

また、浴槽水に係る水質基準は濁度を除きいずれも現場での測定が難しい項目である。管理面からは、現場でのモニタリングが可能な指標が必要と考える。その中で、レジオネラの検査法として遺伝子検査法の有用性が再検証され、今後の活用に道が開けたものとする。

E 結論

当該研究においては循環式浴槽においてレジオネラ汚染に至るメカニズムとその対処方法、並びにそれに付随した問題点を指摘してきた。また、現行の予防措置としての塩素消毒は緊急避難的措置であり、根本解決には至らないことを示した。

レジオネラの増殖は〔浴槽水の有機物汚染⇒細菌類の繁殖⇒細菌捕食性微生物（アメーバ等の原虫類など）⇒アメーバを中心とした宿主生物の繁殖⇒レジオネラ汚染〕といった浴槽内で増殖する微生物から派生する問題である。当該研究事業では、

1. 浴槽水のレジオネラ汚染は浴槽水の使い回しをしないことと、洗浄の徹底により回避できる
2. レジオネラは環境細菌であることから浴槽水に存在するのは当然であるとの主張は間違いである

との立場を鮮明にして研究を進めてきた。前者は、有機物汚染がないか、あっても微生物の繁殖の機会を与えないように管理すれば問題は発生しないからで、後者は、循環式浴槽が人工の構造物であり、そこに繁殖するレジオネラ菌数は自然界

では起き得ないレベルに達すると考えるからである。

さらに

3. 循環式浴槽に生物浄化装置は不要であることを論理的に説明した
4. 培養法に替わる迅速検査法（遺伝子検出法）の開発への目途を立てたことが特筆される。

目下、循環式浴槽の管理・規制は既存の循環装置を前提として論議されている。しかし、現行の循環式浴槽システムは構造面から抜本的に改良しない限りレジオネラ汚染問題の解決は無いと確信している。ひるがえって、公衆浴場法が制定された当時に立ち返ると、浴水の使いまわし（連用）は許されておらず、その時点でレジオネラ問題が発生しなかったことは示唆に富む事実といえる。循環式浴槽は浴槽水を連続使用するもので、従来の浴槽システムとは根本的に異なる。従って、現行の水質基準を準用することの是非を検証する必要がある。

資源保護の立場から循環式浴槽を評価する向きもあるが、その以前にはほぼ無制限に入浴施設を作り、地下水をくみ上げることを資源保護の見地から論議すべきではないかと考える。昨今の入浴施設を衛生施設の枠を超えてレジャー施設として位置付けるのであれば、基準や規制、あるいは設置基準などはそれに即したものにしなければならないと考える。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

1. 遠藤卓郎、泉山信司、八木田健司. 生活用水のアメーバ汚染. 化学療法の領域.<特集：住環境と感染・アレルギー> 23(4), 65-68, 2007.
2. 河野喜美子, 岡田美香, 倉 文明, 前川純子, 渡辺治雄：循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 II. 診断検査法の比較、感染症誌 81(2):173-82、2007.
3. 倉 文明：微生物感染と NOX、生体防御医学事典（鈴木和男監修）、218-22、朝倉書店、東京、（印刷中）.
4. F. Kura, J. Amemura-Maekawa, K. Yagia, T. Endo, M. Ikeno, H. Tsuji, M. Taguchi, K. Kobayashi, E. Ishii and H. Watanabe. Outbreak of Legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. Epidemiol. Infect., 134, 385-391, 2006.
5. Kobayashi S, Kura F, Amemura-maekawa J, Chang B, Yamamoto N, Watanabe H: Locus on chromosome 13 in mice involved in clearance of *Legionella pneumophila* from the lungs. p.310-312. In Cianciotto NP et al. (ed.) *Legionella* :State of the Art 30 Years after Its Recognition, ASM Press, Washington, D. C., 2006.
6. Kura F, Amemura-Maekawa J, Yagita K, Endo T, Ikeno M, Tsuji H, Taguchi M, Kobayashi K, Ishii E, Watanabe H: Outbreak of legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. Epidemiol Infect 134:385-91, 2006.
7. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H: Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis and sequence-based typing (SBT) of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from Japan. p.159-162. In Cianciotto NP et al. (ed.) *Legionella* :State of the Art 30 Years after Its Recognition, ASM Press, Washington, D. C., 2006. ASM Press, Washington, D.C.
8. Ohata, K., K. Sugiyama, M. Suzuki, R. Shimogawara, S. Izumiyama, K. Yagita, T. Endo : Growth of *Legionella* in Nonsterilized, Naturally Contaminated Bathing Water in a System that Circulates the Water. IN *Legionella*: State of the Art 30 Years after Its Recognition. Eds. Nicholas P. Cianciotto et al., 2006. ASM Press, Washington, D.C.
9. K. Sugiyama, K. Ohata, M. Suzuki, R. Shimogawara, S. Izumiyama, K. Yagita, T. Endo : Inhibition of *Legionella* Growth in Circulating Bathing Water by Filter Refreshment Method Using High Concentration Chlorine. IN *Legionella*: State of the Art 30 Years after Its Recognition. Eds. Nicholas P. Cianciotto et al., 2006. ASM Press, Washington, D.C.

10. 遠藤卓郎. 提言—新寄生虫事情— 食品衛生研究. 56(6), 5, 2006.
11. 倉 文明、登坂直規、渡辺治雄：日本と世界のレジオネラ感染症情報、わが国の感染症法に基づいた届け出の現状、レジオネラ感染症ハンドブック（斉藤 厚編）、254-66、日本医事新報社、東京、2006.
12. Yosaburo Oikawa, Kazuko Kitagawa, Kenji Yagita, Takuro Endo, Ichiro Shma and Teruaki Ikeda. Drug Susceptibility of *Acanthamoeba* Isolated from 13 Japanese Patients with *Acanthamoeba* Keratitis. J. Kanazawa Med. Univ., 30(2), 67-70, 2005.
13. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. レジオネラ症 Update —宿主アメーバからみたレジオネラの水系汚染対策. 臨床と微生物 32(4), 383-388, 2005.
14. 岡田美香、河野喜美子、倉 文明、前川純子、渡辺治雄、八木田健司、遠藤卓郎、鈴木 泉. 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例. 1. 発症状況と環境調査 感染症学雑誌 79(6), 365-374, 2005.
15. Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N, Watanabe H: Identification of a novel adhesion molecule involved in virulence of *Legionella pneumophila*. Infect Immun 73: 4272-4280, 2005.
16. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, and Watanabe H: *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan from a distinct genetic cluster. Microbiol Immunol 49:1027-1033, 2005.
17. 遠藤卓郎、泉山信司. 「病原微生物対策への理解に向けて」 Safe Drinking-Water:for the Control of Microbial Hazards. 用水と廃水 46(7), 43-49, 2004.
18. 倉 文明：今ふえているレジオネラ症—その正体と予防対策，食と健康，48（7）：54-63，2004.
19. 倉 文明、前川純子、渡辺治雄：レジオネラ症、感染症の事典（国立感染症研究所学友会編）、265-6，朝倉書店、東京、2004.
20. 倉 文明、常 彬、前川純子(アイウエオ順)：レジオネラ、図説 呼吸器系細菌感染症：疫学、診断、治療（荒川宜親、渡辺治雄監修，佐々木次雄編集）、105-22，じほう、東京、2006.
21. Amemura-Maekawa J, Hayakawa Y, Sugie H, Moribayashi A, Kura F, Chang B, Wada A, Watanabe H: Legiolulin, a new isocoumarin compound responsible for blue-white autofluorescence in *Legionella (Fluoribacter) dumoffii* under long-wave length UV light, Biochem Biophys Res Commun 323 (3):954-959, 2004.
22. Chang B, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kawamura I, Watanabe H: Expression of IL-6 and TNF- α in human alveolar epithelial cells is induced by invading, but not by adhering, *Legionella pneumophila*. Microb Pathog 37: 295-302, 2004.

