

は少ないものと考えられてきた。ところが掛け流し式浴槽は施設管理の不徹底から、循環式に比べて *Legionella* 属菌陽性率が高い実態が報告されている。

循環式浴槽での *Legionella* 属菌集団感染を受けて塩素消毒の徹底が図られているが、掛け流し式ではその特性を生かし、塩素消毒への依存から脱却した管理を目指すことが重要な課題である。

源泉で *Legionella* 属菌が検出されることは稀であることから、掛け流し式浴槽で検出される *Legionella* 属菌は源泉貯湯タンク以降で増殖したのと考えられる。*Legionella* 属菌が増殖するには宿主アメーバとそれを支持する環境で、その基礎としての温度と有機物である。

源泉に含まれる有機物量を微生物の増殖ポテンシャルとして測定できれば、一つの指針としてタンクや配管系の管理に反映させることが可能となる。

AOC は、塩素消毒を用いない水道における配管中の微生物の制御を目的に開発された指標である。*Pseudomonas fluorescens* P17 株ならびに *Aquaspirillum* sp. NOX 株の 2 種を滅菌した試験水に接種し、その増殖量から試料水中の有機物を酢酸炭素量相当に換算する。数値が大きければ有機物が多く、微生物が増殖する恐れが高いことを意味する。当該研究ではこの方法を用いて源泉中の微生物増殖ポテンシャルの評価を試みたので報告する。

B. 方法

試料水 100ml は 300°C12 時間の乾熱処理したガラス瓶を用いて源泉あるいは源泉タンクより採水した。75°C30 分間温浴にて加熱処理した後、測定施設まで輸送した。AOC 測定は P17-NOX 法を行った。すなわち、*Pseudomonas fluorescens* P17 株並びに *Aquaspirillum* sp. NOX 株を接種し、25°C暗所にて静置培養した。定期的に一部試料を取り出し R2A 培地 (Difco) を用いて培養し、1 ヶ月間菌濃度を測定した。あらかじめ用意した検量線を用いて、菌の増殖から酢酸炭素等量の AOC 濃度を求めた。

TOC (Total organic carbon、全有機炭素) 測定は上水試験法に準じて行い、TOC-VCPH 型式他 (島津製) を使用した。一部試料では無機炭素の正の妨害があったことから、機器に設定していた無機炭素処理とは別に、追加の塩酸処理を検討した。すなわち、試料 20ml に 0.1N HCl 20ml を添加し、激しく振とうして炭酸を二酸化炭素として除去した。添加した塩酸量は、滴定により炭酸を中和するのに適当な量として定めた。

C. 結果および考察

AOC 測定の結果を一覧にして表示した (表 1)。試料採取した施設は別の研究目的でも検討を行っている場所で、*Legionella* 属菌の検出状況も併記した。AOC 測定値は一部例外を除き、2~314ug/L の範囲であった。例数は少ないが、*Legionella* 属菌が陽性であった試料はいずれも AOC の値が 100ug/L を超えており、現時点では 100 前後が源泉における *Legionella* 属菌汚染への警戒値と考えた。

AOC 測定は手技としては大変煩雑であることから、AOC を代替する方法があれば管理

指針として利用が期待される。有機炭素量の測定方法として近年 TOC 測定が水道を中心に
行われており、本研究でもあわせて測定を行った。AOC と TOC の関係を図 1 に示したが、
回帰直線の相関計数は $R^2=0.26$ と低かった。試料[B オ]は AOC が高いにもかかわらず TOC
が低く両者の間で整合性がとれないが、これを除けば有機物が高濃度の領域では多少の相
関は認められると考えられた。

相関が得られない理由は、本来 AOC は TOC の一部で、両者の量比が一定するとは限ら
ないこと、また、2 種類の測定上の妨害が考えられた。1 つは TOC が炭酸によるプラス妨
害（測定値の過大評価）を強く受けること、もう一つは阻害物質による AOC のマイナス妨
害（測定値の過小評価）である。

TOC 濃度の極端な例外として C12 の試料は当初 746mg/L と測定されたが、炭酸ガスの
プラス妨害が判明し、方法に記した塩酸処理の検討を行った結果として 1.8mg/L に落ち着
いた。現行の TOC 測定は水道での利用が中心であることから、機器の保護を目的に塩酸濃
度が抑えられており、今後測定する全ての試料について塩酸量を増加させる必要がある。

試料[G]は試料[B オ]と逆の方向に測定値が乖離し、G 試料の TOC の値が 2.8mg/L と結果
内で 2 番目に高い値であるにもかかわらず、AOC は 20ug/L と低かった。そこで、同試料
を 10 倍に希釈して測定を行った結果、10 倍希釈測定は原液での測定の 100 倍近い大きな値
となり、高い TOC 値が AOC 値に反映された。この源泉は腐食した植物由来の有機物が多
量に含まれていた。この例が示すように泉種によっては微生物の生育を阻害する物質が含
まれる可能性が示され、詳細な検討が必要である。

