

毒に依存しない管理が望まれよう。浴槽は物理洗浄を徹底することが基本となるが、給湯水が汚染されていないことが前提となる。源泉で *Legionella* 属菌が検出されることは稀であり、源泉タンク以降が *Legionella* 属菌の発生の場合である。これまで源泉タンクや配管には注意が払われておらず、その実態はよく知られていない。本研究ではこれを明らかにすることを目的として PCR-DGGE 法を用いた細菌叢の解析を行った。

B. 方法

PCR-DGGE 法に用いた試料水は源泉タンク、湯口、UV 殺菌装置の前後、並びに浴槽より各 500ml を得た。一部配管を切断し、内部を滅菌綿棒でぬぐい、懸濁液を試料とした (図 1)。試料水は孔径 0.22 μ m 直径 47mm の PTFE フィルター (Millipore) でろ過濃縮後、ハイブリバッグを用いて TE 緩衝液中で濃縮物を剥離回収し、室温条件下 7000 \times g で 10 分間遠心濃縮した。沈さに対して 0.2mg/ml の Proteinase K と、0.15M NaCl、0.1% TritonX-100 を含む TE 緩衝液を添加し、60 $^{\circ}$ C で 30 分間溶解処理を行った。溶解後は PMSF を 0.1mM とするよう添加し、これを鋳型 DNA とした。PCR 阻害物質が多く含まれる場合はカラム精製 (Qiagen) を実施した。

PCR-DGGE 法は Muzer ら (1995) の方法に従った。すなわち、PCR プライマーに原核生物の 16S rRNA の一部領域を標的とした GC クランプ付きの GC-341F (5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG - 3') 並びに 907R (5'- CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT - 3', R=A or G) を用いた。アンダーラインで示した GC クランプは、DGGE 泳動の際に 2 本鎖 DNA が 1 本鎖 DNA に完全解離して流れ去ることのない様に付加された配列である。PCR のプログラムはタッチダウン PCR とし (図 2、表 1)、65 $^{\circ}$ C から 55 $^{\circ}$ C まで 1 サイクル毎にアニール温度を 0.5 $^{\circ}$ C 低下させた。サイクル数は良好な増幅産物が得られるように鋳型量に合わせて計 30 サイクルから 40 サイクルの間で調整した。PCR 産物は 2% アガロースで電気泳動を行い、増幅を確認した。

DGGE には D-Code システム (BioRad) を用いた。ポリアクリルアミドゲルの濃度は 6% で、ホルムアミド濃度勾配は 20 から 60% とした。泳動条件は 1 \times TAE 緩衝液 (BioRad) 中で 60 $^{\circ}$ C、70V 定電圧とし、13 時間泳動した。泳動マーカーとして *Legionella pneumophila* SG1 環境分離株、並びにマーカー C を使用した (平成 16 年度報告)。泳動後は 1 \times SYBRGold を用いて染色後、VisiBlue トランスイルミネーターで観察・撮影を行った。得られたバンドは必要に応じて個々に解析を行った。すなわち、バンドをカッターの刃で小さく切り出し、滅菌水で 1 回すすいでホルムアミドを除去した後、再度滅菌水に懸濁し、これを鋳型に PCR を行い再増幅した。再増幅産物は単一のバンドになったことを DGGE で確認後、直接塩基配列決定を行った。

塩基配列決定では、ABI PRISM BigDye Terminator V1.1 (Applied Biosystems) ならびに ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を使用した。PCR 産物は QIAquick PCR purification キット (Qiagen) を用いて残留プライマーを除去した。塩基配列決定用のプライマーには 341F

の3'末より20残基と、907Rを用い、両鎖の配列を取得した。得られた塩基配列はBlast検索によりDDBJ/GenBank/EMBLに登録されている既存の塩基配列との比較を行った。検索結果では培養されていない配列に一致することが多いことから、一致率が最も高かった配列の情報、並びに95%の一致率を目安として種名を有する配列の情報を列挙した。アライメントの作成はPileUp (GCG Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys)を使用した。系統樹の作成はMEGA2 (Version 2.1, Kumar et al., 2001)を用いて近接結合法 (NJ法)で行なった。

C. 結果および考察

PCR-DGGE法 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)では試料濃縮、PCR、DGGE分離、バンドの比較解析を行うが、複数の菌種を含む試料から分離培養の操作を経ることなく、細菌叢を明らかにすることが特長である (Muyzerら、1993)。従って、従来的一般細菌数試験とは異なった解析が可能になるものと期待され、パターンの比較並びに試料中に含まれる代表的な菌種の塩基配列決定による同定を試みた。

施設AおよびBの貯湯槽と湯口の試料水より得たパターンの比較を図3に示した。いずれのパターンにおいても2桁以上のバンドが観察され、多様な微生物叢の存在が示された。PCR-DGGE法では菌の存在割合がバンドの強弱として表現されるが、レーン2に矢印で示したように、A施設のパターンは明らかに優先種の交代が認められた。この施設では貯湯槽と湯口の間配管が30m程と長くはなかったが、水温が低く、配管内での盛んな微生物増殖が危惧された。

B施設ではA施設に比べて多様性に乏しいパターンが得られたが (レーン3)、湯口水においてA施設と同じ位置のバンドが強く現れた (レーン4、矢印)。この種は配管の増殖に関連する微生物と考えられるが、貧栄養な湖の堆積物から取得された塩基配列と98%の割合で一致した (表2)。

施設Cの貯湯槽では前述の施設に比べてより豊かな微生物叢の存在が認められたが、温泉水が地域を循環してタンクに戻る配管を有する施設であったことから、配管中の汚染が全て貯湯槽に反映された結果と考えられた (図4)。一方、湯口で優先種が交代するのはその湯口付近の汚染を反映したものと考えられた。なお、施設間で、貯湯槽、配管の全てにおいて共通して検出されるバンドは見出されず、個々の施設において独立した微生物叢が定着・増殖しているものと推察された。

施設Dでは配管を切断し内部を確認した結果、全面が黒くバイオフィームで覆われていた (図1)。加えて、多量の沈殿物が貯湯槽に認められた。この施設はレジオネラ属菌が分離されているが、併せて微生物増殖ポテンシャルが高いことが本研究グループの別の報告で明らかとなっている。DGGEパターンの代表例を図5に示したが、貯湯槽、貯湯槽沈殿物、配管ぬぐい試料、湯口の試料はほぼ同一のパターンを示した (レーン4等)。一方、浴槽水の試料より、配管とは全く異なるパターンが得られた (レーン12等)。この施設では

集中的に繰り返し試料採取を行い図 5 で示した他に 20 以上の試料を用いたが、パターンの変化は少なく、配管系あるいは浴槽系の 2 つのパターンを容易に判別できた。

浴槽系で最も優先的なバンドは、浴槽水中で優先的に増殖する種に由来すると予想された。このバンドの塩基配列は白血病患者の骨髄から分離したとされる *Tepidimonas arfidensis* Sp. Nov. と 99% の一致であったが、96% の一致率で環境分離株が続いていた。日和見感染症の病原体である可能性が否定できないことから、詳細に検討する必要があるものと考えている。その他に 97% の一致率を有する配列が施設 B の貯湯槽からも得られており、併せて検討する。