学会発表

1. 高橋淳子、久保田佳子、小島幸一、栗原綱義、渡辺実、青木信道、大沢高温、菅原英治、田幡憲一、佐久間豊夫、松本秀章、矢根五三美、佐藤望、田中(相原)真紀、香川(田中)聡子、神野透人、高鳥浩介各種浴場施設内における消毒副生成物の曝露評価。第34回建築物環境衛生管理全国大会(東京)、平成19年1月24・25日
2. 高橋淳子、村山志帆、宇津木祥子、小島幸一、栗原綱義、渡辺実、青木信道、大沢高温、菅原英治、田幡憲一、佐久間豊夫、松本秀章、矢根五三美、鈴木茂雄、神野透人、高鳥浩介。浴室内における消毒副生成物の曝露評価—浴槽水および浴室空気中における消毒副生成物の消長について—。第33回建築物環境衛生管理全国大会(東京)、平成18年1月19・20日
3. 倉 文明：レジオネラ感染症の現状と展望、特別講演、第18回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会、2006年2月、長野。
4. 高橋淳子、宇津木祥子、小島幸一、神野透人、高鳥浩介、遠藤卓郎。公衆浴場内における消毒副生成物の曝露評価。日本防菌防黴学会第33回年次大会(東京)平成18年5月30・31日
5. Kawano K, Okada M, Kura F, Amemura-Maekawa J, Watanabe H: The largest outbreak of legionellosis in Japan associated with spa baths: Diagnostic tests. 21st Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Lisbon, Portugal. May 2006.
6. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Watanabe H: Typing of *Legionella pneumophila* isolates in Japan by *flaA* gene. 21st Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Lisbon, Portugal. May 2006.
7. 河野仁志、松竹眞、大木誠、杉山寛治、大畑克彦、鈴木光彰。熱回収型高温加熱殺菌システムにおけるレジオネラ属菌対策に関する研究。空気調和・衛生工学会大会学術講演論文集。1549-1552, 2005.
8. 前川純子、倉 文明、常 彬、渡辺治雄： *Legionella pneumophila* 血清群1の sequence-based typing (SBT), 第78回日本細菌学会総会, 2005年4月, 東京。
9. Kura F, Kobayashi S, Amemura-Maekawa J, Aratani Y, Suzuki K, Watanabe H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Legionella pneumophila*. 6th International Conference on Legionella. October 2005, Chicago, USA.
10. K. Ohata, K. Sugiyama, M. Suzuki, R. Shimogawara, S. Izumiya, K. Yagita, T. Endo : Growth of *Legionella* in Non-sterilized, Naturally Contaminated Bath Water in a Facility Which Mechanically Circulates and Purifies the Water. 6th

- International Conference on Legionella. October 2005, Chicago, USA.
11. K. Sugiyama, K. Ohata, M. Suzuki, R. Shimogawara, S. Izumiyama, K. Yagita, T. Endo : Inhibition of *Legionella* Growth in Circulating Bathing Water by Filter Refreshment Method Using High Concentration Chlorine. 6th International Conference on Legionella. October 2005, Chicago, USA.
12. 小林静史、倉 文明、前川純子、高橋 朋子、渡辺治雄: *Legionella pneumophila* 感染における Lgn1 遺伝子の機能についてコンジェニックマウスを用いた解析, 第 77 回日本細菌学会総会, 2004 年 4 月, 大阪。
13. 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. 防菌防黴誌、32、2004

著者氏名	タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社	出版地	出版年	総ページ(ページ)
遠藤卓郎	154原虫・寄生虫 154.1種類と性状	日本水環境学会	水環境ハンドブック	朝倉書店	東京	2006	736 (453-457)
遠藤卓郎 黒木俊郎	6. 生物的因子 と健康	大沢基保 内海英雄	環境衛生科学	南江堂	東京	2006	439 (159-184)
遠藤卓郎 泉山信司 黒木俊郎	2 章原虫 3 章細菌 緊急時の 対応	金子美光	水道の病原微生物対策	丸善 (株)	東京	2006	255 (9-69) (158-162) (239-248)
T. Endo & Y. Morishima	18 :Major helminth soonoses in water	WHO	Waterborne Zoonoses	IWA Publishing	London	2004	506 (291-304)
遠藤卓郎 八木田健司	5. 寄生虫 1.総論 2.原虫類	監修 厚生労働 省	食品衛生指針 -微生物編 2004	日本食品 衛生協会	東京	2004	683 (518-534)

G 知的財産権の取得状況

なし

II. 資 料 編

循環式浴槽におけるバイオフィーム形成とその対策

分担研究者	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
	泉山 信司	国立感染症研究所
	八木田健司	国立感染症研究所
研究協力者	大畑 克彦	静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨

循環ろ過式モデル浴槽を用いて、自然汚染、無殺菌状況下で浴槽水を循環させ、循環浴槽系内のろ過材、配管、集毛器、パッキンにおけるレジオネラ属菌等によるバイオフィームの形成を拭取り培養や走査型電子顕微鏡観察、蛍光標識 DNA プローブ法で明らかにした。

さらに、各部位におけるバイオフィーム形成の抑制と除去方法を検討し、それらのバイオフィーム防止対策を示した。特に、ろ過器におけるフィルターリフレッシュ法、集毛器の毎日の洗浄・消毒、および定期的な配管洗浄がバイオフィーム対策として有効である

A. 研究目的

バイオフィーム（生物膜）は固体表面に付着した微生物とその菌体外生産物が集積した構造体である。人工水環境においてレジオネラ属菌はバイオフィームを形成することが知られており、バイオフィームによる菌汚染の継続やバイオフィームの殺菌・除去の困難性が問題となっている。

循環式浴槽におけるレジオネラ症の発生防止対策として、浴槽水におけるレジオネラ属菌の殺菌と並行して、浴槽設備内でのバイオフィームの形成抑制・除去が重要であるが、循環浴槽系内におけるバイオフィーム形成の実態については充分解明されていない。そこで、循環ろ過式モデル浴槽を用いて、循環浴槽系内におけるレジオネラ属菌を含むバイオフィームの形成状況と形成箇所の特定期および、それらの部位におけるバイオフィーム形成の抑制、除去方法について検討した。

B. 方法

1. ろ過式モデル浴槽における自然汚染、無殺菌増殖時のバイオフィーム形成箇所

循環式モデル浴槽（入浴による有機物の蓄積が可能で、現場施設と同様な機器を備えた循環ろ過式浴槽装置）を使用し、次亜塩素酸ナトリウム溶液による殺菌管理下、入浴により皮脂や垢等の有機物を蓄積させた後、塩素の注入を停止し、残留塩素を消失させた。その後、入浴や窓の開放により自然汚染を促し、以後、入浴なしの無殺菌状況下で循環させ、浴槽水、ろ過器内水、および装置内のレジオネラ属菌やアメーバの汚染菌量を調べた。

2. 電子顕微鏡と蛍光標識 DNA プローブ法によるバイオフィームの観察

無殺菌状況下で循環後、採取したろ過材、VP（塩化ビニル）配管テストピース、EPDM（エチレン・プロピレンゴム共重合体）ゴムパッキンを、常法に従って、固定、脱水、乾燥、金蒸着後、走査型電子顕微鏡（JEOL JSM-T100）で観察した。さらに、EPDM ゴムパッキンのバイオフィームの一部を用いて、蛍光標識 DNA プローブ法（VIT-*Legionella*; vermicon 社）により *Legionella pneumophila* の同定を試みた。

3. 電子顕微鏡およびマイクロスコープによる EPDM およびテフロンパッキンの表面構造の観察

モデル浴槽で使用した EPDM およびテフロンパッキンの表面を清浄にした後、乾燥させ、

金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡で観察した。

4. 循環浴槽系内におけるバイオフィーム形成の抑制と除去方法の検討

モデル浴槽において、循環浴槽系内におけるバイオフィーム形成の抑制と除去方法を検討した。

C. 結果および考察

1. 循環ろ過式モデル浴槽における自然汚染、無殺菌増殖時のバイオフィーム形成箇所

モデル浴槽において、無殺菌状態の循環運転時に、レジオネラ属菌の自然汚染と、爆発的な増殖(殺菌停止後、3日目を以降にアメーバとともに増殖、最高菌数 $10^5 \sim 10^6$ CFU/100ml)が確認できた(図1)。循環浴槽水中では、まず蓄積されたヒトの有機物等を栄養源とする細菌の増殖が起き、その後、それらの細菌をエサとするアメーバの急激な繁殖があり、ほぼ同時期に、アメーバ内増殖性のあるレジオネラの爆発的な増加が認められた。浴槽水中でのレジオネラ増殖にアメーバが深くかかわっていることが推察された。

装置内のレジオネラ汚染箇所はろ過器内ろ過材、集毛器、配管、パッキンなど多岐にみられた(図2)。特に、循環装置内で最大の表面積を占めるろ過材の表面は、レジオネラやアメーバ等の微生物叢(バイオフィーム)の最大の貯蔵庫になっており、ろ過材の殺菌が不十分であれば、換水してもろ過材が浴槽水の新たな汚染源になり、浴槽水のレジオネラ汚染が継続することが明らかとなった。