D. 結論

源泉タンクと配管の管理の指針とすることを目的に、微生物増殖の恐れを増殖ポテンシ
ヤルとして表すことのできる AOC 測定を行った。その結果、AOC100ug/L を超えた施設
と *Legionella* 属菌陽性が関連しており、現時点で 100 程度が汚染警戒値と考えられた。煩雑
な AOC 測定に変わる方法として TOC 測定を検討した。現時点で相関が乏しいが、1mg/L
前後に閾値の存在が示唆された。今後、TOC の炭酸ガスによるプラス妨害、AOC の阻害物
質によるマイナス妨害を考慮した検査方法の検討が必要である。

E. 参考文献

1. 上水試験法解説編、同化性有機炭素（AOC）、pp935-941、日本水道協会、2001.
2. 金子光美（監訳 McFeter, G, A., Ed）；飲料水の微生物学、飲料水中の同化可能有機炭
素（AOC）、pp.55-78、技法堂、1992
3. 厚生労働科学特別研究事業「循環式浴槽システムにおける微生物管理手法に関する研
究」（主任：遠藤卓郎）より掛け流し式浴槽のレジオネラ汚染調査（杉山寛治ら）、平
成 14 年度

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

泉山信司、縣 邦雄、遠藤卓郎：浴槽水における有機物汚染の蓄積に関する考察、環境技術学会（大阪）、2005年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 AOC 測定結果

試料	AOC[$\mu\text{g/L}$]	TOC[mg/L]	Legionella属菌
A1	18	0.6	-
A2	161	1.9	陽性
A3	36	1.4	-
B才	314	0.5	陽性
Bテ	272	6.9	陽性
Bヨ	124	1.1	陽性
C12	2	1.8	-
C13	55	0.4	-
C14	17	0.2	-
D1	15	0.9	-
D2	29	0.4	-
D3	18	0.4	-
E17	2	0.4	-
EM	7	0.4	-
ET	8	0.3	-
FT	32	1.2	-
FH	22	1.3	-
G	20	2.8	(no data)
G10倍希釈	1700	-	

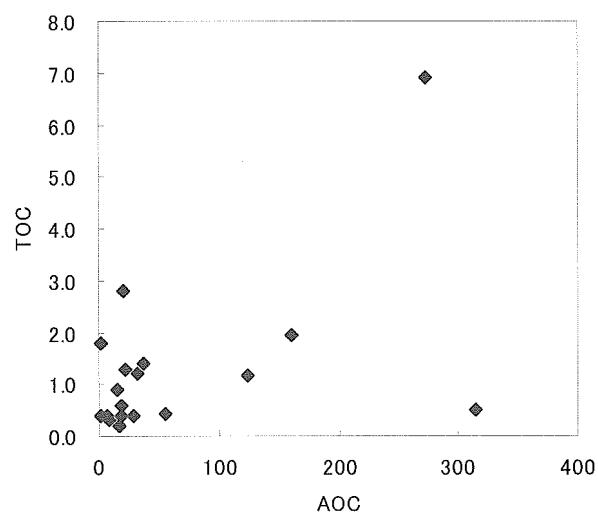


図 1 AOC と TOC の相関図

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究

平成 17 年度分担研究報告

原泉貯槽のバイオフィルム調査

分担研究者	遠藤卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
	大谷勝実	山形県衛生研究所
	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
	杉山寛治	静岡県環境衛生科学研究所
	烏谷竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	蔵元強	鹿児島県環境保健センター
	縣邦雄	アクアス株式会社つくば総合研究所
研究協力者	山口誠一	山形県村山保健所
	藪崎裕昭	アクアス株式会社つくば総合研究所

研究概要

掛け流し式温泉の塩素剤を使用していない施設において、原泉貯槽におけるバイオフィルム生成程度を調査した。5箇所の温泉施設の原泉貯槽水にシリコンゴムの試験片を浸漬、定期的に取り出し、付着した微生物量を検査した。温泉施設により付着する微生物量に違いがあり、またレジオネラ属菌の定着の程度も異なった。レジオネラ属菌の定着が起きる場合は2～3ヶ月の浸漬で確認された。付着微生物量、レジオネラ属菌の定着の有無に及ぼす影響因子として、水温が考えられたが、水質などの要因の検討も今後の課題である。原泉貯槽でのレジオネラ属菌の定着が2～3ヶ月で起きる事が確認された。従って、原泉貯槽のバイオフィルム生成状況に応じた清掃消毒管理の重要性が示された。

A. はじめに

掛け流し式温泉施設におけるレジオネラ属菌対策の管理ポイントとして、原泉貯槽、貯槽から浴槽への配管、浴槽自体が考えられる。原泉そのものにはレジオネラ属菌は存在しない場合も、原泉貯槽で大気開放して貯留された場合にレジオネラ属菌が増殖する可能性が高い。