以上のパターンより代表的なバンドの直接塩基配列決定を行った配列を図 6 に示し、Blast 検索の結果を表 2 にまとめた。配列の一致率は 86~100% の範囲にあったが、本研究の塩基配列とデータベースの登録配列が完全一致することは少なかった。得られた配列の多くは自然環境から分離された配列で占められ、その内訳は硫黄代謝に関連した細菌、分解や廃棄に関連した細菌、温泉や地殻等の高温な環境に関連した細菌等であった。

系統樹解析では大きく分けて 3 つのグループが観察された (図 7)。最初のグループは温泉-硫黄-汚染に関連しており、割合として半数以上を占めた。この一部は属名を有する配列と 95% 以上の相同性を有し、サブグループを形成した。次に地下に関連したグループで、特に 86% の最も低い一致率の細菌を含んでおり、未知の細菌の集合と言えた。このグループは C 施設からの分離に集中しており、源泉の特徴を反映したと考えられた。次に乳酸球菌と完全一致したグループであるが、一般に乳酸菌として利用される菌種の 1 つであり、自然界に広く分布すると考えられた。

D. 結論

掛け流し式浴槽の *Legionella* 属菌対策の一環として、PCR-DGGE 法を用いて貯湯槽、配管に存在する微生物叢の解析を行った。配管前後でパターンを比較すると、配管の汚染と考えられる優先種の交代が認められ、汚染の存在を明らかにする方法として有効であった。微生物の増殖ポテンシャルが高い源泉を有する施設 D では内壁が一様にバイオフィルムで覆われており、源泉タンク、配管バイオフィルム、湯口のいずれからも同様のパターンが得られた。一方、浴槽での優先種の交代が示唆される明らかなパターン変化が認められた。

E. 参考文献

- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Mar;59(3):695-700.
- Ko KS, Lee NY, Oh WS, Lee JH, Ki HK, Peck KR, Song JH. *Tepidimonas arfidensis* Sp. Nov., a Novel Gram-negative and thermophilic bacterium isolated from the bone marrow of a patient with leukemia in Korea. *Microbiol Immunol.* 2005;49(8):785-8.

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）「循環式浴槽における微生物管理手法に関する研究」、主任研究者：遠藤卓郎、平成 14 年度研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）「循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」、主任研究者：遠藤卓郎、平成 16 年度研究報告書

F. 健康危険情報

なし

G. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

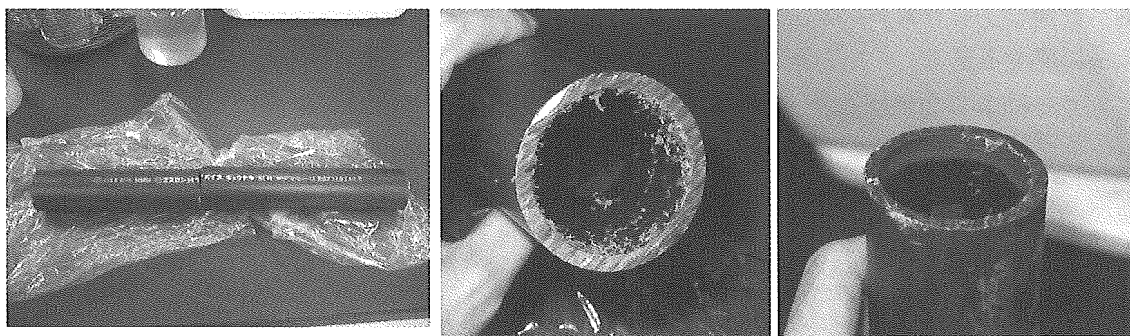


図1 施設D配管

塩化ビニールの配管を切断した結果、内部は全面が黒くバイオフィームで覆われていた。内部を滅菌綿棒でぬぐい、試料を採取した。

1 cycle		
94°C	5 min.	
80°C	1 min.	ここでEx Taqを各チューブに添加
65°C	1 min.	
72°C	3 min.	
↓		
19 cycle		
94°C	1 min.	
64°C	1 min.	(0.5°C/cycleの温度低下設定による
72°C	3 min.	タッチダウン法を実施)
↓		
10 cycle		サイクル数を10から20で調整
94°C	1 min.	
55°C	1 min.	
72°C	3 min.	
↓		
1 cycle		
72°C	7 min.	
15°C	∞	

表1 PCR反応液組成

滅菌蒸留水	76.5 ul
10×Ex Taq緩衝液	10
dNTP (2.5 mM each)	10
Primer 1 (25pmol/ul)	1
Primer 2 (25pmol/ul)	1
鋳型DNA	1
Ex Taq (5U/ul)	0.5
計	100

図2 PCR プログラム

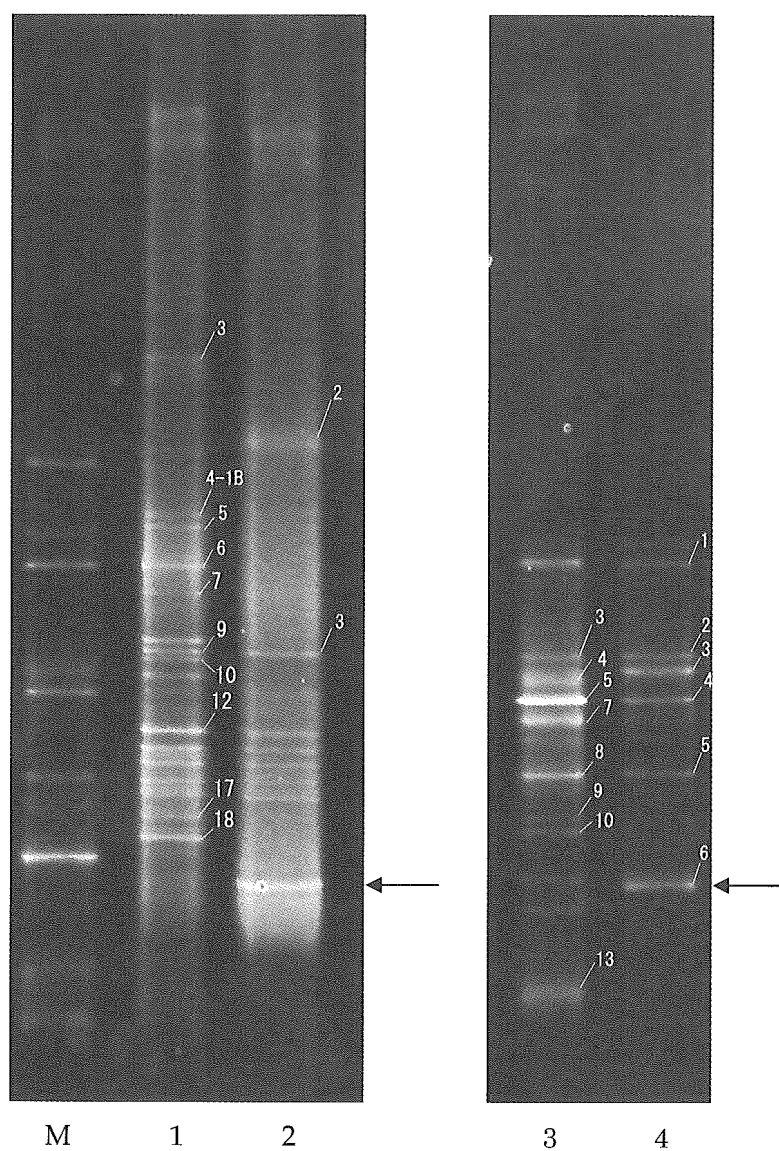


図3 施設 A、B の DGGE パターン比較

レーン M：マーカー、1：施設 A 貯湯槽、2：同湯口、3：施設 B 貯湯槽、4：同湯口。塩基配列を取得したバンドには番号を付しており、レーン 1 は EH3D、レーン 2 は EH5D、レーン 3 は YA1、レーン 4 は YA2 のバンドとして結果を表 2 に列挙している。