2. 走査型電子顕微鏡と蛍光標識 DNA プローブ法によるバイオフィームの観察

無殺菌下で3週間循環させた後に採取したろ過材には、著しいレジオネラ属菌汚染(ろ過材1g当り 2.8×10^6 CFU)が認められ、走査型電子顕微鏡で多量のかん菌と菌体外生産物が観察された(図3)。VP配管テストピースでは、3日後にかん菌の散在がみられ、6日後では長かん菌と短かん菌の集積像(レジオネラ属菌数: 1.6×10^4 CFU/綿棒拭取り)が観察された(図4)。EPDMゴムパッキンでは、繊維状に伸長した菌体が絡み合っている像(レジオネラ属菌数: 5×10^5 CFU/綿棒拭取り)が観察された(図5)。なお、蛍光標識 DNA プローブ法により、この繊維状の菌体は *Legionella pneumophila* の同定された(図6)。

モデル浴槽での自然汚染、無殺菌増殖試験から、レジオネラ属菌は、浴槽水やろ過器内水のアメーバ内で増殖後、浴槽水を介して浴槽系全体に拡散し、ろ過材や配管などの表面に付着しバイオフィーム(生物膜)を形成していることが示唆された。

3. 走査型電子顕微鏡およびマイクロ스코ープによる EPDM およびテフロンパッキンの表面構造の観察

EPDMパッキンの接液部表面には、塩素剤等による劣化に起因すると思われる微小な穴が観察された(図7、8)。そのためバイオフィームが定着しやすく、除去しにくくなっていることが示唆された。一方、耐薬品性、撥水性に優れたテフロンパッキンの接液部表面は平滑であり、バイオフィームが定着しにくく、除去されやすいことが推察された。

4. 循環浴槽系内におけるバイオフィーム形成の抑制と除去方法の検討

我々は、モデル浴槽での塩素管理下の入浴実験から、浴槽水への塩素注入は殺菌法としては有効であるが、入浴に伴う有機物等の持ち込みの影響で遊離残留塩素濃度の維持管理が容易でないこと(特にろ過器前に塩素を注入した時)、さらに、残留塩素濃度が0.5 ppm程度では、ろ過材、パッキン等ですでに形成されてしまったバイオフィーム中のレジオネラ殺菌が困難であることを確認した。

そこで、循環浴槽水のレジオネラ対策として、浴槽水への塩素注入法と併用して、ろ過器対策やレジオネラ増殖抑制につながるアメーバ対策を考慮した新たな衛生管理法が必要と考えた。そのひとつが、毎日、濾過器内を 5~10 ppm 塩素により、5 分間以上逆洗浄する方法（フィルター・リフレッシュ法と呼ぶ、論文発表 3）の文献参照）であり、レジオネラ（図 9）やその増殖宿主であるアメーバ（図 10）の殺菌効果が高く、毎日繰り返すことでレジオネラ、アメーバの増殖を抑制できることがわかった（図 11）。フィルター・リフレッシュ法と浴槽水への塩素注入法と併用することで、二重の安全・防御対策（Multi-Barrier System）となり、より安全な循環浴槽水の提供が可能になる。

また、レジオネラが自然増殖したモデル浴槽内を各種薬剤で 2 時間洗浄した後の、部位別の洗浄殺菌効果を比較した（表 1）。ろ過材、配管はいずれの薬剤でもレジオネラの殺菌・除去が可能であった。しかし、集毛器網のレジオネラの殺菌は一部の薬剤では不完全であった。配管接合部の水漏れを防ぐために用いられるゴムパッキンはバイオフィルムの付着が著しく、一旦形成されたバイオフィルム中のレジオネラの殺菌は検討したどの薬剤でも困難であることがわかった。

これらの解決策として、集毛器網は毎日タワシで物理的に洗浄した後、消毒用エタノール噴霧で殺菌する方法が、またゴムパッキンはバイオフィルム付着の少ない、殺菌・洗浄が可能なテフロン加工パッキンに交換することが強く薦められる。

D. 結論

循環ろ過式モデル浴槽を用いて、自然汚染、無殺菌状況下で浴槽水を循環させ、循環浴槽系内のろ過材、配管、集毛器、パッキンにおけるレジオネラ属菌等によるバイオフィルムの形成を拭取り培養や走査型電子顕微鏡観察、蛍光標識 DNA プローブ法で明らかにした。

さらに、各部位におけるバイオフィルム形成の抑制と除去方法を検討し、それらのバイオフィルム防止対策を示した。特に、ろ過器におけるフィルターリフレッシュ法、集毛器の毎日洗浄・消毒、および定期的な配管洗浄がバイオフィルム対策として有効である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 大畑克彦、鈴木光彰、江塚安伸、曾布川尚民、杉山寛治（2004）： 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. 防菌防黴誌、32、(12)、p. 593~600

2) K. Ohata, K. Sugiyama, M. Suzuki, R. Shimogawara, S. Izumiyama, K. Yagita, T. Endo (2006) : Growth of *Legionella* in Non-sterilized, Naturally Contaminated Bath Water in a Facility Which Mechanically Circulates and Purifies the Water. *Legionella* : State of the Art 30 Years after Its Recognition. P. 431-435

3) K. Sugiyama, K. Ohata, M. Suzuki, R. Shimogawara, S. Izumiyama, K. Yagita, T. Endo (2006) : Inhibition of *Legionella* Growth in Circulating Bathing Water by Filter Refreshment Method Using High Concentration Chlorine. *Legionella* : State of the Art 30 Years after Its Recognition. p. 497-500.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

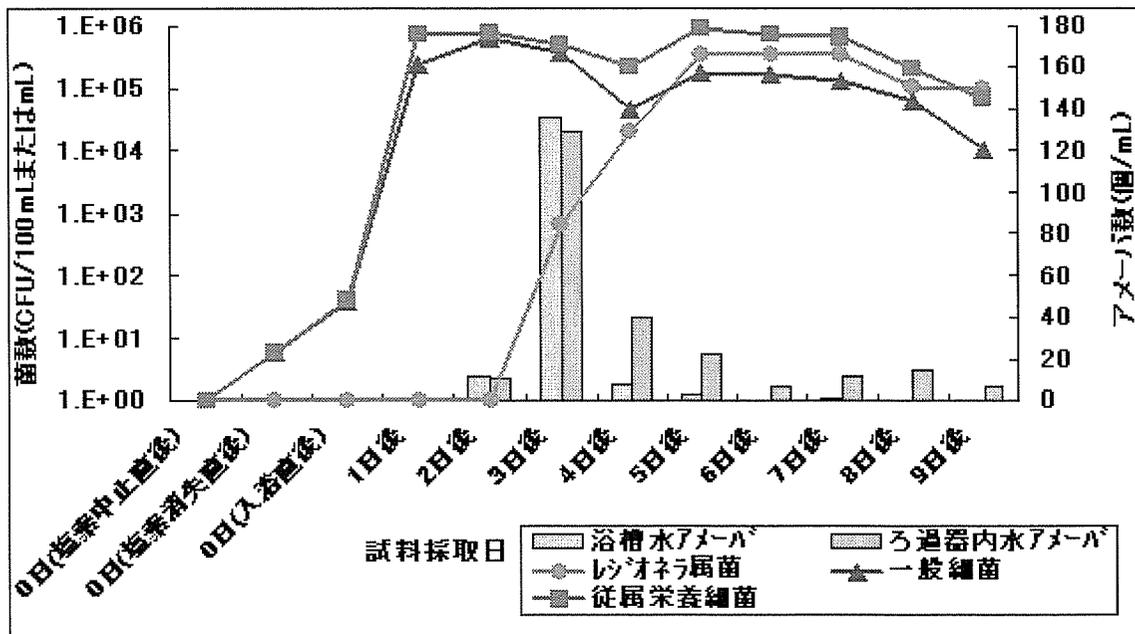
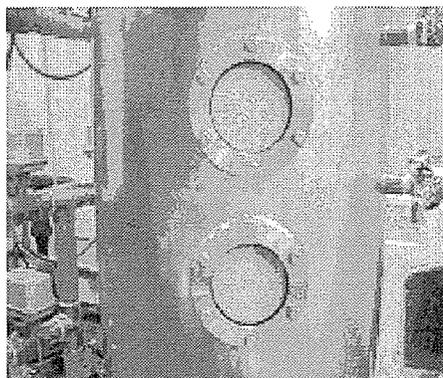
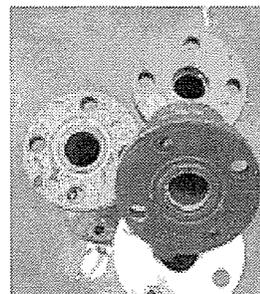