原泉貯槽のバイオフィルム付着程度を経時的に調査することにより、各原泉貯槽の内壁におけるバイオフィルム生成程度の評価、レジオネラ属菌定着の可能性の評価、適正な原泉貯槽清掃頻度の検討の基礎データとする。

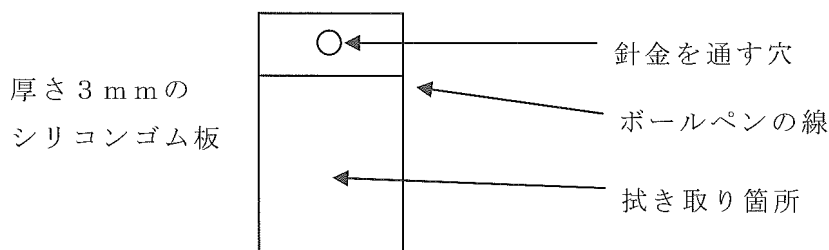
B. 研究方法

1. 測定方法

掛け流し式温泉の原泉貯槽に、シリコンゴム板（25×50×3mm）を浸漬し、定期的に取り出して、付着したバイオフィルムの微生物量を測定する。

(1) シリコンゴム板

市販の、3mm厚のシリコンゴム板を25×5.0cmに切断する。長手方向の端から1cmのところにボールペンで線を引く。2.5×1.0cmの中心に3mmφの穴をあける。



(2) 原泉貯槽への浸漬

シリコンゴム板数枚を、被覆針金を用いて浸漬する。このとき、低水位でもシリコンゴム板が空気に露出しない深さに設置する。

(3) 取り出し

一定期間ごとにシリコンゴム板を取り出し、上部から1cmの線で切り取り、10mLの滅菌水を入れた50mLの遠沈管に入れる。

同時に、原泉貯槽の水を採取し、遠沈管とともに冷蔵宅配便で検査機関に送る。

(4) 微生物類検査

シリコンゴム板は、付着物を剥離して10mLの滅菌水に懸濁したものを試料とする。各試料について、ATP*、一般細菌数、従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数、アメーバ数を検査する。

*ATP：アデノシン3リン酸、生きている微生物の細胞中に存在する物質であり、およその微生物量を迅速に知ることが出来る。測定は微生物からATPを水中に遊離させた後、ルシフェラーゼ、ルシフェリン発光(蛍の発光原理)させ、光の量を専用の計器で測定する。

2. 調査施設

A施設、B施設、C施設、D施設、E施設の5箇所の掛け流し式温泉施設の原泉貯槽で調査を行なった。

項目	A施設	B施設	C施設	D施設	E施設
貯槽容量(m ³)	32	100	100	4.3	100
流入量(m ³ /h)	16.8	25	50	約2	12(18h)
貯槽材質	FRP	FRP	FRP	コンクリート	コンクリート
水温(°C)	48	49~53	48.6	17.9	48~50

3. 各調査施設の温泉水質

単位：pH、電気伝導率以外はmg/L

項目	A施設	B施設	C施設	D施設	E施設
pH	7.5	7.9	7.8	7.4	9.1
電気伝導率(mS/m)	1200	390	1900	130	21
全硬度(CaCO ₃)	880	542	326	112	4
Ca硬度(CaCO ₃)	730	510	280	88	4
Mg硬度(CaCO ₃)	150	32	46	24	0
鉄	1.7	<0.05	1.2	0.05	<0.05
マンガン	3.1	<0.05	0.17	0.07	<0.05
酸消費量 pH4.8(CaCO ₃)	99	38	200	200	70
塩化物イオン	760	1100	6400	300	11
硫酸イオン	25	320	<1	10	13
亜硝酸イオン	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
硝酸イオン	1	1	<0.1	<0.1	0.8
シリカ	98	54	26	28	42
過マンガン酸カリ ウム消費量	8.7	1.4	3.2	1.1	3.5
TOC	1.5	0.5	NT	0.3	NT

C. 結果と考察

1. A施設

(1) 試験条件

設置場所	屋外地上設置
材質	FRP
容量	32 m ³
流入水量	16.8 m ³ /h
入れ替わり時間	114分
温度	平均48℃(最低46から最高50℃)
シリコンゴム設置場所	底面からの高さ50cm、水面からの深さ150cm

(2) 水質(2005年8月23日採水) 単位：pH、電気伝導率以外はmg/L

項目	値
pH	7.5
電気伝導率(mS/m)	1200
全硬度(CaCO ₃)	880
Ca硬度(CaCO ₃)	730
Mg硬度(CaCO ₃)	150

鉄	1.7
マンガン	3.1
酸消費量 pH4.8 (CaCO ₃)	99
塩化物イオン	760
硫酸イオン	25
亜硝酸イオン	<0.05
硝酸イオン	1
シリカ	98
過マンガン酸カリウム消費量	8.7
TOC	1.5