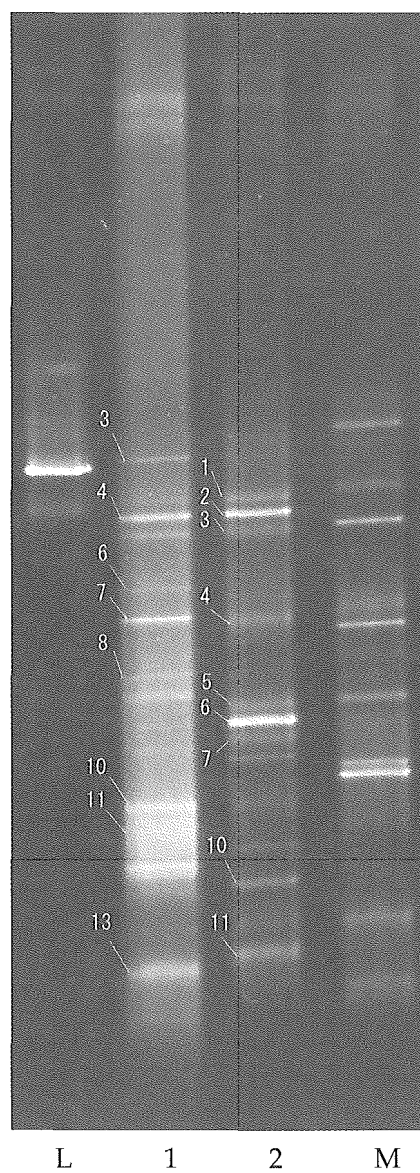
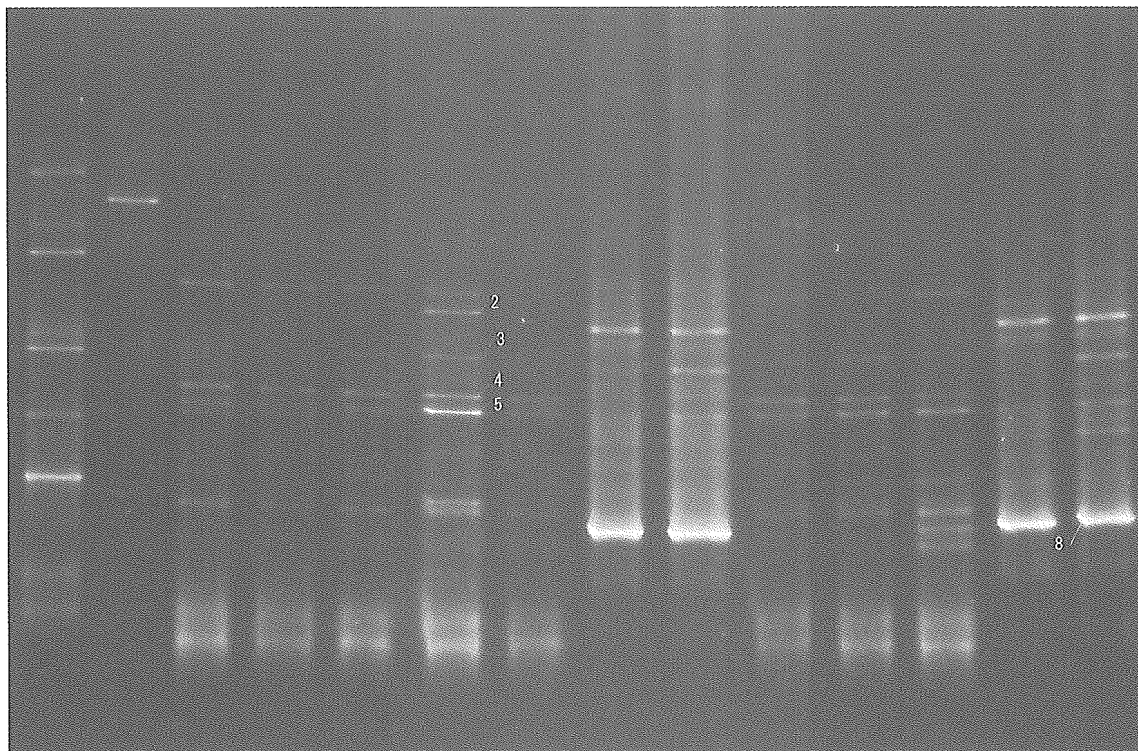


図4 施設CのDGGEパターン比較

レーンL：マーカー (*Legionella*)、1：施設C貯湯槽、2：同湯口、レーンM：マーカー。
塩基配列を取得したバンドに番号を付しており、レーン1はKG1、レーン2はKG2と対応する(表2)。



M L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

図5 施設Dより得たDGGEパターン

レーンM：マーカー、L：*Legionella*、1～5、8～10：配管系（UV直前、UV前、UV前、UV後、湯口、UV前、UV後、湯口、いずれも日付と時間を変えて取得）、6～7、11～12：浴槽系（露天風呂浴槽、内湯浴槽、露天風呂浴槽、内湯浴槽、同様）。塩基配列を取得したバンドに番号を付しており、レーン4はD、レーン12はLのバンドと対応する（表2）。