図1. 自然汚染による循環浴槽水中のレジオネラ属菌およびアメーバ等の経日変化



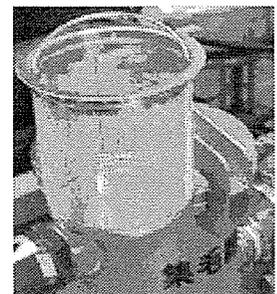
ろ過装置内のろ過材

レジオネラ(L)菌数: $10^5 \sim 10^7$ CFU/濾過材 1g
 アメーバ数: 10^3 PFU/ろ過材 1g



配管、パッキン

拭き取りL菌数: $10^3 \sim 10^6$ CFU/綿棒
 アメーバ数: 10^3 PFU/綿棒



ヘアキャッチャー

拭き取りL菌数: $10^4 \sim 10^5$ CFU/綿棒
 アメーバ数: 10^2 PFU/綿棒

図2. 循環式モデル浴槽における汚染箇所

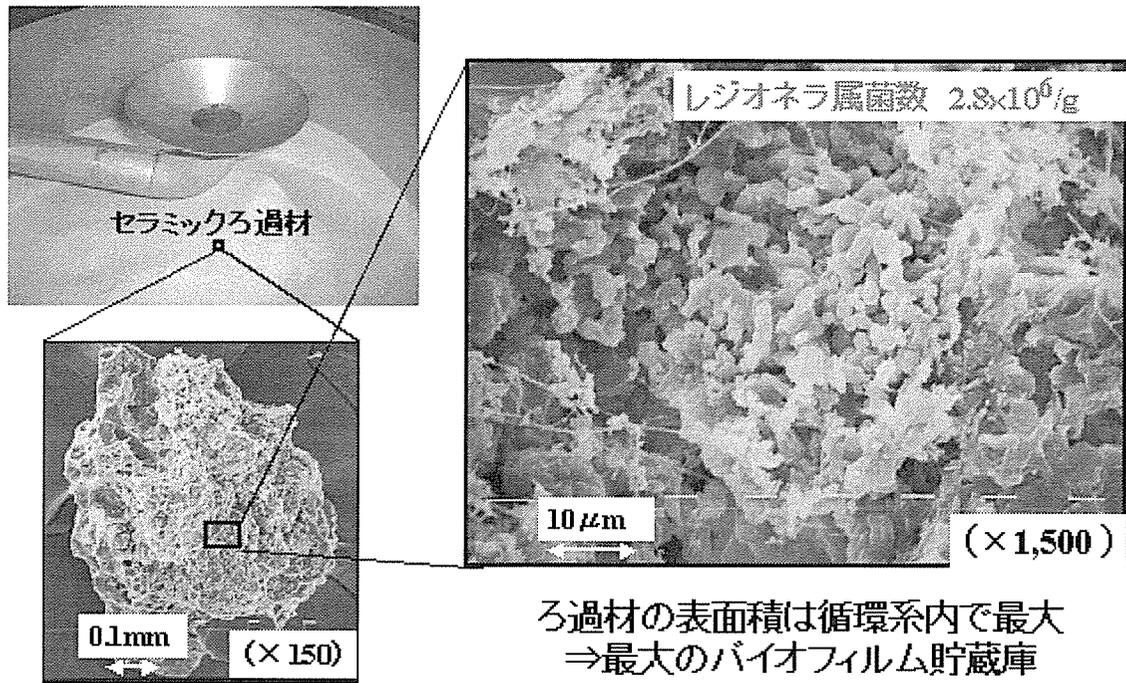


図3. ろ過器内ろ過材のバイオフィーム

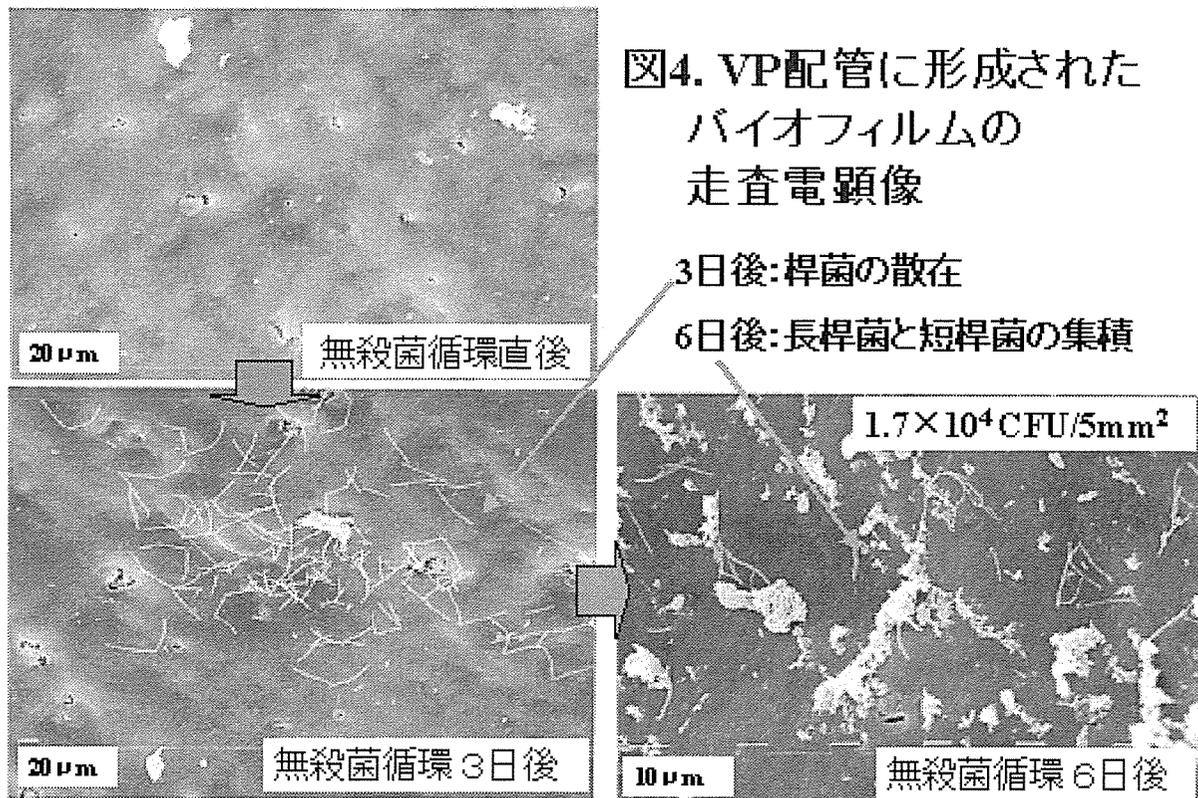


図4. VP配管に形成されたバイオフィームの走査電顕像

3日後:桿菌の散在

6日後:長桿菌と短桿菌の集積