(3) 調査日程

年 月/日	内 容
2005年8月22日	原泉貯槽の清掃実施
2005年8月23日	シリコンゴム板設置
2005年9月20日	1回目取り出し
2005年10月24日	2回目取り出し
2005年11月21日	3回目取り出し
2005年12月19日	4回目取り出し
2005年12月26日	原泉貯槽の清掃実施
2005年12月27日	再試験シリコンゴム板設置
2006年1月24日	再試験1回目取り出し

(4) 細菌数測定結果

①原泉貯槽水

月日	8/23	9/20	10/24	11/21		12/19
A T P (pmol/L)		<10	<10	<10	-	<10
レジオネラ属 (CFU/100mL)	<10	<10	<10	50	-	1500
一般細菌数 (CFU/mL)	200	8	1	74	-	2
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	340	18	9	80	-	7
アメーバ類 (PFU/100mL)		<2	<2	<2	-	<2

原泉貯槽水では、清掃後3ヶ月目の採水でレジオネラ属菌が検出されている。
4ヶ月目の12月19日の採水では1500CFU/100mLとなった。一般細菌数、従属栄養細菌数ともに低い値で推移した。

②シリコンゴム板

月日		9/20	10/24	11/21 ①	11/21 ②	12/19
A T P (n mol/L)	-	3.24	0.83	1.33	0.94	0.76
レジオネラ属菌 (CFU/mL)	-	<10	10	280	140	1300
一般細菌数 (CFU/mL)	-	170	24	140	13	47
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	-	23000	34	150	20	50
アメーバ類 (PFU/mL)	-	<1	<1	<1	<1	<1

11月21日はシリコンゴム板を2枚同時に取り出して検査した。

レジオネラ属菌は2ヶ月目のサンプリングから検出され始め、次第に増加した

③再試験の原泉貯槽水とシリコンゴム板

月日	原泉貯槽水		シリコンゴム板	
	12/27	1/24		1/24
A T P (n mol/L)		<10		1.1
レジオネラ属菌 (CFU/mL)	<10	2100		2600
一般細菌数 (CFU/mL)		19		9
従属栄養細菌数 (CFU/mL)		25		240
アメーバ類 (PFU/mL)		<2		<1

11月、12月とレジオネラ属菌を検出したので清掃を行い再試験を実施した。

12月26日清掃実施しており、翌日の採水では原泉貯槽のレジオネラは不検出であった。一ヵ月後の検査では、原泉貯槽水、シリコンゴム板ともにレジオネラ属菌が検出された。

(5) A施設の結果と考察

試験期間中を通じて、一般細菌数、従属栄養細菌の菌数は少ない。

清掃直後レジオネラ属菌は検出されないが2~3ヶ月目から検出され、4ヶ月まで菌数の増加が認められる。貯湯槽へのレジオネラ属菌の定着、増殖が認められる。レジオネラ属菌は *L. pneumophila* SG6 及び L 属菌であった。これらの菌種は2005年7月にも検出されており、槽内に生き残っていた可能性が指摘される。

再試験の12月から1月にかけてはレジオネラ属菌の定着が、8月から10月にかけてよりも早く、その原因として原泉貯槽内部の汚れが清掃しきれていなかったか、あるいは冬季で水温がやや低かったことが影響していた可能性がある。

本試験においては、シリコンゴム板に茶色の泥状物が付着していたことが特徴的である。付着物の成分は80%が鉄であり、11%がケイ素で、温泉成分の鉄が付着したものであった。

2. B施設

(1) 試験条件

設置場所	屋外地上設置
材質	FRP
容量	100 m ³
流入水量	25 m ³ /h
入れ替わり時間	4時間
温度	48.8℃から53.4℃
シリコンゴム設置場所	原泉貯槽マンホールより吊るし、 底面から50～100cmとした。

(2) 水質 (2005年8月31日採水) 単位：pH、電気伝導率以外は mg/L

項目	値
pH	7.9
電気伝導率 (mS/m)	390
全硬度 (CaCO ₃)	542
Ca 硬度 (CaCO ₃)	510
Mg 硬度 (CaCO ₃)	32
鉄	<0.05
マンガン	<0.05
酸消費量 pH4.8 (CaCO ₃)	38
塩化物イオン	1100
硫酸イオン	320
亜硝酸イオン	<0.1
硝酸イオン	1
シリカ	54
アンモニウムイオン	<0.1
過マンガン酸カリウム消費量	1.4
TOC	0.5

(3) 調査日程

年 月/日	内 容
2005年6月	原泉貯槽の清掃実施
2005年8月31日	シリコンゴム板設置
2005年9月28日	1回目取り出し
2005年10月31日	2回目取り出し
2005年12月4日	3回目取り出し