d-2 : C---GCCTTAA---CGGGGAGGTGGCAATTCATCTACTGTTGG---CCTTAGCTCTCGAGCCAGCCGGAAAT---TACCGGTAGAGGGTGAHAATCCTTAGATAATCGTCAAGAACACCCGATAGTGAAGACAGCTTTGCC---AGAGAGCAACTGACCCCTGAG---GCACGMAAGTGT : 409
d-3 : ---A---TTC---C---AA---A.A.A---T.T---TATG.A.ATA.T.GC.T---G.AG---GAMAT---C.C.C---A.G---AGCTAT---C.C.G---A.T---A---CT.A---C.T---A--- : 409
eh3d-3_sphingobacterium : ---C---G.A.AC.C---TATG.A.ATA.T.GC.T---G.AG---GAMAT---C.C.C---A.G---AGCTAT---C.C.G---A.T---A---CT.A---C.T---A--- : 410
eh3d-10_sphingobacterium : ---C---G.A.AC.C---TATG.A.ATA.T.GC.T---G.AG---GAMAT---C.C.C---A.G---AGCTAT---C.C.G---A.T---A---CT.A---C.T---A--- : 412
ya2-1_lactococcus : ---C---ATT.T---CAT.G.A.A---A.A---AGA.T---CCAT---G---ATGG.G---G.G.C---AG.G---C.C.T---T---G---CCT.T---A--- : 415
kg1-4_lactococcus : ---C---ATT.T---CAT.G.A.A---A.A---AGA.T---CCAT---G---ATGG.G---G.G.C---AG.G---C.C.T---T---G---CCT.T---A--- : 415
kg2-1_lactococcus : ---C---ATT.T---CAT.G.A.A---A.A---AGA.T---CCAT---G---ATGG.G---G.G.C---AG.G---C.C.T---T---G---CCT.T---A--- : 415
kg2-2_lactococcus : ---C---ATT.T---CAT.G.A.A---A.A---AGA.T---CCAT---G---ATGG.G---G.G.C---AG.G---C.C.T---T---G---CCT.T---A--- : 415
kg2-3_lactococcus : ---C---ATT.T---CAT.G.A.A---A.A---AGA.T---CCAT---G---ATGG.G---G.G.C---AG.G---C.C.T---T---G---CCT.T---A--- : 415
kg2-5 : ---A---TTAC.GAC.C.T.G.A---CA.TA---CAGACA.G.A---CCT---A---AGG.G---G.G---TG.G---G.C.T---TG.GTCCTG---G--- : 390
kg2-6 : ---A---TTAC.GAC.C.T.G.A---CA.TA---CAGACA.G.A---CCT---A---AGG.G---G.G---TG.G---G.C.T---TG.GTCCTG---G--- : 390
kg2-7 : ---A---TTAC.GAC.C.T.G.A---CA.TA---CAGACA.G.A---CCT---A---AGG.G---G.G---TG.G---G.C.T---TG.GTCCTG---G--- : 390
kg2-4 : ---A---TATAAGAC.C.C.G.A---TA.TA---CAGACA.G.A---CCT---A---AGG.G---G.G---TG.G---G.C.T---TG.GTCCTG---A--- : 390
ya1-8 : TG.C.C.TA---AC.CGT.TG.TAAA---G---G.CA---GG.T---CCAC---A--- : 415
ya2-5 : TG.C.C.TA---AC.CGT.TG.TAAA---G---G.CA---GG.T---CCAC---A--- : 415
eh3d-12 : CG.C.T---AC.CGC.TG.CAA.A---G---TG.CA---GG.T---CCAC---A--- : 415
ya2-6 : CG.C.T---AC.CGC.TG.CAA.A---G---TG.CA---GG.T---CCAC---A--- : 415
eh3d-17 : CG.C.T---AC.CAT.TGA---GCAT---A---TTGTCA---GG.T---CCGC---A--- : 415
kg2-10 : TG.C.C.TA---AT.CGT.GA---GCAT---A---G.CA---G.T---CCT---A---AGG.G---G.C---G.C.T---T---G---GCT.AC---C.T--- : 415
kg2-11 : CG.C.C.T---AC.CAT.TG.C.A---A---G.CA---GGA.T---CCGC---A--- : 415
ya1-10_thiomonas : CG.C.C.T---AC.CAT.TG.C.A---A---G.CA---GGA.T---CCGC---A--- : 415
d-5_caldimonas : CG.C.C.T---AC.CAT.TG.C.A---A---G.CA---GGA.T---CCGC---A--- : 415
kg1-8_caldimonas : CG.C.C.T---AC.CAT.TG.C.A---A---G.CA---GGA.T---CCGC---A--- : 415
kg1-11_aquabacterium : TG.C.C.TA---ATG.C.T.TG.CAA---G---G.CA---GG.AT---CCGC---A--- : 415
l-8_tepidimonas : CG.C.C.T---AC.CAT.TG.C.A---G---G.CA---GG.AT---CCGC---A--- : 415
ya1-13_tepidimonas : CG.C.C.T---ATG.CGC.TG.CAA---G---G.CA---GG.AT---CCGC---A--- : 415
eh3d-9_hydrogenophaga : CG.C.C.T---ATG.CGC.TG.CAA---G---G.CA---GG.AT---CCGC---A--- : 415
eh5d-3_hydrogenophaga : CG.C.C.T---ATG.CGC.TG.CAA---G---G.CA---GG.AT---CCGC---A--- : 415
ya1-9_comamonas : CG.C.C.T---AT.C.T.TG.CA.A---G---A.G.CA---GG.AT---CCGC---A--- : 415
kg1-10 : CG.C.C.T---AC.CAT.TG.C.A---A---TTGTCA---GG.T---CCAC---A--- : 415
ya1-3 : TG.C.C.TA---AT.CAT.C---TC.A---A---ATG.A---GG.TA---CC--- : 415
ya2-2 : CG.C.C.TA---AT.CAT.C---TC.A---A---ATG.A---GG.TA---CC--- : 415
ya2-3 : CG.C.C.TA---AT.CAT.C---TC.A---A---ATG.A---GG.TA---CC--- : 415
ya1-4 : TG.C.C.TA---ATG.CAT.C---TCA---A---AGGA.A---AGA.G---CCGC---A--- : 415
ya1-5 : TG.C.C.TA---ATG.CAT.C---TCA---A---AGGA.A---AGA.G---CCGC---A--- : 415
ya2-4 : TG.C.C.TA---ATG.CAT.C---TCA---A---AGGA.A---AGA.G---CCGC---A--- : 415
eh3d-6_thiobacillus : CGA....C---TT---ATG.CAT.C---TCAA---A---AGGC.A---A.A.G---CCGC---A--- : 415
kg1-3 : AG....CTT---AC.C.CA---TCGAT---G---CAGA.CA---TGAAT---CCAA...G.A---T.G.A--- : 390
eh3d-5 : ---AA.AC.C.T---AA.G.C---TATG.G---G.GA---G---G.A.T---CCA---G---G.A.T---GAG.C---G.CATC--- : 408
kg1-6 : CG....C---G.ACA.ACC.CGCC...G---T.CAT---G.AA---GT.AT---CCT---G---G.C.C---G.G.TCA---CTG.TCC---CC.T.G---C--- : 409
kg1-7 : TGC....C---I---AT.CGT.C...CAG...---A---CA.GA.A---T---CC...---GAG.G---AG.G.C---G.C.G.C.T---T---G.CCC.ITG--- : 464
kg1-13 : TG.C.C---C.CC---A---T---C---AA---A---G---GA.A---A---CC---A.G--- : 392
d-4 : GG....C.CC---A---T---C---AA---A---G---GA.A---A---CC---A--- : 390
eh3d-7 : GGA....C.CT---TTGC.CAC.G---CAA---A---A.A.AA---T.ANG---CC.A--- : 391
eh5d-2_sulfuricum : AAT....C.CATT---AC.CAT...A...GA.C---A...T.A.A.A---AGT--- : 390