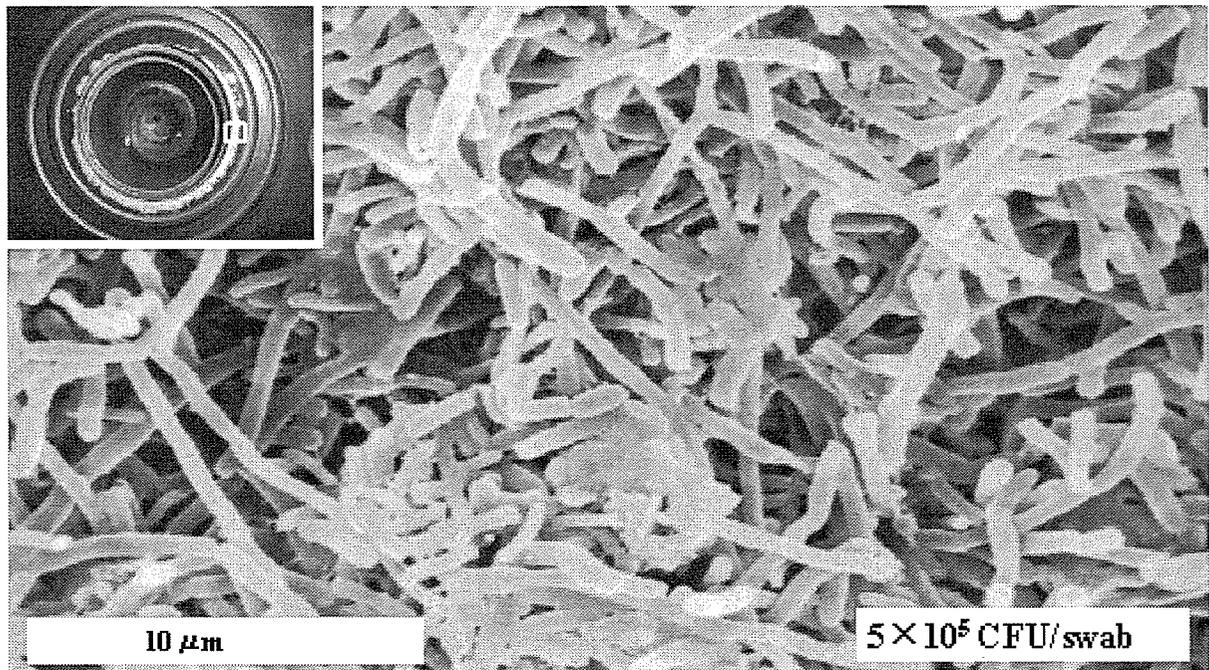


図5. EPDMパッキンに形成されたバイオフィルムの走査電顕像(無殺菌循環 18日後)

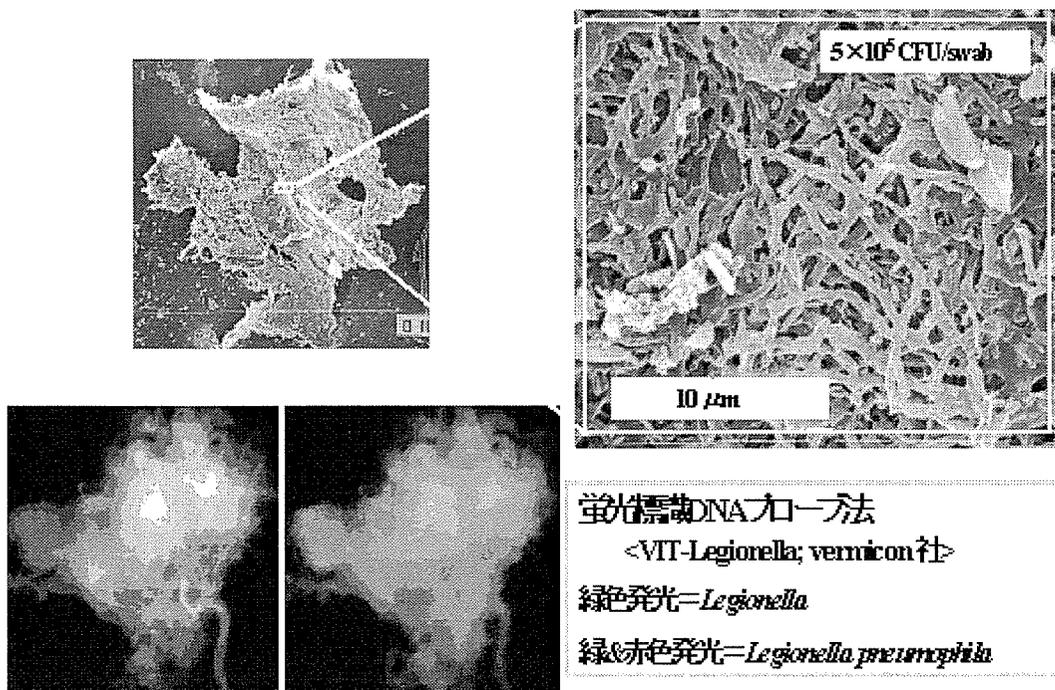
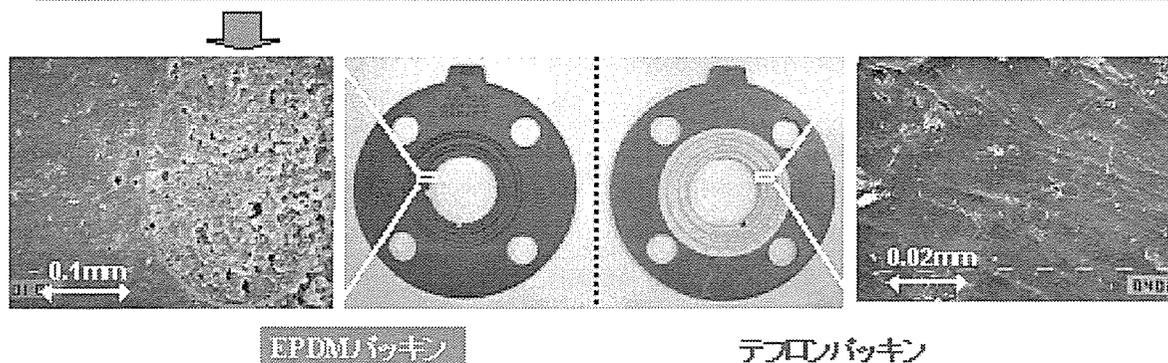


図6. EPDMパッキン上バイオフィルム中の *Legionella pneumophila* の同定

塩素剤を始めとした洗浄薬剤により表面が劣化し微少な穴を形成。そのためバイオフィルムが定着しやすく、且つ、除去しにくいものと考えられる。



対策として、耐薬品性があり撥水・撥油性が高いテフロンパッキンに交換することにより、バイオフィルムが定着しにくく、且つ、除去しやすくなる。

図7. EPDMパッキンは テフロンパッキンに交換する

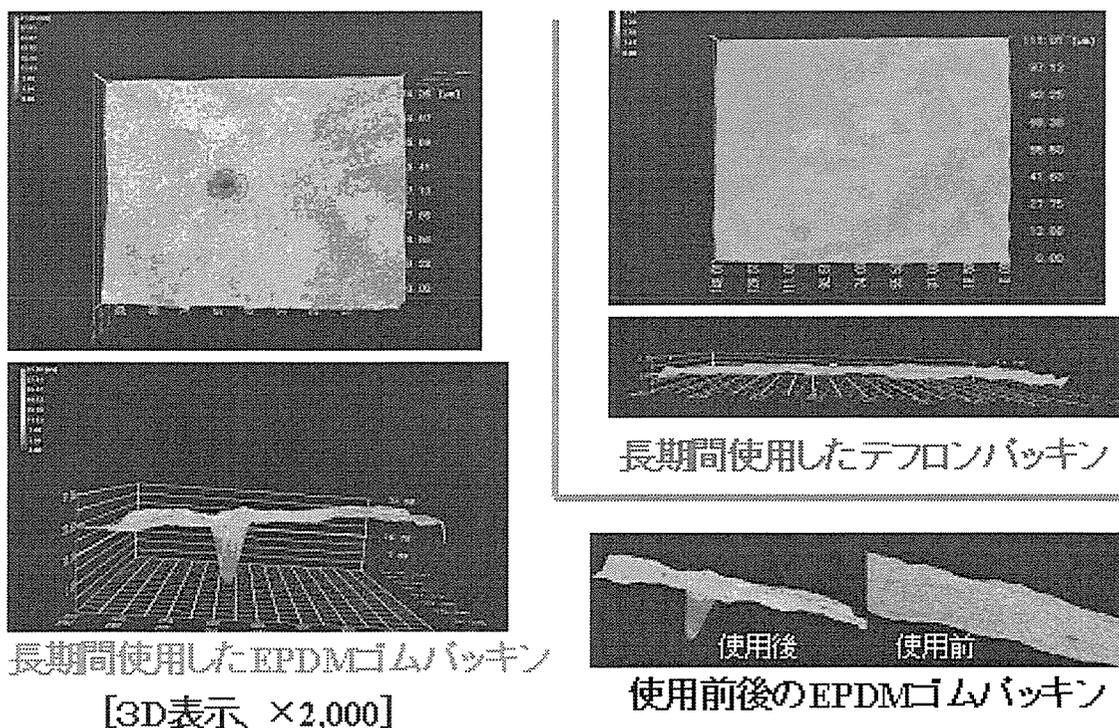
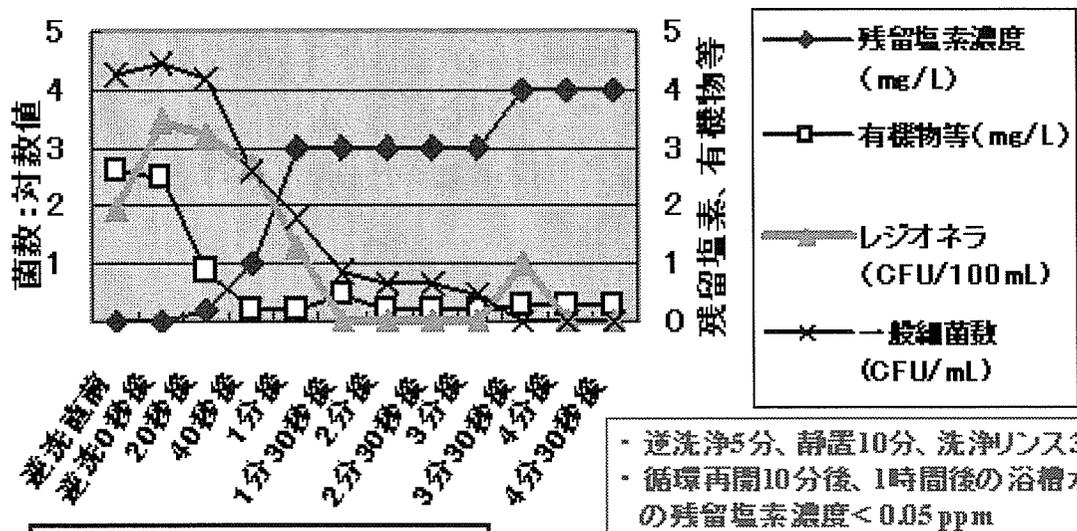