(4) 細菌数測定結果

①原泉貯槽水

月日	8/31	9/28	9/28 水位計	10/31	12/4
温度(°C)	48.8	53.4	42	52.6	
A T P (pmol/L)	NT	<10	<10	20	59
レジオネラ属(CFU/100mL)	60	<10	<10	<10	<10
一般細菌数 (CFU/mL)	0	0	11	0	0
従属栄養細菌数(CFU/mL)	110	1	130	0	0
アメーバ類 (PFU/100mL)	NT	<2	<2	<2	<2

8月31日の採水でレジオネラ属菌が60CFU/100mL検出されたが、その後は不検出を維持した。これは水温が低かった影響が考えられる。

9月28日は温度の低い水位計からも採水したところ貯槽水に比較して従属栄養細菌数が高かった。9月28日以降、原泉貯槽水の細菌数は低い値を維持した。

原泉貯槽の水温は、いくつかの原泉が混ざって入ってくること、及び季節によって変動するが、調査期間中の管理目標温度は57°Cであった。

②シリコンゴム板

月日	8/31	9/28	10/31	12/4 ①	12/4 ②
A T P (nmol/L)	-	7.1	35	36	28
レジオネラ属菌(CFU/mL)	-	<10	<10	<10	<10
一般細菌数 (CFU/mL)	-	6	14	110	98
従属栄養細菌数(CFU/mL)	-	7	18	200	600
アメーバ類 (PFU/mL)	-	<1	<1	<1	<1

12月4日はシリコンゴム板を2枚同時に取り出して検査した。

試験期間中、レジオネラ属菌の定着は無かった。一般細菌数、従属栄養細菌数は3ヶ月目でやや高い値を示した。期間を通じてATP値が高い値であった。

(5) B施設の結果と考察

原泉貯槽水は温度の低い場合を除いて、一般細菌数、従属栄養細菌数は低い値を示した。レジオネラ属菌は、8月31日の温度の低い貯槽水試料で検出されたが、その後不検出を維持した。これは、原泉貯槽の温度維持がレジオネラ対策として重要であることを示している。

シリコンゴム板の菌数は2ヶ月目までは低い値であったが、3ヶ月目にやや増加した。その場合もレジオネラ属菌の定着は無かった。

シリコンゴム板のATP値がやや高めの値を示しており、細菌類の挙動とは異なっているが、高ATPの由来は不明である。

3. C施設

(1) 試験条件

設置場所	屋外地上設置
材質	FRP
容量	100 m ³
流入水量	50 m ³ /h
入れ替わり時間	2時間
温度	平均 48.6℃
シリコンゴム設置場所	流出箇所近く、底面から50cmの高さ、水面からの深さ120cm。

(2) 水質 (2006年1月24日採水) 単位：pH、電気伝導率以外は mg/L

項目	値
pH	7.8
電気伝導率 (mS/m)	1900
全硬度 (CaCO ₃)	326
Ca硬度 (CaCO ₃)	280
Mg硬度 (CaCO ₃)	46
鉄	1.2
マンガン	0.17
酸消費量 pH4.8 (CaCO ₃)	200
塩化物イオン	6400
硫酸イオン	<1
亜硝酸イオン	<0.1
硝酸イオン	<0.1
シリカ	26
過マンガン酸カリウム消費量	3.2
アンモニウムイオン	5.8

(3) 調査日程

年 月/日	内 容
2006年2月6日	原泉貯槽の高圧ジェットによる清掃実施
2006年2月13日	シリコンゴム板設置
2006年2月20日	1回目取り出し
2006年2月26日	2回目取り出し
	継続中

(4) 細菌数測定結果

2月6日に採取した、原泉貯槽の堆積物と一緒に採取した貯槽水中のレジオネラ属菌数は 6000 CFU/100mL であった。

堆積物中は酸化鉄 49%、灼熱減量 31%であり、鉄バクテリア主体であり、その中にレジオネラも存在しているものと考えられる。

(5) C施設の結果と考察

第一回目にシリコンゴム板を取り出した時、茶色の泥状物質が付着していた。

付着の程度はゴム板の面により異なっていた。

付着物は、原泉貯槽堆積物から判断して、鉄分が主体と考えられる。

鉄の付着により、バイオフィルム、レジオネラ属菌の付着が生じやすいかについて、検討する必要がある。

C施設は今後、試料の検査及びデータの解析を行なっていく。

4. D施設

(1) 試験条件

設置場所	地下埋設
材質	コンクリート
容量	4.3 m ³
流入水量	約 2 m ³ / h
入れ替わり時間	2 時間
温度	平均 17.9℃、最高 18.8℃・最低 17.0℃
シリコンゴム設置場所	本施設は、地下埋設型の貯槽に源泉が直接自噴しており、ポンプアップにより加温ボイラ及び浴槽に供給している。浴槽での利用状況に応じて、貯槽内の水位は 3 m から 0.5 m の範囲で変動するため、貯槽中央部に底面から 20~30 cm の高さにシリコンゴム板を設置。