d-2	520	540	560	580	600	620	640	660
ehd3d-4-1b	GGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACACTGTAMACGATGACTCCCTGTT	GGCGATATAA	G	GGCGATATAA	G	GGCGATATAA	G	GGCGATATAA
ehd3d-3_sphingobacterium	T	T	T	T	T	T	T	T
ehd3d-10_sphingobacterium	T	T	T	T	T	T	T	T
ya2-1_lactococcus	G	G	G	G	G	G	G	G
kg1-4_lactococcus	G	G	G	G	G	G	G	G
kg2-1_lactococcus	G	G	G	G	G	G	G	G
kg2-2_lactococcus	G	G	G	G	G	G	G	G
kg2-3_lactococcus	G	G	G	G	G	G	G	G
kg2-5	G	G	G	G	G	G	G	G
kg2-6	G	G	G	G	G	G	G	G
kg2-7	G	G	G	G	G	G	G	G
kg2-4	G	G	G	G	G	G	G	G
ya1-8	G	G	G	G	G	G	G	G
ya2-5	G	G	G	G	G	G	G	G
ehd3d-12	G	G	G	G	G	G	G	G
ya2-6	G	G	G	G	G	G	G	G
ehd3d-17	G	G	G	G	G	G	G	G
ya1-7	G	G	G	G	G	G	G	G
kg2-10	G	G	G	G	G	G	G	G
kg2-11	G	G	G	G	G	G	G	G
ehd3d-18_thiomonas	G	G	G	G	G	G	G	G
ya1-10_thiomonas	G	G	G	G	G	G	G	G
d-5_caldimonas	G	G	G	G	G	G	G	G
kg1-8_caldimonas	G	G	G	G	G	G	G	G
kg1-11_aquabacterium	G	G	G	G	G	G	G	G
l-8_tepidimonas	G	G	G	G	G	G	G	G
ya1-13_tepidimonas	G	G	G	G	G	G	G	G
ehd3d-9_hydrogenophaga	G	G	G	G	G	G	G	G
ehd3d-3_hydrogenophaga	G	G	G	G	G	G	G	G
ya1-9_comamonas	G	G	G	G	G	G	G	G
kg1-10	G	G	G	G	G	G	G	G
ya1-3	G	G	G	G	G	G	G	G
ya2-2	G	G	G	G	G	G	G	G
ya2-3	G	G	G	G	G	G	G	G
ya1-4	G	G	G	G	G	G	G	G
ya1-5	G	G	G	G	G	G	G	G
ya2-4	G	G	G	G	G	G	G	G
ehd3d-6_thiobacillus	G	G	G	G	G	G	G	G
ehd3d-5	G	G	G	G	G	G	G	G
kg1-3	G	G	G	G	G	G	G	G
kg1-6	G	G	G	G	G	G	G	G
kg1-7	G	G	G	G	G	G	G	G
kg1-13	G	G	G	G	G	G	G	G
d-4	G	G	G	G	G	G	G	G
ehd3d-7	G	G	G	G	G	G	G	G
ehd3d-2_sulfuricum	G	G	G	G	G	G	G	G