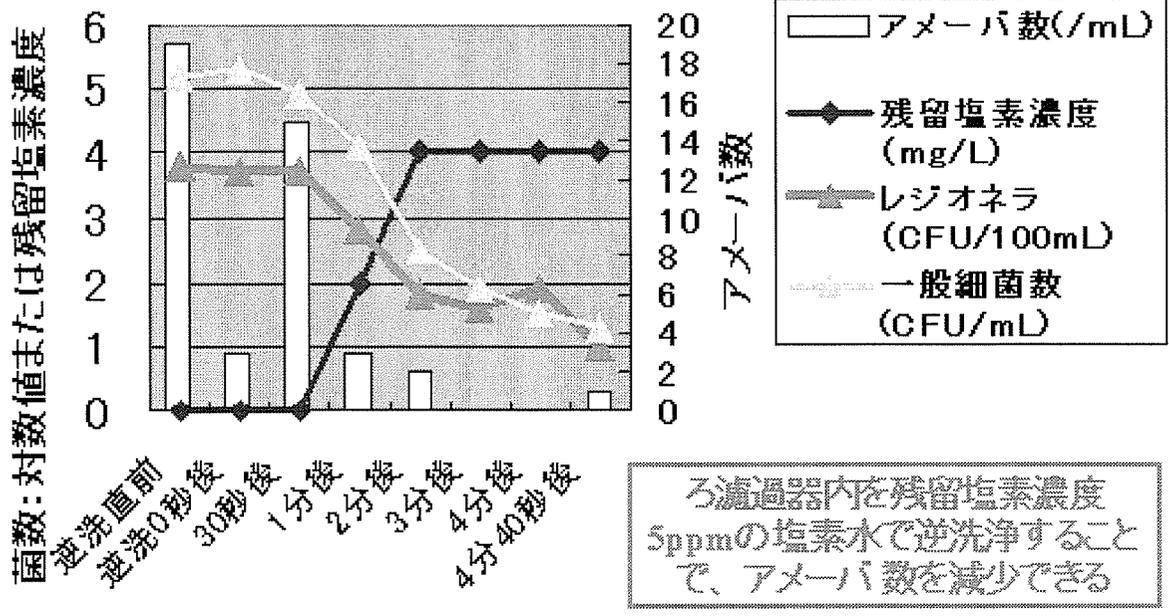
図8. マイクロスコープによるパッキン表面の比較



ろ過材のレジオネラ菌数:
逆洗浄前 $6.0 \times 10^2/g$
逆洗浄後 検出しない

ろ過器内を残留塩素濃度 5ppmの塩素水で逆洗浄することで、レジオネラ、一般細菌を殺菌し、有機物を減少させることができる

図9. フィルター・リフレッシュ法の効果(1)



ろ過器内を残留塩素濃度 5ppmの塩素水で逆洗浄することで、アメーバ数を減少させる

図10. フィルター・リフレッシュ法の効果(2)

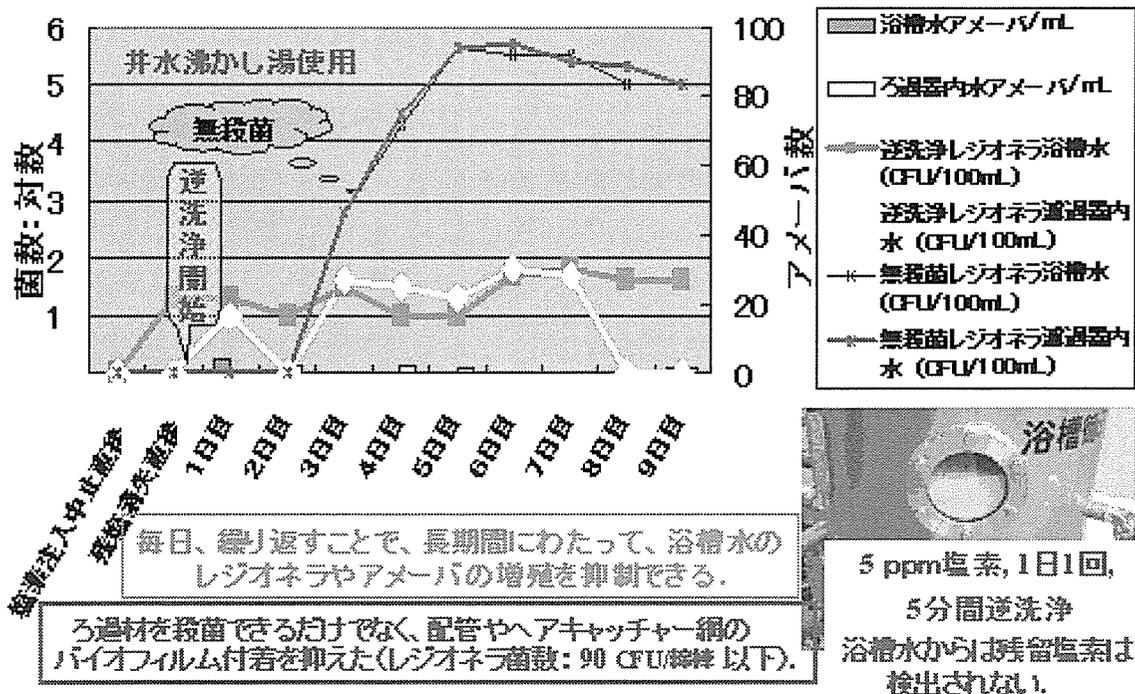


図11. フィルター・リフレッシュ法の長期的効果

表 1. 循環浴槽系内における各種洗浄・殺菌法の効果

	集毛器網	ゴムパッキング	テフロンパッキング	配管	濾過材
過酸化水素	◎	×	◎	◎	◎
高濃度塩素	△	×	◎	◎	◎
二酸化塩素	◎	×	◎	◎	◎
ブロム剤	◎	×	◎	◎	◎
電解次亜塩素酸	◎	×	◎	◎	◎
低腐食性イソシアヌル酸	◎	×	◎	◎	◎
オゾン水	◎	×	◎	◎	△
過炭酸 Na	◎	×	◎	◎	◎

◎ : 洗浄殺菌可能

△ : 不完全な場合あり

× : 洗浄・殺菌困難

集毛器網を、毎日、清掃・消毒する。
方法はタワシで物理的に洗浄後、
消毒用エタノール噴霧で殺菌する。

ゴムパッキングはいずれの薬剤も殺菌・洗浄できない。

循環浴槽水の微生物制御手法としての珪藻土ろ過の有用性

分担研究者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部
	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
研究協力者	大畑 克彦	静岡県環境衛生科学研究所
	小野 更生	日本フィルコン株式会社生産技術部
	山中 俊治	ミウラ化学装置株式会社技術部
	松本 英樹	ミウラ化学装置株式会社技術部