(2) 水質 (2005年8月31日採水) 単位: pH、電気伝導率以外は mg/L

項目	値
pH	7.4
電気伝導率 (mS/m)	130
全硬度 (CaCO ₃)	112
Ca 硬度 (CaCO ₃)	88
Mg 硬度 (CaCO ₃)	24
鉄	0.05
マンガン	0.07
酸消費量 pH4.8 (CaCO ₃)	200

塩化物イオン	300
硫酸イオン	10
亜硝酸イオン	<0.1
硝酸イオン	<0.1
シリカ	28
過マンガン酸カリウム消費量	1.1
TOC	0.3

(3) 調査日程

年 月/日	内 容
2004年10月(試験の前年)	原泉貯槽の清掃実施
2005年8月7日	シリコンゴム板設置
2005年8月31日	1回目取り出し
2005年9月6日	台風による大雨があり、貯槽内に雨水・泥水が流入した。泥水等をポンプにより排出した後も、数日間源泉に濁りが認められたが、3日目に清浄な状態に戻ったため、特段の措置を行うことなく営業を再開
2005年10月11日	2回目取り出し
2005年11月2日	3回目取り出し
2005年12月5日	4回目取り出し

(4) 細菌数測定結果

①原泉貯槽水

月日	8/7	8/31	10/11	11/2	12/5
A T P (pmol/L)	-	-	27	650	50
レジオネラ属(CFU/100mL)	<10	<10	90	<10	<10
一般細菌数(CFU/mL)	2.5×10^3	2.4×10^2	5.4×10	3.8×10	6.0×10
従属栄養細菌数(CFU/mL)	2.9×10^3	3.9×10^2	3.0×10^2	5.2×10^2	3.1×10^2
アメーバ類(PFU/100mL)	7	300	<2	18	<2

10月11日にレジオネラ属菌が90CFU/100mL検出されている。これは、前月9月6日の台風による雨水・泥水混入の影響が考えられた。アメーバ類はたびたび検出されている。

②シリコンゴム板

月日	8/31	10/11	11/2	12/5①	12/5②
A T P (nmol/L)	46.8	8.0	7.0	8.6	13.7
レジオネラ属菌(CFU/mL)	<10	<10	10	20	10
一般細菌数(CFU/mL)	4.1×10^2	2.6×10^3	3.5×10^4	3.1×10^4	3.8×10^4

従属栄養細菌数(CFU/mL)	5.4x10 ²	4.6x10 ⁴	1.1x10 ⁵	2.5x10 ⁵	4.1x10 ⁵
アメーバ類 (PFU/mL)	380	14	24	8	12

12月5日はシリコンゴム板を2枚同時に取り出して検査した。全般に微生物汚染の程度が高く、アメーバ類も検出された。レジオネラ属菌は11月2日以降低い菌数であるが検出されている。

シリコンゴム板及び吊り下げ用被覆針金の表面には、設置後1ヵ月目から茶色の泥状物が付着し、見た目の汚れは時間が経過してもあまり変化がなかった。

(5) D施設の結果と考察

バイオフィルム調査の採水の際に、当該調査のほかに源泉貯槽水の大腸菌、大腸菌群、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、抗酸菌の検査を3回(8/7、8/31、11/2)実施し、いずれの試料からも大腸菌及び大腸菌群が検出されていた。このことから、当該源泉貯槽には生活排水を含む地下水が浸入していると考えられた。貯槽水の従属栄養細菌数は調査期間中10²~10³ CFU/mLと比較的高い値で推移した。アメーバ類は最大300 PFU/100mL検出され、槽内におけるバイオフィルムの蓄積が示唆されたが、泉温が18℃前後と低温であるため、*Hartmannella*以外には温水環境を好む*Naegleria*や*Acanthamoeba*等の宿主アメーバは見られず、検出アメーバ中に占める宿主アメーバの割合は小さいものと考えられた。貯槽水中のレジオネラ属菌は、雨水流入後の検査で一度検出されたが、その後再び陰性に転じた。

貯槽内に設置したシリコンゴム板表面の細菌数は、設置後3ヶ月目までは指数的に増殖したが、3ヶ月目以降は一般細菌数10⁴ CFU/mL、従属栄養細菌数10⁵ CFU/mL程度で安定した。シリコンゴム板表面へのレジオネラ属菌の定着は、細菌数が安定期に入った3ヶ月目以降に確認された。レジオネラ属菌の検出と雨水の流入との因果関係は明らかではないが、シリコンゴム板上のレジオネラ属菌は浮遊性のレジオネラが陰性化した後にも引き続き検出されていることから、20℃に満たない低温環境であっても貯槽内のバイオフィルム中にはレジオネラ属菌が定着していることが示された。

ATP量と細菌数との間に相関は見られなかったが、アメーバ数が多い場合にATP量が上昇する傾向が見られた。

5. E施設

(1) 試験条件

設置場所	丘の上部
材質	コンクリート
容量	100 m ³
流入水量	12 m ³ /h × 18時間
入れ替わり時間	11時間
温度	48℃から50℃
シリコンゴム設置場所	貯湯槽点検口から吊るした