図6 本研究で取得した塩基配列のアライメント

表 2 直接塩基配列決定一覧

施設名	試料	バンド#	Blast serchによる相同性検索結果	相同性			基準配列	配列情報
				Identities	Gaps			
A	貯湯槽	EH3D-3	Uncultured Sphingobacterium sp. clone LKC3_102B.59	96 %	520 / 541	0 / 541	AY510257	硫化物泉
A	貯湯槽	EH3D-4-1B	Uncultured bacterium	96 %	519 / 540	0 / 540	AB205882	脱窒活性汚泥
A	貯湯槽	EH3D-5	Uncultured bacterium clone HP1B26	96 %	506 / 525	3 / 525	AF502221	脱リン活性汚泥
A	貯湯槽	EH3D-6	Thiobacillus barengensis	96 %	522 / 543	2 / 543	TB169RRNA	硫黄酸化
A	貯湯槽	EH3D-7	Uncultured bacterium clone Napoli-3B-41	92 %	483 / 523	1 / 523	AY592714	深海堆積物
A	貯湯槽	EH3D-9	Unidentified bacterium	100 %	548 / 548	0 / 548	UBZ93977	下水処理活性汚泥
			Hydrogenophaga sp. PG-10	97 %	535 / 548	0 / 548	AY566583	フェノール分解槽
A	貯湯槽	EH3D-10	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone LKC2.127-25	97 %	531 / 543	0 / 543	AY208811	硫化物泉
			Uncultured Sphingobacterium sp. clone LKC3_19.50	97 %	529 / 543	1 / 543	AY510258	硫化物泉
A	貯湯槽	EH3D-12	Uncultured bacterium clone BE16FW031601GDW_hole1-11	98 %	544 / 550	0 / 550	DQ088734	地殻
A	貯湯槽	EH3D-17	Uncultured beta proteobacterium clone LKC3_198.29	97 %	536 / 549	2 / 549	AY510251	硫化物泉
A	貯湯槽	EH3D-18	Thiomonas perometabolis	100 %	548 / 548	0 / 548	AY455808	鉄硫黄砒素酸化、鉱山
A	湯口	EH5D-2	Uncultured epsilon proteobacterium clone FTL212	99 %	520 / 524	0 / 524	AF529098	トリクロロエタン汚染場所
			Sulfuricurvum kujense	98 %	518 / 524	0 / 524	AB080644	硫黄酸化
A	湯口	EH5D-3	Hydrogenophaga sp. PG-10	99 %	543 / 548	0 / 548	AY566583	フェノール分解槽
			Hydrogenophaga palleronii	98 %	541 / 548	0 / 548	AF019073	スルホン酸アゾ化合物で代謝生育
B	貯湯槽	YA1-3	Uncultured bacterium clone cwr366	96 %	476 / 493	2 / 493	AY799962	硫黄還元あるいはセルロース分解細菌
B	貯湯槽	YA1-4	Uncultured hydrocarbon seep bacterium BPC028	95 %	524 / 550	1 / 550	AF154088	漏出炭化水素
B	貯湯槽	YA1-5	Uncultured hydrocarbon seep bacterium BPC028	95 %	524 / 550	1 / 550	AF154088	漏出炭化水素
B	貯湯槽	YA1-7	Uncultured beta proteobacterium	95 %	518 / 544	0 / 544	AB113610	地熱水
B	貯湯槽	YA1-8	Uncultured bacterium clone W17	99 %	548 / 550	0 / 550	AY770957	油田
B	貯湯槽	YA1-9	Uncultured beta proteobacterium clone OPPB187	98 %	542 / 548	0 / 548	AY861897	地熱生態系
			Comamonas sp. MBIC3885	97 %	536 / 548	0 / 548	AB008429	トリクロロエチレン分解細菌
B	貯湯槽	YA1-10	Thiomonas sp. B3	96 %	527 / 548	0 / 548	AJ549220	鉄硫黄砒素酸化、鉱山
			Thiomonas intermedia	95 %	526 / 548	0 / 548	AY455809	鉄硫黄砒素酸化、鉱山
B	貯湯槽	YA1-13	Tepidimonas arfidensis	97 %	533 / 548	0 / 548	AY594193	白血病患者骨髄分離
			Hydrogenophaga sp. PG-10	96 %	530 / 548	0 / 548	AY566583	フェノール分解槽
B	湯口	YA2-1	Lactococcus lactis strain CICC6023	100 %	549 / 549	0 / 549	DQ212982	乳酸球菌
B	湯口	YA2-2	Uncultured bacterium clone cwr366	96 %	476 / 493	2 / 493	AY799962	硫黄還元あるいはセルロース分解細菌
B	湯口	YA2-3	Uncultured bacterium clone cwr366	96 %	474 / 493	2 / 493	AY799962	硫黄還元あるいはセルロース分解細菌
B	湯口	YA2-4	Uncultured hydrocarbon seep bacterium BPC028	95 %	524 / 550	1 / 550	AF154088	漏出炭化水素
B	湯口	YA2-5	Uncultured bacterium clone W17	99 %	548 / 550	1 / 550	AY770957	油田
B	湯口	YA2-6	Uncultured bacterium	98 %	524 / 531	0 / 531	AB127634	貧栄養湖堆積物
C	貯湯槽	KG1-3	Uncultured green sulfur bacterium clone SM1H02	93 %	504 / 541	0 / 541	AF445702	温泉緑色硫黄細菌
C	貯湯槽	KG1-4	Lactococcus lactis strain SL3	100 %	549 / 549	0 / 549	AY675242	乳酸球菌
C	貯湯槽	KG1-6	Uncultured bacterium	87 %	475 / 542	5 / 542	AB179535	珪酸堆積岩
C	貯湯槽	KG1-7	Uncultured bacterium clone EV821FW101601SAC67	87 %	376 / 428	1 / 428	DQ226085	地下水
C	貯湯槽	KG1-8	Caldimonas taiwanensis strain On1	99 %	545 / 548	0 / 548	AY845052	温泉分離アミラーゼ産生菌
C			Leptothrix sp. MBIC3364	99 %	543 / 548	0 / 548	AB015048	塩化物泉
C	貯湯槽	KG1-10	Uncultured bacterium clone B44	99 %	547 / 548	0 / 548	AF407722	52°C大讃井盆地
C	貯湯槽	KG1-11	Phenanthrene-degrading bacterium 90	98 %	538 / 548	0 / 548	AY177371	芳香族分解
C			Aquabacterium sp. Aqua2	96 %	531 / 548	0 / 548	AF089858	飲料水バイオフィーム形成
C	貯湯槽	KG1-13	Uncultured bacterium a2b022	86 %	378 / 437	1 / 437	AF419667	グァイマス海盆熱水孔堆積物
C	湯口	KG2-1	KG2-2と同じ	%	/	/		
C	湯口	KG2-2	Lactococcus lactis strain SL3	100 %	549 / 549	0 / 549	AY675242	乳酸球菌
C	湯口	KG2-3	KG2-2と同じ	%	/	/		
C	湯口	KG2-4	Uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	95 %	498 / 524	2 / 524	DQ088762	地殻
C	湯口	KG2-5	KG2-6と同じ	%	/	/		
C	湯口	KG2-6	Uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	95 %	495 / 523	0 / 523	DQ088762	地殻
C	湯口	KG2-7	KG2-6と同じ	%	/	/		
C	湯口	KG2-10	Uncultured beta proteobacterium	98 %	540 / 548	0 / 548	AB176697	地熱水
C	湯口	KG2-11	Unidentified beta proteobacterium OS-R	94 %	519 / 548	0 / 548	U46750	温泉微生物被膜
D	配管途中	D-2	Uncultured soil bacterium clone 453	92 %	498 / 540	0 / 540	AY493953	土壌
D	配管途中	D-3	Uncultured bacterium isolate SSCP band GT-D_8_7	100 %	385 / 385	0 / 385	DQ077604	飲料水配水系
D	配管途中	D-4	Uncultured bacterium clone 254ds10	96 %	506 / 525	0 / 525	AY212703	下水下流10m
D	配管途中	D-5	Caldimonas taiwanensis strain On1	100 %	548 / 548	0 / 548	AY845052	温泉分離アミラーゼ産生菌
D	浴槽	L-8	Tepidimonas arfidensis	99 %	543 / 548	0 / 548	AY594193	白血病患者骨髄分離
			Comamonas sp. MBIC3885	96 %	531 / 548	0 / 548	AB008429	トリクロロエチレン分解細菌