研究要旨： 循環浴槽水の微生物制御手法としての珪藻土ろ過の有用性について検討した。

まず、珪藻土を用いたケーキろ過の微粒子除去性能の事前評価実験を行ったところ、細菌の短径に相当する $0.5\mu\text{m}$ のポリスチレン粒子の最大 99.99% (4 log) 除去が達成され、浴槽水より直接的な細菌除去が可能であるとの結果が得られた。

つぎに、細菌の除去効果が期待できる珪藻土ろ過装置をモデル浴槽に組み入れて、循環浴槽水の微生物制御手法としての珪藻土ろ過の有用性を評価した。

殺菌なしの珪藻土ろ過単独運転（毎日、珪藻土張替え）時に、自然汚染で、増殖した従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数のろ過器通過前、後の菌数を比較し、ろ過による細菌除去効果を確認した。同時に、ろ過材や通過水側のろ布等におけるレジオネラ属菌数の増加も認めた。そこで、珪藻土ろ過（毎日、珪藻土張替え）に、適量の塩素注入を併用することで、浴槽水やろ過材におけるレジオネラ属菌やアメーバ等の微生物汚染制御が可能か検討した。その結果、珪藻土ろ過材の毎日交換、浴槽水への適量の塩素 ($0.2\sim 0.4\text{ mg/L}$) 注入と、週 1 回の配管洗浄によって、長期間 (21 日間) にわたって、浴槽水、珪藻土ろ過材をレジオネラ属菌、アメーバのない状態に保つことが可能であり、循環浴槽水の浄化・消毒方法として優れていることが確認された。

A. 研究目的

これまで、循環式浴槽におけるろ過機能として、浴槽水からの有機物の除去と濁質の除去が行われていた。しかしながら、*Legionella* 汚染防止の必要性から残留塩素管理が推奨されるにいたり、生物浄化による有機物の除去は理論的に不可能となり、ろ過の目的は濁度管理のみにしぼられる。ろ過器に蓄積した濁質等の有機物を放置すれば細菌、アメーバ、そして *Legionella* 属菌が増殖することから、ろ過層の管理は循環式浴槽における重要な管理点の 1 つである。ろ過層のろ材は主に砂が用いられるが、一度使用を開始すれば年余にわたって同じ砂を使いつづけることが想定される。蓄積した濁質を除去するには逆洗浄が行われるが、一部の微生物（バイオフィルム）が残ることは避けられず、高濃度塩素による殺菌あるいは常時塩素注入を行って浴槽水の安全を担保する必要がある。

一方、珪藻土ろ過は、水泳プール、食品、銭湯など広く使用されているものであるが、大型浴場施設にはほとんど導入実績はないようである。珪藻土ろ過では珪藻土を支持体の上に積層させてケーキ作り、水を圧送してろ過を行う。一般的な珪藻土の使用量は $0.2\sim 1.6\text{ kg/m}^2$ で、

この条件下でのケーキの厚さは数 mm である。ケーキの張替はほぼ自動的に行えるような構造がとられており、ケーキ交換時の洗浄にかかる負担は少ない。

ろ過材に蓄積された濁質を容易に廃棄でき、新しいろ過材に交換、清浄な状態にリセットすることが可能な珪藻土ろ過の導入により、浴槽水中の細菌数を大幅に低減させ、あわせて *Legionella* の発生をおさえることが可能と期待される。

まず、珪藻土を用いたケーキろ過の微粒子除去性能の事前評価試験では、珪藻土ろ過で、細菌の短径に相当する $0.5\mu\text{m}$ のポリスチレン粒子の除去率を求め、直接的な細菌除去が可能か検等した。

つぎに、珪藻土ろ過装置を組み入れたモデル浴槽を用いて、珪藻土ろ過材の毎日交換を伴った珪藻土ろ過単独運転実験と、珪藻土ろ過材の毎日交換と浴槽水への適量の塩素注入を併用した実験を行い、循環浴槽水の微生物制御手法としての珪藻土ろ過の有用性を評価した。

B. 方法

1. 珪藻土を用いたケーキろ過の微粒子除去性能の事前評価

ビーズは $0.5\mu\text{m}$ (Fluoresbrite、ポリスチレン製、Polyscience) を用いた。ビーズはあらかじめ蛍光染色されており、B 励起で緑の蛍光を発し、蛍光顕微鏡下での観察が容易である。

珪藻土ろ過試験装置は、直径 47mm の支持体 (ろ布) を有する小型試験装置 (ミウラ化学装置 (株)) を用いた (図 1)。10L の原水タンクにフィルターろ過した脱イオン水を入れ、ビーズを所定の濃度となるよう添加した。珪藻土は 100 番あるいは 200 番 (ラジオライト、昭和化学 (株)) を $0.5\text{gk}/\text{m}^2$ ないし $1.6\text{kg}/\text{m}^2$ の条件で使用し、支持体上に珪藻土を積層させてケーキを形成させた (いわゆるプリコート操作)。原水タンクより濃度計数用の試料 200ml を 2 本採取後、ろ過を開始した。ろ過水は 500ml のボトルに回収し、1.5L から 3L までの 3 本の試料より平均ビーズ濃度を求めた。流速は $10\text{m}/\text{h}$ 程度を目標に原水タンクの圧力を調整し、実際の流量、並びにろ過圧力を確認した。

試料水は 150ml を直径 23mm 孔径 $0.22\mu\text{m}$ のポリカーボネートフィルター (Millipore) でろ過し、蛍光顕微鏡下でビーズ数を計数した。視野あたりのビーズ数と予め求めた視野面積、あるいは全視野のビーズ数より、試料水中のビーズ濃度を算出した。

2. 珪藻土ろ過単独運転実験

循環水量 $4\text{m}^3/\text{h}$ のモデル浴槽に、珪藻土ろ過器 (珪藻土内面プレコート方式、日本フィルコン社製、表面積 0.15m^2 のろ過筒のろ布 (テフロン製) 5 本使用、図 2) を設置した。珪藻土は孔径が小さい 100 番 (ラジオライト、昭和化学 (株)) をろ過面積あたりの珪藻土量として $1.6\text{kg}/\text{m}^3$ (ろ圧 0.2Mpa) の条件で使用した。珪藻土は 1 日、1 回定時に、空気吸入攪拌洗浄方式で排水し、珪藻土に捕捉された細菌や汚れを除去した後に、新たな珪藻土をろ筒ろ布内側にプリコートさせた。

最初に、浴槽水への次亜塩素素注入 (自動測定、自動注入で、遊離残留塩素濃度 $0.2\sim 0.4\text{mg}/\text{L}$ を維持) による塩素管理下で 5 日間、21 名が入浴し、浴槽水への有機物蓄積を行った。その後、塩素注入を停止し、一切の殺菌剤等の注入なしで、珪藻土ろ過の単独運転による循環ろ過を 9 日間実施した。毎日、珪藻土張替直前の浴槽水、ろ過器内水、およびろ過器通過水と、ろ過材張替時の古い珪藻土をサンプリングし、浴槽水等は、レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、

アメーバ数、過マンガン酸カリウム消費量、TOCなどを検査した。また、1日間使用した珪藻土ろ過材は、レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、アメーバ数を検査した。

3. 珪藻土ろ過と塩素管理の併用実験

モデル浴槽に設置された珪藻土ろ過器に珪藻土 200 番（ラジオライト、昭和化学（株）、ろ過面積あたりの珪藻土量：1.6kg/m³）を、1日、1回定時に張替え、珪藻土に捕捉された細菌や汚れを除去した。また、浴槽水への次亜塩素酸注入（自動測定、自動注入で、遊離残留塩素濃度 0.2~0.4 mg/L を維持）による殺菌を併用した。さらに、浴槽、配管、ろ過タンク内部のバイオフィーム除去のための週 1 回の定期的な洗浄、消毒を想定して、8 日目と 15 日目に浴槽水へ次亜塩素酸ナトリウムを添加し配管洗浄（遊離残留塩素濃度 10 mg/L、2 時間循環）を実施した。その後、排水と浴槽水の全換水を行った。以上の条件下で 3 週間にわたり入浴を実施する実験を 2 回行った（入浴者数 1 回目：計 45 名、2 回目：計 43 名）。