(2) 水質 (2005年9月20日採水) 単位: pH、電気伝導率以外は mg/L

項目	値
pH	9.1
電気伝導率 (mS/m)	21
全硬度 (CaCO ₃)	4
Ca 硬度 (CaCO ₃)	4
Mg 硬度 (CaCO ₃)	0
鉄	<0.05
マンガン	<0.05
酸消費量 pH4.8 (CaCO ₃)	70
塩化物イオン	11
硫酸イオン	13
亜硝酸イオン	<0.1
硝酸イオン	0.8
シリカ	42
アンモニウムイオン	<0.1
過マンガン酸カリウム消費量	3.5
TOC	<0.5

(3) 調査日程

年 月/日	内 容
2005年8月19日	シリコンゴム板設置
2005年9月20日	1回目取り出し
2005年10月31日	2回目取り出し
2005年12月5日	3回目取り出し

(4) 細菌数測定結果

①原泉貯槽水

月日	9/20	10/31	12/5
ATP (pmol/L)	<10	<10	<10
レジオネラ属 (CFU/100mL)	<10	<10	<10
一般細菌数 (CFU/mL)	2	3	3
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	20	3	12
アメーバ類 (PFU/100mL)	<2	<2	<2

いずれの採水においても、ATP 値、細菌数は低い値を示した。

②シリコンゴム板

月日	9/20	10/31	12/5
ATP (nmol/L)	4.9	4.8	5.4
レジオネラ属菌 (CFU/mL)	<10	<10	<10

一般細菌数 (CFU/mL)	53	390	100
従属栄養細菌数 (CFU/mL)	55	390	130
アメーバ類 (PFU/mL)	<1	<1	<1

一般細菌数、従属栄養細菌数はやや高い値を示しているが、レジオネラ属菌の定着は無かった。

(5) E施設の結果と考察

原泉貯槽水中の微生物量は少なく、温度が高いことが影響していることが考えられる。シリコンゴム板は設置一ヵ月後では50CFU/mL程度の細菌類の付着であったが2ヵ月後以降やや増加した。3ヶ月目も著しい増加傾向は認められず、レジオネラ属菌の定着は無かった。

細菌類の定着が少ない理由としては、水温が高いことに加えて、鉄、マンガンが少なくシリコンゴム板上への付着物が殆ど無かったことが考えられる。

D. 結論

- 施設により、シリコンゴム板上へのバイオフィーム、レジオネラ属菌の付着程度は大きな差が認められた。

- 低水温のD施設では一般細菌数、HPC、アメーバ類が貯槽水、シリコンゴム板の両方で高く、加えて大腸菌が検出されたことから原泉貯槽に生活排水が混入している可能性があった。一回の検査に限られるが、過マンガン酸カリウム消費量は低値であり、微生物汚染については、温度が低い要因も影響していると思われる。

レジオネラ属菌のシリコンゴム板への定着は設置後3ヶ月目からであった。

- 他の4箇所では、水温は48から53℃と比較的狭い温度範囲であるが、レジオネラ属菌の挙動に違いが見られた。

B施設とE施設は、貯槽水中の微生物数が少なく、シリコンゴム板では経時的に一般細菌数、従属栄養細菌数が多くなっていったが、貯槽水、シリコンゴム板ともにレジオネラ属菌は定着しなかった。この要因としては、温度がやや高いことが考えられた。

- A施設では、他に比較して一般細菌数や従属栄養細菌数は多くないが、レジオネラ属菌の定着が認められた。シリコンゴム板への定着は、設置後2ヶ月目からであった。菌数が多い理由として他施設との水温の違い(やや低い)影響が考えられた。

一旦レジオネラ属菌を検出後、清掃した場合、一ヶ月目の検査でシリコンゴム板にレジオネラ属菌の定着が確認された。これは原泉貯槽内部の汚れが清掃しきれていなかったか、冬季で水温がやや低かった可能性がある。

- 塩素処理を行っていない原泉貯槽水において、4件全ての施設(C施設は試験中にて除く)において経時的にバイオフィームの定着が確認されたが、3ヶ月までの調査ではレジオネラ属菌の定着は2件であり、2ヶ月目、3ヶ月目の試料から検出した。

レジオネラ属菌の検出／不検出の要因として、貯水槽の水温の影響、温泉の泉質の影響（鉄、マンガンの存在、有機物量など）が考えられる。

・原泉貯槽のバイオフィーム生成状況に応じた、清掃消毒管理が重要である。

E. 参考資料：42℃の水中におけるバイオフィーム付着量

シリコンゴム板へのバイオフィームの付着程度に関して、水道水、42℃の条件で実験室で試験を行なったデータを示す。42℃条件でのシリコンゴム板への微生物付着程度の参考のために示す。

(1) 試験の目的

浴槽水において、過マンガン酸カリウム消費量の有無でバイオフィーム付着量の程度に相違があるかどうかを評価する。また、遊離残留塩素管理によるバイオフィーム抑制の程度を評価する。