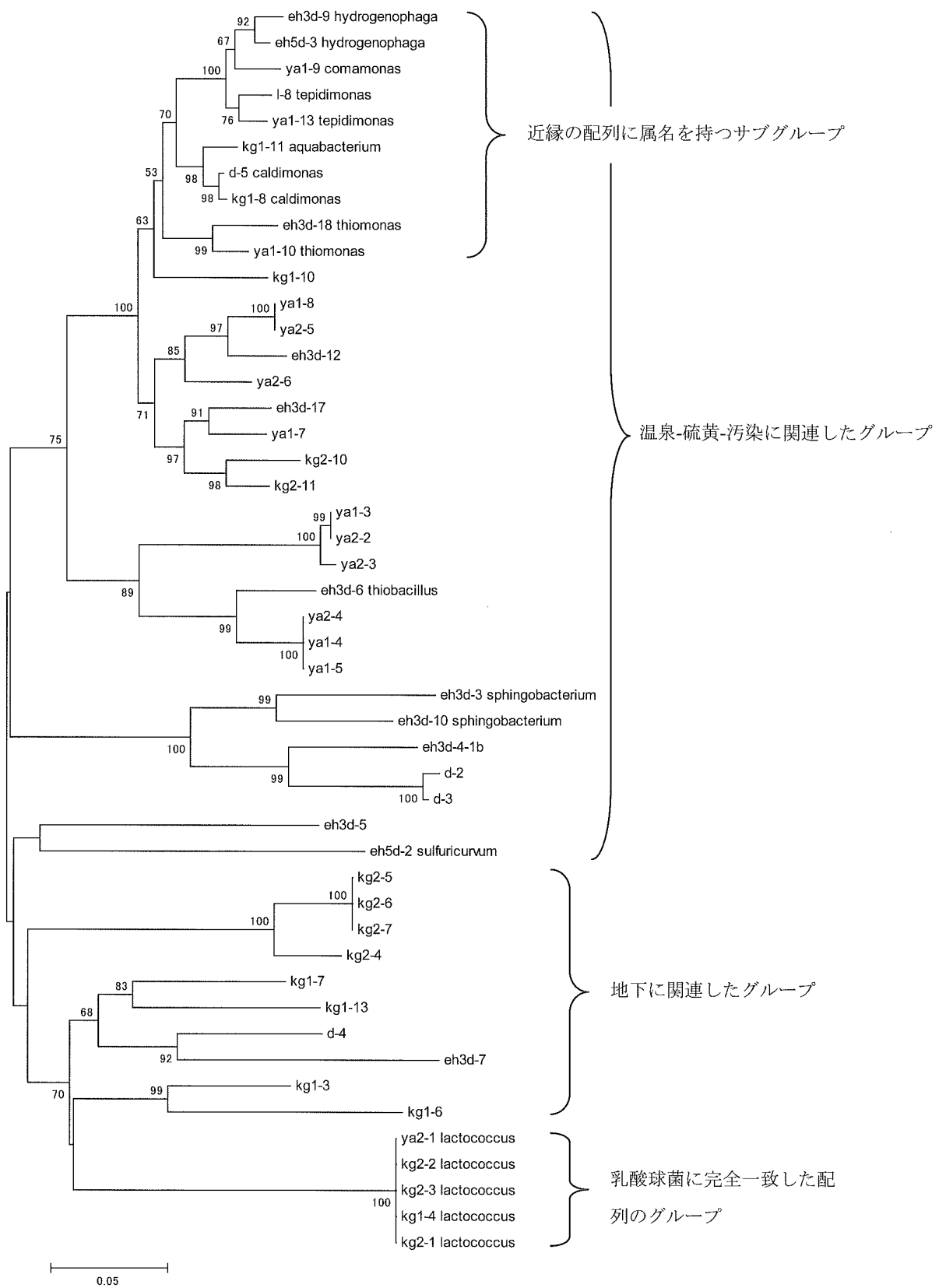


図7 本研究で取得した配列より構築した系統樹

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

紫外線殺菌装置の有効性評価

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
	縣邦雄	アクアス株式会社つくば総合研究所
研究協力者	八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部
	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

掛け流し式温泉の浴槽水中のレジオネラ属菌抑制対策として紫外線殺菌装置の有効性を確認するために、実際の施設を使用して試験を行なった。掛け流し温泉施設、3箇所の供給湯配管に流水式紫外線殺菌装置を設置して、浴槽水のレジオネラ属菌、一般細菌数、従属栄養細菌数の挙動を調査した。その結果、供給湯中のレジオネラ属菌が不検出の状態から浴槽水からレジオネラ属菌が検出された。原因は浴槽内壁のバイオフィルムの清掃除去不十分であり、清掃・消毒を徹底することで不検出としたが、5日程度で再度レジオネラ属菌が定着した。一般細菌数、従属栄養細菌数は浴槽中で1日以内に 10^5 CFU/mL台に増加することが確認された。

塩素剤を使用しないかけ流し式温泉において、流水式紫外線殺菌装置を供給湯配管に設置して供給系統のレジオネラ属菌汚染を防止することは可能であるが、浴槽内のレジオネラ属菌汚染を防止するためには、浴槽内部のバイオフィルムの除去が重要であることが示された。また、浴槽内での一般細菌数、従属栄養細菌数の増加及び、大腸菌が殺菌されずに存在する可能性について課題が残された。

A. はじめに

掛け流し式温泉では、ろ過器を含む循環系が無いので、供給湯中にレジオネラ属菌が存在しなければ、浴槽水中のレジオネラ属菌を不検出に維持し易いと考えられる。供給湯は原泉貯槽及び給湯配管を経由する事が多いので、湯温が低く塩素消毒をしていない場合はレジオネラ属菌で汚染されている可能性が高い。

供給湯中のレジオネラ属菌を不検出状態とするために紫外線殺菌装置を用いることで、泉質を変化させることなく消毒が行なえる。

実際の掛け流し式温泉浴槽で、供給湯を紫外線処理してレジオネラ属菌不検出した場合の、浴槽水中のレジオネラ属菌不検出のための浴槽管理条件を確立する。また、供給湯中のレジオネラ属菌を不検出にする手段として流水式紫外線殺菌装置の妥当性を評価する。

B. 研究方法

A施設、B施設、C施設の3箇所の掛け流し式温泉施設において、供給湯の配管に流水式紫外線殺菌装置を設置して、供給湯中のレジオネラ属菌を殺菌する。

採水は、紫外線殺菌装置の入口（及び出口）、湯口、浴槽で行ない、それぞれレジオネラ属菌数、一般細菌数、従属栄養細菌数を測定する。

一日のうちの菌数の挙動がわかるようにするために、朝、昼、夜等に採水する。

また、長期間での挙動を調査するために、1ヶ月程度ごとの採水も行なう。

(1) 試験箇所の概要

	A施設	B施設	C施設
浴槽容量 (m ³)	11	13	7
浴槽の種類	屋内	露天	屋内
浴槽の材質	木の板(15cm角)を貼り付け	壁面は岩、底面は平らな石	磨いた石
供給湯量 (m ³ /h)	1.5	2.5 (1.0*)	3
浴槽滞留時間 (h)	7.3	5.2	2.3
補給湯温度 (°C)	51	57	47~53
紫外線照射線量 (mJ/cm ²)	60	40 (1.0*)	35
清掃方法、頻度	毎日営業終了後、水抜きし、ジェット洗浄、その後1000ppmの塩素水散布。 月2回程度の休業日は5ppmの塩素漬け置き実施。	数日から1週間に一度(不定期)、水抜きし、ジェット洗浄、その後殺菌剤を散布。 *湯張り時の流量と照射線量	毎日営業終了後、水抜きし、ジェット洗浄、その後6%塩素水散布。 貯湯槽は毎月洗浄、配管は半年に一度酸洗浄。

(2) 紫外線殺菌装置仕様

メーカー名：岩崎電気株式会社

型式：流水殺菌装置（参考図面を添付）

処理槽：SOS304、バフ研磨仕上げ

紫外線ランプ：A施設は65W、BとC施設は120W（いずれも100V）

照射線量と通水量：水温50°Cにおいて、33.3mJ/cm²の照射線量の通水量

65Wタイプ：2.8t/h、120Wタイプ：3.2t/h

C. 結果と考察

1. A施設

(1) 試験条件

	紫外線処理浴槽	対照浴槽
浴槽の種類	屋内大浴槽（浴室は別々）	
浴槽容量（m ³ ）	1.1	1.1
浴槽の材質	木の板（15cm角）を貼り合わせた。目地部は欠損して隙間が多くなっている	石を平らに磨いたもの、浴槽内部に隙間などはほとんど無し。
供給湯量（m ³ /h）	1.5	1.5
紫外線照射線量（mJ/cm ² ）	60	紫外線照射無し
浴槽滞留時間（h）	7.3	
補給湯温度（℃）	51	
清掃方法、頻度	毎日営業終了後、水抜きしジェット洗浄、その後1000ppmの塩素水を散布。翌朝にかけて湯張りを行う。月2回程度の休業日は浴槽自体を5ppmの残留塩素濃度で漬け置き実施。	

温泉の水質（平成13年12月19日採水）

項目	値	項目	値
pH	7.2	蒸発残留物	4012
カルシウム	134	塩化物イオン	1343
マグネシウム	38	硫酸イオン	288
マンガン	0.3	炭酸水素イオン	1356
鉄	1.7	ケイ酸	197

