mg/L , $n=26$ ）であり、初期時は 4.28～9.65 mg/L と高値を示したが、生物浄化が安定すると 4.0 mg/L 以下となった。TOC は 1.36～4.86 mg/L （ $n=27$, 中央値 3.80 mg/L ）であり、 KMnO_4 と同様の傾向であった。

表 7.2 生物ろ過膜仕様における浴槽水の水質試験結果

経過日数(日)	pH	Cond.($\mu\text{S}/\text{cm}$)	TOC(mg/L)	KMnO_4 消費量(mg/L)
1	7.6	163	3.18	2.52
2	7.4	152	3.87	4.28
3	7.4	158	4.60	5.31
5	7.4	160	4.52	4.33
6	7.5	160	4.38	6.29
7	7.7	160	4.09	4.45
8	7.8	159	4.16	6.15
9	7.7	160	4.41	8.39
10	7.9	161	3.89	6.66
11	7.7	162	4.25	5.96
12	7.8	160	3.80	7.66
14	7.3	166	3.43	9.65
17	7.2	170	4.07	—
29	7.2	173	3.78	7.66
34	7.4	178	3.85	4.70
35	7.2	174	3.72	3.64
36	7.3	177	3.80	4.56
37	7.2	179	3.58	4.11
40	7.2	180	3.30	4.33
41	7.3	182	3.35	3.61
42	7.5	183	3.02	3.52
43	7.5	185	3.37	3.22
55	7.2	171	1.36	3.22
58	7.2	170	1.56	3.50
59	7.4	170	4.35	3.92
65	7.5	170	3.53	2.10
66	7.5	172	4.68	3.66

調査期間: 2005 4/15～6/22