(2) 試験方法

つくば市水及び、つくば市水にグルコースを 15mg/L（過マンガン酸カリウム消費量として 30mg/L）入れた水を 20L の開放容器に入れ、実験室内で 42℃で加温、攪拌した。各水中にはシリコンゴム板を浸漬した。

試験開始から、14 日間は次亜塩素酸ナトリウムを添加して水中の遊離残留塩素濃度を 0.2～0.5mg/L に維持した。（残留塩素濃度監視計器による連続測定制御とした）

14 日目に、塩素剤の添加を止め、その後 30 日目まで経過を追った。

試験期間中、定期的にシリコンゴム板を取り出し、面積 20cm² の付着物を滅菌水 10mL に懸濁して細菌数を測定した。

(3) 結果

シリコンゴム板の測定結果を示す。表中の表記で G 有りはグルコースが入っている水を示す。

経過日数	一般細菌数(CFU/mL)		従属栄養細菌数(CFU/mL)		
	G有り	G無し	G有り	G無し	
0	0	0	0	0	塩素管理
7	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	塩素停止
15	0	0	0	0	塩素無し
17	220000	190	230000	250	
21	330000	130000	360000	140000	
30	340000	180000	380000	200000	

水中に遊離残留塩素が維持されている期間中は、シリコンゴム板への微生物類の付着は認められなかった。

塩素剤の添加を停止すると、翌日は全て検出無し。3 日後にグルコース有りでは一般細菌数、従属栄養細菌数とも 10⁵CFU/mL 台となった。3 日後のグルコース無では 10²CFU/mL 台であり、グルコース有りに比較して低い菌数にとどまった。

塩素停止後 7 日目では、一般細菌数、従属栄養細菌数とも 10⁵CFU/mL 台となり、グルコース有りはグルコース無しに比較して 2 倍以上高い菌数であった。

(4) 考察

42℃の温度条件では、バイオフィルムの付着程度は早く、栄養条件が充たされれば3日目で多くの細菌類が付着することが示された。これを反映して、過マンガン酸カリウム消費量が高い値を示す試料ではバイオフィルムの付着が促進されていることが確認された。

一方、過マンガン酸カリウム消費量成分が30mg/L程度と高い値を示す場合でも、遊離残留塩素濃度を一定以上維持することでバイオフィルムの付着は抑制されることが示された。

F. 文献

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権出願・登録状況

なし

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

掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究

PCR-DGGE 法による給湯配管系等水環境中の細菌叢の解析

分担研究者	遠藤卓郎（国立感染症研究所寄生動物部） 黒木俊郎（神奈川県衛生研究所） 烏谷竜哉（愛媛県立衛生環境研究所）
研究協力者	関根 寛（国立感染症研究所寄生動物部） 泉山信司（国立感染症研究所寄生動物部）

概要

源泉に *Legionella* 属菌の汚染が認められるのは稀であり、実際は源泉タンク、給湯配管、浴槽の汚れが *Legionella* 属菌の汚染源となることから、掛け流し式浴槽では後者が重要な管理点となる。浴槽は徹底した物理洗浄が基本で広く推奨されているが、貯湯タンクあるいは配管における汚染にはあまり注意が払われてこなかった。本研究では PCR-DGGE 法を用いてタンクあるいは配管の微生物汚染の解析を試みた。その結果、貯湯タンクあるいは配管には多様な微生物叢が存在していることが示された。PCR-DGGE 法はユニバーサルプライマーを用いて遺伝子の一部領域を混合状態のまま増幅し、変性材濃度勾配ゲルを用いて DNA を分離解析する手段である。バンドパターンの比較から、配管を通過する間に配管の汚染を受けて優先微生物種が変化する場合、源泉の増殖ポテンシャルが高くタンクから配管まで同じ微生物叢で占められている場合が認められた。一方、浴槽水中の微生物叢は配管と全く異なるパターンが得られ、配管と浴槽の汚染は質的に異なることが示唆された。

A. 目的

循環式浴槽における *Legionella* 属菌の集団感染を受け、現在は塩素消毒の徹底が指導されている。循環式浴槽はろ過器の微生物叢が有機物を消費し、浴槽水中の過マンガン酸カリウム消費量を基準値以下に抑えるが、微生物種の制御は困難であり、*Legionella* 属菌の発生は避けられない。一方、掛け流し式浴槽はろ過器が無いことから、塩素消毒を行わなくてもレジオネラ属菌の汚染を避けることができると期待されていた。ところが掛け流し式浴槽の試料水は 60%がレジオネラ属菌陽性との結果が報告され（杉山ら、H14 年度報告）、例え掛け流し式浴槽であっても管理を怠れば容易に *Legionella* 属菌の汚染を受けることが明らかとなっている。

掛け流し式浴槽ではろ過器を持たないことや絶えず完全換水を行うことにより、塩素消