単位：pHは無し、その他はmg/kg。

(2) 試験日程

年 月/日	内容
2005年 8/16	紫外線処理開始
2005年 8/16	第一回目採水（朝、昼、晩）、UV浴槽は塩素添加無し
2005年 8/28	第二回目採水（朝、昼、晩）、UV浴槽は塩素添加無し
2005年 9/11	第三回目採水（朝、昼、晩）、UV浴槽は塩素添加無し
2005年 10/14、15	紫外線処理浴槽の殺菌洗浄実施（高濃度塩素処理含む） 紫外線ランプの石英保護管の点検・洗浄
2005年 10/16	第四回目採水（朝、昼、晩）、湯張り時に塩素添加実施
2005年 10/20、24	レジオネラ属菌のみ検査（20日は朝、晩、24日は晩）、湯張り時に塩素添加実施
2005年 11/13	第五回目採水（朝、昼、晩）、湯張り時に塩素添加実施

(3) 細菌数測定結果

表中の細菌数単位：レジオネラはCFU/100mLであり、表中0は10CFU/100mL未満を示す。一般細菌数、HPC(従属栄養細菌数)はCFU/mL。

①8月16日採水

	検査項目	レジオネラ	一般細菌数	HPC(25℃)
UV:入口	朝	0	153	480
	昼	0	23	48
	晩	0	16.6	52
UV:湯口	朝	0	0.5	10
	昼	0	0.2	2
	晩	0	0.1	1
UV:浴槽	朝	10	8000	84000
	昼	70	22300	770000
	晩	120	122000	1340000
対照:湯口	朝	0	0.1	1.4
	昼	0	0.2	0.7
	晩	0	0.6	2.9
対照:浴槽	朝	10	130	35000
	昼	10	1500	12800
	晩	60	60000	2840000

レジオネラは、UV入り口、湯口、対照湯口とも不検出であるが、浴槽はUV処理、対象とも検出されている。一般細菌数、HPCはUV湯口では少ないが、UV浴槽では高い菌数を示し、朝に比べて昼、夜と次第に菌数が高くなっている。対象浴槽でも同様の傾向がある。

②8月28日採水

	検査項目	レジオネラ	一般細菌数	HPC(25℃)
UV:入口	朝	0	5.9	33
	昼	0	2	1.4
	晩	0	10.3	12.6
UV:湯口	朝	0	1.9	1.4
	昼	0	6.9	3.4
	晩	0	1.5	1.7
UV:浴槽	朝	290	4900	53000
	昼	500	95000	750000
	晩	470	149000	2050000
対照:湯口	朝	0	1.4	5.5
	昼	0	0.8	3.3
	晩	0	0.6	15
対照:浴槽	朝	20	8.5	25000
	昼	20	28000	400000
	晩	20	360000	2100000

8月16日採水と同様の傾向を示した。レジオネラ属菌数はUV浴槽の方が対象浴槽よりも高くなっており、朝から比較的高い菌数であった。

③9月11日採水

	検査項目	レジオネラ	一般細菌数	HPC(25℃)
UV:入口	朝	0	1	2
	昼	0	8	80
	晩	0	0	3.6
UV:湯口	朝	0	1	7.7
	昼	0	3	2.5
	晩	0	1	1
UV:浴槽	朝	280	2000	59000
	昼	520	20000	730000
	晩	740	200000	1010000
対照:湯口	朝	0	0	1.6
	昼	0	0	6.4
	晩	0	0	0.8
対照:浴槽	朝	10	1100	29000
	昼	0	11000	3280000
	晩	0	70000	3840000

前2回と同様の傾向である。湯口においてはUV、対照ともすべての項目について低い菌数であるが、レジオネラはUV浴槽では朝から高い菌数を示している。対象浴槽のレジオネラ属菌数は低いレベルにある。浴槽中の一般細菌数、HPCは朝から昼、夜にかけて菌数が増加する傾向にある。

④10月16日採水

	検査項目	レジオネラ	一般細菌数	HPC(25℃)
UV:入口	朝	0	0	0
	昼	0	9	43
	晩	0	0	80
UV:湯口	朝	0	5	1
	昼	0	0	1
	晩	0	0	2
UV:浴槽	朝	0	0	0
	昼	0	1700	48000
	晩	0	290000	800000
対照:湯口	朝	0	1	1
	昼	0	1	1
	晩	0	0	4
対照:浴槽	朝	0	1280	320
	昼	0	300	600
	晩	10	580000	3680000

10月14日、15日に殺菌洗浄を行なった後の採水である。今回より、両浴槽とも夜間湯張り時に塩素剤を添加し、朝の残留塩素濃度を約0.4mg/Lとしている。日中営業時は、塩素剤の追加添加は行なっておらず、昼には残留塩素は無くなっている。レジオネラ属菌は浴槽でもほぼ不検出であった。一般細菌数、HPCは浴槽中で昼から夜にかけて菌数が増加した。

⑤10月20日、24日採水：UV浴槽水のみ

月／日	時刻	レジオネラ属菌数
10／20	8：00	<10
10／20	20：00	40
10／24	20：00	20

殺菌洗浄実施5日目の夜にレジオネラ属菌が検出され、浴槽に定着していることが考えられた。朝は塩素剤が入っているため不検出であった可能性が高い。

⑥11月13日採水

	検査項目	レジオネラ	一般細菌数	HPC(25℃)
UV：入口	朝	0	7.8	51
	昼	0	39	113
	晩	10	4	10
UV：湯口	朝	0	0	1
	昼	0	0	8
	晩	0	4	75
UV：浴槽	朝	0	1	0
	昼	260	13600	160000
	晩	620	690000	7700000
対照：湯口	朝	0	1.6	10
	昼	0	1	6
	晩	0	1	10
対照：浴槽	朝	0	10	10
	昼	0	250	4800
	晩	10	15000	2000000

湯口の菌数はUV、対照とも低いですが、UV浴槽のレジオネラは昼以降260、620と高い菌数を示した。朝は、浴槽水に残留塩素を維持しているためにUV浴槽でもレジオネラ不検出になっているものと考えられる。対照浴槽は晩に10CFU/100mLであった。一般細菌数、HPCは以前と同様に昼、晩にかけて菌数が増加した。

11月13日以前の殺菌洗浄は、10月25日、11月8日の各休館日に、50mg/Lの高濃度塩素を維持させて漬け置きによる殺菌洗浄を行っている。

11月13日は昼までに75人、夜までに240人の入浴者があった。

11月8日の殺菌洗浄後、5日目の採水でレジオネラ属菌の定着が確認された。

(4) 殺菌洗浄の方法(手順)

10月14日、15日に浴槽水の殺菌洗浄を行った。これは、1、2、3回目の採水でUV浴槽水から、レジオネラ属菌が高い値で検出されたために実施した。

10月14日の殺菌洗浄の手順は以下のようであった。

- ①浴槽水に塩素剤(ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム)を添加し、浴槽水中の残留塩素濃度を120mg/Lとして約20分間放置。
- ②その後高塩素濃度浴槽液で水面上露出部分の板壁のブラッシングをデッキブラシを用いて行う。
- ③塩素投入してから40分後に中和し放流、浴槽内壁全面をブラッシングした。
- ④すすぎの目的で高圧洗浄を全面に行った。