実験開始 1 日目、4 日目、8 日目、11 日目、15 日目、18 日目、21 日目の珪藻土張替直前の浴槽水と、ろ過材張替時の古い珪藻土をサンプリングした。浴槽水は、レジオネラ属菌数（培養法およびリアルタイム PCR によるレジオネラ遺伝子検出：*mip*、属特異的 5S r RNA 遺伝子の両者）、従属栄養細菌数、アメーバ数、過マンガン酸カリウム消費量、TOCなどを検査した。また、1日間使用した珪藻土ろ過材は、レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数、アメーバ数を検査した。

C. 結果および考察

1. 珪藻土を用いたケーキろ過の微粒子除去性能の事前評価

ろ過前並びにろ過後のビーズ濃度を一覧に示した（表 1）。

珪藻土は加圧ろ過であることから圧力でサイズが変化する恐れを考慮し、微生物より小さな粒子である 0.5μm のビーズを細菌類に見立てて除去性能の評価を行った。珪藻土の 100 番は 200 番よりも孔径が小さく、微細粒子の除去を目的とした製品として販売されている。評価の結果、0.5μm の非常に細かな粒子であっても 99.99% の非常に高い除去性能が得られた。しかしながらこの条件では送水圧力が高くなる傾向がみられた。

より粗い 200 番の珪藻土を使用した場合、珪藻土使用量を 1.6kg/m² に設定すると 0.5μm のビーズが 1 回のろ過で 99% 以上除去されることが示された。一方、ケーキを薄くして 0.5kg/m² とした場合には 74% の除去に留まった。その際、結果には示さないがろ圧の変動はほとんど認められなかった。得られた結果から珪藻土の量を 0.5~1.6kg/m² の間で、より適正な条件を設定すれば細菌類を直接除去できるものと判断された。

最新の知見によれば、浴槽水において半日程度の間で一般細菌数が 10~10⁶/ml に達することが示されている。仮に、20 分に 1 回分裂増殖する細菌が存在するとして、1 回のろ過で 99% の除去効果を有するろ過を 1 時間に 1 回行うと、理論上は除去が勝り、浴槽水中の総細菌類の除去が可能となる（単純計算では、1 時間で 1 の細菌が 8 に増える間に 99% 除去され、合で微生物が 0.08 に減少）。今後、実機による検討を予定している。

なおデータは示していないが、3μm のビーズを対象とした除去試験では、ラジオライト 200 を用いて 0.5~1.6kg/m² のケーキ層の条件でそれぞれ 1.4 及び 5.9log₁₀ 程度の除去が確認されており大きな粒径夾雑物の除去に関しては極めて良好な結果を得ている。一方、砂ろ過器の性

能試験の報告によると、ろ速 20~60m/h、ろ過砂粒径 0.6mm、ろ過層厚 300~600mm の実験条件で単回ろ過 (one pass) での濁度除去率 (濁度 7NTU の原水使用) は 40%未満にとどまることが示されている (文献)。

2. 珪藻土ろ過単独運転実験

9日間の珪藻土ろ過単独運転時の浴槽水、ろ過器内水、ろ過器通過水の従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数の推移を図3に示した。運転開始から6日間は、ろ過器内水と、ろ過器通過水の従属栄養細菌数には 1ml あたり 10^1 弱から 10^3 の減少がみられ、同じくレジオネラ属菌数にも 100ml あたり 10^1 から 10^3 の減少がみられ、珪藻土ろ過による細菌除去効果が確認された。浴槽水も、従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数ともに、ろ過器通過水とほぼ同様な菌数を示し、細菌除去効果が浴槽水にも及んでいることが示された。しかし、7日目以降のろ過器内水、ろ過器通過水、および浴槽水の従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数にはほとんど差がみられなくなった。

図4に珪藻土ろ過単独運転時のろ過材、ろ過器通過水側のろ布拭き取り、ろ過筒ゴムパッキン拭き取りの従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数を示した。珪藻土ろ材の従属栄養細菌数は1日後にはろ材 1g あたり 10^8 CFU に達し、レジオネラ属菌数も徐々に増加した。通過水側のろ布拭き取り検査で0日目、3日目はレジオネラ属菌は検出されなかったが、8日目には 25cm² の拭き取りで、ろ布から 3.8×10^3 CFU、ろ過筒ゴムパッキンから 2.1×10^5 CFU の高い菌数でレジオネラ属菌を検出し、長期間運転時の通過水側でのレジオネラ属菌の増殖が確認された。

また、ろ過筒内の圧力が珪藻土ろ材張替え時には、圧力限界上限値 (0.23Mpa) に近い数値に上昇しており、ろ過器内水でみられた従属栄養細菌等の増殖に伴う珪藻土の目詰まりが起きていることが推測された。

3. 珪藻土ろ過と塩素管理の併用実験

モデル浴槽を用いて、ろ過材の毎日交換と、浴槽水への適量の塩素注入の併用および、週1回の配管洗浄の条件下で、長期間 (21日間) にわたる入浴実験を2回行い、浴槽水と珪藻土ろ過材におけるレジオネラ属菌、従属栄養細菌、アメーバ汚染、有機物量などの推移を調べた。その結果、2回の実験とも、浴槽水、珪藻土ろ過材のいずれからもレジオネラ属菌は検出されず、レジオネラ属菌の増殖宿主であるアメーバの検出もなかった。図5に、2回目の結果を示した。また、浴槽水からはレジオネラ属菌に特異的な遺伝子 (*mip*、属特異的 5S rRNA 遺伝子) も検出されず、珪藻土ろ過装置を使用した本条件の衛生管理で、レジオネラの遺伝子レベルの汚染 (死菌も含めて) も防げることが示唆された。従属栄養細菌数は、浴槽水で 100 CFU/ml 以下、珪藻土ろ過材で 10^4 CFU/ろ材 1g 以下であった (図5)。浴槽水の水質分析では、2回の実験とも、7回すべての採水において、濁度は 0.1 度未満とその濁質除去効果が確認できた。

また、ろ過筒内の圧力は常時、ほぼ 0.18Mpa 前後を維持しており、塩素殺菌によってバイオフィームの生成が阻止され、ろ布の目詰まりが防止され、ろ過が順調に行われたと考えられた。

循環式浴槽のろ過装置として、珪藻土ろ過を使用し、次の①、②、③の衛生管理を実施することで、①ろ過材の毎日交換による濁質、捕捉微生物の一斉除去、②浴槽水への適量の塩素注入による浴槽水、ろ過材の塩素殺菌、③週1回の配管洗浄・換水による配管等循環系内のバイオフィーム除

去が期待でき、長期間にわたって、浴槽水、珪藻土ろ過材をレジオネラ属菌のない清浄な状態に保つことが可能であった。今後は、実際の浴槽施設で同様な評価を行い、浴槽水の新たな微生物制御手法として確立させていきたい。

D. 結論

循環式浴槽のろ過器は砂ろ過が行われているが、蓄積された濁質や微生物に異化された有機物等を砂から除去するのは困難である。これに対し、珪藻土を用いたケーキろ過ではケーキの廃棄を前提としており、ろ過捕捉物を一緒に廃棄することが出来る利点がある。

基礎実験で、細菌の除去効果が確認された珪藻土ろ過装置をモデル浴槽に組み入れて、循環浴槽水の微生物制御手法としての珪藻土ろ過の有用性を評価した結果、以下の結論を得た。

殺菌なしの珪藻土ろ過単独運転（毎日、珪藻土張替え）実験で、ろ過器通過前、後の従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数を比較し、珪藻土ろ過による 1~3 log の細菌除去効果を確認した。しかし、7 日目以降の長期にわたっては、ろ過材通過水側におけるバイオフィーム等の細菌の増殖の影響と思われる除去効果の低下がみられた。

珪藻土ろ過（毎日、珪藻土張替え）、適量の塩素注入、週 1 回の配管洗浄を併用することで、長期間（21 日間）にわたって、浴槽水、珪藻土ろ過材をレジオネラ属菌、アメーバのない状態に保つことが可能であった。本手法は、①珪藻土ろ過材による濁質・微生物の除去と系外への排出、②浴槽水、ろ過材の塩素殺菌、および③循環系内のバイオフィーム除去などの微生物制御法を効果的に組み合わせており、今後、循環浴槽水の浄化・消毒方法の優れた一手法となり得ると思われた。

E. 参考文献

1. 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 年度報告書（主任研究者 井上博雄）
2. レジオネラプロジェクト、温泉のレジオネラ除菌、モニタリングシステムの開発、静岡県環境衛生科学研究所研究主幹杉山寛治、平成 16 年度報告書
3. 厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）「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. 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